

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin

(Department) Tübingen

Abteilung I

(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Vergleichende Sequenzanalyse von Immunglobulin-
und T-Zell-Rezeptor- Rearrangements vor und nach
Stammzelltransplantation zur Charakterisierung der
Minimalen Resterkrankung (MRD)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Yasemin Yarkin

aus

Stuttgart

2009

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin

(Department) Tübingen

Abteilung I

(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Vergleichende Sequenzanalyse von Immunglobulin-
und T-Zell-Rezeptor- Rearrangements vor und nach
Stammzelltransplantation zur Charakterisierung der
Minimalen Resterkrankung (MRD)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Yasemin Yarkin

aus

Stuttgart

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Bader

2. Berichterstatter:

Frau Professor Dr. K. Klingel

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Grundlagen	1
1.1.1	Leukämien	1
1.1.2	Akute Leukämien	2
1.1.3	Therapieziel	3
1.1.4	Risikogruppeneinteilung	4
1.1.5	Behandlung der ALL	6
1.1.6	Therapiebedingte Komplikationen	7
1.1.7	ALL- Rezidive	7
1.1.8	Stammzelltransplantation	8
1.1.9	Transplantationsassoziierte Komplikationen	9
1.2	Minimale Resterkrankung (MRD)	11
1.2.1	Klonspezifische Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor Genneuanordenungen (Rearrangements) als Zielstruktur	12
1.3	Fragestellung	13
2.	Methoden und Materialien	15
2.1	Methoden	15
2.1.1	Untersuchungsmaterial und Probenbearbeitung	15
2.1.1.1	Ficollisolation	15
2.1.1.2	DNA-Isolierung	17
2.1.1.3	Bestimmung der DNA Konzentration	18
2.1.1.4	Screening PCR -Identifizierung klonaler Rearngements	18
2.1.1.5	Markercharakterisierung – Eingesetzte Primer und deren Charakteristika	20

2.1.1.6	PCR Einstellung und Zyklusbedingungen	23
2.1.1.7	Gelelektrophorese	23
2.1.1.8	Gelherstellung	24
2.1.1.9	Heteroduplexanalyse	25
2.1.2	Rearrangementanalyse	26
2.1.2.1	Aufreinigung der PCR Produkte mittels ExoSapIT Enzym	26
2.1.2.2	Sequenzreaktion	26
2.1.2.3	Ausfällungsreaktion	28
2.1.2.4	Auswertung der Sequenz	28
2.2	Verwendete Materialien	29
2.2.1	Lösungen und Chemikalien	29
2.2.2	Notwendige Geräte	30
2.2.3	Sonstige Artikel	32
3.	Patientenkollektiv	33
4.	Ergebnisse und Auswertung	35
4.1	Interpretation der Ergebnisse aus Homo-/ Heteroduplexanalyse und Sequenzierung	35
4.2	Häufigkeitsverteilung von Immunglobulin- und T- Zell-Rezeptor-Genrearrangements	39
4.2.1	Häufigkeit von Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor- Rearrangements bei Diagnose	39
4.2.2	Häufigkeit von Immunglobulin- und T- Zell- Rezeptor- Rearrangements zum Zeitpunkt des Rezidivs	39
4.2.3	Häufigkeit und Stabilität von Immunglobulin- und T- Zell- Rezeptor- Rearrangements zwischen Diagnose und Rezidiv	39

4.3	Markerveränderungen und Evolutionsmuster Patientenkollektiv	41
4.3.1	Markerverlust	41
4.3.2	Oligoklonale Marker	41
4.3.3	Mutationen	42
4.3.3.1	Lokalisation und Charakteristika der Basensequenzänderungen	42
4.3.4	Neue Marker	43
4.3.5	Anteil der verschiedenen Immunglobulin- / T-Zell-Rezeptor- Rearrangements an der klonalen Evolution	43
4.3.6	Häufigkeitsverteilung der klonalen Evolution im Patientenkollektiv	43
4.4	Stabilität der untersuchten Immunglobulin- und T- Zell- Rezeptor-Rearrangements	45
4.4.1	IgH- Rearrangements	46
4.4.2	IgK- Rearrangements	46
4.4.3	TCRG- Rearrangements	47
4.4.4	TCRD- Rearrangements	47
4.5	Markerstabilität innerhalb des Patientenkollektivs	48
4.5.1	Stabilität der Marker bei Patienten mit zweitem Rezidiv nach Stammzelltransplantation	49
4.5.2	Stabilitäten einfach- und mehrfach- rearrangierter Marker eines Genlokus	53
4.6	Veränderungen im Markerprofil	54
4.7	Patienten mit vollständig erhaltenem Markerprofil	55
4.8	Patienten mit vollständig erhaltenem Markerset pro Genlokus	55
4.9	Stabilität von mindestens der Hälfte der Marker beim Rezidiv	55

4.10	Verlust der Mehrzahl der Rearrangements bei gleichzeitigem Erhalt von mindestens einem Marker	55
4.11	Verlust aller Immunglobulin- / T- Zell- Rezeptor-Rearrangements beim Rezidiv	56
4.12	Stabilität der oligoklonalen Rearrangements	57
5.	Diskussion	59
5.1	Bedeutung der kontinuierlichen MRD- Messung zur Einteilung in Risikogruppen und zur Rezidiverkennung	59
5.2	Bedeutung der MRD- Messung vor und nach einer Stammzelltransplantation	60
5.3	Stabilitätsrangordnung	61
5.4	Entwicklung von Subpopulationen	62
5.5	Markerverlust	62
5.6	Häufigkeit und Vergleich der klonalen Evolutionen	63
5.7	Reduktion des Risikos falsch-negativer Ergebnisse	63
5.8	Stabilitätsverteilung innerhalb des Patientenkollektivs	64
5.9	Vergleich des Evolutionsmusters innerhalb der verschiedenen Arbeiten	65
5.9.1	Monoklonaler IgH- Genlocus	65
5.9.2	Oligoklonaler IgH- Genlocus	66
5.9.3	IgK- Genlocus	66
5.9.4	TCRG- Genlocus	67
5.9.5	TCRD- Genlocus	67
5.10	Verwendbarkeit der Immunglobulin-/ T-Zell-Rezeptor-Genrearrangements	68
5.11	Rezidiverfassung bei kombinierten Auswahlstrategien	69
5.12	MRD limitierende Faktoren	70

6.	Zusammenfassung	73
7.	Sequenzierungen	75
8.	Anhang	I
8.1	Abkürzungsverzeichnis	I
8.2	Literaturverzeichnis	II

1 Einleitung

1.1 Grundlagen

1.1.1 Leukämien

Die akute lymphatische Leukämie (auch akute lymphoblastische Leukämie genannt) ist eine maligne Erkrankung lymphatischer Vorläuferzellen. Der Begriff akute Leukämie wurde erstmals 1889 von Wilhelm Ebstein (1836-1912) geprägt. Die Entwicklung von Färbeverfahren für Blutaussstriche im Jahre 1891 durch Paul Ehrlich führte zu neuen Erkenntnissen über die Morphologie der akuten Leukämien und ermöglichte in der Folge die Abgrenzung der lymphatischen von der myeloischen Leukämie (Nägli 1990).

Die Pathogenese der akuten Leukämien wird heute als neoplastische Transformation auf der Ebene der hämatopoetischen Stammzellen und anschließender Expansion des malignen Zellklons auf Kosten der normalen Hämatopoese aufgefasst. Die leukämische Evolution ist gekennzeichnet durch fehlende Differenzierung und Ausreifung der neoplastischen Zellen, unkontrollierte Zellproliferation unabhängig von physiologischen Regulationsfaktoren, generalisierte Ausdehnung im gesamten haematopoetischen Gewebe, Übergreifen auf extramedulläre Organe und Ausschwemmung der leukämischen Zellen ins Blut sowie eine Suppression der normalen Hämatopoese. Daraus resultiert die klinische Symptomatik einer progredienten Knochenmarkinsuffizienz.

Die Unterteilung der verschiedenen Leukämieformen, die von wesentlicher Bedeutung für das therapeutische Vorgehen und die prognostische Beurteilung sind, erfolgt aufgrund klinischer, morphologischer, zytochemischer, immunologischer und molekularbiologischer Kriterien.

1.1.2 Akute Leukämien

Jedes Jahr erkranken in Deutschland etwa 13-14 von 100.000 Kindern bis zum vollendeten 14. Lebensjahr an Krebs. (Das entspricht einer Gesamtzahl von 1.700 Neuerkrankungen pro Jahr. Mit 35% ist die Leukämie die häufigste bösartige Neubildung im Kindesalter, das entspricht 600 Leukämiefällen pro Jahr [59], wovon 80% auf die ALL entfallen. Kinder können in jedem Alter an einer Leukämie erkranken, am häufigsten betroffen ist aber die Altersgruppe zwischen dem ersten und dem fünften Lebensjahr [60, 61, 62]. Jungen erkranken in dieser Altersgruppe etwas häufiger als Mädchen (Verhältnis 3:2) [60, 63]. Erstmanifestationen im Säuglingsalter und nach dem zehnten Lebensjahr sind eher selten und werden mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert. In den USA tritt die ALL bei weißen Kindern doppelt so häufig auf, als bei schwarzen Kindern. Die genauen Ursachen einer ALL-Entstehung sind unbekannt. Risikofaktoren der ALL sind einige genetische und immundefiziente Syndrome (Down Syndrom, Neurofibromatose Typ 1, Bloom Syndrom und Ataxia Teleangiectica). Die Assoziation eines erhöhten Geburtsgewichtes mit einem erhöhten Risiko für ALL wurde beschrieben [64]. Das Erkrankungsrisiko für Geschwister erkrankter Kinder ist nur geringfügig höher, als bei nicht verwandten Kindern (etwa 1,1). Bei monozygoten Zwillingen im Alter unter fünfzehn Jahren liegt das Erkrankungsrisiko bei 350. Bei eineiigen Zwillingen unter fünf Jahren ist die Wahrscheinlichkeit an einer Leukämie zu erkranken so hoch (25%), dass in jedem Falle eine Untersuchung des Blutbildes und eventuell auch des Knochenmarks indiziert ist.

Führte die ALL noch vor 30 Jahren bei der überwiegenden Zahl der Patienten innerhalb von wenigen Wochen zum Tode, so ist sie heute bei 40-50% der Erwachsenen und bei 80% aller Kinder heilbar. Diese Therapieerfolge sind auf eine systematische Verbesserung der Therapie zurückzuführen, die auf seit Ende der 60er Jahre systematisch weiterentwickelte Therapiestudien basieren. Ziel dieser Protokolle ist die Verbesserung der klinischen Ergebnisse bei gleichzeitiger Minimierung der akuten toxischen und der spät auftretenden Nebenwirkungen der Behandlung.

1.1.3 Therapieziel

Die Leukämie ist eine Erkrankung des Knochenmarks. Sie ist gekennzeichnet durch eine ungehemmte klonale Proliferation unreifer, blutbildender Vorläuferzellen. Es kommt zur Verdrängung der normalen Hämatopoese, die unbehandelt in jedem Fall zum Tode führt [104].

Dank der Kombination hochwirksamer, zytostatischer Medikamente gelingt es heute bei der Mehrzahl der Kinder, den Leukämiezellklon zu eliminieren und die normale Hämatopoese wiederherzustellen. Vorrangiges Ziel ist das Erreichen eines Zustands, in dem die Leukämiezellen im Knochenmark nicht mehr nachweisbar sind und eine normale Hämatopoese erfolgen kann (Remission). Bei der akuten lymphatischen Leukämie beträgt die Remissionsrate über 95%. Bei anhaltender Remission für mindestens fünf Jahre, können diese Kinder als geheilt betrachtet werden [104]. Die Wahrscheinlichkeit eines Krankheitsrückfalls (Rezidiv) nimmt mit jedem Jahr weiter ab und tritt jenseits von fünf Jahren nur noch selten auf. Es wurden jedoch Fälle beschrieben, bei denen es noch nach 10 Jahren zu einem Rezidiv gekommen ist [33].

Das Ziel der Behandlungsprotokolle liegt in der Einteilung der Patienten in Risikogruppen und anschließender risikoadaptierter Behandlung. Zum einen, um Patienten, die einer Gruppe mit niedrigem Wiedererkrankungsrisiko angehören (low-risk) vor überflüssiger Toxizität der Behandlung zu schonen, und zum anderen, um bei Patienten mit einem hohen Wiedererkrankungsrisiko (high-risk) die angemessenere, aggressivere Therapie nicht zu versäumen. Die Entwicklung der risikoadaptierten Therapie Regime und die Einführung von Therapien zur Prävention der ZNS-Beteiligung haben wesentlich zum Anstieg der Überlebensraten beigetragen.

Dabei dienen verschiedene Parameter zur Risikoeinteilung, wie zum Beispiel die Menge der Leukozyten (WBC), Alter bei Diagnose, cytogenetische und immunphenotypische Merkmale sowie das Ansprechen auf die Induktionstherapie. ALL erkrankte Kinder mit „Niedrig –Risiko-Parametern“ wie junges Alter, niedrige Leukozytenzahl und Hyperdiploidie erreichen zu 90% ein ereignisfreies Überleben (EFS) [65, 66].

ALL-Risikogruppe	Anteil in %	Merkmale
Standard	65	Alter: 1-6 (-9) Jahre Leukozytenzahl: $<20 (<50) \times 10^3/\mu\text{l}$ Immunphänotyp: non-T-ALL keine ungünstigen molekularen Befunde (t(9;22);t(t;11)) Ansprechen auf die Therapie: Prednison good response (PGR) : $<10^{-3}$ Blasten / μl an Tag 8 Exzellente molekulare response: MRD negativ
Mittleres	25	Alter: $> 6 (>10)$ Jahren Leukozytenzahlen: $>20 (>50) \times 10^3/\mu\text{l}$ Ansprechen auf die Therapie: Intermediäre molekulare response (non-S; non-H)
Hoch	10	Chromosomale Translokationen: t(9;22); t(4;11) Hypodiploidie Ansprechen auf die Therapie: Prednison poor response (PPR): $>10^3$ Blasten / μl an Tag 8 Schlechte molekulare response (MRD $> 10^{-3}$)

Tabelle 1: Prognosefaktoren bei ALL-Ersterkrankung.

1.1.4 Risikogruppeneinteilung

Leukozytenmenge und Alter bei Diagnose haben sich als wichtige und unabhängige Parameter zur Risiko- und Prognoseeinschätzung etabliert [67, 68]. Dabei zeigte sich in einigen Untersuchungen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen anfänglicher Leukozytenzahl und dem Resultat der Therapie besteht [69,70]. Kinder mit einer anfänglichen Leukozytenmenge von $>50.000/\mu\text{l}$ haben eine schlechtere Prognose und werden bei der Behandlung einer Hoch-Risiko-Gruppe zugewiesen [68]. Als prognostisch ungünstiger Parameter gilt auch das Alter bei Diagnose der ALL von älter als 10 Jahren und jünger als 1 Jahr [70, 71, 72, 73, 74]. Dabei weist die Säuglings -ALL andere biologische Merkmale auf. Bei 60-80% der Säuglinge findet man eine Translokation der Chromosomenbande 11q23, die das MLL Gen (mixed-lineage-leukemia) enthält, mit Bildung eines Fusionsproteins innerhalb des

MLL/ALL-1 Gens. Diese Leukämien mit MLL Translokationen haben ein höchst abweichendes Genexpressionsprofil und müssen typischerweise mit aggressiveren Regimen behandelt werden, so dass es sich um eine unterschiedliche Erkrankung zu handeln scheint [75, 76, 77, 78, 79, 80].

Auch zytogenetische Merkmale der ALL Lymphoblasten werden bei der Risikoeinschätzung mitberücksichtigt. Hyperdiploidie der Lymphoblasten (d.h. Chromosomenzahlen von 50-67) in Verbindung mit Trisomien der Chromosomen 4, 10 oder 17 sowie Hyperdiploidie bei gleichzeitigem Vorliegen von Rearrangements der Translokation t(12;21) TEL/AML 1 in pro-B-ALL werden in Gruppen mit niedrigem Wiedererkrankungsrisiko eingestuft [81,82]. Dagegen werden massive Hyperploidie (zwischen 82 und 94 Chromosomen) und Hypoploidie der Lymphoblasten (<45 Chromosomen) mit einer schlechten Prognose assoziiert. Zu den Sehr-Hoch-Risiko-Gruppen gehören hypodiploide Patienten [81, 83].

Etwa 4% aller Patienten mit ALL weisen ein Philadelphia Chromosom auf. Eine Translokation t(9;22), die sowohl in der B-ALL, als auch in der T-ALL vorkommen kann und mit einer besonders ungünstigen Prognose assoziiert ist. Kinder mit Ph+ ALL sind meist älter, haben zu Beginn eine erhöhte Leukozytenmenge und sind resistent gegenüber der ALL Standardtherapie.

Die Immuntypisierung, also die Differenzierung des ALL Typs ist für die weitere Therapieplanung entscheidend. Es werden dabei die Oberflächenproteine (CD; cluster of differentiation) des lymphoblastischen Klons untersucht. Patienten mit T- ALL und reifer B -Zell ALL werden nicht mit der Standardtherapie behandelt.

Einer der wichtigsten Prognosefaktoren bei der ALL ist das initiale Ansprechen auf die Therapie [81, 84, 85, 86]. Beurteilt wird dabei der Blastenanteil im Knochenmark am Tag 8 der Induktionstherapie, der Remissionsstatus am Ende der Induktionstherapie und der Karyotyp der Blasten.

Auch wenn das initiale Ansprechen als wichtigster Prognosefaktor gilt, ist eine sensiblere Methode zur Abschätzung des Therapierfolges wünschenswert und erforderlich.

1.1.5 Behandlung der ALL

Die erfolgreiche Behandlung der kindlichen ALL wird erreicht durch die Verabreichung eines Polychemotherapieregimes. Sie ist in mehrere Therapiephasen aufgeteilt (Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie) und beinhaltet die medikamentöse ZNS Behandlung. Je nach Immunphänotyp und Risikokategorie der ALL dauert die Behandlung zwischen 2 bis 3 Jahre. Durch den Einsatz mehrerer Chemotherapeutika erreicht man eine maximale synergistische Wirkung mit Reduktion der Einzeldosis bei gleichzeitiger Minimierung der Resistenzentwicklung. Die lange Therapiedauer ist unter anderem darin begründet, dass die Medikamente eine maligne Zelle erst „abtöten“ können, wenn diese sich in ihrer S- Phase, d. h in ihrer Synthesephase (teilungsaktive, teilungsvorbereitende Phase) befindet. Da sich niemals alle Zellen eines Klons gleichzeitig in der S-Phase befinden, muss die Chemotherapiegabe in Zyklen stattfinden, um dann auch die Zellen, die aus der G₀- Phase (inaktive-/Ruhephase) in die S-Phase übergehen, zu erfassen. Zum Zeitpunkt der Diagnose müssen viele Kinder zur Chemotherapie eine Supportivtherapie erhalten. Kinder mit einer hohen Tumorlast bekommen zusätzliche Medikamente zur Behandlung der Hyperurikämie. Trotz der Entwicklung der Supportivtherapie bleibt das Problem der Behandlungstoxizität mit letalem Ausgang [87].

1.1.6 Therapiebedingte Komplikationen

Die durch die Medikamente verursachten Nebenwirkungen sind nicht unerheblich. Dabei wird unterschieden zwischen den frühen Komplikationen die noch während der Therapie entstehen und den späten Komplikationen, die sich im Laufe der Jahre entwickeln bzw. sich erst dann bemerkbar machen. Akute lebensbedrohliche Komplikationen sind das Tumor-Lyse-Syndrom, Thrombosen (intradurale Sinusvenenthrombose, tiefe Venenthrombosen, Lungenembolien) und Blutungen. Durch die Myelosuppression kommt es zu einer lebensbedrohlichen Infektanfälligkeit für bakterielle, virale und mykotische Erkrankungen. Aufgrund der Hepatotoxizität mancher Medikamente zu einer reduzierten Bildung von Plasmaproteinen (Albumin, Gerinnungsfaktoren u.v.a.m.). Je nach eingesetztem Medikament können zudem anaphylaktische Reaktionen, Mukositis, Pankreatitis und Hyperglykämien, neurotoxische Veränderungen (Epileptische Anfälle, Leukencephalopathien) auftreten.

Durch verbesserte Langzeitüberlebensraten steigt auch die Zahl der spät auftretenden Komplikationen. Diese hängen ab von der Art und Intensität der verwendeten Chemotherapeutika. Es sind zu nennen, die Entstehung von Sekundärtumoren bei 2-3% (v.a. Gehirntumore und AML) [90, 91], Infertilität, Schädigung des ZNS, Kardiomyopathien, vermindertes Längenwachstum, ebenso wie ein allgemein reduzierter Gesundheitszustand, verursacht durch neurokognitive Dysfunktionen, Depressionen und Angst.

1.1.7 ALL-Rezidive

Trotz intensiver, risikoadaptierter Induktions- und Postremission kommt es bei etwa 20-25 % der erkrankten Kinder zu einem Rezidiv. Dies entspricht 90 bis 120 Kindern pro Jahr. Durch die verbesserten Behandlungsprotokolle haben zwar die Heilungsraten von Kindern mit ALL- Ersterkrankung deutlich zugenommen, aber gleichzeitig wird dadurch die Selektion des

Leukämiezellklons und dessen Zytostatikaresistenz gefördert. Somit stellt die Behandlung des Rezidivs ein ernsthaftes Problem dar. Zum einen ist die Toleranz der Patienten mit rezidiviertem ALL gegenüber der aggressiveren Reinduktionstherapie stark reduziert. Zum anderen ist die hämatopoetische Stammzelltransplantation oft die einzigste Behandlungsmöglichkeit die das Überleben wahrscheinlich macht.

Eine der wichtigsten Faktoren für das Überleben nach dem Rezidiv ist die Zeitspanne zwischen Diagnose und Rezidiv. Patienten bei denen es nach Beendigung der Therapie zu einem Rezidiv kommt, haben günstigere Überlebenschancen als diejenigen, bei denen es noch während der Behandlung zu einem Rezidiv kommt. Für alle Patienten steigt die Überlebensrate mit der Dauer der ersten Remission. Patienten aus der Niedrig-Risiko-Gruppe neigen dazu erst nach Beendigung der Therapie oder zu noch späteren Zeitpunkten zu rezidivieren. Das Ansprechen auf ein zweites Behandlungsprogramm korreliert direkt mit der Länge der Dauer der ersten Remission [106, 107].

1.1.8 Stammzelltransplantation

Im Kindesalter erhalten lediglich Patienten der Hoch-Risiko-Gruppe nach Erreichen einer ersten Remission die Indikation zur allogenen SZT. Dies betrifft etwa 10 % aller Kinder mit ALL. Kriterien für die Einteilung zur Hoch-Risiko-Gruppe (high-risk) sind u.a. schlechtes Ansprechen auf Steroide, Nonresponse am Tag 33, hohe Blastenlasten zu definierten Zeitpunkten und das Vorliegen des Philadelphiachromosoms. Für Patienten mit Rezidiv einer ALL genügt die intensivere aggressivere Reinduktionstherapie meist nicht für eine dauerhafte Heilung. Diese Patienten sind in zweiter Remission Kandidaten für die hämatopoetische Stammzelltransplantation [88]. Ebenso bildet die Transplantation bei frühen, isolierten Knochenmarkrezidiven (während der ersten 24 bis 30 Monate nach Beginn der Induktionstherapie) in zweiter

Remission die einzige Therapieoption, die ein rezidivfreies Überleben wahrscheinlich macht [88].

Tritt das Rezidiv im Zentralen Nervensystem (ZNS) oder an den Testikeln auf werden diese Regionen zusätzlich radiotherapeutisch behandelt [89]. Die Durchführung der allogenen- SZT wird in CR 1 und in CR 2 mit HLA-identischen Geschwisterspendern, bei höheren Remissionen auch mit einem Fremdspender empfohlen. Nach erfolgter Transplantation übernehmen die Spender-Stammzellen die Haematopoese und Lymphopoese des Empfängers. Aufgrund des unterschiedlichen genetischen Ursprungs entsteht ein hämatopoetischer Chimärismus. Solange die gesamte Hämatopoese durch die Spenderstammzelle erfolgt, wird dieser Zustand als kompletter Chimärismus bezeichnet. Sind im peripheren Blut oder im Knochenmark Empfängerzellen nachweisbar oder nimmt dessen Anteil zu, spricht man von gemischtem Chimärismus bzw. von zunehmendem gemischtem Chimärismus. Die Bestimmung des hämatopoetischen Chimärismus nach Transplantation zeigt den „Funktionszustand“ des neuen Knochenmarkes an und ist vor allem bei malignen Erkrankungen ein wichtiges Instrument zur frühzeitigen Rezidiverkennung. Es wird dabei der zunehmende Empfängerzellanteil nachgewiesen.

1.1.9 Transplantationsassoziierte Komplikationen

Ebenso gefürchtet ist die transplantationsassoziierte Toxizität. Durch das hochdosierte Konditionierungsregime kann es vor allem am Herzen und an der Leber zu irreversiblen, therapieresistenten und lebensgefährlichen Veränderungen kommen. Hierzu zählen u.a. Ödeme, Hämorrhagien, interstitieller Fibrose, Herzmuskelnekrosen und Verschluss der terminalen Lebervenen). Die Niereninsuffizienz und das Nierenversagen sind häufig die Folge der Ganzkörperbestrahlung (TBI). Die nach Transplantation häufig

beobachtete hämorrhagische Zystitis kann meistens symptomatisch behandelt werden.

Kommt es innerhalb der ersten 100 Tage nach allogener Stammzelltransplantation zu einem Syndrom aus entzündlichen Reaktionen an der Haut, der Leber und oder dem Gastrointestinaltrakt, spricht man von einer akuten Gravit-versus-host-Erkrankung (GvHD). Deren Ausmaß wird in Graden ausgedrückt. Daraus ergibt sich ein Gesamtstadium, das ein wichtiger Risikoparameter für das Überleben darstellt.

Es handelt sich dabei um eine Reaktion des Transplantats, d.h. noch enthaltener immunkompetenter Zellen (T-Zellen) eines genetisch nicht identischen Spenders gegen den immundefizienten Organismus des Empfängers. Je größer der genetische Unterschied innerhalb der HLA-Merkmale ist, desto größer ist die Gefahr für das Auftreten einer GvHD und desto stärker das Ausmaß dieser Reaktion. Die chronische GvHD tritt in der Regel nach Tag 100 auf und stellt ein partielles oder komplettes Scheitern der Immuntoleranz der transplantierten Stammzellen gegenüber dem Empfängerorganismus dar. Es können dabei mehrere Organe und Organsysteme betroffen sein. Die Prognose der Patienten mit einer „Limited chronic GvHD“ ist günstig, wohingegen Patienten mit einer „extended chronic GvHD“ eine schlechte Überlebensprognose haben.

