

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung I  
(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Analyse der minimalen Resterkrankung  
im peripheren Blut  
nach allogener Stammzelltransplantation  
bei Kindern mit ALL**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen

vorgelegt von

YVONNE WANNER  
aus Böblingen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Bader

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Brossart

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Akute Lymphatische Leukämie .....	1
1.2 Die Stammzelltransplantation .....	3
1.2.1 Die autologe Stammzelltransplantation .....	4
1.2.2 Die allogene Stammzelltransplantation .....	5
1.3 Indikationen für eine allogene Stammzelltransplantation bei Kindern mit ALL .....	6
1.4 Komplikationen der allogenen Stammzelltransplantation .....	7
1.4.1 Therapieassoziierte Früh- und Spättoxizität .....	7
1.4.2 Infektion .....	7
1.4.3 Non-Engraftment und Abstoßung .....	8
1.4.4 Akute und chronische Graft-versus-Host Disease .....	8
1.4.5 Rezidiv .....	10
1.5 Möglichkeiten der Rezidivfrüherkennung .....	11
1.5.1 Analyse des hämatopoetischen Chimärismus .....	12
1.5.2 Messung der minimalen Resterkrankung .....	13
1.5.2.1 Flowzytometrische Immunphänotypisierung .....	13
1.5.2.2 PCR-Analyse chromosomaler Anomalien .....	14
1.5.2.3 PCR-Analyse klonspezifischer DNA-Rearrangements der Immunglobulin (Ig)- und T-Zellrezeptor (TCR) Gene .....	15
<b>2. Material</b> .....	<b>21</b>
2.1 Untersuchungsmaterial .....	21
2.2 Reagenzien .....	21
2.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen .....	21
2.2.2 DNA-Isolation .....	21
2.2.3 Screening-PCR .....	22
2.2.4 Gelelektrophorese und Gelentwicklung .....	22
2.2.5 Sequenzanalyse .....	23
2.2.5.1 Aufreinigung der DNA .....	23
2.2.5.2 Sequenzierreaktion .....	23
2.2.5.3 Ethanolfällung .....	23
2.2.6 Real-time PCR .....	23
2.3 Kunststoff- und Glasartikel .....	24
2.4 Geräte und Computerprogramme .....	25
<b>3. Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.1 Methoden im Überblick .....	26
3.2 Isolierung mononukleärer Zellen (MNC) durch Dichtegradientenzentrifugation und Zellzählung .....	26
3.3 DNA-Isolation .....	28
3.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA .....	28
3.5 Screening-PCR zur Identifizierung der patientenspezifischen Rearrangements .....	29
3.5.1 Primerkombinationen .....	30

3.5.2	Ablauf der Screening-PCR .....	32
3.5.3	Gelelektrophorese der PCR-Produkte .....	34
3.5.3.1	Herstellung der Gele .....	34
3.5.3.2	Gelelektrophorese .....	35
3.5.3.3	Färben der Gele .....	35
3.5.3.4	Fotodokumentation der Gele .....	35
3.6	Sequenzanalyse der identifizierten patientenspezifischen Rearrangements .....	36
3.6.1	Aufreinigung der Target-DNA .....	37
3.6.2	Sequenzierreaktion .....	38
3.6.3	Ethanol-fällung .....	39
3.6.4	DNA-Sequenzierung im ABI™Prism 310 Genetic Analyzer und Sequenzanalyse .....	40
3.7	Herstellung der patientenspezifischen Primer .....	41
3.8	Messung der minimalen Resterkrankung mit der Real-time PCR .....	42
3.8.1	Funktionsprinzip der Real-time PCR .....	42
3.8.2	Sensitivitätstestung der Primer .....	50
3.8.3	Ablauf einer Real-time PCR zur Analyse der minimalen Resterkrankung .....	52
3.8.4	Interpretation der mit der Real-time PCR generierten Daten .....	54
<b>4.</b>	<b>Patienten .....</b>	<b>57</b>
4.1	Patientenkollektiv .....	57
4.2	Patiententabellen .....	58
4.3	Statistische Methoden und Tests .....	61
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
5.1	Sensitivität der Real-time PCR .....	63
5.2	Einteilung der Patienten in MRD-Gruppen .....	64
5.3	Verteilung der MRD-Gruppen innerhalb der ALL-Subgruppen .....	65
5.4	Betrachtung des klinischen Verlaufes der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation .....	66
5.4.1	Klinischer Verlauf aller untersuchten Patienten .....	66
5.4.2	Klinischer Verlauf der Patienten in Abhängigkeit der MRD-Gruppe .....	69
5.4.3	Klinischer Verlauf der Patienten in Abhängigkeit von der ALL-Subgruppe .....	74
5.4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	78
5.6	Bedeutung der Messung der MRD im Peripherblut bei Patienten mit Rezidiv im Verlauf nach allogener Stammzelltransplantation .....	79
5.6.1	Betrachtung des Zeitabstandes zwischen allogener Stammzelltransplantation und Auftreten des Rezidives .....	80
5.6.2	Betrachtung des Intervalls zwischen MRD-Positivität im Peripherblut und Auftreten des Rezidives .....	82
5.7	Bedeutung der Höhe und Dynamik der MRD im Peripherblut nach allogener Stammzelltransplantation für die Wahrscheinlichkeit eines Rezidives .....	85
5.7.1	Übersicht über die gemessenen MRD-Werte der Patienten im Peripherblut .....	85
5.7.2	Individuelle Verläufe .....	93
5.7.2.1	Individuelle Verläufe der MRD im Peripherblut bei Patienten, die ein Rezidiv erlitten haben .....	93
5.7.2.2	Individuelle Verläufe der MRD im Peripherblut bei Patienten mit positiven MRD-Befunden ohne Auftreten eines Rezidives .....	110
5.8	Vergleich der gemessenen MRD-Befunde im Peripherblut mit den MRD-Befunden im Knochenmark .....	120
5.8.1	Vergleich der Höhe und des Vorkommens der MRD-Last zwischen Peripherblut und Knochenmark .....	120

