

5 Diskussion

5.1 *TEL-AML1*-Spleißvarianten

5.1.1 Methodische Aspekte

Die Amplifikation des kompletten *TEL-AML1*-Transkripts erwies sich auch nach ausführlichen Optimierungsversuchen als schwierig. Dies lag neben der Länge des Transkripts vor allem am hohen GC-Gehalt im Exon 8 von *AML1*. Nur die Verwendung eines bestimmten Enzymgemischs in Kombination mit einem bestimmten Primerpaar führte überhaupt zu einem reproduzierbaren Ergebnis. Ebenfalls mußte darauf geachtet werden, das Konzentrationsverhältnis aller Reagenzien sowie das Temperaturprofil genau einzuhalten, da hier schon geringe Änderungen oft zu einem nicht verwertbaren PCR-Ergebnis führten.

Ein weiteres Problem stellte die Tatsache dar, dass es immer auch zur Bildung unspezifischer Nebenprodukte kam. Um diese wenigstens zu vermindern, mußte stets auf Eis gearbeitet werden und mußten auch zunächst zwei getrennte Reaktionsgemische pipettiert werden, die erst kurz vor Beginn der PCR vermischt wurden. Trotzdem war die *long-distance* PCR nicht bei allen untersuchten Knochenmarksproben erfolgreich und wenn doch, dann waren wegen der unspezifischen Nebenprodukte häufig noch weitere PCR-Untersuchungen zur Bestätigung des Ergebnisses nötig.

5.1.2 Ergebnisse im internationalen Vergleich

Verschiedene Arbeitsgruppen haben in vorangehenden Sequenzanalysen des *TEL-AML1*-Fusionsgens gezeigt, dass, mit Ausnahme einer ALL-Probe, der Bruchpunkt im *TEL*-Gen immer im Intron 5 lokalisiert ist. Im *AML1*-Gen liegt der Bruchpunkt bei 90% der Patienten im Intron 1 und ansonsten im Intron 2. Dies führt dazu, dass bei dem *TEL-AML1*-Fusionstranskript das Nukleotid 1033 von *TEL* (das 3'-Ende des Exons 5) mit dem Nukleotid 502 (dem 5'-Ende des Exons 2) oder mit dem Nukleotid 541 (dem 5'-Ende des Exons 3) von *AML1* fusioniert ist.³⁹ In vielen Studien wurde nachgewiesen, dass die meisten ALL-Proben, bei denen der Bruchpunkt im Intron 1 von *AML1* liegt, eine zusätzliche *TEL-AML1*-Variante exprimieren, die durch alternatives Spleißen unter Entfernung des Exon 2 (exon-skipping) gebildet wird.⁴⁰

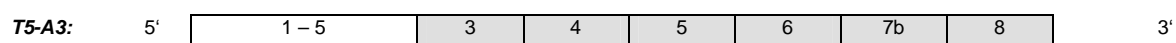
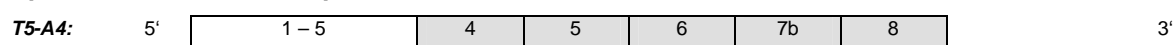
Satake et al. haben bei beiden Bruchpunkt-Möglichkeiten noch eine weitere Spleißvariante beschrieben.⁵³ Die von ihnen untersuchten Patientenproben exprimierten jeweils

zwei verschiedene Fusionstranskripte: zum Einen die komplette *TEL-AML1*-mRNA, bei der je nach Bruchpunkt im *AML1*-Gen das Exon 5 von *TEL* mit dem Exon 2 oder 3 von *AML1* fusioniert war, und dann noch jeweils ein Transkript, bei dem das Exon 3 von *AML1* fehlte.

Spleißvarianten bei Bruchpunkt im *AML1* Intron 1:



Spleißvarianten bei Bruchpunkt im *AML1* Intron 2:



Exons von *TEL*

Exons von *AML1*

Abbildung 23: Schematische Darstellung der vier verschiedenen *TEL-AML1*-Fusionstranskripte, die von Satake et al. beschrieben werden.

In der vorliegenden Untersuchung von Leukämiezellproben von 25 Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL konnten die von Satake et al. beschriebenen Spleißvarianten ohne Exon 3 von *AML1* nicht nachgewiesen werden. Die Sequenz der beiden Fusionstranskripte mit und ohne Exon 2 von *AML1* ließ sich jedoch bestätigen. Zweiundzwanzig Patientenproben exprimierten ferner eine noch nicht beschriebene Spleißvariante, bei der das Exon 2 von *TEL* mit dem Exon 5 von *AML1* fusioniert ist.

Eine weitere ALL-Probe zeigte ein Transkript, bei dem das Exon 4 von *TEL* mit dem Exon 2 von *AML1* fusioniert ist. Da sich bei dieser Leukämie keine *TEL-AML1*-mRNA mit *TEL* Exon 5 nachweisen ließ, ist anzunehmen, dass es sich hierbei nicht um eine Spleißvariante handelt, sondern dass ein anderer Bruchpunkt im *TEL*-Gen vorliegt. Ein solcher Fall wurde bereits von Shurtleff et al. beschrieben.⁵⁴ Bei einem der von ihnen untersuchten Patienten lag der Bruchpunkt im Intron 4 von *TEL*, so dass dem *TEL-AML1*-Fusionstranskript ebenfalls das Exon 5 von *TEL* fehlte. Ein Bruch im Intron 4 von *TEL* wird auch bei der Translokation t(5;12) gefunden, bei der die Exons 1 – 4 von *TEL* mit *PDGFRβ* (*platelet-derived growth factor receptor-β*) fusionieren.²⁸

5.1.3 Funktion der verschiedenen Proteine

5.1.3.1 Funktion von TEL

Normalerweise wird TEL in hohem Maße sowohl von hämatopoetischen als auch von nicht hämatopoetischen Geweben exprimiert. Molekulargenetische Veränderungen des TEL-Genlocus kommen aber vor allem bei malignen hämatopoetischen Erkrankungen vor.⁵⁵

Während der frühen embryonalen Entwicklung wird TEL für die Angiogenese im Dottersack und für das Überleben verschiedener Zelltypen gebraucht, jedoch nicht für die fetale Hämatopoese in der Leber. Im postnatalen Leben ist es dann zur Etablierung einer stabilen Hämatopoese im Knochenmark notwendig. Die genaue Funktion von TEL hierbei ist noch unklar, aber wahrscheinlich beeinflusst TEL die Interaktion der hämatopoetischen Stammzellen mit dem Knochenmarksstroma.²³