Eine ineffektive Erradikation des malignen Zellklons kann zu einem Rezidiv mit anschließender Transplantatabstoßung führen. Mit 30% stellt das hohe Rezidivrisiko nach erfolgter, allogener SZT eine weitere Herausforderung dar. Eine frühzeitige spezifische Rezidiverfassung könnte dabei von großem Nutzen sein.

1.2 Minimale Rest Erkrankung (MRD)

Mehr als 90% der Kinder mit ALL erreichen eine komplette Remission (CR). Bei etwa 80% der erkrankten Kinder wird ein ereignisfreies Überleben, d.h. eine Heilung, erzielt. 20 bis 25 % erkranken erneut. Die Mehrzahl der Rezidive tritt im Knochenmark auf, weniger häufig kommt es zu einer extramedullären Lokalisation (v.a. im Gehirn, seltener in den Testikeln oder Lymphknoten) [90]. Die Überlebenschancen der Kinder, die nach Beendigung der Therapie und oder nach erfolgter Stammzelltransplantation, ein Rezidiv erleiden, sind extrem schlecht und stellen die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache dar. Um auch für diese Patienten die Überlebensraten zu steigern, sind verbesserte Risikoeinteilungen notwendig.

Zu einem Rezidiv nach erreichter kompletter Remission kommt es durch verbliebene leukämische Zellen. Die Definition einer kompletten Remission ist mit konventionellen morphologischen Methoden nicht sehr zuverlässig. So kann ein Patient trotz kompletter Remission, nach herkömmlichen Kriterien (weniger als 5% Blasten im Knochenmarkausstrich) immer noch 10^{10} Blasten enthalten. Lichtmikroskopisch lassen sich somit 5 Blasten unter 100 normalen Zellen nachweisen. Mit Hilfe der PCR können dagegen 5-10 Blasten unter 100000 kernhaltigen Zellen nachgewiesen werden. Diese verbliebenen Leukämiezellen werden als minimale Resterkrankung (Minimal residual disease, MRD) bezeichnet. Mit der PCR- Messung ist eine sensitivere Technik zur Festlegung der kompletten Remission verfügbar [17].

Zur Erfassung der MRD stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (Cytogenetik, Zellkultursysteme, Fluoreszenz in situ Hybridisierung [FISH], Southern blotting, Immunphänotypisierung und PCR). Einige sind sehr zeitaufwendig, kostspielig und benötigen einen hohen Materialeinsatz. Aus diesem Grunde werden hauptsächlich folgende Techniken angewendet:

- 1., Durchfluss-Zytometrische- Immunphänotypisierung und
- 2., die Polymerase-Kettenreaktion mit Untersuchung von leukämiespezifischen Fusionsgenen (chromosomalen Rearrangements) und klonspezifischer Immunglobulin und T-Zell-Rezeptor Genrearrangements [97,99,101].

Gegenwärtig wird vor allem letztere Methodik zur MRD Charakterisierung bei Kindern mit ALL eingesetzt.

1.2.1 Klonspezifische Immunglobulin (Ig) und T-Zell-Rezeptor (TCR) Genneuanordnungen (Rearrangements) als Zielstrukturen

Die Antigen-Rezeptor-Gene stammen aus mehreren diskontinuierlichen Keimbahn-Segmenten, die in der frühen Lymphogenese Genneuanordnungsprozesse durchlaufen. Bei dieser Neuordnung der Ig- und TCR- Gene kommt es zu zufälligen Mutationen (Deletionen oder Insertionen) innerhalb der Verknüpfungsstellen der Sequenzen. So entstehen einmalige und charakteristische Gensequenzen (Verbindungssequenzen), die als klonspezifische Marker dienen können. Jedes Genrearrangement ist einzigartig und stellt somit einen für den ALL Patienten spezifischen „Leukämie-Fingerprint“ dar [101]. Zum Zeitpunkt der Diagnose kann die genaue Basensequenz der Verbindungsregion des Ig- oder TCR- Gens in der leukämischen Zelle bestimmt werden und ermöglicht so die Bildung von verbindungsregionspezifischen Oligonukleotiden. Diese patientenspezifischen Sonden können schließlich therapiebegleitend für die weitere MRD Erfassung verwendet werden [41].

Ein ernstes Problem ist die klonale Evolution der leukämischen Zellen und die damit verbundene Entstehung von Subklonen und oder oligoklonaler Veränderungen, die zu falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen führen [23, 26] und für Patienten dramatische Konsequenzen haben können. Oligoklonalität der Ig- und TCR-Genrearrangements zum Zeitpunkt der Diagnose ist ein relativ häufig beobachtetes Phänomen [102, 28]. Die bei Diagnose festgestellten Rearrangements können während der Therapie weitere Genneuanordnungen durchlaufen, daher erscheint es zweckmäßig – falls vorhanden - bei jedem ALL Patienten mindestens zwei PCR Zielmoleküle zu beobachten, um im weiteren Verlauf falsch-negative Ergebnisse ausschließen zu können [46, 96, 99].

1.3 Fragestellung

Um die Überlebenschancen der an ALL erkrankten Kinder mit Rezidiven zu verbessern, gilt es ist zu klären, ob ein frühzeitiges Erkennen des Rezidivs durch die MRD Bestimmung, die Therapie lenken und das Überleben verbessern kann.

Als ein Problem erweist sich die Tatsache, dass es sich bei der Leukämie um eine polyklonale Erkrankung handelt, bei der sich, sowohl durch eine Selektion, als auch durch eine Evolution, Veränderungen der Marker bzw. des Markerprofils abzeichnen.

Im Speziellen soll in dieser Arbeit geklärt werden, ob Veränderungen innerhalb der Sequenz eines Markers zwischen deren Auftreten bei Diagnose einer Leukämie und deren Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation zu erkennen sind. Es sollte untersucht werden, ob die myeloablative Behandlungsmodalität dieses Therapiezweiges sich durch klonale Selektion oder durch Induktion von Mutationen, auf die Stabilität der Ig- und T-Zell-Rezeptoren auswirkt. Hierzu gab es bislang keinen Datenbestand. Dazu sollten 1., die Marker zum Zeitpunkt der Diagnose, als auch zum Zeitpunkt des Rezidivs, identifiziert und charakterisiert werden und

2., Aus der Art und der Häufigkeit der Veränderungen sollten dann Rückschlüsse gezogen werden, welche Gruppen von Markern für das Monitoren der MRD bevorzugt oder gemieden werden sollten.

2. Methoden und Materialien

2.1 Methoden

2.1.1 Untersuchungsmaterial und Probenbearbeitung

Das Probenmaterial pro Patient besteht aus Leukoblastenproben der Erstdiagnose und dem Rezidiv. Die Blasten können sowohl aus Knochenmark, als auch aus Peripherblut gewonnen werden. Mit EDTA versetzt, können die Blastenproben kurzfristig bei 4°C, bis zur Bearbeitung, aufbewahrt werden.

2.1.1.1 Ficoll-Isolation

Zur Gewinnung der leukämischen Blasten aus der Diagnose- bzw. der Rezidivprobe eines Patienten wird die unterschiedliche Dichtespezifität der Blutzellen ausgenutzt. Mittels Verwendung einer Ficoll-Lösung erfolgt die Auftrennung der Blutzellreihen aus dem Knochenmark/Peripherblut. Die dichteren Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren bei der Zentrifugation durch die Plasma-Ficoll-Interphase und werden verworfen, die Lymphozyten und die leukämischen Blasten verbleiben in der Plasma-Ficoll-Interphase. Nach Absaugen der Plasma Ficoll Interphase und anschließenden Reinigungsschritten erhält man die leukämischen Blasten. Bei jedem Patienten wird dieser Schritt separat für die Diagnoseprobe und die Rezidivprobe durchgeführt und entsprechend gekennzeichnet.

1. Probenmaterial (Knochenmark oder Peripherblut) 1:1 verdünnen mit PBS.
2. Steriles 50 ml Falconröhrchen bis zur Hälfte mit Ficoll-Lösung auffüllen.
3. Lösung aus KM/PB und PBS langsam auf die Ficoll-Lösung aufpipettieren.
4. Tarierung der Falconröhrchen und Zentrifugation für 20 Minuten bei 8000g.

5. Die oberste Schicht des Gemisches entspricht dem Blutserum. Die darunter liegende trübe Schicht entspricht dem Plasma und enthält die mononukleären Zellen, einschließlich die leukämischen Blasten.
6. Zunächst die Serumschicht bis etwas über der Plasmaschicht abpipettieren und verwerfen. Anschließend vorsichtig den „Plasmafilm“ abpipettieren und in ein zweites steriles Falconröhrchen umfüllen. Der Rest (Ficolllösung, Erythrozyten und Granulozytengemisch) wird verworfen.
7. Falconröhrchen mit PBS auffüllen, vortexen und für 12 min bei 450 g zentrifugieren.
8. Überstand abpipettieren, das am Boden haftende Pelett mit PBS auffüllen, vortexen und für 12 min bei 450 g zentrifugieren.
9. Überstand abpipettieren.
10. Da man i. d. R. aus jeder Patientenprobe reichlich leukämische Blasten erhält, können diese für eventuell weitere Untersuchungen aufgeteilt, also aliquotiert und archiviert werden. Zur Aliquotierung Pelett mit PBS auffüllen. Pro Aliquot 1 ml aus der Pelett/PBS Mischung in ein Eppendorftube umfüllen, 6 min bei 800 RCF zentrifugieren und Überstand abpipettieren.
11. Je nach Ausgangsmenge enthält ein Aliquot ca. 5×10^6 mononukleäre Zellen.
12. Bei der anschließenden DNA-Isolierung Probe auf Eis bearbeiten, bzw. die Probe bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C aufbewahren.

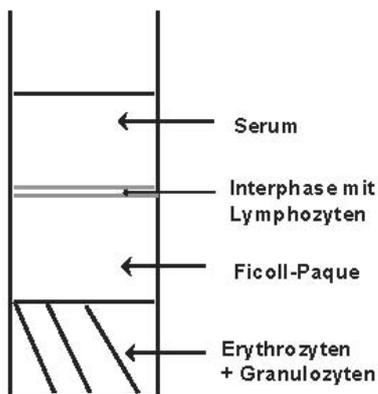


Abb. 1: Schematische Darstellung der Lymphozytenisolierung.

2.1.1.2 DNA-Isolierung

Bei jedem Patienten werden die folgenden Schritte separat für dessen Diagnoseprobe und Rezidivprobe durchgeführt:

1. Die nach dem Auftrennung erhaltene Probe der mononukleären Zellen aus Diagnose- bzw. Rezidivmaterial mit 200 μ l PBS auffüllen.
2. 20 μ l Protease und 200 μ l AL Puffer dazu pipettieren, vortexen; für 10 Minuten in einem Wasserbad (70°C) inkubieren.
3. 200 μ l Ethanol (100%) dazu pipettieren und gut vortexen.
4. Lösung auf neues Eppendorftube mit aufgesetzter Filtersäule aufpipettieren.
5. Filtersäule mit Eppendorftube für 2 Minuten bei 8000 g zentrifugieren.
6. Filtersäule aus dem Eppendorftube entnehmen und in ein neues Eppendorftube aufsetzen (das andere wird verworfen).
7. 500 μ l AW1 Waschpuffer auf die Filtersäule aufpipettieren und 2 Minuten bei 8000 g zentrifugieren. Eppendorftube und Durchfluss werfen.
8. Filtersäule auf ein neues Eppendorftube aufsetzen, 500 μ l AW2 Waschpuffer aufpipettieren und 2 Minuten bei 8000 g zentrifugieren.

Eppendorftube und Durchfluss werfen.

9. Filtersäule auf eine neue Eppendorftube aufsetzen und zum Lösen der DNA 50 µl AE-Puffer mittig auf den Filter auftragen.

10. Nach 5 Minuten Inkubation Filtersäulen für 2 Minuten bei 8000 g zentrifugieren.

11. Eluat nochmals auf Filtersäule pipettieren, 5 Minuten inkubieren und 2 Minuten bei 8000 g zentrifugieren; Filtersäule werfen.

Das Eluat in der Eppendorftube enthält die gelöste DNA der leukämischen Blasten aus der Diagnose- bzw. der Rezidivprobe eines Patienten.

2.1.1.3 Bestimmung der DNA Konzentration

Die Konzentrationsmessung erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Nullwertbestimmung des Photometers wird mit 100 µl Ampuwa durchgeführt. Die zu bestimmende DNA-Lösung wird im Verhältnis 1:20 verdünnt (z.B. 95 µl Ampuwa mit 5 µl DNA), in die Quarzküvette aufpipettiert und gemessen.

2.1.1.4 Screening PCR -Identifizierung klonaler Rearrangements

Pro Patient werden zwei Screening – Verfahren/Primertests durchgeführt, d.h. ein Screening der Blasten- DNA aus der Diagnoseprobe und eines der Blasten- DNA aus der Rezidivprobe. Die Patienten DNAs werden dabei auf die 24 am häufigsten beobachteten Rearrangements hin untersucht.

Für das Screening wird eine PCR Rezeptur, ein sogenannter Mastermix vorbereitet, der sich lediglich in den verwendeten Primern unterscheidet.

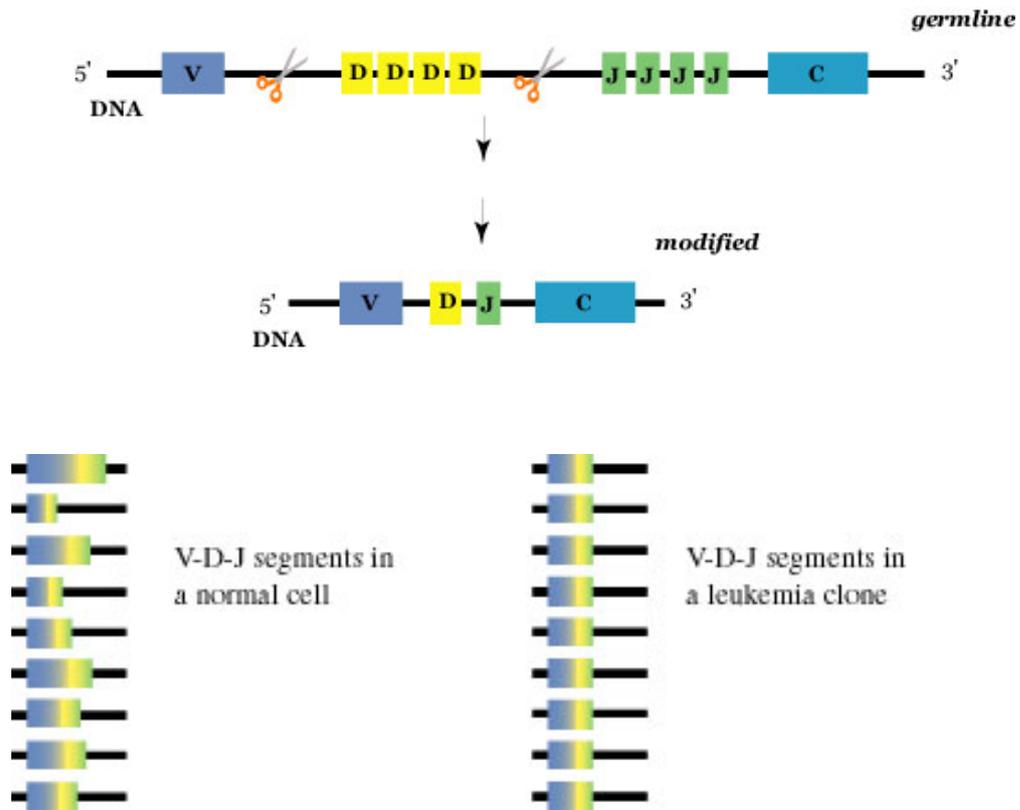


Abb. 2: Schematische Darstellung der Zusammensetzung eines Rearrangements.

Pro PCR-Ansatz werden 25-50ng DNA eingesetzt, bei insgesamt 24 zu untersuchenden Primern entspricht dies 1200 ng DNA pro Screening-Verfahren.

Reagenzien	Menge
Puffer	5µL
MgCl ₂ (25mM)	3µL
DNTP	2µL
Aqua ad injektabilia	40µL
Taq DNA Polymerase (5U/ µL)	0,25µL
DNA	25-50ng

Tabelle 2: Zusammensetzung des PCR Ansatzes.

Für jedes der 24 eingesetzten Testprimer-Paare wird ein Primermix, bestehend aus je 5µL (5pmol) des Sense- und des Antisenseprimers, hergestellt.

Die 24 Testprimer werden einzeln in die PCR- Tubes aufgetragen und mit jeweils 40µl des Mastermixes versetzt. Im Anschluß erfolgt die PCR Amplifikation.

2.1.1.5 Markercharakterisierung Eingesetzte Primer und deren Charakteristika

Um die jeweilige DNA-Sequenz, in diesem Fall das Rearrangement amplifizieren zu können, müssen Primer, das sind Einzelstrang Oligonukleotide (etwa 20 Basen lang), konstruiert und synthetisiert werden. Durch Amplifikation des klon-spezifischen DNA Abschnittes hat man die Möglichkeit, eine maligne Zelle unter 10^4 bis 10^6 normalen Zellen zu erfassen. Im Folgenden sind die Charakteristika der hier verwendeten Primer dargestellt (Tabelle 3).

Primer-Nr.	Gen	5'	3'	Chromosomale Lokalisation	Länge des Amplifikats [bp]
1	IgH	VH1/7	Jhcons	14q32.3	~340
2	IgH	VH2	Jhcons	14q32.3	~380
3	IgH	VH3	Jhcons	14q32.3	~320
4	IgH	VH4	Jhcons	14q32.3	~320
5	IgH	VH5	Jhcons	14q32.3	~360
6	IgH	VH6	Jhcons	14q32.3	~100
7	IgK	Vkl	Kde	2p11.2	~431
8	IgK	VkII	Kde	2p11.2	~447
9	IgK	VkIII	Kde	2p11.2	~429
10	IgK	VKIV	Kde	2p11.2	~445
11	IgK	intron	Kde	2p11.2	~511
12	TCR γ	VgI γ	Jg1.1/2.1	7p14	~329
13	TCR γ	VgI γ	Jg1.3/2.3	7p14	~533
14	TCR γ	VgII	Jg1.1/2.1	7p14	~318
15	TCR γ	VgII	Jg1.3/2.3	7p14	~522
16	TCR γ	VgIII	Jg1.3/2.3	7p14	~527
17	TCR γ	VgIV	Jg1.1/2.1	7p14	~357
18	TCR γ	VgIV	Jg1.3/2.3	7p14	~561
19	TCR δ	Vd1	Jd1	14q11.2	~452
20	TCR δ	Vd2	Dd3	14q11.2	~501
21	TCR δ	Vd2	Jd1	14q11.2	~443
22	TCR δ	Vd3	Jd1	14q11.2	~440
23	TCR δ	Dd2	Dd3	14q11.2	~608
24	TCR δ	Dd2	Jd1	14q11.2	~550

Tabelle 3: Charakteristika der untersuchten Rearrangements.

Primer	V-Primer 5'-3'	J-Primer 3'-5'
1	GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG	CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC
2	GTCTGGTCCTACGCTGGTGAACCC	CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC
3	CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG	CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC
4	CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG	CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC
5	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT	CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC
6	TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG	CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC
7	TCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTG	ATCCTGTTGGACGAGACTGGAGACTCC
8	GGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTC	ATCCTGTTGGACGAGACTGGAGACTCC
9	CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC	ATCCTGTTGGACGAGACTGGAGACTCC
10	CAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTT	ATCCTGTTGGACGAGACTGGAGACTCC
11	CGTGGCACCGCGAGCTGTAGAC	ATCCTGTTGGACGAGACTGGAGACTCC
12	GGAAGGCCCCACAGCTTCTT	CGAGTATCATTGAAGCGGACCATT
13	GGAAGGCCCCACAGCTTCTT	GAGAAACCGTCACCTTGTTGTG
14	CGGCACTGTCAGAAAGGAATC	CGAGTATCATTGAAGCGGACCATT
15	CGGCACTGTCAGAAAGGAATC	GAGAAACCGTCACCTTGTTGTG
16	AGCATGGGTAAGACAAGCAA	GAGAAACCGTCACCTTGTTGTG
17	CTTCCACTTCCACTTTGAAA	CGAGTATCATTGAAGCGGACCATT
18	CTTCCACTTCCACTTTGAAA	GAGAAACCGTCACCTTGTTGTG
19	ATGCAAAAAGTGGTCGCTATT	CTTGGGCACACTGACACCTTG
20	ATACCGAGAAAAGGACATCTATG	TATAGGAGTGGGACCCAGGGT
21	ATACCGAGAAAAGGACATCTATG	CTTGGGCACACTGACACCTTG
22	GTACCGGATAAGGCCAGATTA	CTTGGGCACACTGACACCTTG
23	AGCGGGTGGTGTATGGCAAAGT	TATAGGAGTGGGACCCAGGGT
24	AGCGGGTGGTGTATGGCAAAGT	CTTGGGCACACTGACACCTTG

Tabelle 4: Sequenz der verwendeten Sense- und Antisense- Primer [6].

2.1.1.6 PCR Einstellung und Zyklusbedingungen

Verwendet wird ein Gene Amp PCR System 9700 PE von Applied Biosystems.

Schritte	Temperatur	Dauer (min)	Ramping	Abnahme/Zyklus
Hold:	94°C	11:00	100%	
	96°C	01:00	100%	
8 Zyklen:	94°C	00:45	100%	
	63°C	00:30	29%	um 1°C/Zyklus
	70°C	00:45	23%	
37 Zyklen:	90°C	00:30	100%	
	56°C	00:30	29%	
	70°C	00:45	23%	
Hold	72°C	07:00	100%	
Hold (Hetero-/Homoduplex):				
	95°C	05:00	100%	
	4°C	∞		

Tabelle 5: PCR Einstellungen und Zyklusbedingungen.

2.1.1.7 Gelelektrophorese

Im Anschluß an die PCR werden die amplifizierten DNA Produkte mittels Gelelektrophorese identifiziert. Hierbei bewegen sich negativ geladene DNA Fragmente in Richtung der positiven Elektrode. Das Gel dient als molekulares Sieb, dessen Porengröße vom prozentualen Anteil des eingesetzten Acrylamids abhängig ist. Die angelegte Spannung sowie die Größe des DNA-Fragments bestimmen dessen Laufgeschwindigkeit. Durch die anschließende Ethidiumbromidfärbung des Gels, das einen Komplex mit den Nukleinsäuren bildet, können die amplifizierten Fragmente bei UV- Belichtung als einzelne Fluoreszenz-Banden dargestellt und fotografiert werden.

2.1.1.8 Gelherstellung

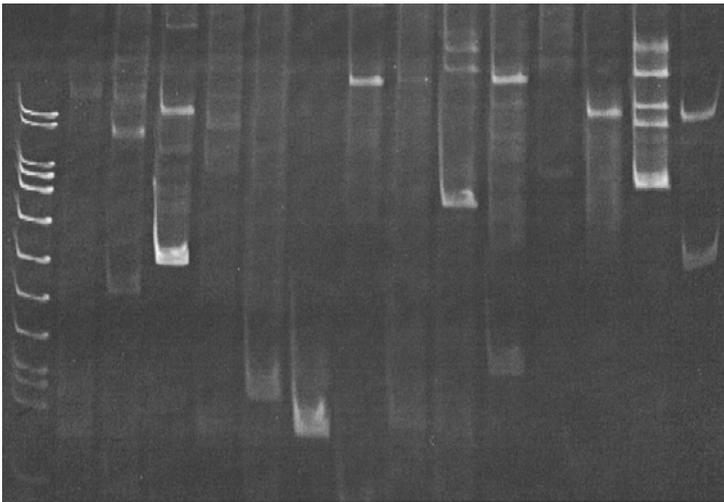
1. 2 Glasplatten (18cm x 16cm x1,5mm) zusammen mit je einem „Spacer“ (16cm x 2cm x 3mm) am Seitenrand und einem Plastikamm in der oberen Öffnung (Zähne des Kammes 0,5 x 3cm), an der Halterung befestigen.
2. Die Gel-Mischung über den oberen Seitenrand, zwischen die Glasplatten, aufpipettieren.
3. Nach 30 Minuten den Plastikamm entfernen und die Glasplatten in eine mit TBE- Puffer gefüllte Elektrophoresekammer einlegen.
4. In die erste Geltasche 14 µl eines Molekularmarker aufgetragen.
5. Auf Eis arbeitend jeweils 40 µl PCR Ansatz mit 12µl loading Puffer vermischen und nebeneinander in je eine Geltasche aufgetragen. Da hier auf 24 Primer getestet wird, müssten pro Screenig -Verfahren 2 Gele hergestellt werden. Die angelegte Spannung beträgt 440V.
6. Die restlichen 10µl der PCR Ansätze für die spätere Sequenzanalyse bei – 20°C lagern.
7. Das Gel nach einer Laufzeit von 1 h abziehen, 10 min zur Färbung in eine Ethidiumbromidlösung legen und anschließend mit Leitungswasser auswaschen.
8. Durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht können die amplifizierten DNA Fragmente als einzelne fluoreszierende Banden dargestellt werden.

Reagenzien	1 Gel
Acrylamid 30% (ml)	7
10 xTBE Puffer (ml)	3,5
Wasser (ml)	24,2
TEMED (µl)	35
APS 10% (µl)	245
Total (ml)	35

Tabelle 6: Gelherstellung: verwendete Substanzen und deren Mengenangaben .

2.1.1.9 Heteroduplex Analyse der PCR Produkte

Zur Unterscheidung der polyklonalen Rearrangements werden die PCR-Ansätze vor dem Auftragen auf das Gel bei hohen Temperaturen (95°C über 5 min) denaturiert und bei plötzlich einsetzenden 4°C (über mindestens 30 Minuten) renaturiert. Diese beschleunigte Duplexbildung führt bei polyklonalen Rearrangements zu verschiedenen Heteroduplexformationen, welche sich in der Gelelektrophorese von den Homoduplexformationen in ihrer Laufgeschwindigkeit (Laufeigenschaft) und in ihrer Bandendarstellung unterscheiden. Somit lassen sich in der anschließenden Gelelektrophorese die monoklonalen Rearrangements (Homoduplexbanden) identifizieren.



MM VH1 IgH HO IgH FR3 IgK IgK IgK IgK int Vgl TG HD TG

Abb. 3: Homo-Heteroduplexanalyse einer Screening PCR eines Patienten. PAGE Analyse und Ethidiumbromidfärbung.

MM: Molekularmarker. VH1. HO: Homoduplexbande, monoklonaler Marker. FR3: Marker aus der Gruppe der IgH. Vkl , intron: Marker aus der Gruppe der IgK. HD: Heteroduplexbande, oligoklonaler Marker. TG, Vgl, VglI: Marker aus der Gruppe der TCRG.

