

3. Material und Methoden

3.1. Die Fall-Kontroll-Studie ALL-Rezidive

Es wurde der Einfluss der Polymorphismen von *CYP2C18* und *MDR1* bei Kindern mit ALL-Rezidiv auf das Überleben sowie auf die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens und die Therapietoxizität geprüft. Zur Prüfung der Hypothesen wurden retrospektive Fall-Kontroll-Studien durchgeführt. Selektionsparameter für die Studienpatienten waren dabei Therapie gemäß Studienprotokollen ALL-REZ BFM sowie Vorhandensein von DNA-Proben. Es wurden Fall-Kontroll-Paare definiert, die sich hinsichtlich

- A) der Folgeereignisse (Zweitrezidiv vs. anhaltende komplette Remission)
- B) der Response (Non-Responder vs. Responder) unterschieden.

Insgesamt konnten 49 Fall-Kontroll-Paare identifiziert werden, wobei jedes Paar aus einem Patienten mit ALL-Erstrezidiv besteht, bei dem es im Krankheitsverlauf zu einem zweiten Rezidiv gekommen war (Fall 1) und von einem ALL-Rezidivpatienten der in anhaltender kompletter Remission geblieben ist (Kontrolle 1).

Außerdem wurden 24 Fall-Kontroll Paare von Kindern mit ALL-Erstrezidiv gebildet, wobei Patienten, die auf eine Therapie des Erstrezidivs nicht angesprochen hatten, so genannte Non-Responder (Fall 2), mit ALL-Erstrezidivpatienten gepaart wurden, die in eine zweite Remission gekommen waren, so genannte Responder (Kontrolle 2). Exakte Matchkriterien für beide Patientenzuordnungen waren:

1. der Zeitpunkt des ersten Rezidivs (siehe Tabelle 1, Abschnitt 1.2.4.),
2. die Lokalisation des Erstrezidivs (siehe Tabelle 2, Abschnitt 1.2.4.),
3. die periphere Leukozytenzahl bei Diagnose des Erstrezidivs.

Außerdem wurden bei Gruppe 1 die Patienten danach gepaart, ob sie eine Stammzelltransplantation erhalten hatten und nach dem Modus der Transplantation (allogen versus autolog). Für die Studie nicht gepaart wurden das Alter der Kinder beim Rezidiv, ihr Geschlecht, sowie das Vorhandensein der Translokationen TEL/AML1 und BCR/ABL in den Leukämiezellen. Tabelle 6 stellt die Kriterien zur Bestimmung der Patientenkollektive für die Fall-Kontroll-Studie zusammen:

Tabelle 6: Charakteristika der in die Fall-Kontroll-Studie einbezogenen Patienten mit ALL-Erstrezidiv

	Fälle 1 Rezidive	Kontrollen 1 Andauernde Vollremission	Fälle 2 Non- Responder	Kontrollen 2 Responder
Patientenzahl	49	49	24	24
Prognostische Parameter				
Zeitpunkt des Rezidivs				
sehr früh	1	1	15	15
früh	15	15	7	7
spät	33	33	2	2
Lokalisation				
KM isoliert	31	31	23	23
KM kombiniert	12	12	1	1
extramedullär	6	6	-	-
Periphere Leukozytenzahl				
<1/ μ l	12	12	1	1
\geq 1 und < 10000/ μ l	34	34	18	18
\geq 10000 / μ l	3	3	5	5
Therapiegruppe				
S2	43	43	2	2
S3	5	5	5	5
S4	1	1	17	17
S2 Subgruppe				
S2A	11	11	-	-
S2B	23	23	-	-
S2C	3	3	2	2
S2D	6	6	-	-
Alter beim Erstrezidiv				
< 5 Jahre	2	5	7	4
\geq 5 und < 10 Jahre	23	23	9	12
\geq 10 Jahre	24	21	8	8
Geschlecht				
männlich	37	28	11	20
weiblich	12	21	13	4
Immunphänotyp				
B-Vorläuferzell-ALL	49	49	19	19
TEL/AML1				
Positiv	5	12	-	1
Negativ	21	20	15	14
Keine Daten	23	17	9	9
BCR/ ABL				
Positiv	1	1	2	1
Negativ	38	40	22	17
Keine Daten	10	8	-	6

