

Aus der Klinik für Pädiatrie m.S. Onkologie/Hämatologie

Otto-Heubner-Centrum für Kinder und Jugendmedizin

der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Klonale Verwandtschaft leukämischer Zellen aus Hoden und Knochenmark bei Kindern mit
kombiniertem testikulären Rezidiv der akuten lymphoblastischen Leukämie

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Nils C. G. Waldhüter

aus Marburg

Datum der Promotion: 27.02.2015

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Seeger

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Gruhn

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Metzler

*Εἰ δέ, ἦν δ' ἐγώ, ἐντεῦθεν ἔλκοι τις αὐτὸν βία
διὰ τραχείας τῆς ἀναβάσεως καὶ ἀνάντους,
καὶ μὴ ἀνεῖη πρὶν ἐξελκύσειεν εἰς τὸ τοῦ ἡλίου φῶς,
ἄρα οὐχὶ ὀδυνᾶσθαι τε ἂν καὶ ἀγανακτεῖν.*

Πλάτων, πολιτεία

Abstrakt

Trotz deutlicher Verbesserung der Therapie in den letzten vier Jahrzehnten erleiden zirka 20% der Kinder ein Rezidiv der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL). Jeder zweite Junge, der an einem extramedullären Rezidiv erkrankt, erleidet dabei eine Hodenbeteiligung. Aus der notwendigen Radikalität der Therapie (Orchiektomie, Radiatio und Chemotherapie) ergibt sich die Aufgabe, die zugrunde liegende Pathophysiologie besser zu verstehen, um die Wiedererkrankung mit Hodenbeteiligung in Zukunft effektiver verhindern zu können. Diese Arbeit ist die erste molekulargenetische Untersuchung, die den klonalen Verwandtschaftsgrad leukämischer Zellen aus dem Hoden und dem Knochenmark (KM) zum Rezidivzeitpunkt erforscht. Der Vergleich wurde über die Analyse der Immunglobulin- (IG) und T-Zell-Rezeptor- (TCR) Genumlagerungen gezogen. Dazu wurde in den Leukämiezellen aus dem Hoden und dem KM nach den häufigsten Immungen-Umlagerungen in Standard-PCRs gescreent und nicht übereinstimmende Marker mittels Echt-Zeit-PCR und individuellen Primern quantifiziert. Auf diese Weise wurde ebenfalls mit allen verfügbaren DNA-Proben der Initialdiagnose verfahren. Es konnten 35 Probenpaare des kombinierten Rezidivs und in 17 Fällen zusätzlich das Material der Ersterkrankung analysiert werden. Alle untersuchten Patienten wurden nach dem ALL-REZ BFM 96 und 02 Therapieoptimierungsprotokoll behandelt. Es zeigte sich eine engere klonale Verwandtschaft zwischen Hoden und KM-Rezidiv als zwischen der Ersterkrankung und einem Rezidivorgan ($p < 0,05$). Auf Markerebene stimmten in den Proben des Rezidivs 77% (103/133) aller identifizierten IG- und TCR-Genumlagerungen überein. Dagegen waren es im Vergleich der Ersterkrankung mit dem KM-Rezidiv 55% (37/67), beziehungsweise im Vergleich der Ersterkrankung mit dem Hoden 65% (47/72). Aus den klinischen und molekulargenetischen Ergebnissen konnten zwei Hypothesen zur Entstehung eines kombinierten Hodenrezidivs hergeleitet werden: Die erste Hypothese folgert, dass eine prä-leukämische, häufig *TEL/AML-1* positive Stammzelle die Ersterkrankung verursachen und die Ersttherapie überdauernd aus dem Hoden heraus eine zweite, „neue“ Leukämie begründen könnte. Die zweite Hypothese sieht Subklone einer häufig oligoklonalen, aggressiven Ersterkrankung, die unter Selektionsdruck in den Hoden migrieren. Dort verändert sich die Dominanz einzelner Subklone, die ein frühes kombiniertes Hodenrezidive verursachen. Diese Ergebnisse legen den Grundstein für weitere Forschung, da erstmals gezeigt werden konnte, dass es sich nicht in allen Fällen eines kombinierten ALL-Hodenrezidivs im Kindesalter um den identischen Leukämie-Klon im Hoden und im beteiligten KM handelt. Trotzdem ist die Übereinstimmung der Immungenmarker zwischen Hoden und KM des Rezidivs bei den späten Rezidiven am höchsten, was einen nahen Verwandtschaftsgrad unterstreicht.

Abstract

Clonal relationship of leukemic cells derived from the testes and the bone marrow (BM) in children with testicular relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL)

Despite impressive improvements in the treatment of childhood ALL relapses occur in about 20% of patients. About half of male patients with an extramedullary disease show a testicular involvement of ALL. Fifty percent of these boys suffer from combined testicular relapse. Less is known about the mechanisms resulting in the preferential migration of leukemic cells into the testis.

In the present experiment we assessed the clonal relationship of leukemic blasts derived from the testes and the BM at relapse and the BM at initial diagnosis (ID) to learn more about the nature of leukemic cells migration into the testis. Our study included 35 boys with testicular involvement at relapse. In 17 cases material of the ID was available. All patients were included in the ALL-REZ BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) study protocols 96 or 02. Clonal immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor (TCR) gene rearrangements identified by PCR, Sanger sequencing and clone specific real-time PCR were used to describe clonal populations, their evolution and relationship.

Seventy-seven percent of Ig and TCR gene rearrangements were concordant in a major clone comparing blasts derived from the BM and the testis at relapse. However, only 55% of markers were identical when comparing BM at relapse with BM at ID and 65% comparing blasts derived from the relapsed testis with the BM at ID. Assessing Ig and TCR gene rearrangements the relation between the relapsed compartments can be described as closer than between ID and relapse. Furthermore, the relationship between ID and relapsed testis seems closer than between ID and relapsed BM.

Considering clinical aspects, we developed two hypotheses based on the molecular genetic findings: some combined testicular relapses may have their roots in a pre-leukemic, often *TEL/AML-1* positive stem cell which outlasts the treatment of first disease in the testes. A new second hit generates a new second leukemia that occurs in most cases more than six months after the first complete remission. But our findings show that in some patients subclones of an apparently more aggressive initial disease immigrate into the testes. These clones survived the initial treatment in the testes and may be responsible for mostly early relapses.

Our findings emphasize the heterogeneity of leukemic diseases and offer a great approach for continued research, for instance, on *TEL/AML-1* positive leukemic cells in the testis at ID or by Next Generation Sequencing.

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt (Deutsch)	004
Abstract (Englisch)	005
I Einleitung	
1 Akute lymphoblastische Leukämie	
1.1 ERSTERKRANKUNG	
1.1.1 <i>Definition und Inzidenz</i>	008
1.1.2 <i>Ätiopathogenese</i>	008
1.1.3 <i>Therapie und Prognose</i>	009
1.1.4 <i>Testikuläre Beteiligung</i>	011
1.2 REZIDIVERKRANKUNG	
1.2.1 <i>Definition, Inzidenz und Lokalisation</i>	012
1.2.2 <i>Testikuläres Rezidiv</i>	013
1.2.3 <i>Therapie und Prognose des testikulären Rezidivs</i>	014
2 Der menschliche Hoden	
2.1 ENTWICKLUNG UND PHYSIOLOGIE	016
2.2 PATHOHISTOLOGIE LEUKÄMISCHER INVASION IN DEN HODEN	017
3 Diversität, Klonalität und Evolution	
3.1 DIVERSITÄT DURCH IG- UND TCR-GENUMLAGERUNGEN	018
3.2 KLONALITÄT UND EVOLUTION	019
3.3 STABILITÄT DER IMMUNGEN-MARKER	020
II Aufgaben und Ziele der Arbeit	022
III Methodik	
1 Materialien	023
2 Methoden	
2.1 ALLGEMEINES VORGEHEN	026
2.2 SEPARATION MONONUKLEARER ZELLEN UND DNA-EXTRAKTION	
2.2.1 <i>Aus Knochenmarkpunktat</i>	026
2.2.2 <i>Aus Hodengewebe</i>	027
2.3 QUALITÄTSPRÜFUNG	029
2.4 SCREENING-PCR	029
2.5 GELELEKTROPHORESE	032

2.6 SEQUENZIERUNG	033
2.7 QUANTIFIZIERUNG	033
3 Patientenkollektiv und -proben	035
4 Statistik und Darstellung	036
IV Ergebnisse	
1 Verwendbarkeit von FFPE Hodenmaterial	
1.1 QUALITÄT DER FFPE DNA	037
1.2 SENSITIVITÄT DES STANDARD-SCREENINGS	040
1.3 EINSATZ DES FFPE HODENMATERIALS	044
2 Beschreibung des Patientenkollektives	046
3 Häufigkeit der Genumlagerungen	047
4 Ergebnisse des PCR-Screenings und der Echt-Zeit-Quantifizierung	050
5 Genumlagerungen der Leukämiezellen im Knochenmark und Hoden	063
6 Stabilität der Genumlagerungen im Krankheitsverlauf	069
7 Einteilung der Gruppen	072
V Diskussion	
1 Methodischer Ansatz	075
2 Frequenz der IG- und TCR-Genumlagerungen	078
3 Aussage der IG- und TCR-Genumlagerungsvergleiche	079
VI Abkürzungsverzeichnis	086
VII Abbildungsverzeichnis	087
VIII Literaturverzeichnis	089
IX Anhang	
Eidesstattliche Erklärung	102
Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	103
Lebenslauf	104
Danksagung	107

I Einleitung

1 Akute lymphoblastische Leukämie

1.1 ERSTERKRANKUNG

1.1.1 Definition und Inzidenz

Die akute Leukämie ist Folge einer malignen Entartung von Leukozyten beziehungsweise derer unreifer Vorläuferzellen. Diese führt durch Verdrängung der Erythropoese zu Anämie, der Thrombopoese zu Hämorrhagie und funktionsfähiger Leukozyten zu Immundefizienz. Unbehandelt versterben nahezu alle Patienten innerhalb weniger Wochen. Bei der akuten lymphoblastischen/lymphatischen Leukämie (ALL) kommt es zu einer klonalen und enthemmten Proliferation einer Zelle aus der lymphatischen Reihe.

Unter den Leukämien im Kindesalter ist die ALL mit in Deutschland jährlich zirka 550 neuerkrankten Kindern unter 15 Jahren nicht nur die bei weitem häufigste Krebserkrankung des blutbildenden Systems, sondern mit einem Anteil von 27,2% auch die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter überhaupt. Es entfallen 75-80% der Leukämieerkrankungen im Kindesalter auf die ALL [1-3]. Die jährliche Inzidenz der ALL liegt zwischen vier und fünf Erkrankungen auf 100.000 Kinder unter 15 Jahren. Eine leichte, jährliche Zunahme der Inzidenzzahlen in Deutschland und Europa von durchschnittlich 0,7% wird von manchen Autoren als echt beschrieben [1], andere sehen in dem Anstieg keine statistische Signifikanz [4]. Global ist die Inzidenz in westlichen Industriestaaten wie den Vereinigten Staaten von Amerika und den Ländern Europas höher als in Entwicklungs- und Schwellenländern [3, 5]. Die Relation von 1,2 Jungen zu 1,0 Mädchen zeigt eine Knabenwendigkeit der Erkrankung an. Unter Erwachsenen tritt die ALL sehr selten auf. Zirka 60% aller ALL-Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnose das 20. Lebensjahr noch nicht vollendet. Neben dem absoluten Altersgipfel zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahr bei der ALL im Kindesalter [6] steigt die Erkrankungswahrscheinlichkeit ab dem 50. Lebensjahr erneut an [7, 8].

1.1.2 Ätiopathogenese

Die detaillierten pathogenetischen Prozesse, die zur lymphatischen Leukämogenese führen, sind unbekannt. Epidemiologische Studien aus Großbritannien entwickelten die Hypothese, eine abnorme Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion führe zur Entartung einer Immunzelle. Dabei unterscheiden sich zwei Ansätze im Detail: Während eine Hypothese eine Verbindung zwischen der Durchmischung der Bevölkerung und Infektionskrankheiten (neue Erreger treffen

auf naives Immunsystem) zieht [9, 10], fokussiert sich eine zweite Hypothese auf die statistische Beobachtung, dass Kinder in individueller häuslicher Betreuung häufiger an einer Leukämie erkranken als in Gruppen betreute Kinder [11]. Zwar tritt die Erkrankung auch in Assoziation mit angeborenen Genmutationen wie Trisomie 21 oder Fanconi-Anämie [12, 13], Chromosomeninstabilitätssyndromen wie Ataxia teleangiectatica, Bloom-Syndrom oder Nijmegen-Breakage-Syndrom [14] sowie nach Exposition gegenüber erhöhter ionisierter Strahlung oder spezifischen Chemikalien wie Benzol und Chemotherapeutika wie Alkylanzien und Topoisomerase-II-Inhibitoren (Etoposid) [10] auf, doch waren nur 5% der neudiagnostizierten Patienten einem dieser Risikofaktoren ausgesetzt [3]. Zudem lässt die Vielzahl an chromosomalen und molekularen Veränderungen, die in dem Leukämiezellklon auftreten und diesen selber stark begrenzen, darauf schließen, dass es sich um erworbene und nicht angeborene zelluläre Fehlfunktionen handelt. Durch Zwillingsuntersuchungen ist es zudem gelungen zu zeigen, dass präleukämische Zellen schon in utero existieren [15]. Seit Anfang der 1990er Jahre steht dabei das Fusionsgen *TEL/AML-1* (*ETV6-RUNX1*, t(12;21)-Translokation) in der Diskussion [16, 17]. Es ist das häufigste Fusionsgen der kindlichen ALL mit einer Frequenz von 16-27% [18-21]. Nach Auswertung der ALL-REZ BFM 02 Studiengruppe hatten 16-18% der BPC-ALL-Patienten ein fusioniertes *TEL/AML-1* Gen. Es führt zur Bildung eines aberranten Fusionsproteins, dessen Rolle im Entartungsprozess noch nicht abschließend geklärt ist. Jedoch wurde in einer amerikanischen Untersuchung in Nabelschnurblut von zirka 1% aller gesunden Neugeborenen die t(12;21)-Translokation nachgewiesen [22]. Es lässt den Schluss zu, dass bei einem Teil der betroffenen Kinder einerseits schon pränatale Mutationen stattgefunden haben [23], postnatal andererseits weitere Mutationsereignisse, sogenannte Hits, zur Entstehung einer ALL jedoch notwendig sind [24]. Leukämie rezidive mit (12.21)-Translokation treten häufig spät auf und sind Chemotherapie sensitiver [3]. Dies ließ zusammen mit der Beobachtung, dass sich Deletionen des zweiten translokierten *TEL*-Allels in Initialdiagnose und Rezidiv unterscheiden, den Schluss zu, dass *TEL/AML-1*-Fusionsgen positive Rezidive nicht von einem therapieresistenten Blasten der Ersterkrankung, sondern von einer prä-leukämischen „Stammzelle“ abstammen. Als zweiter Hit käme die Translokation des zweiten *TEL*-Allels infrage [25, 26].

1.1.3 Therapie und Prognose

Noch Ende der 1970er Jahre galt die ALL als weitgehend unheilbar. 90% der Kinder starben innerhalb der ersten vier Jahre nach Diagnosestellung [27]. Aktuelle Studien verdeutlichen dagegen den dramatischen Fortschritt der letzten Jahrzehnte: 75-80% der Kinder mit einer

Diagnose der ALL bleiben langfristig in kompletter Remission (complete remission, CR) [28, 29].

Mitte des letzten Jahrhunderts waren es noch die Entdeckungen neuer chemischer, zytotoxischer Substanzen wie das von Sidney Farber 1947 erstmals angewandte Antifolat Aminopterin, die für die ersten Fortschritte in der Behandlung der ALL verantwortlich waren. Ab 1956 führten randomisierte Therapieoptimierungsstudien („chemotherapeutischer Prüfplan“) am „National Cancer Institute“ der USA durch Zytostatikakombinationen und Dosisanpassungen zu einer Lebenszeitverlängerung durch vorübergehende Remissionen [30]. Es folgte die Einführung einer gesonderten ZNS-Behandlung mittels intrathekaler Methotrexat-Gabe und Radiatio zur ZNS-Rezidiv-Prophylaxe. Seit 1981 werden erkrankte Kinder in Deutschland, Österreich und Teilen der Schweiz nach randomisierten, kontrollierten, ungeblindeten Therapieoptimierungsstudien der ALL BFM- (Berlin-Frankfurt-Münster-) Studiengruppe behandelt. Die Einteilung der Behandlung der Kinder nach Risikofaktoren und schließlich die seit Ende der 90er Jahre implementierte MRD-Diagnostik (MRD: minimal residual disease) haben zuletzt zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebenschancen geführt.

Heute wird in zirka 80% der Behandlungszentren Deutschlands und vielen Europas nach dem AIEOP-BFM ALL 2009 Therapieoptimierungsprotokoll risikoadaptiert behandelt.

Risikoadaption setzt eine möglichst exakte Beschreibung der individuellen Leukämieerkrankung voraus. Morphologische, zytochemische, immunologische und molekulargenetische Merkmale befähigen den Kliniker zu einer prognose- und therapieassoziierten Einteilung von ALL-Subtypen.

Unter zytomorphologischen Gesichtspunkten kommt nur dem Subtyp L3 der FAB-Klassifikation (FAB: French-American-British) eine prognostische Relevanz zu [31, 32]. Sie beschreibt eine akute Lymphoblastenleukämie mit großen Zellen und Vakuolen.

Unter Immunphänotypisierung versteht man die Zuordnung der Leukämie zu einer Zellreihe sowie zu deren Differenzierungsgrad. Monoklonale Antikörper markieren Expressionsmuster von Oberflächenantigenen, die typisch für das jeweilig arretierte Entwicklungsstadium sind. So werden die Leukämien aus der B-Zellreihe (BCP-ALL) weiter unterteilt in pro-B-ALL, common-ALL (c-ALL), prä-B-ALL und reife (mature) B-ALL. Analog dazu erfolgt die Einteilung der T-Zellreihe in pro-T-ALL, prä-T-ALL, kortikale T-ALL und reife T-ALL [33]. Heute haben Kinder, die an einer BCP-ALL erkranken, bessere Heilungschancen als Kinder mit

einer T-ALL. Unter den T-ALL kommt dem kortikalen Subtyp der T-ALL eine günstige Prognose zu [34].

Mehr als 200 mit Leukämie verbundene genetische Veränderungen sind heute bekannt [35]. Davon werden zahlreiche Mutationen stark assoziiert mit jeweilig einheitlichen, klinisch-biologischen Eigenschaften der Leukämie [36]. Dieses Wissen um die relevanten Chromosomenaberrationen hat in den letzten beiden Jahrzehnten bedeutend zugenommen und ist heute Teil vieler Stratifizierungen. Dabei zählt zu den prognostisch günstigen Veränderungen die Hyperdiploidität [37] und die t(12;21)-Translokation, das *TEL/AML-1* Fusionsgen. Eine ungünstige Prognose dagegen kommen dem *BCR-ABL* Fusionsgen (t(9;22)-Translokation, Philadelphia-Chromosom) [38], den Fusionsgenen *E2A/PBX1* (t(1;19)-Translokation) [39] und *MLL/AF4* [40] sowie der Hypodiploidität [41] zu. Hinzu kommen klinische Parameter, die den Therapiefad mitbestimmen: Eine hohe Leukämiezellmasse (hohe Leukozytenzahl im peripheren Blut, Hepatosplenomegalie, Mediastinaltumor) bei Diagnose, initialer ZNS-Befall, schlechtes Ansprechen auf Glukokortikoide (prednisone poor response), die minimale Resterkrankung (MRD) zu definierten Zeitpunkten und das Erkrankungsalter unter einem und über zehn Jahren sind prognostisch ungünstige Faktoren. Geschlechterspezifisch konnte neben der Knabenwendigkeit der ALL festgestellt werden, dass Jungen eine schlechtere Prognose als Mädchen haben [42].

1.1.4 Testikuläre Beteiligung

Hustu und Aur stellten 1978 nach Auswertung von post mortem Studien fest, dass zwischen 28% und 92% der Jungen an einer testikulären Infiltration mit Leukoblasten litten. Gleichzeitig wurde eine ovarielle Infiltration nur bei 11% bis 24% der Mädchen beobachtet [43]. Nachman et al. zeigten 1990 durch routinemäßige Hodenbiopsien an 708 Jungen, dass 10% der sich in Remission befindenden Patienten kurz vor Ende ihrer Erhaltungstherapie eine okkulte Hodeninfiltration durch Leukämiezellen aufweisen [44]. Diese Jungen hatten ein erhöhtes Risiko für Wiedererkrankung und Tod. Weiter publizierten sie Ergebnisse, wonach das Ereignisfreie Überleben (EFS) in den nächsten vier Jahren trotz zusätzlicher Therapie der okkulten testikulären Leukämien mit Vincristin, Prednisolon, L-Asparaginase, intrathekaler ZNS Methotrexat-Gabe und bilateraler testikulärer Radiatio mit 24 Gy bei 56% ($\pm 14\%$) lag und damit schlechter war als bei Jungen ohne bioptischen Nachweis der Infiltration ($78\% \pm 4\%$, $p < 0,01$). Auch zeigte sich kein verbessertes EFS dieser Patienten im Vergleich zu nicht zusätzlich behandelten Jungen mit positivem testikulären Biopsie-Befund. Unter den Jungen mit einer neudiagnostizierten ALL haben zirka 2% eine klinische Hodenbeteiligung (overt testicular

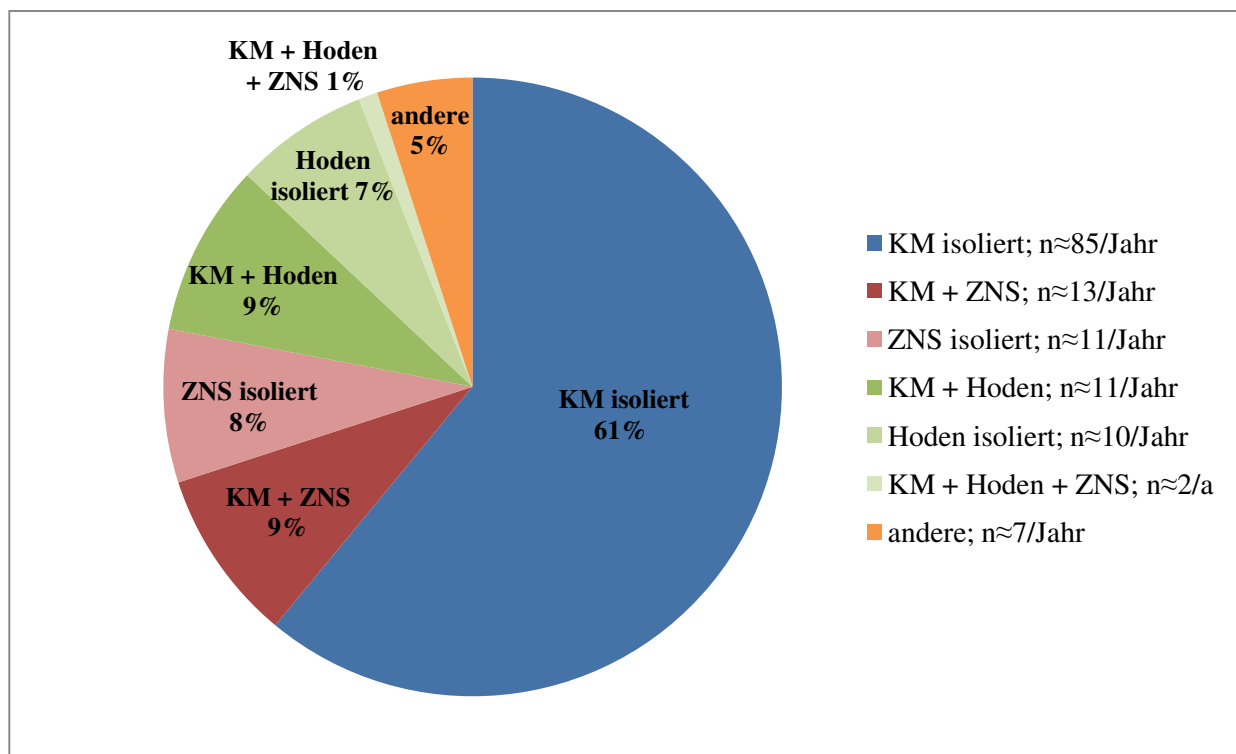
disease, OTD) bei der Ersterkrankung. Lange Zeit wurde angenommen, dass eine OTD einen negativen prognostischen Einfluss auf den Krankheitsverlauf habe [45, 46]. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass eine leukämische Hodeninfiltration bei der Initialdiagnose kein eigenständiger Risikofaktor ist und eine lokale Bestrahlung die Häufigkeit von Rezidiven nicht senken kann [47, 48].

1.2 REZIDIVERKRANKUNG

1.2.1 Definition, Inzidenz und Lokalisation

Trotz einer Heilungsrate der ALL bei Kindern von über 80% [3] bleibt die Entität der Wiedererkrankung (des Rezidivs) während oder nach abgeschlossener Therapie unter den fünf häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter [28]. Zirka 20% der Patienten entwickeln ein Rezidiv. Nach einer Analyse der ALL-REZ BFM-Studiengruppe von 2002 beträgt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit dieser wiedererkrankten Kinder 35%. Der Großteil der Rezidive tritt als isoliertes Knochenmarkrezidiv auf. Definitionsgemäß müssen dazu mindestens 25% Lymphoblasten im Knochenmark (KM) detektiert werden.

Abbildung 1: Lokalisation der ALL-Rezidive bei Jungen. In den meisten Fällen ist das Knochenmark (KM) isoliert betroffen. Betrachtet man nur Rezidive mit extramedullärer Beteiligung, so ist in knapp der Hälfte der Fälle der Hoden involviert. Die Fallzahlen rechts beziehen sich auf Rezidiverkrankungen pro Jahr in Deutschland [49].



Zirka 40% der Rezidive treten in extramedullären Organen auf. *Abbildung 1* zeigt die Verteilung der Rezidiv-Lokalisationen bei Jungen mit ALL. Es zeigt sich, dass als häufigstes Rezidiv mit extramedullärer Beteiligung das ZNS betroffen ist. Der Hoden folgt als das am zweithäufigsten involvierte, extramedulläre Organ [50]. In absoluten Zahlen wird deutlich, dass das Hodenrezidiv eine sehr seltene Erkrankung ist: Nach gezielter Auswertung der Studien ALL-REZ BFM 96 und 2002 erkrankten in Deutschland durchschnittlich zehn Jungen im Jahr an einem kombinierten Hodenrezidiv der ALL. Bemerkenswert ist, dass unter erwachsenen Patienten mit ALL die Hodenbeteiligung kaum eine Rolle spielt. Nur zirka 1% der Rezidive beim Mann gehen einher mit Infiltration des Hodens [51, 52].

1.2.2 Testikuläres Rezidiv

Das testikuläre Rezidiv wird klinisch als Schwellung eines oder beider Hoden auffällig und nach einer sonografischen Untersuchung durch histopathologischen Nachweis von Leukämiezellen im Biopat diagnostiziert. Bei einem Blastenanteil von unter 5% im KM handelt es sich definitionsgemäß um ein isoliertes Hodenrezidiv (ITR), bei einem Anteil von über 5% um ein kombiniertes Hodenrezidiv.

Aus historischer Sicht ist die Inzidenz der Hodenrezidive von 20% [53, 54] auf 10% in den letzten drei Jahrzehnten rückläufig [55]. Als Hauptgrund kann die eingeführte Methotrexat-Hochdosistherapie sowie eine Intensivierung der Initialtherapie angesehen werden [56].

Die Mechanismen, die den Hoden zu dem am dritthäufigsten betroffenen Kompartiment machen [43], sind bis heute unbekannt. Dazu finden sich seit mehreren Dekaden Hypothesen in der Literatur: 1. Die niedrigere Temperatur (siehe Kapitel II.2.) und Ausschüttung von Leukozyten supprimierenden Faktoren durch die Blut-Hoden-Schranke des Hodengewebes führe zu einer niedrigeren Stoffwechselaktivität und damit auch niedrigeren Proliferationsrate der Leukoblasten. Dadurch könnte die Wirkung von Zellzyklus abhängigen Chemotherapeutika abnehmen. 2. Das innere (prä-) pubertäre Milieu des Hodeninterstitiums fördere die Immigration der Blasten insbesondere durch Zytokine der Leydig-Zellen [57-59]. Ein Experiment an Ratten zeigte 1993, dass eine intraperitoneale Injektion von T-lymphoblastischen Leukämiezellen bei 100% der Ratten, die vor der Geschlechtsentwicklung standen, zu einer nachweisbaren Testesinfiltration führte. Bei reifen, fruchtbaren Rattenmännchen war dies bei 46% der Tiere der Fall [58]. Ferner treten Hodenrezidive auch bei Jungen mit der höchsten Frequenz im frühpubertären Alter zwischen zehn und zwölf Jahren auf [60].

Nach dieser klinischen Untersuchung von Jahnukainen et al. [60] ist kombinierten und isolierten Hodenrezidiven gemein, dass sie häufiger spät auftreten und eine bessere Prognose als Rezidive anderer Lokalisationen haben. Daraus schloss die finnische Arbeitsgruppe, dass kombinierten und isolierten Rezidiven eine gemeinsame Ätiopathogenese zugrunde liegt. Auch Henze und Jacobs zeigten, dass das späte Auftreten typisch für ein Rezidiv mit Hodenbeteiligung ist [50, 61]. Danach treten zirka 52% der isolierten Hodenrezidive spät auf, 34% intermediär und 14% früh. Im Vergleich dazu treten isolierte ZNS-Rezidive bei 13% der Erkrankten spät auf, 44% intermediär und 43% früh. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass sich die Definitionen der Rezidivzeitpunkte international unterscheiden. Amerikanische Arbeitsgruppen, wie die hier zitierte unter Leitung von James Jacobs [50], haben festgelegt, dass Rezidive innerhalb der ersten 18 Monate nach Beginn der Remission als frühe Rezidive, zwischen 18 und 35 Monaten nach Remission als intermediäre und nach 36 Monaten nach Remission als späte Rezidive eingestuft werden. In Europa - so auch in Studien der BFM-Gruppe - gelten Rezidive innerhalb von 18 Monaten nach der Initialdiagnose als sehr früh. Rezidive, die 18 Monaten nach Initialdiagnose und bis zu sechs Monate nach Ende der Ersttherapie auftreten, werden als frühe Rezidive klassifiziert. Späte Rezidive schließen sich jenen zeitlich an. Diese Arbeit folgt den Festlegungen der BFM-Gruppe.

Eine Posterpublikation von Dr. C. Eckert mit dem Titel „Testicular ALL relapses might derive from pre-leukaemic clone and not from resistant overt leukaemia“ [Hodenrezidive der ALL könnten von einem prä-leukämischen Klon und nicht von einer resistenten Leukämieerkrankung abstammen] analysierte die IG- und TCR-Genumlagerungen von elf Jungen, die an einem Hodenrezidiv wiedererkrankten. Darin stieß sie auf Markerunterschiede zwischen Hoden und KM des Rezidivs. Zudem stellte sie nach statistischer Auswertung der ALL-REZ BFM Studien 06 und 02 fest, dass der Anteil an *TEL/AML-1* Fusionsgen positiven Leukämien mit 42% signifikant höher ist als unter ALL-Rezidiven ohne Hodenbeteiligung [62]. Daraus leitete sie die im Postertitel bereits formulierte Hypothese ab.

1.2.3 Therapie und Prognose des testikulären Rezidivs

Isolierte wie kombinierte testikuläre ALL-Rezidive sind systemische Erkrankungen und erfordern eine systemische Polychemotherapie. Begründet wird diese Aussage mit der Beobachtung aus den 1980er Jahren, dass bei Jungen mit nur lokal bestrahlten Hodenrezidiven wenige Monate später ein KM-Rezidiv auftrat [63, 64]. Zudem haben Untersuchungen gezeigt, dass zum Zeitpunkt eines isolierten Hodenrezidivs leukämische Blasten in Leber, Milz und abdominalen Lymphknoten gefunden werden können [65]. Schon damals äußerten Fengler et al.

die Vermutung, Leukämiezellen könnten im Hoden die Ersttherapie „gleichsam überwintern“ und Urheber eines folgenden, systemischen Rezidivs sein [66]. Zehn Jahre später konnten Forscher mithilfe der MRD-Diagnostik leukämische Blasten auch im KM bei ITR nachweisen [67-69].