Über die HLH-Domäne bildet TEL nicht nur Homodimere, sondern auch Heterodimere mit dem Fli-1 Onkoprotein, einem weiteren Mitglied der ETS-Familie. Die von Fli-1 vermittelte Transkriptionsaktivierung wird durch die gleichzeitige Expression von TEL gehemmt, wofür aber nicht nur die HLH-Domäne von TEL, sondern das komplette TEL-Protein notwendig ist.^{56,57} Ebenfalls über die HLH-Domäne wird die Interaktion mit dem Enzym UBC9 vermittelt. Dessen Substrat ist SUMO-1, welches TEL durch die Konjugation mit einem spezifischen Lysin-Rest der HLH-Domäne so modifiziert, dass es zur Lokalisation von TEL in spezifischen Kernkörperchen kommt. Diese Kernkörperchen scheinen vorzugsweise während der S-Phase des Zellzyklus exprimiert zu werden, ihre genaue Bedeutung ist aber noch unklar.⁵⁸

TEL wirkt weiterhin als sequenzspezifischer Repressor an ETS-Bindungsstellen enthaltenden Promotoren, wie zum Beispiel dem Stromelysin-1 Promotor.⁵⁹ Für diese Repression benötigt TEL sowohl die ETS-Domäne als auch eine zentrale Domäne (Aminosäuren 268–303), sowie die nukleären Co-Repressoren mSin3a und N-CoR, die an diesen Domänen binden. Die zentrale Domäne bindet außerdem noch Histone-Deacetylase-3, was für die Hemmung des Stromelysin-1 Promotors essentiell ist.⁶⁰

5.1.3.2 Funktion von AML1

Das AML1-Protein enthält zwei funktionelle Domänen. Die *runt-homology-domain* ist für dessen DNA-Bindung an die *enhancer core* Sequenz TGT/cGGT verantwortlich. Gene, für deren Transkription diese Sequenz benötigt wird, kodieren für die T-Zell-Rezeptoren

$-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$ und $-\delta$, für Myeloperoxidase und neutrophile Elastase, für GM-CSF und den CSF-1-Rezeptor sowie für Interleukin 3.⁶¹ AML1b und AML1c enthalten noch die Transaktivierungsdomäne, die von den Exons 7b und 8 kodiert wird. Da AML1a diese Domäne fehlt, hat es keine transkriptionsaktivierenden Eigenschaften. Es hat aber eine höhere DNA-Affinität als AML1b, kann so die Transkriptionsaktivierung von AML1b unterdrücken und als negativer Regulator wirken. Eine Überexpression von AML1a hemmt die Differenzierung von Granulozyten, ein Effekt, der durch die Überexpression von AML1b wieder aufgehoben werden kann.⁶² Beim Erwachsenen wird *AML1*-mRNA in allen Geweben nachgewiesen, die höchste Expression findet man jedoch im Thymus, im Knochenmark und im Blut.⁶³

Der heterodimere Komplex aus AML1 und CBF β spielt eine wichtige Rolle für die Bildung des definitiven hämatopoetischen Systems. So führen Mutationen des *AML1*-Gens zu keiner Veränderung von Anzahl oder Morphologie der primitiven Erythrozyten im Dottersack, aber die fetale Hämatopoese in der Leber und somit die Entstehung einer definitiven Erythropoese, Myelopoese und Lymphopoese ist blockiert. Bei Fehlen von AML1 sterben Mausembryos zwischen Tag E11.5 und E12.5 und weisen massive Hämorrhagien und Nekrosen vor allem des ZNS auf.^{63,64,65,66}

Um seine Wirkung als Transkriptionsfaktor voll zu entfalten, muß AML1 aber nicht nur seine spezifischen DNA-Sequenzen binden, sondern auch noch mit anderen Transkriptionsfaktoren und transkriptionellen Co-Aktivatoren, wie z. B. p300 und CBP, interagieren. Es scheint, als ob der AML1/CBF β -Komplex als Transkriptionsorganisator wirkt, der andere Faktoren in einen Nukleoprotein-Komplex rekrutiert, welcher dann die gewebespezifische Transkription regelt.^{34,67}

5.1.3.3 Funktion des TEL-AML1 Fusionsproteins

Über die *runt-homology-domain* kann das Fusionsprotein genau wie AML1 spezifisch die *enhancer core* Sequenz TGT/cGGT binden und mit CBF β interagieren, was zu einer Verstärkung der DNA-Bindung führt.⁶¹

Die HLH-Domäne vermittelt sowohl die Homodimerisation von TEL-AML1-Fusionsproteinen als auch die Heterodimerisation von TEL-AML1 mit dem normalen TEL-Protein. In Transkriptionsaktivierungs-Versuchen zeigten TEL-AML1-Konstrukte ohne die HLH-Domäne eine verringerte biologische Aktivität, so dass eventuell auch eine Heterodimerisation mit TEL die transformierenden Eigenschaften von TEL-AML1 vermindern könnte. Eine Deletion des zweiten *TEL*-Allels, wie sie bei *TEL-AML1* posi-

ven ALL häufig beobachtet wird, wäre dann ein wichtiges sekundäres Ereignis, das den Prozeß der Leukämogenese triggern könnte.^{6,28,68} Über die HLH-Domäne kommt es beim TEL-AML1-Fusionsprotein außerdem noch, ebenso wie bei TEL, zu einer Konjugation mit SUMO-1, welche dann zur Lokalisation von TEL-AML1 in spezifischen Kernkörperchen führt. Das Expressionsmuster von TEL-AML1 im Zellkern ähnelt so dem Expressionsmuster von TEL und unterscheidet sich von dem des AML1-Proteins.⁵⁸

