

Aus dem  
CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin  
mit Perinatalzentrum und Humangenetik  
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie  
Direktorin: Prof. Dr. med. Angelika Eggert

## **Habilitationsschrift**

### ***Minimal Residual Disease* beim Rezidiv der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindes-/Jugendalter**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. rer. medic. Cornelia Eckert**

Eingereicht:	August 2015
Dekan:	Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachterin:	Prof. Dr. Claudia Rössig, Münster
2. Gutachter:	Prof. Dr. Wolf-Karsten Hofmann, Mannheim

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungen</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
2.1 Produkte der Ig/TCR Genrekombination zum sensitiven Nachweis klonaler Populationen.....	4
2.2 Klonale Heterogenität, Selektion und Evolution .....	7
2.3 Prognostische Bedeutung von MRD und Einsatz in der Therapiestratifizierung.....	9
<b>3. Eigene Arbeiten</b> .....	<b>12</b>
3.1 Klonale Stabilität und Evolution bei ALL Rezidiven.....	12
3.2 Neue Definition des isoliert extramedullären Rezidivs.....	22
3.3 Prognostische Bedeutung von MRD nach der Induktionstherapie bei ALL-Rezidiven.....	32
3.4 Verbesserung der Prognose durch MRD basierte Therapiestratifizierung.....	44
3.5 MRD Persistenz nach Induktionstherapie bis zur HSCT.....	58
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>68</b>
4.1 Klinisches Potential des MRD-Monitorings in verschiedenen ALL-Rezidiv Subgruppen .....	68
4.2 Modifizierung des prognostischen MRD-Effekts durch den Ort und Zeitpunkt des Rezidivs .....	71
4.3 Verbesserung des Response-Monitorings - Erhöhung der diagnostischen Präzision.....	72
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>75</b>
<b>6. Literatur</b> .....	<b>76</b>
<b>7. Danksagung</b> .....	<b>83</b>
<b>8. Erklärung</b> .....	<b>84</b>

## 1. Abkürzungen

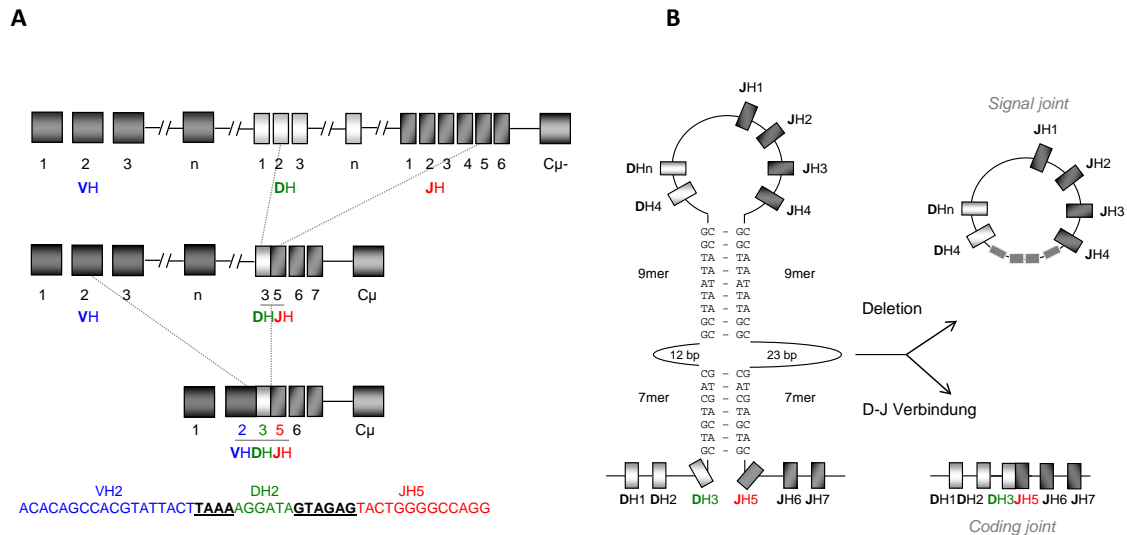
AID	<i>Activation Induced Cytidine Deaminase</i>
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
BCP-ALL	<i>B-cell precursor ALL</i> , B-Vorläuferzell ALL
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
FC	<i>Flow Cytometry</i> , Durchflusszytometrie
HSCT	<i>Hematopoietic stem cell transplantation</i> , hämatopoetische Stammzelltransplantation
Ig	<i>Immunoglobulin</i> , Immunglobulin
IgH	<i>Immunoglobulin heavy chain</i> , Immunglobulin schwere Ketten
MRD	<i>Minimal residual disease</i> , Minimale Leukämiezelllast
NGS	<i>Next-generation sequencing</i> , Hochdurchsatzsequenzierung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
RAG	<i>Recombination activating gene</i> , Rekombination aktivierendes Gen
RSS	<i>Recombination signal sequences</i> , Rekombinationssignalsequenzen
SE	<i>Standard error</i> , Standardfehler
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-Zellrezeptor
TdT	<i>Terminal Deoxynucleotidyltransferase</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 2. Einleitung

### 2.1 Produkte der Ig/TCR Genrekombination zum sensitiven Nachweis klonaler Populationen

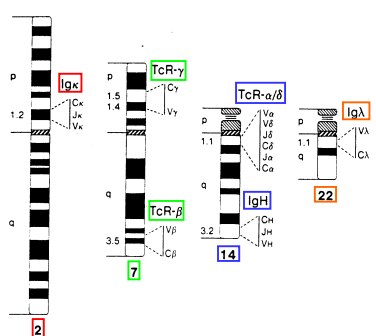
Susumu Tonegawa erhielt im Jahr 1987 den Nobelpreis für Medizin für seine in den 70er/Anfang der 80er Jahre erschienenen Arbeiten zur Aufdeckung der genetischen Grundlage der Antikörper Diversität – die somatische Genrekombination.<sup>1, 2</sup> In den darauffolgenden Jahren wurde diese grundlegende Information auch für die Klassifizierung lymphoproliferativer Erkrankungen genutzt. Die somatische Rekombination innerhalb der Immunglobulin(Ig)- und T-Zellrezeptor(TCR)-Gene ermöglicht eine Diversität dieser, die auf genomischer und Proteinebene zu einem einzigartigen Produkt in jedem einzelnen Lymphozyten und damit in jedem lymphozytären Klon führt.<sup>3</sup> Dieses Wissen wurde auch für den submikroskopischen genomischen Nachweis von Leukämiezellen bei der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) genutzt, da diese eine klonale lymphoproliferative Erkrankung ist.<sup>4-6</sup>

Die somatische Genrekombination findet während der normalen physiologischen Reifung der B- oder T-Zell Lymphozyten innerhalb der Ig und TCR Gene statt. Dieser Prozess wird spezifisch durch verschiedene Enzymen und Faktoren katalysiert: i) das Rekombinase Enzymsystem, das u.a. die Schlüsselprodukte der Rekombination aktivierenden Gene *RAG1* und *RAG2* enthält, ii) in die DNA-Reparatur des *Nonhomologen Endjoinings* involvierte Faktoren, wie die DNA-Ligase IV, die DNA abhängige Proteinkinase, die Nuklease Artemis und das Ku Protein, iii) die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) sowie iv) die Exonuklease und v) die DNA-Polymerase.<sup>7</sup> Die Diversität der Antigenrezeptoren liegt bei mindestens  $10^9$  und würde in einzelnen Genen kodiert einen zu großen Platz des Genoms einnehmen. Sie setzt sich aus der variablen Kombination jeweils eines der verschiedenen V-, D- und J- Segmente sowie der Verbindung dieser durch das zufällige Matrizenstrang unabhängige Einfügen von Nukleotiden durch die TdT und der Deletion von Nukleotiden an den Verbindungsstellen der Segmente zusammen (**Abbildung 1A, B**).<sup>1, 8-10</sup> Dieser Prozess wird über verschiedene entwicklungs- und zelltypabhängige Mechanismen auf genetischer und vor allem epigenetischer Ebene fein reguliert. So findet die Genumlagerung unter allelischem Ausschluss statt, d.h. nur ein Allel wird jeweils rearrangiert. Häufig sind beide Allele rearrangiert. Jedoch werden nur etwa 30% der Genumlagerungsprodukte exprimiert, die anderen sind außerhalb des DNA Leserasters.<sup>11</sup>



**Abbildung 1:** Genumlagerungsprozess – schematisch – der Variable (V), Diversity (D) und Joining (J) Gensegmente der Immunglobulin schweren Ketten – IgH. (A) Folgende zwei Prozesse werden durchlaufen, die zur Vielfalt der Genumlagerungsprodukte beitragen. 1. Rekombination jeweils eines V, D oder J Segments (**kombinatorische Diversität**). Im Fall von IgH werden zuerst ein DH mit einem JH Segment und dann ein VH mit dem entstandenen DHJH Segment kombiniert. 2. Verknüpfung der jeweiligen Segmente durch zufälliges Einfügen von Nukleotiden (schwarz unterstrichen) durch die TdT und Deletion von Nukleotiden an den Verbindungsstellen der Segmente (**verbindende Diversität**). Die am Schluss resultierende Sequenz ist wie ein Fingerabdruck für eine Zelle bzw. einen Zellklon. (B) Erkennung von Heptamer-/Nonamer Rekombinations-Signalsequenzen (RSS) durch die Hauptenzyme der Rekombination RAG1 und RAG2 zwischen den jeweiligen V, D oder J Segmenten und Induktion eines Doppelstrangbruchs nach der komplementären Paarung der Heptamer-/Nonamer Sequenzen. Dieser Prozess resultiert in der Verbindung von zwei Segmenten (hier des DH3 mit dem JH5 Segments), bezeichnet als **Coding joint**, sowie die Deletion der Segmente dazwischen (zwischen DH3 und JH5), des sogenannten **Signal joints**. (modifiziert aus der PhD Arbeit von T. Szczepanski).<sup>12</sup>

Es gibt sechs verschiedene Genorte, in denen die somatische Genrekombination während der Lymphozytenreifung stattfindet (**Abbildung 2**). Für die ALL ist bekannt, dass etwa 80% der B-Zellvorläufer(BCP) ALL die TCR und 20% der T-Zell ALL die Ig-Ketten umlagern, was auch, jedoch selten, für gesunde reife T- und B-Lymphozyten beschrieben ist.<sup>13-16</sup> Die funktionelle Bedeutung der Rekombinase Aktivität wurde kürzlich für die auch klonal expandierenden natürlichen Killerzellen gezeigt, die aus einer bereits RAG exprimierenden gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle stammen.<sup>17</sup>

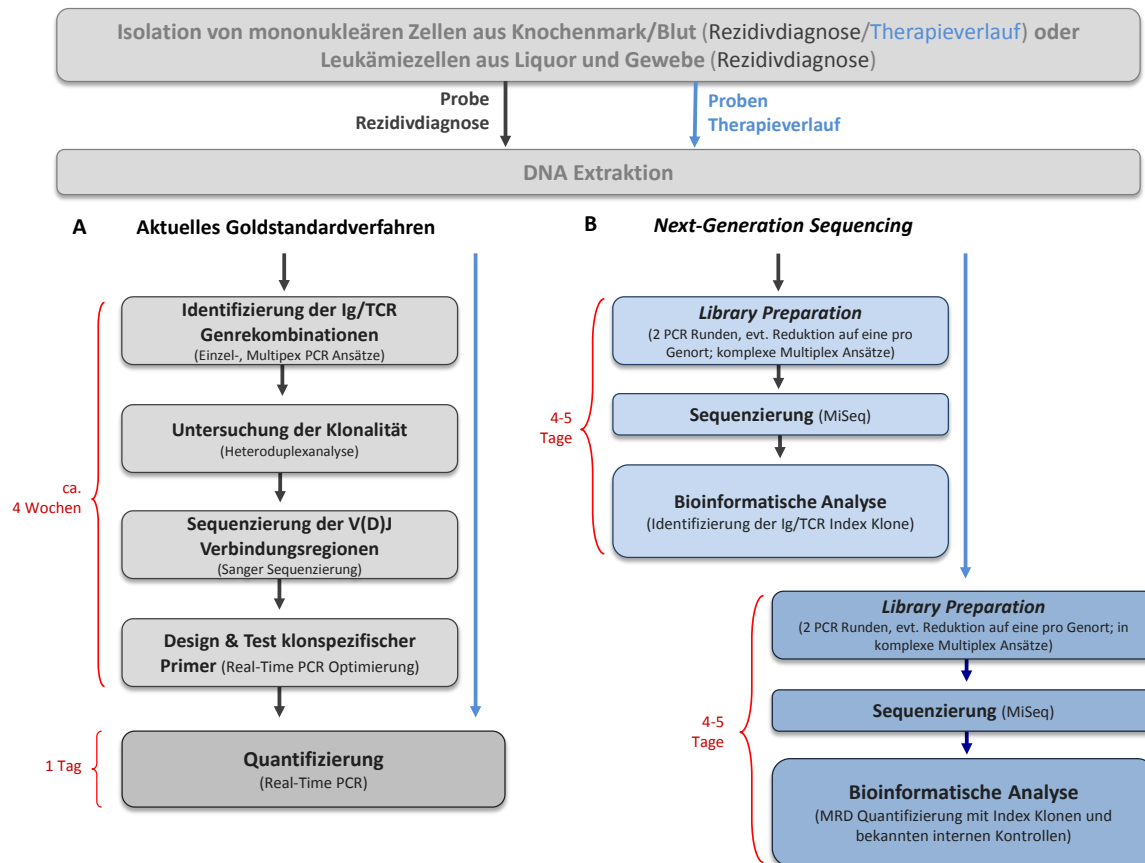


**Abbildung 2:** Schematische Übersicht der Genorte der V(D)J Genumlagerungen. Die leichten Ketten Igk und Igl liegen auf den Chromosomen 2 (rot) und 22 (orange), die Ig schweren Ketten (IgH) auf Chromosom 14 (blau), TCRg and TCRb auf Chromosom 7 (grün) und TCRd innerhalb des TCRa Genorts auf Chromosom 14 (blau) (modifiziert aus van Dongen JIM, *Clin Chim Acta* 1991 – Part I).<sup>9</sup>

Die klonalen Produkte der Ig/TCR Genrekombination können mit verschiedenen Labormethoden nachgewiesen werden. Anfänglich wurden diese mit Southern Blot identifiziert. Später war ihr Nachweis mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) möglich.<sup>9, 10, 18</sup> Die anschließende Sanger Sequenzierung erlaubte die genaue Lokalisation und Auswertung der klonenspezifischen Sequenz - die Verbindungsstelle der jeweiligen V-, D- und J-Segmente. Diese dient als Basis für die Entwicklung eines klonenspezifischen Oligonukleotids (Sonde oder Primer), das für den spezifischen (semi-)quantitativen Nachweis von leukämischen Restzellen mit Hilfe der Dot-Blot

Hybridisierung und der ab Ende der 90er Jahre verfügbaren *Real-Time* PCR verwendet wurde.<sup>19-21</sup> Mit der *Real-Time* PCR ist es möglich, spezifisch Leukämiezellen 100- bis 1000-fach sensitiver als mit dem