Die Rezidivtherapie verfolgt einen kurativen Ansatz. Dazu müssen die Entstehung eines zweiten Rezidivs einerseits und schwere, therapiebedingte Toxizitätsschäden mit lebensbedrohlichen Kurz- und Langzeitfolgen andererseits verhindert werden. Mit dem ALL-BFM REZ 95/96 Studienprotokoll wurden vier Stratifizierungsgruppen (S1-S4) eingeführt, nach denen Patienten mit einer risikoadaptierten Polychemotherapie und gegebenenfalls einer Radiatio geholfen werden kann. Rezidive mit testikulärer Beteiligung haben in den meisten Fällen eine günstige Prognose [60, 70, 71]. Der T-Zell-Immunphänotyp wirkt sich negativ aus und bedarf einer intensiveren Therapie. Je später das Rezidiv auftritt, desto besser ist die Prognose [72, 73]. Die Prognose variiert zwischen den Stratifizierungsgruppen erheblich: Erkrankte Kinder aus der Therapiegruppe S1 haben mit einem 5-Jahres-EFS von 75% die beste Prognose. Bei der Gruppe S2 sinkt es auf 45%. Für alle Patienten aus den Gruppen S3 und S4 sieht das Protokoll eine Stammzelltherapie vor. Jedoch erreichen nur 50-60% überhaupt eine Remission. 2008 analysierte Tabien Daten von 219 testikulären Rezidiven aus den ALL-BFM Studien von 1983 bis 2002 hinsichtlich der Geschlechtsentwicklung der behandelten Jungen. Aus diesem Patientenkollektiv wurden 24% in die Strategiegruppe S1, 70% in S2 und 6% in die Risikogruppe S4 eingeteilt [55].

Neben der systemischen Therapie ist eine gesonderte Lokalthherapie der Hoden wichtig. Das aktuelle Studienprotokoll ALL-BMF REZ 2002 empfiehlt die Orchiektomie des klinisch befallenen Hodens nach einer sonografischen Diagnoseerhärtung und bioptischen Diagnosesicherung. Der gegebenenfalls klinisch unauffällige, kontralaterale Hoden wird bioptiert. Werden Leukämiezellen im klinisch nicht befallenen Hoden histologisch nachgewiesen, ist eine Radiatio mit 18 Gy erforderlich. Findet sich hingegen kein Hinweis auf eine Infiltration, beträgt die prophylaktische Strahlendosis 15 Gy. Diese Strahlendosis führt nicht zu einer kompletten Atrophie der testikulären Zellen und ermöglicht deshalb eine endokrine Restfunktion mit spontanem Pubertätseintritt.

2 Der menschliche Hoden

2.1 ENTWICKLUNG UND PHYSIOLOGIE

Bei zwei Dritteln der rezenten Säugetierarten trägt das Männchen das Geschlechtsorgan extrakorporal. Der Testis mit der Epididymis unterliegt auch beim Menschen einem pränatalen Deszensus und bildet eine schlecht geschützte Bauchfelleklave im Skrotum, obwohl es das primäre Organ zur Entwicklung der Virilität und Fertilität ist. Doch die signifikant niedrigere Temperatur im Hoden im Vergleich zum Körperkern ermöglicht eine effizientere Spermatogenese. Für Arten, die sich saisonal fortpflanzen und bei denen ein Männchen zahlreiche Weibchen in kurzer Zeit befruchten muss, ist dies ein evolutionärer Vorteil [74].

Vier Mechanismen erniedrigen bei Bedarf die skrotale Temperatur: 1) Tunica dartos: Eine Schicht glatter Muskelfasern unter der Haut des Hodensackes kann die Oberfläche vergrößern. Gleichzeitig fehlt eine isolierende Fettschicht. 2) Musculus cremaster: Der Hodenheber ist in der Lage den Abstand zum Körper zu verändern. 3) Ein venös-arterielles Gegenstromprinzip kühlt das von zentral her fließende Blut ab. 4) Zahlreiche Schweißdrüsen erhöhen gezielt die Evaporation [74].

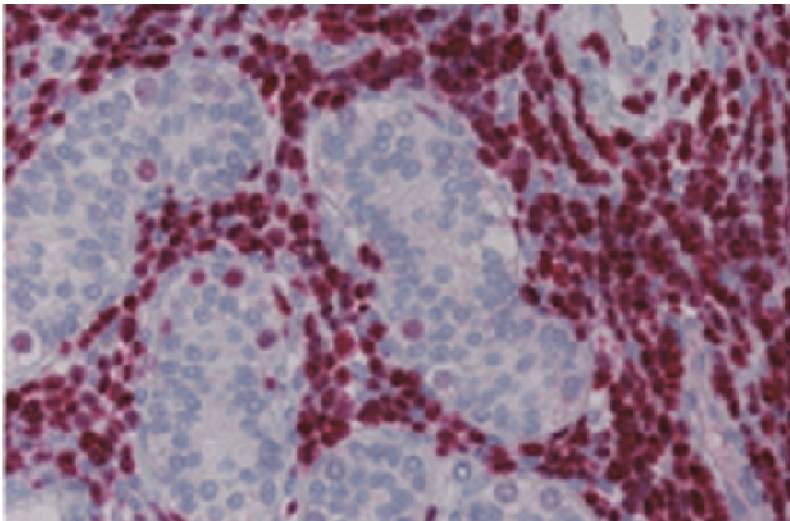
Die beiden Hauptfunktionen der Testes sind die Herstellung funktionstüchtiger Gameten und die Produktion von Testosteron, dem wichtigsten männlichen Geschlechtshormon. Ein hypothalamo-hypophyseotestikulärer Regelkreis steuert über Gonadoliberin (GnRH) und luteinisierendes Hormon (LH) die Produktion des Androgens in den Leydig-Zellen. Diese liegen perivaskulär im Interstitium des Hodens. Mit Eintritt des Jungen in die Pubertät im Alter von 8-14 Jahren [75] beginnt die Androgenproduktion und die Zahl der Leydig-Zellen nimmt zu. Es kommt zu einer physiologischen Zunahme des Hodenvolumens [76].

Die sogenannte Blut-Hoden-Schranke wird aus Zonulae occludentes (tight junctions, Schlussleiste) zwischen den bipolaren Sertoli-Zellen gebildet [77]. Sie trennen das Interstitium von den Tubuli seminiferi, den Hodenkanälchen, die in den Samenleiter münden. Ihren Zweck erfüllt die Barriere dadurch, dass sie ein geeignetes Mikromilieu für die Spermatogenese schafft und die postmeiotischen Spermatozoen vor der körpereigenen Immunantwort schützt. Da erscheint es logisch, dass die Blut-Hoden-Schranke ihre endgültige Funktionalität Androgen vermittelt erst mit dem Einsetzen der Pubertät erlangt [78, 79].

2.2 PATHOHISTOLOGIE LEUKÄMISCHER INVASION IN DEN HODEN

Im Tiermodell ist eine intra- und perivaskuläre Leukoblasteninfiltration in das testikuläre Interstitium bei Nagern mit ALL beschrieben [58]. Angrenzend an die transformierten Leukoblasten wird eine Degeneration der Sertoli-Zellen beschrieben, die mit vereinzelt Brüchen in der Blut-Hoden-Schranke einhergeht. Diese Aussage deckt sich mit immunhistochemisch gefärbten Schnitten aus unserem Haus. Siehe dazu *Abbildung 2* [80]. Antikörper gegen die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) der Leukozyten markieren die Leukämiezellen, die sich in großer Dichte im Interstitium des Hodengewebes ansammeln. Auch hier ist ein vereinzelt Eindringen der Blasten zwischen die Sertoli-Zellen erkennbar. Neben der Tatsache, dass die Blut-Hoden-Schranke, wie oben beschrieben, erst mit Einsetzen der Pubertät ausreift, spricht auch der pathohistologische Befund gegen eine zentrale Beteiligung des intratubulären Milieus an der Pathogenese des testikulären Rezidivs.

Abbildung 2: *Immunhistochemisch gefärbter Schnitt eines von ALL infiltrierte Hodens [80]. Deutlich erkennbar ist die vorwiegend interstitielle Invasion der Blasten.*



3 Diversität, Klonalität und Evolution

3.1 DIVERSITÄT DURCH IG- UND TCR-GENUMLAGERUNGEN

Vier Mechanismen schaffen aus dem begrenzten Informationsgehalt des Erbguts eine schier unendliche Vielfalt an kodierenden Immunglobulin- (IG) und T-Zell-Rezeptor- (TCR) Genen. Diese ermöglichen dem Organismus eine spezifische Immunantwort auf theoretisch jedes Antigen. Die Mechanismen finden auf ähnliche Weise in beiden lymphoiden Zellreihen statt, denn die TCR sind IG strukturell ähnlich und werden durch homologe Gene codiert.

Somatische Rekombination bezeichnet den Vorgang in reifenden, lymphoiden Vorläuferzellen, in dem mittels Rekombinationssignalsequenzen (RSS) aus $V_H D_H J_H$ -Segmenten Genrekombinationen für schwere Ketten und aus $V_L J_L$ -Segmenten Kombinationen für leichte Ketten der Immunglobuline bei B-Zell-Vorläufern aus einem begrenzten Repertoire des Chromosoms 14q32 zusammengefügt werden. Der TCR α -Locus besteht wie derjenige für die leichten IG-Ketten aus V- und J-Gensegmenten (V_α und J_α), wohingegen analog zu den schweren IG-Ketten in den TCR β -Locus zusätzlich zu den V_β - und J_β -Segmenten noch ein D-Gen-Segmente eingebaut wird. *Tabelle 1* zeigt die Anzahl der funktionsfähigen Gensegmente für die variable Region in menschlichen IG- und TCR-Loci.

Tabelle 1: Anzahl funktioneller Gensegmente für die variablen Regionen der schweren und leichten Ketten in menschlicher DNA. Sie bilden die Grundbausteine, aus denen durch somatische Rekombination neue $V_H D_H J_H$ -, $V_L J_L$ - beziehungsweise $V_\beta D_\beta J_\beta$ und $V_\alpha J_\alpha$ -DNA-Segmente entstehen [81].

Segment	Immunglobuline (IG)			TCR α und β Rezeptoren	
	leichte Ketten		schwere Ketten	leichte Ketten	schwere Ketten
	κ	λ	H	α	β
V-Segmente	40	30	65	≈ 70	52
D-Segmente	0	0	27	0	2
J-Segmente	0	4	6	61	13

Die Organisation der TCR γ - und δ -Loci ähneln wiederum stark den TCR α - und β -Umlagerungen. Besonderheiten sind eine geringere Anzahl an V-Segmenten sowie die vollständig innerhalb des TCR α -Locus liegenden, die δ -Ketten codierenden Gensegmente. Anschließend modifizieren DNA-Reperaturenzyme die geöffneten Haarnadelstrukturen, indem sie Nukleotidbasen durch ihre Endonukleaseaktivität quantitativ variabel entfernen. Die

lymphoidspezifische terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) fügt wiederum eine zufällige Basensequenz an die Einzelstrangenden an und erzeugt dadurch einen einzigartigen Genabschnitt, der als genetischer „Fingerabdruck“ bezeichnet werden könnte. Der dritte Mechanismus beschränkt sich auf die Kombination von jeweils zwei synthetisierten leichten und schweren Ketten, verändert also nicht das Genom der Immunzelle. In Antikörper sezernierenden, also aktivierten B-Zellen führen zufällige Punktmutationen (somatische Hypermutationen) in der Folge zu immer besseren Antigen-Antikörper-Bindungen. Dieser vierte Variabilitätsmechanismus ist bei TCR nicht beschrieben. Der Grund liegt wahrscheinlich in der Zellständigkeit der TCR [81].

3.2 KLONALITÄT UND EVOLUTION

Das gegenwärtige Konzept der Leukämogenese basiert auf der Idee der klonalen Expansion *einer* transformierten hämatopoetischen Zelle [82-85]. BCP- und T-Zell-Leukämien gehen zurück auf eine veränderte hämatopoetische Zelle, die in ihrer Entwicklung arretiert, deren Potenzial auf eine Linie determiniert ist und deren IG- und TCR-Genumlagerungen in den meisten Fällen vollzogen sind. Damit eignen sich diese IG-/TCR-Genumlagerungen hervorragend als klonspezifische Marker. *Tabelle 2* und *3* zeigen eine Übersicht über die in der Literatur beschriebene Häufigkeit der mittels PCR und Southern Blot gefundenen Genrekombinationen bei akuten T- und BCP-Leukämien.

Tabelle 2 und 3: Häufigkeit von IG- und TCR-Genumlagerungen: Der Prozentsatz gibt an, in wie vielen Proben mindestens eine dieser Marker-Familien detektiert wurde [86-90].

Zelllinie	IG _H : V _H -J _H	IG _H : V _H -D _H	IG _k (κ-de)
BCP-ALL	75-95%	20%	20-50%
T-Zell-ALL	5-15%	23%	-

Zelllinie	TCR α	TCR β	TCR γ	TCR δ
BCP-ALL	40%	35%	40-60%	40-60%
T-Zell-ALL	-	90%	50-90%	70-90%

Damit findet sich in über 90% der Proben mindestens eine klonale IG-TCR-Genumlagerung [91]. Die häufigste Genumlagerung ist die IG_H-Umlagerung. Aus anderen Untersuchungen ist zu entnehmen, dass 29-40% aller detektierten Umlagerungen der IG_H-Familie angehören, 12-17%

der IG κ -, 25% der TCR γ -, 17-22% der TCR δ -, 9% der TCR α - und 4% der TCR β -Familie [92, 93].

Die oben beschriebenen somatischen Umlagerungsprozesse sind eng mit der Entwicklung der Immunzellen verknüpft. Pro Entwicklungsschritt wird nur ein Locus umgelagert, die Reihenfolge dabei steht fest. Beide Zellreihen ordnen als erstes die schweren Segmente um, später folgen die leichten. In der normalen T-Zell-Entwicklung wird zuerst der TCR δ -, dann der TCR γ -Locus umgelagert. Es folgen die Loci des TCR β und α [94, 95].

Seit 1999 ist im Zuge der ALL-BFM 2000 Studie das Ansprechen auf die Therapie mittels MRD-Diagnostik zur Therapiestratifizierung für Ersterkrankungen eingeführt. Eckert konnte den prognostischen Wert der MRD auch für Rezidiverkrankungen der ALL nachweisen [96]. Die Fähigkeit zur Messung von MRD mündete in einer Neudefinition von *Remission* und schuf einen neuen, starken Prädiktor für das Behandlungsergebnis (Outcome) der Patienten. Sowohl das frühe Ansprechen auf die Therapie als auch der Remissionsstatus vor Stammzelltransplantation konnte sensitiver beurteilt werden [97, 98]. Bei der MRD-Diagnostik werden klonenspezifische Primer für jeden Patienten individuell entworfen und synthetisiert. Dadurch kann in einer Echt-Zeit-Polymerase-Kettenreaktion (Echt-Zeit-PCR, Real-time-PCR) eine Sensitivität von 10^{-5} erreicht werden [99].

Die Idee der klonalen Erkrankung Krebs ist seit geraumer Zeit erweitert worden um den Gedanken der Evolution [100, 101]. Greaves beschreibt Krebs in einer Übersichtsarbeit als ein „komplexes, Darwin'sches, adaptives System“ [102], bei dem Subklone sich in ihrer Dominanz zeitlich ablösen und eng mit ihrem Mikrohabitat interagierten. Demnach folgt der klonalen Expansion eine genetische Auffächerung, die sich durch eine erhöhte Instabilität der Chromosomen selbst avanciert *und* begrenzt. Hinzu kommt ein durch das limitierte Nährstoffangebot, die körpereigene Immunantwort sowie iatrogene Heilungsversuche enormer Selektionsdruck innerhalb der Subklon-Familien.

Lymphoide Neoplasien bieten die einzigartige Möglichkeit mithilfe der oben beschriebenen IG- und TCR-Genumlagerungen nicht nur die Leukämiezelllast quantitativ zu messen (MRD), sondern auch die Krankheitsentwicklung qualitativ nachzuvollziehen. Anlass dazu bot die Beobachtung der Oligoklonalität zu einem Krankheitszeitpunkt beziehungsweise das Auffinden von Markern des Rezidiv-Hauptklons in Proben der Ersterkrankung auf MRD-Niveau (weniger als eine Leukämizelle auf 10^3 unauffälligen Zellen) [103-105]. Es wurde gezeigt, dass die Therapie-Antwort von Subklonen bei oligoklonalen, akuten lymphoblastischen Leukämien sehr

stark differiert und ein einzelner therapieresistenter Subklon verantwortlich für eine Wiedererkrankung des Kindes sein kann [106]. Damit scheint Oligoklonalität bei Ersterkrankung ein Risikofaktor für ein späteres Rezidiv zu sein [107]. Oligoklonale Leukämien lassen sich daran erkennen, dass mehr als zwei IG/TCR-Genumlagerungen pro Genort identifiziert werden konnten. Bei zwei Umlagerungen eines Genortes kann es sich um ein zweites, umgelagertes Allel oder einen zweiten Klon handeln. Oligoklonalität tritt häufiger bei BCP-ALL als bei T-ALL auf und wurde am häufigsten bei Umlagerungen der IG_H-Familie beobachtet [108-110].

3.3 STABILITÄT DER IMMUNGEN-MARKER

Für die Implementierung der MRD-Diagnostik war es essentiell herauszufinden, wie verlässlich die Kontinuität der IG- und TCR-Genumlagerungen bei einem Patienten über seinen Krankheitsverlauf hin ist. Denn die Gefahr von falsch negativen Ergebnissen hängt mit dem potentiellen Verlust detektierter Marker zusammen. Zu Veränderungen im Markerrepertoire kommt es unter anderem durch die inaktivierte V(D)J-Rekombinase, bei einer V_H zu D_HJ_H-Verbindung, einem V_H-V_H-Tausch und dem „open-shut“-Mechanismus, durch die oben beschriebene klonale Evolution, also der Änderung der Anteile von Hauptklon und Subklonen und bei Leukämogenese de novo [105, 111-113]. Eine Vielzahl von Studien haben gezeigt, dass zirka 70% der Marker der Erstdiagnose im Vergleich zum Rezidiv stabil bleiben [93, 114-118]. Ob der unterschiedlichen Stabilität der Immunenumlagerungs-Markern herrscht Dissonanz. Szczepanski et al. berichten von der höchsten gefundenen Stabilität unter den Igκ-Umlagerungen (90%), gefolgt von TCRγ (75%), IgH (64%) und TCRδ (63%) [93]. Daraus leitet er die Empfehlung ab Igκ-Genumlagerungen - wenn vorhanden - als Verlaufsmarker zu verwenden. Andere sehen keine Unterschiede und schlagen die Verwendung von mindestens zwei sensitiven Markern vor, um falsch negative Messungen unwahrscheinlich zu machen [118, 119]. Die Untersuchung von Erst- und Zweitrezidiven ergab ein ähnliches Bild. Guggemos et al. verglichen die Marker von 49 Kindern, die an einem zweiten Rezidiv der ALL erkrankten. 73% der 149 im ersten Rezidiv gefundenen Marker wurden auch im KM beim zweiten Rezidiv gefunden. Die Stabilitätsunterschiede zwischen den Genorten waren nicht signifikant [120].

II Aufgaben und Ziele der Arbeit

Diese molekulargenetische Arbeit widmet sich kombinierten Hodenrezidiven der kindlichen ALL. Knapp jeder zweite Junge, der an einem extramedullären Rezidiv der ALL erkrankt, erleidet eine Hodenbeteiligung, deren Therapie erhebliche biopsychosoziale Konsequenzen hat. Während sich in den 90er Jahren eine Vielzahl von Forschern den klinisch-biologischen Grundlagen von testikulären Rezidiven widmete, ging das Interesse an dieser seltenen Erkrankung im neuen Jahrtausend offenbar zurück, obwohl über die Herkunft der Hodenrezidive weitestgehend nur spekuliert werden kann.

Ziel dieser Arbeit ist es, den klonalen Verwandtschaftsgrad von leukämischen Blasten zum Zeitpunkt der Diagnose des Rezidivs aus dem Hoden und aus dem KM zu erforschen, um dadurch Hinweise auf die Pathophysiologie der Hodenrezidive zu erhalten. Beleuchtet werden ebenfalls die molekulargenetischen Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Ersterkrankung im Vergleich zu den beiden betroffenen Organen des kombinierten Rezidivs. Der klonale Verwandtschaftsgrad wird beschrieben, indem klonale IG- und TCR-Genumlagerungen der isolierten Leukoblasten detektiert und miteinander verglichen werden.

Zur Erfüllung dieser Aufgabe soll nicht nur nach den häufigsten Genumlagerungen in einem PCR-Screening gesucht, sondern nicht übereinstimmende Ergebnisse validiert und mittels Echtzeit-PCR quantifiziert werden. Auf diese Weise können Subklone erkannt und Hinweise auf die Entwicklung der Erkrankung, die leukämische Evolution, gewonnen werden.

Die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung sollen dann in Verbindung mit den klinischen Daten der Patienten gebracht werden, um Unterschiede in Subgruppen zu erkennen und zu beschreiben.

Ein Zwischenziel der Arbeit ist es durch die Entwicklung geeigneter Methoden zur Einschätzung der Qualität und Verwendbarkeit Formalin fixiertes und Paraffin eingebettetes (FFPE) Hodenmaterial für die molekulargenetische Diagnostik nutzbar zu machen.

III Methodik

1 Materialien

Isolierung mononukleärer Zellen:

Ficoll Separating Solution	Biochrom AG Seromed [®] , Berlin, Deutschland
RPMI 1649 Medium (w 25mM HEPES, w stable Glutamine)	Biochrom AG Seromed [®] , Berlin, Deutschland
PBS Dulbecco (1x), w/o Ca ⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG Seromed [®] , Berlin, Deutschland
TÜRKIS Lösung	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMSO (Dimethylsulphoxide)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Verwendete Kits:

NucleoSpin [®] Tissue	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin [®] FFPE DNA	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin [®] Extract -II	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Standard-PCR und Echt-Zeit PCR:

Aqua destillatum	Braun, Melsungen, Deutschland
Desoxynukleotid dNTP Set 100mM	Invitrogen [™] Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
PTC-200 Peltier Thermal	MJ Research, Waltham, USA
MgCl ₂ 50 mM	Invitrogen [™] Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
PE 10x Puffer (15mM MgCl ₂)	Perkin Elmer [™] Life Sciences, Foster City, USA
PCR Puffer	Invitrogen [™] Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
AmpliTaq Gold [®] Polymerase	Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien
Platinum [®] Taq Polymerase	Invitrogen [™] Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Primer, Sonden	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland/Genua, Italien

Gelelektrophorese:

Agarose SERVA for DNA electrophoresis	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Lösung Tris-Acetat (TEA) 50x hergestellt aus:	
· 242g Trizma Base [®]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
· 100ml EDTA 0,5 (pH 8,0)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
· 57,1 ml Eisessig	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
· Auf 1l bidestilliertes Aqua	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland

Agarosegel-Platten hergestellt aus:

- 100 ml TEA
- 2 g Agarose SERVE
- 10 µl Ethidiumbromid (1%ige Lösung in Aqua destillatum)

ExcelGel™ DNA Analysis Kit	GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala, Schweden
Ethidiumbromid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gel Ladepuffer II, Ambion	Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien
DNA-Längenmarker	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 10%	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Salpetersäure 16%	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

Sequenzierung:

BigDye® Terminator	Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien
NucleoSEQ Columns	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien
POP6™	Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien
Puffer mit EDTA	Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien

Geräte:

Vortexer:

VWR® Galaxy Mini	VWR International bvba, Löwen, Belgien
VWR® Galaxy Ministar	VWR International bvba, Löwen, Belgien
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Vortex Mixer k neo Lab 7-2020	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Zentrifugen:

Centrifuge 5415D	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5430	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
VWR® Galaxy Mini	VWR International bvba, Löwen, Belgien
Waage Scaltec, SBA/SBC	Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Nano Drop-1000 Lichtspektrometer	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

PCR-Geräte:

GeneAmp® PCR System 9700	Perkin Elmer™ Life Sciences, Foster City, USA
Peltier Thermal Cycler PTC-200	Biozym Diagnostics GmbH, Oldendorf, Deutschland
Step One Plus® Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Singapur, Singapur
Phoresekkammer Wide Mini Sub Cell GT	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Power-Pack P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Fotokammer: GeneFlash	Syngene, Synoptics, Cambridge, Großbritannien
Video Graphic Printer UP 895MD	Syngene, Sony, Tokyo, Japan
Multifor II	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Kühlung: Julabo F12	Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland
Belly Dancer: Promax® 1020	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sequenzierung: ABI Prism® 310	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

Software:

Sequencing Analyses 3.7	Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien
StepOne™ Software Version 2.1 und 2.2.2	Applied Biosystems, Singapur, Singapur
Berechnung der Schmelztemperatur	http://tib-molbiol.com
Sequenzauswertung	http://vbase2.org http://ensembl.org http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
Statistische Auswertung	IBM SPSS Statistics 21, Armonk, USA

2 Methoden

2.1 ALLGEMEINES VORGEHEN

Ziel des molekulargenetischen Verfahrens ist es, die umgelagerten Gensequenzen der Leukämiezellklone aus dem KM und aus dem betroffenen Hoden zu identifizieren und miteinander zu vergleichen. Dazu muss DNA aus Knochenmarkpunktaten und Hodenpräparaten aufgearbeitet, qualitativ geprüft sowie quantitativ genormt werden. Im PCR-Screening wird nach den häufigsten Genumlagerungen gesucht. Die in der Gelelektrophorese positiven Rearrangements werden sequenziert und individuelle Primer entworfen. Spezifische und sensitive Primer eines Kompartiments können dann genutzt werden um Marker, die in einem anderen Kompartiment in der Screening-PCR nicht gefunden werden konnten, sozusagen rückwärts sensitiv zu quantifizieren. Durch die hohe Sensitivität dieser Methode, die die Messung eines leukämischen Blasten unter bis zu 100.000 gesunden Zellen ermöglicht, können auf diese Weise Subklone definiert werden. Die angewandten Methoden sind im Berliner Forschungslabor im Rahmen der MRD-Diagnostik für die BFM-ALL REZ Therapieoptimierungsstudie etabliert. Eine Ausnahme hiervon bildet die Isolation von Leukämiezellen aus frischem, gefrorenem oder in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem (FFPE: formalin-fixed, paraffin-embedded) Hodenmaterial. Im Folgenden werden die genannten Arbeitsschritte im Einzelnen vorgestellt.

2.2 SEPARATION MONONUKLEARER ZELLEN UND DNA-EXTRAKTION

2.2.1 Aus Knochenmarkpunktat

Die Isolation mononukleärer Zellen aus KM und Blut stellt ein Routineverfahren dar [121, 122]. Sie gelingt mittels Dichtegradientenzentrifugation und Aufbereitung des transferierten „Ficollrings“ mit RPMI-Lösung und PBS-Dulbecco. Je 5ml der je nach geschätzter mononukleärer Zellzahl verdünnten Materiallösung werden auf 4ml Ficoll-Lösung pipettiert und zentrifugiert. Der jetzt sichtbare „Ficollring“, hauptsächlich bestehend aus mononukleären Zellen, wird mit einer Transferpipette abgesaugt und 1:1 mit RPMI-Lösung verdünnt. Nach mehrmaligem „Waschen“ der Zellen mit PBS-Dulbecco können die Zellen in Lysepuffer überführt werden.

Die Extraktion der DNA erfolgt mit dem Verfahren NucleoSpin®Tissue nach Angaben des Herstellers Macherey-Nagel.

2.2.2 Aus Hodengewebe

Frisches und gefrorenes Hodengewebe: Das Gewebe wird gegebenenfalls aufgetaut und mit einem Skalpell geteilt. In vielen Fällen ist die Leukoblasteninfiltration makroskopisch als weiße Masse erkennbar. Durch wiederholtes Abstreifen der Gewebeflächen mit dem Schnittwerkzeug werden Leukämiezellen abgetragen und in RPMI-Lösung überführt. Es schließt sich eine Zentrifugation mit 450g für zwei Minuten an. Zur DNA-Extraktion kann ab diesem Stadium ebenfalls den Anweisungen des DNA-Extraktionskits NucleoSpin® Tissue von Macherey-Nagel gefolgt werden und der Probe 180µl T1 Puffer und 25µl Proteinkinase K beigelegt werden.

Formalin fixiertes, Paraffin eingebettetes Hodengewebe (FFPE Hodengewebe): Das fixierte Hodenmaterial wurde bundesweit von diversen pathologischen Institutionen angefordert und uns zugesandt.

Seit einigen Jahren wird an der molekulardiagnostischen Verwendbarkeit von Formalin fixiertem, Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebe geforscht. Eine Arbeit, die die Frage behandelt, inwieweit FFPE Hodenmaterial für molekulargentische Routineverfahren verwendbar ist, wurde bislang nicht publiziert. Bekannt ist, dass DNA, die aus FFPE Gewebe isoliert wurde (FFPE DNA), durch die Fixierung und Lösung beschädigt und teilweise zerstückelt werden kann [123, 124]. Bonin und Stanta fassen zusammen, dass die Qualität der DNA aus FFPE nicht nur Resultat der Extraktionsmethode ist, sondern vom Fixierungsprotokoll, der Fixierungszeit, der Lagerungszeit und der Art des Gewebes beeinflusst wird.

Zur Verarbeitung wurden die Paraffin-Blöcke, die das Hodenmaterial umgeben, in dünne, 3-10µm dicke Schnitte zerkleinert. Mit jeweils zirka 5mg Material wurden mehrere Protokolle zur Entparaffinisierung und DNA-Extraktion getestet und modifiziert. An dieser Stelle sollen die beiden erfolgversprechendsten Methoden vorgestellt werden, nach deren Anweisung schließlich alle FFPE Hodengewebe verarbeitet wurden. *Tabelle 4* bietet dazu eine gegenüberstellende Auflistung der einzelnen Schritte. Beide entwickelten Methoden gehen in das Protokoll des Herstellers Macherey-Nagel über, bedienen sich jedoch verschiedener Methoden der Entparaffinisierung: Wird einerseits ein chemischer Paraffin-Dissolver verwendet (Protokoll A), bedient sich der Anwender des Protokoll B der thermischen Trennung von Wachs und Gewebe. Protokoll A orientiert sich dabei an dem Kit NucleoSpin® FFPE DNA von Macherey-Nagel.

Table 4: Vorgehen beim Entparaffinisieren und DNA-Extrahieren von FFPE Hodenmaterial. Protokoll A und B in der Übersicht.

	Protokoll A	Protokoll B
Entparaffinisierung	+ 600µl Paraffin-Disolver. Kurz vortexen. 3 Min. bei 60° C und 300 rpm (Eppendorf 5414R) inkubieren. Stark vortexen Wenn Paraffin nicht ganz gelöst ist, länger inkubieren.	+ 800µl PBS 1-2 Min. bei 95° C und 300 rpm (Eppendorf 5414R) inkubieren. Mit 11000g zentrifugieren. Wachsschicht entfernen, ggf. Schritt wiederholen.
Vorlyse	+ 180µl T1, stark vortexen. 1 Min. bei 11000g zentrifugieren. Es bilden sich zwei Phasen: oben Paraffin, unten Gewebe.	+ 180µl T1 Lyse Puffer In neues Eppy überführen-
Verdau	+ 25µl Proteinase K in untere Phase, dort vorsichtig mit Pipette mischen. Kurz vortexen, bei 11000g 1 Min. zentrifugieren. 3 Std., besser über Nacht bei 56° C inkubieren.	+ 12,5µl Proteinase K, kurz vortexen. 24 Std. bei 56° C und 450-550rpm (Eppendorf 5414R) inkubieren. + 12,5µl Proteinase K, kurz vortexen. 24 Std. bei 56° C und 450-550rpm (Eppendorf 5414R) inkubieren.
Lösen der molekularen Fixierung	Kurz vortexen, 1 Min bei 11000g zur Phasenbildung zentrifugieren. + 200µl Descrosslink in untere Phase. Vorsichtig vortexen, und 30 Sek. bei 11000g zentrifugieren. 15 Min bei 90° C inkubieren. Kurz vortexen, bei 11000g 30 Sek. Zentrifugieren.	
Lyse		+ 200µl B3 Puffer 10 Min. bei 70° C inkubieren. 60 Min. veu 90° C inkubieren.
Vorbereitung zum Binden	+ 400µl Ethanol (96-100%) in untere Phase. 2x5 Sek. vortexen und 30 Sek. bei 11000g zentrifugieren.	+ 210µl Ehtanol (96-100%) Kurz vortexen.
Reinigung	Untere, DNA-haltige Phase auf Tissue Säule auftragen.	Alles auf Tissue Säule auftragen.

Den Anweisungen des Herstellers Machery-Nagel NucleoSpin®Tissue mit Punkt 6 folgen.

2.3 QUALITÄTSPRÜFUNG

Nano Drop-1000 Lichtspektrometer: Der Erfolg der DNA-Extraktion misst sich an der Menge und Reinheit der isolierten DNA. Zwei Methoden geben darüber Auskunft: Die spektrophotometrische Messung basiert auf einem Absorptionsmaximum der DNA bei 260nm (OD₂₆₀) und von Aminosäureresten bei 280nm (OD₂₈₀). Die Ratio OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ deckt die Verunreinigung der Probe auf. Die Messung optimal reiner DNA ergibt eine Ratio von 1,8. Je kleiner der Wert, desto größer ist die Verunreinigung.