2.1.2 Rearrangementanalyse

Im Anschluss an die Homo-/Heteroduplexanalyse, also nach Identifizierung der patientenspezifischen Einzelbanden in der Gelanalyse, können diese PCR-Produkte der rearrangierten Gene entweder aus dem Gel herausgeschnitten, oder direkt aus der PCR- Reaktion entnommen und in ihrer Sequenz analysiert werden. In dieser Arbeit haben wir uns für die Verwendung der direkten Sequenzierung entschieden:

2.1.2.1 Aufreinigung der PCR-Produkte mittels ExoSapIT-Enzym

Zum Abbau überschüssiger Primer wird jede zu untersuchende PCR-Reaktion eines Patienten (4µl) mit jeweils 1,5µl ExoSapIT (Amersham) Enzym versetzt.

Zyklen	Temperatur	Dauer (min)
1Hold	37°C	15:00
2 Holds	80°C	15:00
	4°C	∞

Tabelle 7: PCR Einstellungen und Dauer bei Verwendung von ExoSapIT.

2.1.2.2 Sequenzreaktion

Bei der Sequenzanalyse werden der 5'-3'- und der 3'-5'-Strang eines Rearrangements separat sequenziert und anschließend bei der Analyse am Computer zusammengeführt. Diese sind komplementär zueinander und enthalten je nach Rearrangement die komplette oder inkomplette klonspezifische V-N-D-N'-J Sequenz. Es werden hierbei dieselben Primer verwendet, nur dass zu diesem Replikationsansatz geringe Mengen aller 4 ddNTP's dazugegeben werden. Diese sind fluoreszenzmarkiert und fungieren als Terminatoren. Die 4 Farbstoffe absorbieren im selben Wellenbereich

emittieren jedoch bei unterschiedlichen Wellenlängen. Das nach der Replikation erhaltene Gemisch wird über die Kapillarelektrophorese getrennt. Die so gewonnenen Kettenfragmente wandern somit nach Kettenlänge geordnet durch den Strahl und emittieren dabei den Fluoreszenzfarbstoff des jeweiligen ddNTP-Farbstoffs. Werden die Fluoreszenz-Intensitätsverläufe der 4 Spektrallinien gegen die Laufzeit übereinander aufgetragen, kann die Sequenz durch den Verlauf der jeweiligen Maxima bei den Emissionswellen bestimmt werden.

Reagenzien	Menge (µl)
PCR Ansatz (ExoSapIT Reaktion)	2
Mix Big Dye	2
Aqua ad.	2
Primer verdünnt (1:100)	2
Total	8

Tabelle 8: PCR Ansatz für die Sequenzierung.

Die PCR Einstellung hierfür:

Zyklenanzahl	Temperatur	Dauer (min)
1Hold	94°C	00:10
27 Zyklen	96°C	00:10
	55°C	00:05
	60°C	00:50
2Holds	72°C	05:00
	4°C	∞

Tabelle 9: PCR Einstellungen.

2.1.2.3 Ausfällungsreaktion:

1. Pro Sequenzierung ein Eppendorftube mit 10 µl Natriumacetat (3 mol, pH 4,6) vorbereiten
2. die 8µl PCR Ansätze werden mit jeweils 80µl Aqua ad aufgestockt (Verlustreduktion), gut vermischen und in die vorbereiteten Tubes pipettieren.
3. 250 µl Ethanol absolut dazu pipettierten, vortexen und über 30 min bei Raumtemperatur inkubieren, alternativ können die Proben über Nacht in den Kühlschrank gestellt werden. Hierbei erfolgt die Ausfällung der DNA.
4. Eppendorfröhrchen 15 min bei 15000 x g zentrifugieren, den Überstand verwerfen und mit 250-300 µL Ethanol (70%) aufgefüllen, 5 min bei 15000 x g zentrifugieren und der Überstand erneut verwerfen (hierbei aggregiert die DNA und das Natriumacetat geht in Lösung).
5. Die Eppendorfröhrchen bei geöffnetem Deckel in einer Vakuumzentrifuge 5 min lang bei 50°C trocknen. Dabei präzipitiert die DNA am Boden des Gefäßes und diese anschließend mit 20µl Aqua dest. lösen.

Die Proben können in dieser Form direkt der Sequenzierung in der Kapillarelektrophorese zugeführt werden.

2.1.2.4 Auswertung der Sequenz

Die resultierenden DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des DNA-Analyse Programms Sequence Navigator (DNA and Protein Comparison Software) der Firma Applied Biosystems auf einem Macintoshrechner bearbeitet. Die patientspezifischen Sequenzen wurden mit den aus den Genbanken (NCBI-Blast und IMGT databases) erhaltenen Nukleotidsequenzen der Variablen- und Junktionsregionen der Keimbahn-Gensegmenten verglichen und bestätigt.

2.2 Verwendete Materialien

2.2.1 Lösungen und Chemikalien

Substanzen	Hersteller
Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30	Roth
Ammoniumpersulfat-Lösung (10% APS)	Sigma
Amplitaq Gold DNA Polymerase (U/μl)	Applied Biosystems
Bromphenolblau	Serva
Buffer AW1	Qiagen
Buffer AW2	Qiagen
Buffer AE Elution	Qiagen
Buffer AL Lysis	Qiagen
D-PBS (CaCl ₂ ,MgCl ₂)	Gibco
DNA Molekular Weight Marker VIII (19-1114bp)	Roche Diagnostics
Ethanol 99,9%	Universitäts- Apotheke
Ethidiumbromid-Lösung 10% (5mg/ml)	Roth
Ficoll Separation Solution (Density 1,077g/ml)	Biochrom AG
NaAcetat	Merck
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine	Serva
Nukleotide dATP, Li-Salt, 25μmol, 100mM, pH7	Roche
Nukleotide dCTP, Li-Salt, 25μmol, 100mM, pH7	Roche
Nukleotide dGTP, Li-Salt, 25μmol, 100mM, pH7	Roche
Nukleotide dTTP, Li-Salt, 25μmol, 100mM, pH7	Roche
PCR Buffer	Qiagen
PCR-Primer-Paare diverse	Roth
Protease	Qiagen
TEMED p.a. 99% für Elektrophorese	Roth

TE-Puffer	Universitäts-
TBE-Puffer pH 8	Apotheke
Xylencyanol FF	Roth

2.2.2 Notwendige Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Accu-jet	Brand
Aufnahmeeinrichtungen	Cybertech
Collection Tubes (2ml)	Qiagen
Dispensette (Pumpe)	Brand
Densitometer	Cybertech
Elektrophoresekammern Hoefer SE 600	Amersham Biosciences
Entsorgungsbox	Sarstedt
Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5ml	Eppendorf
Eppendorf Multipipette plus	Eppendorf
Gen Amp PCR System	PE Applied Biosystems
HPLC, H ₂ O	Merck
Multipipettenspitzen 0,5ml;1ml;5ml;10ml	Eppendorf
Pasteur Pipetten Länge 230 mm	Fortuna
Photometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Pipetten 10 µl,50 µl, 100 µl, 200 µl	Eppendorf
Pipetten 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Gilson
Pipettenspitzen 200µl gelb	Sarstedt
Pipettenspitzen 1000µl blau	Greiner bio-one

PP-Test-Tubes 15ml; 50 ml cellstar	Greiner bio-one
Präzisionsküvette aus Quarzglas Suprasil	Hellma
Probenständer	Nalgere
Stripetten 5ml, 10ml, 25ml	Costar
Rotor JA 25.15 für Zenrifuge Avanti J-25	Beckman
Spannungsquelle Phero-Stab 300	Bachofer
Sterilbench Herasafe	Heraeus
	Instruments
Tarierwaage BP 1200	Sartorius
Thermocycler 60	bio-med
UV-Kamera raytest	Raytest
Video copy processor P67E	Mitsubishi
Vortex Heidolph Roaxtop	neolab Heidelberg
Vortex Genie 2	Scientific
	Inudstruies
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge Mikro 22R Typ 1110	Hettich
Zenrtifuge Rotixa 50 RS	Hettich
	Zenrifugen

2.2.3 Sonstige Artikel

Artikelbezeichnung	Hersteller
Amplifikationsgefäße Multiply Safecup	Sarstedt
DNA Analyse Programm Sequence Navigator™	Applied-Biosystems
Disketten 3,5	Sentinel
Druckerpapier	Mitsubishi
Eppendorf Cups Safe-lock	Eppendorf
Glasplatten für das Herstellen von Gelen 18x16cm	
Handschuhe Biogel Diagnostik	Regent Medical
Handschuhe Nitrile Touch N Tuff	Ansell/Edmont
Kämme	Amersham
Kimwipes	Kimberly-Clarke
Pasteur-Pipetten	Hirschmann Laborgeräte
Pipettenspitzen blau, 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen Diamond D 10, 10µl	Gilson
Pipettenspitzen gelb, 100 µl	Eppendorf
PP Röhrchen	Greiner Labortechnik
Präzisionsquvette Quarzglas SUPRASIL 105.202-QS	Hellma
Säulen	Qiagen
Spacersets 1,5 mm	Amersham
Ständer für die Säulen	Qiagen
Wasserstrahlpumpe	Greiner Labortechnik
Zentrifugenröhrchen Oak-Ridge PC 16x 106mm	Nalge Nunc

3. Patientenkollektiv

Einige der untersuchten Patienten wurden an folgenden auswärtigen Hämatologischen Zentren behandelt:

- Universitätskinderklinik Freiburg
- Universitätsklinik für Kinder und Jugendliche Erlangen
- Universitäts-Kinderklinik Essen,
- Universitätskinderklinik und Poliklinik Ulm
- Universitätskinderklinik Halle Wittenberg
- Universität Frankfurt am Main
- Zentrum für Kinderheilkunde Gießen
- Kinderklinik Münster
- Kinderklinik Düsseldorf

Bei der vergleichenden Analyse der 30 beteiligten Patienten wurde jeweils eine Diagnose- und eine Rezidivproben untersucht. Alle Patienten haben eine allogene Stammzelltransplantation in kompletter Remission (CR) erhalten (CR1= 10, CR2= 13, CR3 =6, bei Pat. Nr.: 23 unbekannt). Als Quellen hämatopoetischer Stammzellen dienten Knochenmark (14 Patienten) und peripheres Blut (9 Patienten). Bei den Rezidivproben handelte es sich um Rezidive, die sich nach erfolgter Stammzelltransplantation ereignet haben. Die Rezidive traten zwischen Tag 41 und Tag 620 (im Mittel 241,5 Tage) nach SZT auf. Das Konditionierungsregime beinhaltete eine Ganzkörperbestrahlung bei 21 Kindern und eine intensivierete Chemotherapie bei 3 Patienten. Bei 6 Kindern liegen keine Daten über das Behandlungsregime vor.

Die Proben stammen aus einem Zeitraum von August 1998 bis September 2004.

Die Altersverteilung der Kinder bei Erstdiagnose lag zwischen 1 und 15 Jahren. Immunphenotypische Untersuchungen zeigten einen Anteil von c-ALL von (20/30) 66,7%, von pre-B-ALL mit (8/30) 26,7% und T- ALL mit (2/30) 6,6%.

Pat. Nr.	UPN	ALL Subtyp	Remissionsstatus	Alter	HLA	SZ Quelle	Zeit des Rezidivs nach SZT	Konditionierung	GvHD Prophylaxe	T-Zell-Depletion
1.	2346	cALL	CR1	6	id	peri	T 106	TBI-Eto-MTX i.t. -Alex	ja	nein
2.	2119	cALL	CR1	7,5	id	KM	T 421	TBI-Eto	ja	nein
3.	2056	cALL	CR1	11,5	non-id	peri SZ	T 65	Eto-Thio-ATG	ja	ja
4.	2295	cALL	CR1	7,5	id	KM	T 526	TBI-Eto-ATG	ja	nein
5.	2130	T ALL	CR1	4,5	id			unbek.		
6.	2043	cALL	CR1	11,5	id	KM	T 523	TBI-Eto-Cyc-Pred-O	ja	ja
7.	2298	T ALL	CR1	8,5	id	peri SZ	T 419 T534	TBI-Flu-ATG-Eto	ja	ja
8.	2445	pre B ALL	CR2	4,25	non-id		T 386	TBI-Eto-ATG	ja	ja
9.	2478	pre B ALL	CR1	6	id	KM	T 142	TBI-Eto	ja	nein
10.	1756	cALL	CR3		id		T 133	unbek.		
11.	1829	cALL	CR3	10,5	id	peri SZ	T 209	TBI-Flu	ja	ja
12.	1965	cALL	CR3	12	id	peri SZ	T 620	TBI-Thio-Eto-ATG	ja	ja
13.	2231	pre B ALL	CR2	5	id	KM	T 275	TBI-Eto	ja	nein
14.	2451	cALL	CR2	5	id	peri SZ	T 319	TBI-Eto-Flu-ATG	ja	ja
15.	2217	pre B ALL	CR3	5	non-id	peri SZ	T 100	TBI-Eto-ATG	ja	ja
16.	1282	pre B ALL	CR3	2,5	id	KM	T 49	TBI-Eto-Cyc	ja	nein
17.	1776	pre B ALL	CR2	1,25	id	peri SZ	T 152	Bus-Cyc-Eto-ATG	ja	ja
18.	1820	cALL	CR3	11	non-id	peri SZ	T 493	TBI-Cyc-Eto	ja	ja
19.	1793	cALL	CR2	9	id	peri SZ	T 205	TBI-Thio-Eto-ATG	ja	ja
20.	2613	cALL	CR2	13,5	id	KM	T 63	TBI-Eto	ja	nein
21.	2560	pre B ALL	CR2	12,25	id	KM	T 214	TBI-Eto-ATG	ja	nein
22.	2114	cALL	CR2	8,75	non-id	peri SZ	T 117	TBI-Flu-ATG-Eto	nein	ja
23.	2194	cALL	unbek.	4	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	
24.	2760	pre B ALL	CR2	15	id	unbek.	T 97	unbek.	unbek.	
25.	2743	cALL	CR2	8	id	peri SZ	T 230	TBI-Eto-ATG	ja	unbek.
26.	2688	cALL	CR2	11	non-id	KM	T 447	TBI-Eto-ATG	ja	nein
27.	2413	cALL	CR1	8,5	id	peri SZ	T 339	Bu-Cyc	ja	nein
28.	2788	cALL	CR1		unbek.		T 126	unbek.	unbek.	
29.	2266	cALL	CR2	8,5	id	peri SZ	T 41	TBI-Flud-ATG-Eto	unbek.	ja
30.	2890	cALL	CR2	12	id	unbekannt	T 220	unbek.	unbek.	

Tabelle 10: Patientendaten. TBI= Total body irradiation; Bus=Busulfan, Cyc= Cyclophosphamid, Eto= Etoposid, MTX i.t.= Methotrexat intra thecal, ATG= Antithymozytenglobulin.

4. Auswertung und Ergebnisse

4.1 Interpretation der Ergebnisse aus Homo-/Heteroduplexanalyse und Sequenzierung

Anhand der Gelelektrophorese können die monoklonalen Marker identifiziert werden. Diese stellen sich im Gel als eine homogene Bande dar und können in der anschließenden Sequenzierung eindeutig identifiziert werden (Abbildung 6). Biklonale/oligoklonale Marker stellen sich in der Gelelektrophorese als typische Heteroduplex Banden dar. Eine direkte Sequenzierung der biklonalen Marker ist nicht möglich, da es zu einem Abbruch in der Mitte des Rearrangements kommt (siehe Abbildung 8). Polyklonale Rearrangements ergeben zwar Banden (z. T. mehrere Heteroduplexbanden, Abb.7), diese lassen sich jedoch nicht sequenzieren. Diese falsch-positiven Banden findet man aufgrund des eingeschränkten Immunrepertoires gehäuft bei transplantierten Patienten (Abbildung 7).

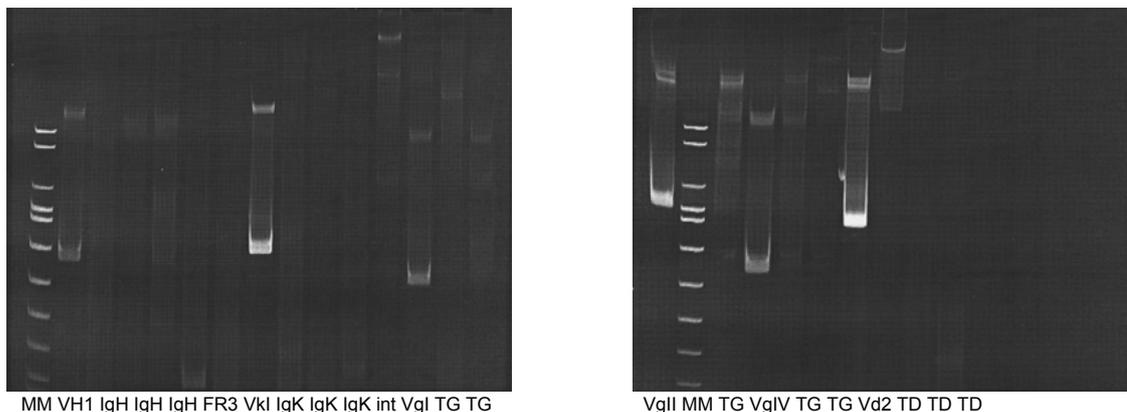
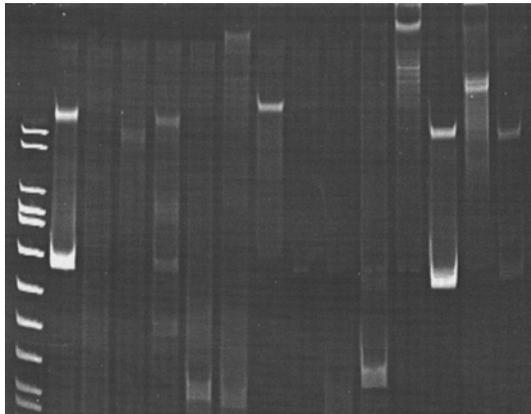
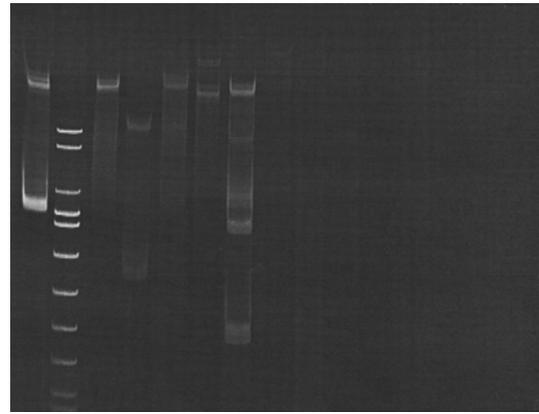


Abb. 4: Screeninganalyse eines Patienten (Pat. Nr. 26, UPN: 2688) auf spezifische Rearrangements bei Diagnose. Gruppe der untersuchten und bei diesem Patienten erfassten Marker.

MM: Molekularmarker. VH1, FR3: Marker aus der Gruppe der IgH; Vkl, intron: Marker aus der Gruppe der IgK. TG, Vgl, VgII, VgIV: Marker aus der Gruppe der TCRG. Vd2 und TD: Marker aus der Gruppe der TCRD.



MM VH1 IgH IgH IgH FR3 IgK IgK IgK IgK int Vgl TG TG



VgII MM TG TG TG TG TD TD TD TD

Abb.5: Screeninganalyse der Rezidivprobe des obigen Patienten (Abb. 4).

MM: Molekularmarker. VH1 , FR3: Marker aus der Gruppe der IgH. Vkl, intron: Marker aus der Gruppe der IgK. TG, Vgl, VgII: Marker aus der Gruppe der TCRG. Vd2, TD: Marker aus der Gruppe der TCRD.

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen die Screeninganalyse der Diagnoseprobe und der Rezidivprobe eines Patienten. Am linken Gelrand wurde in die erste bzw. zweite Geltasche ein Molekularmarker aufgetragen. Die monoklonalen Marker stellen sich als homogene Banden in der ihrem Molekulargewicht entsprechenden Höhe des Gels dar. Bei diesem Patienten können die bei der Diagnose erfassten Marker (hier IgH-, IgK- und TCRD- Genrearrangements) auch im „Rezidivgel“ identifiziert werden. Die im Anschluss durchgeführte Sequenzierung bestätigte deren unveränderte Primärstruktur (Pat. Nr. 13).

Die Sequenzierungen monoklonaler Marker erfolgen problemlos: das gesamte Rearrangement wird sequenziert. Dabei wird durch die Fluoreszenzmarkierung jeder Base eine Farbe zugeordnet: hier Adenin A= grün; Thymin T= rot; Guanin G= schwarz und Cytosin C = blau. Jede einzelne Base wird eindeutig erkannt und die Abstände der Basen zueinander sind identisch (Pat. Nr. 13) (Abbildung 6).

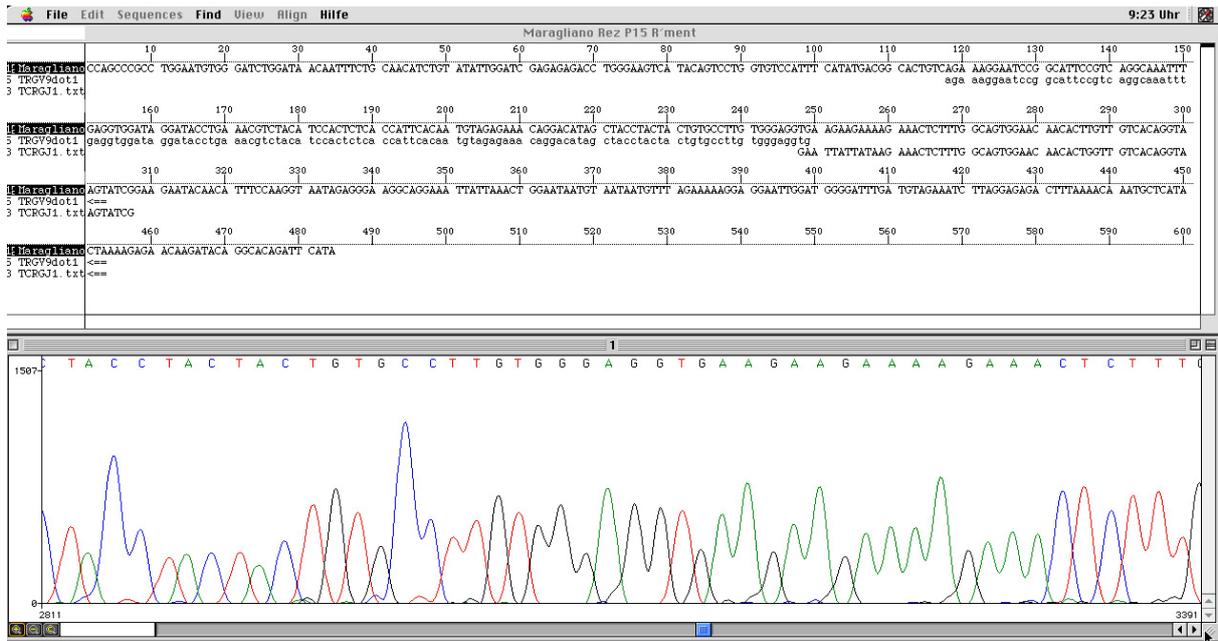


Abb. 6: Oberer Abschnitt: Sequenzanalyse eines monoklonalen Rearrangements: die patientenspezifische Sequenz (Zeile 1) im Alignment mit Keimbahnsequenzen.

Unterer Abschnitt: Elektropherogramm des junctionalen Abschnitts.

In der Gelabbildung (Abb.: 7) einer Rezidivprobe ist eine oligoklonale Bande vorhanden. Eine Sequenzierung oligoklonaler Banden ist nicht möglich; man erkennt in der Abbildung 8, wie es etwa in der Mitte des Elektropherogramms zu einem Abbruch kommt.

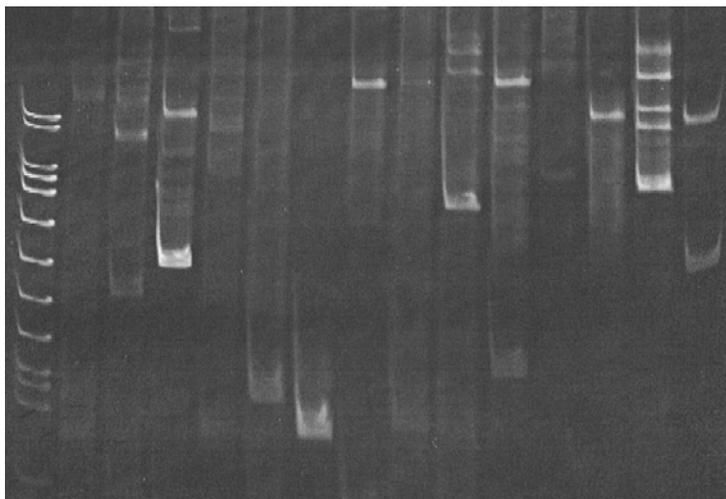


Abb. 7: Darstellung von Homo (HO) - und Heteroduplexbanden (HD) .

MM: Molekularmarker. VH1. HO: Homoduplex, bande, monoklonaler Marker. HD: Heteroduplex, oligoklonaler Marker. FR3: Marker aus der Gruppe der IgH. Vkl , intron: Marker aus der Gruppe der IgK. TG, VgI, VgII: Marker aus der Gruppe der TCRG.

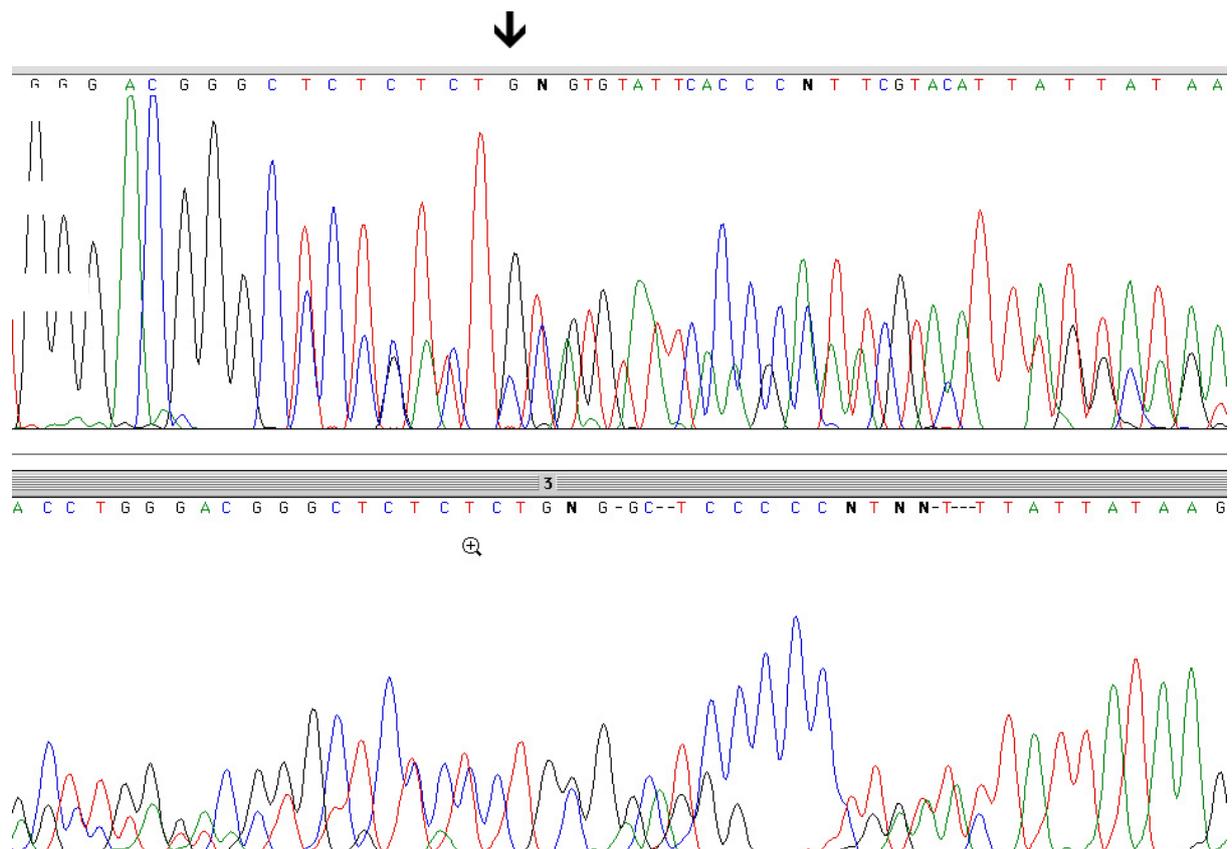


Abb. 8: Elektropherogramm eines biklonalen/ oligoklonalen Markers.