Das TEL-AML1-Fusionsprotein führt zu einer Hemmung der Transkription des T-Zell-Rezeptor- β (TZR β) -enhancers und des Interleukin-3-Promotors. Der genaue Mechanismus dieser Hemmung ist noch unklar. Eine wichtige Rolle spielt auf jeden Fall die HLH-Domäne, da ihre Deletion dem TEL-AML1-Fusionsprotein die Fähigkeit nimmt, als Transkriptioninhibitor zu wirken. Die von der HLH-Domäne vermittelte Dimerisation des TEL-AML1-Moleküls könnte seine Interaktion mit anderen Transkriptions-Coaktivatoren, wie p300 verhindern.⁶⁹ Die HLH-Domäne ist aber nicht allein verantwortlich für die Transkriptions-Hemmung von TEL-AML1. Die Inhibition benötigt auch die *runt*- und die Sin3-Interaktions-Domäne von AML1, sowie die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen in den Transkriptionskomplex.⁶⁷

Etwas anders verhält es sich beim MCSFR (*monocyte colony stimulating factor receptor*) -Promotor. Dieser wird normalerweise von AML1 und C/EBP α gemeinsam aktiviert. Auch hier führt TEL-AML1 zu einer Hemmung des Promotors, allerdings nur in Gegenwart von C/EBP α . Eine Deletion der HLH-Domäne des Fusionsproteins verringert zwar diese Hemmung, hebt sie aber nicht vollständig auf. Zusätzlich wurde noch beobachtet, dass TEL-AML1-Konstrukte, denen die Transaktivierungsdomäne fehlt, zu einer stärkeren Hemmung des Promotors geführt haben als das TEL-AML1-Protein mit Transaktivierungsdomäne.⁷⁰

Bernadin et al. haben gezeigt, dass die Expression von TEL-AML1 zur Leukämogenese in Mäusen beiträgt.⁷¹ Sie haben ebenfalls beobachtet, dass dieser Effekt durch den Verlust der *p16/p19* Gene, welcher bei 20 % der B- und 60 % der T-ALL beobachtet wird, noch verstärkt wird.

5.1.3.4 Mögliche Funktion der verschiedenen TEL-AML1-Spleißvarianten

Bei der T5-A3-Variante fehlt das 39 bp lange Exon 2 von *AML1* entweder weil der Bruchpunkt im Intron 2 von *AML1* liegt oder weil während der primären RNA-Prozessierung das Exon 2 durch Exonskipping entfernt wurde. Da für diesen Bereich aber bis jetzt noch keine funktionelle Bedeutung beschrieben wurde, ist kein Einfluß auf

die biologische Wirkung anzunehmen. Anders ist es bei den von Satake et al. beschriebenen Varianten, bei denen das Exon 3 von *AML1* fehlt.⁵⁴ Dieses kodiert für einen Teil der *runt*-Domäne, welche im AML1-Protein für die DNA-Bindung und die Heterodimerisation mit CBF β verantwortlich ist. Da auch das TEL-AML1-Fusionsprotein über die *runt*-Domäne die AML1-Zielgene bindet, könnte diese Funktion bei den Spleißvarianten ohne Exon 3 gestört sein.

Der *T2-A5*-Spleißvariante fehlt sowohl die von den Exons 3 und 4 von *TEL* kodierte HLH-Domäne als auch ein Großteil der *runt*-Domäne, welche von den Exons 3 – 5 von *AML1* kodiert wird. Komplett erhalten ist nur die von den Exons 7b und 8 von *AML1* kodierte Transaktivierungsdomäne. Insgesamt erscheint eine funktionelle Relevanz dieser Variante wenig wahrscheinlich.

Das TEL-Protein enthält eine zentrale Repressionsdomäne (Aminosäuren 268 –303), über die es verschiedene Co-Repressoren bindet und als sequenzspezifischer Repressor an ETS-Bindungsstellen enthaltenden Promotoren wirkt. Diese Domäne wird von einem Teil des Exons 5 kodiert, welches in seltenen Fällen nicht im *TEL-AML1*-Fusionstranskript enthalten ist (*T4-A2*-Variante). Wang et al. haben gezeigt, dass TEL-Proteine ohne die zentrale Repressionsdomäne eine verminderte Transkriptionsrepression bewirken.⁶⁰ Insofern ist es durchaus denkbar, dass auch TEL-AML1-Fusionsproteine ohne die zentrale Repressionsdomäne eine geringere Transkriptionsrepression ausüben als diejenigen, in denen diese Domäne enthalten ist.

5.1.4 Bedeutung der *T2-A5*-Spleißvariante für die *TEL-AML1*-Diagnostik

Fragestellung der vorliegenden Arbeit war neben der Identifizierung von weiteren *TEL-AML1*-Spleißvarianten die Evaluierung ihrer Relevanz für die molekulargenetische Diagnostik. Sollten nämlich in den leukämischen Blasten in großer Menge *TEL-AML1*-Varianten vorliegen, deren Bruchpunkt außerhalb der von den Standard-Primern erfaßten Region liegt, könnte dies zu falsch negativen PCR-Ergebnissen führen.

Satake et al. haben die von ihnen beschriebenen Spleißvarianten mit verschiedenen Primerkombinationen jeweils getrennt amplifiziert.⁵⁴ Sie stellten fest, dass die PCR, die das Fusionstranskript mit *AML1* Exon 3 nachweist, eine 10fach höhere Sensitivität hat als die PCR, die das Fusionstranskript ohne Exon 3 nachweist. Diese unterschiedliche Sensitivität sowie die Tatsache, dass Exon 3 für einen Teil der *runt*-Domäne kodiert, läßt sie vermuten, dass das Transkript mit *AML1* Exon 3 das Hauptprodukt der leukämi-

schen Zellen ist. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Pallisgaard et al., die ebenfalls die unterschiedliche Expression der Varianten mit und ohne Exon 2 sowie mit und ohne Exon 3 von *AML1* untersucht haben.¹⁵ Sie konnten zeigen, dass bei Patientenproben mit Bruchpunkt im Intron 1 von *AML1* die Variante mit Exon 2 gleich stark oder bis zu achtfach stärker exprimiert wird als die Variante ohne Exon 2. Die *TEL-AML1*-Spleißvariante ohne Exon 3 von *AML1* wurde unabhängig davon, ob der Bruchpunkt im Intron 1 oder im Intron 2 von *AML1* lag 30-60fach schwächer exprimiert als die Variante mit Exon 3 von *AML1*.