Tabelle 7: Verteilung der Fall-Kontroll-Patienten nach Behandlung

	Fälle 1 Rezidive	Kontrollen 1 Andauernde Vollremission	Fälle 2 Non-Responder	Kontrollen 2 Responder
Patientenzahl	49	49	24	24
Therapie der Ersterkrankung				
ALL-BFM	41	34	18	21
COALL	6	11	4	2
Andere	2	4	2	1
Therapie des Rezidivs				
ALL-REZ BFM 85/86	9	3	3	-
ALL-REZ BFM 90	12	10	6	8
ALL-REZ BFM 95	8	12	2	2
ALL-REZ BFM 96	20	24	13	14
KM-Transplantation				
Keine	44	44	24	8
Allogen	4	4	-	9
Haploident	1	1	-	2
Autolog/ syngen	-	-	-	2
Unbekannt	-	-	-	3

Tabelle 8: Folgeereignisse bei den Patienten der Fall-Kontroll-Studie nach Gruppen

	Fälle 1 Rezidive	Kontrollen 1 Andauernde Vollremission	Fälle 2 Non-Responder	Kontrollen 2 Responder
Patientenzahl	49	49	24	24
Non-Response	-	-	24	-
Tod als Folge der Chemotherapie	-	-	-	8
Rezidiv	49	-	-	8
Sekundäre Malignomerkrankung	-	-	-	1
Andauernde voll- ständige Remission	-	49	-	7

3.2. Patienten

Für die Untersuchungen wurde DNA der ALL-Rezidiv-Patienten, die für die oben beschriebene Fall-Kontroll-Studie (s. Abschnitt 3.1.) selektiert worden waren, verwendet. Die DNA war bei Diagnosestellung des Erstrezidivs aus Knochenmark oder Lymphozyten des peripheren Blutes gewonnen und bis zur Verwendung bei -40° Celsius tiefgekühlt konserviert worden. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Prävalenz der beiden untersuchten Mutationen *MDR1* C3435T und *CYP2C18* T1154C in einer gesunden Population und einer Population von Kindern mit ALL-Ersterkrankung die DNA von 78 gesunden Probanden für das *MDR1*-Gen und 80 gesunden Probanden für das *CYP2C18*-Gen, sowie von 98 Kindern mit ALL-Ersterkrankung für das *MDR1*-Gen und 102 Kindern mit ALL-Ersterkrankung für das

CYP2C18-Gen untersucht. Bei der Wahl der Patienten mit ALL-Ersterkrankung wurde eine Häufigkeitsverteilung von 90% Patienten mit ALL der B-Zell-Linie und 10% Patienten mit T-ALL gewählt, um ein möglichst repräsentatives Kollektiv von Patienten mit ALL-Ersterkrankungen zu bilden.

3.3. Material

Zunächst wurden Primer für eine Polymerasenkettenreaktion (PCR) hergestellt. Dabei handelt es sich um zum jeweiligen Strang komplementäre synthetische Oligonukleotide, die das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren, d.h. den Genabschnitt der DNA mit der jeweiligen Punktmutation im *MDR1*-Gen sowie im *CYP2C18*-Gen einschließen. Für die Untersuchung des *MDR1*-Gens wurden folgende Primer verwendet (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland):

Tabelle 9: Primer zur Bestimmung des Polymorphismus *MDR1* C3435T

Gen	Primer	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)
<i>MDR1</i>	MDR1F	ATGTTTCAGTGGCTCCGAGCAC	21
	MDR1R2	TCGATGAAGGCATGTATGTTG	21

Die verwendeten synthetisierten Oligonukleotide (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland) waren für das *CYP2C18*-Gen:

Tabelle 10: Primer zur Bestimmung des *CYP2C18* T1154C Polymorphismus

Gen	Primer	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)
<i>CYP2C18</i>	2C18in7F	CTGTCTGGGTGGGAATGTA	21
	2C18R	CATCTCTGGGTGGGGAA	18

Das Genprodukt für *MDR1* hatte eine Länge von 162 Basenpaaren und für *CYP2C18* eine Länge von 189 Basenpaaren. Für die Etablierung der Endpunkt-PCR wurden die oben genannten Primer, MgCl₂ in einer Konzentration von 50 mM (GIBCO, Gaithersburg, USA), Puffer 10x (GIBCO, Gaithersburg, USA), das Enzym Ampli Taq 5U/μl (GIBCO, Gaithersburg, USA), sowie eine im Labor hergestellte Mischung von Deoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs), (Boehringer, Mannheim, Deutschland) verwendet. Für die Übertragung der etablierten PCR auf die Technologie des LightCyclers wurden zusätzlich zu den oben erwähnten Materialien für jedes der beiden zu untersuchenden Gene jeweils ein spezifischer LightCycler-Sensor und ein Anchor benötigt. Auf die Funktionsweise der LightCycler-Technologie wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