↓ : Abbruchstelle im Rearrangement. Eine Sequenzierung ist ab hier nicht mehr möglich.

4.2 Häufigkeitsverteilung von Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements

4.2.1 Häufigkeit von Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements bei Diagnose

Bei allen der insgesamt 30 Patienten lagen zum Zeitpunkt der Diagnose monoklonale Rearrangements vor (100%). So wurden insgesamt 102 Immunglobulin- und T-Zell Rezeptor- Genrearrangements identifiziert. Dabei waren die IgK- Marker mit einem Anteil von 15,3% (15/102), die TCRD- Marker mit 18,6% (19/102), die IgH- Rearrangements mit 26,5% (26/102) und der TCRG- Genlocus mit 41,2% (42/102) beteiligt (Abb.:9). Pro Patient sind dies durchschnittlich 3,4 Marker.

4.2.2 Häufigkeit von Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements zum Zeitpunkt des Rezidiv

Zum Rezidiv lagen bei den 30 Patienten insgesamt 90 Rearrangements vor. Hierbei waren die IgK-Rearrangements mit 12% (11/90), die TCRD- Marker mit 18% (17/90), die IgH- Marker mit 32% (26/90) und der TCRG- Genlocus mit 43% (36/90) vertreten (Abb.: 9). Dies ergibt durchschnittlich 3 Marker pro Patient.

4.2.3 Häufigkeit und Stabilität der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements zwischen Diagnose und Rezidiv

Von den 102 bei Diagnose erfassten klonalen Markern waren 72 (71%) beim Rezidiv unverändert. Die höchste Stabilität wurde in absteigender Reihenfolge für den TCRG- Marker mit 74% (31/42), den IgK- Marker mit 73% (11/15), gefolgt vom IgH- Marker mit 69% (18/26) und schließlich dem TCRD- Marker mit 63% (12/19) beobachtet (siehe Tabelle 11).

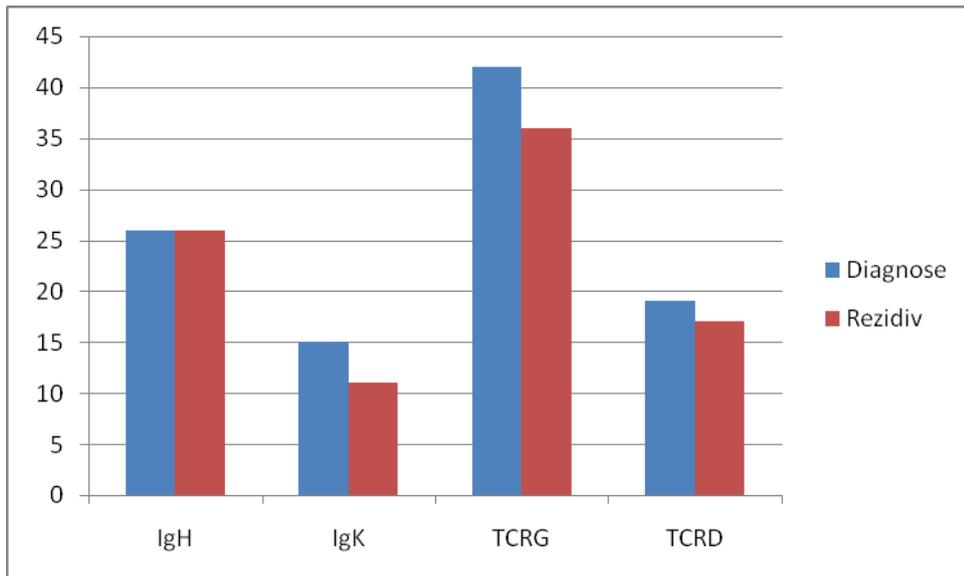


Abb. 9: Graphische Darstellung der Markerverteilung zum Zeitpunkt der Diagnose und zum Rezidiv.

	TCRD		TCRG		IgK		IgH	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Vorkommen von rearrangierten Ig/TCR Genloci (d.h. Anzahl der Rearrangements pro Genlocus und Patient)	18/30	60	20/30	67	13/30	43	22/30	73
Patienten mit zwei oder mehr Genrearrangements pro Genlocus	1/18	6	12/20	60	2/13	15	4/22	18
Patienten bei denen alle Rearrangements Erhalten geblieben sind	11/18	61	12/20	60	9/13	69	14/22	64
Patienten bei denen mindestens ein Rearrangement erhalten geblieben ist	11/18	61	17/20	85	9/13	69	17/22	77
Gesamtzahl der stabilen Rearrangements	12/19	63	31/42	74	11/15	73	18/26	69

Tabelle 11: Inzidenz, Stabilität und Veränderungen in TCRD-, TCRG-, IgK-Kde- und IgH-Rearrangements bei 30 Patienten mit pre B- ALL.

4.3 Markerveränderungen und Evolutionsmuster im Patientenkollektiv

4.3.1 Markerverlust

Bei 6 Patienten (20%) (Pat. Nr.: 1, 9, 10, 19, 25, 28) ist es im Verlauf der Behandlung zu einem Verlust von insgesamt 8 Markern gekommen (Tabellen 11 und 17): der IgH- Marker ist auch hierbei mit 37,5% (3/8) am häufigsten vertreten. Mit einem gleich hohem Anteil von 37,5% (3/8) ist der TCRD- Marker ebenfalls unter den verlorenen gegangenen Markern nachweisbar. Der IgK- und der TCRG- Genlocus sind in dieser Gruppe zu jeweils 12,5% (1/8) gleichhäufig vertreten.

4.3.2 Oligoklonale Marker

Von Veränderungen durch eine biklonale/ oligoklonale Entwicklung sind 7 Patienten (Pat. Nr.: 6, 8, 13, 14, 15, 24, 26) mit insgesamt 10 Markern betroffen. Wobei oligoklonale Entwicklungen sich bereits in der Gelelektrophorese als Doppelbanden darstellten, wohingegen biklonale Marker z.T. erst durch die Sequenzanalyse erfasst wurden. Die IgK- und IgH- Rearrangements sind dabei zu je 20% (2/10), die TCRG- und TCRD- Rearrangements zu je 30% (3/10) beteiligt.

Von oligoklonaler Entwicklung und Markerverlust sind alle 4 Genloci unterschiedlich häufig betroffen. Im TCRD- Genlocus ist es mit 33,3% (6/18) am häufigsten zu einem Verlust gekommen. In den IgH- und TCRG- Rearrangements ist dies gleichhäufig mit jeweils 27,7% (5/18) der Fall. Der Verlust von IgK- Rearrangements ist in dieser Arbeit mit 16,6% (3/18) am geringsten (Tabelle 12).

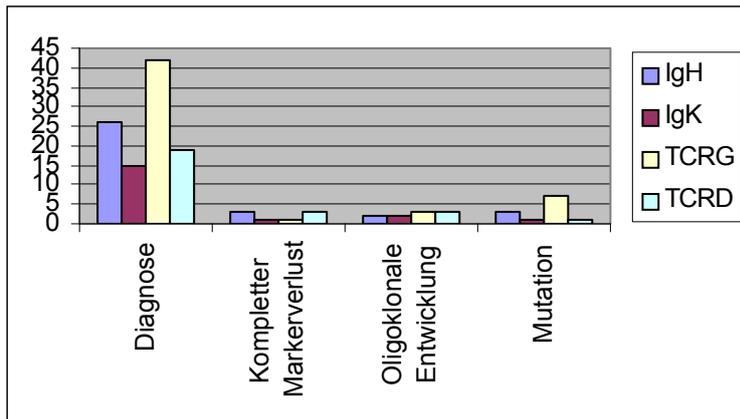


Abb. 10: Graphische Darstellung der Markerveränderungen.

4.3.3 Mutationen

Bei 12 Patienten (40%) (Pat. Nr.: 1, 2, 6, 7, 17, 18, 21, 24, 25, 26, 28, 30) ist es zu Basenveränderungen in insgesamt 12 Markern gekommen. Am häufigsten betroffen sind die TCRG- Marker mit 58,3% (7/12), gefolgt vom IgH- Genlocus mit 25% (3/12) und schließlich die IgK- und TCRD- Genloci mit jeweils gleich hohen Anteilen von 8,3% (1/12). Diese Rearrangements ließen sich in der Homo-Heteroduplexanalyse identisch zu ihrer Diagnoseprobe darstellen (Abbildungen 4 und 5) und erst die Sequenzanalyse zeigte die entsprechenden Veränderungen.

4.3.3.1 Lokalisation und Charakteristika der Basensequenzänderungen

Die Sequenzänderungen innerhalb der TCRG- Rearrangements (Pat. Nr.: 1, 2, 25, 26, 28, 30) betreffen das komplette Rearrangement (V γ -J γ - Abschnitte). Bei Patient Nr. 11 ist das gesamte IgH- Rearrangement verändert (VH, DH und JH), bei 2 Patienten (Nr.: 21, 24) ist in der D- Region eine Insertion von 3 Basen zuerkennen. Die einzige Basenveränderung am IgK- Genrearrangement (Pat. Nr.: 18) betrifft die V κ II-Region mit einem Basenaustausch. Die Sequenzveränderungen am TCRD- Marker (Pat. Nr. 17) sind ebenfalls an der D-Region nachweisbar. Es handelt sich dabei um einem Basenaustausch an zwei Positionen (siehe Tabelle 17: Sequenzierungen).

4.3.4 Neue Marker

Hinzugekommen sind 18 neue Marker: der IgH- Marker ist hierbei mit 44% (8/18) am häufigsten vertreten. Die TCRD- und TCRG- Rearrangements kommen in dieser Gruppe mit jeweils 28% (5/18) gleichhäufig vor. Unter den neuentstandenen Rearrangements waren keine IgK-Kde Rearrangements nachweisbar.

4.3.5 Anteil der verschiedenen Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements an der klonalen Evolution

Von Basenveränderungen, oligoklonaler Entwicklung und Markerverlust sind somit insgesamt 19 Patienten (63%) betroffen. Es ergibt sich in abnehmender Reihenfolge ein Anteil von 37% (11/30) für den TCRG- Genlocus, den IgH- Marker mit 27% (8/30), den TCRD- Genlocus mit 23% (7/30) und für den IgK- Genlocus mit 13% (4/30).

4.3.6 Häufigkeitsverteilung der klonalen Evolution im Patientenkollektiv

Von Veränderungen der TCRG- Marker sind 40% (8/20) der Kinder betroffen. Veränderungen der TCRD- Marker zeigen sich bei 39% (7/18) der Untersuchten. Klonale Evolution der IgH- Marker ist bei 36% (8/22) der Patienten nachweisbar und von Veränderungen der IgK- Marker sind 30% (4/13) der untersuchten Kinder betroffen (Tabelle 11,12,17).

Somit überwiegen diese Veränderungen der Rearrangements mit 30 Markern deutlich deren Zugewinn mit 18 Marker (Tabelle 15).

Auswertung und Ergebnisse

Patienten Nummer	Alter bei Diagnose	TCRD	TCRG	IgK-KDE	IgH	Verlust-Basenveränderung/ Gesamtzahl der R'ments bei Diagnose	Zunahme von R'ments bei Rezidiv
1	6	D1D2/id	D1D2D3/id, R3bv	D/-	0/0	1-1/6	0
2	7,5	D1/id	D1D2D3D4/id, R4bv	D/id	0/R1	0-1/6	1
3	11,5	D1/id	O/O	D1/id	D1/id	0-0/3	0
4	7,5	O/O	O/O	O/O	D1/id	0-0/1	0
5	4,5	D1/id	O/O	O/O	O/O	0-0/1	0
6	11,5	O/O	D1D2D3D4D5/id, R3bv,R5olig	O/O	O/O	1-1/5	0
7	8,5	D1/id	D1/R1bv	O/O	O/O	0-1/2	0
8	4,25	D1/id	o/o	D1/-	D1/id	1-1/3	0
9	6	D1/o	D1/D2/id	o/o	D1/o	2-0/4	1
10		0/0	0/R1	D1D2/id	D1/o	1-0/3	1
11	10,5	D1/id	D1D2/id	0/0	D1/R1oli+R2	0-1/4	1
12	12	D1/id	0/0	0/0	D1/id	0-0/2	0
13	5	D1/olig	D1/id	D1/id	D1/id D2/0	2-1/5	0
14	5	D1/O+R2	o/R1	0/0	D1/id	1-0/2	2
15	5	0/R1	D1/id	D1/id	D1/oligo	1-0/3	1
16	2,5	0/R1	D1/id	0/0	D1D2/id	0-0/3	1
17	1,25	D1/bv	0/0	0/0	D1/R1+R2	0-1/2	1
18	11	0/0	D1D2/id	D1/bv	D1/id	0-1/4	0
19	9	o/R1	D1/id+R2	0/0	D1/id D2/0	1-0/3	2
20	13,5	0/R1	D1D2/id	0/0	0/0	0-0/2	1
21	12,25	0/0	0/0	0/0	D1/id D2/bv	0-1/2	0
22	8,5	0/0	D1/id	D1/id	D1/id+R2	0-0/3	1
23	4	D1/id	0/R1	D1D2/id	D1/id	0-0/4	1
24	15	D1/0	D1D2/0	D1/id	D1/bv	3-1/5	0
25	8	D1/0	D1/bv	0/0	D1/id	1-1/3	0
26	11	D1/id	D1D2/id D3/bv	D1/0	0/0	1-1/5	0
27	8,5	D1/id	D1D2/id	D1/id	D1/id	0-0/5	0
28		D1/o	D1D2/id D3D4/Obv	0/0	0/0	2-1/5	0
29	8,5	0/0	D1/id	0/0	D1/id	0-0/2	0
30	12	0/0	D1/bv+R2	0/0	D1/id+R2	0-1/2	2

D1, D2 ; D3=bei Diagnose ist bzw. sind 1, 2, 3 Rearrangement aus dieser Gruppe vorhanden.

0/0 = Weder bei der Diagnose, noch beim Rezidiv vorhanden (Diagnose/Rezidiv).

0/R1= Bei der Diagnose noch nicht vorhanden, erst im Rezidiv neu aufgetreten.

D1/0= Das bei der Diagnose identifizierte Rearrangement ist im Rezidiv nicht mehr nachweisbar.

D1,D2/id= Die bei der Diagnose identifizierten Rearrangements liegen bei beim Rezidiv unverändert vor.

D1/id+R2= Das bei der Diagnose identifizierte Rearrangement ist im Rezidiv unverändert, zusätzlich ist im Rezidiv ein neues Rearrangement aus dieser Gruppe dazu gekommen.

Bv= Basenverlust/Punktmutation; Olig.= klonale Evolution.

Tabelle 12: Ig/TCR Genrearrangement Stabilitätsmuster bei 30 Kindern mit ALL zwischen Diagnose und Rezidiv.

4.4 Stabilitäten der untersuchten Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor- Rearrangements

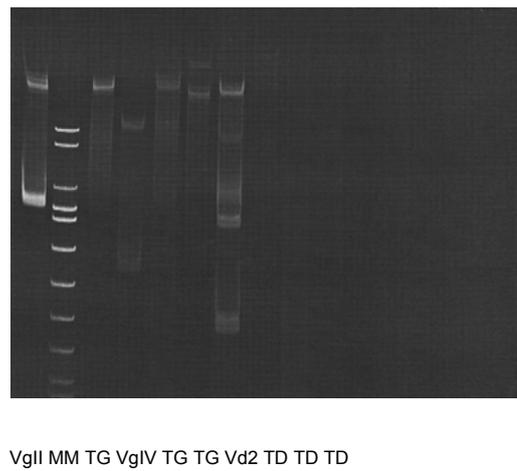
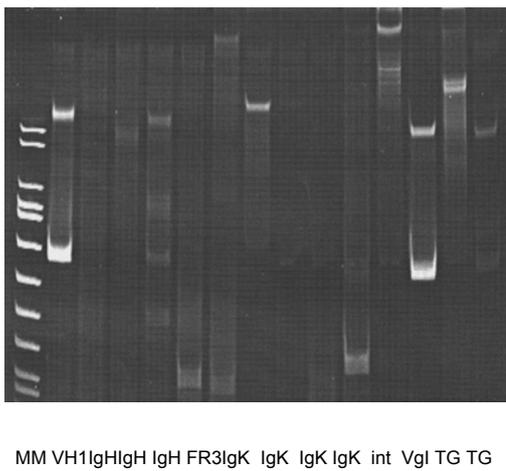
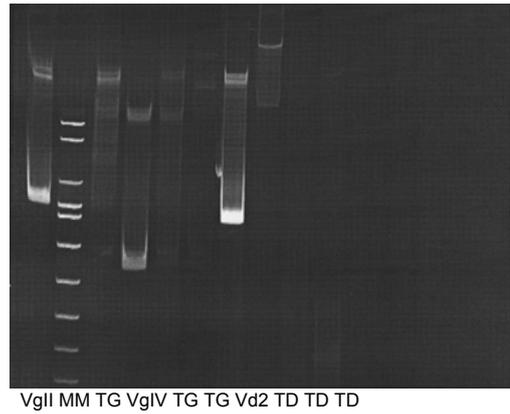
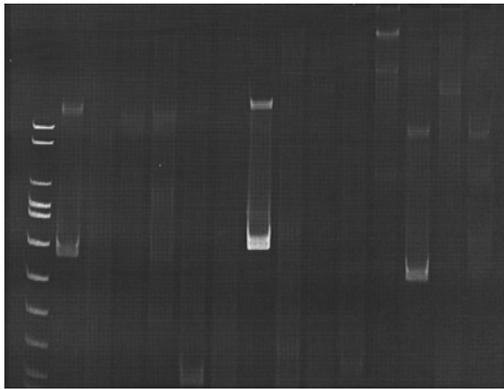


Abb.11: Diagnoseprobe (oberen 2 Gele) und Rezidivprobe (unteren Gele) eines Patienten:

MM: Molekularmarker. VH1 , FR3: Marker aus der Gruppe der IgH. Vkl , intron: Marker aus der Gruppe der IgK. TG, Vgl, VgII: Marker aus der Gruppe der TCRG. Vd2, TD: Marker aus der Gruppe der TCRD.

4.4.1 IgH- Rearrangements

Bei 22 von 30 Patienten (73 %) sind bei Diagnose klonale IgH Rearrangements nachweisbar. Bei 17 Patienten (77 %) ist beim Rezidiv mindestens ein stabiler Marker erhalten geblieben.

Die Veränderungen der IgH- Rearrangements sind größtenteils bedingt durch Verlust des IgH- Markers bei 4 Patienten (Nr. 9, 10, 13, 19).

Bei Patient Nr. 11 betrifft die Veränderung alle Abschnitte des Rearrangements VH-DH-JH. Bei den Patienten Nr. 21 und Nr. 24 sind jeweils die DH- Regionen durch Punktmutationen verändert. Von einer oligoklonalen Entwicklung des IgHs ist ein Patient (Nr. 15) betroffen.

4.4.2 IgK- Rearrangements

Bei 13 der 30 Patienten (43%) konnten bei Diagnose IgK- Rearrangements nachgewiesen werden. Zum Rezidiv war in 9 Fällen mindesten 1 IgK- Rearrangement erhalten (69%). Bei den Veränderungen handelt es sich bei Patient Nr. 26 um eine oligoklonale Entwicklung, bei Patient Nr. 18 um eine Punktmutation im Vk-Abschnitt, bei Patient Nr. 8 um eine klonale Entwicklung innerhalb des Kde-Abschnittes und bei Patient Nr. 1 um einen totalen Verlust des IgK- Markers.

4.4.3 TCRG- Rearrangements

Bei 20 der 30 Patienten (67%) konnten in den Diagnoseproben TCRG-Genrearrangements festgestellt werden. Bei 18 von ihnen (90 %) war mindestens 1 TCRG- Marker zum Rezidiv unverändert nachweisbar. Bei den stattgefundenen Veränderungen handelt es sich hier vor allem um Insertionen am 3'-Ende, downstream. Betroffen sind 6 Patienten (Nr. 1, 2, 25, 26, 28, 30). Bei Patient Nr. 28 ist es zu einem Verlust, bei den Patienten Nr. 6 und Nr. 24 zu einer oligoklonalen Entwicklung des TCRG- Rearrangements gekommen. Bei Diagnose lagen keine oligoklonalen TCRG- Rearrangements vor.

Gen	Probe	Marker	V-Region	D-Region	J-Region
TCR			CACCTGGG	AGGCGGAGG	ACCACTGGT
G	Diagnose	Vgl-5' Jg11/21-3'	AC	G	T
TCR			CACCTGGG	AGGC <u>C</u> GGAG	ACCACTGGT
G	Rezidiv	Vgl-5' Jg11/21-3'	AC	GG	T

Abb. 12: Sequenzdarstellung eines Marker bei Pat. Nr. 26. Zum Rezidiv Markerveränderung in Form einer Insertion in der D-Region.

4.4.4 TCRD- Rearrangements

Bei 18 der 30 untersuchten Patienten (60%) sind zum Zeitpunkt der Diagnose TCRD- Rearrangements vorhanden. Zum Rezidiv sind bei 11 Patienten (61%) die TCRD- Marker erhalten geblieben. Die Veränderungen der Marker sind hier zu jeweils gleichen Anteilen durch eine oligoklonale Entwicklung (Pat. Nr. 13, 14, 24) und durch totalen Verlust (Pat. Nr. 9, 25, 28) verursacht. Bei einem Patienten (Nr. 17) hat sich am 5'-Ende des Rearrangements und am Ende des D δ -Abschnittes ein Basenaustausch ereignet.

4.5 Markerstabilität innerhalb des Patientenkollektivs

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich eine insgesamt hohe Stabilität der untersuchten Marker bzw. der 4 Genloci. Zum Rezidiv ist bei allen untersuchten Patienten (100%) mindestens ein stabiler Marker vorhanden. Bei 73% (22/30) der Patienten sind mindestens zwei stabile Marker nachweisbar:

Bei 8 Patienten (Pat. Nr.: 4, 5, 14, 17, 21, 24, 25 und 30) ist ein stabiler Marker vorhanden. Bei 10 Patienten (Pat. Nr.: 8, 9, 10, 12, 15, 16, 19, 20, 28, 29) sind mindestens 2 stabile Marker nachweisbar. Bei weiteren 8 Patienten liegen mindestens 3 stabile Rearrangements vor (Pat. Nr.: 3, 6, 7, 11, 13, 18, 22, 26). Bei 4 Patienten sind sogar 4 (Pat. Nr.: 1 und 23) bzw. 5 (Pat. Nr.: 2 und 27) stabile Marker erkennbar.

Der am häufigsten nachgewiesene stabile Genloкус ist in dieser Arbeit mit 74% der TCRG- Genloкус. Dieser ist bei 20 von 30 Patienten (67%) als stabiler Marker vorhanden (Patienten Nr.: 1, 2, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30). Am zweithäufigsten ist der IgH- Genloкус vertreten: bei 17 von 30 Patienten (57%) ist mindestens ein stabiles IgH- Rearrangement nachweisbar (Patienten Nr.: 3, 4, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 25, 27, 29, 30). Bei 11 von 30 Patienten (37%) ist mindestens ein stabiles TCRD- Rearrangement (Patienten Nr.: 1, 2, 3, 5, 7, 8, 11, 12, 23, 26, 27) und bei 9 der 30 untersuchten (Patienten Nr.: 2, 3, 10, 13, 15, 22, 23, 24, 27) ist mindestens ein stabiles IgK- Rearrangement vorhanden.

Bei den Patienten mit nur einem stabilen Marker ist der IgH- Marker mit 75% am häufigsten nachweisbar (Patienten Nr.: 4, 14, 17, 21, 25, 30). Der TCRG- Genloкус ist innerhalb dieser Gruppe nicht vertreten.

4.5.1 Stabilität der Marker bei Patienten mit zweitem Rezidiv nach Stammzelltransplantation

Bei 2 der untersuchten Patienten (Patienten Nr.: 5 und 7) lagen insgesamt 3 Proben vor (Diagnoseprobe; Probe des 1. Rezidivs und eine Blastenprobe des 2. Rezidivs). Beim Patienten Nr. 5 war nur ein Rearrangement bei der Diagnose nachweisbar, dieses lag im 1. Rezidiv unverändert vor. Beim 2. Rezidiv war eine neu aufgetretene Basenveränderung zu sehen, diese lag jedoch am Ende der J-Region und hatte keinen Einfluss auf die Detektion des Markers beim Screening. Beim Patienten Nr.7 war das bei der Diagnose festgestellte Rearrangement im 1. Rezidiv um 2 Basen verändert, im 2. Rezidiv hingegen war es identisch zu dem der Diagnose. In beiden Fällen (Patienten Nr.: 5 und 7) handelte es sich um ein Rearrangement des TCRD-Genlokus.