Ähnliches ließ sich auch bei der *T2-A5*-Spleißvariante beobachten. Bei der Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel waren die Banden, die der *T2-A5*-Spleißvariante entsprachen, in den meisten Fällen wesentlich schwächer als die Banden, die dem kompletten Fusionstranskript entsprachen. Bei einer normalen PCR war dies immer der Fall. Eine Amplifikation mit Primern, die im *TEL* Exon 5 und im *AML1* Exon 3 gelegen waren, ergab immer eine deutliche Bande auf dem Agarosegel. Die Verwendung von Primern im *TEL* Exon 2 und im *AML1* Exon 5, womit nur die Spleißvariante nachgewiesen wird, führte hingegen zu viel schwächeren Banden. Dies deutet darauf hin, dass die *T2-A5*-Spleißvariante in geringerem Maße exprimiert wird als das normale Fusionstranskript. Da das *T2-A5*-Fusionsprotein kaum funktionelle Domänen enthält, ist eine wesentliche funktionelle Bedeutung ohnehin fraglich und es erscheint sehr wahrscheinlich, dass diese Variante nur ein Nebenprodukt ohne klinische Relevanz ist.

Die meisten Arbeitsgruppen nutzen bei Untersuchungen des *TEL-AML1*-Fusionstranskripts, sei es, um auf das Vorliegen der Translokation zu screenen oder als MRD-Marker bei Verlaufsbeobachtungen, Primer, die im *TEL* Exon 5 und im *AML1* Exon 3 gelegen sind. Diese ermöglichen einen spezifischen Nachweis der *T5-A2*- und der *T5-A3*-Varianten. Ein gleichzeitiger und spezifischer Nachweis aller hier beschriebenen Spleißvarianten ist aufgrund der Größe des *TEL-AML1*-Fusionstranskripts nur schwer durchführbar. Da jedoch, sofern der Bruchpunkt im *TEL* Intron 5 liegt, die *T5-A2*- und die *T5-A3*-Varianten die Hauptprodukte der leukämischen Zellen zu sein scheinen, erscheint es durchaus gerechtfertigt, bei den etablierten Primerkombinationen zu bleiben.

Eine Ausnahme stellen ALL-Proben dar, deren Bruchpunkt im Intron 4 des *TEL*-Gens liegt. Da hier gar kein Fusionstranskript mit Exon 5 von *TEL* exprimiert wird, kommt es in diesen Fällen zu falsch negativen PCR-Ergebnissen. Shurtleff et al. haben als erste einen solchen Patienten beschrieben.⁵⁴ Sie haben in ihrer Studie 160 Kinder mit einer

ALL-Ersterkrankung und 50 Kinder mit einer AML auf das Vorliegen der Translokation t(12;21) untersucht. Dazu haben sie zunächst eine PCR mit Primern, die im Exon 5 von *TEL* und im Exon 3 von *AML1* liegen, durchgeführt. Alle negativen Fälle haben sie dann noch einmal mit einem Primer, der im Exon 3 von *TEL* liegt, untersucht. So fanden sie die eine von ihnen beschriebene ALL, dem das Exon 5 von *TEL* fehlt. Borkhardt et al. haben in ihrer Studie über die Inzidenz der *TEL-AML1*-Fusion ebenfalls die Möglichkeit eines Bruchpunktes im Intron 4 von *TEL* in Betracht gezogen.⁷² Von den ALL-Patienten, die mit Standard-Primern negativ für die t(12;21) waren, haben sie 56 Patienten mit Primern, die im Exon 4 von *TEL* und im Exon 3 von *AML1* liegen, untersucht. Es wurde jedoch in keinem Fall ein Amplifikat nachgewiesen.

Insgesamt scheinen also andere Bruchpunkte als die im Intron 5 von *TEL* und im Intron 1 bzw. 2 von *AML1* selten zu sein. Da mit der in der vorliegenden Arbeit etablierten *long distance* PCR jedoch nicht von allen Patientenproben eine Amplifikation des *TEL-AML1*-Transkripts möglich war, ist dies eher keine geeignete Methode, um ALL-Proben mit abweichenden Bruchpunkten sicher zu entdecken. Hier stellt statt dessen die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FisH) als zweite Screening-Untersuchung neben der einfachen PCR eine Alternative dar, da deren Zuverlässigkeit in vielen Studien nachgewiesen wurde.^{73,74} Sollte sich dann, wie in der vorliegenden Arbeit, in der FisH ein positives Signal zeigen, kann mit der *long distance* PCR die Probe gezielt untersucht werden und aus der Länge der Bande im Agarosegel oder mittels Sequenzierung des PCR-Produkts auf das oder die fehlenden Exons geschlossen werden.

5.2 MRD

5.2.1 Methoden zum Nachweis von MRD

Um leukämische Zellen lichtmikroskopisch sicher diagnostizieren zu können, müssen mindestens 5% der kernhaltigen Zellen Blasten sein. Es gibt drei verschiedene Methoden, mit denen es gelingt, diese Schwelle zu unterschreiten und so einen ausreichend sensitiven Nachweis von MRD ermöglichen: die Durchflußzytometrie, der PCR-Nachweis von klonspezifischen T-Zell-Rezeptor- (TZR) bzw. Immunglobulin- (Ig) Genrekombinationen und der RT-PCR-Nachweis von leukämiespezifischen Fusionstranskripten.