Für das *MDR1*-Gen wurden folgende Sonden verwendet (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland):

Tabelle 11: LightCycler Sonden für den *MDR1* C3435T Polymorphismus

Gen	Produkt	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)
<i>MDR1</i>	MDR1-Sensor mt	CTTTGCTGCCCTCACAATCTCTTCC	25
	MDR1-Anchor LC Red640	TGACACCACCCGGCTGTTGTCTCCA.	25

Für das *CYP2C18* Gen wurden entsprechend folgende LightCycler Sonden hergestellt (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland):

Tabelle 12: LightCycler Sonden für den *CYP2C18* T1154C Polymorphismus

Gen	Produkt	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)
<i>CYP2C18</i>	2C18 Sensor	GGGCACGACCATAATAACATCCC	23
	2C18 Anchor LC Red640	GACTTCTGTGCTGCACAATGACAAAG	26

Außerdem wurde für den LightCycler Ansatz anstelle der Ampli Taq DNA-Polymerase die Taq DNA-Polymerase PLATINUM (GIBCO, Gaithersburg, USA) verwendet, sowie dem Master Mix BSA in einer Konzentration von 1,0 µg/µl hinzugefügt.

3.4. Methoden

3.4.1. DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte nach der Methode der Firma Gentra Systems mit dem Puregene® DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Plymouth, USA). Vor 1993 wurden DNA Proben mittels der Phenol-Chloroform-Methode isoliert, später wurden die Qiagensäulen der Firma QIAGEN (Qiagen, Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch Dichtemessung mit Hilfe eines Photometers, gegebenenfalls wurde die DNA auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

3.4.2. Konventionelle PCR und Agarosegelelektrophorese

Die PCR ist eine Technik zur zyklischen Amplifizierung bestimmter DNA-Bereiche. Nach Denaturierung der DNA und damit Trennung der Doppelstränge lagert sich bei geeigneten Temperaturen ein Paar spezifischer, 15-30 Basen langer, Oligonukleotide, so genannte Primer, an die den zu untersuchenden DNA-Bereich flankierende Regionen an (Annealing) und initiiert die Synthese des jeweils komplementären DNA-Stranges durch eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Elongation). Das Enzym synthetisiert bei Vorhandensein von dNTPs (Desoxyribonukleotidtriphosphate als Bausteine der zu bildenden DNA) vom 3'-Ende der angelagerten Primer ausgehend einen zur

Ursprungs-DNA komplementären DNA-Strang. Weitere Zyklen mit den sich wiederholenden Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation folgen. Dabei dienen die an der Ursprungs-DNA synthetisierten DNA-Stränge wiederum als Matrize zur weiteren Amplifizierung von DNA durch die Polymerase. Da mit jedem Zyklus die Zahl der synthetisierten DNA-Fragmente sich theoretisch verdoppelt, resultiert eine exponentielle Vermehrung der PCR-Produkte. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung können die PCR-Produkte als Bande durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe oben beschriebener Primer wurde, wie schon erwähnt, zunächst eine konventionelle Endpunkt-PCR etabliert. Dazu verwendeten wir DNA-Proben von etablierten Zelllinien wie Raji (einer menschlichen Burkitt-Lymphom Zelllinie), Reh (einer menschlichen prä-B-Leukämie-Zelllinie), Molt 4 (einer menschlichen T-Zell-Leukämie-Zelllinie), SupB15, Buffy Coat sowie einer Plazenta-Zelllinie. Der optimierte PCR-Ansatz für den C3435T Polymorphismus im *MDR1*-Gen bestand aus:

Zusammensetzung des Master Mixes (Angaben pro Ansatz):

- 2 µl 10x PCR Puffer von GIBCO ohne MgCl₂ Zusatz
- 1,8 µl 50 mM MgCl₂ (entspricht 3 mM MgCl₂)
- 3 µl einer 2 mM Lösung von dNTP
- 1 µl einer 10 µM Lösung von Primer MDR1-F
- 1 µl einer 10 µM Lösung von Primer MDR1-R2
- 0,15 µl Taq DNA Polymerase PLATINUM von GIBCO
- 20,05 µl destilliertes H₂O