5.8.2 Vergleich des Zeitpunktes des Nachweises der MRD im Peripherblut und im Knochenmark bei Patienten mit Rezidiv .....	125
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>128</b>
6.1 Methode .....	128
6.2 Allgemeine Bedeutung der MRD bei Kindern mit ALL .....	130
6.3 Bedeutung der MRD bei Kindern mit ALL nach allogener Stammzelltransplantation.....	131
6.4 Ergebnisse der Untersuchung der MRD im Peripherblut.....	131
6.4.1 Betrachtung der Patienten der MRD high Gruppe.....	132
6.4.2 Betrachtung der Patienten der MRD low Gruppe .....	134
6.4.3 Betrachtung der Patienten der MRD negativ Gruppe.....	135
6.4.4 Möglichkeiten der Intervention in Form einer adjuvanten Immuntherapie basierend auf den MRD-Daten.....	136
6.5 Vergleich der gemessenen MRD-Befunde im Peripherblut mit den MRD-Befunden im Knochenmark.....	137
6.5.1 Vergleich der Höhe und des Vorkommens der MRD-Last zwischen Peripherblut und Knochenmark .....	137
6.5.2 Vergleich des Zeitpunktes des Nachweises der MRD im Peripherblut und im Knochenmark bei Patienten mit Rezidiv .....	139
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>141</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>X</b>
<b>Danksagung</b>	<b>XXII</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>XXIII</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammengefasste Darstellung verschiedener Klassifikationsmöglichkeiten der ALL .....	2
Tabelle 2: Einteilung der Patienten in die Risikogruppen S1 bis S4 gemäß der Definition der Studien BFM 95/96 .....	10
Tabelle 3: Primer für die Screening-PCR und Sequenzanalyse .....	32
Tabelle 4: Darstellung der verwendeten Primer und TaqMan Sonden für die Real-time PCR.....	50
Tabelle 5: Patiententabelle .....	59
Tabelle 6: Überblick über wichtige Kenndaten des gesamten Patientenkollektives .....	61
Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse .....	78
Tabelle 8: MRD-Werte des gesamten Patientenkollektives.....	87
Tabelle 9: Darstellung aller MRD-Werte pro Patient.....	90
Tabelle 10: Übersicht Patienten mit positiven MRD-Befunden ohne Auftreten eines Rezidives .....	110

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Rearrangementprozesses am Beispiel des IgH Lokus .....	17
Abbildung 2: Methoden im Überblick .....	26
Abbildung 3: Ergebnis einer Screening-PCR der Blasten-DNA eines Patienten .....	36
Abbildung 4: Sequenzanalyse eines patientenspezifischen Rearrangements .....	40
Abbildung 5: Position des Forward Primers, der TaqMan Sonde und des Reverse Primers innerhalb des Rearrangments .....	42
Abbildung 6: Funktionsprinzip der Real-time PCR .....	44
Abbildung 7: Ct-Werte der Verdünnungsstufen 10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-5</sup> der Standardreihe.....	46
Abbildung 8: Standardgerade .....	46
Abbildung 9: Auswertung der Daten mit der Sequence Detector v1.7 Software am Beispiel von 5 Folgeproben eines Patienten .....	47
Abbildung 10: Ct-Werte des Albuminstandards .....	48
Abbildung 11: Auswertung des Albuminstandards mit der Sequence Detector v1.7 Software .....	49
Abbildung 12: Pipettierschema einer 96-Well-Reaktionsplatte zur Messung der MRD .....	54
Abbildung 13: Darstellung der erzielten maximalen Sensitivitäten.....	63
Abbildung 14: Verteilung der MRD-Gruppen innerhalb des Patientenkollektives .....	64
Abbildung 15: Verteilung der ALL-Subgruppen innerhalb des Patientenkollektives .....	65
Abbildung 16: Darstellung des Rezidivfreien Überlebens (RFS) des Patientenkollektivs .....	67
Abbildung 17: Darstellung des Ereignisfreien Überlebens (EFS) des Patientenkollektivs .....	68
Abbildung 18: Klinischer Verlauf in Abhängigkeit von der MRD-Gruppe.....	69
Abbildung 19: Darstellung des Rezidivfreien Überlebens (RFS) der Gruppen MRD positiv und MRD negativ .....	70
Abbildung 20: Darstellung des Ereignisfreien Überlebens (EFS) der Gruppen MRD positiv und MRD negativ .....	71

Abbildung 21: Darstellung des Rezidivfreien Überlebens (RFS) der Gruppen MRD high, MRD low und MRD negativ .....	72
Abbildung 22: Darstellung des Ereignisfreien Überlebens (EFS) der Gruppen MRD high, MRD low und MRD negativ .....	73
Abbildung 23: Klinischer Verlauf innerhalb der ALL-Subgruppen .....	74
Abbildung 24: Darstellung des Rezidivfreien Überlebens (RFS) der ALL-Subgruppen.....	76
Abbildung 25: Darstellung des Ereignisfreien Überlebens (EFS) der ALL-Subgruppen.....	77
Abbildung 26: Verteilung des Chimärismusstatus des Patientenkollektives und der MRD-Gruppen.....	78
Abbildung 27: Darstellung der Rezidivtage der einzelnen Patienten.....	80
Abbildung 28: Darstellung der Rezidivtage innerhalb eines Zeitintervalls von 100 Tagen .....	81
Abbildung 29: Vorkommen einer MRD-Last im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives.....	82
Abbildung 30: Darstellung der Tage Differenz zwischen erster positiver Probe und Auftreten des Rezidives der einzelnen Patienten.....	83
Abbildung 31: Darstellung der Tage Differenz zwischen erster positiver Probe und Auftreten des Rezidives in einem Intervall von 30 Tagen ..	83
Abbildung 32: Höhe der ersten gemessenen MRD-Werte im Peripherblut .....	84
Abbildung 33: Patient UPN 2056 .....	94
Abbildung 34: Patient UPN 2116 .....	94
Abbildung 35: Patient UPN 2266 .....	95
Abbildung 36: Patient UPN 2043 .....	97
Abbildung 37: Patient UPN 1756 .....	98
Abbildung 38: Patient UPN 2217 .....	98
Abbildung 39: Patient UPN 1776 .....	99
Abbildung 40: Patient UPN 2346 .....	99
Abbildung 41: Patient UPN 2451 .....	100
Abbildung 42: Patient UPN 2445 .....	100
Abbildung 43: Patient UPN 1965 .....	101
Abbildung 44: Patient UPN 2478 .....	103
Abbildung 45: Patient UPN 2298 .....	104
Abbildung 46: Patient UPN 2560 .....	105
Abbildung 47: Patient UPN 1793 .....	106



Abbildung 48: Patient UPN 1820 .....	106
Abbildung 49: Patient UPN 2613 .....	107
Abbildung 50: Patient UPN 2105 .....	108
Abbildung 51: Patient UPN 2119 .....	109
Abbildung 52: Patient UPN 1891 .....	111
Abbildung 53: Patient UPN 1926 .....	111
Abbildung 54: Patient UPN 2276 .....	112
Abbildung 55: Patient UPN 1615 .....	113
Abbildung 56: Patient UPN 1737 .....	114
Abbildung 57: Patient UPN 2488 .....	114
Abbildung 58: Patient UPN 1718 .....	116
Abbildung 59: Patient UPN 1889 .....	116
Abbildung 60: Patient UPN 2366 .....	117
Abbildung 61: Patient UPN 1753 .....	117
Abbildung 62: Patient UPN 2059 .....	118
Abbildung 63: Patient UPN 2060 .....	118
Abbildung 64: Darstellung der Verteilung der MRD-Werte aller Patienten im Knochenmark und im Peripherblut.....	121
Abbildung 65: Darstellung der Verteilung der MRD im Knochenmark und im Peripherblut bei Patienten mit einer T-ALL .....	123
Abbildung 66: Darstellung der Verteilung der MRD im Knochenmark und im Peripherblut bei Patienten mit einer Vorläufer B-ALL.....	124