	UPN	Erfasste Rearrangements bei Diagnose	Erfasste Rearrangements beim Rezidiv
1.	2346	IgK (Vkl-Kde)	Nicht mehr nachweisbar
		TCRG (Vgl-Jg1.1/2.1.1)	Basenveränderung
		TCRG (VgII-Jg1.3/2.3)	Stabil
		TCRG (VgIII-Jg1.3/2.3)	Stabil
		TCRD (Vd2-Jd1)	Stabil
		TCRD (Vd3-Jd1)	Stabil
2.	2119	kein IgH	Neues IgH (VH4-JHcons)
		IgK (Vkl-Kde)	Stabil
		TCRG: Vg1 (Vgl-Jg1.1/2.1)	Stabil
		Vg2	Stabil
		Vg5	Stabil
		Vg2	1 Basenveränderung
		TCRD (Vd2-Dd3)	Stabil
3.	2056	IgH (VH3-Jhcons)	Stabil
		IgK (Vkl-Kde)	Stabil
		TCRD (Vd2-Dd3)	Stabil
4.	2295	IgH (VH3-JHcons)	Stabil
5.	2130	TCRD (Vd1-Jd1)	Stabil
6.	2043	TCRG (Vgl-Jg1.1/2.1)	Stabil
		TCRG (Vgl-Jg1.3/2.1): Vg1	Stabil
		Vg2	Stabil
		Vg5	Stabil
		Vg7	1 Basenveränderung
		TCRD (Vd2-Dd3)	Stabil
7.	2298	TCRG (Vgl-Jg1.3/2.3)	1Rez: polyklonal; 2. Rezidiv: identisch zur Diagnose
		kein Vg2	1.Rez: neues Vg2 im 2. Rez: stabil
		kein Vg4	1.Rez: neues Vg4 im 2. Rez: stabil
		kein Vg7	1.Rez: neues Vg7 im 2. Rez: nicht mehr nachweisbar
		TCRD (Dd2-Jd1)	1.Rez: basenverändert; im 2. Rez: identisch zur Diag.
8.	2445	IgH (VH1/7-Jhcons)	Stabil
		IgK (Vkl-Kde)	D Region komplett verändert
		TCRD (Vd2-Dd3)	Stabil
9.	2478	IgH (VH2-JHcons)	nicht mehr nachweisbar
		kein IgH	Neues IgH (VH3-JHcons)
		TCRG (Vgl-Jg1.3/2.3)	Stabil
		TCRG (VgII-Jg1.3/2.3)	Stabil
		TCRD (VD2-Dd3)	nicht mehr nachweisbar

10.	1756	IgH (VH3-Jhcons)	nicht mehr nachweisbar
		IgK (VklII-Kde)	Stabil
		IgK (VklIV-Kde)	Stabil
		kein TCRG nachweisbar	Neues TCRG (Vgl- Jg1.1/2.1)
11.	1829	IgH oligoklonal	Neues IgH (VH3-JH cons)
		IgH (VH4- JH cons)	veränderte JH3 Region
		TCRG (Vgl- Jg1.3/2.3)	Stabil
		TCRG (VgII- Jg1.1/2.1)	Stabil
		TCRD (Vd2-Dd3)	Stabil
12.	1965	IgH (VH1/7-JH cons)	Stabil
		TCRD (Vd2-Dd3)	Stabil
13.	2231	IgH (VH2-JH cons)	biklonale Entwicklung: JH3 und JH4
		IgH (VH3-JH cons)	Stabil
		IgK (VklII-Kde)	Stabil
		TCRG (VgII-Jg1.3/2.3)	Stabil
		TCRD (Vd2-Dd3)	biklonale Entwicklung
14.	2451	IgH (VH1/7-JH cons)	Stabil
		kein TCRG	Neues TCRG (VgII-Jg1.1/2.1)
		TCRD oligoklonal	Neues TCRD (Vd2-Dd3)
		TCRD (Dd2-Dd3)	oligoklonale Entwicklung
15.	2217	IgH (VH2-JH cons)	oligoklonale Evolution
		IgK (Vkl-Kde)	Stabil
		TCRG (Vgl-Jg1.1/2.1)	Stabil
		kein TCRD	Neues TCRD (Vd1-Jd1)
16.	1282	IgH (VH3-JH cons)	Stabil
		IgH (VH4-JH cons)	Klonale Evolution nur JH2 stabil
		TCRG (Vgl-Jg1.3/2.3)	Stabil
		kein TCRD	Neues TCRD (Dd2-Dd3)
17.	1776	IgH (VH4-Jhcons): JH6	stabil und zusätzlich: neues JH3
		TCRD (Dd2-Dd3)	verändert : 2 Punktmutationen
18.	1820	IgH (VH3-JH cons)	Stabil
		IgK (VklII-Kde)	ein Basenunterschied in V
		TCRG (Vgl-Jg1.3/2.3)	Stabil
		TCRG (VgII-Jg1.3/2.3)	Stabil
19.	1793	IgH (VH3-JH cons)	Stabil
		IgH (VH4-JH cons)	nicht mehr nachweisbar
		TCRG (Vgl-Jg1.3/2.3)	Stabil
		kein TCRG	Neues TCRG (VgII-Jg1.1/2.1)
		kein TCRD	Neues TCRD (Vd2-Dd3)
20.	2613	TCRG (Vgl-Jg1.1/2.1)	Stabil
		TCRG (Vgl-Jg1.3/2.3)	Stabil
		kein TCRD	Neues TCRD (Dd2-Dd3)

21.	2560	IgH (VH1-JH cons)	stabil
		IgH (VH4-JH cons)	Ein Basenunterschied
22.	2114	IgH (VH3-JH cons)	Stabil
		kein IgH	Neues IgH (VH4-JH cons)
		IgK (VklI-Kde)	Stabil
		TVRG (Vgl-Jg1.1/2.1)	Stabil
23.	2194	IgH (VH3-JH cons)	Stabil
		IgK (Vkl-Kde)	Stabil
		IgK (VklI-Kde)	Stabil
		kein TCRG	Neues TCRG (VgII-Jg1.1/2.1)
		TCRD (Vd2-Dd3)	Stabil
24.	2760	IgH (VH 1-JH cons)	Insertion
		IgK (VklII-Kde)	Stabil
		TCRG (Vgl-Jg1.1/2.1)	oligoklonale Evolution
		TCRG (Vgl-Jg1.3/2.3)	oligoklonale Evolution
		TCRD (Vd2-Dd3)	oligoklonale Evolution
25.	2743	IgH (VH3-JH cons)	Stabil
		TCRG (VgIV-Jg1.3/2.3)	Insertion
		TCRD (Dd2-Dd3)	Kein Marker mehr nachweisbar
26.	2688	IgK (VKI-Kde)	oligoklonale Entwicklung
		TCRG (Vgl-Jg1.1/2.1)	Eine Baseninsertion
		TCRG (VgII-Jg1.3/2.3)	Stabil
		TCRG (VgIV-Jg1.1/2.1)	Stabil
		TCRD (Vd2-Dd3)	Stabil
27.	2413	IgH (VH3-JH cons)	Stabil
		IgK (Vkl-Kde)	Stabil
		TCRG (Vgl-Jg1.3/2.3)	Stabil
		TCRG (VgII-Jg1.3/2.3)	Stabil
		TCRD (Vd2-Dd3)	Stabil
28.	2788	TCRG (Vgl-Jg1.3/2.3): Vg 2	Stabil
		Vg 4	Stabil
		TCRG (VgII-Jg1.1/2.1)	Basenveränderung in der D Region
		TCRG (VgIII-Jg1.3/2.3)	nicht mehr nachweisbar
		TCRD (Vd2-Dd3)	nicht mehr nachweisbar
29.	2266	IgH (VH4-JH cons)	Stabil
		TCRG (Vgl-Jg1.3/2.3)	Stabil
30.	2890	IgH (VH1/7-JH cons)	Stabil
		kein IgH	Neues IgH (VH3-JH cons)
		kein TCRG	Neues TCRG (Vgl-Jg1.3/2.3)
		TCRG (VgII-Jg1.3/2.3)	Basenverlust

Tabelle 13: Übersicht über die patientenspezifischen Rearrangements bei Diagnose und Rezidiv.

4.5.2 Stabilitäten einfach- und mehrfach- rearrangierter Marker eines Genlocus

Beim Vergleich der Stabilität zwischen einzeln- und mehrfach- rearrangierten Marker eines Genlocus zeigen sich geringe Unterschiede.

Die Stabilität insgesamt ist jedoch in beiden Gruppen sehr groß. Bei den TCRD- und den IgK- Genloci errechnet sich bei Vorliegen von mindestens 2 Markern pro Genlocus eine Stabilität von jeweils 100%, ihre Anzahl ist jedoch zu niedrig und eine zuverlässige Aussage machen zu können. Es zeigt sich aber, dass bei 20 von 21 (95%) mehrfach- rearrangierten Ig/TCR Genloci mindestens ein Marker pro Genlocus stabil erhalten ist (Tabelle 14). Aus der Tabelle 14 ist auch ersichtlich, dass Patienten mit einzeln- rearrangierten Markern der TCRG- und IgH-Loci gegenüber Patienten mit mehrfach-rearrangierten IgH- und TCRG-Genloci eine deutlich höhere Stabilität aufweisen.

	TCRD		TCRG		IGK		IGH	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Stabilität bei nur einem erfassten Rearrangement pro Genlocus	11/17	65	6/8	75	7/11	64	13/22	59
Stabilität bei zwei oder mehr erfassten Rearrangements pro Genlocus	1/1	100	6/12	50	2/2	100	1/4	25
Stabilität von mindestens einem Rearrangements bei ursprünglich mindestens zwei Rearrangements	1/1	100	11/12	91,6	2/2	100	4/4	100

Tabelle 14: Verhältnis zwischen der Erfassung von mehr als einem klonalen PCR Produkt pro Ig/TCR Genlocus und klonaler Evolution.

4.6 Veränderungen im Markerprofil

In Tabelle 15 sind die Veränderungen des Markerprofils zusammengefasst. IgH- und TCRG- Marker zeigen, trotz höherem Anteil an klonaler Evolution, höhere Stabilitäten unter Erhalt mindestens eines Markers auf. Eine Veränderung im IgK- und im TCRD- Genlocus ist mit einem Verlust aller Marker im Rezidiv verbunden, eine Veränderung im IgH- Locus geht mit einer Markerzunahme einher.

Gesamtzahl der Patienten mit Markern des Genlocus:	TCRD (n=18)	TCRG (n=20)	IgK (n=13)	IgH (n=22)
Patienten mit verändertem Markerprofil	7	8	4	8
Patienten mit Rearrangementverlust, bei erhaltener Stabilität von mindestens einem Rearrangement	–	4	–	4
Patienten mit Rearrangementzunahme, bei erhaltener Stabilität der restlichen Rearrangements	–	1	–	4
Patienten mit Verlust und Zunahme von Rearrangements bei erhaltener Stabilität der restlichen Rearrangements	–	–	–	1
Patienten mit neuen, bei Diagnose nicht erfassten Rearrangements	5	5	–	7
Patienten mit Verlust aller Rearrangements	7	3	4	4
Patienten mit totalem Verlust und Zunahme von Rearrangements, wovon keines beim Rezidiv erhalten ist	1	1	–	1

Tabelle 15: Vergleich des klonalen Evolutionsmusters der Ig/TCR Genrearrangements zwischen Diagnose und Rezidiv bei pre-B- ALL Patienten.

4.7 Patienten mit vollständig erhaltenem Markerprofil

Bei 11 Patienten (37%) sind alle erfassten Rearrangements erhalten geblieben. Bei 4 dieser Kinder sind zudem neue Marker nachweisbar. Dabei könnte es sich um die Entwicklung von Subklonen handeln, die bei Diagnose noch nicht ausgebildet und somit noch nicht detektierbar waren.

4.8 Patienten mit vollständig erhaltenem Markerset pro Genlokus

Bei 69% (9/13) der Patienten sind alle zum Zeitpunkt der Diagnose erfassten IgK-Marker erhalten geblieben. Bei 64% (14/22) Patienten konnten alle IgH-Marker identifiziert werden. Bei 61% (11/18) der untersuchten waren alle TCRD-Marker nachweisbar. In 60% (12/20) der Fälle konnte alle TCRG-Marker detektiert werden (Tabelle 12).

4.9 Stabilität von mindestens der Hälfte der Marker beim Rezidiv

Bei 15 von 30 Patienten (50%) ist mindestens die Hälfte der Marker erhalten geblieben. 9 dieser 15 Patienten (60%) zeigen zudem einen Zugewinn von einem oder zwei Ig/TCR- Genrearrangements. Bei diesen 9 Patienten besteht trotz des Markerzugewinns ein Zusammenhang zwischen den Leukämien bei Diagnose und Rezidiv.

4.10 Verlust der Mehrzahl der Rearrangements, bei gleichzeitigem Erhalt von mindestens einem Marker

Bei 7 Patienten (23%) (Pat. Nr.: 14, 17, 21, 24, 25, 28, 30) ist es zu einem Verlust der Mehrzahl der Rearrangements gekommen. Bei gleichzeitigem Erhalt von mindestens einem Marker (Tabellen 12, 13, 17). Etwa 1/3 der bei Diagnose erfassten Marker blieben beim Rezidiv erhalten (Reduktion von im Durchschnitt 3 auf 1,1

Rearrangements pro Patient). Bei einem Patienten (Pat. Nr. 24) sind von dem Verlust 3 Genloci betroffen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein innerhalb des Klons fortwährender Rearrangementprozess oder die Ausbildung von Subklonen ohne bestimmtes Ig/TCR- Genrearrangement sein.

Pro Genlokus zeigte sich mindestens 1 Marker als unverändert innerhalb der TCRD Marker bei 61% (11/18), der IgK- Marker bei 69% (9/13), der IgH- Marker bei 77% (17/22) und der TCRG- Marker bei 85% (17/20) der Kinder (Tabelle 11).

4.11 Verlust aller Immunglobulin-/ T- Zell- Rezeptor- Rearrangements beim Rezidiv

Bei keinem der untersuchten Patienten ist es zu einem kompletten Verlust aller Marker gekommen.

Patient	Basenveränderung	Markerverlust
1	TCRG	IgK
2	TCRG	-
6	TCRG	TCRG
8	-	IgK
9	-	TCRD, IgH
10	-	IgH
11	IgH	-
13	-	IgH, TCRD
14	-	TCRD
15	-	IgH
17	TCRD	-
18	IgK	-
19	-	IgH
21	IgH	-
24	IgH	2 TCRG, TCRD
25	TCRG	TCRD
26	TCRG	IgK
28	TCRG	TCRG, TCRD
30	TCRG	-

Tabelle 16: Verteilung des Markerverlustes.

4.12 Stabilität der oligoklonalen Rearrangements

Bei 2 Patienten (Pat. Nr.: 11, 15) war in der Diagnoseprobe jeweils ein oligoklonaler Marker (IgH und TCRG) nachweisbar. Diese haben sich zum Rezidiv in einen monoklonalen Marker entwickelt. Dabei könnte es sich um eine während der Therapie stattgefundene Selektion handeln.

5 Diskussion

5.1 Bedeutung der kontinuierlichen MRD- Messung zur Einteilung in Risikogruppen und zur Rezidiverkennung

Fortlaufende Analysen zeigten, dass mehr als 70% der Patienten, unmittelbar nach Beendigung der Induktionstherapie MRD positiv waren und es innerhalb der ersten 6 Monate zu einer Abnahme der MRD gekommen ist [93, 94].

Prospektive MRD Studien bestätigen, dass die Wahrscheinlichkeit des auf lange Zeit rezidivfreien Überlebens direkt proportional zum MRD- Niveau der frühen Behandlungsphase [17, 22, 25, 36, 55, 96] und auch zum MRD- Niveau späterer Zeitpunkte [17, 25] ist. Bei einer semiquantitativen MRD- Studie mit 246 ALL- Patienten zeigte die multivariante Analyse, dass eine PCR- Messung von $> 10^{-2}$ verbliebenen Blasten, am Ende einer intensiven Induktionstherapie, der stärkste unabhängige Rezidivanzeiger ist [17]. Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten zeigten, dass MRD- Lasten von $> 10^{-3}$ mit einem signifikant höheren Rezidivrisiko assoziiert waren. Eine weitere MRD- Studie mit 240 an ALL erkrankten Kindern differenzierte, durch Kombination semiquantitativer MRD Informationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, 3 Risikogruppen: eine Standard- Risikogruppe (low-risk) 43% mit einer 3 Jahres Rezidivrate von 2%, eine Mittlere- Risikogruppe (intermediate-risk) 43% mit einer Rezidivrate von 23% und eine Hoch- Risikogruppe (high-risk) 15% mit einer 75% gen Rezidivrate [34, 96]. Weitere Studien haben ergänzend die Signifikanz der fortlaufenden quantitativen MRD- Messung bestätigt, auf deren Basis selbst bei Kindern ohne nachweisbarem MRD, bei dessen Wiederauftreten, eine Rezidivvoraussage gemacht werden kann [17, 44].

Mehrere prospektive Studien haben den hohen prognostischen Wert der MRD- Lastquantifizierung, nach Beendigung der Induktionstherapie, bei neudiagnostiziertem ALL demonstriert [96, 97, 98]. Diese sensitive Bewertung des Ansprechens auf die Behandlung mit cytotoxischen Medikamenten,

ermöglicht nicht nur die Identifizierung der Patienten mit hohem Rezidivrisiko, sondern auch die Identifizierung der Patienten mit niedrigem Rezidivrisiko und einem dementsprechendem EFS von mehr als 95%.

Die Bedeutung der kontinuierlichen und regelmäßigen MRD- Messung wird durch die Tatsache bestärkt, dass leukämische Klone über 10 Jahre lang ruhen und sich erst dann zu einem Rezidiv entwickeln können. In einer Studie kam es bei 8 von 12 Kindern nach mehr als 10 Jahren, nach diagnostizierter ALL, zu einem Rezidiv. Dabei waren die beim Rezidiv erfassten Ig- und TCR-Rearrangements dieselben wie zum Zeitpunkt der Diagnose [33].

5.2 Bedeutung der MRD- Messungen vor und nach einer Stammzelltransplantation

Die Transplantation stellt für viele Hochrisikopatienten die einzige Therapiemöglichkeit dar. Mit zunehmender Zahl der Rezidive verringert sich der Erfolg dieser Behandlung. Zudem kommt, dass ein aufgetretenes, klinisches Rezidiv nach Transplantation kaum noch zu behandeln ist. Bei rechtzeitiger Intervention kann durch das Absetzen von CSA oder die Gabe von Donorlymphozyten-Infusion (DLI) versucht werden, ein Rezidiv immunologisch zu verhindern [122]. Jedoch sind diese Interventionen nicht ausreichend. Gerade in diesem Zusammenhang kann die MRD Diagnostik nach erfolgter Transplantation von entscheidender Bedeutung sein.

Eine MRD- Untersuchung 64 an ALL erkrankter Kinder und Erwachsener zeigte, dass jedes vor Transplantation messbare MRD- Niveau mit einem 2 jährigen ereignisfreien Überleben (EFS) von 17% verbunden war. Dem stand ein Prozentsatz von 73% ohne nachweisbare Resterkrankung gegenüber [31]. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Untersuchungsgruppe mit 30 ALL- Patienten [32]. Ebenso korrelierte die Erfassung von MRD nach erfolgter SCT mit einer erhöhten Rezidivrate. In einer Studie mit 71 Kindern zeigte sich, dass diejenigen, die während der ersten 3 Monate nach SCT MRD positiv waren, im

Gegensatz zu denen mit negativem MRD, ein 9 Mal höheres Rezidivrisiko enthielten [21].

5.3 Stabilitätsrangordnung

Wie in einigen vorherigen Arbeiten, als auch dieser Arbeit untersucht wurde, können die Ig-/TCR- Rearrangements aufgrund ihrer Stabilität und bei entsprechender Kombination, als sensitive Marker eines Rezidivs benützt werden. In dieser Arbeit konnte bei 30 Patienten gezeigt werden, dass die Marker, die bei der Erstmanifestation der ALL erfasst wurden, selbst bei Rezidiven nach einer Stammzelltransplantation unverändert nachweisbar sind. Bei den 30 Patienten wurden zum Zeitpunkt der Diagnose insgesamt 102 monoklonale Marker erfasst. Im Durchschnitt waren dies 3,4 Marker pro Patient. Von diesen Rearrangements konnten 72 (71%) unverändert zum Rezidiv identifiziert werden. Alle untersuchten Patienten enthielten mindestens einen stabilen Marker (100%).

Die am häufigsten erfassten Genloci in dieser Arbeit waren der TCRG- Genlocus mit 74% und der IgK- Locus mit 73%. Auch in der Arbeit von Guggemos und Eckert, in der die Ig-/TCR- Rearrangements von 49 Patienten zwischen erstem und zweitem Rezidiv verglichen wurden, waren die Ergebnisse sehr ähnlich. Von den 149 erfassten Markern (3 Marker pro Patient), waren 109 (73%) unverändert, mit der höchsten Stabilität für den TCRG- Genlocus mit 76% und den IgH- Genlocus mit 75% [5]. Die Arbeit von Szczepanski, in der die Rearrangements von 91 Patienten zwischen Diagnose und erstem Rezidiv untersucht wurden, zeigte der IgK- Genlocus die höchste Stabilität mit 90%, gefolgt vom TCRG- Locus mit 75%. Hier waren von den 362 Markern 256 (71%) erhalten geblieben [1].

Niedrigere Stabilitäten in dieser Untersuchung zeigte der TCRD- Marker mit 63% und der IgH- Marker mit 69%. Auch hierin sind die Ergebnisse mit denen von Szczepanski et al. und Guggemos et al. vergleichbar [1, 5]. Bei

Szczepanski et al. weisen der TRCD- Lokus mit 63% und IgH- Genlokus mit 64% ebenfalls die niedrigeren Stabilitäten auf.

5.4 Entwicklung von Subklonpopulationen

In dieser Arbeit übertrifft der Zugewinn an Markern deren Verlust. Insgesamt sind 18 Rearrangements neu aufgetreten. Innerhalb dieser ist das IgH mit (8/18): 44% am häufigsten, die TCRD- und TCRG- Rearrangements mit je 28% (jeweils 5/18) vertreten. IgK- Rearrangements waren nicht nachweisbar. Dieser Zugewinn an Markern spricht für einen kontinuierlichen Entwicklungsprozess der Rearrangements. Es kann sich hierbei um ehemalige Subklonpopulationen handeln, die sich nun im Verlauf ausgebildet haben.

5.5 Markerverlust

Von den erfassten 102 Markern ist es lediglich bei 6 Patienten (20%) zu einem Verlust von insgesamt 8 Rearrangements gekommen. Dies betrifft v.a. die Marker mit geringerer Stabilität: die IgH- und TCRD- Genrearrangements mit jeweils gleich hohen Anteilen von 37,5% (3/8). Die IgK- und TCRG- Genloci sind davon zu jeweils 12,5% (1/8) betroffen.

Der geringe Anteil an IgK- Genrearrangements innerhalb dieser, wie auch in der Gruppe der Subpopulationen ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei den IgK- Rearrangements um „Endzustandrearrangements“ handelt und daher keine weiteren Entwicklungsprozesse mehr möglich sind [102, 103]. Daraus erklärt sich deren insgesamt hohe Stabilität. Der Verlust aller IgK- Marker bei einem Patienten spricht für eine erfolgreiche Erradikation des leukämischen Klons mit IgK- Kde- Rearrangement.

5.6 Häufigkeit und Vergleich der klonalen Evolutionen

Von einer klonalen Evolution der Marker sind in dieser Arbeit insgesamt 63% (19/30) Patienten betroffen. Die klonale Entwicklung zeigt sich bei 6 Patienten als Markerverlust (8 Marker), bei 7 Patienten als bi-/oligoklonale Entwicklung (10 Marker) und bei 6 Patienten als Basenveränderungen (12 Marker) in Form von Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen. Dies betraf bei Guggemos 75% der Patienten (36 von 48). Es wurde postuliert, dass das Vorhandensein mehrfach rearrangierter Marker eines Genlokus mit einem höheren Risiko für eine klonale Evolution einhergeht. Auch wurde ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit klonaler Evolutionen mit der Länge der Remissionsdauer beobachtet. 41% der Patienten (15/36) mit veränderten Marker hatten ein spätes Rezidiv. Wohingegen Patienten mit kurzer Remissionsdauer zu 16% vertreten waren (6/36). Diese Werte waren jedoch nicht signifikant [5]. Szczepanski et al. konnte diese Aussagen widerlegen. Er konnte zeigen, dass die MRD- Stabilität weder mit dem Alter, dem Geschlecht, noch mit der Zellzahl oder der Remissionsdauer korreliert [1].

5.7 Reduktion des Risikos falsch-negativer Ergebnisse

Nach Szczepanski et al. ist der stärkste Prediktor einer klonalen Evolution während der ALL Therapie die Unterscheidung der monoklonalen Marker von den oligoklonalen Markern zum Zeitpunkt der Diagnose. Auf diese Weise können die Faktoren, die mit dem Auftreten klonaler Evolutionen, und dem damit erhöhten Risiko eines falsch-negativen MRD Ergebnisses identifiziert werden. Szczepanski et al. unterscheidet in seiner Arbeit zwischen der Stabilität von monoklonalen Markern, die zu 89% erhalten geblieben sind und den oligoklonalen Rearrangements, von denen noch 40 % erfassbar waren und empfiehlt zur MRD- Erfassung ausschließlich die Verwendung monoklonaler Marker. In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich monoklonale Marker berücksichtigt, zumal in den untersuchten Diagnoseproben nur 2 oligoklonale

Marker (IgH, TCRG) bei 2 Patienten (6,6%) vorlagen. Beide entwickelten sich zum Rezidiv in monoklonale Rearrangements. Es könnte sich dabei um eine während der Therapie stattgefundene Selektion handeln.

5.8 Stabilitätsverteilung innerhalb des Patientenkollektivs

Trotz klonaler Evolution sind bei 37% (11/30) der Patienten alle Rearrangements zum Rezidiv unverändert erhalten. Bei Szczepanski et al. ist dies bei 38% der Patienten der Fall. In dem Patientenkollektiv bei Guggemos et al. sogar bei 52% der Untersuchten. Bei 50% (15/30) der Patienten ist mindestens die Hälfte der Marker erhalten (2,4 Marker pro Patient). 23 % der untersuchten haben die Mehrzahl ihrer Marker verloren, bei gleichzeitigem Erhalt mindestens eines stabilen Markers. In der Gruppe der Patienten mit nur einem erhaltenen Marker ist der IgH- Locus mit 75% am häufigsten nachweisbar. Der TCRG- Genlocus ist hier, vermutlich aufgrund der begrenzten Kombinationsvielfalt, nicht vertreten. In den Arbeiten von Guggemos et al. und Szczepanski et al. konnte dies nicht beobachtet werden. In der Untersuchung von Guggemos et al. war die Mehrzahl der Rearrangements bei 40% der Patienten erhalten geblieben. Bei 92% der Patienten war mindestens ein stabiler Marker feststellbar, bei Szczepanski et al. war dies bei 95% der Untersuchten der Fall und in der vorliegenden Arbeit bei allen 30 Patienten (100%). Zu einem kompletten Verlust aller Marker kam es bei Guggemos et al. in 8% (4 /49) der Patienten, bei Szczepanski et al. bei 6% der Patienten (6/96) [1, 5]. In dieser Arbeit konnte bei keinem der Untersuchten ein kompletter Verlust beobachtet werden.