Zum Master Mix wurde pro Ansatz 1 µl der zu untersuchenden DNA in einer Konzentration von 100 µM dazugegeben. Das PCR-Programm für die *MDR1*-PCR war:

Initiale Denaturierung: 94° C für 5 Minuten

Annealing 60°C für 45 Sekunden

Amplifizierung: 72° C für 90 Sekunden

32 Zyklen: - Denaturierung 94° C für 1 Minute
- Annealing 60° C für 45 Sekunden
- Amplifizierung 72° C für 90 Sekunden

Letzte Amplifizierung 72°C für 7 Minuten

Die hier beschriebene Methode wurde in der gleichen Art und Weise auch bei der Untersuchung des Polymorphismus T1154C im *CYP2C18*-Gen angewendet.

Die optimierten PCR-Bedingungen waren:

Zusammensetzung des Master Mixes (Angaben pro Ansatz):

- 3 µl 10x PCR Puffer von GIBCO mit einem Zusatz von 15mM MgCl₂ (entspricht 45 mM MgCl₂ pro Ansatz)
- 3 µl einer 2mM Mischung von dNTPs
- 0,5 µl einer 10 µM Lösung von Primer 2C18 in2F
- 0,5 µl einer 10 µM Lösung von Primer 2C18 R
- 0,2 µl Ampli Taq DNA Polymerase von GIBCO (5U/µl)
- 21 µl destilliertes H₂O

Zu dem Master Mix wurde ebenfalls 1 µl der zu untersuchenden DNA in einer Konzentration von 100 µM dazugegeben. Der 29,2 µl Ansatz wurde dann folgendem Programm unterzogen, so dass es zu einer Amplifizierung des gewünschten 189 Basenpaare langen Genabschnittes aus dem *CYP2C18*-Gen kam:

Initiale Denaturierung: 94° C für 5 Minuten

Annealing 55°C für 1 Minute

Amplifizierung: 72° C für 30 Sekunden

- 34 Zyklen:
- Denaturierung 94° C für 1 Minute
 - Annealing 55° C für 1 Minute
 - Amplifizierung 72° C für 30 Sekunden

Letzte Amplifizierung 72°C für 7 Minuten.

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit 1/3 Volumen eines Gelladepuffers (Orange G) versetzt und in die Slots eines Agarosegels einpipettiert. Parallel dazu wurde ein DNA-Längenstandard aufgetragen (BIO-RAD, Precision Molecular Mass Standard, Hercules, USA), der die Größenordnung der im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente erlaubte. Bei der Agarosegelelektrophorese wandern DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe und Ladung in einem konstanten elektrischen Feld. Die Auftrennung erfolgt in einem 2-3%igen mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel (NuSieve GTC zu SeaKem GTC im Verhältnis 2:1 für 3%ige Gele, SeaKem LE für 2%ige Gele, Biozym Diagnostics GmbH, Oldendorf, Deutschland) bei 120 Volt über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten. Durch den Zusatz von Ethidiumbromid, einem Farbstoff, der mit DNA interkaliert und bei Licht einer Wellenlänge von 256 nm fluoresziert, werden die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente auf dem UV-Transilluminator anschließend sichtbar. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgt mit einer Polaroidkamera. Durch einen Vergleich der Markierungen der jeweiligen PCR-Produkte mit dem DNA-Längenstandard wurde überprüft, dass die vorhandene amplifizierte

Nukleotidsequenz die erwartete, von der MDR1-Primerlokalisierung vorgegebene Länge von 163 bp hat. Somit wurde eine unerwünschte Produktion von Primerdimeren oder anderen PCR-Nebenprodukten ausgeschlossen. Die Effektivität der *CYP2C18*-PCR wurde ebenfalls, wie oben beschrieben, durch eine Gelelektrophorese mit Hilfe eines 100 bp Fluoreszenzmarkers geprüft, wobei die erwartete Größe des PCR-Produktes 189 bp betrug. (siehe Abb.4) Nach Etablierung der jeweiligen PCR auf Block übertrugen wir die PCR auf die Technologie des LightCyclers.

