

Aus der Klinik für Pädiatrie m. S. Onkologie/Hämatologie
Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Submikroskopische Knochenmarkbeteiligung bei Kindern
mit einem isoliert extramedullären Rezidiv der
akuten lymphoblastischen Leukämie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nikola Hagedorn

aus Potsdam

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Henze
 2. Prof. Dr. med. P. Bader
 3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kneba

Datum der Promotion: 20.11.2009

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Rezidive der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter	1
1.2	Isoliert extramedulläre Rezidive im Kindesalter	3
1.2.1	Definition und Diagnostik von isoliert extramedullären Rezidiven.....	3
1.2.2	Inzidenz und Prognose von isoliert extramedullären Rezidiven.....	4
1.2.3	Prognostische Faktoren bei isoliert extramedullären Rezidiven	5
1.2.4	Stratifizierung und Therapie von isoliert extramedullären Rezidiven	6
1.3	Bedeutung der Knochenmarkbeteiligung bei Rezidiven mit extramedullärer Manifestation	8
1.4	Sensitivitätsgrenze der mikroskopischen Beurteilung von Knochenmark- und Blutausstrichen.....	9
1.5	Methoden zur submikroskopischen Messung von residuellen Leukämiezellen	9
1.6	Biologie und Pathogenese.....	12
2	Aufgabenstellung	15
3	Materialien, Methoden und Patienten.....	17
3.1	Materialien.....	17
3.2	Methoden	19
3.2.1	Separation mononukleärer Zellen	20
3.2.2	DNA-Extraktion	22
3.2.3	T-Zell-Rezeptor- und Immunglobulin-Gen-Screening-PCR	22
3.2.4	Homo-Heteroduplexanalyse.....	27
3.2.5	Sequenzierung.....	28
3.2.6	Quantifizierung.....	29
3.3	Patienten	35
3.3.1	Studiendesign	35
3.3.2	Studiengruppe	35
3.3.3	Ein- und Ausschlusskriterien.....	36
3.4	Statistische Auswertung	36
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Repräsentativität des Patientenkollektivs.....	39
4.2	Charakterisierung des Patientenkollektivs	41

4.2.1	Klinische Merkmale des Patientenkollektivs	41
4.2.2	Überleben der Patienten	43
4.3	Submikroskopische Knochenmarkbeteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose ...	45
4.3.1	Identifizierung klonaler Marker und Überprüfung ihrer Stabilität.....	45
4.3.2	Quantitative Variabilität der submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung.....	46
4.4	Submikroskopische Knochenmarkbeteiligung und relevante klinische Parameter.....	48
4.5	Submikroskopische Knochenmarkbeteiligung und Prognose	49
4.5.1	Univariate Analyse der Gesamtgruppe	49
4.5.2	Univariate Analyse – Auftrennung nach Rezidivort.....	50
4.5.3	Univariate Analyse – Auftrennung nach Rezidivzeitpunkt.....	53
4.5.4	Multivariate Analyse	56
4.6	Submikroskopische Knochenmarkbeteiligung und Folgerezidiv	56
5	Diskussion.....	59
5.1	Heterogenität der submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung	59
5.2	Submikroskopische Knochenmarkbeteiligung und Prognose	62
5.3	Neudefinition von isoliert extramedullären und kombinierten Rezidiven	63
5.4	Neue Stratifizierung der isoliert extramedullären Rezidive	65
5.5	Ort des Folgerezidivs	66
5.6	Beitrag zur Pathogenese von extramedullären Rezidiven	67
5.7	Problem der Materialsammlung	68
5.8	Ausblick	70
6	Zusammenfassung.....	73
	Literatur.....	75
	Lebenslauf.....	81
	Wissenschaftliche Beiträge im Rahmen der Doktorarbeit	83
	Danksagung	85
	Erklärung.....	87

1 Einleitung

1.1 Rezidive der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. In den Jahren 1997-2006 erkrankten in Deutschland 4934 Kinder unter 15 Jahren an einer ALL.¹ Die Heilungschancen sind in den letzten 20 Jahren studienabhängig auf 70-80 % angestiegen.²⁻⁴ Die übrigen 20-30 % der Patienten können durch die Erstbehandlung nicht geheilt werden und erleiden einen Rückfall ihrer Erkrankung. Für diese Kinder liegen die Heilungschancen mit 35-40 % deutlich ungünstiger.⁵

Die Therapie von Kindern mit ALL-Rezidiv erfolgt risikoadaptiert in Therapieoptimierungsstudien mit geprüften Polychemotherapieelementen. Die Stratifizierung in verschiedene Therapiearme erfolgt unter Berücksichtigung von Prognosefaktoren. Diese wurden in Vorgängerstudien als signifikant die ereignisfreie Überlebenswahrscheinlichkeit (pEFS) beeinflussende Faktoren identifiziert.⁵⁻⁸ Die drei Prognosefaktoren, die im ALL-Rezidivprotokoll der Berlin-Frankfurt-Münster (ALL-REZ BFM)-Studiengruppe seit 1995 zur Therapiestratifizierung verwendet werden, sind der Rezidivzeitpunkt, der Rezidivort, sowie der Immunphänotyp.⁹

Der bedeutendste Prognosefaktor ist der Rezidivzeitpunkt, d.h. die Zeitspanne zwischen Initialdiagnose und Rezidivdiagnose. In den einzelnen Studien ist die Definition des Rezidivzeitpunktes nicht einheitlich.^{8,10} Die Studiengruppe ALL-REZ BFM definiert Rezidive als *sehr früh*, wenn das Rezidiv innerhalb von 18 Monaten nach der initialen Diagnose auftritt, als *früh*, wenn das Rezidiv zwischen 18 und 30 Monaten nach initialer Diagnose auftritt und als *spät* bei Diagnose des Rezidivs später als 6 Monate nach Ende der Ersttherapie.¹¹ Die pEFS unterscheidet sich signifikant in den durch den Rezidivzeitpunkt definierten Gruppen. Von 910 Patienten, die zwischen 1983 und 1997 entsprechend den Therapieoptimierungsstudien ALL-REZ BFM 83, 85, 87, 90 oder 95 behandelt worden sind, ist die pEFS in der Gruppe der späten Rezidive mit 40 % signifikant besser als in der Gruppe der sehr frühen und frühen Rezidive mit 20 % bzw. 13 %. Patienten mit sehr frühen und frühen Rezidiven sprechen häufiger nicht auf die Therapie an und weisen zudem eine kürzere zweite komplette Remission (*continuous complete remission, CCR*) und eine kleinere rezidivfreie Überlebensrate auf.⁹

Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor ist der Rezidivort. Rezidive manifestieren sich örtlich isoliert (z. B. isoliertes Knochenmark[KM]-Rezidiv oder isoliertes Testis-Rezidiv) oder kombiniert an mehreren Orten (z. B. kombiniertes KM/Testis-Rezidiv). Ein *isoliertes KM-Rezidiv* liegt bei Vor-

handensein von $\geq 25\%$ eindeutigen Blasten im KM und keiner extramedullären Beteiligung vor. Bei einem KM-Befall mit $\geq 5\%$ Blasten und gleichzeitigem Nachweis mindestens einer extramedullären Manifestation der ALL spricht man von einem *kombinierten KM-Rezidiv*. Ein *isoliert extramedulläres (IEM) Rezidiv* präsentiert sich als Krankheitsmanifestation außerhalb des KM und einer KM-Beteiligung von $< 5\%$ Blasten. Das isolierte KM-Rezidiv stellt die häufigste Rezidivform dar und hat mit einer pEFS von 19 % nach 10 Jahren eine besonders schlechte Prognose.⁹ Für kombinierte KM-Rezidive und IEM-Rezidive konnte eine signifikant bessere Heilungschance als für isolierte KM-Rezidive gezeigt werden (pEFS [kombinierte Rezidive] = 40 %; pEFS [IEM-Rezidive] = 47 %).^{8,9,12}

Der dritte Prognosefaktor beim ALL-Rezidiv ist der Immunphänotyp. Der bei Erstdiagnose nachgewiesene Immunphänotyp (ebenso wie Translokationen mit ihren entsprechenden Fusionstranskripten) findet sich zumeist beim Rezidiv wieder. In der Literatur sind jedoch auch instabile Immunphänotypen beschrieben.^{13,14} Der Immunphänotyp wird gemäß den durch die EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) festgelegten Kriterien bestimmt.¹⁵ Rezidive der T-Zellreihe, die ungefähr 13 % der ALL-Rezidive ausmachen, sind wesentlich aggressiver und resistenter als die der B-Zellreihe. Sie gehören überwiegend zu den sehr frühen und frühen Rezidiven. Die Remissionsrate sowie die Wahrscheinlichkeit des rezidivfreien Überlebens in zweiter CCR sind geringer.^{10,16}

Nach älteren Daten sind die prognostisch ungünstigen chromosomalen Translokationen in Leukämiezellen von Kindern mit ALL-Rezidiv im Vergleich zur Ersterkrankung überrepräsentiert. Dies betrifft insbesondere das BCR/ABL-Fusionstranskript, das Korrelat zur chromosomalen Translokation t(9;22).¹⁷ Da diese Patienten entsprechend dem aktuellen ALL-Erstbehandlungsprotokoll häufig ein Knochenmarkstransplantat erhalten, ist von einer Häufung BCR/ABL-positiver Leukämierезidive aktuell nicht mehr auszugehen (keine publizierten Daten vorhanden). Die chromosomale Translokation t(12;21) bzw. ihr molekulargenetisches Äquivalent TEL/AML1 ist mit etwa 20 % die häufigste chromosomale Aberration bei B-Zellimmunphänotyp ALL-Rezidiven im Kindes- und Jugendalter. Sie ist assoziiert mit prognostisch günstigen Faktoren wie langer erster CCR und niedriger Blastenzahl im Blutbild bei Rezidivdiagnose.^{18,19} Bei 70 % der ALL-Rezidivpatienten lässt sich keines der bekannten Fusionstranskripte in den Leukämiezellen nachweisen.

Neben Rezidivort, Rezidivzeitpunkt und Immunphänotyp sind aus verschiedenen Studien weitere Faktoren bekannt, die mit der Wahrscheinlichkeit einer anhaltenden zweiten CCR assoziiert sind. Eine periphere Blastenzahl $< 10.000/\mu\text{l}$, eine Leukozytenzahl $< 20.000/\mu\text{l}$, sowie ein Alter zwischen 2 und 10 Jahren zum Zeitpunkt des Rezidivs sind mit einer günstigen Prognose assoziiert.²⁰⁻²² Im Gegensatz dazu sind Leukozytenzahlen $\geq 50.000/\mu\text{l}$, ein Alter ≥ 10 Jahre und männliches Geschlecht mit einer kleineren pEFS assoziiert.^{8,6,21,22}

Das Ansprechen auf die Polychemotherapie stellt sowohl in der Rezidivbehandlung als auch in der Erstbehandlung einen wesentlichen Prognosefaktor dar. Sensitive molekulargenetische Methoden erlauben das Messen des Ansprechens auf die Therapie im KM unterhalb der zytologischen Nachweisgrenze. Diese ermittelte minimale Resterkrankung (Minimal residual disease, MRD) stellt bei ALL-Rezidiven in der Gruppe von Patienten mit mittlerem Risiko einen entscheidenden zusätzlichen Prognosefaktor dar, der in der aktuellen Studie ALL-REZ BFM 2002 für die Entscheidung über die Indikation für eine Stammzelltransplantation (SZT) herangezogen wird.²³

1.2 Isoliert extramedulläre Rezidive im Kindesalter

1.2.1 Definition und Diagnostik von isoliert extramedullären Rezidiven

Ein IEM-Rezidiv ist definiert als zytologisch und/oder histologisch und/oder immunologisch nachgewiesene Leukämie in einem extramedullären Kompartiment ohne eine eindeutig erkennbare KM-Beteiligung; d.h. mittels Lichtmikroskopie sind weniger als 5 % Leukämiezellen im KM nachweisbar.^{5,24}

Die häufigsten IEM-Rezidive treten im Zentralen Nervensystem (ZNS) und Testis auf. Rezidive in anderen extramedullären Organen wie Lymphknoten, Mediastinum, Haut, Brust, Knochen, Muskel, abdominalen Organen, Ohr und Auge sind sehr selten.^{7,25-27}

Ein ZNS-Rezidiv liegt beim Nachweis von morphologisch eindeutig identifizierbaren lymphoblastischen Leukämiezellen im Liquor und einer Pleozytose von $> 5/\mu\text{l}$ kernhaltigen Zellen vor. Die meisten Patienten mit einem IEM-ZNS-Rezidiv haben keine klinische Symptomatik. In seltenen Fällen präsentiert sich ein ZNS-Rezidiv mit Hirnnervenausfällen, Symptomen einer ZNS-Blutung oder Symptomen einer spinalen Rückenmarkseinklemmung.²⁸ Bei Verdacht auf ein ZNS-Rezidiv, jedoch unauffälligem Liquorbefund, sollte ein kranielles Computertomogramm bzw. eine Magnet-Resonanz-Tomographie des Kopfes angefertigt werden, um eine lokale Manifestation auszuschließen. Eine kraniale Raumforderung sollte bioptisch gesichert werden.^{9,29}

Ein testikuläres Rezidiv liegt bei einer kurzfristig aufgetretenen uni- oder bilateralen schmerzlosen Hodenschwellung ohne Entzündungszeichen vor, aus der sich mittels Biopsie eine Infiltration mit lymphoblastischen Leukämiezellen belegen lässt. Bei klinisch nur unilateral befallenem Hoden wird der kontralaterale Hoden bioptisch auf einen subklinischen Befall untersucht.^{9,29}

Ein sonstiges extramedulläres Rezidiv kann durch bildgebende Verfahren (z. B. Sonographie, Computertomographie, Magnetresonanztomographie) lokalisiert und durch eine Biopsie morphologisch und immunologisch verifiziert werden.^{9,29}

Zur vollständigen Diagnostik bei Verdacht auf ein IEM-Rezidiv gehört ebenfalls eine KM-Aspiration an zwei verschiedenen Punktionsstellen zum Ausschluss oder zur Bestätigung eines kombinierten Rezidivs. Das gewonnene Aspirat wird molekulargenetisch und zytogenetisch untersucht und die Zellen werden immunologisch typisiert.²⁹

1.2.2 Inzidenz und Prognose von isoliert extramedullären Rezidiven

IEM-Rezidive machen 15-25 % aller ALL-Erstrezidive aus.⁹ In den Jahren 1997-2003 erkrankten in Deutschland jährlich 12-19 Patienten (14-24 %) an einem IEM-Rezidiv (ALL-REZ BFM 1996-2002).

IEM-ZNS-Rezidive machen zwei Drittel der IEM-Rezidive aus.^{6,8,9,30} Vor der Einführung der lokalen ZNS-Therapien in den siebziger Jahren erlitten mehr als 50 % der Kinder mit ALL ein Rezidiv, das seinen Ursprung im ZNS hatte.³¹⁻³³ Durch die Einführung der kraniellen Bestrahlung, der intrathekalen Chemotherapie (Methotrexat, Cytarabin, Hydrokortison) und der systemischen Applikation von Chemotherapeutika mit adäquater Penetration ins ZNS (Hochdosis-Methotrexat, Dexamethason, Hochdosis-Cytarabin) konnte diese hohe Rate deutlich reduziert werden. Die kumulative Inzidenz eines Rezidivs im ZNS beträgt studienabhängig 3-10 %, wobei sich die Hälfte dieser Rezidive als IEM-ZNS-Leukämie manifestieren.²⁸ Für Kinder mit einem IEM-ZNS-Rezidiv, die gemäß den Studienprotokollen ALL-REZ BFM 83, 85, 87, 90 therapiert wurden, beträgt die pEFS 42 % nach 10 Jahren.³⁴

Wie bei isolierten und kombinierten KM-Rezidiven ist auch bei IEM-Rezidiven die pEFS signifikant abhängig vom Rezidivzeitpunkt.^{8,9} Die Mehrheit der IEM-ZNS-Rezidive (sehr frühe und frühe Rezidive) tritt innerhalb von 30 Monaten nach Erstdiagnose auf. Nur ein kleiner Anteil der IEM-ZNS-Rezidive (späte Rezidive) wird später als 30 Monate diagnostiziert.^{35,36} Die pEFS für sehr frühe, frühe und späte IEM-ZNS-Rezidive, die nach ALL-REZ BFM 83-95 behandelt wurden, beträgt 29 %, 45 % und 67 %.⁹

Der Testis ist der zweithäufigste Ort eines IEM-Rezidivs. IEM-Testis-Rezidive treten in der Regel später als IEM-ZNS-Rezidive auf und sind mit einer günstigeren Prognose assoziiert.³⁷ Die pEFS liegt bei ungefähr 70 % nach 5 Jahren.^{8,30,38} In der Rezidivstudie der Children`s Cancer Group (USA) liegen die pEFS bei sehr frühen (0-17 Monate nach Erstdiagnose), frühen (18-36 Monate nach Erstdiagnose) und späten (> 36 Monate nach Erstdiagnose) IEM-Testis-Rezidiven bei 52 %, 57 % und 81 % nach 6 Jahren.⁸

Sonstige IEM-Rezidive sind sehr selten. In einer Analyse der ALL-REZ BFM-Studien 1983-2003 erlitten nur 2 % (52/2671) der eingeschlossenen Patienten ein sonstiges IEM-Rezidiv. Befallene Organe waren (häufigste erstgenannt): Lymphknoten, Mediastinum, Knochen, Haut, Niere, weiblicher Genitaltrakt, Serosa, Auge/Orbita, Drüsen, Leber, Milz, Pankreas, Darm und Prosta-

ta. Analysen zum Überleben von Patienten mit einem sonstigen IEM-Rezidiv sind nicht publiziert. In einer Analyse der ALL-REZ BFM-Studien 1983-2003 wurden die Prognosen von Patienten mit isolierten (52/2671) und kombinierten sonstigen Rezidiven (80/2671) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die pEFS von der Lokalisation und vom Immunphänotyp abhängt. Die pEFS für die Gruppe der sonstigen IEM-Rezidive ist schlecht, insbesondere für Patienten mit einem Rezidiv im Mediastinum.³⁹

1.2.3 Prognostische Faktoren bei isoliert extramedullären Rezidiven

Wie in der Gesamtgruppe der Rezidive hat auch in der Gruppe der IEM-Rezidive der Rezidivzeitpunkt eine hohe prognostische Relevanz.^{8,9}

Auch die extramedulläre Manifestation (ZNS, Testis, sonstiges Organ) hat Einfluss auf die Prognose. So haben Patienten mit einem IEM-Testis-Rezidiv eine höhere Überlebenschance als Patienten mit IEM-ZNS-Rezidiv.³⁷

Für die Subgruppe der *IEM-ZNS-Rezidive* wurde in einer Analyse gezeigt, die die ALL-REZ BFM-Studien 83-96 einschliesst, dass das Geschlecht und das Alter bei Erstdiagnose zusätzliche prognostische Faktoren darstellen.^{29,40} Andere Studiengruppen beschrieben ähnliche Ergebnisse.^{30,41} In der multivariaten Analyse stellten sich für diese Gruppe der frühe Zeitpunkt des Rezidivs, das männliche Geschlecht, ein hohes Alter bei Erstdiagnose und der T-Immunphänotyp als unabhängige ungünstige prognostische Faktoren heraus. Anhand der Kombination dieser Risikofaktoren lässt sich die Gruppe der sehr frühen und frühen IEM-ZNS-Rezidive in eine prognostisch günstigere Standardrisikogruppe und eine prognostisch ungünstigere Hochrisikogruppe unterteilen (Tabelle 1).²⁹ Entsprechend wurde während der Laufzeit der ALL-REZ BFM-Studie 2002 für die Hochrisiko-Patienten eine Therapieintensivierung durch eine autologe SZT empfohlen.

In der Gruppe der *IEM-Testis-Rezidive* sind der Rezidivzeitpunkt, der Immunphänotyp und das Ausmaß der Hodenbeteiligung (unilateral oder bilateral) signifikant mit der Prognose assoziiert

Tabelle 1: Einteilung von Kindern mit sehr frühem oder frühem IEM-ZNS-Rezidiv in Hochrisikopatienten (H) und Standard-Risikopatienten (S). (ALL-REZ BFM 2002²⁹)

	Geschlecht	Männlich		Weiblich	
		Alter bei Erstdiagnose	≥ 6	< 6	≥ 6
Immunphänotyp	Zeitpunkt				
T	Sehr früh	H	H	H	H
	früh	H	H	H	H
Non-T	Sehr früh	H	H	S	S
	früh	H	S	S	S

(Ergebnis der univariaten Analyse der ALL-REZ BFM-Studien 83-96).⁴² Der T-Zell-Ursprung der Leukämie ist in der Subgruppe der sehr frühen und frühen Testis-Rezidive mit einer ungünstigen Prognose assoziiert.²⁹ In der multivariaten Analyse sind nur Rezidivzeitpunkt und Ausmaß der Hodenbeteiligung unabhängige prognostische Faktoren. In der Gruppe der sehr frühen und frühen IEM-Testis-Rezidive ist das Ausmaß der Hodenbeteiligung der einzige signifikante prognostische Faktor (pEFS [unilateral] = 68 %, SE \pm 0,13 und pEFS [bilateral] = 22 %, SE \pm 0,08).⁴²

1.2.4 Stratifizierung und Therapie von isoliert extramedullären Rezidiven

Im ALL-Rezidivprotokoll der BFM-Gruppe (Deutschland, Österreich, Schweiz, Tschechische Republik und Toronto) werden die Patienten seit der Studie ALL-REZ BFM 96 gemäß den oben beschriebenen prognostischen Parametern Rezidivzeitpunkt, Rezidivort und Immunphänotyp der ALL in eine von vier Risikogruppen (S1-S4) stratifiziert. Patienten mit einem IEM-Rezidiv werden in Abhängigkeit vom Rezidivzeitpunkt entweder in S1 oder S2 eingruppiert. Während sich die Risikogruppe S1 ausschließlich aus späten IEM-Rezidiven zusammensetzt, umfasst die Risikogruppe S2 sehr frühe und frühe IEM-Rezidive, frühe und späte kombinierte KM-Rezidive, sowie späte isolierte KM-Rezidive.⁹ Im ALL-Rezidivprotokoll AIEOP (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica) ALL REC 2003 erfolgt die Stratifizierung der IEM-Rezidive ebenfalls nur nach dem Rezidivzeitpunkt.⁴³ In den Vorläuferstudien ALL-REZ BFM 85, 87, 90 wurden alle IEM-Rezidive unabhängig vom Rezidivzeitpunkt in der gleichen Stratifizierungsgruppe (Therapiegruppe C) mit einer weniger intensiven Therapie behandelt.^{5,11} Das französische Rezidivprotokoll COOPRALL (Protocole coopérateur de traitement des rechutes de leucémies aiguës de l'enfant) stratifiziert die Rezidive in die Risikogruppen G1 bis G3. Patienten mit einem IEM-Rezidiv befinden sich ausschließlich in den Gruppen G2 und G3. G2 schließt T-Zell-Rezidive und frühe Hochrisiko-Rezidive (chemoresistent während der Initialtherapie und/oder Nachweis der Translokationen t(9;12) oder t(4;11)) ein. G3 beinhaltet ausschließlich B-Zell-Rezidive und schließt frühe initiale Hochrisiko-Patienten aus. G3 ist entsprechend der Dauer der ersten CCR in frühe (CCR \leq 24 Monate: G3a) und späte (CCR > 24 Monate: G3b) IEM-Rezidive unterteilt.⁴⁴

Der Behandlungsplan für IEM-Rezidive umfasst eine intensive Induktionstherapie, gefolgt von einer Konsolidierungstherapie, beide mit jeweils verschiedenen Polychemotherapieelementen und einer sich anschließenden Dauertherapie. Die verwendeten Medikamente, deren Dosis und die Dauer der einzelnen Therapieelemente variieren zwischen den verschiedenen Studienprotokollen.^{6,8,30,45} In der BFM-Rezidivstudie erhalten Patienten mit einem IEM-Rezidiv die gleiche systemische Polychemotherapie wie isolierte und kombinierte KM-Rezidive, ergänzt durch eine Lokaltherapie. Im Vergleich zu S1-Patienten, erhalten S2-Patienten eine intensivere und längere Therapie: In der S2-Gruppe umfasst die Konsolidierungstherapie zwei zusätzliche R-Blöcke

und die 24-monatige Dauertherapie beinhaltet Etoposid-Reinduktionspulse; in der S1-Gruppe erfolgt hingegen eine 12-monatige Dauertherapie ohne Reinduktionspulse.

Für einige S2-IEM-Patienten (z. B. Hochrisiko-ZNS-Patienten) besteht die Option einer autologen oder allogenen SZT. Die Indikation zur SZT bei Kindern mit IEM-Rezidiv ist in den verschiedenen Therapieprotokollen sehr unterschiedlich. Im COOPRALL-Protokoll besteht für Patienten der G3a-Gruppe eine Indikation zur HLA-identischen Familienspender (*matched-family donor*) SZT; Patienten der G3b-Gruppe haben keine SZT-Indikation. Auch in anderen Studienprotokollen wird die SZT bei IEM-Rezidiven als Therapieelement verwendet.⁴⁶

Zusätzlich zur systemischen Polychemotherapie stellt die Lokalthherapie die zweite wichtige Säule der Behandlung von Kindern mit IEM-Rezidiv dar. Bei Kindern mit IEM-ZNS-Rezidiv besteht die Lokalthherapie aus intrathekaler Chemotherapie und Bestrahlung des Schädels. Die Strahlentherapie der BFM-Rezidivstudie beinhaltet die Bestrahlung des Schädels und der oberen 3 Halssegmente mit 18 Gray (Gy). Bei Vorbelastungen von über 18 Gy, bzw. über 15 Gy bei Kindern jünger als 2 Jahre, wird die Bestrahlungsdosis auf 15 Gy reduziert. Beträgt das Bestrahlungsintervall zur initialen Strahlentherapie weniger als 24 Monate, wird bereits bei einer Vorbelastung von über 15 Gy, bzw. mehr als 12 Gy bei Kindern jünger als 2 Jahre, die Strahlendosis auf 15 Gy reduziert. Die lokale Bestrahlungstherapie erfolgt zwischen Konsolidierungstherapie und Beginn der Dauertherapie.³⁴ Auch in anderen Studien geht der Trend zu einer späten Bestrahlung, da verschiedene Autoren hohe Leukoenzephalopathieraten bei Kindern beschreiben, bei denen die kranielle Strahlentherapie der intrathekalen Therapie und der systemischen Chemotherapie (insbesondere Methotrexat) vorausging.⁴⁷⁻⁴⁹ Über den Bestrahlungsmodus, Schädelbestrahlung oder Schädelbestrahlung mit spinaler Bestrahlung, besteht keine Einigkeit.^{8,45,48,49} Die intrathekale Chemotherapie der BFM-Rezidivstudie ist jeweils eine Tripletherapie bestehend aus Methotrexat, Cytarabin und Prednison. Die Dosierung der einzelnen Medikamente ist altersabhängig. Die erste Dosis der intrathekalen Tripletherapie wird bei der diagnostischen Lumbalpunktion verabreicht. Mit Beginn der Dauertherapie wird die intrathekale Chemotherapie beendet.

Im Rahmen der Behandlung entsprechend der aktuellen ALL-REZ BFM-Studie wird bei Kindern mit einem Testis-Rezidiv der klinisch involvierte Hoden entfernt. Der kontralaterale, klinisch nicht befallene Hoden wird biopsiert. Ist der kontralaterale Hoden histologisch nicht von Leukämiezellen befallen, erfolgt die Bestrahlung mit einer reduzierten Dosis von 15 Gy. Nach dieser Dosis ist die Wahrscheinlichkeit für einen spontanen Eintritt in die Pubertät durch die endokrine Restfunktion hoch.⁵⁰ Bei histologisch befallenem kontralateralen Hoden erfolgt die Bestrahlung mit 18 Gy.³⁴ In anderen Rezidivstudien wird häufig die bilaterale Bestrahlung der Hoden mit Bestrahlungsdosen zwischen 20 und 26 Gy bevorzugt.⁵¹⁻⁵⁵ Die optimale Bestrahlungsdosis ist

unklar. Bei Strahlendosen von 24 Gy und mehr ist nachfolgend von einer gonadalen Dysfunktion auszugehen.^{56,57}

Im Falle einer sonstigen extramedullären Lokalisation wie Lymphknoten, Mediastinum, Haut, Brust, Knochen, Muskel und abdominalen Organen erfolgt in der Regel keine spezifische Lokaltherapie, da diese Organe nicht über eine funktionelle Schranke gegenüber der systemischen Chemotherapie verfügen.

1.3 Bedeutung der Knochenmarkbeteiligung bei Rezidiven mit extramedullärer Manifestation

Eine Analyse der Studien ALL-REZ BFM 1983-95 vergleicht die KM-Beteiligung bei Rezidiven mit extramedullärer Manifestation (IEM-Rezidive und kombinierte KM-Rezidive) mit der pEFS.⁹ Die durchgeführte Kaplan-Meier-Analyse von 372 Patienten mit einem ALL-Rezidiv mit extramedullärer Beteiligung zeigte keinen Einfluss des Ausmaßes der KM-Beteiligung auf die pEFS ($p[\text{Log-Rank}] = 0,15$) (Abbildung 1). Eine weitere Analyse, die die pEFS bei IEM-Rezidiven ($< 5\%$ Blasten) und kombinierten KM-Rezidiven ($\geq 5\%$ Blasten) vergleicht, zeigt ebenfalls keinen Unterschied: pEFS [IEM] = 47%, SE $\pm 0,04$ und pEFS [kombiniert] = 40%, SE $\pm 0,04$.⁹

Das in Abbildung 1 dargestellte Analysenergebnis bezieht sich auf die Gesamtgruppe der Rezidive mit extramedullärer Beteiligung. Eine separate Analyse für verschiedene Subgruppen (Aufteilung nach befallenen extramedullären Kompartiment [ZNS, Testis] oder Rezidivzeitpunkt [sehr früh, früh, spät]) wäre sehr sinnvoll, denn in Subgruppen ist ein anderes Ergebnis zu erwarten. So konnte zum Beispiel in der Studie MRC UKALL X (United Kingdom Medical Research Council Working Party on Childhood Leukemia) für die Subgruppe der späten extramedullären ZNS-Rezidive gezeigt werden, dass sich die pEFS von kombinierten ZNS-Rezidiven

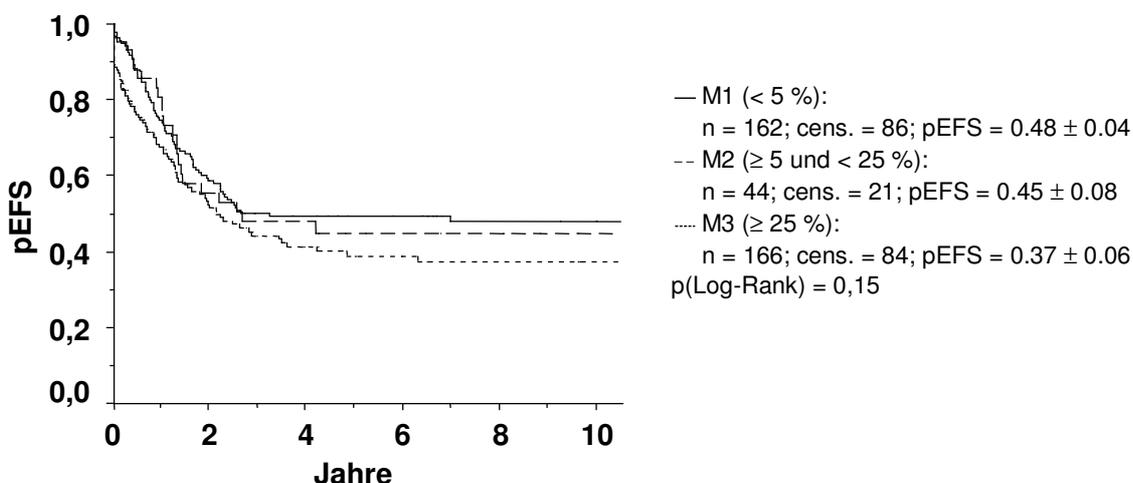


Abbildung 1: pEFS von Kindern mit einem extramedullären Rezidiv der ALL entsprechend dem Anteil der leukämischen KM-Beteiligung (SZT zensiert). ALL-REZ BFM 83-95.