## Abkürzungsverzeichnis

<b>aGvHD</b>	akute Graft-versus Host Erkrankung
<b>allo-SZT</b>	allogene Stammzelltransplantation
<b>ALG</b>	Anti-Lymphozyten-Globulin
<b>ALL</b>	Akute Lymphatische Leukämie
<b>AR</b>	Autologe Rekonstitution
<b>ASO</b>	Allel-spezifisches Oligonukleotid
<b>ATG</b>	Anti-Thymozyten-Globulin
<b>BUCY</b>	Busulfan und Cyclophosphamid
<b>Bus</b>	Busulfan
<b>CC</b>	Kompletter Chimärismus
<b>CD</b>	Oberflächendifferenzierungsantigen
<b>cGvHD</b>	chronische Graft-versus-Host Erkrankung
<b>CR</b>	Komplette Remission
<b>CSA</b>	Cyclosporin A
<b>Ct</b>	Cycle Treshold
<b>Cyc</b>	Cyclophosphamid
<b>dNTP</b>	Desoxynukleotidtriphosphat
<b>ddNTP</b>	Didesoxynukleotidtriphosphat
<b>decreasing MC</b>	abnehmender gemischter Chimärismus
<b>DLI</b>	Donor-Spender-Lymphozyten-Infusion
<b>DNA / DNS</b>	Desoxynukleotidsäure
<b>EBMF</b>	European Group für Blood and Marrow Transplantation
<b>EFS</b>	Ereignisfreies Überleben
<b>EGIL</b>	European Group of Immunolglcal Characterization of Leukemias
<b>ESG-MRD-ALL</b>	European Study Group on MRD in ALL
<b>Eto</b>	Etoposid
<b>FAB</b>	French-American-British
<b>Flu</b>	Fludarabin
<b>G-CSF</b>	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
<b>GvHD</b>	Graft-versus-Host Erkrankung
<b>GvL</b>	Graft-versus-Leukemia
<b>Haplo</b>	Haploidentisch
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>increasing MC</b>	zunehmender gemischter Chimärismus
<b>KM</b>	Knochenmark
<b>Ltopo</b>	Ltopophos

lowlevel MC	konstant gemischter Chimärismus auf niedrigem Niveau
<b>m</b>	männlich
<b>MC</b>	Gemischter Chimärismus
<b>MD</b>	Matched Donor / HLA-identischer Spender
<b>MFD</b>	Matched Family Donor / HLA-identischer Familienspender
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex
<b>MMD</b>	MisMatched Donor / nicht-HLA-identischer Spender
<b>MMFD</b>	MisMatched Family Donor / nicht-HLA-identischer Familienspender
<b>MMUD</b>	MisMatched Unrelated Donor / nicht-HLA-identischer Fremdspender
<b>MRD</b>	Minimale Resterkrankung
<b>MSD</b>	Matched Sibling Donor / HLA-identischer Geschwisterspender
<b>MUD</b>	Matched Unrelated Donor / HLA-identischer Fremdspender
<b>n</b>	Anzahl
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>NTP</b>	Nukleotidtriphosphat
<b>OKT 3</b>	monoklonale Lymphozyten-Antikörper
<b>PB</b>	Peripherblut
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>Pred</b>	Prednison
<b>RAG</b>	recombinase activating genes
<b>RFS</b>	Rezidivfreies Überleben
<b>RSS</b>	recombination-signal-sequence
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkription-PCR
<b>RZ</b>	Rezidiv
<b>STR</b>	Short-Tandem-Repeats
<b>SZ</b>	Stammzelle
<b>SZT</b>	Stammzelltransplantation
<b>TCR</b>	T-Zellrezeptor
<b>TBI</b>	Ganzkörperbestrahlung
<b>TdT</b>	Terminale desoxynucleotid Transferase
<b>Thio</b>	Thiotepa
<b>TRM</b>	Therapieassoziierte Mortalität
<b>UPN</b>	Patientennummer
<b>VNTR</b>	Variable Number of Tandem Repeats
<b>VOD</b>	Venenverschlusskrankheit
<b>w</b>	weiblich
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Akute Lymphatische Leukämie

Leukämien sind mit 35% die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter. Im Vordergrund steht die Akute Lymphatische Leukämie (ALL), welche 80% der akuten Leukämien ausmacht. Am häufigsten betroffen ist die Altersgruppe zwischen dem ersten und fünften Lebensjahr, wobei Jungen häufiger betroffen sind als Mädchen (Verhältnis 3:2).

Die ALL beruht auf der Expansion einer lymphatischen Vorläuferzelle, die zu andauernder Proliferation und Verlust der weiteren Differenzierung führt. Bis heute ist die genaue Pathogenese nicht bekannt. Es scheint ein Zusammenwirken genetischer, immunologischer und wachstumsregulierender Vorgänge, beeinflusst von exogenen Faktoren, bedeutend für die Pathogenese der Leukämie zu sein.<sup>38,55,57</sup>

Eine Klassifikation der ALL kann erfolgen anhand:

- 1) Zytomorphologie: Die FAB (French-American-British)- Klassifikation unterscheidet drei Typen von Lymphoblasten (L1-L3).
- 2) Immunophänotypisierung: EGIL- Klassifikation (European Group of Immunological Characterization of Leukemias)
- 3) Nachweis genetischer Aberrationen wie z.B. Translokationen (z.B. t(9;22) bzw. Philadelphia-Chromosom)

Tabelle 1 gibt einen Überblick über verschiedenen Klassifikationsmöglichkeiten der ALL.

**Tabelle 1: Zusammengefasste Darstellung verschiedener Klassifikationsmöglichkeiten der ALL**

**Erläuterungen:** CD = Oberflächendifferenzierungsantigen; FAB = French-American-British; HLA = Human Leukocyte Antigen; Ig = Immunglobulin; L = Lymphoblasten; t = Translokation; TCR = T-Zellrezeptor; TdT = Terminale desoxynucleotid Transferase

EGIL-Klassifikation	Differenzierungsantigene	genetische Aberrationen	FAB-Klassifikation
<b>B- Linien ALL</b>	2 von 3 positiv: CD19, CD79a, CD22 meist auch TdT+, HLA-DR+		
BI : Pro-B-ALL	keine weiteren B-Zell- Differenzierungsantigene	t (4;11) AF4-MLL	L1, L2
BII : Common ALL	CD10+		L1, L2
BIII: Pre-B-ALL	zytoplasmatisches IgM+	t(1;19) E2A-PBX1	L1, L2
BI - BIII:		t(12;21) TEL-AML1	
B-Vorläufer-ALL		t(9;22) BCR-ABL	
BIV: Reife B-ALL	zytoplasmatisches oder Oberflächenkappa oder lambda+	t(8;14) c-myc	L3
<b>T-Linien ALL</b>	zytoplasmatisches /Oberflächen CD3+ meist TdT+, HLA-DR-, CD34- CD7+	t (1;14) TAL1/SCL-TCL5 t(11;14) TTG1-TTG2	L1, L2
TI : Pro-T-ALL	CD2 u/o CD5 u/o CD8+		L1,L2
TII : Pre-T-ALL			L1,L2
TIII: Kortikale T-ALL			L1,L2
TIV:Reife T-ALL	Oberflächen CD3+, CD1a-		L3
alpha/beta+ T-ALL (Gruppe a)	Anti-TCR alpha/beta +		
gamma/delta+ T-ALL (Gruppe b)	Anti-TCR gamma/delta +		
ALL mit Expression myeloischer Marker	CD13, CD 33, CD41, CD117	t (9;22) BCR-ABL	

