

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Stellenwert der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme GSTM1  
und GSTT1 bei ALL-Rezidiven im Kindesalter

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadya Al-Wakeel

aus Berlin

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger  
                            2. Priv.-Doz. Dr. med. Chr. Scholz  
                            3. Prof. Dr. G. Fleischhack

Datum der Promotion: 05.06.2011

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Einführung</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Epidemiologie .....	5
1.2.3.1 Positiv prädiktive Faktoren .....	6
1.2.3.2 Negativ prädiktive Faktoren .....	7
1.2.4 ALL-Rezidive .....	7
1.2.5 ALL-Therapie .....	9
1.2.5.1 Glukokortikoide .....	10
1.2.5.2 Asparaginase .....	10
1.2.5.3 Zytostatika .....	10
<b>1.3 Polymorphismen Arzneimittel-metabolisierender Enzymsysteme</b> .....	<b>13</b>
1.3.1 Assoziation hereditärer Polymorphismen von DMS mit Krebsrisiko .....	13
1.3.2 Phase I-/II-Enzyme .....	14
<b>1.4 Glutathion-S-Transferasen</b> .....	<b>14</b>
1.4.1 Polymorphismen der GST .....	14
1.4.1.1 GST $\mu$ .....	15
1.4.1.2 GST $\theta$ .....	17
<b>2. FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>19</b>
<b>3. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1 Patienten</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2 Material</b> .....	<b>21</b>
3.2.1 Chemikalien .....	21
3.2.2 Puffer und Lösungen .....	21
3.2.2.1 DNA-Isolierung .....	21
3.2.2.2 PCR .....	21
3.2.2.3 Elektrophorese .....	22
3.2.3 Enzyme .....	22
3.2.4 Nukleinsäuren .....	22
3.2.5 Nukleinsäureextraktion .....	22
3.2.6 Filme .....	22
3.2.7 Software .....	23
3.2.8 Geräte .....	23
<b>3.3 Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.3.1 DNA-Isolierung .....	23
3.3.2 PCR .....	25
3.3.3 Quantitative Analyse der PCR-Amplifikate .....	26
3.3.4 Statistische Methoden .....	27
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1 Inzidenz der <i>GSTM1</i>- und <i>GSTT1</i>-Polymorphismen</b> .....	<b>28</b>
4.1.1 <i>GSTM1</i> .....	28
4.1.1.1 ALL-Erstrezidive .....	28
4.1.1.2 ALL-Ersterkrankung und Kontrollgruppe .....	30
4.1.2 <i>GSTT1</i> .....	30
4.1.2.1 ALL-Erstrezidive .....	30
4.1.2.2 ALL-Ersterkrankung und Kontrollgruppe .....	32
4.1.3 <i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> .....	34
4.1.3.1 ALL-Erstrezidive .....	34
4.1.3.2 ALL-Ersterkrankung und Kontrollgruppe .....	34
<b>4.2 <i>GSTM1</i>- und <i>GSTT1</i>-Polymorphismen und kontinuierliche Variablen bei ALL</b> .....	<b>38</b>
4.2.1 <i>GSTM1</i> .....	38
4.2.1.1 BVZ-ALL .....	38
4.2.1.2 T-ALL .....	39

4.2.2	<i>GSTT1</i> .....	39
4.2.2.1	BVZ-ALL.....	39
4.2.2.2	T-ALL.....	40
4.2.3	<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> .....	40
4.2.3.1	BVZ-ALL.....	40
4.2.3.2	T-ALL.....	41
<b>4.3</b>	<b><i>GSTM1</i>- und <i>GSTT1</i>-Polymorphismen und Langzeitüberleben bei ALL.....</b>	<b>41</b>
4.3.1	<i>GSTM1</i> .....	42
4.3.1.1	BVZ-ALL.....	42
4.3.1.2	T-ALL.....	42
4.3.2	<i>GSTT1</i> .....	43
4.3.2.1	BVZ-ALL.....	43
4.3.2.2	T-ALL.....	43
4.3.3	<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> .....	44
4.3.3.1	BVZ-ALL.....	44
4.3.3.2	T-ALL.....	45
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>46</b>
<b>5.1</b>	<b>Inzidenz der <i>GSTM1</i>- und <i>GSTT1</i>-Polymorphismen.....</b>	<b>46</b>
5.1.1	<i>GSTM1</i> .....	46
5.1.1.1	ALL-Erstrezidive.....	46
5.1.1.2	ALL-Ersterkrankungen und Kontrollgruppe.....	48
5.1.2	<i>GSTT1</i> .....	51
5.1.2.1	ALL-Erstrezidive.....	51
5.1.2.2	ALL-Ersterkrankungen und Kontrollgruppe.....	52
5.1.3	<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> .....	56
5.1.3.1	ALL-Erstrezidiv.....	56
5.1.3.2	ALL-Ersterkrankung und Kontrollgruppe.....	56
<b>5.2</b>	<b><i>GSTM1</i>- und <i>GSTT1</i>-Polymorphismen und kontinuierliche Variablen bei ALL.....</b>	<b>59</b>
5.2.1	<i>GSTM1</i> .....	59
5.2.1.1	BVZ-ALL.....	59
5.2.1.2	T-ALL.....	59
5.2.2	<i>GSTT1</i> .....	60
5.2.2.1	BVZ-ALL.....	60
5.2.2.2	T-ALL.....	60
5.2.3	<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> .....	61
5.2.3.1	BVZ-ALL.....	61
5.2.3.2	T-ALL.....	61
<b>5.3</b>	<b><i>GSTM1</i>- und <i>GSTT1</i>-Polymorphismen und Langzeitüberleben bei ALL.....</b>	<b>62</b>
5.3.1	<i>GSTM1</i> .....	62
5.3.1.1	BVZ-ALL.....	62
5.3.1.2	T-ALL.....	62
5.3.2	<i>GSTT1</i> .....	62
5.3.2.1	BVZ-ALL.....	62
5.3.2.2	T-ALL.....	63
5.3.3	<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> .....	63
5.3.3.1	BVZ-ALL.....	63
5.3.3.2	T-ALL.....	64
<b>5.4</b>	<b>Bedeutung von GST in der Konjugationsreaktion mit Alkylanzien.....</b>	<b>64</b>
5.4.1	<i>GSTM1</i> .....	65
5.4.2	<i>GSTT1</i> .....	65
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>70</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Einführung

Leukämien bilden die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Sie entstehen durch maligne Transformation und klonale Expansion hämatopoetischer oder lymphatischer Zellen und deren Akkumulation primär im blutbildenden Knochenmark. Gegebenenfalls kommt es zu einer Infiltration lymphatischer Gewebe und extramedullärer Organe sowie zu einer Dissemination leukämischer Zellen ins Blut.

In Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf unterscheidet man akute und chronische Leukämien, die immunologisch entsprechend des proliferierenden Zellklons in einen myeloischen und einen lymphatischen Typ unterteilt werden.

## 1.2 Die akute lymphoblastische Leukämie

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist gekennzeichnet durch die Dysregulation einer lymphatischen Vorläuferzelle der B- oder T-Zellreihe. In der Folge kommt es zu einem Reifungsstopp und zu einer unkontrollierten Proliferation des Zellklons.

### 1.2.1 Epidemiologie

Die ALL bildet mit 25-30% die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter und macht etwa 75% aller Leukämien in dieser Altersgruppe aus.<sup>1-4</sup> Bei einer Inzidenz von 31 pro 1 Millionen Kinder liegt der Erkrankungsgipfel im vierten Lebensjahr. Zwar kann in 70 – 80% der Fälle ein 5-jähriges ereignisfreies Überleben (*probability of event-free survival*, pEFS) erreicht werden,<sup>5-26</sup> jedoch entwickeln trotz intensiver Chemotherapie 20 bis 30% der Patienten Therapieresistenzen und/oder rezidivieren.<sup>2,10,27,28</sup>

### 1.2.2 Ätiologie

Risikofaktoren für die Entstehung der ALL scheinen im Zusammenspiel von Umwelt- sowie endogenen und genetischen Faktoren zu liegen. Atombombenexplosionen in Hiroshima und Nagasaki sowie Reaktorunfälle wie in Tschernobyl haben gezeigt, dass das Auftreten von Leukämien durch radioaktive Strahlung begünstigt werden kann.<sup>29,30</sup> Neben therapeutischer Strahlenbehandlung und diagnostischer Röntgenstrahlenbelastung bei Schwangeren<sup>31,32</sup> erhöht auch eine Strahlentherapie im Kindesalter das Erkrankungsrisiko für Leukämien.<sup>33-35</sup> Die Entstehung von Leukämien kann zudem durch Pestizide<sup>36</sup> und andere Chemikalien wie Kohlenwasserstoffe,<sup>37</sup> aber auch durch Viren, beispielsweise das Epstein-Barr-Virus, gefördert werden.<sup>38</sup> Es gibt Hinweise, dass bei beruflicher Benzol-Exposition der Eltern sowie in In-

dustriegebieten ein erhöhtes Leukämierisiko für Kinder besteht.<sup>39</sup> Auch kann der Einsatz von Zytostatika, insbesondere alkylierender Substanzen und Epipodophyllotoxinen, bei malignen Erkrankungen im Kindesalter das Risiko, im längerfristigen Verlauf an einer Leukämie zu erkranken, erhöhen.<sup>35,40,41</sup> Sasco et al. berichten, dass sowohl das Rauchen der Mütter während der Schwangerschaft als auch der Väter vor der Geburt (wahrscheinlich durch eine genetische Schädigung von Spermazellen) mit einem erhöhten Risiko insbesondere für akute Leukämien und Lymphome bei Kindern einhergeht.<sup>42</sup> Kinder mit Down-Syndrom sind einem deutlich gesteigerten Risiko für ALL ausgesetzt.<sup>43,44</sup>

### **1.2.3 Prognose-Parameter der ALL**

Nach dem Protokoll ALL-BFM 2000 der Berlin-Frankfurt-Münster (BFM)-Gruppe werden die Patienten in die Risikogruppen SR (Standardrisiko), MR (mittleres Risiko) und HR (hohes Risiko) eingeteilt.<sup>45,46</sup> Die Risikostratifizierung richtet sich in erster Linie nach dem Ansprechen auf die Chemotherapie. Mittels der Erfassung klonspezifischer Rekombinationen in T-Zell-Rezeptor- und Immunglobulingenen anhand klonspezifischer DNA-Sonden als Nachweis einer minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) kann die Dynamik des Ansprechens der Leukämie auf die Therapie in der Induktionsphase quantitativ beurteilt werden.<sup>46-52</sup> Ein MRD-positiver Befund liegt bei einem Nachweis von mindestens einer Leukämiezelle pro 1000 normaler Zellen ( $\geq 10^{-3}$ ) vor, während  $< 10^{-3}$  Leukämiezellen als negativer MRD-Befund gewertet werden. Ein weiteres Stratifizierungsmerkmal bildet das Ansprechen auf Prednison (*prednisone response*). Dieses wird durch die Messung von Blasten im peripheren Blutbild an Tag 8 nach sieben Tagen Prednison-Vorphase und intrathekaler Applikation von Methotrexat an Tag 1 bestimmt. Während in der Studie ALL-BFM 2000 neben Alter und Leukozytenzahl bei Diagnose auch die T-Immunologie nicht mehr als Stratifizierungsmerkmal gilt, wird diese zur Indikationsstellung von Stammzelltransplantation und Schädelbestrahlung weiterhin herangezogen. Von prognostischer Bedeutung ist zudem ein initialer Nachweis von mRNA der Fusionsgene *BCR/ABL*, *MLL/AF4*, *TEL/AML1* und *E2A/PBX* mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) für die Beurteilung des Therapieerfolges.

#### **1.2.3.1 Positiv prädiktive Faktoren**

Prognostische Faktoren der ALL lassen sich in Patienten-, Krankheits- und Therapieassoziierte Faktoren unterteilen.<sup>27</sup> Dabei zählen zu erstgenannten Faktoren sowohl Alter und Geschlecht als auch die Zugehörigkeit zu verschiedenen ethnischen Gruppen. Ein Alter von

ein bis neun Jahren bei Diagnosestellung, weibliches Geschlecht und kaukasische oder asiatische Volkszugehörigkeit gelten als positiv prädiktive Faktoren der ALL. Krankheitsassoziierte Faktoren wie eine Leukozytenzahl  $< 50.000/\mu\text{l}$  (*white blood cells*, WBC), ein DNA-Index  $> 1,16$  sowie ein hyperdiploider Chromosomensatz von  $> 50$  pro Leukämiezelle werden als prognostisch günstige Merkmale beschrieben. Zu diesen Faktoren gehören zudem die Trisomien 4, 10 und 17 sowie der Nachweis des Fusionsgens *TEL/AML1*.<sup>53,54</sup> Bezüglich der Immunphänotypen der ALL wird die B-Vorläuferzell (BVZ)-ALL mit der besten Prognose assoziiert. In Hinblick auf die Therapie gilt der Nachweis von  $< 1000$  Blasten/ $\mu\text{l}$  Blut an Tag 8 nach sieben Tagen Prednison-Vorphase mit Methotrexat intrathekal an Tag 1 als weiterer wichtiger positiv prädiktiver Faktor zur Beurteilung des *in vivo* Therapieerfolges (gute Prednison-Antwort, *prednisone good response*). Zudem sprechen auch ein blastenfreier Liquor sowie ein negativer MRD-Befund (siehe Kapitel 1.2.3) für einen günstigen Krankheitsverlauf.

### 1.2.3.2 Negativ prädiktive Faktoren

Ein Alter von  $< 1$  Jahr<sup>55</sup> bzw.  $> 9$  Jahren bei Diagnosestellung sowie männliches Geschlecht gelten als negative prognostische Faktoren der ALL.<sup>27,53,56</sup> Krankheitsassoziiert stellen WBC  $> 50.000/\mu\text{l}$ , Infiltration extramedullärer Organe, insbesondere des ZNS, durch leukämische Zellen sowie hypoploider Chromosomensatz  $< 45$  in Blasten Kriterien einer schlechteren Prognose dar.<sup>53</sup> Hinsichtlich zytogenetischer Merkmale gilt der Nachweis der Fusionsgene *BCR/ABL* (chromosomale Translokation t(9;22) (Philadelphia-Chromosom)),<sup>7,55,57</sup> *MLL/AF4* (Translokation t(4;11))<sup>58,59</sup> und *E2A/PBX* (Translokation t(1;19)),<sup>60</sup> immunphänotypisch das Vorliegen einer T-Zell-ALL als prognostisch ungünstiger Faktor.<sup>27,53,61</sup> Betrachtet man das Ansprechen auf die Therapie, so ist bei einem Nachweis von  $> 1000$  Leukämiezellen/ $\mu\text{l}$  Blut an Tag 8 nach siebentägiger Prednison-Vorphase mit Methotrexat intrathekal an Tag 1 (schlechte Prednison-Antwort, *prednisone poor response*)<sup>55</sup> sowie positivem MRD-Befund (siehe Kapitel 1.2.3) von einer eher schlechteren Prognose auszugehen.

### 1.2.4 ALL-Rezidive

Trotz stetiger Optimierungen in der ALL-Therapie treten bei 20-30% der Patienten Rezidive auf.<sup>10,27,28,62,63</sup> Die im Vergleich zur Ersterkrankung deutlich schlechtere Langzeitprognose lässt sich insbesondere durch drei Merkmale beurteilen:

1. Zeitpunkt des Rezidivs (siehe Tabelle 1)<sup>64</sup>
2. Manifestationsort des Rezidivs<sup>64-66</sup>
3. Immunphänotyp des Rezidivs (T-ALL vs. non-T-ALL)<sup>65,67</sup>

Das Auftreten von Rezidiven im Rahmen der Remissionsinduktionstherapie (sehr frühe Rezidive) oder innerhalb von sechs Monaten nach Therapieende (frühe Rezidive) ist bei einem Langzeitüberleben von 10 bis 20% mit der schlechtesten Prognose assoziiert.<sup>63,68,69</sup> Hingegen sprechen späte Knochenmark (KM)-Rezidive, welche die Zeitspanne von sechs Monaten nach Therapieabschluss überschreiten, mit einem Langzeitüberleben von 30-40% für eine günstigere Prognose.<sup>70,71</sup>

Tabelle 1: Definition der Zeitpunkte des ALL-Erstrezidivs (ALL-REZ BFM)

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

\* Für den seltenen Fall, dass das Ende der Ersttherapie (i.d.R. Ende der vorangegangenen Dauertherapie) ≥ 6 Monate und die Erstdiagnose < 18 Monate her ist (z.B. nach Therapieabbruch oder nach B-NHL-Therapie), ist der Rezidivzeitpunkt als spät zu definieren.

Gaynon et al. berichten, dass Patienten mit isoliertem Hodenrezidiv eine deutlich bessere Wahrscheinlichkeit des Überlebens haben als solche mit isoliertem ZNS-Rezidiv. Bei isoliertem KM-Rezidiv ist die Prognose noch schlechter.<sup>64</sup>

Je nach Lokalisation und Zeitpunkt des Rezidivs werden Patienten im aktuellen Protokoll der BFM-Studiengruppe zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit einem ALL-Rezidiv (ALL-REZ BFM) in nachfolgend definierte Strategiegruppen (S1 bis S4) eingeteilt (Tabelle 2). Dabei wird bei Strategiegruppe 1 (S1) von einem niedrigen, bei Strategiegruppe 2 (S2) von einem intermediären Rezidivrisiko ausgegangen, während Strategiegruppen 3 und 4 (S3, S4) als Hochrisikogruppen eingestuft werden.

In Hinblick auf die pEFS bestehen deutliche Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Strategiegruppen als auch innerhalb dieser Gruppen. Dabei lassen sich die meisten Kinder mit ALL-Rezidiv der Strategiegruppe 2 zuordnen, welche anhand zusätzlicher klinischer Parameter (Ort und Zeitpunkt des Rezidivs, periphere Blastenzahl (*peripheral blast cells*, PBC) und *BCR/ABL*-Positivität) in die Subgruppen S2A, S2B, S2C und S2D unterteilt ist.

Tabelle 2: Definition der Strategiegruppen S1 bis S4 (ALL-REZ BFM)

Immunphänotyp	non-T-ALL			(prä-) T-ALL		
Lokalisation	EM isoliert	KM kombiniert	KM isoliert	EM isoliert	KM kombiniert	KM isoliert
Zeitpunkt						
sehr früh	S2	S4	S4	S2	S4	S4
früh	S2	S2	S3	S2	S4	S4
spät	S1	S2	S2	S1	S4	S4

EM = extramedullär      KM = Knochenmark

Zur Prognoseeinschätzung wird neben dem Zeitpunkt des Rezidivs und der PBC der Nachweis einer minimalen Resterkrankung (siehe Kapitel 1.2.3) an Tag 36 der Rezidivtherapie herangezogen. Ein negativer MRD-Befund ist mit einer pEFS von 86% assoziiert, während ein positiver MRD-Befund eine pEFS von 0% zur Folge hat.<sup>72</sup> Zudem sind die Fusionsgene *BCR/ABL*, *MLL/AF4*, *MLL/AF9* und *MLL/ANL* sowie *TEL/AML1* bei ALL-Rezidiven von prognostischer Bedeutung. Der Nachweis der drei erstgenannten ist mit einer schlechteren Prognose verbunden.<sup>57</sup> Heilungschancen sind bei *BCR/ABL*-positivem Befund lediglich mit intensivierter Polychemotherapie zur Remissionsinduktion und anschließender allogener Stammzelltransplantation (SZT) zu erwarten.<sup>57</sup> Im Gegensatz dazu ist der Nachweis von *TEL/AML1* bei in der Regel gutem Ansprechen auf eine erneute Chemotherapie mit einer guten Heilungschance verbunden.<sup>73-75</sup>

Eine besondere therapeutische Herausforderung stellt die bei ALL-Rezidiven im Vergleich zur Ersterkrankung höhere Resistenz der Leukämiezellen gegenüber Glukokortikoiden und Zytostatika (Anthrazykline, Thiopurine) sowie L-Asparaginase dar.<sup>76,77</sup> Dies erfordert nicht nur eine Intensivierung der Polychemotherapie, sondern auch einen vermehrten Einsatz von SZT, welche mit einer höheren Rate an Morbidität und Mortalität als die konventionelle Chemotherapie assoziiert sind. In Anbetracht der schlechten Prognose bei sehr frühen KM-Rezidiven ist eine allogene SZT in diesem Falle am ehesten von Nutzen. Hingegen kann bei Patienten mit späten insbesondere isoliert extramedullär auftretenden Rezidiven mittels alleiniger Chemotherapie eine Verbesserung der Prognose erreicht werden.<sup>78</sup>

### 1.2.5 ALL-Therapie

Im Rahmen der ALL-Therapie kommen sowohl bei Ersterkrankungen als auch bei Rezidiven Kombinationen mehrerer Chemotherapeutika zum Einsatz. Diese beinhalten neben

Glukokortikoiden und Asparaginase zahlreiche Zytostatika verschiedener Substanzgruppen: Alkylanzien, Anthrazykline, Vinca-Alkaloide, Folsäureantagonisten, Purin- und Pyrimidinanaloga sowie Etoposid. Nachfolgend soll in Anlehnung an das Therapieprotokoll ALL-REZ 2002 der BFM-Gruppe auf die einzelnen Wirkstoffgruppen näher eingegangen werden.

#### **1.2.5.1 Glukokortikoide**

Kennzeichnend für diese Substanzgruppe ist ihre immunsuppressive, antiphlogistische und ulzerogene Wirkung. Diese resultiert aus der Hemmung der Arachidonsäure-Freisetzung als Ausgangssubstanz für Leukotriene und Prostaglandine mittels Blockade des Enzyms Phospholipase 2. Bei der ALL-Therapie kommen Dexamethason und Prednison zum Einsatz. Erstgenanntes bindet im Vergleich zu anderen Substanzen aus dieser Gruppe mit höherer Affinität an Glukokortikoid-Rezeptoren lymphoblastischer Zellen. Folgen sind Komplexbildung, Translokation in den Zellkern und schließlich Apoptose der Leukämiezellen.

#### **1.2.5.2 Asparaginase**

Dieses Enzym wird von den Bakterien *Escherichia coli* und *Erwinia chrysanthemi* produziert und katalysiert die Spaltung der Aminosäuren Asparagin in Asparaginsäure und Ammonium sowie Glutamin in Glutamat und Ammonium. Ziel ist es den lymphoblastischen Leukämiezellen durch Asparagin-Depletion im Serum diese für sie essenzielle Aminosäure zu entziehen. Daraus resultiert für Organe mit hoher Protein-Syntheserate wie Leber und Pankreas trotz möglicher Asparagin-Synthese in Zellen des menschlichen Körpers ein relativer Mangel an Asparagin. Asparaginase greift in die S-Phase des Zellzyklus ein.

#### **1.2.5.3 Zytostatika**

##### **1.2.5.3.1 Alkylanzien**

Wichtige Vertreter dieser Wirkstoffgruppe bilden die Stickstoff-Lost-Derivate Cyclophosphamid und Ifosfamid aus der Gruppe der Oxazaphosphorine. Beide Substanzen liegen als nahezu unwirksame *prodrugs* vor, ihre zytostatische Wirkung wird erst durch Metabolisierung mittels Enzymen der Cytochrom-P450-Gruppe in der Leber entfaltet. Die entstehenden Metabolite können kovalente Verbindungen mit DNA oder Proteinen eingehen. Es kommt zu Vernetzung und Spaltung von DNA-Strängen (*cross-links*) sowie zu einer Bildung abnormer Basenpaare, letztlich ist eine Hemmung der DNA-Replikation und Transkription die Folge.

Die zytotoxische Wirkung von Cyclophosphamid kommt in der S-Phase, diejenige von Ifosfamid hingegen in der G2-Phase des Zellzyklus zum Tragen. Acrolein, ein Metabolit von Cyclophosphamid, wirkt urotoxisch.

#### **1.2.5.3.2 Anthrazykline**

Zytotoxische Antibiotika dieser Wirkstoffgruppe wie Daunorubicin und Idarubicin werden aus Streptomyces-Arten isoliert. Ihr Einsatz als Zytostatika beruht auf mehreren Wirkungsmechanismen. Interkalation in die doppelsträngige DNA führt zum Abbruch der Nukleinsäuresynthese, während durch Inhibition des Enzyms Topoisomerase II eine Entwindung und Trennung der DNA-Stränge als wichtige Voraussetzung für die DNA-Replikation sowie die Reparatur von DNA-Strangbrüchen behindert wird. Doppelstrangbrüche können durch in der Leber gebildete aktive Metabolite (Semichinonradikale) und zytotoxische Superoxide, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale ausgelöst werden.

Akute und chronische häufig irreversible Kardiotoxizität mit Kardiomyopathie als limitierende Nebenwirkung für den Einsatz von Anthrazyklinen sind am ehesten auf die Bildung der genannten Radikale zurückzuführen, wobei eine Korrelation mit der applizierten Gesamtdosis besteht.

#### **1.2.5.3.3 Vinca-Alkaloide**

Die Wirkung der Vinca-Alkaloide (Vincristin, Vindesin) beruht auf einer Blockade der Mitose durch Bindung an Tubulin. Substanzen dieser Wirkstoffgruppe behindern sowohl DNA- als auch RNA-Synthese.

#### **1.2.5.3.4 Folsäureantagonisten**

Als Beispiel sei hier Methotrexat genannt, das als Antimetabolit spezifisch und reversibel das Enzym Dihydrofolatreduktase inhibiert. Die dadurch gestörte Purinnukleotidsynthese führt schließlich zu einer verminderten Synthese von DNA und RNA. Bei Auftreten von Nebenwirkungen wie Mukositis und Dermatitis sowie Nephro- und Hepatotoxizität kann Methotrexat durch Tetrahydrofolsäure antagonisiert werden.

#### **1.2.5.3.5 Purinanaloga**

Purinanaloga wie Thioguanin und 6-Mercaptopurin sind Antimetabolite und werden durch das Enzym Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase in Triphosphatnukleotide umgewandelt. Deren Einbau in die DNA zieht nicht nur Strangbrüche, sondern auch Abbrüche der DNA-

Neusynthese nach sich, wobei die zytotoxische Wirkung in der G1- und S-Phase des Zellzyklus auftritt. Die durch Substanzen dieser Gruppe auslösbare Myelosuppression ist dosislimitierend.

### 1.2.5.3.6 Pyrimidinanaloga

Als Beispiel für die zur Gruppe der Antimetabolite gehörenden Pyrimidinanaloga sei hier Cytarabin genannt, welches insbesondere in der G1-Phase des Zellzyklus zytotoxisch wirkt. Mittels Phosphorylierung wird es in seine aktive Form (Cytosinarabinosidtriphosphat) umgewandelt und während der DNA-Replikation anstelle des Nukleotids Cytosintriphosphat als „falsche“ Base in die DNA eingebaut. Es kommt zu Strangbrüchen, zudem wird die Pyrimidinsynthese gehemmt.