StepOne® Plus Echt-Zeit-PCR: Mit einer Konzentration der DNA-Proben von 100ng/µl (±15ng/µl) führen wir als zweiten Schritt eine Echtzeit-PCR durch. Als Referenzgen dient das in allen Zellen codierte β-Globin-Gen. DNA aus mononukleären Zellen von fünf bis zehn gesunden Spendern (Buffy Coat, BC; ebenfalls in einer Konzentration von 100ng/µl) wird als Vergleichsgröße beziehungsweise Positivkontrolle verwendet. Dazu wird eine Standardreihe des BCs mit Aqua destillatum von 10⁰ bis 10⁻⁴ hergestellt. Das bedeutet, dass die DNA-Menge des eingesetzten BCs von 670ng bis 6,7pg reicht. Das Messresultat dient der Erfassung der amplifizierbaren und mindestens 173bp langen DNA-Menge der Proben. Weiteres zu Amplifikationsbedingungen und zur Auswertung ist im Absatz 2.7 beschrieben.

Tabelle 5: Primer und TM-Sonde der Quantifizierung des β-Globin Referenzgen mittels Echt-Zeit-PCR

Element	Genort	Fragmentlänge	Primer	Sequenz
β-Globin	11p15	173bp	β-Globin forward	5'-TATTGGTCTCCTTAAACCTGTCTCTTG-3'
			β-Globin reverse	5'-CTGACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'
			TM-Sonde	5'-CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACT-3'

2.4 SCREENING-PCR

1984 erstmals in Kalifornien dem damals noch uninteressierten Fachpublikum vorgestellt, wurde Kary Mullis 1993 für die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Heute ist die PCR ein molekulargenetisches Basisverfahren, um definierte Genabschnitte „molekulargenetisch zu klonen“ [125]. Mithilfe zweier Primer, die mit ihrer Bindung an die DNA den zu amplifizierenden Abschnitt einrahmen, der DNA-Polymerase, die die Polymerisation von Desoxyribonukleotiden in die DNA katalysiert, und einem festgelegten Temperaturzyklus werden DNA-Fragmente exponentiell vervielfacht. *Tabelle 6* fasst die PCR-Amplifikationsbedingungen der IGH-, Igk-, TCR α-, β-, γ- und δ-Elemente zusammen. Das

PCR-Screening nach Genumlagerungen der TCR α -Familie wurde teilweise als Multiplex-PCR durchgeführt. Dazu wurden drei Ansätze verwendet. Der erste Ansatz (Vd2J α -54) entspricht einer Einzel-PCR und setzt sich aus den in *Tabelle 6* vorgegebenen Inhalten zusammen. Der zweite Ansatz (Vd2J α -29, -48) enthält die doppelte Menge des 5'-Primers (2 x 2 μ l) und entsprechend 2 μ l weniger Aqua destillatum. Der dritte Ansatz (Vd2J α -30, -55, -58, -61) enthält vier 5'-Primer und dementsprechend nur 68,8 μ l Aqua destillatum. *Tabelle 7* zeigt eine Übersicht aller Elemente (Rearrangements), nach denen im Rahmen dieser Arbeit gesucht wurde, sowie deren Genlokalisierung und Fragmentlänge. Dabei zeigt die Spalte „Erste Wahl“ an, bei welcher Zelllinie der ALL nach entsprechenden Immungen-Umlagerungen gescreent wird. Sollten nicht ausreichend Sequenzen, die für die MRD-Diagnostik verwendbar sind, gefunden werden, kann als zweite Wahl auch bei Vorliegen der anderen Zelllinie auf diese Rearrangement-Familie zurückgegriffen werden. Die in der Arbeit verwendeten PCR-Techniken und Primer sind bereits publiziert und entsprechen der routinemäßigen MRD-Diagnostik des Labors [126-128].

Tabelle 6: Amplifikations-Bedingungen aller im PCR-Screening verwendeten Genloci

Element: PCR-Strategie:	IG μ /IG κ Einzel	TCR γ Multiplex	TCR δ Multiplex	TCR $\alpha/\gamma/\delta$ Einzel	TCR β Multiplex
<i>Volumen in μl</i>					
Aqua destillatum	74,8	16,8	19,8	74,8	14,8
PE 10xPuffer 15mM MgCl ₂	10	3	3	10	10
2mM dNTP's	10	3	3	10	10
10 μ M 5'-Primer	2	4x1	4x0,5	2	16x2
10 μ M 3'-Primer	2	2x1	2x0,5	2	16x2
5U/ μ l Taq Gold Polymerase	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
100ng/ μ l DNA	1	1	1	1	1
Endvolumen	100	30	30	100	100
<i>Temperatur/Zyklen</i>					
Vordenaturierung	94°C, 10min	94°C, 10min	94°C, 10min	94°C, 10min	94°C, 10min
Zyklen	30	30	38	35/30	35
Denaturierung	94°C 45sek	94°C 60sek	94°C 60sek	94°C 60sek	94°C 45sek
Annaeling	60°C 90sek	59°C 60sek	60°C 120sek	59°C 60sek	60°C 90sek
Extension	72°C 120sek	72°C 100sek	72°C 60sek	72°C 100sek	72°C 120sek
Endverlängerung	72°C 10 min	72°C 10min	72°C 10min	72°C 10min	72°C 10min

Table 7: Genloci und verwendete Primer der Screening-PCR [88, 119, 129-133]

Element	Genort	Erste Wahl bei	Primer	Fragmentlänge
IgH (VJ)	14q32	B-ALL	VH1/7/JH-cons	300-350bp
			VH2/JH-cons	300-350bp
			VH3/JH-cons	300-350bp
			VH4/6/JH-cons	300-350bp
			VH5/JH-cons	300-350bp
			VH6/JH-cons	300-350bp
IgH (DJ)	14q32	B-ALL	DH1/JH-cons	150bp
			DH2/JH-cons	250bp
			DH3/JH-cons	200bp
			DH4/JH-cons	200bp
			DH5/JH-cons	300bp
			DH6/JH-cons	200bp
			DH7/JH-cons	250bp
Ig κ	22q11	B-ALL	VkI-Kde	433bp
			VkII-Kde	433bp
			VkIII-Kde	429bp
			VkIV-Kde	445bp
			Vkintron-Kde	511bp
TCR γ	7p15	B-/T-ALL	Vg1/8/int- Jg1/2/int*	780/233bp
			Vg9/int- Jg1/2/int*	605/150bp
			Vg10/int- Jg1/2/int*	940/72bp
			Vg11/int- Jg1/2/int*	670/174bp
			Vg1/8/int-Jp1/2*	355/225bp
			Vg9/int-Jp1/2*	180/142bp
			Vg10/int-Jp1/2*	510/164bp
			Vg11/int-Jp1/2*	240/217bp
TCR δ	14q11-12**	B-/T-ALL	Vd2-Dd3/int*	800/286bp
			Vd1/si-Dd3/*	700/330bp
			Vd2/si-Jd1/2*	500/347bp
			Dd2/ex-Dd3/int*	400/230bp
			Vd3-Jd1/2	300bp
			Dd2-Jd1/2	100bp
TCR α	14q11-12	B-/T-ALL	Ja-54/Vd2	400-450bp
			Ja-29,-48/Vd2	400-450bp
			Ja-9/Vd2	400-450bp
			Ja-30,-55,-58,-61/Vd2	400-450bp
TCR β	7q32-35	T-ALL	Tβ ⁺ + Jβ 1.1-1.6, 2.2, 2.6, 2.7	254-286bp
			Tβ ⁺ + Jβ 2.1, 2.3-2.5	258-293bp
			Jβ ⁺ + Dβ1 + Dβ2	304-320bp

*Multiplex: externe Primer; Single-PCR: interne Primer. **innerhalb des TCR α-Locus

†Tβ: Vβ2, 4, 5/1, 6a/11, 6b/25, 6c, 7, 8a, 9, 10, 11, 12a/3/13a/15, 13b, 13c/12b/14, 16-22, 23/8b, 24

Bei jedem PCR-Ansatz werden zwei Negativkontrollen eingesetzt. Eine besteht aus 100ng DNA des BC. Um eine Kontamination des Ansatzes aufzudecken, wird in ein weiteres Tube Aqua destillatum als zweite, absolute Negativkontrolle hinzugegeben. Als Positivkontrolle fungieren Zelllinien oder bekannte Patientenproben. Die Zelllinie REH wird bei den Amplifikationen von VH3/JH, Vd2/Dd3, Vd2/Ja-29,-48,-30,-55,-58,-61, Vk3-Kde und VKintr-Kde eingesetzt und die Zelllinie PEER für Vd1/D3 und MOLT16 für Vg1/Jp1/2 als Positivkontrollen verwendet.

2.5. GELELEKTROPHORESE

Agarose-Gelelektrophorese: In der Gelelektrophorese werden Nukleinsäurestränge in einem elektrischen Feld durch eine unterschiedliche, von ihrer Größe abhängigen Wanderungsgeschwindigkeit aufgefächert. Dazu werden 9µl PCR-Amplifikat zu jeweils 1µl Ladepuffer gegeben und zusammen mit einem DNA-Längenmarker, einer DNA-Positiv-Kontrolle, der DNA-Negativkontrolle und der H₂O Negativ-Kontrolle in eine Tasche der 2%igen Agarose-Platte pipettiert. Positive Ergebnisse aus den Multiplex-Verfahren werden nun in einer Einzel-PCR wiederholt. Positive und fraglich positive Ergebnisse werden in der Homo-/Heteroduplexanalyse auf Oligoklonalität getestet.

Homo-/Heteroduplexanalyse: Das Excel-Polyacrylamidgel (12%) verfügt über eine feinere und homogenere Struktur als das Agarose Gel. Es eignet sich besonders für die Auflösung von kleinen DNA-Fragmenten bis 1000bp. Vor dem Einsetzen in das Gel werden die Proben bei 95°C (5 Minuten) denaturiert und anschließend 60 Minuten lang bei 50°C gelagert. In dieser Zeit konstituieren sich die getrennten DNA-Stränge. Die PCR-Produkte werden erneut zusammen mit einem DNA-Längenmarker, einer Positivkontrolle sowie den beiden Negativkontrollen auf das Excel-Gel aufgetragen und unter Kühlung auf 4°C in die Multifor eingelegt. Nach 120-150 Minuten folgt die Silbernitratfärbung im Belly Dancer:

- 5 Minuten in 10%igem Ethanol, waschen mit Aqua destillatum.
- 3 Minuten in 16%iger Salpetersäure, zweimaliges Waschen mit Aqua destillatum.
- 20 Minuten Silbernitrat, zweimaliges Waschen mit Aqua destillatum.
- Entwicklung mit Natriumcarbonat und Formaldehyd bis Banden deutlich.
- 5 Minuten in 10%iger Essigsäure, zweimaliges Waschen mit Aqua destillatum.

In den meisten Fällen finden sich zwei exakt gleiche Stränge, das Genumlagerungsprodukt ist monoklonal. Sind im Lymphblasten beide Allele umgelagert oder existieren zwei gleichhäufige Klone, bilden sich im Bereich des „Fingerabdrucks“ (siehe Seite 17) eine Schleife (Loop), die das Wanderverhalten des DNA-Stranges beeinflusst. Im Polyacrylamidgel sind dann zwei

Banden zu sehen. Eine dritte Variante entsteht, wenn zwei Klone unterschiedlich häufig vorkommen und sich drei oder vier Banden bilden. Einzelne Banden können vorsichtig ausgeschnitten in 20-30µl Aqua destillatum über Nacht bei 50°C gelöst werden. Von dieser Lösung werden 0,5-1,5µl - je nach Stärke der Bande - in einer neuen PCR (Reamplifikation) angesetzt. Polyklonalität zeichnet sich hingegen durch viele „verschmierte“ Banden aus, die nicht ausgeschnitten werden können.

2.6. SEQUENZIERUNG

Die Didesoxymethode nach Sanger [134] wird auch Kettenabbruchsynthese genannt, da die mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierten Didesoxynukleosidtriphosphate nach Anbau am 3'-Ende aufgrund ihrer fehlenden OH-Gruppen eine weitere Kettenverlängerung verhindern. Diese Kettenabbruchprodukte werden in einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mittels Laser zur Fluoreszenz angeregt. So entsteht ein Chromatogramm, aus dem die Nukleotidsequenz geschlossen werden kann.

Alle PCR-Produkte werden für die Sequenzier-PCR aufgereinigt. Dies erfolgt mit dem NucleoSpin® Extract-II-Kit von Macherey-Nagel. Zur Sequenzier-PCR wird BigDye® verwendet. Zur Aufreinigung des Sequenzier-PCR-Produktes folgt man den Herstellerangaben des Kits NucleoSEQ Columns von Macherey-Nagel. Mit Hilfe der Software Sequencing Analyses 3.7 wird das Chromatogramm so ausgewertet, dass jedem Absorptionsmaximum einer bestimmten Wellenlänge eine der vier Nukleotidbasen zugeordnet wird. Diese Zuordnung muss jedoch auf Fehler überprüft werden. Die Auswertung erfolgt mithilfe der Germline-Sequenzvorlage der „European Study Group on minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia“ (ESG-MRD-ALL) und der im Abschnitt II.1 *Materialien* genannten Webseiten.

2.7 QUANTIFIZIERUNG

Die Echt-Zeit PCR ermöglicht eine quantitative Aussage über einen definierten Genabschnitt. Neben generellen Primern und TM-Sonden [127] werden dazu individuelle Primer über die klonspezifische Region der V-(D)-J verbindenden Regionen entworfen, die über die klonspezifische Sequenz reichen und einen Schmelzpunkt zwischen 55°C-60°C haben sollten. Der Schmelzpunkt wurde mithilfe eines Internetprogrammes von Tib Molbiol (www.tib-molbiol.com) berechnet. Die Primer werden von Tib Molbiol hergestellt. Weitere Regeln und Bedingungen zur Entwicklung der klonspezifischen Primer sind im Labor etabliert und publiziert [127]. Die Primer werden auf eine Konzentration von 10pmol/µl verdünnt und auf ihre Spezifität

und Sensitivität getestet. In der Spezifitätsmessung sollten die mindestens drei eingesetzten BC-Proben negativ sein und der CT-Wert der 67ng DNA-Probe zwischen 28 und 32 liegen. Wird der BC positiv gemessen, kann eine Temperaturerhöhung die Spezifität verbessern. Ist der CT-Wert der DNA-Probe zu hoch, verbessert eine niedrigere Temperatur den Kurvenverlauf. In der Sensitivitätsmessung werden als Verdünnungsreihe Samples mit einer DNA-Menge von 670ng bis 67pg eingesetzt und mit unverdünnter BC-DNA verglichen. Negativkontrollen (Aqua destillatum) werden stets mit gemessen. Geeignete Primer sind nun in der Lage für die Quantifizierungsläufe der zu testenden Kompartimente eingesetzt zu werden. PCR-Bedingungen der quantitativen Echt-Zeit PCR sind in *Tabelle 8* zusammengefasst. Hingewiesen sei auf die Justierungsmöglichkeiten in Fällen, in denen die Ergebnisse nicht optimal auszuwerten sind. Der für Läufe aus der TCR γ Familie per se vorgesehene, höhere $MgCl_2$ -Anteil im PCR-Ansatz kann bei Bedarf auf alle anderen Markergruppen übertragen werden. Ebenso verhält es sich mit der Annealing-Temperatur und Denaturierungszeit, die in Einzelfällen angepasst werden kann. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der StepOne™ Software v2.1 und v2.2.2.

Tabelle 8: Bedingungen der Echt-Zeit PCR

PCR Strategie	TCR γ	Alle anderen
<i><u>Volumen in μl</u></i>		
Aqua destillatum	3,4	4,4
50mM $MgCl_2$	3	2
10x PCR Rxn Buffer	2	2
2mM dNTP's	2	2
10 μ M 5'-Primer	1	1
10 μ M 3'-Primer	1	1
5U/ μ l Platinum® Taq-DNA Polymerase	0,2	0,2
BSA	0,5	0,5
10 μ M TM Sonde	0,2	0,2
100ng/ μ l DNA	6,7	6,7
Endvolumen	20	20
<i><u>Temperatur/Zyklen</u></i>		
Vordenaturierung	95°C, 5min	
Zyklen	40	
Denaturierung	95°C, 9 (+11)sek	
Annealing/Elongation	65 (\pm 5)°C, 23sek	

3 Patientenkollektiv und -proben

Für die molekulargenetischen Untersuchungen wurden Jungen mit der Diagnose eines ersten und zweiten kombinierten Hodenrezidivs eingeschlossen, die in den Studienprotokollen ALL-REZ BFM 96 und ALL-REZ BFM 2002 registriert wurden und von denen aus der Rezidivdiagnose wenigstens ausreichend KM-Punktat und Hodenmaterial des klinisch befallenen Hodens verfügbar waren. Diese Forschung basiert auf einem positiven Beschluss des zuständigen Ethikrates und dem Einverständnis der dazu berechtigten, involvierten Personen. Sie ist Teil der ALL-REZ BFM 1996 und 2002 Therapieoptimierungsstudien. Bevorzugt wurde frisches beziehungsweise gefrorenes Hodenmaterial. In den Fällen, in denen Hodengewebe in dieser Form nicht vorhanden war, wurden die Pathologien der behandelnden Kliniken um die Zusendung von FFPE Hodengewebe gebeten. Neben dem biologischen Material des kombinierten Rezidivs wurden auch KM-Proben der Ersterkrankungsdiagnose sowie weiterer Folgerezidive systematisch gesucht und gesammelt, um ein möglichst vollständiges molekulargenetisches Bild des Erkrankungsverlaufes zu erhalten.

Insgesamt konnten 35 kombinierte Rezidive eingeschlossen werden. In 17 Fällen (#1-17) war das Diagnosematerial der Ersterkrankung verfügbar. In vier dieser Fälle (#4, #5, #15, #17) konnte das verantwortliche Labor nur die Ergebnisse ihres eigenen Screenings mitteilen, da kein Ersterkrankungsmaterial mehr vorhanden war. In einem Fall (#4) konnte KM-Material eines zweiten, isolierten KM-Rezidivs mit ausgewertet werden und in einem anderen Fall (#3) handelte es sich bei den ausgewerteten Proben um das KM-Diagnosematerial, das Material des ersten isolierten KM-Rezidivs und des zweiten, kombinierten Rezidivs.

Von 13 Patienten (#18-27, #32, #34, #35) konnte ausschließlich das Hoden- und KM-Material des kombinierten Rezidivs analysiert werden. In vier weiteren Fällen (#28-30, #33) kam eine KM-Probe eines zweiten Rezidivs hinzu. In einem Fall (#31) war das kombinierte Rezidiv das zweite Rezidiv und eine Probe des ersten, isolierten Rezidivs erweiterte die Auswertung. In einem anderen Fall (#33) wurde eine Blutprobe statt der KM-Probe als Material des 1. Rezidivs verwendet. Damit wurden für diese Arbeit insgesamt 94 Patientenproben, 59 KM-Aspirate und 35 testikuläre Gewebeproben molekulargenetisch untersucht.

In nicht allen Fällen war es möglich, frisches oder gefrorenes Hodengewebe aus den Kliniken nach einer therapeutischen Orchiektomie für die Forschung zu erhalten. In diesen Fällen wurde auf das von den Pathologien gelagerte FFPE Hodengewebe zurückgegriffen, um ein größeres Patientenkollektiv dieser seltenen Erkrankung zu generieren. Von den 35 verwertbaren DNA-

Proben aus den testikulären Leukoblasten stammen 23 aus frischem oder gefrorenem und zwölf aus FFPE Hodengewebe (#10-17, #32-35).

4 Statistik und Darstellung

Die statistische Datenauswertung erfolgte mit dem Programm „IBM SPSS Statistics 21“. Für den Vergleich zweier qualitativer Variablen wurde der exakte Test nach Fisher oder der Chi-Quadrat-Test (2-seitig) angewandt. Bei mehr als zwei qualitativen Variablen kam der Pearson-Chi-Quadrat-Test zur Anwendung. Der Unterschied zweier quantitativer Variablen wurde durch den zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test, der Unterschied dreier quantitativer Variablen durch den Kruskal-Wallis-Test statistisch geprüft. Für den Vergleich der Proportionsverteilung zweier beziehungsweise dreier Gruppen wurde der z-Test angewandt.

Bei allen Analysen wurde das Signifikanzniveau α auf 0,05 gesetzt. Damit können Unterschiede mit einem Signifikanzwert $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen werden.

Die Ergebnisse wurden in Tabellen, Kreis- und Balkendiagrammen sowie mit Hilfe von Fotografien und einem Fließschema dargestellt.

IV Ergebnisse

1 Verwendbarkeit von FFPE Hodenmaterial

Aufgrund der schwankenden DNA-Qualität ist für die Identifizierung von klonalen TCR/IG-Genumlagerungen im PCR-Screening sowie für die quantitative Messung der Genumlagerungen von Zellen aus fixiertem Hodengewebe ein einheitliches Vorgehen mit der extrahierten FFPE DNA notwendig. Zur Messung der DNA-Qualität stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Im Folgenden werden Ergebnisse der Qualitätsbestimmung der FFPE DNA am Lichtspektrometer Nano Drop 1000, durch die β -Globin-Referenzgenquantifizierung mittels Echt-Zeit-PCR und die Fragmentlängenbestimmung in einer Standard-PCR vorgestellt und daraus ein Fließschema zur Verwendbarkeit von FFPE DNA aus Hodengewebe hergeleitet.

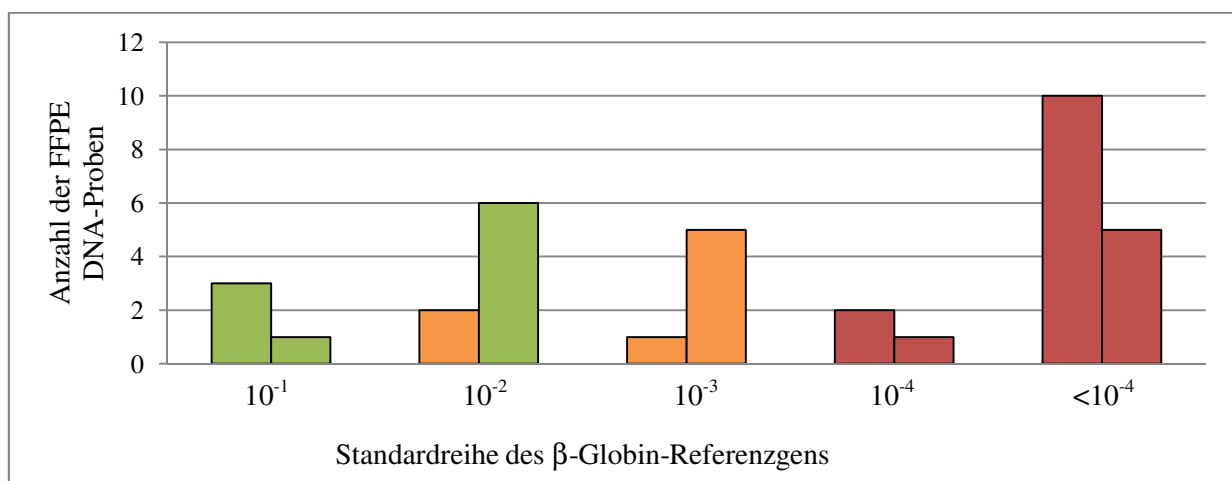
1.1 QUALITÄT DER FFPE DNA

Lichtspektrometer: Die oben beschriebene spektrophotometrische Messung der Verunreinigung und Konzentration der DNA erwies sich für die Bestimmung der DNA-Qualität aus FFPE Hodengewebe (FFPE DNA) als alleinige Methode als nicht zielführend, da die gemessenen Werte mit den Ergebnissen der Quantifizierung des β -Globin Referenzgens mittels Echt-Zeit-PCR nicht übereinstimmten: Obwohl eine optimale OD_{260}/OD_{280} -Ratio von zirka 1,8 ($\pm 0,1$) angezeigt und die Konzentration auf $100\text{ng}/\mu\text{l}$ ($\pm 30\text{ng}/\mu\text{l}$) eingestellt wurde, war es vielfach nicht möglich, das β -Globin-Gen zu quantifizieren. Der Hintergrund für diese oft fälschlicherweise guten Messresultate im Spektrometer ist unklar, dürfte jedoch in Zusammenhang mit der Paraffin induzierten DNA-Verkettung stehen, die im Zuge der Paraffin-Lösung und DNA-Extraktion zu einer Zerstückelung der DNA-Stränge führt. Somit mäße der Spektrophometer kurze, unzusammenhängende DNA-Abschnitte, an denen eingesetzte Primer nicht binden können.

Quantifizierung des β -Globin Referenzgens mittels Echt-Zeit-PCR: Als weitere Methode wurde ein Genabschnitt ($\approx 200\text{bp}$ lang) des β -Globin Genloci unter genannten Standardbedingungen der Echt-Zeit-PCR quantitativ gemessen. Diese DNA-Mengen-Bestimmung unter Berücksichtigung ihrer Amplifizierbarkeit wurde, wie oben beschrieben, mit allen DNA-Proben durchgeführt, um anschließend eine quantitative Aussage über die identifizierten Genumlagerungen treffen zu können. Aus der amplifizierbaren DNA-Menge lassen sich weitere Informationen über die DNA-Qualität schließen. Alle Messungen der DNA-Proben aus KM und frischem/gefrorenem Hoden zeichneten ein einheitliches Bild und wiesen in der Echt-Zeit-PCR einen CT-Wert auf, der stets zwischen denen der unverdünnten (10^0) und 1:10 (10^{-1}) verdünnten Positivkontrolle (BC) lag. Ein anderes Bild ergab sich bei der Auswertung der 18 verfügbaren FFPE DNA-Proben, deren

DNA-Messung im Lichtspektrometer den genannten Kriterien entsprach. Der gemessene β -Globin-Wert variierte extrem. Um inhibitorische Effekte, die die PCR-Reaktion durch die Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung beeinflussen können, zu erkennen und abzuschwächen, wurden alle FFPE DNA-Proben jeweils in originaler Konzentration (im Spektrophometer gemessene 100ng/ μ l) und in Aqua destillatum 1:10 und 1:100 verdünnt gemessen. Dabei zeigte sich bei 12 von 18 Proben eine Inhibition, die falsch niedrige beziehungsweise falsch negative β -Globin-Werte in den unverdünnten Proben hervorbrachte. Die logarithmische Abstufung der 1:100-Verdünnung entsprach dabei aber stets der mathematisch korrekten Folge der Verdünnungsreihe. Das heißt, dass der β -Globin-Wert der 1:10-Verdünnungen 10% der „wahren“ DNA-Mengen widerspiegelt. Das Balkendiagramm in *Abbildung 4* zeigt die gemessenen β -Globin Werte der 18 FFPE DNA Proben. Die Balkenfarben beziehen sich auf das in *Abbildung 6* gezeigte Fließschema und deuten die weitere Verwendbarkeit an. *Tabelle 9* zeigt die gemessenen β -Globin-Werte der zwölf weiter verwendeten und analysierten Patienten, deren Amplifizierbarkeit des β -Globin-Gens mindestens 10^{-3} in der Echt-Zeit-PCR entsprach.

Abbildung 3: *Amplifizierbarkeit des β -Globin-Referenzgens der FFPE DNA-Proben. An der Verteilung ist zu erkennen, dass unbekannte, molekulare Reaktionen die quantitative Messung des Referenzgens in unverdünnten Proben (linker Balken) behindern. Die Farben weisen auf die weitere Verwendbarkeit der DNA hin.*



Legende zur Abbildung 3:

Jede FFPE DNA-Probe ist in der Abbildung in zwei Balken vertreten: Der jeweils linke Balken zeigt das Messergebnis der unverdünnten Probe, der jeweils rechte Balken das der 1:10 verdünnten Probe.

Grün: Proben zum PCR-Screening geeignet. Orange: Proben quantifizierbar. Rot: Proben nicht verwertbar.

Tabelle 9: *β-Globin-Amplifizierungsergebnisse der zwölf weiter analysierten FFPE DNA-Proben.*

Patienten	Amplifizierbarkeit des β-Globins		
	unverdünnt	1:10 Verdünnung	Inhibition
#10	10 ⁻⁴	10 ⁻²	+
#11	nicht messbar	10 ⁻²	+
#12	nicht messbar	10 ⁻¹	+
#13	10 ⁻²	10 ⁻³	-
#14	nicht messbar	10 ⁻³	+
#15	10 ⁻¹	10 ⁻²	-
#16	10 ⁻²	10 ⁻³	-
#17	10 ⁻²	10 ⁻²	+
#32	nicht messbar	10 ^{-1,5}	+
#33	10 ⁻⁴	10 ⁻³	+
#34	nicht messbar	10 ⁻³	+
#35	10 ⁻²	10 ⁻²	+

β-Globin PCR zur Fragmentlängenbestimmung: Um die Integrität der DNA und damit die möglichen Fragmentlängen, die sicher amplifiziert werden können, zu erfassen, wurden die in *Tabelle 7* aufgelisteten Primer entworfen. Diese binden an die β-Globin Gensequenz und dienen der Amplifikation von Fragmenten unterschiedlicher Längen. Die PCR-Bedingungen entsprechen den für die TCR-α Familie in *Tabelle 3* beschriebenen.

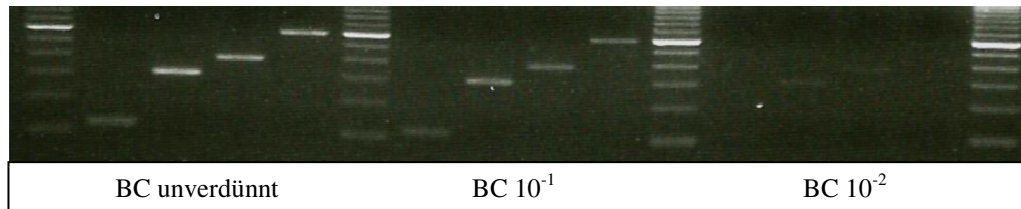
Tabelle 10: *Entworfene Primer zur β-Globin Fragmentlängenbestimmung der extrahierten FFPE DNA*

Element	Genort	Primer	Sequenz	Fragmentlänge
β-Globin	11p15	β-Globin forward	5'-CTGACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'	(consensus)
		β-Globin reverse 100	5'-CCAACCTTCATCCACGTTTAC-3'	120bp
		β-Globin reverse 300	5'-CAAAGGACTCAAAGAACCTCTG-3'	300bp
		β-Globin reverse 400	5'-CCATCACTAAAGGCACCG-3'	400bp
		β-Globin reverse 600	5'-GTCTGTTTCCCATCTAAACTG-3'	600bp

Abbildung 4 zeigt das Ergebnis einer Gelelektrophorese (2%igen Agarose). Buffy Coat (BC) wurde als Positivkontrolle verwendet. Eindeutig erkennbar sind die positiven Banden bei unverdünntem BC (100ng DNA vor Amplifizierung eingesetzt) und bei einer 1:10 Verdünnung

des BCs (10ng DNA vor Amplifizierung eingesetzt). Die Nachweisgrenze und damit die Sensitivität der Methode ist bei einer Verdünnung der Positivkontrolle von 1:100 (1ng DNA vor Amplifizierung eingesetzt) überschritten. An dieser Stelle sind nur zwei schwache Banden mit einer Länge von 300 und 400 Basenpaaren erkennbar.

Abbildung 4: Sensitivitätstest der β -Globin Primer mit BC (Positivkontrolle)



Aus diesem Sensitivitätstest folgte, dass alle FFPE DNA-Proben, deren Amplifizierbarkeit des β -Globin-Gens entweder 10^{-1} in verdünnten beziehungsweise unverdünnten Proben oder 10^{-2} in den verdünnten Proben ergab, auf ihre Fragmentlängen getestet werden konnten. Dabei wurde unabhängig von vorhandener Inhibition stets die unverdünnte Originallösung eingesetzt, da sich zeigte, dass der Einfluss der Inhibition nicht auf die Standard-PCR übertragbar ist. *Tabelle 11* zeigt die Ergebnisse der β -Globin PCRs zur Fragmentlängenbestimmung der sieben qualifizierten Patienten.

Tabelle 11: Amplifizierbare Fragmentlängen (Standard-PCR) der sieben FFPE DNA-Proben, die zuvor eine ausreichende Amplifizierbarkeit des β -Globin-Gens in der Echt-Zeit-PCR aufwiesen.