($\geq 5\%$ Blasten) und IEM-ZNS-Rezidiven ($< 5\%$ Blasten) um bis zu 20 % unterscheidet (pEFS [späte kombinierte ZNS-Rezidive] = 41 % und pEFS [späte IEM-ZNS-Rezidive] = 64 %).⁶

Zusätzlich kann durch eine multivariate Analyse, die neben bekannten prognostischen Faktoren auch das Ausmaß der KM-Beteiligung einschließt, untersucht werden, ob die KM-Beteiligung ein prognostisch unabhängiger Risikofaktor ist.

1.4 Sensitivitätsgrenze der mikroskopischen Beurteilung von Knochenmark- und Blutausstrichen

Die zytomorphologische Untersuchung von Blut- oder KM-Ausstrichen mit der Pappenheim- oder Wright-Färbung hat sich als schnelle und kostengünstige Methode in der Diagnostik und im Therapieverlauf der ALL bewährt. Morphologisch werden die lymphatischen Zellen gemäß den Kriterien der French-American-British Cooperative Group klassifiziert.⁵⁸

Die Sensitivitätsgrenze des Lichtmikroskops beträgt 5×10^{-2} bis 10^{-1} , zum Beispiel fünf bis zehn Leukämiezellen unter einhundert ausgezählten Zellen. Ein verlässlicher Nachweis von weniger als fünf Leukämiezellen unter einhundert gesunden Zellen ist mit der Methode der Lichtmikroskopie nicht möglich.^{59,60}

1.5 Methoden zur submikroskopischen Messung von residuellen Leukämiezellen

Für die Bestimmung von Leukämiezellen unterhalb der Nachweisgrenze der Lichtmikroskopie stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die sich hinsichtlich ihrer Sensitivität und Anwendbarkeit, sowie der Kosten und des Zeitaufwands unterscheiden.

Als sensitivste und reproduzierbarste Methoden für den Nachweis von Leukämiezellen bei der ALL im Kindesalter haben sich (a) die quantitative durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von abnormalen Oberflächenmarkerkombinationen und (b) die Amplifikation von leukämiezellspezifischen klonalen T-Zellrezeptor (TZR)- und Immunglobulin (Ig)- Genumlagerungen durch Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgesetzt (Tabelle 2). In den therapiebegleitenden MRD-Studien der ALL-Therapieoptimierungsstudien gilt die PCR-Methode als der Goldstandard.^{61,62}

Während der frühen B- und T-Zell-Differenzierung werden die V (*variable*)-, D (*diversity*)- und J (*joining*)-Gensegmente der Genorte, die für die variablen Domänen der Ig- und TZR-Gene kodieren, neu angeordnet. Im Falle des IgH-, TZR β - und TZR δ -Genortes codieren V-, D- und J-Segmente die variablen Regionen; im Falle des Ig κ -, Ig λ -, TRZ α - und TZR γ -Genortes werden die variablen Regionen nur durch V- und J-Segmente codiert. Durch den Umlagerungsprozess erhält jeder Lymphozyt eine spezifische Kombination von jeweils einem V-(D)-J-Segment. Ver-

mittelt wird dieser Genumlagerungsprozess durch ein Rekombinase-Enzym-System, das aus verschiedenen Komponenten wie die Rekombinase aktivierenden Gene RAG-1 und RAG-2 besteht. Die enorme Vielfalt der spezifischen Antigenrezeptoren entsteht zum einen durch das oben beschriebene Rearrangieren von Gensegmenten (Kombinationsvielfalt) und zum anderen durch die Verbindungsvielfalt dieser Gensegmente. An den aufeinander treffenden Bereichen von zwei Gensegmenten werden Nukleotide in der *germline*-Sequenz entfernt und/oder zwischen den beiden Gensegmenten Nukleotide eingefügt. Der letztgenannte Prozess wird durch die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) katalysiert. Die TdT ist in der Lage, Nukleotide an 3'-Enden von DNA-Strangbrüchen ohne Matrize einzufügen. Als dritter Mechanismus der Vielfältigkeit der TZR- und Ig-Genumlagerungen zählen somatische Mutationen.⁶³ Die somit entstehenden Verbindungsregionen zwischen den V-(D)-J-Regionen stellen „Fingerabdruck“-ähnliche Sequenzen dar, die in jeder lymphatischen Zelle unterschiedlich sind. Da die ALL eine klonale Proliferation einer lymphatischen Vorläufer-Zellen darstellt, kann diese Verbindungsregion als leukämiezellspezifisches Target für den PCR-basierten submikroskopischen Nachweis von Leukämiezellen verwendet werden.⁶¹

Der auf dieser Methode basierende submikroskopische Nachweis von Leukämiezellen kann bei mehr als 80 % der Kinder mit ALL angewendet werden. Die Identifizierung dieser Marker und das Generieren sensitiver klonspezifischer Sonden sind jedoch arbeits- und kostenintensiv.⁶²

Parallel zu den PCR-basierten Nachweismethoden hat sich die Durchflusszytometrie mit der Verwendung Leukämiezell-assoziiierter Oberflächenmarker als submikroskopische Nachweismethode von Leukämiezellen durchgesetzt.⁷⁴ Unter Leukämiezell-assoziierten Oberflächenmarkern versteht man aberrante Expressionen von Antigenen auf den Leukämiezellen. Diese Immunphänotypen entstehen zum Beispiel durch *cross-lineage* Antigenexpression, asynchrone

Tabelle 2: Häufigkeiten identifizierbarer TZR- und Ig-Genrekombinationen als PCR-Target bei ALL im Kindesalter.

Genort	Rearrangement	Häufigkeiten	
		B-Vorläufer ALL	T-ALL
IgH	VH-JH	92 % ⁶⁴	4 % ⁶⁵
	DH-JH	22 % ⁶⁴	18 % ⁶⁵
Igκ	Igκ-Kde	48 % ⁶⁶	0 %
	Vκ-Jκ	30 % ⁶⁷	< 1 % ⁶⁸
Igλ	Vλ-Jλ	17 % ⁶⁷	< 1 % ⁶⁸
TZRγ	TZRγ	60 % ⁶⁹	95 % ⁶⁹
TZRδ	TZRδ	49 % ⁷⁰	37 % ⁷⁰
TZRα	Vδ2-Jα	25 % ⁷¹	keine Daten
TZRβ	Vβ-Jβ	25 % ⁷²	80 % ⁷³
	Dβ-Jβ	15 % ⁷²	53 % ⁷³

Expression von Antigenen, Über- bzw. Unterexpression von Antigenen oder durch ektoper Antigenexpression.⁶¹ Die Unterschiede der Antigenexpression zwischen Leukämiezellen und normalen B- und T-Lymphozyten können qualitativ und/oder quantitativ sein. Zur Identifizierung von Leukämiezellen nutzt man Kombinationen von Oberflächenmarkern, die mittels Antikörpern, die mit verschiedenen Fluorochromen konjugiert sind, nachgewiesen werden. Die Muster der Antigenexpression können sich im Verlauf der Erkrankung verändern; tatsächlich ist jedoch bei mindestens 80 % der ALL eine Leukämiezell-assoziierte Antigenkombination zum Zeitpunkt des Rezidivs noch stabil.^{74,75} Die Durchflusszytometrie kann somit bei mehr als 80 % der Kinder mit ALL zum Nachweis von Leukämiezellen angewendet werden.⁷⁶ Die Methode ist schnell durchführbar und relativ preisgünstig.

Submikroskopische Messung der Knochenmarkbeteiligung bei isoliert extramedullären Rezidiven

Ungefähr ein Fünftel der Erstrezidive der ALL im Kindesalter treten in einem extramedullären Ort ohne morphologischen Nachweis einer KM-Beteiligung auf. Die hohe Inzidenz von Folge- rezidiven im KM ließ jedoch vermuten, dass zum Zeitpunkt des IEM-Rezidivs Leukämiezellen auf submikroskopischem Niveau im KM vorhanden sein müssten.³² Diesem klinischen Verdacht einer okkulten Leukämie im KM zum Zeitpunkt des IEM-Rezidivs wurde in vier Studien, die in den Jahren 1993 bis 1998 erschienen sind, nachgegangen. Diese untersuchten erstmalig bei IEM-Rezidiven die KM-Beteiligung unterhalb der morphologischen Nachweisgrenze.^{38,77-79} Zusammengefasst sind diese vier Studien in Tabelle 3.

Tabelle 3: Studien zur Messung der submikroskopischen KM-Beteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose bei IEM-Rezidiven.

Arbeitsgruppe	Patientenzahl	extramedullärer Ort	erreichte Sensitivität	Ergebnis	Methode
Goulden et al. (1994)	13 (B-ALL)	ZNS (8) Testis (4) Auge (1)	10^{-4} (5) 10^{-5} (5) n.u. (3)	2/13 10^{-2} 5/13 10^{-3} 2/13 10^{-4} 3/13 positiv 1/13 negativ	Genorte: V δ 2D δ 3, IgH Dot-Blot-Hybridisierung
O'Reilly et al. (1994)	7	ZNS (4) Testis (3)	10^{-3} (1) 10^{-4} (4) 10^{-5} (2)	1/7 10^{-1} 2/7 10^{-3} 2/7 10^{-4} 1/7 $10^{-4/5}$ 1/7 n.u.	Genort: IgH Dot-Blot-Hybridisierung
Neale et al. (1993)	6 (T-ALL)	ZNS (6)	10^{-3} (1) 10^{-4} (4) 10^{-5} (1)	2/6 10^{-2} - 10^{-3} 2/6 10^{-3} - 10^{-4} 2/6 n.u.	Genorte: TZR δ , Sil-Tal-Deletion Dot-Blot-Hybridisierung
Lal et al. (1998)	6	Testis (6)	10^{-3} - 10^{-5}	6/6 positiv	Genort: IgH semi-quantitative (semi-nested) PCR Agarosegelelektrophorese

n.u. – nicht untersucht

Die Studien wurden retrospektiv durchgeführt; die Auswahl der Patienten erfolgte entsprechend dem Vorhandensein von Patienten-DNA-Proben. Die untersuchten Patientengruppen stellten jeweils Subgruppen dar, wie zum Beispiel ZNS- oder Testis-Rezidive sowie T-ALL oder B-ALL-Rezidive. Die untersuchten Patientengruppen waren in allen vier Studien sehr klein (< 15 Patienten). Die Bestimmung leukämischer Restzellen erfolgte mit semi-quantitativen Methoden (PCR basierte Dot-Blot-Hybridisierung bzw. semi-quantitative PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese); teilweise konnten nur qualitative Aussagen (positiv/negativ) getroffen werden. Als klonspezifische Marker wurden TZR- und Ig- Genumlagerungen sowie die Sil/Tal Deletion verwendet. Die Identifizierung der klonspezifischen Marker im KM erfolgte zum Zeitpunkt der Erstdiagnose; nur von Lal et al. wurde die Stabilität der Marker zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose überprüft.³⁸ Der Screeningprozess zur Identifizierung klonaler Marker beschränkte sich bei O'Reilly et al. und Lal et al. auf den IgH-Genort; Goulden et al. haben zusätzlich den TZR δ -Genort betrachtet. Neale et al. screenen auf klonale Marker im TZR δ -Genort und die Sil/Tal Deletion. Diese ersten Studien führten aufgrund der geringen Patientenzahlen noch keine statistischen Analysen durch und konnten damit keine Aussagen zu einem möglichen Zusammenhang zwischen der unterhalb der morphologischen Nachweisgrenze bestimmten KM-Beteiligung und der Prognose dieser Patienten treffen.

Von Uckun et al. wurden 1999 und 2001 zwei Arbeiten veröffentlicht, in denen die Last leukämischer Vorläuferzellen zum einen in 31 pädiatrischen B-Vorläufer-Zell-ALL-Patienten und zum anderen in 15 pädiatrischen T-ALL-Patienten zum Zeitpunkt des IEM-Rezidivs mittels Durchflusszytometrie und Kolonieassay bestimmt wurde.^{80,81} Der Anteil der Patienten mit nachgewiesenen leukämischen Progenitorzellen war kleiner als in den oben erwähnten Arbeiten (19/31 B-ALL; 8/15 T-ALL). Jedoch sind die Ergebnisse aufgrund der unterschiedlich angewendeten Methoden und der sich im Reifegrad unterscheidenden Zellen nicht vergleichbar. Uckun et al. korrelierten die nachgewiesenen leukämischen Vorläuferzellen mit klinischen Parametern (Rezidivort, Rezidivzeitpunkt, Alter, Leukozytenzahl), konnten jedoch keinen statistischen Beweis für einen Zusammenhang finden.

1.6 Biologie und Pathogenese

Vorraussetzung für die Wanderung von Leukämiezellen aus dem KM in extramedulläre Organe sind bestimmte Zelleigenschaften, zum Beispiel Adhäsions-, Migrations- und Invasionseigenschaften. Diese Eigenschaften werden durch Chemokine, Zytokine und deren Rezeptoren (z. B. SDF-1/CXCR 4, CXCL 12, IL 15) vermittelt und sind Gegenstand aktueller Forschungen.⁸²⁻⁸⁴

Die führende Hypothese zur Entstehung einer Leukämie im ZNS oder Testis vermutet den Ursprung der Leukämiezellen im KM.⁸⁵ Der Vergleich von zytogenetischen und molekularbiologischen Markern, Immunphänotypen und Karyotypen von Leukämiezellen im extramedullären

Kompartiment (ZNS, Testis) mit initialen KM-Leukämiezellen unterstützt diese Hypothese.^{38,86} Auch die klinische Beobachtung, dass extramedulläre Organe zum Zeitpunkt des Rezidivs deutlich häufiger befallen sind als bei Initialerkrankung, macht eine Besiedlung der extramedullären Organe durch Leukämiezellen, die aus dem KM stammen, wahrscheinlich. Diese Hypothese schließt jedoch nicht aus, dass die Leukämiezellen auch im ZNS ihren Ursprung haben können und zu einem späteren Zeitpunkt das KM rückbesiedeln. In der Literatur sind Einzelfälle beschrieben, bei denen eine ZNS-Leukämie diagnostiziert worden war, bevor im KM oder Blut eine Leukämie nachgewiesen werden konnte.^{87,88} Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die Hämatopoese zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Embryogenese auch im Plexus choroideus und in den Leptomeningen stattfindet und nach dem Wechsel des Hämatopoeseortes das Potenzial für hämatopoetische Aktivität und somit für leukämische Transformation erhalten bleibt.⁸⁵

Leukämiezellen können über die systemische Blutzirkulation oder vom Schädelknochen direkt ins Gehirnparenchym gelangen.²⁸ Erstes lässt sich durch Autopsiestudien stützen, die Leukämiezellen in den Wänden von oberflächlichen Arachnoidalvenen nachweisen konnten.⁸⁹ Man geht davon aus, dass die Leukämiezellen durch Migration durch das venöse Endothel in das Gehirnparenchym eindringen können. Begünstigt wird die Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke durch Infektionen.³⁵ Das Eindringen von Leukämiezellen ins ZNS kann auch durch kraniale petechiale Blutungen möglich sein. Klinische Studien haben gezeigt, dass schwere Thrombozytopenien zum Zeitpunkt der Diagnose mit einer hohen Inzidenz an ZNS-Leukämien assoziiert sind.⁹⁰

Die Ausbreitung von Leukämiezellen vom Schädelknochen direkt ins ZNS kann über die Adventitia von Brückenvenen und über das Perineurium von Nerven, die den subduralen Raum überqueren, erfolgen.⁹¹ Eine weitere Möglichkeit ist die Ausbreitung der Leukämiezellen durch die bei knöchernen Läsionen des Schädels beschädigten Meningen.

Man vermutet, dass die Leukämiezellen um den Zeitpunkt der Diagnosestellung, wenn die Leukämie mikroskopisch im KM und im Blut nachweisbar ist, ins ZNS gelangen. Proliferationsstudien zeigten eine viel geringere Proliferationsrate der Leukämiezellen im Liquor im Vergleich zu jenen im Blut und KM; auch sind die Leukämiezellen im Liquor kleiner als im Blut bzw. KM.⁹²⁻⁹⁴ Diese langsam proliferierenden Leukämiezellen können lange Zeit nach der Ersterkrankung zu einem ZNS-Rezidiv führen. Die Anwesenheit von bis zu $10^9/10^{10}$ Leukämiezellen im Körper zum Zeitpunkt der hämatologischen CCR macht eine Ausbreitung von Leukämiezellen ins ZNS während hämatologischer CCR ebenfalls möglich.⁹⁵ Die Wirksamkeit der lokalen ZNS-Therapien zur Prävention von ZNS-Rezidiven (appliziert im Therapieverlauf, zumeist während der Patient in CCR ist) unterstützt diese Hypothese.

Die hohe Rate von Folgerezidiven im KM nach IEM-ZNS-Rezidiven und die beobachtete mögliche Prävention dieser KM-Rezidive durch lokale ZNS-Therapien macht eine Rückbesiedlung des KM mit ZNS-Leukämiezellen wahrscheinlich. Neben den Wegen, die für den Eintritt der Leukämiezelle ins ZNS diskutiert wurden, kommt für die Rückbesiedlung des KM die Resorption der Liquorleukämiezellen durch die Pacchioni-Granulationen in Betracht. Hierbei handelt es sich um Ausstülpungen der Arachnoidea durch die Dura hindurch, die den Liquor aus dem Subarachnoidalraum in die venösen Sinus ableiten.

Ein Folgerezidiv im KM nach Auftreten eines IEM-Rezidivs kann auch durch okkulte Leukämiezellen im KM zum Zeitpunkt des IEM-Rezidivs verursacht sein.

2 Aufgabenstellung

ALL-Rezidive mit einer extramedullären Beteiligung stellen mehr als ein Drittel der Rezidive im Kindesalter dar. Die morphologische Beurteilung des KM bei Rezidivdiagnose erlaubt die Unterteilung dieser Rezidive in 2 Kategorien: kombinierte KM-Rezidive ($\geq 5\%$ Blasten) und IEM-Rezidive ($< 5\%$ Blasten). Der Bereich $< 5\%$ ist aufgrund der dort liegenden Nachweisgrenze der Lichtmikroskopie morphologisch nicht zu beurteilen.

Schon vor mehr als 10 Jahren wurde mit den damals zur Verfügung stehenden semi-quantitativen Methoden nachgewiesen, dass unterhalb der morphologischen Nachweisgrenze Leukämiezellen im KM von Kindern mit IEM-Rezidiv vorhanden sein können. In dieser Arbeit soll mit Hilfe der quantitativen *Real-time PCR* (RQ-PCR) von klonalen Antigenrezeptoren an einer großen Patientenzahl systematisch geprüft werden, ob bei Patienten mit einem IEM-Rezidiv zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose Leukämiezellen im KM nachweisbar sind.

Für diese Arbeit ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Besteht bei extramedullären Rezidiven mit morphologisch $< 5\%$ Leukämiezellen im KM zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose eine submikroskopische KM-Beteiligung?
- Wie hoch ist die durch RQ-PCR von klonalen Antigenrezeptoren ermittelte submikroskopische KM-Beteiligung? Welches sind die minimalen und maximalen Werte? Wie hoch ist der Anteil an IEM-Rezidiven, die entsprechend der Sensitivität der TZR-/Ig-RQ-PCR keinen submikroskopischen Nachweis einer KM-Beteiligung haben?
- Besitzt das Ausmaß der submikroskopischen KM-Beteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose eine prognostische Relevanz? Ist zum Beispiel durch Messung der submikroskopischen KM-Beteiligung ein Folgerezidiv vorhersehbar? Besteht eventuell ein Zusammenhang zwischen der Höhe des quantitativen Werts der submikroskopischen KM-Beteiligung und dem Ort des Folgerezidivs?
- Welche klinische und therapeutische Konsequenz muss aus der eventuellen prognostischen Relevanz der submikroskopischen KM-Beteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose geschlossen werden?

3 Materialien, Methoden und Patienten

3.1 Materialien

Chemikalien

Agarose NuSieve® GTG® Agarose	Biozym Diagnostics GmbH, H. Oldendorf, Deutschland
Agarose Seakem® GTG®	Biozym Diagnostics GmbH, H. Oldendorf, Deutschland
Borsäure	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dextran sulfate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DMSO (Dimethylsulphoxide)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
EDTA-Puffer	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Eisessig	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100 %	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid, reinst	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ficoll (Type 400)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Ficoll Separating Solution	Biochrom AG Seromed®, Berlin, Deutschland
Foetal Bovine Serum, Mycoplasmen getestet	Biochrom AG Seromed®, Berlin, Deutschland
Formamid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid Plättchen	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
PBS-Dulbecco (1x), w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG Seromed®, Berlin, Deutschland
POP 6	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RPMI 1649 Medium (w 20mM Hepes, w stable Glutamine)	Biochrom AG Seromed®, Berlin, Deutschland
Saccharose	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trizma Base®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
TÜRKIS Lösung	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Water, Molecular Biology Grade	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Wasser, HPLC gereinigt	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylen	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylencyanol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland

Säulen- und Filtersysteme

DyeEx™, Sephadexsäulen	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
------------------------	----------------------------------

Reagenziensysteme (Kits)

Big Dye™ Terminator	Perkin Elmer™ Life Sciences, Foster City, CA, USA
QIAquick®, PCR Purification System	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Enzyme

AmpliTaQ Polymerase	Perkin Elmer™ Life Sciences, Foster City, CA, USA
AmpliTaQ Gold Polymerase	Perkin Elmer™ Life Sciences, Foster City, CA, USA
Platinum® Taq Polymerase	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K 10 mg/ml	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

DNA-Längenmarker/ DNA/ Deoxynukleotide/ Puffer/ Magnesiumchlorid

DNA-Längenmarker 100 bp	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
dNTP Set 100 mM	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂ 50 mM	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
PE 10xPuffer (15 mM MgCl ₂)	Perkin Elmer™ Life Sciences, Foster City, CA, USA
PCR Puffer (ohne MgCl ₂)	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

DNA-Präparationssysteme

Puregene™ DNA-Isolierungskit	Biozym Diagnostics GmbH, H. Oldendorf, Deutschland
------------------------------	--

Lösungen

EDTA 0,5 M pH 8,0

- EDTA, 186,12 g
- pH 8,0 mit NaOH Plätzchen einstellen, ~ 20 g
- H₂O, bidestilliert, auf 1 l auffüllen
- autoklavieren

Ladepuffer

- Bromphenolblau, 0,25 %
- Xylene Cyanol, 0,25 %
- Saccharose, 40 % (w/v)
- Lagerung bei 4 °C

TAE 50x (Tris-Acetat)

- Trizma Base® 242 g (2 M)
- EDTA 0,5 M (pH 8,0) 100 ml (0,05 M)
- Eisessig 57,1 ml (2 M)
- H₂O, bidestilliert auf 1 l auffüllen

TBE 10x (Tris-Borat)

- Trizma Base®, 108 g (0,445 M)
- Borsäure, 55 g (0,445 M)
- EDTA 0,5 M (pH 8,0), 40 ml (0,01 M)
- H₂O, bidestilliert, auf 1 l

Erylyse-Puffer

- NH₄CL, 89,9 g
- KHCO₃, 10 g
- Na₄-EDTA (auch Titriplex), 3,72 g
- pH 7,3 mit NaOH einstellen
- H₂O, bidestilliert, auf 1 l auffüllen
- autoklavieren oder sterilisieren
- fest verschlossen bei 4 °C lagern

Filmmaterial

Land Pack Filme Typ 667 (36 DIN)	Polaroid, Offenbach/Main, Deutschland
----------------------------------	---------------------------------------

Primer und Sonden

Primer	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland / Genova, Italien
Hydrolysisierungssonden	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland / Genova, Italien

Geräte

Elektrophoresekammern	
Agarose-Gel	Biometra, Göttingen, Deutschland
Widi Mini Sub Cell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Heizplatten und Magnetrührer	
Heizplatte-Magnetrührer RCT	Janke&Kunkel GmbH&Co. KG, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Kamera	
CU-5 Nahaufnahme-Kamera	Polaroid, Offenbach/Main, Deutschland

Mikrowelle		
Mikrowelle MW 706		CLATronic, Kempen, Deutschland
pH-Meter		
pH-Meter, pH 330 Set1		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Photometer		
Biophotometer		Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Power Supply		
Power-Pack	P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Sequenziergerät		
ABI Prism310		Perkin Elmer™ Life Sciences, Foster City, CA, USA
Thermo-Cycler (PCR-Geräte)		
GeneAmp® PCR System9700		Perkin Elmer™ Life Sciences, Foster City, CA, USA
Peltier Thermal Cycler, PTC-200		Biozym Diagnostics GmbH, H. Oldendorf, Deutschland
LightCycler		Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
UV-Transluminator		
TFX-20M		Fröbel, Labortechnik, France
Vortexer		
VF2		Janke&Kunkel GmbH&CoKG, JKA Labortechnik Staufen, Deutschland
Waage		
Scaltec, SBA/SBC		Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Zellsieb		
Zellsieb 70 µm Nylon		Becton Dickinson NJ USA
Zentrifugen		
Biofuge		Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Labofuge 400		Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland
Labofuge 400R		Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland
Megafuge 1.0		Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland

Webseiten und Software zur Sequenzanalyse und zum Primerdesign

Sequenzanalyse		
DNA Plot		http://www.vbase2.org/vbdnplot.php
Primerdesign		
Tib-Molbiol		http://www.tib-molbiol.de

3.2 Methoden

Abbildung 2 stellt die Arbeitsschritte zur Bestimmung der submikroskopischen KM-Beteiligung und die verwendeten molekularbiologischen Methoden dar. Von der Identifizierung der klonalen Marker bis zur Quantifizierung werden durchschnittlich 4 Wochen benötigt.

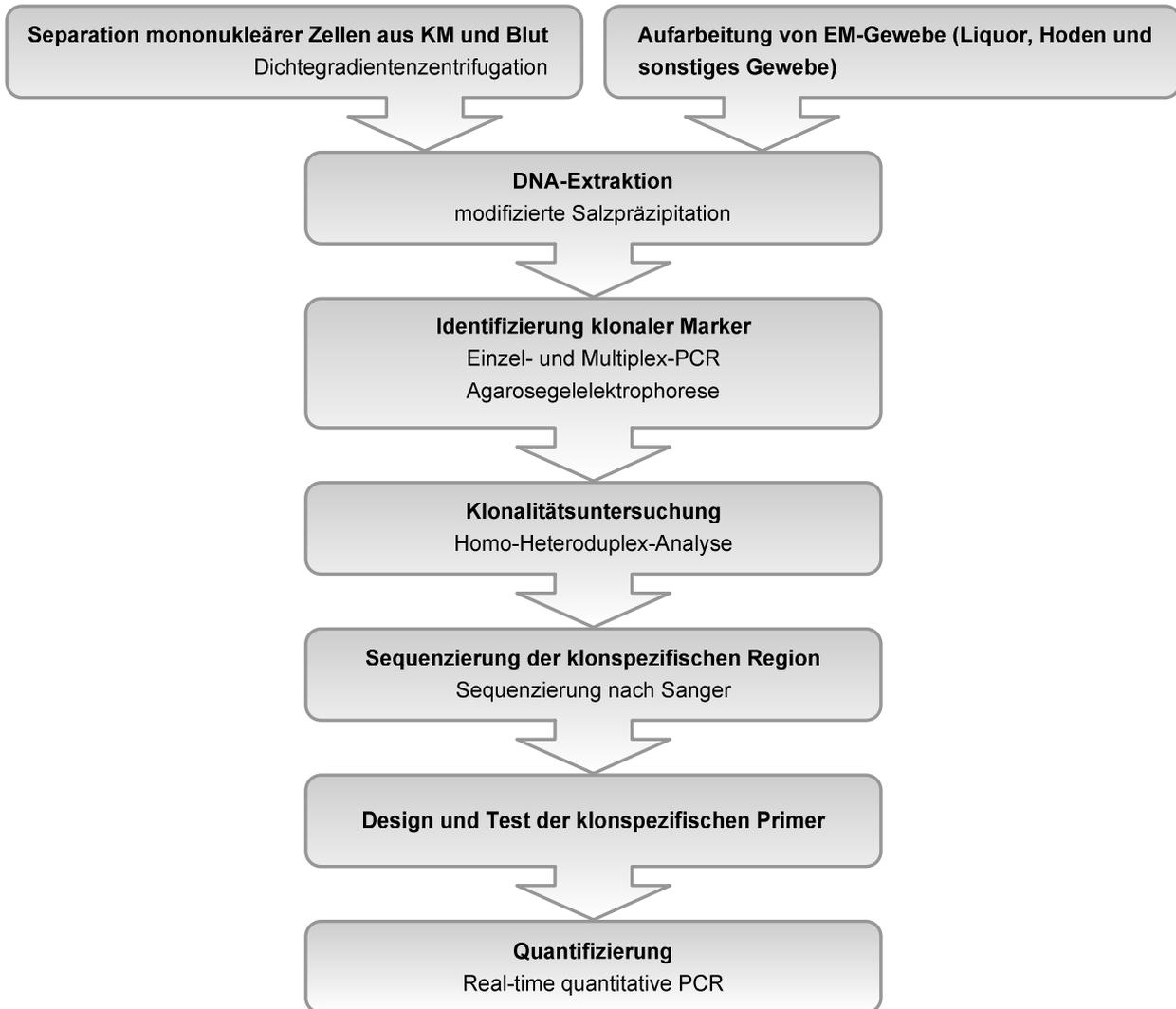


Abbildung 2: Methoden und Ablauf der Bestimmung der submikroskopischen KM-Beteiligung.

Die Methoden und der methodisch-logistische Ablauf waren bereits im Rahmen der Studie zur Messung des Ansprechens auf die Therapie bei Kindern mit ALL-Rezidiv in unserem Labor etabliert worden.