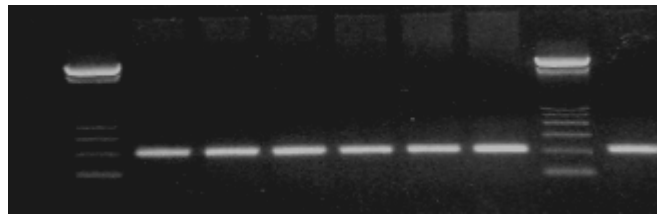


Abbildung 3: Produkte der Endpunkt-PCR des Gens *CYP2C18*, Banden: 1 Reh, 2 Raji, 3 Plazenta, 4-7 DNA Proben von Gesunden, 100bp Marker Orange

3.4.3. Der LightCycler

Der LightCycler stellt eine moderne multifunktionale Technologie dar, die grundsätzlich aus zwei verschiedenen Komponenten besteht – einer Cyler-Komponente und einer Fluorimeterkomponente. Diese arbeiten eng miteinander, um komplexe Anwendungen wie die Analyse von PCR Produkten, deren Quantifizierung sowie Genmutationsanalysen auf eine einfache und schnelle Art zu ermöglichen. Die Cyler-Komponente besteht ihrerseits aus einem Karussell als Ablageort für die sich in dünnen Glasküvetten befindlichen Proben, und einer Thermalkammer, die mit dem optischen System des Fluorimeters direkt verbunden ist, so dass die Fluoreszenzstärke schon während des PCR Laufes in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet werden kann. Die Fluoreszenzkomponente besteht aus einer blauen Diode, die als Energiequelle für Anregung der Proben dient. Das von der Diode emittierte Licht wird von einem besonderen optischen System gefiltert und auf die gleiche Wellenlänge gebracht, nämlich 470 nm. Dieses homogene Licht von 470 nm Wellenlänge wird dann nacheinander auf die einzelnen Proben in den durchsichtigen Glaskapillaren gerichtet. Besondere Spiegel streuen nun das von den einzelnen Proben emittierte Licht auf einen der drei Detektionskanäle. Dabei ist jeder Kanal durch eine bestimmte Wellenlänge charakterisiert, nämlich 530 nm, 640 nm und 710 nm. Welcher Kanal das emittierte Licht erhält, hängt von den spektralen Eigenschaften des verwendeten Fluorophores ab.

3.4.3.1. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Es gibt mehrere Prinzipien für die fluorometrische Detektion von PCR Reaktionen – einerseits Fluorophoren, die sequenzunspezifisch an jede Doppelstrang-DNA binden, zum Beispiel der Farbstoff SYBR Green I, andererseits Fluorophoren wie zum Beispiel LightCycler-Red 640 und Fluorescein, die an sequenzspezifische Oligonukleotide gekoppelt sind und damit bestimmte PCR Produkte erkennen und nur mit diesen reagieren. Da für diese Arbeit die zweite Methode verwendet wurde, soll nur diese näher betrachtet werden. Es werden zwei Oligonukleotide verwendet, die sequenzkomplementär zu dem zu untersuchenden DNA-Abschnitt sein und benachbarte Sequenzen hybridisieren sollen. Das dem 5'- Ende nähere Oligonukleotid - der Donor – ist an seinem 3'- Ende mit Fluorescein verbunden, während das 3'-Oligonukleotid – der so genannte Akzeptor – LightCycler-Red 640 an seinem 5'- Ende hat. Wenn beide Oligonukleotide mit ihren Zielsequenzen hybridisiert sind, befinden sich die beiden Fluoreszenzstoffe räumlich sehr nahe beieinander. Es findet ein so genannter Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) statt, d.h. eine Energieübertragung ohne Photonemission von einem Fluorophor auf den benachbarten Fluorophoren. Durch das Licht der blauen Diode des LightCyclers wird das Fluorescein F1 angeregt, dieses gibt über den Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer Energie weiter an den LightCycler Red 640 Fluoreszenzstoff F2, der durch die erhaltene Energie seinerseits ein messbares Licht der Wellenlänge von 640 nm emittiert. Folgende Grafik stellt den geschilderten Sachverhalt dar:

