

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *long-distance* RT-PCR zum Nachweis von *TEL-AML1*-Spleißvarianten

Zum Nachweis von Spleißvarianten wurde die kodierende *TEL-AML1*-mRNA-Sequenz in einer *long-distance* RT-PCR amplifiziert. Sofern Spleißvarianten vorhanden sind, müßten diese, da ihnen kodierende Sequenzen fehlen, zur Bildung kürzerer PCR-Produkte führen als die bekannte *TEL-AML1*-mRNA. Dies wiederum ließe sich in der Agarosegelelektrophorese durch eine schnellere Wanderung der kürzeren PCR-Produkte erkennen.

#### 4.1.1 Etablierung der *long-distance* RT-PCR

Zur Etablierung der *long-distance* RT-PCR wurde RNA der Zelllinie REH verwendet. Nach Optimierung aller Parameter wurde dann Gesamt-RNA der leukämischen Blasten von Patienten mit einer *TEL-AML1* positiven ALL untersucht.

##### 4.1.1.1 Optimierung der Reversen Transkription

Die *TEL-AML1*-mRNA weist carboxyterminal einen hohen GC-Gehalt auf, was zu einer besonders stabilen Sekundärstrukturbildung führt. Um möglichst viel cDNA in optimaler Qualität für die *long-distance* PCR zu erhalten, wurden zwei verschiedene Enzyme für die Reverse Transkription getestet.

Die SuperScript II Reverse Transkriptase hat ein Temperaturoptimum von 40 – 50°C, die *C. therm.* Polymerase hingegen von 60 – 70°C, was eine effektivere c-DNA-Synthese GC-reicher Sequenzen ermöglichen soll. Beide Enzyme wurden sowohl mit spezifischen Primern als auch mit Hexanukleotiden, bei verschiedenen Temperaturen sowie mit und ohne Zugabe von DMSO getestet. Die Ergebnisse waren insgesamt vergleichbar. Vor allem erbrachte die Verwendung der *C. therm.* Polymerase keinen Vorteil, so dass die Reverse Transkription standardmäßig mit SuperScript II und Hexanukleotiden bei 37°C durchgeführt wurde.

##### 4.1.1.2 Primerdesign

Die Primer für die *long-distance* PCR wurden so ausgewählt, dass sie zwischen 20 und 30 Nukleotiden lang sind, ähnliche Schmelztemperaturen sowie einen GC-Gehalt von 40-60% haben. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass möglichst keine internen Anlage-

rungsstellen vorhanden sind, um eine Sekundärstrukturbildung zu verhindern und dass keine 3'-Komplementarität der Primer besteht.

Die Optimierung des Primerdesigns und die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte mit speziell zu diesem Zweck angebotenen Computerprogrammen (OLIGO 5.0 und JAVA OLIGO).

#### 4.1.1.3 Auswahl der Polymerase

Zunächst wurde versucht, die komplette *TEL-AML1*-cDNA mit normaler TaqPolymerase zu amplifizieren, was aber nicht gelang. Auch die TaqPolymerase Gold, die erst durch eine fünfminütige Inkubation bei über 90°C aktiviert wird, was unspezifische Reaktionen während des Pipettierens verhindert, führte zu keinem Ergebnis. Dann wurden verschiedene Kits, die extra für die Amplifikation langer und GC-reicher Sequenzen konzipiert wurden, getestet. Im einzelnen waren dies das Expand Long Template PCR System, das Expand 20kb<sup>plus</sup> PCR System, das GC-Rich PCR System, das FailSafe™ PCR System und das Extensor Hi-Fidelity PCR Kit. Nur das Expand 20kb<sup>plus</sup> PCR System führte zu einer reproduzierbaren Amplifikation.

#### 4.1.1.4 Weitere Optimierungsstrategien

Die verschiedenen Primer wurden zunächst in einer normalen PCR hinsichtlich ihrer Spezifität getestet. Die sich als geeignet herausstellenden Primer wurden dann in allen möglichen Zweierkombinationen in der *long-distance* PCR eingesetzt. Am günstigsten erwies sich der *upstream* Primer TEL2 (im *TEL* Exon 2 gelegen) zusammen mit dem *downstream* Primer AML1954 (im *AML1* Exon 8). Da anfangs nur eine sehr schwache und auch nicht konstant reproduzierbare Amplifikation erfolgte, wurden verschiedene weitere Strategien zur Optimierung der *long-distance* PCR angewandt. Um die Sekundärstrukturen aufzuheben, wurde DMSO in verschiedenen Konzentrationen zum PCR-Ansatz dazugegeben, sowie die Denaturierungstemperatur und -zeit erhöht. Nach Optimierung des Konzentrationsverhältnisses der verschiedenen Reagenzien wurde das Temperaturprofil systematisch verändert. Die Einführung eines „*touch-down*“-Schritts, das heißt einer sukzessiven Verminderung der *annealing*-Temperatur im PCR-Verlauf, erwies sich als entscheidend für die Amplifikation.