3.2.1 Separation mononukleärer Zellen

Die Isolierung mononukleärer Zellen aus dem KM und Blut erfolgt über den Dichtegradienten der Zellen. Dazu werden die Patientenmaterialien mit einer isotonischen Lösung (Ficoll) zentrifugiert.^{96,97}

Entsprechend der Zellzahl im nativen KM wird dieses mit RPMI im Verhältnis 1:3 (Volumen teilbar durch 5) verdünnt. Anschließend werden je 5 ml des verdünnten KM mit 4 ml Ficoll unter- oder überschichtet und bei 2000 U/min für 18 min zentrifugiert. Der durch Zentrifugation entstandene Zellring wird vorsichtig abgenommen, mit 10 ml PBS aufgefüllt und erneut 10 min bei

1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und das Pellet aufgewirbelt. Dieser Schritt wird zweimal wiederholt. Im Falle von starker Kontamination mit Erythrozyten nach dem ersten Schritt, wird vor den zwei folgenden Schritten eine Erylyse durchgeführt; dazu wird das badialisierte Pellet mit Erylyse-Puffer für 5 min in einer Laborschaukel inkubiert und anschließend 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Nach dem dritten Waschschrift werden die Zellen in 1 ml RPMI gelöst, damit eine standardisierte Zählung erfolgen kann. Die Zellen werden in fetalem Kälberserum mit DMSO (1:10) bei -80°C eingefroren und später in Flüssigstickstoff umgelagert. Zellen aus denen DNA isoliert werden soll, werden unmittelbar nach der Separation in DNA-Lysepuffer gegeben. Die optimale Zellzahl zur DNA-Extraktion beträgt 8×10^6 ($1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$).

Besonderheiten bei extramedullärem Material

Liquor: Um eine ausreichende Menge an DNA aus dem Liquor isolieren zu können, sind $1-5 \times 10^6$ Zellen erforderlich; abhängig von der Zellzahl werden mindestens 2 ml nativer Liquor benötigt. Im Vorfeld der DNA-Extraktion wurde der Liquor 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert, der Überstand entfernt und anschliessend Lysepuffer zum aufgewirbelten Zellpellet dazugegeben.

Nicht bei allen Patienten mit ZNS-Rezidiv stand der Liquor zur Verfügung, teilweise waren nur Liquorzytospins vorhanden. In diesen Fällen wurden die Zellen abgeschabt und in Lysepuffer gegeben oder direkt für die PCR verwendet.

Testis oder sonstiges extramedulläres Gewebe: Eine Menge von 50-100 mg Gewebe sind optimal, um 20-150 µg DNA zu gewinnen. Wenn möglich, sollten zwei Gewebestücke, von zwei verschiedenen Orten analysiert werden. Nach der Entnahme beim Patienten sollte das Gewebe in physiologischer Kochsalzlösung oder in Kultur-Medium verschickt werden. Mit Hilfe eines Zellsiebes und RPMI-Medium wurden die Gewebestücke zerkleinert und homogenisiert. Die entstandene Zelllösung wurde bei 2000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und DNA-Lysepuffer dazugegeben.

Paraffin-eingebettetes Gewebe: Für die DNA-Isolation aus in Paraffin eingebettetes Gewebe sind 5-10 mg bzw. zehn jeweils 10 µm dünne Gewebeschnitte notwendig. Bei einer Menge < 5 mg führten wir die PCR-Analysen direkt mit dem gelösten Gewebe durch.

Nach dem Abschneiden von überschüssigem Paraffin wurden die Gewebe-Paraffinschnitte in einen 1,5 ml Tube gegeben und 300 µl Xylen dazu pipettiert. Dieses Gemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur (oder wenn erforderlich bei 37°C über Nacht) in einem Laborrotator inkubiert und anschließend bei 13.000-16.000 U/min für 1-3 Minuten zentrifugiert; das Xylen mit dem gelösten Paraffin wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurde zu den sich abgesetzten festen Bestandteilen 300 µl 100%iger Ethanol gegeben. Die

Lösung wurde erneut für 5 min inkubiert, das Ethanol entfernt und dieser Arbeitsschritt mit 90%igem und 70%igem Ethanol wiederholt. Das extrahierte Gewebe wurde dann in 300-900 µl DNA-Lysepuffer gebracht und mit Proteinase K versetzt.

3.2.2 DNA-Extraktion

Zur DNA-Extraktion wurde das Puregene™ DNA-Isolierungskit der Firma Biozym Diagnostik GmbH verwendet. Dieses DNA-Isolierungskit wird in der Literatur speziell für MRD-Studien empfohlen und erlaubt auch noch bei sehr geringen Zellzahlen ($\leq 5 \times 10^6$) eine DNA-Extraktion.

Die Methode beruht auf einer modifizierten Salzpräzipitation. Sie wird nach der Beschreibung des Herstellers durchgeführt. Ein wichtiger Optimierungsschritt im Aufarbeitungsprozess besteht darin, die Zellen wie oben beschrieben sofort in DNA-Lysepuffer zu überführen. Darin sind sie über mehrere Wochen haltbar. Bei Zellen, von denen ein bis zwei Mal pro Woche DNA isoliert werden soll, kann somit der Einfrier- und Auftauprozess umgangen werden.

Konzentration und Reinheit der DNA wurden sowohl durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) mit einem Photometer (Eppendorf Biophotometer, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum der DNA) und 280 nm (Verunreinigung durch Proteine oder aromatische Substanzen) beurteilt, als auch durch das elektrophoretische Auftrennen eines Aliquots der DNA auf einem 1%igen Agarosegel geprüft. Die Berechnung der DNA-Konzentration führt das Photometer aus: Verdünnungsfaktor (in der Regel 1:40) \times 50 µg/ml (1 OD von doppelsträngiger DNA = 50 µg/ml H₂O) \times OD der gemessenen Probe (Einheit: µg/ml).

3.2.3 T-Zell-Rezeptor- und Immunglobulin-Gen-Screening-PCR

Die PCR ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung einer spezifische DNA-Sequenz aus einem DNA-Gemisch in wenigen Stunden, indem der Prozess der in vivo DNA-Verdopplung nachgeahmt wird. Auf diesem Wege können DNA-Fragmente genauer charakterisiert und identifiziert werden.⁹⁸

Die, durch die somatischen Umlagerungen (Rearrangements) der TZR- und Ig-Gene vor der klonalen Expansion der Leukämiezellen entstandenen, spezifischen verbindenden Regionen der V-(D)-J-Produkte können als Zielsequenz zum Nachweis von Leukämiezellen mittels PCR genutzt werden. Als klonale Marker haben sich in den vergangenen Jahren in den therapiebegleitenden MRD-Studien bei ALL die Genumlagerungsprodukte der Genorte TZR- γ , - δ , - β , V δ 2-J α , IgH, sowie Ig κ durchgesetzt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer und PCR-Bedingungen wurden von Taube et al., Peter et al., Szczepanski et al., sowie von Pongers-Willemse et al. entwickelt.^{64,71,99-101} Die Rekombinationsprodukte der einzelnen Genorte sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: PCR-Ansätze zum Nachweis von klonalen Genrekombinationen von fünf unterschiedlichen Genorten der Antigenrezeptoren.^{64,71,99-101}

Genorte	TZR δ ⁹⁹	TZR γ ¹⁰⁰	IgH ⁶⁴	Ig κ ¹⁰¹	V δ 2-J α ⁷¹
PCR-Methode	Multiplex Einzel	Multiplex Einzel	Einzel	Einzel	Multiplex
Klonale Genrekombi- nationen	V2 D3	VI J1/2	VH1(DH)JH	V κ I Kde	V δ 2 J α 9
	D2 D3	V9 J1/2	VH2(DH)JH	V κ II Kde	V δ 2 J α 29
	V2 J1	VI JP1/2	VH3(DH)JH	V κ III Kde	V δ 2 J α 30
	V3 J1	V9 JP1/2	VH4(DH)JH	V κ IV Kde	V δ 2 J α 48
	V1 J1	VI JP	VH5(DH)JH	intron Kde	V δ 2 J α 54
	D2 J1	V9 JP	VH6(DH)JH		V δ 2 J α 55
		V10 J1/2	VH7(DH)JH		V δ 2 J α 58
		V11 J1/2			V δ 2 J α 61
		V10 JP1/2			
		V11 JP1/2			
		V10 JP			
	V11 JP				
DNA Menge pro PCR	100 ng	100 ng	100 ng	100-200 ng	100 ng

Die Primer, Positivkontrollen und optimierten Bedingungen der einzelnen PCR sind in den Tabellen 5, 6 und 7 zusammengefasst. Als DNA-Negativkontrolle wurde für jeden PCR-Ansatz 100 bzw. 200 ng DNA aus mononukleären Blutzellen 5-10 gesunder Probanden (buffy coat; BC) verwendet. Als absolute Negativkontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen und zur Kontrolle von unerwünschten Primer-Interaktionen wurde zusätzlich in jedem PCR-Ansatz Wasser anstelle von DNA zum Mastermix pipettiert.

Nach jeder PCR werden die PCR-Produkte, einschließlich der positiven DNA-Kontrolle und der Negativ-Kontrollen, auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen.¹⁰² Parallel dazu wird jeweils in der ersten und letzten Tasche des Gels ein 100-Basenpaar-DNA-Marker (1 μ l/Tasche) mitgeführt, um die Länge der einzelnen PCR-Produkte ablesen zu können. PCR-Produkt und DNA-Marker werden zuvor mit 3 μ l Ladepuffer gemischt.

Bei der Agarosegelelektrophorese bewegen sich die negativ geladenen DNA-Moleküle in einem konstanten elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe in Richtung Kathode. Die anliegende Spannung beträgt 125 V.

Tabelle 5: Die Primer der TZR δ , TZR γ , Ig κ , IgH und V δ 2-J α PCR. ^{64,71,99-101}

Genort	Name des Primers	extern/intern, up/down	Sequenz 5' - 3'
Igκ Einzel-PCR	V κ I-5'	extern, up	GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT
	V κ I-3'	intern, up	GTT CAG CGG CAG TGG ATC TG
	V κ II-5'	extern, up	TGG AGA CCG GCC TCC ATC TC
	V κ II-3'	intern, up	ACA GAT TTC ACA CTG AAA ATC AG
	V κ III-5'	extern, up	GGG AAA GAG CCA CCC TCT CCT G
	V κ III-3'	intern, up	GGG ACA GAC TTC ACT CTC AC
	V κ IV-5'	extern, up	GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC
	V κ IV-3'	intern, up	GGG ACA GAT TTC ACT CTC AC
	Intron-5'	extern, up	GTT ATT CCC AAA AGC TCA ATC TCA AAG
	Intron-3'	intern, up	CGA TTG AGT GGC TTT GGT GG
	Kde-3'	extern, down	CCC TTC ATA GAC CCT TCA GGC AC
	Kde-5'	intern, down	TTC CTA GGG AGG TCA GAC TC
IgH Einzel-PCR	VH1/7	up	TCT GGG GCT GAG GTG AAG AA
	VH2	up	ACC TTG AAG GAG TCT GGT CCT
	VH3	up	GGG GGT CCC TGA GAC TCT C
	VH4/6	up	GCC CAG GAC TGG TGA AGC
	VH5	up	CTG GTG CAG TCT GGA GCA G
	VH6	up	GTA CAG CTG CAG CAG TCA GGT
	JH consensus	down	ACC TGA GGA GAC GGT GAC C
TZRδ Multiplex-PCR	V1m	up	TGG TAG GCA CTG AAC TTT GAG CTT C
	V2m	up	TAA GGC AGA CCC CAG AAC TTG GGC
	V3m	up	TGA GGT GGT ACT GCT CTG CAC TTA C
	D2m	up/down	AGA GGG TTT TTA TAC TGA TGT GTT TC
	D3m	up/down	TCC GTA TGA GGT GGC TCA TAT AAC TC
	JD12m/s	down	CTT GGT TCC ACA GTC ACA CG
Kontrolle β -globin	β -globin up	up	TAT TGG TCT CCT TAA ACC TGT G
	β -globin down	down	CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC
TZRδ Einzel-PCR	V2s	up	GAG TCA TGT CAG CCA TTG AG
	V3s	up	TGA GGT GGT ACT GCT CTG CAC TTA C
	D3s	down	TGT TTG TCT CCT GAG GCA TG
	D2s	up	TTT CAG GGG TAT TGT GGA TGG
	VD11s	up	GGT TAC TCA AGC CCA GTC ATC
	V3s	up	TGA GGT GGT ACT GCT CTG CAC TTA C
	JD12m/s	down	CTT GGT TCC ACA GTC ACA CG
TZRγ Multiplex-PCR	VI (V1-8)	up	TCT TCC AAC TTG GAA GGG AGA
	V9	up	GAA AGG AAT CCG GCA TTC CG
	V10	up	GAA CAT TTC AGT CTA GCT GCG
	V11	up	CTG GCA GAA ACC AAA CAA AGG C
	JG12	down	TTC ACT AAG CAG TGA GTG GTG G
	JP	down	CTG CCT GCC AGC CTC CCA TC
	JP12	down	GAA GTT ACT ATG AGC (C/T)TA GTC C
	Kontrolle β -Actin	β -actin up	up
	β -actin down	down	AAT CTC ATC TTG TTT TCT GCG
TZRγ Einzel-PCR	VI (V1-8) intern	up	CAC AGC GTC TTC TGT ACT ATG A
	V9 intern	up	GTG GAT AGG ATA CCT GAA ACG
	V10 intern	up	GAC AAG CAA CAA AGT GGA GGC A
	V11 intern	up	AGG TGG GAA GAC TAA GAA ACT T
	JG 12 intern	down	TTC TTC CGA TAC TTA CCT GTG ACA AC
	JP intern	down	GCC TCC CAT CCC TTC TTT AC
	JP12	down	GAA GTT ACT ATG AGC(C/T)TA GTC C

Vδ2-Jα	V δ 2-	up	ACCAAACAGTGCCTGTGTCAATAGG
Einzel-PCR+	J α 9	down	TTAACTGGCAGACAAAACATG
Multiplex-PCR	J α 29	down	GGCAAAAGCATTCTAGGTACA
	J α 30	down	GCCACCCACATGTCTTAG
	J α 48	down	TCCCCAGAATCTTATGCAG
	J α 54	down	GAGGGGCAAGTAATTTAAATCA
	J α 55	down	AGTATACGTCCCTCAAGGAGA
	J α 58	down	GACTTGAATGTGGCAGAGA
	J α 61	down	GTTTGTTAAGGCACATTAGAATC

Tabelle 6: Positivkontrollen und Fragmentlängen der TZR δ , TZR γ , Ig κ , IgH und V δ 2-J α PCR.^{64,71,99-101}

Genort	Genumlagerung	Positivkontrolle	Fragmentlänge (bp)	
			extern	intern
Igκ	V κ I Kde	Patient	433	196
	V κ II Kde	Patientt	443	174
	V κ III Kde	Zelllinie REH	429	180
	V κ IV Kde	Patient	445	177
	intron Kde	Zelllinie REH	511	207
IgH	VH1/7	Nalm6	ca. 350	
	VH2	Patient	ca. 350	
	VH3	Zelllinie REH	ca. 350	
	VH4/6	Patient	ca. 350	
	VH5	Patient	ca. 350	
TZRδ	V2 D3	Zelllinie REH	800	
	D2 D3	Patient	400	
	V2 J1	Patient	500	
	V3 J1	Patient	300	
	V1 J1	Peer	700	
	D2 J1	Zelllinie Loucy	100	
Kontrolle	β -globin	buffy coat	173	
TZRδ	V2 D3	Zelllinie REH	286	
	D2 D3	Patient	230	
	V2 J1	Patient	347	
	V3 J1	Patient	290	
	V1 J1	Zelllinie Peer	330	
	D2 J1	Zelllinie Loucy	100	
TZRγ	VI JG12	Zelllinie Jurkat/REH	777-792	233
	VI JP	Patient	415/416	276
	VI JP12	Patient	354-360	225
	V9 JG12	Patient	600-614	150
	V9 JP	Patient	238	193
	V9 JP12	Patient	177-182	142
	V10 JG12	Zelllinie HSB2	932-946	172
	V10 JP	Patient	570	215
	V10 JP12	Patient	509-514	164
	V11 JG12	Zelllinie Jurkat	661-675	174
	V11 JP	Patient	299	217
	V11 JP12	Patient	238-243	217
Kontrolle	β -actin	buffy coat	180	

Vδ2-Jα	Vδ2 Jα9	Patient	ca. 400-450
	Vδ2 Jα29	Zelllinie REH	ca. 400-450
	Vδ2 Jα30	Patient	ca. 400-450
	Vδ2 Jα48	Patient	ca. 400-450
	Vδ2 Jα54	Patient	ca. 400-450
	Vδ2 Jα55	Patient	ca. 400-450
	Vδ2 Jα58	Zelllinie REH	ca. 400-450
	Vδ2 Jα61	Patient	ca. 400-450

Tabelle 7: Die Amplifikationsbedingungen der TZRδ, TZRγ, Igκ, IgH und Vδ2-Jα PCR. ^{64,71,99-101}

	Genort				
	Vδ2-Jα [†]	TZRδ [‡]	TZRγ [‡]	Igκ	IgH
Volumen (μl)					
PE 10xPuffer with MgCl ₂ (15 mM)	10	3 nur bei Multiplex: 1 μl NaOH (0,05 M) auf 100 μl Puffer	3 1 μl NaOH (0,05 M) auf 100 μl Puffer	10	10
dNTP's (2 mM)	10	3	3	10	10
Primer <i>up</i>	2 (10 μM)	-	-	2,5 (10 μM)	3 (100 μM)
Primer <i>down</i>	2 (10 μM)	-	-	2,5 (10 μM)	0,75 (100 μM)
Primer mix	-	3 (10 μM)	7 (10 μM)	-	-
Primer mix Kontrollgen	-	0,2 (10 μM) β-Globin	0,5 (10 μM) β-Actin	-	-
TaqPolymerase (5 U/μl)	0,4 (G)	0,2 (G)	0,3 (G)	0,4 (AT)	0,2 (G)
PE AmpliTaq (AT)					
PE Taq Gold (G)					
Wasser (RNase; DNase frei)	67,6-73,6	19,6	15,2	73,6	75,05
DNA (100 ng/μl)	1	1	1	1-2	1
Endvolumen	100	30	30	100	100
Temperaturen/Zeiten					
Vordenaturieren	94 °C/ 10 min	95 °C/ 10 min	95 °C/ 10 min	92 °C/ 3 min	94 °C/ 10 min
Zyklen	35	38 (Multiplex +Einzel: D2D3) 30 (Einzel)	30 (multiplex) 35 (single)	40	38 (VH4/6: 30)
Denaturieren	92 °C/ 45 s	95 °C/ 1 min	95 °C/ 1 min	92 °C/ 45 s	94 °C/ 45 s
Primerbindung (<i>annealing</i>)	60 °C/ 90 s	60 °C/ 2 min	59 °C/ 1 min	60 °C/ 90 s	60 °C/ 90 s
Verlängerung (<i>extension</i>)	72 °C/ 2 min	72 °C/ 1 min	72 °C/ 1,4 min	72 °C/ 2 min	72 °C/ 2 min
Endverlängerung (<i>final extension</i>)- nach den Zyklen	72 °C/ 10 min	-	72 °C/ 7 min	72 °C/ 10 min	72 °C/ 10 min

[†] Multiplex-PCR Vδ2-Jα: Vier Tubes: (1) Vδ2/Jα54; (2) Vδ2/Jα29, Jα48; (3) Vδ2/Jα9; (4) Vδ2/Jα30, Jα55, Jα58, Jα61

[‡] Multiplex-PCR TZRγ, TZRδ: Jeweils einen Tube für TZRγ und TZRδ

Herstellung eines Agarosegels: 2 g NuSieve Agarose (2 %) bzw. 2 g NuSieve und 1 g Seakem Agarose (3 %), 100 ml 1x TAE-Puffer und 4 μl Ethidiumbromid.

Das Ethidiumbromid wird zum Anfärben der Nukleinsäuren im Agarosegel verwendet. Einzelne Ethidiumbromidmoleküle interkalieren dabei zwischen die Basen der DNA (Einlagerung im Abstand von 10 Basenpaaren), wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verän-

dert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht (UV-Transluminator) stark erhöht wird. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel nach Wanderung in Richtung Kathode (positive Elektrode) die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren (negativ geladen) befinden, hell auf, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden DNA-Konzentration, sowie zur Länge der Nukleinsäure. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgt mittels Polaroidkamera.

Bei einer Multiplex-PCR werden in einem PCR-Reaktionsgefäß gleichzeitig mehrere Primerpaare eingesetzt. Dies ermöglicht die simultane Amplifikation und Detektion von mehreren DNA-Regionen (Genumlagerungen) in einem PCR-Ansatz. Nach jeder Multiplex-PCR (TZR δ , TZR γ) wird von den positiven oder fraglich positiven Genumlagerungen eine Einzel-PCR durchgeführt (Tabellen 5, 6 und 7).

Die nach Auftrennung durch die Agarosegelelektrophorese als positiv oder fraglich positiv beurteilten Einzel-PCR-Produkte des Screeningprozesses werden gemeinsam mit der positiven und den negativen Kontrolle in einer Homo-Heteroduplexanalyse genauer untersucht. Es wird geprüft, ob das identifizierte Genumlagerungsprodukt ein monoklonales, ein biallelisches/biklonales oder ein oligoklonales Rearrangement ist. Hierbei können im Agarose-Gel auch falsch-positiv identifizierte Genumlagerungsprodukte, die durch eine unspezifische *Background*-Amplifikation von ähnlichen Rearrangements in polyklonalen Lymphozyten verursacht sind, aufgedeckt werden.

3.2.4 Homo-Heteroduplexanalyse

Die Homo-Heteroduplexanalyse wird mit den PCR-Produkten der Einzel-PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte werden zuerst vollständig denaturiert. Anschließend wird durch Kühlung die Renaturierung mit Duplexbildung induziert. Bei Vorliegen einer monoklonalen Lymphoblastenpopulation, d.h. bei in der Basensequenz der Antigen-Genumlagerungen vollständig komplementären Einzelsträngen, kommt es zur Homoduplexbildung. Ein Heteroduplex bildet sich dagegen aus zwei Strängen, die sich im klonspezifischen Sequenzbereich des PCR-Fragments unterscheiden. Es bildet sich ein *Loop* an der Stelle des Sequenzunterschieds, der eine andere Konformation und damit eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit als die des Homoduplex besitzt.^{103,104}

Durch die Homo-Heteroduplexanalyse können verschiedene Basensequenzen innerhalb eines polykonal rekombinierten PCR-Produkts isoliert werden, was die notwendig Voraussetzung für die anschließende Sequenzanalyse ist.

Durchführung der Homo-Heteroduplexanalyse

Von den positiven und fraglich positiven PCR-Produkten der Einzel-PCR werden 5 µl für die Homo-Heteroduplexanalyse verwendet. Das PCR-Produkt wird zuerst für 5 min bei 95°C denaturiert, danach für 60 min bei 50°C renaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Für die Homo-Heteroduplexanalyse wird ein Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) System (Multiphor II electrophoresis unit mit MultiTemp thermostatic circulator (4 °C), Excelgel Kit DNA Analysis Kit 17-1198-07 [12.5 %, 48 Taschen/Gel]) der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, eingesetzt. Dieses System verwendet 12%ige nicht denaturierende PAGE-Gel.

Es werden maximal 5 µl PCR-Produkt für dieses Gel benötigt. Jede Probe wird vor dem Auftragen mit 2 µl Ladepuffer vermischt. Das Gel verfügt über 48 Geltaschen; in der ersten und letzten Geltasche läuft immer ein 100 bp DNA-Längenmarker (0,5 µl vom 100 bp Marker + 4,5 µl Wasser) mit. Die Elektrophoresebedingungen sind: Dauer 1½ Stunden, Temperatur 4°C, Spannung 500 V, Stromstärke 35 mA, Leistung 30 W. Die im Gel elektrophoretisch aufgetrennten Homo-/Heteroduplexe werden durch eine Silber-Nitrat-Färbung sichtbar gemacht.

Silber-Nitrat-Färbung:

- Gel für 5 min in 10%ige Ethanollösung legen
- Gel mit Wasser waschen
- Gel für 3 min in HNO₃-Lösung (15,4 ml HNO₃/Liter) baden
- Gel 2x mit Wasser waschen
- Gel für 20 min in Silber-Nitrat-Lösung (2,4 g AgNO₃/Liter) legen
- Gel 2x mit Wasser waschen
- Gel in Reduktionlösung (30 g NaCO₃ + 540 µl Formaldehyd/Liter) legen und warten bis die Banden gut sichtbar sind
- Gel für 5 min in 10%iger Essigsäure baden
- Gel für 5 min in Wasser legen

Liegt eine Homoduplexbande vor, kann das PCR-Produkt direkt zum Sequenzieren eingesetzt werden. Sind mehr als eine Bande zu sehen, werden diese sauber ausgeschnitten und in 100 µl Wasser (Molecular Biology Grade) über Nacht bei 50°C gelöst. Von diesem „Bandenwasser“ werden 10 µl für eine erneute PCR eingesetzt. Bei dieser Reamplifizierung werden bevorzugt „interne“ Primer verwendet, wodurch kürzere Basenfragmente entstehen (siehe Tabellen 5 und 6). Die PCR-Bedingungen sind dieselben wie beim Screening (Tabelle 7). Zeigt sich das Reamplifizierungsprodukt mit einer Bande im Agarosegel, wird es direkt zum Sequenzieren eingesetzt.

3.2.5 Sequenzierung

Die verwendete Methode zur Sequenzierung nach Sanger et al. beruht auf einem nukleotidspezifischen Kettenabbruch durch den enzymatischen Einbau eines didesoxy-Nukleotids.¹⁰⁵

Die Sequenzierung wurde mit einem Ein-Kapillar-Sequenziergerät von Applied Biosystems (ABI Prism 310) durchgeführt. Dieses Sequenziergerät analysiert die Proben hintereinander durch eine Gelelektrophorese in einer Kapillare. Es besteht die Möglichkeit bis zu 96 Proben zu analysieren. Die Sequenzierung eines Fragments, das ungefähr 350 bp lang ist, dauert circa 45 Minuten.

Durchführung

Für die Sequenzierung wurde das PCR-Produkt direkt verwendet (nativ) oder mit dem QIAquick PCR Purification System aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, um die für die Sequenzier-PCR erforderliche Menge aufgereinigtes PCR-Produkt genauer abschätzen zu können.

Sequenzier-PCR (Cycle-Sequencing): Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen: 0,8-4 µl natives oder aufgereinigtes PCR-Produkt, 0,5 µl *up-* oder *down-*Primer (10 µM), 1 µl BigDye Terminator Kit und 4,5-7,7 µl Wasser. Das Temperaturprotokoll lautet: Vordenaturierung 1 min bei 95°C → 30 Zyklen: Denaturierung 30 s bei 95°C, *annealing* 15 s bei 55°C, *extension* 4 min bei 60°C → *final extension* 7 min bei 60°C.

Aufreinigung des Sequenzier-PCR-Produkts: Das Sequenzier-PCR-Produkt wird gemäß Handbuch des DyeEx™ Kit (Standard Protokoll für den ABI Prism 377, 373, 310) aufgereinigt.

Vorbereitung der Proben vom ABI 310: Zum Sequenzieren wurden 4 µl des aufbereiteten Sequenzier-PCR-Produktes mit 16 µl von HPLC gereinigtem Wasser.

Auswertung der Sequenzierung: Die Sequenzen von sauberen, eindeutig interpretierbaren Chromatogrammen werden mit verschiedenen Datenbanken und Germline-Sequenzvorlagen ausgewertet. Für jede Sequenz wurde die klonspezifische Region (*junctional region*) genau identifiziert, d.h. die Deletionen der im Genumlagerungsprozess aufeinandertreffenden V-(D)-J-Segmente, sowie die Insertion von Nukleotiden zwischen den V-(D)-J-Segmenten.

3.2.6 Quantifizierung

Prinzip

Zur Quantifizierung der Nukleinsäuren verwendeten wir die Methode der RQ-PCR.^{106,107} Mit dieser PCR ist eine Messung der Zunahme der Amplifikationsprodukte in jedem PCR-Zyklus möglich. Unter Verwendung von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sonden (TaqMan-Sonde, siehe unten), die sich in jedem PCR-Zyklus an die Amplifikationsprodukte binden, werden diese messbar. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu.

Die Amplifikationskinetik einer PCR besteht aus drei Phasen: (1) frühe Hintergrundphase, (2) exponentielle Phase (oder log-lineare Phase) und (3) Plateau-Phase. In der ersten Phase ist

das Fluoreszenzsignal der entstandenen PCR-Produkte geringer als das Hintergrundsignal vom System. Bei signifikantem Überschreiten des Hintergrundfluoreszenzsignals beginnt die exponentielle Phase. Der entsprechende PCR-Zyklus wird als Schwellenwert (*cycle threshold*, CT-Wert) bezeichnet. In der exponentiellen Phase erreicht die PCR die optimale Effizienz; in jedem Zyklus wird die Template-DNA-Menge verdoppelt. Die exponentielle Phase endet mit dem Eintritt in die Plateau-Phase bei Abfall der PCR-Effizienz. Nur in der exponentiellen Phase besteht eine lineare umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten bekannten DNA-Menge und dem CT-Wert.

TaqMan-Sonde als Quantifizierungsformat

Zur Fluoreszenzmessung bei der RQ-PCR wird das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (fluorescence resonance energy transfer, FRET) angewendet.¹⁰⁸ Von den verfügbaren FRET-Sonden nutzten wir die TaqMan-Sonde (Hydrolysisierungs-sonde) als Quantifizierungsformat.¹⁰⁹ Die verwendete TaqMan-Sonde ist FAM/TAMRA markiert: FAM (6-carboxy fluorescein) dient als Reporter (korrespondierender Farbstoff) am 5'-Ende und TAMRA (6-carboxytetramethyl rhodamine) als Quencher (Unterdrücker-Farbstoff) am 3'-Ende desselben Oligonukleotids. Die TaqMan-Sonde bindet zwischen dem *up*-Primer und dem *down*-Primer (Abbildung 3.A). Die *annealing*-Temperatur der Sonde sollte zwischen 60°C und 69°C liegen. Bei der Verwendung der TaqMan-Sonde wird ausgenutzt, dass die *Thermus aquaticus* (Taq) Polymerase neben der Polymeraseaktivität eine 5'→3' Exonukleaseaktivität besitzt. Während der *extension* bei 72°C stößt die Taq Polymerase auf das 5'-Ende der Sonde und beginnt die gebundenen Nukleotide zu hydrolysieren (Abbildung 3.B). Dadurch entfernen sich FAM und TAMRA voneinander und die Reporter-Fluoreszenz wird gemessen (Abbildung 3.C). Während der Amplifikation nimmt die Fluoreszenz proportional mit der exponentiellen Vermehrung der PCR-DNA-Produkte zu.

Design von Sonden und Primern

Die Spezifität und Sensitivität einer RQ-PCR sind abhängig von der leukämieklon-spezifischen Sequenz und dem Primer, dessen 3'-Ende in die klon-spezifische Region gelegt wird.