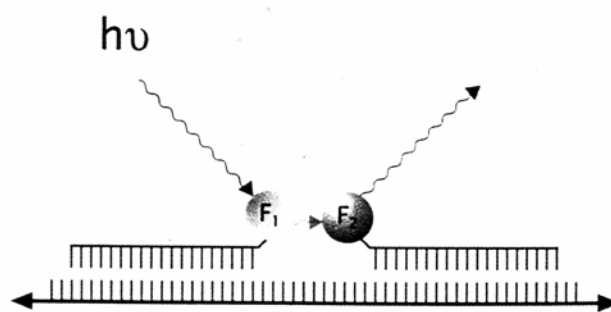


Abbildung 4: Prinzip des FRET zwischen zwei benachbarten Fluorophoren, wodurch es zu einer messbaren Fluoreszenzemission kommt

Wenn die an Oligonukleotide gebundenen Fluorophoren dazu verwendet werden, um Genmutationen aufzufinden, bindet der Sensor (F1) an den Genabschnitt, in dem sich die Mutation befindet, während der Anchor (F2) das fluoreszierende Signal produziert.

3.4.3.2. Schmelzpunktanalyse

Die Sequenz eines Sensors kann entweder die Wildtyp-Sequenz erkennen oder die mutierte Sequenz. Meistens verursacht eine Nichtübereinstimmung zwischen der mutierten Zielsequenz und dem die Wildtyp-Sequenz erkennenden Sensor bei der Schmelzanalyse eine Verschiebung des Schmelzpunktes um 5° bis 8° im Vergleich zu dem Schmelzpunkt eines Wildtyp-Hybriden. Wie stark der Schmelzpunkt verschoben wird, hängt vor allem von der Sequenz um den Mutationslokus ab. Eine Schmelzpunktanalyse findet im LightCycler nach einem PCR-Lauf statt. Dabei wird die Fluoreszenz der einzelnen Proben dargestellt, während die Temperatur stufenweise erhöht wird. Durch die steigende Temperatur kommt es zu einer zunehmenden Trennung von Zielsequenz und Oligonukleotid-Fluorophor-Komplex, und damit zu einer räumlichen Trennung der FRET-Partner, so dass ab einer bestimmten Temperatur ein Abnehmen der Fluoreszenz zu erwarten ist. Das Ziel der Schmelzkurvenanalyse ist es, die charakteristische Schmelztemperatur eines PCR-Produktes festzustellen, was dann zu dessen Identifizierung, zur Identifizierung von Beiprodukten wie Primerdimeren oder auch zum Erkennen von Mutationen genutzt werden kann. In dieser Arbeit wurde die Methode zur Genotypbestimmung bezüglich des *MDR1*-Gens sowie des *CYP2C18*-Gens verwendet. Zur näheren Erläuterung folgt hier die LightCycler-Darstellung der Schmelzkurven der *CYP2C18* SNP-Analyse mehrerer Patienten - homozygot Wildtyp (Fluoreszenz-Maximum bei 61.5°C), homozygot Mutante (Fluoreszenz-Maximum bei etwa 67.5°C), sowie einer heterozygoten Probe mit zwei Peaks (bei 61.5°C und 67.5°C), die den beiden Allelen entsprechen. Ein Unterschied von maximal 0.5 °C zwischen den Schmelztemperaturen in den verschiedenen LightCycler Läufen konnte festgestellt werden.