5.9 Vergleich des Evolutionsmusters innerhalb der verschiedenen Arbeiten

5.9.1 Monoklonaler IgH- Genloкус

Die in dieser Arbeit innerhalb des IgH- Genrearrangements beobachteten Veränderungen sind v.a. durch einen kompletten Verlust der Marker und Insertionen in allen Rearrangementabschnitten (VH-DH-JH) gekennzeichnet. Eine oligoklonale Entwicklung erfolgte bei einem Marker. Bei 2 Patienten sind die DH- Regionen durch eine Punktmutation verändert.

Szczepanski et al. konnte in seiner Arbeit eine höhere Stabilität innerhalb der kompletten VH-JH- Rearrangements mit 69%, als in der Gruppe der inkompletten DH-JH- Marker (43%) beobachten. In 12 Patienten konnten die IgH- Marker mittels PCR nicht mehr nachgewiesen werden. Eine zusätzliche Southern Blot-Untersuchung zeigte jedoch dass es sich bei 9 Patienten um identische Marker handelte. Bei weiteren 3 Patienten war es zu einer Deletion in der JH- Region gekommen. Diese 15 Patienten wurden für die IgH- Stabilitätsmessung nicht berücksichtigt. Insgesamt ist es bei Szczepanski et al. zu einem Verlust von 62 IgH- Markern bei 36 Patienten gekommen. Bei 8 Patienten mit monoklonalen Markern und bei 26 Patienten mit oligoklonalen Markern ist das genaue Evolutionsmuster erfassbar. In 7 Patienten (2 mono-, 5 oligoklonal) waren die Marker im Southern- Blot identisch. Jedoch zeigte die PCR- Untersuchung den Verlust eines Markers an. Vermutlich handelt es sich dabei um einen kleinen Subklon. Bei 3 Patienten waren die monoklonalen Marker verändert, jedoch zeigte der Sequenzvergleich ein VH- Replacement mit erhaltenen VH-N-DH-N-JH Verbindungen. Bei 2 Patienten konnte eine klonale Regression eines Markers in die Germlinekonfiguration beobachtet werden. Bei 2 Patienten waren die IgH- Marker durch 2 unabhängige Marker ersetzt worden. Dies spricht für eine Zweiterkrankung [1]. Bei den hier untersuchten 30 Patienten konnte dies nicht beobachtet werden.

5.9.2 Oligoklonaler IgH- Genloкус

Bei der Untersuchung der oligoklonalen IgH- Marker stellte Szczepanski et al. bei 11 Patienten eine monoklonale Entwicklung fest. Dies spricht für eine klonale Selektion unter der Behandlung. Bei weiteren 10 Patienten mit oligoklonalen Markern wurde die Oligoklonalität zum größten Teil beibehalten, bei einigen kam es zum Verlust des Rearrangements bzw. zum Auftreten neuer Subklone. Der Sequenzvergleich bei 12 Patienten mit oligoklonalen Markern zeigte eine weiterführende VH zu DH-JH- Bindungen mit Erhalt des häufigen DH-JH- Stamms in 5 Patienten und mögliche sekundäre Rearrangements in 5 weiteren Fällen an. Bei den anderen 2 Patienten waren die IgH- Sequenzen unverwandt und deuten auf die Ausbildung aus einem Progenitor zu einem unabhängigen sekundären Rearrangements hin [1].

5.9.3 IgK- Genloкус

In der Gruppe der IgK- Genrearrangements ist mindestens 1 Marker in 69% der Untersuchten stabil erhalten. Bei Szczepanski et al. ist dies in 93% der Patienten der Fall. Bei 4 Patienten wurden Veränderungen in Form einer klonalen Entwicklung, einer Punktmutation im Vk- Abschnitt, einer oligoklonalen Entwicklung und eines Verlusts des IgK- Markers erfasst. Bei Szczepanski et al. wurden insgesamt 60 IgK- Marker zum Zeitpunkt der Diagnose erfasst. Davon waren 55 monoklonal. Diese sind zu 95% (52/55) unverändert erhalten geblieben. Bei den oligoklonalen Markern sind 2 erhalten und bei 3 ist es zu deren Verlust gekommen. Szczepanski et al. konnte in seiner Arbeit keinen signifikanten Unterschied zwischen der Stabilität von Vk –Kde- und intron- Kde- Rearrangements beobachten [1].

5.9.4 TCRG- Genlokus

Bei den 20 der 30 untersuchten Patienten liegt zum Diagnosezeitpunkt ein TCRG- Rearrangement vor. Bei 90% (18/20) konnte mindestens 1 stabiler Marker im Rezidiv erfasst werden. Eine klonale Evolution innerhalb des TCRG- Genlokus war bei 40% der Patienten zu beobachten. Bei 6 Patienten in Form von einer Insertionen am 3'Ende. Bei 2 Patienten kam es zu einer oligoklonalen Entwicklung und bei einem Patienten zum Verlust des TCRG- Markers. Zum Zeitpunkt der Diagnose wurden keine oligoklonalen Marker erfasst. In der Untersuchungsgruppe von Szczepanski et al. waren 19 Patienten von einer klonalen Evolution in TCRG- Lokus betroffen. Hierbei kam es zu einem Verlust von insgesamt 22 Markern. Bei 9 Patienten kam es zu einer Regression oligoklonaler Marker in eine Germlinekonfiguration. Bei 5 Patienten konnte eine Rekombination mit Umplatzierung der V γ - und J γ -Segmente beobachtet werden. Bei weiteren 5 Patienten zeigte der Sequenzvergleich der V γ -J γ -Rearrangements das Auftreten eines initialen preleukämischen Klons [1].

5.9.5 TCRD- Genlokus

Die klonalen Veränderungen innerhalb der TCRD- Marker betreffen in dieser Arbeit 39% der Patienten (7/18). Bei 3 Patienten ist es zu einem Verlust gekommen. Bei weiteren 3 Patienten zu einer oligoklonalen Entwicklung. Bei einem Patienten ist es zu einem Basenaustausch am 5'Ende und am D δ -Abschnitt des Rearrangements gekommen. In der Arbeit von Szczepanski et al. ist es bei 17 Patienten zu einem Verlust vom 22 Markern gekommen. 12 dieser Patienten wiesen oligoklonale, 5 Patienten monoklonale Marker auf. Bei 6 Patienten (davon 4 mit monoklonalen V δ 2-D δ 3- Rearrangements) waren Deletionen zu beobachten. Bei 8 Patienten (davon 1 Patient mit einem V δ 2-D δ 3-Rearrangement) wurde eine Regression in eine Germlinekonfiguration festgestellt. Bei 3 Patienten wurden neue Rearrangements erfasst (eine V δ 2-D δ 3-Verknüpfung und zwei unidentifizierbare Rearrangements aus den D δ 3-

J δ 1-Regionen). 5 von 10 Patienten mit oligo-/ polyklonalen Rearrangements V δ 2-D δ 3-Rearrangements hatten zum Rezidiv monoklonale V δ 2-D δ 3-Rearrangements vorliegen. Bei den restlichen 5 Patienten wurden in 2 Fällen weitere Deletionen festgestellt, bei 2 kam es zu einer Regression und bei einem Patienten wurde das oligo-/polyklonale Muster beibehalten [1].

5.10 Verwendbarkeit der Immunglobulin-/ T- Zell- Rezeptor - Rearrangements

Die Arbeiten von Guggemos et al. und Szczepanski et al., wie auch die vorliegende Arbeit können somit die Untersuchungen von Imashuku et al. eindeutig widerlegen [2]. In dieser wurde die mangelhafte Verwendbarkeit der Rearrangements zur Erfassung eines Rezidivs nach Stammzelltransplantation postuliert. Hierbei wurden ebenfalls die Rearrangements von 95 Patienten bei Diagnose und nach erfolgter SZT untersucht. Es handelte sich dabei um 84 B-ALL- und 11 T-ALL- Patienten. Vor der SZT waren bei lediglich 88% der Patienten Marker identifizierbar (92%). Ein Monat nach SZT wurden bei (16/88): 19% Rearrangements erfasst. 3 Monate nach SZT betrug der Anteil 12,3%. Nach 6 Monaten 16,7%. Und nach 1 Jahr noch 12,3%. Jedoch ist diese Arbeit in vielen Punkten nicht eindeutig verwertbar, da von den 95 untersuchten Patienten nur 20 ein Rezidiv erlitten haben, wodurch sich diese niedrige MRD-Nachweisbarkeit erklären lässt. Dieser relativ konstante MRD- Nachweis nach SZT wurde nicht permanent von denselben Patienten geschaffen, daher müsste der MRD- Nachweis bezogen auf jeden Patienten noch niedriger sein. Zum anderen waren von den 20 Rezidiven nur 19 auswertbar. Aus der besagten Untersuchung geht auch nicht hervor wie das Rearrangementmuster der rezidivierenden Patienten im Vergleich zur Diagnose ausgesehen hat. Und es ist auch nicht erkennbar welche der Erkrankungsgruppen (B-ALL oder T-ALL Patienten) rezidivierten. Auch die Anzahl des untersuchten Markersets ist deutlich geringer als in den anderen erwähnten Arbeiten. Die, wie in mehreren

Untersuchungen gezeigt, stabilen Endzustandsmarker des IgK-Genlocus wurden bei Imashuku und Kollegen nicht verwendet. Ebenfalls ist nicht erkennbar, ob es sich bei den untersuchten Markern um oligoklonale oder monoklonale Marker handelt. Wie von den Autoren eingeräumt wird, sind die Ergebnisse in vielen Punkten nicht signifikant [2].

5.11 Rezidiverfassung bei kombinierten Auswahlstrategien

Aus der Arbeit von Szczepanski, bei der die Markerstabilitäten mittels PCR und Southern-Blot untersucht wurden, ergaben sich je nach Untersuchungsmethode verschiedene Empfehlungen. Bei Anwendung von PCR und Southern-Blot sollten 2 monoklonale Marker aus den IgK-, IgH- und/ oder TCRD- Genloci berücksichtigt werden. Als Marker der zweiten Wahl wurden hier die oligoklonalen IgH- Marker genannt, da sie, trotz des Risikos einer klonalen Evolution, bei 10% der untersuchten Patienten die einzigen, nachweisbaren Marker darstellten. Zur Reduktion des Risikos falsch-negativer Werte sollen jedoch grundsätzlich alle Marker verfolgt werden [1].

Bei alleiniger PCR- Anwendung empfiehlt Szczepanski et al. als Marker der ersten Wahl die Kde-Rearrangements. Als zweite Wahl, alle identifizierten IgH-Marker, ergänzend mit monoklonalen TCRD- Markern. Durch die Verwendung einer größeren Anzahl von IgH- und TCRD- Markern kann die Lücke (fehlende Unterscheidung von monoklonalen und oligoklonalen Markern durch Southern Blot- Untersuchung) kompensiert werden. Unter Anwendung beider Strategien konnten bei Szczepanski et al. 95% der Rezidive erfasst werden [1].

In der Studie von Guggemos et al. wurde ebenfalls eine Auswahlstrategie zur Verminderung falsch-negativer Ergebnisse erarbeitet. Die erste Wahl besteht in der Verwendung zweier Marker aus verschiedenen Genloci. Bei Vorliegen mehrerer Genloci sollten die IgH- und TCRG- Rearrangements bevorzugt werden. Als Marker der zweiten Wahl wurden mehrere Marker aus einem

Genlokus verwendet. Dadurch war es ihnen möglich, ein Rezidiv bei 98% ihrer Patienten zu erfassen [5].

Unter Anwendung der Auswahlstrategien aus der Arbeit von Guggemos und Kollegen auf die vorliegende Arbeit, würde man bei 73% (22/30) der Patienten ein Rezidiv erkennen oder anders betrachtet könnte man bei diesen 22 Patienten ein falsch-negatives Ergebnis zu 100% (22/22) vermeiden. Durch zusätzliche Anwendung der Marker der zweiten Wahl erhöht sich die Zahl der detektierbaren Rezidive um 6 weitere Patienten (28/30), so dass 93% der Rezidive erkannt werden können. Durch Kombination beider Vorgehensweisen kann bei allen hier untersuchten Patienten ein Rezidiv zu 100% (28/28) erfasst werden. Die restlichen 2 Patienten (7%) (Pat. Nr.: 4 IgH-Rearrangement; Pat. Nr.: 5 TCRD- Rearrangement) besitzen nur einen Marker und wären somit für diese MRD- Überwachung mittels zweier Marker nicht geeignet. Beide verfügen jedoch über einen stabilen Marker, so dass auch hier, bei kontinuierlicher MRD-Messung, ein Rezidiv erkannt werden kann.

5.12 Limitierende Faktoren für die MRD-Bestimmung

Wie auch diese Untersuchung zeigt, ist die Resterkrankung ein dynamischer Prozess, bei dem es über die Zeit zu ständigen Veränderungen der klonalen Zellzahl kommt [20, 27]. So bedeutet ein kurz nach Beendigung der Therapie stattfindender Abfall der Blastenlast unter den fassbaren Grenzwert molekularer Untersuchungen nicht zwangsläufig eine tatsächliche Elimination des Klons. Dieser kann zu einem späteren Zeitpunkt wieder messbar, erhöht vorliegen und zu einem klinischen Rezidiv führen oder anschließend erneut unter die messbare Schwelle abfallen, was bei PCR- Untersuchungen häufig beobachtet wird, wenn die Proliferation eines leukämischen Klons unter der Kontrolle immunologischer oder hämostatischer Mechanismen über Jahre hin verhindert wird [33]. Ebenso beschränken falsch-negative-PCR Ergebnisse, durch klonale Evolution der Ig/TCR-Genrearrangements, die Aussagekraft negativer Ergebnisse [1, 41, 44, 45]. Dieser potentielle Fehler kann jedoch, wie oben

erwähnt durch die Verwendung geeigneter Genrearrangements und deren Kombinationen, sowie durch die gleichzeitige Durchführung Durchfluss-Zytometrischer-Untersuchungen, reduziert werden [19].

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob die myeloablative Behandlungsmodalität sich auf die Stabilität der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor- Rearrangements auswirkt. Es sollte untersucht werden, ob sich damit eine Möglichkeit der frühen Erkennung des Wiederauftretens einer Resterkrankung bieten würde und ob charakteristische Markerveränderungen erkennbar wären, die im Zusammenhang mit dem Rezidiv stehen.

Die vergleichende Analyse der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements erfolgte bei 30 Patienten im Alter von 1 bis 15 Jahren. Die Knochenmarktransplantationen waren an verschiedenen Deutschen Zentren durchgeführt worden. Von jedem beteiligten lag eine Diagnoseprobe und eine Probe eines Rezidivs nach Stammzelltransplantation vor. Durch eine Homo-/Heteroduplexanalyse wurden die jeweiligen Rearrangements detektiert. Die Sequenzanalyse erfolgte mittels ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die myeloablative Behandlung keinen negativen Einfluss auf die Stabilität der Immunglobulin- und T-Zellrezeptor-Rearrangements hat. 71% der bei Diagnose erfassten Marker waren in den Rezidivproben unverändert nachweisbar. Diese hohe Stabilität ermöglicht die kontinuierliche MRD- Messung der Immunglobulin- und T-Zellrezeptor-Rearrangements mittels PCR- Untersuchung. Durch die Verwendung von zwei Markern wird die Zuverlässigkeit gesteigert. Somit kann durch die kontinuierlicher MRD- Messung der Immunglobulin- und T-Zellrezeptor- Rearrangements das Wiederauftreten eines Rezidivs erkannt, bzw. können falsch-negative Ergebnisse sicher ausgeschlossen werden. Dies gelingt durch die hohe Spezifität der klonalen Marker zu 100%.

Die Verwendbarkeit klonspezifischer Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements zur Erfassung eines Rezidivs nach einer Stammzelltransplantation ist in dieser Arbeit untersucht und diskutiert worden. Es konnte

gezeigt werden, dass die Gefahr falsch-negativer Ergebnisse durch klonale Evolutionen, unter Verwendung geeigneter Rearrangements und bei Anwendung von Auswahlkriterien, umgangen werden kann.

Diese Beobachtungen belegen unter anderem, dass die Anwendung der MRD-Messung als ergänzende Untersuchung unverzichtbar ist.

Wie in mehreren Untersuchungen bereits belegt, korrelieren hohe MRD-Lasten stark mit einem Rezidivrisiko. Durch Anwendung der MRD-Untersuchungen ist es möglich einen Grenzwert zu bestimmen, bei deren Überschreitung ein Rezidiv sehr wahrscheinlich ist [17]. Die Verwendung automatisierter, quantitativer Real-time-PCR ist eine bereits häufig verwendete Methode und kann dadurch zur Standardisierung der MRD beitragen.

Die Frage nach den Anwendungskriterien fortwährender MRD-Untersuchungen (die sowohl therapiebegleitend, als auch in regelmäßigen Abständen bei Nachsorgeuntersuchungen durchgeführt werden), zur Toxizitätsreduktion der Chemotherapie und zur Verhinderung offenkundiger Rezidive, ist noch Gegenstand laufender Studien der Europäischen Pädiatrischen Arbeitsgruppe I-BFM-SG. Diese Untersuchungen werden eine verbesserte Einsicht in die Pathogenese der Leukämien und den biologischen Eigenheiten des residualen, leukämischen Klons liefern können.

Dadurch scheint eine weitere Stratifizierung absehbar zu sein. So dass bei Kindern, die auf die Therapie gut ansprechen eine Therapiereduktion möglich sein könnte. Dagegen kann bei Kindern mit schlechtem Ansprechen die Prognose durch Anwendung einer intensiveren Behandlung, wie die SZT, verbessert werden. Erste Ergebnisse über die Bedeutung der MRD vor und nach einer allogenen SZT liegen bereits vor [21, 31].

7. Sequenzierungen der Rearrangements aus den Diagnose- und Rezidivproben aller Patienten.

Pat.	UPN	Locus	Zeitpunkt	Primerpaar	V-Region	D-Region	J-Region
1	2346	Igk	Diagnose	Vkl-5' Kde-3'	ATAGTTATTC	G	GGAGCCCTAG
		IgK	Rezidiv	Vkl-5' Kde-3'		Markerverlust	Markerverlust
		TCRG	Diagnose	VgII-5' Jg1.1/2.1-3'	GTGGGAGGTG	CAGGAGGGGTGAGG	GGTTGGTTC
		TCRG	Rezidiv	VgII-5' Jg1.1/2.1-3'	TTGTGGGAGG	GGGGCGGCC	CTGTTGGTT
		TCRG	Diagnose	VgII-5' Jg1.3/2.1-3'	TTGTGGGAGG	CGCAG	GAAACTCTTT
		TCRG	Rezidiv	VgII-5' Jg1.3/2.1-3'	TTGTGGGAGG	CGCAG	GAAACTCTTT
		TCRG	Diagnose	VgIII-5' Jg1.3/2.1-3'	CTGTGCTGCG	ACACT	TTATTATAAG
		TCRG	Rezidiv	VgIII-5' Jg1.3/2.1-3'	CTGTGCTGCG	ACACT	TTATTATAAG
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Jd1-3	CTGTGACACC	GGTACTGGGGGATAGA GCTAGT	ACACCGATAA
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Jd1-3	CTGTGACACC	GGTACTGGGGGATAGA GCTAGT	ACACCGATAA
		TCRD	Diagnose	Vd3-5' Jd1-3	TGCCACTTAC	CAATCCTTTTCGAGTTGT ACACTGCCTCCGTTTGT GACTGGGGGTAGTTT	ACCGATAAAC
		TCRD	Rezidiv	Vd3-5' Jd1-3	TGCCACTTAC	CAATCCTTTTCGAGTTGT ACACTGCCTCCGTTTGT GACTGGGGGTAGTTT	ACCGATAAAC
2	2119	IgH	Diagnose	VH4-JHcons		Kein Marker bei Diagnose	
		IgH	Rezidiv	VH4-JHcons	CTGTGCCAGA	AGACTACGGTGACTACT GAGGGG	CTACTACTAC
		IgK	Diagnose	VkII-5' Kde-3'	AATTTCTCA	TCCTTACC	GGAGCCCTAG
		IgK	Rezidiv	VkII-5' Kde-3'	AATTTCTCA	TCCTTACC	GGAGCCCTAG
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg1.1/2.1-3'	CTGGGACGGG	CACTCCCCTCC	TAGTGATTGG
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg1.1/2.1-3'	CTGGGACGGG	CACTCCCCTCC	TAGTGATTGG
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg1.1/2.1-3'	CTGGGACGGG	CACTCCCCTCC	TAGTGATTGG
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg1.1/2.1-3'	CTGGGACGGG	CACTCCCCTCC	TAGTGATTGG
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg1.1/2.1-3'	CACCTGGGAC	AGTCGCCCCATTCCGT	ATACCACTGG
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg1.1/2.1-3'	CACCTGGGAC	AGTCGCCCCATTCCGT	ATACCACTGG
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg1.1/2.1-3'	GCCACCTGGG	TTCCC	TTGGTTCAAG
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg1.1/2.1-3'	GCCACCTGGGA	TC	ACCACTGGTT

Tabelle 17: Sequenzierungen der Rearrangements aus den Diagnose- und Rezidivproben aller Patienten.

Basenveränderungen sind durch die **Fett**taste hervorgehoben.

Sequenzierungen

		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3' new	TGTGCCTGTG	TCCCCA	GGGGATACGC
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3' new	TGTGCCTGTG	TCCCCA	GGGGATACGC
3	2056	IgH	Diagnose	VH3-JHcons	GTGCGAGAGA	TCCAATTGTGTAGTAGT ACCAGCTGCCGCCTAC AGTTTGGTC	TTACTACTA
		IgH	Rezidiv	VH3-JHcons	GTGCGAGAGA	TCCAATTGTGTAGTAGT ACCAGCTGCCGCCTAC AGTTTGGTC	TTACTACTA
		IgK	Diagnose	Vkl-5' Kde-3'	CTGTCAACAG	AGTTACAGTACCCTC	TGGCAGCCCA
		IgK	Rezidiv	Vkl-5' Kde-3'	CTGTCAACAG	AGTTACAGTACCCTC	TGGCAGCCCA
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3' new	CCTGTGACAC	AGGGCCCCATGT	ACTGGGGGAT
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3' new	CCTGTGACAC	AGGGCCCCATGT	ACTGGGGGAT
4	2295	IgH	Diagnose	VH3-JHcons	GTGCGAGAGA	TCAAAGGAGCTCGTCC	TGCTTTTGAT
		IgH	Rezidiv	VH3-Jhcons	GTGCGAGAGA	TCAAAGGAGCTCGTCC	TGCTTTTGAT
5	2130	TCRD	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTCTTGGGGA	TGTACCTCCTTCCTATT GGGGG	ACACCGATAA
		TCRD	Rezidiv I	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTCTTGGGGA	TGTACCTCCTTCCTATT GGGGG	ACACCGATAA
		TCRD	Rezidiv II	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTCTTGGGGA	TGTACCTCCTTCCTATT GGGGG	ATCTGAAGTT
6	2043	TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg11/21-3'	GCCACCTGGG	CCCGGGCTGAGAA	TGGTTCAAGA
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg11/21-3'	GCCACCTGGG	CCCGGGCTGAGAA	TGGTTCAAGA
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGCCGGG	GGAGG	TAAGAAACTC
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGACGGG	CCG	ATTATAAGAAAC TC
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGCCGGG	GGAGG	TAAGAAACTC
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGCCGGG	GGAGG	TAAGAAACTC
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg11/21-3'	ACTGTGCCT	CTCGTGG	GGTTGGTTCA
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg11/21-3'	oligklonal	verändert	
7	2298	TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGACGGG	CCTTTATAGTGG	TTATAAGAAA
		TCRG	Rezidiv I	Vgl-5' Jg13/21-3'	oligklonal	verändert	
		TCRG	Rezidiv II	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGACGGG	CCTTTATAGTGG	TTATAAGAAA
		TCRG	Rezidiv I	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGACGGG	CCTTTATAGTGG	TTATAAGAAA
		TCRG	Rezidiv II	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGACGGG	CCTTTATAGTGG	TTATAAGAAA

Fortsetzung Tabelle 17: Sequenzierungen der Rearrangements aus den Diagnose- und Rezidivproben aller Patienten.
Basenveränderungen sind durch die **Fett**taste hervorgehoben.

		TCRG	Rezidiv I	Vgl-5' Jg13/21-3'	CCACCTGGGA	TGAGG	GAAACTCTTT
		TCRG	Rezidiv II	Vgl-5' Jg13/21-3'	CCACCTGGGA	TGAGG	GAAACTCTTT
		TCRG	Rezidiv I	Vgl-5' Jg13/21-3'	TGTGCCACCT	TCCTCCTCCACTG Verdacht auf Subklon	AAGAAACTCT
		TCRD	Diagnose	Dd2-5' Jd1-3'new	TGTGCCTTCC	CCGGTACTGGGGGATA CGGGATAGGTGAGA	TTGGAAAAGG
		TCRD	Rezidiv I	Dd2-5' Jd1-3'new	TGTGCCTTCC	CCGGTACTGGGGGATA CGGGCATAGGTGAG CA A V.a.Subklon	TTGGAAAAGG
		TCRD	Rezidiv II	Dd2-5' Jd1-3'new	TGTGCCTTCC	CCGGTACTGGGGGATA CGGGATAGGTGAGA	TTGGAAAAGG
8	2445	IgH	Diagnose	VH1-JHcons	TGTGCGAGAG	GGTGAAGGACCGACAG CCTTCTAATGGTGTATG GTGGGCCGTTT	ACTACTTTGA
		IgH	Rezidiv	VH1-JHcons	TGTGCGAGAG	GGTGAAGGACCGACAG CCTTCTAATGGTGTATG GTGGGCCGTTT	ACTACTTTGA
		IgK	Diagnose	VkII-5' Kde-3'	CACTGGCCTC	TCCGGAGTCACACTA	GAGCCCTAGT
		IgK	Rezidiv	VkII-5' Kde-3'	CACTGGCCTC	TCCGGAGTCACACTAGA GCCCTAGTGGCAGCCC AGGGCGACTCCTCATG AG	GAAGCCTCCC
						TCTGCAGCTGCATTTTT GCCATATCCACTATTTG GAGTCTGACCTCCCTA G	
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3'new	TGCCTGTGAC	GCTCCC	ACTGGGGGAT
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3'new	TGCCTGTGAC	GCTCCC	ACTGGGGGAT
9	2478	IgH	Diagnose	VH2-JHcons	GTGCACGGAT	TGGAGGTGAACGACGA CGAACGCTTTGGA	GGTATGGACG
		IgH	Rezidiv	VH2-JHcons		Markerverlust	
		IgH	Diagnose	VH3-JHcons		Kein Marker bei Diagnose	
		IgH	Rezidiv	VH3-JHcons	GACTAGACA	CGGCGGATTGGAGGTG AACGACGACGAACGCTT TGGA	GGTATGGACG
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	TCTGGGGTCT	TTGGGGG	GGAACAACAC
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg13/21-3'	TCTGGGGTCT	TTGGGGG	GGAACAACAC
		TCRG	Diagnose	VglI-5' Jg13/21-3'	TTGTGGGAGG	CCCCGAAAG	GAAACTCTTT
		TCRG	Rezidiv	VglI-5' Jg13/21-3'	TTGTGGGAGG	CCCCGAAAG	GAAACTCTTT
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3'new	CTACTGTGCC		ACTGGGGGAT
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3'new		Markerverlust	
10	1756	IgH	Diagnose	VH3-JHcons	GTGCAAGAGA	TAAAGGTAGGTGCCGCT AGCTGGGGCTGCCAGT CCTCACCTACACCTAN GGTGAGCCACANGCGC	GACGTCTGGG
						CTGAGCCTGNAANGGA	

Fortsetzung Tabelle 17: Sequenzierungen der Rearrangements aus den Diagnose- und Rezidivproben aller Patienten.