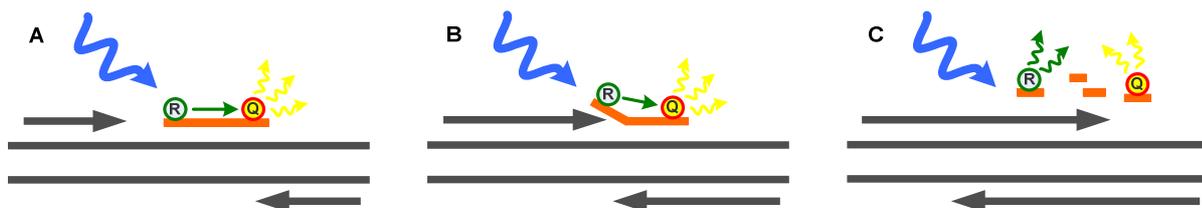


Abbildung 3: Prinzip der TaqMan-Sonde. A) Die TaqMan-Sonde mit Reporter (R) und Quencher (Q) bindet zwischen *up*- und *down*-Primer, B) die Taq Polymerase hydrolysiert das 5'-Ende der TaqMan-Sonde, C) die Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden.

Neben den allgemeinen Regeln des Primerdesigns, wie ausgeglichene Verteilung der 4 Basen, Vermeidung repetitiver Motive und monotoner Bereiche, wurden die von Eckert et al. entwickelten Regeln beim Design von klonspezifischen Primern beachtet.¹¹¹

Tabelle 8 zeigt die verwendeten TaqMan-Sonden und generellen Primer, die von Verhagen et al. und Eckert et al. entwickelt worden sind.^{110,111}

Tabelle 8: Sequenzen der generellen Primer (Down, Up) und der TaqMan-Sonden.

Primer/TaqMan-Sonde	Sequenz
Igκ: κde (Vκ-κde)	
Down (κdeR)	5'- AGA CCC TTC AGG CAC ATG CTT -3'
TM-Sonde (κdeTM)	5'- 6-FAM-TCC TCA GAG GTC AGA GCA GGT TGT CC XT ph -3'
TZRδ: Dδ3 (Vδ2-Dδ3, Dδ2-Dδ3)	
Down (Dδ3R)	5'- CTG CTT GCT GTG TTT GTC TCC T -3'
TM-Sonde (Dδ3TM)	5'- 6FAM-ATA TCC TCA CCC TGG GTC CCA TGC CXT ph -3'
TZRδ: Jδ1 (Vδ1-Jδ1, Vδ2-Jδ1, Vδ3-Jδ1, Dδ2-Jδ1)	
Down (Jδ1R)	5'- TGC CTT AAC CTT AAA CTT CAG A -3'
TM-Sonde (Jδ1TM)	5'- 6FAM-AAC CCG TGT GAC TGT GGA ACC AAG T XT ph -3'
TZRδ: Vδ2 (Vδ2-Dδ3, Vδ2-Jδ1)	
Up (Vδ2F)	5'- CCC AAG GTA ACA CAA TCA CTT -3'
TM-Sonde (Vδ2TM)	5'-6FAM -TAC CGA GAA AAG GAC ATC TAT GGC CCX ph -3'
TZRδ: Vδ2 (Vδ2-Jα9, Vδ2-Jα29, Vδ2-Jα30, Vδ2-Jα48, Vδ2-Jα54, Vδ2-Jα55, Vδ2-Jα58, Vδ2-Jα61)	
Forward (Vδ2F)	5'- TGC AAA GAA CCT GGC TGT ACT TAA -3'
TM-Sonde (Vδ2TM)	5'- 6FAM -AGA CCC TTC ATC TCT CTC TGA TGG TGC AAG TXA ph -3'
IgH: JH1 – 6 (VHJH)	
Down	
R-JH1-CONS1	5'- CGC TAT CCC CAG ACA GCA GA -3'
R-JH2-CONS1	5'- GGT GCC TGG ACA GAG AAG ACT -3'
R-JH3-CONS1	5'- AGG CAG AAG GAA AGC CAT CTT AC -3'
R-JH4-CONS2	5'- CAG AGT TAA AGC AGG AGA GAG GTT GT -3'
R-JH5-CONS1	5'- AGA GAG GGG GTG GTG AGG ACT -3'
R-JH6-CONS2	5'- GCA GAA AAC AAA GGC CCT AGA GT -3'
TM-Sonde	
T-JH1.2.4.5.-CONS1	5'- 6FAM -CCC TGG TCA CCG TCT CCT CAG GTG TXT ph -3'
T-JH3-CONS1	5'- 6FAM -CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA XT ph -3'
T-JH6-CONS2	5'- 6FAM -CAC GGT CAC CGT CTC CTC AGG TAA GAA XT ph -3'
TZRγ: Jγ1/2 (VγJγ1/2) (VγJγ1.3, 2.3)	
Down (Jγ1/2R)	5'- GTT TAA TAA TTT CCT GCT TTC CCT CTA T -3'
TM-Sonde (Jγ1/2TM)	5'- 6FAM-TCC GAT ACT TAC CTG TGA CAA CAA GTG TXT ph -3'
TZRγ: JPγ1/2 (VγJPγ1/2) (VγJγ1.1, 2.1)	
Down (JPγ1/2R)	5'- ACC CTG AAA AAT TGC TGT TCG T -3'
TM-Sonde (JPγ1/2TM)	5'- 6FAM-TAC TGA GGC CAG GAA TGT GAC ATA TXTCAGph -3'
Referenzgen: β-globin	
Up (β-globF)	5'- TAT TGG TCT CCT TAA ACC TGT CTT G -3'
Down (β-globR)	5'- CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC -3'
TM-Sonde	5'- 6FAM-CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACX T ph -3'

X: modifiziert, ph: 3'-Phosphat

Die Sequenzen der IgH RQ-PCR wurden von Verhagen et al. veröffentlicht.¹¹⁰ Die anderen Sonden und Primer wurden im eigenen Labor von Eckert et al. entwickelt.¹¹¹

Test der Primerspezifität

Bevor die klonspezifischen Primer zum Quantifizieren verwendet wurden, wurde deren Spezifität und Sensitivität getestet. Zum Test der Primerspezifität wurden 100 ng DNA der Leukämiezellen (DNA in der die Antigenrezeptor-Genumlagerungen nachgewiesen bzw. bestätigt wurden) mit 100 ng BC-DNA verglichen (5-fach eingesetzt). Der Primer wurde als spezifisch gewertet, wenn der CT-Wert der Leukämiezell-DNA zwischen 23 und 28 Zyklen lag und der CT-Wert der BC-DNA mindestens 3 Zyklen höher war. Wenn ein Primer nicht spezifisch war, wurde die *annealing*-Temperatur von 65°C bis auf maximal 69°C erhöht.

Test der Primersensitivität und Anlegen einer Verdünnungsreihe

Zum Test der Sensitivität des Primers und zum Quantifizieren der submikroskopischen KM-Beteiligung muss eine logarithmische Verdünnungsreihe aus DNA des extramedullären Materials oder des Initialdiagnosematerials und DNA aus BC generiert werden. Für die Herstellung der Verdünnungsreihe wird DNA aus Leukämiezellen in BC-DNA verdünnt; beide müssen dieselbe Konzentration haben (angestrebt sind 100 ng/µl).

Grundlage für jede Quantifizierung, die PCR-basierte DNA-Marker verwendet, ist die Tatsache, dass eine Zelle 6,7 pg DNA enthält. Um die angestrebte Sensitivität von 10^{-5} (Nachweis von 1 Leukämiezelle unter 100.000 gesunden Zellen) erreichen zu können, muss jeweils 670 ng DNA (DNA-Gehalt von 100.000 Zellen) eingesetzt werden. Die Verdünnungsreihe wird, wie in Tabelle 9 angegeben, in logarithmischen Stufen hergestellt. Abbildung 4.A zeigt ein Beispiel einer Verdünnungsreihe.

Für das Anlegen der Verdünnungsreihe wurde jede PCR im zweifachen Ansatz angesetzt sowie mindestens 5 Proben a 670 ng BC-DNA und als absolute Negativkontrolle Wasser analysiert. Die zu quantifizierenden Proben wurden im dreifachen Ansatz angesetzt.

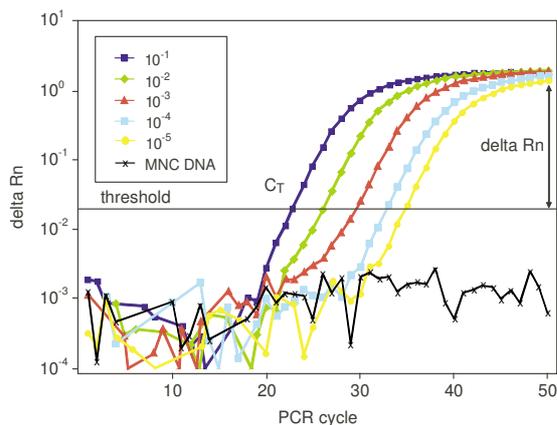
Es ist wichtig den Anteil von Leukämiezellen im Diagnosematerial (Liquor, Testis) zu berücksichtigen. War dieser Anteil < 50 %, dann wurde die DNA-Menge, die zum Herstellen der Verdünnungsreihe verwendet wurde, angepasst.

Die Sensitivität des Primers bezeichnet die höchste Verdünnungsstufe, in welcher der ermittelte

Tabelle 9: Erstellen der Verdünnungsreihe zum Test der Sensitivität des Primers und zum Quantifizieren der submikroskopischen KM-Beteiligung.

Menge an Leukämiezellen in 10^5 Gesamtzellen	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	1
Leukämie-DNA (100 ng/µl)	670 ng	67 ng	6,7 ng	670 pg	67 pg	6,7 pg
BC-DNA (100 ng/µl)	0 ng	603 ng	663,3 ng	669,33 ng	669,933 ng	669,9933 ng
Gesamt-DNA Menge	670 ng	670 ng	670 ng	670 ng	670 ng	670 ng
Sensitivität	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}

A) Verdünnungsreihe



B) Standardkurve

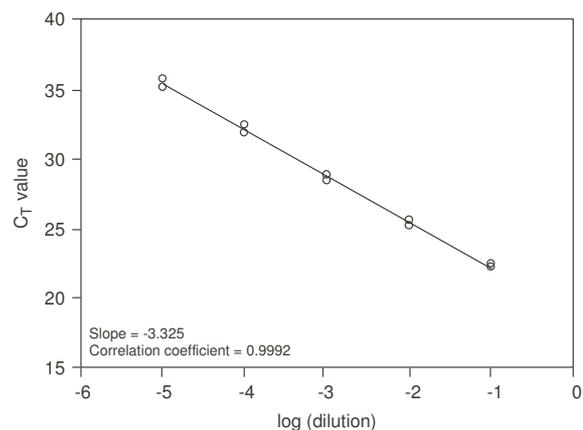


Abbildung 4: Beispiele für eine Verdünnungsreihe (A) und eine Standardkurve (B) eines RQ-PCR-Ansatzes.¹⁰⁷

CT-Wert mindestens einen CT-Wert geringer ist, als der kleinste CT-Wert der BC-DNA. Es wurde eine Sensitivität von mindestens 10^{-4} angestrebt. Wenn die erforderliche Sensitivität bzw. Spezifität nicht erreicht wurde, wurde ein neuer Primer entwickelt. Wenn diese Möglichkeit erschöpft war, wurde auf einen anderen Genort zurückgegriffen.

Quantifizierung

Die RQ-PCR wurde mit dem Lightcycler von Roche Diagnostics, Mannheim, durchgeführt. Der LightCycler ist ein ausserordentlich schneller Cyclus, kombiniert mit einem Fluorimeter, der eine Spezialoptik von Rodenstock für die Messung von Mikrovolumina nutzt. Der Aufheiz- und Abkühlungsprozess wird durch wechselnde Zufuhr von heißer Luft und Raumluft geregelt. Wegen der geringen Ausmaße der Reaktionskammer können sehr schnelle Temperaturwechsel erzielt werden.¹¹²

PCR-Bedingungen der quantitativen RQ-PCR: Der PCR-Mix hat folgende Zusammensetzung: 5 mM (TZR δ , V δ 2-J α , Ig κ , IgH, β -Globin) bzw. 7,5 mM (TZR γ) MgCl₂, 1 Unit Platinum DNA Taq Polymerase, 2 μ l 10xPCR-Puffer (ohne MgCl₂), 200 μ M dNTP's, 5 μ g BSA (Bovine Serum Albumin), je 500 nM Primer, 100 nM Hydrolysierungssonde und 670 ng DNA. Das PCR-Volumen beträgt 20 μ l.

Das Temperaturprotokoll lautet: Vordenaturierung 5 min bei 94°C → 50 Zyklen: Denaturierung 8 s bei 94°C, *annealing/extension* 23 sec bei 60-69°C.

Die RQ-PCR wird in Glaskapillaren durchgeführt. Das BSA wird in der RQ-PCR eingesetzt, um ein Anhaften der Taq Polymerase an die Glaskapillarwand zu verhindern.

Auswertung am RQ-PCR Gerät: Der LightCycler bestimmt den Bereich der log-linearen Phase der Amplifikation, um die Standardkurve zu erstellen und schließlich die Konzentration der unbekanntenen Proben zu ermitteln. Der LightCycler bietet zwei Möglichkeiten zur Auswertung: die *Second Derivative Maximum*-Methode und die *Noise Band*-Methode.¹¹³ Bei der *Second Derivative Maximum*-Methode erfolgt die Festlegung der log-linearen Amplifikationsphase automatisch durch die Software; bei der *Noise Band*-Methode ist eine manuelle Anpassung möglich.

Zwischen dem Logarithmus der eingesetzten bekannten DNA-Menge und der ermittelten CT-Werte, angegeben in Zyklen, besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung. Trägt man die ermittelten CT-Werte (y-Achse) gegen den Logarithmus der anfangs eingesetzten DNA-Mengen der Verdünnungsreihe (x-Achse) auf, erhält man eine Standardkurve (Abbildung 4.B). Der Anstieg der Standardkurve drückt aus, wie effizient eine PCR ist. Im Idealfall sollte dieser bei -3,3 liegen. Das ist dann der Fall, wenn bei einer in log-Stufen angelegten Verdünnungsreihe der Abstand zwischen den einzelnen Verdünnungspunkten genau 3,3 Zyklen beträgt. Das bedeutet, dass in jedem PCR-Zyklus jeweils alle vorliegenden Moleküle verdoppelt werden. Im Rahmen der Quantifizierung von TZR- und Ig-Genumlagerungen durch die Verwendung von klonspezifischen Primern ist eine Schwankung des Anstiegs zwischen -3,0 und -3,7 akzeptiert. Der Korrelationskoeffizient der Standardkurve muss mindestens 0,95 betragen.

Mit dem Anstieg der Standardkurve (m), dem Schnittpunkt der Standardkurve mit der y-Achse (n) und dem gemessenen CT-Wert der zu quantifizierenden Probe (y) kann der Logarithmus der Konzentration der Probe durch die Geradengleichung $y = m * x + n$ ermittelt werden. Die gesuchte Konzentration ergibt sich durch Umstellen dieser Gleichung nach $x = (CT - n) / m$ und Auflösung des Logarithmus (10^x).

Die RQ-PCR Daten wurden gemäß den Regeln der *European Study Group on MRD detection* interpretiert.¹¹⁴

Normalisierung

Zur Beurteilung der Quantität und Amplifikationsqualität der eingesetzten Leukämiezell-DNA, wurde das Referenzgen β -Globin genutzt. Dieses liegt als einfach vorkommendes Gen (*single copy gene*) in jeder Zelle vor. Für die Normalisierung wird für jede DNA-Mengen-Bestimmung eine β -Globin Verdünnungsreihe angelegt. Dazu wurde die BC-DNA nach der oben beschriebenen Vorgehensweise in Wasser verdünnt. Durch die Bestimmung der Häufigkeit von β -Globin in einem PCR-Ansatz, der dieselbe Menge DNA enthält, wie sie im Anschluss für die klonspezifische PCR eingesetzt wird, kann die genau eingesetzte Leukämiezell-DNA-Menge berechnet werden. Die Zahl der Leukämiezellen mit klonspezifischen Genrekombinationen kann somit pro angenommene 100.000 Zellen normalisiert werden.

Zur Durchführung der Normalisierung wurden die am LightCycler ermittelten CT-Werte für die Verdünnungsreihen und die zu messenden Proben zum einen für das Referenzgen und zum anderen für die klonspezifische Genumlagerung in eine Excel-Datei exportiert. Das Tabellenkalkulationsprogramm wurde genutzt, um die mittels Referenzgen bestimmten DNA-Mengen und die mittels RQ-PCR quantifizierten klonspezifischen Genumlagerungen aufeinander zu beziehen.

Zur Bestimmung der Anzahl von Leukämiezellen in einhunderttausend Zellen (100.000 Zellen entsprechen 670 ng DNA) wurde nach Dreisatz die anhand von Genumlagerungen ermittelte Leukämiezellzahl mit 100.000 multipliziert und durch die Anzahl der eingesetzten Zellen, ermittelt mit dem Referenzgen, dividiert.

3.3 Patienten

3.3.1 Studiendesign

Die vorliegende Arbeit war Teil einer internationalen Kooperationsstudie des *Resistant Disease Committee der Internationalen BFM Gruppe*. Die aus Deutschland eingeschlossenen Patienten wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht, anschließend mit den Daten der anderen teilnehmenden Länder zusammengebracht und ausgewertet. Diese internationale Kooperation ermöglichte, die Aussagekraft der Studie durch Erhöhung der Patientenzahl zu verbessern.

Die vorliegende Studie wurde überwiegend retrospektiv durchgeführt. Eingeschlossen wurden Patienten mit einem IEM-Rezidiv entsprechend der Verfügbarkeit von Probenmaterial (extramedulläres Material und KM vom Zeitpunkt der Rezidivdiagnose).

3.3.2 Studiengruppe

In diese Studie wurden 64 Patienten mit einem IEM-Erstrezidiv einer ALL eingeschlossen. 39 dieser Patienten wurden in Deutschland, 16 in Frankreich und 9 in der Tschechischen Republik gemäß den nationalen Protokollen ALL-REZ BFM (Deutschland, Tschechische Republik) und COOPRALL (Frankreich) behandelt. Die deutschen Patienten erkrankten im Zeitraum zwischen 09/94 und 02/05, die französischen Patienten zwischen 12/90 und 06/04 und die tschechischen Patienten zwischen 10/01 und 04/04. Die mittlere Beobachtungszeit betrug 3,26 Jahre (Median: 2,7; Minimum: 0,03; Maximum: 16,2).

3.3.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Folgende Ein- und Ausschlusskriterien wurden für die Studie festgelegt:

Patient und Behandlung:

- Eingeschlossen wurden nur IEM-Rezidive.
- Eingeschlossen wurden nur Erstrezidive.
- Das Alter zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose betrug höchstens 17 Jahre.
- Die Patienten wurden nach den nationalen Protokollen ALL-REZ BFM oder COPRALL behandelt.

Material und klonale Marker:

- KM vom Zeitpunkt der Rezidivdiagnose in ausreichender Menge und Qualität.
- Nachweis von klonalen TZR- und/oder Ig-Genumlagerungen in der DNA des Rezidivdiagnosematerials. Es wurde eine Quantifizierung der submikroskopischen KM-Beteiligung mit mehreren monoklonalen Markern angestrebt.
- Von den klonalen Markern, die zum Quantifizieren herangezogen wurden, sollte wenigstens einer eine Sensitivität von mindestens 10^{-4} erreichen. Nur in bestimmten Sondersituationen war eine geringe Sensitivität gestattet.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der SPSS-Software (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA, Version 15.0) und der R-Software ausgeführt.

Für die Auswertung der Kreuzklassifikationen wurde der Chi-Quadrat-Test oder Fisher's exakter Test (2-seitig) benutzt; hierbei wird geprüft, ob die Verteilung einer Variablen in zwei unabhängigen Stichproben signifikant verschieden ist bzw. zwischen zwei Variablen ein signifikanter Zusammenhang besteht.

Die univariaten Kaplan-Meier-Analysen wurden verwendet, um die pEFS und die Wahrscheinlichkeit des Gesamt-Überlebens (pOS) zu berechnen.¹¹⁵ Mögliche Unterschiede im Überleben wurden mit dem Log-Rank Test geprüft.¹¹⁶ Die kumulative Inzidenz eines Folgerezidivs wurde mit der Methode von Kalbfleisch-Prentice und der Gray-Statistik ermittelt.^{117,118} Der Zeitraum des EFS wurde vom Zeitpunkt der Rezidivdiagnose bis zum Zeitpunkt des letzten Recalls oder bis zum Datum eines Ereignisses (Tod oder Folgerezidiv) berechnet. Für die jeweilige Fragestellung nicht relevante Folgeereignisse wurden zum Zeitpunkt ihres Eintretens zensiert. Patien-

ten, die nach erreichter CCR transplantiert wurden, wurden in der Berechnung der Gesamtergebnisse der Studie bezüglich des absoluten EFS und OS berücksichtigt.

Die Unabhängigkeit von prognostischen Faktoren für das Überleben wurde mit der multivariaten Cox-Proportional-Hazard/Regression-Analyse und dem Wald-Test in der „Vorwärtsprüfung“ der einzelnen Faktoren, einschließlich der SZT als zeitabhängige Variable, geprüft.¹¹⁹ Der Mann-Whitney-Test wurde als verteilungsunabhängiger T-Test verwendet, wobei ein zentraler Wert einer Variablen zwischen verschiedenen Gruppen verglichen wird. Ein zweiseitiger p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Repräsentativität des Patientenkollektivs

Die in die Studie eingeschlossenen Patienten stammen, wie bereits in Abschnitt 3.3 erwähnt, zum einen aus deutschen und tschechischen Kliniken, die an der ALL-REZ BFM-Studie teilnehmen, und zum anderen aus französischen Kliniken, die die Patienten gemäß COOPRALL behandeln.

Zur Beurteilung der Repräsentativität wurde das deutsche Patientenkollektiv (39/64) mit Patienten der ALL-REZ BFM-Studienpopulation verglichen, die ein IEM-Rezidiv in derselben Beobachtungszeit erlitten hatten. Die Repräsentativitätskontrolle wurde auf die in Deutschland behandelten ALL-REZ BFM-Patienten beschränkt, da nur für diese Patienten die kompletten Daten des Vergleichskollektivs vorlagen. Die Analyse schließt folgende Faktoren ein: Geschlecht, Alter bei Rezidivdiagnose, Rezidivzeitpunkt, Rezidivort und Immunphänotyp der ALL (Tabelle 10).

Tabelle 10: Vergleich der klinischen Charakteristika für das untersuchte Patientenkollektiv aus Deutschland (n = 39) und die Gesamtpopulation von IEM-Rezidiven aus Deutschland (n = 165).

Klinische Charakteristika	Studienpatienten		Gesamtpopulation		p-Wert
	n	%	n	%	
Geschlecht					0,54
männlich	31	79,5	121	73,3	
weiblich	8	20,5	44	26,7	
Rezidivzeitpunkt					0,91
sehr früh	12	30,8	46	27,9	
früh	15	38,5	69	41,8	
spät	12	30,8	50	30,3	
Immunphänotyp [†]					1,0
B-Vorläufer	26	72,2	105	72,9	
T-Zell	10	27,8	39	27,1	
Rezidivort [‡]					
ZNS	22	56,4	90	54,5	0,86
Testis	14	35,9	53	32,1	0,71
Sonstiges	4	10,3	28	17,0	0,46
Alter bei Rezidivdiagnose					0,85
< 5 Jahre	6	15,4	29	17,6	
≥ 5 bis < 10 Jahre	15	38,5	68	41,2	
≥ 10 Jahre	18	46,2	68	41,2	

[†] Die Angabe des Immunphänotyps fehlte für 3 Patienten der Studie und für 21 Patienten der Referenzgruppe.

[‡] Ein Patient der Studie hatte ein kombiniertes ZNS/Testis-Rezidiv. In der Referenzgruppe waren bei 4 Patienten 2 extramedulläre Orte (2-mal ZNS/Testis; 2-mal ZNS/Sonstiges) und bei 1 Patienten 3 Orte (ZNS/Testis/Sonstiges) befallen. Diese Patienten sind in der Tabelle jeweils in beiden bzw. allen drei Gruppen aufgeführt.

Die Analyse der klinischen Merkmale zeigt eine Gleichverteilung für die Parameter Geschlecht, Rezidivzeitpunkt, Immunphänotyp, Rezidivort und Alter bei Rezidivdiagnose.

Weiterhin wurden die pEFS und pOS der 39 eingeschlossenen deutschen Patienten und der Gesamtgruppe der IEM-Rezidive in der ALL-REZ BFM-Studie im gleichen Beobachtungszeitraum verglichen. Der Vergleich zeigt keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 5).

Die pEFS nach 5 Jahren bei Kindern mit IEM-Rezidiv, die im Zeitraum September 1994 bis Februar 2005 erkrankten und gemäß den Studien der ALL-REZ BFM-Gruppe behandelt worden sind, beträgt 42 % (SE \pm 0,05). Für die in die vorliegende Studie eingeschlossenen deutschen Kinder beträgt die pEFS 34 % (SE \pm 0,10; p[Log-Rank] = 0,46). Die pOS nach 4 Jahren liegt in der Referenzgruppe bei 50 % (SE \pm 0,05) gegenüber 28 % (SE \pm 0,21) nach 7,5 Jahren bei den eingeschlossenen deutschen Patienten (p[Log-Rank] = 0,99).

Für die Gesamtgruppe der untersuchten Patienten (n=64) entsprechen die pEFS nach 5 Jahren und die pOS nach 7,5 Jahren mit 38 % (SE \pm 0,08) und 48 % (SE \pm 0,11) der Literatur.^{9,28}

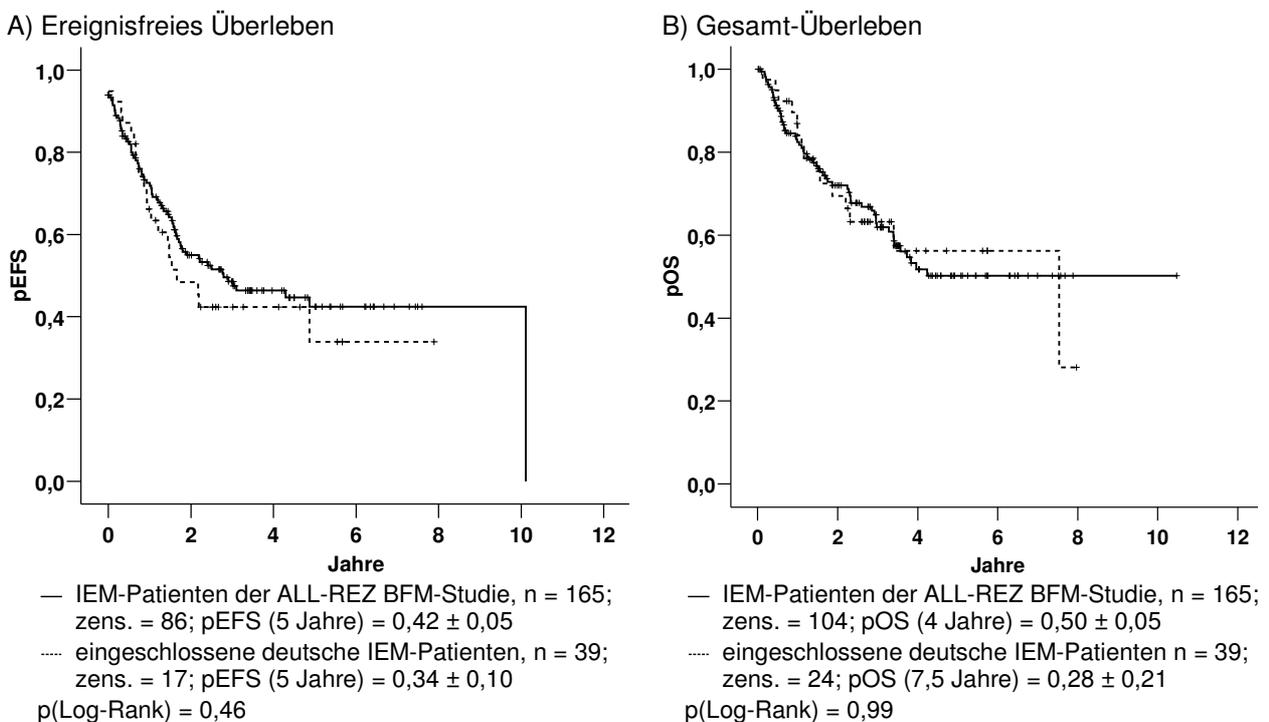


Abbildung 5: pEFS (A) und pOS (B) der in die Studie eingeschlossenen Patienten aus Deutschland (n = 39) und der IEM-Patienten der ALL-REZ BFM-Studie in der gleichen Beobachtungszeit (n = 165).

4.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

4.2.1 Klinische Merkmale des Patientenkollektivs

Vierundsechzig Patienten wurden entsprechend den im Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Selektionskriterien in diese Studie eingeschlossen. Von diesen 64 Kindern erlitten 38 ein ZNS-Rezidiv (59 %), 21 ein Testis-Rezidiv (33 %), 2 ein Lymphknoten-Rezidiv, 1 Kind ein Rezidiv im Ovar und 1 Kind ein Rezidiv im Mediastinum. Bei einem weiteren Patienten waren zwei extramedulläre Orte involviert, ZNS und Testis. In den folgenden Analysen wurde dieser Patient der ZNS-Gruppe zugeordnet, da dieser Manifestationsort die Prognose bestimmt.

Bei 7 Patienten war die chromosomale Translokation t(12;21) *TEL/AML1* nachweisbar, bei 4 Patienten konnten in den Leukämiezellen die Translokation t(9;22) *BCR/ABL* und bei einem die Translokation t(9;11) *MLL/AF9* identifiziert werden.

Zweiundsechzig Patienten erreichten die 2. CCR. Zwei Patienten sprachen nicht auf die Therapie an (lokale Nonresponder). Einer von beiden hatte ein IEM-Testis-Rezidiv und erreichte vor dem 6. Therapieblock nach beidseitiger Orchiektomie die CCR. Der zweite lokale Nonresponder hatte ein IEM-ZNS-Rezidiv und verstarb 6 Wochen nach Diagnosestellung. Diese zwei Patienten

Tabelle 11: Verteilung von klinischen Parametern in den durch die submikroskopische KM-Beteiligung definierten Gruppen (Grenzwert: 10^{-4}).