### 1.2.5.3.7 Etoposid

Etoposid, ein Derivat des Epipodophyllotoxins aus dem Maiapfel (*Podophyllum peltatum*), hemmt die Zellteilung in der prämitotischen Phase. Seine zytotoxische Wirkung entfaltet es in der späten S- oder in der frühen G2-Phase. Durch Induktion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA wird die Zytotoxizität dieser Substanz zusätzlich verstärkt. Als Inhibitor der Topoisomerase II hemmt Etoposid die DNA-Reparatur.

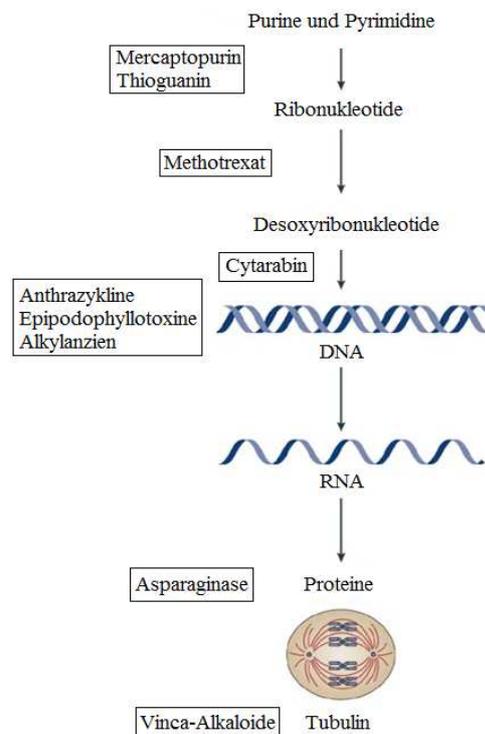


Abbildung 1: Wirkorte von Zytostatika der ALL-Therapie in Phasen des Zellzyklus nach Pui et al.<sup>79</sup>

### 1.3 Polymorphismen Arzneimittel-metabolisierender Enzymsysteme

Im Hinblick auf Effektivität und Toxizität der beschriebenen Chemotherapeutika im Rahmen risikoadaptierter Behandlungsprotokolle bei der Therapie der ALL zeigen sich bedeutende interindividuelle Unterschiede. Einen Erklärungsansatz für diese Wirkungsvariabilität stellt die individuell unterschiedliche Metabolisierung von Medikamenten mit Hilfe Arzneimittel-metabolisierender Enzymsysteme (*drug-metabolizing systems*, DMS) dar.<sup>80-84</sup> Genetische Varianten dieser DMS kommen durch Basenaustausch in dem entsprechenden kodierenden Gen zustande. Tritt eine Variante mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent in der Bevölkerung auf, so spricht man von einem Polymorphismus (*single nucleotid polymorphism*, SNP). Im Gegensatz dazu werden Allelfrequenzen von unter einem Prozent als Mutationen bezeichnet.<sup>85</sup>

Veränderungen des Substratstoffwechsels werden durch Polymorphismen der DMS verursacht. Jene, die mit einer geringeren Aktivierung oder einem Funktionsverlust des Enzyms einhergehen, führen zu einer verlangsamten Elimination und somit Akkumulation des jeweiligen Substrates. In der Folge kommt es zu verlängerter Wirkung oder vermehrt auftretenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen, bei Medikamenten, deren Wirkung erst nach Metabolisierung zum Tragen kommt (*prodrugs*), gegebenenfalls zum vollständigen Wirkungsverlust. Phänotypisch werden homozygote Träger solcher Polymorphismen als langsame Metabolisierer (*poor metabolizer*, PM) von Individuen mit ultra-schnellem Metabolismus (*ultra-rapid metabolizer*, UM) infolge einer Genduplikation unterschieden.

#### 1.3.1 Assoziation hereditärer Polymorphismen von DMS mit Krebsrisiko

Ein Zusammenhang zwischen hereditären Polymorphismen der DMS Cytochrom P450 (CYP) 1A1, Glutathion-S-Transferase (GST), Thiopurin-Methyltransferase (TPMT) und/oder N-Acetyltransferase (NAT) 2 und dem Entstehungsrisiko von Neoplasien des Gehirns, der Lunge, Harnblase, Cervix und Mamma sowie des Gastrointestinaltraktes und Hals-Nasen-Ohren-Bereiches ist in verschiedenen Studien beschrieben worden.<sup>86-115</sup>

Bezüglich des Myelodysplastischen Syndroms (MDS) liegen widersprüchliche Untersuchungen vor. So wird *GSTT1* in der Studie von Chen et al. mit einem erhöhten MDS-Risiko assoziiert<sup>116</sup>, während Davies et al. diesen Zusammenhang nicht bestätigen konnten.<sup>117</sup>

Im Hinblick auf die Leukämogenese im Kindesalter werden bestimmte Genotypen von *CYP1A1*, *GSTM1* und *GSTT1* mit einem erhöhten ALL-Risiko in Zusammenhang gebracht.<sup>3,118-120</sup> Dabei sind sowohl einzelne als auch die Kombination mehrerer Polymor-

phismen mit entsprechend additiver Wirkung von entscheidender Bedeutung für eine Zunahme der ALL- Erkrankungswahrscheinlichkeit.

### 1.3.2 Phase I-/II-Enzyme

Je nach Wirkmechanismus lassen sich DMS den Phase-I- bzw. Phase-II-Enzymen zuordnen. Die Wirkung erstgenannter, wie beispielsweise der Isoenzyme des CYP 450-Familie, ist durch Aktivierung von Medikamenten oder Karzinogenen mittels Einführung einer funktionellen Gruppe am Substrat durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse gekennzeichnet. Phase-II-Enzyme vermögen anhand von Glukoronidierung, Acetylierung, Sulfatierung oder Konjugation von Glutathion hydrophile und damit renal eliminierbare Verbindungen herzustellen.<sup>121</sup> Als Beispiele seien hier neben Isoenzymen von NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase I (NQO1), TPMT, Epoxidhydrolase und NAT jene der GST genannt, welche im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet werden sollen.

## 1.4 Glutathion-S-Transferasen

Glutathion-S-Transferasen (GST) sind Phase II-Enzyme, welche durch Konjugation mit Glutathion die Inaktivierung verschiedener hydrophober und elektrophiler endo- und exogener Substrate katalysieren.<sup>27,122-130</sup> Dazu gehören u.a. Organophosphate, Epoxide und polyzyklische Kohlenwasserstoffe.<sup>117,131</sup> GST sind unmittelbar an dem Metabolismus antileukämischer Substanzen und deren Metabolite wie Alkylanzien (z.B. Cyclophosphamid), Etoposid, Doxorubicin, Anthrazykline und Steroide beteiligt<sup>1,27,120,132-134</sup> und schützen vor oxidativem Stress.<sup>129,135</sup> Somit können GST-vermittelte Stoffwechselfvorgänge sowohl eine protektive Wirkung haben als auch zur Entstehung mutagener und karzinogener Substanzen führen.

Lösliche GST mit dimerer Struktur werden sieben Klassen zugeordnet: alpha ( $\alpha$ ), mu ( $\mu$ ), pi ( $\pi$ ), theta ( $\theta$ ), zeta ( $\zeta$ ), omega ( $\omega$ ) und sigma ( $\sigma$ ).<sup>136</sup>

Innerhalb dieser Klassen erfolgt mittels arabischer Zahlen die weitere Unterteilung in Unterheiten nach der Reihenfolge ihrer Beschreibung.<sup>136-138</sup> In dieser Arbeit sind GST der  $\mu$ - sowie der  $\theta$ -Klasse Gegenstand der Untersuchungen.

### 1.4.1 Polymorphismen der GST

Polymorphismen sind sowohl für die GST der  $\mu$ - (*GSTM1*) als auch für jene der  $\theta$ -Klasse (*GSTT1*) beschrieben. Dabei ist das Fehlen der Enzymaktivität in beiden Fällen auf eine homozygot vererbte Gendelektion (Nullgenotyp) zurückzuführen.<sup>108,117,120,139,140</sup> Folge der feh-

lenden Enzymfunktion ist eine Akkumulation kanzerogener Substrate im Körper mit erhöhtem Erkrankungsrisiko für verschiedene Karzinome (s.u. 1.4.1.1.4 und 1.4.1.2.4).

### **1.4.1.1 GST $\mu$**

#### **1.4.1.1.1 Gen**

Das kodierende Gen für *GSTM1* ist auf Chromosom 1p13.3 lokalisiert.<sup>108,141-143</sup> Folgende Allelvarianten sind bisher bekannt: das Wildtypallel (*GSTM1\*1*), die *GSTM1*-Deletion (Nullgenotyp, *GSTM1\*0*) sowie *GSTM1\*A* und *GSTM1\*B*. Letztere unterscheiden sich durch eine C→G-Substitution an Basenposition 534, welche den Austausch von Lysin durch Asparagin an Kodon 172 zur Folge hat.<sup>108,139,144</sup>

#### **1.4.1.1.2 Frequenz**

*GSTM1\*0\*0* kommt bei 38-67% der kaukasischen, 33 bis 63% der ostasiatischen und 22 bis 35% der afrikanischen und afro-amerikanischen Ethnien vor.<sup>108,134</sup>

#### **1.4.1.1.3 Fremdstoff-Metabolisierung**

Die Entgiftung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff-Epoxid-Verbindungen, wie z.B. Metabolite von Benzpyren,<sup>127</sup> alkylierenden Nitrosharnstoffderivaten, z.B. Bis-Chlorethyl-Nitrosurea (BCNU),<sup>145</sup> und Arylaminen wird durch *GSTM1* entscheidend vermittelt. Zudem ist *GSTM1* an der Metabolisierung von Alkylanzien wie Cyclophosphamid beteiligt.<sup>133,146-149</sup>

#### **1.4.1.1.4 Assoziation zu Erkrankungen**

Epidemiologische Studien zeigen eine Assoziation zwischen *GSTM1\*0\*0* und dem Risiko, an Lungen-,<sup>86-90,113,115</sup> Larynx-<sup>91</sup> und Harnblasen- bzw. Urothelkarzinomen,<sup>89,92-95,150</sup> häufig in Kombination mit Zigarettenrauch,<sup>89,93,95,96,110</sup> Adenokarzinomen des Kolons<sup>97,98</sup> und Magens,<sup>98</sup> malignen Melanomen<sup>99</sup> und Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches<sup>100</sup> zu erkranken.

Die Untersuchungen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen Polymorphismen der GST und MDS sowie akuten Leukämien zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Während Tsabouri et al. von einem signifikanten Effekt von *GSTM1\*0\*0* auf das MDS-Risiko ausgehen,<sup>151</sup> konnte in anderen Studien eine Assoziation weder für *GSTM1\*0\*0* allein<sup>116,152,153</sup> noch für die Kombination aus *GSTM1\*0\*0* und *GSTT1\*0\*0* als Doppelnullegenotyp<sup>154</sup> belegt werden. Haase et al. fanden bei Patienten mit MDS/akuter myeloischer Leukämie (AML) nach

Chemo- und/oder Radiotherapie zur Behandlung eines Mamma-Karzinoms ein gehäuftes Auftreten des Doppelnullegenotyps.<sup>154</sup>

Für AML ist im Vergleich zu ALL eine gesteigerte Expression von GST der  $\mu$ -Klasse beschrieben,<sup>155</sup> wobei *GSTM1*\*0/\*0 bei AML sowohl im Kindesalter<sup>156</sup> als auch bei Erwachsenen, isoliert oder als Doppelnullegenotyp mit *GSTT1*\*0/\*0,<sup>157</sup> einen signifikanten Risikofaktor darstellt. Im Gegensatz dazu konnte diese Assoziation in anderen Studien nicht festgestellt werden.<sup>152,154,158-160</sup>

Ein im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen gehäuftes Auftreten von *GSTM1*\*0/\*0 bei Patienten mit ALL ist mehrfach beschrieben worden, wobei ein damit verbundenes erhöhtes Risiko an ALL zu erkranken angenommen wird.<sup>4,118,119,155,161</sup> Bei gleichzeitigem Vorhandensein von *GSTM1*\*0/\*0 und *CYP1A1m1*<sup>162</sup> oder *Cyp1A1*\*2A<sup>119</sup> und/oder *NAT2*<sup>4</sup> steigt dieses Risiko zusätzlich an. Für die Kombination aus *GSTM1*\*0/\*0 und *GSTP1*\*B ist ebenfalls ein erhöhtes ALL-Risiko beschrieben worden.<sup>163</sup> Chen et al. fanden eine signifikant erhöhte Frequenz des Doppelnullegenotyps (*GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0) bei afro-amerikanischen Kindern mit ALL, jedoch konnten diese Genotypen bei Kaukasiern nicht mit einem gesteigerten ALL-Risiko in Zusammenhang gebracht werden.<sup>120</sup> Auch in anderen Studien konnte diese Assoziation nicht nachgewiesen werden.<sup>3,117,156,164</sup> In einer Untersuchung an japanischen Kindern zeigte sich eine niedrigere Frequenz von *GSTM1*\*0/\*0 bei ALL-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe.<sup>165</sup> Barnette et al. fanden ein erhöhtes ALL-Risiko bei Kindern mit *non-GSTM1*\*0/\*0.<sup>166</sup>

Hinsichtlich der Heilungschancen bei ALL kann *GSTM1*\*0/\*0 sowohl mit einem reduzierten<sup>167,168</sup> als auch mit einem erhöhten Rezidivrisiko für frühe Rezidive (< 30 Monate nach Therapiebeginn) bei Kombination mit *GSTT1*\*0/\*0 als Doppelnullegenotyp<sup>165</sup> assoziiert sein. Eine Tendenz zu einem reduziertem Auftreten von ZNS-Rezidiven bei Nachweis von *GSTM1*\*0/\*0 konnte von Chen et al. gezeigt werden.<sup>120</sup> Rocha et al. beschreiben ein vermehrtes Auftreten von hämatologischen Rezidiven bei ALL-Patienten mit *non-GSTM1*\*0/\*0, welches bei Anwesenheit der TYMS 3/3-Genotyps noch gesteigert wird.<sup>135</sup> Ein verringertes Rezidiv-freies Überleben von Kindern mit ALL, deren Blasten GST $\mu$ -positiv sind, ist von Hall et al. demonstriert worden.<sup>132</sup>

In anderen Untersuchungen konnte keine Korrelation zwischen *GSTM1*\*0/\*0 und Rezidivrisiko<sup>120,169</sup> bzw. Heilungschancen (*outcome*)<sup>1,117,120,169</sup> bei Patienten mit ALL festgestellt werden.

## 1.4.1.2 GST $\theta$

### 1.4.1.2.1 Gen

Das kodierende Gen für GSTT1 liegt auf Chromosom 22q11.2.<sup>170</sup> Entsprechend GSTM1 wird das Wildtypallel als *GSTT1\*1* bezeichnet, die *GSTT1*-Deletion (Nullgenotyp) als *GSTT1\*0*.<sup>108,142</sup>

### 1.4.1.2.2 Frequenz

Bei Kaukasiern ist der Genotyp *GSTT1\*0/\*0* mit einer Frequenz von 11 bis 18% deutlich seltener als *GSTM1\*0/\*0* nachweisbar, während dieser bei der ostasiatischen Bevölkerung mit 16 bis 58% und bei Afrikanern und Afro-Amerikanern mit 24 bis 38% ähnliche Frequenzen wie *GSTM1\*0/\*0* zeigt.<sup>108,134</sup>

### 1.4.1.2.3 Fremdstoff-Metabolisierung

GSTT1 katalysiert den Abbau von Halomethanen, z.B. Methylbromid, Dihalomethanen, 1-Butadien, Ethylenoxid und Alkylanzien.<sup>171, 172</sup> Dabei führen Veränderungen der DNA vorwiegend zu einer Störung der DNA-Replikation und –Transkription in sich schnell-teilenden, proliferierenden Zellen. Bei Vorliegen von *GSTT1\*0/\*0* können die Metabolite dieser mutagenen und kanzerogenen Substanzen nur eingeschränkt metabolisiert werden.<sup>140</sup> Hingegen kann es durch GSTT1-vermittelte Glutathion-Konjugation zur Entstehung toxischer Metabolite wie z.B. Dichlormethan und –ethan kommen.<sup>173,174</sup>

### 1.4.1.2.4 Assoziation zu Erkrankungen

Auch für *GSTT1\*0/\*0* ist ein erhöhtes Risiko für kolorektale,<sup>102,103</sup> Magen-,<sup>101</sup> Lungen-<sup>90</sup> und Harnblasenkarzinome,<sup>89,96,104,110</sup> darüber hinaus für Nierenzellkarzinome,<sup>105</sup> Astrozytome<sup>106</sup> und Oligodendrogliome<sup>107</sup> beschrieben worden.

Bei Patienten mit MDS fand sich im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Frequenz von *GSTT1\*0/\*0*, wobei von einem erhöhten MDS-Erkrankungsrisiko ausgegangen wird.<sup>116,175</sup> In anderen Studien konnte diese Assoziation nicht nachgewiesen werden.<sup>153,158,176</sup>

Auch hinsichtlich der AML liegen keine einheitlichen Ergebnisse vor. Während ein gesteigerter Nachweis von *GSTT1\*0/\*0*, auch in Kombination mit *GSTM1\*0/\*0*, bei Erwachsenen mit AML<sup>157</sup> sowie ein reduziertes Langzeitüberleben<sup>131</sup> beschrieben worden sind, könnte der Nullgenotyp bei Kindern auch mit einem reduzierten AML-Risiko einhergehen.<sup>164</sup> Basu et al. und Crump et al. fanden keine Assoziation zwischen *GSTT1\*0/\*0* und AML-Risiko.<sup>158,159</sup>

Wie bereits unter Abschnitt 1.4.1.1.4 genannt, konnte ein gehäuftes Vorkommen von *GSTT1*\*0/\*0 in Kombination mit *GSTMI*\*0/\*0 als Doppelnullegenotyp bei afro-amerikanischen Kindern mit ALL festgestellt werden,<sup>120</sup> eine Assoziation zwischen Doppelnullegenotyp<sup>117</sup> bzw. isoliertem *GSTT1*\*0/\*0 und erhöhtem Risiko, an einer ALL zu erkranken, fand sich jedoch nicht.<sup>3,117,120</sup> Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien sowohl ein geringeres<sup>166,168</sup> als auch ein erhöhtes ALL-Risiko ermittelt.<sup>177</sup>

Eine Reduktion des Rezidivrisikos von ALL-Patienten mit *GSTT1*\*0/\*0 konnte gezeigt werden.<sup>134,167,168</sup> Die Kombination mit weiteren GST-Genotypen (*GSTMI*\*0/\*0 und *GSTP1* an Kodon 105) verringerte das Risiko zusätzlich.<sup>168</sup> Hingegen war der Doppelnullegenotyp *GSTT1*\*0/\*0 / *GSTMI*\*0/\*0 (s.u. 1.4.1.1.4) mit einem deutlich erhöhten Risiko für frühe Rezidive assoziiert.<sup>165</sup> Andere Studien ergaben keinen Zusammenhang zwischen Rezidivrisiko<sup>1,4,117,120,156</sup> bzw. Heilungschancen (*outcome*)<sup>117,120</sup> und *GSTT1*\*0/\*0.

## 2. FRAGESTELLUNG

Glutathion-S-Transferasen (GST) nehmen als Fremdstoff-metabolisierende Enzyme einen entscheidenden Einfluss auf die Metabolisierung von Zytostatika im Rahmen der Polychemotherapie von Kindern mit ALL.

Polymorphismen der GST stellen einen prädisponierenden Faktor für die Entstehung verschiedener Neoplasien dar. Während sich die GST-Wirkung bei Vorliegen eines homozygoten Genotyps ohne Alleldeletion ( $GSTM1*1/*1$ ;  $GSTT1*1/*1$ ) voll entfalten kann, gehen Wildtyp ( $GSTM1*1/*0$ ;  $GSTT1*1/*0$ ) und Nullgenotyp ( $GSTM1*0/*0$ ;  $GSTT1*0/*0$ ) mit einer geringeren Aktivierung oder einem Funktionsverlust des jeweiligen Enzyms einher. Eine Akkumulation und langsamere Elimination des entsprechenden Zytostatikums und seiner Metabolite mit verlängerter Wirkung und/oder gehäuften unerwünschten Arzneimittelwirkungen sind die Folge. Handelt es sich um *prodrugs* mit Wirkungseintritt erst nach Metabolisierung, kommt es gegebenenfalls zu einem vollständigen Wirkungsverlust. Auf diesem Wege beeinflussen GST in bedeutendem Maße Detoxifizierung und Toxizität und somit auch die Effektivität der Zytostatika.

Durch Genotypisierung der GST bei Diagnosestellung könnte ein wichtiger Schritt in Richtung einer individualisierten Zytostatika-Therapie von ALL-Rezidiven im Kindesalter unternommen werden, um sich dem Ziel einer optimierten Behandlung mit maximaler Wirksamkeit bei kleinstmöglicher Toxizität anzunähern.

Unter diesem Aspekt wurden folgende Fragestellungen formuliert:

1. Wie verhält sich die Verteilung der *GST*-Genotypen bei Kindern mit ALL-Erstrezidiv im Vergleich zu Gesunden?
2. Weisen die Inzidenzen der *GST*-Polymorphismen zu verschiedenen Erkrankungszeitpunkten Unterschiede auf (Erstrezidiv im Vergleich zu Ersterkrankung)?
3. Existieren Korrelationen zwischen *GST*-Polymorphismen und klinischen Parametern bei ALL-Erstrezidiv im Kindesalter? (Zeitpunkt, Lokalisation, Immunphänotyp, Geschlecht, Blasten-/Leukozytenzahl)
4. Korreliert das Auftreten von *GST*-Polymorphismen mit der Langzeitheilung von Kindern mit ALL-Erstrezidiv?

### 3. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Patienten

Zur Bestimmung von Frequenz und Bedeutung der *GST*-Polymorphismen als Risikofaktor bei der Pathogenese der ALL und Einflussgröße auf die Therapie von ALL-Rezidiven wurden Proben von 276 Kindern mit ALL (238 Erstrezidive, 38 Ersterkrankung) und einer Kontrollgruppe aus 72 Gesunden untersucht. Leukämische Zell-DNA aus KM-Aspiraten bzw. DNA aus Leukozyten von Gesunden wurden zur molekulargenetischen Diagnostik herangezogen. Bei Nachweis eines Polymorphismus wurden die Untersuchungen zum Vergleich an somatischen mononukleären KM-Zellen zum Zeitpunkt der Remission durchgeführt. Entsprechend der Therapieoptimierungsstudien der BFM-Gruppe wurden sowohl die Kinder mit ALL-Erstrezidiv (ALL-REZ-BFM 1983-2002) als auch jene mit ALL-Ersterkrankung (ALL-BFM 1981-2000) behandelt. Bei letztgenannten erfolgte die Analyse der Polymorphismen an Proben aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum. Proben von Patienten mit ALL-Erstrezidiv wurden der Einrichtung von weiteren Kliniken für pädiatrische Onkologie/Hämatologie bundesweit zur Diagnostik zugesendet.

Die Kontrollgruppe wurde aus gesunden Labormitarbeitern und Studierenden gebildet, die bisher weder an einer neoplastischen noch einer chronischen Erkrankung gelitten hatten.

Tabelle 3: ALL-Patientenkollektiv bei Kindern mit Erstrezidiv bzw. Ersterkrankung im Vergleich zur Kontrollgruppe (ALL-REZ BFM)

		Rezidiv	Ersterkrankung	Kontrollgruppe
Immunphänotyp	BVZ	204	34	
	(prä-) T-ALL	34	4	
Gesamt		238	38	72

## 3.2 Material

### 3.2.1 Chemikalien

FMC BioProducts, Rockland, ME, USA

MDE, Gel Solution  
NuSieve GTG Agarose  
SeaKem GTG Agarose

Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Schottland

Acrylamid  
MgCl<sub>2</sub>

Sigma, Deisenhofen, Deutschland

BSA

### 3.2.2 Puffer und Lösungen

Tris-Puffer: 1 M Tris/HCl, pH 7,5

#### 3.2.2.1 DNA-Isolierung

Erythrozytenlysepuffer: 155 mM NH<sub>4</sub>Cl  
10 mM KHCO<sub>3</sub>

10 x TEN-Puffer: 200 mM Tris, pH 7,5  
25 mM EDTA  
300 mM NaCl

Proteinase K: 20 mg/ml

Phenol: 1 kg kristallines Phenol wird bei 37°C in ca. 1000 ml Aqua  
dest. gelöst, zur Einstellung des pH von 7,8 mit 0,1 M TrisCl  
ausgeschüttelt und mit Hydrocholin (1:1000, v/v) versetzt.

Chloroform/Isoamylalkohol: 24:1 (v/v)

#### 3.2.2.2 PCR

Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA

Gene Amp® 10 x PCR-Puffer

USB, Cleveland, Ohio, USA

10 x PCR-Puffer

Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

10 x PCR-Puffer

### 3.2.2.3 Elektrophorese

1 x TBE, pH 8,0:	90	mM	Tris
	90	mM	Borsäure
	2,5	mM	EDTA
1 x TAE, pH 8,0:	24,2	g	Tris-Base (TRIZMA-Base, 99,9%)
	5,71	ml	Eisessig (100%)
	10	ml	EDTA 0,5 M
	500	ml	Aqua dest.
1 x Gelladepuffer (OrangeG):	20	%	Ficoll
	10	mM	Tris, pH 7,5
	1	mg/ml	OrangeG

### 3.2.3 Enzyme

Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA

AmpliTaq® DNA-Polymerase

Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Platinum Taq DNA-Polymerase

### 3.2.4 Nukleinsäuren

Boehringer Mannheim GmbH, Heidelberg, Deutschland

Deoxynukleosid-Triphosphat-Set

BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, USA

1 Kb-DNA-Leiter

TIB Molbiol, Berlin, Deutschland

Oligonukleotide (Primer und Sonden)

### 3.2.5 Nukleinsäureextraktion

Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA

QIAquick DNA Purification System™

### 3.2.6 Filme

Polaroid Co., Cambridge, Mass., USA

Land Pack Filme Typ 667 (36 DIN)

### **3.2.7 Software**

Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca, USA

Molecular Analyst® /PC, UV Gel Documentation

Microsoft®

Office Word 2007

Office Excel 2007

SPSS Inc., Chicago, IL, USA

SPSS Statistics, Version 17.0

### **3.2.8 Geräte**

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Wide Mini-Sub® Cell (Agarosegelelektrophoresekammer)

Gel Doc 1000™ (Gel-Dokumentationssystem)

Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland

Certomat® R/Certomat® H, B. (Schüttelinkubator)

Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland

Centrifuge 5415 C

Biophotometer

Fröbel Labor Technik GmbH, Berlin, Deutschland

TFX-20M (UV-Transilluminator)

Perkin-Elmer Life Sciences, Foster City, CA, USA

Sequencer ABI Prism 377

Polaroid, Offenbach/Main, Deutschland

Polaroid CU-5 Nahaufnahme-Kamera

## **3.3 Methoden**

### **3.3.1 DNA-Isolierung**

Mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden mononukleäre Zellen aus den KM-Proben von Kindern mit ALL und aus Blutproben von Gesunden isoliert.<sup>178,179</sup> Natives Knochenmark bzw. Blut wurde entsprechend der darin enthaltenen Zellzahl mit RPMI verdünnt (meist 1:3, teilbar durch 5). Davon wurden je 5 ml mit 4 ml Ficoll unter- oder überschichtet und über 18 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Die mononukleären Zellen wurden vor-

sichtig abgenommen und mit 10 ml RPMI aufgefüllt. Bei 1500 U/min wurde über zehn Minuten erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet aufgewirbelt. Insgesamt wurde diese Prozedur zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen abgenommen und nach Lösung in 1 ml PBS (*phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung) gezählt. Es folgten Einfrierung in fetalem Kälberserum mit DMSO (Dimethylsulfoxid) (1:10) bei -80°C und später Umlagerung in Flüssigstickstoff. Nach der Separation wurden etwa  $1 \times 10^7$  Zellen zur Isolierung von DNA umgehend mit Lysepuffer versetzt.