Lichtmikroskop, also im submikroskopischen Bereich - bezeichnet als minimal residual disease (MRD), nachzuweisen. Die Methode ist aktuell der Goldstandard für das Therapie begleitende MRD-Monitoring bei der ALL in Europa. In den vergangenen Jahren wurde im *EuroMRD* Konsortium (<http://www.euomrd.org>) in gemeinsamer Arbeit verschiedener Labore das methodische Verfahren zur *Real-Time* PCR basierten Anwendung der Ig/TCR Marker für die MRD Quantifizierung bei der ALL optimiert, standardisiert, Regeln für die Analyse und Interpretation der Daten aufgestellt sowie regelmäßige Qualitätskontrollen durchgeführt (**Abbildung 3A**).<sup>22</sup> Da Hintergrundwissen sowie einschlägige Erfahrungen notwendig sind, führen nur definierte Labore (*Referenzlabore*) die Messung von MRD in Behandlungsstudien durch. Neben der PCR unter Verwendung der klonalen Ig/TCR Marker hat sich in den vergangenen Jahren die Mehrfarbendurchflusszytometrie als zweite, zusätzliche Methode zur MRD Quantifizierung bei der ALL durchgesetzt. Hier werden aberrante Oberflächen- und intrazelluläre Marker, die den Immunphänotyp der ALL Zellen charakterisieren, verwendet. Diese Methode erreicht inzwischen eine ähnlich gute Sensitivität wie die PCR, jedoch ist sie bisher nicht in der Form standardisiert wie die PCR.<sup>23,24</sup> Eine neue Technologie, das *next-generation sequencing* (NGS) kann sowohl zur Identifizierung der klonalen Ig/TCR Genumlagerungen bei der Diagnose einer ALL als auch zum sensitiven quantitativen Nachweis von MRD während der Therapie verwendet werden. Der Vorteil der NGS basierten MRD Quantifizierung ist vor allem, dass keine patientenspezifischen *Real-Time* PCRs etabliert werden müssen, d.h. es ist kein Design und Testen von spezifischen Primern und Optimieren der *Real-Time* PCRs für verschiedene identifizierte und sequenzierte Ig/TCR Genumlagerungen pro Patient erforderlich (**Abbildung 3A, B**). Bei der NGS basierten Identifizierung klonaler Genrekombinationen werden große umfassende PCR Multiplexansätze durchgeführt, für die die Primer so designt werden, dass ein größeres Repertoire von möglichen Genrearrangements erfasst werden kann. Beim klassischen Vorgehen werden dagegen überwiegend die bei der ALL häufigsten Genrearrangements mit in der Regel Einzel-PCRs oder kleineren Multiplexansätzen erfasst. Die NGS basierte MRD Quantifizierung erfordert jedoch eine komplexere bioinformatische Analyse. Aktuell befindet sich die Methode in einem Etablierungs- und Standardisierungsprozess. Wenn dieser abgeschlossen ist, muss sie prospektiv zur aktuell angewandten Methode (Goldstandard) verglichen werden.<sup>18</sup> Als Goldstandardmethode zur MRD Quantifizierung hat sich in den vergangenen 17 Jahren die *Real-time* PCR unter Verwendung der mit PCR und *Sanger* Sequenzierung identifizierten klonalen Ig/TCR Genumlagerungen durchgesetzt. Vom NGS wird im Vergleich zum aktuellen Goldstandard eine vereinfachte, sensitivere und damit diagnostisch präzisere MRD Monitoring erwartet. Dies schließt die Identifizierung klonaler Ig/TCR Umlagerungen bei ALL Diagnose und MRD-Quantifizierung im Therapieverlauf ein.<sup>25-28</sup>



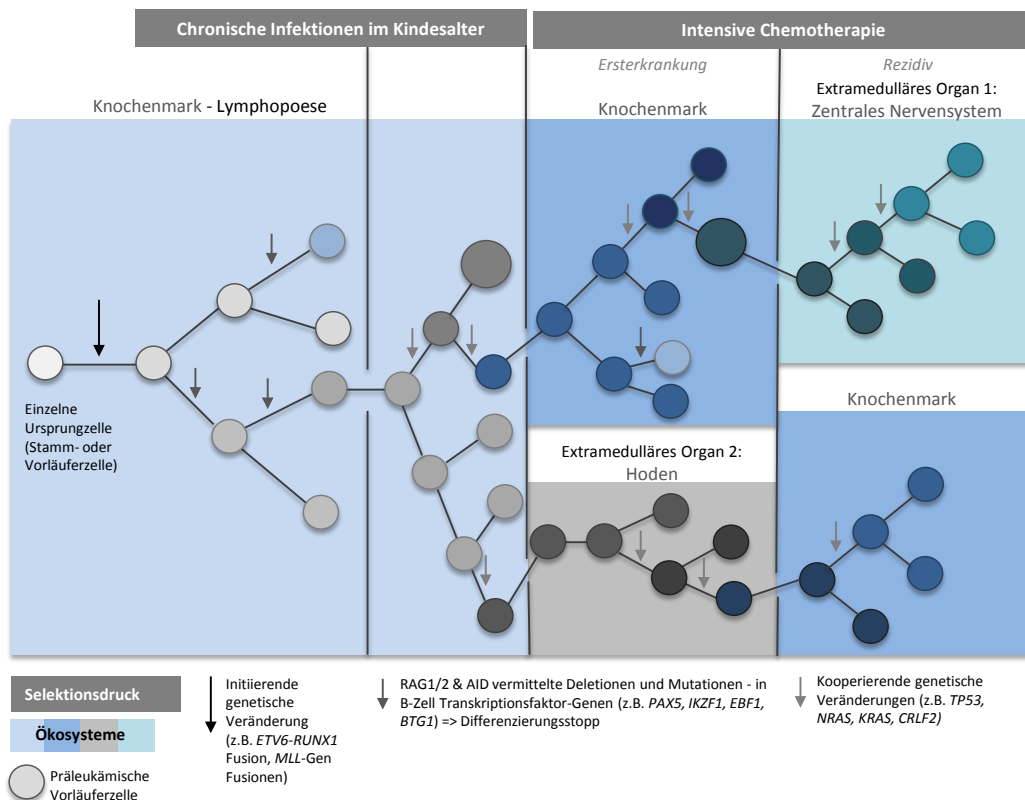
**Abbildung 3:** Gegenüberstellung des klassischen Goldstandardverfahrens und des aktuell vom EuroMRD Konsortium etablierten neuen Verfahrens, dem NGS, zur Ig/TCR basierten MRD Bestimmung. Mit dem methodischen Ablauf des Goldstandardverfahrens werden in der Leukämiezell-reichen Probe (Diagnose) zum Identifizieren und Sequenzieren (Sanger Sequenzierung) der klonalen V(D)J Fingerabdrucksequenzen und dem Design und der Tests der verschiedenen klonenspezifischen Primer für die Patienten spezifischen Real-Time PCRs für im Routinebetrieb (Proben von ca. 6 Patienten werden gleichzeitig untersucht) etwa 4 Wochen gebraucht. Zum Quantifizieren eingehender Patientenproben (hellblauer Pfeil) mit den jeweils etablierten patientenspezifischen Real-Time PCRs wird nach Ankunft der Probe im Labor bis zur Fertigstellung des Befundes etwa einen Tag benötigt. Bei der NGS basierten MRD Bestimmung wird zur Identifizierung der Ig/TCR Indexklone, die später für die bioinformatische quantitative Auswertung der MRD Proben erforderlich sind, werden 4-5 Tage gebraucht. Ein enorme Zeitreduktion, der die klon- bzw. patientenspezifischen Real-Time PCRs nicht mehr etabliert werden müssen. Die MRD Quantifizierung in einer Probe dauert jedoch aktuell mit dem NGS etwa 4-5 Tage, was nach Probenentnahme eine nicht sofortige Bereitstellung des MRD Ergebnisses innerhalb von einem Tag erlauben würde, was aktuell die Kliniken im Rahmen des MRD Monitoring der ALL-REZ BFM Studien erwarten.

## 2.2 Klonale Heterogenität, Selektion und Evolution

Der Ursprung der ALL ist eine mutierte lymphoide Vorläuferzelle. Die ALL wurde deshalb anfänglich als monoklonale Erkrankung verstanden.<sup>29</sup> Inzwischen wurde jedoch gezeigt, dass sich ein leukämischer Klon durch das Auftreten neuer genetischer Ereignisse mit der Zeit weiter verändert. Dieser Prozess wird als klonale Evolution bezeichnet. Lange wurde angenommen, dass die genetischen Ereignisse nacheinander auftreten und somit einem linearen Modell folgen. In den vergangenen Jahren wurde jedoch bewiesen, dass klonale Verwandtschaften komplex und verzweigt sind. Dies basiert auf der genetischen Heterogenität der fortlaufend sich verändernden Zellen, die als Einheiten eines Selektionsprozesses verstanden werden können. Dieser findet unter physiologischen, pathophysiologischen Bedingungen und während der Therapie statt (**Abbildung 4**).<sup>30-33</sup> Die genetische

Heterogenität spiegelt sich in funktionell hoch oder weniger relevanten genetischen Veränderungen, aber auch in den nichtfunktionell in den Prozess der Entstehung und Progression der Leukämie eingebundenen Ig/TCR Genrekombinationen wieder. Diese können durch die fortwährende Aktivität des Rekombinase Enzymsystems in den lymphoiden Vorläuferzellen weiter umgelagert werden. Das ist der sogenannte sekundäre Genumlagerungsprozess, der auch physiologisch auftritt, um eine produktive Genumlagerung in einem zweiten Ansatz zu erzeugen. Zu diesem Prozess gehören der Austausch von V-Segmenten der V(D)J Genumlagerungen der TCR und der Ig schweren Ketten (heavy chain, IgH), der Austausch von weiter *upstream* gelegenen D- und weiter *downstream* gelegenen J-Segmenten von D-J Genumlagerungen sowie das Rearrangieren eines  $J\alpha$  Segments zu einer  $V\delta 2D\delta 3$  Genumlagerung im TCR $\delta/\alpha$  Genort.<sup>16, 34, 35</sup> Die Prozesse führen zur gleichzeitigen Existenz von Klonen verschiedener Größe, die während der Therapie einem noch wenig bekannten dynamischen Prozess unterliegen und Quelle falsch negativer oder falsch niedriger MRD Messungen sein können.<sup>36-39</sup> Von dem in Lymphoblasten aktiven Rekombinase Enzymsystem ist bekannt, dass RAG1/RAG2 auch außerhalb der Ig/TCR Genorte RSS ähnliche Sequenzen erkennen und damit zu Deletionen oder Fusionen, die pathophysiologisch in der ALL Entstehung und Progression funktionell höchst relevant sein können, beitragen.<sup>40-43</sup> Ein weiteres wichtiges Enzym, das bei der ALL Entstehung und der klonalen Evolution involviert ist, stellt die *Activation Induced Cytidine Deaminase* (AID) dar, die eine wichtige Funktion im Wechsel der Ig Isotypenklassen spielt. Aktuellste Daten zeigen, dass eine gleichzeitige Aktivierung der AID und der RAG1/RAG2 zur Erhöhung der genetischen Vulnerabilität sich differenzierender B-Zellen in einem bestimmten Stadium ihrer Entwicklung führt. Dies passiert aufgrund wiederholter Stimulation durch z.B. chronische Infektion.<sup>44</sup> Zusammenfassend kann formuliert werden, dass in der Entstehung und Progression der ALL das Zusammenwirken von den in lymphoiden Vorläuferzellen auch physiologisch aktiven Enzymsystemen RAG1/RAG2 und AID mit dem durch z.B. chronische Infektion und intensive Chemotherapie erzeugten Selektionsdruck eine entscheidende Rolle spielt. Dadurch entstehen sich durchsetzende maligne und resistente, überlebensfähige Zellen/Klone (**Abbildung 4**).





**Abbildung 4:** Vereinfachte Darstellung der verzweigten Architektur der klonalen Evolution bei der ALL im Kindes-/Jugendalter. Durch selektiven Druck wird mutierten Subklonen erlaubt zu expandieren, während andere aussterben oder in einem nicht-proliferierenden Zustand verweilen. Die vertikalen Linien stehen für den eingrenzenden oder selektiven Druck. Dieser selektive Druck kann durch chronische Infektionen oder im Rahmen der Rezidiventstehung durch die Chemotherapie erzeugt werden. Genetische Veränderungen können den Leukämiezellen Eigenschaften verleihen, der systemischen Therapie in verschiedener Art zu entkommen, wie z.B. das Auswandern in andere Ökosysteme, bei der ALL extramedulläre Organe (ZNS, Hoden), um sich dort zu verstecken. Die ALL im Kindes-/Jugendalter braucht wie andere Tumoren im Kindes-/Jugendalter weniger eingrenzende und genetische Ereignisse als Tumoren im Erwachsenenalter. Die farblich unterschiedlich markierten Ökosysteme stellen bestimmte Gewebe bzw. Bedingungen dar. Jeder farblich anders markierte Kreis stellt einen eigenen genetischen Subklon mit angeedeuteter unterschiedlicher Größe dar. (Stark modifiziert nach Greaves M & Maley CC Clonal Evolution in Cancer, *Nature* 2012)<sup>33, 45</sup>

### 2.3 Prognostische Bedeutung von MRD und Einsatz in der Therapiestratifizierung

Die ALL ist der häufigste Tumor im Kindes- und Jugendalter mit einer aktuellen Inzidenz von durchschnittlich 4 auf 100.000 Kinder/Jugendliche in der deutschen Bevölkerung, wobei im Altersspek zwischen 2 und 5 Jahren die Inzidenz auf 10 in 100.000 Kindern/Jugendlichen ansteigt (<http://www.kinderkrebsregister.de>). Aufgrund kontinuierlicher Therapieoptimierung in multizentrischen nationalen und internationalen Studien seit den 70er Jahren liegt die derzeitige ereignis-freie Überlebenswahrscheinlichkeit für die pädiatrische ALL bei etwa 80%.<sup>46, 47</sup> Patienten in Deutschland wurden bisher nach Protokollen der *ALL-BFM* (Berlin-Frankfurt-Münster) und der *COALL* Studien behandelt (<http://www.kinderkrebsinfo.de>). Wenn Kinder und Jugendliche mit einer ALL nicht geheilt werden, erleiden sie in der Regel ein Rezidiv. Die ALL-Rezidive wurden und werden in Deutschland auch im Rahmen von Therapieoptimierungsstudien, den *ALL-REZ BFM* Studien, seit Beginn der 80er Jahre behandelt.<sup>48</sup> Auch wenn die Zahl der ALL-Rezidive in den vergangenen Jahren deutlich abgenommen hat, ist ihr Anteil im Vergleich zu anderen Tumorentitäten im Kindes-/Jugendalter weiterhin beachtlich (<http://www.kinderkrebsregister.de>).

Eine wesentliche Komponente der Therapieoptimierung ist die Stratifizierung der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose in verschiedene Gruppen, die entsprechend ihres Risikos, nicht geheilt zu werden, behandelt werden. Zu den klassischen bei Diagnose relevante prognostischen Faktoren zählen das Alter, das Geschlecht, der Immunphänotyp der ALL (BCP-ALL oder T-Zell ALL), der Anteil von Leukämiezellen im Blut und das Vorliegen bestimmter struktureller oder numerischer genetischer Aberrationen der Leukämiezellen wie z.B. die Translokationen t(12;21) als Standardrisiko Merkmal und die Translokationen t(9;22), t(4;11) oder der Ploidie Status, genau die Hypodiploidie (DNA-Index <0,8 bzw. <44 Chromosomen) als Hochrisikomerkmale.<sup>49-56</sup> Zusätzlich zur Risikogruppierung zum Zeitpunkt der Diagnose wird auch das Ansprechen auf die Chemotherapie zur weiteren Therapieplanung herangezogen. Somit ist ein wichtiger etablierter Risikofaktor der ALL-Erstbehandlung das Ansprechen auf Glukokortikoide, das am Tag 8 der Therapie im Blut gemessen wird.<sup>57</sup> Neben der mikroskopischen Beurteilung des frühen Ansprechens auf Glukokortikoide spielt ihre submikroskopische Beurteilung mit Hilfe der PCR und auch der Durchflusszytometrie zu definierten Zeitpunkten während der Therapie eine entscheidende Rolle für die weitere Therapiestratifizierung in vielen Protokollen. Der sensitive Nachweis von MRD kann zur Beurteilung des frühen Ansprechens auf die Therapie sowie des Remissionsstatus' zu einem späteren Zeitpunkt, vor allem vor einer HSCT, herangezogen werden. In verschiedenen Studien wurde für die ALL-Ersterkrankung und das ALL-Rezidiv gezeigt, dass das Ansprechen auf die Induktionstherapie (ca. Tag 29-36 in der Therapie) die stärkste prognostische Relevanz trotz unterschiedlicher Risikogruppen und Induktionstherapien in den jeweiligen Studien besitzt.<sup>58, 59</sup> Pathophysiologisch ist es bisher nicht geklärt, warum das frühe Ansprechen auf die Therapie, diese frühe in-vivo Chemosensitivität bzw. -resistenz, mit dem Auftreten von Rezidiven assoziiert ist. Der Nachweis von MRD zu späteren Zeitpunkten während der Therapie scheint auch prognostisch relevant zu sein.<sup>60-62</sup> Besondere klinische Bedeutung besitzt das MRD-Niveau vor einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT). Hier wurde sowohl für Patienten in erster als auch in zweiter Remission eindeutig gezeigt, dass MRD unmittelbar vor einer HSCT eine wichtige und unabhängige prognostische Relevanz besitzt.<sup>63</sup> Dies zieht die Frage einer möglichen Intervention vor und/oder nach der HSCT im Fall der Überschreitung des klinisch relevanten MRD Niveaus nach sich und wurde bereits in ersten Ansätzen geprüft.<sup>64-68</sup> Weiterhin ist die MRD-Messung auch nach der HSCT prognostisch relevant. Die umfassendste Untersuchung wurde hierzu im Rahmen des ALL-BFM-SCT 2003 Studie an den Tagen 30, 60, 90, 180 und 365 nach HSCT in 113 Patienten durchgeführt und zeigt die prognostische Bedeutung von jedem Zeitpunkt, was als Entscheidungsgrundlage eines sofortigen präventiven Eingreifens herangezogen werden kann.<sup>69</sup> Die Geschwindigkeit der Reduktion von MRD hängt stark von der Art und Intensität der zuvor gegebenen Therapie ab. Somit muss die prognostische Bedeutung von MRD und die dafür relevante kritische MRD-Grenze (*cut-off*) immer im Kontext eines Behandlungsprotokolls untersucht werden. MRD kann z.B. durch eine intensivere Induktionstherapie

