

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie / Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Gewinne und Verluste von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X
und deren klinische Relevanz
bei *TEL-AML1* positiven und negativen Erstrezidiven
der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Franziska Meyr

aus Eggenfelden

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger

2. Prof. Dr. med. U. Kontny

3. Priv.-Doz. Dr. med. Ph. le Coutre

Datum der Promotion: 04.02.2011

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	6
1.1 Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter.....	6
1.1.1 Einführung und Epidemiologie.....	6
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese von Leukämien.....	7
1.1.3 Diagnostik und Klassifikation der ALL.....	7
1.1.4 Chromosomale Veränderungen bei ALL.....	8
1.1.4.1 <i>TEL-AML1</i> -Fusion.....	9
1.1.4.2 Zusätzliche chromosomale Veränderungen bei <i>TEL-AML1</i> positiver ALL.....	11
1.2 ALL-Rezidive im Kindesalter.....	11
1.2.1 Epidemiologie und Risikostratifizierung.....	11
1.2.1.1 Minimal residual disease (MRD).....	13
1.2.2 Zusätzliche chromosomale Veränderungen beim ALL-Rezidiv.....	14
1.2.3 Rezidivtherapie.....	14
1.2.4 Glukokortikoide.....	16
1.2.4.1 Glukokortikoidrezeptor-Gen.....	17
1.2.4.2 Glukokortikoide in der ALL-Rezidivtherapie.....	18
1.3 Chromosomale Veränderungen der untersuchten Regionen bei ALL.....	19
1.3.1 Veränderungen von 5q31.3 bei ALL.....	19
1.3.2 Veränderungen von 5p15.33 bei ALL.....	20
1.3.3 Veränderungen von Chromosom X bei ALL.....	20
1.4 Hintergrund, Ziel und Fragestellungen dieser Arbeit.....	21
2. Patientenproben, Material und Methoden	22
2.1 Patientenproben.....	22
2.1.1 MRD-Risikogruppen.....	23
2.2 Ermittlung der Cut-off Werte durch gesunde Kontrollen.....	24
2.3 REH.....	24
2.4 Material.....	24
2.5 Methoden.....	27
2.5.1 Nick Translation.....	27
2.5.2 Gelelektrophorese.....	28
2.5.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FisH).....	29
2.5.3.1 Verwendete Sonden.....	31
2.5.3.1.1 5q31.3-Sonde und 5p15.33-Sonde.....	31

2.5.3.1.2	Zentromer-X-Sonde	31
2.5.3.2	Vorbehandlung der Blut- und Knochenmarkausstriche für die FisH	32
2.5.3.3	Denaturierung von Ziel- und Sonden-DNA.....	33
2.5.3.4	Gegenfärbung und Einbettung der Kerne	33
2.5.3.5	Verwendete Protokolle	34
2.5.3.5.1	Protokoll für die Vorbehandlung der Blut- und Knochenmarkausstriche	34
2.5.3.5.2	Protokoll für Nick Translation und FisH	34
2.5.3.6	Kontrolle der Hybridisierungsspezifität auf Metaphase-Chromosomen ..	36
2.6	Auswertung	37
2.6.1	Automatisierte Fluoreszenzmikroskopie	37
2.6.2	Weiterverarbeitung der Daten	40
2.6.3	Subpopulationsanalyse.....	40
2.7	Statistische Methodik	41
3.	Ergebnisse	42
3.1	Cut-off Werte.....	42
3.1.1	Korrektur des Cut-off Werts für Chromosom-X-Verlust	42
3.2	Interphase-FisH-Analyse des Patientenmaterials.....	44
3.2.1	Gewinne und Verluste der untersuchten Regionen.....	45
3.2.2	Vergleich zwischen FisH-Ergebnissen und DNA-Index.....	47
3.2.3	Ergebnisse der Subpopulationsanalyse.....	50
3.2.3.1	Subpopulationen mit Veränderungen von 5q31.3.....	50
3.2.3.2	Subpopulationen mit Veränderungen von 5p15.33.....	51
3.2.3.3	Subpopulationen mit Veränderungen von Chromosom X	51
3.2.3.4	Seltenere Subpopulationen.....	52
3.2.4	Ergebnisse der Interphase-FisH-Analyse von REH.....	53
3.3	Gegenüberstellung von FisH-Ergebnissen, Zytogenetikbefunden und aCGH-Ergebnissen	55
3.4	Verlaufsbeobachtung bei einer Patientin	56
3.5	Klinische Relevanz.....	56
3.5.1	Überprüfung des gewählten Patientenkollektivs auf Repräsentativität	56
3.5.2	Korrelation der FisH-Ergebnisse mit MRD-Daten.....	59
3.5.3	Vergleich verschiedener Gruppen innerhalb des Patientenkollektivs	61
3.5.3.1	TEL-AML1 positive und negative ALL	61
3.5.3.2	ALL mit und ohne 5q31.3-Verlust	61

3.5.3.3	ALL mit und ohne 5q31.3-Gewinn	63
3.5.3.4	ALL mit und ohne 5p15.33-Verlust	63
3.5.3.5	ALL mit und ohne 5p15.33-Gewinn	63
3.5.3.6	ALL mit und ohne Gewinn von Chromosom X	64
3.5.3.7	ALL mit Kombinationen mehrerer Veränderungen	64
4.	Diskussion	67
4.1	Interphase-FisH zur Detektion chromosomaler Aberrationen	67
4.2	Prävalenz und klinische Relevanz der untersuchten Aberrationen	68
4.2.1	Prävalenz der untersuchten Aberrationen bei <i>TEL-AML1</i> positiver ALL	68
4.2.2	Gewinne und Verluste von 5q31.3	70
4.2.2.1	Verluste von 5q31.3	70
4.2.2.1.1	Verluste von 5q31.3 bei hämatologischen Erkrankungen	70
4.2.2.1.2	Verluste von 5q31.3 bei anderen Malignomen	71
4.2.2.1.3	Größe der deletierten Bereiche in der Region 5q31.3	72
4.2.2.1.4	Konsequenzen der 5q31.3-Deletion	72
4.2.2.1.5	Weitere Mechanismen der Glukokortikoidresistenz	75
4.2.2.1.6	Ausblick: Ansätze zur Reversibilität der Glukokortikoid-Resistenz	76
4.2.2.2	Gewinne von 5q31.3	77
4.2.3	Gewinne und Verluste von 5p15.33	78
4.2.3.1	Verluste von 5p15.33	78
4.2.3.2	Gewinne von 5p15.33	79
4.2.4	Gewinne und Verluste von Chromosom X	80
4.2.4.1	Verluste von Chromosom X	80
4.2.4.2	Gewinne von Chromosom X	82
4.2.5	Kritische Anmerkungen	82
4.2.6	Beantwortung der gestellten Fragen	82
5.	Zusammenfassung	86
6.	Literatur	89
7.	Abbildungsverzeichnis	101
8.	Abkürzungsverzeichnis	102
9.	Lebenslauf	103
10.	Danksagung	104
11.	Erklärung	105

1. Einleitung

1.1 Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter

1.1.1 Einführung und Epidemiologie

Jährlich werden in Deutschland bei ungefähr 1800 Kindern unter 15 Jahren neu aufgetretene maligne Erkrankungen diagnostiziert. Leukämien machen mehr als ein Drittel der Fälle aus^{1, 2}. Sie entstehen durch klonale Proliferation unreifer Progenitorzellen im Knochenmark (KM) und werden je nach klinischem Verlauf in akute und chronische und nach Abstammung der Ursprungszelle in lymphatische und myeloische Leukämien eingeteilt.

Durch Expansion der afunktionalen Leukämiezellen (Blasten) im KM wird die normale Hämatopoese verdrängt. Die Patienten zeigen der KM-Insuffizienz entsprechende Symptome wie Anämie, Thrombozytopenie und Infektneigung³. Eine akute Leukämie verläuft unbehandelt letal.

Die häufigste Leukämieform im Kindesalter ist mit 80% die akute lymphoblastische Leukämie (ALL), deren Inzidenz in Deutschland bei 4/100.000 pro Jahr liegt². Das heißt, dass jährlich etwa 550 Kinder und Jugendliche neu erkranken. Mit 27% stellt die ALL die häufigste maligne Systemerkrankung bei Kindern und Jugendlichen dar² und erreicht ihren Prävalenzgipfel bei zwei- bis fünfjährigen Patienten⁴. Seltenerer Formen im Kindesalter sind die akute myeloische Leukämie (AML), die den Großteil der Leukämien im Erwachsenenalter einnimmt, und die chronische myeloische Leukämie (CML). Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) wird aufgrund ihrer Biologie zu den Non-Hodgkin-Lymphomen gerechnet und betrifft vor allem das höhere Lebensalter. Rudolf Virchow beschrieb 1845 im Rahmen einer Sektion eines an CML erkrankten Patienten erstmals eine durch die Leukozytose hervorgerufene weißliche Trübung des Blutes, die den Namen Leukämie („weißes Blut“) prägte.

Durch verbesserte Therapieprotokolle und intensive, risikoadaptierte Behandlung können mittlerweile zwar 75-80% der Kinder mit ALL geheilt werden, bei knapp einem Viertel der Patienten rezidiert die Erkrankung jedoch und/oder führt zum Tod. Die Raten des ereignisfreien Überlebens (*event-free survival*, EFS) sind in den letzten Jahren nicht wesentlich angestiegen, so dass eine weitere Optimierung der ALL-Therapie schwierig erscheint. Es ist anzunehmen, dass eine genauere molekulargenetische Charakterisierung der Leukämiezellen bei der Ersterkrankung und

beim Rezidiv hilft, die Ursachen der leukämischen Transformation von Zellen besser zu verstehen und dementsprechend die Therapie individuell anzupassen.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese von Leukämien

Die Ursachen der Entstehung von Leukämien sind nicht hinreichend geklärt aber vermutlich multifaktoriell bedingt. In wenigen Fällen (<5%) wird ein Zusammenhang mit angeborenen prädisponierenden Erkrankungen wie Trisomie 21, Bloom-Syndrom, Ataxia teleangiectasia, Li-Fraumeni-Syndrom, Fanconi-Anämie, Shwachman-Diamond-Syndrom oder dem Nijmegen-Breakage-Syndrom oder anderen Faktoren wie ionisierender Strahlung, chemischen Substanzen wie Benzol und Zytostatika sowie bestimmten Viren, z. B. HTLV-1 gesehen⁴. Ebenso wenig eindeutig identifiziert sind die genauen pathogenetischen Mechanismen der ALL-Entstehung. Retrospektive Untersuchungen von archiviertem Blut aus Guthrie-Karten auf Leukämie-spezifische Fusionsgene, die durch chromosomale Translokationen entstehen, oder Hyperdiploidie und Leukämiestudien bei monozygoten Zwillingen weisen auf einen pränatalen Ursprung einiger Leukämien hin^{5, 6}. So offenbarte das Screening von Proben aus neonatalem Nabelschnurblut bei 1% der Neugeborenen einen vermeintlich präleukämischen Klon, der das *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*-Fusionsgen trägt. Diese Zahl ist 100fach höher als die Prävalenz der durch dieses Fusionsgen definierten Leukämie in der Kindheit (1.1.4.1)⁷. Die niedrige Konkordanzrate von ca. 10% bei Zwillingen mit diesem Genotyp⁸, die unterschiedliche Latenzzeit bis zum Auftreten der Erkrankung sowie die variable Heilungschance der Patienten unterstützen die These, dass zusätzliche Faktoren für die leukämische Transformation notwendig sind.

1.1.3 Diagnostik und Klassifikation der ALL

Die Diagnose einer ALL wird in der Regel durch eine KM-Punktion bei einem Blastenanteil von >25% im Punktat oder Detektion von Blasten im peripheren Blut oder im Liquor cerebrospinalis gesichert. Mit zur klinischen Diagnostik gehört auch die Untersuchung mittels Röntgen und Sonographie zum Nachweis eventueller extramedullärer Herde.

Anhand verschiedener Parameter wird die ALL in weitere Subgruppen unterteilt: Die Analyse des Expressionsmusters bestimmter Proteine auf der Zelloberfläche und im Zytoplasma der entarteten Leukozytenvorstufen mithilfe markierter Antikörper ermöglicht die Immunphänotypisierung, also die Zuordnung zur B- oder T-Zellreihe. T-

Zell-Leukämien stellen mit ca. 13% der ALL im Kindesalter eine relativ kleine Gruppe dar⁹, wohingegen ungefähr 85% B-Vorläuferzell-ALL (BVZ-ALL) sind, die nach verschiedenen Differenzierungsstufen der Blasten in drei Gruppen unterteilt werden können (4% pro-B-, 62% common-, 18% prä-B-ALL)⁹. 1% der ALL sind nicht klassifizierbar oder biphänotypisch⁹. Die reife B-Zell-Leukämie kommt sehr selten vor (3%)³.

Eine Einteilung nach morphologischen Kriterien (Zellgröße, Chromatinstruktur, Kernform, Nukleolen, Zytoplasma, Basophilie, Vakuolisierung) wurde 1976 von Bennett et al. durch die FAB (French-American-British-Group)-Klassifikation getroffen¹⁰ (Tabelle 1).

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der akuten lymphoblastischen Leukämie

ALL-Subtyp	Blastenmorphologie
L1 (kindlicher Typ)	vorwiegend kleine Blasten, heterochromatische Kerne
L2 (Erwachsenen-Typ)	heterogene Zellpopulation
L3 (Burkitt-Typ)	vorwiegend große Blasten

Die FAB-Klassifikation hat heutzutage eher akademischen als klinischen Wert, da nur noch die Zuteilung zur L3-Gruppe, die einer reifen B-ALL entspricht, prognostische und therapeutische Folgen hat. Äußerst wichtig und aufschlussreich ist dagegen die Analyse chromosomaler Aberrationen der Leukämiezellen (1.1.4).

1.1.4 Chromosomale Veränderungen bei ALL

Aberrationen in Anzahl und Struktur der Chromosomen der Krebszellen sind ein wichtiges Kennzeichen maligner Erkrankungen. Vermutlich tragen kooperierende onkogene Läsionen zur malignen Transformation von Zellen bei und beeinflussen die Prognose der Patienten. Durch den Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (z. B. durch Deletion eines Chromosoms bzw. Chromosomenabschnitts oder Methylierung von Promotorregionen) oder durch die Aktivierung eines Protoonkogens zu einem Onkogen (z. B. durch Punktmutation, Translokation oder Inversion) kann die maligne Entartung einer Zelle begünstigt werden.

Bei 75% der Patienten mit ALL werden chromosomale Abnormalitäten wie Translokationen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen mit biologischer und therapeutischer Relevanz in den Leukämiezellen nachgewiesen¹¹. Für die Pathogenese und Prognose der ALL im Kindes- und Jugendalter bedeutsame Veränderungen sind die Translokationen t(12;21) mit dem daraus entstehenden *TEL-AML1*-Fusionsgen

(1.1.4.1) und t(9;22)(q34;q11), die im auch als „Philadelphia-Chromosom“ bezeichneten und häufig bei der CML des Erwachsenenalters gefundenen Fusionsgen *BCR-ABL* resultiert. Abnormalitäten des *MLL*-Genorts in der Region 11q23 charakterisieren prognostisch ungünstige Leukämien und werden fast immer (bis zu 80% der Fälle) bei Kindern <1 Jahr nachgewiesen¹². Weitere rekurrente Chromosomenaberrationen der Patienten mit ALL sind die zur *E2A-PBX1* führende Translokation t(1;19)(q23;p13)¹³ sowie Rearrangements von *MYC* mit Immunglobulingenen und Rekombinationen von T-Zell-Rezeptor (TZR)-Genen.

Numerische Chromosomenveränderungen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Prognose. So hängt eine Hyperdiploidie mit einer Chromosomenzahl >50 (DNA-Index ≥ 1.16), die bei ungefähr 30% der ALL im Kindesalter gefunden wird, mit einer guten Prognose zusammen¹⁴. Besonders häufig hinzugewonnen sind dabei die Chromosomen 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 und X¹⁵. Einen prognostisch ungünstigen Effekt in dieser Untergruppe hat der Zugewinn von Chromosom 5¹⁶. Auch mit einer schlechten Prognose einhergehend ist bei Patienten mit diploider ALL eine isolierte Trisomie 5, die als seltenes Ereignis beschrieben wird¹⁷.

Prognostisch besonders ungünstig ist ein (selten gefundener) beinahe haploider Karyotyp mit 23-29 Chromosomen¹⁸.

Im Folgenden werden die Ursprünge und Folgen der bei ALL im Kindes- und Jugendalter häufigsten Chromosomenveränderung, der *TEL-AML1*-Fusion, die das Patientenkollektiv dieser Arbeit charakterisiert, genauer erläutert.

1.1.4.1 *TEL-AML1*-Fusion

Die balancierte, reziproke Translokation t(12;21)(p13;q22) mit dem resultierenden Fusionsgen *TEL-AML1* wurde 1994 erstmals beschrieben¹⁹ und ist mit einer Inzidenz von 20-25% mit die häufigste genetische Veränderung bei ALL im Kindes- und Jugendalter²⁰⁻²². Durch konventionelle zytogenetische Methoden wird sie in nur 0.05% der ALL entdeckt²³. Mithilfe von FisH (*Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung*, 2.5.3) kann das Fusionsgen nachgewiesen werden, mittels PCR (*polymerase chain reaction*, *Polymerase-Kettenreaktion*) die mRNA des Fusionsgens.

TEL (*translocation*, *ETS*, *leukemia*) und *AML1* (*acute myeloid leukemia 1*) sind Transkriptionsfaktoren, die hämatopoetisches Wachstum und Differenzierungsprogramme regulieren. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die die Expression ihrer Zielgene verstärken oder herabsetzen, indem sie an regulatorische

DNA-Elemente (Promoter, Enhancer, Silencer) binden. Das Gen für AML1, das zur Familie der Transkriptionsfaktoren CBF/PEBP2 gehört, liegt auf Chromosom 21q22. AML1 spielt eine Rolle bei der Leberhämatopoese aller Zellreihen²⁴.

In die Familie der eukaryotischen ETS-Proteine einzuordnen ist TEL und wird deshalb auch als ETV6 (*E twenty-six specific variant gene 6*) bezeichnet. Das Gen für diesen Transkriptionsfaktor, der Entwicklung und Funktion der hämatopoetischen Zellreihe reguliert, liegt auf Chromosom 12p13. Mit TEL wurde erstmals ein für die Hämatopoese im KM spezifischer Transkriptionsfaktor nachgewiesen²⁵. Im Fusionsgen *TEL-AML1*, das auf dem derivativen Chromosom 21 liegt, ist der N-Terminus des *TEL*-Gens, welcher die HLH-Domäne enthält, mit beinahe der gesamten Kodierungssequenz des *AML1*-Gens verbunden²⁶. In 90% der Fälle fusioniert Exon 5 von *TEL* mit *AML1* Exon 2, selten mit Exon 3. Die Funktion des entstehenden Proteins TEL-AML1 ist nicht sicher bekannt. Es kann Homo- oder Heterodimere mit dem *TEL*-Wildtyp bilden und dominant die Transkriptionsaktivierung bestimmter Zielgene durch AML1 hemmen^{27, 28}. Die Bedeutung für die Leukämogenese erklärt sich möglicherweise durch die von *TEL-AML1* auf diese Weise veränderte Regulation hämatopoetischer Zellen.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL eine bessere Prognose als Patienten ohne diese chromosomale Rekombination haben^{21,23, 29}. Die Wahrscheinlichkeit ereignisfreien Überlebens (*probability of event-free survival*, pEFS) war bei *TEL-AML1* positiver ALL signifikant höher als bei *TEL-AML1* negativer ALL^{21, 30}. Die *TEL-AML1*-Fusion war mit prognostisch günstigen Parametern wie einem Erkrankungsalter zwischen 1-10 Jahren, einem BVZ-Immunphänotyp und einer Leukozytenzahl bei Diagnose von <50000/μl assoziiert.

Die *TEL-AML1*-Fusion geht *in vitro* mit einer hohen Empfindlichkeit für Chemotherapeutika, vor allem L-Asparaginase, einher³¹.

Die initiale Vermutung, dass die Translokation t(12;21)(p13;q22) mit einer guten Prognose zusammenhängt, ist insofern in Frage gestellt worden, als dass *TEL-AML1* in zwei Studien ähnlich häufig bei der Ersterkrankung und beim Rezidiv gefunden wurde^{30, 32}. Allerdings trat das Rezidiv bei den meisten Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL zu einem späten Zeitpunkt auf, so dass diese Patienten im Rezidivfall eine eher günstige Prognose aufwiesen.

Neuere große prospektive Studien deuten an, dass der *TEL-AML1*-Status tatsächlich mit einem positiven Krankheitsverlauf assoziiert ist³³ bzw. einen unabhängigen prädiktiven Wert hat³⁴.

Da in der vorliegenden Arbeit u. a. chromosomale Veränderungen bei *TEL-AML1* positiver ALL untersucht wurden, werden die bei dieser ALL am häufigsten gefundenen Mutationen im Folgenden zusammenfassend dargestellt.

1.1.4.2 Zusätzliche chromosomale Veränderungen bei *TEL-AML1* positiver ALL

Offenbar reicht das bloße Vorhandensein eines präleukämischen, *TEL-AML1* positiven Klons nicht aus, um eine leukämische Transformation zu induzieren. Dementsprechend werden in *TEL-AML1* positiven ALL häufig weitere rekurrente Chromosomenveränderungen gefunden.

In einer Studie an KM-Proben von 169 Kindern mit *TEL-AML1* positiver ALL war der Karyotyp in der konventionellen zytogenetischen Analyse in fast 90% aberrant³⁵. Dabei hatten Veränderungen von 12p die größte Prävalenz. Häufig beschrieben wird der Verlust des zweiten, nicht an der Translokation beteiligten *TEL*-Allels durch Deletion der Region 12p13³⁶⁻³⁸. Außerdem traten unspezifische Deletionen in den Chromosomen 6 und 9 auf. Die häufigste numerische Chromosomenveränderung war die Trisomie von Chromosom 21³⁵. Bei ungefähr der Hälfte der Patienten waren die Blasten pseudodiploid und bei etwa einem Viertel hyperdiploid (47-51 Chromosomen).

Die Translokation t(12;21) war weder mit extremer Hyperdiploidie (52-68 Chromosomen) noch den Translokationen t(9;22), t(4;11) und t(1;19) assoziiert³⁵. In neueren array-CGH Studien war in mehreren Fällen auch Chromosom 10^{22, 36} und 16²² und besonders häufig die Region 21q22 mit *AML1*³⁷ oder auch das ganze Chromosom 21²² hinzugewonnen. Deletiert waren Chromosomenabschnitte auf 6q, 8p, 9p, 11q, 12p und 13q²² und dabei vor allem Gene, die bei der B-Zell-Entwicklung eine Rolle spielen, wie z. B. *EBF1* (auf Chromosom 5), *IKZF1* (auf Chromosom 7), *PAX5* oder *CDKN2A* (auf Chromosom 9)³⁷ sowie in einigen Fällen ein Chromosom X²².

1.2 ALL-Rezidive im Kindesalter

1.2.1 Epidemiologie und Risikostratifizierung

Trotz der in den meisten Fällen erfolgreichen, intensivierten und risikoadaptierten Induktions- und Postremissionstherapie der ALL-Ersterkrankung und der hohen pEFS bleibt das Rezidiv, das ungefähr 20-25% der Kinder mit ALL erleiden, weiterhin ein klinisches Problem. Durch Resistenzen der Leukämiezellen gegen Chemotherapeutika gestaltet sich die Behandlung der ohnehin schon geschwächten Patienten schwierig. Für die Therapieplanung werden die Patienten in der multizentrischen

Therapieoptimierungsstudie zur Behandlung von ALL-Rezidiven im Kindesalter ALL-REZ BFM (ALL-Rezidivstudie Berlin-Frankfurt-Münster) in Risikogruppen stratifiziert, die eine mehr oder weniger intensive Behandlung benötigen (Tabelle 2). Wichtige Parameter für die Prognose, die dabei berücksichtigt werden, sind Zeitpunkt (früh/spät) und Ort des Rezidivs (extramedullär/kombiniert/medullär) sowie der Immunphänotyp der Leukämiezellen (T oder non-T). Rezidive, die während der Therapie der initialen Erkrankung innerhalb von <18 Monaten nach Diagnosestellung entstehen, werden als sehr frühe Rezidive bezeichnet. Späte Rezidive treten ab sechs Monaten nach Beendigung der Ersttherapie auf. Sie machen mit über 50% die größte Gruppe aus³⁹ und haben die beste Prognose⁴⁰. Alle Rezidive, die sich zwischen diesen beiden Zeitpunkten entwickeln, werden als frühe Rezidive zusammengefasst. Während frühe Rezidive sich möglicherweise aus nicht eradizierten Blasten der Ersterkrankung entwickeln, können späte Rezidive eine *de novo* Entwicklung der Leukämie aus einem gemeinsamen prämaligen Klon repräsentieren⁴¹. Studien zeigen, dass eine Zweitremission in über 70% der Frührezidive und 96% der Spätrezidive erreicht wird³⁹. Bei der Rezidivlokalisierung werden ausschließlich extramedulläre Rezidive von solchen mit isoliertem KM-Befall ($\geq 25\%$ Blasten im KM; kein Befall anderer Organe) und kombinierten Rezidiven (KM-Beteiligung mit $\geq 5\%$ Blasten und vor allem ZNS- und Hodeninfiltration) unterschieden. Die 10-15% der Kinder mit initialer ALL, die einen isolierten KM-Rückfall⁴¹ erleiden, haben eine schlechtere Prognose als Patienten mit ausschließlich extramedullärem Rezidiv⁴⁰. Patienten mit T-ALL haben eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit non-T-Immunphänotyp⁴⁰. Entsprechend der oben genannten Kriterien werden Patienten mit günstigeren prognostischen Parametern der Strategiegruppe S1 zugeteilt. Die Strategiegruppe S2 gilt als Gruppe mit intermediärem Risiko, S3 und S4 werden als Hochrisikogruppen bezeichnet.

Tabelle 2: Definition der Strategiegruppen im Protokoll ALL-REZ BFM 2002

Zeitpunkt	Ort	Immunphänotyp: non-T			Immunphänotyp: (prä-) T		
		extramedullär isoliert	KM kombiniert	KM isoliert	extramedullär isoliert	KM kombiniert	KM isoliert
sehr früh	S2	S4	S4	S2	S4	S4	
früh	S2	S2	S3	S2	S4	S4	
spät	S1	S2	S2	S1	S4	S4	

Für bestimmte Untergruppen von Bedeutung sind außerdem Zahl der peripheren Blasten (*peripheral blast count*, PBC), Geschlecht, Alter und genetische Veränderungen

der Zellen^{42, 43}. So kann die Gruppe S2, je nach Anteil peripherer Blasten bei der Rezidivdiagnose und *BCR-ABL*-Status, weiter eingeteilt werden (S2 A-D).

1.2.1.1 Minimal residual disease (MRD)

Anhand der molekulargenetischen Quantifizierung residueller Leukämiezellen zu bestimmten Zeitpunkten während der Therapie ist es möglich, das Ansprechen auf die Behandlung genauer zu beurteilen und zuverlässiger die Heilungschancen und das Rezidivrisiko der Patienten vorherzusagen. Das Maß, in dem die Leukämiezell-Last in den ersten Therapiewochen reduziert wird, ist mittlerweile ein wichtiger prognostischer Indikator⁴⁴. Da residuelle Leukämiezellen mikroskopisch nur sichtbar sind, wenn sie >1-5% der kernhaltigen Zellen im KM ausmachen⁴⁴, sind sensitivere Methoden nötig um noch vorhandene Blasten zu entdecken, von denen sich auch bei klinischer (morphologischer) Remission bis zu 10^{10} im Körper befinden können. Mittels PCR können Leukämie-spezifische TZR- und Immunglobulin (Ig)-Genrekombinationen⁴⁵ detektiert werden. Da Leukämie eine klonale Erkrankung ist, tragen alle leukämischen Zellen eines Individuums dieselben Ig/TZR-Genrekombinationen⁴⁴.

MRD (*minimal residual disease, minimale Resterkrankung*), das mit real-time PCR-Analyse solcher individuellen Rearrangements von Leukämiezellklonen bestimmt wurde, ist der wichtigste unabhängige prädiktive Faktor des EFS in rezidierten ALL im Kindes- und Jugendalter⁴⁶. Durch das MRD-Monitoring können Patienten in Risikogruppen eingeteilt und die Therapie entsprechend angepasst werden. In der Studie ALL-REZ BFM 2002 wird MRD an Tag 15 (nach Therapieblock F1) und 36 (nach Therapieblock F2) gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung von MRD nach dem zweiten Induktionsblock F2 den größten prognostischen Wert hat⁴⁷. In Abhängigkeit vom Ergebnis der MRD-Messung werden Patienten mit intermediärem Risiko (S2) entweder weiter chemotherapeutisch behandelt ($MRD \leq 10^{-3}$) oder einer Stammzelltransplantation zugeführt ($MRD \geq 10^{-3}$) (Tabelle 3). Bei Kindern mit $\leq 10^{-3}$ residuellen Blasten (MRD 0, 1) an Tag 36 lag pEFS nach sechs Jahren bei 86%, bei Kindern mit nachweisbarer Resterkrankung über dieser Grenze (MRD 2, 3) bei 0%⁴⁷. Allerdings tragen Patienten mit anhaltender hoher MRD-Last unmittelbar vor der Transplantation ein signifikant höheres Folgeresidivrisiko als Patienten mit $MRD \leq 10^{-4}$ (MRD 0), unabhängig von der Risikostratifierungsgruppe⁴⁶. Das heißt, dass klassische prognostische Parameter wie Immunphänotyp, Rezidivlokalisierung oder Rezidivzeitpunkt an Bedeutung verlieren, wenn die Patienten sich in klinischer

Zweitremission befinden und eine Stammzelltransplantation erhalten. MRD stellt dann den einzigen unabhängigen Prädiktor für die Prognose dar⁴⁸.

Tabelle 3: Definition der MRD-Risikogruppen

MRD-Risikogruppe	Anteil der Leukämiezellen	Stammzelltransplantation
0	$\leq 10^{-4}$	nein
1	$10^{-4} - 10^{-3}$	
2	$10^{-3} - 10^{-2}$	ja
3	$\geq 10^{-2}$	

1.2.2 Zusätzliche chromosomale Veränderungen beim ALL-Rezidiv

Das genetische Profil der Leukämiezellen im Rezidiv unterscheidet sich teilweise von dem der Ersterkrankung. Da in der vorgelegten Arbeit nur rezidierte ALL analysiert wurden, werden die bedeutendsten im Rezidiv hinzukommenden Mutationen kurz dargestellt.

In einem von Mullighan et al. untersuchten Kollektiv von 61 pädiatrischen ALL-Rezidivpatienten traten chromosomale Aberrationen signifikant häufiger auf als bei der initialen Erkrankung⁴⁹. Dabei waren vor allem zusätzliche chromosomale Regionen deletiert. Meist waren die im Rezidiv vorherrschenden Klone in kleinerem Anteil bereits schon in der Ersterkrankung nachweisbar, wie retrospektiv festgestellt werden konnte. Am häufigsten betroffen waren die Gene *CDKN2A/B* und *ETV6*, welches auch bei initialer ALL häufig mutiert ist³⁷, sowie einige die B-Zell-Entwicklung und den Zellzyklus regulierende Gene. In wenigen Fällen unterschieden sich die chromosomalen Muster von Ersterkrankung und Rezidiv komplett, was mit einer vollständig neu entwickelten zweiten Leukämie zusammenhängen kann.

Für eine der in dieser Arbeit untersuchten Genveränderungen gibt es einen hypothetischen Zusammenhang mit vermindertem Therapieansprechen. Deshalb werden die Therapie des ALL-Erstrezidivs und Resistenzmechanismen gegen diese im Folgenden beschrieben.

1.2.3 Rezidivtherapie

Gegenwärtig liegen die Heilungschancen von Kindern und Jugendlichen mit einem ALL-Erstrezidiv ungefähr bei 35-40%⁵⁰. Zur Behandlung wird eine Kombination aus Glukokortikoiden (*glucocorticoids*, GC; Dexamethason, Prednison), Methotrexat, Cytarabin, Vindesin, Asparaginase, Cyclophosphamid/Ifosfamid und Anthracyclinen (Idarubicin/Daunorubicin) eingesetzt. Erschwerend für die Therapieplanung ist die

Tatsache, dass die Leukämiezellen im Rezidiv resistenter gegenüber den in der Ersttherapie verwendeten Chemotherapeutika sind⁵¹. Während bei ALL-Ersterkrankung bis zu 80% Remissionsraten mit GC erreicht werden, gelingt dies bei etwa nur 35% der Rezidivpatienten⁵². Im Gegensatz zur Therapie der initialen ALL, bei der sich eine kontinuierliche Chemotherapeutikgabe bewährt hat, werden die Medikamente in der Induktions- und Konsolidierungsphase der ALL-Rezidivtherapie in kurzen, intensiven Blöcken mit therapiefreien Intervallen zur Regeneration der KM-Funktion, anschließender Schädelbestrahlung und Dauertherapie verabreicht. Da die Medikamente das ZNS nach Passieren der Blut-Hirn-Schranke in verminderter Konzentration und Wirkung erreichen, werden eventuell im ZNS vorhandene Blasten zusätzlich durch Bestrahlung mit 12 Gy eradiziert.

In der Studie ALL-REZ BFM 2002 wird außerdem ab der fünften Therapiewoche eine weniger intensive, kontinuierliche Konsolidierungstherapie mit der bisherigen intermittierenden Therapie verglichen. Ziele der erstgenannten Therapieform sind die Reduktion der MRD und der Toxizität der Therapie sowie die Verbesserung des ereignisfreien und absoluten Überlebens⁵³. In der folgenden Abbildung 1 wird das Therapieschema der Studie ALL-REZ BFM 2002 samt der verwendeten Medikamente (Tabelle 4 und 5) dargestellt.

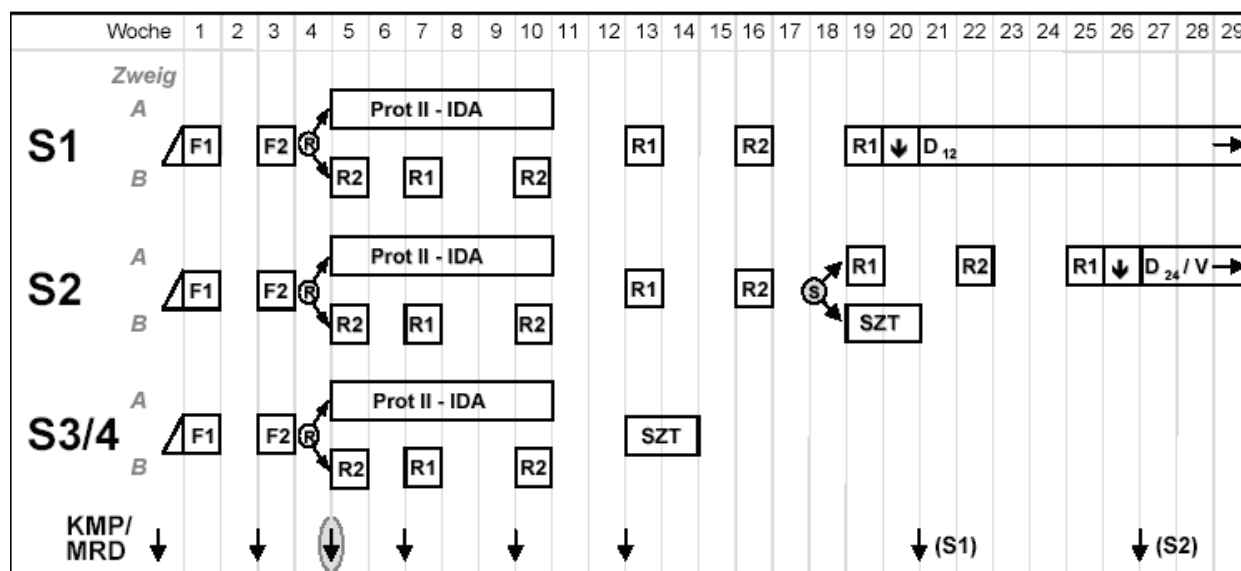


Abbildung 1: Therapieübersicht ALL-REZ BFM 2002

D₁₂/D₂₄: 12/24 Monate Dauertherapie; **R**: Randomisierung; **S**: Stratifizierung; V: Reinduktionspulse;
 ↓ lokale Strahlentherapie; **I**: KMP-Zeitpunkt für Postremissions-Stratifizierung in S2,
 SZT Stammzelltransplantation; KMP Knochenmarkpunktion; Chemotherapieblöcke: F1, F2, R2, R1,
 Protokoll II-IDA

Tabelle 4: In den Therapieblöcken von ALL-REZ BFM 2002 verwendete Medikamente⁵³

Therapieblock	Medikamente
F1 & F2	Dexamethason p. o., Vincristin i. v., Methotrexat i. v. & i. th., Asparaginase i. v., Cytarabin i. th., Prednison i. th.
R2	Dexamethason p. o., Thioguanin p. o., Vindesin i. v., Methotrexat i. v. & i. th., Ifosfamid i. v., Daunorubicin i. v., Asparaginase i. v., Cytarabin i. th., Prednison i. th.
R1	Dexamethason p. o., Mercaptopurin p. o., Vincristin i. v., Methotrexat i. v. & i. th., Cytarabin i. v. & i. th., Asparaginase i. v., Prednison i. th.
Protokoll II-IDA	Dexamethason p. o., Vincristin i. v., Idarubicin i. v., Asparaginase i. v., Cyclophosphamid i. v., Cytarabin i. v. & i. th., Thioguanin p. o., Methotrexat i. th., Prednison i. th.