Mit der Durchflußzytometrie werden leukämieassoziierte anormale Immunphänotypen gemessen.⁷⁵ Hierbei werden mit Hilfe verschiedener Kombinationen von mono- und polyklonalen Antikörpern Oberflächen-, zytoplasmatische- und nukleäre Leukozytenantigene identifiziert, die in dieser spezifischen Kombination nur von den leukämischen Lymphoblasten, jedoch nicht von den normalen Knochenmarkszellen exprimiert werden.^{76,77} Diese Technik ist bei 60-98% der B-Vorläuferzell-ALL und bei über 90% der T-ALL anwendbar.⁷⁸ Von Vorteil ist vor allem, dass sie schnell durchzuführen ist. Zur Sensitivität, die mit der Durchflußzytometrie erreicht werden kann, sind verschiedene Untersuchungsergebnisse publiziert. Einige Studien berichten eine standardmäßig erreichbare Nachweisgrenze von 10^{-4} (d.h. der Nachweis einer leukämischen Zelle unter 10^4 gesunden Zellen), jedoch sehen die meisten Arbeitsgruppen die Sensitivität eher im Bereich von 10^{-3} ($\sim 10^{-4}$).⁷⁹ Von Nachteil ist ebenfalls die Tatsache, dass es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann, da die Leukämiezellen im Verlauf der Erkrankung ihren Immunphänotyp ändern können. Auch hier sind die veröffentlichten Ergebnisse zur Häufigkeit, mit der dies geschieht, abweichend, jedoch wird fast immer die Untersuchung von zwei verschiedenen leukämieassoziierten Immunphänotypen pro Patient befürwortet. Ein weiteres Problem ist, dass noch nicht sicher ist, ob Durchflußzytometrie und PCR vergleichbare Ergebnisse liefern, die parallel in einer Studie verwendbar sind. Mit der PCR werden entweder klonspezifische TZR- bzw. Immunglobulin (Ig-Genrekombinationen oder leukämiespezifische Translokationen nachgewiesen. TZR- oder Ig-Genrekombinationen sind klonspezifische Marker, die bei 90 – 95 % aller ALL nachgewiesen werden können. Durch MRD-Bestimmung mittels PCR wird eine höhere Sensitivität, nämlich von bis zu 10^{-5} gewährleistet. Um semiquantitative oder quantitative PCR-Ergebnisse zu erhalten, wurden verschiedene Ansätze etabliert, die auf der Hybridisierung des PCR-Produkts mit radioaktiv markierten spezifischen Sonden basieren. Die gemessene Signalintensität kann zum Beispiel mit der einer Verdünnungsreihe verglichen und so semiquantitativ das MRD-Level abgeschätzt werden.⁸⁰

Genauere Ergebnisse liefern kompetitive PCR-Versuche, bei denen das untersuchte Gen und ein homologer interner Standard gemeinsam amplifiziert werden. Aufgrund der Konkurrenz um die Reagenzien kommen beide Reaktionen schließlich unabhängig von der initialen Kopienzahl zur gleichen Zeit zum Stillstand. Die jeweils gebildete Menge an PCR-Produkt wird gemessen, zueinander ins Verhältnis gesetzt und anhand einer zuvor etablierten Standardkurve das MRD-Level abgelesen.¹⁸ Diese Versuche sind jedoch alle sehr zeit- und arbeitsintensiv und deshalb nur bedingt für die Routinediagnostik ge-

eignet. Die beiden ersten großen MRD-Studien haben diese Methoden zwar genutzt, allerdings nur um retrospektive Daten zu gewinnen.^{18,19}

Wenn von den Ergebnissen aber Therapieentscheidungen abgeleitet werden sollen, ist eine schnelle Verfügbarkeit unverzichtbar. Außerdem wird die Menge an gebildetem PCR-Produkt nicht immer optimal in der exponentiellen Phase der PCR gemessen. Die semiquantitativen Techniken versuchen dies zu erreichen, indem die Reaktion nach einer begrenzten Zyklenzahl abgebrochen wird. Geschieht das jedoch zu früh, ist eventuell noch gar nichts nachweisbar und wird zu spät abgebrochen, ist möglicherweise bereits die Plateauphase erreicht und die Reaktion aufgrund verschiedener Faktoren zum Stillstand gekommen. Der Zeitpunkt, an dem das geschieht und somit die Menge an PCR-Produkt, die insgesamt gebildet wird, kann von Versuch zu Versuch variieren. Dies kann dann bei der Rückrechnung, wieviel Kopien des untersuchten Gens initial vorlagen, zu Fehlern führen.

Die Entwicklung der *real-time* PCR zur MRD-Quantifizierung erbrachte hier einen wesentlichen Vorteil, da das PCR-Produkt in der exponentiellen Phase der PCR direkt während seiner Entstehung gemessen wird.⁸¹ Pongers-Willemse et al. beschrieben die erste *real-time* MRD-Quantifizierung mit klonspezifischen Sonden und dem ABI PRISM 7700 SDS Sequencer.⁸² Seitdem haben viele Arbeitsgruppen die Möglichkeiten der MRD-Quantifizierung mit Hilfe der *real-time* PCR und der TaqMan oder der LightCycler-Technik untersucht. Drunat et al. haben die kompetitive PCR und die *real-time* PCR miteinander verglichen.⁸³ Sie haben 13 Knochenmarksproben von Kindern mit *TEL-AML1* positiver ALL mit beiden Methoden untersucht und konnten bei gleicher Sensitivität (5×10^{-5}) übereinstimmende MRD-Ergebnisse nachweisen. Die *real-time* PCR hatte jedoch neben der Zeit- und Arbeitersparnis den Vorteil, dass PCR und Quantifizierung gleichzeitig in einem geschlossenen System stattfanden, so dass das Risiko einer Kontamination minimiert war.

5.2.1.1 Vergleich der verschiedenen *real-time* PCR-Techniken

Es gibt verschiedene Fluorochrome, die bei der auf Fluoreszenzmessung basierenden *real-time* PCR verwendet werden können. Wenig spezifisch ist SYBR Green, welches fluoresziert, wenn es an doppelsträngige DNA gebunden wird. Somit werden nicht nur das zu untersuchende Gen, sondern auch andere Nebenprodukte wie z.B. Primer-Dimere nachgewiesen.⁸⁴ Eine größere Spezifität wird durch die Verwendung von sequenzspezifischen fluoreszenzmarkierten Sonden gewährleistet. Dies können entwe-

der Hydrolisierungssonden, wie in der vorliegenden Arbeit, oder Hybridisierungssonden sein.

Hybridisierungssonden bestehen aus zwei benachbarten Sequenzen, die an ihren angrenzenden Enden unterschiedliche Fluorochrome enthalten. Wenn beide Sonden an das PCR-Produkt binden, kommt es zwischen den Fluorochromen zur Energieübertragung (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET), die den Nachweis einer Amplifikation ermöglicht. Eckert et al. aus unserer Arbeitsgruppe haben diese drei Farbstoffe zur MRD-Quantifizierung mit der LightCycler *real-time* PCR verglichen.⁸⁵ Wegen der geringen Spezifität sehen sie SYBR Green als ungeeignet für die MRD-Quantifizierung an, nicht jedoch Hydrolisierungssonden oder Hybridisierungssonden.