auf ein niedrigeres Niveau als eine weniger intensive Induktionstherapie gesenkt werden, was aber nicht automatisch mit einer besseren Prognose assoziiert sein muss.<sup>68</sup> MRD wäre jedoch perfekt geeignet, um die in einer Randomisierung geprüfte antileukämische Aktivität/Wirksamkeit zweier Medikamente oder Medikamenten-Kombinationen miteinander zu vergleichen und damit auch als Endpunkt (in Phase II/III) Studien verwendet werden. Jedoch kann MRD nicht das ereignis- oder rezidivfreie Überleben ersetzen.<sup>70, 71</sup> Das Ansprechen auf die Therapie zählt somit zu einem der wichtigen klinischen Werkzeuge zur Therapiesteuerung bei der ALL im Kindes-/Jugendalter. Die sensitive submikroskopische Messung des Ansprechens auf die Therapie durch die Quantifizierung von MRD zu definierten Zeitpunkten der Therapie hat sich mit der für das jeweilige Erkrankungsstadium und die jeweilige Therapieintensität prognostisch relevanten Grenzwerten als unabhängiger prognostischer Marker in vielen Studien erwiesen.

Die durch die MRD Messung beschriebene frühe Antwort auf die Therapie und sensitive Beurteilung des Remissionsstatus in späteren Therapiephasen spiegelt Eigenschaften der Leukämie eines Patienten genauso wie die antileukämische Aktivität einer Therapie wieder. Das Therapie begleitende MRD Monitoring wird aus diesem Grund eingesetzt, um Patienten eine der Aggressivität ihrer Leukämie und damit dem Risiko, nicht geheilt zu werden, entsprechend intensive Therapie zukommen zu lassen. Dagegen brauchen Patienten mit einem hohen Risiko, geheilt zu werden, keine vergleichbar intensive Therapie. Bei Kindern/Jugendlichen mit einem ALL-Rezidiv ist aufgrund der bereits erfolgten primären Therapie die korrekte Einschätzung der Intensität der weiterführenden Therapie essentiell, um die Therapie ausreichend intensiv zur Vernichtung der zum zweiten Mal aufgetretenen Leukämie zu gestalten, ohne gleichzeitig langfristig die Lebensqualität, aber auch das Leben selbst des Patienten mit einer zu hohen Toxizität zu gefährden. Aus diesem Grund ist es von besonderer Bedeutung gewesen, die prognostische Relevanz der Messung des submikroskopischen Ansprechens auf die Therapie, die MRD Kinetik vor HSCT und den submikroskopischen Knochenmarkbefall bei Diagnose von Kindern/Jugendlichen mit einem ALL-Rezidiv im Rahmen der *ALL-REZ BFM* Studien zu untersuchen und eine MRD basierte Stratifizierung bzw. Intervention zu prüfen.

### 3. Eigene Arbeiten

#### 3.1 Klonale Stabilität und Evolution bei ALL Rezidiven

***“Very early/early relapses of acute lymphoblastic leukemia show unexpected changes of clonal markers and high heterogeneity in response to initial and relapse treatment.”***

Klonale Evolution kann vor, während und nach der Behandlung innerhalb der Leukämiezellpopulationen auftreten. Diese Dynamik ist bisher vor allem während der Therapie wenig untersucht ist. Es galten die Annahmen, dass frühe bzw. während oder kurz nach Beendigung der initialen Therapie auftretende ALL-Rezidive von einem schon bei der Diagnose resistenten stabilen Klon stammen und diese Resistenz im Rezidiv zunimmt.<sup>72, 73</sup> Mit unserer Arbeit haben wir diese Hypothesen geprüft. In eine prospektiven Studie wurden alle Patienten der *ALL-BFM 2000* Ersterkrankungstudie mit einem Rezidiv, das im Rahmen der *ALL-REZ BFM P95/96* oder *2002* Studie behandelt wurde, eingeschlossen (n=45). In der *ALL-BFM 2000* Studie wurde die Messung von MRD am Ende der Induktionstherapie (Tag 33) und vor Protokoll M (Tag 78) zur Risikogruppen-Stratifizierung herangezogen. In den *ALL-REZ BFM P95/96* oder *2002* Studien wurde MRD entweder geblindet, prospektiv gemessen oder bei Rezidiven der intermediären Risikogruppe des *ALL-REZ BFM 2002* Protokolls am Ende der Induktionstherapie zur Therapiestratifizierung herangezogen. Die Patienten der untersuchten Kohorte hatten überwiegend sehr frühe (während der ersten 18 Monate nach Therapiebeginn: 22/45, 49%) und frühe (zwischen 18 Monaten nach Therapiebeginn und 6 Monaten nach Ende der Therapie: 11/45, 24%) Rezidive. Späte Rezidive (> 6 Monate nach Beendigung der initialen Therapie: 12/45, 27%) waren unterrepräsentiert. Es wurden die bei initialer und Rezidivdiagnose identifizierten und für die MRD Untersuchungen ausgewählten Ig/TCR Marker als auch das damit gemessene Ansprechen auf die Therapie auf Patientenniveau verglichen. Der Vergleich der bei Ersterkrankung und im Rezidiv identifizierten Ig/TCR Genrekombinationen eines Patienten zeigte, dass in 89% der Patienten wenigstens eine der initial identifizierten Ig/TCR Genrekombinationen stabil blieb. Beim Rezidiv waren jedoch die für die MRD-Untersuchungen ausgewählten Marker in der Hälfte der Patienten anders als bei der initialen Diagnose. Der Zugewinn von Markern zum Rezidiv war nicht mit dem Zeitpunkt des Rezidivs assoziiert. Sensitive *Backtracking* Untersuchungen vom Rezidiv zur Ersterkrankung zeigten, dass bei 77% der Patienten der im Rezidiv erstmalig nachgewiesene Ig/TCR Marker bereits als ein kleinerer Subklon bei der initialen Diagnose vorlag. Der Vergleich des Ansprechens auf die Therapie der initialen und der Rezidiv-Behandlung ergab, dass 38% der Patienten ein ähnliches Ansprechen, 38% ein besseres und 25% ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie beim Rezidiv hatten. Diese Daten demonstrieren eine unerwartet hohe klonale Heterogenität und Dynamik in sehr frühen und frühen Rezidiven. Damit beleuchten sie kritisch einige Hypothesen zur ALL-Rezidiventstehung.<sup>74</sup>

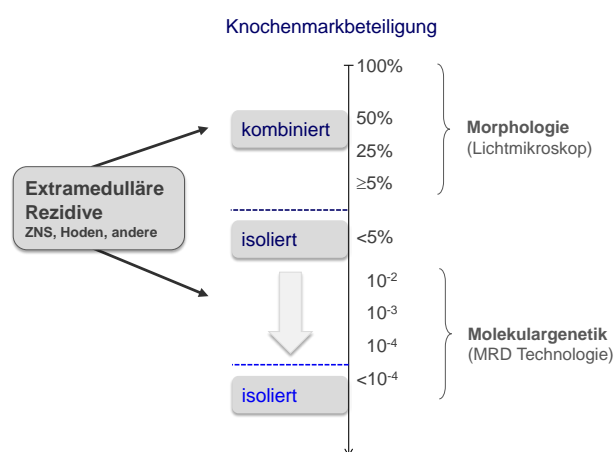
Eckert C, Flohr T, Koehler R, Hagedorn N, Moericke A, Stanulla M, Kirschner-Schwabe R, Cario G, Stackelberg A, Bartram CR, Henze G, Schrappe M, Schrauder A. Very early/early relapses of acute lymphoblastic leukemia show unexpected changes of clonal markers and high heterogeneity in response to initial and relapse treatment. *Leukemia*. 2011 Aug;25(8):1305-13.

<http://dx.doi.org/10.1038/leu.2011.89>

### 3.2 Neue Definition des isoliert extramedullären Rezidivs

***“Submicroscopic bone marrow involvement in isolated extramedullary relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia: a more precise definition of “isolated” and its possible clinical implications, a collaborative study of the Resistant Disease Committee of the International BFM study group.”***

Eine Quelle für die Entstehung von ALL-Rezidiven können auch nicht blutbildende Organe außerhalb des Knochenmarks sein. Zu diesen extramedullären Organen zählen bei der ALL im Kindes-/Jugendalter vor allem das zentrale Nervensystem (ZNS) und der Hoden neben Lymphknoten, Haut, Pleurahöhle und andere seltene Lokalisationen.<sup>48</sup> Das ZNS ist in etwa 60% und der Hoden in 30% der Patienten mit extramedullärem Befall betroffen. Die extramedullären Rezidive können kombiniert mit dem Knochenmark oder isoliert im extramedullären Kompartiment ohne mikroskopische Knochenmarkbeteiligung (<5% Leukämieblasten im Knochenmark) auftreten (**Abbildung 5**).<sup>48, 75-77</sup> Da die ALL eine systemische Erkrankung ist, und es bereits erste Hinweise auf eine submikroskopische Knochenmarkbeteiligung bei Rezidivdiagnose gab, haben wir uns die Frage gestellt, in welchem

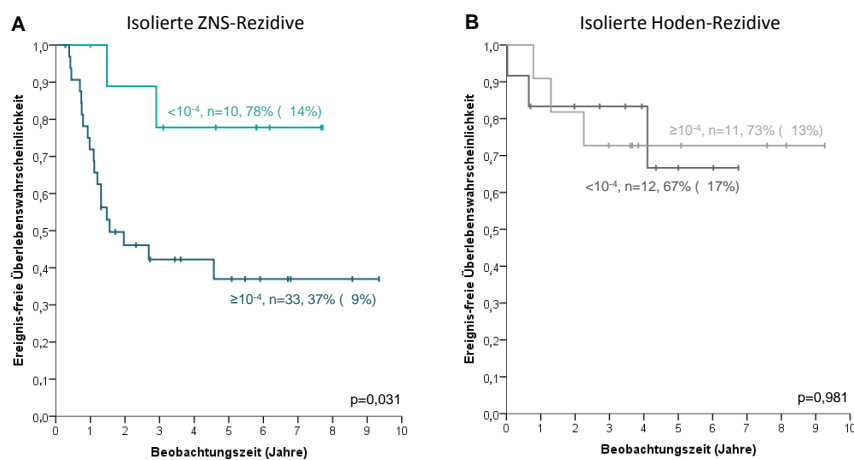


**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der aktuellen ( $< 5\%$ , morphologische Beurteilung) und möglicherweise neuen Bestimmung ( $< 10^{-4}$ , molekulargenetische Bestimmung) des Leukämiezellanteils im Knochenmark.

Ausmaß das Knochenmark auf submikroskopischen Niveau involviert ist und ob die Höhe mit klinischen Faktoren und der Prognose assoziiert ist.<sup>78-81</sup> Um diese Frage zu beantworten, haben wir mit Hilfe der MRD Technologie unter Verwendung der zum Rezidiv stabil gebliebenen Ig/TCR Marker die submikroskopische Knochenmarkbeteiligung bei Rezidivdiagnose gemessen. Aufgrund der geringen Zahl von isoliert extramedullären Rezidiven, hatten wir die geplante Studie im

Rahmen einer internationalen Kooperation um die Daten unserer tschechischen und französischen Kooperationspartner erweitert. In diese retrospektive Studie wurden 64 Patienten mit einem isoliert extramedullären Rezidiv eingeschlossen. Die submikroskopische Knochenmarkbeteiligung bei Rezidivdiagnose wurde genauso wie für die MRD-Bestimmung mittels quantitativer *Real-Time* PCR unter Verwendung der klonalen Ig/TCR Marker bestimmt. Diese war auf einem Niveau von  $\geq 10^{-4}$  ( $> 10^{-2}$  bis  $10^{-4}$ ) bei 46 Patienten und von  $< 10^{-4}$  bei 18 Patienten ( $n=11 < 10^{-4}$  positiv,  $n=7 < 10^{-4}$  negativ) nachweisbar. Bei Patienten mit einer Knochenmarkbeteiligung  $\geq 10^{-4}$  lag die ereignis-freie Überlebenswahrscheinlichkeit bei 30% ( $SE \pm 9\%$ ) im Vergleich zu denen mit einer Knochenmarkbeteiligung von  $< 10^{-4}$ , die eine ereignis-freie Überlebenswahrscheinlichkeit von 60% ( $SE \pm 12\%$ ) hatten ( $p=0,13$ ). Die kumulative Inzidenz von Folge rezidiven lag bei 24% ( $SE \pm 1\%$ ) für

Patienten mit einer submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung  $<10^{-4}$  und 65% (SE $\pm$ 1%) mit  $\geq 10^{-4}$  (p=0,012). ZNS-Rezidive hatten eine ereignis-freie Überlebenswahrscheinlichkeit von 11% (SE $\pm$ 9%) bei einer submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung von  $\geq 10^{-4}$  und 63% (SE $\pm$ 17%) bei  $<10^{-4}$  (p=0,053). Für die Hoden-Rezidive konnte dieser Unterschied in der ereignis-freien Überlebenswahrscheinlichkeit nicht gesehen werden (**Abbildung 6A, B**). ZNS-Rezidive hatten häufiger ( $\geq 10^{-4}$ : 80%) eine submikroskopische Knochenmarkbeteiligung als Hodenrezidive ( $\geq 10^{-4}$ : 57%, p=0,08). Insgesamt konnte in unserer Kohorte von isoliert extramedullären ALL-Rezidiven eine beachtliche Heterogenität der submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung von  $\geq 10^{-2}$  bis  $<10^{-4}$  gesehen und ihre prognostische Bedeutung gezeigt werden.<sup>82</sup>



**Abbildung 6:** Ereignis-freie Überlebenswahrscheinlichkeit entsprechend der submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung bei Rezidivdiagnose innerhalb der isolierten ZNS- und Hoden-Rezidive. Bei ZNS Rezidiven (**A**) ist im Vergleich zu den Hoden Rezidiven (**B**) ein signifikanter Unterschied im ereignis-freien Überleben zu sehen. Bei den Hodenrezidiven überlappen die Kurven von Patienten mit einer submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung  $<10^{-4}$  und  $\geq 10^{-4}$  (Up-date zur Bestätigung unserer publizierten Daten durch eine erweiterte Kohorte von Patienten der ALL-REZ BFM 2002 Studie).

Aktuell werden die im Rahmen einer prospektiven internationalen Studie erhobenen Daten über eine webbasierte Datenbank zusammengetragen. Hier verfolgen wir das Ziel, mit einer ausreichend hohen Zahl von Patienten die Daten unserer retrospektiven Studie zu bestätigen. Neben der Messung der submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung bei Rezidivdiagnose wird auch ihre Reduktion während der Rezidivtherapie erfasst, um hier deren klinische Bedeutung des Ansprechens auf die Therapie zu prüfen. Die Bestätigung der bereits publizierten Daten sollte in einer neuen Definition von isoliert extramedullären Rezidiven und einer entsprechenden einheitlichen Therapieempfehlung münden.