Klinische Parameter \ Gesamt	Gesamtgruppe		Submikroskopische KM-Beteiligung				p-Wert
			< 10^{-4}		≥ 10^{-4}		
	n	%	n	%	n	%	
Geschlecht	64	100	18	100	46	100	0,73
Männlich	52	81	14	78	38	83	
Weiblich	12	19	4	22	8	17	
Alter							0,68
< 5 Jahre	10	16	3	17	7	15	
≥ 5 bis < 10 Jahre	24	38	8	44	16	35	
≥ 10 Jahre	30	47	7	39	23	50	
Zeitpunkt							0,91
< 18 Monate	24	38	6	33	18	39	
≥ 18 bis < 30 Monate	20	31	6	33	14	30	
≥ 30 Monate	20	31	6	33	14	30	
Extramedullärer Ort							0,18
ZNS [†]	39	61	8	44	31	67	
Testis	21	33	9	50	12	26	
Sonstige	4	6	1	6	3	7	
Immunphänotyp							1,0
B-Vorläufer	49	80	13	81	36	80	
T-Zell	12	20	3	19	9	20	
keine Daten	3		2		1		

[†] Beinhaltet einen Patienten mit kombiniertem ZNS/Testis-Rezidiv.

ten wurden als Nonresponder betrachtet und in alle folgenden Analysen eingeschlossen.

Von insgesamt 64 Patienten blieben 30 (47 %) in CCR, 30 Patienten (47 %) erlitten ein Folge-
rezidiv und 4 Patienten starben nach Erreichen der CCR, aber noch während der Therapie. Die
Folgerезidive traten in folgenden Organen auf: KM (12/30, 40 %), ZNS (10/30, 33 %), Testis
(2/30, 7 %), Lymphknoten (1/30, 3 %), Mediastinum (1/30, 3 %), KM/ZNS (3/30, 10 %),
KM/Testis (1/30, 3 %). 21 Kinder starben am Folgerезidiv und 9 Kinder überlebten in 3. CCR.

Siebzehn Patienten erhielten eine SZT: 4 vom HLA-identischen Familienspender (*matched fa-
mily donor*, MFD), 3 von einem HLA-identischen unverwandten Spender (*matched unrelated
donor*, MUD) und 9 Patienten erhielten ein autologes Transplantat.

**Tabelle 12: Erstbehandlungstherapien und Rezidivtherapien in den durch die submikroskopische
KM-Beteiligung definierten Gruppen (Grenzwert: 10^{-4}).**

Therapie \ Gesamt	Gesamtgruppe		Submikroskopische KM-Beteiligung				p-Wert
			< 10^{-4}		$\geq 10^{-4}$		
	n	%	n	%	n	%	
Therapie \ Gesamt	64	100	18	100	46	100	
Initiale Therapie							0,14
ALL-BFM 90/96	20	31	5	28	15	33	
ALL-BFM 2000	14	22	3	17	11	24	
EORTC 58-881/952 [†]	16	25	8	44	8	17	
COALL-92/97 [‡]	14	22	2	11	12	26	
Initiale Schädelbestrahlung							0,93
Ja	42	78	11	79	31	78	
Nein	12	22	3	21	9	23	
Keine Daten	10		4		6		
Rezidivprotokoll							0,02
ALL-REZ BFM 90/96	16	25	1	6	15	33	
ALL-REZ BFM P02/02	32	50	9	50	23	50	
COOPRALL [§]	16	25	8	44	8	17	
Schädelbestrahlung im Rezidiv							0,30
Nein	19	40	7	50	12	36	
Ja ^Δ	18	39	4	29	14	42	
GKB [¶]	10	21	3	21	7	21	
Keine Daten	17		4		13		
SZT							0,30
Nein	47	75	14	78	33	73	
Allogen [§]	7	11	2	11	5	11	
Autolog	9	14	2	11	7	16	
Keine Daten	1		0		1		

[†] EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer

[‡] COALL: cooperative ALL-Studie

[§] COOPRALL: Protocole coopérateur de traitement des rechutes de leucémies aigues de l'enfant

^Δ 12 Gy n = 2; 15/18 Gy n = 17 Patienten

[¶] GKB: Ganzkörperbestrahlung, 12 Gy n = 4; 15/17 Gy n = 6 Patienten

[§] 4 Patienten erhielten ein Transplantat vom HLA-identischen Geschwister und 3 Patienten vom HLA-identischen unverwandten Spender.

Die Tabellen 11 und 12 fassen die Patientenmerkmale und die bei Initialerkrankung und Rezidiv durchgeführten Therapien zusammen.

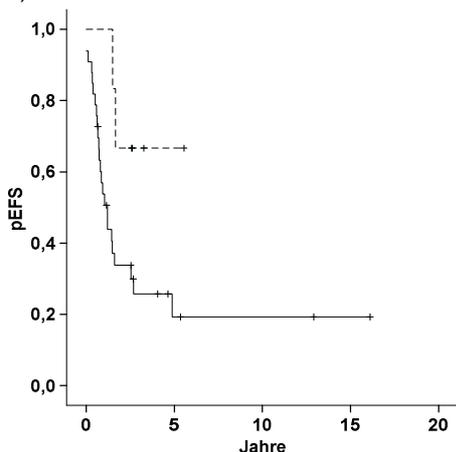
4.2.2 Überleben der Patienten

Wie in Abschnitt 4.1 erwähnt, beträgt die pEFS für die Gesamtgruppe ($n = 64$) 38 % ($SE \pm 0,08$), die pOS beträgt 48 % ($SE \pm 0,11$).

In der untersuchten Patientengruppe ($n = 64$) sind die pEFS und die pOS vom bekannten prognostischen Faktor Rezidivzeitpunkt abhängig. Die pEFS in der Gruppe der späten Rezidive ist mit 62 % ($SE \pm 0,11$) signifikant besser als in der Gruppe der sehr frühen und frühen Rezidive mit 29 % ($SE \pm 0,09$; $p[\text{Log-Rank}] = 0,027$) (Abbildung nicht gezeigt). Bei der getrennten Analyse der Gesamtgruppe bezüglich des befallenen extramedullären Ortes (ZNS, Testis) zeigt sich in der Gruppe der ZNS-Rezidive eine Abhängigkeit vom Rezidivzeitpunkt, in der Gruppe der Testis-Rezidive jedoch nicht (Abbildung 6).

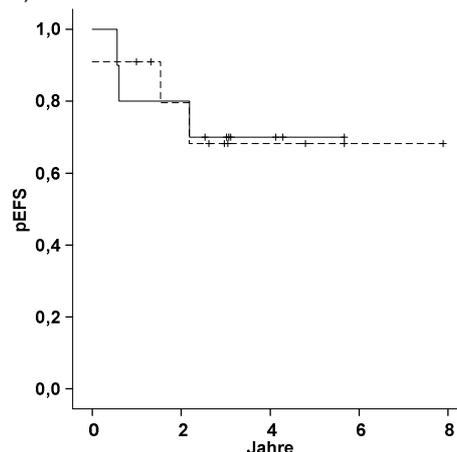
In der Gruppe der ZNS-Rezidive ist die pEFS von Kindern mit sehr frühen und frühen Rezidiven grenzgradig signifikant schlechter ($pEFS = 19\%$; $SE \pm 0,08$) als bei denen mit späten Rezidiven ($pEFS = 67\%$; $SE \pm 0,19$) ($p[\text{Log-Rank}] = 0,053$) (Abbildung 6.A). Die Anzahl der späten ZNS-Rezidive ist jedoch sehr klein. In der untersuchten Gruppe der Testis-Rezidive ist das Überleben nicht vom Rezidivzeitpunkt abhängig ($p[\text{Log-Rank}] = 0,96$). Sowohl bei sehr frühen und frühen als auch bei späten Testis-Rezidiven beträgt die pEFS ca. 70 % (Abbildung 6.B).

A) ZNS-Rezidive



— sehr frühe/frühe ZNS-Rezidive, $n = 33$;
zens. = 9; $pEFS$ (5 Jahre) = $0,19 \pm 0,08$
- - - - - späte ZNS-Rezidive, $n = 6$; zens. = 4;
 $pEFS$ (2 Jahre) = $0,67 \pm 0,19$
 $p(\text{Log-Rank}) = 0,053$

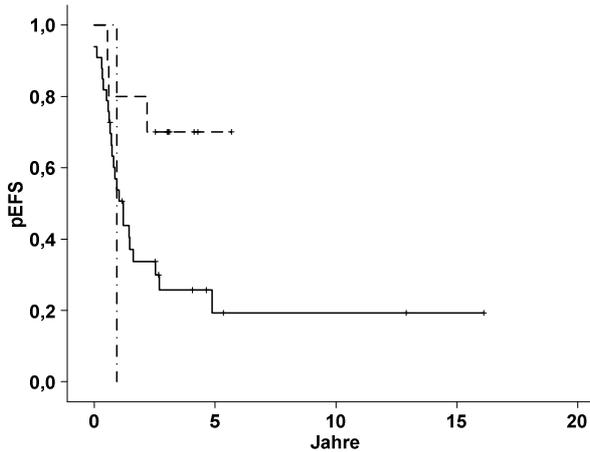
B) Testis-Rezidive



— sehr frühe/frühe Testis-Rezidive, $n = 10$;
zens. = 7; $pEFS$ (2 Jahre) = $0,70 \pm 0,15$
- - - - - späte Testis-Rezidive, $n = 11$; zens. = 8;
 $pEFS$ (2 Jahre) = $0,68 \pm 0,15$
 $p(\text{Log-Rank}) = 0,96$

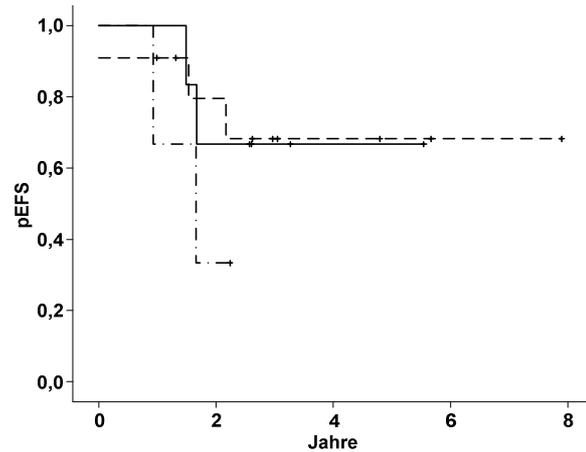
Abbildung 6: pEFS von Kindern mit ZNS-Rezidiv ($n = 39$) (A) und Testis-Rezidiv ($n = 21$) (B) in Abhängigkeit vom Rezidivzeitpunkt.

A) Sehr frühe und frühe Rezidive



— ZNS-Rezidive, n = 33; zens. = 9;
 pEFS (5 Jahre) = 0,19 ± 0,08
 Testis-Rezidive, n = 10; zens. = 7;
 pEFS (2 Jahre) = 0,70 ± 0,14
 --- Sonstige Rezidive, n = 1; zens. = 0;
 pEFS (1 Jahre) = 0,00 ± 0,00
 p(Log-Rank) = 0,07

B) Späte Rezidive



— ZNS-Rezidive, n = 6; zens. = 4;
 pEFS (2 Jahre) = 0,67 ± 0,19
 Testis-Rezidive, n = 11; zens. = 8;
 pEFS (2 Jahre) = 0,68 ± 0,15
 --- Sonstige Rezidive, n = 3; zens. = 1;
 pEFS (2 Jahre) = 0,33 ± 0,27
 p(Log-Rank) = 0,43

Abbildung 7: pEFS von Kindern mit sehr frühen und frühen (n = 44) (A) und späten Rezidiven (n = 20) (B) in Abhängigkeit vom Rezidivort.

Neben dem Rezidivzeitpunkt beeinflusst auch der Ort des extramedullären Befalls die Prognose. Die pEFS in der Gruppe der Kinder mit Testis-Rezidiv ist mit 70 % (SE ± 0,10) signifikant besser als in der Gruppe der Kinder mit ZNS-Rezidiv mit 26 % (SE ± 0,09) (p[Log-Rank] p = 0,007) (Abbildung nicht gezeigt). Bei Auftrennung der Gesamtgruppe bezüglich des Rezidivzeitpunktes (sehr früh und früh versus spät) zeigt sich nur in der Gruppe der sehr frühen und frühen Rezidive die Abhängigkeit vom involvierten Ort des IEM-Rezidivs, in der Gruppe der späten Rezidive jedoch nicht (Abbildung 7).

In der Gruppe der sehr frühen und frühen Rezidive ist die pEFS der Patienten mit Testis-Rezidiv deutlich besser (pEFS = 70 %; SE ± 0,14) als bei Patienten mit ZNS-Rezidiv (pEFS = 19 %; SE ± 0,08) (p[Log-Rank] = 0,07) (Abbildung 7.A). In der Gruppe der späten Rezidive unterscheidet sich die Prognose von Patienten mit ZNS- und Testis-Rezidiv nicht (pEFS [ZNS] = 67 %, pEFS [Testis] = 68 %, p[Log-Rank] = 0,43) (Abbildung 7.B). Aussagen über die anderen Rezidivorte sind aufgrund der zu geringen Patientenzahlen (sehr früh und früh: n = 1, spät: n = 3) nicht möglich.

4.3 Submikroskopische Knochenmarkbeteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose

4.3.1 Identifizierung klonaler Marker und Überprüfung ihrer Stabilität

Zum Identifizieren der klonalen Ig- und TZR-Genrekombinationen wurde neben der DNA, die aus extramedullären Proben des Erstrezidivs gewonnen wurde, auch Ersterkrankungs- oder Folgerezidivmaterial für den Screeningprozess verwendet. Vor dem Auswählen der Marker für die Quantifizierung musste deren Stabilität für den Zeitpunkt des ersten Rezidivs überprüft werden, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen (Tabelle 13).

Bei 27 Patienten konnten die extramedullären Proben für den Screeningprozess verwendet werden. Hier war eine Bestätigung der Markerstabilität nicht erforderlich, da DNA des aktuellen Rezidivs für die Identifizierung der klonspezifischen Marker genutzt werden konnte. Bei den übrigen 37 Patienten stand nicht ausreichend Material der extramedullären Probe für den Screeningprozess zur Verfügung, so dass in 34 Fällen Initialdiagnosematerial (KM bzw. peripheres Blut) und in 3 Fällen Material des Zweitrezidivs (KM) verwendet wurde. Die Bestätigung der Markerstabilität erfolgte bei 30 dieser 37 ALL (81 %) durch ein positives quantitatives Ergebnis und bei den verbleibenden 7 ALL (19 %) durch PCR mit Rest-DNA der extramedullären Probe.

Tabelle 13: Material für die Identifizierung und Bestätigung von klonspezifischen Markern.

Material für das Markerscreening	extramedulläre Probe zum Zeitpunkt des Erstrezidivs			nicht-extramedulläre Probe	
	Liquor	Testis	Sonstiges	Material der Initialdiagnose	Material vom Zweitrezidiv
Anzahl	14	11	2	34	3
<i>Bestätigung der Stabilität der klonalen Marker...</i>					
durch PCR mit aus Liquor-Zytospins oder Gewebeschnitten extrahierter DNA	nicht notwendig			7	0
durch ein positiv quantitatives Ergebnis	nicht notwendig			27	3

Tabelle 14: Zahl der pro ALL zum Quantifizieren verwendeten Ig- und TZR-Genrekombinationen.

Anzahl der Genrekombinationen	1	2	3	4
Zahl der Patienten	22	34	5	3

Tabelle 15: Sensitivitäten der zum Quantifizieren verwendeten Ig- und TZR-Genrekombinationen.

Sensitivität		10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Zahl der Genrekombinationen	gesamt 117	20	72	24	1

In den Tabellen 14 und 15 ist dargestellt, wieviele klonale Ig- und TZR-Genrekombinationen pro ALL zum Quantifizieren verwendet wurden und wie deren Sensitivität ist. Bei 66 % der ALL (42/64) standen zur Bestimmung der submikroskopischen KM-Beteiligung zwei oder mehr klonale Marker zur Verfügung. Die Verwendung nur eines stabilen klonalen Markers zur Quantifizierung der leukämischen Restzellen zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose ist zulässig, da klonale Evolution hier keine Rolle spielt. Bei 87 % der ALL konnte mindestens ein Marker mit der Sensitivität von 10^{-4} oder 10^{-5} zum Quantifizieren verwendet werden. Eine Sensitivität von 10^{-3} oder 10^{-2} wurde akzeptiert, wenn die submikroskopische KM-Beteiligung der gemessenen Probe oberhalb der Sensitivitätsgrenze lag oder wenn bereits ein Marker mit einer Sensitivität von mindestens 10^{-4} zur Verfügung stand.

4.3.2 Quantitative Variabilität der submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung

Zur Messung der submikroskopischen Anzahl von leukämischen Blasten im KM zur Rezidivdiagnose wurde die Methode der RQ-PCR angewendet (Abschnitt 3.2.6). Der quantitativ ermittelte Wert wurde einer von vier festgelegten Kategorien zugeordnet: a) $< 10^{-4}$, b) $\geq 10^{-4}$ bis $< 10^{-3}$, c) $\geq 10^{-3}$ bis $< 10^{-2}$, d) $\geq 10^{-2}$. (Abbildung 8)

Die einzelnen Werte der submikroskopischen KM-Beteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose sind sehr unterschiedlich. Quantitative Werte zwischen 1×10^{-4} und $1,72 \times 10^{-1}$ wurden nachgewiesen, d. h. die untersuchten Patienten wiesen KM-Beteiligungen von einer Leukämiezelle unter mehr als 10.000 gesunden Zellen bis zu 2 Leukämiezellen unter 10 gesunden Zellen auf.

Eine submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ wurde bei 28 % (18/64) der Patienten gemessen, wobei sich bei 11 Patientenproben unterhalb der Nachweisgrenze von 10^{-4} ein Signal zeigte. Bei den übrigen 7 Patientenproben konnte unterhalb von 10^{-4} kein Signal mehr detektiert werden.

Patienten mit einem ZNS-Rezidiv zeigten signifikant höhere submikroskopische KM-Beteiligungen als Patienten mit Testis-Rezidiv (Tabelle 16): 62 % (24/39) der Patienten mit ZNS-Rezidiv haben eine submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-3}$ im Vergleich zu 29 % (6/21) der Patienten mit Testis-Rezidiv ($p[\text{Chi-Quadrat}] = 0,03$). Die Durchführung der Analyse mit dem Grenzwert von 10^{-4} ergibt folgende Verteilung: 80 % (31/39) der Patienten mit ZNS-Rezidiv haben eine submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ im Vergleich zu 57 % (12/21) der Patienten mit Testis-Rezidiv ($p[\text{Chi-Quadrat}] = 0,08$).

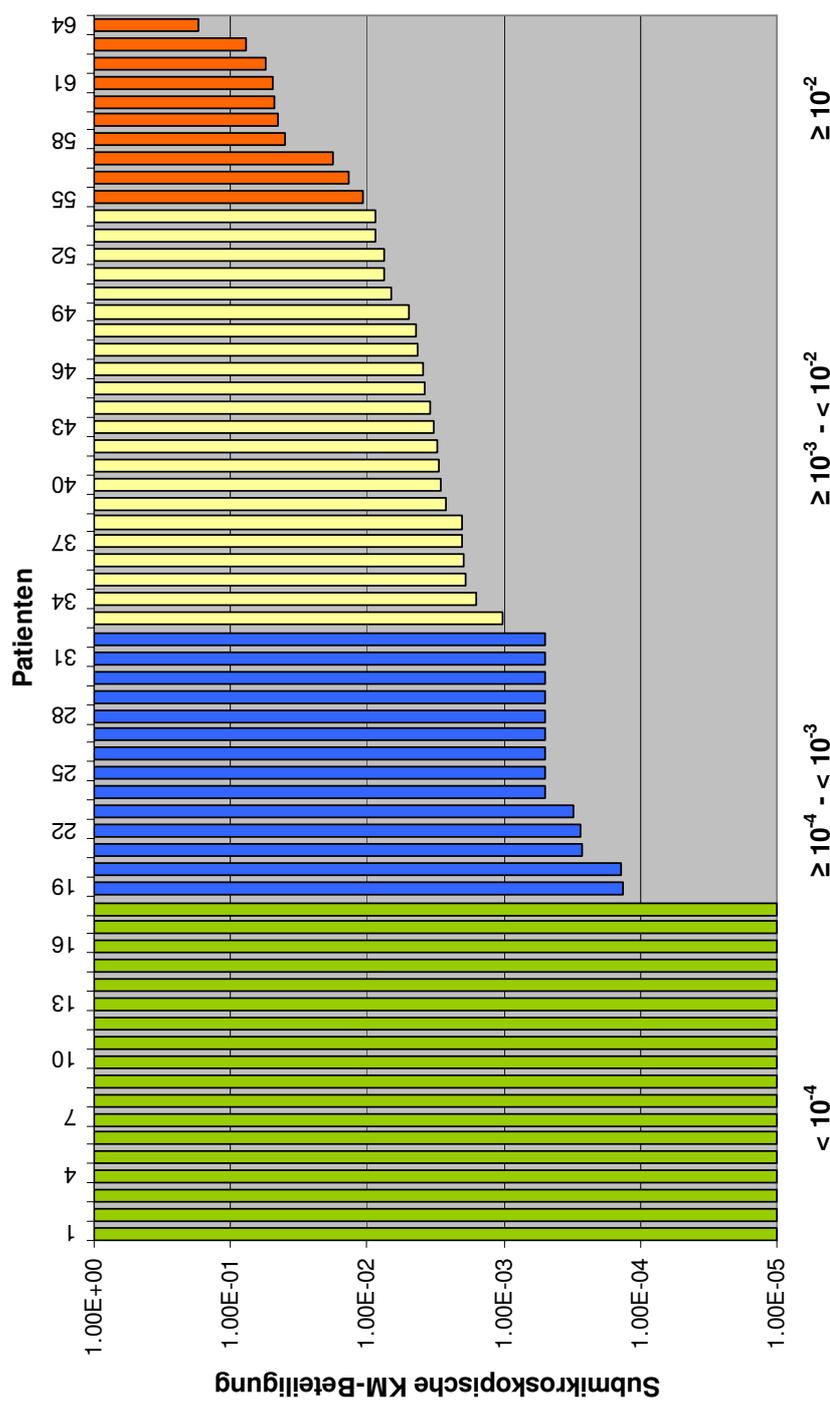


Abbildung 8: Verteilung der quantitativen Werte der submikroskopischen KM-Beteiligung bei Patienten mit IEM-Rezidiv zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose.

Tabelle 16: Verteilung der submikroskopischen KM-Beteiligung bei Patienten mit ZNS- oder Testis-Rezidiv.

Submikroskopische KM-Beteiligung	extramedullärer Ort				Gesamt	
	ZNS		Testis			
	n	%	n	%	n	%
$< 10^{-4}$	8	20,5	9	42,9	17	28,3
$< 10^{-3} - \geq 10^{-4}$	7	17,9	6	28,6	13	21,7
$< 10^{-2} - \geq 10^{-3}$	15	38,5	4	19,0	19	31,7
$\geq 10^{-2}$	9	23,1	2	9,5	11	18,3
Gesamt	39	100	21	100	60	100

Für sämtliche weitere Analysen wurden die Patienten entsprechend der submikroskopischen KM-Beteiligung in zwei Subgruppen eingeordnet: $< 10^{-4}$ und $\geq 10^{-4}$. Diese Definition basiert auf dem Grenzwert von 10^{-4} , der für die Mehrheit der Genrekombinationen erreichten höchsten Sensitivitätsgrenze. Eine Sensitivität von 10^{-4} für mindestens ein spezifisches TZR-/Ig-Umlagerungsprodukt konnte für 38 von insgesamt 64 ALL erreicht werden. Eine Sensitivität von 10^{-5} wird im Allgemeinen nur für wenige Genrekombinationen erreicht; in unserem Patientenkollektiv hatten 18 von 64 der ALL mindestens ein TZR-/Ig-Umlagerungsprodukt mit einer Sensitivität von 10^{-5} .

4.4 Submikroskopische Knochenmarkbeteiligung und relevante klinische Parameter

Die Verteilung der klinischen Parameter in den durch die submikroskopische KM-Beteiligung definierten Gruppen (Tabelle 11, Abschnitt 4.2.1) zeigt, dass es keine Assoziation zwischen submikroskopischer KM-Beteiligung und Geschlecht des Patienten, Alter bei Rezidivdiagnose, Zeitpunkt des Rezidivs, extramedullärem Ort und Immunphänotyp der Erkrankung gibt.

Weiterhin konnte kein Zusammenhang zwischen der submikroskopischen KM-Beteiligung und der Initialtherapie, der kranialen Bestrahlung während Initial- und Rezidivtherapie und der SZT in 2. CCR nachgewiesen werden. Es gibt jedoch eine Korrelation zwischen submikroskopischer KM-Beteiligung und der Rezidivtherapie: Patienten die gemäß ALL-REZ BFM, im Besonderen nach dem ALL-REZ BFM-Protokoll 90/96 behandelt wurden, weisen zu einem höheren Anteil submikroskopische KM-Beteiligungen von $\geq 10^{-4}$ auf als Patienten die gemäß COOPRALL behandelt wurden ($p = 0,02$) (Tabelle 12, Abschnitt 4.2.1).

4.5 Submikroskopische Knochenmarkbeteiligung und Prognose

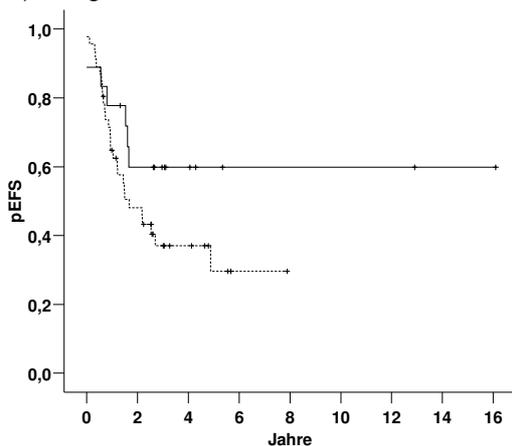
4.5.1 Univariate Analyse der Gesamtgruppe

Die prognostische Bedeutung der submikroskopischen KM-Beteiligung wird durch die pEFS und die pOS anhand von Kaplan-Meier-Kurven und durch die Darstellung kumulativer Inzidenzen (pCumInc) für das Auftreten von Folgerezidiven veranschaulicht. Diese sind nachfolgend für die Gesamtgruppe dargestellt (Abbildungen 9 und 10). Als kritische Grenze der submikroskopischen KM-Beteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose wurde, wie im Abschnitt 4.3.2 bereits erläutert, der Nachweis von einer Leukämiezelle auf 10.000 gesunde Zellen (10^{-4}) festgelegt.

Die pEFS bei Kindern mit IEM-Rezidiv und einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ beträgt 60 % (n = 18; SE $\pm 0,12$), bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ dagegen 30 % (n = 46; SE $\pm 0,09$) (p[Log-Rank] = 0,13) (Abbildung 9.A). Die pOS liegt in der $< 10^{-4}$ -Gruppe bei 71 % (SE $\pm 0,11$) gegenüber 39 % (SE $\pm 0,13$) in der $\geq 10^{-4}$ -Gruppe (p[Log-Rank] = 0,27) (Abbildung 9.B).

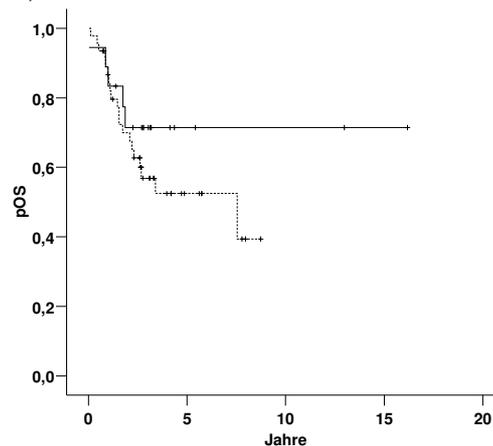
In der Gesamtgruppe (n = 64) beträgt die Wahrscheinlichkeit, 5 Jahre nach Rezidivdiagnose ein Folgerezidiv zu erleiden, bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ 24 % (n = 18; SE $\pm 0,01$) gegenüber 65 % (SE $\pm 0,01$) bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ (n = 46) (p[Gray] = 0,012; Abbildung 10).

A) Ereignisfreies Überleben



— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$, n = 18;
zens. = 11; pEFS (2 Jahre) = $0,60 \pm 0,12$
..... submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$, n = 46;
zens. = 18; pEFS (5 Jahre) = $0,30 \pm 0,09$
p(Log-Rank) = 0,13

B) Gesamt-Überleben



— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$, n = 18;
zens. = 13; pOS (2 Jahre) = $0,71 \pm 0,11$
..... submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$, n = 46;
zens. = 26; pOS (5 Jahre) = $0,39 \pm 0,13$
p(Log-Rank) = 0,27

Abbildung 9: pEFS (A) und pOS (B) in Abhängigkeit der submikroskopischen KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose – Gesamtgruppe (n = 64).

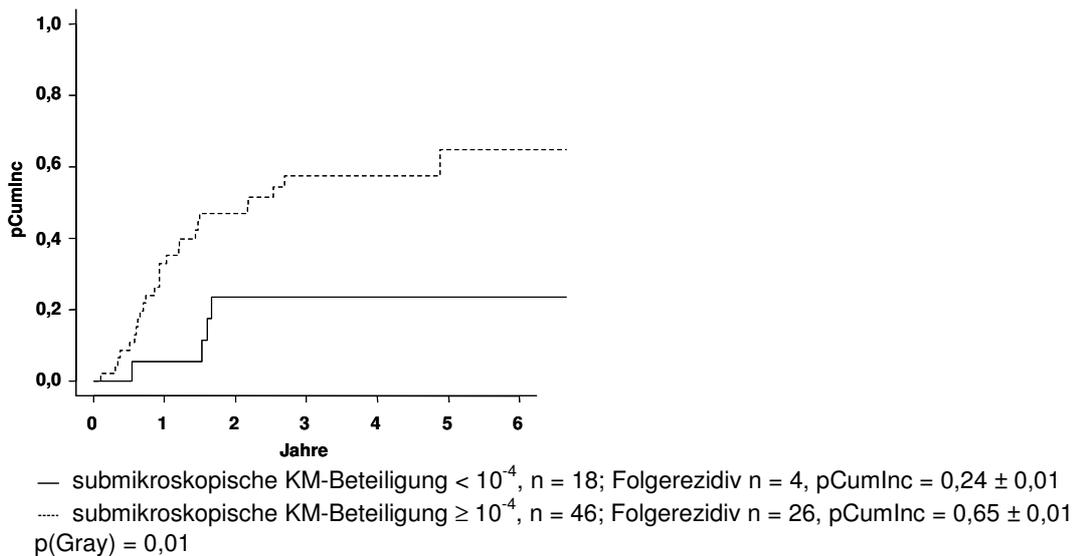


Abbildung 10: Kumulative Inzidenz eines Folgerezidivs in Abhängigkeit der submikroskopischen KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose – Gesamtgruppe (n = 64).

4.5.2 Univariate Analyse – Auftrennung nach Rezidivort

Nachfolgend sind die Kaplan-Meier-Kurven und die kumulativen Inzidenzen für die häufigsten extramedullären Orte (ZNS und Testis) dargestellt.