In F1 und F2 werden die Medikamente zu verschiedenen Zeitpunkten verabreicht.
p. o. per os; i. v. intravenös; i. th. intrathekal

Tabelle 5: Wirkmechanismen der in ALL-REZ BFM 2002 eingesetzten Medikamente

Name	Gruppe	Wirkmechanismus	Resultat
Asparaginase	Enzym	Katalyse von Asparagin und Glutamin	Aminosäuremangel in leukämischen Blasten
Cyclophosphamid Ifosfamid	Oxazaphosphorine	DNA-Alkylierung / Störung der DNA- Replikation und Transkription	Zytotoxizität
Cytarabin	Antimetabolit: Cytidinisomer	Hemmung der Pyrimidinsynthese	
Methotrexat	Antimetabolit: Folsäureantagonist	Hemmung der Dihydrofolatreduktase	Hemmung der Purin- und Pyrimidinsynthese
Mercaptopurin Thioguanin	Antimetabolit: Purinanalogon Guaninanalogon	Einbau falscher Basen in die DNA	Chromatinschädigung
Daunorubicin Idarubicin	Anthrazykline	DNA-Interkalation, Hemmung der Topoisomerase II	Zytotoxizität
Dexamethason Prednison	Glukokortikoide	Hemmung der Phospholipase 2	Apoptose von ALL- Blasten (1.2.4)
Etoposid	Epipodophyllotoxinderivat	Hemmung der Topoisomerase II	Zytotoxizität
Vincristin Vindesin	Vinca-Alkaloide	Tubulinbindung	Blockade der Mitose

1.2.4 Glukokortikoide

GC sind integraler Bestandteil der ALL-Therapie. Sie gehören zu den Steroidhormonen und werden in der Nebennierenrinde gebildet. Der wichtigste Vertreter beim Menschen ist das Cortisol. Auf zellulärer Ebene werden ihre Wirkungen über den Glukokortikoidrezeptor (GR) vermittelt, der als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor arbeitet. Er transloziert nach Bindung des Hormons und Konformationsänderung in den Zellkern, wo er entweder an so genannte *glucocorticoid response elements* (GRE) bindet oder mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert.

GC spielen durch ihre zahlreichen Wirkungen eine wichtige Rolle für die ALL-Therapie. Sie können in lymphatischen Zellen Apoptose induzieren oder zum Zellzyklusarrest führen⁵⁴. Wichtige therapeutische Konsequenzen ergeben sich aus der Fähigkeit der GC zur Immunsuppression und Antiinflammation, allerdings entstehen aus den breit gefächerten Wirkungen auch zahlreiche Nebenwirkungen, die beim therapeutischen Einsatz von GC beachtet werden müssen. Dazu gehören u. a. Nebennierenrindenatrophie, Blutbildveränderungen, diabetogene Wirkungen, Osteoporose, Wachstumshemmung, Hautatrophie, Katarakt, psychische Veränderungen und Infektanfälligkeit.

1.2.4.1 Glukokortikoidrezeptor-Gen

Das Gen für den GR, *NR3C1* (*nuclear receptor subfamily 3, group c, member 1*), liegt auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q31.3, Abbildung 2). Das humane mRNA-Transkript besteht aus neun Exons (777 Aminosäuren), die für drei charakteristische Domänen des Proteins kodieren (Abbildung 3). Die N-terminale Domäne enthält eine Transaktivierungsdomäne (AF-1), die für die Transkriptionsaktivierung von Zielgenen verantwortlich ist⁵⁵. Wichtig für die Bindung an die GRE ist eine DNA-Bindungsdomäne, die aus zwei hochkonservierten Zinkfingern besteht und ein Kernlokalisierungssignal (NLS1) enthält. Der erste Zinkfinger (Exon 3) spielt eine Rolle für den Transrepressionsmodus des Rezeptors, indem er für Domänen kodiert, die für die NFκB- und AP-1-Bindung notwendig sind. Dahingegen kodiert Exon 4, die zweite Zinkfingerdomäne, für die Rezeptordimerisierung und durch GRE vermittelte Transaktivierung. Die Domäne, die durch Interaktion mit dem Liganden und Hitzeschockproteinen die Aktivität des Rezeptors kontrolliert, ist im Carboxy-terminalen Teil des Proteins enthalten. Dort gibt es ein zweites Kernlokalisierungssignal (NLS2) und eine weitere Transkriptionsaktivierungsdomäne (AF-2)⁵⁶.

Das GR-Protein kann sowohl als Transkriptionsfaktor als auch als Regulator anderer Transkriptionsfaktoren wirken. Es wird in heteromeren zytoplasmatischen Komplexen zusammen mit Hitzeschockfaktoren und Immunophilinen gefunden und befindet sich normalerweise im Zytoplasma. Ligandenbindung bewirkt den Transport in den Zellkern. Durch alternatives Spleißen von Exon 9β entsteht die GR-Isoform GR-β, die im Gegensatz zur funktionellen Rezeptorvariante GR-α die GC-Bindungsfähigkeit verloren hat⁵⁷. Möglicherweise können Mutationen im oder Deletionen des *NR3C1*-Gen(s) zur GC-Resistenz führen.



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lage des Glukokortikoidrezeptor-Gens *NR3C1* auf Chromosom 5

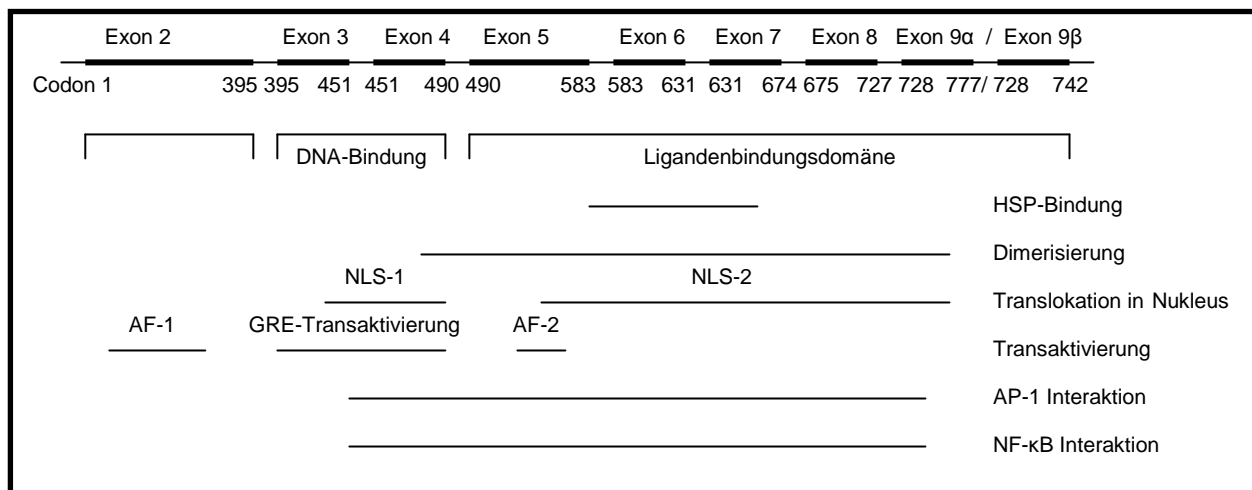


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Glukokortikoidrezeptor-Gens *NR3C1* mit seinen funktionellen Anteilen⁵⁶

1.2.4.2 Glukokortikoide in der ALL-Rezidivtherapie

In der ALL-Rezidivtherapie werden GC in allen Therapiephasen eingesetzt. Dexamethason ist dabei besonders in der zytoreduktiven Vorphase wichtig und Prednison wirkt intrathekal gegen Blasten im ZNS. Die genauen molekularen Mechanismen der Effekte von GC und der Resistenz von Leukämiezellen gegen diese sind noch nicht genau verstanden. GC regulieren etwa 900 verschiedene Gene⁵⁸, von denen einige, wie z. B. der NFκB-Inhibitor α oder das Protoonkogen c-myc, in den Apoptose-Signalweg involviert sind. Ploner et al. berichten, dass GC über Regulation pro- und antiapoptischer Proteine der BCL-2-Familie zum programmierten Zelltod führen⁵⁹.

Studien an Leukämiezelllinien zeigen, dass ausreichend viele funktionierende GR vorhanden sein müssen, damit GC Apoptose induzieren können^{60, 61}. Allerdings exprimieren auch GC-resistente Xenograft-Proben hohe GR-Level⁶² und in einer älteren Studie wurden beim Rezidiv ähnlich hohe GR-Level wie bei der initialen Erkrankung gefunden⁶³, so dass vermutlich noch andere Mechanismen zum Zelltod durch GC beitragen. Postuliert wurde auch, dass GC über eine positive Rückkopplung das GR-

Gen hochregulieren und so zwar zu einer gesteigerten GC-Antwort führen, gleichzeitig aber auch essenzielle Signaltransduktionswege in der Zelle verstärkt inhibieren, was ein mit dem Überleben der Zelle unvereinbares metabolisches Desaster zur Folge hat⁶⁴. Ein weiteres starkes Apoptosesignal in proliferierenden leukämischen Zellen ist möglicherweise der Arrest der Zellzyklusprogression⁶⁵.

Der Begriff „Glukokortikoidresistenz“ ist recht allgemein und kann sowohl eine Reaktion des gesamten Organismus meinen (primäre GC-Resistenz)⁶⁶ als auch sich auf einzelne Zellklone wie bei ALL beziehen. Manche Leukämien sprechen auf die Therapie mit GC nicht an oder entwickeln im Laufe der Therapie Resistenzen^{52, 67}. Die *in vivo* und *in vitro* GC-Resistenz wurde als negativer prognostischer Faktor bei initialer ALL identifiziert⁶⁴. *Prednisone poor responder*, also Leukämien, die definitionsgemäß schlecht auf die GC-Therapie ansprechen (periphere Blastenzahl >1000/μl am 8. Therapietag), hatten in der Studie ALL-BFM 95 nur eine 55%ige pEFS nach sechs Jahren im Gegensatz zu 82% in der Gruppe der *prednisone good responder*⁶⁸. Zum Rezidivzeitpunkt entnommene Zellen waren in einer Studie *in vitro* 300mal resistenter gegen Prednisolon als Zellen des Erstdiagnosezeitpunkts⁵¹. Mögliche Mechanismen der GC-Resistenz werden in 4.2.2.1.5 erläutert.

1.3 Chromosomale Veränderungen der untersuchten Regionen bei ALL

1.3.1 Veränderungen von 5q31.3 bei ALL

In einer aktuellen Studie an Leukämiezellproben von 242 Kindern mit initialer ALL beschreiben Mullighan et al. zahlreiche genetische Alterationen. Deletionen von 5q31.3 wurden bei acht Patienten (5.1%) mit BVZ-ALL gefunden, von denen sechs *TEL-AML1* positiv waren (12.8% aller untersuchten *TEL-AML1* positiven ALL)³⁷. Die Läsion trat auch in den Lymphozyten von Kindern mit T-ALL auf (6% aller Kinder mit T-ALL in dieser Studie). Im Jahr 2008 veröffentlichte dieselbe Arbeitsgruppe eine Analyse über die klonalen Ursprünge des ALL-Rezidivs. *NR3C1* war bei vier von 47 BVZ-ALL (8.5%) deletiert und damit das am vierthäufigsten verlorene Gen. Meist war die *NR3C1*-Deletion erst im Rezidiv sichtbar⁴⁹. In einer Analyse unserer Arbeitsgruppe wurde ein 5q31.3-Verlust bei 11% der untersuchten *TEL-AML1* positiven ALL gefunden (1.4). Gewinne von 5q31.3 sind bei Patienten mit hyperdiploider ALL im Sinne eines Gewinns von Chromosom 5 beschrieben¹⁶ aber sonst bei ALL eher selten.

1.3.2 Veränderungen von 5p15.33 bei ALL

Mangels einer Zentromersonde für Chromosom 5 wurde die Region 5p15.33 als Kontrollregion ausgewählt, da Gewinne und Verluste von 5p15.33 bei ALL selten beschrieben sind. Dort befinden sich die Gene *SLC9A3* (*solute carrier family 9*), welches eine Rolle bei der Signaltransduktion einnimmt und in die pH-Regulation involviert ist, *CEP72* (*centrosomal protein 72kDa*) und *TPPP* (*tubulin polymerization promoting protein*), das als Protein die Polymerisierung von Mikrotubuli beeinflusst. Wenn es überexprimiert wird, inhibiert es die Bildung der Mitosespindel und das Auflösen der Kernhülle in der Mitose. Die Angaben für Verluste von 5p15.33 bei ALL in der Literatur schwanken zwischen 0 und 3%^{22, 36}, Gewinne wurden in höchstens 2% der ALL gefunden²². Eine neuere Studie der eigenen Arbeitsgruppe detektierte bei 9% der *TEL-AML1* positiven ALL Gewinne dieser Region.

1.3.3 Veränderungen von Chromosom X bei ALL

Riesch et al. fanden bei sechs von 178 (3.4%) Kindern mit ALL-Ersterkrankung einen Chromosom-X-Verlust⁶⁹. Fünf der sechs betroffenen Mädchen hatten eine *TEL-AML1* positive ALL und die *TEL-AML1* negative ALL zeigte eine ungewöhnliche Translokation t(1;19)(p13;q31). In anderen Studien lag die Prävalenz des Chromosom-X-Verlusts zwischen 0.6% und 3.9%⁷⁰⁻⁷², der also als seltenes Ereignis eingestuft werden kann. Bei der Betrachtung ausschließlich *TEL-AML1* positiver ALL ergeben sich höhere Prozentzahlen, z. B. 17% bei Erstrezidivpatienten in einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe (Giese, siehe 1.4) oder 7-8% in einer Studie an Patienten mit initialer ALL^{22, 35}. In allen Studien waren fast ausnahmslos Mädchen betroffen.

Gewinne von Chromosom X sind vor allem bei Patienten mit hyperdiploidem Chromosomensatz in den Blasten häufig⁷¹. Zytogenetisch kryptische Gewinne von Xq wurden bei einer Reihe von Jungen mit *TEL-AML1* positiver ALL gefunden. Die Autoren vermuten, dass das dort liegende, Hoden-spezifische Gen *SPANXB* eine pathogenetische Rolle bei t(12;21)-positiver ALL einnimmt⁷³. Obwohl sich nur 4% (1098) aller menschlichen Gene auf Chromosom X befinden, werden ihm 10% der monogenen Erbkrankheiten zugerechnet⁷⁴. Viele der Gene auf Chromosom X sind Mediatoren für die maligne Transformation von Zellen oder greifen in die Zellzyklusprogression, Apoptose (z. B. *XIAP*) oder die Angiogenese ein⁷⁵. Bei verschiedensten bösartigen Erkrankungen ist die Expression von auf dem Chromosom

X liegenden Genen hoch oder herunter reguliert. Die genaue Rolle numerischer Veränderungen von Chromosom X bei ALL bleibt noch zu klären.

1.4 Hintergrund, Ziel und Fragestellungen dieser Arbeit

In array-CGH-Analysen (CGH = *comparative genomic hybridization*) der eigenen Arbeitsgruppe von 53 *TEL-AML1* positiven, erstrezidierten ALL im Kindesalter wurden in 11% der Patientenproben Verluste von 5q31.3 gesehen, die signifikant mit schlechtem Ansprechen auf Therapie assoziiert waren. Dagegen zeigten neun Mädchen mit ALL (17%) aus der untersuchten Gruppe eine Deletion von Chromosom X, die mit einer guten Therapieantwort zusammenhing (Almut Giese, Prof. Dr. Dr. Karl Seeger, Dr. Reinhard Ullmann, persönliche Kommunikation).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, diese Ergebnisse an einem unabhängigen *TEL-AML1* positiven und negativen Kollektiv zu validieren, d. h., Prävalenz und klinische Bedeutung der genannten chromosomalen Veränderungen zu untersuchen. Im Speziellen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- 1. Wie zuverlässig ist die Interphase-FISH-Analyse dieser Arbeit zur Detektion von Deletionen und Gewinnen?**
- 2. Wie häufig gibt es Gewinne und Verluste von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X bei *TEL-AML1* positiven und negativen ALL-Erstrezidiven im Kindes- und Jugendalter?**
- 3. Welche Subpopulationen von Zellen mit Gewinnen oder Verlusten der untersuchten Regionen werden gefunden?**
- 4. Welche klinischen Korrelate und welche prognostische Bedeutung haben diese Veränderungen?**
- 5. Gibt es Gruppenunterschiede zwischen *TEL-AML1* positiven und negativen ALL bezüglich der Chromosomenaberrationen?**
- 6. Existiert ein Zusammenhang zwischen Gewinnen und Verlusten der bezeichneten Regionen oder zwischen bestimmten Kombinationen von Aberrationen und klinischen Daten?**

2. Patientenproben, Material und Methoden

2.1 Patientenproben

Die FisH-Analysen wurden an zum Rezidivdiagnosezeitpunkt angefertigten KM-Ausstrichen von Kindern mit ALL-Erstrezidiv durchgeführt. Die ALL-Proben waren mittels real-time PCR auf Vorhandensein der Fusionsgene *TEL-AML1* und *BCR-ABL* sowie *MLL*-Aberrationen untersucht worden.

Die für die Hybridisierung verwendeten KM-Ausstriche wurden in den Jahren 1996-2008 hergestellt und waren bis zur Untersuchung bei -80°C gelagert. Das Patientenmaterial stammt aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie der Charité, Campus Virchow-Klinikum, sowie aus Kliniken, die an der Studie ALL-REZ BFM teilnehmen. Von allen Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigten liegt eine schriftliche Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Therapieoptimierungsprüfung und damit verbundenen Untersuchungen von Blut bzw. KM vor.

Insgesamt konnte Material von 45 Patienten (19 mit *TEL-AML1* positiver und 26 mit *TEL-AML1* negativer ALL) analysiert werden, die nach folgenden strengen Einschlusskriterien ausgewählt worden sind:

- bekannter *TEL-AML1*-Status (positive oder negative real-time PCR)
- bekannter MRD-Status (MRD-Messung an Tag 36)
- negativer *BCR-ABL*-Status
- negativer *MLL-AF4*- und *MLL-ENL*-Status
- B-Vorläuferzell-ALL
- spätes Rezidiv
- Alter bei Erstrezidiv <18 Jahre (eine Patientin war zum Zeitpunkt des Erstrezidivs 21.15 Jahre alt)
- Blastenanteil im KM >60%
- KM-Ausstrich des Erstrezidiv-Diagnosezeitpunkts vorhanden
- Therapie nach Studie ALL-REZ BFM

Die Auswahlmerkmale waren im *TEL-AML1* negativen und positiven Kollektiv gleich verteilt (Abbildung 5, p-Werte im Fisher's Exact Test >0.2).

Da auch der Zusammenhang zwischen gefundenen Mutationen und dem klinischem Verlauf betrachtet werden sollte, wurden Patienten mit positivem *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*- oder *MLL-ENL*-Status aus der Untersuchung ausgeschlossen, da diese Veränderungen mit einer schlechten Prognose assoziiert sind⁴.

Um Interpretationsfehler durch einen hohen Anteil gesunder Zellen zu vermeiden, wurden nur Ausstriche von Patienten mit einem Blastenanteil von >60% im KM untersucht. Dabei enthielt das KM von 68% (13/19) der *TEL-AML1* positiven ALL >80% Blasten und von knapp 32% (6/19) zwischen 64% und 79% Leukämiezellen. Bei 96% der *TEL-AML1* negativen ALL lag der Blastenanteil bei >80%, bei einem Patienten machten die Blasten 73% der Zellen im untersuchten KM aus.

2.1.1 MRD-Risikogruppen

MRD ist mittlerweile einer der wichtigsten Parameter für die Prognose der ALL-Patienten. Die Häufigkeit der verschiedenen MRD-Status der Patienten dieser Studie entspricht der Verteilung, die auch in einem größeren Kollektiv von Patienten mit *TEL-AML1* positiver und negativer ALL (n = 160) gefunden wurde (Abbildung 4).

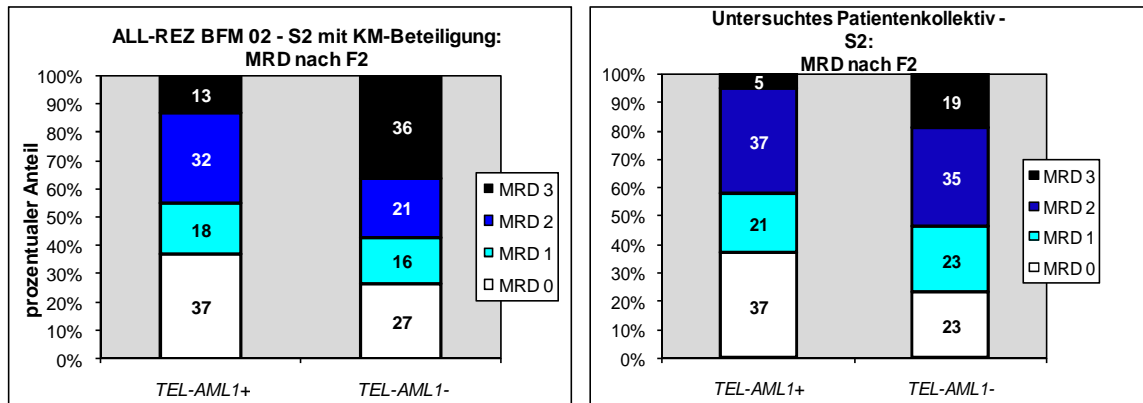


Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der MRD-Risikogruppen im Patientenkollektiv der ALL-REZ BFM 02 und im Kollektiv dieser Studie

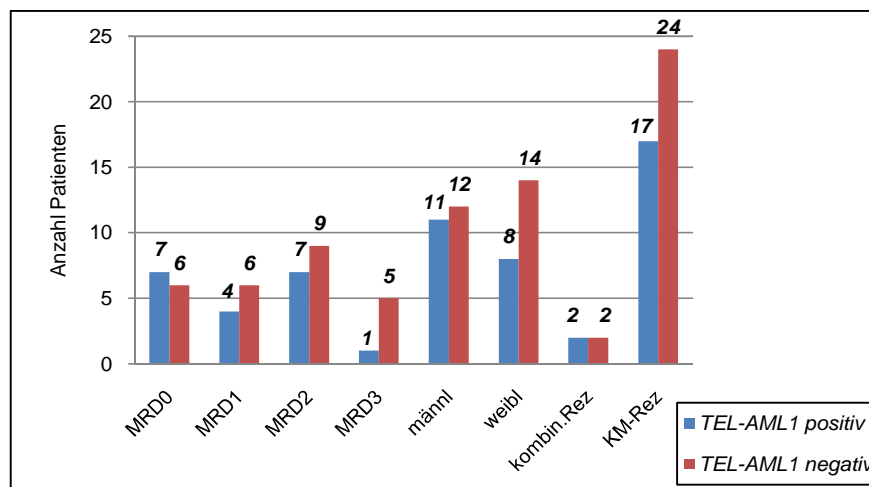


Abbildung 5: Einige Merkmale des *TEL-AML1* positiven und negativen Patientenkollektivs. Die Merkmale sind in beiden Gruppen gleich verteilt (p-Werte im Fisher's Exact Test >0.2)

2.2 Ermittlung der Cut-off Werte durch gesunde Kontrollen

Auch in Proben von Gesunden werden in der FisH-Analyse bisweilen mehr oder weniger Signale als erwartet gesehen. Dies bedeutet aber nicht unbedingt eine krankhafte Veränderung, da durch zufälliges Übereinanderliegen der homologen Chromosomen oder gepaarte Signale in replizierten Chromatinbereichen eine Deletion oder Duplikation vorgetäuscht werden kann. Es gilt also, einen Grenzwert festzulegen, um gesund von krank unterscheiden zu können und falsch-positive Ergebnisse zu minimieren. Diese Grenze nennt man Cut-off Wert.

Zur Ermittlung der Cut-off Werte wurden Blutausstriche von 20 gesunden Probanden unter den gleichen Bedingungen und nach demselben Protokoll wie die KM-Ausstriche der Patienten vorbehandelt, hybridisiert und ausgewertet. Da sich die Gewinnung von KM-Proben gesunder Kinder und Erwachsener als nicht durchführbar darstellte, wurden Blutausstriche erwachsener freiwilliger Spender benutzt. Pro Objektträger wurden durchschnittlich 245 Kerne ausgewertet und anschließend Mittelwerte und Standardabweichungen der Häufigkeiten von Verlust oder Gewinn von Signalen der 5q31.3-Region, des Kontrollbereichs 5p15.33 und des oder der Chromosomen X berechnet.

Cut-off Werte wurden aus der Summe des Mittelwerts und der dreifachen Standardabweichung gebildet. Diese Formel wird in der Literatur für Interphase-FisH-Analysen beschrieben und angewendet^{76, 77}.

2.3 REH

Zusätzlich wurde noch ein Ausstrich der humanen *TEL-AML1* positiven prä-B Leukämie-Zelllinie REH untersucht. Sie wurde von Blasten eines 15jährigen Mädchens mit ALL-Erstrezidiv etabliert⁷⁸. Diese wurden in 90% RPMI 1640 Medium und 10-20% FBS bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.4 Material

Neben der üblichen Laborausstattung wurden folgende Materialien benutzt (Tabelle 6, auf der folgenden Seite):

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendetes Material

Chemikalien

Hersteller	Produkt	Katalognummer
Invitrogen, USA	Agarose Electrophoresis Grade	15510-019
Merck, Deutschland	Ethanol absolut z. A. (zur Analyse)	1.00983.2511
	Methanol z. A.	1.06009.2511
	Essigsäure z. A.	1.00063.2500
	Magnesiumchlorid-Hexahydrat z. A.	1.05833.1000
	Salzsäure 1mol/L (1N)	1.09057.1000
	Formaldehyd mindestens 37% z. A., stabilisiert mit etwa 10% Methanol	1.04003.1000
	Formamid, deionisiert mit	1.09684.1000
	BIO-RAD AG® 501-X8 (D) Resin	142-6425
	Natrium-Acetat wasserfrei z. A.	1.06268.1000
	Serva, Deutschland	Dextransulfat 500 - Natriumsalz
Vector Laboratories Inc., USA	Vectashield, Eindeckmedium	H-1000
Marabuwerke GmbH & Co, Deutschland	Fixogum	38565
Sigma-Aldrich Inc., USA	Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat)	P 7947

Enzyme

Hersteller	Enzym	Katalognummer
Roche Applied Sciences, Deutschland	RNase A	10109142001
Sigma-Aldrich Inc., USA	Pepsin	P 7012

Lösungen, Puffer und Kits

Alle Puffer wurden mit Millipore Wasser verdünnt.

Puffer	Zusammensetzung
SSC-Puffer	20x SSC (3.0M NaCl, 300mM Natriumcitrat, ddH ₂ O, pH 7.0)
PBS-Puffer	10x PBS (1.37M NaCl, 27.0 mM KCl, 100mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4)
Elektrophoresepuffer	50x TAE (2.0M Tris, 1.0M Essigsäure, 50mM EDTA, pH 8.0)
Prähybridisierungspuffer	2x SSC, 10% Dextransulfat, 50% Formamid, pH 7-8

Hersteller	Kit	Katalognummer
Abbott Molecular Inc., USA	Nick Translation Reagent Kit: Nick Translation Enzym (DNA Polymerase I, DNase in 50% Glyzerol, 50mM Tris-HCl, pH 7.2, 10mM MgSO ₄ , 0.1mM DTT, 0.5 mg/ml nukleasefreies BSA), 10x Nick Translation Puffer (500mM Tris-HCl, pH 7.2, 100mM MgSO ₄ , 1mM DTT), dTTP, dCTP, dATP, dGTP (0.3mM) nukleasefreies Water	32-801300

Zelllinie

bereitgestellt von	Produkt	Katalognummer
DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Deutschland)	TEL-AML1 positive humane prä-B-Leukämie Zelllinie REH	ALL-22

Farbstoffe und Nukleotide

Hersteller	Farbstoff	Katalognummer
Sigma-Aldrich, Deutschland	DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid) zur Kernanfärbung	D 9542
Serva Feinbiochemika GmbH, Deutschland	Ethidiumbromid Lösung (10 mg/ml Ethidiumbromid in ddH ₂ O)	21251
Abbott Molecular Inc, USA	SpectrumOrange™-dUTP	30-803000
Roche Diagnostics GmbH, Deutschland	Fluoreszein-12-2'-deoxy-uridin-5'-triphosphat (FITC-12-dUTP)	11 373 242 910
MBI Fermentas GmbH, Deutschland	pUC Mix Marker, 8 6x DNA Ladepuffer (10mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.03% Bromphenolblau, 0.03% Xylen Zyanol FF, 60% Glycerol, 60mM EDTA)	#SM0301 #R0611

Nukleinsäuren

Hersteller	Produkt	Katalognummer
Roche Diagnostics GmbH, Deutschland	Cot Human DNA	11 584 074 001
Invitrogen, USA	Ultra Pure™ Herring Sperm DNA Solution	15634-017
Abbott Molecular Inc., USA	CEP X alpha SpectrumAqua	32-131023
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Deutschland	BACs: RP11773M18, RP11614D16	

Geräte

Hersteller	Gerät
Eppendorf GmbH, Deutschland	Heizblock, Thermostat 5320, Thermomixer 5430 Zentrifuge 5415D, 5417 R, 5810R
Carl Roth GmbH & Co, Deutschland	Tischzentrifuge Pasteurpipette
IKA-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland	Vortexer
Agilent, USA	AF 30-WS, Self Contained Ice Machine
Primus HT MWG AG Biotech	PDC Cycler Primus Multiblock
GIBCO BRL Life Technologies, Schottland	Elektrophoresekammer, Horizon 11.14
Ultra-Violet Products Inc., USA	UV-Lichtkasten C 62
Herolab GmbH, Deutschland	Gel-Dokumentationssystem E.A.S.Y. Win 32
Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland	Lichtmikroskop Axiovert 100, Okular E-PL 10x/20, Objektiv Acrostigmat 10x/0,25
Uniequip GmbH, Deutschland	Heizplatte, Thermoleader Dry Block Heat Bath
Grant Instruments (Cambridge) Ltd., Großbritannien	Wasserbad, Schüttelwasserbad 3005
Edmund Bühler GmbH, Deutschland	Kombischüttler KL 2

Hersteller	Gerät
Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland	Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 mit motorisiertem Filterwechsler und X-Y-Z Scanningtisch; 8fach Reflektorrevolver, Objektiv 40x/0.75 zur automatisierten Interphase-FisH-Analyse und 100x/1.3 zur Aufnahme von Metaphasen; Okular PL 10x/25
MetaSystems, Deutschland Engelbrecht, Medizin- und Labortechnik GmbH, Deutschland Edermünde	Metafer 4-MetaCyte Software, Version 2.6.5 Deckgläschen eckig 18x18 mm, 24x60 mm
Pechiney Plastic Packaging, USA	Parafilm
Integra Biosciences, Schweiz	Pipett Boy

2.5 Methoden

2.5.1 Nick Translation

Die Nick Translation (NT) ist eine Methode zur Markierung von DNA-Abschnitten. Diese können entweder indirekt mit einem Hapten oder direkt mit einem an dUTP gebundenen Fluorochrom markiert (gelabelt) werden⁷⁹. Nachdem das Enzym DNase I Einzelstrangbrüche (so genannte Nicks) erzeugt hat, nutzt DNA-Polymerase I die 3´OH-Enden dieser Nicks als Primer für die Synthese des komplementären Strangs. Ihre 5´-3´-Exonuklease-Aktivität entfernt Nukleotide in Syntheserichtung, die durch die Polymeraseaktivität des Enzyms bei einer Reaktionstemperatur von 15°C durch fluoreszenz- oder radioaktiv markierte Nukleotide ersetzt werden (Abbildung 6). Die laterale Verschiebung der Nicks wird als Translation bezeichnet und ist namensgebend für diese Art der DNA-Markierung. Der verwendete Nick Translation Kit der Firma Abbott enthält die beiden Enzyme bereits als Gemisch. Die Größe der gelabelten Probe sollte 200-500 (optimal 300) Basenpaare betragen. Sonden oberhalb dieser Größe können zu störenden Hintergrundsignalen bei der Hybridisierung führen, die durch unspezifische Anheftung der Probe an die Glasoberfläche entstehen, kürzere Sonden setzen die Hybridisierungseffizienz ebenfalls herab.

Wie vom Hersteller empfohlen, wurde der NT-Ansatz neun Stunden bei 15°C im Cycler inkubiert. Die Reaktion wurde danach durch kurzzeitiges Erhitzen auf 75°C gestoppt und die gelabelte DNA anschließend mit 70% Alkohol bei niedriger Temperatur (-20°C oder -80°C, je nach Dauer) in Anwesenheit eines Überschusses von cot1-DNA und HS (herring sperm)-DNA gefällt. Die Zugabe von cot1-DNA unterdrückt Kreuzhybridisierungen menschlicher repetitiver DNA. Cot1-DNA wird aus männlichen

humanen Plazenten gewonnen und enthält vor allem schnell anlagernde repetitive Sequenzen, die beim Denaturieren die komplementären Sequenzen der Ziel-DNA binden und so, wie auch HS-DNA, unspezifische Signale vermindern.

Das für die NT verwendete Protokoll ist in 2.5.3.5.2 aufgeführt.

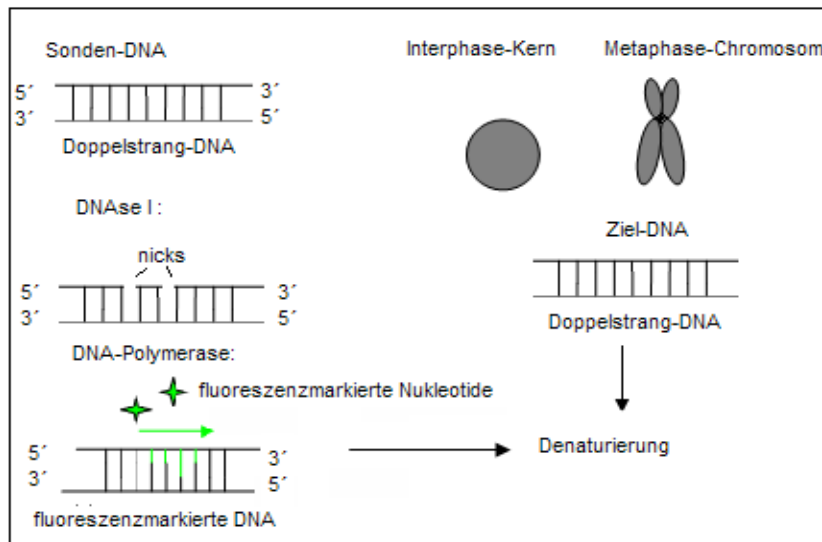


Abbildung 6:
Schematische
Darstellung der
Nick Translation

2.5.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht das Auftrennen von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe. Die Poren im Agarosegel, das sich in einer ionischen Pufferlösung befindet, wirken wie ein Sieb und bestimmen die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA, die sich wegen ihrer negativen Ladung stets in Richtung der Anode bewegt. Dabei wandern kurze DNA-Fragmente schneller als Lange. Als Referenz dient ein Marker aus DNA-Molekülen bekannter Länge. Für die vorliegenden Versuche wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet (1g Agarose in 100 ml TAE-Puffer). Durch anschließende Färbung mit dem in die DNA interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid können die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. In diesem Fall diente die Gelelektrophorese als Kontrolle der Größe der bei der Nick Translation entstandenen DNA-Fragmente (Abbildung 7).