Durch die enormen Fortschritte in der Therapie der ALL, wie der Einführung der Polychemotherapie in den 60er Jahren und der prophylaktischen ZNS- Behandlung, können heute 60-85% der Patienten geheilt werden. Erstes Ziel der Therapie ist das Erreichen einer kompletten Remission, was heute in bis zu 98% der Fälle möglich ist. Die Therapie besteht aus drei Bausteinen: Der Induktionsphase, der Konsolidierungsphase und der Erhaltungsphase, die oft durch Intensivierungen oder Reininduktionen ergänzt wird. Die am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika setzen sich zusammen aus einer Kombination von

Kortikosteroiden, Vincristin, L-Asparaginase, Anthrazyklinen (v.a. Daunorubicin), Cyclophosphamid, 6-Mercaptopurin, Methotrexat und Cytarabin.

Mittels bestimmter Parameter und Prognosefaktoren wie der Leukozytenzahl, dem Alter, dem Geschlecht, dem Nachweis bestimmter chromosomaler Aberrationen, dem Ansprechen auf die Induktionstherapie und dem ALL-Subtyp, erfolgt eine Einteilung in Risikogruppen, anhand derer die Therapie modifiziert werden kann.

Trotz der guten Resultate erleiden 20-30% der Kinder ein Rezidiv der Grunderkrankung.<sup>38,58,55</sup>

## **1.2 Die Stammzelltransplantation**

Die Stammzelltransplantation (SZT) ist heute ein wichtiger und etablierter Bestandteil in der Therapie verschiedener maligner Erkrankungen wie den Leukämien, dem Myelodysplastischen Syndrom oder dem Neuroblastom. Auch bei nicht malignen Erkrankungen wie der schweren aplastischen Anämie, der Thalassämie und verschiedenen Immundefektsyndromen und Stoffwechselstörungen wird die SZT als Therapieelement eingesetzt.<sup>3,4,123,127</sup>

Ein wichtiger erster Schritt in der Entwicklung der SZT war 1949 die Entdeckung von Jacobsen et al., die herausfanden, dass Mäuse eine letale Strahlendosis überlebten, wenn ihre Milz vor den radioaktiven Strahlen abgeschirmt wurde.<sup>60</sup> Nur kurze Zeit später konnten Lorenz et al. zeigen, dass intravenös verabreichtes Knochenmark den gleichen Effekt hatte.<sup>76</sup> 1956 bewiesen Ford et al. mit Hilfe zytogenetischer Untersuchungen, dass nicht wie bisher angenommen humorale Faktoren für den Schutzeffekt verantwortlich waren, sondern dass das Knochenmark des Spenders vom Empfänger angenommen wurde.<sup>48</sup> Ein weiterer Meilenstein in der Entwicklung der SZT war die Entdeckung und Erforschung des „human-leucocyte-antigen (HLA) systems“ Ende der 50er Jahre durch Dausset.<sup>35</sup> Die Gene dieses Systems bilden den Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex; MHC), der eine wichtige Rolle bei der Erkennung von körpereigenen und fremden Antigenen spielt. Vor allem der Arbeit von Thomas ED, dem späteren Nobelpreis-

träger und seiner Arbeitsgruppe war es zu verdanken, dass Ende der 60er Jahre die erste erfolgreiche allogene SZT bei einem an Leukämie erkrankten Patienten durchgeführt werden konnte und diese Therapie in den folgenden Jahren breite Akzeptanz fand.<sup>3,4,123,127</sup>

Bei der SZT werden intravenös hämatopoetische Vorläuferzellen (CD 34+ - Zellen) übertragen, die in der Lage sind das Knochenmark zu besiedeln (Homing). Sie besitzen eine hohe Regenerationskapazität und sind in der Lage das blutbildende System, sowie das Immunsystem des Patienten zu ersetzen.<sup>3,4,55</sup>

Als Stammzellquellen stehen heute Knochenmark, peripheres Blut und Nabelschnurblut zur Verfügung. Durch die Entwicklung neuer Apheresetechniken und den Einsatz von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie GM-CSF oder G-CSF (Granulozyten-Makrophagen- bzw. Granulozyten-Colony Stimulating Factor), die eine Regeneration und eine Ausschüttung der Stammzellen ins Blut fördern, besteht heute die Tendenz zur Stammzellgewinnung aus dem peripheren Blut. Nicht nur, weil die aufwendige Gewinnung von Knochenmark unter Anästhesiebedingungen aus dem Beckenkamm entfällt, sondern auch weil die Rekonstitution bei Verwendung von Stammzellen aus dem peripherem Blut schneller zu verlaufen scheint.<sup>3,4,49,55</sup>

Man unterscheidet die autologe und die allogene SZT.

### **1.2.1 Die autologe Stammzelltransplantation**

Bei der autologen SZT werden dem Patienten seine eigenen, vor einer Hochdosischemotherapie gesammelten und kryokonservierten Stammzellen reinfundiert, um das durch die Therapie toxisch geschädigte Knochenmark wiederherzustellen. Dadurch ist es möglich die Dosis der Chemotherapeutika zu steigern und den Tumor stärker zu schädigen, wobei zwangsläufig auch das Knochenmark des Patienten irreversibel geschädigt wird. Ein Vorteil der autologen gegenüber der allogenen Transplantation ist, dass praktisch keine immunologischen Komplikationen, wie eine Graft-versus-Host Disease (GvHD) auftreten, da Spender und Empfänger identisch sind und eine weniger intensive

Konditionierungstherapie nötig ist, woraus zudem eine niedrigere therapie-assoziierte Mortalität (TRM = Treatment-Related-Mortality) resultiert. Ein Nachteil besteht allerdings darin, dass die Möglichkeit besteht, dass sich Tumorzellen im Transplantat befinden und der Graft-versus-Leukemia (GvL)-Effekt wegfällt, was sich in einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit nach autologer Transplantation widerspiegelt. (der GvL-Effekt wird näher in Abschnitt 1.4.4 erläutert)

Die autologe SZT findet in der Therapie von Kindern mit ALL praktisch keine Anwendung.<sup>3,52,98</sup>

### **1.2.2 Die allogene Stammzelltransplantation**

Bei der allogenen Stammzelltransplantation (allo-SZT) stammen die Stammzellen von einem Spender, der nicht genetisch identisch mit dem Empfänger ist, aber der gleichen Spezies (Mensch) angehört. Eine Ausnahme bildet die Spende von einem genetisch identischen eineiigen Zwilling, die sogenannte syngene SZT, die aber kaum eine Rolle in der Praxis spielt.