#### 4.1.2 Nachweisbare Spleißvarianten

Mit der oben beschriebenen *long-distance* PCR wurden Proben von 25 Patienten untersucht. Jeder PCR-Ansatz enthielt eine Negativkontrolle ohne cDNA sowie eine Positivkontrolle mit cDNA der Zelllinie REH. In der anschließenden Agarosegelelektrophorese war bei 17 Patientenproben eine Bande von 2300 bp nachweisbar, welche dem kompletten Fusionstranskript entspricht. Alle Proben, auch die, die nicht die 2300 bp-Bande aufwiesen, zeigten mehrere kürzere Banden. Diese Banden wurden ausgeschnitten, unter denselben Versuchsbedingungen reamplifiziert und sequenziert (Abbildung 13). Aus fünf der ausgeschnittenen und sequenzierten Banden lies sich eine noch nicht beschriebene *TEL-AML1*-Spleißvariante nachweisen. Hierbei ist das *TEL* Exon 2 mit dem *AML1* Exon 5 fusioniert. Im Vergleich mit dem bekannten *TEL-AML1*-Fusionstranskript (Fusion von *TEL* Exon 5 mit *AML1* Exon 2) fehlen also die Exons 3 – 5 von *TEL* sowie die Exons 2 – 4 von *AML1*. Insgesamt ist die neue Spleißvariante 1296 bp kürzer als das *TEL-AML1*-Fusionstranskript mit *TEL* Exon 5 / *AML1* Exon 2.

##### *TEL-AML1*-Fusionsgen mit *AML1* Exon 2



##### *TEL-AML1*-Fusionsgen ohne *AML1* Exon 2



##### *T2 – A 5*



Exons von *TEL*

Exons von *AML1*

Abbildung 12: Schematische Darstellung der *TEL-AML1*-Spleißvarianten

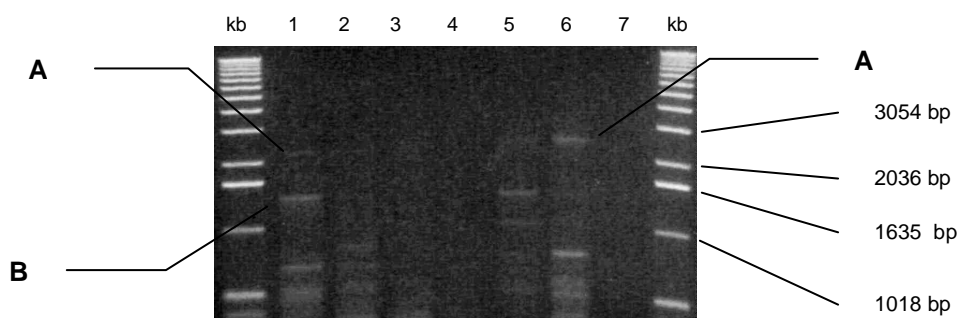


Abbildung 13: Spleißvarianten von *TEL-AML1* Fusionstranskripten bei ALL im Kindesalter. In der Agarosegelelektrophorese aufgetrennte Amplifikate aus der *long-distance* RT-PCR. In Spur 1 – 5 sind RNA-Proben verschiedener an einer *TEL-AML1* positiven ALL erkrankter Patienten eingesetzt; Spur 6: Positivkontrolle (RNA der Zelllinie REH); Spur 7: Negativkontrolle ohne RNA; kb: DNA-Längenmarker; A: *TEL-AML1*-Fusionstranskript mit *TEL* Exon 5 / *AML1* Exon2 (*T5-A2*); B: *T2-A5*-Spleißvariante

#### 4.1.3 Vereinfachung des Nachweises der neuen Spleißvariante

Um ein größeres Patientenkollektiv spezifisch auf das Vorhandensein der *T2-A5*-Spleißvariante untersuchen zu können, wurde eine PCR etabliert, die nur zu einer Amplifikation der Spleißvariante, nicht jedoch des kompletten Fusionstranskripts führt. Verwendet wurden hierfür Primer, die im *TEL* Exon 2 und im *AML1* Exon 5 liegen, was bei der Spleißvariante einem PCR-Produkt von ca. 200 bp entspricht, bei der kompletten *TEL-AML1*-mRNA jedoch von ca. 1500 bp. Da die verwendete TaqPolymerase Gold Sequenzen bis ca. 800 bp vorzugsweise amplifiziert, kam es nur zu einer Amplifikation der *T2-A5*-Spleißvariante. Mit dieser PCR wurden dann die 25 Patienten, die bereits mit der *long-distance* PCR untersucht worden waren, erneut kontrolliert.

Es wurden ebenfalls mehrere Primer entworfen, deren Sequenz die neue Fusionsstelle überspannt. Von originaler cDNA war mit diesen Primern keine oder nur eine sehr schwache Amplifikation möglich. Bei der Reamplifikation ausgeschnittener Banden aus der *long-distance* PCR zeigte sich jedoch eine deutliche Bande erwarteter Länge auf dem Agarosegel. Dies ermöglicht zumindest ohne komplizierte und zeitaufwendige Sequenzierung nachzuweisen, ob sich in unerwarteten Banden einer PCR die *T2-A5*-Spleißvariante verbirgt oder nicht.