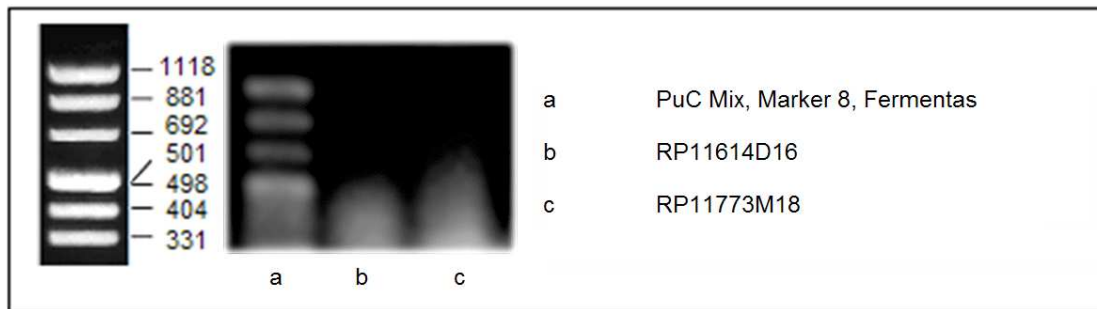


Abbildung 7: Gelelektrophorese (35 min, 120 V) zur Kontrolle der Größe von Produkten der Nick Translation zweier BACs (b, c)

2.5.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FisH)

Trotz Verbesserungen hochauflösender Bänderungstechniken und Zellkulturmethoden bleiben viele chromosomale Veränderungen maligner hämatologischer Erkrankungen der konventionellen zytogenetischen Analyse von Metaphase-Chromosomen verborgen. Dies kann z. B. auf dem Vorhandensein multipler abnormaler Zellklone, einem niedrigen Mitoseindex, mangelnder Repräsentativität der arretierten Metaphasen, unzureichender Chromosomenmorphologie oder den Grenzen des Auflösungsvermögens konventioneller Analysetechniken beruhen. Seit Ende der 80er Jahre ist die zytogenetische Analyse durch eine Reihe von *in-situ*-Hybridisierungstechniken weiterentwickelt und in einigen Aspekten verbessert worden. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FisH) ist eine moderne molekularzytogenetische Methode, mit der bestimmte DNA- oder auch spezifische RNA-Sequenzen auf Chromosomen gekennzeichnet werden können. Dabei wird ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter einzelsträngiger DNA-Abschnitt mit bekannter Sequenz als Sonde eingesetzt (Abbildung 8). Sowohl Ziel- als auch markierte Sonden-DNA werden in einer Formamidlösung durch Hitze denaturiert. Die Hybridisierungsreaktion findet danach bei 37°C statt. Anschließend wird ungebundene Probe durch Waschschriffe entfernt. Da der Nachweis direkt in der Zelle erfolgt, spricht man von *in-situ* („am Ort selbst“) Hybridisierung.

Diese Technik wurde Ende der 1960er Jahre von zwei Arbeitsgruppen unabhängig entwickelt^{80, 81}. Damals wurden radioaktiv markierte Sonden verwendet, deren Auflösungsvermögen, verglichen mit heutigen, auf Fluoreszenz basierenden Techniken, relativ schlecht war.

Die FisH ermöglicht selbst Jahre nach der Gewinnung des Materials die Untersuchung von Gewebeschnitten, Auftropfpräparaten oder Blut- und KM-Ausstrichen. Die

Etablierung der Interphase-FisH hat sogar die Hybridisierung auf sich nicht teilende Zellen ermöglicht, so dass auch unkondensiert im Zellkern vorliegende DNA einer Analyse zugänglich wurde und die Zeit für die Kultivierung von Zellen zur Herstellung von Metaphase-Chromosomen-Präparaten entfiel. Interphase-FisH erlaubt die Identifizierung numerischer und struktureller Chromosomenveränderungen auf DNA-Sequenzniveau und schließt somit die Lücke zwischen Molekulargenetik und konventionellen zytogenetischen Methoden⁸².

Als Sonden für FisH eignen sich:

- Zentromer-Sonden mit repetitiven Sequenzen (*chromosome enumeration probe*, CEP)
- Whole Chromosome Paints (WCP)
- Lokus-spezifische Sonden (*locus specific identifier*, LSI)

Chromosomen-spezifische Zentromer-Sonden (CEP), deren Bindungsziel sich im Heterochromatin des Chromosomenzentromers befindende Tandem-repeat α (oder β) Satelliten-Sequenzen sind, werden dazu benutzt, numerische Veränderungen eines Chromosoms sichtbar zu machen oder schnell das Geschlecht zu bestimmen. Über strukturelle Abnormalitäten können mit CEP keine Aussagen getroffen werden.

WCP dienen der Identifizierung von Markerchromosomen, wenn das Bandenmuster keine verlässliche Information liefert. Da die Chromosomen in der Interphase dekondensiert vorliegen, beschränkt der Nutzen der WCP sich auf Metaphase-Präparationen. Kleine interstitielle Deletionen, Inversionen oder Duplikationen entziehen sich der Analyse beim Einsatz von WCP. Der Nachweis solch struktureller Veränderungen oder auch einzelner Gene gelingt mithilfe von LSI. Spezifische Sequenzen werden in Vektoren wie YAC, PAC oder BAC kloniert. Ist die Zielsequenz bekannt, können so Sonden für jeden beliebigen Teil des Genoms hergestellt werden.

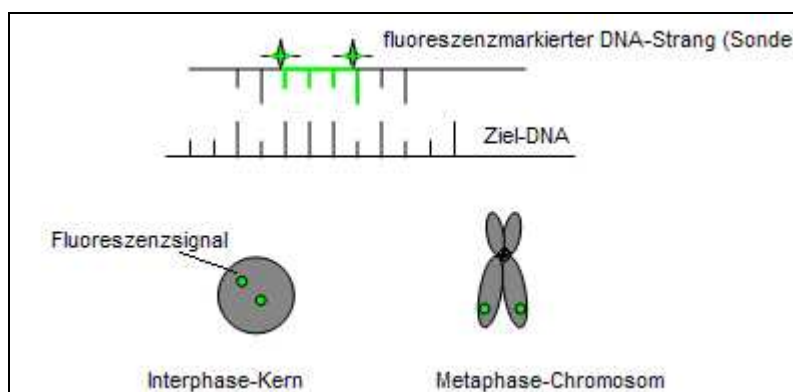


Abbildung 8:
Schematische
Darstellung der
Fluoreszenz-in-situ-
Hybridisierung.

Eine fluoreszenzmarkierte Sonde (grün) bindet an die komplementäre Zielsequenz im Untersuchungsmaterial.

Das für die FisH verwendete Protokoll ist in 2.5.3.5.2 aufgeführt.

2.5.3.1 Verwendete Sonden

2.5.3.1.1 *5q31.3-Sonde und 5p15.33-Sonde*

Ein BAC (*bacterial artificial chromosome*) ist ein aus *E. coli* künstlich hergestelltes bakterielles Chromosom, das typischerweise aus 50-300 Kilobasenpaaren DNA besteht. BACs dienen als Vektoren eingebauter *E. coli*-fremder DNA und erlauben die Klonierung größerer (z. B. humaner) Genomabschnitte, die bis zu einer Größe von >300 Kilobasenpaaren mit hoher Stabilität im BAC verbleiben⁸³. Vorteile von BACs sind die hohe Effizienz des Klonierens und die einfache Handhabung der klonierten DNA. Mithilfe von BAC-Klonen wurde die Erstellung von das gesamte Genom abdeckenden Genom-Bibliotheken enorm erleichtert.

Die Sonde für die 5q31.3-Region und für die Kontrollregion auf dem kurzen Arm von Chromosom 5 wurde mithilfe von spezifischen präparierten BACs (bereitgestellt von Dr. Ullmann, Abteilung Professor Ropers, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin Dahlem) hergestellt, die mit NT mit Fluoreszenzfarbstoffen gelabelt wurden.

Für den Bereich in 5q31.3 (Basenpaare 142706912-142910614) wurde der BAC RP11614D16 verwendet, der mit SpectrumOrange markiert wurde. Dieser BAC wurde ausgewählt, weil er sowohl die in einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe gefundene minimale gemeinsame deletierte Region auf 5q31.3 (Basenpaare 142706911-143119010; Abbildung 9, A, auf der folgenden Seite) abdeckt als auch den von der Arbeitsgruppe um Mullighan als kleinste gemeinsame deletierte Region beschriebenen Bereich (142760000-142847000)³⁷ (Abbildung 9, B). Diese Bereiche enthalten das GR-Gen *NR3C1*.

Der BAC für den Kontrollbereich 5p15.33 (Basenpaare 1568396-1760486), RP11773M18, wurde mit FITC gelabelt.

2.5.3.1.2 *Zentromer-X-Sonde*

Die CEP[®]-Sonde SpectrumAqua von Abbott ist eine direkt markierte Sonde. Sie detektiert chromosomenspezifische Tandem-Repeat DNA-Sequenzen (Adenin-/Thyminreiche α -Satelliten-Sequenzen) in der Zentromerregion (Xp11.1-q11.1, Locus DXZ1) von Chromosom X (Abbildung 10, auf der folgenden Seite). Sie enthält außerdem ungelabelte Blockierungs-DNA um hochrepetitive Sequenzen zu unterdrücken.

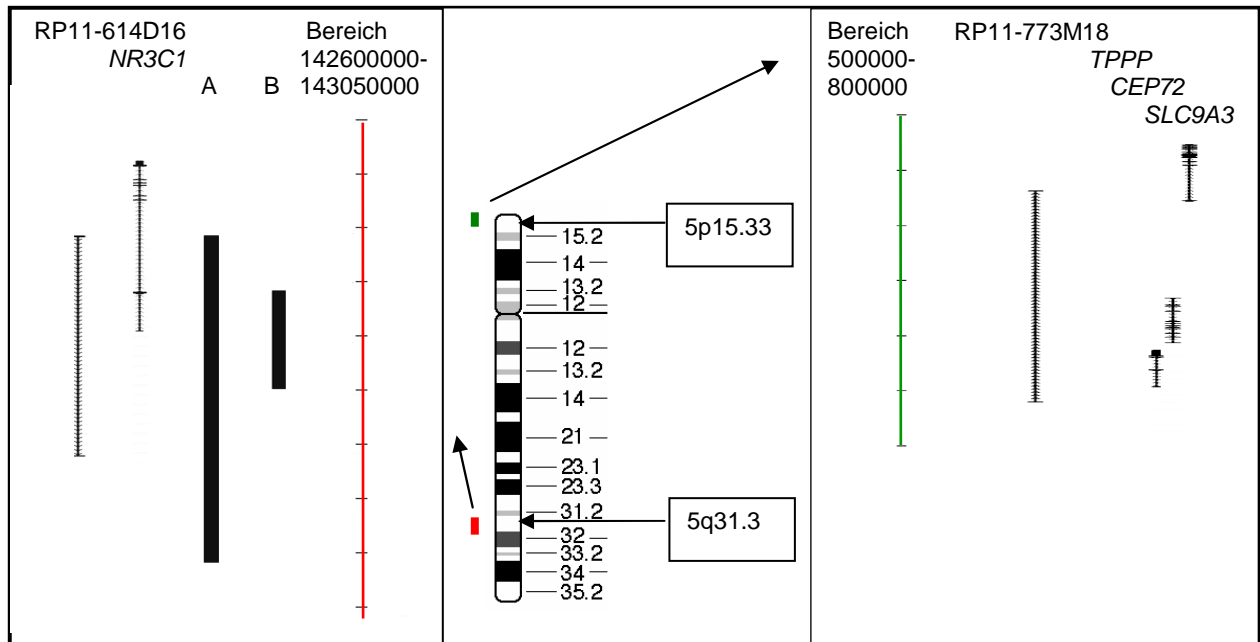


Abbildung 9: Chromosom 5, Bindungsstellen von RP11614D16 (rot) und RP11773M18 (grün) und in diesen Bereichen liegende Gene

A: minimale gemeinsame deletierte Region in einer Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe (Almut Giese, persönliche Mitteilung)

B: minimale gemeinsame deletierte Region in einer Arbeit von Mullighan³⁷

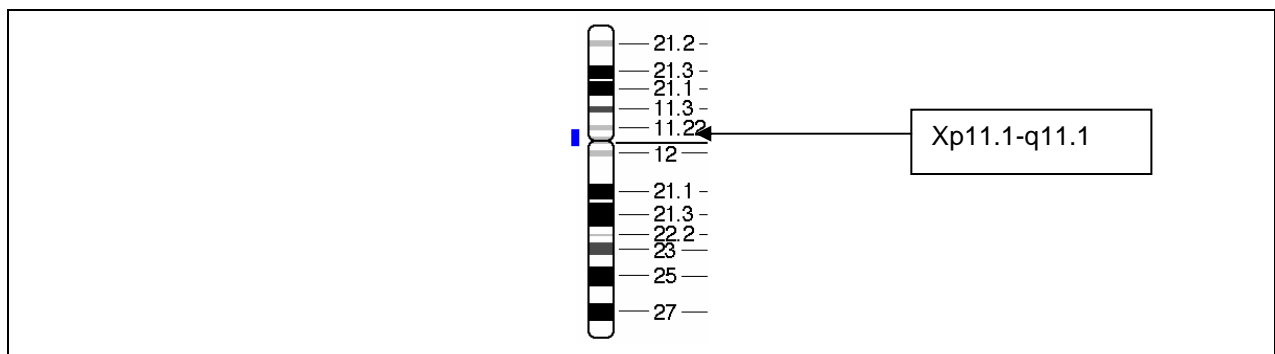


Abbildung 10: Chromosom X, Bindungsort der CEP-X-Sonde (blau)

2.5.3.2 Vorbehandlung der Blut- und Knochenmarkausstriche für die FisH

Um die Hybridisierungseffizienz zu erhöhen und Beiträge von Autofluoreszenz zu verringern, wurden die Ausstriche einer Vorbehandlung unterzogen, durch die das Zytoplasma der Zellen weitgehend entfernt wurde.

Nach einer mehrstündigen Lagerung in -20°C kaltem 70%igen Ethanol wurden die Ausstriche (nach dem verwendeten Protokoll, s. u., angelehnt an⁸⁴) mit einem Gemisch aus Methanol (100%) und Eisessig (100%) im Verhältnis 3:1 behandelt. Dadurch wurden noch vorhandene Erythrozyten lysiert und die DNA in den Zellkernen fixiert.

Jeder Ausstrich wurde vor Beginn der Enzymbehandlung unter dem Lichtmikroskop nach Zellmorphologie und -dichte beurteilt um die nötigen Einwirkzeiten abzuschätzen. Dann wurden zur Vermeidung von Kreuzhybridisierungen Ribonukleinsäuren mit dem Enzym RNase A hydrolysiert. Mit der Protease Pepsin wurden Proteine außerhalb der Zellen, im Zytoplasma und z. T. auch im Zellkern verdaut. So wurde die Permeabilität des Zellkerns erhöht und das Eindringen der Sonde erleichtert.

Durch die enzymatischen Behandlungsschritte wird das Verhältnis Signal-Hintergrund der FisH-Analyse verbessert. Da die Zellkerne durch die Pepsinbehandlung anschwellen, darf die Pepsineinwirkzeit nicht zu hoch sein, weil sonst die Gefahr besteht, dass die Kerne zerfallen. Verschiedene Waschschrte mit Puffern unterschiedlicher Elektrolytkonzentrationen und Temperaturen sowie Entwässerungsschritte mit Alkoholreihen ergänzten die Vorbehandlung. Durch den kurz vor Ende der Vorbehandlungsprozedur eingesetzten Formaldehyd wurden die Zellkerne fixiert. Das für die Vorbehandlung verwendete Protokoll ist in 2.5.3.5.1 aufgeführt.

2.5.3.3 Denaturierung von Ziel- und Sonden-DNA

Für das Gelingen der Hybridisierungsreaktion müssen Ziel- und Sonden-DNA einzelsträngig vorliegen. Dies wurde durch Denaturieren bei einer Temperatur, die über dem Schmelzpunkt liegt, in Anwesenheit von Formamid erreicht. Die Hybridisierung wurde durch Dextransulfat beschleunigt. Durch Tauchen der Objektträger in eiskalten (-20°C) Alkohol bzw. Lagerung der Sonden auf Eis wurde die Denaturierungsreaktion beendet. Anschließend wurden Ziel- und Sonden-DNA ineinander überführt.

2.5.3.4 Gegenfärbung und Einbettung der Kerne

Für die Kerngegenfärbung wurde der in der Fluoreszenzanregung blau leuchtende Farbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) verwendet. Die Anfärbung erleichtert beim Mikroskopieren das Auffinden der Zellkerne. Zum Schutz vor Ausbleichen wurden die Präparate in einem Antifade-Medium (Vectashield) eingebettet und anschließend mit einem 24x60 mm großen Deckglas versehen. Die Präparate wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.5.3.5 Verwendete Protokolle

2.5.3.5.1 *Protokoll für die Vorbehandlung der Blut- und Knochenmarkausstriche*

Die folgende Vorbehandlung der Blut- und KM-Ausstriche soll möglichst am Tag der Hybridisierung durchgeführt werden.

- | | | | |
|---|---|----------------------|------------------------------|
| • | Fixierung der Ausstriche in 70% Ethanol bei -20°C mindestens eine Nacht | | |
| • | Lufttrocknen | | |
| • | Fixieren in Methanol : Eisessig = 3:1 | | 2 x 3 min |
| • | Lufttrocknen | | |
| • | Inkubation in 2x SSC | 37°C | 30 min |
| • | Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe (70%, 90%, 100%) | | je 5 min |
| • | Lufttrocknen | | |
| • | Inkubation mit RNase A (100 µg / ml 2x SSC) * | 37°C | 10-60 min, je nach Zeldichte |
| • | Waschen mit 2x SSC | RT (=Raumtemperatur) | 3 x 5 min |
| • | Waschen mit 1x PBS | RT | 5 min |
| • | Verdauen mit Pepsin (0.005% in 10 mM HCl) # | 37°C | 10 min |
| • | Waschen mit 1x PBS / 50 mM MgCl ₂ (95 ml 1x PBS + 5 ml 1M MgCl ₂) | RT | 5 min |
| • | Fixieren in 1% Formaldehyd / 1xPBS / 50 mM MgCl ₂ (97.3 ml 1x PBS /50 mM MgCl ₂ + 2.7 ml 37% Formaldehyd) | RT | 10 min |
| • | Waschen mit 1x PBS | RT | 3 min |
| • | Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe (70%, 90%, 100%) | | je 2 min |
| • | Lufttrocknen | | |

* RNase A: - Stammlösung durch Lösen von 50 mg RNase A in 5 ml 2x SSC, Konz. = 10 µg/µl und Inkubation für 10 min in kochendem Wasser (im Wasserbad) zubereiten

- Lösung abkühlen lassen und in 100 µl Portionen aliquotieren, bei -20°C lagern

- pro Objektträger ein Gemisch von 1 µl RNase Stammlösung + 99 µl 2x SSC auftragen

- Objektträger mit Deckglas versehen und in einer Alubox im Wasserbad bei 37°C inkubieren

Pepsin: - 99 ml H₂O + 1 ml 1M HCl (10 mM HCl) in der Küvette im Wasserbad auf 37°C vorwärmen

- Stammlösung zubereiten durch Lösen von 10 g Pepsin in 100 ml H₂O (10 % Pepsin) bei 37°C

- Lösung abkühlen und in 50 µl Aliquots bei -20°C lagern

- 50 µl 10% Pepsin kurz vor der Pepsinbehandlung bei 37°C in die vorgewärmte Küvette mit 100 ml 10 mM HCl geben (=0.005% Pepsin)

2.5.3.5.2 *Protokoll für Nick Translation und FisH*

1. **Nick Translations (NT) Ansatz**

- Vor Start der NT wurden folgende Reagenzien vorbereitet:

0.1 mM dTTP-Lösung: 10 µl der 30 mM dTTP aus dem Kit + 20 µl nucleasefreies Wasser

0.1 mM dNTP- Mix (jeweils 10 µl 0.3 mM dATP, 0.3 mM dCTP, 0.3 mM dGTP)

SpectrumOrange und FITC als 0.2 mM Lösungen einsetzen, ggf. nach Anweisung des Herstellers 1 mM Lösungen rekonstituieren und dann verdünnen: 10 µl 1 mM Lösung + 40 µl nucleasefreies Wasser

- sämtliche Lösungen auf Eis lagern, Farbstoffe lichtgeschützt aufbewahren
- folgenden Ansatz auf Eis pipettieren:

nucleasefreies Wasser	14.5	µl
genomische DNA	3.0	µl
0.2 mM Spektrum Orange dUTP bzw. 0.2 mM FITC dUTP	2.5	µl
0.1 mM dTTPs	5	µl

0.1 mM dNTP-Mix	10	µl
10x Nick-Translations-Puffer	5	µl
Nick-Translations-Enzyme	<u>10</u>	µl
Summe	50	µl

- im Cycler inkubieren: 9 h bei 15°C; 10 min bei 75° C

2. Aufreinigung via Ethanol-Fällung

- Mischen von je 5 µl aus beiden NT Ansätzen (SpectrumOrange & FITC)
- Zugabe von 3 µl cot1 DNA (1mg/ml) +1µl HS-DNA (10 mg/ml)
- Zugabe von 35µl Ethanol abs +1.4µl Na Acetat (3M, pH 5.0-5.5)
- Inkubation für 1h bei –80°C oder 2h bei –20°C oder über Nacht bei –20°C
- Zentrifugieren bei 14000 rpm (30 min, 4°C) Überstand verwerfen
- 100µl 70% Ethanol hinzufügen, mixen
- Zentrifugieren bei 14000 rpm (15 min, 4°C) Überstand so weit wie möglich entfernen
- Pellet lufttrocknen bei 37°C (5–10 min)

3. Vorbereitung der Proben auf die Hybridisierung

- Hybridisierungspuffer vorbereiten (2x SSC, 10% Dextransulfat, 50% Formamid pH 7-8)
- Pellet in 7 µl 100% Formamid aufnehmen, dann 7 µl 4x SSC, 20% Dextransulfat zugeben, mind. 20 min bei 37°C lösen lassen
- Zugabe von 0.25 µl CEP X Alpha SpectrumAqua FisH Probe

4a. Denaturierung der Sonde (im Dunkeln)

- Denaturierung bei 85°C im Thermomixer (5 min)
- auf Eis lagern (2 min)
- bei 37°C inkubieren (einige min)

4b. Denaturierung der Ziel-DNA

- Heizplatte vorbereiten (78°C)
- 130 µl Prähybridisierungslösung (2x SSC; 70% Formamid) aufs Deckglas (24x60 mm) auftragen
- Deckglas und Objektträger mit vorbehandelten Ausstrichen vereinigen und inkubieren (RT, 10 min)
- Denaturieren der Objektträger bei 78°C (Denaturierungszeit: 1 min 30 s für Ausstriche, 1 min 15 s für Metaphase-Chromosomenpräparate)
- Deckglas abschütteln und Objektträger sofort in eiskalten 70% Ethanol überführen
- Dehydrierung der Objektträger in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90%, 100% Ethanol; je 2 min)
- Trocknen der Objektträger bei RT, gegebenenfalls abblasen

5. Hybridisierung

- Hybridisierungskammer auf 37°C vorheizen
- den kompletten Ansatz der prähybridisierten Probe auf ein Deckgläschen (18x18mm) überführen
- Deckglas und Objektträger vereinigen
- Objektträger mit Fixogum abdichten
- Hybridisierung über Nacht im Wasserbad (37°C)

6. Waschen der Objektträger

- Wasserbad vorheizen auf 75°C
- Fixogum vorsichtig entfernen
- Deckglas in 2x SSC entfernen
- Objektträger in 1x SSC waschen (75°C, 5 min)
- Objektträger in 4x SSCT (4xSSC, 0.05% Tween 20, pH 7-7.5) waschen (RT, 5 min)
- Objektträger in 1x PBS waschen (RT, 3 min)
- Objektträger abblasen

7. Einbettung und Gegenfärbung

- 300 µl DAPI auftragen, 2 min einwirken lassen
- Waschen mit PBS (1 min), trocknen
- 30 µl Vectashield auftragen
- Objektträger und Deckglas vereinigen, lichtgeschützt lagern

2.5.3.6 Kontrolle der Hybridisierungsspezifität auf Metaphase-Chromosomen

Zur Kontrolle der Bindungsspezifität wurde für jede Präparation von BACs eine Hybridisierung auf Metaphase-Chromosomen von Leukozyten aus peripherem Blut eines gesunden männlichen Spenders durchgeführt. Tabelle 7 fasst die Bindungsstellen der gewählten Sonden und ihre Farbmarkierung zusammen. Ein Beispiel einer Kontrollhybridisierung auf Metaphasen zeigt Abbildung 11, ein entsprechendes Beispielbild von hybridisierten Interphase-Kernen ist in Abbildung 12 zu sehen.

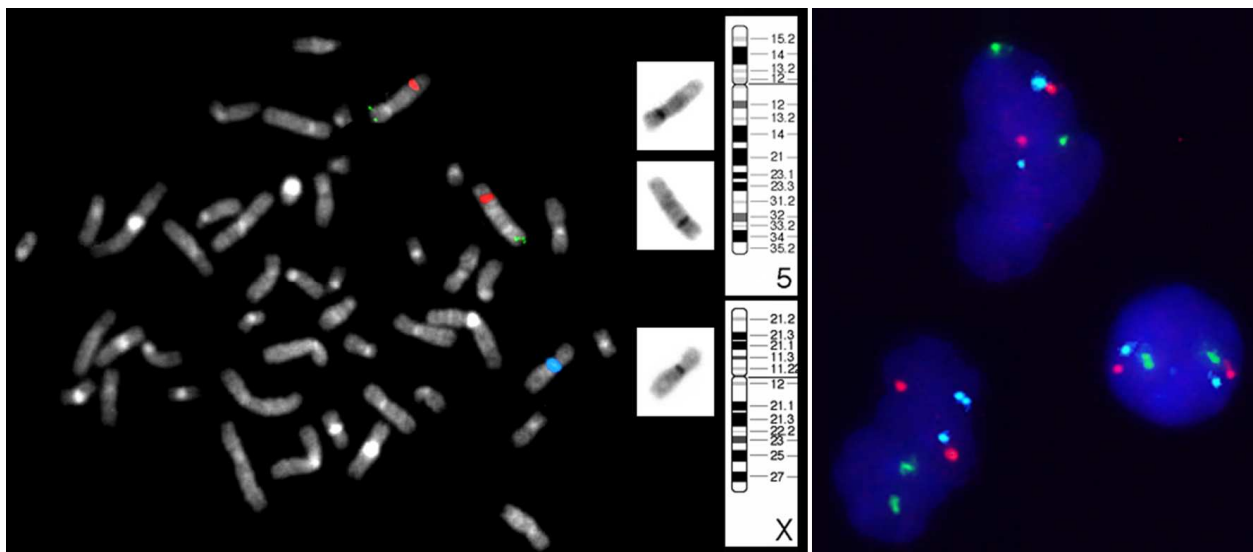


Abbildung 11:
Hybridisierungsergebnis auf Metaphase-Chromosomen
(männlich): Die BACs binden spezifisch.

Abbildung 12:
Hybridisierungsergebnis
auf Interphase-Kernen
(weiblich)

Tabelle 7: Übersicht über Bindungsstellen der BACs und Farbstoffmarkierung

Farbstoff	Sonde	Bindungsstelle in Region
SpectrumOrange (rot)	RP11614D16	5q31.3
FITC (grün)	RP11773M18	5p15.33
SpectrumAqua (blau)	CEP X	Zentromer X

2.6 Auswertung

2.6.1 Automatisierte Fluoreszenzmikroskopie

Die hybridisierten Objektträger wurden mit dem Scanningsystem MetaSystems Metafer-MetaCyte automatisch ausgewertet. Dafür wurde der den Messablauf steuernde, so genannte „Classifier“, der für die Zweifarben-Analyse von Interphase-Zellen entwickelt worden war, für die Dreifarben-Analyse angepasst. Wichtige Parameter wie Zahl und Abstand der Fokusebenen, Schwellenwerte für die Signaldetektion und -verstärkung wurden geprüft. Der Objektisch wurde mit maximal acht Objektträgern bestückt, auf denen jeweils 300 (Blutausstriche) bzw. 400 (KM-Ausstriche) Zellkerne automatisch analysiert und in den vier verwendeten Fluoreszenzfarben (DAPI, SpectrumOrange, FITC, SpectrumAqua) aufgenommen wurden. Da Signale sich überall im dreidimensionalen Zellkern befinden können, wurde jeder Kern in fünf Fokusebenen gescannt („erweiterter Fokus“) und die Bilder anschließend übereinander gelegt („Overlay“). Aus weiteren Bearbeitungsschritten resultierte schließlich ein so genanntes Galleriebild für jeden Zellkern mit vom Programm vorgeschlagenen Signalzahlen. Über die Relokalisierungsfunktion und die Analyse der einzelnen Fokusebenen des erweiterten Fokusbildes wurde die Richtigkeit der automatisierten Analyse kontrolliert. Leider ist bei einem normalen Scanvorgang mit der MetaCyte-Version 2.6.5 die Darstellung der verwendeten vier Farbstoffe nur in der Gallerieübersicht möglich, die Original Overlay-Bilder zeigen in dieser Programmversion nur zwei Signalfarben. In Abbildung 13 sind die einzelnen Schritte der automatisierten Bildgewinnung und –analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt.

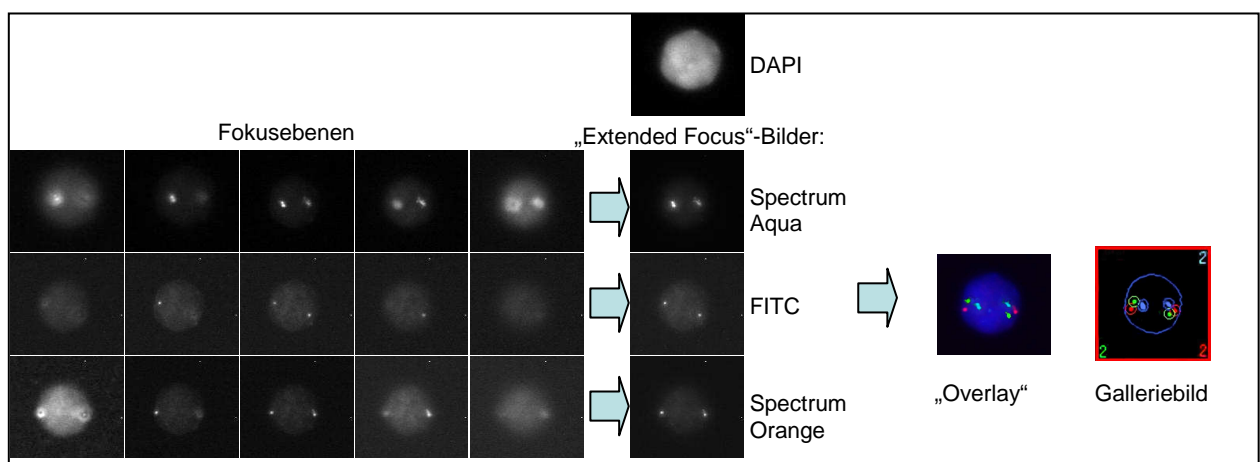


Abbildung 13: Automatisierte Bildgewinnung und -analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Galleriebilder wurden anschließend manuell geprüft und im Einzelfall korrigiert. Dabei wurden folgende Kriterien angewendet (nach den Empfehlungen der Firma Abbott, siehe Abbott-Webseite

http://www.abbottmolecular.com/DualColorEnumeration_36752.aspx),

ergänzt für MetaCyte-Bildgalerien:

- Diffuse Signale werden gezählt, wenn sie von anderen Signalen getrennt liegen.
- Gesplittete Signale, also zwei kleinere Signale, die sehr nah beieinander liegen, werden als ein Signal gewertet, da sie sich auf einem Chromosom befinden.
- Zwei durch einen Fluoreszenzstrang verbundene Signale werden als eins gezählt.
- Wenn Signale verschiedener Farbe in einem Kern überlappen, wird entweder die Zelle oder das Signal ausgeschlossen, je nach Größe des überlappenden Signals.

NICHT gezählt werden

- Zellkerne, die überlappen.
- Zellen ohne Signale, außer wenn sie von Zellen mit Signalen umgeben werden.
- zerstörte Nuklei.
- unspezifische Hintergrund-Signale, die anhand ihrer geringeren Intensität und unterschiedlichen Form identifiziert werden können.
- Kerne, die auch Signale außerhalb der Kernperipherie aufweisen.
- Zellkerne in Bildern, die wegen eines stark fluoreszierenden, in einem Zellkern liegenden, Hintergrundsignals zu kurz belichtet sind.
- Nuklei, die nicht scharf fokussiert sind.
- Zellkerne, die nicht sicher zu interpretieren sind.

Abbildung 14 (auf der folgenden Seite) zeigt Beispiele von Zellkernen, die von der Auswertung ausgeschlossen wurden (1, 2, 4, 6) bzw. deren Signanzahl korrigiert wurde (3, 5).

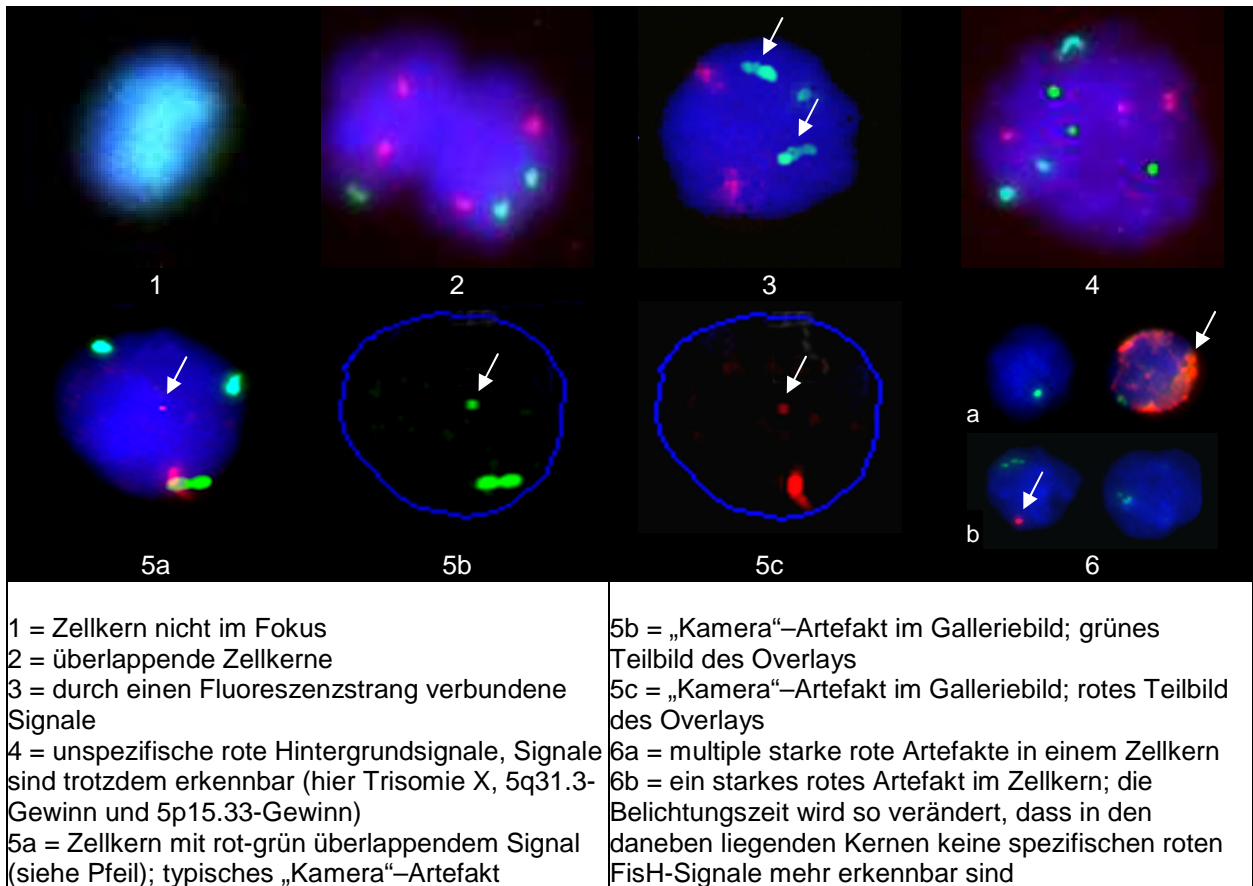


Abbildung 14: Beispiele für Zellkerne, die von der Auswertung ausgeschlossen wurden (1, 2, 4, 6) oder deren Signalzahl korrigiert wurde (3, 5) (5q31.3-Signale = rot; 5p15.33-Signale = grün, X-Signale = blau)

Nach Ausschluss der nicht interpretierbaren Zellkerne blieben bei den Blutausstrichen durchschnittlich 245, bei den KM-Ausstrichen 261 Kerne für die FisH-Analyse übrig (Abbildung 15).