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

**<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-04-082040>**



### 3.3 Prognostische Bedeutung von MRD nach der Induktionstherapie bei ALL-Rezidiven

**“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.”**

Bei Kindern/Jugendlichen mit ALL-Rezidiv haben sich weltweit drei prognostische Faktoren durchgesetzt, deren Kombination zur Risikogruppen-Einteilung für die Rezidivbehandlung verwendet wird (**Tabelle 1**).<sup>83, 84</sup> Die größte und heterogenste Risikogruppe im ALL-Rezidiv ist die intermediäre Risikogruppe (S2). Für diese Gruppe war lang nicht geklärt, ob die Patienten eine HSCT brauchen, um langfristig eine Überlebenschance zu haben. Aus diesem Grund wurde innerhalb dieser Gruppe nach anderen prognostischen Kriterien gesucht, die für die Indikation der HSCT herangezogen werden können.

**Tabelle 1:** Risikogruppen-Stratifizierung beim ALL-Rezidiv im Kindes-/Jugendalter (ALL-REZ BFM P95/96 & 2002 Studien)

Immun- phänotyp	BCP-ALL				T-Zell ALL		
	Ort des Rezidivs	Isoliert extra- medullär	Kombiniert Knochen- mark, extramedullär	Isoliert Knochen- mark	Isoliert extra- medullär	Kombiniert Knochen- mark, extramedullär	Isoliert Knochen- mark
Zeitpunkt des Rezidivs	Sehr früh	S2	S4	S4	S2	S4	S4
	Früh	S2	S2	S3	S2	S4	S4
	Spät	S1	S2	S2	S1	S4	S4

**Risikogruppen** S1=Standardrisiko, S2=intermediäres Risiko, S3/S4=Hochrisiko

**Zeitpunkt des Rezidivs** sehr früh: innerhalb der ersten 18 Monate nach Beginn der initialen Therapie, früh: > 18 Monate nach Therapiebeginn bis 6 Monate nach Therapieende, spät: >6 Monate nach Therapieende

Die von uns erstmalig beim ALL-Rezidiv in einer retrospektiven Studie nachgewiesene prognostische Bedeutung von MRD nach der Induktionstherapie bei ALL-Rezidiven in der intermediären Risikogruppe, musste vor Anwendung zur Therapiesteuerung durch eine prospektive Studie in einer vergrößerten Kohorte erhärtet werden.<sup>85</sup> Aus diesem Grund haben wir geblindet prospektiv MRD am Ende der Induktion im Rahmen der ALL-REZ BFM P95/96 Studie gemessen. Es wurden 80 Kinder und Jugendliche mit einem ersten ALL-Rezidiv der intermediären Risikogruppe mit morphologischer Knochenmarkbeteiligung bei Rezidivdiagnose eingeschlossen, d.h. Patienten mit einem kombinierten oder Knochenmark isolierten späten Rezidiv einer BCP-ALL oder Patienten mit einem kombinierten frühen Rezidiv einer BCP-ALL. Die Patienten wurden entsprechend des ALL-REZ BFM P95/96 Protokolls in der Pilot (P95)- und Hauptstudie (96) behandelt. MRD wurde genomisch unter Verwendung der klonalen Ig/TCR Genrekombinationen mit Hilfe quantitativen *Real-Time* PCR gemessen. Patienten mit einem gutem Ansprechen auf die Therapie (MRD<10<sup>-3</sup>, n=46) hatten eine ereignis-freie Überlebenswahrscheinlichkeit nach 10 Jahren von 76% (SE±6%) und eine kumulative Inzidenz von Folgerezidiven von 21% (SE±6%). Dagegen war bei Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die Induktionstherapie (MRD≥10<sup>-3</sup>, n=34) die ereignis-freie Überlebenswahrscheinlichkeit nach 10 Jahren

18% (SE±7%) und die kumulative Inzidenz von Folgeerzidiven 61% (SE±9%, p<0,001). Mit der multivariaten Cox Regressionsanalyse bewies sich MRD nach der Induktionstherapie als ein unabhängiger und der stärkste prognostische Parameter. Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die Induktionstherapie (MRD≥10<sup>-3</sup>) hatten im Vergleich zu Patienten mit einem guten Ansprechen (MRD<10<sup>-3</sup>) ein 6,6-fach erhöhtes Risiko, an einem Folgeereignis zu erkranken (95% Konfidenzintervall 3,3-13,5; p<0,001). Zusammenfassend konnten wir bestätigen, dass ein niedriges MRD Niveau nach der Induktionstherapie bei ALL-Rezidiven der intermediären Risikogruppe mit einem exzellenten Langzeitüberleben mit konventioneller Chemo-/Radiotherapie assoziiert ist. Demgegenüber haben Patienten mit einem schlechten Ansprechen auf die Induktionstherapie eine ungenügende Prognose. Aus diesem Grund wurde in der Folgestudie zur Behandlung von Kindern/Jugendlichen mit Rezidiv einer ALL, der *ALL-REZ BFM 2002* Studie, MRD nach der Induktionstherapie für die Indikation einer allogenen HSCT herangezogen.<sup>86</sup>

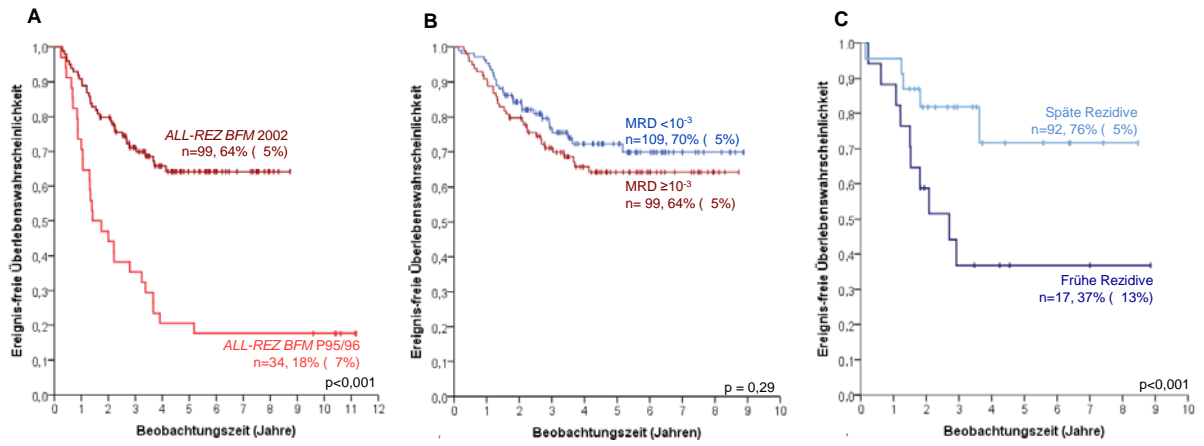
Eckert C, von Stackelberg A, Seeger K, Groeneveld TW, Peters C, Klingebiel T, Borkhardt A, Schrappe M, Escherich G, Henze G. Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia - long-term results of trial ALL-REZ BFM P95/96. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1346-55.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.11.010>

### 3.4 Verbesserung der Prognose durch MRD basierte Therapiestratifizierung

#### ***“Indication of allogeneic hematopoietic SCT based on MRD improves outcomes for children with relapsed ALL in the intermediate risk group”***

In der *ALL-REZ BFM 2002* Studie war eine Hauptfragestellung für die intermediäre Risikogruppe, ob die Prognose dieser Patienten durch die MRD basierte Stratifizierung der Therapie verbessert werden kann, d.h. Patienten mit einem guten Ansprechen auf die Induktionstherapie weiterhin eine herausragende Prognose haben, wenn sie allein mit Chemo-/Radiotherapie behandelt werden, und Patienten mit einem schlechten Ansprechen auf die Induktionstherapie eine verbesserte Prognose, da sie einer HSCT unterzogen wurden. In der untersuchten *ALL-REZ BFM 2002* Studienkohorte hatten 99 Patienten aufgrund des schlechten Ansprechens auf die Induktionstherapie ( $\text{MRD} \geq 10^{-3}$ ) eine Indikation für eine allogene HSCT. Bei 109 Patienten wurde eine Fortsetzung der Chemotherapie aufgrund des guten Ansprechens auf die Induktionstherapie ( $\text{MRD} < 10^{-3}$ ) empfohlen. MRD wurde, wie in der Vorläuferstudie mit Hilfe der quantitativen *Real-Time* PCR unter Verwendung der klonalen Ig/TCR Marker gemessen. Die ereignis-freie Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit  $\text{MRD} \geq 10^{-3}$  lag bei 64% ( $\text{SE} \pm 5\%$ ) in der *ALL-REZ BFM 2002* im Vergleich zu 18% ( $\text{SE} \pm 7\%$ ) in der *ALL-REZ BFM P95/96* Studie ( $p < 0,001$ , **Abbildung 7A**). Dieses Ergebnis ist hauptsächlich auf die Reduktion der kumulativen Inzidenz von Folgerezidiven zurückzuführen, die von 59% ( $\text{SE} \pm 9\%$ ) auf 27% ( $\text{SE} \pm 5\%$ ) reduziert werden konnte ( $p < 0,001$ ). Die extrem günstige Prognose von Rezidivpatienten der intermediären Risikogruppe mit  $\text{MRD} < 10^{-3}$  nach der Induktionstherapie konnte für Patienten mit einem späten isolierten oder kombinierten Knochenmarkrezidiv bestätigt werden. Jedoch hatten Patienten mit einem frühen kombinierten Rezidiv trotz guten Ansprechens auf die Therapie eine schlechte Prognose mit einer ereignis-freien Überlebenswahrscheinlichkeit von 37% ( $\text{SE} \pm 13\%$ ) und einer kumulativen Inzidenz von Folgerezidiven von 63% ( $\text{SE} \pm 13\%$ , **Abbildung 7C**). Patienten, die trotz schlechten Ansprechens auf die Induktionstherapie keine HSCT bekamen ( $n=17$ ), hatten eine ereignis-freie Überlebenswahrscheinlichkeit von 24% ( $\text{SE} \pm 10\%$ ) im Vergleich zu 74% ( $\text{SE} \pm 5\%$ ) der Patienten, die eine HSCT erhalten haben ( $n=81$ ), ( $p < 0,001$ ). Somit ist die Prognose dieser Patienten vergleichbar schlecht zu den Patienten mit  $\text{MRD} \geq 10^{-3}$  nach der Induktionstherapie in der *ALL-REZ BFM P95/96* Studie. Insgesamt konnten wir die zu prüfende Hypothese bestätigen: mit der allogenen HSCT wurde die Prognose der Patienten mit einem schlechten Ansprechen auf die Induktionstherapie deutlich verbessert, so dass diese keinen Unterschied zur Gruppe der gut ansprechenden Patienten zeigt (**Abbildung 7B**). Jedoch brauchen Patienten mit einem frühen kombinierten Rezidiv trotz guten Ansprechens eine Intensivierung der Therapie, da sie eine ungünstige Prognose haben. Dieses Ergebnis spiegelt die Stärke der prognostischen Bedeutung des Zeitpunkts des Rezidivs, eventuell auch der Kombination Zeitpunkt und Ort, wieder.<sup>87</sup>



**Abbildung 7:** Verbesserung der Prognose durch MRD basierte Stratifizierung der Therapie und Identifizierung einer Sub-gruppe, in der Patienten trotz guten MRD Ansprechens eine schlechte Prognose haben. Ereignis-freie Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit schlechtem MRD Ansprechen der ALL-REZ BFM P95/96 und ALL-REZ BFM 2002 Studien (**A**), der MRD gut und schlecht ansprechenden Patienten in der ALL-REZ BFM 2002 Studie (**B**) sowie der Patienten der ALL-REZ BFM 2002 Studie mit gutem MRD Ansprechen, aufgetrennt nach Zeitpunkt/Ort des Rezidivs (**C**). Modifiziert aus Eckert et al JCO 2013)<sup>87</sup>

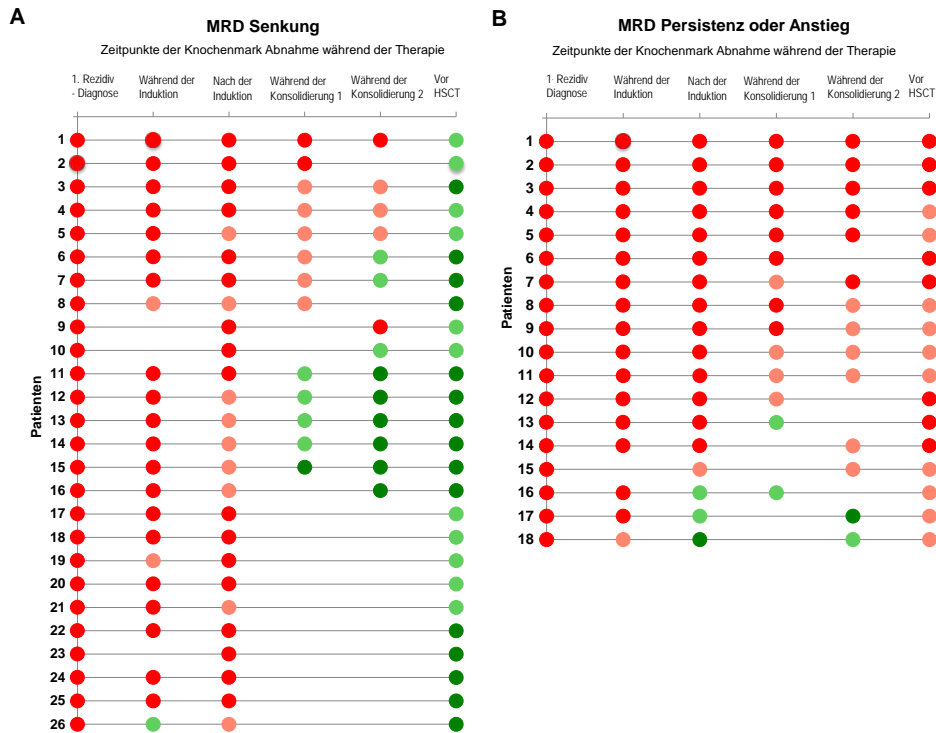
Eckert C, Henze G, Seeger K, Hagedorn N, Mann G, Panzer-Grümayer R, Peters C, Klingebiel T, Borkhardt A, Schrappe M, Schrauder A, Escherich G, Sramkova L, Niggli F, Hitzler J, von Stackelberg A. Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group. *J Clin Oncol*. 2013 Jul 20;31(21):2736-42.