Isoliert extramedulläre ZNS-Rezidive

Die pEFS bei Kindern mit IEM-ZNS-Rezidiv und einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ beträgt 63 % (n = 8; SE ± 0,17), bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ dagegen 11 % (n = 31; SE ± 0,09) (p[Log-Rank] = 0,053) (Abbildung 11.A). Die pOS liegt in der $< 10^{-4}$ -Gruppe bei 63 % (SE ± 0,17) gegenüber 20 % (SE ± 0,15) in der $\geq 10^{-4}$ -Gruppe (p[Log-Rank] = 0,30) (Abbildung 11.B).

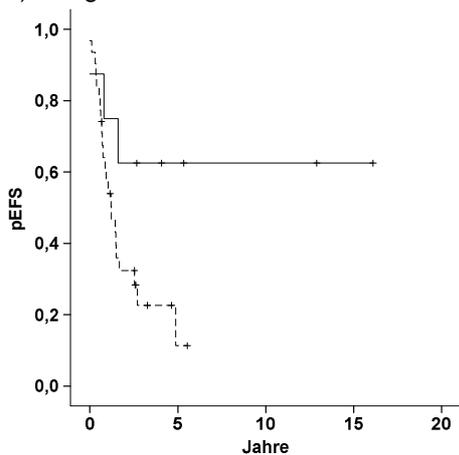
In der ZNS-Gruppe (n = 39) beträgt die Wahrscheinlichkeit, 5 Jahre nach Rezidivdiagnose ein Folgerezidiv zu erleiden, bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ 13 % (n = 8; SE ± 0,00) gegenüber 82 % (SE ± 0,02) bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ (n = 31) (p[Gray] = 0,01; Abbildung 12).

Isoliert extramedulläre Testis-Rezidive

Die pEFS bei Kindern mit IEM-Testis-Rezidiv und einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ beträgt 65 % (n = 9; SE ± 0,17), bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ 73 % (n = 12; SE ± 0,13) (p[Log-Rank] = 0,53) (Abbildung 13.A). Wie die pEFS ist die pOS mit 76 % (SE ± 0,15) in der Gruppe $< 10^{-4}$ gegenüber 91 % (SE ± 0,09) in der $\geq 10^{-4}$ -Gruppe nicht verschieden (p[Log-Rank] = 0,34) (Abbildung 13.B).

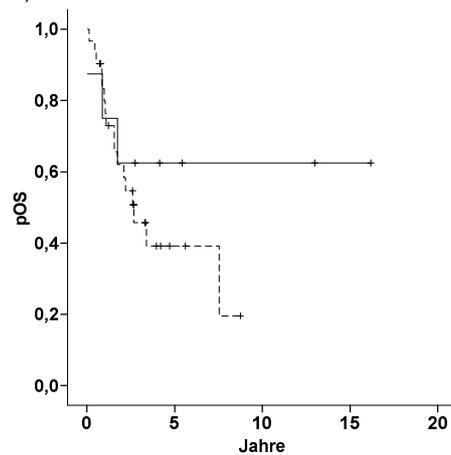
In der Gruppe der Testis-Rezidive (n=22) beträgt die Wahrscheinlichkeit, ein Folgerezidiv 5 Jahre nach Rezidivdiagnose zu erleiden, bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ (n = 9) 24 % (SE $\pm 0,03$) gegenüber 31 % (SE $\pm 0,02$) bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ (n = 12) (p[Gray] = 0,06; Abbildung 14).

A) Ereignisfreies Überleben



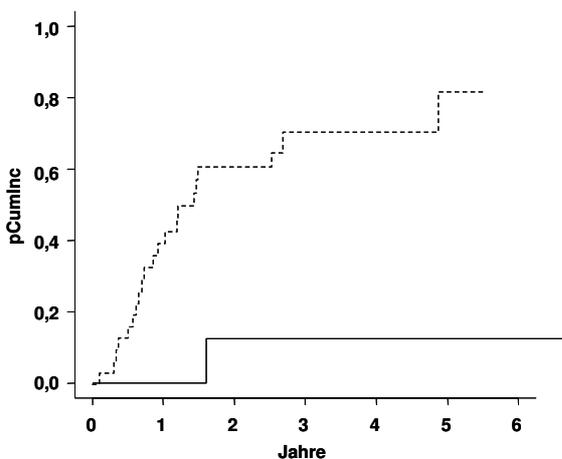
— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$, n = 8;
zens. = 5; pEFS (2 Jahre) = $0,63 \pm 0,17$
- - - submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$, n = 31;
zens. = 8; pEFS (5 Jahre) = $0,11 \pm 0,09$
p(Log-Rank) = 0,053

B) Gesamt-Überleben



— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$, n = 8;
zens. = 5; pOS (2 Jahre) = $0,63 \pm 0,17$
- - - submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$, n = 31;
zens. = 14; pOS (8 Jahre) = $0,20 \pm 0,15$
p(Log-Rank) = 0,30

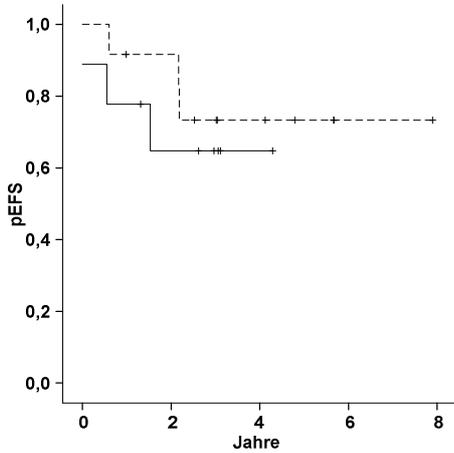
Abbildung 11: pEFS (A) und pOS (B) in Abhängigkeit der submikroskopischen KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose – ZNS-Gruppe (n = 39).



— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$, n = 8; Folgerezidiv n = 1, pCumInc = $0,13 \pm 0,00$
- - - submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$, n = 31; Folgerezidiv n = 21, pCumInc = $0,82 \pm 0,02$
p(Gray) = 0,01

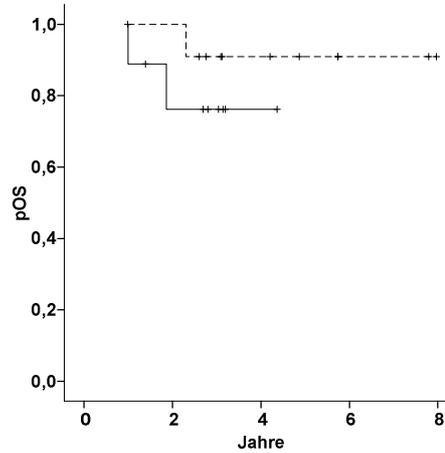
Abbildung 12: Kumulative Inzidenz eines Folgerezidivs in Abhängigkeit der submikroskopischen KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose – ZNS-Gruppe (n = 39).

A) Ereignisfreies Überleben



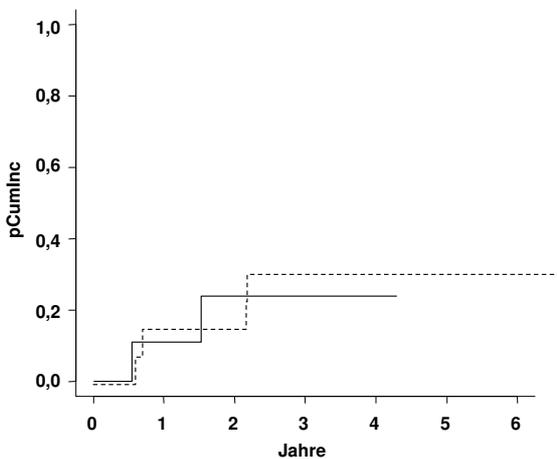
— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$, n = 9;
zens. = 6; pEFS (2 Jahre) = $0,65 \pm 0,17$
- - - submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$, n = 12;
zens. = 9; pEFS (2 Jahre) = $0,73 \pm 0,13$
p(Log-Rank) = 0,53

B) Gesamt-Überleben



— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$, n = 9;
zens. = 7; pOS (2 Jahre) = $0,76 \pm 0,15$
- - - submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$, n = 12;
zens. = 11; pOS (2 Jahre) = $0,91 \pm 0,09$
p(Log-Rank) = 0,34

Abbildung 13: pEFS (A) und pOS (B) in Abhängigkeit der submikroskopischen KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose – Testis-Gruppe (n = 21).



— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$, n = 9; Folgerezidiv n = 2, pCumInc = $0,24 \pm 0,03$
- - - submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$, n = 12; Folgerezidiv n = 4, pCumInc = $0,31 \pm 0,02$
p(Gray) = 0,06

Abbildung 14: Kumulative Inzidenz eines Folgerezidivs in Abhängigkeit der submikroskopischen KM-Beteiligung zur Rezidivdiagnose – Testis-Gruppe (n = 21).

4.5.3 Univariate Analyse – Auftrennung nach Rezidivzeitpunkt

Nachfolgend sind die Kaplan-Meier-Kurven und die kumulativen Inzidenzen für die Gruppe der sehr frühen und frühen und für die Gruppe der späten IEM-Rezidive dargestellt. Die Analysen zeigen die prognostische Bedeutung der submikroskopischen KM-Beteiligung in der Gruppe der sehr frühen und frühen IEM-Rezidive.

Sehr frühe und frühe Rezidive

Die pEFS bei Kindern mit einem sehr frühen oder frühen IEM-Rezidiv und einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ ($n = 12$) beträgt 67 % ($SE \pm 0,14$), im Vergleich bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ ($n = 32$) 11 % ($SE \pm 0,09$) ($p[\text{Log-Rank}] = 0,016$) (Abbildung 15.A). Die pOS liegt in der $< 10^{-4}$ -Gruppe bei 67 % ($SE \pm 0,14$) gegenüber 28 % ($SE \pm 0,13$) in der $\geq 10^{-4}$ -Gruppe ($p[\text{Log-Rank}] = 0,24$) (Abbildung 15.B).

In der Gruppe der sehr frühen und frühen Rezidive ($n = 44$) beträgt die Wahrscheinlichkeit 5 Jahre nach Rezidivdiagnose ein Folgerezidiv zu erleiden, bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ ($n = 12$) 17 % ($SE \pm 0,12$) gegenüber 85 % ($SE \pm 0,11$) bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung von $\geq 10^{-4}$ ($n = 32$) ($p[\text{Gray}] = 0,0015$; Abbildung 16).

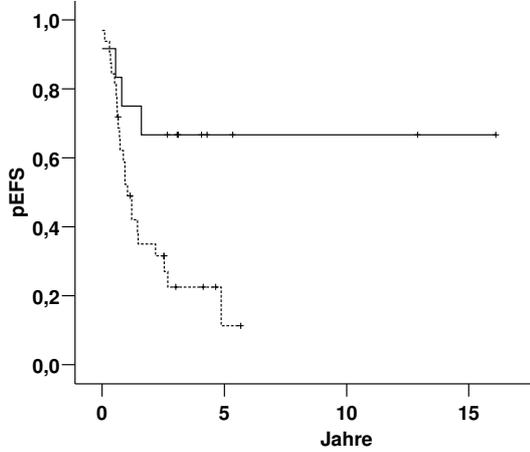
Späte Rezidive

Die submikroskopische KM-Beteiligung bei späten IEM-Rezidiven hat in der untersuchten Gruppe keine prognostische Relevanz.

Die pEFS bei Kindern mit einem späten IEM-Rezidiv und einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ ($n = 6$) beträgt 42 % ($SE \pm 0,22$), im Vergleich bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ ($n = 14$) 70 % ($SE \pm 0,13$) ($p[\text{Log-Rank}] = 0,21$) (Abbildung 17.A). Die pOS liegt in der $< 10^{-4}$ -Gruppe bei 80 % ($SE \pm 0,18$) gegenüber 77 % ($SE \pm 0,12$) in der $\geq 10^{-4}$ -Gruppe ($p[\text{Log-Rank}] = 0,83$) (Abbildung 17.B).

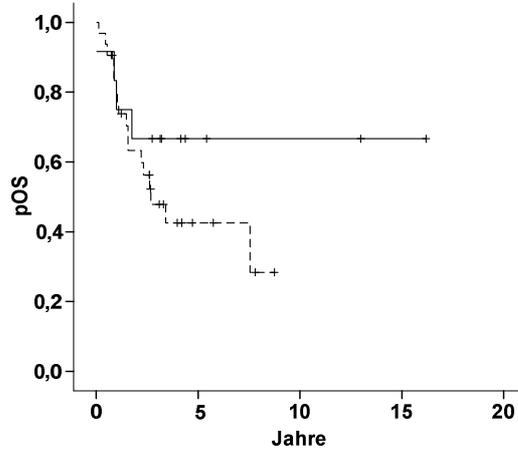
In der Gruppe der späten Rezidive ($n = 20$) beträgt die Wahrscheinlichkeit, 5 Jahre nach Rezidivdiagnose ein Folgerezidiv zu erleiden bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ ($n = 6$) 42 % ($SE \pm 0,26$) gegenüber 21 % ($SE \pm 0,12$) bei Kindern mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung von $\geq 10^{-4}$ ($n = 14$) ($p[\text{Gray}] = 0,47$; Abbildung 18).

A) Ereignisfreies Überleben



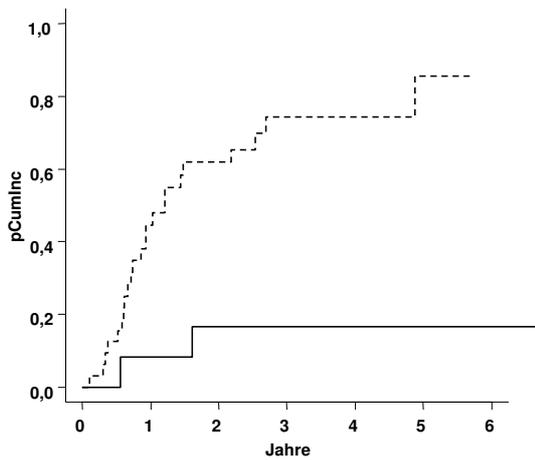
— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$,
 n = 12; zens. = 8;
 pEFS (2 Jahre) = $0,67 \pm 0,14$
 submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$,
 n = 32; zens. = 8;
 pEFS (5 Jahre) = $0,11 \pm 0,09$
 p(Log-Rank) = 0,016

B) Gesamt-Überleben



— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$,
 n = 12; zens. = 8;
 pOS (2 Jahre) = $0,67 \pm 0,14$
 submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$,
 n = 32; zens. = 15;
 pOS (8 Jahre) = $0,28 \pm 0,13$
 p(Log-Rank) = 0,24

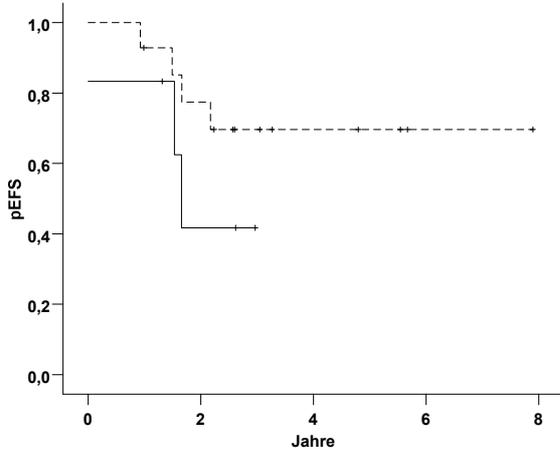
Abbildung 15: pEFS (A) und pOS (B) in Abhängigkeit der submikroskopischen KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose – sehr frühe und frühe Rezidive (n = 44).



— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$, n = 12; Folgerezidiv n = 2, pCumInc = $0,17 \pm 0,12$
 submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$, n = 32; Folgerezidiv n = 23, pCumInc = $0,85 \pm 0,11$
 p(Gray) = 0,0015

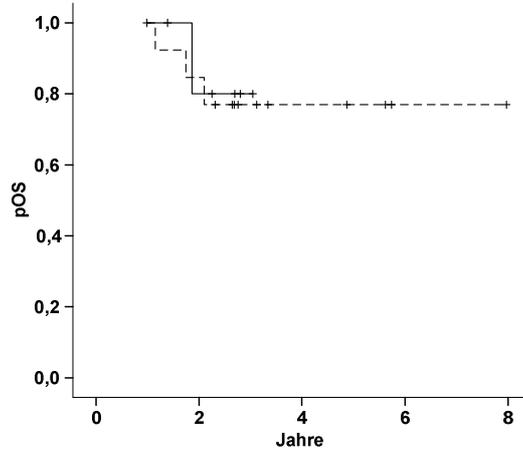
Abbildung 16: Kumulative Inzidenz eines Folgerezidivs in Abhängigkeit der submikroskopischen KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose – sehr frühe und frühe Rezidive (n = 44).

A) Ereignisfreies Überleben



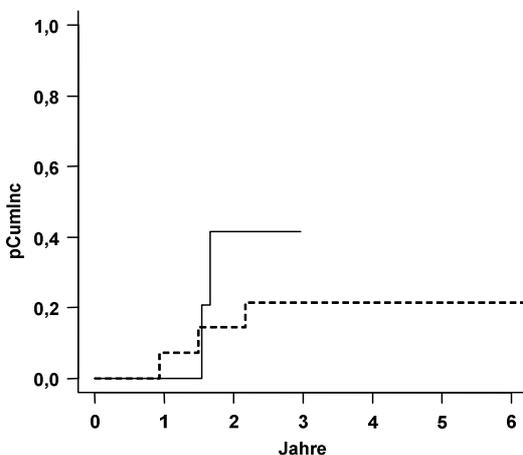
— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$,
 n = 6; zens. = 3;
 pEFS (5 Jahre) = $0,42 \pm 0,22$
 submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$,
 n = 14; zens. = 10;
 pEFS (5 Jahre) = $0,70 \pm 0,13$
 p(Log-Rank) = 0,21

(B) Gesamt-Überleben



— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$, n = 6;
 zens. = 5;
 pOS (2 Jahre) = $0,80 \pm 0,18$
 submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$,
 n = 14; zens. = 11; pOS (5 Jahre) = $0,77 \pm 0,12$
 p(Log-Rank) = 0,83

Abbildung 17: pEFS (A) und pOS (B) in Abhängigkeit der submikroskopischen KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose – späte Rezidive (n = 20).



— submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$, n = 6; Folgerezidiv n = 2;
 pCumInc = $0,42 \pm 0,26$
 submikroskopische KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$, n = 14; Folgerezidiv n = 3;
 pCumInc = $0,21 \pm 0,12$
 p(Gray) = 0,47

Abbildung 18: Kumulative Inzidenz eines Folgerezidivs gemäß der submikroskopischen KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose – späte Rezidive (n = 20).

4.5.4 Multivariate Analyse

Um zu klären, ob die submikroskopische KM-Beteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose einen unabhängigen prognostischen Marker darstellt, wurde eine multivariate Analyse durchgeführt. Die multivariate Cox-Regression schloss alle potentiell relevanten Parameter ein: Geschlecht, Alter bei Rezidivdiagnose, Immunphänotyp, Zeitpunkt und Ort des Rezidivs, submikroskopische KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose, Ersterkrankungstherapie, Rezidivtherapie und SZT. In diesem Modell zeigten sich die submikroskopische KM-Beteiligung, das Alter bei Rezidivdiagnose, der extramedulläre Ort des Rezidivs und der Immunphänotyp als prognostische Faktoren (Tabelle 17). Patienten mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ haben ein 2,7-fach höheres Risiko (95 % Konfidenzintervall 1,1 - 6,5) zu sterben oder ein Folgerezidiv zu erleiden als Patienten mit einem Niveau $< 10^{-4}$.

4.6 Submikroskopische Knochenmarkbeteiligung und Folgerezidiv

Der Vergleich der Rezidivorte von erstem Rezidiv und zweitem Rezidiv der in dieser Arbeit untersuchten Patientengruppe zeigt, dass Patienten mit ZNS-Rezidiv am häufigsten Folgerezidive im KM erleiden (9/22 KM isoliert, 3/22 KM kombiniert), jedoch zu fast gleichen Anteilen erneut im ZNS rezidivieren (Tabelle 18). In der Gruppe der Testis-Rezidive haben 4 von 5 Patienten ein Folgerezidiv im KM erlitten. Bei einem Patienten trat ein Folgerezidiv erneut im Testis auf.

Zwischen dem Ort des Folgerezidivs und der submikroskopischen KM-Beteiligung zum Zeit-

Tabelle 17: Cox-Regressionsmodell für die Überlebenszeit bis zum Folgerezidiv oder Tod.

Parameter	Patientenzahl	Hazardrate	95 % Konfidenzintervall	p-Wert
Immunphänotyp				< 0,001
B-Vorläufer	49	1		
T-Zell	12	5,3	2,1 – 13,1	
Submikroskopische KM-Beteiligung				0,04
$< 10^{-4}$	16	1		
$\geq 10^{-4}$	45	2,7	1,1 – 6,9	
Alter bei Rezidivdiagnose				0,015
≥ 10 Jahre	28	1		
≥ 5 - < 10 Jahre	23	0,9	0,4 – 2,0	
< 5 Jahre	10	3,9	1,5 – 10,3	
extramedullärer Ort				0,001
ZNS	38	1		
Testis	20	0,24	0,09 – 0,62	
Sonstige	3	0,43	0,09 – 2,04	

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Orte des 1. und 2. Rezidivs.

Ort des 1. Rezidivs	Ort des Folgerezidivs (2. Rezidiv)						Gesamt
	KM	KM/ZNS	KM/Testis	ZNS	Testis	Sonstige	
ZNS	9	2	1	9	1	0	22
Testis	3	1	0	0	1	0	5
Sonstige	0	0	0	1	0	2	3
Gesamt	12	3	1	10	2	2	30

Tabelle 19: Submikroskopische KM-Beteiligung zur Rezidivdiagnose des 1. Rezidivs und Ort des Folgerezidivs.

Ort des Folgerezidivs	Submikroskopische KM-Beteiligung bei 1. Rezidiv				Gesamt
	$< 10^{-4}$	$< 10^{-3} - \geq 10^{-4}$	$< 10^{-2} - \geq 10^{-3}$	$\geq 10^{-2}$	
KM	1	1	9	1	12
KM/ZNS	2	0	0	1	3
KM/Testis	0	0	0	1	1
ZNS	1	4	2	3	10
Testis	0	1	1	0	2
Sonstige	0	1	1	0	2
Gesamt	4	7	13	6	30

punkt der Diagnose des 1. Rezidivs ist eine Tendenz sichtbar. 83 % (10/12) der Patienten, die ein Folgerezidiv im KM erlitten haben, zeigten eine hohe submikroskopische KM-Beteiligung ($\geq 10^{-3}$) zum Zeitpunkt des 1. Rezidivs, während nur 17 % (2/12) der Patienten mit Folgerezidiv im KM eine submikroskopische KM-Beteiligung von $< 10^{-3}$ aufwiesen. Bei Patienten mit Folgerezidiv im IEM-Organ waren die Werte der submikroskopischen KM-Beteiligung gleichmässig auf hohe oder niedrige submikroskopische Kategorien verteilt. In der Gruppe der kombinierten Folgerezidive zeigten 2/4 Patienten eine hohe submikroskopische KM-Beteiligung von $\geq 10^{-2}$ und die übrigen 2/4 Patienten eine sehr geringe KM-Beteiligung von $< 10^{-4}$ (Tabelle 19).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde systematisch zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose bei Kindern mit einem IEM-Rezidiv einer ALL mittels RQ-PCR der klonalen Antigenrezeptoren das Vorhandensein von Leukämiezellen im KM unterhalb der mikroskopischen Nachweisgrenze überprüft. Die submikroskopische KM-Beteiligung, d.h. die Menge der quantifizierten Leukämiezellen, wurde mit der Prognose assoziiert.

Die Analyse der Daten zeigt, dass die quantitative Menge der submikroskopischen KM-Beteiligung in der Gesamtgruppe der IEM-Rezidive einen potentiellen *neuen prognostischen Marker* darstellt. Sowohl in der Subgruppe der ZNS-Rezidive als auch in der Subgruppe der sehr frühen und frühen Rezidive konnte die prognostische Bedeutung der submikroskopischen KM-Beteiligung gezeigt werden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden neue mögliche Therapiestratifizierungen entworfen und anhand der aktuellen Literatur diskutiert.

Darüber hinaus zeigt diese Studie, dass mit Hilfe der RQ-PCR eine sensitivere Diagnostik der IEM-Rezidive als mit Lichtmikroskopie möglich ist. Nach prospektiver Bestätigung würde diese genauere Diagnostik eine *Neudefinition von IEM-Rezidiven* erlauben. Auf der Basis der möglichen Neudefinition des IEM-Rezidivs wird eine veränderte Einteilung von Rezidiven mit extramedullärer Beteiligung vorgeschlagen und diskutiert.

Weiterhin liefern diese Ergebnisse Hinweise zum besseren Verstehen der Biologie von ZNS- und Testis-Rezidiven, sowie der unterschiedlichen Pathogenese von sehr frühen und frühen im Vergleich zu späten Rezidiven. Sie unterstützen vorhandene Hypothesen und liefern die Grundlage für das Aufstellen neuer Hypothesen.

Auf der Basis dieser Daten wurden andere Studiengruppen auf der Internationalen-BFM-Tagung im April 2008 eingeladen, an einer großen prospektiven Studie teilzunehmen, die in einer realistischen Zeit (2 bis maximal 4 Jahre) die erhobenen Ergebnisse bestätigen soll und durch größere Patientenzahlen weitere Analysen in Subgruppen erlauben wird.

5.1 Heterogenität der submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung

In unserer kooperativen Studie konnten wir zeigen, dass bei der Mehrheit der Kinder mit einem IEM-Rezidiv (46/64; 72 %) eine submikroskopische KM-Beteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose nachweisbar ist (Abbildung 8). Unsere Ergebnisse stimmen mit vorhergegangenen

Studien überein, die ebenfalls eine submikroskopische KM-Beteiligung bei der Mehrheit der untersuchten Patienten nachweisen konnten (siehe Abschnitt 1.5). Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie der vorhergegangenen Studien unterstützen somit die Annahme, dass ein IEM-Rezidiv in den meisten Fällen die lokale Manifestation eines systemischen Rezidivs ist.^{2,77}

Die früheren Arbeiten basieren auf sehr kleinen Patientenzahlen (6, 6, 7 und 13 Patienten).^{38,77-79} Die Quantifizierung erfolgte mit semi-quantitativen PCR-Methoden und in nur wenigen Fällen wurde die Stabilität der zur Quantifizierung verwendeten, initialen Marker überprüft.

Die vorliegende Arbeit zeigt außerdem, dass das Ausmaß der submikroskopischen KM-Beteiligung im untersuchten Kollektiv äußerst unterschiedlich verteilt war. Nur bei 18 von 64 Patienten war eine submikroskopische KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ ($n = 11$) bzw. keine KM-Beteiligung ($n = 7$) nachweisbar. Bei 11 von 18 war ein schwaches Signal in der PCR detektierbar, bei den übrigen 7 nicht. Mögliche Ursachen für ein negatives PCR-Ergebnis sind: Das Vorhandensein eines ausschließlich „wahren“ IEM-Rezidivs (ohne mikroskopische und submikroskopische KM-Beteiligung), das Vorliegen einer KM-Beteiligung unterhalb der Detektionsgrenze der RQ-PCR von 10^{-4} bzw. 10^{-5} , sowie falsch-negative Ergebnisse. Die Verwendung von initialen Markern für die Quantifizierung der KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose kann bei klonaler Evolution der Leukämiezelle bzw. der Ig- und TZR-Genumlagerungen oder bei Verlust des Markers zu falsch-negativen Ergebnissen führen.^{120,121} Durch die Bestätigung der Stabilität aller verwendeten initialen Marker wurden falsch-negative Ergebnisse ausgeschlossen. Es ist jedoch möglich, dass für die Quantifizierung ein Marker verwendet wurde, der im extramedullären Gewebe identifiziert wurde, jedoch nicht die Zellen beschreibt, die im KM zur Rezidivdiagnose vorhanden sind. In diesem Falle sind die vom extramedullären Kompartiment in das KM ausgewanderten Zellen andere als die im extramedullären Kompartiment zurückgebliebenen.

Tabelle 20: Gegenüberstellung der submikroskopischen KM-Beteiligung und der morphologisch ermittelten Leukämiezellzahl im KM-Ausstrich.

Patient	submikroskopische KM-Beteiligung	Leukämiezellen im KM-Ausstrich in %
C3_IEM-Nr. 10	$1,06 \times 10^{-2}$	nicht bekannt
C1_IEM-Nr. 13	$1,35 \times 10^{-2}$	0
C2_IEM-Nr. 16	$1,80 \times 10^{-2}$	nicht bekannt
C2_IEM-Nr. 5	$4,00 \times 10^{-2}$	nicht bekannt
C1_IEM-Nr. 5	$4,48 \times 10^{-2}$	rechts 3, links 4
C1_IEM-Nr. 10	$4,77 \times 10^{-2}$	1
C1_IEM-Nr. 44	$4,89 \times 10^{-2}$	0
C1_IEM-Nr. 1	$5,50 \times 10^{-2}$	1
C1_IEM-Nr. 11	$7,74 \times 10^{-2}$	5
C1_IEM-Nr. 32	$1,72 \times 10^{-1}$	2

Neun von 64 Patienten wiesen eine submikroskopische KM-Beteiligung größer als 10^{-2} auf, bei einem Patienten war diese sogar größer als 10^{-1} . Es ist zu vermuten, dass diese hohe submikroskopische KM-Beteiligung auch im KM-Ausstrich sichtbar bzw. mit der morphologisch bestimmten Blastenzahl assoziiert ist. Jedoch zeigen die in Tabelle 20 dargestellten quantitativen Werte der submikroskopischen KM-Beteiligung und der im KM ausgezählten Leukämiezellen dieser 10 Patienten keine Korrelation. Ähnliches beobachteten Neale et al., die bei einem Patienten mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung von 10^{-1} morphologisch keine Leukämiezellen nachweisen konnten.⁷⁸

Eine mögliche Ursache hierfür stellt die morphologische Sensitivitätsgrenze der Lichtmikroskopie von 5 % dar, die zur Ermittlung der Blastenzahl verwendet wird.^{59,60} Dies entspricht 5 Leukämiezellen in 100 ausgezählten Zellen im KM-Ausstrich. In der von uns untersuchten Kohorte hatten nur 6 Patienten mit IEM-Rezidiv eine submikroskopische KM-Beteiligung von 5×10^{-2} oder mehr. Auch eine Korrelation der submikroskopischen KM-Beteiligung dieser 6 Patienten mit der Blastenzahl zeigte keine eindeutige Assoziation. Weiterhin erfährt die zur DNA-Isolation verwendete KM-Probe eine Art Konzentrierung durch den Ficoll-Dichtegradienten, mit dem die mononukleären Zellen isoliert werden: das Ausmaß der Erhöhung durch die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation ist unbekannt. Es wird angenommen, dass sie geringer als eine log-Stufe ist. Somit ist ein Vergleich zwischen der mikroskopisch bestimmten Blastenzahl im KM-Ausstrich und der gemessenen submikroskopischen KM-Beteiligung in der mittels Ficoll-Dichtegradienten isolierten DNA nicht genau durchführbar. Deshalb wäre zu erwarten, dass alle morphologisch positiven KM-Proben ein positives RQ-PCR Ergebnis haben, umgekehrt aber nicht alle RQ-PCR positiven KM-Proben ein positives morphologisches Ergebnis zeigen müssen. In der Gruppe der Patienten mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ (18/64) wurden in den dazugehörigen KM-Austrichen in zweidrittel der Fälle auch Leukämiezellen identifiziert; leider lagen nur bei 6 von 18 Patienten die Angabe der Blastenzahl im KM vor. Dieses Ergebnis ist als falsch-positiver Nachweis von Leukämiezellen im Mikroskop zu interpretieren und unterstreicht die Sensitivitätsgrenze der Lichtmikroskopie unterhalb der kein spezifischer Nachweis von Leukämiezellen mehr möglich ist.