Basenveränderungen sind durch die **Fett**taste hervorgehoben.

Sequenzierungen

						GACCCACCCAGCAGC CCAGCCCCTACCCAGG AGGCCCCAGAGCTCAG G	
						GCGCCTGGGTGGATCT GAACAGCCCCACCGG GTTAGAAAGAGCGCCG G	
		IgH	Rezidiv	VH3-JHcons		Markerverlust	
		IgK	Diagnose	VkIII-5' Kde-3'	CTGTCAGCAG	TATAATAACTGGCC	CCCTAGTGGC
		IgK	Rezidiv	VkIII-5' Kde-3'	CTGTCAGCAG	TATAATAACTGGCC	CCCTAGTGGC
		IgK	Diagnose	VkIV-5' Kde-3'	TATAGTACTC	TCAG	GCCCTAGTGG
		IgK	Rezidiv	VkIV-5' Kde-3'	TATAGTACTC	TCAG	GCCCTAGTGG
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg11/21-3'		Kein Marker bei Diagnose	
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg11/21-3'	TATFACTGTG	GCCGGGGGAGGATAGT GATTGGT	ATCAAGACGT
11	1829	IgH	Diagnose	VH3-JHcons		Kein Marker bei Diagnose	
		IgH	Rezidiv	VH3-JHcons	GTGCGAGAGA	TCGAACGCGGCTA	CGATGCTTTT
		IgH	Diagnose	VH4-JHcons	TGTATTACTG	TGCAAGAGATGGGGTC GGAAATCGGCGGCCGA AATCGGCGAGCAGCCA CCCC	TTGGCTAGGG
		IgH	Rezidiv PB	VH4-JHcons	CTGTGCGAGA	CTTCGGAGAGATCG AACGCGGCTAC	GATGCTTTTG
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CACCTGGGAC	AGCCCCCAGGGGG	ATAAGAACT
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg13/21-3'	CACCTGGGAC	AGCCCCCAGGGGG	ATAAGAACT
		TCRG	Diagnose	VglI-5' Jg11/21-3'	CTACTGTGCC	CCT	TGGTTGGTTC
		TCRG	Rezidiv	VglI-5' Jg11/21-3'	CTACTGTGCC	CCT	TGGTTGGTTC
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3' new	TGTGCCTGTG	GGGACCTAA	ACTGGGGGAT
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3' new	TGTGCCTGTG	GGGACCTAA	ACTGGGGGAT
12	1965	IgH	Diagnose	VH1/7-JHcons	GAGGACACGG	CCGTGTATTACTGTGCA ACAGGCCCAACCGCC AAATGGTGTATGCCATC AGGGG	CTACTACTAC
		IgH	Rezidiv	VH1/7-JHcons	GAGGACACGG	CCGTGTATTACTGTGCA ACAGGCCCAACCGCC AAATGGTGTATGCCATC AGGGG	CTACTACTAC
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3' new	TGCCTGTGAC	CATCCCTGT	ACTGGGGGAT
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3' new	TGCCTGTGAC	CATCCCTGT	ACTGGGGGAT
13	2231	IgH	Diagnose	VH2-JHcons	TGTGCACAC	GGGGCCCTTACCAGCT GCT	ACTACTGGGG

Fortsetzung Tabelle 17: Sequenzierungen der Rearrangements aus den Diagnose- und Rezidivproben aller Patienten.
Basenveränderungen sind durch die **Fett**taste hervorgehoben.

		IgH	Rezidiv	VH2-JHcons	TGTGCACAC	JH 3 + JH 4	
		IgH	Diagnose	VH3-JHcons	CTGTGCGAGA	CAAGTTGTCAGGGGAGGA TCCAAGAATGATATTGTAG TGGTGGTAGCTGC	TACTACTACT
		IgH	Rezidiv	VH3-JHcons	CTGTGCGAGA	CAAGTTGTCAGGGGAGGA TCCAAGAATGATATTGTAG TGGTGGTAGCTGC	TACTACTACT
		IgK	Diagnose	VkIII-5' Kde-3'	TATGGTAGCT	TCCCCCCC	CAGCCCAGGG
		IgK	Rezidiv	VkIII-5' Kde-3'	TATGGTAGCT	TCCCCCCC	CAGCCCAGGG
		TCRG	Diagnose	VgII-5' Jg13/21-3'	GCCTTG TGGG	GGGGGAGGGATCC	TATTATAAGA
		TCRG	Rezidiv	VgII-5' Jg13/21-3'	GCCTTG TGGG	GGGGGAGGGATCC	TATTATAAGA
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3' new	GGGTCTTACT	TTGGG	GGATACGCAC
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3' new		Biklonal verändert	
14	2451	IgH	Diagnose	VH1/7-JHcons	GTGCGAGAG A	GAGGGAGAAGCAGTGTCCG GGGAGAA	ACTACTACTA
		IgH	Rezidiv	VH1/7-JHcons	GTGCGAGAG A	GAGGGAGAAGCAGTGTCCG GGGAGAA	ACTACTACTA
		TCRG	Diagnose	VgII-5' Jg11/21-3'		Kein Marker bei Diagnose	
		TCRG	Rezidiv	VgII-5' Jg11/21-3'	CCTTG TGGGA	ATCTT	ACTGGTTGGT
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3' new		Oligoklonaler Marker	
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3' new	ACTGTGCCTG	CCCCCT	CTGGGGGATA
		TCRD	Diagnose	Dd2-5' new Dd3-3' new	GCCTTCCTAC	CCTCTCGT	ACTGGGGGAT
		TCRD	Rezidiv	Dd2-5' new Dd3-3' new		Biklonal verändert	
15	2217	IgH	Diagnose	VH2-JHcons	CTGTGCACGG	CCCCACTATGGTTCCGGG GAGTTATTATAACCTTT	ACTACTTTGA
		IgH	Rezidiv	VH2-JHcons	CTGTGCACGG	CCCCACTATGGTTCCGGG GAGTTATTATAACCTTT oligoklonal	ACTACTTTGA
		IgH	Diagnose	Vkl-5' Kde-3'	TCAACAGTAT	GATAATCTCCCTTTTCGAG	CCTAGTGGCA
		IgH	Rezidiv	Vkl-5' Kde-3'	TCAACAGTAT	GATAATCTCCCTTTTCGAG	CCTAGTGGCA
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg11/21-3'	CACCTGGGAC	CGACCTTCGT	CCACTGGTTG
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg11/21-3'	CACCTGGGAC	CGACCTTCGT	CCACTGGTTG
		TCRD	Diagnose	Vd1-5' Jd1-3'		Kein Marker bei Diagnose	
		TCRD	Rezidiv	Vd1-5' Jd1-3'	GCTCTTGGGG	GTCGACGGGGTATTGGGA G	ACACCGATAA
16	1282	IgH	Diagnose	VH3-JHcons	TGTACCACAG	CGGAGTATATTGTACTAAT	GGATGCTTTT

Fortsetzung Tabelle 17: Sequenzierungen der Rearrangements aus den Diagnose- und Rezidivproben aller Patienten.

Basenveränderungen sind durch die **Fett**taste hervorgehoben.

Sequenzierungen

						GGTGTATGCTTT	
		IgH	Rezidiv	VH3-JHcons	TGTACCACAG	CGGAGTATATTGTAATAAT GGTGTATGCTTT	GGATGCTTTT
		IgH	Diagnose	VH4-JHcons	TGTATTACTG	TGCAAGAGATCCCCTAACT GGGG	ACTGGTACTT
		IgH	Rezidiv	VH4-Jhcons	TGTATTACTG	TGCAAGAGATCCCCTAACT GGGG	ACTGGTACTT
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGACGG G	CCGACGGG	TTATTATAAG
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGACGG G	CCGACGGG	TTATTATAAG
		TCRD	Diagnose	Dd2-5' new Dd3-3' ne		Kein Marker bei Diagnose	
		TCRD	Rezidiv	Dd2-5' new Dd3-3' ne	GTGTTTCATT	CCGTCCCC	CACAGTGCTA
17	1776	IgH	Diagnose	VH4-JHcons	GTGCAAGAGA	TCCAAACTGGAATAAGG G	ATTACTACTA
		IgH	Rezidiv	VH4-JHcons	GTGCAAGAGA	TCCAAACTGGAATAAGG G	ATTACTACTA
		IgH	Diagnose	VH4-JHcons		Kein Marker bei Diagnose	
		IgH	Rezidiv	VH4-JHcons	ATTACTGTGC	AGCCCCCTATTAAGCAG CTCGTCCCGG	GATGCTTTTG
		TCRD	Diagnose	Dd2-5' new Dd3-3' ne	TGTTTCATTG	CGCCTCGGGACGCACAGC	GCTACAAAAC
		TCRD	Rezidiv	Dd2-5' new Dd3-3' ne	TGTTTCATTG	<u>TCCTCGGGACGCACAG</u>	GCTACAAAAC
18	1820	IgH	Diagnose	VH3-JHcons	CTGTACTAGA	CTTACGGATTGGGGGA GTGGTTATTAT	ATTACTACTA
		IgH	Rezidiv	VH3-JHcons	CTGTACTAGA	CTTACGGATTGGGGGA GTGGTTATTAT	ATTACTACTA
		IgK	Diagnose	VklI-5' Kde-3'	AACGTACACA	CTGGCCTCCGGGGC	CCCTAGTGCC
		IgK	Rezidiv	VklI-5' Kde-3'	AAGGTACACA	CTGGCCTCCGGGGC	CCCTAGTGCC
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGACGG G	CCGGGGA	TATAAGAAAC
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGACGG G	CCGGGGA	TATAAGAAAC
		TCRG	Diagnose	VglI-5' Jg13/21-3'	CCTTGTGGGA	AGAA	TATTATAAGA
		TCRG	Rezidiv	VglI-5' Jg13/21-3'	CCTTGTGGGA	AGAA	TATTATAAGA
19	1793	IgH	Diagnose	VH3-JHcons	CTCCCGGGTA	GGTGGTTATTACCGT	ACAACGGTT
		IgH	Rezidiv	VH3-JHcons	CTCCCGGGTA	GGTGGTTATTACCGT	ACAACGGTT
		IgH	Diagnose	VH4-JHcons	TGTATTACTG	TGCGAGAGAATTGGGGAA GAG	ACGATTTTTG
		IgH	Rezidiv	VH4-JHcons		Markerverlust	

Fortsetzung Tabelle 17: Sequenzierungen der Rearrangements aus den Diagnose- und Rezidivproben aller Patienten. Basenveränderungen sind durch die **Fett**taste hervorgehoben.

		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGTGCCACC	GGACCTTTCC	GAATTATTAT
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGTGCCACC	GGACCTTTCC	GAATTATTAT
		TCRG	Diagnose	VglI-5' Jg11/21-3'		Kein Marker bei Diagnose	
		TCRG	Rezidiv	VglI-5' Jg11/21-3'	CTGTGCCTTG	GAGA	CTGGTTGGTT
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3' new		Kein Marker bei Diagnose	
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3' new	ACTGTGCCTG	CCCCCT	CTGGGGGATA
20	2613	TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg11/21-3'	GGGACGGGC C	GGATG	GTGATTGGAT
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg11/21-3'	GGGACGGGC C	GGATG	GTGATTGGAT
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg11/21-3'	GGGACGGGC C	GGATG	GTGATTGGAT
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	GCCACCTGG G	CCGTTGG	GAAACTCTTT
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	GCCACCTGG G	CCGTTGG	GAAACTCTTT
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg13/21-3'	GCCACCTGG G	CCGTTGG	GAAACTCTTT
		TCRD	Diagnose	Dd2-5' new Dd3-3' ne		Kein Marker bei Diagnose	
		TCRD	Rezidiv	Dd2-5' new Dd3-3' ne	TGCCTCCTA	ATCAACC	GCACAGTGCT
21	2560	IgH	Diagnose	VH1-JHcons	TGTGCGAGAG	GGAGG	TACTTTGACT
		IgH	Rezidiv	VH1-JHcons	TGTGCGAGAG	GGAGG	TACTTTGACT
		IgH	Diagnose	VH4-JHcons	TGTGCGAGAG	GTACTATGATAGTAGTG TATTACTACGGTAAACCGA GATTTGA	CT CTGGGGCC
		IgH	Rezidiv	VH4-JHcons	TGTGCGAGAG	GTACTATGATAGTAGTG TATTACTACGGTAAACCGA GATTTG ACTA	CTGGGGCCAG
22	2114	IgH	Diagnose	VH3-JHcons	CATGTATTAC	CCGTACCCCGGGAGGGAA AAGAAGACGCCAGGGG TTGGCCC	CCCCTGGGGC
		IgH	Rezidiv	VH3-JHcons	CATGTATTAC	CCGTACCCCGGGAGGGAA AAGAAGACGCCAGGGG TTGGCCC	CCCCTGGGGC
		IgH	Diagnose	VH4-JHcons		Kein Marker bei Diagnose	
		IgH	Rezidiv	VH4-JHcons	GTGCGAGAG A	AAGGGAAGGATATTATGAT TACGTTTGGGGGAGTTATC GTTATACAGCAGGTACGG	TAGGGTGTCC
		IgK	Diagnose	VkII-5' Kde-3'	AAGGTACACA	CTGGCCCCCGGCTA	CCCTAGTGCC
		IgK	Rezidiv	VkII-5' Kde-3'	AAGGTACACA	CTGGCCCCCGGCTA	CCCTAGTGCC
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg11/21-3'	GCCACCTGG G	TGCTTC	GGTTGGTTCA
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg11/21-3'	GCCACCTGG G	TGCTTC	GGTTGGTTCA

Fortsetzung Tabelle 17: Sequenzierungen der Rearrangements aus den Diagnose- und Rezidivproben aller Patienten.

Basenveränderungen sind durch die **Fett**taste hervorgehoben.

Sequenzierungen

23	2194	IgH	Diagnose	VH3-Jhcons	TGTGCGAGAG	TGGGGGCCCAAGGATAG A	TATAGCAGCA
		IgH	Rezidiv	VH3-JHcons	TGTGCGAGAG	TGGGGGCCCAAGGATAG A	TATAGCAGCA
		IgK	Diagnose	Vkl-5' Kde-3'	GTATAACAGT	GCCCCACGG	GGCAGCCCAG
		IgK	Rezidiv	Vkl-5' Kde-3'	GTATAACAGT	GCCCCACGG	GGCAGCCCAG
		IgK	Diagnose	VklI-5' Kde-3'	AAGGTACACA	CTGGCCTTCAT	GTGGCAGCCC
		IgK	Rezidiv	VklI-5' Kde-3'	AAGGTACACA	CTGGCCTTCAT	GTGGCAGCCC
		TCRG	Diagnose	VglI-5' Jg11/21-3'		Kein Marker bei Diagnose	
		TCRG	Rezidiv	VglI-5' Jg11/21-3'	GTGGGAGGT G		CCACTGGTTG
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Jd1-3'	CTGTGACACC	CGGGGGATACAGTCT	CGATAAACTC
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Jd1-3'	CTGTGACACC	CGGGGGATACAGTCT	CGATAAACTC
24	2760	IgH	Diagnose	VH1-JHcons	CTGTGCGAGA G	GAAG GAGCCCCTGTAGT AGTACCAGCTGCTATATT TTCAGGTCTG	GCTTTTGATA
		IgH	Rezidiv	VH1-JHcons	CTGTGCGAGA	ATGGATGTCGA GAGCCCC TGTAGTAGTACCAGCTGCT ATATTTTCAGGTCTG	GCTTTTGATA
		IgK	Diagnose	VklII-5' Kde-3'	TATGGTACCT	CC	GTGGCAGCCC
		IgK	Rezidiv	VklII-5' Kde-3'	TATGGTACCT	CC	GTGGCAGCCC
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg11/21-3'	CTGGGACGG G	CAAGTAG	TGATTGGATC
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg11/21-3'	oligoklonal	verändert	
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTTTGGGGTC	GGAAGAAACTCTTTGGC AGTGGA	ACAACACTGG
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg13/21-3'	oligoklonal	verändert	
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3' new	GTGCCTGTGA	AGGT	ACTGGGGGAT
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3' new	Oligoklonal	verändert	

25	2743	IgH	Diagnose	VH3-JHcons	ACTGTGCGAG	GTGTAGTAGTACCAGCTG CCC	ATACTCCAG
		IgH	Rezidiv	VH3-JHcons	ACTGTGCGAG	GTGTAGTAGTACCAGCTG CCC	ATACTCCAG
		TCRG	Diagnose	VglV-5' Jg13/21-3'	TGGATTAGGC	C	CAGTGAACA
		TCRG	Rezidiv	VglV-5' Jg13/21-3'	GATTAGGCAC	GTAAGCG	ATAAGAACT
		TCRD	Diagnose	Dd2-5' new Dd3-3' ne	ATTGTGCCTT	GGTATGGGCTCGG	CTGGGGGATA
		TCRD	Rezidiv	Dd2-5' new Dd3-3' ne		Markerverlust	

Fortsetzung Tabelle 17: Sequenzierungen der Rearrangements aus den Diagnose- und Rezidivproben aller Patienten. Basenveränderungen sind durch die **Fett**taste hervorgehoben.

26	2688	IgK	Diagnose	Vkl-5' Kde-3'	TGCCAACAGT	TATTCAG	TAGTGGCAGC
		IgK	Rezidiv	Vkl-5' Kde-3'	Oligklonal	verändert	
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg11/21-3'	CACCTGGGAC	AGGCGGAGGG	ACCACTGGTT
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg11/21-3'	CACCTGGGAC	AGGCGGAGGG	ACCACTGGTT
		TCRG	Diagnose	VglI-5' Jg13/21-3'	GTGGGAGGT G	AAGAAGAA	AAGAAACTCT
		TCRG	Rezidiv	VglI-5' Jg13/21-3'	GTGGGAGGT G	AAGAAGAA	AAGAAACTCT
		TCRG	Diagnose	VglV-5' Jg11/21-3'	TGCCTGCTGG	T	TACCACTGGT
		TCRG	Rezidiv	VglV-5' Jg11/21-3'	TGCCTGCTGG	T	TACCACTGGT
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3' new	CTGTGCCTGT	T	CTGGGGGAT
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3' new	CTGTGCCTGT	T	CTGGGGGAT
27	2413	IgH	Diagnose	VH3-Jhcons	GTGCGAGAG A	TCCCTGGCTGGGA	GCTACTTTGA
		IgH	Rezidiv	VH3-Jhcons	GTGCGAGAG A	TCCCTGGCTGGGA	GCTACTTTGA
		IgK	Diagnose	Vkl-5' Kde-3'	ATAATAGTTA	CCCTC	GAGCCCTAGT
		IgK	Rezidiv	Vkl-5' Kde-3'	ATAATAGTTA	CCCTC	GAGCCCTAGT
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGACGG G	CCGGGG	AAGAAACTCT
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg13/21-3'	CTGGGACGG G	CCGGGG	AAGAAACTCT
		TCRG	Diagnose	VglI-5' Jg13/21-3'	TGTGGGAGGT	CCGCATTCGGG	TAAGAAACTC
		TCRG	Rezidiv	VglI-5' Jg13/21-3'	TGTGGGAGGT	CCGCATTCGGG	TAAGAAACTC
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3' new	TGTGCCTGTG	GGA	GGGGATACGC
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3' new	TGTGCCTGTG	GGA	GGGGATACGC
28	2788	TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CACCTGGGAC	TCCGGGG	GAAACTCTTT
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg13/21-3'	CACCTGGGAC	TCCGGGG	GAAACTCTTT
		TCRG	Diagnose	Vgl-5' Jg13/21-3'	CCACCTGGGA	TAATG	CTCTTTGGCA
		TCRG	Rezidiv	Vgl-5' Jg13/21-3'	CCACCTGGGA	TAATG	CTCTTTGGCA
		TCRG	Diagnose	VglI-5' Jg11/21-3'	CTACTGTGCC	GCTCGA	TGTTGGTTC
		TCRG	Rezidiv	VglI-5' Jg11/21-3'	CTACTGTGCC	TTGTGGGATTACCAC	TGTTGGTTC

Fortsetzung Tabelle 17: Sequenzierungen der Rearrangements aus den Diagnose- und Rezidivproben aller Patienten.

Basenveränderungen sind durch die **Fett**taste hervorgehoben.

Sequenzierungen

		TCRG	Diagnose	VgIII-5' Jg13/21-3'	TGCTGCGTGG	GATTATAGGTGG	CTCTTTGGCA
		TCRG	Rezidiv	VgIII-5' Jg13/21-3'		Markerverlust	
		TCRD	Diagnose	Vd2-5' Dd3-3'new	CTGTGCCTGT	TCAGGA	TACAAAACCT
		TCRD	Rezidiv	Vd2-5' Dd3-3'new		Markerverlust	
29	2266	IgH	Diagnose	VH4-JHcons	TTACTGTGCG	AGACAAGGAGGTTACGATT TTTGGAGTGGCT	ACAACTGGTT
		IgH	Rezidiv	VH4-JHcons	TTACTGTGCG	AGACAAGGAGGTTACGATT TTTGGAGTGGCT	ACAACTGGTT
		TCRG	Diagnose	VgI-5' Jg13/21-3'	CTGGGACAG G	CCTTCGGGGAGGG	TAAGAACTC
		TCRG	Rezidiv	VgI-5' Jg13/21-3'	CTGGGACAG G	CCTTCGGGGAGGG	TAAGAACTC
30	2890	IgH	Diagnose	VH1/7-JHcons	CTGTGCGAGA	CGAGAGTCGGAGCC	TGCTTTTGAT
		IgH	Rezidiv	VH1/7-JHcons	CTGTGCGAGA	CGAGAGTCGGAGCC	TGCTTTTGAT
		IgH	Diagnose	VH3-JHcons		Kein Marker bei Diagnose	
		IgH	Rezidiv	VH3-JHcons	TGTACTAGAC	GGGTCCCTTTGGAGTGGT TATTACC	TTCTACTACT
		TCRG	Diagnose	VgI-5' Jg13/21-3'		Kein Marker bei Diagnose	
		TCRG	Rezidiv	VgI-5' Jg13/21-3'	TGCCACCTGG		ATTATTATAA
		TCRG	Diagnose	VgII-5' Jg13/21-3'	ATAGCTACCT	GGT	<u>TT</u> ATAAGAAA
		TCRG	Rezidiv	VgII-5' Jg13/21-3'	ATAGCTACCT	GGT <u>CTTA</u>	ATAAGAACT

Fortsetzung Tabelle 17: Sequenzierungen der Rearrangements aus den Diagnose- und Rezidivproben aller Patienten.
Basenveränderungen sind durch die **Fett**taste hervorgehoben.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute Lymphatische Leukämie
Allo-SZT	Fremder Stammzellspender
Auto-SZT	Konservierung eigener Stammzellen vor Hochdosis Chemotherapie
AML	Akute Myeloische Leukämie
A	Adenin
C	Cytosin
CR	Komplette Remission
DFS	Erkrankungsfreies Überleben
DLI	Donor-Lymphozyteninfusion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EFS	Ereignisfreies Überleben
G	Guanin
GvHD	Graft versus Host-Erkrankung, Spenderzellen reagieren gegen Empfängerorganismus
GvL	Graft versus leukemia, Spenderzellen attackieren Leukämiezellen
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
MRD	Minimale Resterkrankung
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
SZT	Stammzelltransplantation
T	Thymin
TBI	Ganzkörperbestrahlung
TRM	Transplantationsassoziierte Toxizität

9.2 Literaturverzeichnis

1. Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, Van Wering ER, Van der Burg M, VanDongen 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.
2. Imashuku S, Terui K, Matsuyama T, Asami K, Tsuchiya S, Ishii E, Kawa K, Kosaka Y, Eguchi H, Tsuchida M, Ikuta K, Kato S, Koizumi S, Okamura J, Morimoto A, Hibi S, Hamaoka K. Lack of clinical utility of minimal residual disease detection in allogeneic stem cell recipients with childhood acute lymphoblastic leukemia: multi-institutional collaborative study in Japan. *Bone Marrow Transplantation*. 2003; 31: 1127-1135.
3. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlind JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Campana D. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000; 96(8): 2692-2696.
4. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: Methodologic Advances and clinical Significance. *Blood*. 1995; 85: 1416-1434.

5. Guggemos A, Eckert C, Szczepanski T, Hanel C, Taube T, Van der Velden HJ, Graf- Einsiedel H, Henze G, Seeger KH. 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: 737-746.
6. Van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E Garcia-Sanz R, Van Kierken JHJM, Droese J Gonzalez D, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in subject lymphoproliferations: Report of BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003; 17: 2257-2317.
7. Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willems MJ, Hählen 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.
8. Germano G, Del Giudice L, Palatron S, Giarin E, Gazzaniga G, Biondi A, Basso G. Clonality profile in relapsed precursor B-ALL children by Gene Scan and sequencing analyses. Consequences on minimal residual disease monitoring. *Leukemia*. 2003; 17: 1573-1582.

9. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlegger N, Fritsch G, Gadner H. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002; 99(6): 1952-1958.
10. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki, T, Neale GA, Mihara K, Pui CH, Campana D. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2001; 97: 2115-2120.
11. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002; 100 (7): 2399-2402.
12. Beishuizen A, Verhoeven MA, Van Wering ER, Hähnen K, Hooijkaas H, Van Dongen JJ. Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis and subsequent relapse: Implications for the detection of minimal residual disease. *Blood*. 1994; 83(8): 2238-2247.
13. Van der Velden VH, Brüggemann M, Hoogeveen PG, De Bie M, Hart PG, Raff T, Pfeifer H, Lüschen S, Szczempanski T, Van Wering ER, Kneba M, Van Dongen JJ. TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor B-ALL: frequency, applicability as MRD-PCR target and stability between diagnosis and relapse. *Leukemia*. 2004; 18: 1971-1980.