**<http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2012.48.5680>. Epub**

### 3.5 MRD Persistenz nach Induktionstherapie bis zur HSCT

#### *“Monitoring minimal residual disease in children with high-risk relapses of acute lymphoblastic leukemia: Prognostic relevance of early and late assessment”*

Die Prognose von Kindern/Jugendlichen mit einem Hochrisiko ALL-Rezidiv ist aktuell mit einem Gesamtüberleben von etwa 30% unbefriedigend.<sup>48, 72</sup> Ohne HSCT würde das Überleben nahe 0 gehen.<sup>88-91</sup> Aus diesem Grund haben alle Hochrisiko ALL-Rezidive eine HSCT Indikation. In die Hochrisikogruppe der ALL-Rezidive werden nach Berücksichtigung der oben beschriebenen klassischen prognostischen Faktoren beim Rezidiv folgende Patienten eingeschlossen: frühe isolierte Knochenmark-Rezidive und sehr frühe Rezidive mit Knochenmarkbeteiligung einer BCP-ALL sowie Patienten mit einer T-Zell ALL mit einem sehr frühen, frühen oder späten Rezidiv und Knochenmarkbeteiligung (**Tabelle 1**).<sup>48, 83</sup> Da die Remissionsqualität vor der HSCT mit über den Erfolg dieser entscheidet, untersuchten wir im Rahmen der *ALL-REZ BFM 2002* Studie, ob bei Hochrisiko ALL-Rezidiven die MRD Kinetik vom Ende der Induktionstherapie, während der Konsolidierungstherapie bis zur HSCT prognostisch relevant ist und sich ein Fenster für eine Interventionstherapie vor der HSCT für zukünftige Therapieansätze bei Hochrisiko ALL-Rezidiven definieren lässt.<sup>65</sup> Die genannte Arbeit schloss 125 Patienten ein, die im Rahmen der *ALL-REZ BFM 2002* Studie im Hochrisikoarm einheitlich behandelt wurden. Die mediane Beobachtungszeit lag bei 4,8 Jahren. Patienten mit einem MRD  $\geq 10^{-3}$  nach der Induktionstherapie (76/119, 64%) oder unmittelbar vor HSCT (19/71, 27%) hatten 10 Jahre nach Rezidivtherapiebeginn eine signifikant schlechtere erkrankungs-freie Überlebenschance von 26% (SE $\pm$ 6%) bzw. 23% (SE $\pm$ 7%) im Vergleich zu 58% (SE $\pm$ 8%) bzw. 48% (SE $\pm$ 7%) für Patienten mit MRD  $< 10^{-3}$ . Die konventionelle intensive Konsolidierungstherapie reduzierte MRD nach der Induktionstherapie auf ein Niveau  $< 10^{-3}$  bis vor der HSCT in 63% der Patienten, wobei in 37% der Patienten MRD stabil hoch blieb oder bis zur HSCT anstieg (**Abbildung 8**). Unsere Daten unterstützen die Verwendung von MRD nach Beendigung der Induktionstherapie zur Beurteilung der Aktivität verschiedener Induktionstherapieansätze im Rahmen von Phase II/III Studien bei Hochrisiko ALL-Rezidiven. MRD Persistenz auf dem  $\geq 10^{-3}$  vor der HSCT kennzeichnet eine Erkrankung, die hoch resistent zur konventionellen Chemotherapie ist. Aus diesem Grund müssen prospektiv kontrollierte neue Therapiestrategien und Medikamente im Rahmen klinischen Studien geprüft werden.<sup>92</sup>



**Abbildung 8:** MRD Kinetiken vor der HSCT sind sehr heterogen zwischen den einzelnen Patienten. Die Patienten wurden in eine Gruppe mit MRD Senkung (A) eingeteilt. Diese hatten ein MRD Niveau von  $\geq 10^{-3}$  nach der Induktionstherapie und  $< 10^{-3}$  unmittelbar vor der HSCT. Eine zweite Gruppe wurde gebildet mit persistierendem oder ansteigendem MRD auf einem Niveau von vor der HSCT  $\geq 10^{-3}$  (B). oder MRD Persistenz/Anstieg (B) bis zur HSCT. Die drei MRD Grenzwerte ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$ ) wurden zur der vier oder zwei MRD Kategorien verwendet, wie in der MRD Skala farblich abgebildet (mittel-/hellrot hohe MRD Niveaus,  $\geq 10^{-3}$ ; hell-/mittel-/dunkelgrün niedrige MRD Niveaus  $< 10^{-3}$ ). (Modifiziert aus Eckert et al. *Leukemia* 2015, Supplement)<sup>92</sup>



Eckert C, Hagedorn N, Sramkova L, Mann G, Panzer-Grümayer R, Peters C, Bourquin JP, Klingebiel T, Borkhardt A, Cario G, Alten J, Escherich G, Astrahantseff K, Seeger K, Henze G, von Stackelberg A. Monitoring minimal residual disease in children with high-risk relapses of acute lymphoblastic leukemia: prognostic relevance of early and late assessment. *Leukemia*. 2015 Aug;29(8):1648-55.

<http://dx.doi.org/10.1038/leu.2015.59>

## 4. Diskussion

Die Gesamtüberlebensraten beim Rezidiv der ALL im Kindes-/Jugendalter sind mit etwa 50% schlecht.<sup>68, 91, 93-95</sup> Aufgrund der bereits hohen Therapieintensität aktueller Ersterkrankungsstudien ist die Behandlung beim Rezidiv eine Herausforderung. Patienten mit einem ALL-Rezidiv können eine höhere Therapieresistenz und eine schlechtere Toleranz gegenüber der Therapie haben.<sup>73, 96-98</sup> Aus diesem Grund sind bei Kindern/Jugendlichen mit einem ersten Rezidiv ein dem Risiko, ein zweites Rezidiv zu erleiden oder während der Therapie zu versterben, angepasste Therapie entscheidend und deshalb eine verlässliche Therapiesteuerung erforderlich.

### 4.1 Klinisches Potential des MRD-Monitorings in verschiedenen ALL-Rezidiv Subgruppen

Vier der vorgestellten Arbeiten haben sich mit der klinischen Bedeutung des submikroskopischen Nachweises von Leukämiezellen vor und zu definierten Zeitpunkten während der Therapie in verschiedenen Subgruppen des ALL-Rezidivs beschäftigt. Sie ordnen sich in der Gesamtliteratur aufgrund der Auswahl und Größe der Kohorten, der langen Beobachtungszeit, der einheitlichen Behandlung oder des Status', die erste Arbeit zu dem Thema zu sein, als Schlüsselarbeiten ein (**Tabelle 2**). Zu den ALL-Rezidiv Subgruppen zählen die Patienten (1) mit einem isoliert extramedullären Rezidiv, (2) mit einem Rezidiv der intermediären Risikogruppe und (3) mit einem Rezidiv der Hoch-Risikogruppe (**Tabelle 1**). (1) Für die Patienten mit einem isoliert extramedullären Rezidiv konnten wir für die ALL erstmalig in einer großen Kohorte die prognostische Bedeutung der submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung bei Rezidivdiagnose zeigen, was die Frage einer neuen Definition isoliert extramedullärer Rezidive nach sich zieht.<sup>82</sup> Nach einer Bestätigung der Daten und auch der Prüfung der prognostischen Bedeutung der Reduktion der submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung während der Therapie, könnte die Messung von „MRD“ bei Patienten mit einem scheinbar isoliert extramedullären Rezidiv auch in dieser Gruppe zur Risikogruppenstratifizierung und damit eventuell auch zur Indikation der HSCT, die in der Gruppe bisher nicht eindeutig ist, herangezogen werden. (2) Bei Patienten der intermediären Risikogruppe mit mikroskopischer Knochenmarkbeteiligung bei Rezidivdiagnose und Behandlung im Rahmen der *ALL-REZ BFM P95/96* Studie konnten wir in einer prospektiven Untersuchung zeigen, dass MRD nach Beendigung der Induktionstherapie die stärkste und eine unabhängige prognostische Relevanz besitzt. Dieses Ergebnis wurde in der Folgestudie *ALL-REZ BFM 2002* für die große heterogene Gruppe der Patienten mit intermediären Risiko zur Indikationsstellung der HSCT herangezogen. Durch diese MRD basierte Stratifizierung konnte das ereignisfreie Überleben in der auf die Induktionstherapie schlecht ansprechenden Gruppe um 46% in der *ALL-REZ BFM 2002* im Vergleich zur *ALL-REZ BFM P95/96* Studie verbessert werden. Ein damals erstmaliger Beweis, dass eine Verbesserung der Prognose wirklich auf eine MRD basierte Stratifizierung zurückzuführen ist. Die Verbesserung war so hoch, dass der prognostische Wert von

MRD im Vergleich zur gut ansprechenden Gruppe komplett aufgehoben wird. Für Patienten mit einem intermediären Risiko hat sich somit die Verwendung von MRD nach der Induktionstherapie als Parameter für die Indikation einer HSCT bewiesen und wird deshalb im aktuell begonnen internationalen Folgeprotokoll zur Behandlung von Kindern/Jugendlichen mit ALL-Rezidiv *IntReALL SR 2010* entsprechend angewandt. (3) Für die Hochrisikogruppe unter den ALL-Rezidiven konnten wir für die nach dem *ALL-REZ BFM 2002* Protokoll behandelten Patienten zeigen, dass MRD nach Beendigung der Induktionstherapie auch prognostisch relevant ist. Dies ist für die Hochrisiko ALL-Rezidivgruppe höchst bedeutsam, um die Wirksamkeit neuer Therapieansätze schon in der Induktionstherapie zu prüfen. In der neuen internationalen Studie zur Behandlung von Kindern/Jugendlichen mit Hochrisiko ALL-Rezidiv *IntReALL HR 2010* werden randomisiert zwei Therapiearme (*ALLR3* Induktionstherapie mit und ohne *Bortezomib*) bezüglich des Erreichens einer Remission verglichen werden. Hier werden die mikroskopisch und submikroskopisch nachweisbare Leukämiezelllast nach Beendigung der Induktionstherapie als primärer bzw. sekundärer Endpunkt verwendet. In unserer Hochrisiko ALL-Rezidiv Kohorte konnte bei zwei Dritteln der Patienten MRD nach der Induktionstherapie von  $\geq 10^{-3}$  auf  $< 10^{-3}$  bis zur HSCT mit der konventionellen Therapie gesenkt werden. Bei einem Drittel der Patienten persistierte MRD jedoch auf einem hohen Niveau von  $\geq 10^{-3}$  oder stieg wieder an. Diese Gruppe mit persistierendem MRD wäre für geprüfte klinische Studien neuer Therapieansätze vor der HSCT interessant. Aktuell wurde bei ALL-Hochrisiko und/oder ALL-Rezidiv Patienten Therapieintensivierungen bei MRD Persistenz vor der HSCT vorgenommen.<sup>64, 68</sup> Auch in unserem *ALL-REZ BFM 2002* Protokoll haben wir seit 2010 bei Patienten mit persistierender MRD Last während der Konsolidierung eine Intensivierung vor der HSCT empfohlen. Diese Daten werden gerade aktualisiert ausgewertet. In der ersten Auswertung zeigte sich eine deutliche MRD-Reduktion durch die Intensivierungstherapie (um mindestens 1 log-Stufe bei 78% und um mindestens 2 log-Stufen bei 59% der Patienten). Diese MRD-Reduktion setzte sich jedoch nicht in ein signifikant besseres Überleben für Patienten mit Intensivierung im Vergleich zu denen ohne um (Manuskript in Vorbereitung). Balduzzi et al zeigte dagegen, dass bei Patienten mit MRD  $\geq 10^{-4}$  vor der HSCT, die eine Intensivierung mit einem FLA-D Block (Fludarabine, Cytarabine und Daunorubicin oder Doxorubicin) erhalten haben, MRD bis  $< 10^{-4}$  reduziert werden konnte und eine signifikant besseres Überleben als bei Patienten ohne Intervention vor der HSCT erreicht werden konnte.<sup>64</sup> Zusammenfassend zeigen die vorgestellten Arbeiten für verschiedene ALL-Rezidiv Subgruppen die prognostische Bedeutung der sensitiven submikroskopischen Messung der Leukämiezelllast vor und während der Therapie bei ALL-Rezidiven im Kindes-/Jugendalter und ihren erfolgreichen Einsatz zur Stratifizierung der Therapie, ihren Einsatz als potentieller Endpunkt klinischer Studien oder ihre Eignung zur Identifizierung von MRD Persistenz als mögliches Einschlusskriterium für Studien zur klinischen Prüfung neuer Medikamente. Die Ergebnisse der genannten Arbeiten wurden und werden international in verschiedenen Studien zu

Behandlung von Kindern/Jugendlichen mit ALL-Rezidiv im Rahmen der Stratifizierung und Endpunktbestimmung berücksichtigt.

**Tabelle 2:** Systematische Übersicht publizierter Daten zur prognostischen Bedeutung von MRD und ihre potentielle oder aktuelle klinische Konsequenz in verschiedenen ALL-Rezidiv Subgruppen im Kindes-/Jugendalter

Protokoll	Messzeitpunkt(e)	Ko- horten- Größe	MRD Methode	MRD <i>cut-off</i>	Klinische Konsequenz, aktuell (a), potentiell (p)	Publika- tionen
<b>(1) Isoliert extramedulläre Rezidive</b>						
<i>ALL-REZ BFM Studien, COOPRALL</i>	Rezidiv- diagnose	64	PCR	10 <sup>-4</sup>	p: Neue Definition des Ort des Rezidivs, neue Stratifizierung	Hagedorn et al. 2007 <sup>82</sup>
<b>(2) Rezidive mit intermediärem Risiko (mit morphologischer Knochenmarkbeteiligung)</b>						
<i>ALL-REZ BFM Studien</i>	Nach der Induktion (T36)	30	PCR	10 <sup>-3</sup>	p: Indikation der HSCT	Eckert et al. 2001 <sup>85</sup>
<i>COG AALL01P2</i>	Nach 1., 2., 3. Therapieblock	55	FC	0,01%	a: Beurteilung der Wirksamkeit der 3 Therapieblöcke p: Stratifizierung der weiteren Rezidivtherapie, neue Therapieansätze	Raetz et al. 2008 <sup>99</sup>
<i>ALL-REZ BFM 96</i>	Nach der Induktion	80	PCR	10 <sup>-3</sup>	p: Indikation der HSCT	Eckert et al. 2013 <sup>86</sup>
<i>ALL-REZ BFM 2002</i>	Nach der Induktion	208	PCR	10 <sup>-3</sup>	a: Indikation der HSCT	Eckert et al. 2013 <sup>87</sup>
<i>ALL-REZ BFM 96,2002</i>	Vor HSCT	35	PCR	10 <sup>-4</sup>	p: Therapieintensivierung vor HSCT	Bader et al. 2009 <sup>63</sup>
<b>(3) Hochrisiko Rezidive</b>						
<i>AIEOP ALL REC 2003</i>	Nach 1. (W3-5), 2. (W6-8) und 3. (W9-16) Therapieblock	60 1. 45, 2. 28, 3. 46	PCR	10 <sup>-4</sup> , neg.	p: Identifizierung von Patienten, die von konventioneller Therapie, einschließlich der HSCT profitieren und denen, die neue innovative, experimentelle Therapieansätze brauchen	Paganin et al. 2008 <sup>100</sup>
<i>COG AALL01P2</i>	Nach 1., 2., 3. Therapieblock	69	FC	0,01%	a: Beurteilung der Wirksamkeit der 3 Therapieblöcke p: Stratifizierung der weiteren Rezidivtherapie, neue Therapieansätze	Raetz et al. 2008 <sup>99</sup>
<i>ALL-REZ BFM 2002</i>	Nach Induktion, während Konsolidierung, vor HSCT	125	PCR	10 <sup>-4</sup>	p: Sekundärer Endpunkt Phase II, Intensivierung vor HSCT im Rahmen von klinischen Studien	Eckert et al. 2015 <sup>92</sup>
<i>ALL-REZ BFM 96,2002</i>	Vor HSCT	42	PCR	10 <sup>-4</sup>	p: Therapieintensivierung vor HSCT	Bader et al. 2009 <sup>63</sup>
<b>(2) und (3) Rezidive mit intermediärem und Hochrisiko</b>						
<i>St. Jude ALL-Rezidiv Studien</i>	Nach Reinduk- tionsblock (T36)	35	FC	0,01%	p: Entscheidung über Postremissionstherapie	Coistan-Smith et al. 2004 <sup>101</sup>
<i>MRC UKALL R1, R2 oder ALL-REZ BFM 90 Studien</i>	Vor HSCT	45	PCR	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-5</sup> , neg.	p: Identifizierung von Patienten, die von einem innovativen HSCT Ansatz profitieren	Knechtli et al. 1998 <sup>102</sup>
<i>DCLSG Rezidiv Studien</i>	Vor HSCT	8*	PCR	neg.	p: Indikation für zusätzliche immunmodulatorische Ansätze nach HSCT	Van der Velden et al. 2001 <sup>103</sup>
<i>ALL-REZ BFM Studien</i>	Vor HSCT	32	PCR	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-5</sup> , neg.;	p: Therapieintensivierung vor HSCT	Bader et al. 2002 <sup>104</sup>
<i>Nicht genannt</i>	Vor HSCT	8*	PCR	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-5</sup> , neg.	p: Individuelles Anpassen der Post-HSCT Therapie	Uzunel et al. 2001 <sup>105</sup>
<i>Nicht genannt</i>	Vor HSCT	17*	PCR	neg.	p: Steuerung der immun-suppressive Therapie nach HSCT	Sramkova et al, 2001 <sup>106</sup>
<i>Metaanalyse</i>	Vor HSCT	49*	PCR	10 <sup>-3</sup> , neg.	p: Immunmodulation nach HSCT	Krejci et al. 2003 <sup>107</sup>
<i>DCOG Rezidiv Studien</i>	Vor HSCT	22*	PCR	10 <sup>-4</sup>	a: Präventive Alloimmunreaktion: frühe Cyclosporin A Reduktion mit Donorlymphozyten Infusionen nach HSCT	Lankester et al. 2010 <sup>67</sup>
<i>Nicht genannt</i>	Vor HSCT	51	PCR	10 <sup>-3</sup>	a: Reduktion der Immunsuppressiven Therapie	Gandemer et al. 2014 <sup>66</sup>
<i>Verschiedene ALL-Rezidiv Studien</i>	Vor HSCT	47*	PCR	10 <sup>-4</sup>	a: Intensivierung der Therapie vor HSCT mit einem FLA-D Block	Balduzzi et al. 2014 <sup>64</sup>