Vor 1993 wurde DNA nach der Phenol-Chloroform-Methode extrahiert.<sup>180</sup> Um Erythrozyten selektiv zur Lyse zu bringen, wurden 3 bis 5 ml Knochenmark mit Erythrozytenlysepuffer dreifachen Volumens gemischt. Waren diese vollständig zerstört, erfolgte die Zentrifugation der Leukozyten mit 1200 U/min über 30 Minuten. Nach Resuspension des sedimentierten Leukozytenpellets in 10 ml TEN-Puffer wurden Proteinase K (Endkonzentration: 10 µg/ml) und 1/10 Volumen 20% SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) hinzugegeben. Anschließend wurde die Probe bei 37°C für ca. zwölf Stunden auf dem Roller-Mixer inkubiert, wobei sich Zell- und Kernmembran der Leukozyten auflösten und DNA freigesetzt wurde. Durch Extraktion mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol wurde diese von Zellproteinen gereinigt. Dazu wurde die Probe mit jeweils 1/2 Volumen Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und zehn Minuten gemischt. Nach Zentrifugation über 15 Minuten bei 5000 U/min wurde der Überstand in ein weiteres Gefäß dekantiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis in der Interphase keine Proteine mehr enthalten waren. Zur Reinigung der Probe von Phenolresten wurde 1/10 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol verwendet. In 3 Volumina absolutem Ethanol und 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat wurde die DNA präzipitiert, in 70%igem Ethanol gewaschen und je nach gewonnener DNA-Menge in 300 bis 2000 µl Tris-Puffer gelöst.

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde durch die DNA-Isolation mit Qiagensäulen (QIAquick DNA Purification System™, Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) ersetzt.

Konzentration und Reinheit der DNA wurden mittels Dichtemessung im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und 280 nm (bei Verunreinigung durch Proteine und aromatische Substanzen) bestimmt. Dabei wurde die DNA gegebenenfalls auf die gewünschte Konzentration verdünnt (Verdünnungsfaktor (VF): 1:40). Folgende Formel wurde zur Berechnung der DNA-Konzentration angewendet:

$$VF \times 50 \mu\text{g/ml} \times OD \text{ der gemessenen Probe [1 OD von dsDNA} = 50 \mu\text{g/ml H}_2\text{O}]$$

(Einheit: µg/ml, OD = optische Dichte, ds = doppelsträngig)

### 3.3.2 PCR

Anhand dieser Methode gelingt es durch Nachahmung der *in vivo* DNA-Replikation eine spezifische DNA-Sequenz innerhalb kürzester Zeit millionenfach zu amplifizieren.<sup>181,182</sup> Folgende Komponenten werden benötigt:

- einsträngige DNA
- Primer
- dNTP (Desoxyribonukleotidtriphosphate)
- DNA-Polymerase

Bei den Primern handelt es sich um jeweils 15 bis 30 Basen umfassende Oligonukleotide, welche komplementär zu den Enden der zu amplifizierenden DNA-Sequenz sind. Die dNTP dienen als Bausteine für den zu synthetisierenden DNA-Abschnitt.

Die PCR umfasst drei sich zyklisch wiederholende Schritte:

#### 1. DNA-Denaturierung:

Durch Erhitzen auf 92 bis 94°C kommt es zur Separierung des DNA-Doppelstrangs in seine Einzelstränge.

#### 2. Annealing:

Die Primer lagern sich an die den zu synthetisierenden DNA-Bereich flankierenden Regionen an und initiieren dadurch die DNA-Synthese.

#### 3. Elongation:

Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase) wird in Gegenwart der dNTP vom 3'-Ende der angelagerten Primer ausgehend ein zur DNA-Matrize komplementärer DNA-Strang synthetisiert.

Mit jedem Zyklus verdoppelt sich idealerweise die Zahl der synthetisierten DNA-Fragmente, die DNA-Menge nimmt also exponentiell zu. Die komplementär zu dem ursprünglichen DNA-Strang gebildeten DNA-Abschnitte fungieren dabei wiederum selber als Matrize für den zu synthetisierenden DNA-Bereich.

Zur Genotypisierung der Polymorphismen von *GSTMI* und *GSTTI* entsprechend der von Chen et al.<sup>183</sup> beschriebenen Methode wurde die Multiplex-PCR angewendet. Bei diesem Verfahren liegen in einer PCR-Reaktion gleichzeitig mehrere Primer-Paare vor. Die Primer schließen den Genabschnitt der DNA ein, der die jeweilige Mutation im *GSTMI*- und *GSTTI*-Gen beinhaltet. Zur internen Kontrolle der Reaktionsbedingungen und der quantitativen Bestimmung der PCR-Produkte wurde ein Oligonukleotid-Paar für  $\beta$ -Globin verwendet.

Bei der Genotypisierung von *GSTM1* und *GSTT1* kamen folgende Primer zum Einsatz:

Primer zur Bestimmung des Genotyps von *GSTM1*

Gen	Primer	Sequenz (5' → 3')	Fragmentlänge (bp)
<i>GSTM1</i>	<i>GSTM1-s</i>	GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C	215
	<i>GSTM1-a</i>	GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G	

bp = Basenpaare

Primer zur Bestimmung des Genotyps von *GSTT1*

Gen	Primer	Sequenz (5' → 3')	Fragmentlänge (bp)
<i>GSTT1</i>	<i>GSTT1-s</i>	TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC	480
	<i>GSTT1-a</i>	TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA	

Primer zur internen DNA-Bestimmung

Gen	Primer	Sequenz (5' → 3')	Fragmentlänge (bp)
$\beta$ -Globin	Glob- $\beta$ -s	TTC TGA CAC AAC TGT GTT CAC TAG C	175
	Glob- $\beta$ -a	TAT TGG TCT CCT TAA ACC TGT CTT G	

Der modifizierte PCR-Ansatz für ein Volumen von 30  $\mu$ l enthielt folgende Komponenten:

DNA 100 ng	1 $\mu$ l
PCR-Puffer, 10 x konzentriert	3 $\mu$ l
dNTP, 2 mM	3 $\mu$ l
je Primer, 10 pm/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l
Taq-Polymerase, 5 U/ $\mu$ l	0,1 $\mu$ l

Unter folgenden Bedingungen wurde die PCR durchgeführt:

Initiale Denaturierung	94°	4 min
30 Zyklen á		
Annealing	62°	1 min
Elongation	72°	1 min
Denaturierung	94°	1 min
Annealing	62°	1 min
letzte Elongation	72°	10 min

### 3.3.3 Quantitative Analyse der PCR-Amplifikate

DNA-Moleküle wandern bei der Agarosegelelektrophorese entsprechend ihrer Größe und Ladung in einem konstanten elektrischen Feld. Nach Zugabe eines Tris-Azetat-EDTA (TAE)-Puffers wurden die PCR-Amplifikate in die Taschen von 3%igen mit Ethidiumbromid

(200 µg/l) gefärbten Agarosegelen pipettiert und bei ca. 2 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Ethidiumbromid interkaliert mit doppelsträngiger DNA und fluoresziert bei Licht mit einer Wellenlänge von 256 nm. Die amplifizierten PCR-Produkte werden in Form von Banden sichtbar und können im Vergleich zu einem internen Referenzgen, in diesem Falle  $\beta$ -Globin, quantifiziert werden. Ein jeweils parallel aufgetragener DNA-Längenmarker (1 Kb-DNA-Leiter, BRL) ermöglichte eine Orientierung über die Länge der aufgetrennten DNA-Fragmente. Zur Bestimmung und Dokumentation der relativen Konzentration wurden ein Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc 1000™, Bio-Rad Laboratories) sowie die Molecular Analyst® Software eingesetzt.

### 3.3.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte computergestützt mit der Software SPSS Statistics, Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) für Windows. Zur Überprüfung der Abhängigkeit zweier Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson angewendet. Handelte es sich um kontinuierliche Parameter, so wurde der zweiseitige Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Dabei galt ein Testergebnis bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant, während  $p > 0,05$  als nicht signifikant (n. s.) gewertet wurde.

Ereignisfreies Überleben (*event-free survival*, EFS) und Überlebenszeit (*survival*, SRV) wurden anhand von Life-Table-Analysen nach Kaplan-Meier und Box-Plots beurteilt. Letztere dienen der zusammenfassenden Darstellung von Werten einer Gruppe, wobei Median, Quartile und Extremwerte berücksichtigt werden. Die Box stellt den interquartilen Bereich mit 50% aller Werte, die durch die Box verlaufende Linie den Median dar. Die „Antennen“ umfassen den Bereich vom Rand der Box bis zum jeweils höchsten bzw. niedrigsten Wert. Davon ausgenommen sind „Ausreißer“, deren Abstand von dem oberen bzw. unteren Rand der Box 1,5 bis 3 Box-Längen beträgt.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Inzidenz der *GSTM1*- und *GSTT1*-Polymorphismen

Zur Bestimmung der Inzidenz von Polymorphismen der *GST*-Klassen M1 und T1 wurden Proben von insgesamt 276 Kindern mit ALL untersucht. Davon waren 238 Kinder an einem Erstrezidiv erkrankt, bei 38 Kindern handelte es sich um die Erstdiagnose. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 72 Gesunden zusammen. Bei sechs Patienten mit ALL-Ersterkrankung (BVZ-ALL: n = 4; T-ALL: n = 2) und fünf Gesunden konnten die Genotypen nicht bestimmt werden, weshalb zur Genotypisierung 32 von insgesamt 38 Proben (ALL-Ersterkrankung) bzw. 67 von 72 Proben (gesunde Kontrollen) zur Verfügung standen. Der überwiegende Teil der Patienten mit ALL-Erstrezidiv litt an einer B-Vorläuferzell (BVZ)-ALL (n = 204) (85,7%), während bei 34 Kindern (14,3%) eine T-ALL diagnostiziert wurde. Auch bei Kindern mit ALL-Ersterkrankung zeigte sich hinsichtlich der Immunphänotypen eine ähnliche Verteilung (BVZ-ALL: n = 30 (93,75%), T-ALL: n = 2 (6,25%)). Die Inzidenzen der *GSTM1*- und *GSTT1*-Polymorphismen bei Kindern mit ALL-Erstrezidiv sind nach BVZ- und T-ALL getrennt aufgeführt und tabellarisch klinischen sowie molekulargenetischen Parametern der ALL gegenübergestellt. Die Verteilung der Polymorphismen bei BVZ-ALL-Ersterkrankung nach molekulargenetischen Variablen sowie bei der Kontrollgruppe ist jeweils im Anschluss zusammengefasst. Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten, die erstmalig an einer T-ALL erkrankt waren (n = 2), wurde auf eine Darstellung der entsprechenden Ergebnisse verzichtet.

#### 4.1.1 *GSTM1*

##### 4.1.1.1 ALL-Erstrezidive

###### 4.1.1.1.1 BVZ-ALL

Innerhalb des BVZ-ALL-Patientenkollektivs lag bei 53,4% (109/204) der Genotyp *GSTM1*\*0/\*0, bei 46,6% *non-GSTM1*\*0/\*0 vor. Hinsichtlich Geschlecht, Zeitpunkt und Ort des Rezidivs, Strategiegruppen (SG), Therapieansprechen (*response*), Knochenmarktransplantation (KMT), Ereignis und *TEL-AML 1*- bzw. *BCR-ABL*-Positivität zeigten sich zwischen diesen beiden Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tabelle 4).

Tabelle 4: Inzidenz der *GSTM1*-Polymorphismen bei BVZ-ALL- Erstrezidiv (ALL-REZ BFM)

		<i>GSTM1</i>						
		<i>*0/*0</i>		<i>*1/*0</i>		<i>*1/*1</i>		<b>Gesamt</b>
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl
<b>Geschlecht</b>	m	76	52,8	18	12,5	50	34,7	144
	w	33	55	13	21,7	14	23,3	60
	Gesamt	109	53,4	31	15,2	64	31,4	204
<b>Zeitpunkt</b>	sehr früh	27	62,8	7	16,3	9	20,9	43
	früh	37	56,9	7	10,8	21	32,3	65
	spät	45	46,9	17	17,7	34	35,4	96
	Gesamt	109	53,4	31	15,2	64	31,4	204
<b>Ort</b>	isol. KM	79	54,9	23	16	42	29,2	144
	komb. KM/EM	23	52,3	6	13,6	15	34,1	44
	isol. EM	7	43,8	2	12,5	7	43,8	16
	Gesamt	109	53,4	31	15,2	64	31,4	204
<b>Rezidiv</b>	1	109	53,4	31	15,2	64	31,4	204
	Gesamt	109	53,4	31	15,2	64	31,4	204
<b>SG</b>	1	2	33,3	0	0	4	66,7	6
	2	60	50,4	19	16	40	33,6	119
	3	22	56,4	5	12,8	12	30,8	39
	4	25	62,5	7	17,5	8	20	40
	Gesamt	109	53,4	31	15,2	64	31,4	204
<b>Response</b>	Resp.	72	52,9	22	16,2	42	30,9	136
	Non-Resp.	14	60,9	2	8,7	7	30,4	23
	Angabe fehlt	23	51,1	7	15,6	15	33,3	45
	Gesamt	109	53,4	31	15,2	64	31,4	204
<b>KMT</b>	keine	87	54,7	24	15,1	48	30,2	159
	MRD	13	56,5	3	13	7	30,4	23
	MMRD	0	0	1	33,3	2	66,7	3
	MUD	3	37,5	2	25	3	37,5	8
	autolog	6	54,5	1	9,1	4	36,4	11
	Gesamt	109	53,4	31	15,2	64	31,4	204
<b>Ereignis</b>	CCR	28	49,1	12	21,1	17	29,8	57
	lost to follow-up	1	100	0	0	0	0	1
	Th.-Tod	5	38,5	5	38,5	3	23,1	13
	2.Malignom	0	0	0	0	1	100	1
	Rezidiv	52	54,7	10	10,5	33	34,7	95
	Progression	14	60,9	2	8,7	7	30,4	23
	Ind.tod	9	64,3	2	14,3	3	21,4	14
	Gesamt	109	53,4	31	15,2	64	31,4	204
<b>TEL-AML 1</b>	negativ	24	45,3	11	20,8	18	34,0	53
	positiv	13	52	2	8	10	40	25
	Angabe fehlt	72	57,1	18	14,3	36	28,6	126
	Gesamt	109	53,4	31	15,2	64	31,4	204
<b>BCR-ABL</b>	negativ	72	51,4	22	15,7	46	32,9	140
	positiv	12	57,1	4	19	5	23,8	21
	Angabe fehlt	25	58,1	5	11,6	13	30,2	43
	Gesamt	109	53,4	31	15,2	64	31,4	204

#### Tabellenlegende:

Geschlecht:	m = männlich; w = weiblich
Ort:	isol./komb. = isoliert/kombiniert; KM/EM = Knochenmark/extramedullär
Response:	Resp. = Responder; Non-Resp. = Non-Responder
KMT:	MRD = HLA-identischer Familienspender MMRD = HLA-nicht-identischer Familienspender MUD = Fremdspender
Ereignis:	CCR = komplette 2.Remission; Th.tod = Therapietod; Ind.tod = Induktionstod

#### **4.1.1.1.2 T-ALL**

Kinder mit Erstrezidiv einer T-ALL wiesen mit 73,5% (25/34, siehe Tabelle 6) deutlich häufiger *GSTM1*\*0/\*0 auf als solche mit BVZ-ALL (53,4%). Bezüglich klinischer und molekulargenetischer Parameter konnten auch bei der T-ALL keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen *GSTM1*\*0/\*0 und *non-GSTM1*\*0/\*0 festgestellt werden (Tabelle 5).

#### **4.1.1.2 ALL-Ersterkrankung und Kontrollgruppe**

Der *GSTM1*-Polymorphismus wurde bei 30 Kindern mit BVZ-ALL-Ersterkrankung und 67 Gesunden bestimmt. Dabei wiesen 60% der Kinder mit BVZ-ALL-Ersterkrankung gegenüber 53,4% derjenigen mit –Erstrezidiv den Genotyp *GSTM1*\*0/\*0 auf. Innerhalb der Patientengruppe mit *TEL-AML 1*-positiver ALL konnte *GSTM1*\*0/\*0 bei 66,7% nachgewiesen werden, unter Kindern mit *BCR-ABL*-positiver ALL war dieser Genotyp mit 50% vertreten. Statistisch signifikante Korrelationen zwischen Fusionsgenen und *GSTM1*\*0/\*0 fanden sich nicht. In der Kontrollgruppe lag die Inzidenz von *GSTM1*\*0/\*0 bei 52,2% (Tabelle 6) und ist somit mit jener bei BVZ-ALL-Erstrezidiven (53,4%) vergleichbar.

#### **4.1.2 *GSTT1***

##### **4.1.2.1 ALL-Erstrezidive**

###### **4.1.2.1.1 BVZ-ALL**

Der Genotyp *GSTT1*\*0/\*0 war bei 20,6% der Kinder mit Erstrezidiv einer BVZ-ALL nachweisbar. Jungen hatten eine höhere Inzidenz für den Nullgenotyp als Mädchen (23,6% vs. 13,3%;  $p = 0,176$ ). Insgesamt zeigten sich hinsichtlich klinischer und molekulargenetischer Parameter zwischen *GSTT1*\*0/\*0 und *non-GSTT1*\*0/\*0 keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tabelle 7).

Tabelle 5: Inzidenz der *GSTM1*-Polymorphismen bei (prä-) T-ALL-Erstrezidiv (ALL-REZ BFM)

		<i>GSTM1</i>						
		*0/*0		*1/*0		*1/*1		Gesamt
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl
<b>Geschlecht</b>	m	22	78,6	4	14,3	2	7,1	28
	w	3	50	2	33,3	1	16,7	6
	Gesamt	25	73,5	6	17,6	3	8,8	34
<b>Zeitpunkt</b>	sehr früh	16	69,6	4	17,4	3	13	23
	früh	6	75	2	25	0	0	8
	spät	3	100	0	0	0	0	3
	Gesamt	25	73,5	6	17,6	3	8,8	34
<b>Ort</b>	isol. KM	14	66,7	5	23,8	2	9,5	21
	komb. KM/EM	9	90	1	10	0	0	10
	isol. EM	2	66,7	0	0	1	33,3	3
	Gesamt	25	73,5	6	17,6	3	8,8	34
<b>Rezidiv</b>	1	25	73,5	6	17,6	3	8,8	34
	Gesamt	25	73,5	6	17,6	3	8,8	34
<b>SG</b>	2	2	66,7	0	0	1	33,3	3
	4	23	74,2	6	19,4	2	6,5	31
	Gesamt	25	73,5	6	17,6	3	8,8	34
<b>Response</b>	Resp.	9	64,3	3	21,4	2	14,3	14
	Non-Resp.	10	83,3	2	16,7	0	0	12
	Angabe fehlt	6	75	1	12,5	1	12,5	8
	Gesamt	25	73,5	6	17,6	3	8,8	34
<b>KMT</b>	keine	22	75,9	5	17,2	2	6,9	29
	MRD	0	0	1	100	0	0	1
	MMRD	1	100	0	0	0	0	1
	MUD	1	100	0	0	0	0	1
	autolog	1	50	0	0	1	50	2
	Gesamt	25	73,5	6	17,6	3	8,8	34
<b>Ereignis</b>	CCR	2	100,0	0	0	0	0	2
	Rezidiv	10	62,5	3	18,8	3	18,8	16
	Progression	10	83,3	2	16,7	0	0	12
	Ind.tod	3	75	1		0	0	4
	Gesamt	25	73,5	6	17,6	3	8,8	34
<b>TEL-AML 1</b>	negativ	1	100	0	0	0	0	1
	positiv	0	0	0	0	0	0	0
	Angabe fehlt	24	72,7	6	18,2	3	9,1	33
	Gesamt	25	73,5	6	17,6	3	8,8	34
<b>BCR-ABL</b>	negativ	15	71,4	5	23,8	1	4,8	21
	positiv	2	100	0	0	0	0	2
	Angabe fehlt	8	72,7	1	9,1	2	18,2	11
	Gesamt	25	73,5	6	17,6	3	8,8	34

#### Tabellenlegende:

Geschlecht:	m = männlich; w = weiblich
Ort:	isol./komb. = isoliert/kombiniert; KM/EM = Knochenmark/extramedullär
Response:	Resp. = Responder; Non-Resp. = Non-Responder
KMT:	MRD = HLA-identischer Familienspender MMRD = HLA-nicht-identischer Familienspender MUD = Fremdspender
Ereignis:	CCR = komplette 2.Remission; Th.tod = Therapietod; Ind.tod = Induktionstod

#### 4.1.2.1.2 T-ALL

Bei den Patienten mit T-ALL-Erstrezidiv wies *GSTT1*\*0/\*0 mit 23,5% eine ähnliche Häufigkeit wie bei jenen mit Erstrezidiv einer BVZ-ALL (20,6%) auf. Statistisch signifikante Differenzen zwischen *GSTT1*\*0/\*0 und *non-GSTT1*\*0/\*0 konnten bezüglich des Rezidivzeitpunkts ermittelt werden. Patienten mit frühem (87,5%) und sehr frühem Rezidiv (82,6%) hatten häufiger *non-GSTT1*\*0/\*0 als *GSTT1*\*0/\*0 ( $p = 0,05$ ). Hingegen wiesen alle Patienten mit spätem Rezidiv *GSTT1*\*0/\*0 auf. Annähernd statistische Signifikanz erbrachte die Bestimmung der *GSTT1*-Polymorphismen hinsichtlich der Strategiegruppen. Während bei 80,6% der Kinder aus der Strategiegruppe 4 *non-GSTT1*\*0/\*0 zu sehen war, konnte *GSTT1*\*0/\*0 in Strategiegruppe 2 mit 66,7% deutlich häufiger nachgewiesen werden ( $p = 0,065$ ). Für die weiteren Variablen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden (Tabelle 8).

Tabelle 6: Inzidenz von *GSTM1*-Polymorphismen bei Kindern mit BVZ-ALL-Ersterkrankung und in der Kontrollgruppe (67 Gesunde) (ALL-REZ BFM)

		<i>GSTM1</i>						
		<i>*0/*0</i>		<i>*1/*0</i>		<i>*1/*1</i>		<b>Gesamt</b>
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl
<b>Immunologie</b>	BVZ	18	60	5	16,7	7	23,3	30
<b>TEL-AML1</b>	negativ	8	57,1	2	14,3	4	28,6	14
	positiv	6	66,7	1	11,1	2	22,2	9
	Gesamt	14	60,9	3	13	6	26,1	23
<b>BCR-ABL</b>	negativ	14	58,3	4	16,7	6	25	24
	positiv	2		1	25	1	25	4
	Gesamt	16	57,1	5	17,9	7	25	28
<b>Kontrollgruppe</b>		35	52,2	8	11,9	24	35,8	67

#### 4.1.2.2 ALL-Ersterkrankung und Kontrollgruppe

Die Inzidenz von *GSTT1*\*0/\*0 nahm bei Patienten mit BVZ-ALL-Ersterkrankung und in der gesunden Kontrollgruppe ähnliche Werte an (23,3% und 20,9%, Tabelle 9) und entsprach damit näherungsweise dem Auftreten von *GSTT1*\*0/\*0 bei Erstrezidiven von BVZ- und T-ALL (20,6% und 23,5%; siehe Tabelle 7 und Tabelle 8).

Tabelle 7: Inzidenz der *GSTT1*-Polymorphismen bei BVZ-ALL-Erstrezidiv (ALL-REZ BFM)

		<i>GSTT1</i>						
		<i>*0/*0</i>		<i>*1/*0</i>		<i>*1/*1</i>		<b>Gesamt</b>
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl
<b>Geschlecht</b>	m	34	23,6	30	20,8	80	55,6	144
	w	8	13,3	11	18,3	41	68,3	60
	Gesamt	42	20,6	41	20,1	121	59,3	204
<b>Zeitpunkt</b>	sehr früh	7	16,3	14	32,6	22	51,2	43
	früh	11	16,9	11	16,9	43	66,2	65
	spät	24	25	16	16,7	56	58,3	96
	Gesamt	42	20,6	41	20,1	121	59,3	204
<b>Ort</b>	isol. KM	29	20,1	33	22,9	82	56,9	144
	komb. KM/EM	9	20,5	7	15,9	28	63,6	44
	isol. EM	4	25	1	6,3	11	68,8	16
	Gesamt	42	20,6	41	20,1	121	59,3	204
<b>Rezidiv</b>	1	42	20,6	41	20,1	121	59,3	204
	Gesamt	42	20,6	41	20,1	121	59,3	204
<b>SG</b>	1	1	16,7	0	0	5	83,3	6
	2	29	24,4	19	16	71	59,7	119
	3	6	15,4	8	20,5	25	64,1	39
	4	6	15	14	35	20	50	40
	Gesamt	42	20,6	41	20,1	121	59,3	204
<b>Response</b>	Resp.	30	22,1	26	19,1	80	58,8	136
	Non-Resp.	2	8,7	8	34,8	13	56,5	23
	Angabe fehlt	10	22,2	7	15,6	28	62,2	45
	Gesamt	42	20,6	41	20,1	121	59,3	204
<b>KMT</b>	keine	32	20,1	31	19,5	96	60,4	159
	MRD	3	13,0	5	21,7	15	65,2	23
	MMRD	1	33,3	1	33,3	1	33,3	3
	MUD	4	50	2	25	2	25	8
	autolog	2	18,2	2	18,2	7	63,6	11
	Gesamt	42	20,6	41	20,1	121	59,3	204
<b>Ereignis</b>	CCR	14	24,6	9	15,8	34	59,6	57
	lost to follow-up	0	0	0	0	1	100	1
	Th.-Tod	3	23,1	3	23,1	7	53,8	13
	2.Malignom	0	0	0	0	1	100	1
	Rezidiv	22	23,2	18	18,9	55	57,9	95
	Progression	2	8,7	8	34,8	13	56,5	23
	Ind.tod	1	7,1	3	21,4	10	71,4	14
	Gesamt	42	20,6	41	20,1	121	59,3	204
<b>TEL-AML 1</b>	negativ	9	17	12	22,6	32	60,4	53
	positiv	8	32	5	20	12	48	25
	Angabe fehlt	25	19,8	24	19	77	61,1	126
	Gesamt	42	20,6	41	20,1	121	59,3	204
<b>BCR-ABL</b>	negativ	29	20,7	24	17,1	87	62,1	140
	positiv	3	14,3	5	23,8	13	61,9	21
	Angabe fehlt	10	23,3	12	27,9	21	48,8	43
	Gesamt	42	20,6	41	20,1	121	59,3	204

#### Tabellenlegende:

Geschlecht:	m = männlich; w = weiblich
Ort:	isol./komb. = isoliert/kombiniert; KM/EM = Knochenmark/extramedullär
Response:	Resp. = Responder; Non-Resp. = Non-Responder
KMT:	MRD = HLA-identischer Familienspender MMRD = HLA-nicht-identischer Familienspender MUD = Fremdspender
Ereignis:	CCR = komplette 2.Remission; Th.tod = Therapietod; Ind.tod = Induktionstod

### **4.1.3 *GSTM1* / *GSTT1***

#### **4.1.3.1 ALL-Erstrezidive**

##### **4.1.3.1.1 BVZ-ALL**

Ein Doppelnullegenotyp (*GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0) lag bei 13,2% (27/204) der Patienten mit Erstrezidiv einer BVZ-ALL vor. Keines der Allele war bei 23% (47/204) deletiert (Tabelle 10). Statistisch signifikante Unterschiede waren unter Berücksichtigung der Genotypen von *GSTM1* und *GSTT1* zwischen den einzelnen Genkonstellationen bezüglich klinischer (Geschlecht, Zeitpunkt und Ort des Rezidivs, SG, Response, KMT, Ereignis) und molekulargenetischer Variablen (*TEL-AML 1*- bzw. *BCR-ABL*-Positivität) nicht nachweisbar.