Patient	Fragmentlänge				Legende zu Tabelle 11:
	120bp	300bp	400bp	600bp	
#10	+	+	+	+	+ $\hat{=}$ positiv
#11	+	+	+	+	(+) $\hat{=}$ schwach positiv
#12	+	+	+	+	- $\hat{=}$ negativ
#15	+	+	+	+	
#17	+	(+)	-	-	
#32	+	+	(+)	-	
#35	+	+	+	+	

1.2 SENSITIVITÄT DES STANDARD-SCREENINGS

Die im Standard-Screening verwendeten Primer wurden auf ihre Sensitivität hin getestet, um für den Einsatz von FFPE DNA im Standard-Screening die erforderliche Amplifizierbarkeit zu

definieren. So wurde statt der Patientenproben eine Verdünnungsreihe der Positivkontrollen in BC von 10^0 bis 10^{-3} eingesetzt und nach den oben beschriebenen Standardbedingungen amplifiziert sowie mit der beschriebenen Agarose- und zur Homo-Heteroduplexanalyse verwendeten Polyakrylamid-Gelelektrophorese dargestellt. Die Ergebnisse fassen *Tabellen 12* und *13* zusammen.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese inklusive der beschriebenen Silbernitratfärbung stellte sich im Vergleich zur Agarose-Gelelektrophorese als sensitiver heraus, positive DNA-Banden hervorzuheben. Die Banden der Rearrangement-Familien Ig κ , IG V_HJ_H , IG D_HJ_H und TCR γ waren im Agarose-Gel in vielen Fällen begleitet von einer „verschmierten“ BC-Bande. Je höher die Verdünnung, das heißt je weniger Positivkontrolle im Verhältnis zum BC in der eingesetzten Lösung war, desto geringer wurde der Unterschied zwischen einem fraglich positivem Ergebnis und der BC-Bande. Als Beispiel dient *Abbildung 5*.

Zusammengefasst beträgt die Sensitivität der Methode in den meisten Fällen 10^{-1} . Einzel-PCR-Produkte haben eine höhere Nachweisgrenze als die der Multiplex. Eine Besonderheit bilden die TCR-Familien bei der Agarose-Gelelektrophorese. Hier sind zum Teil auch in den Einzel-PCRs nur unverdünnte Positivkontrollen eindeutig nachweisbar. Dahingegen zeugt die Nachweisbarkeit der 1:10-Verdünnungen unter Verwendung des Polyacrylamid-Gels für die Überlegenheit dieser aufwendigeren und kostenintensiveren Methode.

Table 12: Sensitivität der Screening-PCRs mit Agarose-Gelelektrophorese:

Genloci		Sensitivität				
Rearrangement-Familie	Rearranement	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	BC
Ig κ	Ig κ1	+	+	-	-	-
	Ig κ2	+	+	-	-	-
	Ig κ3	+	+	-	-	-
	Ig κ4	+	+	-	-	-
	Ig κi	+	+	-	-	-
Ig V _H J _H	VH1/7	+	((+))	-	-	-
	VH2	+	(+)	-	-	-
	VH3	+	+	-	-	-
	VH4/6	+	+	-	-	-
	VH5	+	+	-	-	-
	VH6	+	+	((+))	-	-
Ig D _H J _H	DH1	+	+	((+))	-	-
	DH2	+	(+)	-	-	-
	DH3	+	+	-	-	-
	DH4	+	(+)	-	-	-
	DH5	+	+	-	-	-
	DH6	+	+	((+))	-	-
TCR α	V2Jα54	+	+	+	(+)	-
	V2Jα29, 48	+	+	+	((+))	-
	V2Jα9	+	+	(+)	((+))	-
	V2Jα30, 55, 58, 61	+	+	(+)	-	-
TCR δ (Multiplex)	V2D3	+	-	-	-	-
	V1JD12	+	(+)	-	-	-
	V3JD12	+	(+)	-	-	-
	D2D3	+	(+)	-	-	-
	V2JD12	+	(+)	((+))	-	-
	D2JD12	+	-	-	-	-
TCR δ (Einzel-PCR)	V3JD12	+	+	-	-	-
	V2D3	+	((+))	-	-	-
	V1JD12	+	+	(+)	-	-
	D2D3	+	+	-	-	-
	V2JD12	+	(+)	-	-	-
	D2JD12	+	+	-	-	-
TCR γ (Multiplex)	V1JG1/2	(+)	-	-	-	-
	V11JG1/2	+	(+)	-	-	-
	V9JG1/2	+	-	-	-	-
	V10JG1/2	+	-	-	-	-
	V1JP12	+	-	-	-	-
	V9JP12	+	((+))	-	-	-
	V10Jp12	+	((+))	-	-	-
	V11JP12	+	(+)	-	-	-
TCR γ (Einzel-PCR)	V11JG1/2	+	(+)	-	-	-
	V9JG1/2	+	+	(+)	-	-
	V10JG1/2	+	-	-	-	-
	V1JP12	+	-	-	-	-
	V9JP12	+	(+)	-	-	-
	V10Jp12	+	-	-	-	-
	V11JP12	+	(+)	-	-	-
	V1JG1/2	+	-	-	-	-

Legende zu Tabelle 12:

+ ≙ positiv

(+) ≙ schwach positiv

((+)) ≙ fraglich positiv

[Stippled Box] ≙ BC

Tabelle 13: Sensitivität der Screening-PCRs mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Genloci		Sensitivität				
Rearrangement-Familie	Rearrangement	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Ig κ	Ig κ1	+	+	(+)	-	-
	Ig κ2	+	+	(+)	-	-
	Ig κ3	+	+	(+)	-	-
	Ig κ4	+	+	((+))	-	-
	Ig κi	+	+	-	-	-
Ig V _H J _H	VH1/7	+	+	-	-	-
	VH2	+	+	-	-	-
	VH3	+	+	((+))	-	-
	VH4/6	+	+	-	-	-
	VH5	+	+	-	-	-
	VH6	+	+	((+))	-	-
Ig D _H J _H	DH1	+	+	(+)	-	-
	DH2	+	(+)	((+))	-	-
	DH3	+	+	(+)	-	-
	DH4	+	(+)	(+)	-	-
	DH5	+	+	+	-	-
	DH6	+	+	(+)	-	-
TCR α	V2Jα54	+	+	+	+	-
	V2Jα29, 48	+	+	+	+	-
	V2Jα9	+	+	+	+	-
	V2Jα30, 55, 58, 61	+	+	((+))	-	-
TCR δ (Multiplex)	V2D3	+	((+))	-	-	-
	V1JD12	+	(+)	-	-	-
	V3JD12	+	(+)	-	-	-
	D2D3	+	(+)	-	-	-
	V2JD12	+	+	-	-	-
	D2JD12	+	(+)	-	-	-
TCR δ (Einzel-PCR)	V3JD12	+	+	-	-	-
	V2D3	+	+	-	-	-
	V1JD12	+	+	-	-	-
	D2D3	+	+	+	-	-
	V2JD12	+	+	((+))	-	-
	D2JD12	+	+	-	-	-
TCR γ (Multiplex)	V1JG1/2	+	-	-	-	-
	V11JG1/2	+	(+)	-	-	-
	V9JG1/2	+	(+)	-	-	-
	V10JG1/2	+	-	-	-	-
	V1JP12	+	-	-	-	-
	V9JP12	+	(+)	-	-	-
	V10Jp12	+	-	-	-	-
	V11JP12	+	(+)	-	-	-
TCR γ (Einzel-PCR)	V11JG1/2	+	+	((+))	-	-
	V9JG1/2	+	+	(+)	-	-
	V10JG1/2	+	+	-	-	-
	V1JP12	+	+	-	-	-
	V9JP12	+	+	((+))	-	-
	V10Jp12	+	(+)	-	-	-
	V11JP12	+	+	-	-	-
	V1JG1/2	+	((+))	-	-	-

Legende zu Tabelle 13:

+ ≙ positiv

(+) ≙ schwach positiv

((+)) ≙ fraglich positiv


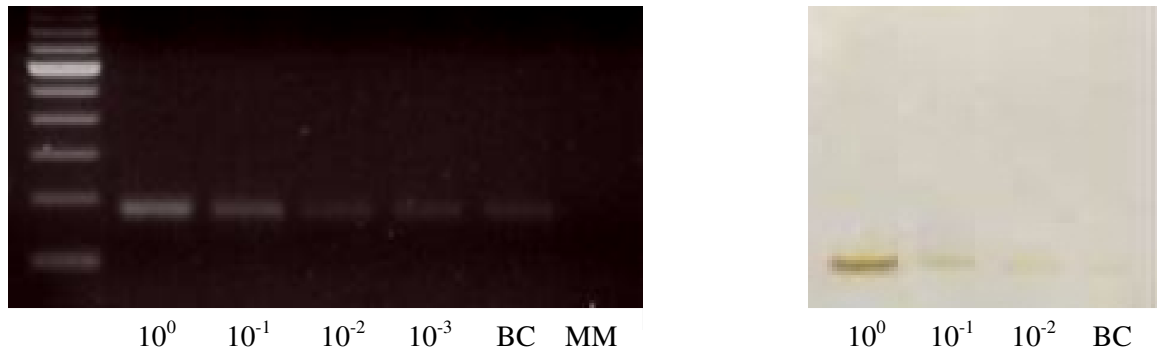
 ≙ BC

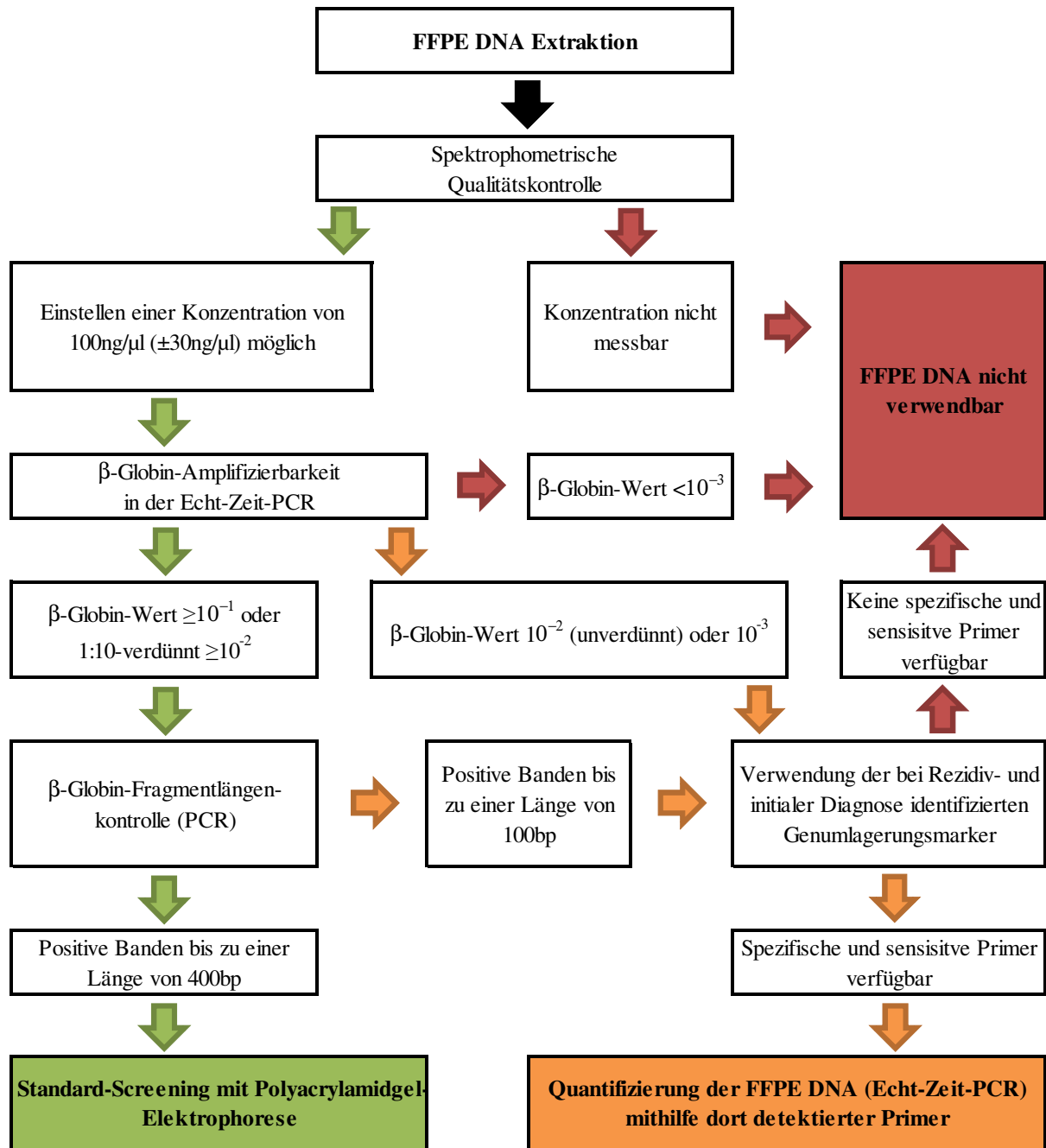
Abbildung 5: Vergleich der Sensitivität von Agarosegel und Polyacrylamidgel. Die unverdünnte Bande des Markers V9JP12 (TCR γ) ist nach Agarose-Gelelektrophorese (links) im UV-Licht eindeutig positiv. Aber schon die 1:10-Verdünnung mit BC lässt nur noch einen schwachen Unterschied erkennen. Im Gegensatz dazu erscheint die Bande der 1:10-Verdünnung auf dem Polyacrylamidgel (rechts) leichter abzugrenzen. Es lässt sich sogar eine fragliche Bande der 1:100-Verdünnung (10^{-2}) erkennen.



1.3 EINSATZ DES FFPE HODENMATERIALS

Da die Qualität der FFPE DNA stark variiert und es, wie oben beschrieben, bei manchen Proben inhibitorische Effekte auf die PCR-Amplifizierung gibt, war es nötig, den Einfluss der Fixation auf nachfolgende molekulargenetische Verfahren zu untersuchen. Aus den Ergebnissen und Konsequenzen der oben beschriebenen Versuche konnte ein einheitliches Fließschema entwickelt werden, das den Einsatz des FFPE Hodenmaterials abhängig von DNA-Konzentration, Amplifizierbarkeit und Fragmentlänge festlegt und vereinheitlicht. *Abbildung 6* präsentiert das Ergebnis dieser Bestrebung. Es zeigt, dass abhängig von der Qualität der FFPE DNA entweder ein (1) Standard-Screening nach klonalen TCR/IG Genumlagerungen mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt werden kann, (2) die Identität von Genumlagerungen in testikulären Leukoblasten in einer Echt-Zeit-PCR mithilfe von entworfenen Primern aus dem KM des Patienten bestimmt werden können oder (3) die FFPE DNA nicht verwendbar ist. Entscheidungspunkte sind die spektrophotometrische Konzentrationsmessung, die Amplifizierbarkeit durch Quantifizierung des β -Globin-Referenzgens mittels Echt-Zeit-PCR und die Fragmentlängenkontrolle.

Abbildung 6: Fließschema zur Verwendbarkeit von FFPE DNA.



2 Beschreibung des Patientenkollektives

Das Alter der 35 Jungen betrug bei Diagnose der Ersterkrankung im Median 4,5 Jahre (0-16 Jahre). Der Altersmedian zum Zeitpunkt des Hodenrezidivs lag bei 8,3 Jahren (1-19 Jahre).

Tabelle 14: *Klinische Parameter des Patientenkollektivs*

Parameter	Kategorie	n
Alter bei Erstdiagnose	<5 Jahre	19-54%
	5 - 10 Jahre	3-9%
	≥10 Jahre	13-37%
Alter Rezidivdiagnose	<5 Jahre	5-14%
	5 - 10 Jahre	14-40%
	≥10 Jahre	16-46%
Zeitpunkt	sehr früh	3-9%
	früh	14-40%
	spät	18-51%
Immunphänotyp	0-ALL	1-3%
	c-ALL	22-69%
	prä-T-ALL	2-6%
	prä-B-ALL	6-19%
	kortik. T-ALL	1-3%
	keine Angabe	3-/
<i>TEL/AML-1</i>	negativ	19-61%
Transfusionsgen (nur BCP-ALL)	positiv	12-39%
	keine Angabe	1-/
periphere Blastenzahl	0-100/μl	20-61%
	>100/μl	13-39%
	keine Angabe	2-/
Protokoll	ALL-REZ BFM 96	9-26,5%
	ALL-REZ BFM 02	25-73,5%
	keine Angabe	2-/
Klonalität	monoklonal	24-68,5%
	oligoklonal	10-28,5%
	polyklonal	1-3%

Der Rezidivzeitpunkt war überwiegend spät: Vier Jungen (11,1%) erkrankten an einem sehr frühen, 43 (38,9%) an einem frühen und 18 Jungen (50,0%) an einem späten kombinierten Hodenrezidiv. Die Dauer zwischen initialer Diagnose und Rezidivdiagnose betrug im Median

2,5 Jahre (25. Perzentile: 2,3 Jahre, 75. Perzentile: 3,5 Jahre). Bei vier Jungen (11,1%) wurde eine ZNS-Beteiligung bei Diagnose des kombinierten Hodenrezidivs festgestellt. Der Großteil der Patienten (n=30, 83,3%) wurde in die Strategieguppe 2 eingeteilt. Die drei Jungen mit sehr frühem Rezidiv (#3, #26, #27) sowie zwei weitere Patienten mit T-ALL (#5, #11) wurden in die Hochrisikogruppe S4 stratifiziert. Weitere klinische Daten fasst *Tabelle 14* zusammen.

3 Häufigkeit der Genumlagerungen

318 klonale Genumlagerungen wurden im PCR-Screening in 94 Patientenproben identifiziert. Das Kreisdiagramm in *Abbildung 7* zeigt die Häufigkeitsverteilung der sieben Rearrangement-Familien. Durchschnittlich konnten pro Patient 4,4 Marker detektiert werden. In der einzelnen DNA-Probe konnten insgesamt 3,6 (0-8) Genumlagerungsmarker im Durchschnitt gefunden werden. Die Analysen der KM-Proben der Initialdiagnose und des kombinierten Rezidivs brachten beide 3,5 Marker (1-7 beziehungsweise 0-7) und der aus dem Hoden isolierten Blasten durchschnittlich 3,7 (0-8) Marker hervor. Wertet man die auf MRD-Niveau unter 10^{-2} gemessenen subklonalen IG- und TCR-Genumlagerungen als negativ, wurden in den Proben der Initialdiagnose durchschnittlich 3,3 (1-7), im KM des kombinierten Rezidivs 3,3 (0-7) und im Hoden 3,7 (0-7) Marker identifiziert. Während bei den Ersterkrankungen von 65 identifizierten Markern fünf subklonal gemessen werden konnten (8%) und im KM des Rezidivs von 124 zehn subklonale Genumlagerungen vorlagen (8%), waren es im Hoden zwei bei insgesamt 129 Markern (1,5%). Eine mediane Markerzahl von 3,0 wurde in den Proben der Initialdiagnosen gefunden unter der Annahme, dass nur die hauptklonalen Marker zählen. Dahingegen waren es im Median 3,5 Marker für den Fall, dass subklonale Marker miteingefasst wurden. In den Proben des kombinierten Rezidivs betrug die mediane Anzahl der IG- und TCR-Genumlagerungen hauptklonal und subklonal jeweils 3,0 Marker. *Abbildung 8* bringt überblicksartig die Anzahl der Proben mit der jeweiligen Markeranzahl in Verbindung. Die Auswertung wurde an dieser Stelle nach Erkrankungsstadium und Entnahmeort differenziert. In DNA-Proben der Initialdiagnose wurden in allen Fällen mindestens ein und in 89% mindestens zwei Marker gefunden. Die KM-Analyse des kombinierten Rezidivs fiel mit 92% beziehungsweise 83% niedriger aus. In den Hodenproben, die die oben genannten Qualitätskriterien erfüllten, wurden im PCR-Screening in 97% mindestens ein und in 86% mindestens zwei klonale Genumlagerungen detektiert. Die Balkendiagramme in *Abbildung 9 bis 11* beziehen sich mit ihrer Auswertung der Frequenz der Genumlagerungen ausschließlich auf BCP-ALL-Patienten. Sie zeigen, dass am häufigsten mindestens eine Genumlagerung aus der IG V_{HJH} - und TCR γ -Familie identifiziert werden

konnte. Dagegen finden sich in 100% der vier T-ALL-Patientenproben mit T-ALL mindestens ein Marker der TCR β - und TCR γ -Familie.

Abbildung 7: Inzidenz aller identifizierten IG- und TCR-Genumlagerungen. Die 318 im PCR-Screening identifizierten Marker verteilen sich zu 50% auf IG- und zu 50% auf TCR-Genumlagerungen.

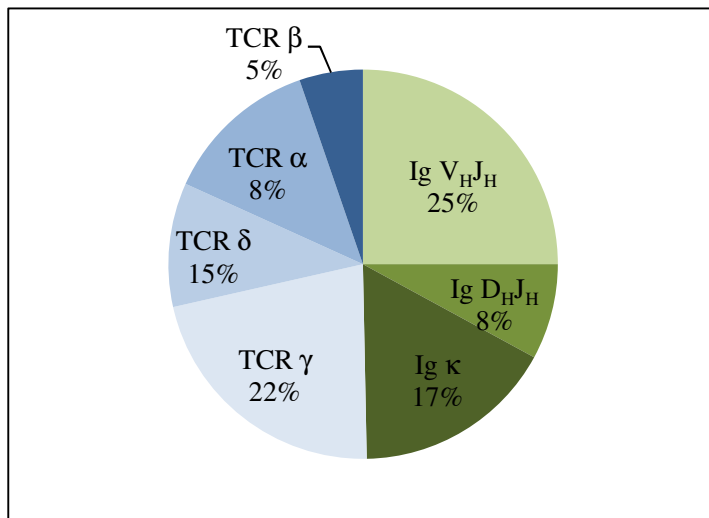


Abbildung 8: Anzahl identifizierter Genumlagerungen pro analysierter DNA-Probe.

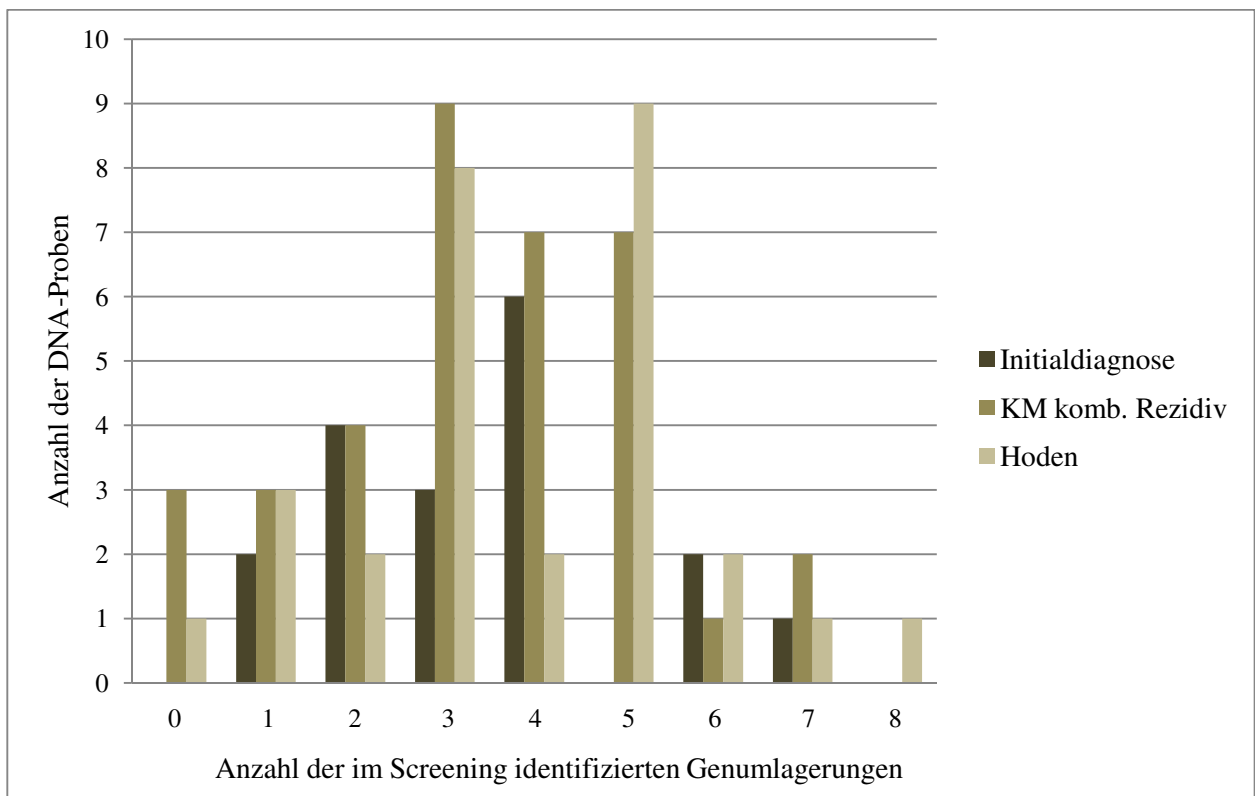


Abbildung 9: Diese Auswertung bezieht sich auf BCP-ALL Proben der Initialdiagnose (n=15). Das Diagramm zeigt den Anteil der Proben, in denen mindestens eine entsprechende Genumlagerung identifiziert werden konnte.

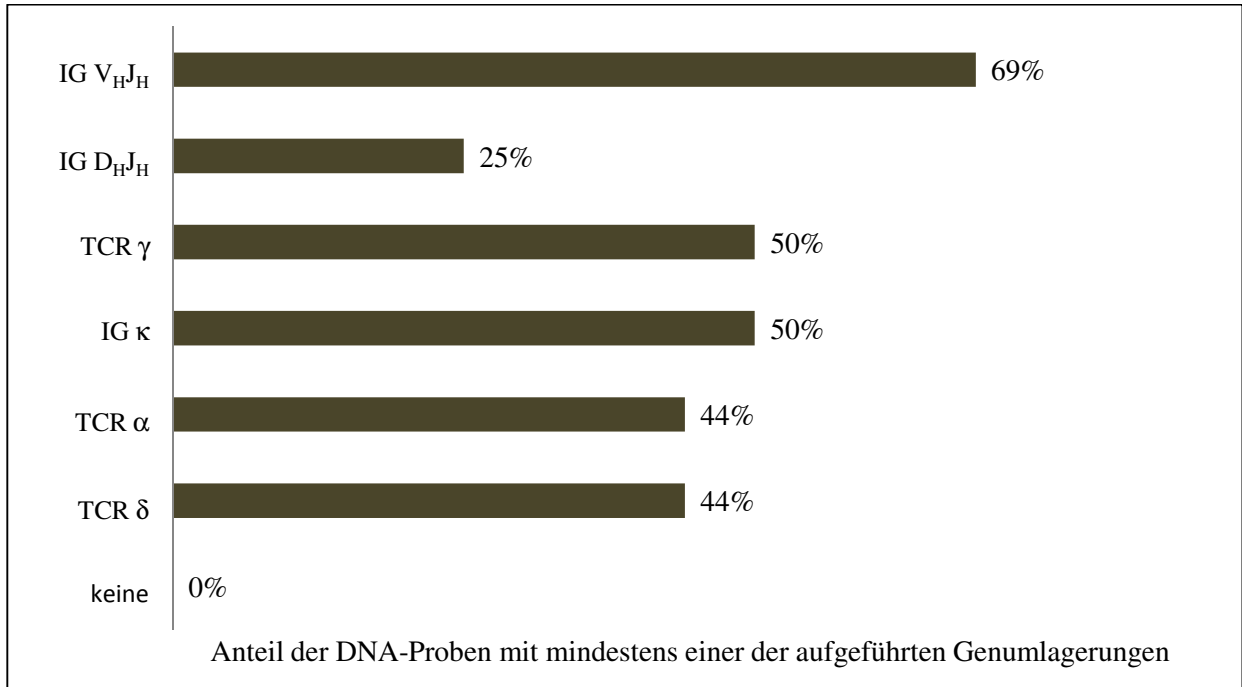


Abbildung 10: Diese Auswertung bezieht sich auf BCP-ALL Proben des KMs des kombinierten Rezidivs (n=32). Das Diagramm zeigt den Anteil der Proben, in denen mindestens eine entsprechende Genumlagerung identifiziert werden konnte.

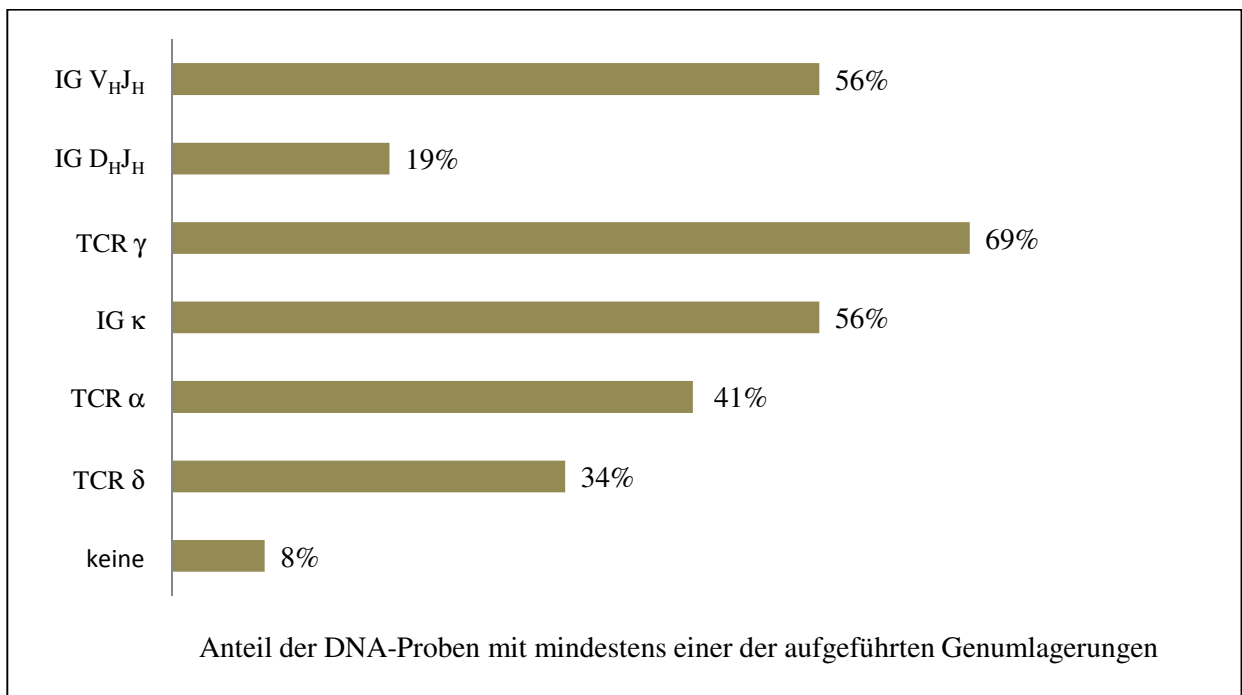
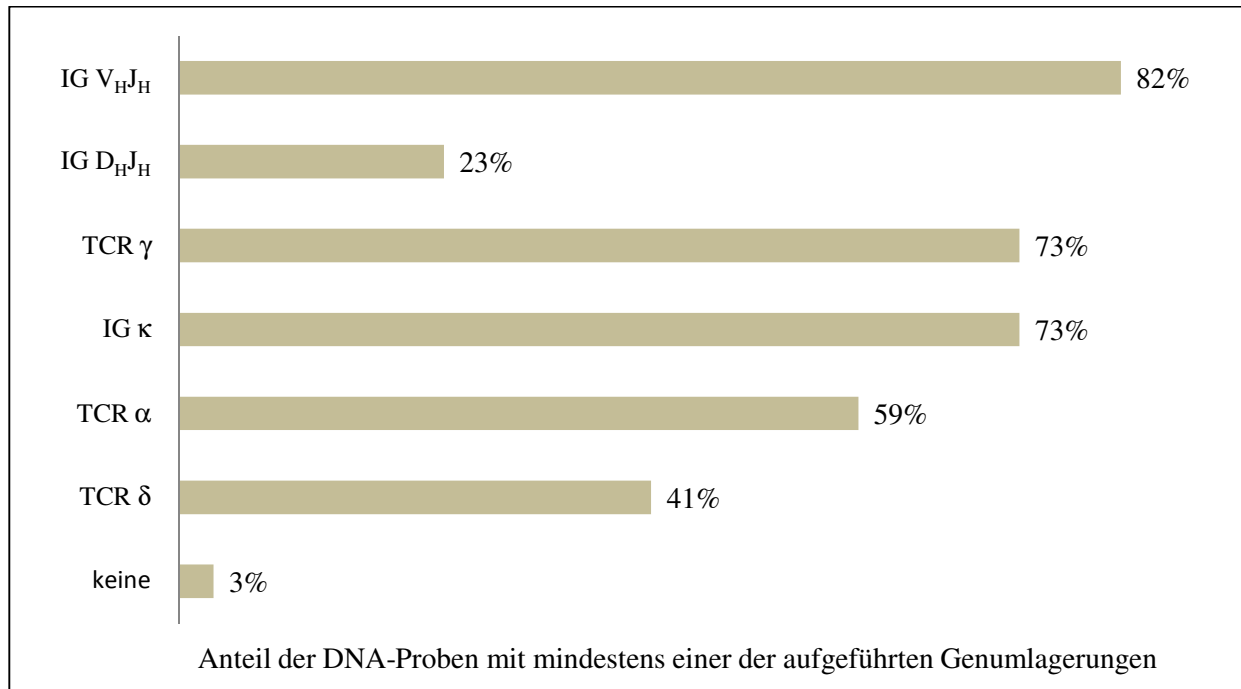


Abbildung 11: Diese Auswertung bezieht sich auf BCP-ALL Proben des Hodens ($n=29$). Das Diagramm zeigt den Anteil der Proben, in denen mindestens eine entsprechende Genumlagerung identifiziert werden konnte.