Abkürzungen: T, Tag; W, Woche; neg., negativ; FLA-D Block (Fludarabine, Cytarabine und Daunorubicin oder Doxorubicin)

\* Keine separate Analyse von hier angegebenen Patienten mit 1. Rezidiv, sondern gemeinsame Analyse von Patienten mit ALL Ersterkrankung und teilweise Patienten mit 2. Rezidiv

#### 4.2 Modifizierung des prognostischen MRD-Effekts durch den Ort und Zeitpunkt des Rezidivs

Die submikroskopische Knochenmarkbeteiligung bei Rezidivdiagnose und das submikroskopisch gemessene Ansprechen auf die Therapie können jeweils als zusammenfassende Parameter der Kombination verschiedener biologischer und klinischer Merkmale der Leukämie eines Patienten betrachtet werden. Die Auswertungen der genannten Daten geben Hinweise auf mögliche biologische Zusammenhänge, die in weiteren Projekten tiefgreifender untersucht werden müssen. Einiger dieser Beobachtungen und Hinweise sind nachfolgend kurz dargestellt und diskutiert. Bei isoliert extramedullären Rezidiven zeigte sich die prognostische Relevanz der submikroskopischen Knochenmarkbeteiligung bei Rezidivdiagnose beim getrennten Betrachten des Orts der extramedullären Beteiligung nur bei Patienten mit ZNS-Rezidiv, jedoch nicht bei Hoden-Rezidiven.<sup>82</sup> Somit scheint die submikroskopische Beteiligung als Maß der Wiederbesiedlung des Knochenmarks vom im ZNS proliferierenden resistenten Leukämiezellen ein Ausdruck der Aggressivität der Leukämie der überwiegend sehr früh und früh auftretenden ZNS-Rezidive zu sein.<sup>84, 108</sup> Im Vergleich dazu könnten bei den in der Regel spät auftretenden Hoden-Rezidiven Zellen, die bei Rezidivdiagnose im Knochenmark nachweisbar sind, eine das Knochenmark langsam rückbesiedelnde Population sein. Diese spricht jedoch immer sehr gut auf die Therapie an, da die Zellen nach unserer bisherigen Annahme bereits vor Beginn der initialen Therapie in den Hoden einwandern und sich dort nicht proliferierend verstecken (**Abbildung 4**). Somit waren die Zellen bisher keiner Therapie ausgesetzt und sprechen gut auf diese an.<sup>109, 110</sup> Bei Patienten der intermediären Risikogruppe mit mikroskopischer Knochenmarkbeteiligung der *ALL-REZ BFM 2002* Studie haben wir beobachtet, dass frühe kombinierte Rezidive trotz guten Ansprechens auf die Induktionstherapie häufig Folgerezidive und damit eine ereignis-freie Überlebenswahrscheinlichkeit von deutlich unter 50% hatten.<sup>87</sup> Bei diesen Patienten spiegelt damit das Ansprechen auf die Therapie im Knochenmark nicht in jedem Fall das Ansprechen im extramedullären Organ wieder. Weiterhin kann das frühe Auftreten dieser Rezidive wiederum für die Aggressivität der extramedullären, vorwiegend ZNS, befallenen Leukämie sein. Bei späten kombinierten Rezidiven haben wir diese Beobachtung nicht gemacht. Hier haben Patienten mit gutem Ansprechen auf die Induktionstherapie eine hervorragende Prognose.<sup>87</sup> Die genannten Beobachtungen zeigen, dass der Zeitpunkt des Auftretens eines Rezidivs, ob sehr früh, früh oder spät (**Tabelle 1**) und das bei einer extramedullären Beteiligung involvierte Organ, ZNS oder Hoden bzw. die Kombination beider Faktoren unterschiedliche Pathogenesen kennzeichnen. Insgesamt ist aktuell noch wenig zur Pathogenese von eher sehr früh und früh auftretenden ZNS- und überwiegend spät auftretenden Hoden-Rezidiven bekannt. Beide Organe bilden Nischen, die zentral an der Rezidiv- und Resistenzentwicklung bei der ALL im Kindes-/Jugendalter teilnehmen.<sup>111</sup> Bezüglich des Rezidivzeitpunkts allgemein wurde zeitgleich vor einigen Jahren von unserer Gruppe und der von W. Carroll über die Untersuchung von Genexpressionsprofilen bei ALL-Rezidiven gezeigt, dass sich sehr

frühe bzw. während der initialen Therapie auftretende Rezidive im Vergleich zu späten bzw. nach Beendigung der Therapie auftretenden Rezidiven in der Expression von Genen im Zellzyklus, der DNA-Reparatur und in Apoptose-Signalwegen unterscheiden.<sup>96, 98</sup> Weiterhin haben wir und andere in verschiedenen zielgerichteten und genomweiten Untersuchungen Mutationen und Kopienzahlveränderungen identifiziert, die signifikant häufiger bei sehr frühen/frühen im Vergleich zu späten Rezidiven auftreten wie z.B. *CDKN2A/B* Deletionen oder Mutationen in *NRAS*, *KRAS* Genen sowie in Genen des Nukleotidstoffwechsels *NT5C2* und *PRPS1*.<sup>112-116</sup> Für sehr frühe und frühe Rezidive wird aktuell angenommen, dass sie aus einem resistenten bereits bei initialer Diagnose existierenden Klon stammen, der sich in der Therapie dominant durchsetzt. In diesem Prozess sind vermutlich auch hinzugewonnene einen Selektionsvorteil verschaffende Mutationen, wie z.B. im *NT5C2* oder *PRPS1* Gen, beteiligt (**Abbildung 4**). Angenommen wurde bisher, dass diese Resistenz durch einen dominanten stabilen Klon bestimmt wird und zum Rezidiv bleibt und damit die sehr frühen/frühen Rezidive klonal stark verwandt mit der Ersterkrankung sind und im Rezidiv in der Regel schlecht auf die Therapie ansprechen.<sup>72</sup> Diese Annahmen konnten wir widerlegen durch eine unserer hier vorgestellten Arbeiten. Diese zeigte eine unerwartet hohe Heteroklonalität bei sehr frühen und frühen Rezidiven bezüglich ihrer klonalen Ig/TCR Markerkonstellation, dem Vorhandensein von Subklonen und ihrem Ansprechen auf die initialen und Rezidiv-Therapie.<sup>74</sup> Für späte Rezidive wird aktuell angenommen, dass diese eher von einer früheren mit der Ersterkrankung gemeinsamen Vorläuferzelle stammen, aber unabhängig zur Ersterkrankung später Mutationen entwickelt, die zum Rezidiv führen, jedoch nicht Therapieresistenz vermittelt sind.<sup>117-119</sup> Das Verstehen der Pathophysiologie der Kombination von Rezidivzeitpunkt und extramedullärer Beteiligung (ZNS/Hoden) in der Rezidiventstehung und der weiteren Progression der ALL sowie was präventiv und diagnostisch getan werden kann, sind Aufgaben aktueller und zukünftiger Forschungsprojekte von uns.

#### **4.3 Verbesserung des Response-Monitorings - Erhöhung der diagnostischen Präzision**

Der in unseren wie in verschiedenen anderen Studien zur Behandlung der ALL trotz unterschiedlicher Behandlungsprotokolle und Erkrankungsstadien nachgewiesene Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf die Induktionstherapie und dem Auftreten von Rezidiven/Folgerezidiven, führt zur naheliegenden Hypothese, dass die Rezidiv fördernden Zellen oder klonalen Populationen bereits am Ende der Induktionstherapie vorhanden sein müssen.<sup>58, 120</sup> Die Identifizierung und Charakterisierung dieser Zellen/ Zellpopulationen und deren Dynamik während der Therapie, wäre eine Voraussetzung, um hier Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die Induktionstherapie und persistierendem MRD spezifisch individuell zu behandeln und nicht einer generellen Therapieintensivierung zu unterziehen. Bisher wurden in Einzelfällen beim Rezidiv im Vergleich zu Ersterkrankung des selben Patienten hinzugewonnene genomische Veränderungen wie z.B. *NRAS/KRAS* Mutationen in relevanten MRD Proben nachgewiesen.<sup>38, 112</sup> Es gibt hierzu keine weiter tiefgreifenden und umfassenden Analysen. Es

wäre hoch relevant neben den klonalen Ig/TCR Markern potentiell funktionell wichtige, an der Rezidiv- und Resistenzentstehung beteiligte genomische Veränderungen im Therapieverlauf in den residuellen Leukämiezellen zu monitoren. Dies würde auch die Messung der Wirksamkeit einer spezifisch gegen Zielstrukturen der resistenten Zellen gerichteten Therapie erlauben. Andererseits würde ein MRD Monitoring mit einer ausreichenden Zahl an zusätzlichen genomischen Markern ein besseres Bild über die Dynamik klonaler Population während der Therapie geben und somit die Wirkung eines zu starken Selektionsdrucks eines spezifischen Medikaments aufzeigen (**Abbildung 4**).<sup>32, 121</sup> Um die potentiell mit der Leukämieprogression, der Rezidiv-/Resistenzentstehung verbundenen genomischen Veränderungen der Leukämiezellen zu identifizieren, aber auch sensitiv zu monitoren, könnte das tiefe zielgerichtete NGS verwendet werden.<sup>25, 122</sup> Das NGS wäre deshalb sehr gut geeignet, da viele Genorte parallel angeschaut werden könnten sowie neben Sequenzmutationen auch potentiell Kopienzahlveränderungen analysiert und auch unbekannte Mutationen in Zielgenen ins sensitive Monitoring einbezogen werden könnten. Die Identifizierung von Mutationen und genomischer Bruchpunkte von bekannten Deletionen und Fusionen können auch per Sanger Sequenzierung erfolgen. Hierzu müsste jedoch der Bruchpunkt der Fusionen und Deletionen näher eingrenzt werden, was z.B. durch genomweite SNP Analysen versucht werden könnte.<sup>123, 124</sup> Aktuell planen und organisieren wir, den genomweiten SNP *CytoScan HD Array* (Affymetrix) für die molekulargenetische Grundcharakterisierung für alle ALL-Rezidive durchzuführen. Die Deletionen und Fusionen bei der ALL, die über das Rekombinase Enzymsystem (RAG1/RAG2) entstehen, haben oft denselben Bruchpunkt, was ihre Verwendung als MRD Marker anbietet.<sup>40, 41, 43</sup> Als Alternativmethode zur Quantifizierung von MRD gegenüber der klassischen angewandten *Real-Time* PCR oder dem aktuell für die Ig/TCR Marker intensiv in Etablierung befindlichen NGS könnte die *digital droplet PCR* verwendet werden. Diese Methode zeichnet sich durch eine höhere Präzision im Vergleich zur *Real-Time* PCR aus (10% statt 50%) und erlaubt aufgrund der Aufteilung eines PCR Mixes in bis maximal 20.000 Droplets eher den Ansatz von Multiplex PCRs, was die Erhöhung von gleichzeitig zu untersuchenden Marker/Zielstrukturen ermöglicht.<sup>125</sup> Neben dem sensitiven Nachweis von Leukämiezellen auf genomischer Ebene, können diese auch auf Proteinebene nachgewiesen werden mit Hilfe der Mehrfarben-Durchflusszytometrie. Auch diese Methode wurde in den vergangenen Jahren durch die Möglichkeit der Messung von acht oder mehr Farben deutlich optimiert und befindet sich in weiterer Optimierung bezüglich der Standardisierung der Messung und spezifischer Software zum Auswerten.<sup>18, 23, 24</sup> Diese Methode kann zusätzlich zur genomischen Quantifizierung von MRD sehr nützlich sein, z.B. wenn eine Antikörpertherapie gegeben wird, wie aktuell im Rahmen der internationalen kooperativen Studien zur Behandlung von Kindern/Jugendlichen mit ALL-Rezidiv: der *IntReALL SR 2010* Studie (*Epratuzumab*, Anti-CD22) und der *IntReALL HR 2010* Studie (*Blinatumomab*, bi-spezifischer Antikörper gegen CD19 und CD3).<sup>126-129</sup> Zusammenfassend gibt es ein hohes Potential, die Technologie zum MRD Monitoring

auf genomischer Ebene weiterzuentwickeln, was die Nutzung neuer Marker zum Nachweis von MRD einschließt. Aktuell ist hier eine Umbruchzeit, die zu einem sensitiveren, verlässlichen und umfassenderen Monitoring des Therapieansprechens führen wird und damit der intensivierten, individuelleren Therapie gerecht wird. Wir etablieren aktuell in unserem Labor über eine BMBF Verbundprojektförderung gemeinsam mit technologischen und bioinformatischen Partnern ein neues *Individual Response Monitoring Assay (IRMA-4-ALL)*, das mit einer neuen MRD Technologie und der Anwendung eines erweiterten Sets von MRD Markern eine diagnostisch präziseres MRD-Monitoring erlauben wird.



## 5. Zusammenfassung

Die Herausforderung, Kindern/Jugendlichen mit einem ALL Rezidiv eine ausreichend wirksame und trotzdem sowohl kurz- als auch langfristig mit einer guten Lebensqualität verbundenen Therapie anzubieten, ist hoch und wächst aufgrund der intensiveren initialen Therapie. Aus diesem Grund ist eine bestmögliche Therapiestratifizierung in den meist auf nationaler oder internationaler Ebene durchgeführten Therapieoptimierungsstudien erforderlich. Drei der hier dargestellten Arbeiten demonstrieren die prognostische Bedeutung der submikroskopischen Messung von Leukämiezellen vor oder zu definierten Zeitpunkten während der Therapie in verschiedenen ALL-Rezidiv Subgruppen. Sie stufen sich als Schlüsselarbeiten auf diesem Gebiet ein. Eine vierte Arbeit beweist, dass die MRD basierte Stratifizierung in der intermediären ALL-Rezidiv Risikogruppe zu einer beachtlichen Verbesserung der Prognose führt. Die Daten dieser vier Arbeiten finden Berücksichtigung in der vor einem Jahr für Standardrisiko ALL-Rezidivpatienten initiierten und in wenigen Monaten für Hochrisiko ALL-Rezidivpatienten beginnenden internationalen kooperativen Studien zur Behandlung von Kindern/Jugendlichen mit einem ALL-Rezidiv - die *IntReALL SR 2010* und die *IntReALL HR 2010* Studien. Weiterhin liefern die genannten Arbeiten Hinweise zur Pathophysiologie der ALL-Rezidive, an deren Klärung im Rahmen aktueller und zukünftiger Projekte in unserem Labor gearbeitet wird.

Für den sensitiven submikroskopischen Nachweis von Leukämiezellen stehen bei der ALL idealerweise genomisch die Produkte der somatischen Genrekombination der Ig/TCR Gene als klonspezifische Marker zu Verfügung. Ihre Verwendung in der *Real-Time* PCR hat sich in Europa in den vergangenen 17 Jahren als Goldstandard zum sensitiven Nachweis von MRD durchgesetzt. Die bei einer Leukämie identifizierten klonalen Ig/TCR Marker sind aufgrund der klonalen Evolution bei der ALL jedoch nicht in jedem Fall stabil im Erkrankungsverlauf. In der fünften hier dargestellten Arbeit zeigen wir, dass die klonale Heterogenität bei sehr frühen und frühen Rezidiven unerwartet hoch ist und nicht, wie bis dahin angenommen, durch einen resistenten aggressiven Klon dominiert wird. Um diese klonale Heterogenität besser im Therapieverlauf erfassen zu können, um möglicherweise falsch negative oder falsch niedrige MRD Ergebnisse zu vermeiden, wäre die Verwendung von weiteren genomischen Markern unterstützend. Weiterhin wären MRD Marker, die auch funktionell an der Resistenzentstehung teilhaben und Angriffspunkt zielgerichteter Therapien sein können, sinnvoll. Daneben könnten neue Technologien, wie z.B. das NGS oder die *digital droplet* PCR, durch einen sensitiveren und methodisch präziseren Nachweis von MRD zur Verbesserung der diagnostischen Präzision beitragen. Wir arbeiten aktuell auch in unserem Labor an einer Verbesserung des Verfahrens zum sicheren individuellen Monitoring des Ansprechens auf die Therapie.