Kreuzer et al.⁸⁶ sehen den Nachteil von Hybridisierungssonden darin, dass sie schwieriger zu designen sind als Hydrolisierungssonden und dass so, abhängig von dem zu untersuchenden Gen, nicht immer optimale Sonden entworfen werden können. Außerdem ist die Optimierung der PCR bei der Verwendung von Hybridisierungssonden komplizierter. Es müssen nämlich zwei Primer und zwei Sonden aufeinander abgestimmt werden und nicht, wie bei der Verwendung von Hydrolisierungssonden, zwei Primer und nur eine Sonde. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass bei der PCR auch unspezifische Nebenprodukte gebildet werden, was die Sensitivität und Spezifität des Versuchs vermindert.

In einer Arbeit von Bolufer et al. wird allerdings ein *real-time* PCR-Ansatz zum Nachweis von *TEL-AML1* mit Hilfe von Hybridisierungssonden im LightCycler beschrieben.⁸⁷ Der Versuch erreicht eine Sensitivität von 10^{-4} und die Autoren sehen den Vorteil gegenüber der Verwendung von Hydrolisierungssonden darin, dass kürzere *annealing*- und *Elongationszeiten* möglich sind und so die ganze PCR schneller abläuft.

5.2.2 Vergleich von DNA- und RNA-Untersuchung

Bei der quantitativen MRD-Bestimmung mittels *real-time* PCR werden entweder TZR- bzw. Ig-Genrekombinationen oder, wie in der vorliegenden Arbeit, leukämiespezifische Translokationen nachgewiesen.^{18,88,89} TZR- bzw. Ig-Rekombinationen sind klonspezifische Marker, die bei bis zu 95% der akuten lymphoblastischen Leukämien gefunden werden. Im Gegensatz dazu kommen leukämiespezifischen Translokationen nur bei 35-40% der ALL vor. Beim Nachweis von TZR- bzw. Ig-Rekombinationen muß jedoch jede einzelne Genrekombination sequenziert, individuelle Primer für diese Rekombination

entworfen und jede PCR extra optimiert werden. Außerdem kann es im Verlauf der Erkrankung zu Veränderungen der Genrekombinationen kommen.

Dies geschieht vor allem bei B-Vorläuferzell-ALL häufiger, wenn bereits bei Diagnose mehr als ein leukämischer Klon vorlagen (Oligoklonalität).^{90,91} Für jeden Patienten müssen demzufolge möglichst zwei Genrekombinationen bestimmt werden, um falsch negative PCR-Ergebnisse zu vermeiden. Bei der Quantifizierung leukämiespezifischer Fusionstranskripte kommt zwar noch der zusätzliche Arbeitsschritt der Reversen Transkription dazu, aber dafür kann ein einmal optimierter RT-PCR-Ansatz für alle Patienten, deren Leukämiezellen das jeweilige Fusionstranskript exprimieren, verwendet werden. Von Nachteil ist hier die im Vergleich zur DNA geringere Stabilität der RNA.

Da MRD-Studien meist multizentrische Studien sind, können unter Umständen mehrere Tage zwischen der Knochenmarkentnahme und der Extraktion der mononukleären Zellen vergehen und so eventuell eine Abnahme der RNA-Menge zur Folge haben. Ebenso beeinflussen DNA- oder Protein-Kontaminationen der Probe und Variationen der Aktivität der eingesetzten Enzyme das Ergebnis der RT-PCR. Die in der *real-time* PCR gemessenen RNA-Level können also nicht direkt ins Verhältnis zu einer bestimmten Anzahl von Zellen gesetzt werden, sondern müssen mit einer endogenen RNA-Kontrolle verglichen werden, welche die Menge und Qualität der RNA sowie die Effektivität der Reversen Transkription widerspiegelt. Insgesamt ist die Untersuchung von TZR- bzw. Ig-Genrekombinationen wesentlich teurer, arbeits- und zeitintensiver, dafür aber breiter anwendbar als die Untersuchung leukämiespezifischer Fusionstranskripte. In mehreren Studien wurden die beiden Methoden bei der Untersuchung von *TEL-AML1* positiven ALL verglichen. De Haas et al. haben bei 34 von 36 Knochenmarksproben mit beiden *real-time* PCR-Ansätzen ähnliche MRD-Level ermittelt ($P < 0,0001$).⁹² In zwei Proben waren mit der *TEL-AML1*-PCR noch niedrige MRD-Level nachweisbar, während die TZR/Ig-PCR schon negativ geworden war. Als Grund dafür vermuten die Autoren eine höhere Sensitivität der RT-PCR gegenüber der DNA-Untersuchung wegen des Vorhandenseins von mehr als einem mRNA-Transkript pro Zelle.

5.2.3 Vergleich verschiedener Referenzgene

Bei quantitativen RNA-Untersuchungen muß die RNA-Menge des untersuchten Gens anhand des RNA-Anteils eines sogenannten Referenzgens aus derselben Probe normalisiert werden. Dieses Referenzgen sollte ein ubiquitäres und im untersuchten Gewebe konstant exprimiertes Transkript sein. Außerdem sollte es ein vergleichbares Ex-

pressionslevel und eine ähnliche Degradationsrate wie das zu untersuchende Transkript haben. Zu Beachten ist auch, dass eine Kontamination mit genomischer DNA sowie die Existenz von Pseudogenen des gewählten Referenzgens zu Fehlinterpretationen führen können.⁹³ Als endogene Referenzgene werden sogenannte „*housekeeping genes*“ verwendet. Diese kodieren für Proteine, die essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen sind.

Pallisgaard et al. haben die Expressionslevel dreier solcher Gene, *β2-Mikroglobulin*, *GAPDH* (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) und *ABL*, im Blut und im Knochenmark von Leukämiepatienten mit denen im Blut von gesunden Spendern verglichen.¹⁵ Die Expressionslevel von *β2-Mikroglobulin* waren bei Gesunden und bei Leukämiepatienten sehr ähnlich, wohingegen sich die von *ABL* und die der *GAPDH* bis um das zehnfache unterschieden. Als Referenzgen für die *real-time* Quantifizierung von *TEL-AML1* haben Pallisgaard et al. dann das auch in der vorliegenden Arbeit verwendete *β2-Mikroglobulin* ausgewählt. *β2-Mikroglobulin* gehört zu den MHC Klasse I Proteinen und wird mit einem mittleren Expressionslevel ($10^3 - 10^4$ Moleküle pro Zelle) in einer Vielzahl von Geweben recht stabil exprimiert. Bis jetzt sind von diesem Gen keine Pseudogene bekannt und wie die in der vorgelegten Arbeit gemachten Versuche gezeigt haben, ist die Degradationsrate ähnlich der von *TEL-AML1*.