4 Ergebnisse des PCR-Screenings und der Echt-Zeit-Quantifizierung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Fälle vorgestellt. Die Übersichten „*Patient #1*“ bis „*Patient #35*“ präsentieren die klonalen IG- und TCR-Genumlagerungsmuster, die sich aus der molekulargenetischen Untersuchung des KMs der Initialdiagnose, des KMs des ersten oder zweiten kombinierten Hodenrezidivs sowie weiterer KM-Proben ergeben. In einigen Fällen weist die Abkürzung „n.a.“ (nicht analysierbar) darauf hin, dass keine ausreichend spezifischen beziehungsweise sensitiven Primer entworfen werden konnten, um das negative Screening-Ergebnis zu quantifizieren. War eine Genumlagerung nicht messbar, wurde der Bereich unter der Sensitivitätsgrenze als wahre Aussage mitaufgenommen. Ein „+“ steht für ein positives, ein „-“ für ein negatives Screening-Ergebnis. In den Fällen, in denen die FFPE DNA in der β -Globin Referenzgenbestimmung 1:10 verdünnt einen Wert von beispielsweise 10^{-2} und 1:100 verdünnt einen Wert von 10^{-3} hatte und ein Genumlagerungsmarker in der quantitativen Echt-Zeit-PCR - es wurde bei vorhandener Inhibition die 1:10 Verdünnung eingesetzt - dann bei 10^{-3} gemessen wurde, ist in den folgenden Übersichten der geschlossene Wert 10^{-1} zu finden.

Patient #1: TEL/AML-1 positive c-ALL und spätes Rezidiv. 25% Blastenanteil im KM des 1. Rezidivs.

#1		VH3DH6JH4	VκII-kde	VκIV-kde	Vg1Jg1/2	Vg9Jg1/2	V2D3Jα58	V2D3Jα29	V2D3
Initialdiagnose	KM	+	+	+	+	+	+	<10 ⁻²	+
1. Rezidiv	KM	+	+	+	+	+	10 ⁻²	+	+
	Hoden, frisch	+	+	+	+	+	+	10 ⁻¹	+

Patient #2: Prä-B-ALL, frühes Rezidiv und ZNS-Beteiligung. 96% Blastenanteil im KM des 1. Rezidivs.

#2		VκII-kde	Vg1Jp1/2	Vg1Jg1/2	V2D3Jα54
Initialdiagnose	KM	+	+	10 ⁻⁴	+
1. Rezidiv	KM	+	+	+	+
	Hoden, frisch	+	+	+	+

Patient #3: Prä-B-ALL und sehr frühes Rezidiv. 37% Blastenanteil im KM des 2. Rezidivs.

#3		VH3DH6JH3	VH3DH2JH4	Vki-kde	V2D3	V2D3Jα58	V2D3Jα48	V2Jα29
Initialdiagnose	KM	+	+	n.a.	+	<10 ⁻⁴	<10 ⁻³	+
1. Rezidiv	KM	+	+	n.a.	+	+	10 ⁻²	n.a.
2. Rezidiv	KM	+	+	n.a.	+	+	10 ⁻²	n.a.
	Hoden, frisch	+	+	+	+	+	+	n.a.

Patient #4: *c-ALL und frühes Rezidiv. Es waren nur die initialen Marker, kein KM-Material verfügbar. 6% Blasten im KM des 1. Rezidivs.*

#4		VH1DH3JH4	VH2DH5JH4	Vg1Jg1/2 (1)	Vg1Jg1/2 (2)	V2Jα29
Initialdiagnose	KM	+	+	-	-	-
1. Rezidiv	KM	<10 ⁻³	<10 ⁻⁴	n.a.	<10 ⁻³	<10 ⁻³
	Hoden, frisch	+	+	+	+	+
2. Rezidiv	KM	+	+	+	+	+

Patient #5: *Kortikale T-ALL und frühes Rezidiv. Nur initiale Marker, kein KM-Material verfügbar. 34% Blasten im KM des 1. Rezidivs.*

#5		Vg1Jg1/2	Vβ5Jβ1.1	Dβ2Jβ2.2
Initialdiagnose	KM	-	+	+
1. Rezidiv	KM	10 ⁻¹	+	+
	Hoden, frisch	+	+	+

Patient #6: *TEL/AML-1 positive c-ALL und spätes Rezidiv. 94% Blasten im KM des 1. Rezidivs.*

#6		VH6DH2JH6	Vg9Jg1/2	Vg1Jg1/2	V2D3	V2D3Jα29
Initialdiagnose	KM	+	<10 ⁻³	+	+	+
1. Rezidiv	KM	+	<10 ⁻³	+	+	+
	Hoden, frisch	+	+	+	+	+

Patient #7: TEL/AML-1 positive c-ALL und spätes Rezidiv. KM-Material der Initialdiagnose wurde aufgebraucht. 91% Blasten im KM des 1. Rezidivs.

#7		VH3DH6JH6	VH4DH7JH6	VH4JH5	VκII-κde	Vg9Jg1/2	Vg1Jg1/2	V2D3	V2D3Jα30
Initialdiagnose	KM	10 ⁻⁴	+	+	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	+	+	10 ⁻⁴
1. Rezidiv	KM	+	-	-	+	+	-	-	+
	Hoden, frisch	+	-	-	+	10 ⁻⁴	-	-	+

Patient #8: TEL/AML-1 positiver c-ALL und spätem Rezidiv. 94% Blasten im KM des 1. Rezidivs.

#8		Vκi-κde	Vg1Jg1/2	V2D3Jα29
Initialdiagnose	KM	+	+	+
1. Rezidiv	KM	+	+	+
	Hoden, frisch	+	+	+

Patient #9: c-ALL und spätes Rezidiv. 59% Blasten im KM des 1. Rezidivs.

#9		DH3JH4	DH5JH4
Initialdiagnose	KM	polyklonal	1
1. Rezidiv	KM	polyklonal	n.a.
	Hoden, frisch	polyklonal	n.a.

Patient #10: *c-ALL und frühes Rezidiv mit ZNS-Beteiligung. FFPE DNA war für das PCR-Screening geeignet. 15% Blasten im KM des 1. Rezidivs.*

#10		VH4JH4	VH2JH6	V κ i- κ de	V2D3 (1)	V2D3 (2)	D β 2J β 2.7
Initialdiagnose	KM	+	+	+	+	+	+
1. Rezidiv	KM	10^{-3}	10^{-3}	+	$<10^{-3}$	$<10^{-3}$	$<10^{-4}$
	Hoden, FFPE	+	+	n.a	+	+	+

Patient #11: *Prä-T-ALL und frühes Rezidiv. FFPE DNA war für das PCR-Screening geeignet. 98% Blasten im KM des 1. Rezidivs.*

#11		Vg1Jg1/2	V β 2D β 1.2	V β 10J β 1.2	D β 2J β 2.7
Initialdiagnose	KM	+	+	+	+
1. Rezidiv	KM	+	+	+	+
	Hoden, FFPE	+	+	+	+

Patient #12: *TEL/AML-1 positive 0-ALL und spätes Rezidiv. FFPE DNA war für das PCR-Screening geeignet. 88% Blasten im KM des 1. Rezidivs.*

#12		VHDH2JH6	V2D3J α 29
Initialdiagnose	KM	+	$<10^{-4}$
1. Rezidiv	KM	+	+
	Hoden, FFPE	+	+

Patient #13: *c-ALL und spätes Rezidiv mit ZNS-Beteiligung. FFPE DNA war für die Quantifizierung geeignet. 79% Blasten im KM des 1. Rezidivs.*

#13		DH2JH5	V2D3 (1)	V2D3 (2)	Vd2Jd1/2
Initialdiagnose	KM	+	+	+	+
1. Rezidiv	KM	+	+	+	+
	Hoden, FFPE	10 ⁰	n.a.	n.a.	n.a.

Patient #14: *c-ALL und spätes Rezidiv. FFPE DNA war für die Quantifizierung geeignet. 95% Blasten im KM des 1. Rezidivs.*

#14		VκII-kde	VκI-kde	Vg2Jg1/2
Initialdiagnose	KM	+	+	+
1. Rezidiv	KM	+	+	+
	Hoden, FFPE	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁰

Patient #15: *c-ALL und spätes Rezidiv. FFPE DNA war für das PCR-Screening geeignet. Es waren nur die initialen Marker, dahingegen kein KM-Material verfügbar. 95% Blasten im KM des 1. Rezidivs.*

#15		VH3DH4JH4	VH4DH2JH5	VκIII-kde	Vg9Jg1/2	Vg9Jp1/2	V2D3
Initialdiagnose	KM	+	+	+	+	+	+
1. Rezidiv	KM	<10 ⁻⁴	<10 ⁻³	<10 ⁻⁴	n.a.	n.a.	n.a.
	Hoden, FFPE	+	+	+	n.a.	n.a.	n.a.

Patient #16: TEL/AML-1 positive prä-B-ALL und spätes Rezidiv. FFPE DNA war für die Quantifizierung geeignet. 95% Blasten im KM des 1. Rezidivs.

#16		VκI-κde	Vg1Jg1/2	V2Jα29
Initialdiagnose	KM	+	n.a.	+
1. Rezidiv	KM	+	+	+
	Hoden, FFPE	>10 ⁰	n.a.	10 ⁻¹

Patient #17: c-ALL und spätes Rezidiv. FFPE DNA war für die Quantifizierung geeignet. Es waren nur die initialen Marker, dahingegen kein KM-Material verfügbar. 95% Blasten im KM des 1. Rezidivs.

#17		VH3DH6JH1	DH7JH4	DH3JH5
Initialdiagnose	KM	+	+	-
1. Rezidiv	KM	+	+	+
	Hoden, FFPE	10 ⁰	n.a.	10 ⁰

Patient #18: TEL/AML-1 positive BPC-ALL und spätes Rezidiv. 57% Blasten im KM des 1. Rezidivs.

#18		Vg1Jg1/2	Vg1Jp1/2	V2D3Jα29
1. Rezidiv	KM	+	+	+
	Hoden, frisch	+	+	+

Patient #19: TEL/AML-1 positive c-ALL und spätes Rezidiv. 72% Blasten im KM.

#19		VH1JH5JH4	VH3JH4	VκIV-κde	Vg9Jg1/2	V2D2Jα29
1. Rezidiv	KM	+	+	+	+	+
	Hoden, frisch	+	+	+	+	+

Patient #20: TEL/AML-1 positive c-ALL und frühes Rezidiv. 13% Blasten im KM.

#20		VH4DH2JH4	VκII-κde	VκI-κde	Vg1Jg1/2	V2D3
1. Rezidiv	KM	+	+	+	+	+
	Hoden, frisch	+	+	+	+	+

Patient #21: c-ALL und frühes Rezidiv. 23% Blasten im KM.

#21		VH4DH2JH4	VH1DH2JH6	DH2JH6	VκI-κde	Vg9Jg1/2	V2Jα53	V2D3
1. Rezidiv	KM	+	+	+	+	+	+	+
	Hoden, frisch	+	<10 ⁻³	+	+	+	+	+

Patient #22: Keine Angabe zum Immunphänotyp. Spätes Rezidiv. 98% Blasten im KM.

#22		VH3JH6	VH4DH1JH2	VκII-κde	VκI-κde	Vg9Jp1/2
1. Rezidiv	KM	+	+	+	+	+
	Hoden, frisch	+	+	+	+	+

Patient #23: TEL/AML-1 positive ALL und spätes Rezidiv. Keine Angabe zum Immunphänotyp. 9% Blasten im KM.

#23		VH3JH6	VκI-κde	Vg9Jg1/2
1. Rezidiv	KM	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
	Hoden, frisch	+	+	+

Patient #24: TEL/AML-1 positive prä-B-ALL und spätes Rezidiv. 21% Blasten im KM.

#24		V2D3	Vg9Jg1/2
1. Rezidiv	KM	+	+
	Hoden, frisch	+	+

Patient #25: c-ALL und sehr frühes Rezidiv. Keine Angabe zum Vorliegen eines TEL/AML-1-Fusiongens. 16% Blasten im KM.

#25		DH2JH5	DH2JH6	VκII-κde	Vκi-κde	V2D3
1. Rezidiv	KM	+	+	+	+	+
	Hoden, frisch	+	+	+	+	+

Patient #26: Prä-T-ALL und sehr frühes Rezidiv. 21% Blasten im KM.

#26		DH1JH4	Vg1Jg1/2	Vg11Jg1/2	V1Jd12	Vβ28Jβ2.7
1. Rezidiv	KM	+	+	+	+	+
	Hoden, frisch	+	+	+	+	+

Patient #27: *c-ALL und frühes Rezidiv. 10% Blasten im KM.*

#27		VH1DH1JH4	VκII-κde
1. Rezidiv	KM	+	+
	Hod. li, frisch	10^{-1} - 10^{-2}	+
	Hod. re, frisch	+	+

Patient #28: *Prä-B-ALL und frühes Rezidiv. 6% Blasten im KM des 1. Rezidivs.*

#28		VH3DH3JH4	VH4DH3JH6	VH6DH1JH6	DH1JH6	DH6JH4	DH2DH4JH6	VκI-κde
1. Rezidiv	KM	10^{-2} - 10^{-3}	10^{-2} - 10^{-3}	$<10^{-3}$	+	+	10^{-2} - 10^{-3}	n.a.
	Hoden, frisch	+	+	+	+	+	+	+
2. Rezidiv	KM	10^{-5}	+	10^{-3}	+	+	+	n.a.

Patient #29: *Prä-B-ALL und frühes Rezidiv. 83% Blasten im KM des 1. Rezidivs.*

#29		VH6DH3JH4	D2D3	V2D3Jα53
1. Rezidiv	KM	+	10^{-3}	+
	Hoden, frisch	+	+	+
2. Rezidiv	KM	+	$<10^{-4}$	+

Patient #30: *c-ALL und frühes Rezidiv. 61% Blasten im KM des 1. Rezidivs.*

#30		VH5DH5JH4	Vg1Jp1/2	Vg1Jg1/2
1. Rezidiv	KM	+	+	+
	Hoden, frisch	+	+	+
2. Rezidiv	KM	+	+	-

Patient #31: *c-ALL und frühes Rezidiv. 14% Blasten im KM des 2. Rezidivs.*

#31		VH4DH6JH3	VκI-κde	Vg9Jg1/2
1. Rezidiv	KM	+	+	+
2. Rezidiv	KM	n.a.	+	$<10^{-2}$
	Hod. li, frisch	n.a.	+	$<10^{-2}$
	Hod. re, frisch	n.a.	+	$<10^{-2}$

Patient #32: *c-ALL und frühes Rezidiv. FFPE DNA war für das PCR-Screening geeignet. 85% Blasten im KM des Rezidivs.*

#32		VH3DH7JH6	VκII-κde	VκIV-κde	Vκi-κde	Vg9Jg1/2	D2D3
1. Rezidiv	KM	+	+	+	+	+	+
	Hoden, FFPE	+	$<10^{-4}$	+	+	+	+

Patient #33: *c-ALL und spätes Rezidiv. FFPE DNA war für die Quantifizierung geeignet. 95% Blasten im KM des 1. Rezidivs. 18% Blasten im Blutaustrich.*

#33		VH1DH2JH2	V2D3	Vg11Jg1/2
1. Rezidiv	Blut	+	+	+
	Hoden, FFPE	10^{-1} - 10^{-2}	10^{-1} - 10^{-2}	n.a.
2. Rezidiv	KM	+	+	+

Patient #34: *TEL/AML-1 positive c-ALL und frühes Rezidiv. FFPE DNA war für die Quantifizierung geeignet. 79% Blasten im KM.*

#34		VκII-κde	VκIV-κde	V2Jα29
1. Rezidiv	KM	+	+	+
	Hoden, FFPE	10^{-1}	10^{-1}	10^0

Patient #35: *c-ALL und spätes Rezidiv. FFPE DNA war für das PCR-Screening geeignet. 97% Blasten im KM.*

#35		VH6DH2JH4	VH6JH3	VH1JH5	Vg1Jp1/2	V2D3
1. Rezidiv	KM	+	+	+	+	+
	Hoden, FFPE	+	+	+	+	+

5 Genumlagerungen der Leukämiezellen im Knochenmark und Hoden

Durchschnittlich stimmten 77% der klonalen Genumlagerungen von Hoden und KM bei Rezidivdiagnose im Hauptklon überein. Marker wurden im Hauptklon als gleich gewertet, wenn in der Sanger-Sequenzierung eine identische Umlagerung in Hoden und KM gefunden wurde oder die Quantifizierung mittels Echt-Zeit-PCR weniger als zwei log-Stufen auseinander lag. War die Sequenz messbar, unterschied sich jedoch quantitativ um mehr als zwei log-Stufen in der Echt-Zeit-PCR von der Vergleichsprobe, wurde die Genumlagerung als subklonal übereinstimmend gewertet. Von den 23% der im Hauptklon nicht konkordanten Genumlagerungen konnten 40% subklonal nachgewiesen werden. Damit lag die Übereinstimmung auf subklonalem Niveau bei 86%. Für die folgenden Analysen wurden drei Stabilitätskategorien gebildet. In die Gruppe mit einer niedrigen Übereinstimmungsrate von weniger als 70% im Hauptklon wurden neun Patienten eingeteilt. Fünf Patienten haben eine Stabilität von 70-90%. Die Übereinstimmungsrate dieser Gruppe wurde als mittlere Stabilitätskategorie definiert. 21 Patienten bilden die Gruppe mit mehr als 90% übereinstimmenden IG/TCR-Genumlagerungen zwischen Hoden und KM des Rezidivs.

Im Hauptklon finden sich Übereinstimmungen von 100% bei der TCR δ - und β -Familie sowie 88% bei der TCR γ -Familie. Es folgen die IG D_HJ_H-Familie mit 80%, die TCR α -Familie mit 77% und die IG κ -Familie mit 76% Übereinstimmung. Die niedrigste Konkordanz haben Marker der IG V_HJ_H-Familie mit 68% Gleichheit. Bei einem Patienten (#23) traten nur subklonal übereinstimmende Marker auf. Bei zwei Patienten (#4, #15) fand sich keine Übereinstimmung, weder im Hauptklon noch subklonal. In diesen beiden Fällen wurde überhaupt kein Marker im KM des kombinierten Rezidivs nachgewiesen. *Tabelle 15* präsentiert die Auswertung aufgeschlüsselt nach Subgruppen. Entsprechende statistische Tests ergaben keine signifikanten Unterschiede. *Abbildungen 13* und *14* beschreiben den klonalen Verwandtschaftsgrad der Leukämiezellen aus dem Hoden mit denen aus dem KM detaillierter, indem der Anteil der Patienten mit mindestens einem/zwei gleichen beziehungsweise unterschiedlichen Immungen-Markern dargestellt wird. Es wird unterschieden zwischen Übereinstimmung im Hauptklon und Subklon. *Abbildung 15* zeigt den Einfluss des Alters bei Rezidiverkrankung auf den Grad an Übereinstimmung der IG- und TCR-Genumlagerungen. *Abbildung 16* hebt diesen Einfluss auf die Unterschiedlichkeit der beiden Kompartimente Hoden und KM hervor. *Die Abbildungen 17* und *18* zeigen den Einfluss des Zeitpunktes des Rezidivs und *Abbildung 19* den Einfluss der peripheren Blastenzahl bei Diagnose des kombinierten Rezidivs auf den Verwandtschaftsgrad

der Hauptklone der beiden befallenen Organe. Alle erkennbaren Tendenzen stellten sich dabei als nicht signifikant heraus.

Für die Analyse der Übereinstimmungsrate wurde festgelegt, dass IG- und TCR-Genumlagerungen nicht in die Wertung einfließen, wenn die FFPE DNA zur Quantifizierung mittels Echt-Zeit-PCR geeignet war, jedoch keine spezifischen beziehungsweise sensitiven Primer entworfen werden konnten. Nicht quantifizierbare, negative Screening-Ergebnisse wurden hingegen als „Unterschied“ im Hauptklon gewertet.

Table 15: Subgruppenanalyse der Übereinstimmungsrate des Hauptklons des kombinierten Rezidivs.

Parameter	Kategorie	n	Stabilitätskategorie			Signifikanz
			niedrig	mittel	hoch	
Alter bei Erstdiagnose	<5 Jahre	19	5 - 26%	3 - 16%	11 - 58%	<i>p</i> =0,711
	5 - 10 Jahre	3	0 - /	1 - 33%	2 - 67%	
	≥10 Jahre	13	4 - 31%	1 - 8%	8 - 62%	
	Median (min-max)		2,6 (0-14)	3,4 (1-10)	4,5 (1-16)	
Alter bei Rezidivdiagnose	<5 Jahre	5	3 - 60%	1 - 20%	1 - 20%	<i>p</i> =0,308
	5 - 10 Jahre	14	2 - 14%	2 - 14%	10 - 72%	
	≥10 Jahre	16	4 - 25%	2 - 12,5%	10 - 62,5%	
	Median (min-max)		8,5 (1-17)	6,4 (3-12)	8,1 (4-19)	
Rezidivzeitpunkt	sehr früh	4	1 - 33%	0 - /	2 - 67%	<i>p</i> =0,946
	früh	13	4 - 29%	2 - 14%	8 - 57%	
	spät	18	4 - 22%	3 - 17%	11 - 61%	
TEL/AML-1 Fusionsgen (nur BCP-ALL)	negativ	18	7 - 39%	2 - 11%	9 - 50%	<i>p</i> =0,348
	positiv	12	2 - 16%	3 - 25%	7 - 58%	
	keine Angabe	1				
periph. Blastenzahl	≤100/μl	20	6 - 30%	2 - 10%	12 - 60%	<i>p</i> =0,452
	>100/μl	13	2 - 15%	3 - 23%	8 - 62%	
	keine Angabe	2				
Klonalität	monoklonal	24	4 - 17%	1 - 4%	19 - 79%	<i>p</i> =0,039
	oligoklonal	10	3 - 30%	4 - 40%	3 - 30%	
	polyklonal	1	0 - /	0 - /	1 - 100%	

Abbildung 12: Vergleich der IG- und TCR-Genumlagerungen zwischen Hoden und KM des kombinierten Rezidivs: Übereinstimmungen.

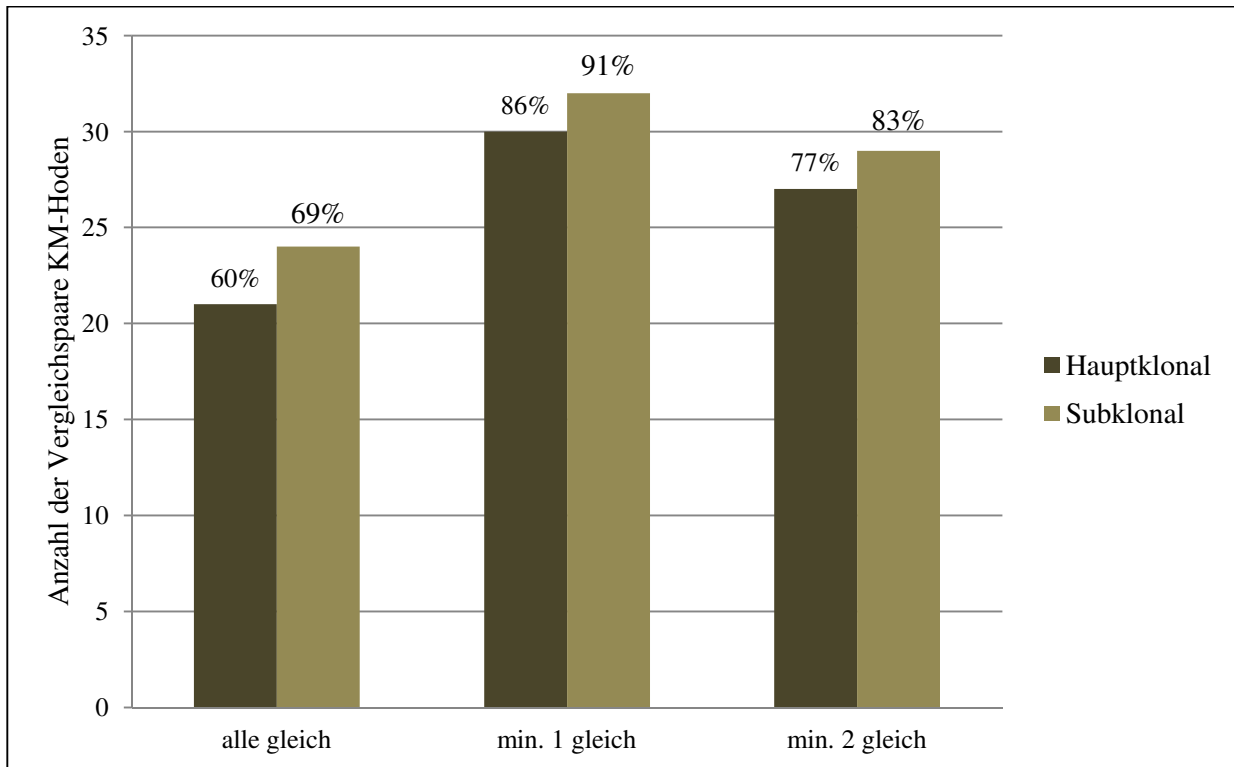


Abbildung 13: Vergleich der IG- und TCR-Genumlagerungen zwischen Hoden und KM des kombinierten Rezidivs: Unterschiedlichkeit.

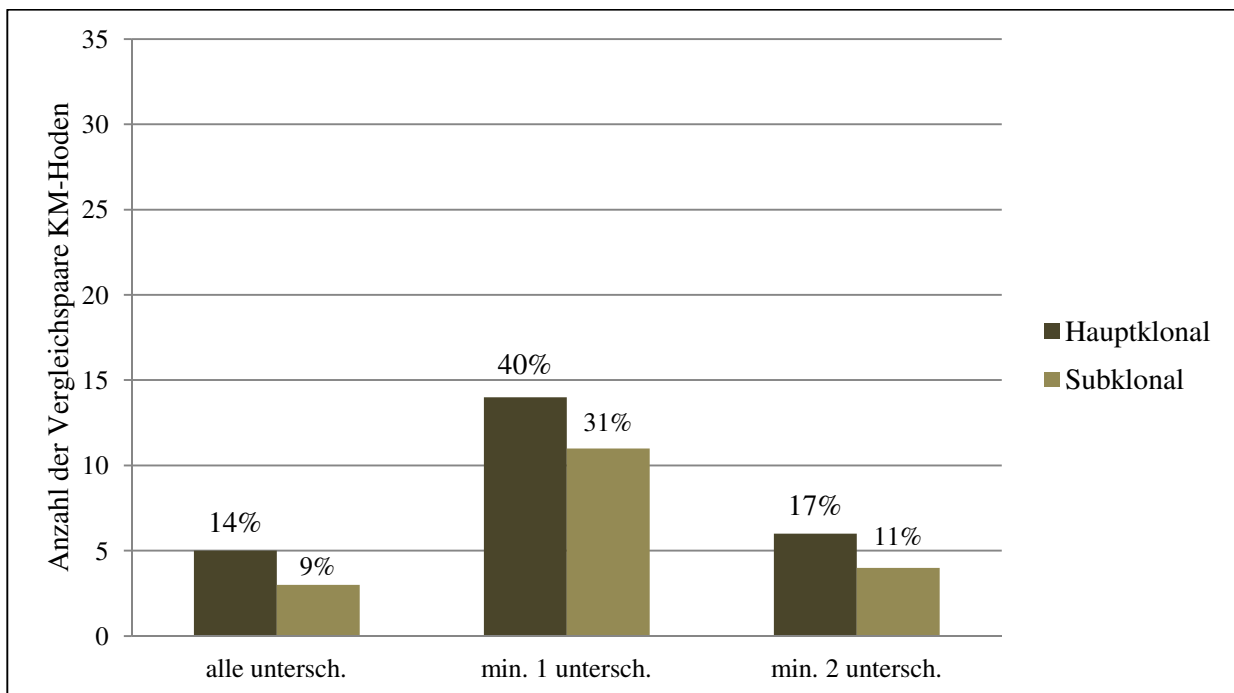


Abbildung 14: Einfluss des Alters bei Rezidivdiagnose auf die Übereinstimmungsrate der IG- und TCR-Genumlagerungen im Hauptklon: Übereinstimmungen.

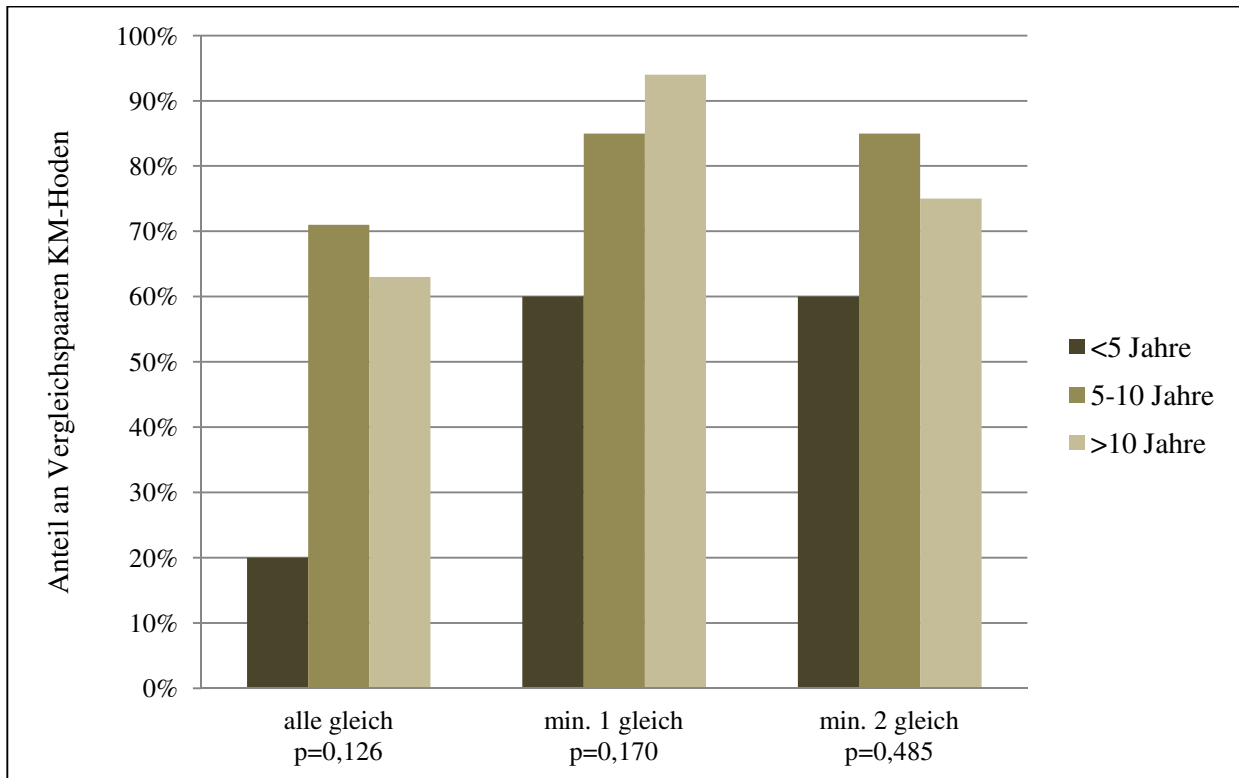


Abbildung 15: Einfluss des Alters bei Rezidivdiagnose auf die Übereinstimmungsrate der IG- und TCR-Genumlagerungen im Hauptklon: Unterschiedlichkeit.