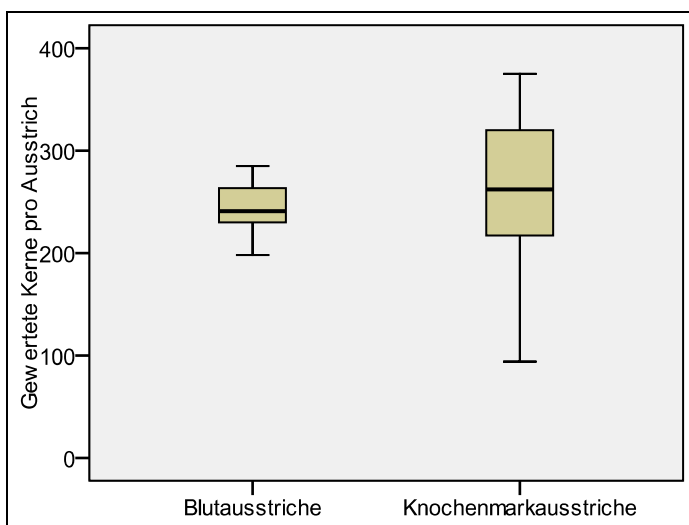


Abbildung 15: Mittlere Anzahl von Zellkernen pro Blut- bzw. Knochenmarksausstrich nach Ausschluss nicht interpretierbarer Kerne.

Eine Boxplotdarstellung mit Minimum, Maximum, Median, 25. und 75. Perzentile ist gezeigt.

2.6.2 Weiterverarbeitung der Daten

Die für jeden Objektträger aus der Gallerieauswertung gewonnenen Daten (Anzahl roter, grüner und blauer FisH-Signale für jeden Zellkern) wurden als txt-Dateien exportiert und mithilfe eines Makros in Microsoft Office Excel 2007 in Gruppen sortiert. Dabei wurden jeweils alle Kerne mit der gleichen Signalkombination aufsummiert. Anschließend wurden die Häufigkeiten für Gewinn oder Verlust der roten (5q31.3), grünen (5p15.33) und blauen (Chromosom X) Signale (in Prozent) berechnet.

Verlust (im Folgenden auch als „zusammengefasster Verlust“ bezeichnet) roter oder grüner Signale bedeutete das Vorhandensein von weniger als zwei (null oder eins), Gewinn (im Folgenden auch als „zusammengefasster Gewinn“ bezeichnet) das Vorhandensein von mehr als zwei (drei, vier oder fünf) roten bzw. grünen Signalen in einem Zellkern. Je nach Geschlecht wurde die Anwesenheit von null (bzw. null oder einem) blauen (Chromosom X) Signalen als Verlust gewertet sowie die Anwesenheit von mehr als einem (bzw. mehr als zwei) Chromosom-X-Signalen als Gewinn. Die tabellarische Erfassung der Häufigkeiten einzelner Signalzahl-Kombinationen gestattete auch die Analyse spezifischer Subpopulationen von Leukämiezellen.

2.6.3 Subpopulationsanalyse

Insgesamt wurden 216 mögliche Subpopulationen mit Signalkombinationen von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X identifiziert. Dabei wurden alle theoretisch möglichen Kombinationen von je null Signalen in allen drei Regionen bis zu je fünf Signalen pro Zelle und Region erfasst. In den folgenden Analysen und Auswertungen werden die **Signalkombinationen mit drei Zahlen abgekürzt: Die Erste steht für die Anzahl von 5q31.3-Signalen, die Zweite für die Anzahl von 5p15.33-Signalen und die Dritte für die Anzahl von Chromosom-X-Signalen.**

D. h. eine Zelle ohne Signale wird mit „0-0-0“ bezeichnet und eine Zelle mit je fünf Signalen in jeder Region mit „5-5-5“.

Alle Signalkombinationen, die in einem höheren Prozentsatz von Zellen als die durch den höchsten Cut-off Wert festgelegte Grenze vorkamen (siehe Tabelle 8), wurden als richtig positiv gewertet sowie Kombinationen, bei denen nur in einer Region ein Verlust oder Gewinn gesehen wurde, wenn diese Veränderung in einem Prozentsatz von Zellen über dem Cut-off Wert für den jeweiligen Verlust oder Gewinn auftauchte. Bei Mutationen in mehr als einer Region wurde der jeweils höhere Cut-off Wert gewählt. Beispielsweise wurden für die Kombination 1-2-2 (Frauen) bzw. 1-2-1 (Männer), deren

einzigste Veränderung der Verlust eines 5q31.3-Signals ist, nur Zellgruppen mit dieser Kombination, die einen Prozentsatz von >7.78 % der Zellen ausmachten, als richtig positiv gezählt, da dies der Cut-off Wert für den Verlust von 5q31.3 ist (siehe Tabelle 8). Da hier nur eine Region verändert ist, fällt die Entscheidung, welcher Cut-off Wert verwendet werden muss, leicht. Für eine komplexere Kombination wie 1-1-2 (Frauen) bzw. 1-1-1 (Männer), bei der mehr als eine Region deletiert ist, in diesem Fall 5q31.3 und 5p15.33, wurde von den Cut-offs 7.78% (5q31.3-Verlust) und 9.62% (5p15.33-Verlust) der höhere, also 9.62% gewählt. Das heißt, dass nur für ALL, die diese Kombination in mehr als 9.62% ihrer ALL-Zellen tragen, ein reeller Subklon dieser Art angenommen wurde.

2.7 Statistische Methodik

Die klinische Bedeutung der mit Fish gefundenen chromosomalen Veränderungen bei den untersuchten Patienten mit ALL-Erstrezidiv wurde mithilfe der SPSS-Software für Windows (SPSS Inc., Version 17.0, Chicago, Illinois, USA) statistisch analysiert. Dabei wurden die Patienten in Gruppen eingeteilt und hinsichtlich klinischer Parameter verglichen. Das Geschlecht (männlich oder weiblich), der Rezidivort (KM isoliert oder kombiniert mit ZNS, Testis oder anderen extramedullären Rezidivorten) und der periphere Blastenteil (eingeteilt in drei prognostisch bedeutsame Gruppen) wurden als kategorielle Variablen definiert. Da in dieser Arbeit nur Patienten mit spätem Rezidiv untersucht wurden, erübrigte sich die Analyse des Rezidivzeitpunkts. Zur Unabhängigkeitstestung der kategoriellen Variablen wurde der Fisher's Exact Test verwendet, der sich gut zur Untersuchung kleiner Fallzahlen eignet. Es wurde zweiseitig getestet. Mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurden Gruppenunterschiede für die stetigen Variablen Alter bei Erst- und Rezidivdiagnose, Dauer der Erstremission, Leukozytenzahl und Prozentsatz peripherer Blasten zum Diagnosezeitpunkt analysiert. Die Wahrscheinlichkeit ereignisfreien Überlebens (pEFS) wurde mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Es wurden Fälle, bei denen ein Ereignis eingetreten war, von „zensierten Fällen“, bei denen bis zum Ende des Beobachtungszeitraums kein Ereignis stattgefunden hatte, unterschieden. Unter „Ereignis“ wurde das Auftreten eines Folgerezidivs, Zweitmalignoms oder Versterbens zusammengefasst. Der Beobachtungszeitraum im vorliegenden Kollektiv betrug 144 Monate (September 1996 bis September 2008). Die Signifikanz für pEFS-Unterschiede wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt. Boxplots wurden ebenfalls in SPSS erstellt.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0.05$ wurde als signifikant betrachtet und mit einem Sternchen (*) symbolisiert, ≤ 0.001 als sehr signifikant (**) und ≤ 0.0001 als höchst signifikant (***).

3. Ergebnisse

3.1 Cut-off Werte

Zur Bestimmung der Cut-off Werte wurden Blutausstriche von 20 gesunden erwachsenen Probanden mit den Sonden für die Regionen 5q31.3, 5p15.33 und Zentromer X hybridisiert. Pro Objektträger wurden im Mittel 245 Kerne ausgewertet (siehe Abbildung 15). Danach wurden die Mittelwerte für Gewinn oder Verlust roter, grüner und blauer Signale errechnet. Der Cut-off Wert ergibt sich aus der Summe des Mittelwerts und der dreifachen Standardabweichung. Alle Werte, die über dem Cut-off liegen, werden als positiver Befund interpretiert.

3.1.1 Korrektur des Cut-off Werts für Chromosom-X-Verlust

Der Blutausstrich einer Probandin (#4) zeigte ungewöhnlich viele Zellen mit Verlust eines Chromosom X. Diese Beobachtung wurde durch wiederholte Analysen unterschiedlicher Bereiche des Blutausstrichs und durch Hybridisieren eines zweiten Blutausstrichs dieser Probandin bestätigt (Abbildung 16), so dass ein technisches Artefakt sehr unwahrscheinlich ist. In der den Sachverhalt darstellenden Boxplot-Darstellung (Abbildung 17) wird der Median durch die mittige Linie in der Box angezeigt. Die obere und untere Grenze der Box stehen für die 75. und 25. Perzentile. Die „whiskers“ markieren hier nicht, wie in der Boxplot-Variante ohne Ausreißer-Darstellung, das Maximum und Minimum, sondern reichen bis zum höchsten bzw. niedrigsten Datenpunkt, der in einem Bereich liegt, der kleiner als die 1.5 fache Höhe der Box ist. Werte außerhalb dieses Bereichs werden mit Kreisen gekennzeichnet, Werte, die in einer größeren Entfernung als die dreifache Box-Höhe liegen, mit einem Stern. Diese Werte sind als Ausreißer (°) - bzw. Extremwerte (*) definiert.

In den übrigen untersuchten Regionen wurden in der Boxplot-Darstellung keine Ausreißer-Werte gefunden (Abbildung 17).

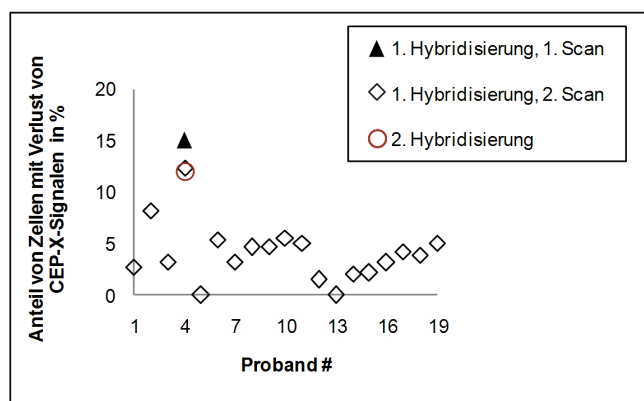


Abbildung 16:
Zellen mit verminderter
Chromosom-X-Signalzahl in
Blutausstrichen von 20
Probanden

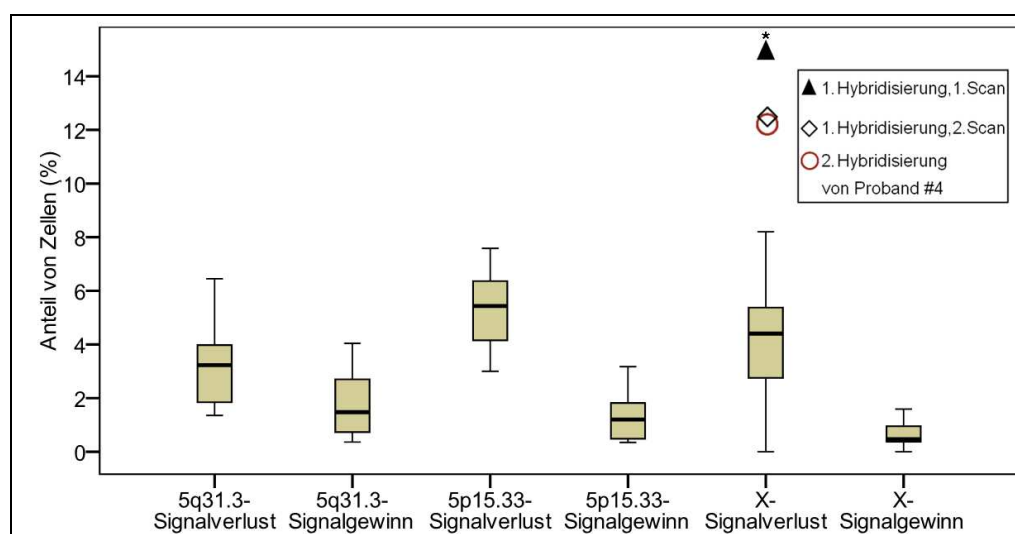


Abbildung 17: Häufigkeiten der Signalgewinne und –verluste von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X (%) in den Blutausstrichen der Kontrollpersonen

Da phänotypisch bei keinem der Probanden ein X0-Karyotyp (Turner-Syndrom) vorliegt, könnte es sich entweder um einen echten Mosaik-Karyotyp, eine Mosaik-Aneuploidie (XX; X0) oder physiologischen, mit zunehmenden Alter assoziierten Chromosom-X-Verlust handeln. In der Literatur wird ein signifikanter Zusammenhang zwischen zunehmendem Verlust von Chromosom X und fortschreitendem Altern beschrieben. Eine Studie an 665 Frauen zwischen 0 und 80 Jahren zeigte, dass bei den unter 16jährigen 0.07%, bei den über 65jährigen aber 7.3% der Zellen nur ein Chromosom X besitzen⁸⁵. Die Arbeitsgruppe um Guttenbach beobachtete ebenfalls, bereits mehr als zehn Jahre vorher, einen erhöhten Anteil von Zellen mit Monosomie X bei Frauen zwischen 51 und 91 Jahren⁸⁶. Autosomen sind von solchen Altersveränderungen nicht betroffen. Außerdem ist der Chromosom-X-Verlust ein Phänomen, das nur in bestimmten Geweben auftritt. So wird er zwar in T-Lymphozyten aus peripherem Blut älterer Frauen häufig gefunden, nicht jedoch im KM⁸⁵. Da als Untersuchungsmaterial

KM-Ausstriche verwendet wurden und die Patienten Kinder waren, die Probandengruppe aber aus Erwachsenen bestand, wurde der Entschluss gefasst, den Chromosom-X-Verlust der erwähnten Probandin als wahrscheinlich altersbedingte Veränderung zu werten und nicht in die Cut-off Berechnung einzuschließen.

Tabelle 8 zeigt die Cut-off Werte für Verlust oder Gewinn der untersuchten Regionen:

Tabelle 8: Ergebnisse der Hybridisierung der Kontrollblutausstriche und Cut-off Werte für Gewinne und Verluste der untersuchten Regionen

Proband #	Geschlecht	Gewertete Kerne	Anteil von Zellkernen (%) mit Signalen für					
			5q31.3		5p15.33		X	
			<2 Signale	>2	<2	>2	<2 (w) <1 (m)	>2 (w) >1 (m)
1	w	255	3.92	0.39	6.27	2.35	2.75	0.00
2	w	244	4.92	1.23	7.38	1.23	8.20	0.00
3	w	285	1.75	0.70	4.21	0.35	3.16	0.35
4	w	255	1.59	3.97	3.17	3.17	(12.30)	1.59
5	m	220	1.82	0.91	5.91	1.36	0.00	0.45
6	w	223	1.35	3.59	5.83	0.45	5.38	0.90
7	w	283	5.65	0.71	6.01	0.71	3.18	0.71
8	w	227	3.80	1.69	4.22	0.84	4.64	1.27
9	w	233	3.43	1.72	3.00	0.86	4.72	0.86
10	w	237	2.11	0.84	5.06	1.27	5.49	0.42
11	w	198	4.04	4.04	7.07	0.51	5.05	1.01
12	w	269	1.86	0.74	4.09	0.37	1.49	1.12
13	m	263	5.32	2.28	6.46	1.52	0.00	1.52
14	w	238	1.68	2.10	3.36	2.52	2.10	0.42
15	w	237	2.95	1.69	5.49	2.53	2.11	0.84
16	w	256	2.34	3.13	7.03	1.17	3.13	0.00
17	w	264	3.03	0.38	7.58	0.38	4.17	0.38
18	w	204	3.92	3.43	4.41	1.96	3.92	0.49
19	w	238	3.78	1.26	3.78	1.68	5.04	0.42
20	w	279	6.45	0.36	5.38	0.36	5.38	0.36
Mittelwert			3.29	1.76	5.29	1.28	4.11	0.66
Standardabweichung			1.50	1.25	1.44	0.85	2.76	0.47
3*Standardabweichung			4.49	3.74	4.33	2.56	8.28	1.42
Cut-off			7.78	5.50	9.62	3.84	12.39 9.76*	2.07
Cut-off zur Bestimmung von Verlusten oder Gewinnen eines Allels [#]			7.52	5.49	9.51	3.88	9.76*	2.03

* korrigierter Wert nach Ausschluss von Proband #4

[#] Anteile einzelner Probanden, Mittelwert und Standardabweichung sind nicht gezeigt

3.2 Interphase-FisH-Analyse des Patientenmaterials

Insgesamt konnten KM-Ausstriche von 19 Kindern mit *TEL-AML1* positiver ALL und 26 Kindern mit *TEL-AML1* negativer ALL zum Zeitpunkt der Erstrezidivdiagnose mit den Sonden für die Regionen 5q31.3, 5p15.33 und Zentromer X hybridisiert werden. Pro KM-Ausstrich wurden 400 Zellkerne gescannt. Nach Abzug der nicht beurteilbaren Kerne wurden im Mittel 261 Zellkerne ausgewertet. Dabei wurden in sieben Fällen

weniger als 200, in 24 Fällen zwischen 200 und 300 und bei 14 Patienten über 300 Kerne interpretiert. Häufige Signalkombinationen sind in Abbildung 18 gezeigt.

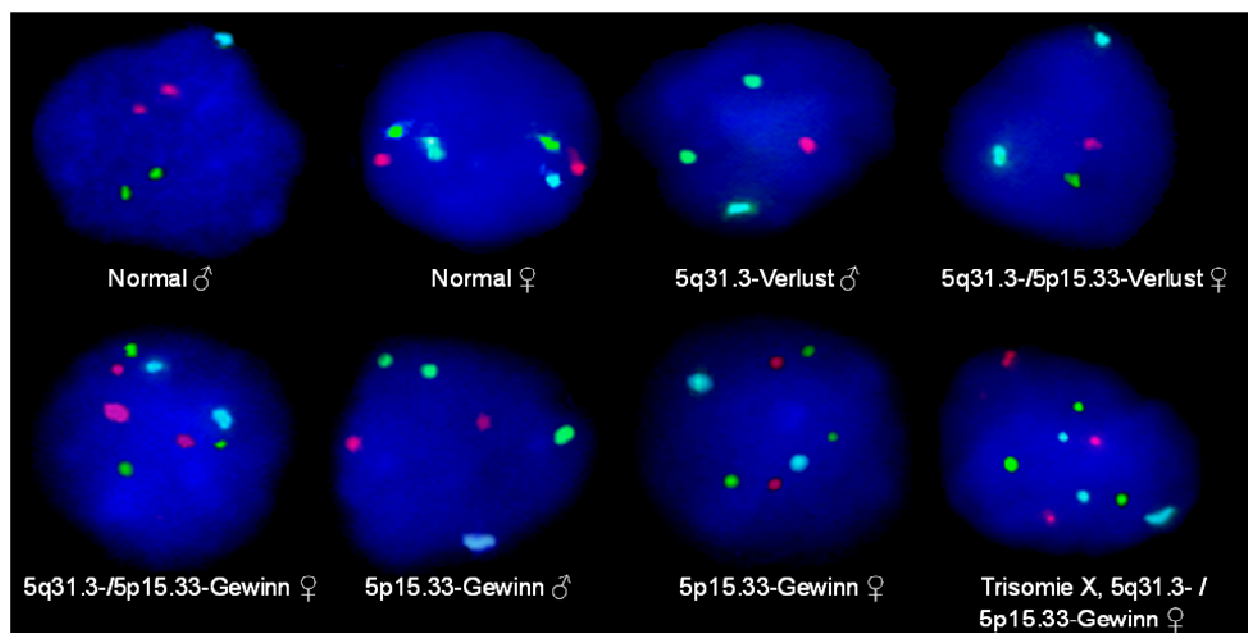


Abbildung 18: Häufig gefundene Kombinationen von Gewinnen und Verlusten von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X in den KM-Ausstrichen der Patienten mit ALL-Rezidiv (5q31.3-Signale = rot; 5p15.33-Signale = grün, Chromosom-X-Signale = blau)

3.2.1 Gewinne und Verluste der untersuchten Regionen

Zehn der 19 untersuchten *TEL-AML1* positiven (52.6%) und 18 der 26 *TEL-AML1* negativen ALL (69.2%) zeigten in mindestens einer Region Veränderungen über der Cut-off Grenze (Tabelle 10). In sieben (36.8%) *TEL-AML1* positiven und fünf (19.2%) *TEL-AML1* negativen ALL wurde ein Verlust von 5q31.3 gesehen. Hinzugewonnen war diese Region bei einer *TEL-AML1* positiven ALL (5.3%) und bei drei *TEL-AML1* negativen ALL (11.5%). Je vier (21.1%) Patienten wiesen in ihren für das Fusionsprotein positiven Blasten eine Deletion oder einen Gewinn der Kontrollregion auf Chromosom 5, 5p15.33, auf, wohingegen ein 5p15.33-Verlust bei zwei (7.7%) und ein Gewinn bei fünf (19.2%) *TEL-AML1* negativen ALL auftrat. Ein Chromosom-X-Verlust wurde bei einem Mädchen mit *TEL-AML1* positiver ALL (5.3%) gefunden aber bei keiner *TEL-AML1* negativen ALL. Von diesen zeigten jedoch mehr als die Hälfte ($n = 15$, 57.7%) einen Gewinn von mindestens einem Chromosom X. Diese Veränderung trat nur bei drei Jungen mit *TEL-AML1* positiver ALL (15.8%) auf. In Abbildung 19 werden Gewinne und Verluste in den Blasten der *TEL-AML1* positiven und negativen ALL dargestellt (19a) und Signalverluste und –gewinne sowohl zusammengefasst (19b) als auch für einzelne Allele aufgeschlüsselt (19c) gezeigt.

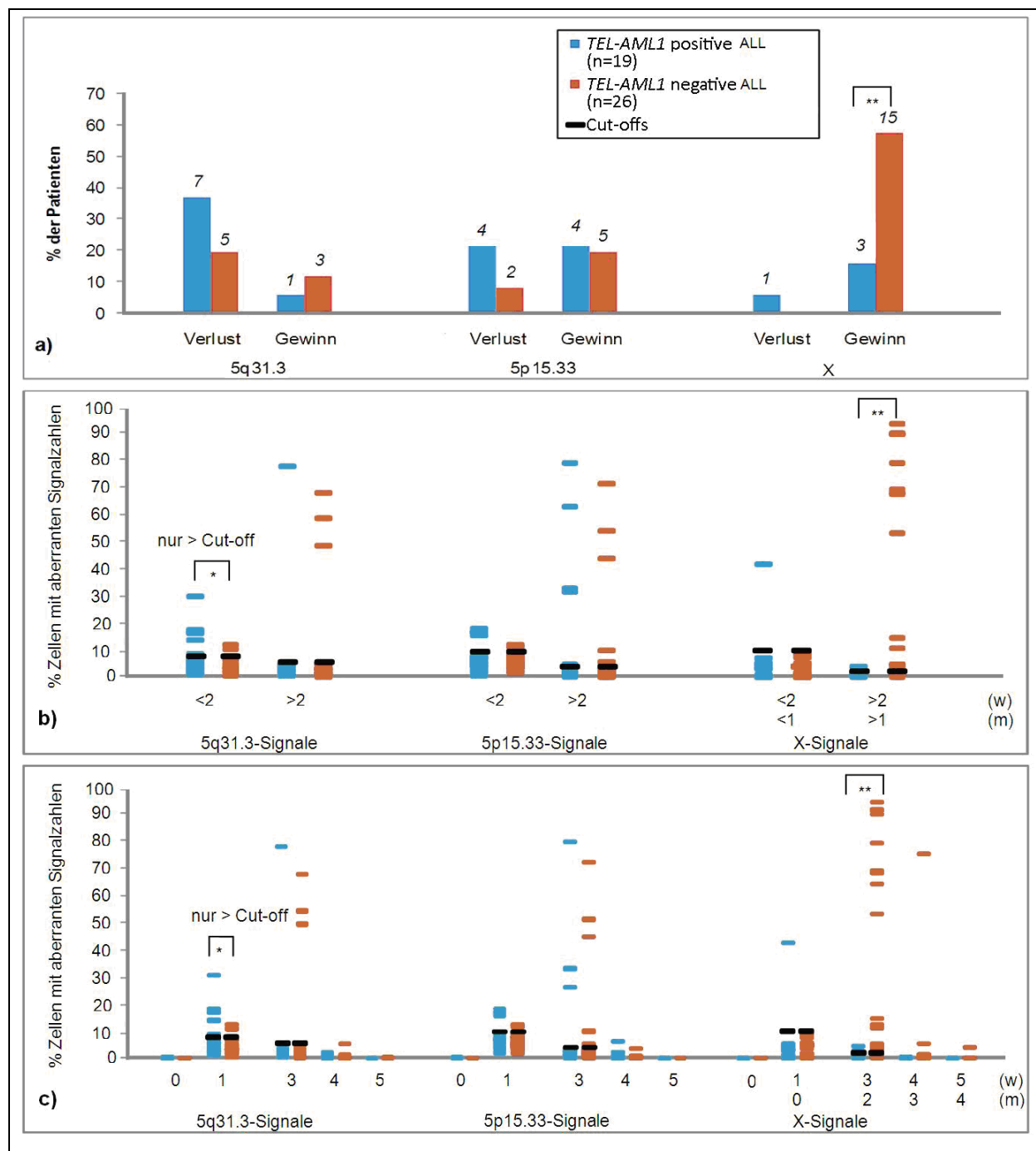


Abbildung 19: Vergleich zwischen *TEL-AML1* positiven und negativen ALL hinsichtlich

a) der Häufigkeiten von Gewinnen und Verlusten der untersuchten Regionen. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$ im Fisher's Exact Test) sind mit Sternchen (*) markiert. Zahlen über den Säulen bezeichnen die Anzahl der ALL mit der jeweiligen Veränderung.

b) des prozentualen Anteils von Zellen mit Signalgewinnen und -verlusten der untersuchten Regionen. Jeder waagerechte Strich repräsentiert einen Patienten, d. h. jede Kolumne besteht aus 19 (*TEL-AML1* positive) bzw. 26 (*TEL-AML1* negative ALL) Strichen, die z. T. übereinander liegen. Die jeweiligen Cut-off Werte sind durch schwarze Balken markiert. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$ im Mann-Whitney-U-Test) sind mit Sternchen markiert.

c) des prozentualen Anteils von Zellen mit Signalgewinnen und -verlusten einzelner Allele. Wie in b) steht jeder waagerechte Strich für einen Patienten. Die Cut-off Werte sind durch schwarze Balken markiert. Für 0, 4 und 5 Signale wurden aufgrund der geringen Ereigniszahlen in den Kontrollblutausstrichen keine Cut-off Werte festgelegt. Signifikante Unterschiede im Mann-Whitney-U-Test sind mit Sternchen markiert.

Im Fisher's Exact Test und im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Häufigkeiten bzw. der Höhe des Chromosom-X-Gewinns zwischen *TEL-AML1* positiven und negativen ALL (Abbildung 19, Tabelle 9). Die 5q31.3-Verluste traten bei *TEL-AML1* positiven ALL in signifikant mehr Zellen über dem Cut-off Wert auf als bei *TEL-AML1* negativen ALL. Für die Gewinne und Verluste einzelner Allele ergab sich nur für den prozentualen Anteil von Zellen mit 5q31.3-Verlust über dem Cut-off Wert und für Zellen mit X-Gewinn ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Wie Abbildung 19c zu entnehmen ist, treten Verluste beider Allele und Gewinne von mehr als einem Allel in den Blasten der Patienten kaum auf, so dass im Folgenden auf diese Aufschlüsselung verzichtet wird.

Tabelle 9: Statistische Auswertung von Signalgewinnen und –verlusten bei *TEL-AML1* positiven und negativen ALL

Region		5q31.3					5p15.33					X				
Signalzahl		<2		>2			<2		>2			<2 (w) <1 (m)	>2 (w) >1 (m)			
Test	Vergleich von															
a) Fisher's Exact Test	Häufigkeiten der Gewinne/Verluste	n. s.										0.006**				
b) Mann- Whitney-U- Test	Höhe der Signalgewinne/- verluste	0.055		n. s.										0.003**		
nur Werte > Cut-off	Höhe der Gewinne/Verluste	0.015*		n. s.										n. d.	0.032*	
	Signalzahl (einzelne Allele)	0	1	3	4	5	0	1	3	4	5	0	1 (w) 0 (m)	3 (w) 2 (m)	4 (w) 3 (m)	5 (w) 4 (m)
c) Mann- Whitney-U- Test	Höhe der Signalgewinne/- verluste einzelner Allele	n. s.	0.062	n. s.										0.005**		n. s.
nur Werte > Cut-off	Höhe der Gewinne/Verluste einzelner Allele	n. d.	0.015*	n.s	n. d.	0.057	n.s	n. d.			0.031*		n. d.			

Gezeigt werden nur p-Werte nahe oder unterhalb des Signifikanzniveaus. Die Buchstaben a), b) und c) beziehen sich auf die in Abbildung 19 gezeigten Sachverhalte.

3.2.2 Vergleich zwischen Fish-Ergebnissen und DNA-Index

Der DNA-Index, der eine Aussage über den DNA-Gehalt leukämischer Blasten erlaubt, kann mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Er berechnet sich aus dem Quotienten der Mittelwerte des aneuploiden G0/G1-Peaks und des diploiden Werts und hat keine Einheit. Ein DNA-Index von 1 bedeutet, dass die Zelle den DNA-Gehalt einer

normalen diploiden Zelle hat, ein DNA-Index >1 , dass die Chromosomenzahl >46 ist. Für die ALL im Kindesalter gibt es eine Assoziation zwischen einem DNA-Index ≥ 1.16 und einer Hyperdiploidie mit >50 Chromosomen.

Tabelle 10 (auf der folgenden Seite) zeigt, dass für die 17 von 45 ALL, bei denen Ploidie-Daten verfügbar waren, die DNA-Indices im peridiploiden Bereich von 0.98-1.11 lagen. Bei elf dieser 17 ALL konnten mit Interphase-FISH Gewinne bzw. Verluste in mindestens einer der drei untersuchten Regionen in den Zellen gefunden werden (fünf *TEL-AML1* positive vs. sechs *TEL-AML1* negative ALL), während sechs (drei vs. drei) ALL keine Veränderungen zeigten.

Tabelle 10: Übersicht über Gewinne und Verluste der untersuchten Regionen bei *TEL-AML1* positiven / negativen ALL

NR	SEX	MRD	5q31.3		5p15.33		X		DI	
			Verlust (%)	Gewinn	Verlust	Gewinn	Verlust	Gewinn		
TEL-AML1 positive ALL										
1	w	0	16.38	1.72	16.81	3.45	4.31	0.43	1	
2	w	0	16.90	1.03	16.55	1.03	41.72	0.00	n. d.	
3	w	1	17.77	3.14	6.97	32.75	5.23	1.74	n. d.	
(3-2)	w	n. d.	2.56	4.03	0.37	63.00	25.27	0.73	n. d.)	
4	m	1	7.25	4.64	6.38	4.64	0.00	4.06	n. d.	
5	w	2	13.93	3.28	18.03	0.82	4.92	2.05	1	
6	w	2	0.94	78.13	2.50	79.38	3.13	1.88	1.11	
7	m	1	13.41	3.07	15.33	1.92	0.00	1.53	1,1	
8	w	2	8.76	3.11	5.08	1.98	2.54	1.98	1	
9	m	0	3.39	1.69	6.78	1.13	0.00	1.69	1	
10	m	2	6.52	3.26	8.33	2.90	0.36	2.17	n. d.	
11	m	2	2.47	1.92	7.42	1.10	0.00	1.65	n. d.	
12	m	0	1.94	5.00	1.94	1.94	0.00	1.94	n. d.	
13	w	1	5.34	3.05	3.82	3.44	3.44	1.15	1	
14	m	0	3.31	2.48	5.79	2.89	0.00	0.83	n. d.	
15	m	2	5.78	0.72	6.86	1.08	1.08	0.72	1	
16	m	3	2.41	1.51	4.52	0.60	0.00	0.90	n. d.	
17	m	0	5.07	1.38	7.37	0.46	0.00	0.92	n. d.	
18	w	2	4.27	0.53	4.00	0.00	2.93	1.33	n. d.	
19	m	0	29.85	2.61	5.22	31.72	0.00	2.24	n. d.	
(REH)	w	n. d.	5.70	1.27	6.65	1.27	98.42	0.00	n. d.)	
TEL-AML1 negative ALL										
1	m	2	3.15	5.24	8.74	3.15	0.00	1.40	n. d.	
2	m	2	10.49	1.23	4.94	1.85	0.00	90.12	1	
3	m	2	2.95	2.11	5.91	0.42	0.00	89.87	n. d.	
4	m	1	1.83	4.89	6.73	1.83	0.00	4.89	n. d.	
5	m	0	6.54	3.27	7.48	9.81	0.00	14.49	1	
6	w	2	0.68	68.14	1.69	71.53	1.69	69.49	n. d.	
7	w	0	2.88	3.29	4.53	2.88	0.00	89.71	n. d.	
8	m	0	11.96	2.45	8.90	1.23	0.00	1.53	1	
9	m	1	6.67	2.50	9.58	2.50	0.00	1.67	n. d.	
10	m	2	2.43	1.46	5.34	2.91	0.00	1.94	n. d.	
11	w	3	3.35	3.35	5.26	1.44	3.35	0.96	1	
12	m	0	3.52	1.32	4.41	3.08	0.00	93.83	n. d.	
13	w	1	7.52	3.27	7.84	1.31	4.90	1.63	n. d.	
14	w	2	7.83	3.69	11.98	3.69	4.15	0.46	n. d.	
15	w	0	2.04	58.67	2.55	54.08	0.00	68.37	n. d.	
16	w	3	1.95	5.19	6.17	0.65	0.97	79.22	n. d.	
17	m	3	4.67	3.50	3.89	1.95	0.39	3.89	n. d.	
18	m	3	3.40	0.00	3.40	0.00	0.00	10.88	0.98	
19	m	3	0.90	48.65	3.60	44.14	0.00	53.15	n. d.	
20	w	2	4.41	1.47	4.41	0.00	4.41	2.94	1	
21	w	1	4.98	2.07	5.81	3.32	7.47	1.24	n. d.	
22	w	1	2.13	3.19	4.26	2.13	8.51	0.00	1	
23	w	2	3.82	1.47	4.41	1.47	1.47	67.94	n. d.	
24	w	2	7.79	4.67	7.48	5.61	4.98	4.67	n. d.	
25	w	1	11.98	2.99	11.38	2.40	5.39	1.20	1	
26	w	0	3.57	1.19	7.74	1.79	4.17	0.60	1	

Werte über dem Cut-off sind fett markiert.

DI = DNA-Index; n. d. = nicht durchgeführt; 3-2: Zweitrezidiv von Patient #3 (*TEL-AML1* positive ALL)

Gleichfarbige Felder in einer Zeile bedeuten, dass die Verluste und Gewinne gemeinsam in einer Subpopulation auftreten (siehe auch Tabelle 11). Fett gedruckte Zahlen, die nicht bunt markiert sind, markieren Veränderungen, die in Subpopulationen nicht mehr in einem Prozentsatz >Cut-off Wert auftauchen.

3.2.3 Ergebnisse der Subpopulationsanalyse

Die „Normalkombination“, die in fast allen Zellen Gesunder auftritt und bei der keine Region verändert ist, also je zwei 5q31.3-, 5p15.33- und X-Signale (bzw. bei Männern ein X-Signal) pro Zelle vorhanden sind, wurde in den Ausstrichen aller Patienten gefunden. Als relevante Subpopulationen mit Aberrationen galten alle Signalkombinationen, die in einer Prozentzahl von Zellen über der durch den Cut-off Wert definierten Grenze bei Gesunden in den Patienten vorkamen. Ihre Häufigkeit und Größe sind in Abbildung 20 und Tabelle 12 gezeigt.

Acht *TEL-AML1* positive (42.1%) und 17 *TEL-AML1* negative (65.4%) ALL zeigten weitere aberrante Subpopulationen von Zellen mit Signalkombinationen, die über dem Cut-off Wert lagen.