##### **4.1.3.1.2 T-ALL**

Kinder mit T-ALL-Erstrezidiv hatten in 17,6% (6/34) einen Doppelnullegenotyp, 5,9% (2/34) wiesen keine Deletion auf (Tabelle 11). Die statistische Analyse ergab auch in dieser Patientengruppe keine signifikanten Differenzen zwischen den möglichen Genkombinationen der *GSTM1*- und *GSTT1*-Polymorphismen hinsichtlich der unter 4.1.3.1.1 genannten klinischen und molekulargenetischen Parameter.

#### **4.1.3.2 ALL-Ersterkrankung und Kontrollgruppe**

Eine Kombination aus *GSTM1*\*0/\*0 und *GSTT1*\*0/\*0 fand sich bei 10% der Kinder, die zum ersten Mal an einer BVZ-ALL erkrankt waren, und bei 13,4% der gesunden Kontrollen, während bei 16,7% bzw. 22,4% keines der Allele deletiert war (Tabelle 12 und Tabelle 13). Somit war die Inzidenz des Doppelnullegenotyps bei BVZ-ALL-Erstrezidiv (13,2%) etwas höher als bei –Ersterkrankungen, im Vergleich zu den gesunden Kontrollen jedoch nahezu identisch. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Kombinationen aus *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypen ließen sich im Hinblick auf Geschlecht, Zeitpunkt und Ort des Rezidivs, SG, Response, KMT, Ereignis und *TEL-AML 1*- bzw. *BCR-ABL*-Positivität in der Patientengruppe nicht ermitteln.

Tabelle 8: Inzidenz der *GSTT1*-Polymorphismen bei (prä-) T-ALL-Erstrezidiv (ALL-REZ BFM)

		<i>GSTT1</i>						Gesamt Anzahl
		*0/*0		*I/*0		*I/*I		
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	
<b>Geschlecht</b>	m	8	28,6	4	14,3	16	57,1	28
	w	0	0	2	33,3	4	66,7	6
	Gesamt	8	23,5	6	17,6	20	58,8	34
<b>Zeitpunkt <sup>1</sup></b>	sehr früh	4	17,4	6	26,1	13	56,5	23
	früh	1	12,5	0	0	7	87,5	8
	spät	3	100	0	0	0	0	3
	Gesamt	8	23,5	6	17,6	20	58,8	34
<b>Ort</b>	isol. KM	5	23,8	2	9,5	14	66,7	21
	komb. KM/EM	1	10	4	40	5	50	10
	Isol. EM	2	66,7	0	0	1	33,3	3
	Gesamt	8	23,5	6	17,6	20	58,8	34
<b>Rezidiv</b>	1	8	23,5	6	17,6	20	58,8	34
	Gesamt	8	23,5	6	17,6	20	58,8	34
<b>SG <sup>2</sup></b>	2	2	66,7	0	0	1	33,3	3
	4	6	19,4	6	19,4	19	61,3	31
	Gesamt	8	23,5	6	17,6	20	58,8	34
<b>Response</b>	Resp.	2	14,3	4	28,6	8	57,1	14
	Non-Resp.	3	25	1	8,3	8	66,7	12
	Angabe fehlt	3	37,5	1	12,5	4	50	8
	Gesamt	8	23,5	6	17,6	20	58,8	34
<b>KMT</b>	keine	7	24,1	5	17,2	17	58,6	29
	MRD	0	0	0	0	1	100	1
	MMRD	0	0	1	100	0	0	1
	MUD	0	0	0	0	1	100	1
	autolog	1	50	0	0	1	50	2
	Gesamt	8	23,5	6	17,6	20	58,8	34
<b>Ereignis</b>	CCR	1	50	1	50	0	0	2
	Rezidiv	4	25	3	18,8	9	56,3	16
	Progression	3	25	1	8,3	8	66,7	12
	Ind.tod	0	0	1	25	3	75	4
	Gesamt	8	23,5	6	17,6	20	58,8	34
<b>TEL-AML 1</b>	negativ	0	0	0	0	1	100	1
	positiv	0	0	0	0	0	0	0
	Angabe fehlt	8	24,2	6	18,2	19	57,6	33
	Gesamt	8	23,5	6	17,6	20	58,8	34
<b>BCR-ABL</b>	negativ	4	19	4	19	13	61,9	21
	positiv	0	0	1	50	1	50	2
	Angabe fehlt	4	36,4	1	9,1	6	54,5	11
	Gesamt	8	23,5	6	17,6	20	58,8	34

Signifikante Differenzen zwischen *GSTT1*\*0/\*0 und *non-GSTT1*\*0/\*0 (Chi-Quadrat nach Pearson, 2-seitig):<sup>1</sup>p = 0,05; <sup>2</sup>p = 0,065

Tabellenlegende:

Geschlecht: m = männlich; w = weiblich  
 Ort: isol./komb. = isoliert/kombiniert; KM/EM = Knochenmark/extramedullär  
 Response: Resp. = Responder; Non-Resp. = Non-Responder  
 KMT: MRD = HLA-identischer Familienspender  
 MMRD = HLA-nicht-identischer Familienspender  
 MUD = Fremdspender  
 Ereignis: CCR = komplette 2.Remission; Th.tod = Therapietod; Ind.tod = Induktionstod

Tabelle 9: Inzidenz der *GSTTI*-Polymorphismen bei 30 Kindern mit BVZ-ALL-Ersterkrankung und in der Kontrollgruppe (67 Gesunde) (ALL-REZ BFM)

		<i>GSTTI</i>						
		<i>*0/*0</i>		<i>*1/*0</i>		<i>*1/*1</i>		<b>Gesamt</b>
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl
<b>Immunologie</b>	BVZ	7	23,3	4	13,3	19	63,3	30
<i>TEL-AML1</i>	negativ	3	21,4	1	7,1	10	71,4	14
	positiv	1	11,1	2	22,2	6	66,7	9
	Gesamt	4	17,4	3	13	16	69,6	23
<i>BCR-ABL</i>	negativ	6	25	3	12,5	15	62,5	24
	positiv	1	25	1	25	2	50	4
	Gesamt	7	25	4	14,3	17	60,7	28
<b>Kontrollgruppe</b>		14	20,9	13	19,4	40	59,7	67

Tabelle 10: *GSTMI* \* *GSTTI*-Kreuztabelle bei 204 Kindern mit BVZ-ALL-Erstrezidiv (ALL-REZ BFM)

		<i>GSTTI</i>				
		<i>*0/*0</i>	<i>*1/*0</i>	<i>*1/*1</i>	<b>Gesamt</b>	
		Anzahl	%	Anzahl	%	
<i>GSTMI</i>	<i>*0/*0</i>	Anzahl	27	20	62	109
		%	13,2	9,8	30,4	53,4
	<i>*1/*0</i>	Anzahl	6	13	12	31
		%	2,9	6,4	5,9	15,2
	<i>*1/*1</i>	Anzahl	9	8	47	64
		%	4,4	3,9	23,0	31,4
<b>Gesamt</b>		Anzahl	42	41	121	204
		%	20,6	20,1	59,3	100

Tabelle 11: *GSTMI* \* *GSTTI*-Kreuztabelle bei 34 Kindern mit T-ALL Erstrezidiv (ALL-REZ BFM)

		<i>GSTTI</i>				
		<i>*0/*0</i>	<i>*1/*0</i>	<i>*1/*1</i>	<b>Gesamt</b>	
<i>GSTMI</i>	<i>*0/*0</i>	Anzahl	6	5	14	25
		%	17,6	14,7	41,2	73,5
	<i>*1/*0</i>	Anzahl	1	1	4	6
		%	2,9	2,9	11,8	17,6
	<i>*1/*1</i>	Anzahl	1	0	2	3
		%	2,9	0	5,9	8,8
<b>Gesamt</b>		Anzahl	8	6	20	34
		%	23,5	17,6	58,8	100

Tabelle 12: *GSTMI* \* *GSTTI*-Kreuztabelle bei 30 Kindern mit BVZ-ALL-Ersterkrankung (ALL-REZ BFM)

		<i>GSTMI</i>				
		<i>*0/*0</i>	<i>*1/*0</i>	<i>*1/*1</i>	<b>Gesamt</b>	
<i>GSTTI</i>	<i>*0/*0</i>	Anzahl	3	3	1	7
		%	10	10	3,3	23,3
	<i>*1/*0</i>	Anzahl	2	1	1	4
		%	6,7	3,3	3,3	13,3
	<i>*1/*1</i>	Anzahl	13	1	5	19
		%	43,3	3,3	16,7	63,3
<b>Gesamt</b>		Anzahl	18	5	7	30
		%	60	16,7	23,3	100

Tabelle 13: *GSTMI* \* *GSTTI* -Kreuztabelle in der Kontrollgruppe (67 Gesunde)

		<i>GSTMI</i>				
		<i>*0/*0</i>	<i>*1/*0</i>	<i>*1/*1</i>	<b>Gesamt</b>	
<i>GSTTI</i>	<i>*0/*0</i>	Anzahl	9	1	4	14
		%	13,4	1,5	6	20,9
	<i>*1/*0</i>	Anzahl	3	5	5	13
		%	4,5	7,5	7,5	19,4
	<i>*1/*1</i>	Anzahl	23	2	15	40
		%	34,3	3	22,4	59,7
<b>Gesamt</b>		Anzahl	35	8	24	67
		%	52,2	11,9	35,8	100

## 4.2 *GSTM1*- und *GSTT1*-Polymorphismen und kontinuierliche Variablen bei ALL

Im Folgenden werden *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypen bei ALL in Zusammenhang mit folgenden kontinuierlichen Daten nach Immunphänotyp getrennt dargestellt: Alter bei Erst- und Rezidivdiagnose, Leukozytenzahl (WBC) und periphere Blastenzahl (PBC) bei Diagnose und Dauer der Erstremission.

### 4.2.1 *GSTM1*

#### 4.2.1.1 BVZ-ALL

Während sich bei Patienten mit BVZ-ALL kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen *GSTM1*\*0/\*0 und *non-GSTM1*\*0/\*0 und dem Alter bei Erst- und Rezidivdiagnose, der Leukozyten- und peripheren Blastenzahl bei Diagnose zeigte, konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der Dauer der Erstremission festgestellt werden. Bei Kindern mit *non-GSTM1*\*0/\*0 lag die mediane Dauer der Erstremission bei 32 Monaten. Hingegen betrug diese bei Vorliegen von *GSTM1*\*0/\*0 nur 28 Monate ( $p = 0,033$ ; Abbildung 2).

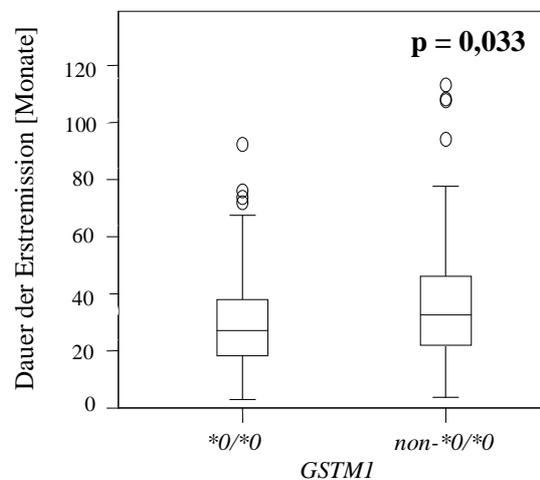


Abbildung 2: Box-Plot der Dauer der Erstremission bei 204 Kindern mit BVZ-ALL nach *GSTM1*-Genotyp (*\*0/\*0*:  $n = 109$ ; *non-\*0/\*0*:  $n = 95$ ) (ALL-REZ BFM)

### 4.2.1.2 T-ALL

Im Gegensatz zur BVZ-ALL konnte bei Patienten mit T-ALL ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen *GSTM1*\*0/\*0 und *non-GSTM1*\*0/\*0 hinsichtlich des Alters bei Erst- und Rezidivdiagnose ermittelt werden. Kinder mit *non-GSTM1*\*0/\*0 waren sowohl bei Erst- (5 Jahre) als auch bei Rezidivdiagnose der T-ALL (7 Jahre) jünger als solche mit *GSTM1*\*0/\*0 (10,5 Jahre bzw. 12,5 Jahre; jeweils  $p = 0,015$ ; Abbildung 3). Leukozyten- und periphere Blastenzahl bei Diagnose sowie die Dauer der Erstremission ließen sich nicht in statistisch signifikanten Zusammenhang mit den *GSTM1*-Polymorphismen bringen.

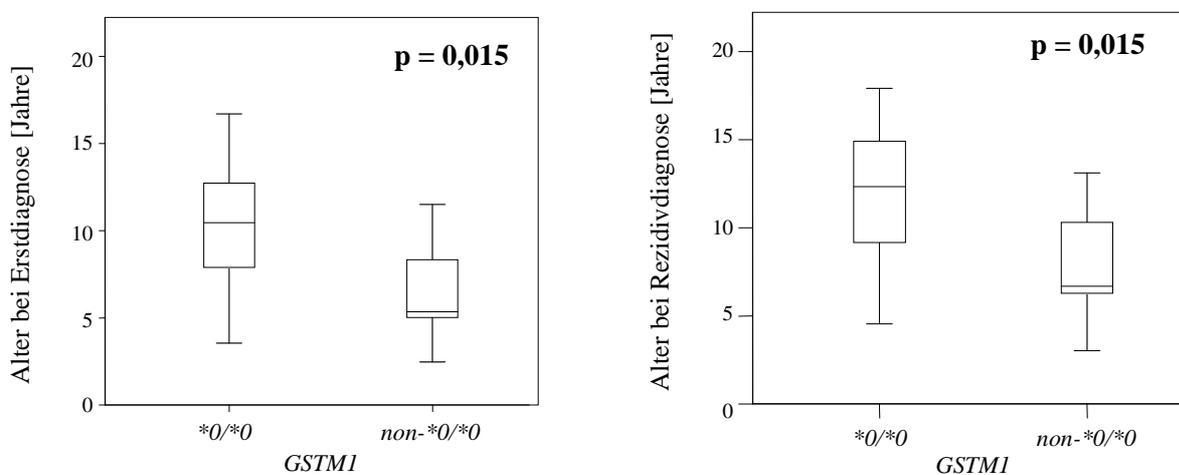


Abbildung 3: Box-Plots des Alters bei Erst- und Rezidivdiagnose bei 34 Kindern mit T-ALL nach *GSTM1*- Genotyp (\*0/\*0: n = 25; *non*-\*0/\*0: n = 9) (ALL-REZ BFM)

### 4.2.2 *GSTT1*

#### 4.2.2.1 BVZ-ALL

In der Gruppe der BVZ-ALL fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen *GSTT1*\*0/\*0 und *non-GSTT1*\*0/\*0 und den bereits erwähnten Parametern.

#### 4.2.2.2 T-ALL

Bei Kindern mit T-ALL dauerte die Erstremission bei Nachweis von *GSTT1* \*0/\*0 22 Monate an, während jene mit *non-GSTT1* \*0/\*0 nur 13 Monate in Erstremission blieben ( $p = 0,031$ ; Abbildung 4). Weitere statistisch signifikante Unterschiede zwischen den *GSTT1*-Genotypen und Alter bei Erst- und Rezidivdiagnose sowie WBC- und PBC-Zahlen bei Diagnose waren nicht feststellbar.

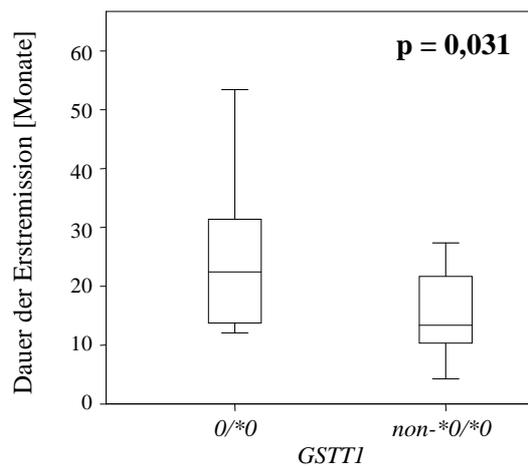


Abbildung 4: Box-Plot der Dauer der Erstremission von 34 Kindern mit T-ALL nach *GSTT1*-Genotyp (\*0/\*0: n = 8; *non*-\*0/\*0: n = 26) (ALL-REZ BFM)

#### 4.2.3 *GSTM1* / *GSTT1*

##### 4.2.3.1 BVZ-ALL

Der Doppelnulldgenotyp aus *GSTM1* \*0/\*0 und *GSTT1* \*0/\*0 stand bei den Patienten mit BVZ-ALL in keinem signifikanten Zusammenhang mit den untersuchten kontinuierlichen Parametern.

#### 4.2.3.2 T-ALL

An T-ALL erkrankte Kinder mit  $GSTM1^*0/0 / GSTT1^*0/0$  blieben über 30 Monate in Erstremission, hingegen dauerte diese bei  $non-GSTM1^*0/0 / GSTT1^*0/0$  nur 14 Monate an ( $p = 0,015$ ; Abbildung 5). Für die übrigen Variablen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

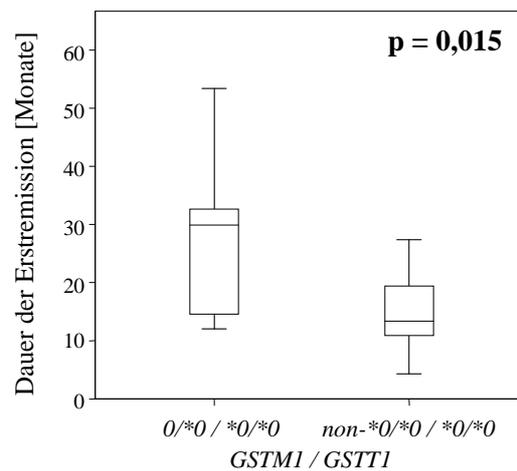


Abbildung 5: Box-Plot der Dauer der Erstremission von 34 Kindern mit T-ALL nach  $GSTM1 / GSTT1$ -Genotyp ( $*0/0$ :  $n = 6$  ;  $non-*0/0$ :  $n = 28$ ) (ALL-REZ BFM)

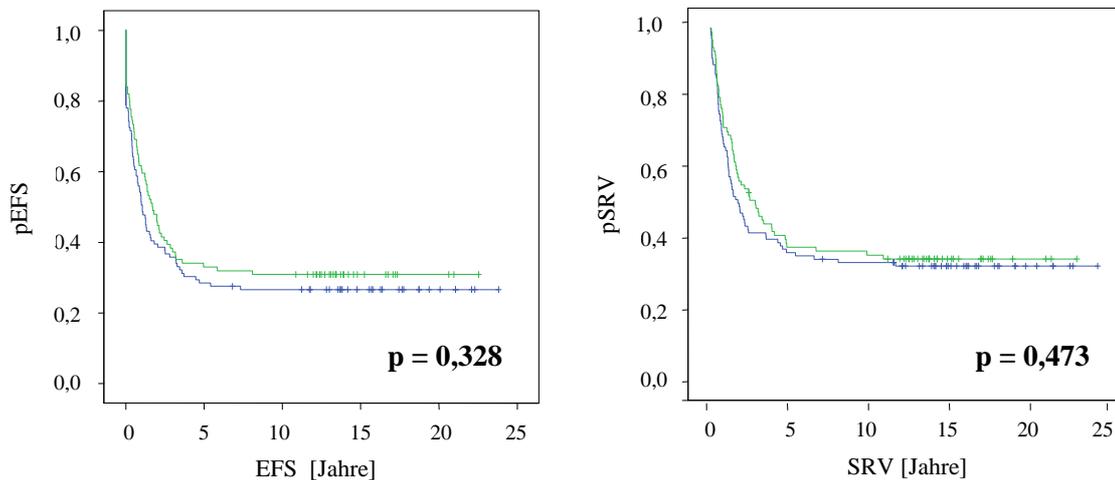
#### 4.3 $GSTM1$ - und $GSTT1$ -Polymorphismen und Langzeitüberleben bei ALL

Die bezüglich des 10-Jahres-EFS und -SRV ermittelten Daten werden jeweils getrennt nach Immunphänotyp beschrieben. Kaplan-Meier-Kurven sind, sofern keine statistisch signifikanten Ergebnisse vorliegen, exemplarisch für die im Vergleich zur T-ALL häufiger auftretende BVZ-ALL aufgeführt, die übrigen Abbildungen befinden sich im Anhang.

### 4.3.1 *GSTM1*

#### 4.3.1.1 BVZ-ALL

Hinsichtlich pEFS und pSRV konnte innerhalb der Patientengruppe mit Erstrezidiv einer BVZ-ALL kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit *GSTM1*\*0/\*0 und *non-GSTM1*\*0/\*0 ermittelt werden (EFS:  $p = 0,328$ ; SRV:  $p = 0,473$ ; Abbildung 6).



<i>GSTM1</i>	n	zensiert	pEFS	zensiert	pSRV
— *0/*0	109	29	$0,266 \pm 0,042$	37	$0,338 \pm 0,045$
— <i>non</i> -*0/*0	94	29	$0,309 \pm 0,048$	34	$0,369 \pm 0,05$

Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurven des 10-Jahres-EFS und -SRV von Kindern mit Erstrezidiv einer BVZ-ALL nach *GSTM1*-Genotyp (ALL-REZ BFM)

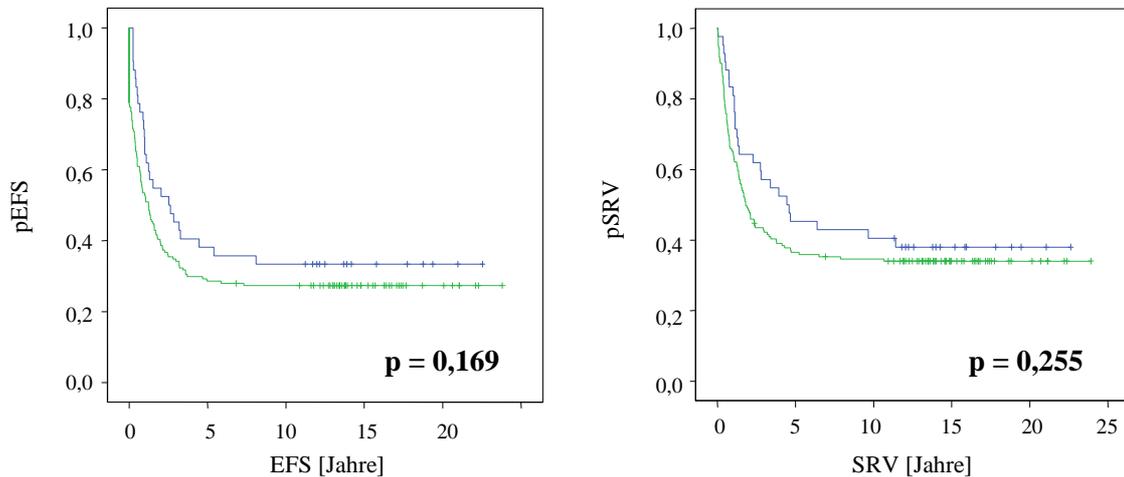
#### 4.3.1.2 T-ALL

Auch bei Patienten mit T-ALL-Erstrezidiv waren weder *GSTM1*\*0/\*0 (pEFS =  $0,08 \pm 0,054$ ; pSRV =  $0,08 \pm 0,054$ ) noch *non-GSTM1*\*0/\*0 (pEFS bzw. pSRV =  $0,111 \pm 0,105$ ) signifikant mit EFS ( $p = 0,404$ ) oder SRV ( $p = 0,179$ ) assoziiert (siehe Abbildung I im Anhang).

### 4.3.2 *GSTT1*

#### 4.3.2.1 BVZ-ALL

Statistisch signifikante Differenzen zwischen den *GSTT1*-Genotypen ließen sich bei der Analyse des EFS und SRV von Kindern mit Erstrezidiv einer BVZ-ALL nicht feststellen (EFS:  $p = 0,169$ ; SRV:  $p = 0,255$ ; Abbildung 7).