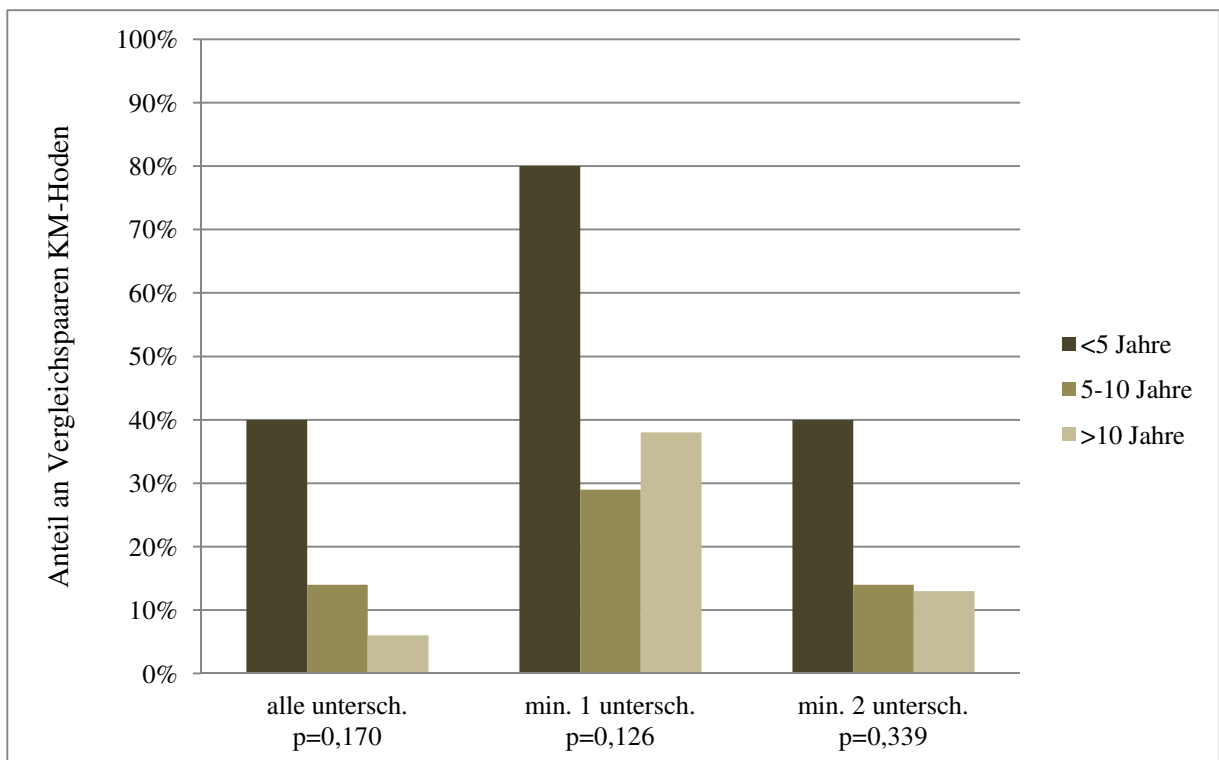


Abbildung 16: Einfluss des Rezidivzeitpunktes auf die Übereinstimmungsrate der IG- und TCR-Genumlagerungen im Hauptklon: Übereinstimmungen.

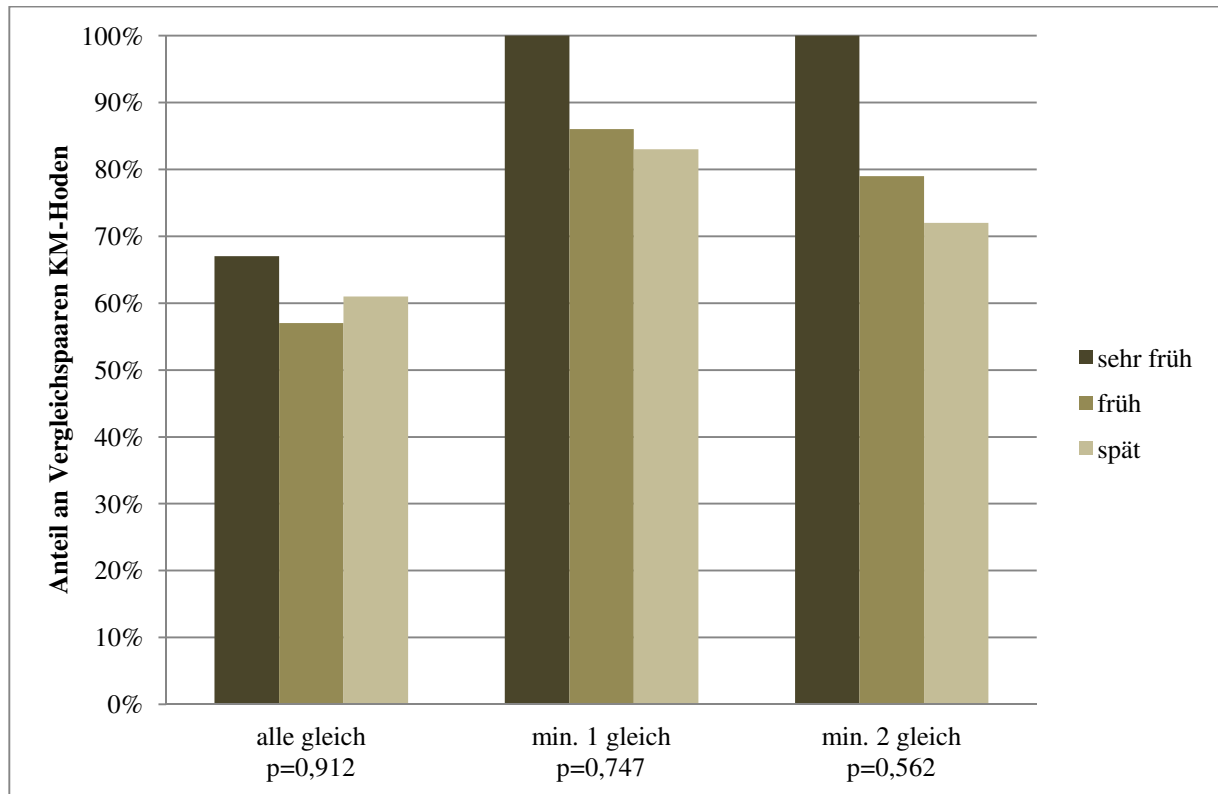


Abbildung 17: Einfluss des Rezidivzeitpunktes auf die Übereinstimmungsrate der IG- und TCR-Genumlagerungen im Hauptklon: Unterschiedlichkeit.

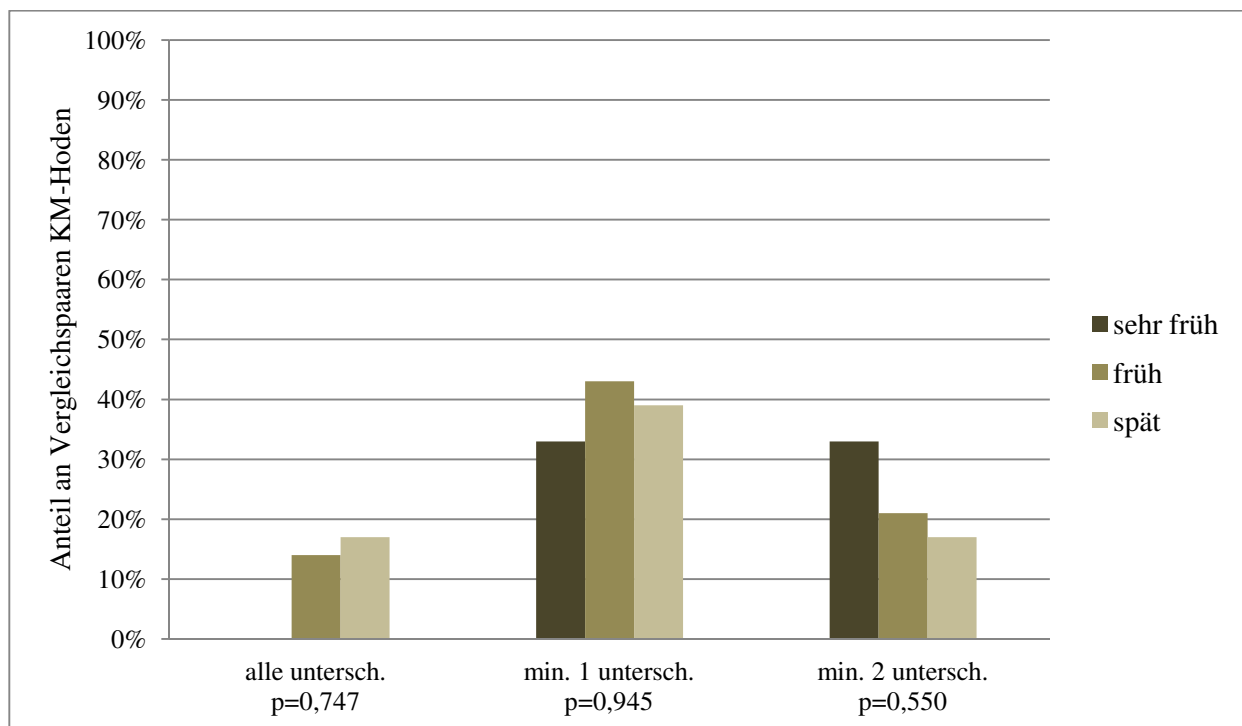
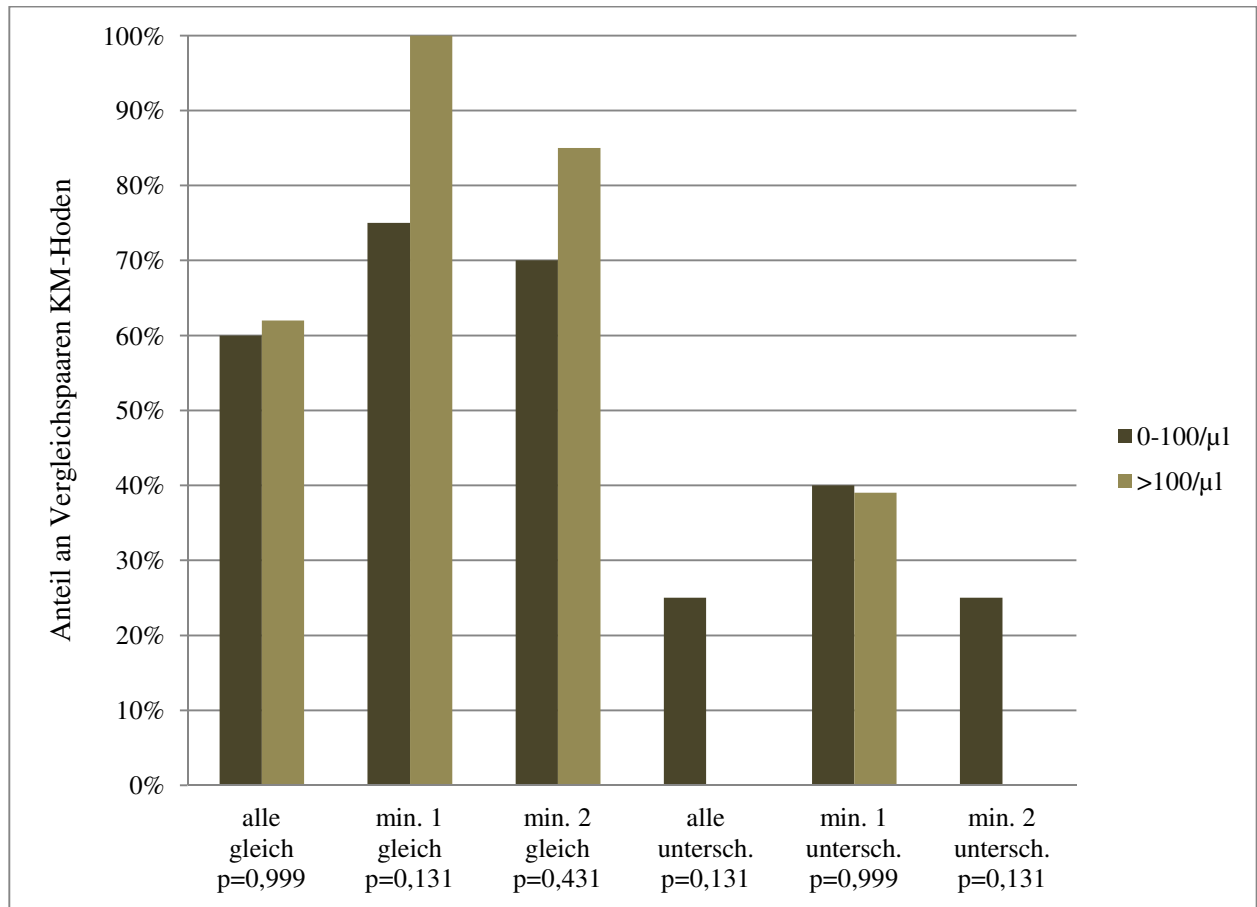


Abbildung 18: Einfluss der peripheren Blastenzahl auf die Übereinstimmungsrate der IG- und TCR-Genumlagerungen im Hauptklon.



6 Stabilität der Genumlagerungen im Krankheitsverlauf

Die Immungen-Umlagerungen des kombinierten Hodenrezidivs konnten in 18 Fällen mit den Screening- und Echt-Zeit-PCR-Ergebnissen der Initialdiagnose verglichen werden. Bei zwei Patienten (#3 und #31) wurde das kombinierte Rezidiv, welches in diesen Fällen das zweite Rezidiv war, mit dem ersten, isolierten KM-Rezidiv verglichen. Als Bedingung für eine Übereinstimmung des Hauptklons war auch hier ein quantitativer Unterschied der Genumlagerungen kleiner als 10^{-2} . Im Vergleich der KM-Proben von Initialdiagnose (beziehungsweise erstem isoliertem KM-Rezidiv) zur kombinierten Rezidivdiagnose sind 37 von 67 (55%) IG/TCR-Genumlagerungen identisch. Wertet man subklonale Übereinstimmungen als positiv, so steigt der Anteil identischer Marker auf 45 von 67 (69%). Die Untersuchung der Genumlagerungen zwischen Initialdiagnose und den Hodenproben ergab, dass 47 von 72 (65%) Markern im Hauptklon und 59 von 72 (82%) Genumlagerungen auf subklonalem Niveau kongruent waren. Der Unterschied der Gesamtmarkerübereinstimmung ist statistisch nicht signifikant. *Tabelle 16* zeigt die Übereinstimmungsraten der jeweiligen Markerfamilien im Detail. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde zwischen den IG_H-Genorten gefunden.

Wichtig ist, dass bei allen genannten Auszählungen die Übereinstimmungsraten aufgeführt werden. Eine andere, in der Literatur ebenfalls zu findende Art der Wiedergabe ist, die Stabilität von Markern aus der Initialdiagnose mit denen des Rezidivs zu vergleichen. Hier fehlen Marker, die im Rezidiv hinzu gewonnen wurden. So sind 64% der Marker (37 von 58) aus dem KM der Initialdiagnose (in Fall #3 und #31 des 1. KM-Rezidivs) hin zum KM des kombinierten Rezidivs stabil. Dagegen wurden 87% (47 von 54) der in der Ersterkrankung positiven IG- und TCR-Genumlagerungen im Hoden erneut detektiert. Vier Marker konnten nicht gemessen werden, da keine spezifischen und sensitiven Primer für das FFPE Hodenmaterial entworfen werden konnten. Sie wurden von der Auswertung ausgenommen.

Tabelle 17 stellt den Anteil der Patienten in den Stabilitätskategorien Initialdiagnose-KM-Rezidiv und Initialdiagnose-Hodenrezidiv in Bezug zu Subgruppen wie Alter bei Erstdiagnose, Zeitpunkt des Rezidivs und periphere Blastenzahl dar. Ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter Trend lässt sich in letztgenannter Subgruppe erkennen: Während ein Großteil der Patienten mit niedriger peripherer Blastenzahl zum Rezidivzeitpunkt auch in eine niedrige Stabilitätskategorie zwischen Initialdiagnose und Rezidiv eingeordnet werden konnten, weist die Mehrheit der Patienten mit hoher peripherer Blastenzahl ($>100/\mu\text{l}$) eine hohe Stabilitätsrate auf.

Abbildung 19: Vergleich der IG- und TCR-Genumlagerungen zwischen Ersterkrankung und kombiniertem Rezidiv: Übereinstimmungen.

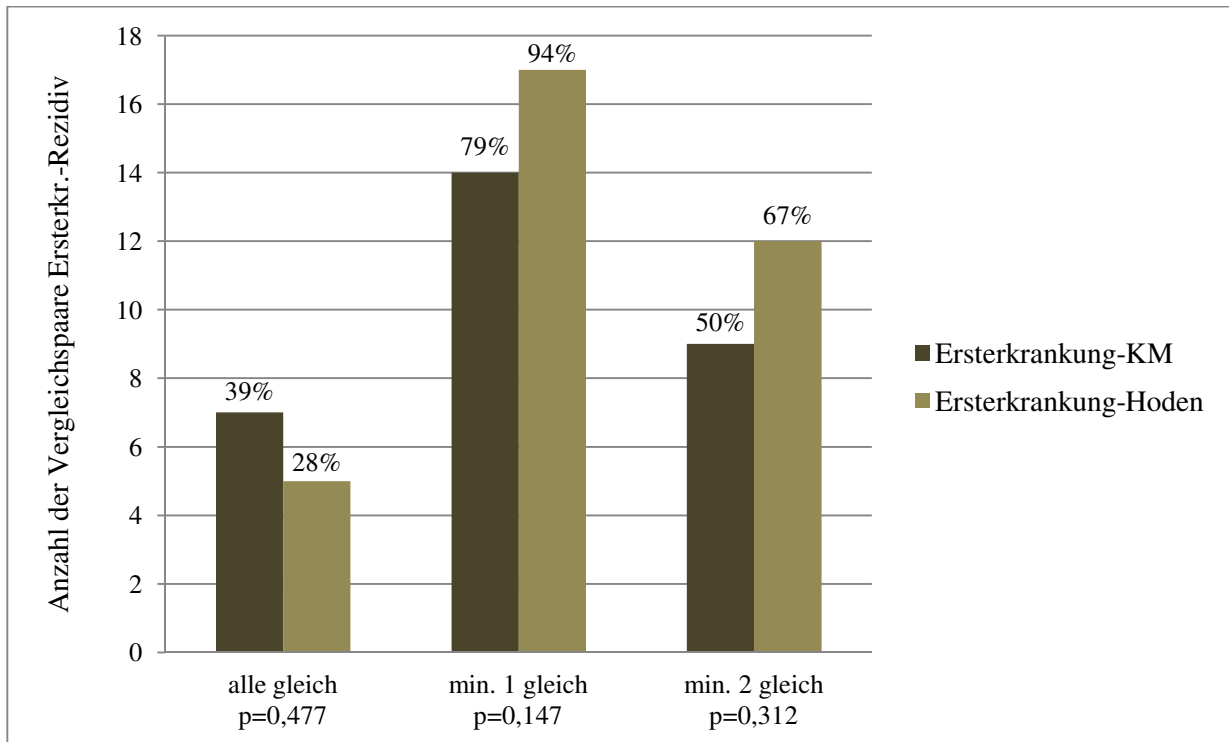


Abbildung 20: Vergleich der IG- und TCR-Genumlagerungen zwischen Ersterkrankung und kombiniertem Rezidiv: Unterschiedlichkeit.

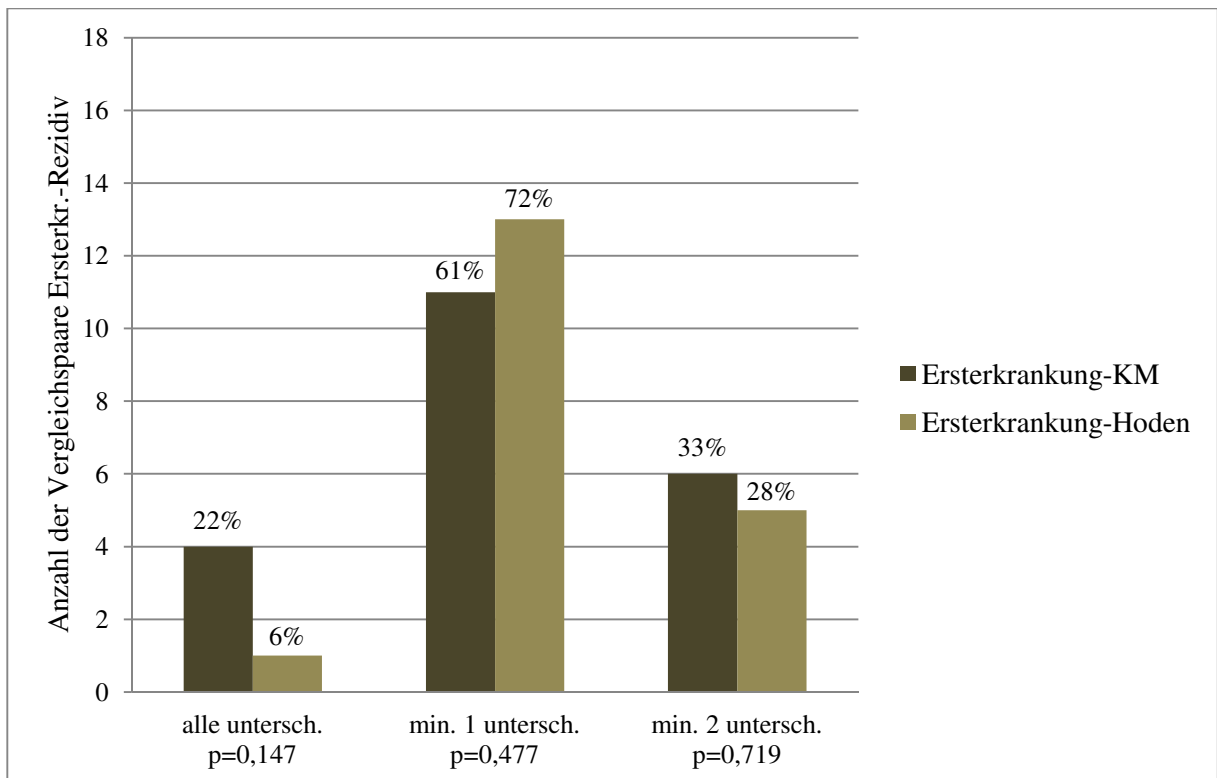


Tabelle 16: Stabilitätsraten der Immungenfamilien *($p < 0,05$).

Vergleichsproben	Übereinstimmungsrate						Gesamt
	IG H	IG κ	TCR γ	TCR α	TCR δ	TCR β	
Initialdiagnose-KM-Rezidiv	43,8%*	81,8%	53,8%	60,0%	42,8%	83,3%	55,2%
Initialdiagnose-Hoden-Rezidiv	81,2%*	81,8%	50,0%	54,5%	71,4%	100,0%	65,3%

Tabelle 17: Subgruppenanalyse der Stabilitätskategorien von initialer Erkrankung zum kombinierten Rezidiv.

Parameter	Kategorie	n	Stabilitätskategorie Initialdiagnose-KM-Rezidiv				Stabilitätskategorie Initialdiagnose-Hodenrezidiv			
			niedrig	mittel	hoch	Signifikanz	niedrig	mittel	hoch	Signifikanz
Alter bei Erstdiagnose	<5 Jahre	10	6 - 60%	1 - 10%	3 - 30%		6 - 60%	2 - 20%	2 - 20%	
	5 - 10 Jahre	1	0 - /	0 - /	1 - 100%		0 - /	1 - 100%	0 - /	
	≥10 Jahre	7	3 - 43%	1 - 14%	3 - 43%	$p=0,719$	3 - 43%	1 - 14%	3 - 43%	$p=0,319$
	Median (min-max)		3,0 (1-13)	7,7 (3-11)	5,8 (0-16)	$p=0,248$	3,0 (0-13)	4,6 (2-11)	13,2 (2-16)	$p=0,346$
Alter bei Rezidivdiagnose	<5 Jahre	4	3 - 75%	0 - /	1 - 25%		3 - 75%	1 - 25%	0 - /	
	5 - 10 Jahre	6	3 - 50%	1 - 17%	2 - 33%		3 - 50%	1 - 17%	2 - 33%	
	≥10 Jahre	8	3 - 37,5%	1 - 12,5%	4 - 50%	$p=0,772$	3 - 37,5%	2 - 25%	3 - 37,5%	$p=0,665$
	Median (min-max)		5,7 (4-17)	10,7 (6-14)	10,8 (1-19)	$p=0,336$	5,7 (4,17)	8,9 (4-14)	15,8 (5-19)	$p=0,228$
Rezidivzeitpunkt	sehr früh	1	0 - /	0 - /	1 - 100%		1 - 100%	0 - /	0 - /	
	früh	6	4 - 67%	1 - 17%	1 - 17%		3 - 50%	2 - 33%	1 - 17%	
	spät	11	5 - 45,5%	1 - 9%	5 - 45,5%	$p=0,578$	5 - 46%	2 - 18%	4 - 36%	$p=0,728$
TEL/AML-1 Fusionsgen (nur BCP-ALL)	negativ	10	6 - 60%	1 - 10%	3 - 30%		6 - 60%	2 - 20%	2 - 20%	
	positiv	6	2 - 33%	1 - 17%	3 - 50%		2 - 33%	2 - 33%	2 - 33%	
	keine Angabe	2				$p=0,556$				$p=0,549$
periph. Blastenzahl	≤100/μl	8	6 - 75%	1 - 12,5%	1 - 12,5%		5 - 62,5%	2 - 25%	1 - 12,5%	
	>100/μl	9	3 - 33%	1 - 11%	5 - 56%		3 - 33%	2 - 22%	4 - 44%	
	keine Angabe	2				$p=0,160$				$p=0,313$

7 Einteilung in Gruppen

Für den folgenden Diskussionsteil war es hilfreich, Patienten mit ähnlichen Ergebnissen des PCR-Screenings und der Echt-Zeit-Quantifizierung in Gruppen zusammenzufassen. Dazu wurden drei Fallgruppen (A, B und C) gebildet, deren Übereinstimmungsraten sich im kombinierten Rezidiv jeweils ähneln. So lassen sich 23 Patienten (66%) mit völlig kongruenten IG- und TCR-Genumlagerungen zur Gruppe A zusammenfassen. Gruppe B schließt vier Patienten (11%) mit unterschiedlichen Markern im Hauptklon zusammen. Entscheidend ist, dass mittels Echt-Zeit-PCR die „fehlenden“ Genumlagerungen auf MRD-Niveau subklonal nachgewiesen werden konnten. Acht Patienten (23%) mit mindestens einer sich unterscheidenden Genumlagerung, die nicht quantifizierbar war, bilden Gruppe C. *Tabelle 18* zeigt die Zuordnung der Patienten zu einer Gruppe.

Tabelle 18: Einteilung der Patienten nach Marker-Übereinstimmungsraten der Proben des kombinierten Hodenrezidivs.

Gruppe A (n=23)	Gruppe B (n=4)	Gruppe C (n=8)
Patient #2	Patient #1	Patient #3
Patient #5	Patient #7	Patient #4
Patient #8	Patient #23	Patient #6
Patient #9	Patient #29	Patient #10
Patient #11-#14		Patient #15
Patient #16-#20		Patient #21
Patient #22		Patient #28
Patient #24-#27		Patient #32
Patient #30		
Patient #31		
Patient #33-#35		

Tabelle 19 beleuchtet die klinischen und genetischen Aspekte der Gruppen A, B und C. In der Tabelle ist die mediane Blastenzahl der KM-Proben des kombinierten Rezidivs nicht enthalten: Gruppe A: 79%. Gruppe B: 54%. Gruppe C: 30%, ($p=0,297$).

Table 19: Klinische und molekulargenetische Parameter bezogen auf die drei gebildeten Gruppen

Parameter	Kategorie	n	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Signifikanz
Alter bei Erstdiagnose	<5 Jahre	19	12 - 52%	3 - 75%	4 - 50%	<i>p</i> =0,905
	5 - 10 Jahre	3	2 - 9%	0 - /	1 - 12,5%	
	≥10 Jahre	13	9 - 39%	1 - 25%	3 - 37,5%	
	Median (min.-max.)		4,6 (1-16)	3,3 (2-14)	4,1 (0-13)	
Alter bei Rezidivdiagnose	<5 Jahre	5	2 - 9%	0 - /	3 - 37,5%	<i>p</i> =0,119
	5 - 10 Jahre	14	10 - 43%	3 - 75%	1 - 12,5%	
	≥10 Jahre	16	11 - 48%	1 - 25%	4 - 50%	
	Median (min.-max.)		8,1 (4-19)	7,7 (5-16)	8,0 (1-16)	
Rezidivzeitpunkt	sehr früh	3	2 - 9%	0 - /	1 - 12,5%	<i>p</i> =0,475
	früh	14	8 - 35%	1 - 25%	5 - 62,5%	
	spät	18	13 - 56%	3 - 75%	2 - 25%	
Immunphänotyp	0-ALL	1	1 - 5%	0 - /	0 - /	<i>p</i> =0,876
	c-ALL	22	14 - 67%	2 - 67%	6 - 75%	
	prä-B-ALL	6	3 - 14%	1 - 33%	2 - 25%	
	prä-T-ALL	2	2 - 9%	0 - /	0 - /	
	kortik. T-ALL	1	1 - 5%	0 - /	0 - /	
	keine Angabe	3	2 - /	1 - /	0 - /	
t(12;21)- Translokation (nur BCP-ALL)	negativ	19	11 - 58%	1 - 25%	7 - 87,5%	<i>p</i> =0,261
	positiv	12	8 - 42%	3 - 75%	1 - 12,5%	
	keine Angabe	1	1 - /	0 - /	0 - /	
periphere Blastenzahl	≤100/μl	20	13 - 59%	2 - 50%	5 - 71%	<i>p</i> =0,758
	>100/μl	13	9 - 41%	2 - 50%	2 - 29%	
	keine Angabe	2	1 - /	0 - /	1 - /	
Protokoll	ALL-REZ BFM 96	13	5 - 24%	3 - 75%	5 - 62,5%	<i>p</i> =0,793
	ALL-REZ BFM 02	20	16 - 76%	1 - 25%	3 - 37,5%	
	keine Angabe	2	2 - /	0 - /	0 - /	
Klonalität	monoklonal	24	19 - 83%	2 - 50%	3 - 37,5%	<i>p</i> =0,081
	oligoklonal	10	3 - 13%	2 - 50%	5 - 62,5%	
	polyklonal	1	1 - 4%	0 - /	0 - /	

Table 20 fasst die entstandenen Vergleichspaare der IG- und TCR-Genumlagerungen auf Markerebene zusammen. Stets wird neben der Übereinstimmungsrate des Hauptklons auch die subklonale Übereinstimmungsrate aufgeführt. Subklonal bedeutet - wie oben beschrieben - dass dieser Marker mit einem quantitativen Abstand von mindestens 2 log-Stufen gemessen wurde.

Somit entstammt höchstens jede hundertste leukämische Zelle aus der Population des Subklons.

Tabelle 21 setzt die Gruppenauswertung mit einer Kreuztabelle zur Stabilitätskategorie fort.

Tabelle 20: *Markerbezogene Gruppenauswertung der Übereinstimmungsraten: *Ergebnisse unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,005$)*.*

	Ersterkrankung-KM-Rez.		Ersterkrankung-Hoden		KM-Rez.-Hoden	
	hauptklonal	subklonal	hauptklonal	subklonal	hauptklonal	subklonal
Gruppe A	75% - 21/28*	79% - 22/28*	75% - 21/28	79% - 22/28	100% - 70/70*	100% - 70/70*
Gruppe B	38% - 6/16*	69% - 11/16	50% - 8/16	69% - 11/16	67% - 12/18*	100% - 18/18
Gruppe C	43% - 10/23*	52% - 12/23*	64% - 18/28	68% - 18/28	47% - 21/45*	60% - 27/45*
Gesamt	55% - 37/67*	67% - 45/67	65% - 47/72*	72% - 52/72	77% - 103/133*	86% - 115/133

Tabelle 21: *Patienten bezogene Gruppenauswertung der Stabilitätskategorien.*

Vergleichspaar/Stabilitätskategorie	n	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Signifikanz
Initialdiagnose-KM-Rezidiv					
niedrig	9	5 - 45,5%	1 - 50%	3 - 60%	
mittel	2	1 - 9%	1 - 50%	0 - /	
hoch	7	5 - 45,5%	0 - /	2 - 40%	
Gesamt	18	11 - 100%	2 - 100%	5 - 100%	$p=0,359$
Initialdiagnose-Hoden					
niedrig	9	5 - 45,5%	1 - 50%	3 - 60%	
mittel	4	1 - 9%	1 - 50%	2 - 40%	
hoch	5	5 - 45,5%	0 - /	0 - /	
Gesamt	18	11 - 100%	2 - 100%	5 - 100%	$p=0,232$
KM-Rezidiv-Hoden					
niedrig	7	0 - /	2 - 50%	5 - 62,5%	
mittel	5	0 - /	2 - 50%	3 - 37,5%	
hoch	23	23 - 100%	0 - /	0 - /	
Gesamt	35	23 - 100%	4 - 100%	8 - 100%	$p < 0,001$

V Diskussion

1 Methodischer Ansatz

Die Veränderungen im IG- und TCR-Genumlagerungsrepertoire im Laufe der Leukämie-Erkrankung sind vielseitig untersucht und beschrieben. Dazu zählen Immungen-Stabilitätsanalysen zwischen Ersterkrankung und Rezidiv sowie zwischen 1. und 2. Rezidiv [93, 114-118, 120, 135]. Ziel der genannten Studien war es, die Häufigkeit des Verlusts der PCR-Marker zu beschreiben, um im nächsten Schritt durch die Empfehlung für die Markerauswahl die Wahrscheinlichkeit von falsch negativen MRD-Ergebnissen zu verringern. Mögliche Ursachen des Marker-Verlustes und der Marker-Hinzugewinnung sind in Kapitel II.3.3. zusammengefasst. Sie lassen vermuten, dass die Markerstabilität und damit die klonale Evolution „Funktion[en] der Zeit“ sind [127]. Und doch wurde gezeigt, dass sehr frühe beziehungsweise frühe und späte Rezidive sich nicht in ihrer Markerstabilität zur Ersterkrankung hin unterscheiden [135, 136].