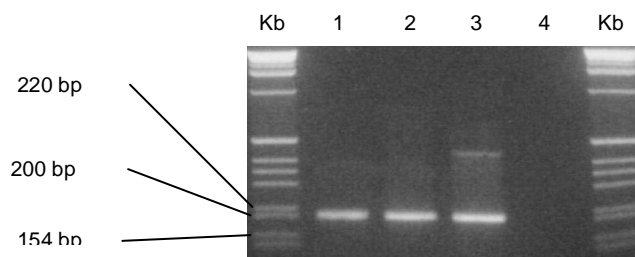


Abbildung 14: Nachweis der *T2-A5*-Variante. In der *long-distance* PCR ausgeschnittene Banden wurden mit Primern, die die neue Fusionsstelle überspannen, reamplifiziert und die Amplifikate dann in Spur 1-3 der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die bei den eingesetzten Primern erwartete Länge des Amplifikats der *T2-A5*-Variante beträgt ca. 200 bp. Spur 4: Negativkontrolle ohne cDNA; kb : DNA-Längenmarker

#### 4.1.4 Häufigkeit der *T2-A5*-Spleißvariante

Insgesamt wurden 25 Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL auf das Vorhandensein von *TEL-AML1*-Spleißvarianten untersucht. Bei 22 Patienten (88%) konnte die *T2-A5*-Spleißvariante nachgewiesen werden. Bei den restlichen drei Patienten war das Ergebnis der PCR nicht eindeutig, da die Variante durchweg nur schwach exprimiert wurde und sich schwer amplifizieren ließ.

Tabelle 10: Häufigkeit der *T2-A5*-Spleißvariante bei *TEL-AML1* positiven ALL im Kindesalter

	n	<i>T2-A5</i> -Spleißvariante	keine <i>T2-A5</i> -Spleißvariante
Ersterkrankungen	8	8	0
Rezidiv	17	14	3
Gesamt	25	22	3

Tabelle 11: Charakteristika der auf das Vorhandensein von *TEL-AML1* Spleißvarianten untersuchten Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL

Patient	Geschlecht	ALL-Subtyp	Ersterkrankung / Rezidiv	T2-A5 vorhanden
1	m	prä-B	Ersterkrankung	nein
2	w	common	Ersterkrankung	ja
3	m	common	Ersterkrankung	ja
4	m	common	erstes Rezidiv	ja
5	m	prä-B	Ersterkrankung	ja
6	w	common	Ersterkrankung	ja
7	m	prä-B	erstes Rezidiv	ja
8	m	prä-B	zweites Rezidiv	ja
9	w	common	zweites Rezidiv	nein
10	m	prä-B	Ersterkrankung	ja
11	m	common	Ersterkrankung	ja
12	m	-	zweites Rezidiv	nein
13	m	-	Rezidiv	ja
14	w	common	erstes Rezidiv	ja
15	m	common	erstes Rezidiv	ja
16	m	common	erstes Rezidiv	ja
17	m	prä-B	erstes Rezidiv	ja
18	m	-	Ersterkrankung	ja
19	w	prä-B	erstes Rezidiv	nein
20	m	common	erstes Rezidiv	ja
21	m	common	erstes Rezidiv	ja
22	w	prä-B	erstes Rezidiv	ja
23	w	-	zweites Rezidiv	ja
24	w	-	zweites Rezidiv	ja
25	w	common	erstes Rezidiv	ja

m: männlich, w: weiblich

#### 4.1.5 Stabilität der T2-A5-Spleißvariante

Zellen der *TEL-AML1* positiven Zelllinie REH wurden bei Raumtemperatur und bei 4°C inkubiert und jeweils nach 0, nach 12, nach 24, nach 48 und nach 72 Stunden extrahiert und bei -80°C eingefroren. Insgesamt ergaben sich neun verschiedene Proben, die anschließend gemeinsam aufgearbeitet wurden. Um festzustellen, ob längere Lagerung zu einer verstärkten Expression der T2-A5-Spleißvariante führt, wurde eine RT-PCR wie bereits beschrieben durchgeführt. Auf dem Agarosegel zeigten sich jedoch konstant schwächere Banden ab einer Inkubation von 12 Stunden.

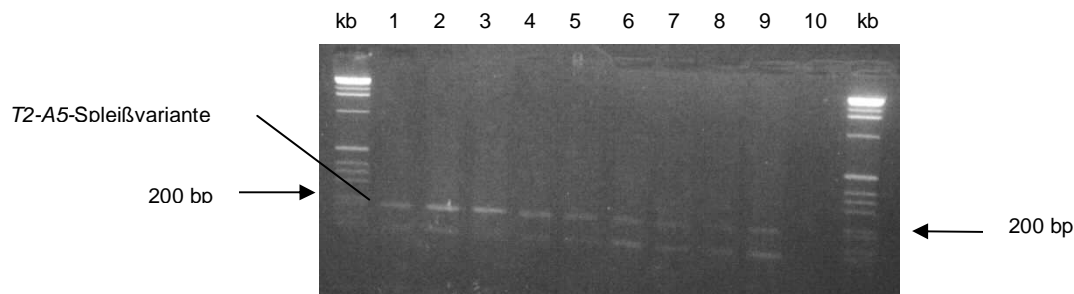


Abbildung 15: Nachweis der T2-A5-Spleißvariante in REH-Zellen nach direkter Aufarbeitung der Zellen (Spur 1), nach Lagerung von 12 h Dauer bei Raumtemperatur (Spur 2), von 12 h bei 4°C (Spur 3), von 24h bei Raumtemperatur (Spur 4), von 24h bei 4°C (Spur 5), von 48 h bei Raumtemperatur (Spur 6), von 48 h bei 4°C (Spur 7), von 72 h bei Raumtemperatur (Spur 8), von 72 h bei 4°C (Spur 9). Spur 10: Negativkontrolle ohne cDNA; kb: Längenmarker