## 6. Literatur

1. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302: 575-581.
2. Tonegawa S, Steinberg C, Dube S, Bernardini A. Evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71: 4027-4031.
3. Korsmeyer SJ. Antigen receptor genes as molecular markers of lymphoid neoplasms. *J Clin Invest* 1987; 79: 1291-1295.
4. Bradstock KF, Janossy G, Tidman N, Papageorgiou ES, Prentice HG, Willoughby M, Hoffbrand AV. Immunological monitoring of residual disease in treated thymic acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 1981; 5: 301-309.
5. Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch JV, Poplack DG, Waldmann TA, Leder P. Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 7096-7100.
6. Yamada M, Hudson S, Tournay O, Bittenbender S, Shane SS, Lange B, Tsujimoto Y, Caton AJ, Rovera G. Detection of minimal disease in hematopoietic malignancies of the B-cell lineage by using third-complementarity-determining region (CDR-III)-specific probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 5123-5127.
7. Alt FW, Zhang Y, Meng FL, Guo C, Schwer B. Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. *Cell* 2013; 152: 417-429.
8. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334: 395-402.
9. 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; 198: 93-174.
10. van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 1991; 198: 1-91.
11. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 541-570.
12. Szczepanski T. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. *PhD Thesis* 2002.
13. Fronkova E, Krejci O, Kalina T, Horvath O, Trka J, Hrusak O. Lymphoid differentiation pathways can be traced by TCR delta rearrangements. *J Immunol* 2005; 175: 2495-2500.
14. Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, Hahlen K, Van Wering ER, Wijkhuijs AJ, Tibbe GJ, De Bruijn MA, Van Dongen JJ. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13: 196-205.
15. Szczepanski T, Pongers-Willemse MJ, Langerak AW, Harts WA, Wijkhuijs AJ, van Wering ER, van Dongen JJ. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. *Blood* 1999; 93: 4079-4085.
16. Szczepanski T, Pongers-Willemse MJ, Langerak AW, van Dongen JJ. Unusual immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemias. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 246: 205-213; discussion 214-205.
17. Karo JM, Schatz DG, Sun JC. The RAG recombinase dictates functional heterogeneity and cellular fitness in natural killer cells. *Cell* 2014; 159: 94-107.
18. van Dongen JJ, van der Velden VH, Bruggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015; 125: 3996-4009.
19. Bruggemann M, van der Velden VH, Raff T, Droese J, Ritgen M, Pott C, Wijkhuijs AJ, Gokbuget N, Hoelzer D, van Wering ER, van Dongen JJ, Kneba M. Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 709-719.
20. Eckert C, Landt O. Real-time PCR to detect minimal residual disease in childhood ALL. *Methods Mol Med* 2004; 91: 175-182.
21. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17: 1013-1034.
22. van der Velden VH, Panzer-Grumayer ER, Cazzaniga G, Flohr T, Sutton R, Schrauder A, Basso G, Schrappe M, Wijkhuijs JM, Konrad M, Bartram CR, Masera G, Biondi A, van Dongen JJ. Optimization of PCR-based minimal

- residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* 2007; 21: 706-713.
23. Coustan-Smith E, Campana D. Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: a comparative approach to molecular testing. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23: 347-358.
  24. Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D. Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2013; 84: 359-369.
  25. Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VE, Stow P, Coustan-Smith E, Pui CH, Campana D. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; 120: 5173-5180.
  26. Gawad C, Pepin F, Carlton VE, Klinger M, Logan AC, Miklos DB, Faham M, Dahl G, Lacayo N. Massive evolution of the immunoglobulin heavy chain locus in children with B precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; 120: 4407-4417.
  27. Pulsipher MA, Carlson C, Langholz B, Wall DA, Schultz KR, Bunin N, Kirsch I, Gastier-Foster JM, Borowitz M, Desmarais C, Williamson D, Kalos M, Grupp SA. IgH-V(D)J NGS-MRD measurement pre- and early post-allotransplant defines very low- and very high-risk ALL patients. *Blood* 2015; 125: 3501-3508.
  28. Wu D, Emerson RO, Sherwood A, Loh ML, Angiolillo A, Howie B, Vogt J, Rieder M, Kirsch I, Carlson C, Williamson D, Wood BL, Robins H. Detection of minimal residual disease in B lymphoblastic leukemia by high-throughput sequencing of IGH. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 4540-4548.
  29. Wright JJ, Poplack DG, Bakhshi A, Reaman G, Cole D, Jensen JP, Korsmeyer SJ. Gene rearrangements as markers of clonal variation and minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 1987; 5: 735-741.
  30. Andersson A, Ritz C, Lindgren D, Eden P, Lassen C, Heldrup J, Olofsson T, Rade J, Fontes M, Porwit-Macdonald A, Behrendtz M, Hoglund M, Johansson B, Fioretos T. Microarray-based classification of a consecutive series of 121 childhood acute leukemias: prediction of leukemic and genetic subtype as well as of minimal residual disease status. *Leukemia* 2007; 21: 1198-1203.
  31. Greaves M. Cancer stem cells: back to Darwin? *Semin Cancer Biol* 2010; 20: 65-70.
  32. Greaves M. Cancer stem cells as 'units of selection'. *Evol Appl* 2013; 6: 102-108.
  33. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481: 306-313.
  34. 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; 11: 1258-1265.
  35. Steenbergen EJ, Verhagen OJ, van Leeuwen EF, van den Berg H, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Frequent ongoing T-cell receptor rearrangements in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: implications for monitoring minimal residual disease. *Blood* 1995; 86: 692-702.
  36. Choi S, Henderson MJ, Kwan E, Beesley AH, Sutton R, Bahar AY, Giles J, Venn NC, Dalla Pozza L, Baker DL, Marshall GM, Kees UR, Haber M, Norris MD. Relapse in children with acute lymphoblastic leukaemia involving selection of a pre-existing drug resistant sub-clone. *Blood* 2007; 19: 19.
  37. 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; 88: 736-746.
  38. 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; 39: 156-160.
  39. Szczepanski T, Willemsse MJ, Brinkhof B, van Wering ER, van der Burg M, van Dongen JJ. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood.* 2002; 99: 2315-2323.
  40. Mendes RD, Sarmiento LM, Cante-Barrett K, Zuurbier L, Buijs-Gladdines JG, Povoia V, Smits WK, Abecasis M, Yunes JA, Sonneveld E, Horstmann MA, Pieters R, Barata JT, Meijerink JP. PTEN microdeletions in T-cell acute lymphoblastic leukemia are caused by illegitimate RAG-mediated recombination events. *Blood* 2014; 124: 567-578.
  41. Onozawa M, Aplan PD. Illegitimate V(D)J recombination involving nonantigen receptor loci in lymphoid malignancy. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 525-535.
  42. Papaemmanuil E, Rapado I, Li Y, Potter NE, Wedge DC, Tubio J, Alexandrov LB, Van Loo P, Cooke SL, Marshall J, Martincorena I, Hinton J, Gundem G, van Delft FW, Nik-Zainal S, Jones DR, Ramakrishna M, Tittley I, Stebbings L, Leroy C, Menzies A, Gamble J, Robinson B, Mudie L, Raine K, O'Meara S, Teague JW, Butler AP, Cazzaniga G, Biondi A, Zuna J, Kempinski H, Muschen M, Ford AM, Stratton MR, Greaves M, Campbell PJ. RAG-

- mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2014; 46: 116-125.
43. Waanders E, Scheijen B, van der Meer LT, van Reijmersdal SV, van Emst L, Kroeze Y, Sonneveld E, Hoogerbrugge PM, van Kessel AG, van Leeuwen FN, Kuiper RP. The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. *PLoS Genet* 2012; 8: e1002533.
  44. Swaminathan S, Klemm L, Park E, Papaemmanuil E, Ford A, Kweon SM, Trageser D, Hasselfeld B, Henke N, Mooster J, Geng H, Schwarz K, Kogan SC, Casellas R, Schatz DG, Lieber MR, Greaves MF, Muschen M. Mechanisms of clonal evolution in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol* 2015; 16: 766-774.
  45. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2013; 381: 1943-1955.
  46. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grumayer R, Moricke A, Arico M, Zimmermann M, Mann G, De Rossi G, Stanulla M, Locatelli F, Basso G, Niggli F, Barisone E, Henze G, Ludwig WD, Haas OA, Cazzaniga G, Koehler R, Silvestri D, Bradtke J, Parasole R, Beier R, van Dongen JJ, Biondi A, Schrappe M. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010; 115: 3206-3214.
  47. Schrappe M, Moricke A, Reiter A, Henze G, Welte K, Gadner H, Ludwig WD, Ritter J, Harbott J, Mann G, Klingebiel T, Gruhn B, Niemeyer C, Kremens B, Niggli F, Debatin KM, Ratei R, Stanulla M, Beier R, Cario G, Schrauder A, Zimmermann M. Key treatment questions in childhood acute lymphoblastic leukemia: results in 5 consecutive trials performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Klin Padiatr* 2013; 225 Suppl 1: S62-72.
  48. Henze G, v Stackelberg A, Eckert C. ALL-REZ BFM--the consecutive trials for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Klin Padiatr* 2013; 225 Suppl 1: S73-78.
  49. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L, Mangioni S, Schrappe M, Riehm H, Lampert F, Basso G, Masera G, Harbott J, Biondi A. 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; 90: 571-577.
  50. Crist WM, Grossi CE, Pullen DJ, Cooper MD. Immunologic markers in childhood acute lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1985; 12: 105-121.
  51. Look AT, Roberson PK, Williams DL, Rivera G, Bowman WP, Pui CH, Ochs J, Abromowitch M, Kalwinsky D, Dahl GV, et al. Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1985; 65: 1079-1086.
  52. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, Dastugue N, Schrappe M, Pui CH, Basso G, Silverman LB, Janka-Schaub GE. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007; 110: 1112-1115.
  53. Sather H, Coccia P, Nesbit M, Level C, Hammond D. Disappearance of the predictive value of prognostic variables in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from Childrens Cancer Study Group. *Cancer* 1981; 48: 370-376.
  54. Sather H, Miller D, Nesbit M, Heyn R, Hammond D. Differences in prognosis for boys and girls with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1981; 1: 739-743.
  55. Sather HN. Age at diagnosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1986; 14: 166-172.
  56. Uckun FM, Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Kraft P, Steinherz PG, Lange B, Hutchinson R, Reaman GH, Gaynon PS, Heerema NA. Clinical significance of Philadelphia chromosome positive pediatric acute lymphoblastic leukemia in the context of contemporary intensive therapies: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 1998; 83: 2030-2039.
  57. Riehm H, Reiter A, Schrappe M, Berthold F, Dopfer R, Gerein V, Ludwig R, Ritter J, Stollmann B, Henze G. [Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83)]. *Klin Padiatr* 1987; 199: 151-160.
  58. Campana D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol* 2012.
  59. Cazzaniga G, Valsecchi MG, Gaipa G, Conter V, Biondi A. Defining the correct role of minimal residual disease tests in the management of acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2011; 155: 45-52.
  60. Marshall GM, Haber M, Kwan E, Zhu L, Ferrara D, Xue C, Brisco MJ, Sykes PJ, Morley A, Webster B, Dalla Pozza L, Waters K, Norris MD. Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21: 704-709.

61. Pui CH, Pei D, Coustan-Smith E, Jeha S, Cheng C, Bowman WP, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Inaba H, Bhojwani D, Gruber TA, Leung WH, Downing JR, Evans WE, Relling MV, Campana D. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study. *Lancet Oncol* 2015; 16: 465-474.
62. Sutton R, Venn NC, Tolisano J, Bahar AY, Giles JE, Ashton LJ, Teague L, Rigutto G, Waters K, Marshall GM, Haber M, Norris MD. Clinical significance of minimal residual disease at day 15 and at the end of therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; 146: 292-299.
63. Bader P, Kreyenberg H, Henze GH, Eckert C, Reising M, Willasch A, Barth A, Borkhardt A, Peters C, Handgretinger R, Sykora KW, Holter W, Kabisch H, Klingebiel T, von Stackelberg A. Prognostic Value of Minimal Residual Disease Quantification Before Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2009; 20: 377-384.
64. Balduzzi A, Di Maio L, Silvestri D, Songia S, Bonanomi S, Rovelli A, Conter V, Biondi A, Cazzaniga G, Valsecchi MG. Minimal residual disease before and after transplantation for childhood acute lymphoblastic leukaemia: is there any room for intervention? *Br J Haematol* 2014; 164: 396-408.
65. Campana D, Leung W. Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2013; 162: 147-161.
66. Gandemer V, Pochon C, Oger E, Dalle JH, Michel G, Schmitt C, de Berranger E, Galambrun C, Cave H, Cayuela JM, Gardel N, Macintyre E, Margueritte G, Mechinaud F, Rorhlich P, Lutz P, Demeocq F, Schneider P, Plantaz D, Poiree M, Bordigoni P. Clinical value of pre-transplant minimal residual disease in childhood lymphoblastic leukaemia: the results of the French minimal residual disease-guided protocol. *Br J Haematol* 2014; 165: 392-401.
67. Lankester AC, Bierings MB, van Wering ER, Wijkhuijs AJ, de Weger RA, Wijnen JT, Vossen JM, Versluys B, Egeler RM, van Tol MJ, Putter H, Revesz T, van Dongen JJ, van der Velden VH, Schilham MW. Preemptive alloimmune intervention in high-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia patients guided by minimal residual disease level before stem cell transplantation. *Leukemia* 2010; 24: 1462-1469.
68. Parker C, Waters R, Leighton C, Hancock J, Sutton R, Moorman AV, Ancliff P, Morgan M, Masurekar A, Goulden N, Green N, Revesz T, Darbyshire P, Love S, Saha V. Effect of mitoxantrone on outcome of children with first relapse of acute lymphoblastic leukaemia (ALL R3): an open-label randomised trial. *Lancet* 2010; 376: 2009-2017.
69. Bader P, Kreyenberg H, von Stackelberg A, Eckert C, Salzmann-Manrique E, Meisel R, Poetschger U, Stachel D, Schrappe M, Alten J, Schrauder A, Schulz A, Lang P, Muller I, Albert MH, Willasch AM, Klingebiel TE, Peters C. Monitoring of minimal residual disease after allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia allows for the identification of impending relapse: results of the ALL-BFM-SCT 2003 trial. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1275-1284.
70. Appelbaum FR, Rosenblum D, Arceci RJ, Carroll WL, Breitfeld PP, Forman SJ, Larson RA, Lee SJ, Murphy SB, O'Brien S, Radich J, Scher NS, Smith FO, Stone RM, Tallman MS. End points to establish the efficacy of new agents in the treatment of acute leukemia. *Blood* 2007; 109: 1810-1816.
71. Raetz EA, Carroll WL. Eliminating a gold standard in childhood acute lymphoblastic leukemia? *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47: 242-244.
72. Bailey LC, Lange BJ, Rheingold SR, Bunin NJ. Bone-marrow relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2008; 9: 873-883.
73. Klumper E, Pieters R, Veerman AJ, Huismans DR, Loonen AH, Hahlen K, Kaspers GJ, van Wering ER, Hartmann R, Henze G. In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 86: 3861-3868.
74. 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; 25: 1305-1313.
75. Gaynon PS, Qu RP, Chappell RJ, Willoughby ML, Tubergen DG, Steiner 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; 82: 1387-1395.
76. Schroeder H, Garwicz S, Kristinsson J, Siimes MA, Wesenberg F, Gustafsson G. Outcome after first relapse in children with acute lymphoblastic leukemia: a population-based study of 315 patients from the Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO). *Med Pediatr Oncol* 1995; 25: 372-378.
77. Wheeler K, Richards S, Bailey C, Chessells J. Comparison of bone marrow transplant and chemotherapy for relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia: the MRC UKALL X experience. Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. *Br J Haematol* 1998; 101: 94-103.