14. Szczepanski T, Van der Velden VH, Hoogeveen PG, De Bie M, Jacobs DC, Van Wering ER, Van Dongen JJ. V δ 2 -J α rearrangements are frequent in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia but rare in normal lymphoid cells. *Blood*. 2004; 103: 3798-3804.
15. Van der Velden VH, Hochhaus A, Gazzaniga 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(6): 1013-1034.
16. Li A, Zhou J, Zuckerman D, Rue M, Dalton V, Lyons C, Silverman S, Sallan E, Gribben JG. Sequence analysis of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and at relapse: implications for pathogenesis and for the clinical utility of PCR-based methods of minimal residual disease detection. *Blood*. 2003; 102: 4520-4526.
17. Cave H, Van der Werff Ten Bosch J, Suci S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchaamp B, Vilmer E. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1998; 339: 591-598.
18. Greaves M. Silence of the leukemic clone. *New England Journal of Medicine*. 1997; 336: 367-369.

19. Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Dietz K, Coustan-Smith E, Campana D, Koscielniak E, Niemeyer C, Schlegel PG, Müller I, Niethammer D, Bader P. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry and real-time PCR. *British Journal of Haematology*. 2005; 128: 774-782.
20. Roberts WM, Estrov Z, Ouspenskaia MV, Johnston D, McClain KL, Zipf TF. Measurement of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1997; 336: 317-323.
21. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, Grandage VL, Rowbottom AW, Green AF, Clarke E, Lankester AW, Potter MN, Cornish JM, Pamphilon DH, Steward CG, Oakhill A. Minimal residual disease status as a predictor of relapse after allogeneic bone marrow transplantations for children with acute lymphoblastic leukemia. 1998. *British Journal of Haematology*, 102: 860-871.
22. Coustan-Smith E., Sancho J, Behm F; Hancock ML. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002; 100: 52-58.
23. Ford AM, Fasching K, Panzer-Grümayer R, König M, Haas OA, Greaves MF. Origins of late relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion genes. *Blood*. 2001; 98: 558-564.
24. Goulden N, Oakhill A, Steward C. Practical application of minimal residual disease assessment in childhood acute

- lymphoblastic leukemia. *British Journal of Haematology*. 2001; 112: 275-281.
25. Gameiro P, Moreira I, Yetgin S, Papaioannou M, Potter MN, Prentice HG. Polymerase chain reaction (PCR)- and reverse transcription PCR-based minimal residual disease detection in long-term follow-up of childhood acute lymphoblastic leukemia. *British Journal of Haematology*. 2002; 119: 685-696.
26. Konrad M, Metzler M, Panzer S, Östreicher I, Peham M, Repp R, Haas OA, Gadner H, Panzer-Grümayer R. Late relapse evolve from slow-responding subclones in t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: evidence for the persistence of a preleukemic clone. *Blood*. 2003; 101:3635-3640.
27. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in. Estrov Z, Freedman MH. Detection of residual disease in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Leukemia and Lymphoma*. 1999; 33: 47-52.
28. Steenbergen EJ, Verhagen OJHM, Van der Berg H, Van Leeuwen EF, Behrendt H, Slater RR, Von dem Borne AEG, Van der Schott 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.
29. Foroni L, Coyle LA, Papaioannou M, Yaxley JC, Cole Sinclair MF. Molecular detection of minimal residual disease in adult and childhood acute lymphoblastic leukemia reveals differences in treatment response. *Leukemia*. 1997; 11: 1732-1741.

30. Gruhn B, Hongeng S, Yi H, Hancock ML, Rubnitz JE, Neale GAM, Kitchingman GR. Minimale residual disease after intensive induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia predicts outcome. *Leukemia*. 1998; 12: 675-681.
31. Knechtli C, Goulden NJ, Hancock JP, Grandage VLG, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, Rowbottom JA, 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.
32. 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.
33. Vora A, Frost L, Goodeve A, Wilson G, Ireland RM, Lilleyman J, Eden T, Peake I, Richards S. Late relapsing childhood lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998; 92: 2234-2337.
34. Willemse MJ, Seriu T, Hettinger K, D'Aniello, Hop WCJ, Panzer-Grümayer R, Biondi A, Schrappe M, Kamps WA, Masera G, Gadner H, Riehm HJ, Bartram CR, Van Dongen JJ. Detection of minimal disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood*. 2002; 99: 4386-4393.
35. Dibenedetto S, Lo Nigro L, Pine Mayer S, Rovera G, Schiliro G. Detectable molecular residual disease at the beginning of maintenance therapy indicates poor outcome in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1997; 90: 1226-1232.

36. Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP, Seyfarth J, Svegaard A, Clausen N, Wesenberg F, Jonsson OG, Forestier E, Schmiegelow K. Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. *Blood*. 2002; 99: 1253-1258.
37. Breit TM, Wolvers-Tettero ILM, Beishuizen A, Verhoeven MAJ, Van Wering E, Van Dongen JJ. Southern blot patterns, frequencies, and junctional diversity of T-cell receptor- δ gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993; 82: 3063-3074.
38. San Miguel JF, Ciudad J, Vidriales MB, Orfao A, Lucio P, Porwit-MacDonald A, Gaipa G, Van Wering E, Van Dongen JJ. Immunphenotypical detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 1999; 32: 175-185.
39. Coustan-Smith E, Behm Fg, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubnitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *The Lancet*. 1998; 351: 550-554.
40. Moppett J, Burke GAA, Steward CG, Oakhill A, Goulden NJ. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical Pathology*. 2003; 56: 249-253
41. Potter MN, Steward CG, Oakhill A. The significance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *British Journal of Haematology*. 1993: 412-418.

42. Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*. 1990; 76: 163-171.
43. Wasserman R, Galili N, Ito Y, Silber JH, Reichard BA, Shane S, Womer RB, Lange B, Rovera G. Residual disease at the end of induction therapy as predictor of relapse during therapy in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 1992; 10: 1879-1888.
44. Nizet Y, Van Daele S, Lewalle P, Vaerman JL, Philippe M, Vermynen C, Cornu G, Ferrant A, Michaux JL, Martiat P. Long-term follow-up of residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients in complete remission using clonogenic IgH probes and the polymerase chain reaction. *Blood*. 1993; 82: 1618-1625.
45. Biondi A, Yokota S, Hansen-Hagge TE, Rossi V, Guidici G, Maglia O, Basso G, Tell C, Masera G, Bartram CR. Minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: Analysis of patients in continuous complete remission or with consecutive relapse. *Leukemia*. 1992; 282-288.
46. Potter MN; Steward CG, Maitland NJ, Oakhill A. Detection of clonality in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction. *Leukemia*. 1992; 6: 289-294.
47. Van Dongen JJ; Breit TM, Adriaansen J, Beizhuizen A, Hooijkaas. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. *Leukemia*. 1992; 6: 47-59.

48. Van der Velden VHJ, Hoogeveen PG, Pieters R, Van Dongen JJM. Impact of two independent bone marrow samples on minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *British Journal of Haematology*. 2006; 133: 382-388.
49. Hübner S, Gazzaniga G, Flohr T, Van der Velden VHJ, Konrad M, Pötschger U, Basso G, Schrappe M, Van Dongen JJM, Bartram CR, Biondi Panzer-Grümayer ER. High incidence and unique features of antigen receptor gene rearrangements in TEL-AML1 positive leukemias. *Leukemia*. 2004; 18: 84-91.
50. Marshall G, Haber M, Kwan E, Zhu L, Ferrara D, Xue C, Brisco MJ, Sykes PL, 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2003; 21: 704-709.
51. Goulden N, Bader P, Van der Velden V, Moppett J, Schilham M, Masden HO, Krejci O, Kreyenberg H, Lankeste A, Revesz T, Klingebiel T. Minimal residual disease prior to stem cell transplant for childhood acute lymphoblastic leukemia. *British Journal of Haematology*. 2003; 122: 24-29.
52. Pongers-Willems MJ, Verhagen OJHM, Tibbe GJM, Wijkhuijs AJM, De Haas V, Roovers E, Van Der Schoot CE, Van Dongen JJM. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*. 1998; 12: 2006-2014.

53. Krejci O, Van der Velden VH, Bader P. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplantation*. 2003; 32: 849-851.
54. Pui CH, Campana D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000; 14: 783-785.
55. Coustan-Smith E, Gajjar A, Hijiya BI, 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.
56. Brisco MJ; Condon J, Hughes E, Neoh SH, Sykes PJ, Seshadri R, Toogood I, Waters K, Tauro G, Ekert H, Morley AA. Outcome prediction acute lymphoblastic leukemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *The Lancet*. 1994; 343: 196-200.
57. Ouspenskaia MI, Johnston DA; Roberts WM, Estroc Z, Zipf T. Accurate quantitation of residual B-precursor acute lymphoblastic leukemia by limiting dilution and a PCR-based detection system: A description of the method and the principles involved. *Leukemia*. 1995; 9: 321-328.
58. Seriu T, Hansen-Hagge TE, Erz DHR, Bartram CR. Improved detection of minimal residual leukemia through modifications of polymerase chain reaction analyses based on clonospesific T-cell receptor junctions. *Leukemia*. 1995; 9: 316-320.

59. Jahresbericht 2000 des Kinderkrebsregisters Mainz .
60. Hjalgrim LL, Rostgaard K, Schmiegelow K, Söderhäll S, Kolmannskog, Kim Vettenranta S, Kristinsson J, Clausen N, Melbye N, Hjalgrim H, Gustafsson G. Age- and Sex-specific Incidence of Childhood Leukemia by Immunophenotype in the Nordic Countries. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003; 95: 1539-1544.
61. Swensen AR, Ross JA, Severson RK, Pollock BH, Robison LL. The age peak in childhood acute lymphoblastic leukemia: Exploring the potential relationship with socioeconomic status. *Cancer*. 1997; 79: 2045-51.
62. McNally RJQ, Rowland D, Roman E, Carwright RA. Age and sex distributions of hematological malignancies in the UK. *Hematologic Oncology*. 1997; 15: 173-189.
63. Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robinson LL. Incidence of cancer in children in the United States: Sex-, race-, and 1 year age-specific rates by histologic type. *Cancer*. 1995; 75: 2186-2195.
64. Hjalgrim LL, Rostgaard K, Hjalgrim H, Westergaard T, Thomassen H, Forestier E, Gustafsson G, Kristinsson J, Melbye M, Schmiegelow K. Birth Weight and Risk for Childhood Leukemia in Denmark, Sweden, Norway, and Iceland . *Journal of the National Cancer Institute*. 2004; 96: 1549-1556.

65. Stark B, Sharon R, Rechavi G, Attias D, Ballin A, Cividalli G, Burstein Y, Sthoeger D, Abramov A, Zaizov R. Effective preventive central nervous system therapy with extended tripele intrathecal therapy and the modified ALL-BFM 86 chemotherapy program in an enlarged non-highrisk group of children and adolescents with non-B-cell acute lymphoblastic leukemia: the Israel National study report. *Cancer*. 2000; 88: 205-216.
66. Moorman AV, Richards SM, Martinau M, Cheung KL, Robinson HM, Jalali GR, Broadfield ZJ, Harris RL, Taylor KE, Gibson BES; Hann IM, Hill FGH, Kinsey SE, Eden TO, Mitchell CD, Harrison CJ. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2003, 102: 2756-2762.
67. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, Gelber R, Heerema N, Korn EL, Murphy S, Pui CH, Pullen J, Reaman G, Sallan Se, Sather H, Shuster J, Simon R, Trigg M, Tubergen D, Uckun F, Ungerleider R. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 1996; 14: 18-24.
68. Maloney, KW, Shuster JJ, Murphy S, Pullen J, Camitta BA. Long-term results of treatment studies for childhood acute lymphoblastic leukemia: Pediatric Oncology Group studies from 1986-1994. *Leukemia*. 2000; 14: 2276-2285.
69. Simone JV, Verzosa MS, Rudy JA. Initial features and prognosis in 363 children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 1975; 36: 2099-2108.

-
70. Sather HN. Age at diagnosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Medical Pediatric Oncology*. 1986; 14 (3):166-172. *Medical and Pediatric Oncology*. 1986; 14(3): 166-72.
71. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Arkin S, Declerk L, Cohen HJ, Sallan. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia. Results of Dana Faber Consortium Protocol 91-01. *Blood*. 2001; 97: 1211-1218.
72. Reaman G, Zeltzer P, Bleyer WA, Amendola B, Sather H. Acute lymphoblastic leukemia in infants less than 1 year of age: a cumulative experience of the children cancer study group. *Journal of Clinical Oncology*. 1985; 3:1513-1521.
73. Pui CH, Kane JR, Christ WM. Biology and treatment of infant leukemias. *Leukemia*. 1995; 9: 762-769.
74. Crist W, Pullen J, Boyett J, Falletta J, van Eys J, Borowitz M, Jackson J, Dowell B, Russell C, Qudus F. Acute lymphoid leukemia in adolescents: clinical and biologic features predict a poor prognosis - A Pediatric Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*. 1988; 6: 34-43.
75. Chen CS, Sorensen PH, Domer PH, Reaman Gh, KOrsmeyer SJ, Heerema NA, Hammond GD, Kersey JH. Molecular rearrangements on chromosom 11q23 predominate in infante acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 1993; 81: 2386-2393.
76. Rubnitz JE, Link MP, Shuster JJ , Carroll AJ, Hakami N, Frankel LS, Pullen DJ and Cleary MI. Frequency and prognostic significance

- of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1994; 84: 570-573.
77. Hilden JM, Frestedt JL, Moore RO, Heerema NA, Arthur DC, Reaman GH, Kersey JH. Molecular analysis of infant acute lymphoblastic leukemia: MLL gene rearrangement and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for t(4; 11)(q21; q23). *Blood*. 1995; 86: 3876 - 3882.
78. Cimino G, Lo Coco F, Biondi A. , Elia L, Luciano A, Croce CM, Maserà G, Mandelli F, Canaani E. ALL-1 gene at chromosome 11q23 is consistently altered in acute leukemia of early infancy. *Blood*. 1993; 82: 544-546.
79. Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H, Zimin-van der Poel S, Kaneko Y, Morgan R, Sandberg AA. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *New England Journal of Medicine*. 1993; 329: 909-14.
80. Stam RW, Den Boer ML, Meijerik JP, Ebus MEG, Peters GJ, Noordhuis P, Janka-Schaub GE, Armstrong SA, Korsmeyer SJ, Pieters R. Differential mRNA expression of Ara-C-metabolizing enzymes explains Ara-C sensitivity in MLL-gene rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2003; 101: 1270-1276.
81. Hann I, Vora A, Harrison G, Harrison C, Eden O, Hill F, Gibson B, Richards S. UK Medical Research Council's Working Party on Childhood Leukaemia. Determinants of outcome after intensified therapy of childhood lymphoblastic leukemia: Results from Medical Research Council UK acute lymphoblastic leukemia IX protocol. *British Journal of Haematology*. 2001; 113: 103-114.

82. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, Zhang T, Hutchinson RJ, Nachman JB, Lange BJ, Steinherz PG, Bostrom BC, Reaman GH, Gaynon PS, Uckun F. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (>50 chromosomes). *Journal of Clinical Oncology*. 2000; 18: 1876-1887.
83. Pui CH, Carroll AJ, Haed D, Raimondi SC, Shuster JJ, Crist WM, Link LP, Borowitz MJ, Behm FG, Land VJ. Near-triploid and near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood*.1990; 76: 590 - 596.
84. Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A, Granada I, Hernandez-Rivas JN, Parody R. Prognostic value of karyotypic analysis in children and adults with high-risk acute lymphoblastic leukemia included in the PETHMA ALL-93 trial. *Haematologica*.2002; 87:154-166.
85. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Henze G, Gadner H, Odenwald E, Riehm H. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to1995. *Leukemia*. 2000; 14: 2205-2222.
86. Visser JH, Wessels G, Hesseling PB, Louw I, Oberholster E, Mansveldt EPG. Prognostic value of day 14 blast percentage and the absolute blast index in bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Hematologic and Oncology*. 2001; 18: 187-191.
87. Rubnitz JE, Lensing S, Zhou Y, Sandlund JT, Razzouk B, Ribeiro RC, Pui CH. Death during induction therapy and first remission of acute leukemia in childhood: St. Jude experience. *Cancer*. 2004; 101: 1677-1684.

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 second remission: a matched pair analysis. *Blood*. 2003; 101: 3835-3839.
89. Quaranta BP, Halperin EC, Krutzberg J, Clough R, Martin PL. The incidence of testicular recurrence in boys with acute leukemia treated with total body irradiation and stem cell transplantation. *Cancer* 2004; 101: 845-850.
90. Kimball-Dalton VM, Gelber RD, Li F, Donnelly MJ, Tarbell NJ, Sallan E. Second malignancies in patients treated for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology*. 1998; 16: 2848-2853.
91. Löning L, Zimmermann M, Reiter A, Kaatsch P, Henze G, Riehm H, Schrappe. Secondary neoplasm subsequent to BFM therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: Significant lower risk without cranial radiotherapy. *Blood*. 2000; 95: 2770-2775.
92. Chessells JM, Veys P, Kempster H, Henley P, Leiper A, Webb D, Hann IM. Long-term follow-up of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *British Journal of Haematology*. 2003; 123: 396-405.
93. Goulden NJ, Knechtli CJ, Garland RJ, Langlands K, Hancock JP, Potter MN, Steward CG, Oakhill A. Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *British Journal of Haematology*. 1998; 100: 235-244.

94. Foroni L, Coyle LA, Papaioannou M, Yaxley JC, Cole Sinclair MF, Chim JS, Cannell P, Secker-Walker LM, Mehta AB, Prentice HG, Hoffbrand AV. Molecular detection of minimal residual disease in adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia reveals differences in treatment response. *Leukemia*. 1997; 11: 1732-1741.
95. Templeton NS. The Polymerase chain reaction. History, methods and applications. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992; 1: 58-72.
96. Cave H, Van der Werff Ten Bosch J, Suci S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1998; 339: 591-598.
97. Van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grünmayer ER, Biondi A, Pongers Willemse MJ, Corral L. Prognostic value of minimal residual disease in lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet*. 1998; 352: 1731-1738.
98. Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Beyersmann B. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Lancet*. 2001; 358: 1239-41.
99. 98 Van Dongen JJ, Szczepanski T, De Bruijn MA, Van Den Beemd MW, De Brun Versteeg S, Wijkhuijs JM. Detection of minimal Residual disease in acute leukemia patients. *Cytokines Molecular Therapy*. 1996; 2: 121-123.

100. Campana, D. Review: Determination of minimal residual in leukaemia patients. *British Journal of Haematology* 2003; 121: 823-838.
101. Szczepanski T, Orfao A, Van Der Velden VH, San Miguel JF, Van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukemia patients. *Oncology*. 2001; 2:409-417.
102. Beishuizen A, Hahlen K, Hagemeyer A, Verhoeven MA, Hooijkaas H, Adriaansen HJ, Wolvers-Tettero IL, van Wering ER, van Dongen JJ. Multiple rearranged immunoglobulin genes in childhood acute lymphoblastic leukemia of precursor B-cell origin. *Leukemia*. 1991; 5: 657-67.
103. Van der Welden VH, Willemse MJ, Van der Schott CE, Hahlen K, Van Wering ER, Van Dongen JJ. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2002; 16: 928-936.
104. Beizhuisen A, Verhoeven MA, Mol EJ, Van Dongen JJ. Detection of immunoglobulin K light-chain gene rearrangement pattern by Southern blot analysis. *Leukemia*. 1994; 8: 2228-2236.
105. Gutjahr, Peter. *Krebs bei Kindern und Jugendlichen*. Deutscher Ärzte-Verlag. 5. Auflage 2004.
106. Gaynon PS, Qu RP, Chappell RJ, Willoughby ML, Tubergen DG, Steinherz PG, Trigg ME. Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: Impact of site and time to first relapse. The children's Cancer Group Experience. *Cancer*. 1998; 82: 1387-95.

107. Rivera GK, Zhou Y, Hancock ML, Gajjar A, Rubnitz J, Ribeiro RC, Sandlund JT, Hudson M, Relling M, Evans WE, Pui CH. Bone marrow recurrence after initial intensive treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2005; 103: 368-76.
108. Bende RJ, Aarts WM, Pals ST, Van Noesel. Immunoglobulin diversification in B- cell malignancies: internal splicing of heavy chain variable region as a by- product of somatic hypermutation. *Leukemia*. 2002; 16 (4): 636-644.
109. Biondi A, Francia DC, Rossi V, Casorati G, Matullo G, Giudici G, Foa R, Migone N. High prevalence of T-cell receptor V delta 2-(D)-D delta 3 or D delta 1/2-D delta 3 rearrangements in B-precursor acute lymphoblastic leukemias. *Blood*. 1990. 75 (9): 1834-1840.
110. Bird J, Galili N, Link M, Stites D, Sklar J. Continuing rearrangement but absence of somatic hypermutation in immunoglobulin genes of human B cell precursor leukemia. *Journal of experimental medicine*. 1988. 168 (1): 229-245.
111. Bunin NJ, Raimondi SC, Mirro J, Behm FG, Goorha R, Kitchingman GR. Alterations in immunoglobulin or T cell receptor gene rearrangements at relapse: involvement of 11q23 and changes in immunophenotype. *Leukemia*. 1990. 4 (11): 727-731.
112. Kitchingman GR, Mirro J, Stass S, Rovigatti U, Melvin SL, Williams DL, Raimondi SC, Murphy SB. Biologic and prognostic significance of the presence of more than two μ heavy- chain genes in childhood acute lymphoblastic leukemia of B precursor cell origin. *Blood*. 1986. 67 (3): 698-703.

113. Li A, Rue M, Zhou J, Wang H, Goldwasser, Neuberger D, Dalton, Zuckerman D, Lyons C, Silverman LB, Sallan SE, Grbbs JG. Utilization of Ig heavy chain variable, diversity, and joining gene segments in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia: implications for the mechanisms of VDJ recombination and for pathogenesis. *Blood*. 2004. 103 (12): 4602-4609.
114. Moreira I, Papaioannou M, Mortuza FY, Gameiro P, Palmisano GL, Harrison CJ, Prentice HG, Metha AB, Hoffbrand AV, Foroni L. Heterogeneity of VH-JH gene rearrangement patterns: an insight into the biology of B cell precursor ALL. *Leukemia*. 2001. 15 (10): 1527-1536.
115. Raghavachar A, Thiel E, Bartram CR. Analysis of phenotype and genotype in acute lymphoblastic leukemias at first presentation and in relapse. *Blood*. 1987. 70 (4): 1079-1083.
116. Sandberg Y, Heule F, Lam K, Lugtenburg PJ, Wolvers-Tettero IL, Van Dongen JJ, Langerak AW. Molecular immunoglobulin/ T-cell receptor clonality analysis in cutaneous lymphoproliferations. Experience with the BIOMED-2 standardized polymerase chain reaction protocol. *Haematologica*. 2003. 88 (6): 659-670.
117. Seeger K, Taube T, Eckert C, Hanel C, Pogodda M, Henze G. Unusual T cell receptor delta gene rearrangement pattern revealed by screening of large series of childhood acute lymphoblastic leukemia by multiplex polymerase chain reaction. *British Journal of Haematology*. 2001. 113 (2): 318-322.
118. Steward CG, Goulden NJ, Katz F, Baines D, Martin PG, Langlands K, Potter MN, Chessells JM, Oakhill A. A polymerase chain reaction study of the stability of Ig heavy chain and T cell

- receptor delta gene rearrangements between presentation and relapse of childhood B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1994. 83 (5): 1355-1362.
119. Szczepanski T, Van der Velden VH, Jacobs DC, Van Wering ER, Bruggemann M, Kneba M, Van Dongen JJ. Comparative analysis of T cell receptor gene rearrangements at diagnosis and relapse of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T ALL. *Leukemia*. 2003. 17 (11): 2149-2156.
120. Wassermann R, Yamada M, Ito Y, Finger LR, Reichard BA, Shane S, Lange B, Rovera G. VH gene rearrangement events can modify the immunoglobulin heavy chain during progression of B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1992. 79 (1): 223-228.
121. Williams ME, Innes DJ, Borowitz MJ, Lovell MA, Sherdlow SH, Hurtubise PE, Brynes RK, Chan WC, Byrne GE, Withcomb CC. Immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements in human lymphoma and leukemia. *Blood*. 1987. 69 (1): 79-86.
122. 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. *Journal of Clinical Oncology*. 1987. 5 (5): 735-741.
123. Bader P, Kreyenberg H, Hölle W, Dückers G, Handgretinger R, Lang B, Kremens D, Dilloo KW, Sykora M, Schrapppe M, Niemeyer C, v. Stackelberg B, Gruhn B., Henze G, Greil J, Niethammer D, Dietz K, Beck JF, Klingebiel T. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with ALL after

allogeneic SCT- Possible role for preemptive immunotherapy?
Journal of clinical Oncology. 2004; 22 (9): 1696-1705.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Bader für die freundliche Aufnahme in sein Labor und die Überlassung des Dissertationsthemas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hermann Kreyenberg für die hervorragende Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die stets freundliche und unermüdliche Anleitung bei den Laboruntersuchungen. Seine wertvolle Unterstützung bei der Durchführung und beim Abfassen der Arbeit war mir eine unschätzbare Hilfe.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem gesamten Team des Chimärismuslabors für die Hilfsbereitschaft, die nette Zusammenarbeit und die sehr angenehme Atmosphäre.

Danken möchte ich auch meinen Eltern und meinem Bruder für den familiären Rückhalt.

Lebenslauf

Yasemin Yarkin

geboren am 05.09.1974 in Stuttgart

- 1981 Einschulung in die Grundschule Süd in Leinfelden.
- 1985 Wechsel auf das Immanuel Kant Gymnasium in Leinfelden.
- 1994 Wechsel auf das Schickhardt Gymnasium nach Stuttgart.
- 1996 Erwerb des Abiturs am Schickhardt Gymnasium.
- 1997 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Tübingen.
- 2000 Ärztliche Vorprüfung an der Universität Tübingen.
- 2000 Famulatur an der Kinderklinik Dona Estefania in Lissabon, Portugal.
- 2002 Famulatur an der Universitäts-Frauenklinik Fundao,
in Rio de Janeiro, Brasilien.
- 2002 1. Staatsexamen an der Universität Tübingen.
- 2003 Ehrenamtliche Teilnahme an einem medizinischen Hilfsprojekt in Petit
Goave, Haiti.
- 2005 Ehrenamtliche Teilnahme an einer Aktion der Deutschen
Knochenmarkspenderdatei (DKMS) in Tübingen.
- 2005 2. Staatsexamen an der Universität Tübingen.
- 2005 Praktisches Jahr:
1. Tertial: Innere Medizin an der Medizinischen Universitätsklinik
Tübingen.
2. Tertial: Chirurgie an der Universitätsklinik Tübingen (Herz- Thorax-
und Gefäßchirurgie sowie Unfallchirurgie).
3. Tertial: Pädiatrie; erste Hälfte an der Universitätskinderklinik in
Havanna, Kuba. Zweite Hälfte an der Universitätskinderklinik in
Tübingen.
- 09.05.2006 3. Staatsexamen an der Universität Tübingen.
- Seit April 2007 Assistenzärztin an der Kinderklinik Idar-Oberstein.