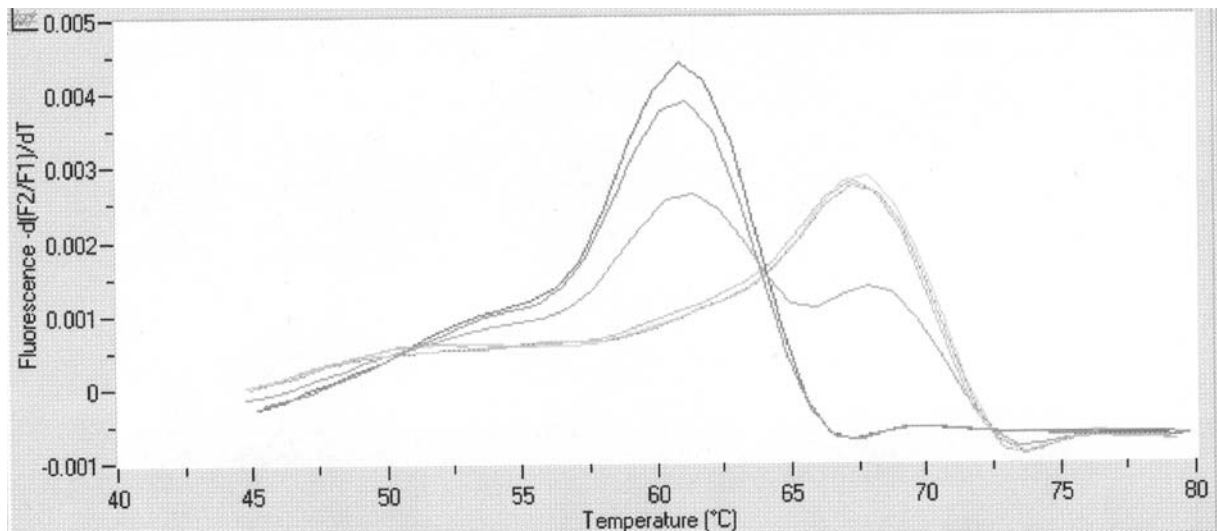


Abbildung 5: Darstellung der Schmelzkurven bei der SNP-Analyse von *CYP2C18* T1154C - Wildtyp, heterozygote sowie homozygote Varianten

Nachdem, wie in Abschnitt 3.4.2. beschrieben, die konventionelle PCR jeweils für das *MDR1* sowie für das *CYP2C18* Gen etabliert war, wurde die PCR auf den LightCycler übertragen, die Methode optimiert sowie durch Übertragen der PCR Produkte auf Agarosegel und nachfolgender Elektrophorese überprüft, dass diese die erwartete Länge von 163 bp für *MDR1* und 189 bp für *CYP2C18* hatten. Die LightCycler Bedingungen für die Analyse des *MDR1* C3435T Polymorphismus lauteten:

Für die Herstellung des Master Mixes (Angaben pro Ansatz):

- 2 µl PCR Puffer 10x von GIBCO
- 2 µl einer 2 mM Mischung von dNTP
- 0,8 µl einer 50 mM Lösung von MgCl₂
- 0,4 µl einer 10 µM Lösung von Primer MDR1 F
- 0,3 µl einer 10 µM Lösung von Primer MDR1 R2
- 1,5 µl einer 3 µM Lösung der Sonde MDR1 Sensor mt
- 1,5 µl einer 3 µM Lösung der Sonde MDR1 Anchor LC Red640
- 0,5 µl einer 1,0 µg/µl Lösung von BSA
- 0,1 µl Taq DNA – Polymerase PLATINUM von GIBCO
- 9,9 µl destilliertes Wasser

Zum Master Mix wurde pro Ansatz 1 µl der zu untersuchenden DNA in einer Konzentration von 100µM dazugegeben. Damit ergab sich ein Ansatz von 20 µl pro Glaskapillare. Bei der

LightCycler-Programmierung für die Untersuchung des *MDRI*-Polymorphismus ergab sich folgende Kombination als optimal:

1. Denaturierung (1 Zyklus)

Segment	Zieltemperatur (°C)	Hold time (sec)	Slope (°C/sec)
1	95	120	20

2. PCR – Zyklen (40 Zyklen)

Segment	Zieltemperatur (°C)	Hold time (sec)	Slope (°C/sec)
1	95	10	20
2	61	20	20
3	72	20	20

3. Schmelzanalyse (1 Zyklus)

Segment	Zieltemperatur (°C)	Hold time (sec)	Slope (°C/sec)
1	95	20	20
2	41	20	20
3	85	0	0,4

4. Kühlung (1 Zyklus)

Segment	Zieltemperatur (°C)	Hold time (sec)	Slope (°C/sec)
1	40	20	20

Die optimierte LightCycler-PCR für die Analyse des *CYP2C18 T1154C*-Polymorphismus lautete: Für die Herstellung des Master Mixes (Angaben pro Ansatz):

- 2 µl PCR Puffer 10x von GIBCO
- 2 µl einer 2mM Mischung von dNTP
- 1,6 µl einer 50 mM Lösung von MgCl₂
- 0,5 µl einer 10 µM Lösung von Primer 2C18 in 2 F
- 0,5 µl einer 10 µM Lösung von Primer 2C18 R
- 1 µl einer 3 µM Lösung der Sonde 2C18 Sensor
- 1 µl einer 3 µM Lösung der Sonde 2C18 Anchor LC Red640
- 0,5 µl einer 1,0 µg/µl Lösung von BSA
- 0,1 µl Taq DNA – Polymerase PLATINUM von GIBCO