<i>GSTT1</i>	n	zensiert	pEFS	zensiert	pSRV
— *0/*0	42	14	$0,333 \pm 0,073$	16	$0,405 \pm 0,076$
— non-*0/*0	161	44	$0,273 \pm 0,035$	55	$0,34 \pm 0,037$

Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurven des 10-Jahres-EFS und –SRV von Kindern mit Erstrezidiv einer BVZ-ALL nach *GSTT1*-Genotyp (ALL-REZ BFM)

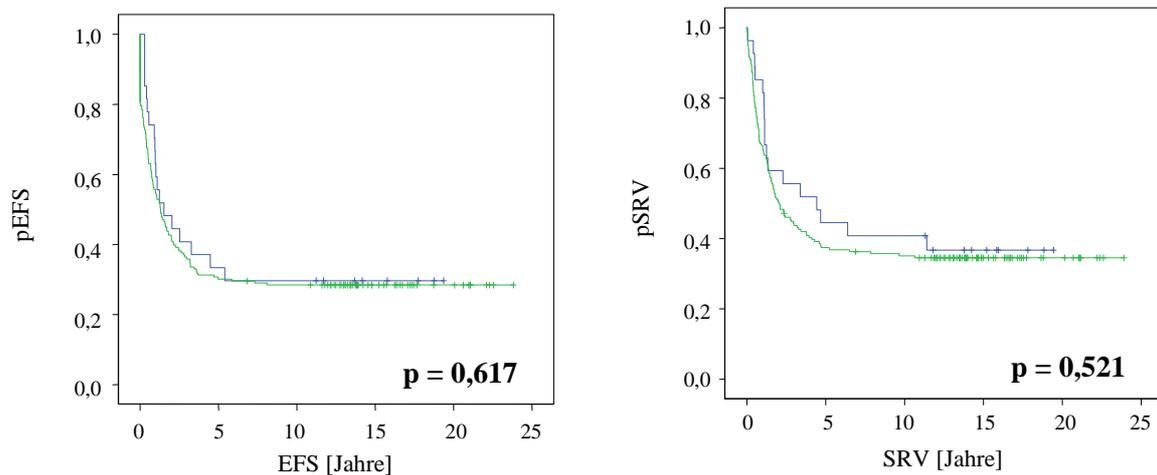
#### 4.3.2.2 T-ALL

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zu den *GSTM1*-Genotypen zeigte sich bei Patienten mit T-ALL-Erstrezidiv hinsichtlich EFS und SRV zwischen *GSTT1*\*0/\*0 (pEFS bzw. pSRV =  $0,125 \pm 0,117$ ) und non-*GSTT1*\*0/\*0 (pEFS bzw. pSRV =  $0,038 \pm 0,038$ ) kein statistisch signifikanter Unterschied (EFS:  $p = 0,195$ ; SRV:  $p = 0,075$ ; siehe Abbildung II im Anhang). Eine Tendenz zu einem besseren SRV war bei Vorliegen von *GSTT1*\*0/\*0 zu beobachten ( $p = 0,075$ ).

### 4.3.3 *GSTM1* / *GSTT1*

#### 4.3.3.1 BVZ-ALL

Weder *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 noch *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 standen in statistisch signifikantem Zusammenhang mit pEFS ( $p = 0,617$ ) und pSRV ( $p = 0,521$ ) bei Erstrezidiv einer BVZ-ALL im Kindesalter (Abbildung 8).

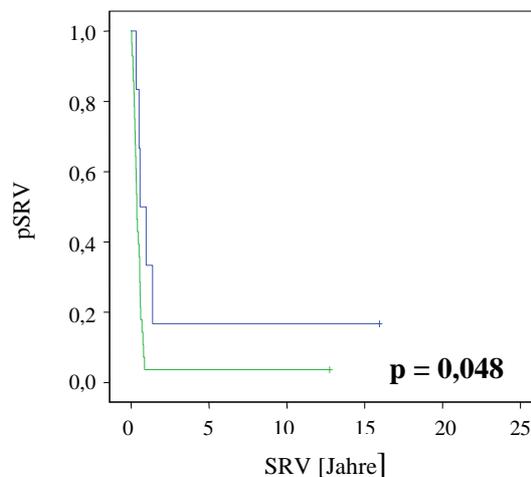


<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i>	n	zensiert	pEFS	zensiert	pSRV
— *0/*0	27	8	$0,296 \pm 0,088$	10	$0,367 \pm 0,093$
— <i>non</i> -*0/*0	176	50	$0,284 \pm 0,034$	61	$0,345 \pm 0,036$

Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurven des 10-Jahres-EFS und –SRV von Kindern mit Erstrezidiv einer BVZ-ALL nach *GSTM1* / *GSTT1*-Genotyp (ALL-REZ BFM)

### 4.3.3.2 T-ALL

Hinsichtlich des EFS konnten keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den verschiedenen Genotypen gefunden werden (*GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0: pEFS = 0,167 ± 0,152; *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0: pEFS = 0,036 ± 0,035; p = 0,167; siehe Abbildung III im Anhang). Hingegen hatten Kinder mit T-ALL-Erstrezidiv bei Vorliegen von *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 ein signifikant besseres SRV als jene mit *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 (p = 0,048, Abbildung 9).



<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i>	n	zensiert	pSRV
— *0/*0	6	1	0,167 ± 0,152
— non-*0/*0	28	1	0,036 ± 0,035

Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve des 10-Jahres-SRV von Kindern mit Erstrezidiv einer T-ALL nach *GSTM1* / *GSTT1*-Genotyp (ALL-REZ BFM)

## 5. DISKUSSION

Die ALL ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Trotz exzellenter Heilungsraten mit einem 5-jährigen ereignisfreien Überleben in 70 bis 80% der Fälle treten bei 20 bis 30% der Patienten Rezidive auf. Infolge einer erhöhten Resistenz der Leukämiezellen gegenüber verschiedenen in der ALL-Therapie verwendeten Substanzen sind diese mit deutlich schlechteren Heilungschancen verbunden und stellen daher eine besondere therapeutische Herausforderung dar. Polymorphismen Arzneimittel-metabolisierender Enzymsysteme führen zu einer erheblichen interindividuellen Variabilität bei der Aktivierung und Detoxifizierung verschiedener Zytostatika, wodurch sowohl das Risiko an ALL zu erkranken als auch der Erfolg einer ALL-Behandlung beeinflusst werden kann.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieser Arbeit die Glutathion-S-Transferasen der  $\mu$ - und  $\theta$ -Klasse als Vertreter Arzneimittel-metabolisierender Enzymsysteme der Phase II in Hinblick auf Inzidenz und Korrelation mit klinischen und molekulargenetischen Parametern sowie deren Einfluss auf das Überleben von Kindern mit Erstrezidiv einer ALL untersucht. Patienten mit ALL-Ersterkrankung und gesunde Kontrollen wurden zum Vergleich herangezogen.

Bei der statistischen Analyse wurden alle Ergebnisse zu Patienten mit ALL-Ersterkrankung und -Erstrezidiv, die nach den Protokollen der BFM-Gruppe (ALL-REZ-BFM) behandelt worden sind, sowie die Daten zur gesunden Kontrollgruppe berücksichtigt. Differierende Patientenzahlen im Hinblick auf verschiedene klinische und/oder molekulargenetische Parameter sind auf das Misslingen einzelner Versuche zurückzuführen. Schwerpunkt der Untersuchungen stellten Kinder mit ALL-Erstrezidiv dar.

### 5.1 Inzidenz der *GSTM1*- und *GSTT1*-Polymorphismen

#### 5.1.1 *GSTM1*

##### 5.1.1.1 ALL-Erstrezidive

Die Inzidenz von *GSTM1*\*0/\*0 betrug bei 204 Patienten mit BVZ-ALL 53,4%, *non-GSTM1*\*0/\*0 fand sich bei 46,6%. In der Studie von Stanulla et al., die insgesamt 64 Kinder mit Erstrezidiv einer BVZ-ALL umfasste, wurde *GSTM1*\*0/\*0 mit 42,2% deutlich seltener nachgewiesen, *non-GSTM1*\*0/\*0 war mit 57,8% vertreten. Zum Vergleich wurden Proben von 64 Patienten mit ALL-Ersterkrankung analysiert.<sup>168</sup> Anderer et al. fanden eine *GSTM1*\*0/\*0-Inzidenz von 45% bei 40 Patienten mit B-/T-ALL- oder AHL-Erstrezidiv.<sup>134</sup> Da das Patientenkollektiv in dieser Arbeit erheblich größer war, kann von einer größeren statisti-

schen Aussagekraft hinsichtlich der ermittelten Inzidenzen ausgegangen werden. Krajinovic et al. untersuchten Kinder mit ALL-Ersterkrankung ohne (n = 252) im Vergleich zu solchen mit Ereignis (*event*) (n = 68), welches als Rezidiv oder Tod während oder nach der Therapie definiert wurde. *GSTMI\*0/\*0* war in letztgenannter Patientengruppe bei 61,8%, *non-GSTMI\*0/\*0* bei 38,2% zu finden. Sowohl Kinder mit B-, T- als auch nicht definierter ALL wurden in die Studie eingeschlossen, eine getrennte Untersuchung der *GSTMI*-Genotypen nach Immunphänotypen erfolgte nicht.<sup>184</sup> Die im Vergleich zu dieser Untersuchung etwas höhere Inzidenz von *GSTMI\*0/\*0* könnte auf einen Zusammenhang zwischen der miteinbezogenen T-ALL, welche mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist,<sup>27,53,61</sup> und des bei Vorliegen von *GSTMI\*0/\*0* möglicherweise erhöhten ALL-Rezidivrisiko zurückgeführt werden.<sup>132</sup> Allerdings hatten in der Studie von Krajinovic et al.<sup>1</sup> lediglich 34 Patienten eine T-ALL gegenüber 264 Kindern mit B-ALL, so dass ein begrenzter Einfluss auf die Auswertung der Daten angenommen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit hatten Kinder mit T-ALL-Erstrezidiv eine deutlich höhere Inzidenz von *GSTMI\*0/\*0* als jene mit BVZ-ALL (73,5% vs. 53,4%). Dies könnte auf eine Assoziation zwischen der ungünstigen Prognose der T-ALL<sup>27,53,61</sup> und *GSTMI\*0/\*0* hinweisen. Da es sich jedoch um ein wesentlich kleineres Patientenkollektiv aus 34 Kindern im Gegensatz zu 204 Kindern mit BVZ-ALL handelte, sollten diese Ergebnisse zukünftig an einer größeren Gruppe überprüft werden.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den verschiedenen *GSTMI*-Genotypen und dem ALL-Rezidivrisiko zeigte sich weder bei BVZ- noch bei T-ALL. Dies konnte auch in anderen Untersuchungen nicht festgestellt werden.<sup>1,134</sup> Ein erhöhtes Risiko für hämatologische Rezidive bei Kindern mit *non-GSTMI\*0/\*0* innerhalb der Hochrisikogruppe (insgesamt 130 Patienten; p = 0,03) wurde von Rocha et al. ermittelt.<sup>135</sup> Stanulla et al. fanden ein erniedrigtes Rezidivrisiko bei Nachweis von *GSTMI\*0/\*0*, jedoch ohne statistische Signifikanz (p = 0,078).<sup>168</sup> Eine Tendenz zu einem niedrigeren Risiko für ZNS-Rezidive (p = 0,054) wurde von Chen et al. beschrieben.<sup>120</sup>

Wie veröffentlicht,<sup>134,168</sup> konnte auch in dieser Studie eine Assoziation zwischen *GSTMI*-Genotypen und Geschlecht, Zeitpunkt und Ort des Rezidivs, SG, Response, KMT, Ereignis und *TEL-AML1*- bzw. *BCR-ABL*-Positivität weder bei BVZ- noch bei T-ALL-Erstrezidiven ermittelt werden.

### 5.1.1.2 ALL-Ersterkrankungen und Kontrollgruppe

Kinder mit BVZ-ALL-Ersterkrankung zeigten in der vorliegenden Arbeit mit 60% eine höhere Inzidenz von *GSTMI*\*0/\*0 als jene mit BVZ-ALL-Erstrezidiv (53,4%). Weitere bisher veröffentlichte Daten sind in Tabelle 14 dargestellt. Vergleichbare Werte bei Kindern wurden von Stanulla et al.<sup>168</sup> (57,8%), Krajinovic et al. (64,9%<sup>119</sup> bzw. 57,1%<sup>1</sup>), Balta et al.<sup>164</sup> (55,4%), Chen et al.<sup>120</sup> (55,2%) und Saadat et Saadat<sup>161</sup> (55,3%) beschrieben. Allerdings muss einschränkend angemerkt werden, dass die Daten in den genannten Studien mit Ausnahme der von Stanulla et al.<sup>168</sup> unabhängig vom Immunphänotyp errechnet wurden und damit neben BVZ-ALL zusätzlich T-ALL und andere nicht definierte akute Leukämien umfassten. In der Untersuchung von Balta et al. reduzierte sich die Inzidenz von *GSTMI*\*0/\*0 bei Betrachtung der BVZ-ALL auf 52%.<sup>164</sup> Andere Autoren fanden sowohl niedrigere<sup>3,117,134,135,165,166,177,185,186,187</sup> als auch höhere Frequenzen<sup>118,188-190</sup> von *GSTMI*\*0/\*0, was in Unterschieden der Größe und Zusammensetzung von Patientengruppen sowie der angewendeten Therapieprotokolle begründet liegen könnte. So waren beispielsweise in der Arbeit von Bolufer et al.<sup>177</sup> über 50% der Patienten älter als 16 Jahre. Da keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Inzidenz der Polymorphismen zwischen Patienten im Alter von 16 Jahren und jünger und jenen älter als 16 Jahre auftraten, wurden die verschiedenen Altersgruppen nicht getrennt untersucht.

Der Genotyp *GSTMI*\*0/\*0 war bei 66,7% der prognostisch günstigeren *TEL-AML 1*-positiven ALL nachweisbar, während sich bei *BCR-ABL*-positiven ALL, welche mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind, eine niedrigere Inzidenz (50%) zeigte. Da die Fallgruppe in dieser Studie auf 30 Kinder mit ALL-Ersterkrankung beschränkt war, sollten die Ergebnisse an einer größeren Patientenzahl bestätigt werden.

Tabelle 14: Übersicht publizierter Daten zur Inzidenz der *GSTMI*-Genotypen bei ALL im Kindesalter

Referenz	Studie: Fälle/Kontrollen	<i>GSTMI</i>	Fälle Gesamt	n (%)	Kontrollen Gesamt	n (%)	P
Chen <sup>120</sup> 1997, USA <sup>1</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0	163	90 (55,2)	213	114 (53,5)	
Chen <sup>120</sup> 1997, USA <sup>2</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0	34	14 (41,2)	203	56 (27,6)	
Krajcinovic <sup>119</sup> 1999, Kanada	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 <i>non</i> -*0/*0	174	113 (64,9) 61 (35,1)	304	156 (51,3) 148 (48,7)	
Stanulla <sup>168</sup> 2000, Deutsch- land <sup>3</sup>	Rezidiv/ Ersterkrankung bzw. Rezidiv > 5 J. <sup>4</sup>	*0/*0 <i>non</i> -*0/*0	64	27 (42,2) 37 (57,8)	64	37 (57,8) 27 (42,2)	0,078
Anderer <sup>134</sup> 2000, Deutschland	Rezidiv/ kein Rezidiv	*0/*0 <i>non</i> -*0/*0	40	18 (45) 22 (55)	92	40 (43,5) 52 (56,5)	0,871
Saadat <sup>161</sup> 2000, Iran	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0	38	(55,3)		(32)	< 0,025
Alves <sup>188</sup> 2002, Portugal	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 <i>non</i> -*0/*0	47	32 (68,1) 15 (31,9)	102	50 (49) 52 (51)	0,035
Krajcinovic <sup>1</sup> 2002, Kanada	Event <sup>5</sup> / kein Event	*0/*0 <i>non</i> -*0/*0	68	42 (61,8) 26 (38,2)	247	141 (57,1) 106 (42,9)	
Davies <sup>117</sup> 2002, USA <sup>1</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0	616	331 (54)	532	286 (54)	1,0
Davies <sup>117</sup> 2002, USA <sup>2</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0	35	14 (40)	201	64 (32)	0,45
Sala <sup>186</sup> 2003, Italien	Ersterkrankung u. Rezidive/keine Kontrollen	*0/*0 <i>non</i> -*0/*0	338	(46,8) (53,2)			
Balta <sup>164</sup> 2003, Türkei	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 <i>non</i> -*0/*0	139	77 (55,4) (B: 52; N-B: 59) 62 (44,6)	185	101 (54,6) 84 (45,4)	
Takanashi <sup>165</sup> 2003, Japan	Ersterkrankung <sup>3</sup> / Gesunde (Erw. <sup>6</sup> )	*0/*0	82	(40,2)	47	(59,6)	0,044
Canalle <sup>3</sup> 2004, Brasilien	Ersterkrankung/ Gesunde (Erw. <sup>6</sup> )	*0/*0 <i>non</i> -*0/*0	113	48 (42,5) 65 (57,5)	221	101 (45,7) 120 (54,3)	0,64
Barnette <sup>166</sup> 2004, USA	ALL-Erkrankung (nicht spezifi- ziert)	*0/*0 <i>non</i> -*0/*0	94	48 (51) 46 (49)			0,001
Wang <sup>189</sup> 2004, China	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0	67	(76,12)	146	(52,74)	< 0,001
Pakakasama <sup>118</sup> 2005, Thailand	Ersterkrankung/ Gesunde (Erw. <sup>6</sup> )	*0/*0 <i>non</i> -*0/*0	107	(71) (29)	320	(59,7) (40,3)	0,04
Rocha <sup>135</sup> 2005, USA	higher-risk arm <sup>7</sup> / lower-risk arm	*0/*0 <i>non</i> -*0/*0	130	59 (45,4) 71 (54,6)	116	46 (39,7) 70 (60,3)	
Aydin- Sayitoglu <sup>190</sup> 2006, Türkei	Ersterkrankung/ Gesunde <sup>8</sup>	*0/*0 <i>non</i> -*0/*0	119	78 (65,5) 41 (34,5)	140	77 (55) 63 (45)	0,09

Referenz	Studie: Fälle/Kontrollen	GSTMI	Fälle Gesamt	n (%)	Kontrollen Gesamt	n (%)	P
Haranatha <sup>187</sup> 2006, Indien	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 non-*0/*0	135	60 (44,44) 75 (55,55)	146	61 (41,75) 88 (60,27)	0,55
Bolufer <sup>177</sup> 2007, Spanien	Ersterkrankung/ Gesunde <sup>9</sup>	*0/*0	140	64 (45,7)	451	232 (51,4)	n. s. <sup>10</sup>
Pigullo <sup>185</sup> 2007, Italien	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 non-*0/*0	323	152 (47) 171 (53)	384	200 (52) 184 (48)	0,1
Eyada et al. <sup>191</sup> 2007, Ägypten	Ersterkrankung/ Gesunde <sup>11</sup>	*0/*0 non-*0/*0	13	6 (46,2) 7 (53,8)	11	11 (100)	

Tabellenlegende:

<sup>1</sup> "weiße" Kinder; <sup>2</sup> "schwarze" Kinder; <sup>3</sup> nur BVZ-ALL; <sup>4</sup> Rezidiv > 5 Jahre nach Erstdiagnose, wenn Follow-up mindestens so lange wie Zeitraum zwischen Erst- und Rezidivdiagnose bei Fällen; <sup>5</sup> Event = Rezidiv oder Tod, der Erkrankung zuschreibbar, während oder nach Therapie; <sup>6</sup> Erw. = Erwachsene; <sup>7</sup> Alter < 1 oder > 10 J. (außer DNA-Index  $\geq 1,16$  und  $\leq 1,60$ ); initiale WBC-Zahl >  $50 \times 10^9/L$  (außer DNA-Index  $\geq 1,16$  und  $\leq 1,60$ ); ZNS-/Testis-Beteiligung; > 5% leukämische Blasten im KM an Tag 19; T-ALL; Anwesenheit von *BCR-ABL*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* in BVZ-ALL; <sup>8</sup> durchschnittliches Alter  $28,7 \pm 8,3$  J.; <sup>9</sup> 93 Patienten + 403 Kontrollen > 16 J.; <sup>10</sup> n. s. = nicht signifikant; <sup>11</sup> Alter unbekannt

Die Inzidenz von *GSTMI* \*0/\*0 belief sich in der gesunden Kontrollgruppe auf 52,2% und ist vergleichbar mit anderen veröffentlichten Daten.<sup>117,119,120,161,164,166,177,185,188-190</sup> Hinsichtlich der Untersuchung von Pigullo et al. ist zu erwähnen, dass es sich bei den der Fallgruppe aus Kindern mit ALL-Ersterkrankung gegenübergestellten Kontrollen um Patienten handelte, die sich aufgrund von Traumata, akuter infektiöser Episoden oder kleinerer chirurgischer Eingriffe in stationärer Behandlung befanden.<sup>185</sup> Da ein Einfluss der *GSTMI*- und *GSTT1*-Gene auf die Anfälligkeit für nicht-maligne Erkrankungen nicht auszuschließen ist, könnten hospitalisierte (keine malignen Erkrankungen) und nicht-hospitalisierte Kontrollen unterschiedliche *GST*-Genotyp-Frequenzen aufweisen. Dies könnte wiederum zur Heterogenität zwischen verschiedenen Studien beitragen, so dass zur besseren Vergleichbarkeit eher nicht-hospitalisierte Kontrollen herangezogen werden sollten.<sup>192</sup>

Barnette et al. <sup>166</sup> verwendeten zur Bestimmung der Frequenzen der *GST*-Genotypen Guthrie-Karten von Neugeborenen aus Utah (USA).

Der Genotyp *GSTMI* \*0/\*0 war bei Kindern mit ALL-Ersterkrankung nicht signifikant häufiger nachweisbar als in der gesunden Kontrollgruppe und bei jenen mit ALL-Erstrezidiv (60% vs. 52,2% vs. 53,4%), was mit den Ergebnissen weiterer Studien in Übereinstimmung steht.<sup>3,117,156,164</sup> Hingegen war *GSTMI* \*0/\*0 in anderen Untersuchungen bei Patienten mit ALL im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe deutlich häufiger zu finden, so dass von

einem erhöhten Risiko an ALL zu erkranken ausgegangen wurde.<sup>118,119,155,161</sup> In einer Untersuchung an japanischen Kindern zeigte sich eine niedrigere Frequenz von *GSTM1*\*0/\*0 bei ALL-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe.<sup>165</sup> Auf eine eingeschränkte Vergleichbarkeit der Daten aufgrund teils erheblich differierender Gruppengrößen (siehe Tabelle 14) und Methoden sei hingewiesen. Den Boer et al.<sup>155</sup> bestimmten die Expression der *GST*-Genotypen in Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie, während dies in der vorliegenden Studie PCR-basiert nach der Methode von Chen et al.<sup>183</sup> erfolgte. Dabei wurden 100 Patienten mit ALL-Ersterkrankung nur acht gesunde Kontrollen gegenübergestellt. *GST* der  $\mu$ -Klasse waren in Lymphozyten von Kindern mit ALL häufiger exprimiert als in jenen von Gesunden.<sup>155</sup> Barnette et al. ermittelten ein im Vergleich zu *GSTM1*\*0/\*0 signifikant höheres ALL-Risiko bei Vorliegen eines *GSTM1*-Allels (*GSTM1*\*A oder *GSTM1*\*B).<sup>166</sup>

## 5.1.2 *GSTT1*

### 5.1.2.1 ALL-Erstrezidive

Der Genotyp *GSTT1*\*0/\*0 fand sich bei 20,6% der 204 untersuchten Kinder mit BVZ-ALL-Erstrezidiv und war in der aus 34 Patienten bestehenden T-ALL-Gruppe mit ähnlicher Häufigkeit vertreten (23,5%). In den bereits unter 5.1.1.1 genannten Studien von Stanulla et al.<sup>168</sup> und Krajinovic et al.<sup>1</sup> wurde *GSTT1*\*0/\*0 wesentlich seltener nachgewiesen (7,8% bzw. 11,8%). Die niedrigste Inzidenz für diesen Genotyp (2,5%) ermittelten Anderer et al..<sup>134</sup> Unterschiede zu der vorliegenden Arbeit lagen sowohl in deutlich geringeren Patientenzahlen als auch in der Differenzierung nach Immunphänotypen. Während Stanulla et al.<sup>168</sup> 64 Patienten mit ALL der B-Zellreihe untersuchten, bezogen sich die von Krajinovic et al.<sup>1</sup> und Anderer et al.<sup>134</sup> erhobenen Daten auf 68 bzw. 40 Kinder mit B- bzw. T-ALL<sup>1,134</sup> oder AHL.<sup>134</sup>

Bei den Patienten mit BVZ-ALL-Erstrezidiv waren die verschiedenen *GSTT1*-Genotypen nicht in statistisch signifikantem Maße mit den unter 5.1.1.1 genannten klinischen und molekulargenetischen Parametern assoziiert. Die Tendenz zu einer höheren Inzidenz von *GSTT1*\*0/\*0 bei Jungen als bei Mädchen (25% vs. 13%;  $p = 0,098$ ) relativiert sich bei Berücksichtigung der deutlich differierenden Gruppengrößen (m: 144; w: 60).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen *GSTT1*-Genotypen und Rezidivzeitpunkt war in der Gruppe der T-ALL-Erstrezidive zu finden. Kinder mit frühen und sehr frühen Rezidiven hatten wesentlich häufiger *non-GSTT1*\*0/\*0, während alle drei Patienten mit späten Rezidiven *GSTT1*\*0/\*0 aufwiesen ( $p = 0,05$ ). Die Verteilung der Genotypen innerhalb der Strategiegruppen (SG) erreichte annähernd statistische Signifikanz ( $p = 0,065$ ).

In SG4 war *non-GSTT1\*0/\*0* mit 80,6%, in SG2 (intermediäres Risiko) *GSTT1\*0/\*0* mit 66,7% am häufigsten zu finden. Beide Assoziationen könnten als Hinweis darauf interpretiert werden, dass *GSTT1\*0/\*0* mit einem erniedrigten Risiko für (frühe) Rezidive einhergeht und somit eine protektive Funktion erfüllt. Der häufige Nachweis von *non-GSTT1\*0/\*0* (*GSTT1\*1/\*0* und *GSTT1\*1/\*1*) in der bei der prognostisch ungünstigen T-ALL größten SG4 (Hochrisikogruppe) lässt vermuten, dass die Anwesenheit mindestens eines *GSTT1*-Allels ein erhöhtes Rezidivrisiko birgt und eine ungünstigere Prognose nach sich zieht. Die beschriebenen Beobachtungen sind aufgrund der geringen Gruppenstärke (34 Kinder) jedoch nur bedingt aussagekräftig und sollten an einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden.