78. 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; 87: 282-285.
79. 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; 8: 768-775.
80. O'Reilly J, Meyer B, Baker D, Herrmann R, Cannell P, Davies J. Correlation of bone marrow minimal residual disease and apparent isolated extramedullary relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 1995; 9: 624-627.
81. Uckun FM, Gaynon PS, Stram DO, Sensel MG, Sarquis MB, Lazarus KH, Willoughby M. Paucity of leukemic progenitor cells in the bone marrow of pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients with an isolated extramedullary first relapse. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2415-2420.
82. Hagedorn N, Acquaviva C, Fronkova E, von Stackelberg A, Barth A, zur Stadt U, Schrauder A, Trka J, Gaspar N, Seeger K, Henze G, Cave H, Eckert C. Submicroscopic bone marrow involvement in isolated extramedullary relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia: a more precise definition of "isolated" and its possible clinical implications, a collaborative study of the Resistant Disease Committee of the International BFM study group. *Blood* 2007; 110: 4022-4029.
83. Gaynon PS. Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. *Br J Haematol* 2005; 131: 579-587.
84. Henze G, von Stackelberg A. Treatment of Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Pui CH, ed. *Treatment of Acute Leukemias. New Directions for Clinical Research*. 2002: Humana Press.
85. 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; 358: 1239-1241.
86. 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. *Eur J Cancer* 2013; 49: 1346-1355.
87. Eckert C, Henze G, Seeger K, Hagedorn N, Mann G, Panzer-Grumayer R, Peters C, Klingebiel T, Borkhardt A, Schrappe M, Schrauder A, Escherich G, Sramkova L, Niggli F, Hitzler J, von Stackelberg A. 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. *J Clin Oncol* 2013; 31: 2736-2742.
88. Borgmann A, von Stackelberg A, Hartmann R, Ebell W, Klingebiel T, Peters C, Henze G. Unrelated donor stem cell transplantation compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission: a matched-pair analysis. *Blood* 2003; 101: 3835-3839.
89. Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R, Fengler R, Schrappe M, Janka-Schaub G, Mann G, Hahlen K, Gobel U, Klingebiel T, Ludwig WD, Henze G. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7942-7950.
90. Leung W, Campana D, Yang J, Pei D, Coustan-Smith E, Gan K, Rubnitz JE, Sandlund JT, Ribeiro RC, Srinivasan A, Hartford C, Triplett BM, Dallas M, Pillai A, Handgretinger R, Laver JH, Pui CH. High success rate of hematopoietic cell transplantation regardless of donor source in children with very high-risk leukemia. *Blood* 2011; 118: 223-230.
91. Tallen G, Ratei R, Mann G, Kaspers G, Niggli F, Karachunsky A, Ebell W, Escherich G, Schrappe M, Klingebiel T, Fengler R, Henze G, von Stackelberg A. Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2339-2347.
92. Eckert C, Hagedorn N, Sramkova L, Mann G, Panzer-Grumayer R, Peters C, Bourquin JP, Klingebiel T, Borkhardt A, Cario G, Alten J, Escherich G, Astrahantseff K, Seeger K, Henze G, von Stackelberg A. Monitoring minimal residual disease in children with high-risk relapses of acute lymphoblastic leukemia: prognostic relevance of early and late assessment. *Leukemia* 2015; 29: 1648-1655.
93. Harned TM, Gaynon P. Relapsed acute lymphoblastic leukemia: current status and future opportunities. *Curr Oncol Rep* 2008; 10: 453-458.
94. Malempati S, Gaynon PS, Sather H, La MK, Stork LC. Outcome after relapse among children with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study CCG-1952. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5800-5807.

95. Nguyen K, Devidas M, Cheng SC, La M, Raetz EA, Carroll WL, Winick NJ, Hunger SP, Gaynon PS, Loh ML. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia* 2008; 22: 2142-2150.
96. Bhojwani D, Kang H, Moskowitz NP, Min DJ, Lee H, Potter JW, Davidson G, Willman CL, Borowitz MJ, Belitskaya-Levy I, Hunger SP, Raetz EA, Carroll WL. Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2006; 108: 711-717.
97. Hogan LE, Meyer JA, Yang J, Wang J, Wong N, Yang W, Condos G, Hunger SP, Raetz E, Saffery R, Relling MV, Bhojwani D, Morrison DJ, Carroll WL. Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. *Blood* 2011; 118: 5218-5226.
98. Kirschner-Schwabe R, Lottaz C, Todling J, Rhein P, Karawajew L, Eckert C, von Stackelberg A, Ungethum U, Kostka D, Kulozik AE, Ludwig WD, Henze G, Spang R, Hagemeyer C, Seeger K. Expression of late cell cycle genes and an increased proliferative capacity characterize very early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4553-4561.
99. Raetz EA, Borowitz MJ, Devidas M, Linda SB, Hunger SP, Winick NJ, Camitta BM, Gaynon PS, Carroll WL. Reinduction platform for children with first marrow relapse of acute lymphoblastic Leukemia: A Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3971-3978.
100. Paganin M, Zecca M, Fabbri G, Polato K, Biondi A, Rizzari C, Locatelli F, Basso G. Minimal residual disease is an important predictive factor of outcome in children with relapsed 'high-risk' acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008; 22: 2193-2200.
101. Coustan-Smith E, Gajjar A, Hijiya N, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Andreansky M, Hancock ML, Pui CH, Campana D. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse. *Leukemia* 2004; 18: 499-504.
102. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Grandage VL, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, Rowbottom AW, Hunt LP, Green AF, Clarke E, Lankester AW, Cornish JM, Pamphilon DH, Steward CG, Oakhill A. Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; 92: 4072-4079.
103. van der Velden VH, Joosten SA, Willemse MJ, van Wering ER, Lankester AW, van Dongen JJ, Hoogerbrugge PM. Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 1485-1487.
104. Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A, Steward CG, Handgretinger R, Beck JF, Klingebiel T. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia* 2002; 16: 1668-1672.
105. Uzunel M, Mattsson J, Jaksch M, Remberger M, Ringden O. The significance of graft-versus-host disease and pretransplantation minimal residual disease status to outcome after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001; 98: 1982-1984.
106. Sramkova L, Muzikova K, Fronkova E, Krejci O, Sedlacek P, Formankova R, Mejstrikova E, Sary J, Trka J. Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48: 93-100.
107. Krejci O, van der Velden VH, Bader P, Kreyenberg H, Goulden N, Hancock J, Schilham MW, Lankester A, Revesz T, Klingebiel T, van Dongen JJ. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 849-851.
108. Barredo JC, Devidas M, Lauer SJ, Billett A, Marymont M, Pullen J, Camitta B, Winick N, Carroll W, Ritchey AK. Isolated CNS relapse of acute lymphoblastic leukemia treated with intensive systemic chemotherapy and delayed CNS radiation: a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3142-3149.
109. Bowman WP, Aur RJ, Hustu HO, Rivera G. Isolated testicular relapse in acute lymphocytic leukemia of childhood: categories and influence on survival. *J Clin Oncol* 1984; 2: 924-929.
110. Fengler R, Henze G, Langermann HJ, Bramswig J, Jobke A, Kornhuber B, Ludwig R, Ritter J, Riehm H. [Frequency and therapy results of testicular relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia]. *Klin Padiatr* 1982; 194: 204-208.
111. Jacobs JE, Hastings C. Isolated extramedullary relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2010; 5: 185-191.
112. Irving J, Matheson E, Minto L, Blair H, Case M, Halsey C, Swidenbank I, Ponthan F, Kirschner-Schwabe R, Groeneveld-Krentz S, Hof J, Allan J, Harrison C, Vormoor J, von Stackelberg A, Eckert C. Ras pathway mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition. *Blood* 2014; 124: 3420-3430.

113. Krentz S, Hof J, Mendioroz A, Vaggopoulou R, Dorge P, Lottaz C, Engelmann JC, Groeneveld TW, Korner G, Seeger K, Hagemeyer C, Henze G, Eckert C, von Stackelberg A, Kirschner-Schwabe R. Prognostic value of genetic alterations in children with first bone marrow relapse of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2013; 27: 295-304.
114. Li B, Li H, Bai Y, Kirschner-Schwabe R, Yang JJ, Chen Y, Lu G, Tzoneva G, Ma X, Wu T, Li W, Lu H, Ding L, Liang H, Huang X, Yang M, Jin L, Kang H, Chen S, Du A, Shen S, Ding J, Chen H, Chen J, von Stackelberg A, Gu L, Zhang J, Ferrando A, Tang J, Wang S, Zhou BB. Negative feedback-defective PRPS1 mutants drive thiopurine resistance in relapsed childhood ALL. *Nat Med* 2015; 21: 563-571.
115. Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, Khiabani H, Tosello V, Allegretta M, Paietta E, Racevskis J, Rowe JM, Tallman MS, Paganin M, Basso G, Hof J, Kirschner-Schwabe R, Palomero T, Rabadan R, Ferrando A. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med* 2013; 19: 368-371.
116. Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, Cai X, Stocco G, Crews K, Wang J, Morrison D, Devidas M, Hunger SP, Willman CL, Raetz EA, Pui CH, Evans WE, Relling MV, Carroll WL. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2008; 112: 4178-4183.
117. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, Downing JR. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2008; 322: 1377-1380.
118. van Delft FW, Horsley S, Colman S, Anderson K, Bateman C, Kempinski H, Zuna J, Eckert C, Saha V, Kearney L, Ford A, Greaves M. Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011; 117: 6247-6254.
119. Zuna J, Ford AM, Peham M, Patel N, Saha V, Eckert C, Kochling J, Panzer-Grumayer R, Trka J, Greaves M. TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 5355-5360.
120. Cazzaniga G, Biondi A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica* 2005; 90: 382-390.
121. Greaves M. Evolutionary Determinants of Cancer. *Cancer Discov* 2015; 5: 806-820.
122. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, Muzny DM, Hampton OA, Rusch M, Song G, Easton J, Harvey RC, Wheeler DA, Ma J, Doddapaneni H, Vadodaria B, Wu G, Nagahawatte P, Carroll WL, Chen IM, Gastier-Foster JM, Relling MV, Smith MA, Devidas M, Guidry Auvil JM, Downing JR, Loh ML, Willman CL, Gerhard DS, Mullighan CG, Hunger SP, Zhang J. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun* 2015; 6: 6604.
123. Liu H, Zilberstein A, Pannier P, Fleche F, Arendt C, Lengauer C, Hahn CS. Evaluating translocation gene fusions by SNP array data. *Cancer Inform* 2012; 11: 15-27.
124. Thieme S, Groth P. Genome Fusion Detection: a novel method to detect fusion genes from SNP-array data. *Bioinformatics* 2013; 29: 671-677.
125. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, Vessella RL, Tewari M. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods* 2013; 10: 1003-1005.
126. Annesley CE, Brown P. Novel agents for the treatment of childhood acute leukemia. *Ther Adv Hematol* 2015; 6: 61-79.
127. Handgretinger R, Zugmaier G, Henze G, Kreyenberg H, Lang P, von Stackelberg A. Complete remission after blinatumomab-induced donor T-cell activation in three pediatric patients with post-transplant relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2011; 25: 181-184.
128. Raetz EA, Cairo MS, Borowitz MJ, Blaney SM, Krailo MD, Leil TA, Reid JM, Goldenberg DM, Wegener WA, Carroll WL, Adamson PC. Chemoimmunotherapy reinduction with epratuzumab in children with acute lymphoblastic leukemia in marrow relapse: a Children's Oncology Group Pilot Study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3756-3762.
129. Zugmaier G, Klinger M, Schmidt M, Subklewe M. Clinical overview of anti-CD19 BiTE((R)) and ex vivo data from anti-CD33 BiTE((R)) as examples for retargeting T cells in hematologic malignancies. *Mol Immunol* 2015; 67: 58-66.



## 7. Danksagung

Danken möchte ich zuerst Herrn Prof. Günter Henze als langjährigen Abteilungsleiter und *ALL-REZ BFM* Studien Initiator und Leiter sowie PD Dr. Arend von Stackelberg als Studienkoordinator und späteren Studienleiter - für ihre Nähe und ihre Begeisterung zum Thema, ihr Vertrauen, die Ein- und Verbindung mit angrenzenden Projekten und Aktivitäten sowie ihre Unterstützung auf verschiedenen Ebenen. Ich danke Herrn Prof. Karlheinz Seeger in der langen Funktion als Laborleiter für das Vertrauen und den Freiraum. Frau Prof. Angelika Eggert möchte ich danken als unsere aktuelle Abteilungschefin für die bisher sehr offene und sinnvolle Einbindung und Unterstützung.

Ich möchte zutiefst meinen nationalen und internationalen Kooperationspartnern & Freunden danken, die ich durch die pädiatrisch-onkologischen Strukturen wie die Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie und die *International BFM Study-Group* kennengelernt habe. Hier gilt mein ganz besonderer Dank André Schrauder, Rolf Köhler, Udo zur Stadt, Martin Stanulla, Gianni Cazzaniga, Andrea Biondi, Jan Trka, Hélène Cavé und Vaskar Saha.

Mein Dank gilt der *ALL-REZ BFM* Studienzentrale, hier ganz besonders den Studiendokumentarinnen Andrea Kretschmann und Julia Dobke sowie den ärztlichen Mitarbeiterinnen. Danken möchte ich der Initiative und dem langjährigen erfolgreichen Bemühen der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, den hervorragenden Strukturen und dem Umfeld der Therapieoptimierungsstudien für den Einsatz der Finanzierung der Studien begleitenden molekulargenetischen Untersuchungen von den Krankenkassen.

Großer Dank gilt den technischen Mitarbeiterinnen, die verantwortungsbewusst, verlässlich und engagiert die praktische, oft herausfordernde Arbeit im Labor durchgeführt haben – von der täglichen Probenaufarbeitung, dem Biobanking, über die MRD Markeridentifizierung sowie Durchführung und Analyse der quantitativen Messungen und Analyse zu besonderen Fragestellungen. Zu diesen Mitarbeiterinnen zählen oder zählten: Claudia Hanel, Jutta Proba, Gabriele Körner, Wilhelmine Keune, Silke Hollmann, Sabine Reuter, Ute Schwiem, Marion Fillies, Susanne Pawlik, Madlen Pfau, Grit Czerwony und Anke Schaubitzer.

Danken möchte ich von Herzen den wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor für ihr Interesse und ihre Nähe zum Thema, gemeinsame Projekte, spannende Diskussionen und vieles mehr Verbindende: Renate Kirschner-Schwabe, Jana Hof, Stefanie Groeneveld-Krentz, Leonid Karawajew und Nikola Hagedorn. Nikola, Andreas Guggemos, Nils Waldhüter, Jana Hoffmann und Annabell Szymansky danke ich für ihren engagierten Einsatz im Rahmen ihrer Doktor-/Masterarbeiten. Danken möchte ich den unmittelbaren Fördergebern der hier dargestellten Untersuchungen und Projekte. Hierzu muss an erster Stelle die *Deutsche Kinderkrebsstiftung* genannt werden, die mit einem hohen Fördervolumen das MRD Projekt bei ALL-Rezidiven substantiell über viele Jahre unterstützt hat. Weiterhin haben wir finanzielle Unterstützung von der *Madeleine Schickedanz Kinderkrebsstiftung*, der *Deutschen José Carreras Leukämienstiftung* und der *Berliner Krebsgesellschaft* erhalten.

Abschließend danke ich den Ärzten und Patienten der Studienkliniken für die Teilnahme an den MRD-Studien bei ALL-Rezidiven, vor allem auch in Zeiten, als die Ergebnisse noch nicht den Kliniken mitgeteilt wurden.

Weiterhin möchte ich noch Menschen danken, die mich in der einen oder anderen Art in den vergangenen Jahren begleitet haben: V. Pfäfflin, A. Poraj, S. Sigusch, R. Körten-Knott und R. Probst.

## 8. Erklärung

### Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

25.08.2015

Datum

Cornelia Eckert

Unterschrift