#### 4.1.6 *TEL-AML1*-Fusion ohne *TEL* Exon 5

Eine weitere *TEL-AML1*-Variante konnte bei einem Patienten mit einer B-Vorläuferzell-ALL-Ersterkrankung nachgewiesen werden. In der routinemäßig durchgeführten *nested* RT-PCR zum Nachweis der *TEL-AML1*-Fusion zeigte sich keine Amplifikation, jedoch lies sich in der zytogenetischen FISH-Untersuchung ein deutliches Fusionssignal nachweisen. Aufgrund dieser Diskrepanz wurde die RNA dieses Patienten mit der oben beschriebenen *long-distance* PCR untersucht. In der anschließenden Agarosegelelektrophorese zeigte sich eine Bande, die jedoch ca. 500 bp kürzer war, als es von den verwendeten Primern her zu erwarten gewesen wäre. Die Sequenzierung der Bande

ergab, dass bei diesem Transkript das Exon 5 von *TEL* fehlte, also Exon 4 von *TEL* mit Exon 2 von *AML1* fusioniert war.

#### ***TEL-AML1*-Fusionsgen ohne *TEL* Exon 5**

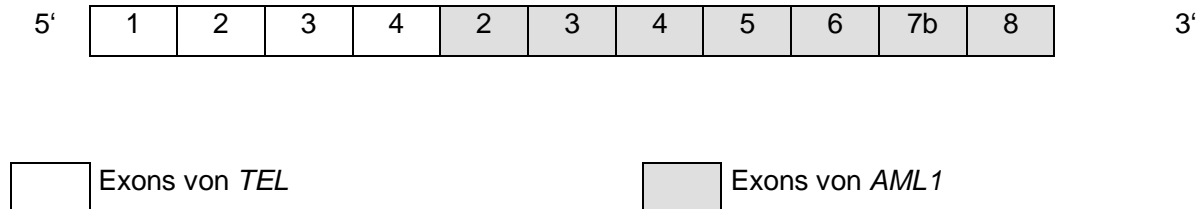


Abbildung 16: Schematische Darstellung der *T4-A2*-Variante

## **4.2 *TEL-AML1*-Quantifizierung zur MRD-Bestimmung**

### **4.2.1 Sensitivität**

Leukämische Zellen von Patienten mit *TEL-AML1* positiver ALL sowie von der Zelllinie REH wurden in mononukleären Zellen gesunder Spender verdünnt. Es wurden je fünf Verdünnungsstufen hergestellt ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  REH Zellen) in Gesamtzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen. Anschließend wurde die RNA extrahiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Unter optimierten PCR-Bedingungen konnten sowohl in den Verdünnungsreihen der ALL-Blasten als auch in der Verdünnungsreihe der REH-Zelllinie 10 leukämische Zellen in  $10^5$  Zellen nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Sensitivität von  $10^{-4}$ . Alle Proben wurden doppelt bestimmt und die Experimente wurden mindestens ein Mal wiederholt.