Stanulla et al. fanden eine statistisch signifikante Assoziation zwischen *GSTT1\*0/\*0* und verringertem ALL-Rezidivrisiko ( $p = 0,048$ ).<sup>168</sup> Auch in einer anderen Untersuchung dieser Arbeitsgruppe wurde ein solcher Zusammenhang vermutet, da lediglich einer von insgesamt 13 Patienten mit *GSTT1\*0/\*0* ein Rezidiv erlitt. Die statistische Analyse erbrachte jedoch keine Signifikanz ( $p = 0,095$ , univariat;  $p = 0,173$  multivariat).<sup>134</sup> Hinsichtlich des initialen Ansprechens auf die Therapie mit Prednison konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Dabei wurden 45 Kinder mit schlechter Prednison-Antwort einer Kontrollgruppe aus 90 Patienten mit guter Prednison-Antwort gegenübergestellt. Nur einer von 13 Patienten mit *GSTT1\*0/\*0* zeigte eine schlechte Prednison-Antwort ( $p = 0,071$ , univariat;  $p = 0,117$ , multivariat). Ein spekulativer Mechanismus, in welchem die Assoziation zwischen *GSTT1*-Genotyp und Rezidiv durch einen Effekt des *GSTT1*-Genotyps auf die Prednison-Behandlung, z.B. durch direkte Interaktion von *GSTT1* mit Glukokortikoiden, ausgelöst wird, wurde als hypothetische Interpretation der beschriebenen Resultate angeführt.<sup>134</sup> Auf eine infolge der relativ kleinen Patientenzahlen möglicherweise eingeschränkte Aussagekraft dieser Untersuchung sei hingewiesen. Die von derselben Arbeitsgruppe in einer weiteren Studie erhobenen Resultate führten ebenfalls zu der Annahme, dass *GSTT1\*0/\*0* einen modulierenden Effekt auf ein frühes Therapieansprechen hat.<sup>193</sup>

Andere Autoren konnten keinen Zusammenhang zwischen *GSTT1\*0/\*0* und ALL-Rezidivrisiko feststellen.<sup>1,4,117,120,156,169</sup>

### 5.1.2.2 ALL-Ersterkrankungen und Kontrollgruppe

In dieser Studie hatten Kinder mit BVZ-ALL-Ersterkrankung mit 23,3% eine ähnliche Inzidenz von *GSTT1\*0/\*0* wie jene mit BVZ- und T-ALL-Erstrezidiv (20,6% bzw. 23,5%). In Tabelle 15 sind bisher publizierte Daten zu den *GSTT1*-Genotypen bei ALL-

Ersterkrankungen im Kindesalter zusammengefasst. Der Genotyp *GSTT1*\*0/\*0 zeigte in mehreren Untersuchungen eine ähnliche Inzidenz wie in der vorliegenden Arbeit.<sup>3,164,168,177,190</sup> Allerdings unterschieden sich diese teilweise erheblich hinsichtlich Größe und Zusammensetzung des jeweiligen Patientenkollektivs sowie der angewendeten Therapieprotokolle. Während Stanulla et al.<sup>168</sup> und Alves et al.<sup>188</sup> die Häufigkeit der *GSTT1*-Genotypen bei 64 bzw. 47 Kindern im Vergleich zu 30 Patienten in dieser Arbeit bestimmten, schlossen die übrigen Autoren wesentlich mehr Personen in ihre Untersuchungen ein (Canalle et al.<sup>3</sup> (n = 113); Aydin-Sayitoglu et al.<sup>190</sup> (n = 119); Balta et al.<sup>164</sup> (n = 139); Bolufer et al.<sup>177</sup> (n = 141)). Eine Verteilung der *GSTT1*-Genotypen nach Immunphänotypen wurde nicht dargestellt.<sup>3,177,188,190</sup> Davon ausgenommen sind die von Balta et al.<sup>164</sup> und Stanulla et al.<sup>168</sup> erhobenen Daten, welche sich wie in dieser Arbeit auf ALL-Ersterkrankungen der B-Zellreihe im Kindesalter bezogen. Die von Bolufer et al. untersuchte Patientengruppe bestand zu mehr als der Hälfte aus Erwachsenen (s.u. 5.1.1.2).<sup>177</sup> Im Vergleich zu dieser Studie zeigte der überwiegende Teil an Publikationen bei durchgehend höheren Patientenzahlen eine niedrigere Inzidenz von *GSTT1*\*0/\*0 (11 bis 17%), eine Differenzierung nach Immunphänotypen erfolgte nicht.<sup>1,117,119,120,134,135,166,185,186,193</sup>

Wesentlich häufiger war der Genotyp *GSTT1*\*0/\*0 bei Kindern mit ALL-Ersterkrankung nachweisbar, die in ost- und südostasiatischen Ländern ansässig waren (36 bis 61%).<sup>118,165,187,189</sup> Dies könnte als Hinweis auf ein mit der ethnischen Zugehörigkeit assoziiertes erhöhtes Risiko für ALL bei Vorliegen dieses Genotyps interpretiert werden. Allerdings sollte angemerkt werden, dass Bevölkerungen innerhalb bestimmter Regionen ethnisch durchaus heterogen sein können.

Unterschiede hinsichtlich Größe und Zusammensetzung der Fallgruppen ließen sich auch in diesen vier Studien feststellen. Im Vergleich zu der vorliegenden Untersuchung waren größere Patientenkollektive involviert (<sup>187</sup> n = 135; <sup>165</sup> n = 82; <sup>118</sup> n = 107; <sup>189</sup> n = 67). Takanashi et al.<sup>165</sup> bezogen sich ausschließlich auf BVZ-ALL, während Pakakasama et al.<sup>118</sup> zusätzlich T- und undeterminierte ALL in ihre Untersuchungen einschlossen. Eine Differenzierung nach Immunphänotypen ist bei Haranatha et al.<sup>187</sup> und Wang et al.<sup>189</sup> nicht beschrieben.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen *TEL-AML1*- bzw. *BCR-ABL*-Positivität und *GSTT1*\*0/\*0 war bei Kindern mit ALL-Ersterkrankung in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisbar.

In der gesunden Kontrollgruppe trat *GSTT1*\*0/\*0 mit 20,9% auf und zeigte damit eine ähnliche Inzidenz wie bei BVZ-ALL-Ersterkrankungen (23,3%) und Erstrezidiven von BVZ- und T-ALL im Kindesalter (20,6% bzw. 23,5%). Die in Tabelle 15 dargestellten Studien zeigen trotz teils differierender Methoden, Gruppengrößen und Therapieprotokolle überwiegend vergleichbare Werte.<sup>3,117,119,120,164,166,168,185,187,188,190</sup> Wie unter 5.1.1.2 erläutert, ermittelten Pigullo et al.<sup>185</sup> die Inzidenz der *GSTT1*-Genotypen bei Kindern, die sich wegen nicht-maligner Erkrankungen im Krankenhaus befanden.

Bolufer et al.<sup>177</sup> fanden *GSTT1*\*0/\*0 deutlich seltener (13,7%), wobei die Kontrollgruppe einen noch größeren Anteil an Personen älter als 16 Jahre aufwies als das oben beschriebene Patientenkollektiv mit ALL-Ersterkrankung.

Eine höhere Inzidenz von *GSTT1*\*0/\*0 bei ost- und südostasiatischen Kindern zeigte sich auch bei den gesunden Kontrollen,<sup>118,165,189</sup> was mit den von Rebbeck et al.<sup>108</sup> zusammengefassten Daten vereinbar ist.

Signifikante Unterschiede hinsichtlich der *GSTT1*\*0/\*0-Häufigkeiten bei Patienten mit BVZ-ALL-Ersterkrankung, -Erstrezidiv und bei Gesunden waren in dieser Arbeit nicht nachweisbar. Eine Assoziation zwischen ALL-Risiko und *GSTT1*\*0/\*0 konnte übereinstimmend mit anderen Studien nicht festgestellt werden.<sup>3,117,120</sup> Hingegen fanden Stanulla et al.<sup>168</sup> und Barnette et al.<sup>166</sup> ein reduziertes Risiko für ALL bei Vorliegen von *GSTT1*\*0/\*0, während dieses in der Untersuchung von Bolufer et al.<sup>177</sup> insbesondere bei männlichem Geschlecht erhöht war. Unterschiede zwischen den genannten Publikationen und der vorliegenden Arbeit sind weiter oben in diesem Abschnitt sowie unter 5.1.1.2 erläutert. Einschränkend sei hier nochmals auf die relativ geringe Anzahl von Patienten mit ALL-Ersterkrankung (n = 30) und von gesunden Kontrollen (n = 67) hingewiesen.

Tabelle 15: Übersicht publizierter Daten zur Inzidenz der *GSTT1*-Genotypen bei ALL im Kindesalter

Referenz	Studie: Fälle/Kontrollen	<i>GSTT1</i>	Fälle Gesamt	n (%)	Kontrollen Gesamt	n (%)	P
Chen <sup>120</sup> 1997, USA <sup>1</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0	163	23 (14,1)	213	32 (15)	
Chen <sup>120</sup> 1997, USA <sup>2</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0	34	12 (35,3)	203	49 (24,1)	
Krajinovic <sup>119</sup> 1999, Kanada	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 non-*0/*0	176	28 (15,9) 148 (84,1)	274	47 (17,2) 227 (82,8)	
Stanulla <sup>168</sup> 2000, Deutsch- land <sup>3</sup>	Rezidiv/ Ersterkrankung bzw. Rezidiv > 5 J. <sup>4</sup>	*0/*0 non-*0/*0	64	5 (7,8) 59 (92,2)	64	14 (21,9) 50 (78,1)	0,048
Anderer <sup>134</sup> 2000, Deutschland	Rezidiv/ kein Rezidiv	*0/*0 non-*0/*0	40	1 (2,5) 39 (97,5)	92	12 (13) 80 (87)	0,095
Alves <sup>188</sup> 2002, Portugal	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 non-*0/*0	47	9 (19,2) 38 (80,8)	102	26 (25,5) 76 (74,5)	0,528
Krajinovic <sup>1</sup> 2002, Kanada	Event <sup>5</sup> / kein Event	*0/*0 non-*0/*0	68	8 (11,8) 60 (88,2)	231	34 (14,7) 197 (85,3)	
Davies <sup>117</sup> 2002, USA <sup>1</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0	616	96 (16)	532	87 (16)	0,8
Davies <sup>117</sup> 2002, USA <sup>2</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0	35	6 (17)	201	56 (28)	0,3
Sala <sup>186</sup> 2003, Italien	Ersterkrankung u. Rezidive/keine Kontrollen	*0/*0 non-*0/*0	338	(15,4) (84,6)			
Balta <sup>164</sup> 2003, Türkei	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 non-*0/*0	139	29 (20,9) (B:20; N.-B:17) 110 (79,1)	185	42 (22,7) 143 (77,3)	
Takanashi <sup>165</sup> 2003, Japan	Ersterkrankung <sup>3</sup> / Gesunde (Erw. <sup>6</sup> )	*0/*0	82	(41,5)	47	(36,2)	0,58
Canalle <sup>3</sup> 2004, Brasilien	Ersterkrankung/ Gesunde (Erw. <sup>6</sup> )	*0/*0 non-*0/*0	113	25 (22,1) 88 (77,9)	221	43 (19,5) 178 (80,5)	0,57
Barnette <sup>166</sup> 2004, USA	ALL-Erkrankung (nicht spezifi- ziert)	*0/*0 non-*0/*0	81	9 (11) 72 (89)			0,035
Meissner <sup>193</sup> 2004, Deu- tschland	gute / schlechte Prednison- Antwort	*0/*0 non-*0/*0	367	58 (15,8) 309 (84,2)	53	4 (7,5) 49 (92,5)	0,12
Wang <sup>189</sup> 2004, China	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0	67	(61,19)	146	(49,32)	> 0,05
Pakakasama <sup>118</sup> 2005, Thailand	Ersterkrankung/ Gesunde (Erw. <sup>6</sup> )	*0/*0 non-*0/*0	107	(46,7) (53,3)	320	(38,1) (61,9)	0,12
Rocha <sup>135</sup> 2005, USA	higher-risk arm <sup>7</sup> / lower-risk arm	*0/*0 non-*0/*0	130	20 (15,4) 110 (84,6)	116	20 (17,2) 96 (82,8)	
Aydin- Sayitoglu <sup>190</sup> 2006, Türkei	Ersterkrankung/ Gesunde <sup>8</sup>	*0/*0 non-*0/*0	119	29 (24,4) 90 (75,6)	140	29 (20,7) 111 (79,3)	0,55

Referenz	Studie: Fälle/Kontrollen	GSTTI	Fälle Gesamt	n (%)	Kontrollen Gesamt	n (%)	P
Haranatha <sup>187</sup> 2006, Indien	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 non-*0/*0	135	48 (35,55) 87 (64,44)	146	23 (15,75) 123 (84,24)	0,00013
Bolufer <sup>177</sup> 2007, Spanien	Ersterkrankung/ Gesunde <sup>9</sup>	*0/*0	141	36 (25,5)	455	61 (13,7)	0,001
Pigullo <sup>185</sup> 2007, Italien	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 non-*0/*0	323	44 (14) 279 (86)	384	69 (18) 315 (82)	0,19
Eyada et al. <sup>191</sup> 2007, Ägypten	Ersterkrankung/ Gesunde <sup>10</sup>	*0/*0 non-*0/*0	13	3 (23,1) 10 (76,9)	11	5 (45,5) 6 (54,5)	

Tabellenlegende:

<sup>1</sup> "weiße" Kinder; <sup>2</sup> "schwarze" Kinder; <sup>3</sup> nur BVZ-ALL; <sup>4</sup> Rezidiv > 5 Jahre nach Erstdiagnose, wenn Follow-up mindestens so lange wie Zeitraum zwischen Erst- und Rezidivdiagnose bei Fällen; <sup>5</sup> Event = Rezidiv oder Tod, der Erkrankung zuschreibbar, während oder nach Therapie; <sup>6</sup> Erw. = Erwachsene; <sup>7</sup> Alter < 1 oder > 10 J. (außer DNA-Index  $\geq 1,16$  und  $\leq 1,60$ ); initiale WBC-Zahl  $> 50 \times 10^9/L$  (außer DNA-Index  $\geq 1,16$  und  $\leq 1,60$ ); ZNS-/Testis-Beteiligung;  $> 5\%$  leukämische Blasten im KM an Tag 19; T-ALL; Anwesenheit von *BCR-ABL*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* in BVZ-ALL; <sup>8</sup> durchschnittliches Alter  $28,7 \pm 8,3$  J.; <sup>9</sup> 93 Patienten + 403 Kontrollen  $> 16$  J.; <sup>10</sup> Alter unbekannt

### 5.1.3 GSTMI / GSTTI

#### 5.1.3.1 ALL-Erstrezidiv

Einen Doppelnullegenotyp aus *GSTMI*\*0/\*0 und *GSTTI*\*0/\*0 hatten 13,2% bzw. 17,6% der Kinder mit BVZ- bzw. T-ALL-Erstrezidiv. Keines der Allele war bei 23% (BVZ-ALL) bzw. 5,9% (T-ALL) deletiert. Publierte Daten zur Inzidenz des Doppelnullegenotyps bei ALL-Erstrezidiven im Kindesalter waren nicht zu finden.

Während der genannte Genotyp in dieser Untersuchung nicht mit dem Rezidivrisiko für BVZ- oder T-ALL assoziiert war, stellten Takanashi et al. <sup>165</sup> ein erhöhtes Risiko für frühe BVZ-ALL-Rezidive bei Kindern mit Doppelnullegenotyp fest. Allerdings war die Fallgruppe mit 24 Patienten erheblich kleiner als in dieser Arbeit ( $n = 204$ ), so dass eine eingeschränkte Aussagekraft angenommen werden kann.

Unter Berücksichtigung sowohl der *GSTMI*- als auch der *GSTTI*-Genotypen zeigten sich weder bei BVZ- noch bei T-ALL-Erstrezidiven statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Genkonstellationen und klinischen sowie molekulargenetischen Parametern.

#### 5.1.3.2 ALL-Ersterkrankung und Kontrollgruppe

Im Vergleich zu den Patienten mit ALL-Erstrezidiv (13,2%) war die Inzidenz des Doppelnullegenotyps bei 30 erstmalig an einer BVZ-ALL erkrankten Kindern mit 10% etwas geringer und nahezu identisch bei 67 gesunden Kontrollen (13,4%). Keine Alleldeletion der *GSTMI*-

und *GSTT1*-Genotypen wiesen 16,7% (BVZ-ALL-Ersterkrankung) bzw. 22,4% (Kontrollen) auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war im Zusammenhang mit *GSTM1\*0/\*0 / GSTT1\*0/\*0* nicht zu finden, so dass eine Assoziation mit einem ALL-Risiko nicht anzunehmen ist. Die Daten sollten jedoch an größeren Kollektiven überprüft werden. Vergleichbare Ergebnisse sind mehrfach publiziert (siehe Tabelle 16).<sup>117,164,188</sup> Wie bereits beschrieben, gab es teilweise erhebliche Differenzen bezüglich der Personenzahlen. Das größte Patientenkollektiv wurde von Davies et al. (*Children's Cancer Group, CCG*) untersucht. Sie bestimmten den Doppelnullgenotyp bei 616 „weißen“ und 35 „schwarzen“ Kindern mit ALL-Ersterkrankung. Beide Gruppen zeigten annähernd gleiche Inzidenzen, die sich auch bei den gesunden Kontrollen wiederfanden (jeweils 10%).<sup>117</sup> Hingegen war *GSTM1\*0/\*0 / GSTT1\*0/\*0* in der Studie von Chen et al. bei „schwarzen“ ALL-Patienten signifikant häufiger vertreten als in der gesunden Kontrollgruppe, ein solcher Zusammenhang ließ sich bei „weißen“ Individuen nicht feststellen.<sup>120</sup> Die Anzahl der untersuchten „schwarzen“ Kinder war in beiden Untersuchungen relativ klein (Chen et al.<sup>120</sup>: n = 34; Davies et al.<sup>117</sup>: n = 35). Dadurch wird einerseits das in dieser Population reduzierte Vorkommen von ALL im Kindesalter widerspiegelt, andererseits ist eine Verfälschung der Ergebnisse durch die geringe Gruppengröße und/oder multiple Analysen nicht auszuschließen.<sup>117</sup>

Übereinstimmend mit den Beobachtungen zur Inzidenz von *GSTT1\*0/\*0* war auch *GSTM1\*0/\*0 / GSTT1\*0/\*0* bei in ost- und südostasiatischen Ländern ansässigen ALL-Patienten (23-51%) und gesunden Probanden (22-26%) im Vergleich zu dieser und den anderen genannten Arbeiten wesentlich häufiger zu finden.<sup>118,165,189</sup> Damit einhergehend hatten Kindern mit ALL eine gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Inzidenz von *GSTM1\*0/\*0 / GSTT1\*0/\*0*.<sup>118,189</sup> In der Untersuchung von Takanashi et al., die sich auf den Einfluss von GST-Genotypen auf frühe BVZ-ALL-Rezidive konzentrierte, konnte ein solcher Zusammenhang nicht gezeigt werden.<sup>165</sup> Am seltensten wurde der Doppelnullgenotyp in einer Studie aus Brasilien an 113 Kindern mit ALL-Ersterkrankung und 221 gesunden Kontrollen ermittelt (jeweils 4%). Signifikante Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollgruppen konnten nicht nachgewiesen werden, der Doppelgenotyp war nicht mit der Suszeptibilität für ALL assoziiert.<sup>3</sup>

Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie, die sich auf BVZ-ALL-Ersterkrankungen bezog, wurde die Verteilung der kombinierten *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypen mit Ausnahme der von Takanashi et al.<sup>165</sup> in keiner der in Tabelle 16 aufgeführten Untersuchungen nach Immunphänotypen differenziert.<sup>3,117,118,120,164,188,189</sup>

Die statistische Berechnung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen *GSTMI* / *GSTTI*-Kombinationen und klinischen bzw. molekulargenetischen Parametern bei Kindern mit ALL-Ersterkrankungen. Dies entspricht den von anderen Autoren publizierten Daten.<sup>117,120</sup>

Zusammenfassend ist nicht auszuschließen, dass die beschriebenen differenten Therapieergebnisse von Kindern mit ALL-Ersterkrankung hinsichtlich des Rezidivrisikos sowie des Überlebens auf die verschiedenen angewendeten Therapieprotokolle zurückzuführen sind. Darüber hinaus sind auch populationsbedingte Unterschiede denkbar, wobei die genetische Suszeptibilität für ALL sowie andere zur Leukämogenese beitragende Faktoren durch *GST*-Genotypen möglicherweise beeinflusst werden.

Tabelle 16: Übersicht publizierter Daten zur Inzidenz der *GSTMI* / *GSTTI*-Genotypen bei ALL im Kindesalter (Doppelnull- vs. Non-Doppelnullgenotyp)

Referenz	Studie: Fälle/Kontrollen	<i>GSTMI</i> / <i>GSTTI</i>	Fälle Gesamt	n (%)	Kontrollen Gesamt	n (%)	P
Chen <sup>120</sup> 1997, USA <sup>1</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 / *0/*0	163	10 (6,1)	213	17 (8)	
Chen <sup>120</sup> 1997, USA <sup>2</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 / *0/*0	34	8 (23,5)	203	8 (3,9)	
Alves <sup>188</sup> 2002, Portugal	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 / *0/*0 non- *0/*0 / *0/*0	47	5 (10,6) 42 (89,4)	102	11 (10,8) 91 (89,2)	
Davies <sup>117</sup> 2002, USA <sup>1</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 / *0/*0	616	60 (9,7)	532	53 (10)	1,0
Davies <sup>117</sup> 2002, USA <sup>1</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 / *0/*0	35	3 (8,6)	201	20 (10)	1,0
Balta <sup>164</sup> 2003, Türkei	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 / *0/*0 non- *0/*0 / *0/*0	139	(10,1) 62 (44,6)	185	(13) 84 (45,4)	1
Takanashi <sup>165</sup> 2003, Japan <sup>3</sup>	Ersterkrankung/ Gesunde (Erw. <sup>4</sup> )	*0/*0 / *0/*0 non- *0/*0 / *0/*0	82	(23,2) (41,5)	47	(25,5) (29,8)	0,83 0,19
Canalle <sup>3</sup> 2004, Brasilien	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 / *0/*0	113	5 (4,4)	221	9 (4,1)	0,48
Wang <sup>189</sup> 2004, China	Ersterkrankung/ Gesunde	*0/*0 / *0/*0	67	(50,74)	146	(24,66)	< 0,001
Pakakasama <sup>118</sup> 2005, Thailand	Ersterkrankung/ Gesunde (Erw. <sup>4</sup> )	*0/*0 / *0/*0 non- *0/*0 / *0/*0	107	(32,7) (67,3)	320	(21,6) (78,4)	0,02

Tabellenlegende:

<sup>1</sup> "weiße" Kinder; <sup>2</sup> "schwarze" Kinder; <sup>3</sup> nur BVZ-ALL; <sup>4</sup> Erw. = Erwachsene

## 5.2 *GSTMI*- und *GSTTI*-Polymorphismen und kontinuierliche Variablen bei ALL

### 5.2.1 *GSTMI*

#### 5.2.1.1 BVZ-ALL

Kinder mit BVZ-ALL hatten bei Vorliegen von *GSTMI*\*0/\*0 eine signifikant kürzere Dauer der Erstremission als jene mit *non-GSTMI*\*0/\*0 (28 vs. 32 Monate;  $p = 0,033$ ). Der vollständige Verlust der *GSTMI*-Aktivität führt zu einer ausbleibenden Detoxifizierung und gleichzeitig verstärkter Toxizität von Zytostatika, welche im Rahmen der ALL-Therapie eingesetzt werden. Daher kann bei Nachweis von *GSTMI*\*0/\*0 von einer schlechteren Prognose als bei Anwesenheit mindestens eines *GSTMI*-Allels ausgegangen werden. Hinsichtlich des Alters bei Erst- und Rezidivdiagnose und der initialen Leukozyten (WBC)- bzw. peripheren Blastenzahl (PBC) bei Diagnose konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen *GSTMI*-Genotypen festgestellt werden. Dies steht in Übereinstimmung mit den Resultaten von Takanashi et al.<sup>165</sup> und Stanulla et al.,<sup>168</sup> die ebenfalls Patienten mit BVZ-ALL untersuchten.

#### 5.2.1.2 T-ALL

Ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen *GSTMI*-Genotypen und initialer WBC- bzw. PBC-Zahl oder der Dauer der Erstremission waren bei Kindern mit T-ALL nicht nachweisbar. Hingegen gab es signifikante Unterschiede bei Betrachtung des Alters sowohl bei Erst- als auch bei Rezidivdiagnose. *GSTMI*\*0/\*0 war mit einem höheren Alter bei Erst- und Rezidivdiagnose (10,5 Jahre und 12,5 Jahre) assoziiert als *non-GSTMI*\*0/\*0 (5 Jahre und 7 Jahre;  $p = 0,015$ ). Dies stützt die unter 5.2.1.1.1 geäußerte Vermutung, dass die Deletion beider *GSTMI*-Allele mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, da neben der T-ALL<sup>27,53,61</sup> ein Alter  $< 1$  Jahr<sup>55</sup> bzw.  $> 9$  Jahren<sup>27,53,56</sup> bei Diagnosestellung zu den negativen prognostischen Faktoren der ALL gezählt wird.

In der Untersuchung von Rocha et al. war *GSTMI*\*0/\*0 in der Hochrisikogruppe, die Patienten mit T-ALL einschloss, bei Kindern mit einer initialen WBC-Zahl von mindestens  $100 \times 10^9/L$  signifikant häufiger vertreten als bei jenen mit weniger Leukozyten.<sup>135</sup> Da eine WBC-Zahl  $> 50 \times 10^9/L$  bei Diagnosestellung mit einer schlechteren Prognose verbunden ist,<sup>53</sup> könnte eine Assoziation zwischen *GSTMI*\*0/\*0 und einem erhöhten ALL-Rezidivrisiko angenommen werden. Jedoch blieb der Genotyp *non-GSTMI*\*0/\*0, der in der Rezidivgruppe bereits mit im Vergleich zu *GSTMI*\*0/\*0 deutlich höherer Inzidenz aufgefallen war, nach Anpassung der Leukozytenzahlen und anderer prognostischer Faktoren ein signifikanter Prädiktor für hämatologische Rezidive.<sup>135</sup>

In anderen Untersuchungen ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen *GSTM1*\*0/\*0 und den beschriebenen kontinuierlichen Parametern feststellen. Wie bereits mehrfach erwähnt, wurde dabei auf eine nach Immunphänotypen differenzierte Analyse verzichtet.<sup>117,134,164,177,185,186</sup> Den Boer et al. fanden hinsichtlich der *GSTM*-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen prognostisch günstigen und ungünstigen ALL-Patientengruppen, wobei z.B. ALL-Ersterkrankungen mit –Rezidiven, BVZ-ALL mit T-ALL, Alter zwischen 1 und 10 Jahren mit > 10 Jahren oder niedrige mit hohen WBC-Zahlen verglichen wurden.<sup>155</sup>

## **5.2.2 *GSTT1***

### **5.2.2.1 BVZ-ALL**

Analog zu anderen Studien<sup>117,134,164,177,185,186</sup> erbrachte die statistische Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen *GSTT1*\*0/\*0 und *non-GSTT1*\*0/\*0 bezüglich Alter bei Erst- und Rezidivdiagnose, initialer WBC- und PBC-Zahl und Dauer der Erstremission. Auch in den Untersuchungen von Takanashi et al.<sup>165</sup> und Stanulla et al.,<sup>168</sup> die sich im Gegensatz zu den eben genannten Autoren explizit auf BVZ-ALL bezogen, waren solche Differenzen nicht nachzuweisen. Balta et al., die zwar die Inzidenz der *GST*-Genotypen nach BVZ- bzw. Non-BVZ-ALL getrennt bestimmten, nicht jedoch deren Zusammenhang mit klinischen Parametern, fanden *GSTT1*\*0/\*0 häufiger bei Kindern im Alter von 0 bis 2 Jahren (29%) als bei älteren (2-10 Jahre: 20%; 10-17 Jahre: 19%), eine statistische Signifikanz wurde nicht erreicht.<sup>164</sup>

### **5.2.2.2 T-ALL**

In der vorliegenden Analyse hatten Kinder mit *GSTT1*\*0/\*0, die an einer T-ALL erkrankt waren, eine signifikant längere Dauer der Erstremission von 22 Monaten als jene mit *non-GSTT1*\*0/\*0 (13 Monate), was im Sinne einer protektiven Funktion des Nullgenotyps infolge fehlender Enzymaktivität interpretiert werden könnte. Die verzögerte Ausscheidung von Zytostatika aus der ALL-Therapie führt möglicherweise neben verstärkter Toxizität gleichzeitig zu einer potenteren Wirksamkeit und schützt auf diesem Wege vor frühen Rezidiven. Im Zusammenhang mit weiteren klinischen Parametern konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den *GSTT1*-Genotypen festgestellt werden.