In der Literatur werden aber noch eine Vielzahl anderer Referenzgene beschrieben. Seeger et al. haben *TEL-AML1* beispielsweise anhand der Expression von *β-Actin* normalisiert. In ihrer Arbeit beschreiben sie für beide Transkripte ebenfalls gleiche Expressionslevel und gleiche Degradationsraten.⁹⁴ Bolufer et al. verwendeten bei ihrer *TEL-AML1 real-time* PCR *AML1* als Referenzgen.⁸⁷ Sie stellten jedoch fest, dass das Expressionsniveau von *AML1* im Verlauf der Therapie abnahm und stellten daraufhin die Eignung von *AML1* als Referenzgen in Frage.

Drunat et al. haben in ihrer Arbeit zwei verschiedene Referenzgene verwendet: *TBP* (*TATA box binding protein*) und *PBGD* (Porphobilinogen Desaminase).⁸³ Sie konnten für die meisten Patienten eine Übereinstimmung der MRD-Ergebnisse nachweisen. Ein ALL wies jedoch eine Deletion im Bereich des *PBGD*-Gens auf, was zu einer falschen Interpretation der *TEL-AML1*-Menge führte. Ballerini et al. haben ebenfalls *TBP* und *PBGD* als Referenzgene getestet.⁹⁵ Sie stellten für *PBGD* jedoch ein niedrigeres Expressionslevel im Vergleich zu *TEL-AML1* fest und entschieden sich deshalb für *TBP*, dessen Expression in ihren Versuchen mit REH-Zellen ähnlich der von *TEL-AML1* war. De Haas et al. verwendeten *ABL* als Referenzgen bei ihrer quantitativen *TEL-AML1*-

Studie.⁹² Sie haben zwar nicht die Degradationsraten der beiden Transkripte miteinander verglichen, jedoch stimmten die Ergebnisse ihrer MRD-Untersuchungen anhand von *TEL-AML1* mit denen anhand von TZR- bzw. *Ig-rearrangements* überein, so dass sie indirekt auf die Eignung von *ABL* als Referenzgen schlossen.

5.2.4 MRD bei ALL-Ersterkrankungen

Cavé et al. haben als erste Arbeitsgruppe die prognostische Bedeutung von MRD an einem großen Patientenkollektiv gezeigt. In einer prospektiven Studie haben sie 178 Kinder mit ALL-Ersterkrankung auf das Vorliegen von residuellen leukämischen Blasten untersucht.¹⁸ Die mediane Beobachtungszeit betrug 38 Monate. Sie stellten fest, dass zu jedem untersuchten Zeitpunkt der Nachweis von MRD signifikant mit einem höheren Rezidivrisiko korreliert war. Anhand des MRD-Status am Ende der Induktionstherapie konnten vor allem Patienten mit einer schlechten Prognose identifiziert werden. Auch nach Berücksichtigung bekannter Risikofaktoren, wie dem Immunphänotyp, der Anzahl weißer Blutzellen, dem Alter des Patienten und der Risikogruppe, blieb das MRD-Ergebnis ein unabhängiger Prognosefaktor.

Inzwischen haben mehrere Studien die Ergebnisse von Cavé et al. bestätigt und ferner gezeigt, dass MRD-Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten einen noch genaueren Einblick in den Verlauf der Erkrankung und in die Wirksamkeit der Therapie gewähren.^{78,80} Anhand der Untersuchung von 240 Kindern mit ALL-Ersterkrankung stellten van Dongen et al. ebenfalls fest, dass MRD-Daten ein unabhängiger Prognosefaktor sind und dass vor allem die Kinetik der Tumor-Reduktion bei der Einteilung in MRD-basierte Risikogruppen hilft.¹⁹ Patienten, bei denen am Ende der Induktionstherapie und vor Beginn der Konsolidierungstherapie MRD nicht nachgewiesen werden konnte, hatten ein sehr niedriges Rezidivrisiko; Patienten, bei denen MRD zu beiden Zeitpunkten positiv war, jedoch ein hohes. Zu einer Gruppe mit mittlerem Rezidivrisiko gehörten Patienten, bei denen am Ende der Induktionstherapie noch MRD nachweisbar war, es aber bis zum zweiten Untersuchungszeitpunkt zu einer deutlichen Abnahme gekommen war.

5.2.5 MRD bei ALL-Rezidiven

Ungefähr 20-30% der Kinder mit ALL erleiden ein Rezidiv und haben dann nur noch eine Heilungschance von ca. 30%.⁹⁶ In einer Arbeit von Eckert et al. wurde untersucht, ob MRD-Ergebnisse auch bei ALL-Rezidiven einen unabhängigen Prognosefaktor darstellen.²⁰ Sie stellten fest, dass die Patienten anhand der MRD-Daten vom Tag 36 der Rezidivtherapie in zwei Gruppen geteilt werden konnten. Die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens über sechs Jahre lag für Patienten, bei denen zu diesem Zeitpunkt MRD $<10^{-3}$ war, bei 86% und für Patienten, bei denen MRD $>10^{-3}$ war, bei 0. Bekannte, etablierte klinische Risikofaktoren, wie der Zeitpunkt und der Ort des Rezidivs, waren gleich verteilt. Eckert et al. schlossen daraus, dass auch bei ALL-Rezidiven die Beurteilung des Therapieansprechens anhand von MRD helfen kann, die Prognose des jeweiligen Patienten individuell abzuschätzen.