Diesen Ansatz verfolgend war es das Ziel dieser Arbeit, die individuellen Immungenumlagerungen der ALL-Patienten zu nutzen, um Hinweise auf den klonalen Verwandtschaftsgrad von kombinierten Hodenrezidiven zu erhalten. Die Isolation mononuklearer Zellen aus KM und Blut, die DNA-Extraktion, das PCR-Screening, die Sanger-Sequenzierung und die Echt-Zeit-PCR folgten den oben beschriebenen, etablierten Methoden der ALL-REZ BFM Studiengruppe. Die Verwertung des frischen und gefrorenen Hodengewebes zur molekulargenetischen Diagnostik stellte sich als unkompliziert dar. Um auf eine größere Studienpopulation zurückgreifen zu können, musste jedoch zunächst ein Weg gefunden werden, die DNA aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Hodengewebe zuverlässig nutzen zu können. Dazu wurde das in *Abbildung 6* dargestellte Fließschema konzipiert. In einem dreistufigen Qualitätstest (spektrometrische Messung der extrahierten DNA, quantitative β -Globin Referenzgenbestimmung, β -Globin Fragmentlängen-PCR) wurden die 18 FFPE DNA-Proben in drei Kategorien eingeteilt: 1.) Geeignet zum Standard PCR-Screening (n=6). 2.) Geeignet zur Quantifizierung mittels Echt-Zeit-PCR (n=6). 3.) Nicht verwertbar (n=6). Somit wurden 29 Rezidiv-Paare (KM- und Hodengewebe) in der Standard-PCR gescreent. Bei sechs Paaren (#13, #14, #16, #17, #33, #34) wurde das KM gescreent und der Hoden mittels beschriebenem „Backtracking“ quantitativ analysiert. Da hierfür ausschließlich die im KM gefundenen Markersequenzen als Grundlage zum Entwurf der Primer zur Verfügung standen, beschränkt sich die Aussagekraft in diesen Fällen auf das Vorhandensein oder den Verlust von KM-Markern. Ob die Leukämiezellen in diesen Hoden zusätzliche Immungen-Umlagerungen aufweisen, konnte nicht untersucht werden. Erschwert wurde die Analyse zusätzlich dadurch,

dass bei einem Drittel der im KM detektierten Marker (6/20) keine spezifischen beziehungsweise sensitiven Primer entworfen werden konnten. Dabei ist zu bedenken, dass die Ansprüche an die Sensitivität des Primers mit jedem Absinken der FFPE DNA-Quantität um eine log-Stufe in der β -Globin Referenzgenbestimmung ansteigt. Als Beispiel diene Patient #33. Bei Inhibition der unverdünnten Probe konnte die 1:10 Verdünnung der extrahierten DNA verwendet werden. Diese entsprach einem β -Globin-Wert von 10^{-3} in der Standardreihe der Referenzgenbestimmung. Der entworfene Primer benötigt demnach mindestens eine Sensitivität von 10^{-4} , um eine Aussagekraft zu entfalten. Lag die Sensitivität aufgrund der Sequenzeigenschaften (zum Beispiel keine/sehr kurze oder repetitive N-Nukleotide) darunter, konnten diese Genumlagerungen somit nicht in die Stabilitätsanalyse mit aufgenommen werden. Diese Sachlage kann für die niedrige Zahl subklonal quantifizierter Genumlagerungen im Hoden verantwortlich sein (durchschnittlich 0,03 pro DNA-Probe statt 0,29 pro DNA-Probe im KM der Ersterkrankung und des Rezidivs).

Durch die dreistufige Qualitätstestung der FFPE DNA konnten die Nachteile der einzelnen Methoden aufgehoben werden. Die Lichtspektrometrische DNA-Mengen und Reinheitsmessung am Nano Drop 1000 konnte dazu genutzt werden, FFPE Proben ohne messbaren DNA-Gehalt auszusortieren. Da die Hodengewebsmenge, die zur DNA-Extraktion eingesetzt wird, aufgrund des umgebenden Paraffins schlecht abzuschätzen ist, kann der Einsatz einer zu geringen Gewebemenge ursächlich für das Misslingen sein. In den meisten Fällen konnte das DNA-Extraktionsverfahren aus dem FFPE Hodengewebe daraufhin wiederholt und die DNA-Konzentration anschließend auf $100\text{ng}/\mu\text{l}$ ($\pm 30\text{ng}/\mu\text{l}$) eingestellt werden. In der standardmäßig durchgeführten β -Globin Referenzgenquantifizierung stellte sich jedoch heraus, dass das β -Globin-Gen zahlreicher FFPE Proben nicht quantifizierbar war. Aufgrund der aus der Literatur bekannten Inhibitionsprobleme mit FFPE DNA aus Brustgewebe, Haut und anderen Organen [123, 137] führten wir die Referenzgenquantifizierung mit 1:10 und 1:100 verdünnten FFPE DNA-Proben erneut durch. So „verbesserte“ sich häufig die Qualität deutlich. Die Quantifizierungsergebnisse der 1:100-Verdünnungen zeigten zudem durch ihre mathematisch korrekten CT-Werte im Vergleich zur Standardreihe, dass - 1:10 verdünnt - die inhibitorischen Moleküle keine signifikante Auswirkung auf die Echt-Zeit-PCR haben. Wie oben ausgeführt, sollte der Goldstandard zur Analyse der IG- und TCR-Genumlagerungen das PCR-Screening sein. Für ein erfolgreiches Binden der β -Globin-Primer in der Referenzgen-Quantifizierung ist eine DNA-Länge von mindestens 200bp notwendig. In *Tabelle 7* sind die Fragmentlängen des PCR-Screenings aufgelistet. Aus ihr geht hervor, dass für ein erfolgreiches Screening aller IG-

und TCR-Familien unter Verwendung der internen Primer eine DNA-Länge von 400-450bp notwendig ist. Hieraus leitet sich die β -Globin-Fragmentlängenbestimmung mittels Standard-PCR ab. Um den Materialverbrauch, den Arbeitsaufwand und die Kosten möglichst gering zu halten, wurden nur die FFPE DNA-Proben auf ihre Fragmentlänge getestet, deren DNA-Menge in der Referenzgen-Quantifizierung ausreichend für ein PCR-Screening war. Wie hoch diese DNA-Menge sein muss, wurde zuvor in einem umfangreichen Sensitivitätstest erforscht. Dabei war die Nachweisgrenze für ein positives PCR-Produkt im Polyacrylamidgel niedriger, die Sensitivität also höher. *Tabelle 13* zeigt, dass jedes Produkt der 1:10 verdünnten DNA-Positivkontrolle nachgewiesen werden konnte. Aus der Auswertung der Fragmentlängen-PCR-Ergebnisse ergab sich die Beobachtung, dass die unbekannt inhibitorischen Effekte, die in der Echt-Zeit-PCR auftraten, die Amplifizierbarkeit in der Standard-PCR nicht beeinträchtigten. Somit konnten auch FFPE DNA-Proben gescreent werden, deren unverdünnte DNA-Mengen aufgrund der Inhibition kleiner als 10^{-1} der BC-Standardreihe gemessen wurden, 1:10 verdünnt jedoch auf einen CT-Wert kamen, der einer β -Globingenmenge von 10^{-2} entsprach.

Der Nachteil der im Fließschema vorgestellten Methode zur Qualitätseinschätzung von FFPE DNA liegt neben einem Materialverbrauch von zirka 20 μ l (bei einer DNA-Konzentration von 70-130ng/ μ l und dem Durchlauf aller drei Teste) vor allem darin, dass nur zirka ein Drittel der extrahierten DNA-Proben für das Screening verwertbar war. An einer weiteren Optimierung des Extraktionsverfahrens und der DNA-Aufreinigung wird aktuell in unserem Labor gearbeitet. Der entscheidende Vorteil liegt in der Vereinheitlichung des Vorgehens bei FFPE Proben mit sehr unterschiedlicher DNA-Qualität. Dadurch kann jeder Probe verlässlich der größtmögliche Informationsgehalt entnommen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für unsere Studienkohorte um DNA der Ersterkrankung in den MRD-Referenzlaboren der ALL-BFM- und COALL-Studien gebeten. Bis zum Abschluss der molekulargenetischen Untersuchungen am 01.08.2013 gingen 13 DNA-Proben (#1-#3, #6-#14, #16) mit Diagnosematerial der ALL-Ersterkrankung in unserem Hause ein. Ob des raren Diagnosematerials konnten zu vier Patienten (#4, #5, #15, #17) nur die identifizierten Markersequenzen übermittelt werden. Bei Patient #7 reichte die DNA-Menge nicht für alle Tests aus. Trotz der genannten Einschränkungen bleibt die Untersuchung der Stabilität von klonalen Ersterkrankungsmarkern und Hodenrezidiv-Markern die bislang umfangreichste, da erste.

2 Frequenz der IG- und TCR-Genumlagerungen

Die durchschnittliche Anzahl der im PCR-Screening identifizierten IG- und TCR-Genumlagerungen sind für alle drei Probenarten mit Werten aus der Literatur [93] vergleichbar (Erstdiagnose: 3,3 (1-7); KM des kombinierten Rezidivs: 3,3 (0-7); Hoden: 3,7 Marker (0-7)). Dabei fiel auf, dass unter den Ersterkrankungen fünf Genumlagerungen subklonal gemessen wurden (8% aller identifizierten Genumlagerungen), im KM des Rezidivs zehn (8%), im Hoden jedoch nur zwei von insgesamt 129 Markern (1,5%). Dieser Unterschied lässt sich auf die häufig niedrigere DNA-Menge in Proben aus Hodengewebe zurückzuführen. Genaueres dazu auch im Kapitel *V.1, Methodischer Ansatz*.

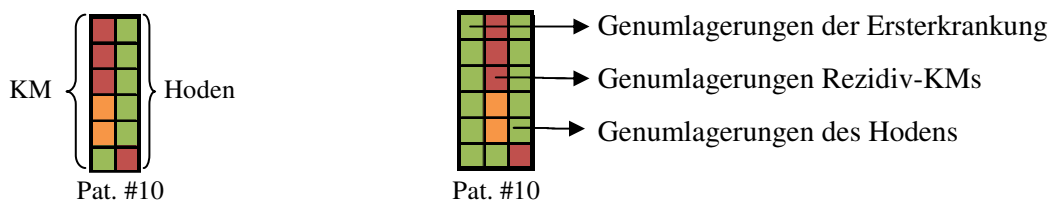
Die Inzidenz der IG- und TCR-Genumlagerungs-Familien verteilte sich zu zirka 50% auf IG- und 50% auf TCR-Genloci. Wie in der Literatur bereits publiziert, ist die IG_H -Familie mit einem Anteil von 33% in dieser Patientenkohorte (V_HJ_H und D_HJ_H) die am häufigsten identifizierte Markerfamilie. Auch das Auftreten der anderen Marker passt zu vorausgegangenen Untersuchungen [92, 93].

Die durchschnittlich höhere Anzahl identifizierter Genumlagerungen in Hoden-Proben spiegelt sich auch im Ergebnis der Auswertung der Marker hinsichtlich der Übereinstimmung der Marker wider (*Abbildung 9 bis Abbildung 11*). Während die Screening- und Echt-Zeit-PCR-Ergebnisse der DNA-Proben der Ersterkrankung und des Hodens sehr gut zu den in der Literatur beschriebenen passen beziehungsweise die Grenzen zum Teil nur leicht überschreiten, fällt der Anteil der KM-Rezidiv-Proben mit mindestens einer Umlagerung des IG_H -Locus (56%) weit unter den in der Literatur genannten (75-95%) [86-90]. Ein Blick auf die Patienten #4, #10, #15 und #28 liefert den entscheidenden Hinweis: Gleich mehrere V_HJ_H -Umlagerungen treten dort in oligoklonalen Leukämien auf. Diese Patienten wurden der Gruppe C zugeordnet. Dort konnten von neun im Hoden gefundenen V_HJ_H -Umlagerungen nur vier subklonal im KM nachgewiesen werden.

3 Aussage der IG- und TCR-Genumlagerungsvergleiche

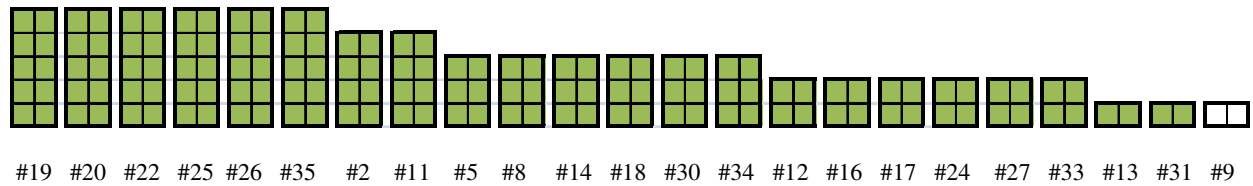
In der molekulargenetisch untersuchten Patientengruppe liegt die Übereinstimmungsrate von IG- und TCR-Genumlagerungen bei den KM- und Hoden-Proben des kombinierten Rezidivs mit 77% im Hauptklon, beziehungsweise 86% subklonal über den Werten, die die initiale Diagnose mit den Kompartimenten des kombinierten-Rezidivs vergleicht. Dieser enge, klonale Verwandtschaftsgrad überrascht nicht, da die beiden Proben statt zeitlich, wie beim Vergleich der Ersterkrankungsmarker mit denen des Rezidivs, nur örtlich disseminiert sind. Beide Proben wurden zu *einem* Zeitpunkt der Erkrankung entnommen, repräsentieren also *eine* Leukämieerkrankung. Jedoch ließe sich dieser Argumentation folgend eine völlige Deckungsgleichheit der Immungen-Marker erwarten. Die Ausgangshypothese der *Einheit* wurde durch den Befund widerlegt, dass 23% unterschiedliche Genumlagerungssequenzen zwischen Hoden und KM gefunden wurden. Sie sprechen dafür, dass es sich nicht in allen Patienten um den identischen Hauptklon im KM und Hoden handelt. Dazu wurden die in Kapitel V.7 vorgestellten Gruppen gebildet. Kriterium der Einteilung waren die IG- und TCR-Genumlagerungsmuster des Hodens und des KMs zum Zeitpunkt der Diagnose des kombinierten Rezidivs. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse und Gruppeneinteilung können *Abbildungen 17 bis 22* herangezogen werden.

Legende zu den Abbildungen 21-26: Die Abbildungen zeigen eine Gegenüberstellung der Marker aus dem KM (linke Säule) und dem Hoden (rechte Säule) beziehungsweise eine Übersicht inklusive der Initialmarker. In diesen Fällen wurde eine dritte Säule für die Ersterkrankung links angeschlossen. Jedes Kästchen entspricht einer IG- und TCR-Genumlagerung. Ein weißes Kästchen steht für eine nicht sequenzierbare, polyklonale Genumlagerung.



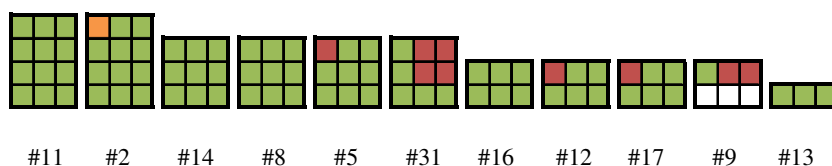
- ≙ Übereinstimmung im Hauptklon.
- ≙ Hoden-Marker wurde subklonal im KM quantifiziert.
- ≙ KM-Marker war im Hoden nicht nachweisbar.

Abbildung 21: Darstellung der Gruppe A: 23 kombinierte Hodenrezidive mit qualitativ und quantitativ identischen IG- und TCR-Genumlagerungen.



Patienten der Gruppe A tragen in 40% (8/20 BPC-ALL) das *TEL/AML-1* Fusionsgen. Dieser Anteil übersteigt den in der Literatur genannten Wert (16-27%) für ALL im Kindesalter [18-21], spiegelt jedoch den hohen, aus den ALL-REZ BFM Studien 96 und 02 (bis 2010) ermittelten Wert (42%) für ALL mit Hodenrezidiv wider [62]. 13 der 23 Rezidive (57%) traten spät auf. Dies passt zu der Beobachtung, dass *TEL/AML-1* Fusionsgen positive Leukämien häufiger späte Rezidive entwickeln [3], denn sieben der acht *TEL/AML-1* positiven Patienten aus dieser Gruppe erlitten ein spätes Rezidiv. Fünf Jungen (22%) erkrankten an einem frühen Rezidiv. Alle drei T-ALL Patienten (#5, #11, #26) finden sich in dieser Gruppe. Von elf Patienten aus Gruppe A konnten wir die IG- und TCR-Genumlagerungen der Initialdiagnose ermitteln. *Abbildung 18* veranschaulicht diese Patienten. Fünf Patienten (46%) zeigen in allen drei DNA-Proben identische Umlagerungsmarker und damit eine enge klonale Verwandtschaft. Vier Patienten (#2, #5, #12, #17) gewinnen in den beiden Proben des kombinierten Rezidivs jeweils einen Marker hinzu, ein Patient (#9) verliert einen, ein anderer Patient (#31) zwei Marker hin zum Rezidiv. Somit sind 21 von 28 (75%) Marker im Hauptklon, beziehungsweise 22 von 28 (79%) auf subklonalem Niveau identisch. Trotz Veränderungen des Markerrepertoires bei mehr als der Hälfte der Jungen gibt es keinen Patienten mit nicht wenigstens einer Übereinstimmung (ausgenommen Patient #9). Dies lässt den Schluss zu, dass diese Patienten an einem kombinierten Hodenrezidiv erkrankten, das in Bezug auf die Genumlagerungen in sich homogen eine klare molekulargenetische Verbindung zur Ersterkrankung hat.

Abbildung 22: Übersicht der Gruppe A inklusive Marker der Initialdiagnose (jeweils linke Säule). Zu Patient #31: Statt initialer Diagnose hier 1. KM-Rezidiv.



Die Hypothese, dass Rezidive von Leukämien, deren Blasten die t(12;21)-Translokation tragen, häufig spät entstünden, da sie nicht Resultat eines Therapie resistenten Klons der Ersterkrankung

sein, sondern von einer Fusionsgen positiven, prä-leukämischen „Stammzelle“ ausgingen, wurde nach Untersuchung der *TEL/AML-1*-Deletionsstellen von Ersterkrankung und Rezidiv bekräftigt [25, 26]. Dieses Modell lässt sich übertragen auf die 23 *TEL/AML-1* positiven Patienten der Gruppe A, denn ein kombiniertes Hodenrezidiv, dessen Ursprung aus einer im Hodeninterstitium „überwinternden“, [66] prä-leukämischen Stammzelle hervorgeht, müsste identische Marker in beiden Kompartimenten haben. Für alle Patienten dieser Gruppe könnte gelten, dass eine „neue“ Leukämie, die durch ihre übereinstimmenden Genumlagerungen einen erkennbaren Bezug zur Ersterkrankung hat, das KM aus dem Hoden heraus befiehlt. Die Übereinstimmungsrate der Immungen-Marker von initialer Diagnose und Rezidiv hängt dann davon ab, in welchem Entwicklungsstadium die prä-leukämische Stammzelle arretiert ist [138]. Sind die Rekombinasen weiter aktiv, lagern sie das Immun-Genom fortlaufend um und die klonale Verwandtschaft nimmt in unseren Augen ab. Der Erklärungsansatz der „Wiederentartung“ einer prä-malignen Stammzelle fügt sich in das Bild, dass die Wahrscheinlichkeit des EFSs für Jungen mit Hodenbeteiligung im Rezidiv signifikant höher ist als bei Rezidiven ohne Hodenbeteiligung ($61\% \pm 5,6$ versus $38\% \pm 2,9$, $p < 0,003$) [55, 62]. Gleichzeitig ist der mediane Blastenanteil in den KM-Proben des kombinierten Rezidivs in dieser Gruppe mit 79% am höchsten. Diese Tendenz könnte dafür sprechen, dass die Abkömmlinge der prä-leukämischen Stammzelle schon früh nach ihrem neuen „Hit“ den Hoden verlassen und somit die zeitliche Möglichkeit haben das KM zu befallen bis die Hodenschwellung der Jungen ärztlich vorgestellt wird.

Abbildung 23: Schema zur ersten Hypothese: Eine prä-leukämische, häufig *TEL/AML-1* positive Stammzelle (schwarz) erfährt eine Genveränderung, die zur Entstehung der Initialerkrankung führt. Mindestens sechs Monate (im Fall von späten Rezidiven) nach erfolgreicher Therapie erfährt die im Hoden (TES) überdauernde Stammzelle erneut einen Hit und verursacht vom Hoden ausgehend ein Rezidiv.

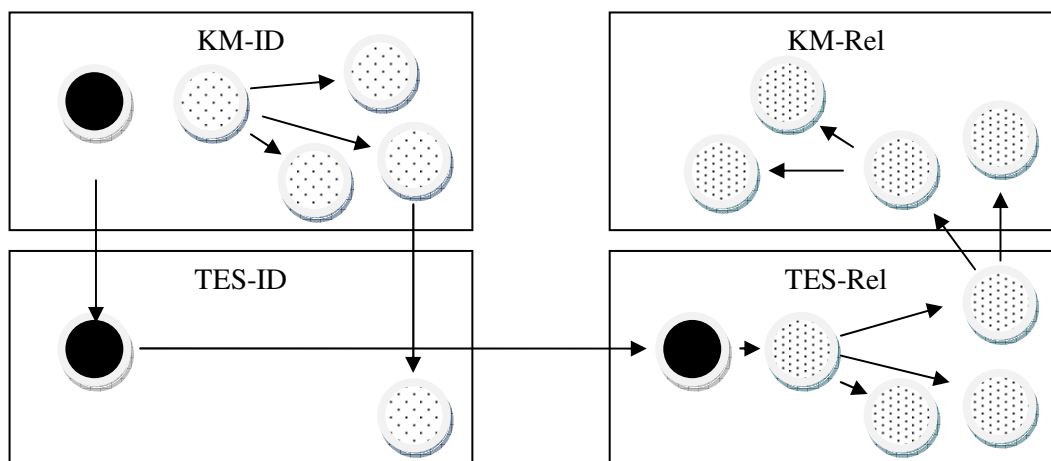
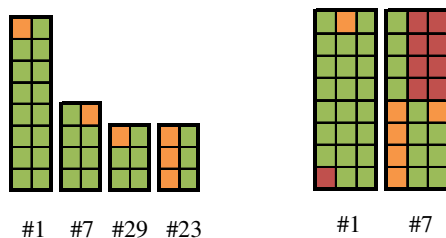


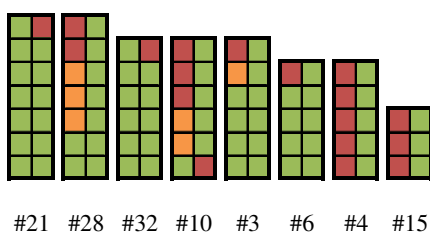
Abbildung 24: Darstellung der Gruppe B. Links: Vier Patienten mit unterschiedlichen IG- und TCR-Genumlagerungen im Hauptklon. Alle im PCR-Screening nicht übereinstimmenden Marker wurden auf MRD-Niveau subklonal nachgewiesen. Rechts: Übersicht der Patienten #1 und #7 inklusive Marker der Initialdiagnose.



Vier Patienten der Gruppe B zeichnet aus, dass einzelne Immungenumlagerungen höchstens nur bei jedem hundertsten (10^{-2}) leukämischen Blasten quantifizierbar waren. Im PCR-Screening waren diese Marker aufgrund der oben beschriebenen Nachweisgrenze im Agarose- und Polyacrylamid-Gel negativ. Zwei Drittel der Genumlagerungen finden sich jedoch in beiden Hauptklonen. Drei Viertel tragen das *TEL/AML-1* Fusionsgen. Diese Patienten (#1, #7, #23) erkrankten zudem an einem späten Rezidiv. Durchschnittlich wurde in den KM-Proben der kombinierten Rezidive ein Blastenanteil von 52% gefunden. Von zwei der Patienten konnten wir die IG- und TCR-Genumlagerungen der initialen Diagnose analysieren. Während 38% (6/16) der Marker von Ersterkrankung und dem KM des kombinierten Rezidivs im Hauptklon und 69% (11/16) subklonal gemessen werden konnten, sind es bei Betrachtung der Ersterkrankung und des Hodens 50% (8/16) beziehungsweise 69% (11/16).

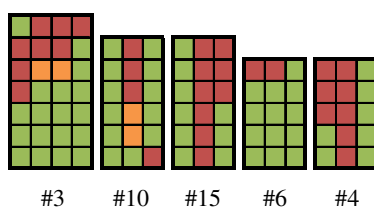
Aufgrund der sehr kleinen Gruppe und der Tatsache, dass nur von Patient #1 und #7 Initialmaterial verfügbar war und diese beiden Patienten im Gegensatz zu den anderen beiden Patientenfällen der Gruppe ein oligoklonales IG-/TCR-Genumlagerungsmuster aufwiesen, konnte für Gruppe B keine Hypothese erarbeitet werden.

Abbildung 25: Darstellung der Gruppe C: Acht Patienten mit unterschiedlichen IG- und TCR-Genumlagerungen.



Mit 47% (21/45) Übereinstimmung der Umlagerungsmarker im Hauptklon und 60% (27/45) subklonal weist Gruppe C den niedrigsten klonalen Verwandtschaftsgrad auf. Mindestens eine IG- und TCR-Genumlagerung war im Screening negativ und konnte nicht quantifiziert werden. Nur bei einem Patienten (#6) wurde das Fusionsgen *TEL/AML-1* über dem genomischen Bruchpunkt nachgewiesen. Während zwei Rezidive (#6, #15) spät auftraten, handelt es sich bei dem Großteil der Rezidive um eine sehr frühe oder frühe Wiedererkrankung (n=6, 75%).

Abbildung 26: Übersicht der Gruppe C inklusive Marker der Initialdiagnose (jeweils linke Säule). Zu Patient #3: 1. Spalte: Initialdiagnose. 2. Spalte: 1. KM-Rezidiv. 3. und 4. Spalte: kombiniertes Rezidiv.



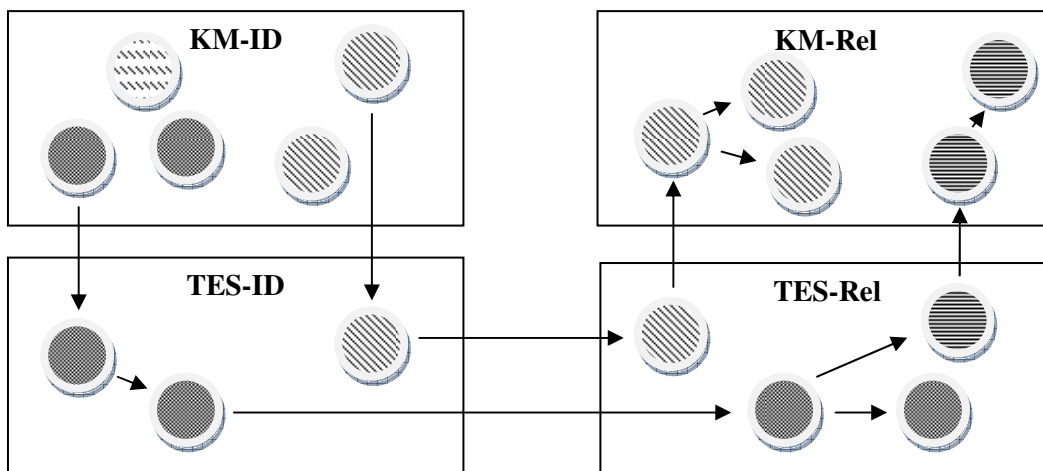
Die höhere Marker-Konkordanz zwischen Ersterkrankung und Hoden im Vergleich zu Ersterkrankung und KM setzt sich in Gruppe C fort. Bemerkenswert ist, dass die Übereinstimmung der Marker im Vergleich der Ersterkrankung und dem Hoden hier sogar höher als die Übereinstimmung zwischen Hoden und dem KM des kombinierten Rezidivs ist. Siehe dazu auch *Tabelle 17*.

Die acht Patienten der Gruppe C zeichnet eine erhöhte Instabilität der Immungene aus. Fünf der acht Patienten weisen ein oligoklonales IG- und TCR-Genumlagerungsmuster auf. Während Gruppe A im Median drei zu vergleichende Marker der Ersterkrankung und Rezidiv zeigt, sind es in Gruppe C 4,5. Aus der Beobachtung, dass die Übereinstimmungsrate zwischen Ersterkrankung und Hoden in dieser Gruppe nicht nur höher ist als zwischen Ersterkrankung und KM des Rezidiv, sondern auch als die Konkordanz der Marker von KM und Hoden im kombinierten Rezidiv, lassen sich Hinweise gewinnen, dass der Hoden schon früh im Krankheitsverlauf, wahrscheinlich während der Ersttherapie involviert worden sein könnte. Durch den hohen Selektionsdruck könnte es manchen Klonen mit besseren Wandereigenschaften gelungen sein, im Hodengewebe Fuß zu fassen. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich oligoklonale Klone in ihrer Therapieantwort unterscheiden können [106] und Oligoklonalität das Risiko einer Wiedererkrankung erhöht [107]. In dieser Weise könnten sie sich in ihrer Eigenschaft, das KM zu verlassen und in andere Organe zu migrieren, unterscheiden. Alle Patienten mit frühem Rezidiv entwickelten ihr Rezidiv höchstens 3,5 Monate

nach Ende der Ersttherapie. Zusammen mit der Beobachtung, dass Leukämiezellen im präpubertären Hoden auf ein besonderes Milieu treffen [74] und dadurch relativ geschützt sein können gegenüber Chemotherapeutika, spräche dies für folgende Entstehungshypothese des kombinierten Hodenrezidivs der Gruppe C:

Oligoklonale Klone der Ersterkrankung befallen früh den Hoden. Dort verändert sich im Laufe der Therapie die Dominanz, neue Subklone bilden sich. Sobald die Therapie beendet wurde, Subklone eine Resistenz entwickelt haben oder das Interstitium des Hodens Wachstumsfaktoren sezerniert, proliferieren die Subklone (unterschiedlich stark), befallen mit unterschiedlichen Subklonen das KM und lösen früh eine sichtbare Hodenschwellung aus, sodass wenig Zeit für die malignen Zellen bleibt, das KM zu befallen. In Gruppe C wurde mit einem Median von 30% Blastenanteil im KM der niedrigste Wert gemessen.

Abbildung 27: Schema zu Hypothese 2: Schon in der Initialdiagnose gibt es mehrere Klone unterschiedlicher Anteile, von denen manche das Interstitium des Hodens infiltrieren. Dort überdauern Leukämiezellen die Therapie und befallen das KM in einem häufig frühen Rezidiv. Die Muster stehen für Subklone mit unterschiedlichen IG-TCR-Genumlagerungen.



Die Tatsache, dass der Anteil an frühen beziehungsweise sehr frühen Rezidiven in dieser Gruppe mit 75% überdurchschnittlich hoch ist, bekräftigt diese Hypothese: Keine „neue“ Leukämie - wie in Gruppe A geschlossen - sondern ein semi-resistenter (Sub)-Klon der Ersterkrankung könnte mit seiner Migration in den Hoden verantwortlich sein für das kombinierte testikuläre Rezidiv.

Bei diesen Überlegungen ist zu berücksichtigen, dass wir mit den IG- und TCR-Genumlagerungen nur einen Teil des Abbildes der realen Leukämieerkrankung gewinnen und beispielsweise Bruchpunktgenanalysen zusätzlichen Aufschluss bieten könnten. Aufgrund der begrenzten Patientenzahl, die in der Rarität des kombinierten Hodenrezidivs begründet ist,

dienen die Ergebnisse keiner abschließenden Bewertung, sondern bereiten den Boden für weitere Forschung. Beispielsweise könnte bei einer größeren Fallzahl untersuchter Patienten ein Zusammenhang zwischen EFS und Gruppenzugehörigkeit (A, B oder C) gesucht werden. Gleichzeitig ist zu bedenken, dass IG-/TCR-Genumlagerungen keine funktionellen, genomischen Veränderungen sind. Daher wäre für eine vertiefende Betrachtung des Themas eine Untersuchung der funktionellen Genveränderungen, beispielsweise der des *TEL/AML-1*-Fusionsgens, hilfreich. Zudem ist zur Festigung der Hypothese 1 der Nachweis von *TEL/AML-1* positiven Leukämiezellen ohne *TEL*-Deletion aus einer Hodenbiopsie bei Ersterkrankung erforderlich. Tiefere Einblicke in die Klonalität und Evolution der Erkrankung würden auch durch das Next-Generation-Sequencing gewonnen werden. Die Frage, wie der Hoden der prä-leukämischen Stammzelle Schutz bietet und was die in den Hoden einwandernden Leukämiezellen beziehungsweise das Hodengewebe auszeichnet, war nicht Gegenstand der Arbeit. Die hohe Zahl *TEL/AML-1* Fusionsgen positiver Leukämien bietet jedoch einen interessanten Ansatz, die bisherige Forschung dazu fortzusetzen.