- 9,8 µl destilliertes Wasser

Für eine genaue Beschreibung der Primer sowie der beiden Sonden siehe Abschnitt 3.3. Zum Master Mix wurde pro Ansatz 1 µl der zu untersuchenden DNA in einer Konzentration von 100µM dazugegeben. Dadurch ergab sich auch hier ein Ansatz von 20 µl pro LightCycler Kapillare, was der optimalen Menge für das Gerät entspricht. Für die Analyse des *CYP2C18*-Polymorphismus wurde der LightCycler wie folgt programmiert:

1. Denaturierung (1 Zyklus)

Segment	Zieltemperatur (°C)	Hold time (sec)	Slope (°C/sec)
1	95	120	20

2. PCR – Zyklen (45 Zyklen)

Segment	Zieltemperatur (°C)	Hold time (sec)	Slope (°C/sec)
1	95	5	20
2	60	5	20
3	72	10	20

3. Schmelzanalyse (1 Zyklus)

Segment	Zieltemperatur (°C)	Hold time (sec)	Slope (°C/sec)
1	95	20	20
2	40	120	20
3	85	0	0,2

4. Kühlung (1 Zyklus)

Segment	Zieltemperatur (°C)	Hold time (sec)	Slope (°C/sec)
1	40	30	20

Zur Sicherung der Spezifität wurde das PCR-Produkt von mehreren etablierten ALL-Zelllinien, wie z.B. Sup B15, Placenta, Reh und Raji sequenziert. Nach Sequenzierung von *MDR1*-PCR Produkten wurde jeweils eine Zelllinie, die als C/C homozygot identifiziert worden war (Reh), eine heterozygote Zelllinie (Plazenta) sowie eine T/T homozygote Zelllinie (Sup B15) als Schmelzkurven-Muster des jeweiligen Genotyps mitgeführt, so dass das Schmelzverhalten der PCR-Produkte der Patienten-DNA immer mit dem dieser Zelllinie verglichen werden konnte, und damit Rückschlüsse auf den Genotyp der Patienten gezogen werden konnten. Dabei ergab sich für den Genotyp *MDR1* 3435C/C homozygot eine Schmelztemperatur von $T_m = 62.2$ °C, für homozygot T ein $T_m = 66.2$ °C, sowie für die

heterozygote Form C/T ein sich intermediär befindlicher Peak bei $T_m=64.0$ °C. Zusätzlich wurde bei allen Untersuchungen eine Negativprobe mitgeführt, die Master Mix jedoch keine DNA enthielt, um eine ungewollte Kontamination des Master Mixes mit fremder DNA auszuschließen. Bezüglich der *CYP2C18* T1154C Mutation konnten eine homozygote Wildtypzelllinie (Reh) sowie eine heterozygote Zelllinie (Raji) identifiziert werden. Wie beschrieben, wurden auch hier diese Zelllinien stets als Muster des jeweiligen Genotyps mitgeführt. Mit dieser Methode konnten schnell und zuverlässig die *MDR1*- bzw. *CYP2C18*-Genotypen der Patienten der Fall-Kontroll-Studien, sowie von Gesunden und Kindern mit ALL-Ersterkrankung bezüglich der untersuchten Polymorphismen bestimmt werden. Da der LightCycler 32 Plätze für Glaskapillaren enthält, können, bei Mitführen einer Positiv- und einer Negativkontrolle, bis zu 30 Proben von Patienten gleichzeitig untersucht werden.

3.4.4. Statistische Methoden

Als statistischer Test für die Abhängigkeit qualitativer Variablen wurde der unverbunden zweiseitige U-Test nach Mann und Whitney verwendet. Bei einem Testergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p<0.05$ wurde das Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet. Bei $p>0.05$ wurde das Ergebnis als nicht signifikant (n.s.) bezeichnet. Beim Prüfen der Abhängigkeit zweier Variablen wurde im Falle, dass mindestens einer der beiden Parameter mehr als zwei Ausprägungen aufwies der zweiseitige Pearson Chi Square Wert berücksichtigt. Bei einer so genannten 2x2-Kreuztabelle mit je zwei Ausprägungen pro Parameter wurde der zweiseitige Fischers Exact Test angewendet. Die Datenverarbeitung erfolgte computergestützt mit dem Statistikprogramm SPSS Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) Version 7.5.2G für Windows 1995. Zur statistischen Beschreibung wurden Diagramme und Tabellen verwendet.