5.2.6 MRD bei *TEL-AML1* positiven ALL

Die häufigste Translokation bei ALL im Kindesalter ist die t(12;21), die zur Bildung des *TEL-AML1*-Fusionsgens führt und die bislang mit einer guten Prognose bei Ersterkrankungen assoziiert zu sein schien. Jedoch variiert die von verschiedenen Arbeitsgruppen berichtete Prävalenz der *TEL-AML1*-Fusion bei ALL-Rezidiven sehr stark (3,6 - 24%), so dass die tatsächliche prognostische Bedeutung dieser Translokation noch unklar ist.^{43,47-49,97} Sicher ist aber, dass der Nachweis der *TEL-AML1*-Fusion ein späteres Rezidiv nicht ausschließt und dass also auch innerhalb der *TEL-AML1* positiven ALL-Patientengruppe zusätzliche Unterscheidungskriterien notwendig sind, um eine angemessene Stratifizierung in die verschiedenen Therapiearme vornehmen zu können. Seeger et al. haben sowohl *TEL-AML1* positive ALL-Ersterkrankungen als auch Rezidive mit einem quantitativen RT-PCR-Ansatz untersucht.⁹⁴ Bei den Ersterkrankungen ließen sich die Patienten in drei Gruppen unterteilen: Patienten mit sehr schnellem und Patienten mit schnellem Therapieansprechen, die am Tag 15 bzw. 33 der Therapie *TEL-AML1* negativ waren und es im Verlauf der weiteren Therapie auch blieben und Patienten mit einem schlechteren Therapieansprechen, die zu Beginn der Reinduktionstherapie noch *TEL-AML1* positiv waren. Dies entspricht ungefähr den Ergebnissen der auf DNA-Untersuchung basierenden MRD-Studien von ALL-Patienten, unabhängig vom Vorliegen bestimmter Translokationen. Auch wenn nach einer mittleren Beobachtungszeit von 21 Monaten alle von Seeger et al. untersuchten Patienten noch in Remission waren, sollte das unterschiedliche Therapieansprechen *TEL-AML1* positiver ALL

bei der Therapiestratifizierung berücksichtigt werden, da Rezidive bei letzteren häufig erst spät auftreten.

Bei den von Seeger et al. untersuchten ALL-Rezidiven zeigte sich, im Vergleich zu den Ersterkrankungen, eine insgesamt langsamere Abnahme der *TEL-AML1*-Transkripte. Drei von sechs Patienten, bei denen MRD vor dem zweiten und dritten Zyklus Chemotherapie $>10^{-3}$ war, erlitten ein Rezidiv. Nach einer mittleren Beobachtungszeit von 21,5 Monaten erlitten überhaupt nur Patienten, die molekulargenetisch ein schlechtes Therapieansprechen zeigten, ein erneutes Rezidiv.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden 31 protokollgerecht behandelte Patienten mit einem *TEL-AML1* positiven ALL-Rezidiv untersucht. Die Patienten waren alle anhand klinischer Faktoren in die Stratifizierungsgruppe S2 eingeordnet worden. Es zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens über fünf Jahre für Patienten, bei denen MRD nach dem zweiten Therapieblock des Rezidivprotokolls unter 10^{-3} lag, 75% betrug, für Patienten, bei denen MRD zu diesem Zeitpunkt größer als 10^{-3} war, jedoch 0. In der nach etablierten Prognosefaktoren homogenen Gruppe der *TEL-AML1* positiven ALL-Rezidive lässt sich also durch Quantifizierung des Therapieansprechens in den ersten Wochen der Rezidivtherapie eine gute Trennung von Patienten mit günstiger und mit ungünstiger Prognose erreichen. Dies kann unter Umständen erhebliche Konsequenzen für die weitere Therapie haben, zum Beispiel bei der Entscheidung zur Durchführung von Stammzell- oder Knochenmarkstransplantationen. Diese sind mit einem hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko assoziiert und deswegen nur bei Patienten mit einer sonst ungünstigen Prognose indiziert. Im Gegensatz dazu könnten Patienten mit niedrigem Rezidivrisiko von einer weniger intensiven, nebenwirkungsärmeren Therapie profitieren.

Bei Betrachtung der Wahrscheinlichkeit des Gesamtüberlebens (pSRV; probability of survival) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen MRD-positiven und -negativen Patienten. Hierbei werden jedoch eventuelle Folgerezidive nicht berücksichtigt. Die Patienten werden erneut behandelt, erreichen vielleicht auch eine dritte Remission und sterben möglicherweise erst später. Bei dem nicht allzu langen Beobachtungszeitraum ist die Analyse des EFS also besser geeignet als die des Gesamtüberlebens, um auf die Wirksamkeit der Therapie bzw. die prognostische Bedeutung von MRD zu schließen.

5.2.7 Ausblick

Publizierte Studien haben übereinstimmend gezeigt, dass quantitative MRD-Untersuchungen im Verlauf der ALL im Kindesalter klinisch relevante Informationen liefern. Zur Interpretation dieser Informationen werden in der Literatur aber noch verschiedene Modelle beschrieben. So variieren zum Beispiel die genauen MRD-Werte, anhand derer die Patienten in unterschiedliche Risikogruppen eingeteilt werden; genauso wie die dazugehörige Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens. Dies kann sowohl an den verschiedenen Behandlungsprotokollen als auch an den unterschiedlichen MRD-Untersuchungszeitpunkten oder an der jeweiligen Technik, mit der MRD quantifiziert wird, liegen. Gerade für den Vergleich der MRD-Daten mehrerer multizentrischer Studien ist die Standardisierung der Technik zur MRD-Bestimmung wichtig. Solange nicht nachgewiesen ist, dass MRD-Werte, die mit unterschiedlichen Methoden gemessen wurden, sicher übereinstimmen, sollten Parallelen nur unter Vorbehalt gezogen werden. Genau wie in der vorliegenden Arbeit sind häufig die untersuchten Patientengruppen klein und die Beobachtungszeiten nicht sehr lang.

Zudem sind die Daten dieser Arbeit sowie alle anderen bislang publizierten Daten retrospektiv und zeigen nur, dass mittels MRD-Untersuchungen Patienten mit schlechter Prognose sicher identifiziert werden können. Im Hinblick auf Therapieänderungen sollten MRD-Ergebnissen auf jeden Fall vorsichtig bewertet werden, da noch nicht sicher ist, ob eine MRD-basierte Therapiestratifizierung für das gesamte Patientenkollektiv die Heilungsrate verbessert. Dies muß zunächst in prospektiven Interventionsstudien, bei denen die Therapie entsprechend des MRD-Ergebnisses modifiziert wird, untersucht werden. Mit diesem Ziel laufen zur Zeit die Therapieoptimierungsstudien ALL BFM 2000 für ALL-Ersterkrankungen und ALL-REZ BFM 2002 für ALL-Rezidive, von denen Ergebnisse in wenigen Jahren zu erwarten sind.