Für das Gelingen der Transplantation ist eine intensive Konditionierung nötig.

Das Ziel der Konditionierung ist die Eradikation der noch im Körper vorhandenen Tumorzellen und eine suffiziente Immunsuppression des Empfängers, um eine Abstoßung des Transplantates zu verhindern. Die meisten Konditionierungsregime bestehen aus einer Ganzkörperbestrahlung (TBI = Total Body Irridation) mit einer Gesamtdosis bis 12 Gray und alkylierenden Substanzen, meist Cyclophosphamid. Zusätzlich oder an Stelle von Cyclophosphamid finden auch Etoposid und Cytarabin, sowie an Stelle der TBI eine Kombination aus Busulfan und Cyclophosphamid (BUCY) Anwendung.<sup>98</sup>

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Spender-Empfänger Beziehungen zueinander. Eine Unterteilung kann anhand der HLA-Kompatibilität und Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger getroffen werden.

An erster Stelle steht die Spende durch ein HLA-identisches Geschwister (MSD = Matched Sibling Donor). Die Wahrscheinlichkeit so einen passenden Spender zu finden beträgt 25%. Weiter unterscheidet man verwandte oder unverwandte



Spender, die in 10 von 10 oder in 9 von 10 HLA-Merkmalen mit dem Empfänger übereinstimmen (Matched Donor = MD bzw. MUD = Matched Unrelated Donor oder MFD = Matched Family Donor). Zuletzt besteht noch die Möglichkeit einer Spende durch einen verwandten oder unverwandten Spender, die in weniger als 9 von 10 HLA-Merkmalen übereinstimmen (MMD = MisMatched Donor bzw. MMUD = MisMatched Unrelated Donor oder MMFD = MisMatched Family Donor). Zu den weiteren Auswahlkriterien zählen der CMV-Status, der möglichst dem des Empfängers entsprechen sollte, das Geschlecht und das Alter. Mit zunehmender HLA-Inkompatibilität steigt das Risiko für eine Abstoßung und das Auftreten einer GvHD. Spender und Empfänger sollten in den HLA-Loci A, B, C, DRB1 und DQB1 übereinstimmen.

Die Vorteile der allo-SZT bestehen in einem niedrigeren Rezidivrisiko. Nachteile beinhalten die Möglichkeit der Abstoßung, der höheren TRM-Rate, basierend auf der nötigen intensiven Konditionierung, dem Auftreten einer akuten oder chronischen GvHD und möglichen Spätschäden, wie dem Auftreten von sekundären Malignomen oder Wachstumsstörungen.<sup>52,55,98</sup>

### ***1.3 Indikationen für eine allogene Stammzelltransplantation bei Kindern mit ALL***

1996 wurden von der EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation) Richtlinien für die Indikationsstellung der allo-SZT veröffentlicht. Danach besteht eine definitive Indikation zur allo-SZT mit einem HLA-identischen Geschwisterspender (MSD) oder einem passenden Fremdspender (MUD) bei Hochrisikopatienten in erster kompletter Remission (CR1) und bei Patienten in zweiter kompletter Remission (CR2) mit frühem Rezidiv (definiert als Rezidiv innerhalb der ersten sechs Monate nach Therapie-Ende). Eine akzeptable Indikation besteht für Patienten mit einem frühen meningealen Rezidiv und für Patienten mit einem späten Rezidiv (definiert als Rezidiv später als 6 Monate nach Therapie-Ende), sofern ein HLA-identischer Geschwisterspender gefunden werden kann.<sup>42,90</sup>

## **1.4 Komplikationen der allogenen Stammzelltransplantation**

### **1.4.1 Therapieassoziierte Früh- und Spättoxizität**

Die zur Behandlung der Grunderkrankung und zur Immunsuppression eingesetzten Medikamente führen auch zu einer Schädigung multipler gesunder Organe.<sup>13</sup> Zu den häufig und früh auftretenden Nebenwirkungen gehören Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Haarausfall<sup>57</sup> und eine Mukositis des Gastrointestinaltrakts, die eine analgetische Therapie erfordert und durch bakterielle und fungale Superinfektion lebensbedrohlich werden kann.<sup>13,112,148</sup> Als schwererwiegende Komplikationen können eine nicht-infektiöse Pneumonitis<sup>84</sup>, eine Kardiomyopathie oder eine hämorrhagische Zystitis, die sich aber mit intensiver Infusionstherapie und Mesnaprohylaxe gut kontrollieren lässt<sup>46,113</sup>, beobachtet werden. Eine der am meist gefürchtetsten Komplikationen mit einer Letalität von 20-50% ist die Venenverschlusskrankheit (Veno-occlusive disease = VOD). Hierbei handelt es sich um eine nicht-thrombotische Obliteration kleiner Lebervenen, die sich klinisch durch Ikterus, Gewichtszunahme, Aszites und schmerzhafte Hepatomegalie äußert und mit renalem und kardiopulmonalem Organversagen assoziiert ist.<sup>14,27,73,83,95,100,106,110</sup>

Als toxische Spätschäden können Wachstumsstörungen, Katarrakte, Sterilität und ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer malignen Zweiterkrankung, wobei hier Non-Hodgin-Lymphome und Gehirntumoren eine Rolle spielen, beobachtet werden.<sup>3,57</sup>

### **1.4.2 Infektion**

Durch die immunsuppressive Therapie und die dadurch entstehende Immundefizienz sind die Patienten sehr anfällig für eine Vielzahl von Infektionen.

Man kann verschiedene Phasen unterscheiden, die durch ein erhöhtes Risiko für bestimmte Erreger gekennzeichnet sind. In der Phase der Aplasie, welche die Konditionierung und ungefähr die ersten 30 Tage nach SZT umfasst, treten vor allem bakterielle und fungale Infektionen in den Vordergrund. In der darauf folgenden Rekonstitutionsphase spielen Infektionen durch Viren (Cytomegalie-

Virus, Herpes-Viren, Adenoviren, Epstein-Barr-Virus) und opportunistische Erreger wie Pneumocystis carinii eine wichtige Rolle. Hervorzuheben ist hierbei die interstitielle Pneumonie mit einer Letalität bis zu 85%, die vor allem 6-8 Wochen nach SZT auftritt und in 15% der Fälle durch CMV verursacht wird. Um diese zu verhindern werden CMV-negative Transplantate bei CMV-negativen Patienten eingesetzt und prophylaktisch Ganciclovir verabreicht. Trotz der Entwicklung und Einführung neuer und effektiverer Antibiotika, Antimykotika und Virostatika wie Aciclovir sterben noch viele Kinder an den Folgen von Infektionen in der Posttransplantationsphase.<sup>3,4,55,57</sup>