Auch die Tatsache, dass für die morphologischen und die molekularbiologischen Untersuchungen unterschiedliche Spritzen mit KM-Material verwendet werden, kann zu Unterschieden in der morphologischen und DNA-basierten Untersuchung beitragen. Für die Morphologie werden die ersten bei einer KM-Punktion gewonnenen KM-Tropfen verwendet, im Gegensatz dazu bekommen die molekularbiologischen Forschungslabore KM aus einer der folgenden angezogenen Spritzen, womöglich auch von einer anderen Punktionsstelle.

5.2 Submikroskopische Knochenmarkbeteiligung und Prognose

Diese Arbeit konnte die Relevanz, Bedeutung und prognostische Signifikanz der KM-Beteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose bei Patienten mit IEM-Rezidiven in der uni- und multivariaten Analyse zeigen. Der Grenzwert von 10^{-4} trennt die untersuchten Patienten in zwei Gruppen mit signifikant unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten ein Folgerezidiv zu erleiden. Die pEFS in den zwei Gruppen sind jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Ursächlich sind wahrscheinlich zum einen die kleine Patientenzahl, zum anderen der Einschluss der zwei Non-responder in die Analyse.

Betrachtet man die ZNS-Rezidive und die sehr frühen und frühen Rezidive separat, so finden sich hier nach Auftrennung entsprechend dem Grenzwert von 10^{-4} jeweils zwei Gruppen mit signifikant unterschiedlicher Prognose (signifikant unterschiedliche pEFS und kumulative Inzidenz eines Folgerezidivs). Eine solche Auftrennung konnte bei den Testis-Rezidiven nicht festgestellt werden. Dies kann zum einen auf die kleine Patientenzahl ($n = 21$) zurückzuführen sein. Zum anderen setzt sich die Gruppe der Testis-Rezidive zu 52 % (11/21) aus späten Rezidiven zusammen, in denen dieser Zusammenhang, wie in Abschnitt 4.5.3 gezeigt, nicht zu sehen ist. An dieser Stelle wird erneut deutlich, wie wichtig die Fortsetzung dieser Arbeit im Rahmen einer prospektiven Studie ist, um die Patientenzahlen insgesamt und in Subgruppen zu erhöhen und um weitere statistische Aussagen auch in Subgruppen durchführen zu können.

In der univariaten Analyse ist die untersuchte Variable (submikroskopische KM-Beteiligung) nicht mit den bekannten klinisch prognostischen Parametern (Rezidivzeitpunkt, Immunphänotyp) assoziiert. Eine Korrelation zwischen den klinischen Parametern Alter bzw. Geschlecht und submikroskopischer KM-Beteiligung konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 11). Auch zwischen dem Ort des extramedullären Befalls (ZNS, Testis, Sonstiges) und der submikroskopischen KM-Beteiligung besteht kein Zusammenhang. Die Untersuchung der Korrelation zwischen der Erstbehandlung bzw. der Rezidivtherapie und der submikroskopischen KM-Beteiligung zeigte bis auf das Rezidivprotokoll keine Korrelation (siehe Tabelle 12). Der Anteil von Patienten, die gemäß dem französischen Rezidivprotokoll COOPRALL behandelt wurden (16/64), ist in der Gruppe mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ deutlich höher (44 %) als in der $\geq 10^{-4}$ -Gruppe (17 %). Die wahrscheinlichste Ursache ist eine Selektion, bedingt durch die Analyse von KM-Proben entsprechend der Verfügbarkeit.

Die signifikante Assoziation der submikroskopischen KM-Beteiligung mit der kumulativen Inzidenz eines Folgerezidivs sowie in Subgruppen mit der pEFS bei nicht vorhandener Assoziation der submikroskopischen KM-Beteiligung mit bekannten klinisch prognostischen Parametern lässt vermuten, dass die submikroskopische KM-Beteiligung ein unabhängiger prognostischer Marker ist. Jedoch zeigt die multivariate Analyse, die die Faktoren Geschlecht, Alter bei Rezi-

divdiagnose, Immunphänotyp, Zeitpunkt und Ort des Rezidivs, submikroskopische KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose, Ersterkrankungstherapie, Rezidivtherapie und SZT einschloss, dass neben der submikroskopischen KM-Beteiligung auch der Immunphänotyp, der extramedulläre Ort und das Alter bei Rezidivdiagnose prognostische Faktoren sind. Die prognostische Bedeutung von Immunphänotyp, extramedullärem Ort und Alter bei Rezidivdiagnose sind stärker als die der submikroskopischen KM-Beteiligung (siehe Tabelle 17). Trotzdem zeigt die multivariate Analyse die Bedeutung der submikroskopischen KM-Beteiligung auf die Prognose bei Kindern mit einem IEM-Rezidiv.

Die vorausgegangenen Studien waren überwiegend aufgrund der sehr geringen Patientenzahlen nicht in der Lage, die submikroskopische KM-Beteiligung mit klinischen Faktoren und der Prognose zu korrelieren.^{38,77-79} Es gibt jedoch zwei Arbeiten von Uckun et al., in denen leukämische Vorläuferzellen im KM bei Rezidivdiagnose bei Kindern mit IEM-Rezidiv mit der Methode des Kolonieassays bestimmt wurden und die Bedeutung dieser Zellen auf die Prognose untersucht wurde.¹²² Er konnte ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Menge der nachgewiesenen leukämischen Vorläuferzellen und dem Rezidivort, dem Rezidivzeitpunkt, dem Alter, der peripheren Blastenzahl und dem Immunphänotyp feststellen. Aber auch seine Studien basierten auf geringen Patientenzahlen (31 B-ALL-Patienten und 15 T-ALL-Patienten).^{80,81}

5.3 Neudefinition von isoliert extramedullären und kombinierten Rezidiven

Sollten IEM-Rezidive mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung größergleich 10^{-4} neu definiert werden?

Die bisherige Unterscheidung zwischen kombinierten und isolierten extramedullären Rezidiven basiert auf dem lichtmikroskopisch bestimmten Niveau von Leukämiezellen im KM; bei $\geq 5\%$ Leukämiezellen im KM und zusätzlicher extramedullärer Beteiligung spricht man von einem kombinierten Rezidiv. Die Grenze von $\geq 5\%$ (Nachweis von mindestens 5 Leukämiezellen in einhundert ausgezählten Zellen) entspricht genau der Nachweisgrenze der Lichtmikroskopie. Im Gegensatz dazu erreicht die RQ-PCR durch die Verwendung von klonalen TZR- und Ig-Genumlagerungen als spezifischen Marker für die Leukämiezellen eine tausendfach höhere Auflösung. Eine viel genauere und sensitivere Diagnostik der KM-Beteiligung und damit des IEM-Rezidivs ist deshalb möglich. Auf der Basis der methodischen Möglichkeiten und des Nachweises der prognostischen Bedeutung der neuen Nachweisgrenze (10^{-4} in mononukleären Zellen) wäre es folgerichtig über eine neue Definition der IEM-Rezidive nachzudenken.

Nach Bestätigung der Daten dieser Arbeit durch eine prospektive Studie würden wir die Einführung der Quantifizierung der submikroskopischen KM-Beteiligung in die Routine-Diagnostik bei

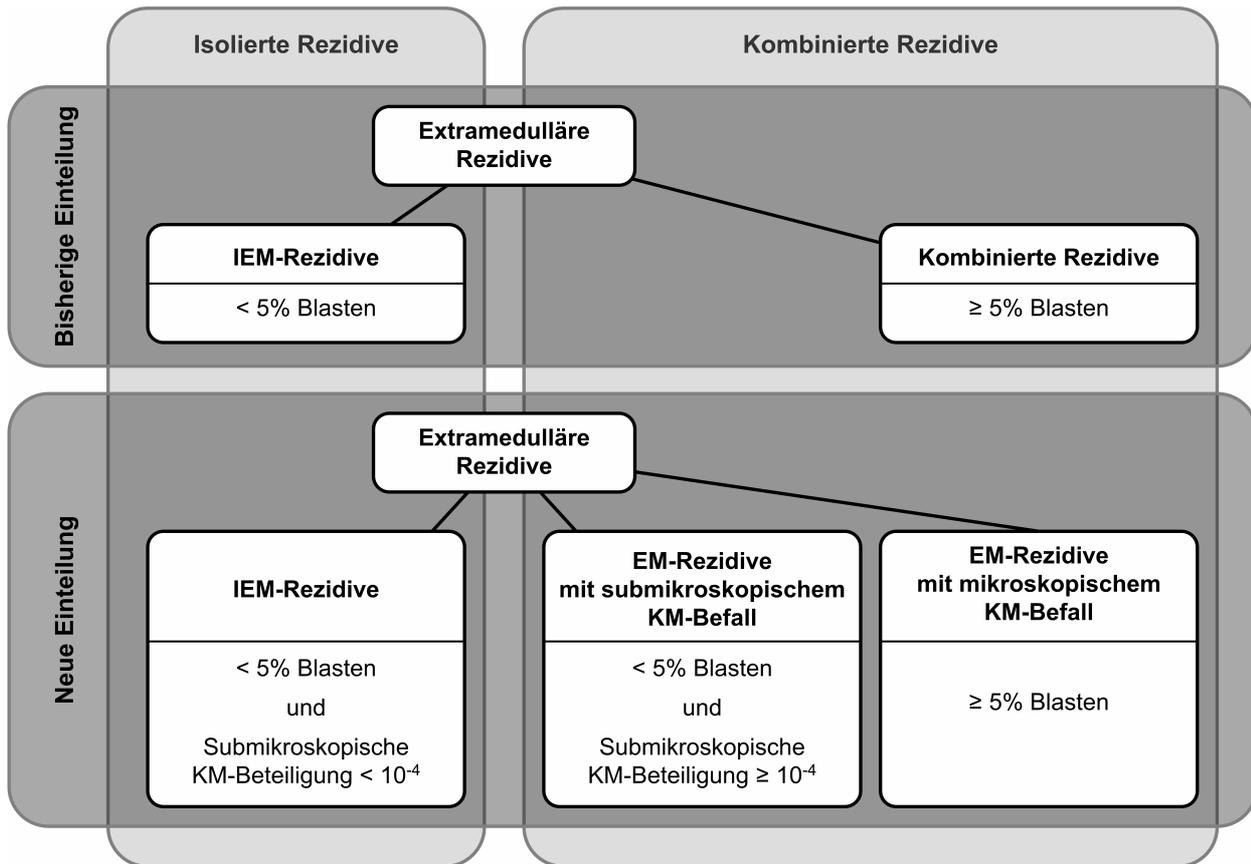


Abbildung 19: Bisherige Einteilung extramedullärer Rezidive in zwei Gruppen (oben) und Vorschlag zur Einteilung in drei Gruppen unter Berücksichtigung der submikroskopischen KM-Beteiligung (unten).

extramedullären Rezidiven mit weniger als 5 % Leukämiezellen im KM-Ausstrich vorschlagen. Zur zuverlässigeren Beurteilung der KM-Beteiligung sollte die Diagnostik eines IEM-Rezidivs eine Kombination aus Lichtmikroskopie und höher auflösenden Methoden, wie zum Beispiel RQ-PCR, sein.

Durch die sensitive Quantifizierung der submikroskopischen KM-Beteiligung könnten Rezidive mit extramedullärer Beteiligung in drei statt bisher zwei Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 19):

1. *IEM-Rezidiv*: extramedulläres Rezidiv mit einer KM-Beteiligung < 5 % und einer submikroskopischen KM-Beteiligung < 10⁻⁴
2. *Extramedulläres Rezidiv mit submikroskopischen KM-Befall*: extramedulläres Rezidiv mit einer KM-Beteiligung < 5 % und einer submikroskopischen KM-Beteiligung ≥ 10⁻⁴
3. *Extramedulläres Rezidiv mit mikroskopischen KM-Befall*: extramedulläres Rezidiv mit einer KM-Beteiligung ≥ 5 %

Die signifikant unterschiedliche Prognose von „neuen“ IEM-Rezidiven und „neuen extramedullären Rezidiven mit submikroskopischem KM-Befall“ konnte in dieser retrospektiven Studie gezeigt werden. Ob sich die Gruppe der „neuen extramedullären Rezidive mit submikroskopi-

schem KM-Befall“ von der Gruppe der „neuen extramedullären Rezidive mit mikroskopischem KM-Befall“ hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit signifikant unterscheiden, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Somit ist dieser Vorschlag der Unterteilung der „neuen“ kombinierten Rezidive noch zu klären.

Gibt es wahre IEM-Rezidive, ohne mikroskopischen und submikroskopischen Nachweis von Leukämiezellen im KM?

Auch wenn die TZR-/Ig-RQ-PCR tausendfach sensitiver als die Zytomorphologie ist, besitzt auch diese Methode eine Nachweisgrenze: Eine KM-Beteiligung unterhalb von 10^{-4} bzw. 10^{-5} ist möglich. Patienten mit einem extramedullären Rezidiv und einer KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ („neue“ IEM-Rezidive) scheinen eine bessere Prognose zu haben als Patienten mit extramedulläre Rezidiv und KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$. Es bleibt zu klären – was jedoch mit den derzeitigen Methoden nicht möglich ist – ob die Gruppe $< 10^{-4}$ eine sehr geringe oder keine KM-Beteiligung besitzt und ob die bessere Prognose in dieser Gruppe mit unterschiedlichen pathophysiologischen Prozessen zu erklären ist oder ob die KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ lediglich durch die zeitigere Diagnosestellung verursacht wird.

5.4 Neue Stratifizierung der isoliert extramedullären Rezidive

Wie bereits in Abschnitt 1.2.4 dargestellt, erhalten Patienten mit einem IEM-Rezidiv ebenso wie Patienten mit einem kombinierten oder isolierten KM-Rezidiv, neben einer Lokalthherapie auch eine systemische Chemotherapie.^{6,8,30,45} Die Empfehlungen für die SZT bei IEM-Rezidiven sind in den verschiedenen Studien sehr uneinheitlich.^{29,46,123}

In den Rezidivprotokollen der ALL-REZ BFM-Studie werden Patienten mit einem IEM-Rezidiv seit der Studie ALL-REZ BFM 96 nur nach dem Prognosefaktor Rezidivzeitpunkt stratifiziert. Patienten mit einem späten Rezidiv erhalten eine weniger intensive und lange Therapie im Vergleich zu Patienten mit einem sehr frühen oder frühen Rezidiv.²⁹

Die schlechte Prognose in den Gruppen mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$, im Besonderen aber in der Gruppe der ZNS-Rezidive und der Gruppe der sehr frühen und frühen Rezidive, deutet auf eine unzureichende Therapie hin. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass das bisher genutzte Stratifizierungskriterium Rezidivzeitpunkt eventuell allein nicht ausreichend ist. Im Falle einer Bestätigung der Daten durch eine große prospektive Studie, könnte die submikroskopische KM-Beteiligung als zusätzliches Stratifizierungskriterium zur Therapiesteuerung benutzt werden.

Bei Überlegungen für mögliche Therapieveränderungen anhand der submikroskopischen KM-Beteiligung muss berücksichtigt werden, dass die Diagnostik vom Eingang des Materials in dem Labor bis zur Befunderstellung durchschnittlich 28 Tage dauert. Die Ursache für diese lange

Dauer liegt im notwendigen erneuten Markerscreening im extramedullären Material, um eine klonale Evolution und falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Das bedeutet, dass eine Stratifizierung anhand der submikroskopischen KM-Beteiligung erst nach der Induktionstherapie, d.h. erst circa 4 Wochen nach Diagnosestellung, möglich ist.

Eine mögliche Stratifizierung nach der Induktionstherapie könnte wie folgt aussehen:

- Variante A: Da die submikroskopische KM-Beteiligung nur bei sehr frühen und frühen Rezidiven trennt, könnte eine erweiterte Stratifizierung in der Gruppe der sehr frühen und frühen Rezidive sinnvoll sein. Diese könnte folgendermaßen aussehen: Empfehlung für eine allogene SZT bei submikroskopischer KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$; Fortführung der systemische Polychemotherapie und Lokalthherapie bei submikroskopischer KM-Beteiligung $< 10^{-4}$.¹²³
- Variante B: Da sich in der untersuchten Gruppe der sehr frühen und frühen Rezidive (S2) zu 75 % ZNS-Rezidive befinden, was auch der Vergleichsgruppe entspricht, wäre eine weitere Möglichkeit, die neue Stratifizierung nur auf die sehr frühen und frühen ZNS-Rezidive anzuwenden. Für diese Gruppe gibt es in der ALL-REZ BFM-Studie 2002 bereits eine Unterteilung in Hochrisiko(HR)-ZNS-Rezidive und Standardrisiko(SR)-ZNS-Rezidive (siehe Abschnitt 1.2.3). Abhängig von der multivariaten Analyse könnte die submikroskopische KM-Beteiligung ergänzend zu Alter, Geschlecht und Immunphänotyp oder sogar anstelle dieser drei klinischen Faktoren zur Stratifizierung in HR-ZNS- und SR-ZNS-Patienten dienen. Diese Frage soll durch eine detaillierte Subgruppenanalyse, die erst nach Erhöhung der Patientenzahl möglich ist, in der prospektiven Studie geklärt werden.

Eine Therapiereduktion für IEM-Rezidive mit submikroskopischer KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ ist nicht empfehlenswert, da KM-Befall $< 10^{-4}$ mit den derzeitigen Methoden nicht auszuschließen ist.

5.5 Ort des Folgerezidivs

Wie in Abschnitt 4.5 belegt, lässt sich das Auftreten eines Folgerezidivs in der Gruppe der IEM-Rezidive vor allem bei Patienten mit einem IEM-ZNS-Rezidiv mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhersagen. Bei IEM-ZNS-Rezidiven mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose beträgt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Folgerezidivs 82 %, in der Gesamtgruppe von IEM-Rezidiven 65 %. Die Reduktion der submikroskopischen KM-Beteiligung im Therapieverlauf könnte ein weiterer Parameter zur Abschätzung des Folgerezidivrisikos sein. Dies soll in der sich anschließenden prospektiven Studie geklärt werden.

Ausgehend von diesem Ergebnis wurde in dieser Arbeit die Frage bearbeitet, ob neben der Vorhersagekraft für ein Folgerezidiv auch der Ort des Folgerezidivs mit der submikroskopischen KM-Beteiligung assoziiert ist. Die geringe Anzahl von Patienten in unserer Studie erlaubt keine definitiven Schlussfolgerungen in Subgruppen. Dennoch scheint eine hohe submikroskopische KM-Beteiligung ($\geq 10^{-3}$) bei Rezidivdiagnose mit einer hohen Rate an Folgerezidiven im KM assoziiert zu sein (Tabelle 19). Allerdings führt eine hohe submikroskopische KM-Beteiligung nicht bei allen Patienten zu Folgerezidiven im KM. Interessanterweise ist das Auftreten von extramedullären Folgerezidiven in dieser Patientengruppe nicht von der submikroskopischen KM-Beteiligung abhängig. Dies unterstützt die Vermutung, dass die systemische Therapie im extramedullären Kompartiment eine limitierte Wirksamkeit besitzt und dass das Folgerezidiv im extramedullären Organ von lokalen biologischen Konditionen abhängt.

5.6 Beitrag zur Pathogenese von extramedullären Rezidiven

Die erhobenen Daten zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der submikroskopischen KM-Beteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose und der Prognose in der Gruppe der sehr frühen und frühen Rezidive. Diese Korrelation konnte bei späten Rezidiven nicht gefunden werden. Erklären lässt sich diese Beobachtung durch unterschiedliche biologische Mechanismen bei sehr frühen und frühen Rezidiven im Vergleich zu späten Rezidiven.

Wir nehmen an, dass *späte Rezidive* mit extramedullärer Beteiligung von einem Zellklon stammen, der sich bereits vor Beginn der Initialtherapie an einem geschützten extramedullären Ort verstecken konnte und somit im nicht-proliferierenden Ruhezustand der Polychemotherapie nicht ausgesetzt wurde. Wie in der Einleitung dieser Arbeit dargestellt (siehe Abschnitt 1.6), wird vermutet, dass die Leukämiezellen das KM vor oder kurz nach der initialen Diagnose der Leukämie verlassen. Monate nach der Initialtherapie wandern die Zellen zurück ins KM, besiedeln es erneut und verursachen bei spät gestellter Diagnose ein kombiniertes Rezidiv und bei früherer Diagnosestellung ein IEM-Rezidiv mit submikroskopischer KM-Beteiligung.

Diese Hypothese wird teilweise durch Ergebnisse von Lal et al. gestützt, die bei Patienten mit Testis-Rezidiv Leukämiezellen im KM und im Testis, zum einen am Ende der Initialtherapie und zum anderen zum Zeitpunkt der Testis-Rezidivdiagnose, bestimmten.³⁸ Von den 4 Patienten mit spätem IEM-Testis-Rezidiv, waren 3 am Ende der Initialtherapie im KM und beiden Testes MRD negativ, zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose war jedoch eine submikroskopische KM-Beteiligung nachweisbar. Der Nachweis einer hohen Leukämiezelllast im Hoden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des IEM-Testis-Rezidivs und der minimale Leukämiezellnachweis im KM, lässt vermuten, dass das Rezidiv seinen Ursprung im Testis hatte. Der vierte Patient hatte am Ende der Initialtherapie sowohl einen histologisch (nicht klinisch) befallenen Hoden als auch ein positives MRD-Ergebnis im KM und in beiden Hoden. Neben den 4 IEM-Testis-Rezidiven schloss die

Studie von Lal et al. auch einen Patienten mit spätem kombinierten Testis-Rezidiv ein, der am Ende der Initialtherapie keine MRD-Last im KM, jedoch Leukämierestzellen im Hoden aufwies. Dies macht eine Rückbesiedlung des KM wahrscheinlich.

Nach unserer Annahme nehmen späte Rezidive mit extramedullärer Beteiligung ihren Ursprung im extramedullären Organ. Die Leukämiezellen, die sich während der Erstbehandlung im extramedullären Organ mit funktioneller Schranke versteckten, sprechen gut auf die Rezidivtherapie an, auch wenn im KM eine größere Anzahl von Tumorzellen vorhanden ist. Durch den von den Leukämiezellen angenommenen nicht-proliferierenden Ruhezustand waren die Leukämiezellen während der initialen Therapie weniger angreifbar. Dies könnte eine mögliche Erklärung sein, warum mit der submikroskopischen KM-Beteiligung in der Gruppe der späten IEM-Rezidive keine Auftrennung mit unterschiedlicher Prognose vorgenommen werden kann. Diese Deutung der Ergebnisse wird durch Beobachtungen der Vorläuferstudien unterstützt, die zeigen, dass Patienten mit einem kombinierten KM-Rezidiv eine bessere Prognose haben als Patienten mit einem isolierten KM-Rezidiv, deren Leukämiezellen während der Initialtherapie teilweise resistent gegenüber Chemotherapeutika geworden sind.^{12,124}

Wir vermuten, dass *sehr frühe und frühe Rezidive* mit extramedullärer Beteiligung aus resistenten Zellen entstehen, die während oder kurz nach der Initialtherapie das KM verlassen und ein oder mehrere extramedulläre Organe besiedeln oder schon bei Initialdiagnose in ein extramedulläres Organ ausgewandert sind und dort weiter proliferieren. Die Menge der Leukämiezellen im KM ist ein Maß für die Resistenz und die Aggressivität der Leukämie. Dies könnte die Erklärung liefern, warum die submikroskopische KM-Beteiligung die sehr frühen und frühen Rezidive in eine Gruppe mit guter (pEFS $< 10^{-4} = 0,67$) und eine mit schlechter Prognose (pEFS $\geq 10^{-4} = 0,11$; p[LogRank] = 0,016) unterteilt.

Ob es sich bei einem Patienten mit der Leukämie im extramedullären Organ um ein kombiniertes oder IEM-Rezidiv handelt, hängt eventuell auch vom Zeitpunkt der Diagnosestellung ab.

5.7 Problem der Materialsammlung

Die größte Einschränkung dieser Studie war die Verfügbarkeit der benötigten Patientenproben in ausreichender Menge und Qualität. Bei Patienten mit einem IEM-Rezidiv wurde in den vergangenen Studien in der Regel keine molekulargenetische Diagnostik im von der Leukämie diagnostisch sichtbar befallenen extramedullären Organ durchgeführt. Dies führte dazu, dass bei der Diagnose eines extramedullären Befalls und im Verlauf der Therapie häufig nur KM und Blut für die morphologische Diagnostik abgenommen wurden, aber nicht für molekulargenetische Untersuchungen. In den älteren ALL-REZ BFM-Studien war es in den Kliniken überwiegend noch nicht etabliert, neben dem KM auch ausreichend Liquor, Testis- oder anderes befall-

lenes Gewebe für molekulargenetische Untersuchungen zu entnehmen, entsprechend vorzubereiten und in unser Labor zu senden.

Da die Idee für diese Studie während bzw. nach Beendigung der Studien ALL-REZ BFM 1985-96 entstand, als noch kein KM und extramedulläres Material von Kindern mit IEM-Rezidiv systematisch angefordert wurde, konnte nur von einer begrenzten Zahl von Kindern mit IEM-Rezidiv auf asserviertes KM, Blut und extramedulläres Gewebe in unserem Labor zurückgegriffen werden. In dieser Arbeit sollte erstmalig retrospektiv, mit den vorhandenen Proben gearbeitet werden. Nach erster großer Datenabfrage rechneten wir mit ca. 65 zu analysierenden Patienten von insgesamt 165 IEM-Rezidiven in der oben genannten Beobachtungszeit. Nach Abschluss sämtlicher Analysen konnten wir insgesamt 39 Patienten (24 % der im Zeitraum registrierten IEM-Patienten) in unsere Auswertungen einschließen. Die Ursachen für den Ausschluss dieser 26 Patienten waren:

- eine zu geringe DNA-Menge für die komplette Analyse (extramedulläres Kompartiment oder KM)
- unzureichende DNA-Qualität aufgrund der zu geringen Zellzahl für die Isolation (überwiegend bei Liquorproben)
- Stabilität der initialen Marker konnte nicht bestätigt werden, da die extramedulläre Probe fehlte
- initiale Marker waren zum Rezidivzeitpunkt nicht mehr stabil; für ein neues Markerscreening im extramedullären Gewebe reichte die Probe nicht aus
- Auswertungsergebnisse entsprachen nicht den Richtlinien der *European Study Group on MRD detection*

Die Tatsache, dass bei vielen Patienten mit ZNS-Rezidiv nicht ausreichend Liquor bzw. Liquor-DNA zur Verfügung stand, ist auch bei Verbesserung der Logistik in der bereits prospektiv laufenden Studie nicht in allen Fällen zu beheben. Die Zellen im Liquor sind sehr empfindlich und sterben in der Regel innerhalb eines Tages, der Materialversand gelingt in vielen Fällen jedoch nicht in so kurzer Zeit. Desweiteren ist die Abnahme von Liquor nur begrenzt möglich, was es erschwert die erforderliche Zellzahl zu erreichen.

Das Ansprechen der submikroskopischen KM-Beteiligung auf die Therapie, durch Messung von KM-Kontrollen im Therapieverlauf, wurde nur in Einzelfällen untersucht. Diese Daten sind in dieser Arbeit nicht gezeigt. In der Folgestudie wird diese Analyse bereits systematisch durchgeführt.

Um in der sich anschließenden Studie die Materialsammlung zu vereinfachen und zu vereinheitlichen und somit die einzuschließende Patientenzahl zu erhöhen, wurde vor einigen Jahren von

Frau Dr. C. Eckert und Frau Dr. H. Cavé ein Protokoll zur Materialsammlung und richtigen Materialaufarbeitung von extramedullären Proben verfasst: *Minimal residual disease in children with isolated extramedullary relapse of acute lymphoblastic leukaemia: Protocol for material collection, DNA-preparation from extramedullary leukaemic blasts, MRD quantification – European Research network on childhood relapsed ALL (EUREAL, unveröffentlicht)*. Dieses Protokoll wurde an Labore und Kliniken verschickt, die an dieser retrospektiven Studie teilgenommen haben bzw. an der folgenden prospektiven Studie teilnehmen werden. Es beinhaltet neben den Einschlusskriterien und Zielen der Studie, genaue Vorgehensweisen und Arbeitsstrategien auf dem Weg der Quantifizierung bei unzureichendem Material. Detailliert sind die Anforderungen bezüglich der Markerstabilität, der Menge der einzelnen Materialien und der Entnahme- bzw. Punktionszeitpunkte dargestellt. Im letzten Abschnitt des Protokolls befinden sich die einzelnen Arbeitsschritte für die DNA-Isolierung aus den verschiedenen Gewebearten.

5.8 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Patienten mit einem IEM-Rezidiv bei Vorhandensein von $\geq 10^{-4}$ Leukämiezellen im KM zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose eine signifikant schlechtere Überlebenschance haben als bei einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$. Dies zeigte sich besonders deutlich in den Subgruppen der sehr frühen und frühen IEM-Rezidive und bei IEM-ZNS-Rezidiven. Diese Studie wurde retrospektiv durchgeführt. Daher konnten Patienten nur entsprechend der Verfügbarkeit von Material eingeschlossen werden. Ein Selektion-Bias kann nicht ausgeschlossen werden.

Um die Gültigkeit der vorgestellten Ergebnisse zu prüfen, werden im Rahmen einer von der Madeleine Schickedanz KinderKrebs-Stiftung geförderten internationalen Studie die Untersuchungen nunmehr prospektiv durchgeführt und die Daten der unterschiedlichen Labore in einer gemeinsamen Datenbank gebündelt und später mit den klinischen Daten korreliert. Die Studie mit dem Titel „*Isoliert extramedulläre ALL Rezidive und submikroskopische Knochenmarkbeteiligung: Ist eine neue Definition des isoliert extramedullären Rezidivs erforderlich? Ist die sensitive Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie im Knochenmark sinnvoll?*“ will durch die Bestätigung der vorgestellten Daten und durch die Bearbeitung angelegener erweiterter Fragestellungen langfristig dazu beitragen, die Prognose der Kinder mit einem IEM-ALL-Rezidiv zu verbessern.