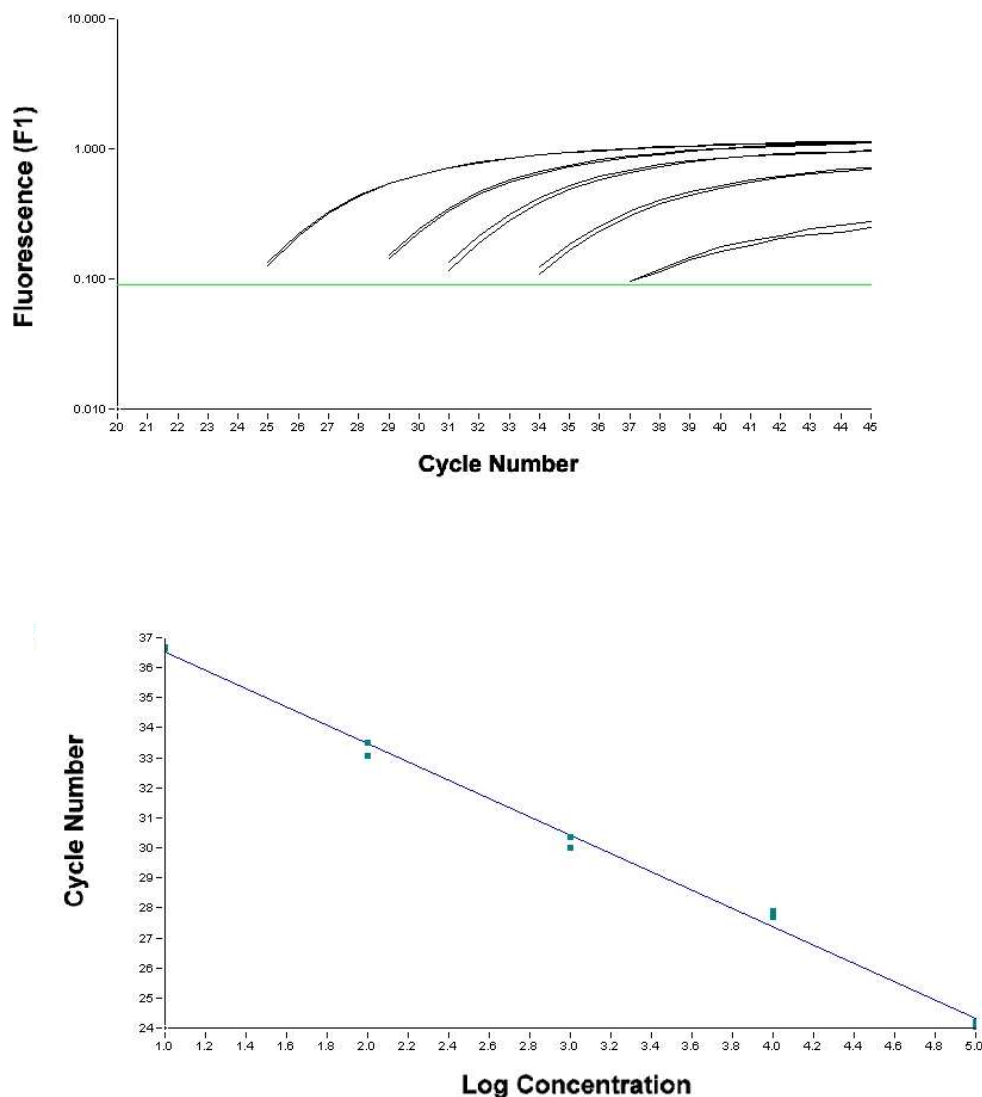


Abbildung 17: *TEL-AML1*-Fusionstranskript: LightCycler *real-time* Quantifizierung über vier Verdünnungsstufen (oben) und daraus errechnete Standardkurve (unten). In jeder Reaktion wurde die cDNA, die aus  $2,5 \times 10^5$  Zellen gewonnen wurde, verwendet. Es konnten 10 *TEL-AML1* positive Zellen in  $10^5$  Zellen nachgewiesen werden.

#### 4.2.2 PCR-Kinetik / Standardkurve

Plasmid-DNA von *TEL-AML1* und von  $\beta 2$ -Mikroglobulin wurde jeweils über fünf Stufen verdünnt ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  Kopien des jeweiligen Gens). Jede dieser beiden Verdünnungsreihen wurde dann mehrfach mit der beschriebenen *real-time* PCR quantifiziert, die *TEL-AML1*-Plasmid-DNA mit den *TEL-AML1*-Primern und die  $\beta 2$ -Mikroglobulin-DNA mit den  $\beta 2$ -Mikroglobulin-Primern. Anschließend wurden die so erstellten Fluoreszenzkurven sowie die hieraus jeweils errechneten Standardkurven der

beiden Gene miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Steigungen der Standardkurven und somit die Effizienzen der PCR-Reaktionen gleich waren. Es erschien angesichts dessen ausreichend, pro Lauf immer nur eine Verdünnungsreihe mitzubestimmen.

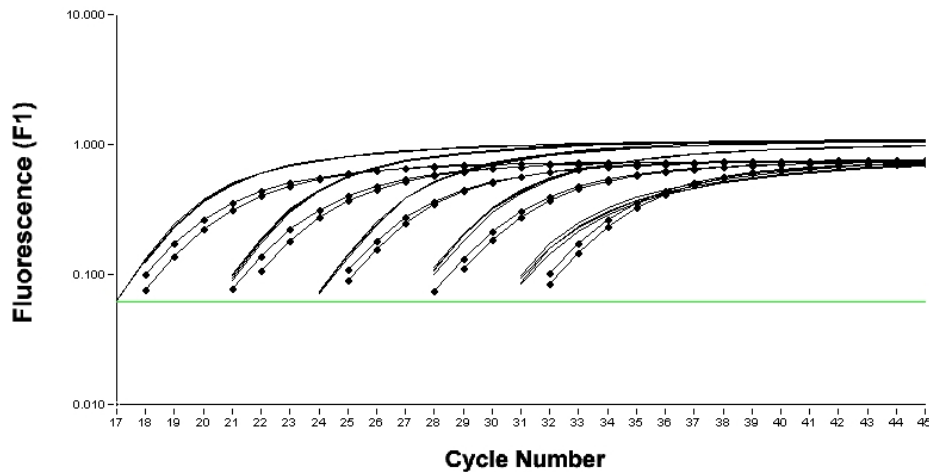


Abbildung 18: LightCycler *real-time* Quantifizierung von *TEL-AML1* (—) und *β2-Mikroglobulin* (●—●) über vier Verdünnungsstufen ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  Kopien des jeweiligen Gens). Die Fluoreszenzkurven der jeweils gleichen Verdünnungsstufen überschreiten die festgesetzte Schwelle nach derselben Anzahl von PCR-Zyklen. Dies zeigt, dass die Effizienzen beider PCR-Amplifikationen gleich sind.

### 4.2.3 RNA-Stabilität

Um die Stabilität der *TEL-AML1*-mRNA zu untersuchen, wurden REH-Zellen bei Raumtemperatur und bei 4°C inkubiert. Die RNA wurde dann nach 0, nach 12, nach 24, nach 36 und nach 48 Stunden Inkubation extrahiert. Nach reverser Transkription wurden, wie bereits beschrieben, *TEL-AML1* und *β2-Mikroglobulin* quantifiziert. Eine Inkubation bis zu 48 Stunden führte nur zu einer geringen Abnahme der *TEL-AML1*- und *β2-Mikroglobulin*-RNA. Die Differenz der Schwellenzyklen von inkubierten und nicht inkubierten Zellen war kleiner 1 und auch das Verhältnis von *TEL-AML1* zu *β2-Mikroglobulin* blieb gleich.