3.2.3.1 Subpopulationen mit Veränderungen von 5q31.3

Die häufigste Kombination bei *TEL-AML1* positiven ALL war eine Kombination, in der der Verlust eines roten (5q31.3) Signals auftrat (1-2-2 bzw. 1-2-1); dies zeigten vier Mädchen und zwei Jungen mit *TEL-AML1* positiver ALL (31.6%). In der *TEL-AML1* negativen Gruppe wurde diese Kombination in einer relevanten Zahl von Zellen je eines Jungen und eines Mädchen gesehen (7.7%), eine ALL zeigte außerdem eine Kombination von 5q31.3-Verlust und Chromosom-X-Gewinn in knapp 10% der Blasten (siehe 3.2.3.4). Unterschiede zwischen den Prozentangaben für die zusammengefassten Gewinne und Verluste (zusammengefasster Gewinn bedeutet dann >2 5q31.3- oder 5p15.33-Signale bzw. je nach Geschlecht >2 oder >1 X-Signal, zusammengefasster Verlust heißt <2 5q31.3- oder 5p15.33-Signale und entsprechend je nach Geschlecht <2 oder <1 X-Signal, siehe 3.2.1) und Veränderungen auf Subpopulationsebene resultieren daraus, dass die zusammengefassten Gewinne und Verluste aus mehreren Subpopulationen zusammen gesetzt sind, von denen einige in ihrer Gesamtheit nicht über dem Cut-off Wert liegen. So zeigt beispielsweise die *TEL-AML1* negative ALL von Patient #14 einen knapp über dem Cut-off Wert liegenden 5q31.3-Verlust von 7.8%, der sich in den gefundenen Subpopulationen nicht widerspiegelt. Den Grund findet man beim Betrachten der Subpopulationsanalyse: Der 5q31.3-Verlust verteilt sich auf eine Untergruppe von Zellen, die auch ein 5p15.33-Signal weniger zeigt (1-1-2) und die 1.4% der Zellen ausmacht (niedriger als Cut-off 9.62% für 5p15.33-Verlust, der bei dieser Kombination angewendet werden müsste)

und auf das Signalmuster 1-2-2, dessen charakteristische Veränderung das Fehlen des einen 5q31.3-Signals ist und das in dieser ALL in 6.5% der Zellen gesehen wurde und somit ebenfalls unter dem Cut-off (von 7.78% für 5q31.3-Verlust) liegt. Bei manchen Proben sind die Verluste und Gewinne einer Region mit weiteren Veränderungen in den anderen Regionen vergesellschaftet, so dass seltenere Kombinationen entstehen, die im Weiteren noch betrachtet werden.

Die Kombination 3-2-1 (bei Jungen) bzw. 3-2-2 (bei Mädchen) mit dem 5q31.3-Gewinn als einziger Veränderung wurde in nur einer *TEL-AML1* positiven und keiner *TEL-AML1* negativen ALL gefunden. Da aber drei (11.5%) *TEL-AML1* negative ALL in einem relevanten Anteil ihrer Zellen, unabhängig von den Subpopulationen, einen 5q31.3-Gewinn zeigten, war anzunehmen, dass diese Veränderung in weiteren Subpopulationen zusammen mit anderen Mutationen vorlag. Beim genauen Betrachten der Subpopulationen stellte sich heraus, dass alle drei *TEL-AML1* negativen ALL mit 5q31.3-Gewinn auch Gewinne in 5p15.33 und X aufwiesen. Die meisten Zellen gehörten zu einer Subpopulation, in der alle drei Regionen amplifiziert waren (3-3-3 bzw. 3-3-2). Daneben gab es Zellgruppen mit verschiedenen Kombinationen von Signalvermehrungen (3-2-2 bzw. 3-2-3, 3-3-2). Möglicherweise lag zumindest in einem Subklon also eine Trisomie 5 vor.

3.2.3.2 Subpopulationen mit Veränderungen von 5p15.33

Verlust oder Gewinn von 5p15.33 war die charakteristische Mutation bei Subpopulationen von je drei (15.8%) *TEL-AML1* positiven ALL, wohingegen 5p15.33-Verlust als einzige Veränderung nur bei einer *TEL-AML1* negativen ALL in einer relevanten Subpopulation auftrat.

3.2.3.3 Subpopulationen mit Veränderungen von Chromosom X

Bei den *TEL-AML1* negativen ALL enthielt die am häufigsten anzutreffende Subpopulation 2-2-2 (bei acht Jungen) bzw. 2-2-3 (sieben Mädchen) den Gewinn eines Chromosom X (57.7% der *TEL-AML1* negativen ALL). Diese Zahl korreliert gut mit den zusammengefasst betrachteten Gewinnen von Chromosom X, was dem Umstand geschuldet sein mag, dass der Cut-off Wert für den Chromosom-X-Gewinn sehr niedrig ist (2.07%), so dass auch Subpopulationen mit einer geringen Zahl von Zellen als positiv gewertet werden können. Keine der *TEL-AML1* positiven ALL wies Subpopulationen mit Chromosom-X-Gewinn über dem Cut-off auf.

Die Subpopulationsanalyse in den Blasten eines Mädchens mit *TEL-AML1* positiver ALL mit Verlust von Chromosom X stimmte gut überein mit der Gesamtanalyse dieser Deletion: Knapp 30% der Zellen zeigten den Verlust eines Chromosom X ohne Veränderungen in 5q31.3 und 5p15.33. Diese Kombination trat bei keiner der *TEL-AML1* negativen ALL auf.

3.2.3.4 Seltene Subpopulationen

Seltene Signalkombinationen waren z. B. die Konstellationen 2-2-4 und 2-2-5 mit entsprechenden Vervielfachungen von Chromosom X, die in insgesamt fast 70% der Leukämiezellen eines Mädchens mit *TEL-AML1* negativer ALL gefunden wurden. Eine *TEL-AML1* positive (5.3%) und fünf *TEL-AML1* negative (19.2%) ALL zeigten zu wertende Subpopulationen, in denen mehr als eine Chromosomenregion verändert war. Einen 5q31.3-Gewinn mit gleichzeitigem 5p15.33-Gewinn, vermutlich einer Trisomie 5 entsprechend, zeigten die Blasten eines Mädchens mit *TEL-AML1* positiver ALL und drei *TEL-AML1* negativer ALL, wobei die drei letzteren zusätzlich noch ein Chromosom X hinzugewonnen hatten. Sie besaßen außerdem noch Subpopulationen mit verschiedenen Kombinationen aus 5q31.3-Gewinn, 5p15.33-Gewinn und Chromosom-X-Gewinn. Im Folgenden werden die gefundenen Subpopulationen (Abbildung 20) und die statistische Analyse der Unterschiede zwischen den Patientengruppen mit *TEL-AML1* positiver und negativer ALL hinsichtlich des Auftretens von Subpopulationen (Tabelle 11) gezeigt.

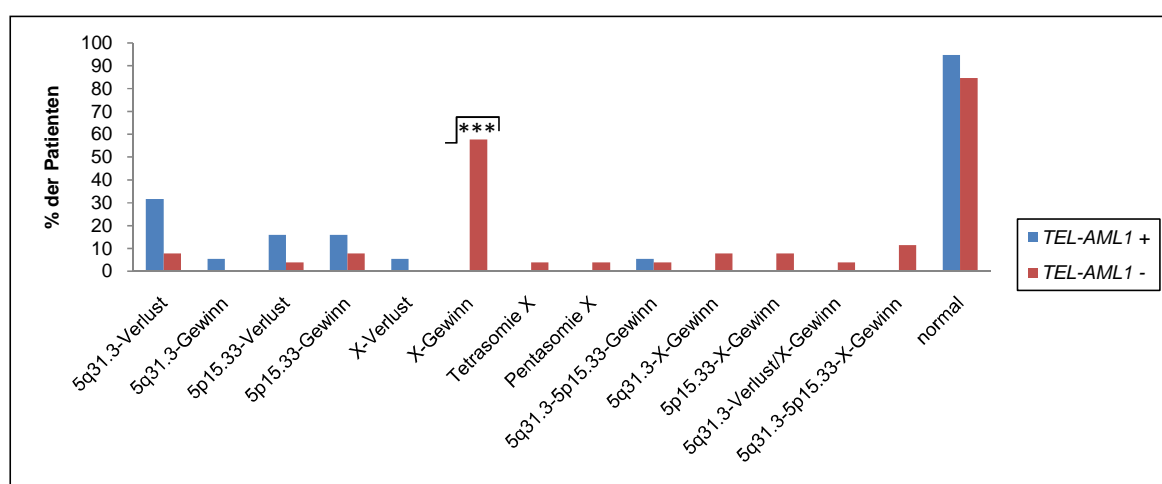


Abbildung 20: Häufigkeiten von Subpopulationen über dem Cut-off Wert in den Blasten der Patienten

Tabelle 11: Statistische Auswertung der Unterschiede zwischen *TEL-AML1* positiven und negativen ALL mit aberranten Subpopulationen

	5q31.3		5p15.33		X	
	Verlust	Gewinn	Verlust	Gewinn	Verlust	Gewinn
Fisher's Exact Test (Häufigkeiten der Gewinne und Verluste)						
p-Wert	0.055	0.42	0.295	0.64	0.42	0.00002***

Die statistische Auswertung wurde nur für Subpopulationen mit Gewinnen und Verlusten einer Region durchgeführt, da die Fallzahlen der übrigen Subpopulationen sehr klein waren. Nur für den Chromosom-X-Gewinn konnte ein signifikanter Unterschied zwischen *TEL-AML1* positiven und negativen ALL gezeigt werden. Für den Verlust von 5q31.3 ist eine Tendenz hin zu häufigerem Auftreten bei *TEL-AML1* positiven ALL zu erkennen, die allerdings keine statistische Signifikanz erreicht.

3.2.4 Ergebnisse der Interphase-FisH-Analyse von REH

Die *TEL-AML1* positive Zelllinie REH wies in 98.4% der Zellen den Verlust eines Chromosom X auf, Veränderungen in den übrigen untersuchten Regionen lagen unterhalb der jeweiligen Cut-off Werte.

Tabelle 12: Zusammenfassung der relevanten Subpopulationen bei TEL-AML1 positiven / negativen ALL.

Signalkombination																
5q31.3	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	
5p15.33	2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	3	3	
X (w/m)	2/1	3/2	2/1	1/0	2/1	3/2	4/3	5/4	1/0	2/1	3/2	2/1	3/2	2/1	3/2	
NR / SEX	TEL-AML1 positive ALL															
1w	9.05		9.91													65.52
2w					29.66											40.34
3w	10.10												25.09			43.90
(3w 2.rez										17.58		39.56				28.94
4m																80.29
5w	8.20				13.11											62.70
6w												12.81		10.94		60.00
7m	8.43				9.96											70.11
8w	7.91															78.53
9m																85.88
10m																77.90
11m																86.54
12m																87.50
13w																82.82
14m																87.19
15m																85.56
16m																90.36
17m																85.25
18w																87.47
19m		18.28														43.66
(REH w													17.54			85.13
TEL-AML1 negative ALL																
1m																80.77
2m			9.62													72.84
3m																77.64
4m								3.67								82.57
5m								10.75				5.61				64.95
6w								3.39				8.47				16.27
7w								11.11	66.26	3.29						9.83
8m		9.82														49.83
9m																76.69
10m																77.92
11w																86.41
12m																85.17
13w																82.38
14w					9.68											75.49
15w								9.18				4.08		7.65		70.51
16w								68.83								19.90
17m								3.11								16.56
18m								9.52								82.88
19m								9.01						6.31		84.35
20w								2.45								36.04
21w																83.82
22w																78.42
23w																79.79
24w												4.36				26.47
25w		10.18														60.88
26w																68.85
																3.74
																69.46
																83.33

	Population ohne Veränderungen
	Cut-off 12.39 % (höchster Cut-off = X-Verlust)
	Cut-off 9.76 % (höchster Cut-off ohne Proband #4)
	Cut-off 7.78 % (5q31.3-Verlust)
	Cut-off 5.50 % (5q31.3-Gewinn)
	Cut-off 9.62 % (5p15.33-Verlust)
	Cut-off 3.84 % (5p15.33-Gewinn)
	Cut-off 2.07 % (X-Gewinn)

Angaben in Prozent; Jede Zeile steht für die Blasten eines Patienten, jede Spalte für eine Subpopulation von Zellen. Subpopulationen ohne Farbmarkierung zeigen den Prozentsatz von Zellen mit Normalkombination (keine Mutation) an. Farblich markiert sind Subpopulationen mit einer oder mehreren Mutationen, die in einem Prozentsatz >Cut-off auftreten. Cut-offs siehe Legende.

3.3 Gegenüberstellung von FisH-Ergebnissen, Zytogenetikbefunden und aCGH-Ergebnissen

Von einer *TEL-AML1* positiven und zwei *TEL-AML1* negativen ALL waren Karyotypanalysen verfügbar, die den Akten entnommen wurden. Die Daten wurden mit den Ergebnissen dieser Studie verglichen (Tabelle 13).

Aufgrund schlechter Chromosomenqualität konnten bei der zytogenetischen Analyse der *TEL-AML1* positiven ALL #1 zusätzliche strukturelle Aberrationen zur Deletion von 6q21 nicht ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Studie wurde bei dieser ALL eine Deletion von 5q31.3 und 5p15.33 in insgesamt 16% der Zellen gefunden.

Die beschriebene Hyperdiploidie von Patient #7 (*TEL-AML1* negative ALL) korreliert gut mit der durch FisH gefundenen erhöhten Kopienzahl von Chromosom X (Tri-, Tetra- und Pentasomie), welches bei hyperdiploiden Patienten zu den am häufigsten hinzugewonnenen Chromosomen gehört¹⁵.

Patient #9 (*TEL-AML1* negative ALL) zeigte in der Analyse der vorliegenden Arbeit in seinen Blasten keine Deletionen oder Gewinne in den untersuchten Regionen. Das Markerchromosom von der Größe eines C-Gruppen-Chromosoms wurde im Zytogenetikbefund in nur einer von 22 Zellen gefunden und trat in weiteren 25 überprüften Metaphasen nicht erneut auf, so dass dieses Ergebnis entweder als Kulturartefakt oder geringer Anteil eines aberranten Zellklons interpretiert werden kann.

Tabelle 13: Vergleich von FisH-Ergebnissen, Zytogenetikbefunden und aCGH-Ergebnissen

Patient Nr.	Geschlecht	<i>TEL-AML1</i> PCR	Karyotyp	array-CGH	FisH		
					5q31.3	5p15.33	X
1	w	positiv	46, XX, del (6)(q21), inc	n. d.	Deletion 16.4%	Deletion 16.8%	o.p.B.
6	w	positiv	n. d.	Gewinn Chromosom 5	Gewinn 78.1%	Gewinn 79.4%	o.p.B.
7	w	negativ	hyperdiploid >50 Chromosomen 46, XY [21]	n. d.	o.p.B.	o.p.B.	Gewinn 89.7%
9	m	negativ	47, XY, +mar [1]	n. d.	o.p.B.	o.p.B.	o.p.B.

n. d.: nicht durchgeführt; o.p.B. ohne pathologischen Befund

Den Akten war außerdem zu entnehmen, dass Patient #13 (*TEL-AML1* negative ALL) eine Trisomie 21 hat. In Bezug auf die Chromosomen 5 und X zeigten die Blasten keine

Veränderungen. Die vermutete Trisomie 5 in den Blasten von Patient #6 (*TEL-AML1* positive ALL) wurde bereits im Rahmen einer früheren Studie mittels Affymetrix 100 K Chip array-CGH nachgewiesen. Diese ALL zeigte außerdem sowohl initial als auch im Rezidiv Gewinne der Chromosomen 2, 7, 10, 16, 19 und von Chromosom 21(>3 / Zelle) sowie beim Rezidiv zusätzlich noch eine Trisomie 8 und 20 (Renia Vagkopoulou, persönliche Kommunikation) und ist somit trotz eines DNA-Index von 1.11 hyperdiploid (>50 Chromosomen).

3.4 Verlaufsbeobachtung bei einer Patientin

Es war möglich, von einem Mädchen mit *TEL-AML1* positiver ALL zusätzlich zum Erstrezidiv noch einen Knochenmarkausstrich des Zweitrezidivs zu untersuchen. Der im Erstrezidiv gesehene 5q31.3-Verlust war im Zweitrezidiv nicht mehr präsent, dafür trat aber ein signifikanter Verlust von Chromosom X auf. Im Zweitrezidiv zeigten mehr als doppelt so viele Zellen wie im Erstrezidiv einen Hinzugewinn von 5p15.33, so dass das Zweitrezidiv möglicherweise von einem Subklon mit 5p15.33-Gewinn ausging.

Tabelle 14: Verlaufsbeobachtung bei einer Patientin mit *TEL-AML1* positiver ALL

Pat. Nr.	Geschlecht	<i>TEL-AML1</i>	Rezidiv	MRD	-5q31.3 (%)	+5p15.33 (%)	-X (%)	Subpopulationen			
								1-2-2	2-2-2	2-3-1	2-3-2
3	w	positiv	1	1	17.8	32.8	5.2	10.1	43.9	0.7	25.1
			2	n. d.	2.6	63	25.3	1.4	28.9	17.6	39.6

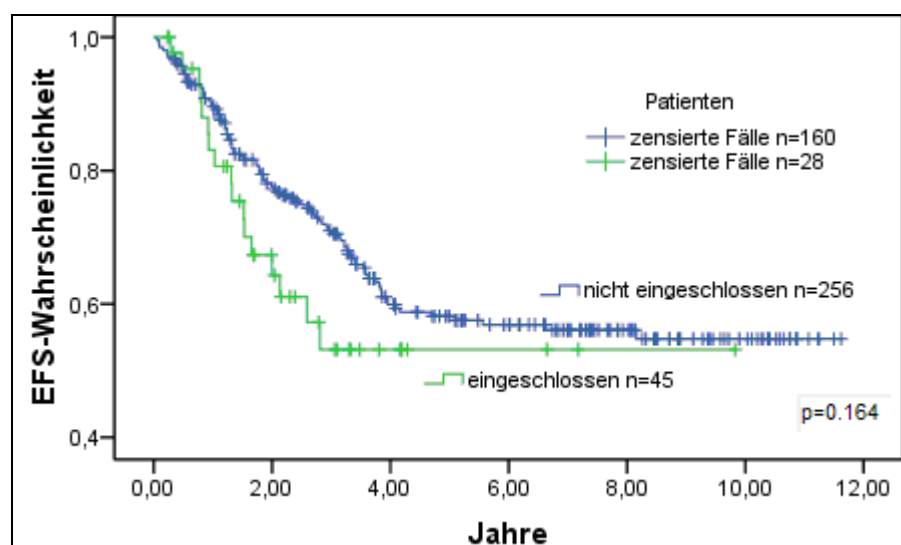
fett gedruckte Zahlen = Werte liegen über dem Cut-off

3.5 Klinische Relevanz

3.5.1 Überprüfung des gewählten Patientenkollektivs auf Repräsentativität

Zunächst wurde das untersuchte Patientenkollektiv in Bezug auf prognostisch wichtige Parameter mit nicht analysierten ALL-Patienten, die ebenfalls gemäß der Therapieprotokolle ALL-REZ BFM '96 und '02 behandelt worden waren, verglichen.

In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die pEFS in den beiden Gruppen (p-Wert im Log-Rank-Test 0.164). Auch bei getrennter Betrachtung von in die vorliegende Studie eingeschlossenen und nicht eingeschlossenen Patienten nach *TEL-AML1*-Status ergab sich keine signifikante pEFS-Differenz (p-Werte bei *TEL-AML1* positiven ALL = 0.571 und bei *TEL-AML1* negativen ALL = 0.102). Abbildung 21 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven für das untersuchte und das Vergleichskollektiv:



pEFS (5 Jahre)
eingeschlossen =
untersucht
 0.532 ± 0.087

pEFS (5 Jahre)
nicht eingeschlossen =
nicht untersucht
 0.576 ± 0.034

Abbildung 21: EFS-Wahrscheinlichkeit für das untersuchte (grün) und das Vergleichskollektiv (blau) (ALL REZ BFM '96/'02)

In Tabelle 15 ist der Vergleich kategorieller Variablen in den beiden Patientengruppen gezeigt. Der p-Wert bezeichnet die im Chi-Quadrat (bzw. Fisher's Exact) Test errechnete Signifikanz.

Tabelle 15: Vergleich kategorieller Variablen im untersuchten und im Vergleichskollektiv

Klinische Parameter	Patienten (B-ALL-Erstrezidiv, Zeitpunkt spät, <i>BCR-ABL</i> negativ, <i>MLL</i> negativ, KM-Beteiligung)				p-Wert
	eingeschlossen		nicht eingeschlossen		
	n	%	n	%	
Geschlecht					0.630
männlich	23	<i>51.1</i>	141	<i>55.1</i>	
weiblich	22	<i>48.9</i>	115	<i>44.9</i>	
Rezidivort					0.044*
KM isoliert	41	<i>91.1</i>	198	<i>77.3</i>	
KM kombiniert	4	<i>8.9</i>	58	<i>22.7</i>	
PBC					0.822
<1/μl	5	<i>11.1</i>	41	<i>16</i>	
≥1 <10000/μl	32	<i>71.1</i>	170	<i>66.4</i>	
≥10000/μl	8	<i>17.8</i>	44	<i>17.2</i>	
keine Daten	0	<i>0</i>	1	<i>0.4</i>	
TEL-AML1-Status					0.031*
positiv	19	<i>42.2</i>	66	<i>25.8</i>	
negativ	26	<i>57.8</i>	190	<i>74.2</i>	
Patientenzahl insgesamt	45	<i>100</i>	256	<i>100</i>	

Prozentangaben sind kursiv dargestellt.

Signifikante Unterschiede ergaben sich für den Ort des Rezidivs und den Anteil von Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL. Da das zu untersuchende Kollektiv *TEL-AML1* positiver ALL möglichst groß gewählt wurde, ist der prozentuale Anteil an Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL, die bekanntermaßen eine bessere Prognose als Patienten mit *TEL-AML1* negativer ALL haben, in dieser Gruppe überrepräsentiert. Trotzdem liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit im untersuchten Kollektiv nicht signifikant höher als im nicht untersuchten (siehe Abbildung 21), was möglicherweise mit dem höheren Anteil isolierter KM-Rezidive (prognostisch ungünstig) im Ersteren zusammenhängt, so dass sich hier die Einflüsse der Variablen *TEL-AML1*-Status und Rezidivort auf die pEFS eventuell ausgleichen. Bezüglich aller übrigen Variablen sind die beiden Gruppen jedoch gut vergleichbar.

In Tabelle 16 werden die stetigen Variablen in den beiden Gruppen gegenübergestellt. Die im Mann-Whitney U-Test errechnete Signifikanz wird durch den p-Wert ausgedrückt.

Tabelle 16: Vergleich stetiger Variablen im untersuchten und im Vergleichskollektiv

Klinische Parameter	Patienten		p-Wert
	eingeschlossen	nicht eingeschlossen	
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	4.9	5.1	0.553
Median (Bereich)	(1.6-18.4)	(0.2-17.3)	
Alter bei Rezidivdiagnose (Jahre)	9.9	9.9	0.893
Median (Bereich)	(5.6-21.2)	(2.7-22.2)	
Dauer der Erstremission (Jahre)	3.7	3.7	0.586
Median (Bereich)	(2.5-13)	(0.9-12.3)	
Leukozytenzahl bei Rezidivdiagnose (T/μl)	7.1	6.2	0.534
Median (Bereich)	(2.1-85)	(0.3-265)	
periphere Blasten (%)	20.0	13.0	0.041*
Median (Bereich)	(0-98)	(0-95)	

Trotz der signifikant höheren Gesamtzahl peripherer Blasten im untersuchten Kollektiv als im Vergleichskollektiv befinden sich anteilmäßig gleich viele Blasten in den drei prognostisch wichtigen PBC-Gruppen (Tabelle 15).

Bei getrenntem Vergleich von in diese Studie eingeschlossenen Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL und nicht eingeschlossenen *TEL-AML1* positiven ALL wurden keine signifikanten Unterschiede in kategoriellen oder stetigen Variablen gefunden. Dies gilt auch für *TEL-AML1* negative in diese Arbeit eingeschlossene und nicht eingeschlossene ALL (Daten nicht gezeigt). Die prognostischen Parameter sind somit

im untersuchten und nicht untersuchten Kollektiv gleich verteilt, so dass Fehler durch Selektionsbias unwahrscheinlich sind.

3.5.2 Korrelation der Fish-Ergebnisse mit MRD-Daten

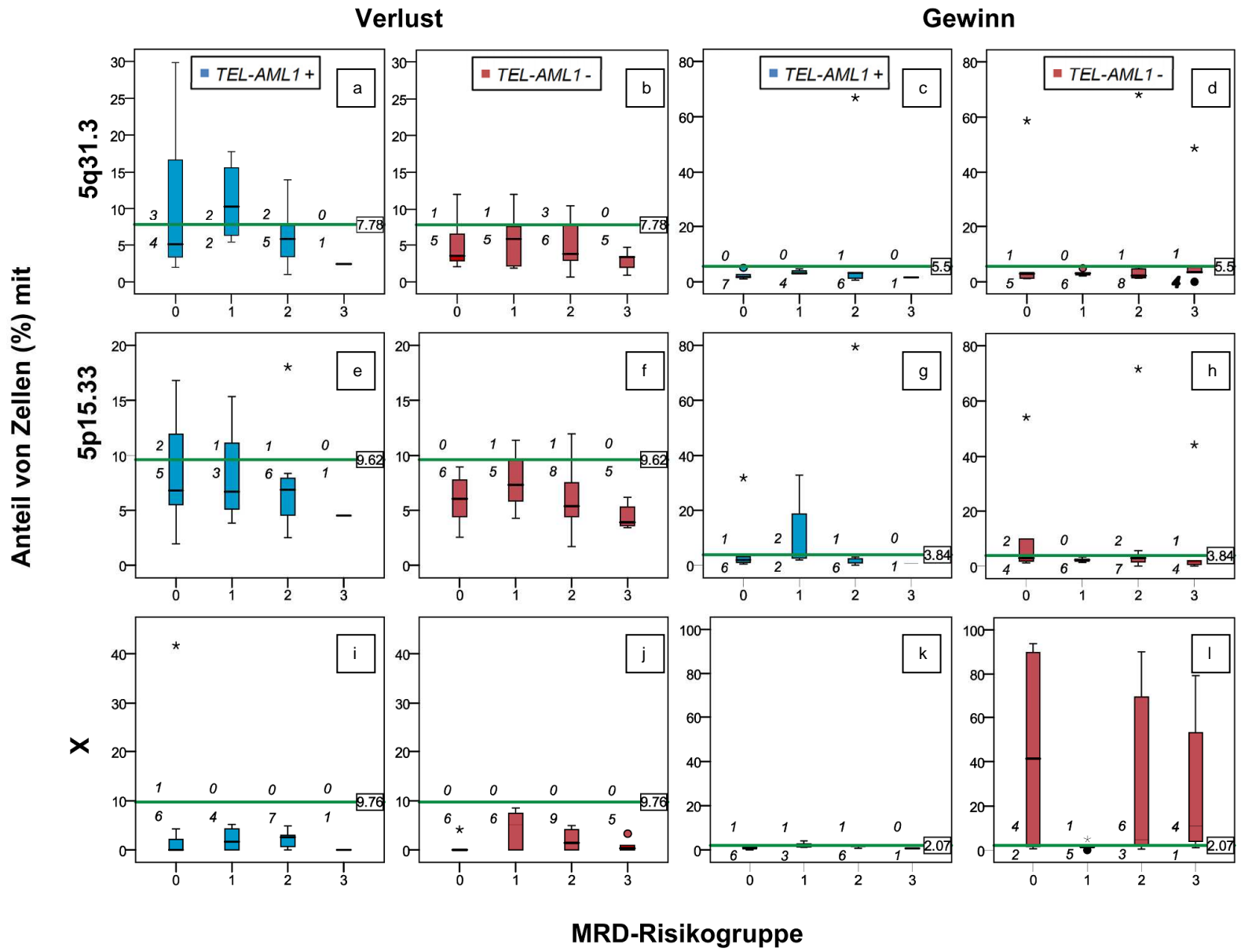
Die Verluste und Gewinne von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X in den leukämischen Blasten zeigten weder in ihrer Häufigkeit noch Ausprägung einen signifikanten Zusammenhang mit MRD. Die MRD-Gruppen sind wie bereits in Tabelle 3 gezeigt nochmals aufgeführt.

In Abbildung 22 sind auf der X-Achse die MRD-Risikogruppen aufgetragen, die Y-Achse zeigt den prozentualen Anteil von Zellen mit Signalgewinnen und -verlusten. Die grüne Linie markiert jeweils den Cut-off Wert, die Zahlen darüber und darunter, wie viele ALL Veränderungen über und unter diesem Wert zeigen. In der ersten Zeile sind die Ergebnisse für Signalgewinne und –verluste von 5q31.3 zu sehen, in der zweiten Zeile für 5p15.33 und in der dritten Zeile für Chromosom X. Ausreißer und Extremwerte sind wie in 3.1.1 beschrieben dargestellt.

Abbildung 22: Gewinne und Verluste von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X in den einzelnen MRD-Risikogruppen in *TEL-AML1* positiven und negativen ALL (auf der folgenden Seite)

- a) 5q31.3-Signalverlust bei *TEL-AML1* positiven ALL
- b) 5q31.3-Signalverlust bei *TEL-AML1* negativen ALL
- c) 5q31.3-Signalgewinn bei *TEL-AML1* positiven ALL
- d) 5q31.3-Signalgewinn bei *TEL-AML1* negativen ALL
- e) 5p15.33-Signalverlust bei *TEL-AML1* positiven ALL
- f) 5p15.33-Signalverlust bei *TEL-AML1* negativen ALL
- g) 5p15.33-Signalgewinn bei *TEL-AML1* positiven ALL
- h) 5p15.33-Signalgewinn bei *TEL-AML1* negativen ALL
- i) Chromosom-X-Signalverlust bei *TEL-AML1* positiven ALL
- j) Chromosom-X-Signalverlust bei *TEL-AML1* negativen ALL
- k) Chromosom-X-Signalgewinn bei *TEL-AML1* positiven ALL
- l) Chromosom-X-Signalgewinn bei *TEL-AML1* negativen ALL

MRD-Risikogruppe	Anteil der Leukämiezellen	Stammzelltransplantation
0	$\leq 10^{-4}$	nein
1	$10^{-4} - 10^{-3}$	
2	$10^{-3} - 10^{-2}$	
3	$\geq 10^{-2}$	ja



3.5.3 Vergleich verschiedener Gruppen innerhalb des Patientenkollektivs

Es wurde sowohl die Gesamtheit der Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL und *TEL-AML1* negativer ALL verglichen als auch Gruppen von Patienten, die bestimmte Merkmale (Verluste und Gewinne) aufwiesen, mit dem Rest des Kollektivs ohne diese Merkmale. Dabei wurden nur Vergleiche angestellt, wenn eine Veränderung bei mindestens drei ALL gefunden worden war. Eine Übersicht der Ergebnisse aller Gruppenvergleiche ist in Tabelle 17 dargestellt.

3.5.3.1 *TEL-AML1* positive und negative ALL

Die pEFS Fusionsgen-positiver und –negativer ALL des untersuchten Kollektivs war nicht signifikant verschieden ($p = 0.088$). Die Variablen Geschlecht, PBC und Rezidivort waren gleich verteilt ebenso wie die Leukozytenzahl, das Alter bei Erst- und Rezidivdiagnose sowie die Dauer der Erstremission.

3.5.3.2 ALL mit und ohne 5q31.3-Verlust

Innerhalb der Fusionsgen-positiven Gruppe wurden Mädchen und Jungen mit 5q31.3-Verlust in den Blasten mit Patienten ohne 5q31.3-Verlust in Blasten hinsichtlich klinischer Variablen verglichen, ebenso wurde mit der für das Fusionsgen negativen Gruppe verfahren.

Bei den *TEL-AML1* positiven ALL mit 5q31.3-Verlust war die Wahrscheinlichkeit, ereignisfrei zu überleben, nicht signifikant anders als die pEFS der Gruppe ohne 5q31.3-Deletion ($p = 0.264$; Abbildung 23). Von den sieben Patienten mit ALL mit 5q31.3-Verlust erlebten zwei (28.6%) ein Ereignis im Gegensatz zu einem (8.3%) von den zwölf Mädchen und Jungen ohne 5q31.3-Verlust. Dieser Unterschied ist, vielleicht aufgrund der kleinen Fallzahlen, nicht signifikant ($p = 0.52$). In Bezug auf die Leukozyten- oder peripheren Blastenzahlen zum Diagnosezeitpunkt, das Alter bei Erst- und Rezidivdiagnose oder die Dauer der Erstremission zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Eventuell ist eine Tendenz zur Bevorzugung des weiblichen Geschlechts beim Auftreten der 5q31.3-Deletion erkennbar, die jedoch keine statistische Signifikanz erreicht ($p = 0.074$). Bei den restlichen betrachteten klinischen Variablen (Rezidivort, Verteilung der peripheren Blasten in PBC-Gruppen) ergaben sich keine Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne 5q31.3-Deletion. Die ALL mit 5q31.3-Verlust in Subpopulationen ($n = 6$) hatten tendenziell einen höheren peripheren

Blastenanteil (Median 66%) als die Patienten ohne 5q31.3-Verlust in Subpopulationen von Blasten ($n = 13$, Median 18%), auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant war ($p = 0.072$). Die genannten Ergebnisse lassen vermuten, dass die 5q31.3-Deletion bei *TEL-AML1* positiver ALL einen negativen prognostischen Einfluss hat. Da allerdings nur relativ wenig Patienten die Deletion aufweisen und die untersuchte Patientengruppe eher klein ist, kann hier keine sichere statistische Aussage getroffen werden.

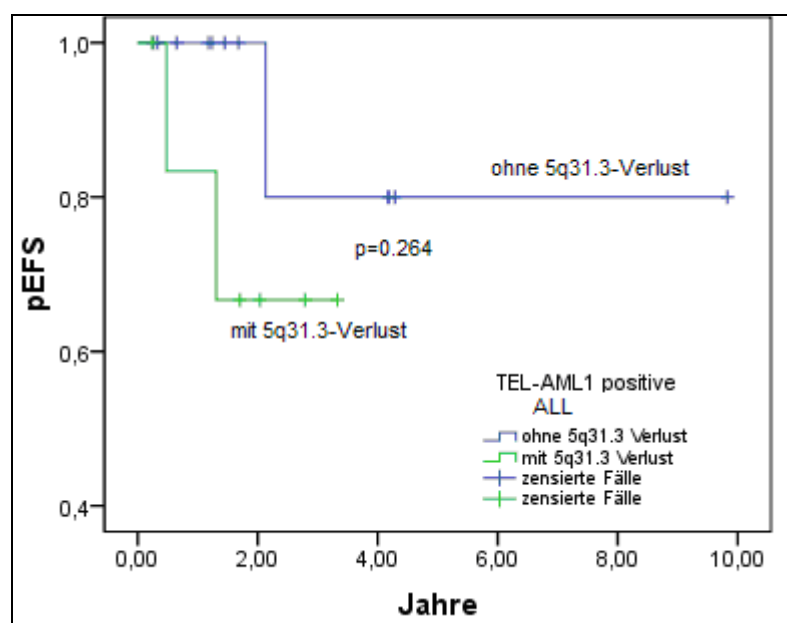


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve der pEFS für *TEL-AML1* positive ALL-Erstrezidive mit (grün) und ohne (blau) 5q31.3-Verlust (ALL-REZ BFM '96/'02)

Zwischen den *TEL-AML1* negativen ALL mit und ohne 5q31.3-Verlust wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der pEFS und der anderen klinischen Parameter festgestellt. Im untersuchten Kollektiv hatten die Patienten mit *TEL-AML1* negativer ALL mit 5q31.3-Deletion sogar eher eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit (nach fünf Jahren 0.8 ± 0.18) als Patienten ohne diese Veränderung (0.3 ± 0.1), doch auch hier sind die Fallzahlen mit nur fünf ALL mit deletionstragenden Blasten zu klein für eine sichere Aussage. Diese Beobachtung entsprach dem Vergleich von ALL mit und ohne Verlust von 5q31.3 in Subpopulationen: Die pEFS der Patienten mit *TEL-AML1* negativer ALL mit 5q31.3-Deletion in Subpopulationen ($n = 3$) lag tendenziell höher als die pEFS des restlichen *TEL-AML1* negativen ALL-Kollektivs (p im Log-Rank-Test = 0.08).

Der 5q31.3-Verlust trat nur bei *TEL-AML1* positiven und negativen ALL mit isoliertem KM-Rezidiv auf, wobei zu beachten ist, dass insgesamt nur vier Patienten im gesamten

Kollektiv dieser Arbeit an einem kombinierten ALL-Rezidiv erkrankt waren. Die Untersuchung eines größeren Kollektivs mit höherem Anteil kombinierter Rezidive würde zur Klärung der Frage beitragen, ob die 5q31.3-Deletion ein Phänomen ist, das nur bei Patienten mit isoliertem KM-Rezidiv zu finden ist und so vielleicht zur schlechten Prognose dieser Gruppe beiträgt.

Die deletionstragenden *TEL-AML1* positiven und negativen ALL unterschieden sich nicht signifikant voneinander in Bezug auf die in den Vergleich einbezogenen klinischen Parameter.