VI Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
BC	Buffy Coat
BCP-ALL	B-Zell-Precursor-ALL
BFM-Gruppe	Berlin-Frankfurt-Münster-Gruppe
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
c-ALL	common-ALL
CR	Komplette Remission (Complete Remission)
EFS	Ereignis freies Überleben
ESG	European Study Group
FAB-Classification	French-American-British-Klassifikation
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
GnRH	Gonadoliberin
IG	Immunglobulin
ITR	Isoliertes, testikuläres Rezidiv
KM	Knochenmark
LH	Luteinisierendes Hormon
MRD	Minimale Resterkrankung (Minimal Residual Disease)
n.a.	nicht analysierbar
OTD	Klinische Hodenbeteiligung (Overt Testicular Disease)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
Rez.	Rezidiv
RSS	Rekombinationssignalsequenz
TES	Hoden (Testis)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase

VII Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u>	<i>Lokalisation der ALL-Rezidive bei Jungen.</i>	010
<u>Abbildung 2:</u>	<i>Immunhistochemisch gefärbter Schnitt eines von ALL infiltrierten Hodens.</i>	015
<u>Abbildung 3:</u>	<i>Amplifizierbarkeit des β-Globin-Referenzgens der FFPE DNA-Proben.</i>	036
<u>Abbildung 4:</u>	<i>Sensitivitätstest der β-Globin Primer mit BC.</i>	038
<u>Abbildung 5:</u>	<i>Vergleich der Sensitivität von Agarosegel und Polyacrylamidgel.</i>	042
<u>Abbildung 6:</u>	<i>Fließschema zur Verwendbarkeit von FFPE DNA.</i>	043
<u>Abbildung 7:</u>	<i>Inzidenz aller identifizierter IG- und TCR-Genumlagerungen.</i>	046
<u>Abbildung 8:</u>	<i>Anzahl identifizierter Genumlagerungen pro analysierter DNA-Probe.</i>	046
<u>Abbildung 9:</u>	<i>Anteil der Proben mit mindestens einer der Genumlagerungen: Initialdiagnose.</i>	047
<u>Abbildung 10:</u>	<i>Anteil der Proben mit mindestens einer der Genumlagerungen: KM des kombinierten Rezidivs.</i>	047
<u>Abbildung 11:</u>	<i>Anteil der Proben mit mindestens einer der Genumlagerungen: Hoden.</i>	048
<u>Abbildung 12:</u>	<i>Vergleich der IG- und TCR-Genumlagerungen zwischen Hoden und KM des kombinierten Rezidivs: Übereinstimmungen.</i>	063
<u>Abbildung 13:</u>	<i>Vergleich der IG- und TCR-Genumlagerungen zwischen Hoden und KM des kombinierten Rezidivs: Unterschiedlichkeit.</i>	063
<u>Abbildung 14:</u>	<i>Einfluss des Alters bei Rezidivdiagnose auf die Übereinstimmungsrate der IG- und TCR-Genumlagerungen im Hauptklon: Übereinstimmungen.</i>	064

<u>Abbildung 15:</u>	<i>Einfluss des Alters bei Rezidivdiagnose auf die Übereinstimmungsrate der IG- und TCR-Genumlagerungen im Hauptklon: Unterschiedlichkeit.</i>	064
<u>Abbildung 16:</u>	<i>Einfluss des Rezidivzeitpunktes auf die Übereinstimmungsrate der IG- und TCR-Genumlagerungen im Hauptklon: Übereinstimmungen.</i>	065
<u>Abbildung 17:</u>	<i>Einfluss des Rezidivzeitpunktes auf die Übereinstimmungsrate der IG- und TCR-Genumlagerungen im Hauptklon: Unterschiedlichkeit.</i>	065
<u>Abbildung 18:</u>	<i>Einfluss der peripheren Blastenzahl auf die Übereinstimmungsrate der IG- und TCR-Genumlagerungen im Hauptklon.</i>	066
<u>Abbildung 19:</u>	<i>Vergleich der IG- und TCR-Genumlagerungen zwischen Ersterkrankung und kombiniertem Rezidiv: Übereinstimmungen.</i>	068
<u>Abbildung 20:</u>	<i>Vergleich der IG- und TCR-Genumlagerungen zwischen Ersterkrankung und kombiniertem Rezidiv: Unterschiedlichkeit.</i>	068
<u>Abbildung 21:</u>	<i>Darstellung der Gruppe A.</i>	078
<u>Abbildung 22:</u>	<i>Übersicht der Gruppe A inklusive Marker der Initialdiagnose.</i>	078
<u>Abbildung 23:</u>	<i>Schematische Darstellung der ersten Hypothese.</i>	079
<u>Abbildung 24:</u>	<i>Darstellung der Gruppe B.</i>	080
<u>Abbildung 25:</u>	<i>Darstellung der Gruppe C.</i>	080
<u>Abbildung 26:</u>	<i>Übersicht der Gruppe C inklusive Marker der Initialdiagnose.</i>	081
<u>Abbildung 27:</u>	<i>Schematische Darstellung der zweiten Hypothese.</i>	082

VIII Literaturverzeichnis

1. Deutsches Kinderkrebsregister, Jahresbericht 2011. Universitätsmedizin Mainz, Kaatsch P, Spix C. Mainz, 2001-2010.
(Accessed August 2, 2013 at www.kinderkrebsregister.de)
2. Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer*. 1995 Apr 15;75(8):2186-2195.
3. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008 Mar 22;371(9617):1030-1043.
4. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect*. 2007 Jan;115(1):138-145.
5. Lilleyman JS. Acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer*. 1997 Jan;33(1):85-90.
6. Kaatsch P, Haaf G, Michaelis J. Childhood malignancies in Germany - methods and results of a nationwide registry. *European Journal of Cancer*. 1995 Jun;31A(6):993-999.
7. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*. 2006 Mar-Apr;56(2):106-130.
8. Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D, Kantarjian HM. Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer*. 2010 Mar 1;116(5):1165-1176.
9. Kinlen LJ. Epidemiological evidence for an infective basis in childhood leukaemia. *Br J Cancer*. 1995 Jan;71(1):1-5.
10. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet*. 1997 Feb 1;349(9048):344-349.
11. Ma X, Buffler PA, Selvin S, Matthay KK, Wiencke JK, Wiemels JL, Reynolds P. Daycare attendance and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*. 2002 May 6;86(9):1419-1424.
12. Birger Y, Izraeli S. DYRK1A in Down syndrome: an oncogene or tumor suppressor? *J Clin Invest*. 2012 Mar 1;122(3):807-810.
13. Maloney KW. Acute lymphoblastic leukaemia in children with Down syndrome: an updated review. *Br J Haematol*. 2011 Nov;155(4):420-425.
14. Seif AE. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis. *Cancer Genet*. 2011 May;204(5):227-244.
15. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2321-2333.

16. Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, Mahmoud H, Steel CM, Chan LC, Greaves M. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature*. 1993 May 27;363(6427):358-360.
17. Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood*. 1999 Aug 1;94(3):1057-1062.
18. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Blood*. 1997 Jul 15;90(2):571-577.
19. McLean TW, Ringold S, Neuberg D, Stegmaier K, Tantravahi R, Ritz J, Koeffler HP, Takeuchi S, Janssen JW, Seriu T, Bartram CR, Sallan SE, Gilliland DG, Golub TR. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996 Dec 1;88(11):4252-4258.
20. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, Macintyre EA, Berger R, Bernard OA. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1995 Dec 1;86(11):4263-4269.
21. The United Kingdom Childhood Cancer Study: objectives, materials and methods. UK Childhood Cancer Study Investigators. *Br J Cancer*. 2000 Mar;82(5):1073-1102.
22. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves M. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Jun 11;99(12):8242-8247.
23. McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Ma X, Buffler PA, Guo W, Loh ML, Smith MT. Prenatal origin of TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia in children born in California. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 May;37(1):36-43.
24. Eden T. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treat Rev*. 2010 Jun;36(4):286-297.
25. Ford AM, Fasching K, Panzer-Grumayer ER, Koenig M, Haas OA, Greaves MF. Origins of "late" relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion genes. *Blood*. 2001 Aug 1;98(3):558-564.
26. Zuna J, Madzo J, Krejci O, Zemanova Z, Kalinova M, Muzikova K, Zapotocky M, Starkova J, Hrusak O, Horak J, Trka J. ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia. *Blood*. 2011 Jan 6;117(1):368-369; author reply 370-361.

27. Bleyer WA. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Advances and prospectus. Cancer.* 1990 Feb 1;65(3 Suppl):689-695.
28. Henze G, v. Stackelberg. Relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Childhood Leukemias.* Cambridge University Press 2006. p. 473-486.
29. Pinkel D. Lessons from 20 years of curative therapy of childhood acute leukaemia. *Br J Cancer.* 1992 Feb;65(2):148-153.
30. Siddhartha. M. Der König aller Krankheiten. Die Geschichte des Krebs. 2012:181-189. Aus dem Englischen von Schaden S.
31. Reid MM, Proctor SJ. Failure of FAB classification to predict relapse-free survival in acute leukemia. *Lancet.* 1982 Jul 17;2(8290)
32. Lilleyman JS, Hann IM, Stevens RF, Richards SM, Eden OB, Chessells JM, Bailey CC. Cytomorphology of childhood lymphoblastic leukaemia: a prospective study of 2000 patients. United Kingdom Medical Research Council's Working Party on Childhood Leukaemia. *Br J Haematol.* 1992 May;81(1):52-57.
33. Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1993 Jul 15;82(2):343-362.
34. Niehues T, Kapaun P, Harms DO, Burdach S, Kramm C, Korholz D, Janka-Schaub G, Gobel U. A classification based on T cell selection-related phenotypes identifies a subgroup of childhood T-ALL with favorable outcome in the COALL studies. *Leukemia.* 1999 Apr;13(4):614-617.
35. Lightfoot T. Aetiology of childhood leukemia. *Bioelectromagnetics.* 2005;Suppl 7:S5-S11.
36. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 1997 Aug;44(4):831-846.
37. Trueworthy R, Shuster J, Look T, Crist W, Borowitz M, Carroll A, Frankel L, Harris M, Wagner H, Haggard M, et al. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1992 Apr;10(4):606-613.
38. Fletcher JA, Lynch EA, Kimball VM, Donnelly M, Tantravahi R, Sallan SE. Translocation (9;22) is associated with extremely poor prognosis in intensively treated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1991 Feb 1;77(3):435-439.
39. Crist WM, Carroll AJ, Shuster JJ, Behm FG, Whitehead M, Vietti TJ, Look AT, Mahoney D, Ragab A, Pullen DJ, et al. Poor prognosis of children with pre-B acute

- lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13): a Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1990 Jul 1;76(1):117-122.
40. Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL, Liu Q, Crist WM, Downing JR, Rivera GK, Kersey JH, Pui CH. Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood*. 1996 Apr 1;87(7):2870-2877.
 41. Heerema NA, Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Lee MK, Hutchinson R, Lange BJ, Steinherz PG, Bostrom B, Gaynon PS, Uckun F. Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's cancer group. *Blood*. 1999 Dec 15;94(12):4036-4045.
 42. Gustafsson G, Garwicz S, Hertz H, Johansson G, Jonmundsson G, Moe PJ, Salmi T, Seip M, Siimes MA, Yssing M, et al. A population-based study of childhood acute lymphoblastic leukemia diagnosed from July 1981 through June 1985 in the five Nordic countries. Incidence, patient characteristics and treatment results. *Acta Paediatr Scand*. 1987 Sep;76(5):781-788.
 43. Hustu HO, Aur RJ. Extramedullary leukaemia. *Clin Haematol*. 1978 Jun;7(2):313-337.
 44. Nachman J, Palmer NF, Sather HN, Bleyer WA, Coccia PF, Lukens JN, Siegel SE, Hammond GD. 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 Mar 1;75(5):1051-1055.
 45. Gajjar A, Ribeiro RC, Mahmoud HH, Sandlund JT, Liu Q, Furman WL, Santana VM, Crist WM, Rivera GK, Pui CH. Overt testicular disease at diagnosis is associated with high risk features and a poor prognosis in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 1996 Dec 1;78(11):2437-2442.
 46. Donadieu J, Auclerc MF, Baruchel A, Leblanc T, Landman-Parker J, Perel Y, Michel G, Cornu G, Bordigoni P, Sommelet D, Leverger G, Hill C, Schaison G. Critical study of prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukaemia: differences in outcome are poorly explained by the most significant prognostic variables. Fralle group. French Acute Lymphoblastic Leukaemia study group. *Br J Haematol*. 1998 Aug;102(3):729-739.
 47. Hijiya N, Liu W, Sandlund JT, Jeha S, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Howard SC, Kyzer EP, Redd DS, Cheng C, Rivera GK, Hudson MM, Relling MV, Pui CH. Overt testicular disease at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: lack of therapeutic role of local irradiation. *Leukemia*. 2005 Aug;19(8):1399-1403. PubMed

48. Marwaha RK, Kulkarni KP, Bansal D, Trehan A. Overt testicular disease at diagnosis in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance and role of testicular irradiation. *Indian J Pediatr.* 2010 Jul;77(7):779-783.
49. Eckert C. Stackelberg v A. ALL-REZ BFM 96 and 02 trails. 2013.
50. Jacobs JE, Hastings C. Isolated extramedullary relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2010 Oct;5(4):185-191.
51. Barnett MJ, Greaves MF, Amess JA, Gregory WM, Rohatiner AZ, Dhaliwal HS, Slevin ML, Biruls R, Malpas JS, Lister TA. Treatment of acute lymphoblastic leukaemia in adults. *Br J Haematol.* 1986 Nov;64(3):455-468.
52. Jensen IM, Jensen PD, Ellegard J, Bastrup-Madsen P, Hokland P. Ekstramedullaere manifestationer hos voksne patienter med akut lymfoblastleukemi (ALL). [Extramedullary manifestations in adults with acute lymphoblastic leukemia (ALL)]. *Ugeskr Laeger.* 1991 Apr 15;153(16):1125-1129.
53. Smith SD, Trueworthy RC, Klopovich PM, Vats TS, Snodgrass W. Management of children with isolated testicular leukemia. *Cancer.* 1984 Dec 15;54(12):2854-2858.
54. Oakhill A, Mainwaring D, Hill FG, Gornall P, Cudmore RE, Banks AJ, Brock JE, Martin J, Mann JR. Management of leukaemic infiltration of the testis. *Arch Dis Child.* 1980 Jul;55(7):564-566.
55. Tabien U. Ergebnisse der Behandlung von Jungen mit testikulärem Rezidiv einer ALL nach Protokollen der ALL – REZ BFM Studien und Auswirkungen auf ihre Geschlechtsentwicklung 2008.
56. Brecher ML, Weinberg V, Boyett JM, Sinks LF, Jones B, Glicksman A, Holland JF, Freeman AI. Intermediate dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia resulting in decreased incidence of testicular relapse. *Cancer.* 1986 Sep 1;58(5):1024-1028.
57. Jahnukainen K, Attermo P, Saari T, Salmi TT, von Euler M, Pollanen P, Soder O. Effects of testicular cytokines on proliferation of rat T-leukaemic lymphoblasts in vitro. *J Reprod Immunol.* 1995 Mar;28(3):263-273.
58. Jahnukainen K, Morris I, Roe S, Salmi TT, Makiperna A, Pollanen P. A rodent model for testicular involvement in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer.* 1993 May;67(5):885-892.
59. Ritzen EM. Testicular relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL). *J Reprod Immunol.* 1990 Aug;18(1):117-121.

60. 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 Jun;87(6):638-643.
61. Henze G. Childhood acute lymphoblastic leukaemia. *European Journal of Cancer.* 1997 Jan;33(1):8-9.
62. Eckert C. HN, Schrauder A., zur Stadt U., Henze G., Stackelberg v. A. . Testicular ALL relapses might derive from pre-leukaemic clone and not from resistant overt leukaemia 2010.
63. Heaney JA, Klauber GT, Conley GR. Acute leukemia: diagnosis and management of testicular involvement. *Urology.* 1983 Jun;21(6):573-577.
64. Byrd RL. Proceedings of the tumor board of the Children's Hospital of Philadelphia. Testicular leukemia: incidence and management results. *Med Pediatr Oncol.* 1981;9(5):493-500.
65. Baum E, Heyn R, Nesbit M, Tilford D, Nachman J. Occult abdominal involvement with apparently isolated testicular relapse in children with acute lymphocytic leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1984 Fall;6(3):343-346.
66. Fengler R, Henze G, Langermann HJ, Bramswig J, Jobke A, Kornhuber B, Ludwig R, Ritter J, Riehm H. Häufigkeit und Behandlungsergebnisse testikulärer Rezidive bei der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter. *Klin Padiatr.* 1982 Jul-Aug;194(4):204-208.
67. 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 Apr;9(4):624-627.
68. Neale GA, Pui CH, Mahmoud HH, Mirro J, Jr., Crist WM, Rivera GK, Goorha RM. Molecular evidence for minimal residual bone marrow disease in children with 'isolated' extra-medullary relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1994 May;8(5):768-775.
69. Goulden N, Langlands K, Steward C, Katz F, Potter M, Chessells J, Oakhill A. PCR assessment of bone marrow status in 'isolated' extramedullary relapse of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 1994 Jun;87(2):282-285.
70. Gaynon PS, Qu RP, Chappell RJ, Willoughby ML, Tubergen DG, Steinherz PG, Trigg ME. Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse--the Children's Cancer Group Experience. *Cancer.* 1998 Apr 1;82(7):1387-1395.

71. Buchanan GR, Boyett JM, Pollock BH, Smith SD, Yanofsky RA, Ghim T, Wharam MD, Crist WM, Vietti TJ, Johnson W, 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 Jul 1;68(1):48-55.
72. Uderzo C, Grazia Zurlo M, Adamoli L, Zanesco L, Arico M, Calculli G, Comelli A, Cordero di Montezemolo L, Di Tullio MT, Guazzelli C, et al. Treatment of isolated testicular relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: an Italian multicenter study. *Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica. J Clin Oncol*. 1990 Apr;8(4):672-677.
73. Finklestein JZ, Miller DR, Feusner J, Stram DO, Baum E, Shina DC, Johnson DG, Gyepes MT, Hammond GD. Treatment of overt isolated testicular relapse in children on therapy for acute lymphoblastic leukemia. A report from the Childrens Cancer Group. *Cancer*. 1994 Jan 1;73(1):219-223.
74. Morgentaler A, Stahl BC, Yin Y. Testis and temperature: an historical, clinical, and research perspective. *J Androl*. 1999 Mar-Apr;20(2):189-195.
75. Largo RH, Prader A. Pubertal development in Swiss boys. *Helv Paediatr Acta*. 1983 Aug;38(3):211-228.
76. Tanner JM. Growth at adolescence, with a general consideration of the effects of hereditary and environmental factors upon growth and maturation from birth to maturity. Blackwell Scientific Publications. Oxford 1962. p. 325.
77. Fawcett DW, Leak LV, Heidger PM, Jr. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J Reprod Fertil Suppl*. 1970;10:105-122.
78. Russell LD, Bartke A, Goh JC. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am J Anat*. 1989 Mar;184(3):179-189.
79. McCabe MJ, Allan CM, Foo CF, Nicholls PK, McTavish KJ, Stanton PG. Androgen initiates Sertoli cell tight junction formation in the hypogonadal (hpg) mouse. *Biol Reprod*. 2012 Aug;87(2):38.
80. Hauptmann K. [Immunhistochemische Färbung eines ALL infiltrierten Hodenschnittes mittels TdT-AK]. Institut für Pathologie Charité Universitätsmedizin Berlin; Berlin, 2012.
81. Murphy K, Travers, P., Walport, M. *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Springer; 2009.

82. Dow LW, Martin P, Moohr J, Greenberg M, Macdougall LG, Najfeld V, Fialkow PJ. Evidence for clonal development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1985 Oct;66(4):902-907.
83. Rinaldi F, Mairs RJ, Wheldon TE, Katz F, Chessells JM, Gibson BE. Clonality analysis suggests that early-onset acute lymphoblastic leukaemia is of single-cell origin and implies no major role for germ cell mutations in parents. *Br J Cancer*. 1999 May;80(5-6):909-913.
84. Yunis JJ. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science*. 1983 Jul 15;221(4607):227-236.
85. Mayumi M, Kubagawa H, Omura GA, Gathings WE, Kearney JF, Cooper MD. Studies on the clonal origin of human B cell leukemia using monoclonal anti-idiotypic antibodies. *J Immunol*. 1982 Aug;129(2):904-910.
86. 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 Mar;15(1):37-57.
87. van der Velden VH, van Dongen JJ. MRD detection in acute lymphoblastic leukemia patients using Ig/TCR gene rearrangements as targets for real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2009;538:115-150.
88. Szczepanski T, Willemse MJ, van Wering ER, van Weerden JF, Kamps WA, van Dongen JJ. 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 Sep;15(9):1415-1423.
89. Foroni L, Harrison CJ, Hoffbrand AV, Potter MN. Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia by molecular analysis. *Br J Haematol*. 1999 Apr;105(1):7-24.
90. Kitchingman GR, Rovigatti U, Mauer AM, Melvin S, Murphy SB, Stass S. Rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1985 Mar;65(3):725-729.
91. Assumpcao JG, Ganazza MA, de Araujo M, Silva AS, Scrideli CA, Brandalise SR, Yunes JA. Detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia using a low-cost PCR strategy. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Dec 15;55(7):1278-1286.
92. Dawidowska M, Derwich K, Szczepanski T, Jolkowska J, van der Velden VH, Wachowiak J, Witt M. Pattern of immunoglobulin and T-cell receptor (Ig/TCR) gene

- rearrangements in Polish pediatric acute lymphoblastic leukemia patients--implications for RQ-PCR-based assessment of minimal residual disease. *Leuk Res.* 2006 Sep;30(9):1119-1125.
93. 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 Apr 1;99(7):2315-2323.
94. Davey MP, Bongiovanni KF, Kaulfersch W, Quertermous T, Seidman JG, Hershfield MS, Kurtzberg J, Haynes BF, Davis MM, Waldmann TA. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement and expression in human lymphoid leukemia cells at different stages of maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Nov;83(22):8759-8763.
95. Kraszewska MD, Dawidowska M, Kosmalka M, Sedek L, Grzeszczak W, Szczepanski T, Witt M, Polish Pediatric Leukemia Lymphoma Study G. Immunoglobulin/T-cell receptor gene rearrangements in the diagnostic paradigm of pediatric patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2012 Jul;53(7):1425-1428.
96. Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Beyermann B, Pogodda M, Proba J, Henze G. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2001 Oct 13;358(9289):1239-1241.
97. Pui CH, Campana D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2000 May;14(5):783-785.
98. Eckert C, von Stackelberg A, Seeger K, Groeneveld TW, Peters C, Klingebiel T, Borkhardt A, Schrappe M, Escherich G, Henze G. Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia - Long-term results of trial ALL-REZ BFM P95/96. *European Journal of Cancer.* 2012 Dec 19.
99. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986-994.
100. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer.* 2006 Dec;6(12):924-935.
101. Pepper JR, Scott Findlay, C., Kassen, R., Spencer, S., Maley, C. Cancer research meets evolutionary biology. *Evol Appl.* 2009;2:62-70.
102. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012 Jan 19;481(7381):306-313.

103. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood*. 1991 Jul 1;78(1):192-196.
104. Potter MN, Steward CG, Maitland NJ, Oakhill A. Detection of clonality in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia by the polymerase chain reaction. *Leukemia*. 1992 Apr;6(4):289-294.
105. Davi F, Gocke C, Smith S, Sklar J. Lymphocytic progenitor cell origin and clonal evolution of human B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996 Jul 15;88(2):609-621.
106. de Haas V, Verhagen OJ, von dem Borne AE, Kroes W, van den Berg H, van der Schoot CE. Quantification of minimal residual disease in children with oligoclonal B-precursor acute lymphoblastic leukemia indicates that the clones that grow out during relapse already have the slowest rate of reduction during induction therapy. *Leukemia*. 2001 Jan;15(1):134-140.
107. Stankovic T, Mann JR, Darbyshire PJ, Taylor AM. Clonal diversity, measured by heterogeneity of Ig and TCR gene rearrangements, in some acute leukaemias of childhood is associated with a more aggressive disease. *European Journal of Cancer*. 1995;31A(3):394-401.
108. Beishuizen A, Hahlen K, Hagemeyer A, Verhoeven MA, Hooijkaas H, Adriaansen HJ, Wolvers-Tettero IL, van Wering ER, van Dongen JJ. Multiple rearranged immunoglobulin genes in childhood acute lymphoblastic leukemia of precursor B-cell origin. *Leukemia*. 1991 Aug;5(8):657-667.
109. Steenbergen EJ, Verhagen OJ, van den Berg H, van Leeuwen EF, Behrendt H, Slater RR, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Rearrangement status of the malignant cell determines type of secondary IgH rearrangement (V-replacement or V to DJ joining) in childhood B precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1997 Aug;11(8):1258-1265.
110. van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. *Clin Chim Acta*. 1991 Apr;198(1-2):93-174.
111. Kitchingman GR. Immunoglobulin heavy chain gene VH-D junctional diversity at diagnosis in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993 Feb 1;81(3):775-782.

112. Hendrickson EA, Liu VF, Weaver DT. Strand breaks without DNA rearrangement in V (D)J recombination. *Mol Cell Biol.* 1991 Jun;11(6):3155-3162.
113. Steenbergen EJ, Verhagen OJ, van Leeuwen EF, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Distinct ongoing Ig heavy chain rearrangement processes in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1993 Jul 15;82(2):581-589.
114. Beishuizen A, Verhoeven MA, van Wering ER, Hahlen K, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis and subsequent relapse: implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. *Blood.* 1994 Apr 15;83(8):2238-2247.
115. Steward CG, Goulden NJ, Katz F, Baines D, Martin PG, Langlands K, Potter MN, Chessells JM, Oakhill A. A polymerase chain reaction study of the stability of Ig heavy-chain and T-cell receptor delta gene rearrangements between presentation and relapse of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1994 Mar 1;83(5):1355-1362.
116. Taylor JJ, Rowe D, Kylefjord H, Chessells J, Katz F, Proctor SJ, Middleton PG. Characterisation of non-concordance in the T-cell receptor gamma chain genes at presentation and clinical relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1994 Jan;8(1):60-66.
117. van der Velden VH, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hahlen K, van Wering ER, van Dongen JJ. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia.* 2002 May;16(5):928-936.
118. Germano G, del Giudice L, Palatron S, Giarin E, Cazzaniga G, Biondi A, Basso G. Clonality profile in relapsed precursor-B-ALL children by GeneScan and sequencing analyses. Consequences on minimal residual disease monitoring. *Leukemia.* 2003 Aug;17(8):1573-1582.
119. Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ. 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 Jan;13(1):110-118.
120. Guggemos A, Eckert C, Szczepanski T, Hanel C, Taube T, van der Velden VH, Graf-Einsiedel H, Henze G, Seeger K. Assessment of clonal stability of minimal residual

- disease targets between 1st and 2nd relapse of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2003 Jul;88(7):737-746.
121. 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.
122. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol*. 1976 Jun;Suppl 5:9-15.
123. Bonin S, Hlubek F, Benhattar J, Denkert C, Dietel M, Fernandez PL, Hofler G, Kothmaier H, Kruslin B, Mazzanti CM, Perren A, Popper H, Scarpa A, Soares P, Stanta G, Groenen PJ. Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch*. 2010 Sep;457(3):309-317.
124. Svachova M, Tichy M. PCR analysis of immunoglobulin heavy chain and TCR gene rearrangements in diagnosis of lymphoproliferative disorders on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Neoplasma*. 2008;55(1):36-41.
125. Sambrook J, Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
126. Deane M, Norton JD. Immunoglobulin heavy chain variable region family usage is independent of tumor cell phenotype in human B lineage leukemias. *Eur J Immunol*. 1990 Oct;20(10):2209-2217.
127. Eckert C. Minimale Resterkrankung bei Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie – Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie durch molekulargenetische Methoden als neues Stratifizierungskriterium der Therapieoptimierungsprüfung ALL-REZ BFM 2002. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin. Berlin, 2004.
128. Eckert C, Henze G, Seeger K. et al., Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group. *Journal of Clinical Oncology*, 2003. 31(21): p. 2736-42.
129. Taube T, Seeger K, Beyermann B, Hanel C, Duda S, Linderkamp C, Henze G. Multiplex PCR for simultaneous detection of the most frequent T cell receptor-delta gene rearrangements in childhood ALL. *Leukemia*. 1997 Nov;11(11):1978-1982.
130. Croce CM, Shander M, Martinis J, Cicurel L, D'Ancona GG, Dolby TW, Koprowski H. Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Jul;76(7):3416-3419.

131. McBride OW, Battey J, Hollis GF, Swan DC, Siebenlist U, Leder P. Localization of human variable and constant region immunoglobulin heavy chain genes on subtelomeric band q32 of chromosome 14. *Nucleic Acids Res.* 1982 Dec 20;10(24):8155-8170.
132. Murre C, Waldmann RA, Morton CC, Bongiovanni KF, Waldmann TA, Shows TB, Seidman JG. Human gamma-chain genes are rearranged in leukaemic T cells and map to the short arm of chromosome 7. *Nature.* 1985 Aug 8-14;316(6028):549-552.
133. Isobe M, Erikson J, Emanuel BS, Nowell PC, Croce CM. Location of gene for beta subunit of human T-cell receptor at band 7q35, a region prone to rearrangements in T cells. *Science.* 1985 May 3;228(4699):580-582.
134. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology.* 1992;24:104-108.
135. Li A, Zhou J, Zuckerman D, Rue M, Dalton V, Lyons C, Silverman LB, Sallan SE, Gribben JG. Sequence analysis of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and at relapse: implications for pathogenesis and for the clinical utility of PCR-based methods of minimal residual disease detection. *Blood.* 2003 Dec 15;102(13):4520-4526.
136. Eckert C, Flohr T, Koehler R, Hagedorn N, Moericke A, Stanulla M, Kirschner-Schwabe R, Cario G, Stackelberg A, Bartram CR, Henze G, Schrappe M, Schrauder A. Very early/early relapses of acute lymphoblastic leukemia show unexpected changes of clonal markers and high heterogeneity in response to initial and relapse treatment. *Leukemia.* 2011 Aug;25(8):1305-1313.
137. Dedhia P, Tarale S, Dhongde G, Khadapkar R, Das B. Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2007 Jan-Mar;8(1):55-59.
138. Peham M, Konrad M, Harbott J, Konig M, Haas OA, Panzer-Grumayer ER. Clonal variation of the immunogenotype in relapsed ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia indicates subclone formation during early stages of leukemia development. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004 Feb;39(2):156-160.

IX Anhang

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nils Waldhüter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

‘Klonale Verwandtschaft leukämischer Zellen aus Hoden und Knochenmark bei Kindern mit kombiniertem testikulären Rezidiv der akuten lymphoblastischen Leukämie’

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen den URM (siehe oben) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden, gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (siehe oben) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

(Nils Waldhüter)

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Publikation:

Waldhüter N., von Stackelberg A., Eckert C. Combined testicular relapses of acute lymphoblastic leukemia: clonal relation between different sites and stages. (In Vorbereitung.)

Kongressbeiträge

Waldhüter N., Eckert C. Clonal relation of combined testicular relapses in children with acute lymphoblastic leukemia. First results of our study. Oral presentation, 9th WIMC (2013).

Lebenslauf

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

Danksagung

Herzlichen Dank Frau Dr. Cornelia Eckert für die Überlassung des Themas. Danke für die jahrelange, hervorragende Betreuung.

Herzlichen Dank dem Labor-Team: Ute Schwiem, Claudia Hanel, Marion Fillies, Wilhelmine Keune, Jutta Proba und Katarzyna Pododzinski. Danke für eure Hilfe und Ratschläge. Danke für den Spaß, den wir zusammen hatten!

Herzlichen Dank meinen Nächsten, den Korrekturlesern und geduldigen Zuhörern - im Besonderen Tobias Oebel und Helmut Neubauer.

Herzlichen Dank meinen Eltern für das Vertrauen und die Unterstützung in den Studienjahren.

Übersetzung des Zitats:

»„Wenn man ihn“, fragte ich weiter, „von dort wegzöge, mit Gewalt, den schwierigen und steilen Anstieg hinan und nicht früher losließe, bis man ihn ans Licht der Sonne gebracht hätte, würde er da nicht voll Schmerz und Unwillen sein über die Verschleppung?“«

Platon, der Staat. Übersetzung von Karl Vretska