### 5.2.3 *GSTM1* / *GSTT1*

#### 5.2.3.1 BVZ-ALL

Ein Assoziation zwischen *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 und beschriebenen kontinuierlichen Variablen war bei Kindern mit BVZ-ALL nicht detektierbar. In der Untersuchung von Takanashi et al. trat dieser Genotyp mit annähernd statistischer Signifikanz ( $p = 0,06$ ) häufiger bei einer WBC-Zahl  $\geq 50 \times 10^9/L$  auf.<sup>165</sup> Da hohe Leukozytenzahlen bei Diagnose, wie unter 5.2.1.1.2 beschrieben, mit einer schlechteren Prognose einhergehen,<sup>53</sup> könnte *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 als Indikator für ein erhöhtes BVZ-ALL-Rezidivrisiko gewertet werden. Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten ( $n = 82$ ) ist eine sichere statistische Aussage jedoch nicht möglich. Chen et al. fanden eine nicht signifikante Tendenz zu einem vermehrten Auftreten von *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 bei Kindern mit niedriger WBC-Zahl  $< 50 \times 10^9/L$  und prognostisch ungünstigen DNA-Indizes ( $< 1,16$  oder  $> 1,6$ ), wobei gegenüber 170 Patienten mit *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 nur 18 eine vollständige Deletion aller *GSTM1*- und *GSTT1*-Allele aufwiesen. Eine getrennte Betrachtung nach Immunphänotypen erfolgte nicht.<sup>120</sup> Übereinstimmend mit dieser Arbeit konnten Davies et al. bei insgesamt 616 „weißen“ und 35 „schwarzen“ Kindern mit BVZ- oder T-ALL keinen signifikanten Zusammenhang zwischen *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 und klinischen Parametern wie Alter und WBC-Zahl bei Diagnose feststellen.<sup>117</sup>

#### 5.2.3.2 T-ALL

Der Genotyp *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 war bei T-ALL-Patienten mit einer wesentlich längeren Dauer der Erstremission verknüpft als *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 (30 Monate vs. 14 Monate,  $p = 0,015$ ). Dies entspricht den unter 5.2.2.2 beschriebenen Daten zu *GSTT1*\*0/\*0. Da die Erstremission bei Vorliegen von *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 noch länger andauerte als bei *GSTT1*\*0/\*0 allein (22 Monate), könnte eine additive Wirkung zum Schutz vor frühen Rezidiven durch Kombination von *GSTM1*\*0/\*0 und *GSTT1*\*0/\*0 vermutet werden. Die erhobenen Daten sollten jedoch an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden.

Weitere signifikante Unterschiede zwischen *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 und *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 konnten hinsichtlich anderer kontinuierlicher Parameter nicht erhoben werden.

## 5.3 *GSTM1*- und *GSTT1*-Polymorphismen und Langzeitüberleben bei ALL

### 5.3.1 *GSTM1*

#### 5.3.1.1 BVZ-ALL

Innerhalb der Patientengruppe mit BVZ-ALL-Erstrezidiv betrugten 10-Jahres-pEFS und -pSRV 26,6% und 33,8% (*GSTM1\*0/\*0*) bzw. 30,9% und 36,9% (*non-GSTM1\*0/\*0*). Analog zu anderen Studien,<sup>1,117,120,165,186,194</sup> die mit Ausnahme von Takanashi et al.<sup>165</sup> neben BVZ-ALL auch andere Immunphänotypen einbezogen, waren zwischen den *GSTM1*-Genotypen keine signifikanten Unterschiede identifizierbar, *GSTM1\*0/\*0* war kein Prognosefaktor für den Therapieerfolg. In der Untersuchung von Chen et al. ging dieser mit einer Tendenz zu einem geringeren Auftreten von ZNS-Rezidiven einher, statistische Signifikanz wurde nicht erreicht.<sup>120</sup> Hall et al. fanden ein signifikant schlechteres EFS bei ALL-Patienten mit *GSTM*-positiven Blasten, wobei eine Differenzierung nach *GSTM*-Isoformen nicht durchgeführt wurde. Zudem sei auf die relativ kleine Fallgruppe, bestehend aus insgesamt 72 Kindern, davon 44 *GSTM*-negativ und 27 -positiv, sowie die differierende Methodik hingewiesen. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurde zur Darstellung der *GST*-Expression in Blasten von Kindern mit ALL eine immunhistochemische Technik angewendet.<sup>132</sup>

#### 5.3.1.2 T-ALL

Die statistische Analyse zeigte auch in dieser Patientengruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den *GSTM1*-Genotypen. Der Therapieerfolg wurde weder durch *GSTM1\*0/\*0* noch durch *non-GSTM1\*0/\*0* beeinflusst. Im Vergleich zu den Kindern mit BVZ-ALL hatten jene mit T-ALL-Erstrezidiv unabhängig vom Genotyp eine wesentlich schlechtere 10-Jahres-pEFS und -pSRV (*GSTM1\*0/\*0*: pEFS und pSRV jeweils 8%, *GSTM1\*1/\*0* bzw. *GSTM1\*1/\*1*: pEFS und pSRV jeweils 11%), was mit anderen publizierten Daten vereinbar ist. Sowohl bei ALL allgemein<sup>27,53,61</sup> als auch speziell bei deren Rezidiven<sup>67,195</sup> ist dieser Immunphänotyp mehrfach mit einer ungünstigen Prognose in Verbindung gebracht worden. Die hier beschriebenen Ergebnisse sollten an einer größeren Fallgruppe bestätigt werden.

### 5.3.2 *GSTT1*

#### 5.3.2.1 BVZ-ALL

Das Überleben von Kindern mit BVZ-ALL-Erstrezidiv war mit keinem der *GSTT1*-Genotypen in signifikantem Maße assoziiert. Patienten mit *GSTT1\*0/\*0* hatten eine bessere pEFS (33,3%) und pSRV (40,5%) als jene mit *GSTM1\*0/\*0*, die für *non-GSTT1\*0/\*0* ermittelten Resultate (27,3% bzw. 34%) waren mit jenen für *non-GSTM1\*0/\*0* vergleichbar. Auch

in anderen Studien wurde kein signifikanter Effekt der *GSTT1*-Genotypen auf EFS und/oder SRV gefunden.<sup>1,117,120,165,186</sup>

### 5.3.2.2 T-ALL

In dieser Gruppe wurde das Überleben durch die *GSTT1*-Genotypen nicht signifikant beeinflusst. Eine Tendenz zu einem besseren SRV bei Vorliegen von *GSTT1*\*0/\*0 ( $p = 0,075$ ) konnte jedoch gezeigt werden und ist mit der unter 5.2.2.2 erläuterten Vermutung zur Schutzfunktion dieses Genotyps vereinbar. *GSTT1*\*0/\*0 und *non-GSTT1*\*0/\*0 gingen mit einer pEFS und pSRV von jeweils 12,5% bzw. 3,8% einher. Analog zu den für die *GSTM1*-Genotypen erhobenen Daten hatten Kinder aus dieser Gruppe eine deutlich schlechtere Heilungschance als jene mit BVZ-ALL-Erstrezidiv, was erneut die ungünstige Prognose der T-ALL widerspiegelte. Verglichen mit *GSTM1*\*0/\*0 nahmen EFS und SRV bei *GSTT1*\*0/\*0 etwas höhere Werte an. Im Gegensatz zu der unter 5.3.2.1 beschriebenen Beobachtung war *non-GSTT1*\*0/\*0 jedoch mit einer wesentlich schlechteren Heilungschance von Patienten mit T-ALL-Erstrezidiv assoziiert als *non-GSTM1*\*0/\*0 (3,8% vs. 11%). Die unter 5.1.2.1 geäußerte Vermutung einer schlechteren Prognose bei Vorliegen mindestens eines *GSTT1*-Allels könnte dadurch gestützt werden. Aufgrund der kleinen Fallzahl sind die Ergebnisse statistisch allerdings nur bedingt aussagekräftig und bedürfen der Überprüfung an einem größeren Patientenkollektiv.

## 5.3.3 *GSTM1* / *GSTT1*

### 5.3.3.1 BVZ-ALL

Übereinstimmend mit den beschriebenen Ergebnissen zu den einzelnen *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypen waren auch zwischen *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 und *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Überlebens nachzuweisen. Die 10-Jahres-pEFS und -pSRV waren vergleichbar mit den bei Kindern mit BVZ-ALL-Erstrezidiv für die *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypen ermittelten Daten (*GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0: 29,6% bzw. 36,7%, *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0: 28,4% bzw. 34,5%). Hingegen beobachteten Takanashi et al. ein gegenüber *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 signifikant schlechteres EFS und SRV bei Vorliegen von *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0. Als Ursache wurde dabei eher das häufige Auftreten von frühen Rezidiven als ein Therapieversagen im Sinne von Toxizität oder Tod vermutet. Von insgesamt 82 Patienten erlitten 24 ein Rezidiv, davon 12 früh (< 30 Monate nach Therapiebeginn). Die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Arbeit ist sowohl aufgrund der erheblich kleineren Fallzahl als auch wegen der differie-

renden Beobachtungszeiträume eingeschränkt. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Heilungschance und *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 ließ sich bei 7 Jahren zunächst nur für das SRV darstellen. Das EFS war lediglich bei 3 Jahren in signifikantem Maße reduziert.<sup>165</sup> Wie in dieser Studie hatten die verschiedenen Kombinationen aus *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypen in anderen Untersuchungen unabhängig vom Immunphänotyp keinen signifikanten Effekt auf EFS und/oder SRV von Kindern mit ALL.<sup>117,120</sup>

### 5.3.3.2 T-ALL

Zwischen den verschiedenen *GSTM1*-/*GSTT1*-Konstellationen und der pEFS waren keine signifikanten Zusammenhänge zu finden. Die erhobenen Daten näherten sich am ehesten jenen zu den *GSTT1*-Genotypen an (*GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0: 16,7%, *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0: 3,6%).

Eine signifikant bessere pSRV von 16,7% konnte in dieser Patientengruppe bei Vorliegen von *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 gezeigt werden, während *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 mit einer ähnlich niedrigen pSRV (3,6%) wie *GSTT1*\*0/\*0 assoziiert war. In Anbetracht der Tatsache, dass *GSTT1*\*0/\*0 allein bereits zu einer annähernd signifikanten Verbesserung des Überlebens bei Kindern mit T-ALL-Erstrezidiv führte (siehe Kapitel 5.3.2.2), ist ein additiver Effekt durch Kombination mit *GSTM1*\*0/\*0 anzunehmen. Ursachen könnten in einer sich überschneidenden Substratspezifität von Enzymen beider GST-Klassen liegen. Möglicherweise kann erst durch Deletion sämtlicher Allele von *GSTM1* und *GSTT1* mit Ausbleiben des Detoxifizierungsprozesses eine vollständige Wirkungsentfaltung eines oder mehrerer in der ALL-Therapie verwendeten Zytostatika erreicht werden. Die weitere Erforschung von Substraten der GST sowie die Bestätigung der erhobenen Daten an einer größeren Patientengruppe ist erforderlich, um eine bessere Prognose für Kinder mit ALL-Rezidiven erreichen zu können.

## 5.4 Bedeutung von GST in der Konjugationsreaktion mit Alkylanzien

Im Rahmen der ALL-Therapie nehmen Alkylanzien eine wichtige Stellung ein. Die Resistenz gegenüber Alkylanzien hängt nur selten von einer erhöhten Expression des MDR1-Gens ab.<sup>133,146</sup> Die Glutathion-Konjugation von Alkylanzien, nicht-enzymatisch oder durch GST vermittelt, trägt zur Entwicklung einer „Resistenz“ bei. Erhöhte zelluläre GST- und/oder GDH-Spiegel in Tumorzellen sind beobachtet worden, wobei von einer Folge des durch die antineoplastische Therapie ausgelösten Selektionsdruckes ausgegangen wird.<sup>144,196</sup>

### 5.4.1 GSTM1

GSTM1 katalysiert neben GST der alpha (GSTA1\*1)- und weniger der pi-Klasse (GSTP1\*1) die Entgiftung von Chlorambucil und Melphalan durch Bildung von Monoglutathionyl-Chlorambucil (GSCB) und –Melphalan (GM).<sup>147</sup> Die gebildeten Glutathion-Konjugate führen wiederum zu einer Hemmung der katalytischen Aktivität von GST der drei genannten Klassen.<sup>148</sup> Zudem ist GSTM an dem Metabolismus von Cyclophosphamid (CP) beteiligt. In der Leber wird dieses mittels Hydroxilierung zu 4-Hydroxy-CP (4-HOCP) durch die Cytochrome P4502B und P4502C aktiviert.<sup>149</sup> Spontaner Zerfall führt zur Entstehung der therapeutisch wirksamen zytotoxischen Metabolite N-Lost-Phosphorsäurediamid (PM) und Acrolein. Das reaktive Agens ist ein Aziridinium-Ion, welches mit Nukleophilen reagiert. Die Bildung dieses Ions stellt in allen Reaktionen mit Nukleophilen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Folgende Glutathion-Verbindungen mit PM und CP sind beschrieben: Mono- und Di-Glutathionyl-PM sowie 4-GSCP,<sup>133,146</sup> dessen Synthese durch GSTM1A\*1A sowie GSTA1\*1, GSTA2\*2 und GSTP1\*1 katalysiert wird.<sup>133</sup>

### 5.4.2 GSTT1

GSTT1\*1 katalysiert die Bildung Monoglutathionyl-Verbindungen mit Ifosfamid und Thiotepa.<sup>172</sup> Über die Bedeutung von GSTT1 in Tumoren und die Entwicklung von Resistenzen ist bisher nur wenig bekannt. Es konnte jedoch in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass der *GSTT1*-Polymorphismus die Rate des Schwester-Chromatid-Austauschs (*sister chromatid exchanges*, SCE) beeinflusst.<sup>173,174,197</sup> Es wird schlussfolgernd angenommen, dass GSTT1 eine protektive Wirkung auf genotoxische Schäden ausübt. So könnte die SCE-Rate durch Entgiftung von Ethylenoxid, ein Epoxid, welches endogen aus Ethylen gebildet wird, reduziert werden. Im Gegensatz zu den GST der  $\mu$ -Klasse wird die katalytische Aktivität von GSTT1 durch konjugierte Glutathion-Produkte nicht inhibiert.<sup>148</sup>

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Akute lymphoblastische Leukämien (ALL) sind die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Dank der kontinuierlichen Weiterentwicklung von Therapieprotokollen konnten in den vergangenen Jahrzehnten zwar stetig zunehmende Heilungsraten erreicht werden, jedoch erleiden noch immer 20 bis 30% der Patienten ein Rezidiv. Da Rezidive mit einer erhöhten Resistenz von Leukämiezellen gegenüber verschiedenen in der ALL-Behandlung zum Einsatz kommenden Substanzen einhergehen, stellen sie eine besondere therapeutische Herausforderung dar. Polymorphismen Arzneimittel-metabolisierender Enzymsysteme bewirken eine erhebliche interindividuelle Variabilität bei der Aktivierung und Detoxifizierung von Zytostatika, wodurch sowohl das Risiko an einer ALL zu erkranken als auch der Erfolg einer ALL-Behandlung beeinflusst werden kann.

In dieser Dissertation wurden die Genotypen der Glutathion-S-Transferasen der  $\mu$ - und  $\theta$ -Klasse als wesentliche Vertreter Arzneimittel-metabolisierender Enzymsysteme der Phase II bestimmt und ihre klinische Relevanz bei ALL-Erstrezidiven ( $n = 238$ ) im Kindesalter untersucht. Vergleichend wurden ALL-Erstkrankungen ( $n = 32$ ) und gesunde Kontrollen ( $n = 67$ ) gegenübergestellt. Die Inzidenzen der *GST*-Genotypen *GSTM1*\*0/\*0 und *non-GSTM1*\*0/\*0, *GSTT1*\*0\*0 und *non-GSTT1*\*0/\*0 sowie *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 und *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 wurden mittels Multiplex-PCR bestimmt und nach Immunphänotypen differenziert statistisch ausgewertet.

Innerhalb der Patientengruppe mit Erstrezidiv einer B-Vorläuferzell (BVZ)-ALL ( $n = 204$ ) wurden die Nullgenotypen *GSTM1*\*0/\*0, *GSTT1*\*0/\*0 und *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 mit 53,4%, 20,6% und 13,2% nachgewiesen. Kinder mit *GSTM1*\*0/\*0 hatten eine signifikant kürzere Dauer der Erstremission als jene mit *non-GSTM1*\*0/\*0 (28 Monate vs. 32 Monate,  $p = 0,033$ ). Hinsichtlich Geschlecht, Zeitpunkt und Ort des Rezidivs, Strategiegruppen, Response, Knochenmarktransplantation, Ereignis und *TEL-AML1*- bzw. *BCR-ABL*-Positivität konnten zwischen den jeweiligen Null- und Non-Nullgenotypen bzw. den einzelnen Genkonstellationen bei Berücksichtigung der Genotypen von *GSTM1* und *GSTT1* keine statistisch signifikanten Differenzen festgestellt werden. *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypen sowie deren Kombinationen waren weder mit dem Alter bei Erst- oder Rezidivdiagnose noch mit der initialen WBC- oder PBC-Zahl in signifikantem Maße assoziiert. Auch die 10-Jahres-pEFS und -pSRV von Kindern mit BVZ-ALL-Erstrezidiv wurden durch die verschiedenen Genotypen nicht signifikant beeinflusst.

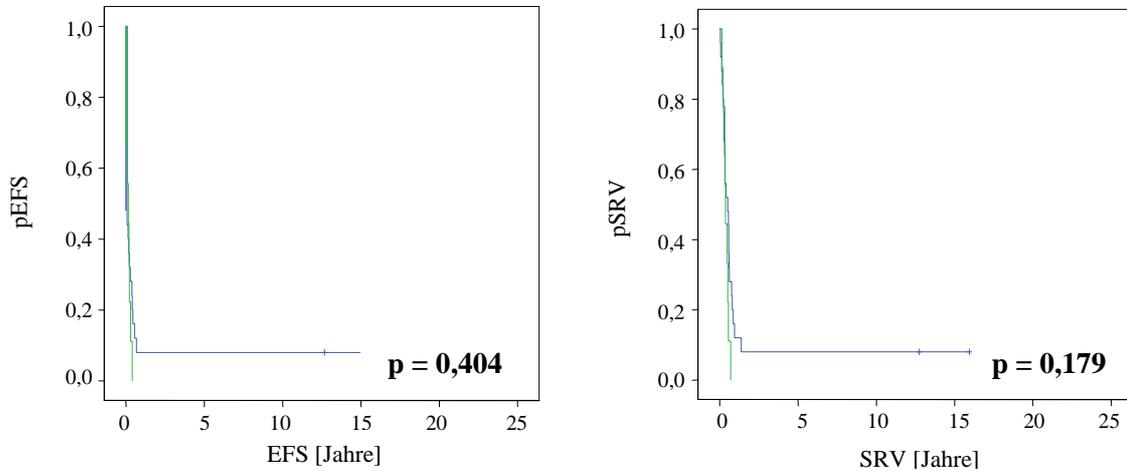
Bei Patienten mit T-ALL-Erstrezidiv (n = 34) lag die Inzidenz von *GSTM1*\*0/\*0, *GSTT1*\*0/\*0 und *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 bei 73,5%, 23,5% und 17,6%. Kinder mit frühen und sehr frühen Rezidiven hatten signifikant häufiger den Genotyp *non-GSTT1*\*0/\*0 (87,5% bzw. 82,6%, p = 0,05), während all jene mit späten Rezidiven *GSTT1*\*0/\*0 aufwiesen. In der Hochrisikogruppe der Studie ALL-REZ-BFM war der Genotyp *non-GSTT1*\*0/\*0, in der Intermediärrisikogruppe hingegen *GSTT1*\*0/\*0 mit der höchsten Inzidenz vertreten (80,6% bzw. 66,7%; p = 0,065). Dieser war zudem mit einer signifikant längeren Dauer der Erstremission (22 Monate) assoziiert als *non-GSTT1*\*0/\*0 (13 Monate; p = 0,031). Auch die Erstremissionsdauer der Patienten mit *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 war signifikant länger (30 Monate) als jener mit *non-GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0 (14 Monate; p = 0,015). Sowohl bei Erst- als auch bei Rezidivdiagnose einer T-ALL waren Kinder mit *GSTM1*\*0/\*0 (10,5 Jahre und 12,5 Jahre) signifikant älter als jene mit *non-GSTM1*\*0/\*0 (5 Jahre und 7 Jahre; jeweils p = 0,015).

Während bei Vorliegen von *GSTT1*\*0/\*0 zunächst eine Tendenz zu einer besseren 10-Jahres-pSRV zu beobachten war (p = 0,075), war diese bei Kombination mit *GSTM1*\*0/\*0 signifikant besser (p = 0,048). Eine statistisch signifikante Assoziation zwischen den *GSTM1*-Genotypen und den Heilungsraten konnte nicht gezeigt werden.

Von den Patienten, die erstmals an einer BVZ-ALL (n = 30) erkrankt waren, hatten 60% den Genotyp *GSTM1*\*0/\*0, 23,3% *GSTT1*\*0/\*0 und 10% *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0. Assoziationen mit Fusionsgenen waren nicht nachweisbar. In der gesunden Kontrollgruppe (n = 67) wurden ähnliche Inzidenzen der Nullgenotypen ermittelt (*GSTM1*\*0/\*0: 52,2%; *GSTT1*\*0/\*0: 20,9%; *GSTM1*\*0/\*0 / *GSTT1*\*0/\*0: 16,4%).

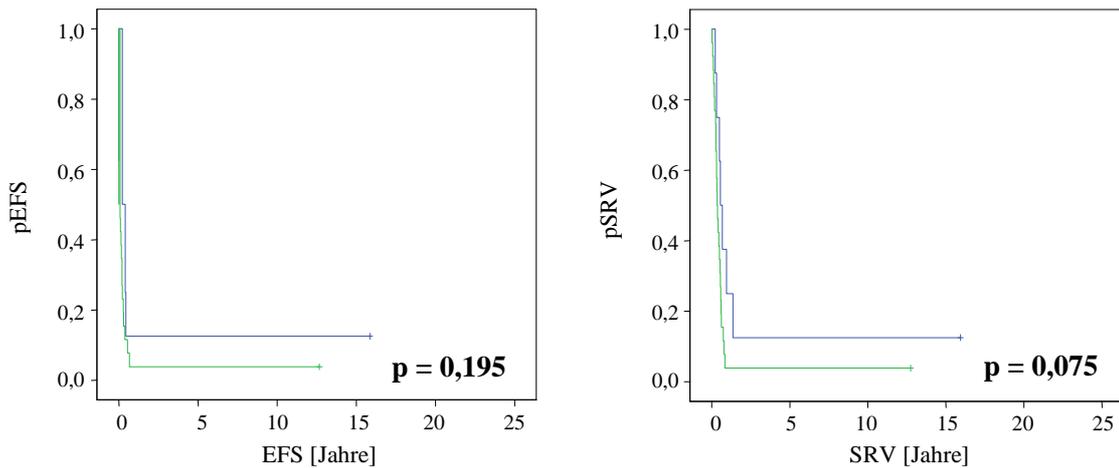
Zusammenfassend weisen die Resultate auf eine Assoziation von *GSTM1*\*0/\*0 mit einem erhöhten Risiko für ALL-Ersterkrankungen und -Rezidive sowie mit einer schlechteren Prognose insbesondere bei Rezidiven einer T-ALL hin. Hingegen scheint *GSTT1*\*0/\*0 gegenüber frühen Rezidiven dieses Immunphänotyps eine protektive Funktion zu erfüllen und ein besseres Gesamtüberleben von Kindern mit T-ALL-Rezidiven zu ermöglichen. Ein additiver positiver Effekt auf das Überleben von Kindern mit ALL-Rezidiven bei gleichzeitigem Auftreten von *GSTM1*\*0/\*0 und *GSTT1*\*0/\*0 ist anzunehmen. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten sollten an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden, um sich dem Ziel einer individualisierten ALL-Therapie mit größerer Effektivität bei gleichzeitig reduzierter Toxizität in Zukunft weiter annähern zu können.