3.5.3.3 ALL mit und ohne 5q31.3-Gewinn

Die pEFS der Patienten mit *TEL-AML1* negativem ALL-Erstrezidiv mit und ohne 5q31.3-Gewinn war annähernd gleich. Innerhalb der *TEL-AML1* positiven Gruppe wurden keine Vergleiche zwischen 5q31.3-Gewinnsträgern und den restlichen Patienten angestellt, da nur eine ALL einen 5q31.3-Gewinn zeigte.

Die Patienten mit *TEL-AML1* negativem ALL-Erstrezidiv mit 5q31.3-Gewinn hatten einen signifikant niedrigeren peripheren Blastenanteil als Patienten ohne 5q31.3-Gewinn. Allerdings war die Verteilung der Blasten in die drei in Tabelle 17 aufgeführten PBC-Gruppen ähnlich. Da nur Blasten von drei Patienten 5q31.3 hinzugewonnen hatten, ist eine sichere Schlussfolgerung bezüglich des Zusammenhangs von Blastenzahlen und 5q31.3-Gewinn bei *TEL-AML1* negativen ALL nicht möglich.

In Bezug auf die übrigen klinischen Parameter ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen ALL mit und ohne 5q31.3-Gewinn ermitteln.

3.5.3.4 ALL mit und ohne 5p15.33-Verlust

Von den 19 *TEL-AML1* positiven ALL zeigten vier einen Verlust von 5p15.33 (in 15-18% der Zellen). Sie unterschieden sich nicht signifikant von den ALL-Patienten ohne 5p15.33-Deletion in den Blasten hinsichtlich der pEFS, Alter bei Erst- und Rezidivdiagnose, Anzahl der Leukozyten und peripherer Blasten oder Dauer der Erstremission. Im untersuchten Kollektiv wurde also kein Zusammenhang zwischen 5p15.33-Deletion und klinischen Parametern gefunden.

3.5.3.5 ALL mit und ohne 5p15.33-Gewinn

Es wurden sowohl *TEL-AML1* positive als auch negative ALL mit und ohne 5p15.33-Gewinn bezüglich der Assoziation mit klinischen Parametern verglichen. Weder bei den

TEL-AML1 positiven noch bei den *TEL-AML1* negativen ALL mit 5p15.33-Gewinn war die Wahrscheinlichkeit, ereignisfrei zu überleben, signifikant verschieden von der pEFS der Patienten mit normaler 5p15.33-Signalzahl. In der Gruppe der Patienten mit 5p15.33-Gewinn in den Blasten hing die pEFS nicht vom *TEL-AML1*-Status ab ($p = 0.870$). Die hier verglichenen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in den getesteten klinischen Merkmalen voneinander. Allerdings waren die peripheren Blastenzahlen zum Diagnosezeitpunkt bei den beiden Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL (#3, #19), bei denen bemerkenswert viele (jeweils etwa ein Drittel der) Zellen einen 5p15.33-Gewinn aufwiesen, tendenziell höher als bei den restlichen Patienten, diese Tendenz war jedoch nicht signifikant ($p = 0.094$).

Bei der Analyse von Patienten mit und ohne 5p15.33-Gewinn in Subpopulationen fiel auf, dass die Dauer der Erstremission bei den *TEL-AML1* positiven ALL, die die Veränderung auch in Subpopulationen zeigten ($n = 3$), tendenziell kürzer war als bei den restlichen Fusionsgen-positiven ALL ohne 5p15.33-Gewinn in Subpopulationen ($p = 0.085$). Die geringe Fallzahl erlaubt allerdings keine sichere statistische Aussage.

3.5.3.6 ALL mit und ohne Gewinn von Chromosom X

Die bei den 26 *TEL-AML1* negativen ALL am häufigsten gefundene Veränderung, der Gewinn mindestens eines Chromosom X, hatte im untersuchten Kollektiv keinen Einfluss auf die pEFS. In der Gruppe der *TEL-AML1* positiven ALL waren nur Jungen betroffen ($p = 0.228$), bei *TEL-AML1* negativen ALL zeigten sowohl Mädchen als auch Jungen Gewinne von Chromosom X in den leukämischen Zellen. Fusionsgen-negative ALL mit Chromosom-X-Gewinn unterschieden sich ebenso wenig signifikant vom Restkollektiv ohne Chromosom-X-Gewinn bezüglich der getesteten Variablen wie *TEL-AML1* positive ALL mit Chromosom-X-Gewinn von negativen mit Chromosom-X-Gewinn.

3.5.3.7 ALL mit Kombinationen mehrerer Veränderungen

Im untersuchten Patientenkollektiv waren drei Gruppen von Patienten mit Kombinationen von Verlusten und Gewinnen in den Blasten auszumachen: Bei den *TEL-AML1* positiven ALL waren dies Deletionsträger der beiden Regionen auf Chromosom 5 ($n = 4$) und bei den *TEL-AML1* negativen ALL fünf Mädchen und Jungen, deren Blasten sowohl 5p15.33 als auch X hinzugewonnen hatten. Von diesen letztgenannten Patienten zeigten drei in den KM-Ausstrichen zusätzlich noch vermehrte

5q31.3-Signale in der FisH, so dass sie zu einer weiteren Gruppe zusammengefasst wurden, die der Gruppe der Patienten mit *TEL-AML1* negativer ALL mit 5q31.3-Gewinn entspricht (siehe 3.5.3.3). Bei der statistischen Analyse dieser Patientengruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den getesteten Parametern, so dass im untersuchten Kollektiv eine prognostische Bedeutung kombinierter Gewinne und Verluste von 5q31.3, 5p15.33 und X nicht nachgewiesen werden konnte.

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung gezeigt.

Gelb markiert sind dabei p-Werte, die in der Nähe oder unterhalb des Signifikanzniveaus liegen und die entsprechenden Ergebnisse. Im oberen Teil der Tabelle sind die Ergebnisse für den Zusammenhang zwischen Gewinnen und Verlusten in allen Blasten der Patienten und klinischen Daten zu finden, im unteren Teil dahingegen die Beziehungen zwischen chromosomalen Veränderungen in Subpopulationen und klinischen Parametern.

Tabelle 17:
Ergebnisübersicht der statistischen Auswertung
Beziehung zwischen numerischen Aberrationen von 5q31.3, 5p15.33
und Chromosom X und klinischen Daten
(auf der folgenden Seite)

Veränderung	TEL-AML1 Status	pEFS 5-Jahre	n	Geschlecht		Ort		PBC			Alter bei Erstdiagnose (in Jahren) Median (Bereich)	Alter bei Rezidivdiagnose (Jahre) Median (Bereich)	Dauer der Erstremission (Jahre) Median (Bereich)	Leukozytenzahl bei Rezidivdiagnose (T/µl) Median (Bereich)	PBC (%) Median (Bereich)
				m n (%)	w n (%)	KM isoliert n (%)	KM kombin. n (%)	<1/µl n (%)	≥1 <10000/µl n (%)	≥10000/µl n (%)					
mit 5q31.3-Verlust ohne 5q31.3-Verlust	+	0.667 0.800	7 12	2 (28.6) 9 (75)	5 (71.4) 3 (25)	7 (100) 10 (83.3)	0 (0) 2 (16.7)	0 (0) 3 (25)	5 (71.4) 8 (66.7)	2 (28.6) 1 (8.3)	5.2 (2.6-10.9) 3.9 (1.6-11.2)	10.4 (8-15.3) 9.4 (6.3-14.7)	4.9 (3.1-5.5) 3.6 (2.7-13)	7.6 (2.4-85.1) 6 (2.3-60.7)	60 (4-86) 24 (0-95)
p-Wert		0.264		0.074		0.509			0.233		0.482	0.536	0.711	0.837	0.196
mit 5q31.3-Verlust ohne 5q31.3-Verlust	-	0.800 0.337	5 21	2 (40) 10 (47.6)	3 (60) 11 (52.4)	5 (100) 19 (90.5)	0 (0) 2 (9.5)	0 (0) 2 (9.5)	4 (80) 15 (71.4)	1 (20) 4 (19)	8.2 (1.9-13.1) 5.7 (2-18.4)	11.5 (6-16.9) 9.8 (5.6-21.2)	3.7 (2.8-4.1) 3.6 (2.5-8.9)	10.8 (3.0-33.9) 6.7 (2.1-73.5)	29 (12-71) 12 (0-83)
p-Wert		0.173		1		1			0.772		0.409	0.613	1	0.659	0.447
mit 5q31.3-Verlust ohne 5q31.3-Verlust	+	0.667 0.800	7 5	2 (28.6) 2 (40)	5 (71.4) 3 (60)	7 (100) 5 (100)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	5 (71.4) 4 (80)	2 (28.6) 1 (20)	5.2 (2.6-10.9) 8.2 (1.9-13.1)	10.4 (8-15.3) 11.5 (6-16.9)	4.9 (3.1-5.5) 3.7 (2.8-4.1)	7.6 (2.4-85.1) 10.8 (3.0-33.9)	60 (4-86) 29 (12-71)
p-Wert		0.727		1		1			1		0.530	0.755	0.106	0.876	0.876
mit 5q31.3-Gewinn ohne 5q31.3-Gewinn	-	0.333 0.437	3 23	1 (33.3) 11 (47.8)	2 (66.7) 12 (52.2)	3 (100) 21 (91.3)	0 (0) 2 (8.7)	0 (0) 2 (8.7)	3 (100) 16 (69.6)	0 (0) 5 (21.7)	6.1 (4-6.9) 5.7 (1.9-18.4)	10.5 (7.1-11.8) 9.8 (5.6-21.2)	3.6 (3.1-5.6) 3.7 (2.5-8.9)	4.8 (2.3-9.9) 8 (2.1-73.5)	5 (4-8) 29 (0-83)
p-Wert		0.679		1		0.778			0.535		1	1	0.705	0.352	0.041*
mit 5p15.33-Verlust ohne 5p15.33-Verlust	+	1 0.642	4 15	1 (25) 10 (66.7)	3 (75) 5 (33.3)	4 (100) 13 (86.7)	0 (0) 2 (13.3)	0 (0) 3 (20)	3 (75) 10 (66.7)	1 (25) 2 (13.3)	5.9 (2.6-10.9) 4.1 (1.6-11.2)	10.9 (8.1-15.3) 9 (6.3-14.7)	5.1 (4.4-5.5) 3.5 (2.7-13)	3.8 (2.4-85.1) 7.6 (2.3-60.7)	14 (4-86) 39 (0.95)
p-Wert		0.267		0.262		1			0.576		0.530	0.307	0.262	0.530	0.810
mit 5p15.33-Gewinn ohne 5p15.33-Gewinn	+	0.667 0.769	4 15	2 (50) 9 (60)	2 (50) 6 (40)	4 (100) 13 (86.7)	0 (0) 2 (13.3)	0 (0) 3 (20)	3 (75) 10 (66.7)	1 (25) 2 (13.3)	6.1 (1.6-7.8) 4.1 (2.6-11.2)	10.7 (8.1-14.8) 9 (6.3-15.3)	3.2 (3.1-13) 4.4 (2.7-9.2)	9.2 (2.9-45.4) 4.9 (2.3-85.1)	66 (2-86) 18 (0-95)
p-Wert		0.537		1		1			0.576		0.665	0.357	0.530	0.530	0.262
mit 5p15.33-Gewinn ohne 5p15.33-Gewinn	-	0.600 0.390	5 21	2 (40) 10 (47.6)	3 (60) 11 (52.4)	5 (0) 19 (90.5)	0 (100) 2 (9.5)	0 (0) 2 (9.5)	4 (80) 15 (71.4)	1 (20) 4 (19)	6.1 (1.9-6.9) 5.7 (2-18.4)	8.6 (6-11.8) 10.3 (5.6-21.2)	3.6 (2.5-5.6) 3.7 (2.5-8.9)	4.8 (2.3-31.4) 8 (2.1-73.5)	8 (4-73) 29 (0-83)
p-Wert		0.535		1		1			0.772		0.447	0.447	0.950	0.447	0.224
mit 5p15.33-Gewinn ohne 5p15.33-Gewinn	+	0.667 0.600	4 5	2 (50) 2 (40)	2 (50) 3 (60)	4 (100) 5 (0)	0 (0) 0 (100)	0 (0) 0 (0)	3 (75) 4 (80)	1 (25) 1 (20)	6.1 (1.6-7.8) 6.1 (1.9-6.9)	10.7 (8.1-14.8) 8.6 (6-11.8)	3.2 (3.1-13) 3.6 (2.5-5.6)	9.2 (2.9-45.4) 4.8 (2.3-31.4)	66 (2-86) 8 (4-73)
p-Wert		0.870		1		1			1		0.730	0.286	0.905	0.556	0.556
mit X-Gewinn ohne X-Gewinn	+	1 0.716	3 16	3 (100) 8 (50)	0 (0) 8 (50)	3 (100) 14 (87.5)	0 (0) 2 (12.5)	0 (0) 3 (18.8)	2 (66.6) 11 (68.8)	1 (33.3) 2 (12.5)	3.7 (1.6-4.8) 4.6 (2.6-11.2)	8.1 (6.9-14.6) 10.2 (6.3-15.3)	3.4 (3.2-13) 4.3 (2.7-9.2)	10.3 (9.8-45.4) 4.6 (2.3-85.1)	60 (30-86) 17.5 (0-95)
p-Wert		0.558		0.228		1			0.533		0.303	0.793	0.875	0.138	0.211
mit X-Gewinn ohne X-Gewinn	-	0.457 0.364	15 11	8 (53.3) 4 (36.4)	7 (46.7) 7 (63.6)	14 (93.3) 10 (90.9)	1 (6.7) 1 (9.1)	1 (6.7) 1 (9.1)	11 (73.3) 8 (72.7)	3 (20) 2 (18.2)	5.7 (1.9-12.1) 7.6 (2-18.4)	9.8 (6-14.7) 10.3 (5.6-21.2)	3.6 (2.5-8.9) 3.7 (2.5-5.3)	6.4 (2.1-34.7) 8 (2.2-73.5)	12 (0-83) 29 (0-80)
p-Wert		0.705		0.453		1			0.971		0.610	0.919	0.540	0.574	0.443
mit X-Gewinn ohne X-Gewinn	+	1 0.457	3 15	3 (100) 8 (53.3)	0 (0) 7 (46.7)	3 (100) 14 (93.3)	0 (0) 1 (6.7)	0 (0) 1 (6.7)	2 (66.6) 11 (73.3)	1 (33.3) 3 (20)	3.7 (1.6-4.8) 5.7 (1.9-12.1)	8.1 (6.9-14.6) 9.8 (6-14.7)	3.4 (3.2-13) 3.6 (2.5-8.9)	10.3 (9.8-45.4) 6.4 (2.1-34.7)	60 (30-86) 12 (0-83)
p-Wert		0.375		0.245		1			0.812		0.130	0.912	0.654	0.203	0.130
Veränderungen in Subpopulationen															
mit 5q31.3-Verlust ohne 5q31.3-Verlust	+	0.600 0.833	6 13	2 (33.3) 9 (69.2)	4 (66.7) 4 (30.8)	6 (100) 11 (84.6)	0 (0) 2 (15.4)	0 (0) 3 (23.1)	4 (66.7) 9 (69.2)	2 (33.3) 1 (7.7)	5 (2.6-7.8) 4.1 (1.6-11.2)	9.3 (8-11.4) 9.9 (6.3-15.3)	4.9 (3.1-5.6) 3.7 (2.7-13)	7.9 (3.8-85.1) 4.9 (2.3-60.7)	66 (11-86) 18 (0-95)
p-Wert		0.105		0.319		1			0.212		0.966	0.966	0.765	0.386	0.072
mit 5q31.3-Verlust ohne 5q31.3-Verlust	-	1 0.339	3 23	2 (66.7) 10 (43.5)	1 (33.3) 13 (56.5)	3 (100) 21 (91.3)	0 (0) 2 (8.7)	0 (0) 2 (8.7)	2 (66.7) 17 (73.9)	1 (33.3) 4 (17.4)	8.2 (4.6-13.1) 5.7 (1.9-18.4)	11.5 (7.4-16.9) 9.8 (5.6-21.2)	3.3 (2.8-3.8) 3.7 (2.5-8.9)	10.8 (4.4-33.9) 6.7 (2.1-73.5)	61 (20-71) 12 (0-83)
p-Wert		0.080		0.580		1			0.730		0.242	0.490	0.705	0.541	0.312
mit 5q31.3-Verlust ohne 5q31.3-Verlust	+	0.600 1	6 3	2 (33.3) 2 (66.7)	4 (66.7) 1 (33.3)	6 (100) 3 (100)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	4 (66.7) 2 (66.7)	2 (33.3) 1 (33.3)	5 (2.6-7.8) 8.2 (4.6-13.1)	9.3 (8-11.4) 11.5 (7.4-16.9)	4.9 (3.1-5.6) 3.3 (2.8-3.8)	7.9 (3.8-85.1) 10.8 (4.4-33.9)	66 (11-86) 61 (20-71)
p-Wert		0.246		0.542		1			1		0.262	0.548	0.167	0.905	0.905
mit 5p15.33-Gewinn ohne 5p15.33-Gewinn	+	0.5 0.774	3 16	1 (33.3) 10 (62.5)	2 (66.7) 6 (37.5)	3 (100) 14 (87.5)	0 (0) 2 (12.5)	0 (0) 3 (18.8)	2 (66.7) 11 (68.8)	1 (33.3) 2 (12.5)	7.5 (4.8-7.8) 3.9 (1.6-11.2)	10.6 (8.1-10.8) 9.4 (6.3-15.3)	3.1 (3.1-3.4) 4.7 (2.7-13)	8.2 (2.9-45.4) 6 (2.3-85.1)	72 (2-86) 24 (0-95)
p-Wert		0.353		0.546		1			0.533		0.138	0.793	0.085	0.793	0.421

4. Diskussion

Molekulargenetische Analysen liefern einen wichtigen Beitrag zur Diagnostik von Leukämien. Sie dienen zudem der genauen Charakterisierung der Erkrankung, der Ermittlung von Prognoseparametern und der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. So kann einerseits der Krankheitsverlauf besser verstanden und andererseits die Therapie optimiert und individuell angepasst werden. Bei einigen Leukämieentitäten wird bereits, basierend auf molekulargenetischen Veränderungen, eine gezielte Therapie angewandt, z. B. mit Imatinib bei *BCR-ABL* oder mit ATRA bei *PML-RARA* positiven Leukämien.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Häufigkeit und klinische Bedeutung chromosomaler Veränderungen von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X bei Kindern und Jugendlichen mit erstem ALL-Rezidiv mittels Interphase-FisH untersucht.

4.1 Interphase-FisH zur Detektion chromosomaler Aberrationen

Die FisH-Analyse hat seit ihrer Etablierung die molekulargenetische Forschung und Diagnostik weit voran gebracht und stellt heutzutage eine der wichtigsten Methoden zur Bestimmung der Häufigkeit und Art chromosomaler Aberrationen dar. Die FisH-Analyse mit Lokus-spezifischen Sonden ist eine sensitive Methode zur Detektion spezifischer Chromosomenrekombinationen in hämatologischen Erkrankungen⁸⁷ und kann Veränderungen aufdecken, die der konventionellen zytogenetischen Analyse verborgen bleiben⁸⁸. Vor allem, wenn die Gewinnung von Metaphasen, wie bei Leukämiezellen, schwierig ist, liefert die Interphase-FisH-Analyse wertvolle Informationen, die der Charakterisierung der Erkrankung und der Therapieplanung dienen.

Weitere Vorteile sind die simultane Untersuchung sehr vieler Zellen auf mehrere Aberrationen durch gleichzeitige Verwendung multipler Sonden, die relativ kurze Versuchsdauer (im Vergleich zu Zellkulturmethoden) und Wiederholbarkeit bei misslungenem Experiment durch Abwaschen der Signale und erneute Hybridisierung sowie die hohe Sensitivität der Methode^{82, 89}.

Allerdings kann mit FisH nur spezifisch nach bekannten Zielsequenzen gesucht werden. Die Signalintensität sowie der Anteil unspezifischer Hintergrundfluoreszenz hängen stark von der Qualität des Zellmaterials und der Sonde sowie der Größe des ausgewählten DNA-Bereichs ab, so dass das verwendete Protokoll diesbezüglich kontrolliert und optimiert werden muss. Bei KM-Ausstrichen sind die Ergebnisse nur bei einem hohen Blastenanteil aussagekräftig.

In der vorliegenden Studie wurden deshalb nur Ausstriche mit einem Blastenanteil >60% untersucht. Durch regelmäßige Überprüfung der Hybridisierung auf Metaphase-Chromosomen wurde die Bindungsspezifität der BACs gesichert. Um versehentliche Wertung von Artefakten zu minimieren, wurden die in 2.6.1 beschriebenen Kriterien zur Beurteilung von FisH-Bildern strikt angewendet. Diese Auswertung wurde von zwei unabhängigen Personen durchgeführt und ergab eine gute Übereinstimmung der Resultate (hohe Korrelationskoeffizienten).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben von 45 Patienten mit ALL untersucht. Bei drei Patienten waren Karyotypanalysen verfügbar, bei einer Patientin array-CGH Daten aus einer anderen Studie (Renia Vagkopoulou, persönliche Kommunikation). Die Ergebnisse der FisH-Analyse an den Zellen dieser Patienten stimmten in allen Fällen mit den vorherigen Untersuchungen überein bzw. lieferten keine widersprüchlichen Resultate: Der bei Patientin #6 (*TEL-AML1* positive ALL) in über 70% der leukämischen Zellen gefundene Gewinn der untersuchten Regionen auf Chromosom 5p und 5q bestätigte die mittels array-CGH gesehene Trisomie 5. Die Analyse des Folgerezidivs von Patientin #3 (*TEL-AML1* positiv) zeigte im Vergleich zum Erstrezidiv zwar Abweichungen des chromosomalen Musters, allerdings auch die klare Expansion eines schon im Erstrezidiv auffällig häufig vorhandenen Klons. Die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Interphase-FisH-Analysen wurde auch durch die vergleichende Auswertung mehrerer Blutausstriche von Proband #4 bestätigt, bei der sehr ähnliche Ergebnisse gefunden wurden (Abbildungen 16, 17), und durch die Analyse von REH: Wie in der Literatur beschrieben^{78, 90}, zeigt diese Zelllinie den Verlust eines Chromosom X. Dies konnte in annähernd 100% der ausgewerteten Zellen verifiziert werden.

Die FisH-Analyse hat sich in dieser Arbeit also als zuverlässige Methode erwiesen, um Gewinne und Verluste von Chromosomen(bereichen) in Interphasezellen zu detektieren.

4.2 Prävalenz und klinische Relevanz der untersuchten Aberrationen

4.2.1 Prävalenz der untersuchten Aberrationen bei *TEL-AML1* positiver ALL

Obwohl in der Literatur mehrere Publikationen über genomweite Analysen chromosomaler Veränderungen bei Kindern mit ALL erschienen sind, ist es in einigen dieser Veröffentlichungen nicht möglich, die genauen Prävalenzen numerischer Aberrationen von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X zu eruieren, da die Autoren den Schwerpunkt teilweise auf die Beschreibung von Mutationen anderer Regionen legen.

In Tabelle 18 sind die Ergebnisse verwertbarer aktuellerer Studien über die Prävalenz numerischer Veränderungen der in dieser Arbeit untersuchten Regionen bei initialen und rezidierten *TEL-AML1* positiven ALL zusammengetragen. Dabei sind nur Gewinne und Verluste von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X bei *TEL-AML1* positiven ALL im Kindes- und Jugendalter aufgeführt, da die in der Literatur beschriebenen, in Studien untersuchten *TEL-AML1* negativen Kollektive oft recht heterogen und deshalb schlecht mit den *TEL-AML1* negativen ALL dieser Arbeit vergleichbar sind.

Tabelle 18: Häufigkeiten von Gewinnen und Verlusten von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X bei *TEL-AML1* positiven, initialen und rezidierten ALL im Kindesalter

Referenz	Stadium	n =	(modale Chromosomenzahl 46-50, <i>BCR-ABL</i> und <i>MLL</i> -Translokation negativ)					
			5q31.3		5p15.33		X	
			Verlust n (%)	Gewinn n (%)	Verlust n (%)	Gewinn n (%)	Verlust n (%)	Gewinn n (%)
Raynaud 1999 ³⁵	ini	169	4 (2.7)*	1 (0.7)*	1 (0.7)*	0	11 (7.5)	4 (2.7)
Forestier 2007 ²²	ini	248	10 (4.0)	6 (2.4)	7 (2.8)	4 (1.6)	20 (8.1)	5 (2.0)
Mullighan 2007 ³⁷	ini	47	6 (12.8)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
Mullighan 2008 ⁴⁹	ini	5	1 (20)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
	rez	5	2 (40)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
Tsuzuki 2007 ³⁶	ini	24	0	0	0	0	0	0
Giese	rez	53	6 (11.3)	2 (3.8)	n. e.	5 (9.4)	9 (17)	n. e.
vorliegende Arbeit	rez	19	7 (36.8)	1 (5.3)	4 (21.1)	4 (21.1)	1 (5.3)	3 (15.8)

ini = initiale Erkrankung; rez = Erstrezidiv; n. e. = nicht eruierbar

In Klammern stehen die Angaben in Prozent.

* In der Arbeit von Raynaud werden die Gewinne und Verluste von 5q und 5p nicht nach Regionen aufgeschlüsselt gezeigt, die Zahlen beziehen sich also jeweils auf Gewinne und Verluste des ganzen Chromosomenarms.

Da in der Literatur vor allem Angaben über den Verlust von 5q31.3 zu finden sind und diese Veränderung die größtmögliche klinische Relevanz hat, wird der Schwerpunkt der Diskussion auf dem Verlust von 5q31.3 liegen.

4.2.2 Gewinne und Verluste von 5q31.3

4.2.2.1 Verluste von 5q31.3

4.2.2.1.1 *Verluste von 5q31.3 bei hämatologischen Erkrankungen*

Erworbene interstitielle Deletionen des langen Arms von Chromosom 5 sind die häufigsten strukturellen Chromosomenaberrationen bei AML und myelodysplastischen Syndromen (MDS) und werden in der Literatur schon seit mehr als 20 Jahren beschrieben⁹¹⁻⁹³. Dabei ist 5q31 das am häufigsten deletierte Segment⁹¹. Le Beau et al. schlagen *EGR1* auf 5q31.2 als putatives, in die Pathogenese involviertes Tumorsuppressorgen vor⁹⁴. Bei ALL sind 5q-Deletionen dagegen selten⁹⁵.

Bisher gibt es wenige Publikationen über Verluste innerhalb der Region 5q31.3. In einer Studie an insgesamt 242 Patienten mit ALL-Ersterkrankung berichten Mullighan et al. über 5q31.3-Deletionen bei sechs von 47 (12.8%) *TEL-AML1* positiven ALL³⁷. In den anderen untersuchten Patientengruppen, die jeweils kleiner waren als die *TEL-AML1* positive Gruppe (Hyperdiploide mit 47-50 Chromosomen, Hyperdiploide mit >50 Chromosomen und andere), trat die Deletion je einmal auf sowie bei Gruppen mit prognostisch ungünstigen Merkmalen wie Hypodiploidie, *MLL*- und *BCR-ABL*-Translokation gar nicht. In einer Analyse klonaler Ursprünge des ALL-Rezidivs derselben Arbeitsgruppe war die Prävalenz des 5q31.3-Verlusts bei *TEL-AML1* positiven ALL im Rezidiv mit 40% doppelt so hoch wie bei der Ersterkrankung (20%), allerdings war die Zahl der analysierten *TEL-AML1* positiven ALL mit fünf sehr klein⁴⁹. Die übrigen zu findenden Publikationen beziehen sich auf initiale Erkrankungen, in welchen ein Verlust von 5q31.3 selten detektiert wurde^{22, 35, 36}.

Die Prävalenz der 5q31.3-Deletion lag im untersuchten Kollektiv der vorliegenden Arbeit bei 26.7%. Dabei zeigten die Blasten der *TEL-AML1* positiven ALL diese Veränderung häufiger (36.8%) als die *TEL-AML1* negativen ALL (19.2%). Dieser Unterschied war nicht signifikant, was durch die kleine Fallzahl bedingt sein kann. In der array-CGH Studie der eigenen Arbeitsgruppe, deren Ergebnisse mithilfe dieser Arbeit validiert werden sollten, hatten sechs *TEL-AML1* positive ALL (11%) eine Deletion von *NR3C1* (Almut Giese, persönliche Mitteilung). Diese Zahl stimmt gut mit dem von Mullighan et al. bei der initialen Erkrankung gefundenen Anteil³⁷ überein, deckt sich jedoch nicht mit der dreifach höheren Prävalenz (36.8%) der 5q31.3-Deletion im hier untersuchten *TEL-AML1* positiven Kollektiv. Diese relativ hohe Zahl entspricht wiederum den Angaben aus der Rezidivstudie von Mullighan (Prävalenz der 5q31.3-Deletion = 40%)⁴⁹.

Möglicherweise ist der Verlust von *NR3C1* in der Region 5q31.3 also ein im Rezidiv häufiger als in der Ersterkrankung anzutreffendes Phänomen bei *TEL-AML1* positiven ALL.

Die gefundenen Differenzen könnten auch auf methodischen Unterschieden beruhen; FisH-Analysen weisen die Verluste eines 5q31.3-Allels in ungefähr 20% der Zellen, die in den hier analysierten Proben gefunden wurden, eventuell besser nach. Die Ergebnisdiskrepanz könnte auch einer möglichen ungewollten Selektion der Patienten oder auch der vielleicht nicht repräsentativ großen Fallzahl von 19 *TEL-AML1* positiven ALL in der vorliegenden Arbeit geschuldet sein. Unwahrscheinlich sind Fehler beim Hybridisieren oder die akzidentelle Wertung von Artefakten.

Interessanterweise gab es in einer Studie an *TEL-AML1* positiven ALL bei 17% Verluste der Region 4q31.23, die das Mineralokortikoidrezeptor-Gen *NR3C2* beherbergt³⁶. Die Autoren bringen diese Veränderungen aber nicht mit GC-Resistenz in Zusammenhang, sondern nehmen an, dass die Deregulation intrazellulärer Signalwege durch Verlust u. a. dieses Gens zur Entwicklung von Leukämien beitragen kann. Offenbar ist *NR3C2* für das Überleben der Zellen nicht essenziell, da die Deletion in zwei Fällen homozygot auftrat. In Zelllinien kann der Mineralokortikoidrezeptor mit seiner N-terminalen Domäne die GC-vermittelte Apoptose lymphoider Zellen hemmen⁹⁶.

4.2.2.1.2 Verluste von 5q31.3 bei anderen Malignomen

Deletionen von 5q31.3 sind nicht nur für Leukämien beschrieben. Johannsdottir et al. berichten in einer Studie zur Pathogenese des Mammakarzinoms (n = 174) über den Verlust der Heterozygotie in der 5q31.3-Region (*loss of heterozygosity*, LOH) bei jeweils 43% der untersuchten Patienten mit sporadischen Tumoren und 43% der Patienten, die eine prädisponierende Mutation im *BRCA2*-Gen tragen⁹⁷. Der 5q31.3-LOH war mit verschiedenen prognostisch ungünstigen Parametern wie hohem Anteil an Zellen in der S-Phase, Aneuploidie und niedrigem Differenzierungsgrad der Zellen assoziiert. Mittels array-CGH wurde der Verlust eines großen Bereichs (11.6 Mbp) in 5q31.3 erkannt, der über 50 Gene beinhaltet. Auf 5q31.3 sind keine Kandidatengene für Brustkrebs bekannt, so dass die Autoren vermuten, dass verschiedene Tumorsuppressorgene auf benachbarten Regionen in 5q31, die mit deletiert werden, eine Rolle für die Tumorgenese spielen⁹⁷.

Allen malignen Erkrankungen ist die (unkontrollierte) Teilung und Expansion maligner Zellen gemein, so dass möglicherweise sogar solide Tumoren wie das

Mammakarzinom und Systemerkrankungen wie Leukämie pathogenetische Ähnlichkeiten aufweisen könnten.

In der AML-Zelllinie HL-60 ist ein großer Bereich auf 5q (11.2-31) inklusive *NR3C1*, das vermindert exprimiert wird, deletiert⁹⁸. Die Autoren bezeichnen die deletierten Gene als „mit malignen Erkrankungen zusammenhängend“, eine klinische Relevanz wurde jedoch nicht untersucht.

Hingegen kann die Funktion von *NR3C1* in Kolonkarzinom-Zelllinien durch Hypermethylierung herunter reguliert und die Expression vermindert sein⁹⁹.

In der Therapie des Kolon- und Mammakarzinoms spielen GC keine entscheidende Rolle, so dass bei diesen Erkrankungen kein Zusammenhang zwischen *NR3C1*-Deletion und GC-Resistenz untersucht wurde.

4.2.2.1.3 Größe der deletierten Bereiche in der Region 5q31.3

Die Arbeitsgruppe um Mullighan beschreibt als kleinste gemeinsame deletierte Region auf 5q31.3 den Bereich 142760000-142847000 mit einer Größe von 0.087 Mbp, der außer dem *NR3C1*-Gen noch das zur gleichen Gruppe gehörige, hypothetische Gen *LOC389335* enthält³⁷. Deutlich größer ist die in einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe gefundene minimale gemeinsame deletierte Region (Basenpaare 142706911-143119010) mit ca. 0.41 Mbp (Almut Giese, persönliche Mitteilung). Der für diese Studie verwendete BAC RP11614D16 bindet an den Bereich 142706912-142910614 und erfasst somit beide Regionen, in denen bereits Deletionen beschrieben wurden, und den größten Teil des *NR3C1*-Gens.

4.2.2.1.4 Konsequenzen der 5q31.3-Deletion

Die 5q31.3-Deletion war in einem von der eigenen Arbeitsgruppe untersuchten Kollektiv mit einem schlechten Ansprechen auf die Therapie (detektierbare MRD und schlechte morphologische Response) aber nur grenzwertig mit der pEFS assoziiert (Almut Giese, persönliche Mitteilung).

In der vorliegenden Arbeit konnten zwischen den *TEL-AML1* positiven ALL mit und ohne 5q31.3-Deletion zwar keine signifikanten Unterschiede bezüglich MRD-Status, pEFS, Alter bei Erst- und Rezidivdiagnose, peripherer Blastenzahl und Leukozytenzahl bei Diagnosestellung ermittelt werden, jedoch traten bei Patienten mit 5q31.3-Verlust in den ALL-Blasten häufiger ungünstige Ereignisse wie Folgerezidiv oder Tod auf. Die

Gruppe *TEL-AML1* positiver ALL mit 5q31.3-Verlust ist mit sieben Patienten allerdings recht klein, so dass kein signifikanter Zusammenhang detektiert werden konnte.

Proben von Mädchen mit ALL waren im untersuchten *TEL-AML1* positiven Kollektiv öfter von einer 5q31.3-Deletion betroffen als Proben von Jungen mit ALL, wobei auch hier angemerkt werden muss, dass die Fallzahl niedrig ist, so dass sich nur eine Tendenz und kein signifikanter Unterschied abzeichnet.

In der vorliegenden Arbeit war es durch den Einsatz von Interphase-FisH-Analysen möglich, auch Aussagen über chromosomale Veränderungen in mehreren Subpopulationen von Zellklonen zu treffen, so dass ein umfassendes Bild über die Situation in Zellen von Kindern mit rezidivierender *TEL-AML1* positiver und negativer ALL gewonnen wurde.

TEL-AML1 positive ALL mit 5q31.3-Verlust in Subpopulationen tendierten in der vorliegenden Arbeit zu höheren peripheren Blastenzahlen zum Diagnosezeitpunkt.

Die 5q31.3-Deletion war nicht mit MRD assoziiert, wobei zu beachten ist, dass die Aufteilung der Patienten auf die einzelnen MRD-Risikogruppen aufgrund der geringen Fallzahlen zu sehr kleinen Gruppen führte (z. B. zeigt nur eine *TEL-AML1* positive ALL einen prognostisch ungünstigen MRD3-Status), so dass die statistische Aussagekraft eingeschränkt war. Außerdem kann eine hohe MRD-Last, also ein schlechtes Therapieansprechen, auch durch Resistenzen der Blasten gegenüber den anderen eingesetzten Pharmaka oder weitere ungünstige prognostische Faktoren bedingt sein.

Die in dieser Arbeit untersuchten Kinder mit *TEL-AML1* positivem ALL-Erstrezidiv trugen die 5q31.3-Deletion in einem signifikant höheren Prozentsatz ihrer leukämischen Zellen über dem Cut-off Wert als *TEL-AML1* negative ALL, allerdings in höchstens 30% der ausgewerteten Zellen und immer in nur einem Allel.