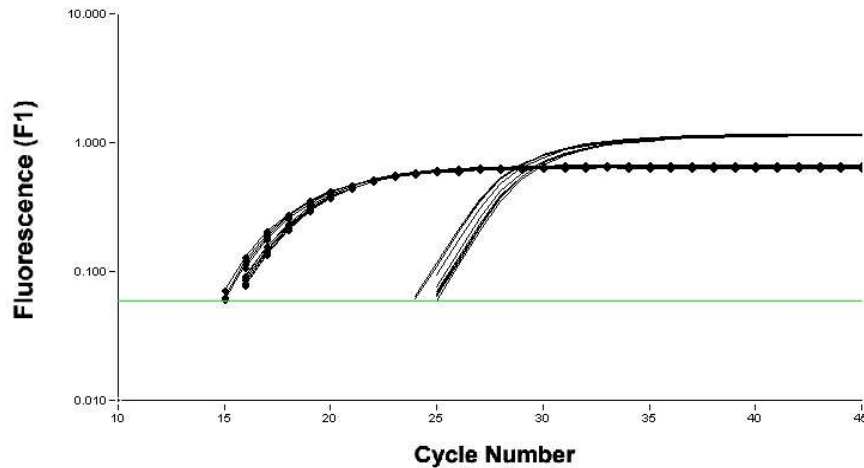


Abbildung 19: RNA-Stabilität: Die Inkubation von REH-Zellen bis zu 48 Stunden führt nur zu einer geringen Abnahme von *TEL-AML1* ( — ) und *β2-Mikroglobulin* ( ●—● ) in der quantitativen *real-time* PCR.

#### 4.2.4 Berechnung des MRD-Levels

Um das MRD-Level der Patienten zu bestimmen wird *TEL-AML1* bei Diagnose auf den Wert 1 gesetzt und dann der Anteil der leukämischen Zellen nach der Gleichung:

$10^x = \frac{\Delta C_p MRD - \Delta C_p Diag}{y}$  berechnet. Hierbei steht  $x$  für den Anteil der leukämischen

Zellen,  $C_p MRD$  für den normalisierten Schwellenwert [ $C_p$  t(12;21) –  $C_p$  β2M] zum MRD-Zeitpunkt,  $C_p Diag$  für den normalisierten Schwellenwert bei Diagnose und  $y$  für die Steigung der Standardkurve.

#### 4.2.5 *TEL-AML1* *real-time* RT-PCR: MRD-Ergebnisse

Das Behandlungsprotokoll der Studie ALL-REZ BFM 96 besteht aus mehreren Polychemotherapiezyklen, die in ca. dreiwöchigen Abständen verabreicht werden. Die *TEL-AML1*-Expression wurde bei allen untersuchten Patienten bei Diagnose des Rezidivs quantifiziert sowie jeweils vor den Therapieblöcken 2-4 (entsprechend ca. Tag 21, Tag 42, Tag 63). Bei vielen Patienten war nicht von allen *follow-up*-Zeitpunkten Knochenmark vorhanden, so dass insgesamt pro Patient zwischen zwei und vier Proben quantifiziert wurden.