### **1.4.3 Non-Engraftment und Abstoßung**

Von einem Non-Engraftment spricht man, wenn bis zum Tag 21 nach SZT keine Erholung der Blutbildung stattgefunden hat. Kommt es nach einer kurzen Phase der Erholung zu einem schnellen Abfall der sich neu gebildeten Blutzellen, spricht man von einer frühen Abstoßung.<sup>2,79</sup>

Ein Grund dafür sind meist im Empfänger noch vorhandene immunkompetente T-Zellen oder Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), welche die Spenderzellen als fremd erkennen, aktiv angreifen und zerstören. Als Risikofaktoren für ein Graft Failure gelten eine weniger intensive Konditionierung, eine hohe T-Zelldepletion des Transplantates, das Ausmaß der HLA-Disparität zwischen Spender und Empfänger und eine bestehende HLA-Sensibilisierung des Empfängers durch z.B. frühere Transfusion von Blutprodukten.<sup>2,3,55</sup> Aversa et al. konnten zeigen, dass durch hohe Gaben von CD 34 positiven Zellen das Risiko einer Abstoßung gesenkt werden kann.<sup>5</sup>

### **1.4.4 Akute und chronische Graft-versus-Host Disease**

Die häufigste Komplikation der allo-SZT ist die Graft-versus-Host Reaktion. Durch die begleitende schwere Immunsuppression kann sie lebensbedrohliche Folgen haben.

Die GvHD wird durch immunkompetente Zellen des Spenders verursacht, die Empfängerantigene als fremd erkennen. Durch diesen Antigenstimulus werden

vor allem CD4 und CD8 positive T-Zellen des Spenders aktiviert. Es kommt zur Zytokinfreisetzung, wobei vor allem Interleukin 2 eine wichtige Rolle zu spielen scheint und zur Proliferation dieser Zellen führt, die dann in der Lage sind, den Empfängerorganismus zytotoxisch zu schädigen.

Tritt diese Reaktion innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation auf, spricht man von einer akuten Graft-versus-Host Disease (aGvHD). Hauptsächlich betroffen sind die Organe Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt. Die Schwere der aGvHD wird in Graden gemessen, die diese drei Organe einbeziehen und deren Gesamtgrad ein wichtiger Risikoparameter für das Überleben darstellt.<sup>55</sup> Klinisch ist die aGvHD charakterisiert durch ein makulopapulöses Exanthem, Erythrodermie, Diarrhoe und Hepatitis.<sup>3,57</sup>

In 20-40% der Fälle tritt die GvHD erst später als Tag 100 nach SZT auf. Dann spricht man von einer chronischen GvHD (cGvHD). Sie zeigt Gemeinsamkeiten mit kollagenen und vaskulären Systemerkrankungen. Klinisch können sklerodermieartige Veränderungen, ein Sicca-Syndrom, Arthritis und in manchen Fällen Gallengangsdegenerationen und Cholestasezeichen beobachtet werden. Das Risiko für das Auftreten einer cGvHD ist erhöht bei älteren Patienten und bei vorheriger aGvHD.<sup>3,4,57</sup>

Das Auftreten einer GvHD und ihre Schwere hängen direkt mit dem Ausmaß der HLA-Disparität zwischen Spender und Empfänger zusammen. Weitere Faktoren, die das Auftreten beeinflussen sind die Anzahl der infundierten CD34 positiven Zellen, das Konditionierungsregime und die Art des Transplantates (T-Zell-Depletion). Um das Risiko für das Auftreten einer GvHD zu minimieren erfolgt eine medikamentöse Prophylaxe mit Cyclosporin und oder Methotrexat sowie eine T-Zell Depletion des Transplantates. Durch die T-Zell Depletion beugt man zwar einer GvHD vor, aber auf Kosten eines erhöhten Abstoßungsrisikos, einer später einsetzenden Immunrekonstruktion und einem Verlust des GvL-Effektes.<sup>3,123</sup> Dieser Effekt, der zuerst von Barnes et al.<sup>12</sup> und Weiden et al.<sup>147</sup> beschrieben wurde, beruht auf der Annahme, dass die alloreaktiven Zellen des Spenders auch Tumorzellen erkennen und diese zerstören können.

Ist eine GvHD bereits ausgebrochen, so besteht die Therapie bei der aGvHD in der Gabe von Steroiden, Antithymozytenglobulin (ATG) und monoklonalen Antikörpern gegen T-Zellen oder ihre Rezeptoren. Bei der cGvHD werden Prednison und Cyclosporin (CSA) eingesetzt.<sup>3,4</sup>

### 1.4.5 Rezidiv

Das Rezidiv, d.h. das Wiederauftreten der Grunderkrankung, ist bei den kindlichen Leukämien die Hauptursache für das Misslingen der Transplantation.<sup>105</sup> Es werden mehrere Ursachen diskutiert wie eine Resistenz der Leukämieblasten gegen die Radiochemotherapie und ein fehlender oder nachlassender GvL-Effekt. Weiter spielen Faktoren wie das Auftreten und die Leukämielast zum Zeitpunkt der Transplantation und das Krankheitsstadium eine wichtige Rolle für den Erfolg der Transplantation.<sup>8,43,108</sup>

Die Erfolgsaussichten bei der Therapie des Rezidives sind wesentlich ungünstiger im Vergleich zur Erstbehandlung und abhängig vom Zeitpunkt des Auftretens und der Lokalisation des Rezidives. Anhand verschiedener Parameter, wie dem Zeitpunkt und dem Ort des Rezidives sowie dem Immunphänotyp werden die Patienten in Risikogruppen (S1 bis S4) eingeteilt und entsprechenden Therapieplänen zugeführt. (Einteilung in die Risikogruppen S1 bis S4 nachfolgend in Tabelle 2). Die Patienten der Gruppe S1 haben eine gute Prognose (Ereignisfreies Überleben (EFS) > 0.75), wohingegen bei den Patienten der Gruppe S4 nur in 50-60% der Fälle eine Remission mit einer medianen Remissionsdauer von drei Monaten mit alleiniger Chemotherapie erreicht werden kann.<sup>1</sup>

**Tabelle 2: Einteilung der Patienten in die Risikogruppen S1 bis S4 gemäß der Definition der Studien BFM 95/96**

	Immunphänotyp					
	non-T			(prä-) T		
Lokalisation	extramedullär isoliert	Knochenmark kombiniert	Knochenmark isoliert	extramedullär isoliert	Knochenmark kombiniert	Knochenmark isoliert
Zeitpunkt						
sehr früh	S2	S4	S4	S2	S4	S4
früh	S2	S2	S3	S2	S4	S4
spät	S1	S2	S2	S1	S4	S4