Aus den Ergebnissen dieser Vorstudie und der damit verbundenen intensiven Auseinandersetzung mit der Gruppe der IEM-Rezidive ergeben sich folgende Ziele und Fragestellungen:

Ziele

- Durchführung einer prospektiven Studie, die fortlaufend alle Patienten mit IEM-Rezidiv online einschließt
- Erhöhung der Patientenzahl
- Internationale Ausweitung der Studie, d.h. Einschluss weiterer Länder
- Weitere Verbesserung und Etablierung der Zusendung von extramedullärem Material und KM/Blut bei Kindern mit IEM-Rezidiv
- Weiterer internationaler Austausch über methodische und technische Optimierungen und über die Standardisierung der Messung der submikroskopischen KM-Beteiligung bei IEM-Rezidiven
- Vergleich der klonalen Marker zwischen Ersterkrankung und Erstrezidiv (nachweisbar im extramedullären Material)
- Bestimmung der submikroskopischen KM-Beteiligung im Therapieverlauf
- Statistisch valide und verlässliche Auswertungen zur Bedeutung der submikroskopischen KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose und im Therapieverlauf sowie der Prüfung der Assoziation mit klinischen Faktoren und der Prognose

Fragestellungen

- Ist die submikroskopische KM-Beteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose mit der Prognose assoziiert? Ist diese ein abhängiger oder unabhängiger Faktor? Welche anderen klinischen Faktoren sind relevant?
- Ist die Messung der submikroskopischen KM-Beteiligung zu verschiedenen Zeitpunkten während der Therapie in der Gruppe der IEM-Rezidive ein geeigneter Parameter zur Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem quantitativen Wert der submikroskopischen KM-Beteiligung und dem Ort des Folgerezidivs?
- Unterscheiden sich die TZR-/Ig-Genumlagerungssequenzen zwischen den im KM nachgewiesenen Zellen und denen im extramedullären Organ?
- Welche klinische Konsequenz muss aus der eventuell prospektiv bestätigten prognostischen Relevanz der submikroskopischen KM-Beteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose gezogen werden?

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde in einer retrospektiven Studie erstmals systematisch das Vorhandensein von Leukämiezellen im Knochenmark (KM) zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose bei Kindern mit einem isoliert extramedullärem (IEM)-Rezidiv einer ALL mittels sensitiver Real-time quantitativer PCR (RQ-PCR) unterhalb der mikroskopischen Nachweisgrenze überprüft. Die Menge der quantifizierten Leukämiezellen (submikroskopische KM-Beteiligung) wurde erstmals mit der Prognose assoziiert.

Eine submikroskopische KM-Beteiligung zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose konnte bei 72 % (46/64) der untersuchten Patienten nachgewiesen werden. Die Höhe der submikroskopischen KM-Beteiligung ist sehr variabel. Quantitative Werte zwischen 1×10^{-4} und 2×10^{-1} wurden ermittelt. Patienten mit einem ZNS-Rezidiv zeigen signifikant höhere submikroskopische KM-Beteiligungen als Patienten mit einem Testis-Rezidiv ($p = 0,029$).

Ein Zusammenhang zwischen der submikroskopischen KM-Beteiligung und relevanten klinischen Parametern sowie der durchgeführten Therapien besteht nicht.

Die submikroskopische KM-Beteiligung in der Gruppe der IEM-Rezidive hat sich als neuer prognostischer Marker herausgestellt. In der Gesamtgruppe der IEM-Rezidive ist die Wahrscheinlichkeit ein Folgerezidiv zu erleiden (p_{CumInc}) bei Patienten mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ signifikant geringer als bei Patienten mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ ($p_{\text{CumInc}}[< 10^{-4}] = 0,24 \pm 0,01$; $p_{\text{CumInc}}[\geq 10^{-4}] = 0,65 \pm 0,01$; $p[\text{Gray}] = 0,012$). Die Wahrscheinlichkeiten für ein ereignisfreies Überleben (p_{EFS}) unterscheiden sich nicht signifikant. In den Subgruppen der IEM-ZNS-Rezidive und der sehr frühen und frühen Rezidive konnte die prognostische Bedeutung der submikroskopischen KM-Beteiligung besonders deutlich gezeigt werden. In der Subgruppe der IEM-ZNS-Rezidive beträgt die p_{EFS} bei Patienten mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ 63 % ($\text{SE} \pm 0,17$) versus 11 % ($\text{SE} \pm 0,09$) bei Patienten mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ ($p[\text{Log-Rank}] = 0,053$). Die p_{CumInc} eines Folgerezidivs beträgt in der Gruppe $< 10^{-4}$ 13 % ($\text{SE} \pm 0,00$) und in der Gruppe $\geq 10^{-4}$ 82 % ($\text{SE} \pm 0,02$) ($p[\text{Gray}] = 0,006$). In der Subgruppe der sehr frühen und frühen IEM-Rezidive beträgt die p_{EFS} bei Patienten mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$ 67 % ($\text{SE} \pm 0,14$) versus 11 % ($\text{SE} \pm 0,09$) bei Patienten mit einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$ ($p[\text{Log-Rank}] = 0,016$). Die p_{CumInc} eines Folgerezidivs beträgt in der Gruppe $< 10^{-4}$ 17 % ($\text{SE} \pm 0,12$) und in der Gruppe $\geq 10^{-4}$ 85 % ($\text{SE} \pm 0,11$).

(p[Gray]= 0,015). Im Gegensatz dazu konnte die prognostische Bedeutung in der Subgruppe der IEM-Testis-Rezidive und der Subgruppe der späten Rezidive nicht nachgewiesen werden.

Die multivariate Analyse, die die Faktoren Geschlecht, Alter bei Rezidivdiagnose, Immunphänotyp, Zeitpunkt und Ort des Rezidivs, submikroskopische KM-Beteiligung bei Rezidivdiagnose, Ersterkrankungstherapie, Rezidivtherapie und SZT einschließt, zeigt, dass neben der submikroskopischen KM-Beteiligung auch das Alter bei Rezidivdiagnose, der Immunphänotyp und der extramedulläre Ort des Rezidivs prognostische Faktoren sind.

Die Studie zeigt, dass mit Hilfe der RQ-PCR eine sensitivere und genauere Diagnostik der KM-Beteiligung und damit der IEM-Rezidive möglich ist. Nach einer Bestätigung der prognostischen Bedeutung der neuen Nachweisgrenze von 10^{-4} empfehlen wir über eine neue Definition der IEM-Rezidive nachzudenken. Die Quantifizierung der submikroskopischen KM-Beteiligung würde Rezidive mit extramedullärer Beteiligung in drei statt bisher zwei Gruppen einteilen:

1. *IEM-Rezidiv*: extramedulläres Rezidiv mit einer KM-Beteiligung $< 5\%$ und einer submikroskopischen KM-Beteiligung $< 10^{-4}$
2. *Extramedulläres Rezidiv mit submikroskopischen KM-Befall*: extramedulläres Rezidiv mit einer KM-Beteiligung $< 5\%$ und einer submikroskopischen KM-Beteiligung $\geq 10^{-4}$
3. *Extramedulläres Rezidiv mit mikroskopischen KM-Befall*: extramedulläres Rezidiv mit einer KM-Beteiligung $\geq 5\%$

Weiterhin liefern die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise zum besseren Verstehen der Biologie von ZNS- und Testis-Rezidiven sowie der unterschiedlichen Pathogenese von sehr frühen und frühen im Vergleich zu späten Rezidiven.

Da IEM-Rezidive nur bei einem geringen Anteil von Patienten mit ALL-Rezidiv auftreten, wurde die Studie in einer internationalen Kooperation im Rahmen des *Resistant Disease Committee of the International BFM-Study Group* durchgeführt.

Auf der Basis dieser ersten Daten wurden im vergangenen Jahr (2008) weitere internationale Kooperationspartner eingeladen, an einer großen prospektiven Studie teilzunehmen, die von Berlin aus koordiniert wird. Ziel ist es, die ersten Ergebnisse zu bestätigen und ausreichend hohe Patientenzahlen für Subgruppen-Analysen zu gewährleisten.

Literatur

1. Kaatsch P. Jahresbericht 2006/2007. Deutsches Kinderkrebsregister. 2008.
2. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371:1030-1043..
3. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006;354:166-178..
4. Schrappe M, Camitta B, Pui CH, et al. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000;14:2193-2194..
5. 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;78:1166-1172.
6. Wheeler K, Richards S, Bailey C, Chessells J. Comparison of bone marrow transplant and chemotherapy for relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia: the MRC UKALL X experience. Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. *Br J Haematol*. 1998;101:94-103.
7. Chessells JM. Relapsed lymphoblastic leukaemia in children: a continuing challenge. *Br J Haematol*. 1998;102:423-438.
8. 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;82:1387-1395.
9. Henze G, von Stackelberg A. Treatment of Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Pui CH, ed. *Treatment of Acute Leukemias. New Directions for Clinical Research*. Memphis: Humana Press; 2002.
10. Chessells JM, Leiper AD, Richards SM. A second course of treatment for childhood acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up is needed to assess results. *Br J Haematol*. 1994;86:48-54..
11. Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R, et al. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87. *J Clin Oncol*. 2005;23:7942-7950.
12. 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;21:470-476..
13. Stass S, Mirro J, Melvin S, Pui CH, Murphy SB, Williams D. Lineage switch in acute leukemia. *Blood*. 1984;64:701-706..
14. van Wering ER, Beishuizen A, Roeffen ET, et al. Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1995;9:1523-1533..
15. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;9:1783-1786.
16. Henze G, Fengler R, Hartmann R, et al. Chemotherapy for bone marrow relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24:S16-19..
17. Beyermann B, Adams HP, Henze G. Philadelphia chromosome in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: a matched-pair analysis. Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. *J Clin Oncol*. 1997;15:2231-2237.
18. 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;91:1716-1722.
19. Seeger K, Stackelberg AV, Taube T, et al. Relapse of TEL-AML1--positive acute lymphoblastic leukemia in childhood: a matched-pair analysis. *J Clin Oncol*. 2001;19:3188-3193..
20. Buehner C, Hartmann R, Fengler R, et al. Peripheral blast counts at diagnosis of late isolated bone marrow relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia predict response to salvage chemotherapy and outcome. *J Clin Oncol*. 1996;14:2812-2817.
21. 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;81:602-609..

22. Chessells JM, Bailey C, Richards SM. Intensification of treatment and survival in all children with lymphoblastic leukaemia: results of UK Medical Research Council trial UKALL X. Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. *Lancet*. 1995;345:143-148..
23. Eckert C, Biondi A, Seeger K, et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2001;358:1239-1241.
24. Henze G, Fengler R, Hartmann R. Chemotherapy for relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: Results of the BFM Study Group. *Haematol Blood Transfus*. 1994;36:374-379.
25. Murray JC, Gmoser DJ, Barnes DA, et al. Isolated bone relapse during hematologic remission in childhood acute lymphoblastic leukemia: report of a metatarsal relapse and review of the literature. *Med Pediatr Oncol*. 1994;23:153-157..
26. Millot F, Klossek JM, Brizard F, et al. Recurrence of childhood acute lymphoblastic leukemia presenting as a tumor of the middle ear: a case report. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1997;19:351-353..
27. Dix DB, Anderson RA, McFadden DE, Wadsworth LD. Pleural relapse during hematopoietic remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1997;19:470-472..
28. Pui CH, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol*. 2008;9:257-268..
29. Henze G. ALL-REZ BFM 2002, Protokoll zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie. .
30. Schroeder H, Garwicz S, Kristinsson J, Siimes MA, Wesenberg F, Gustafsson G. Outcome after first relapse in children with acute lymphoblastic leukemia: a population-based study of 315 patients from the Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO). *Med Pediatr Oncol*. 1995;25:372-378.
31. Aur RJ, Simone J, Hustu HO, et al. Central nervous system therapy and combination chemotherapy of childhood lymphocytic leukemia. *Blood*. 1971;37:272-281..
32. Bleyer WA. Central nervous system leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 1988;35:789-814..
33. Evans AE, Gilbert ES, Zandstra R. The increasing incidence of central nervous system leukemia in children. (Children's Cancer Study Group A). *Cancer*. 1970;26:404-409..
34. Henze G. Chemotherapy for Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 1998;5 (2-4):199-213.
35. Eckert C, Einsiedel HG, Hartmann R, et al. Clonal stability of initial leukemia in a child with central nervous system relapse 7.4 years after bone marrow relapse of common acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2004;89:ECR23..
36. Schweinle JE, Alperin JB. Central nervous system recurrence ten years after remission of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 1980;45:16-18..
37. Jahnukainen K, Salmi TT, Kristinsson J, Muller J, Madsen B, Gustafsson G. The clinical indications for identical pathogenesis of isolated and non-isolated testicular relapses in acute lymphoblastic leukaemia. *Acta Paediatr*. 1998;87:638-643..
38. Lal A, Kwan E, al-Mahr M, et al. Molecular detection of acute lymphoblastic leukaemia in boys with testicular relapse. *Mol Pathol*. 1998;51:277-281.
39. van Schewick C, von Stackelberg A, Schrappe M, Escherich G, Reiter A, Henze G. Other extramedullary localizations in relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia (abstract). SIOP, Berlin. 2008.
40. von Stackelberg A, Hartmann R, Ritter J, et al. Male gender as an independent adverse risk factor for children with isolated CNS relapse of ALL (abstract). Israeli-German Bi-National Conference: Current Concepts in Pediatrics Hematology-Oncology. 1999;Abstract Volume 21.
41. Bleyer WA, Sather H, Hammond GD. Prognosis and treatment after relapse of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma: 1985. A report from the Childrens Cancer Study Group. *Cancer*. 1986;58:590-594..
42. von Stackelberg A, Tabien U, van Schewick C, Schrappe M, Escherich G, Henze G. Bilateral involvement is an important prognostic factor in isolated testicular relapse of childhood ALL (abstract). SIOP, Berlin. 2008.
43. Chiesa R. Preliminary data on S1-S2 patients treated with the ongoing AIEOP ALL Relapse Protocol (presentation). Resistant Disease Group, Meeting, Noordwijkerhout. 2006.
44. Vilmer E, Suci S, Ferster A, et al. Long-term results of three randomized trials (58831, 58832, 58881) in childhood acute lymphoblastic leukemia: a CLCG-EORTC report. *Children Leukemia Cooperative Group. Leukemia*. 2000;14:2257-2266.
45. Lawson SE, Harrison G, Richards S, et al. The UK experience in treating relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia: a report on the medical research council UKALLR1 study. *Br J Haematol*. 2000;108:531-543..

46. Messina C, Valsecchi MG, Arico M, et al. Autologous bone marrow transplantation for treatment of isolated central nervous system relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. AIEOP/FONOP-TMO group. Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica. Bone Marrow Transplant. 1998;21:9-14.
47. Land VJ, Thomas PR, Boyett JM, et al. Comparison of maintenance treatment regimens for first central nervous system relapse in children with acute lymphocytic leukemia. A Pediatric Oncology Group study. Cancer. 1985;56:81-87..
48. Ribeiro RC, Rivera GK, Hudson M, et al. An intensive re-treatment protocol for children with an isolated CNS relapse of acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 1995;13:333-338..
49. Winick NJ, Smith SD, Shuster J, et al. Treatment of CNS relapse in children with acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group study. J Clin Oncol. 1993;11:271-278..
50. Castillo LA, Craft AW, Kernahan J, Evans RG, Aynsley-Green A. Gonadal function after 12-Gy testicular irradiation in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Med Pediatr Oncol. 1990;18:185-189..
51. Nachman J, Palmer NF, Sather HN, et al. Open-wedge testicular biopsy in childhood acute lymphoblastic leukemia after two years of maintenance therapy: diagnostic accuracy and influence on outcome--a report from Children's Cancer Study Group. Blood. 1990;75:1051-1055..
52. Wofford MM, Smith SD, Shuster JJ, et al. Treatment of occult or late overt testicular relapse in children with acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. J Clin Oncol. 1992;10:624-630..
53. Buchanan GR, Boyett JM, Pollock BH, et al. Improved treatment results in boys with overt testicular relapse during or shortly after initial therapy for acute lymphoblastic leukemia. A Pediatric Oncology group study. Cancer. 1991;68:48-55..
54. Atkinson K, Thomas PR, Peckham MJ, McElwain TJ. Radiosensitivity of the acute leukaemic infiltrate. Eur J Cancer. 1976;12:535-540..
55. Grundy RG, Leiper AD, Stanhope R, Chessells JM. Survival and endocrine outcome after testicular relapse in acute lymphoblastic leukaemia. Arch Dis Child. 1997;76:190-196..
56. Brecher ML, Weinberg V, Boyett JM, et al. Intermediate dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia resulting in decreased incidence of testicular relapse. Cancer. 1986;58:1024-1028..
57. Freeman AI, Weinberg V, Brecher ML, et al. Comparison of intermediate-dose methotrexate with cranial irradiation for the post-induction treatment of acute lymphocytic leukemia in children. N Engl J Med. 1983;308:477-484..
58. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol. 1976;33:451-458.
59. Haworth C, Hopleston AD, Morris Jones PH, Campbell RH, Evans DI, Palmer MK. Routine bone marrow examination in the management of acute lymphoblastic leukaemia of childhood. J Clin Pathol. 1981;34:483-485.
60. Rogers PC, Bleyer WA, Coccia P, et al. Yield of unpredicted bone-marrow relapse diagnosed by routine marrow aspiration in children with acute lymphoblastic leukaemia. A report from the Children's Cancer Study Group. Lancet. 1984;1:1320-1322.
61. Szczepanski T, Orfao A, van-der-Velden VH, San-Miguel JF, van-Dongen JJ. Minimal residual disease in leukaemia patients. Lancet Oncol. 2001;2:409-417.
62. Szczepanski T, Flohr T, van der Velden VH, Bartram CR, van Dongen JJ. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol. 2002;15:37-57.
63. Szczepanski T. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Department of Immunology. Rotterdam: Erasmus University Rotterdam; 2002:13-48.
64. Szczepanski T, Willemse M, van Wering E, van Weerden J, Kamps W, van Dongen J. Precursor-B-ALL with D(H)-J(H) gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. Leukemia. 2001;15:1415-1423.
65. Szczepanski T, Pongers-Willemse MJ, Langerak AW, et al. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. Blood. 1999;93:4079-4085.
66. Seriu T, Hansen-Hagge TE, Stark Y, Bartram CR. Immunoglobulin kappa gene rearrangements between the kappa deleting element and Jkappa recombination signal sequences in acute lymphoblastic leukemia and normal hematopoiesis. Leukemia. 2000;14:671-674.

67. van der Velden VH, de Bie M, van Wering ER, van Dongen JJ. Immunoglobulin light chain gene rearrangements in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia: characteristics and applicability for the detection of minimal residual disease. *Haematologica*. 2006;91:679-682. Epub 2006 Apr 2019..
68. Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willems MJ, et al. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999;13:196-205.
69. Szczepanski T, Langerak AW, Willems MJ, Wolvers-Tettero IL, van Wering ER, van Dongen JJ. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T cell acute lymphoblastic leukemia reflect 'end-stage' recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia*. 2000;14:1208-1214..
70. Seeger K, Taube T, Eckert C, Hanel C, Pogoda M, Henze G. Unusual T-cell receptor-delta gene rearrangement patterns revealed by screening of a large series of childhood acute lymphoblastic leukaemia by multiplex polymerase chain reaction. *Br J Haematol*. 2001;113:318-322..
71. Szczepanski T, van der Velden VH, Hoogeveen PG, et al. Vdelta2-Jalpha rearrangements are frequent in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia but rare in normal lymphoid cells. *Blood*. 2004;103:3798-3804. Epub 2003 Dec 3794.
72. van der Velden VH, Bruggemann M, Hoogeveen PG, et al. TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor-B-ALL: frequency, applicability as MRD-PCR target, and stability between diagnosis and relapse. *Leukemia*. 2004;18:1971-1980..
73. Bruggemann M, van der Velden VH, Raff T, et al. Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004;18:709-719..
74. Campana D, Coustan Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry*. 1999;38:139-152.
75. Macedo A, San Miguel JF, Vidriales MB, et al. Phenotypic changes in acute myeloid leukaemia: implications in the detection of minimal residual disease. *J Clin Pathol*. 1996;49:15-18..
76. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2001;97:2115-2120..
77. Goulden N, Langlands K, Steward C, et al. PCR assessment of bone marrow status in 'isolated' extramedullary relapse of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1994;87:282-285.
78. Neale GA, Pui CH, Mahmoud HH, et al. Molecular evidence for minimal residual bone marrow disease in children with 'isolated' extra-medullary relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1994;8:768-775.
79. O'Reilly J, Meyer B, Baker D, Herrmann R, Cannell P, Davies J. Correlation of bone marrow minimal residual disease and apparent isolated extramedullary relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 1995;9:624-627.
80. Uckun FM, Gaynon PS, Stram DO, et al. Paucity of leukemic progenitor cells in the bone marrow of pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients with an isolated extramedullary first relapse. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2415-2420..
81. Uckun FM, Gaynon PS, Stram DO, Sensel MG, Sarquis MB, Willoughby M. Bone marrow leukemic progenitor cell content in pediatric T-lineage acute lymphoblastic leukemia patients with an isolated extramedullary first relapse. *Leuk Lymphoma*. 2001;40:279-285..
82. Rebenko-Moll NM, Liu L, Cardona A, Ransohoff RM. Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:683-689. Epub 2006 Sep 2028..
83. Cario G, Izraeli S, Teichert A, et al. High interleukin-15 expression characterizes childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the CNS. *J Clin Oncol*. 2007;25:4813-4820..
84. Bradstock KF, Makrynikola V, Bianchi A, Shen W, Hewson J, Gottlieb DJ. Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers. *Leukemia*. 2000;14:882-888..
85. Bleyer WA. Biology and pathogenesis of CNS leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1989;11:57-63.
86. Mastrangelo R, Zuelzer WW, Ecklund PS, Thompson RI. Chromosomes in the spinal fluid: evidence for metastatic origin of meningeal leukemia. *Blood*. 1970;35:227-235..
87. Ganick DJ, Sondel PM, Gilbert EF, Borchering W. Leukemia presenting as central nervous disease without bone marrow involvement. *Med Pediatr Oncol*. 1983;11:229-232..
88. Levine GA, Winkelstein A, Shaddock RK. CNS involvement as the initial manifestation of acute leukemia. *Cancer*. 1973;31:959-962..

89. Price R, Johnson W. The central nervous system and childhood leukemia. I. The arachnoid. *Cancer* 1973;31:530-533.
90. West RJ, Graham-Pole J, Hardisty RM, Pike MC. Factors in pathogenesis of central-nervous-system leukaemia. *Br Med J.* 1972;3:311-314..
91. Thomas LB. Pathology of leukemia in the brain and meninges: postmortem studies of patients with acute leukemia and of mice given inoculations of L1210 leukemia. *Cancer Res.* 1965;25:1555-1571..
92. Kuo AH, Yataganas X, Galicich JH, Fried J, Clarkson BD. Proliferative kinetics of central nervous system (CNS) leukemia. *Cancer.* 1975;36:232-239..
93. Tsuchiya J, Moteki M, Shimano S, et al. Proliferative kinetics of the leukemic cells in meningeal leukemia. *Cancer.* 1978;42:1255-1262..
94. Tsukada M, Komiyama A, Akabane T. Scanning electron microscopic study on central nervous system leukemia in children. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi.* 1979;42:635-640..
95. Radich J, Thomson B. Advances in the detection of minimal residual disease. *Curr Opin Hematol.* 1997;4:242-247..
96. Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:31-50..
97. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol.* 1976;Suppl:9-15..
98. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1989;Cold Spring Harbour.
99. Taube T, Seeger K, Beyermann B, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of the most frequent T cell receptor-delta gene rearrangements in childhood ALL. *Leukemia.* 1997;11:1978-1982.
100. Peter A, Eckert C, Hanel C, Taube T, Henze G, Seeger K. Improved Multiplex PCR for simultaneous detection of TCR-gamma gene rearrangements in childhood ALL. *manuskript in preparation.*..
101. Pongers Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia.* 1999;13:110-118.
102. Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1972;269:192-200..
103. Bottaro M, Berti E, Biondi A, Migone N, Crosti L. Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood.* 1994;83:3271-3278.
104. Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia.* 1997;11:2192-2199.
105. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74:5463-5467..
106. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986-994.
107. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia.* 2003;17:1013-1034..
108. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:8790-8794..
109. Livak K, Flood S, Marmaro J, Giustu W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications.* 1995;4:357-362.
110. Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, et al. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2000;14:1426-1435.
111. Eckert C, Landt O. Real-time PCR to detect minimal residual disease in childhood ALL. *Methods Mol Med.* 2004;91:175-182.
112. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a micro-volume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* 1997;22:176-181.
113. Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer, C, Nakagawara, K, ed. *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications.* Heidelberg: Springer Press; 2001:21-34.

114. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21:604-611. Epub 2007 Feb 2008..
115. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-481.
116. Breslow N. Comparison of survival curves. In: Buyse ME, Staquet MJ, Sylvester RJ eds. *Cancer clinical trials: methods and practice*. Oxford, England: Oxford University Press; 1984.
117. Gray RJ. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *The annals of statistics*. 1988;16:1141-1154.
118. Kalbfleisch JD, Prentice. *The Statistical Analysis of Failure Time Data*. New York: Wiley; 1980:168-189.
119. Cox D. Regression models and life tables. *J R Soc Stat [B]*. 1972;34:187-220.
120. Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, van-Wering ER, van-der-Burg M, van-Dongen JJ. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood*. 2002;99:2315-2323.
121. Szczepanski T, van der Velden VH, Raff T, et al. Comparative analysis of T-cell receptor gene rearrangements at diagnosis and relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T-ALL. *Leukemia*. 2003;17:2149-2156..
122. Uckun FM, Stork L, Seibel N, et al. Residual bone marrow leukemic progenitor cell burden after induction chemotherapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2000;6:3123-3130.
123. Yoshihara T, Morimoto A, Kuroda H, et al. Allogeneic stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia after isolated central nervous system relapse: our experiences and review of the literature. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37:25-31.
124. Chessells JM, Veys P, Kempinski H, et al. Long-term follow-up of relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;123:396-405..

Lebenslauf

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

Wissenschaftliche Beiträge im Rahmen der Doktorarbeit

Veröffentlichungen im Rahmen der Doktorarbeit

Eckert C, Einsiedel HG, Hartmann R, von Stackelberg A, Völpel S, Guggemos A, **Hanzsch N**, Kawan L, Seeger K, Henze G. Clonal stability of initial leukemia in a child with central nervous system relapse 7.4 years after bone marrow relapse of common acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2004 Jul;89(7):ECR23.

Hagedorn N, Acquaviva C, Fronkova E, von Stackelberg A, Barth A, zur Stadt U, Schrauder A, Trka J, Gaspar N, Seeger K, Henze G, Cavé H, Eckert C. Submicroscopic bone marrow involvement in isolated extramedullary relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia: a more precise definition of "isolated" and its possible clinical implications, a collaborative study of the Resistant Disease Committee of the International BFM study group. *Blood*. 2007 Dec 1;110(12):4022-9.

Kongressbeiträge im Rahmen der Doktorarbeit

Hanzsch N, Eckert C, Seeger K, zur Stadt U, Schrauder A, Henze G, von Stackelberg A. Quantitative evaluation of MRD in the bone marrow of children with first isolated extramedullary relapse of ALL. 4th Biennial Hannover Symposium on Childhood Leukemia Congress Centrum Celle, Celle, May 3-5, (2004).

Hanzsch N, Eckert C, Seeger K, zur Stadt U, Schrauder U, Henze G, von Stackelberg A. Minimal Residual Disease in the bone marrow of children with isolated extramedullary relapse of ALL. *Klin Pädiatr* (2004).

Hanzsch N, Eckert C, Acquaviva C, Fronkova E, von Stackelberg A, zur Stadt U, Schrauder A, Trka J, Seeger K, Henze G, Cavé H. Prognostic impact of MRD in the bone marrow of children at first isolated extramedullary relapse of ALL, *ASH* (2004).

Eckert C, **Hagedorn N**, Cavé H, Stackelberg v A. Standardised evaluation of MRD in the bone marrow at diagnosis and during salvage treatment in children with isolated extramedullary relapse of ALL: A European co-operative protocol of the international BFM Study Group. *GPOH* (2004).

Eckert C, **Hagedorn N**, Stackelberg v A, Henze G. Neue Ergebnisse und Erkenntnisse der MRD-Messungen bei Kindern mit ALL-Rezidiv – ALL-REZ BFM 2002, GPOH (2008).

Eckert C, **Hagedorn N**, Stackelberg v A, Seeger K, Henze G. Current results of the ongoing minimal residual disease study on patients with first relapse of acute lymphoblastic leukemia treated within the ALL-REZ BFM 2002 trial, SIOP (2008).

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Günter Henze und unserem Laborleiter Herrn Dr. Dr. Karl Seeger für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit im Rahmen der ALL-REZ BFM-Studie in ihrer Arbeitsgruppe durchgeführt haben zu können. Beide haben mich mit Interesse, fachlichem Rat und nicht zuletzt Geduld bei der Durchführung und Niederschrift der Promotionsarbeit unterstützt.

Mein größter Dank gilt Frau Dr. Cornelia Eckert für die hervorragende und wunderbare Betreuung während der gesamten Zeit meines Promotionsvorhabens. Ich danke ihr für die Überlassung der Fragestellung, die Hilfe bei der Einarbeitung in die MRD-Thematik, die Einführung in die MRD-Gemeinde und die gemeinsame Publikationsarbeit. Ich danke ihr für fachlichen Rat und konstruktive Kritik, für motivierende Worte und besonders für die vielen bereichernden Gespräche in freundschaftlicher Vertrautheit.

Weiterhin bedanke ich mich bei den vielen anderen, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben:

Andrea Barth und Dr. Arend von Stackelberg für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Claudia Hanel, Silke Hollmann und Wilhelmine Keune für Hilfe und Ratschläge bei der praktischen Durchführung der Analysen.

Andrea Kretschmann für die schnelle Bereitstellung klinischer Informationen.

Dr. André Schrauder und Dr. Udo zur Stadt für die Bereitstellung von Patienten-Proben und MRD-Markern aus den ALL-BFM- und COALL-Studien.

Dr. Hélène Cavé, Prof. Dr. Jan Trka und Dr. Eva Fronkova für die Bereitstellung von Datensätzen und den intensiven Austausch bei der Veröffentlichung dieser Daten.

Den vielen Mitarbeitern in den vielen Kliniken, die uns im Rahmen der ALL-REZ BFM-Studien Patientenproben zur Verfügung gestellt haben.

Der Deutschen Kinderkrebsstiftung für die finanzielle Förderung dieser Analysen im Rahmen der ALL-REZ BFM-Studie.

Nicht zuletzt bedanke ich mich ganz besonders bei meiner Familie und meinem Mann.

Erklärung

„Ich, Nikola Hagedorn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema *Submikroskopische Knochenmarkbeteiligung bei Kindern mit einem isoliert extramedullären Rezidiv der akuten lymphoblastischen Leukämie* 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