Einerseits stellt sich somit die Frage, ob monoallelische *NR3C1*-Verluste in (nur) knapp einem Drittel der Zellen bereits zu bedeutsam verminderter Proteinexpression und GC-Resistenz führen können, andererseits scheint ein kompletter (Funktions)verlust des GR, zumindest, wenn er in allen embryonalen Zellen auftritt, die Entwicklung stark zu beeinträchtigen und kaum mit dem Überleben vereinbar zu sein: GR-knockout C57BL/6 Mäuse (-/-) starben in einer Studie nach der Geburt an respiratorischer Insuffizienz aufgrund atelektatischer Lungen¹⁰⁰. Nur ein kleiner Teil der Tiere überlebte bis zur adulten Lebensphase, möglicherweise aufgrund von Variationen des genetischen Hintergrunds. Ebenfalls für die Notwendigkeit zumindest einiger funktionierender GR spricht, dass bei der seltenen, generalisierten GC-Resistenz Mutationen von *NR3C1*

fast ausschließlich heterozygot gefunden werden⁶⁶ und dass auch bei rezidivierten ALL zwar ein seltener LOH des GR aber kein biallelischer GR-Verlust beschrieben wird¹⁰¹.

Die Bedeutung von verminderter GR-Expression für die GC-Resistenz, sei es durch Mutationen oder Deletionen im GR-Gen verursacht, ist noch nicht hinreichend geklärt.

Bisher gibt es keine Publikationen zur klinischen Relevanz der *NR3C1*-Deletion bei initialer und rezidivierter ALL. Ältere und aktuelle Studien über den Zusammenhang zwischen GC-Resistenz und Expression des GR oder seiner Varianten liefern widersprüchliche Ergebnisse: In neueren Studien hing die GR-Expression mit der Fähigkeit zur Apoptoseinduktion in den leukämischen Blasten¹⁰², der Prednisolonresistenz *in vivo*¹⁰³ und *in vitro*¹⁰⁴ vor Beginn der Induktions-Kombinations-Chemotherapie und in einer großen, älteren Studie mit der Heilungschance der Patienten zusammen¹⁰⁵, während andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die GC-Resistenz *in vivo* und *in vitro* unabhängig von der GR-Expression^{106, 107} bzw. der durch GC initiierten GR-Hochregulation¹⁰⁸ ist. In der Studie von Lauten et al.¹⁰⁶ wurde jedoch nur Patientenmaterial des initialen Diagnosezeitpunkts untersucht und eine mittlere GR-Expression mit Western Blot bestimmt, so dass GC-resistente Subklone, deren Bedeutung vielleicht erst im Rezidiv zum Tragen gekommen wäre, nicht mit erfasst werden konnten. Essenziell für die Apoptoseinitiierung war in Studien jedenfalls die Hochregulation von *NR3C1* nach GC-Gabe^{109, 110}.

Die relative Expression von Spleißvarianten des GR scheint im Gegensatz zur absoluten Zahl der GR keinen Einfluss auf die GC-Resistenz zu haben^{104, 107}, allerdings werden die GR-Varianten während der Therapie mit GC bei *prednisone poor responder* und *prednisone good responder in vivo* verschieden stark hochreguliert¹¹¹. Diese Aktivierung ist in der Publikation von Lauten in GC-sensitiven ALL stärker als in GC-resistenten ALL, anders als von Tissing et al. 2006¹⁰⁸ beschrieben. In mehreren Studien wurde eine Assoziation zwischen der Expression der GR-Spleißvariante GR γ und GC-Resistenz gefunden^{107, 111, 112}, wobei erwähnt werden muss, dass GR γ nur einen sehr geringen Anteil der GR ausmacht¹⁰⁴.

Somatische Mutationen und LOH des GR sind bisher beim ALL-Rezidiv selten beschrieben^{101, 113}.

Auch wenn Rezeptor-unabhängige Mechanismen ebenfalls zur GC-Resistenz leukämischer Blasten beitragen können, lieferte eine Studie von Schmidt et al. an GC-resistenten Zelllinien Hinweise darauf, dass die Resistenz überwiegend auf Rezeptorebene zustande kommt¹¹⁴. Unklar ist weiterhin, ob Zelllinienmodelle die

klinisch relevanten Vorgänge korrekt widerspiegeln. Primäre ALL-Blasten proliferieren selten *in vitro*, und selbst wenn, kann nur die proliferierende Subpopulation und nicht die meist heterogene Gesamtheit der Blasten untersucht werden. Durch die Kultivierung von Zellen können zudem möglicherweise weitere Mutationen entstehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zwar die Hypothese, dass die Deletion von *NR3C1* in der Region 5q31.3 eine Untergruppe von Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL mit schlechter Prognose charakterisiert, andeuten, die Richtigkeit dieser jedoch nicht beweisen. Eine Evaluierung an einem größeren Kollektiv könnte zur Klärung dieser Fragen beitragen. Für die Pathogenese des ALL-Rezidivs und der Resistenz gegen GC sind sicherlich noch weitere Faktoren bedeutsam. Mögliche, für GC-Resistenz verantwortliche Mechanismen werden im Folgenden dargestellt.

4.2.2.1.5 Weitere Mechanismen der Glukokortikoidresistenz

Die Wirksamkeit von und Resistenz gegenüber GC ist abhängig vom Reifungsgrad der Lymphozyten, von GR-Mutationen und der Konzentration der applizierten GC.

Auf molekularer Ebene können entweder der Glukokortikoid-Rezeptor (Abbildung 24, 2), sein Ligand (Abbildung 24, 1) (*upstream-Mechanismen*), oder die auf die Ligandenbindung folgenden Signaltransduktionswege (*downstream-Mechanismen*, Abbildung 24, 4-5) betroffen sein.

Zu den bisher postulierten *upstream-Mechanismen* der GC-Resistenz nach Kombinationschemotherapie gehören die Überexpression des P-Glykoproteins, das GC-Analoga aus der Zelle befördert¹¹⁵⁻¹¹⁷ und als eher theoretisches Modell die Abschwächung der GC-Wirkung durch GC-metabolisierende Enzyme wie 11 β Hydroxysteroid-Dehydrogenase in der Zelle¹¹⁸⁻¹²⁰.

Weitere, noch nicht vollständig geklärte Mechanismen sind Mutationen und Polymorphismen des GR¹²¹ (Abbildung 24, 2). Für ALL ist bisher der *NR3C1*-Polymorphismus *NR3C1 BCL-I RFLP* beschrieben, der, wenn er homozygot auftritt, mit einer Verringerung der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten assoziiert ist¹²², in einer aktuellen Studie aber nicht mit der ALL-Risikogruppe oder dem Ausmaß der GC-Nebenwirkungen zusammenhängt¹²¹.

Durch alternatives Spleißen, Polyadenylierung oder translationale Initiation an unterschiedlichen Stellen der transkribierten RNA entstehen GR-Varianten, die teilweise unfähig sind, GC zu binden. Bisher sind fünf GR-Isoformen beschrieben, von denen zwei, GR-P/GR- δ und GR-A, ursprünglich in einer GC-resistenten Myelomzelllinie

entdeckt wurden¹²³. GR-P wurde sowohl in normalen Lymphozyten als auch in (hämatologischen) malignen Neoplasien gefunden. Die Rolle dieser und anderer Varianten für die GC-Resistenz ist bislang unklar und wird kontrovers diskutiert.

Über die Bedeutung der GR-Expressionslevel für die GC-Resistenz gibt es widersprüchliche Forschungsergebnisse (4.2.2.1.4).

Mutationen oder abnorme Expressionsraten von GC-assoziierten Proteinen und Faktoren wie Chaperonen oder Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma (Abbildung 24, 3A) oder im Kern (Abbildung 24, 3B) könnten ebenfalls zur GC-Resistenz beitragen.

Ein denkbarer *downstream-Mechanismus* der GC-Resistenz ist ein Defekt der durch GC regulierten Gene, der das Auslösen der gewünschten Apoptosewirkung verhindert (Abbildung 24, 4). Als Kandidatengene mit zum Teil fraglicher Funktion gelten u. a. *c-myc*¹²⁴, *IκB*¹²⁵ oder *c-jun*¹²⁶. Allerdings gibt es bisher noch keine Belege für durch sie vermittelte GC-Resistenz.

Der regelrechte Ablauf der Apoptosekaskade in der Zelle kann durch andere, parallel stattfindende Signaltransduktionswege gestört werden, dies wird als „inhibitorischer Cross-Talk“ bezeichnet (Abbildung 24, 5).

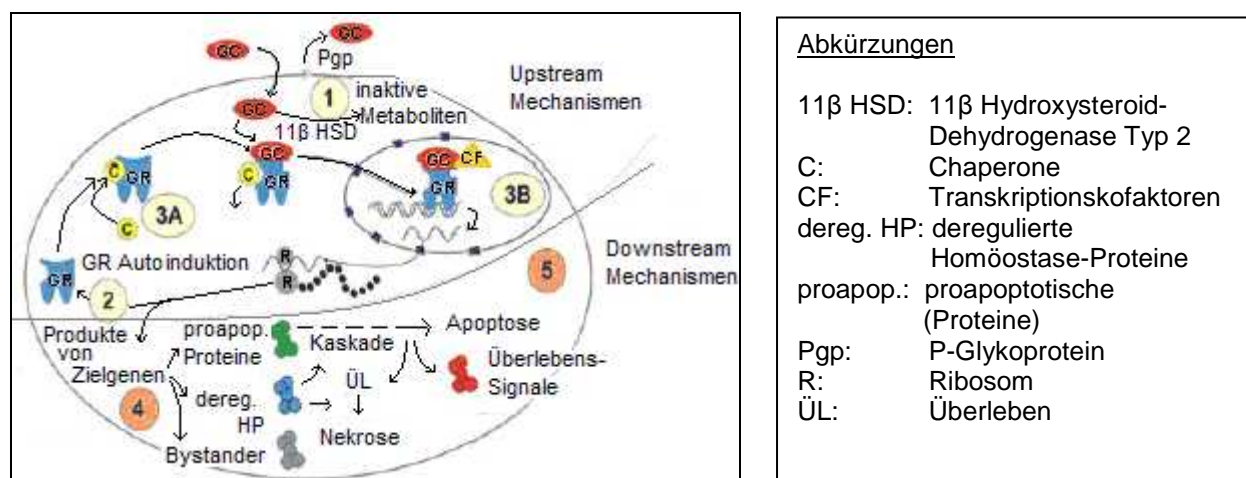


Abbildung 24: Mechanismen der Glukokortikoidresistenz, modifiziert nach⁵⁸
Die in der Abbildung gezeigten Zahlen werden im Text (4.2.2.1.5) erklärt

4.2.2.1.6 Ausblick: Ansätze zur Reversibilität der Glukokortikoid-Resistenz

Neuere Studien zeigen, dass die Resistenz gegenüber GC pharmakologisch teilweise reversibel ist: Gamma-Sekretase Inhibitoren (GSI), die die Aktivierung von Signalwegen des onkogenen Proteins NOTCH 1 hemmen, führten in GC-resistenten T-ALL-Zelllinien zur Selbstinduktion des GR und zur Apoptose¹²⁷. Eventuell hilft dieser Mechanismus bei

verminderter GR-Expression aber nicht, die GC-Resistenz zu überwinden. Bisher ist nicht bekannt, ob die GSI-Gabe auch *in vivo* und auch bei B-ALL eine Aufhebung der GC-Resistenz bewirken kann.

In den letzten Jahren wurde von der Arbeitsgruppe um Golub mithilfe so genannter „connectivity maps“^{128, 129} ein weiterer Ansatz zum Umkehren der GC-Resistenz entwickelt: Dabei wurden „Genexpressionssignaturen“, spezifische Genexpressionsprofile krankhaft veränderter Zellen, z. B. ALL-Zellen, mit den Genexpressionsmustern, die in Zellen durch Gabe verschiedener Medikamente entstanden, verglichen.

In vitro auf GC sensibel reagierende Zellen zeigten dabei die gleiche Genexpressionssignatur wie mit dem Immunsuppressivum Sirolimus (Rapamycin) behandelte Zellen¹³⁰. Sirolimus greift über Hemmung des Proteins mTOR in den Zellzyklus und die T-Zell-Aktivierung ein und wurde bisher zur Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen und zur Beschichtung von Koronarstents verwendet. In einer Studie von Wei et al. führte es bei verschiedenen GC-resistenten Zelllinien zu Sensibilität für die durch GC induzierte Apoptose bzw. zu einer Erniedrigung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀, Konzentration für 50%ige Inhibition *in vitro*) für Dexamethason nach Vorbehandlung mit Rapamycin¹³⁰. Die Autoren beschreiben als mögliche Ursache dieses Phänomens eine Herunterregulation des antiapoptotischen, zur BCL-2-Familie gehörigen Proteins MCL1, das in leukämischen Zellen mit GC-Resistenz *in vitro* zusammenhängt, wenn es stark exprimiert wird¹³¹.

Die *TEL-AML1* positive ALL-Zelllinie REH wurde durch Sirolimus nicht sensibel gegenüber GC, was die Autoren auf einen anders als bei den übrigen getesteten Zelllinien funktionierenden Mechanismus der GC-Resistenz zurückführen¹³⁰. Somit erhebt sich die Frage, ob und wie die GC-Resistenz bei *TEL-AML1* positiver ALL (durch Sirolimus) revertierbar ist.

Sirolimus wurde bisher nicht in der ALL-Therapie eingesetzt, wird aber in einer laufenden klinischen Studie in Kombination mit GC-Gabe getestet¹³².

4.2.2.2 Gewinne von 5q31.3

Signalvermehrungen von 5q31.3 waren im untersuchten Kollektiv selten und wurden nur bei einem Mädchen mit *TEL-AML1* positiver ALL mit hyperdiploidem Chromosomensatz in den Leukämiezellen und drei *TEL-AML1* negativen ALL, deren

Diploidiestatus in den Blasten unbekannt aber vermutlich ebenfalls hyperdiploid ist, gesehen. Auch in der Studie der eigenen Arbeitsgruppe (Giese) gab es kaum 5q31.3-Gewinne (bei 4% der ALL-Rezidive, von denen eines als hyperdiploid eingestuft wurde). Gewinne eines Bereichs auf 5q31.3 (Basenpaare 140021000–141371000) beschreiben Narayan et al. beim Zervixkarzinom und weisen dabei den Genen *CENTD3*, das u. a. wichtig für die Organisation des Zytoskeletts ist, und *DIAPH1*, welches ebenfalls mit der Zytoskelettorganisation sowie mit vererbaren Hörstörungen in Zusammenhang gebracht wird, eine tumorigene Rolle zu¹³³. Der in dieser Arbeit verwendete BAC RP11614D16 für 5q31.3 bindet nicht an die Loci, in denen diese Gene liegen, so dass hier keine Aussage getroffen werden kann, ob es auch bei ALL zu Gewinnen von *CENTD3* und *DIAPH1* kommt.

Bei den *TEL-AML1* negativen ALL mit 5q31.3-Gewinn in der vorliegenden Arbeit lag der periphere Blastenanteil signifikant niedriger als bei den ALL mit normaler oder verminderter 5q31.3-Signalzahl, allerdings verteilten die Blasten sich gleich in prognostisch bedeutsame PBC-Gruppen. Für die übrigen untersuchten Prognoseparameter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Annahme, dass vermehrtes *NR3C1*-Genmaterial protektiv wirkt, bleibt aufgrund kleiner Fallzahlen hypothetisch.

4.2.3 Gewinne und Verluste von 5p15.33

Da Deletionen oder Gewinne von 5p15.33 im Zusammenhang mit ALL in der Literatur selten beschrieben sind, wurde diese Region als Kontrollbereich zur Ermittlung der Kopienzahl pro Zelle bzw. numerischer Veränderungen von Chromosom 5 ausgesucht. Unerwarteterweise zeigten die Zellen bei einem Drittel der ALL Signalvermehrungen oder –verminderungen von 5p15.33 in der FisH-Analyse, die konsekutiv auf prognostische Relevanz untersucht wurden.

4.2.3.1 Verluste von 5p15.33

Im vorliegenden Patientenkollektiv fiel bei 13% aller ALL ein 5p15.33-Verlust auf. Gleichzeitig war in den Blasten dieser ALL 5q31.3 deletiert, trat jedoch in keinem Fall gemeinsam mit der 5p15.33-Deletion in Subpopulationen auf. Das heißt, dass wahrscheinlich nie das ganze Chromosom 5 deletiert war. Für den 5p15.33-Verlust konnte in der statistischen Analyse kein Einfluss auf die Prognose der Patienten nachgewiesen werden. Insofern eignete 5p15.33 sich gut als „neutrale“ Kontrollregion.

4.2.3.2 Gewinne von 5p15.33

Der Gewinn von 5p15.33 inklusive der Gene *TPPP*, das für die Tubulinpolymerisierung wichtig ist, und *ZDHHC11*, dessen Funktion bisher unklar ist, ist beim Urothelkarzinom signifikant mit einem höheren Tumorgrad und fortgeschrittenem Stadium assoziiert¹³⁴. Auch beim Ösophaguskarzinom¹³⁵ und beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC)¹³⁶ ist der Gewinn von 5p15.33 häufig und hängt mit schlechten Prognoseparametern zusammen¹³⁵. Die Bedeutung von *TPPP* für maligne Tumoren ist noch unklar, besteht aber möglicherweise darin, dass ein Gewinn von *TPPP* zu einem Wachstumsvorteil für bestimmte Zellen führt. Unregelmäßigkeiten bei der Tubulinzusammenlagerung und Formation der mitotischen Spindel sind Kennzeichen vieler maligner Tumoren. Allerdings wurden in den genannten Studien nur Proben erwachsener Patienten mit Plattenepithelkarzinomen untersucht, Tumorentität und Patientenkollektiv unterscheiden sich also von der vorliegenden Arbeit.

9% der *TEL-AML1* positiven ALL im von Giese untersuchten Kollektiv zeigten einen Gewinn von 5p15.33. Ein Patient mit hyperdiploidem Chromosomensatz hatte zusätzlich noch 5q31.3, also vermutlich das gesamte Chromosom 5, in seinen Blasten hinzugewonnen. Eine ähnliche Situation (5p15.33- und 5q31.3-Gewinn) fand sich im hier analysierten Kollektiv in den Blasten von insgesamt vier Patienten, von denen drei an *TEL-AML1* negativer ALL erkrankt waren und in ihren Leukämiezellen zusätzlich noch ein oder mehrere Chromosomen X hinzugewonnen hatten. Bei zwei ALL können diese Gewinne sicher im Zusammenhang mit der bekannten Hyperdiploidie gesehen werden. Auch bei den beiden anderen ALL-Patienten deuten die multiplen Gewinne auf einen hyperdiploiden Chromosomensatz in den Blasten hin.

Nur drei *TEL-AML1* positive ALL trugen auch in Subpopulationen von Zellen eine erhöhte 5p15.33-Signalzahl. Diese Patienten tendierten zu einer kürzeren Erstremissionsdauer als die übrigen *TEL-AML1* positiven Patienten, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

In der Gruppe der *TEL-AML1* positiven ALL gab es zwei ALL mit auffälligen 5p15.33-Gewinnen, die im Vergleich mit dem Rest der *TEL-AML1* positiven Gruppe zu höheren peripheren Blastenzahlen tendierten. Die ALL der Patientin #3 zeigte sowohl im Erst- als auch im Zweitrezidiv viele Zellen mit drei 5p15.33-Signalen. Im Zweitrezidiv tauchten diese in doppelt so vielen Zellen wie im Erstrezidiv und teilweise gemeinsam in Subpopulationen mit Chromosom-X-Verlust auf. Bei Patient #19 (*TEL-AML1* positive ALL) war neben dem 5p15.33-Gewinn in vielen Zellen auch ein Verlust von 5q31.3

nachweisbar, fand sich aber in einer separaten Subpopulation, so dass hier kein Klon mit den fraglich negativen Prognosemerkmalen -5q31.3 und +5p15.33 gefunden wurde. Die Untersuchung eines größeren Kollektivs könnte die genannten Beobachtungen vielleicht bestätigen und klären, ob ein *TPPP*-Gewinn auch auf maligne Systemerkrankungen wie ALL einen negativen prognostischen Einfluss ausübt. Allerdings wurden bisher auch in genomweiten Studien chromosomale Veränderungen von 5p15.33 bei ALL nur selten entdeckt (siehe Tabelle 18).

4.2.4 Gewinne und Verluste von Chromosom X

4.2.4.1 Verluste von Chromosom X

Der Verlust eines Chromosom X konnte im untersuchten Kollektiv bei zwei *TEL-AML1* positiven ALL weiblicher Patienten nachgewiesen werden; bei einer im ALL-Erstrezidiv und einer nur im ALL-Zweitrezidiv. Da der Hauptfokus dieser Arbeit auf dem ALL-Erstrezidiv liegt, wird für die Diskussion die Patientin mit ALL-Zweitrezidiv zunächst zurückgestellt.

Wie die neun Patienten mit Chromosom-X-Deletion aus der bereits erwähnten array-CGH Studie der eigenen Arbeitsgruppe (Giese) hat das Mädchen mit relevantem Chromosom-X-Verlust in den Blasten in dieser Arbeit einen prognostisch günstigen MRD-Status (0) und ist weiblich, allerdings lag im untersuchten *TEL-AML1* positiven Kollektiv die Prävalenz der Chromosom-X-Deletion nur bei 5.3% im Gegensatz zur Arbeit von Giese (17%).

In einer größeren Studie von Riesch et al. war die Prävalenz der Chromosom-X-Deletion bezogen auf alle untersuchten ALL (keine Angaben über Anteil *TEL-AML1* positiver ALL) mit 3.4%⁶⁹ jedoch ähnlich niedrig wie in der vorliegenden Arbeit (Prävalenz der Chromosom-X-Deletion im Gesamtkollektiv 2.2%). Diese Zahlen stimmen mit Angaben aus der Literatur überein⁷⁰⁻⁷². Alle Chromosom-X-Deletionsträger in der Studie von Riesch et al. zeigten die Veränderung in mindestens 60% der Zellen⁶⁹. Bei der Patientin mit Chromosom-X-Verlust aus dem hier untersuchten Kollektiv liegt der Prozentsatz der Zellen mit Chromosom-X-Deletion zwar nur bei ca. 40%, ist damit aber ebenfalls sehr hoch und weit vom Cut-off Wert entfernt.

Vergleichbare Zahlen ergibt der Anteil von Mädchen mit Chromosom-X-Verlust an allen untersuchten Mädchen bei Riesch et al. (7.5%)⁶⁹ und in der vorliegenden Patientengruppe (4.5%).

Das mediane Manifestationsalter der Ersterkrankung der Mädchen mit Chromosom-X-Deletion in der Studie von Riesch et al. betrug sieben Jahre und lag somit signifikant über dem medianen Präsentationsalter. Auch die genannte Patientin im vorliegenden Kollektiv erkrankte erst mit 10.89 Jahren an ALL und erlitt mit 15.32 Jahren ein Erstrezidiv.

Der von Giese gefundene mögliche positive prognostische Einfluss der Chromosom-X-Deletion (Assoziation mit gutem Ansprechen auf Therapie) ist insofern fraglich, als dass Riesch et al. bei einem Patienten (der daraufhin von der Betrachtung ausgeschlossen wurde) die Veränderung nur im Rezidiv, nicht aber in der Ersterkrankung gefunden haben⁶⁹. Analog wurde im in dieser Arbeit analysierten Kollektiv bei der *TEL-AML1* positiven ALL #3 die Chromosom-X-Deletion nur in den Zellen des Zweit-, nicht aber des Erstrezidivs entdeckt.

Die ALL-Patienten mit Chromosom-X-Verlust in den leukämischen Blasten in der Arbeit von Riesch et al. befanden sich zum Zeitpunkt der Studie in klinischer Remission, allerdings waren die Follow-Up-Zeiten nicht sehr lang. Die Autoren schließen, dass die Deletion von Chromosom X ein sekundäres Event bei älteren Mädchen mit *TEL-AML1* positiver ALL ist⁶⁹. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Aussage zur prognostischen Bedeutung der Chromosom-X-Deletion getroffen werden, da die Fallzahl ($n = 1$) für eine sichere statistische Aussage zu klein war. Eine Evaluierung an einem größeren Kollektiv wäre sinnvoll.

Auch die *TEL-AML1* positive Zelllinie REH, die aus einer Patientin zum Rezidivzeitpunkt stammt, wies den Verlust eines Chromosom X auf. Dies stimmt mit den Angaben zur zytogenetischen Charakterisierung von REH in der Literatur überein^{78, 90}. Venuat et al. führen den Chromosom-X-Verlust auf einen Enzymdefekt im Prolinmetabolismus zurück⁷⁸, da Prolin ein biologischer Marker von REH ist¹³⁷.

Eine Monosomie X tritt auch bei der AML-Zelllinie HL-60 auf⁹⁸.

Gewinne oder Verluste der Regionen auf Chromosom 5 in REH wurden in dieser Arbeit nicht gesehen. Venuat et al. beschreiben allerdings eine Inversion des langen Arms von Chromosom 5 (5q31→ter) und Translokation auf 3p⁷⁸. In einer array-CGH Studie von Horsley et al. war Chromosom 5 an einer komplexen Translokation t(5;12;16;21) beteiligt, aus der die *TEL-AML1* Fusion resultierte⁹⁰.

4.2.4.2 Gewinne von Chromosom X

Chromosom X ist bei fast allen ALL-Patienten mit >50 Chromosomen in den malignen Zellen (starke Hyperdiploidie)¹³⁸ und ungefähr 50% der Patienten mit niedrig hyperdiploidem Chromosomensatz (47-50 Chromosomen) hinzugewonnen^{71, 139}.

Mehr als die Hälfte (57.7%) des untersuchten *TEL-AML1* negativen Kollektivs dieser Arbeit zeigte Gewinne von Chromosom X. Signalvermehrungen von Chromosom X sind in der Literatur für *TEL-AML1* positive ALL selten beschrieben²² und tauchten bei den untersuchten *TEL-AML1* positiven ALL signifikant seltener und in signifikant weniger Zellen als bei der *TEL-AML1* negativen Gruppe auf. Eine prognostische Bedeutung des Vorhandenseins mehrerer Chromosomen X in den leukämischen Blasten konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden.

4.2.5 Kritische Anmerkungen

Da nicht bei allen in diese Arbeit eingeschlossenen ALL der DNA-Index bestimmt wurde und bisweilen die Zellen hyperdiploider ALL einen DNA-Index <1.16 haben können, war es nicht möglich, hyperdiploide ALL, die ja eine bessere Prognose als (hypo)diploide ALL haben¹⁴ und somit eventuell eine zu gute Heilungschance der untersuchten Gruppe suggerieren, konsequent auszuschließen.

Da hier nur zwei Chromosomen untersucht wurden, kann nicht sicher beurteilt werden, ob es sich bei den gefundenen Gewinnen um Gewinne einzelner Chromosomen(regionen) oder um Vervielfachungen des gesamten Chromosomensatzes in den Blasten handelt. Zumindest bei den drei *TEL-AML1* negativen ALL (#6, 15, 19), die in vielen Zellen sowohl Gewinne von Chromosom X als auch von beiden auf Chromosom 5 untersuchten Regionen (auf dem p- und dem q-Arm und somit möglicherweise eine Trisomie 5) zeigen, könnte der Verdacht auf Hyperdiploidie in den Blasten geäußert werden.

Der Beobachtungszeitraum des untersuchten Patientenkollektivs endete im September 2008. Da einige Patienten ihr ALL-Erstrezidiv erst im Jahr 2008 erlitten, war für sie die Beobachtungszeit recht kurz, so dass nicht bekannt ist, ob vielleicht noch späte Folgerezidive oder andere Ereignisse auftraten.

4.2.6 Beantwortung der gestellten Fragen

Die Antworten auf die in 1.4 gestellten Fragen wurden im Ergebnis- und Diskussionsteil dieser Arbeit bereits ausführlich dargestellt und sollen im Folgenden zusammengefasst

werden. Die Angaben in Klammern verweisen auf die entsprechenden detaillierteren Abschnitte.

1. Wie zuverlässig ist die Interphase-FisH-Analyse dieser Arbeit zur Detektion von Gewinnen und Verlusten?

(ausführliche Beschreibung und Diskussion siehe 3.2.4, 3.3 und 4.1)

Die in dieser Arbeit angewandte Methode gestattet eine sensitive Detektion von Gewinnen und Verlusten der untersuchten Chromosomen(bereiche), wenn die beschriebenen Regeln und Kriterien zur Versuchsdurchführung und –auswertung eingehalten werden. Die FisH-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine gute Reproduzierbarkeit und sind im Einklang sowohl mit Literaturdaten^{78, 90} als auch mit Resultaten, die mit konventioneller Zytogenetik oder aCGH gewonnen wurden.

2. Wie häufig gibt es Gewinne und Verluste von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X bei *TEL-AML1* positiven und negativen ALL-Erstrezidiven im Kindes- und Jugendalter?

(ausführliche Beschreibung und Diskussion siehe 3.2, Abbildung 19 und 4.2)

Tabelle 19: Häufigkeiten von Gewinnen und Verlusten der untersuchten Regionen in Biopsien von *TEL-AML1* positiven und negativen ALL

<i>TEL-AML1</i> - Status	Zahl von Patienten n (%)						
	total	mit 5q31.3		5p15.33		X	
		Verlust	Gewinn	Verlust	Gewinn	Verlust	Gewinn
positiv	19	7 (36.8)	1 (5.3)	4 (21.1)	4 (21.1)	1 (5.3)	3 (15.8)
negativ	26	5 (19.2)	3 (11.5)	2 (7.7)	5 (19.2)	0	15 (57.7)

Zahlen in Klammern bedeuten Angaben in Prozent.

3. Welche Subpopulationen von Zellen mit Gewinnen oder Verlusten der untersuchten Regionen werden gefunden?

(ausführliche Darstellung und Beschreibung der Subpopulationsanalyse siehe 3.2.3)

Im untersuchten Patientenkollektiv wurden, neben Zellen mit normaler Signalkombination, 14 verschiedene Subpopulationen von Zellen mit aberranten Signalkombinationen gefunden, die in jeweils mindestens einer ALL mithilfe der Cut-off Werte identifiziert wurden. Dabei gab es Subpopulationen von Zellen mit

isolierten Gewinnen oder Verlusten von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X und Subpopulationen mit Kombinationen dieser Veränderungen. In der Gruppe der *TEL-AML1* positiven ALL war in der häufigsten Subpopulation (bei 31.6% der ALL) ein 5q31.3-Allel verloren, bei den *TEL-AML1* negativen ALL hatten 57.7% der Patienten Subpopulationen mit Gewinn mindestens eines Chromosom X in ihren Blasten.

4. Welche klinischen Korrelate und welche prognostische Bedeutung haben diese Veränderungen?

(ausführliche Beschreibung und Diskussion siehe 3.5.3, Abbildung 22, Tabelle 17 und 4.2)

Es waren fünf Tendenzen sichtbar, von denen vier allerdings keine statistische Signifikanz erreichten. (a) Bei den *TEL-AML1* positiven ALL waren tendenziell mehr Mädchen als Jungen mit ALL von der 5q31.3-Deletion betroffen ($p = 0.074$). (b) Fusionsgen-positive ALL, bei denen der 5q31.3-Verlust auch in Subpopulationen nachvollziehbar war, tendierten zu höheren peripheren Blastenanteilen zum Diagnosezeitpunkt ($p = 0.072$). (c) Im Gegenzug dazu lag der Prozentsatz peripherer Blasten bei *TEL-AML1* negativen ALL mit 5q31.3-Gewinn signifikant unter dem PBC der Patienten ohne 5q31.3-Gewinn ($p = 0.041$), allerdings waren die Blasten gleich in die drei prognostisch relevanten PBC-Gruppen verteilt. (d) Die pEFS war bei Patienten mit *TEL-AML1* negativer ALL mit 5q31.3-Verlust in Subpopulationen tendenziell höher als bei den restlichen Patienten mit *TEL-AML1* negativer ALL ($p = 0.080$). (e) Die Erstremissionsdauer war bei Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL mit 5p15.33-Gewinn in Subpopulationen tendenziell kürzer als bei den restlichen Patienten, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant ($p = 0.085$). Die Tendenzen (b) und (c), nicht jedoch (d), deuten auf eine schwache Assoziation zwischen dem Vorliegen eines 5q31.3-Verlusts und schlechtem Ansprechen auf Therapie hin.

Keine der gefundenen Chromosomenveränderungen zeigte eine Korrelation mit den MRD-Status der ALL-Patienten.

5. Gibt es Unterschiede zwischen *TEL-AML1* positiven und negativen ALL bezüglich der Chromosomenaberrationen?

(ausführliche Beschreibung und Diskussion siehe 3.5.3, Abbildung 19)

Die gefundenen Häufigkeiten der Gewinne und Verluste sind in Tabelle 19 gezeigt. Sie sind für den Vergleich zwischen *TEL-AML1* negativer und positiver ALL, bis auf den bei *TEL-AML1* negativer ALL häufigeren Gewinn von Chromosom X, nicht signifikant unterschiedlich. Dieser beobachtete häufigere Gewinn von Chromosom X stimmt überein mit Literaturdaten, die zeigen, dass solche Gewinne bei *TEL-AML1* positiver ALL selten und bei hyperdiploider ALL häufig vorkommen. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Verluste betrafen ausschließlich nur ein Allel, Gewinne waren meist durch ein zusätzliches Allel und selten durch zwei bzw. drei Extra-Allele charakterisiert. Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL zeigten tendenziell öfter und in einem signifikant höheren Prozentsatz von Blasten Verluste von 5q31.3 über dem Cut-off Wert als *TEL-AML1* negative ALL. In der statistischen Analyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen *TEL-AML1* positiven und negativen ALL bezüglich der untersuchten klinischen Parameter.

6. Existiert ein Zusammenhang zwischen Gewinnen und Verlusten der untersuchten Regionen oder zwischen bestimmten Kombinationen von Aberrationen und klinischen Daten?

(ausführliche Beschreibung siehe 3.2 und 3.5.3)

Gewinne von 5q31.3 in den Blasten der Patienten gingen immer mit Gewinnen von 5p15.33 in denselben Zellen einher, so dass vermutet werden kann, dass in den Blasten dieser Patienten ein ganzes Chromosom 5 gewonnen war, was in den Zellen einer Patientin im Rahmen einer anderen Studie bereits im Vorfeld nachgewiesen worden war. Zudem besaßen alle *TEL-AML1* negativen ALL, die 5q31.3 und 5p15.33 gewonnen hatten, auch mindestens ein zusätzliches Chromosom X, so dass in den Blasten möglicherweise ein hyperdiploider Chromosomensatz vorlag. Knapp 60% der *TEL-AML1* positiven und 40% der *TEL-AML1* negativen ALL hatten bei 5q31.3-Verlust auch einen 5p15.33-Verlust, allerdings nie in denselben Zellen. Subklone mit Verlusten eines ganzen Chromosoms 5 wurden im untersuchten Kollektiv nicht identifiziert. In der statistischen Analyse konnten keine Zusammenhänge zwischen den Kombinationen von Gewinnen und Verlusten und klinischen Variablen nachgewiesen werden.

5. Zusammenfassung

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste onkologische Erkrankung im Kindes- und Jugendalter. Annähernd 80% der Kinder mit initialer ALL können durch gegenwärtige Polychemotherapie-Protokolle geheilt werden. Für Patienten mit einem Rezidiv ist die ereignisfreie Überlebenschance (pEFS) jedoch trotz intensiver Chemotherapie und möglicher Stammzelltransplantation wegen Resistenzen der leukämischen Blasten gegenüber den eingesetzten Chemotherapeutika mit 30-40% deutlich schlechter.

Molekularbiologische Analysen haben erheblich zur Identifikation genetischer Veränderungen in Leukämiezellen beigetragen, die (1.) ursächlich für die Entstehung und Entwicklung von Leukämien bzw. von Resistenzen verantwortlich sind, (2.) eine bessere prognostische Einschätzung erlauben und somit (3.) zur Verbesserung der Therapieprotokolle herangezogen werden können. Die bei ALL häufigste genetische Veränderung, die zytogenetisch kryptische, chromosomale Translokation $t(12;21)(p13;q22)$ mit dem resultierenden Fusionsgen *TEL-AML1* ist sowohl bei der Ersterkrankung als auch beim Rezidiv mit einem günstigen Krankheitsverlauf assoziiert. Da das Fusionsprotein TEL-AML1 alleine keine leukämische Transformation von Zellen induzieren kann, ist anzunehmen, dass zusätzliche (sekundäre) genetische Veränderungen hierfür notwendig sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden Knochenmarkausstriche (zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose) eines repräsentativen Kollektivs von 45 Kindern mit ALL-Erstrezidiv (19 *TEL-AML1* positive und 26 *TEL-AML1* negative ALL), die einheitlich nach den Therapieoptimierungsprotokollen ALL-REZ BFM behandelt worden sind, sowie ein Ausstrich der *TEL-AML1* positiven ALL-Zelllinie REH mittels Interphase-FISH untersucht. Dabei sollte die Prävalenz und mögliche klinische Bedeutung numerischer Aberrationen von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X ermittelt werden. Angeregt wurde diese Fragestellung durch Ergebnisse einer in unserer Arbeitsgruppe mit hochauflösender, genomweiter microarray-CGH durchgeführten Untersuchung eines *TEL-AML1* positiven Patientenkollektivs, in der sowohl mit schlechtem Ansprechen auf Therapie assoziierte Deletionen von 5q31.3 als auch mit guter Response zusammenhängende Verluste von Chromosom X gefunden wurden.