Es bestehen drei Möglichkeiten für die Therapie des Rezidives: eine erneute Chemotherapie, eine zweite SZT und eine Immuntherapie bzw. eine Kombination dieser drei Ansätze. Mit einer alleinigen Chemotherapie wird oft nur eine kurze Remissionsdauer erreicht.<sup>44,47,126,129,130,131,149</sup> Die zweite SZT ist mit einer stark erhöhten Toxizität und Mortalität im Vergleich zur ersten SZT verbunden.<sup>88</sup>

Die Immuntherapie besteht in der Gabe einer Donor-Spender-Lymphozyten-Infusion (DLI) oder dem Absetzen der Immunsuppression (CSA) mit dem Ziel der Induktion des GvL-Effekts. Mit der Immuntherapie konnten in der Therapie der CML Erfolge verzeichnet werden, wohingegen die ALL schlechter ansprach. Ein Grund dafür könnte darin liegen, dass sich das Rezidiv bei der ALL schneller entwickelt und mit der Therapie zu spät angefangen wurde.<sup>89</sup>

Allgemein kann man sagen, dass die Therapie eines offenen hämatologischen Rezidives bei akuten Leukämien mit der DLI wenig Erfolg verspricht. Nach neueren Studien scheint aber eine frühzeitig einsetzende adjuvante Immuntherapie bei Hochrisikopatienten mit akuten Leukämien das Rezidivrisiko minimieren zu können. Da jedoch die DLI mit der Gefahr des Auftretens einer GvHD und einer Knochenmarksaplasie mit nachfolgenden infektiösen Komplikationen verbunden ist, sollte sie ausschließlich Patienten vorbehalten bleiben, die ein hohes Rezidivrisiko tragen.<sup>7,9,15,39,56,62,94,125</sup>

### ***1.5 Möglichkeiten der Rezidivfrüherkennung***

Das Wiederauftreten der Grunderkrankung ist bei Kindern mit einer ALL nach allo-SZT die häufigste Ursache für das Versagen der Therapie. Die Therapie des Rezidives, vor allem des offenen hämatologischen Rezidives, ist wie oben bereits erwähnt, oft wenig erfolgversprechend und mit einer hohen TRM assoziiert. Um die Aussichten für diese Patienten zu verbessern, wurde in den letzten Jahren das Augenmerk darauf gelegt, Mittel und Wege zu finden, ein drohendes Rezidiv möglichst früh und zuverlässig vorhersagen zu können. Somit bestünde die Option, diesen Patienten eine adjuvante Therapie, z.B. in Form einer Immuntherapie, zukommen zu lassen und so ihre Erfolgsaussichten

zu verbessern. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine frühzeitig durchgeführte Immuntherapie bei Hochrisikopatienten mit akuten Leukämien dazu beitragen kann, ein offenes hämatologisches Rezidiv zu verhindern.<sup>7,9,125</sup>

Es existieren verschiedene Möglichkeiten zur Rezidivüberwachung nach einer Transplantation. Eine wichtige Methode, die direkt den malignen Zellklon nachweist, ist die Messung der minimalen Resterkrankung, der sogenannten MRD (minimal residual disease). Eine indirekte Methode ist die Analyse des hämatopoetischen Chimärismus, bei der aufgrund des Wiederauftretens von Empfängerzellen auf ein sich entwickelndes Rezidiv geschlossen wird.

### **1.5.1 Analyse des hämatopoetischen Chimärismus**

Das Wort Chimärismus bzw. Chimäre stammt aus der griechischen Mythologie und bezeichnete dort ein Fabelwesen mit einem Löwenkopf, einem Ziegenkörper und einem Drachenschweif.<sup>111</sup> Übertragen auf die Transplantationsmedizin bedeutet dies, dass in einem Organismus Zellen, die nicht von ein und demselben Individuum stammen, nebeneinander existieren.

Durch das myeloablative Konditionierungsregime kommt es normalerweise zur völligen Zerstörung der Hämatopoese und des Immunsystems des Empfängers. Dies führt dazu, dass nach einer Transplantation die komplette Hämatopoese und das Immunsystem vom Transplantat des Spenders ausgehend neu gebildet werden. Dieser Zustand wird als kompletter Chimärismus (CC) bezeichnet. Lassen sich im Knochenmark oder Blut autologe Zellen des Empfängers nachweisen, so liegt ein gemischter Chimärismus (MC) vor. Sind keine Spenderzellen nachweisbar, sondern die Hämatopoese erfolgt wieder ausschließlich vom Empfänger, handelt es sich um eine sogenannte autologe Rekonstitution (AR), was einer Abstoßung entspricht.

Meist erfolgt die Analyse des hämatopoetischen Chimärismus durch Untersuchung repetitiver DNA-Sequenzen, sogenannter Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) oder Short Tandem Repeats (STR), die hypervariable Regionen im menschlichen Genom darstellen und sich interindividuell in der Anzahl der Sequenzwiederholungen unterscheiden. Mit Hilfe von PCR-

Methoden können die Sequenzen vermehrt sowie einer Fragmentlängenanalyse unterzogen werden. Darüber hinaus kann, wenn die Länge der Sequenzen von Spender und Empfänger bekannt ist, der Anteil von Spender- oder Empfängerzellen in einer Probe bestimmt werden.<sup>55,80,101,114,132</sup>

Über die Bedeutung eines gemischten Chimärismus für das Risiko ein Rezidiv zu erleiden, waren die Meinungen lange geteilt, was durch die widersprüchlichen Ergebnisse einzelner Studien begründet ist. In neueren prospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem zunehmenden gemischten Chimärismus (increasing Mixed Chimerism = increasing MC) ein signifikant höheres Rezidivrisiko aufweisen und die serielle und quantitative Analyse des gemischten hämatopoetischen Chimärismus nach allo-SZT eine geeignete Methode ist, diese Hochrisikopatienten zu identifizieren.<sup>6,8,10</sup>

### **1.5.2 Messung der minimalen Resterkrankung**

Der Begriff minimale Resterkrankung (minimal residual disease = MRD) bezeichnet die Menge von Tumorzellen, die sich im Körper des Patienten befinden. Diese Menge an Tumorzellen liegt jedoch unter der lichtmikroskopischen Nachweisgrenze. Die hämatologische Vollremission wird anhand morphologischer Kriterien definiert. Sie liegt vor, wenn im Knochenmark weniger als 5% Leukämieblasten unter dem Lichtmikroskop nachgewiesen werden können.<sup>45</sup> Das bedeutet, dass theoretisch in Remission bis zu  $10^{10}$  residuelle Leukämieblasten im Knochenmark unentdeckt persistieren können.<sup>33</sup>

Es existieren verschiedene Methoden zur Messung der MRD. Die drei wichtigsten sind der Nachweis chromosomaler Anomalien durch PCR-Analyse, der Nachweis klonspezifischer DNA-Rearrangements der Immunglobulin (Ig)- und T-Zellrezeptor (TCR) Gene durch PCR-Analyse und die flowzytometrische Immunphänotypisierung.