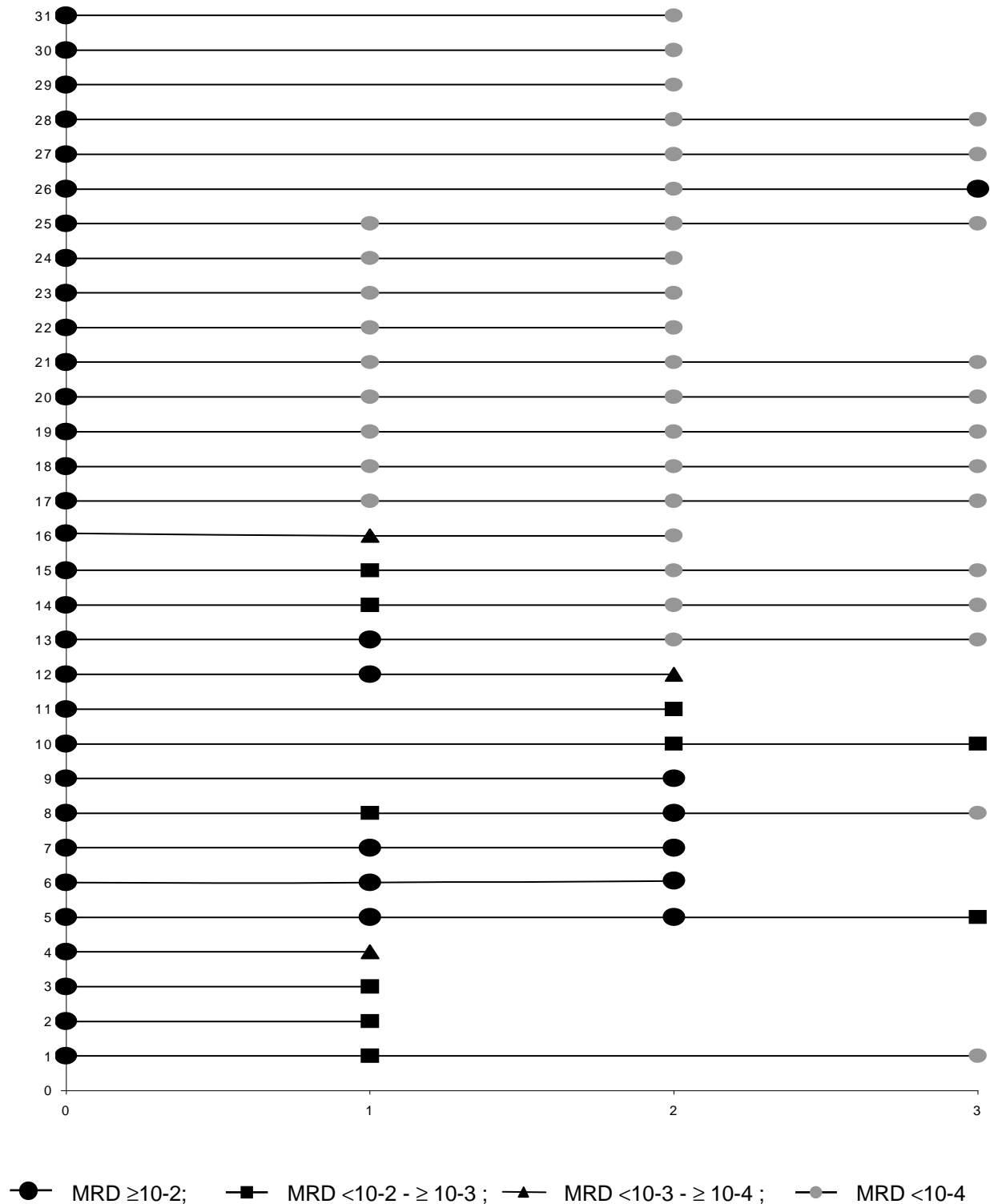


Abbildung 20: Quantifizierung der *TEL-AML1* Fusionstranskripte bei *TEL-AML1* positiver ALL: Darstellung der MRD-Ergebnisse jedes Patienten zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die 31 untersuchten Patienten sind auf der Y-Achse aufgetragen, die Zeitpunkte auf der X-Achse. Zeitpunkt 1: vor dem zweiten Rezidivtherapie-Block F2; Zeitpunkt 2: vor dem dritten Rezidivtherapie-Block R1; Zeitpunkt 3: vor dem vierten Rezidivtherapie-Block R2. Das jeweils gemessene MRD-Level wird durch die unterschiedlichen Symbole dargestellt.

Tabelle 12: Charakteristika der Patienten mit TEL-AML1 positivem ALL-Rezidiv

Patient	Geschlecht	Rezidiv	Alter bei Rezidivdiagnose	B-Vorläuferzell- Immunphänotyp
1	w	erstes	5,1	prä-B
2	m	erstes	8,1	-
3	m	erstes	13,2	common
4	w	erstes	7,6	-
5	w	erstes	8,3	prä-B
6	m	erstes	10,8	common
7	m	erstes	14,7	common
8	m	erstes	5,5	prä-B
9	w	erstes	8,4	-
10	m	zweites	19,6	common
11	m	erstes	7,2	-
12	w	erstes	13,6	common
13	m	erstes	5,6	prä-B
14	w	erstes	7,5	common
15	m	erstes	8,6	common
16	m	erstes	5,3	common
17	m	erstes	12,2	common
18	m	erstes	11,5	-
19	m	erstes	11,4	common
20	m	erstes	9,1	-
21	m	erstes	9	-
22	m	erstes	9,2	common
23	w	erstes	6,8	-
24	w	erstes	11	common
25	m	erstes	10,7	common
26	m	erstes	7,7	common
27	m	erstes	9	common
28	w	erstes	8,6	common
29	m	erstes	4,8	common
30	w	erstes	8	common
31	w	erstes	6,8	common

Altersangabe in Jahren; m: männlich; w: weiblich

#### 4.2.6 MRD-Status und EFS

Anhand der obigen MRD-Ergebnisse wurde die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (*event-free survival*, EFS) der analysierten Patienten mit TEL-AML1 positivem ALL-Rezidiv berechnet. „Ereignis“ bedeutet hierbei ein erneutes Rezidiv oder aber den Tod des Patienten. Je nachdem, ob MRD an dem jeweils untersuchten Zeitpunkt  $\geq 10^{-3}$  (bezeichnet als MRD positiv) oder aber  $<10^{-3}$  (MRD negativ) war, wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt. Bei der Analyse der MRD-Daten vom Tag 36 (vor dem dritten Rezidivtherapie-Block, vor R1) zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Wahrscheinlichkeit des EFS zwischen den beiden Gruppen (siehe Abb. 21). Die Patientencharakteristika (siehe Tab. 13 - 15) desselben Zeitpunkts zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen der MRD-positiven und der MRD-negativen Patientengruppe.

Tabelle 13: Charakteristika von Patienten mit *TEL-AML1* positivem ALL-Rezidiv nach MRD-Untergruppen (Tag 36): stetige Variablen

	MRD $<10^{-3}$	MRD $\geq 10^{-3}$	p
Median (minimum/maximum)			
Gesamt	20	7	
Dauer der 1. Remission (Tage)	1428 (724/3116)	1035 (519/2242)	0.07
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	4.6 (1.9/11.6)	7.3 (3.0/11.2)	0.12
Alter bei Rezidivdiagnose (Jahre)	9.0 (4.8/13.6)	10.8 (5.6/19.6)	0.4
PBC bei Rezidivdiagnose [log n+1/ $\mu$ l]	3.0 (0.0/4.5)	2.6 (0.0/4.2)	0.18
Beobachtungszeit (Jahre)	2.0 (0.9/6.6)	2.9 (1.3/4.6)	0.24

PBC: Anzahl peripherer Blasten

Tabelle 14: Charakteristika von Patienten mit *TEL-AML1* positivem ALL-Rezidiv nach MRD-Untergruppen (Tag 36): kategorielle Variablen