In der Region 5q31.3 liegt das den humanen Glukokortikoidrezeptor (GR) kodierende Gen *NR3C1*. Da Glukokortikoide (GC) in allen Therapiephasen des ALL-Rezidivs eine

essenzielle Rolle spielen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Deletionen des GR-Gens GC-Resistenz und schlechtes Ansprechen auf die Therapie zur Folge haben könnten. Als möglicher, zur GC-Resistenz führender Mechanismus ist eine Deletion von *NR3C1* in der Literatur bisher selten beschrieben.

Die FisH-Analyse der vorliegenden Arbeit ergab Deletionen von 5q31.3 bei 36.8% der *TEL-AML1* positiven ALL und 19.2% der *TEL-AML1* negativen ALL, welche stets monoallelisch und in höchstens 30% der Blasten auftraten.

Vergleiche mit klinischen Daten zeigten folgende Tendenzen: (a) Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL, deren Blasten Subpopulationen von Zellklonen mit 5q31.3-Deletion enthielten, hatten tendenziell höhere periphere Blastenzahlen zum Diagnosezeitpunkt, ohne dass hier eine signifikante Assoziation ermittelt werden konnte ($p = 0.072$). Dies beruht möglicherweise auf der relativ kleinen Fallzahl. Ebenso wurden in Patienten mit *TEL-AML1* negativer ALL schwache Assoziationen zwischen (b) dem Vorliegen eines 5q31.3-Gewinns und einem niedrigen Prozentsatz peripherer Blasten ($p = 0.041$) sowie (c), entgegen unserer Hypothese, dem Vorliegen eines 5q31.3-Verlusts in Subpopulationen und einer höheren pEFS ($p = 0.08$) gefunden. Ein Gewinn von 5q31.3 wurde bei 5.3% der t(12;21)-positiven ALL und 11.5% der t(12;21)-negativen ALL gesehen.

In der zur Kontrolle der Kopienzahl von Chromosom 5 hybridisierten Region 5p15.33 gab es bei je 21.1% der *TEL-AML1* positiven ALL Verluste bzw. Gewinne, wobei letztere Veränderung in Subpopulationen tendenziell, allerdings nicht signifikant, mit einer etwas kürzeren Erstremissionsdauer assoziiert war ($p = 0.085$). Die Region 5p15.33 enthält u. a. das für die Tubulinpolymerisierung wichtige Gen *TPPP*, welches in der Literatur bei verschiedenen soliden Tumoren als amplifiziert und dann mit schlechter Prognose zusammenhängend beschrieben wird. In der Gruppe der Patienten mit *TEL-AML1* negativer ALL gab es in 7.7% Verluste und in 19.2% Gewinne von 5p15.33, für die keine klinische Relevanz ermittelt werden konnte.

Verluste von Chromosom X in den Leukämiezellen wurden in der vorliegenden Arbeit bei einem Mädchen mit *TEL-AML1* positiver ALL gefunden, bei der keine minimale leukämische Resterkrankung (MRD; *minimal residual disease*) nachweisbar war und bei der sich die Erkrankung spät manifestierte. Diese Charakteristika treffen auch auf die bisher in der Literatur beschriebenen ALL mit Verlust von Chromosom X zu. Einen Chromosom-X-Gewinn in den Blasten zeigten signifikant mehr *TEL-AML1* negative als

positive ALL ($p = 0.006$), teilweise in über 90% der Zellen. Einen prognostischen Einfluss hatte dieser Gewinn im untersuchten Kollektiv jedoch nicht.

Keine der genannten Veränderungen war mit MRD assoziiert.

Die Zelllinie REH hatte, wie bereits in der Literatur beschrieben, in allen Zellen ein Chromosom X verloren und zeigte keine Auffälligkeiten im Chromosom 5.

Im untersuchten Kollektiv ergaben sich bezüglich der Variablen Geschlecht, Alter, Rezidivlokalisierung, pEFS, Leukozyten- und periphere Blastenzahl zum Diagnosezeitpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen *TEL-AML1* positiven und negativen ALL.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Detektion monoallelischer Verluste des GR-Gens offenbar keine klare prädiktive Aussage über das (Nicht-)Ansprechen auf Therapie gestattet und dass vermutlich noch andere Mechanismen zur Resistenz gegenüber GC beitragen. Der eindeutige Nachweis möglicher schwacher Assoziationen zwischen solchen heterozygoten Mutationen und dem Therapieausgang sowie die Bedeutung eventueller homozygoter GR-Verluste würden Untersuchungen eines größeren Patientenkollektivs erfordern.

6. Literatur

1. German childhood cancer registry – annual report 2006/7 (1980-2006). (Jahresbericht 2006/7 des Deutschen Kinderkrebsregisters). Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informatik, Universität Mainz, 2009. (Accessed February 06, 2009, at <http://www.kinderkrebsregister.de>.)
2. Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (eds.) Berlin; 2008.
3. Braun J, Renz-Polster H. Leukämien. In: Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J, eds. Basislehrbuch Innere Medizin : kompakt - greifbar - verständlich 3rd ed. München Elsevier Urban & Fischer 2006:298-304.
4. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008;371(9617):1030-43.
5. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 1999;354(9189):1499-503.
6. Maia AT, van der Velden VH, Harrison CJ, et al. Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. *Leukemia* 2003;17(11):2202-6.
7. Mori H, Colman SM, Xiao Z, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(12):8242-7.
8. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2003;3(9):639-49.
9. von Stackelberg A, Henze G. Rezidive der akuten lymphoblastischen Leukämie. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J, eds. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag; 2006:680-9.
10. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33(4):451-8.
11. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 1997;44(4):831-46.
12. Rowley JD. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet* 1998;32:495-519.
13. Pui CH, Crist WM, Look AT. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990;76(8):1449-63.

14. Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM. Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis. *Br Med J* 1978;2(6151):1529-30.
15. Moorman AV, Clark R, Farrell DM, Hawkins JM, Martineau M, Secker-Walker LM. Probes for hidden hyperdiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;16(1):40-5.
16. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, et al. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *J Clin Oncol* 2000;18(9):1876-87.
17. Sandoval C, Mayer SP, Ozkaynak MF, Tugal O, Jayabose S. Trisomy 5 as a sole cytogenetic abnormality in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;118(1):69-71.
18. Pui CH, Williams DL, Raimondi SC, et al. Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1987;70(1):247-53.
19. Romana SP, Le Coniat M, Berger R. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;9(3):186-91.
20. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;350(15):1535-48.
21. Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH, et al. TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. *J Clin Oncol* 1997;15(3):1150-7.
22. Forestier E, Andersen MK, Autio K, et al. Cytogenetic patterns in ETV6/RUNX1-positive pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: A Nordic series of 245 cases and review of the literature. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46(5):440-50.
23. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 1995;9(12):1985-9.
24. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996;84(2):321-30.
25. Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, et al. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 1998;12(15):2392-402.

26. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(11):4917-21.
27. Meyers S, Lenny N, Sun W, Hiebert SW. AML-2 is a potential target for transcriptional regulation by the t(8;21) and t(12;21) fusion proteins in acute leukemia. *Oncogene* 1996;13(2):303-12.
28. Hiebert SW, Sun W, Davis JN, et al. The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol* 1996;16(4):1349-55.
29. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, et al. 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-Munster Study Group. Blood* 1997;90(2):571-7.
30. Seeger K, Adams HP, Buchwald D, et al. TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. Blood* 1998;91(5):1716-22.
31. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, et al. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(3):1094-9.
32. Harbott J, Viehmann S, Borkhardt A, Henze G, Lampert F. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood* 1997;90(12):4933-7.
33. Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. *Blood* 2006;107(11):4508-13.
34. Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, et al. Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2008;26(13):2186-91.
35. Raynaud SD, Dastugue N, Zoccola D, Shurtleff SA, Mathew S, Raimondi SC. Cytogenetic abnormalities associated with the t(12;21): a collaborative study of 169 children with t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1999;13(9):1325-30.

36. Tsuzuki S, Karnan S, Horibe K, et al. Genetic abnormalities involved in t(12;21) TEL-AML1 acute lymphoblastic leukemia: analysis by means of array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* 2007;98(5):698-706.
37. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007;446(7137):758-64.
38. Attarbaschi A, Mann G, Konig M, et al. Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. *Leukemia* 2004;18(10):1611-6.
39. Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R, et al. 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-Munster Group 87. *J Clin Oncol* 2005;23(31):7942-50.
40. Reismüller B, Attarbaschi A, Peters C, et al. Long-term outcome of initially homogenously treated and relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia in Austria--a population-based report of the Austrian Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) Study Group. *Br J Haematol* 2009;144(4):559-70.
41. Bailey LC, Lange BJ, Rheingold SR, Bunin NJ. Bone-marrow relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2008;9(9):873-83.
42. Seeger K, von Stackelberg A, Taube T, et al. Relapse of TEL-AML1--positive acute lymphoblastic leukemia in childhood: a matched-pair analysis. *J Clin Oncol* 2001;19(13):3188-93.
43. Stackelberg A, Hartmann R, Ritter J. Male gender as an independent adverse risk factor for children with isolated CNS relapse of ALL. Israeli-German bi-national conference: current concepts in pediatric hematology-oncology; 1999.
44. Izraeli S, Waldman D. Minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: current status and challenges. *Acta Haematol* 2004;112(1-2):34-9.
45. Eckert C, Scrideli CA, Taube T, et al. Comparison between TaqMan and LightCycler technologies for quantification of minimal residual disease by using immunoglobulin and T-cell receptor genes consensus probes. *Leukemia* 2003;17(12):2517-24.
46. Bader P, Kreyenberg H, Henze GH, et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2009;27(3):377-84.

47. Eckert C, Biondi A, Seeger K, et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2001;358(9289):1239-41.
48. Borgmann A, von Stackelberg A, Hartmann R, et al. Unrelated donor stem cell transplantation compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission: a matched-pair analysis. *Blood* 2003;101(10):3835-9.
49. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2008;322(5906):1377-80.
50. Henze G. 20 Jahre Studien zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL-REZ BFM). Projektförderung der deutschen Kinderkrebsstiftung. *WIR* 2004:13-5.
51. Klumper E, Pieters R, Veerman AJ, et al. In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;86(10):3861-8.
52. Kaspers GJ, Pieters R, Klumper E, De Waal FC, Veerman AJ. Glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leuk Lymphoma* 1994;13(3-4):187-201.
53. Studienkommission der ALL-REZ BFM-Studien. ALL-REZ BFM 2002 Protokoll zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie 25.06.2003.
54. Renner K, Ausserlechner MJ, Kofler R. A conceptual view on glucocorticoid-Induced apoptosis, cell cycle arrest and glucocorticoid resistance in lymphoblastic leukemia. *Curr Mol Med* 2003;3(8):707-17.
55. Hollenberg SM, Evans RM. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 1988;55(5):899-906.
56. Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML, Pieters R. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003;17(1):17-25.
57. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985;318(6047):635-41.
58. Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* 2004;11 Suppl 1:S45-55.
59. Ploner C, Rainer J, Niederegger H, et al. The BCL2 rheostat in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008;22(2):370-7.

60. Hala M, Hartmann BL, Bock G, Geley S, Kofler R. Glucocorticoid-receptor-gene defects and resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *Int J Cancer* 1996;68(5):663-8.
61. Sionov RV, Spokoini R, Kfir-Erenfeld S, Cohen O, Yefenof E. Mechanisms regulating the susceptibility of hematopoietic malignancies to glucocorticoid-induced apoptosis. *Adv Cancer Res* 2008;101:127-248.
62. Bachmann PS, Gorman R, Papa RA, et al. Divergent mechanisms of glucocorticoid resistance in experimental models of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2007;67(9):4482-90.
63. Pui CH, Costlow ME. Sequential studies of lymphoblast glucocorticoid receptor levels at diagnosis and relapse in childhood leukemia: an update. *Leuk Res* 1986;10(2):227-9.
64. Haarman EG, Kaspers GJ, Veerman AJ. Glucocorticoid resistance in childhood leukaemia: mechanisms and modulation. *Br J Haematol* 2003;120(6):919-29.
65. Kofler R. The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochem Cell Biol* 2000;114(1):1-7.
66. Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Chrousos GP. Generalized glucocorticoid resistance: clinical aspects, molecular mechanisms, and implications of a rare genetic disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(5):1563-72.
67. Moalli PA, Rosen ST. Glucocorticoid receptors and resistance to glucocorticoids in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 1994;15(5-6):363-74.
68. Möricke A, Reiter A, Zimmermann M, et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 2008;111(9):4477-89.
69. Riesch M, Niggli FK, Leibundgut K, Caflisch U, Betts DR. Loss of X chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;125(1):27-9.
70. Heerema NA, Nachman JB, Sather HN, et al. Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's cancer group. *Blood* 1999;94(12):4036-45.
71. Heinonen K, Mahlamäki E, Riikonen P, Meltoranta RL, Rahiala J, Perkkio M. Acquired X-chromosome aneuploidy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1999;32(5):360-5.

72. Bueno JL, Watson A, Dainton MG, et al. Monosomy X as the sole cytogenetic abnormality in acute lymphoblastic leukemia: a report of two new patients. *Leuk Lymphoma* 1999;32(3-4):381-4.
73. Lilljebjörn H, Heidenblad M, Nilsson B, et al. Combined high-resolution array-based comparative genomic hybridization and expression profiling of ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemias reveal a high incidence of cryptic Xq duplications and identify several putative target genes within the commonly gained region. *Leukemia* 2007;21(10):2137-44.
74. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 2005;434(7031):325-37.
75. Liao DJ, Du QQ, Yu BW, Grignon D, Sarkar FH. Novel perspective: focusing on the X chromosome in reproductive cancers. *Cancer Invest* 2003;21(4):641-58.
76. Rieder H, Bonwetsch C, Janssen LA, et al. High rate of chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization using BCR and ABL probes in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998;12(9):1473-81.
77. Hagemeyer A, de Klein A, Wijsman J, van Meerten E, de Greef GE, Sacchi N. Development of an interphase fluorescent in situ hybridization (FISH) test to detect t(8;21) in AML patients. *Leukemia* 1998;12(1):96-101.
78. Venuat AM, Testu MJ, Rosenfeld C. Cytogenetic abnormalities in a human null cell leukemia line (REH). *Cancer Genet Cytogenet* 1981;3(4):327-34.
79. Bayani J, Squire JA. Fluorescence in situ Hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol* 2004;Chapter 22:Unit 22 4.
80. Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;64(2):600-4.
81. John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969;223(5206):582-7.
82. Kearney L. The impact of the new fish technologies on the cytogenetics of haematological malignancies. *Br J Haematol* 1999;104(4):648-58.
83. Shizuya H, Birren B, Kim UJ, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(18):8794-7.
84. Arnoldus EP, Wiegant J, Noordermeer IA, et al. Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogenet Cell Genet* 1990;54(3-4):108-11.

85. Russell LM, Strike P, Browne CE, Jacobs PA. X chromosome loss and ageing. *Cytogenet Genome Res* 2007;116(3):181-5.
86. Guttenbach M, Koschorz B, Bernthaler U, Grimm T, Schmid M. Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *Am J Hum Genet* 1995;57(5):1143-50.
87. Paternoster SF, Brockman SR, McClure RF, Remstein ED, Kurtin PJ, Dewald GW. A new method to extract nuclei from paraffin-embedded tissue to study lymphomas using interphase fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 2002;160(6):1967-72.
88. Nordgren A, Heyman M, Sahlen S, et al. Spectral karyotyping and interphase FISH reveal abnormalities not detected by conventional G-banding. Implications for treatment stratification of childhood acute lymphoblastic leukaemia: detailed analysis of 70 cases. *Eur J Haematol* 2002;68(1):31-41.
89. Tibiletti MG. Interphase FISH as a new tool in tumor pathology. *Cytogenet Genome Res* 2007;118(2-4):229-36.
90. Horsley SW, Mackay A, Irvani M, et al. Array CGH of fusion gene-positive leukemia-derived cell lines reveals cryptic regions of genomic gain and loss. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45(6):554-64.
91. Pedersen B, Jensen IM. Clinical and prognostic implications of chromosome 5q deletions: 96 high resolution studied patients. *Leukemia* 1991;5(7):566-73.
92. Van den Berghe H, Vermaelen K, Mecucci C, Barbieri D, Tricot G. The 5q-anomaly. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;17(3):189-255.
93. Martinez-Ramirez A, Urioste M, Melchor L, et al. Analysis of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes by high-resolution comparative genomic hybridization and subtelomeric CGH array. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;42(3):287-98.
94. Le Beau MM, Espinosa R, 3rd, Neuman WL, et al. Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(12):5484-8.
95. Berger R, Le Coniat M, Derre J. 5q- anomaly in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;61(2):201-3.
96. Planey SL, Derfoul A, Steplewski A, Robertson NM, Litwack G. Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis in 697 pre-B lymphocytes by the mineralocorticoid receptor N-terminal domain. *J Biol Chem* 2002;277(44):42188-96.

97. Johannsdottir HK, Jonsson G, Johannesdottir G, et al. Chromosome 5 imbalance mapping in breast tumors from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and sporadic breast tumors. *Int J Cancer* 2006;119(5):1052-60.
98. Ulger C, Toruner GA, Alkan M, et al. Comprehensive genome-wide comparison of DNA and RNA level scan using microarray technology for identification of candidate cancer-related genes in the HL-60 cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;147(1):28-35.
99. Lind GE, Kleivi K, Meling GI, et al. ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis. *Cell Oncol* 2006;28(5-6):259-72.
100. Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, et al. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 1995;9(13):1608-21.
101. Irving JA, Minto L, Bailey S, Hall AG. Loss of heterozygosity and somatic mutations of the glucocorticoid receptor gene are rarely found at relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia but may occur in a subpopulation early in the disease course. *Cancer Res* 2005;65(21):9712-8.
102. Gruber G, Carlet M, Turtscher E, et al. Levels of glucocorticoid receptor and its ligand determine sensitivity and kinetics of glucocorticoid-induced leukemia apoptosis. *Leukemia* 2009;23(4):820-3.
103. Pui CH, Dahl GV, Rivera G, Murphy SB, Costlow ME. The relationship of blast cell glucocorticoid receptor levels to response to single-agent steroid trial and remission response in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 1984;8(4):579-85.
104. Tissing WJ, Lauten M, Meijerink JP, et al. Expression of the glucocorticoid receptor and its isoforms in relation to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2005;90(9):1279-81.
105. Kato GJ, Quddus FF, Shuster JJ, et al. High glucocorticoid receptor content of leukemic blasts is a favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993;82(8):2304-9.
106. Lauten M, Cario G, Asgedom G, Welte K, Schrappe M. Protein expression of the glucocorticoid receptor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003;88(11):1253-8.

107. Haarman EG, Kaspers GJ, Pieters R, Rottier MM, Veerman AJ. Glucocorticoid receptor alpha, beta and gamma expression vs in vitro glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leukemia* 2004;18(3):530-7.
108. Tissing WJ, Meijerink JP, Brinkhof B, et al. Glucocorticoid-induced glucocorticoid-receptor expression and promoter usage is not linked to glucocorticoid resistance in childhood ALL. *Blood* 2006;108(3):1045-9.
109. Ramdas J, Liu W, Harmon JM. Glucocorticoid-induced cell death requires autoinduction of glucocorticoid receptor expression in human leukemic T cells. *Cancer Res* 1999;59(6):1378-85.
110. Pedersen KB, Vedeckis WV. Quantification and glucocorticoid regulation of glucocorticoid receptor transcripts in two human leukemic cell lines. *Biochemistry* 2003;42(37):10978-90.
111. Lauten M, Fernandez-Munoz I, Gerdes K, et al. Kinetics of the in vivo expression of glucocorticoid receptor splice variants during prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer* 2009;52(4):459-63.
112. Beger C, Gerdes K, Lauten M, et al. Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *Br J Haematol* 2003;122(2):245-52.
113. Irving JA, Bloodworth L, Bown NP, Case MC, Hogarth LA, Hall AG. Loss of heterozygosity in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by genome-wide microarray single nucleotide polymorphism analysis. *Cancer Res* 2005;65(8):3053-8.
114. Schmidt S, Irving JA, Minto L, et al. Glucocorticoid resistance in two key models of acute lymphoblastic leukemia occurs at the level of the glucocorticoid receptor. *Faseb J* 2006;20(14):2600-2.
115. Arceci RJ. Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies. *Blood* 1993;81(9):2215-22.
116. Bourgeois S, Gruol DJ, Newby RF, Rajah FM. Expression of an mdr gene is associated with a new form of resistance to dexamethasone-induced apoptosis. *Mol Endocrinol* 1993;7(7):840-51.
117. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2(1):48-58.
118. Funder JW. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase: new answers, new questions. *Eur J Endocrinol* 1996;134(3):267-8.

119. Seckl JR, Walker BR. Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 2001;142(4):1371-6.
120. Csoka M, Bocsi J, Falus A, et al. Glucocorticoid-induced apoptosis and treatment sensitivity in acute lymphoblastic leukemia of children. *Pediatr Hematol Oncol* 1997;14(5):433-42.
121. Marino S, Verzegnassi F, Tamaro P, et al. Response to glucocorticoids and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: Role of polymorphisms of genes involved in glucocorticoid response. *Pediatr Blood Cancer* 2009.
122. Fleury I, Primeau M, Doreau A, et al. Polymorphisms in genes involved in the corticosteroid response and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pharmacogenomics* 2004;4(5):331-41.
123. Moalli PA, Pillay S, Krett NL, Rosen ST. Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 1993;53(17):3877-9.
124. Medh RD, Wang A, Zhou F, Thompson EB. Constitutive expression of ectopic c-Myc delays glucocorticoid-evoked apoptosis of human leukemic CEM-C7 cells. *Oncogene* 2001;20(34):4629-39.
125. Ramdas J, Harmon JM. Glucocorticoid-induced apoptosis and regulation of NF-kappaB activity in human leukemic T cells. *Endocrinology* 1998;139(9):3813-21.
126. Zhou F, Thompson EB. Role of c-jun induction in the glucocorticoid-evoked apoptotic pathway in human leukemic lymphoblasts. *Mol Endocrinol* 1996;10(3):306-16.
127. Real PJ, Tosello V, Palomero T, et al. Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2009;15(1):50-8.
128. Lamb J. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. *Nat Rev Cancer* 2007;7(1):54-60.
129. Lamb J, Crawford ED, Peck D, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 2006;313(5795):1929-35.
130. Wei G, Twomey D, Lamb J, et al. Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance. *Cancer Cell* 2006;10(4):331-42.

131. Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* 2004;351(6):533-42.
132. Sirolimus in Treating Young Patients with Relapsed or Refractory Acute Leukemia or Non-Hodgkin's Lymphoma (Accessed July 31, 2009, at <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00068302>.)
133. Narayan G, Bourdon V, Chaganti S, et al. Gene dosage alterations revealed by cDNA microarray analysis in cervical cancer: identification of candidate amplified and overexpressed genes. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46(4):373-84.
134. Yamamoto Y, Chochi Y, Matsuyama H, et al. Gain of 5p15.33 is associated with progression of bladder cancer. *Oncology* 2007;72(1-2):132-8.
135. Ueno T, Tangoku A, Yoshino S, et al. Gain of 5p15 detected by comparative genomic hybridization as an independent marker of poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8(2):526-33.
136. Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Kim JM. Gain at chromosomal region 5p15.33, containing TERT, is the most frequent genetic event in early stages of non-small cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;182(1):1-11.
137. Lorans G, Rosenfeld C, Petitou M, Phan-Dinh-Tuy F, Mathe G. Metabolism of proline in a human leukemic lymphoblastoid cell line. *Cancer Res* 1978;38(11 Pt 1):3950-3.
138. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, et al. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46(7):684-93.
139. Nordgren A, Farnebo F, Johansson B, et al. Identification of numerical and structural chromosome aberrations in 15 high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemias using spectral karyotyping. *Eur J Haematol* 2001;66(5):297-304.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Therapieübersicht ALL-REZ BFM 2002	15
2	Schematische Darstellung der Lage des GR-Gens <i>NR3C1</i> auf Chromosom 5	18
3	Schematische Darstellung des GR-Gens <i>NR3C1</i> mit seinen funktionellen Anteilen	18
4	Prozentuale Verteilung der MRD-Risikogruppen im Patientenkollektiv der ALL-REZ BFM 02 und im Kollektiv dieser Studie	23
5	Einige Merkmale des <i>TEL-AML1</i> positiven und negativen Patientenkollektivs	23
6	Schematische Darstellung der Nick Translation	28
7	Gelelektrophorese zur Kontrolle der Größe von Produkten der Nick Translation zweier BACs	29
8	Schematische Darstellung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	30
9	Chromosom 5, Bindungsstellen von RP11614D16 und RP11773M18 in diesen Bereichen liegende Gene	32
10	Chromosom X, Bindungsstelle der CEP-X-Sonde	32
11	Hybridisierungsergebnis auf Metaphase-Chromosomen	36
12	Hybridisierungsergebnis auf Interphase-Kernen	36
13	Automatisierte Bildgewinnung und -analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie	37
14	Beispiele für Zellkerne, die von der Auswertung ausgeschlossen wurden oder deren Signalzahl korrigiert wurde	39
15	Mittlere Anzahl von Zellkernen pro Blut- bzw. KM-Ausstrich nach Ausschluss nicht interpretierbarer Kerne	39
16	Zellen mit verminderter Chromosom-X-Signalzahl in Blutausstrichen von 20 Probanden	43
17	Häufigkeiten der Signalgewinne und -verluste von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X (%) in den Blutausstrichen der Kontrollpersonen	43
18	Häufig gefundene Kombinationen von Gewinnen und Verlusten von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X in den Ausstrichen der Patienten	45
19	Vergleich zwischen <i>TEL-AML1</i> positiven und negativen ALL hinsichtlich:	46
19a	der Häufigkeiten von Gewinnen und Verlusten der untersuchten Regionen	46
19b	des prozentualen Anteils von Zellen mit Signalgewinnen und -verlusten der untersuchten Regionen	46
19c	des prozentualen Anteils von Zellen mit Signalgewinnen und -verlusten einzelner Allele	46
20	Häufigkeiten von Subpopulationen über dem Cut-off Wert in den Blasten der Patienten	52
21	EFS-Wahrscheinlichkeit für das Untersuchte und das Vergleichskollektiv	57
22	Gewinne und Verluste in den einzelnen MRD-Risikogruppen	60
23	Kaplan-Meier-Kurve für <i>TEL-AML1</i> positive ALL mit und ohne 5q31.3-Verlust	62
24	Mechanismen der Glukokortikoidresistenz	76
Tabelle	Titel	Seite
1	FAB-Klassifikation der akuten lymphoblastischen Leukämie	8
2	Definition der Strategieguppen im Protokoll ALL-REZ BFM 2002	12
3	Definition der MRD-Risikogruppen	14
4	In den Therapieblöcken von ALL-REZ BFM 2002 verwendete Medikamente	16
5	Wirkmechanismen der in ALL-REZ BFM 2002 eingesetzten Medikamente	16
6	In dieser Arbeit verwendetes Material	25
7	Übersicht über Bindungsstellen der BACs und Farbstoffmarkierung	36
8	Ergebnisse der Hybridisierung der Kontrollblutausstriche und Cut-off Werte für Gewinne und Verluste der untersuchten Regionen	44
9	Statistische Auswertung von Signalgewinnen und -verlusten bei <i>TEL-AML1</i> positiven und negativen ALL	47
10	Übersicht über Gewinne und Verluste der untersuchten Regionen bei <i>TEL-AML1</i> positiven / negativen ALL	49
11	Statistische Auswertung der Unterschiede zwischen <i>TEL-AML1</i> positiven und negativen ALL mit aberranten Subpopulationen	53
12	Überblick über relevante Subpopulationen bei <i>TEL-AML1</i> positiven / negativen ALL	54
13	Vergleich von Fish-Ergebnissen, Zytogenetikbefunden und aCGH-Ergebnissen	55
14	Verlaufsbeobachtung bei einer Patientin mit <i>TEL-AML1</i> positiver ALL	56
15	Vergleich kategorialer Variablen im untersuchten und im Vergleichskollektiv	57
16	Vergleich stetiger Variablen im untersuchten und im Vergleichskollektiv	58
17	Ergebnisübersicht der statistischen Auswertung: Beziehung zwischen numerischen Aberrationen von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X und klinischen Daten	66
18	Häufigkeiten von Gewinnen und Verlusten von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X bei <i>TEL-AML1</i> positiven, initialen und rezidierten ALL im Kindesalter	69
19	Häufigkeiten von Gewinnen und Verlusten der untersuchten Regionen in Biopsien von <i>TEL-AML1</i> positiven und negativen ALL	83

8. Abkürzungsverzeichnis

AF	Transaktivierungsdomäne	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
<i>AF4</i>	ALL1 fused gene from chromosome 4	min	Minute
ALL	akute lymphoblastische Leukämie	<i>MLL</i>	Mixed lineage leukemia-Gen
AML	akute myeloische Leukämie	mM	Millimol
<i>AML1</i>	AML1-Gen	MRD	minimale Resterkrankung (minimal residual disease)
AP 1	Aktivator-Protein 1	mTOR	Mammalian target of rapamycin - Protein
BAC	künstliches bakterielles Chromosom (bacterial artificial chromosome)	<i>MYC</i>	Myelocytomatosis viral Onkogen
BCL-2	B-cell lymphoma 2 - Protein	n. d.	nicht durchgeführt
<i>BCR</i>	Breakpoint cluster region – Gen	n. e.	nicht eruierbar
<i>ABL</i>	Abelson - Gen	NFκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
<i>BRC A2</i>	Breast cancer type 2 – Gen	NLS	Kernlokalisationsignal
BSA	bovines Serumalbumin	NOTCH1	Notch Homolog 1 - Protein
bzw.	beziehungsweise	<i>NR3C1</i>	Nuclear receptor subfamily 3, group c, member 1 – Gen
CBF	core binding factor	n. s.	nicht signifikant
<i>CDKN2A/B</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor A/B – Gen	NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (non small cell lung cancer)
<i>CENTD3</i>	Centaurin, delta 3 - Gen	NT	Nick Translation
CEP	Zentromersonde (chromosome enumeration probe)	o. p. B.	ohne pathologischen Befund
<i>CEP72</i>	Centrosomal protein 72kDa – Gen	OT	Objektträger
CGH	Comparative genomic hybridization	PAC	P1 artificial chromosome
CML	chronische myeloische Leukämie	<i>PAX5</i>	Paired box 5 – Gen
CLL	chronische lymphatische Leukämie	PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid	<i>PBX1</i>	Pre-b-cell leukemia homeobox 1 - Gen
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	PCR	Polmerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	PEPB2	Polyoma-Enhancer bindendes Protein
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	<i>PML</i>	Promyelocytic leukemia - Gen
d. h.	das heißt	p. o.	per os
<i>DIAPH1</i>	Diaphanous homolog 1 - Gen	<i>RARA</i>	Retinoic acid receptor alpha - Gen
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	RT	Raumtemperatur
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	s	Sekunde
dUTP	Desoxyuridintriphosphat	<i>SLC9A3</i>	Solute carrier family 9 – Gen
<i>E2A</i>	E2-alpha - Gen	<i>SPANXB</i>	Sperm protein associated with the nucleus, X chromosome, family member B
<i>EBF1</i>	Early B-cell factor 1 - Gen	SSC	Natrium-Citratpuffer (sodium saline citrat)
EFS	ereignisfreies Überleben	TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>EGR1</i>	Early growth response 1 - Gen	<i>TEL</i>	Translocation, ETS, Leukemia – Gen
<i>ENL</i>	Eleven nineteen leukemia - Gen	TPPP	Tubulin polymerization promoting protein
ETV6	E twenty-six specific variant Gen 6	TZR	T-Zell-Rezeptor
FBS	Fetales bovines Serum	u. a.	unter anderem
FisH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	w	weiblich
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat	<i>XIAP</i>	X-linked inhibitor of apoptosis – Gen
GC	Glukokortikoide	YAC	künstlich hergestelltes Hefechromosom (yeast artificial chromosome)
GR	Glukokortikoidrezeptor	z. B.	zum Beispiel
GRE	Glucocorticoid-responsive elements	<i>ZDHC11</i>	Zinkfinger, DHHC type containing 11 – Gen
HSP	Hitzeschock-Protein	ZNS	zentrales Nervensystem
HTLV-1	humanes T-Zell-Lymphozyten-Virus-1	z. T.	zum Teil
<i>IKZF1</i>	IKAROS Familie Zinkfinger 1 – Gen	Gene werden in kursiver Schreibweise aufgeführt, Proteine in gerader.	
i. th.	intrathekal		
i. v.	intravenös		
KM	Knochenmark		
LOH	loss of heterozygosity		
m	männlich		
Mbp	Megabasenpaare		
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1-Protein		

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Karl Seeger für die Überlassung des interessanten Themas, die Kontaktherstellung zum Max-Planck-Institut und die kritische Durchsicht des Manuskripts sowie seine konstruktiven Vorschläge.

Herrn Prof. Dr. Dr. Günter Henze danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Klinik durchführen zu können und so einen ersten Zugang zur pädiatrischen Onkologie zu erhalten.

Herrn Dr. Dr. Thomas Heiden danke ich für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, für seine Hilfsbereitschaft, gute Ideen und seine Genauigkeit, für die stetige Offenheit zur Diskussion und die konstante Begleitung während der gesamten Arbeit. Ihm und Fabienne Trotier bin ich außerdem besonders verbunden für die Hilfe bei der Optimierung der Einstellungen des Fluoreszenzmikroskops.

Bei Herrn Dr. Reinhard Ullmann aus dem Max-Planck-Institut (MPI) für molekulare Genetik (Abteilung Professor Ropers) möchte ich mich für die Bereitstellung der räumlichen Mittel und Materialien zur Durchführung der Versuche bedanken. Hannelore Madle aus dem MPI bin ich sehr dankbar für das Vermitteln der Hybridisierungstechnik und die kompetente Beratung in technischen und inhaltlichen Fragen. Mein Dank gilt außerdem Ines Müller, Artur Muradyan, Vivien Boldt, Anne Steininger, Alischo Ahmed, Corinna Menzel und Zofia Wotschofsky und allen anderen Mitarbeitern des MPI für ihre Kollegialität und Hilfe.

Großen Dank schulde ich Frau Dr. Cornelia Eckert für das Zusammenstellen des Patientenkollektivs und die geduldige Beantwortung meiner immer wieder aufkommenden Fragen zu MRD und ALL-REZ BFM sowie Gabriele Körner und Wilhelmine Keune v. a. für die Hilfe beim Herstellen der Blutausstriche. Außerdem danke ich allen nicht namentlichen genannten Mitarbeitern des molekulargenetischen Labors im Virchow-Klinikum.

Bei Almut Giese möchte ich mich für ihre Arbeit bedanken, auf deren Grundlage die Fragestellung dieser Arbeit entstanden ist. Ihr und Renia Vagkopoulou danke ich für die Bereitschaft zum Austausch und zur Diskussion.

Ramona Scheufele (Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie, Charité) und Reyk Richter bin ich dankbar für die Beratung bei Statistikfragen, Dr. Arend von Stackelberg für die Hilfe und Anleitung bei der statistischen Auswertung mit SPSS.

Den Eltern der in die ALL-REZ BFM Studien eingeschlossenen Kindern danke ich für die Bereitschaft, zum Fortgang der ALL-Forschung beizutragen sowie allen Mitarbeitern der teilnehmenden Kliniken für ihre Vorarbeiten.

Meinen Eltern Daniéla Meyr und Dr. Hermann Meyr und meiner Großmutter Eva-M. Pescht bin ich dankbar für die moralische und finanzielle Unterstützung während des Medizinstudiums. Meinem Freund Jochen Cuntz danke ich für seine Geduld, sein uneingeschränktes Verständnis und seinen Optimismus.

11. Erklärung

Ich, Franziska Meyr, erkläre,
dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel:

„Gewinne und Verluste von 5q31.3, 5p15.33 und Chromosom X
und deren klinische Relevanz
bei *TEL-AML1* positiven und negativen Erstrezidiven
der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt,
ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer
Arbeiten dargestellt habe.

.....

Datum

.....

Unterschrift