## 7. ANHANG



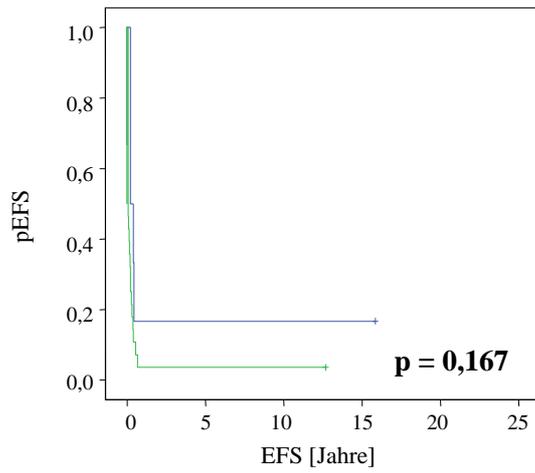
<i>GSTM1</i>	n	zensiert	pEFS	zensiert	pSRV
— *0/*0	25	2	0,08 ± 0,054	2	0,08 ± 0,054
— non-*0/*0	9	0	0,111 ± 0,105	0	0,111 ± 0,105

Abbildung I: Kaplan-Meier-Kurven des 10-Jahres-EFS und -SRV von Kindern mit Erstrezidiv einer T-ALL nach *GSTM1*-Genotyp (ALL-REZ BFM)



<i>GSTT1</i>	n	zensiert	pEFS	zensiert	pSRV
— *0/*0	8	1	0,125 ± 0,117	1	0,125 ± 0,117
— non-*0/*0	26	1	0,038 ± 0,038	1	0,038 ± 0,038

Abbildung II: Kaplan-Meier-Kurven des 10-Jahres-EFS und -SRV von Kindern mit Erstrezidiv einer T-ALL nach *GSTT1*-Genotyp (ALL-REZ BFM)



<i>GSTM1 / GSTT1</i>	n	zensiert	pEFS
— *0/*0	6	1	0,167 ± 0,152
— non-*0/*0	28	1	0,036 ± 0,035

Abbildung III: Kaplan-Meier-Kurve des 10-Jahres-EFS von Kindern mit Erstrezidiv einer T-ALL nach *GSTM1 / GSTT1*-Genotyp (ALL-REZ BFM)

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Krajinovic M, Labuda D, Mathonnet G, et al. Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8:802-10.
2. da Silva Silveira V, Canalle R, Scrideli CA, et al. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and DNA repair genes and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2009;33:898-901.
3. Canalle R, Burim RV, Tone LG, Takahashi CS. Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environ Mol Mutagen* 2004;43:100-9.
4. Sinnott D, Krajinovic M, Labuda D. Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2000;38:447-62.
5. Conter V, Arico M, Valsecchi MG, et al. Intensive BFM chemotherapy for childhood ALL: interim analysis of the AIEOP-ALL 91 study. *Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica. Haematologica* 1998;83:791-9.
6. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 2000;95:3310-22.
7. Uckun FM, Nachman JB, Sather HN, et al. Clinical significance of Philadelphia chromosome positive pediatric acute lymphoblastic leukemia in the context of contemporary intensive therapies: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 1998;83:2030-9.
8. Tsurusawa M, Katano N, Yamamoto Y, et al. Improvement in CNS protective treatment in non-high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: report from the Japanese Children's Cancer and Leukemia Study Group. *Med Pediatr Oncol* 1999;32:259-6.
9. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 2001;97:1211-8.
10. Silverman LB, Sallan SE. Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment. *Curr Opin Hematol* 2003;10:290-6.
11. Silverman LB, Declerck L, Gelber RD, et al. Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995). *Leukemia* 2000;14:2247-56.
12. Moghrabi A, Levy DE, Asselin B, et al. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007;109:896-904.
13. Gustafsson G, Kreuger A, Clausen N, et al. Intensified treatment of acute childhood lymphoblastic leukaemia has improved prognosis, especially in non-high-risk patients: the Nordic experience of 2648 patients diagnosed between 1981 and 1996. *Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology (NOPHO). Acta Paediatr* 1998;87:1151-61.
14. Pulte D, Gondos A, Brenner H. Trends in 5- and 10-year survival after diagnosis with childhood hematologic malignancies in the United States, 1990-2004. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1301-9.
15. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al. Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children. *JAMA* 2003;290:2001-7.
16. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 2004;104:2690-6.
17. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006;354:166-78.

18. Conter V, Arico M, Valsecchi MG, et al. Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) acute lymphoblastic leukemia studies, 1982-1995. *Leukemia* 2000;14:2196-204.
19. Gaynon PS, Trigg ME, Heerema NA, et al. Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. *Leukemia* 2000;14:2223-33.
20. Kamps WA, Bokkerink JP, Hakvoort-Cammel FG, et al. BFM-oriented treatment for children with acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation and treatment reduction for standard risk patients: results of DCLSG protocol ALL-8 (1991-1996). *Leukemia* 2002;16:1099-111.
21. Gustafsson G, Schmiegelow K, Forestier E, et al. Improving outcome through two decades in childhood ALL in the Nordic countries: the impact of high-dose methotrexate in the reduction of CNS irradiation. Nordic Society of Pediatric Haematology and Oncology (NOPHO). *Leukemia* 2000;14:2267-75.
22. Bajel A, George B, Mathews V, et al. Treatment of children with acute lymphoblastic leukemia in India using a BFM protocol. *Pediatr Blood Cancer* 2008;51:621-5.
23. Stanulla M, Schrappe M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2009;46:52-63.
24. Pui CH. Recent advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Formos Med Assoc* 2004;103:85-95.
25. Harms DO, Janka-Schaub GE. Co-operative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia (COALL): long-term follow-up of trials 82, 85, 89 and 92. *Leukemia* 2000;14:2234-9.
26. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998;339:605-15.
27. Felix CA, Lange BJ, Chessells JM. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Challenges and Controversies in 2000. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2000:285-302.
28. Karathanasis NV, Choumerianou DM, Kalmanti M. Gene polymorphisms in childhood ALL. *Pediatr Blood Cancer* 2009;52:318-23.
29. Miller RW. Genetics of leukemia: epidemiologic aspects. *Jinrui Idengaku Zasshi* 1968;13:100-3.
30. Shimizu Y, Schull WJ, Kato H. Cancer risk among atomic bomb survivors. The RERF Life Span Study. Radiation Effects Research Foundation. *JAMA* 1990;264:601-4.
31. Harvey EB, Boice JD, Jr., Honeyman M, Flannery JT. Prenatal x-ray exposure and childhood cancer in twins. *N Engl J Med* 1985;312:541-5.
32. MacMahon B. Prenatal x-ray exposure and twins. *N Engl J Med* 1985;312:576-7.
33. Klein G, Michaelis J, Spix C, et al. Second malignant neoplasms after treatment of childhood cancer. *Eur J Cancer* 2003;39:808-17.
34. Mike V, Meadows AT, D'Angio GJ. Incidence of second malignant neoplasms in children: results of an international study. *Lancet* 1982;2:1326-31.
35. Hawkins MM, Wilson LM, Stovall MA, et al. Epipodophyllotoxins, alkylating agents, and radiation and risk of secondary leukaemia after childhood cancer. *BMJ* 1992;304:951-8.
36. Meinert R, Schuz J, Kaletsch U, Kaatsch P, Michaelis J. Leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a register-based case-control study in Germany. *Am J Epidemiol* 2000;151:639-46; discussion 47-50.
37. Shu XO, Stewart P, Wen WQ, et al. Parental occupational exposure to hydrocarbons and risk of acute lymphocytic leukemia in offspring. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:783-91.
38. Bunin GR. Nongenetic causes of childhood cancers: evidence from international variation, time trends, and risk factor studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199:91-103.
39. Colt JS, Blair A. Parental occupational exposures and risk of childhood cancer. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 3:909-25.

40. Loning L, Zimmermann M, Reiter A, et al. Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy. *Blood* 2000;95:2770-5.
41. Tucker MA, Meadows AT, Boice JD, Jr., et al. Leukemia after therapy with alkylating agents for childhood cancer. *J Natl Cancer Inst* 1987;78:459-64.
42. Sasco AJ, Vainio H. From in utero and childhood exposure to parental smoking to childhood cancer: a possible link and the need for action. *Hum Exp Toxicol* 1999;18:192-201.
43. Hasle H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *The lancet oncology* 2001;2:429-36.
44. Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet* 2000;355:165-9.
45. Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, et al. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia* 2000;14:1939-43.
46. Schrappe M, Camitta B, Pui CH, et al. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000;14:2193-4.
47. Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, et al. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998;16:3774-81.
48. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352:1731-8.
49. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suci S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med* 1998;339:591-8.
50. Coustan-Smith E, Gajjar A, Hijiya N, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse. *Leukemia* 2004;18:499-504.
51. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:1901-28.
52. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96:2691-6.
53. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003:102-31.
54. 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;9:1985-9.
55. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia* 2000;14:2205-22.
56. Silverman LB, McLean TW, Gelber RD, et al. Intensified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia: results from the Dana-Farber Cancer Institute Consortium. *Cancer* 1997;80:2285-95.
57. Beyermann B, Adams HP, Henze G. Philadelphia chromosome in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: a matched-pair analysis. Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *J Clin Oncol* 1997;15:2231-7.
58. Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002;359:1909-15.

59. Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL, et al. Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood* 1996;87:2870-7.
60. Uckun FM, Sensel MG, Sather HN, et al. Clinical significance of translocation t(1;19) in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of contemporary therapies: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 1998;16:527-35.
61. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2000;342:998-1006.
62. Silveira VD, Canalle R, Scrideli CA, et al. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and DNA repair genes and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2009.
63. Henze G, Fengler R, Hartmann R, Niethammer D, Schellong G, Riehm H. BFM group treatment results in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematology and blood transfusion* 1990;33:619-26.
64. Gaynon PS, Qu RP, Chappell RJ, et al. Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse--the Children's Cancer Group Experience. *Cancer* 1998;82:1387-95.
65. Henze G, Fengler R, Hartmann R, et al. Six-year experience with a comprehensive approach to the treatment of recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL-REZ BFM 85). A relapse study of the BFM group. *Blood* 1991;78:1166-72.
66. Buhner C, Hartmann R, Fengler R, et al. Superior prognosis in combined compared to isolated bone marrow relapses in salvage therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1993;21:470-6.
67. Henze G. Childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 1997;33:8-9.
68. Buchanan GR, Rivera GK, Pollock BH, et al. Alternating drug pairs with or without periodic reinduction in children with acute lymphoblastic leukemia in second bone marrow remission: a Pediatric Oncology Group Study. *Cancer* 2000;88:1166-74.
69. Griffin TC, Shuster JJ, Buchanan GR, Murphy SB, Camitta BM, Amylon MD. Slow disappearance of peripheral blood blasts is an adverse prognostic factor in childhood T cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 2000;14:792-5.
70. Rivera GK, Hudson MM, Liu Q, et al. Effectiveness of intensified rotational combination chemotherapy for late hematologic relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;88:831-7.
71. Sadowitz PD, Smith SD, Shuster J, Wharam MD, Buchanan GR, Rivera GK. Treatment of late bone marrow relapse in children with acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1993;81:602-9.
72. Eckert C, Biondi A, Seeger K, et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2001;358:1239-41.
73. 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;91:1716-22.
74. Seeger K, Buchwald D, Peter A, et al. TEL-AML1 fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999;94:374-6.
75. 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;19:3188-93.
76. Klumper E, Pieters R, Veerman AJ, et al. In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;86:3861-8.
77. Klumper E, Giaccone G, Pieters R, et al. Topoisomerase II alpha gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1995;9:1653-60.

78. Borgmann A, Hartmann R, Schmid H, et al. Isolated extramedullary relapse in children with acute lymphoblastic leukemia: a comparison between treatment results of chemotherapy and bone marrow transplantation. *BFM Relapse Study Group. Bone Marrow Transplant* 1995;15:515-21.
79. Pui CH, Jeha S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:149-65.
80. Thomas FJ, McLeod HL, Watters JW. Pharmacogenomics: the influence of genomic variation on drug response. *Curr Top Med Chem* 2004;4:1399-409.
81. Evans DA, McLeod HL, Pritchard S, Tariq M, Mobarek A. Interethnic variability in human drug responses. *Drug Metab Dispos* 2001;29:606-10.
82. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003;348:538-49.
83. Bosch TM. Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes and drug transporters in chemotherapy. *Methods Mol Biol* 2008;448:63-76.
84. Bosch TM, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer. *Clin Pharmacokinet* 2006;45:253-85.
85. Roses AD. Pharmacogenetics. *Hum Mol Genet* 2001;10:2261-7.
86. Ryberg D, Skaug V, Hewer A, et al. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 1997;18:1285-9.
87. Ford JG, Li Y, O'Sullivan MM, et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and lung cancer risk in African-Americans. *Carcinogenesis* 2000;21:1971-5.
88. Lee KM, Kang D, Lee SJ, et al. Interactive effect of genetic polymorphism of glutathione S-transferase M1 and smoking on squamous cell lung cancer risk in Korea. *Oncol Rep* 2006;16:1035-9.
89. Salagovic J, Kalina I, Stubna J, et al. Genetic polymorphism of glutathione S-transferases M1 and T1 as a risk factor in lung and bladder cancers. *Neoplasma* 1998;45:312-7.
90. Kelsey KT, Spitz MR, Zuo ZF, Wiencke JK. Polymorphisms in the glutathione S-transferase class mu and theta genes interact and increase susceptibility to lung cancer in minority populations (Texas, United States). *Cancer Causes Control* 1997;8:554-9.
91. Lafuente A, Maristany M, Arias C, et al. Glutathione and glutathione S-transferases in human squamous cell carcinomas of the larynx and GSTM1 dependent risk. *Anticancer Res* 1998;18:107-11.
92. Abdel-Rahman SZ, Anwar WA, Abdel-Aal WE, Mostafa HM, Au WW. GSTM1 and GSTT1 genes are potential risk modifiers for bladder cancer. *Cancer detection and prevention* 1998;22:129-38.
93. Katoh T, Inatomi H, Kim H, Yang M, Matsumoto T, Kawamoto T. Effects of glutathione S-transferase (GST) M1 and GSTT1 genotypes on urothelial cancer risk. *Cancer Lett* 1998;132:147-52.
94. Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D, et al. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet* 2005;366:649-59.
95. Karagas MR, Park S, Warren A, et al. Gender, smoking, glutathione-S-transferase variants and bladder cancer incidence: a population-based study. *Cancer Lett* 2005;219:63-9.
96. Brockmoller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res* 1996;56:3915-2.
97. Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR, Spurr NK. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993;14:1821-4.

98. Katoh T, Nagata N, Kuroda Y, et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 1996;17:1855-9.
99. Lafuente A, Molina R, Palou J, Castel T, Moral A, Trias M. Phenotype of glutathione S-transferase Mu (GSTM1) and susceptibility to malignant melanoma. MMM group. Multidisciplinary Malignant Melanoma Group. *Br J Cancer* 1995;72:324-6.
100. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Char D, Spitz MR, Wei Q. Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* 1999;84:220-4.
101. Martinez C, Martin F, Fernandez JM, et al. Glutathione S-transferases mu 1, theta 1, pi 1, alpha 1 and mu 3 genetic polymorphisms and the risk of colorectal and gastric cancers in humans. *Pharmacogenomics* 2006;7:711-8.
102. Deakin M, Elder J, Hendrickse C, et al. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis* 1996;17:881-4.
103. Zhang H, Ahmadi A, Arbman G, et al. Glutathione S-transferase T1 and M1 genotypes in normal mucosa, transitional mucosa and colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1999;84:135-8.
104. Kempkes M, Golka K, Reich S, Reckwitz T, Bolt HM. Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes as potential risk factors for urothelial cancer of the bladder. *Arch Toxicol* 1996;71:123-6.
105. Sweeney C, Farrow DC, Schwartz SM, Eaton DL, Checkoway H, Vaughan TL. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms as risk factors for renal cell carcinoma: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:449-54.
106. Elexpuru-Camiruaga J, Buxton N, Kandula V, et al. Susceptibility to astrocytoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTT1 and GSTM1) and cytochrome P-450 (CYP2D6) loci. *Cancer Res* 1995;55:4237-9.
107. Kelsey KT, Wrensch M, Zuo ZF, Miike R, Wiencke JK. A population-based case-control study of the CYP2D6 and GSTT1 polymorphisms and malignant brain tumors. *Pharmacogenetics* 1997;7:463-8.
108. Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:733-43.
109. Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, et al. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis* 2004;25:973-8.
110. Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, et al. GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *Int J Cancer* 2004;110:598-604.
111. Lazarus P, Sheikh SN, Ren Q, et al. p53, but not p16 mutations in oral squamous cell carcinomas are associated with specific CYP1A1 and GSTM1 polymorphic genotypes and patient tobacco use. *Carcinogenesis* 1998;19:509-14.
112. Rebbeck TR, Rosvold EA, Duggan DJ, Zhang J, Buetow KH. Genetics of CYP1A1: coamplification of specific alleles by polymerase chain reaction and association with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:511-4.
113. Alexandrie AK, Sundberg MI, Seidegard J, Tornling G, Rannug A. Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis* 1994;15:1785-90.
114. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Critical reviews in oncology/hematology* 1993;14:77-87.

115. Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Kawajiri K. Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res* 1993;53:2994-9.
116. Chen H, Sandler DP, Taylor JA, et al. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet* 1996;347:295-7.
117. Davies SM, Bhatia S, Ross JA, et al. Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100:67-71.
118. Pakakasama S, Mukda E, Sasanakul W, et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol* 2005;79:202-5.
119. Krajcinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood* 1999;93:1496-501.
120. Chen CL, Liu Q, Pui CH, et al. Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;89:1701-7.
121. Krajcinovic M, Labuda D, Sinnett D. Childhood acute lymphoblastic leukemia: genetic determinants of susceptibility and disease outcome. *Rev Environ Health* 2001;16:263-79.
122. Hoelzer D, Gokbuget N, Ottmann O, et al. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002:162-92.
123. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free radical research* 1999;31:273-300.
124. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 1995;30:445-600.
125. Ketterer B, Meyer DJ, Tan KH. The role of glutathione transferase in the detoxication and repair of lipid and DNA hydroperoxides. *Basic life sciences* 1988;49:669-74.
126. Whalen R, Boyer TD. Human glutathione S-transferases. *Seminars in liver disease* 1998;18:345-58.
127. Ketterer B. Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1988;202:343-61.
128. Vos RM, Van Bladeren PJ. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chemico-biological interactions* 1990;75:241-65.
129. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51-88.
130. Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2006;6:117-29.
131. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2001;19:1279-87.
132. Hall AG, Autzen P, Cattan AR, et al. Expression of mu class glutathione S-transferase correlates with event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1994;54:5251-4.
133. Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 1994;54:4313-20.
134. Anderer G, Schrappe M, Brechlin AM, et al. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics* 2000;10:715-26.
135. Rocha JC, Cheng C, Liu W, et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;105:4752-8.

136. Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I, Pearson WR. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods in enzymology* 2005;401:1-8.
137. Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, et al. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J* 1992;282 ( Pt 1):305-6.
138. Hussey AJ, Hayes JD. Human Mu-class glutathione S-transferases present in liver, skeletal muscle and testicular tissue. *Biochimica et biophysica acta* 1993;1203:131-41.
139. Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:7293-7.
140. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300 ( Pt 1):271-6.
141. Aplenc R, Lange B. Pharmacogenetic determinants of outcome in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2004;125:421-34.
142. Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000;61:154-66.
143. Pearson WR, Vorachek WR, Xu SJ, et al. Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *Am J Hum Genet* 1993;53:220-33.
144. Widersten M, Pearson WR, Engstrom A, Mannervik B. Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione transferases mu and psi. *Biochem J* 1991;276 ( Pt 2):519-24.
145. Smith MT, Evans CG, Doane-Setzer P, Castro VM, Tahir MK, Mannervik B. Denitrosation of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea by class mu glutathione transferases and its role in cellular resistance in rat brain tumor cells. *Cancer Res* 1989;49:2621-5.
146. Tew KD, Monks A, Barone L, et al. Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program. *Molecular pharmacology* 1996;50:149-59.
147. Meyer DJ, Gilmore KS, Harris JM, Hartley JA, Ketterer B. Chlorambucil-mono-glutathionyl conjugate is sequestered by human alpha class glutathione S-transferases. *Br J Cancer* 1992;66:433-8.
148. Meyer DJ. Significance of an unusually low Km for glutathione in glutathione transferases of the alpha, mu and pi classes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 1993;23:823-34.
149. Chang TK, Weber GF, Crespi CL, Waxman DJ. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res* 1993;53:5629-37.
150. Lee SJ, Cho SH, Park SK, et al. Combined effect of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes on bladder cancer risk. *Cancer Lett* 2002;177:173-9.
151. Tsabouri SE, Georgiou I, Alamanos I, Bourantas KL. Increased prevalence of GSTM(1) null genotype in patients with myelodysplastic syndrome: a case-control study. *Acta Haematol* 2000;104:169-73.
152. Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, et al. Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/ myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:4091-5.
153. Atoyebi W, Kusec R, Fidler C, Peto TE, Boulwood J, Wainscoat JS. Glutathione S-transferase gene deletions in myelodysplasia. *Lancet* 1997;349:1450-1.
154. Haase D, Binder C, Bunger J, et al. Increased risk for therapy-associated hematologic malignancies in patients with carcinoma of the breast and combined homozygous gene deletions of glutathione transferases M1 and T1. *Leuk Res* 2002;26:249-54.

155. Den Boer ML, Pieters R, Kazemier KM, et al. Different expression of glutathione S-transferase alpha, mu and pi in childhood acute lymphoblastic and myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1999;104:321-7.
156. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Radloff GA, Ross JA, Perentesis JP. Glutathione S-transferase polymorphisms in children with myeloid leukemia: a Children's Cancer Group study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:563-6.
157. Arruda VR, Lima CS, Grignoli CR, et al. Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) gene defects. *Eur J Haematol* 2001;66:383-8.
158. Basu T, Gale RE, Langabeer S, Linch DC. Glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) gene defect in myelodysplasia and acute myeloid leukaemia. *Lancet* 1997;349:1450.
159. Crump C, Chen C, Appelbaum FR, et al. Glutathione S-transferase theta 1 gene deletion and risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:457-60.
160. Woo MH, Shuster JJ, Chen C, et al. Glutathione S-transferase genotypes in children who develop treatment-related acute myeloid malignancies. *Leukemia* 2000;14:232-7.
161. Saadat I, Saadat M. The glutathione S-transferase mu polymorphism and susceptibility to acute lymphocytic leukemia. *Cancer Lett* 2000;158:43-5.
162. Joseph T, Kusumakumary P, Chacko P, Abraham A, Radhakrishna Pillai M. Genetic polymorphism of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 and susceptibility to acute lymphoblastic leukaemia in Indian children. *Pediatr Blood Cancer* 2004;43:560-7.
163. Sinnott D, Labuda D, Krajcinovic M. Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers--the childhood leukemia experience. *Familial cancer* 2006;5:35-47.
164. Balta G, Yuksek N, Ozyurek E, et al. Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *Am J Hematol* 2003;73:154-60.
165. Takanashi M, Morimoto A, Yagi T, et al. Impact of glutathione S-transferase gene deletion on early relapse in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003;88:1238-44.
166. Barnette P, Scholl R, Blandford M, et al. High-throughput detection of glutathione s-transferase polymorphic alleles in a pediatric cancer population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:304-13.
167. Nachman J, Sather HN, Cherlow JM, et al. Response of children with high-risk acute lymphoblastic leukemia treated with and without cranial irradiation: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 1998;16:920-30.
168. Stanulla M, Schrappe M, Brechlin AM, Zimmermann M, Welte K. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood* 2000;95:1222-8.
169. Goasguen JE, Lamy T, Bergeron C, et al. Multifactorial drug-resistance phenomenon in acute leukemias: impact of P170-MDR1, LRP56 protein, glutathione-transferases and metallothionein systems on clinical outcome. *Leuk Lymphoma* 1996;23:567-76.
170. Tan KL, Webb GC, Baker RT, Board PG. Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta-class glutathione S-transferase gene (GSTT2) to chromosome 22. *Genomics* 1995;25:381-7.
171. Thier R, Bruning T, Roos PH, et al. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int J Hyg Environ Health* 2003;206:149-71.

172. Dirven HA, van Ommen B, van Bladeren PJ. Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione. *Cancer Res* 1994;54:6215-20.
173. Hallier E, Langhof T, Dannappel D, et al. Polymorphism of glutathione conjugation of methyl bromide, ethylene oxide and dichloromethane in human blood: influence on the induction of sister chromatid exchanges (SCE) in lymphocytes. *Arch Toxicol* 1993;67:173-8.
174. Hallier E, Schroder KR, Asmuth K, Dommermuth A, Aust B, Goergens HW. Metabolism of dichloromethane (methylene chloride) to formaldehyde in human erythrocytes: influence of polymorphism of glutathione transferase theta (GST T1-1). *Arch Toxicol* 1994;68:423-7.
175. Sasai Y, Horiike S, Misawa S, et al. Genotype of glutathione S-transferase and other genetic configurations in myelodysplasia. *Leuk Res* 1999;23:975-81.
176. Preudhomme C, Nisse C, Hebbar M, et al. Glutathione S transferase theta 1 gene defects in myelodysplastic syndromes and their correlation with karyotype and exposure to potential carcinogens. *Leukemia* 1997;11:1580-2.
177. Bolufer P, Collado M, Barragan E, et al. The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. *Haematologica* 2007;92:308-14.
178. Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 1968;97:31-50.
179. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scandinavian journal of immunology* 1976;Suppl 5:9-15.
180. Sambrook J, Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 1989;342:224-5.
181. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263-73.
182. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 1990;262:56-61, 4-5.
183. Chen CL, Liu Q, Relling MV. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics* 1996;6:187-91.
184. Krajcinovic M, Labuda D, Sinnett D. Glutathione S-transferase P1 genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics* 2002;12:655-8.
185. Pigullo S, Haupt R, Dufour C, et al. Are genotypes of glutathione S-transferase superfamily a risk factor for childhood acute lymphoblastic leukemia? Results of an Italian case-control study. *Leukemia* 2007;21:1122-4.
186. Sala A, Lanciotti M, Valsecchi MG, et al. Genotypes of the glutathione S-transferase superfamily do not correlate with outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003;17:981-3.
187. Haranatha R, Kaiser J. Polymorphisms in the GST (M1 and T1) gene and their possible association with susceptibility to childhood acute lymphocytic leukemia in Indian population. *Afr J Biotechnol* 2006;5:1454-56.
188. Alves S, Amorim A, Ferreira F, Norton L, Prata MJ. The GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in children from north Portugal. *Leukemia* 2002;16:1565-7.
189. Wang J, Zhang L, Feng J, et al. Genetic polymorphisms analysis of glutathione S-transferase M1 and T1 in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004;24:243-4.

190. Aydin-Sayitoglu M, Hatirnaz O, Erensoy N, Ozbek U. Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias. *Am J Hematol* 2006;81:162-70.
191. Eyada TK, El Ghonemy EG, El Ghoroury EA, El Bassyouni SO, El Masry MK. Study of genetic polymorphism of xenobiotic enzymes in acute leukemia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007;18:489-95.
192. Ye Z, Song H. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2005;41:980-9.
193. Meissner B, Stanulla M, Ludwig WD, et al. The GSTT1 deletion polymorphism is associated with initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18:1920-3.
194. Gurbuxani S, Singh Arya L, Raina V, et al. Significance of MDR1, MRP1, GSTpi and GSTmu mRNA expression in acute lymphoblastic leukemia in Indian patients. *Cancer Lett* 2001;167:73-83.
195. Fengler R, Hartmann R, Bode U, et al. Risk of CNS relapse after systemic relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematology and blood transfusion* 1990;33:511-5.
196. Lewis AD, Hickson ID, Robson CN, et al. Amplification and increased expression of alpha class glutathione S-transferase-encoding genes associated with resistance to nitrogen mustards. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:8511-5.
197. Schroder KR, Wiebel FA, Reich S, Dannappel D, Bolt HM, Hallier E. Glutathione-S-transferase (GST) theta polymorphism influences background SCE rate. *Arch Toxicol* 1995;69:505-7.

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

## **Erklärung**

„Ich, Nadya Al-Wakeel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Stellenwert der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme GSTM1 und GSTT1 bei ALL-Rezidiven 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

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Günter Henze sowie meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Dr. Karl Seeger, der mich auf humorvolle Weise bei der Umsetzung dieser Promotion unterstützt hat.

V o n g a n z e m H e r z e n m ö c h t e i c h m e i n e r F a m i l i e d a n k e n  
– meiner Großmutter, Najat M. Salih, meinen Eltern, Eman und Dr. Ihsan Al-Wakeel, meinen  
Brüdern, Sami und Ramsey Al-Wakeel, meiner Tante, Frau Dr. Sabeeha M. Abdullah –  
die meinen beruflichen Werdegang ermöglicht und liebevoll begleitet haben.

Berlin, im Oktober 2010

Nadya Al-Wakeel