	MRD <10 <sup>-3</sup>	MRD ≥ 10 <sup>-3</sup>	p
<b>Gesamt</b>	20	7	
<b>Rezidiv</b>			0.26
erstes	20	6	
zweites	-	1	
<b>Geschlecht</b>			1.0
männlich	13	5	
weiblich	7	2	
<b>Zeitpunkt</b>			0.21
sehr früh	-	1	
früh	2	1	
spät	18	5	
<b>Ort des Rezidivs</b>			0.16
KM isoliert	13	5	
kombiniert	7	1	
extramedullär	-	1	
<b>Immunphänotyp</b>			0.33
c-ALL	16	4	
prä-B	4	3	
<b>PBC</b>			0.44
< 1/μl	2	2	
≥ 1 and <10000/μl	16	4	
≥ 10000/μl	2	1	
unbekannt	-	1	
<b>Stratifizierungsgruppe</b>			0.17
S2A	6	2	
S2B	13	3	
S2C	1	-	
S2D	-	1	
S3	-	1	

PBC: Anzahl peripherer Blasten;

Tabelle 15: Patientencharakteristika der MRD-Untergruppen am Tag 36: Behandlung

	MRD <10 <sup>-3</sup>	MRD ≥ 10 <sup>-3</sup>	p
Gesamt	20	7	
<b>Therapie bei Ersterkrankung</b>			0.16
ALL-BFM	14	7	
COALL	6	-	
<b>Rezidivtherapie</b>			0.69
ALL-REZ BFM 90	1	-	
ALL-REZ BFM 95	1	-	
ALL-REZ BFM 96	18	7	
<b>Stammzelltransplantation</b>			0.45
keine	16	5	
MFD SZT	1	-	
MUD SZT	1	-	
haploide SZT	1	-	
unbekannt	1	2	

MFD: *matched family donor*, MUD: *matched unrelated donor*, SZT: Stammzelltransplantation

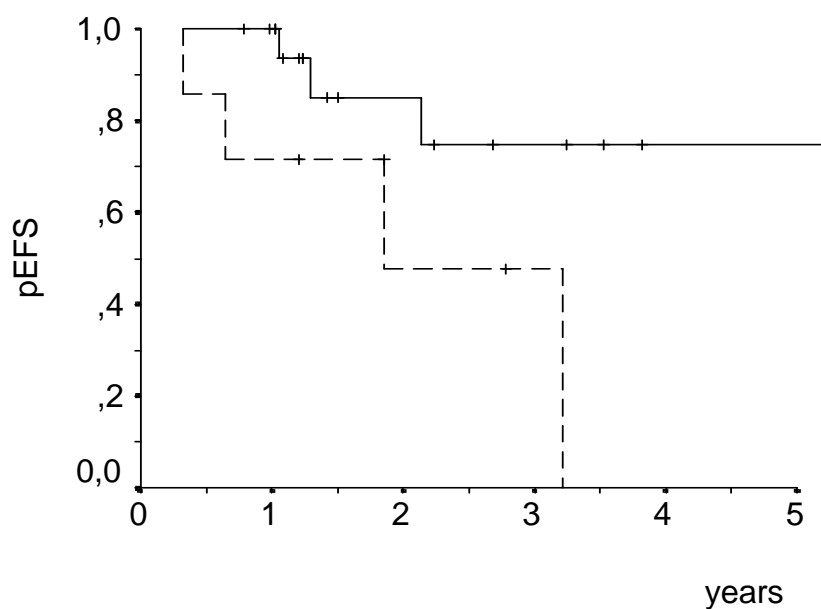


Abbildung 21: Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens nach dem zweiten Therapieblock des Rezidivprotokolls

— MRD <10<sup>-3</sup> : n = 20; zensiert = 17; pEFS = 75 ± 13

---- MRD ≥ 10<sup>-3</sup> : n = 7; zensiert = 3; pEFS = 00 ± 00

Log-Rank test: p = 0.034



#### 4.2.7 MRD-Status und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit

Die Analyse der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit nach dem zweiten Block des Rezidivprotokolls zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der MDR-positiven und der MRD-negativen Patientengruppe.

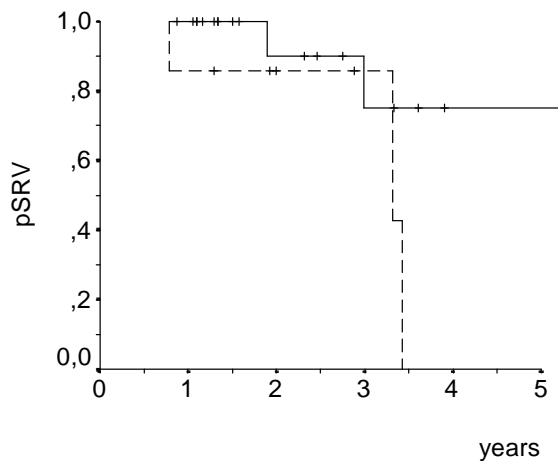


Abbildung 22: Überlebenswahrscheinlichkeit nach dem zweiten Block des Rezidivprotokolls

— MRD  $<10^{-3}$ : n = 20; zensiert = 18; pSRV =  $75 \pm 16$

---- MRD  $\geq 10^{-3}$ : n = 7; zensiert = 4; pSRV =  $00 \pm 00$

Log-Rank test: p = 0.089