#### **1.5.2.1 Flowzytometrische Immunphänotypisierung**

Die flowzytometrische Immunphänotypisierung beruht auf der Detektion qualitativer und quantitativer Unterschiede in der Expression von Antigenen



zwischen Leukämieblasten und normalen hämatopoetischen Zellen, die entweder an der Zelloberfläche oder intrazellulär lokalisiert sind. Hierzu werden meist fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper verwendet. Da sowohl die Leukämieblasten als auch normale hämatopoetische Vorläuferzellen die gleiche Antigenexpression aufweisen können, kann dies zu falsch positiven Ergebnissen führen. Deshalb werden zur Detektion bevorzugt Leukämieblasten mit atypischen immunologischen Merkmalen, wie z.B. tumorassoziierter ektopischer Antigenexpression, cross-lineage Antigenexpression oder Antigenüberexpression verwendet. Durch ein drei- oder vierfach labelling mit verschiedenen Markerkombinationen lassen sich 60-98% der akuten B-Vorläufer Leukämien und fast alle T-Zell Leukämien mit einer Sensitivität von einer Leukämiezelle in 10 000 gesunden Zelle charakterisieren.<sup>25,29,32,33,55,58,86,140,143,146</sup>

#### **1.5.2.2 PCR-Analyse chromosomaler Anomalien**

Bei einigen malignen hämatologischen Erkrankungen existieren bestimmte chromosomale Aberrationen, vor allem Translokationen. Mit Hilfe der PCR-Technik lassen sich diese strukturellen Veränderungen direkt auf DNA-Ebene nachweisen. Zumeist aber resultieren daraus tumorspezifische Fusionstranskripte oder es kommt zu einer aberranten Expression spezifischer Transkripte, die dann mittels RT-PCR (Reverse Transkription-PCR) detektiert werden können. Beispiele für tumorspezifische Fusionstranskripte, die bei der ALL vorkommen sind BCR-ABL oder TEL-AML1. Zudem können auch aberrante Gene bzw. aberrant exprimierte Gene als MRD-Target dienen. Ein Beispiel hierfür ist das WT-1 Gen.

Der große Vorteil bei der Verwendung dieser chromosomalen Aberrationen als Targets beim Monitoring der MRD liegt darin, dass sie während des weiteren Krankheitsverlaufes stabil bleiben. Sie sind leukämiespezifisch und so kann eine Sensitivität zwischen  $1 \times 10^{-4}$  und  $1 \times 10^{-6}$  erzielt werden. Limitiert wird die Verwendung dieser Targets durch die Tatsache, dass sie nur bei einer kleinen Gruppe der ALL Patienten vorkommen. So sind bei der T-ALL nur bei 15-35%

und bei der Vorläufer B-ALL bei 40-47% der Patienten spezielle chromosomale Aberrationen nachweisbar.<sup>22,69,142</sup>

### **1.5.2.3 PCR-Analyse klonspezifischer DNA-Rearrangements der Immunglobulin (Ig)- und T-Zellrezeptor (TCR) Gene**

Das menschliche Immunsystem ist im Laufe des Lebens vielen Millionen unterschiedlichen Antigenen ausgesetzt. Es besitzt die Fähigkeit diese mit spezifischen Antigenrezeptoren zu erkennen und spezifische Antikörper zu produzieren. Wenn die große Vielfalt durch jeweils ein Gen in der DNA kodiert wäre, würde dies einen großen Teil des gesamten menschlichen Genoms in Anspruch nehmen. In der Zwischenzeit weiß man, dass eine begrenzte Anzahl von Genen für die enorme Vielfalt verantwortlich ist, und man kennt die Mechanismen, die dies ermöglichen. Ein dabei sehr wichtiger Mechanismus ist das sogenannte Gen-Rearrangement oder die somatische Rekombination.<sup>36,124,139,143</sup> Zum Verständnis soll kurz auf die chromosomale Organisation der Gene und den Aufbau der Immunglobuline und T-Zellrezeptoren eingegangen werden.

#### ***Immunglobuline***

Immunglobuline bestehen aus zwei schweren Proteinketten (IgH) und zwei leichten Proteinketten (entweder Igk oder Igλ), die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Kette setzt sich aus einer variablen Domäne, die an der Antigenerkennung beteiligt ist und einer (bei den leichten Ketten) bzw. mehreren konstanten Domänen zusammen. Die konstanten Domänen der Immunglobulinketten werden von einem sogenannten C (constant)- Gensegment kodiert. Die variable Domäne einer schweren Kette wird aus einer Kombination eines V (variable)-, eines D (diversity)- und eines J (joining)- Gensegmentes kodiert. Während der Reifung der B-Zellen kommt es durch den Prozess des Gen-Rearrangements zu einer Kombination der vorhandenen Gensegmente.<sup>143</sup>

Im Falle des IgH Lokus, der sich auf Chromosom 14q32 befindet, sind 46-52 funktionelle VH Segmente (abhängig vom individuellen Haplotyp) identifiziert, die sich in 7 VH-Genfamilien aufteilen lassen. Zusätzlich wurden ungefähr 30

nichtfunktionelle VH Segmente beschrieben. Den VH-Segmenten folgen 27 funktionelle DH Segmente, woran sich 6 JH Segmente anschließen.<sup>81,144</sup>

Der Igk Locus kann in 7 Vk Genfamilien und 5 Jk Gensegmente unterteilt werden und befindet sich auf Chromosom 2p11.

Der Igl Locus befindet sich auf Chromosom 22q11. Die 30-33 funktionellen VL Gene lassen sich in 11 Genfamilien unterteilen, zudem existieren 7 JL Gensegmente.<sup>144</sup>

### ***T-Zellrezeptoren (TCR)***

T-Zellrezeptoren bestehen aus zwei Proteinketten. Man kann zwei Typen von T-Zellrezeptoren unterscheiden. Der eine Typ setzt sich zusammen aus einer TCR $\alpha$  und einer TCR $\beta$ - Kette (TCR $\alpha\beta$ ), der andere aus einer TCR $\gamma$ - und einer TCR $\delta$ - Kette (TCR $\gamma\delta$ ). Die meisten T-Lymphozyten (85-98%) exprimieren TCR $\alpha\beta$ . Beide Typen sind eng mit den CD3 Proteinketten assoziiert und bilden den TCR-CD3 Komplex, der für die Antigenerkennung und Signaltransduktion ins Zellinnere verantwortlich ist. Jede Kette besteht aus einer variablen und einer konstanten Domäne. Die konstante Domäne wird von C-Gensegmenten kodiert. Die variable Domäne wird, wie bei den Immunglobulinketten, von einer Kombination aus V- und J-Gensegmenten im Fall der TCR $\alpha$ - und TCR $\gamma$ -Kette kodiert, oder von einer Kombination von V-, D- und J-Gensegmenten im Fall der TCR $\beta$ - und TCR $\delta$ - Ketten.<sup>143</sup>

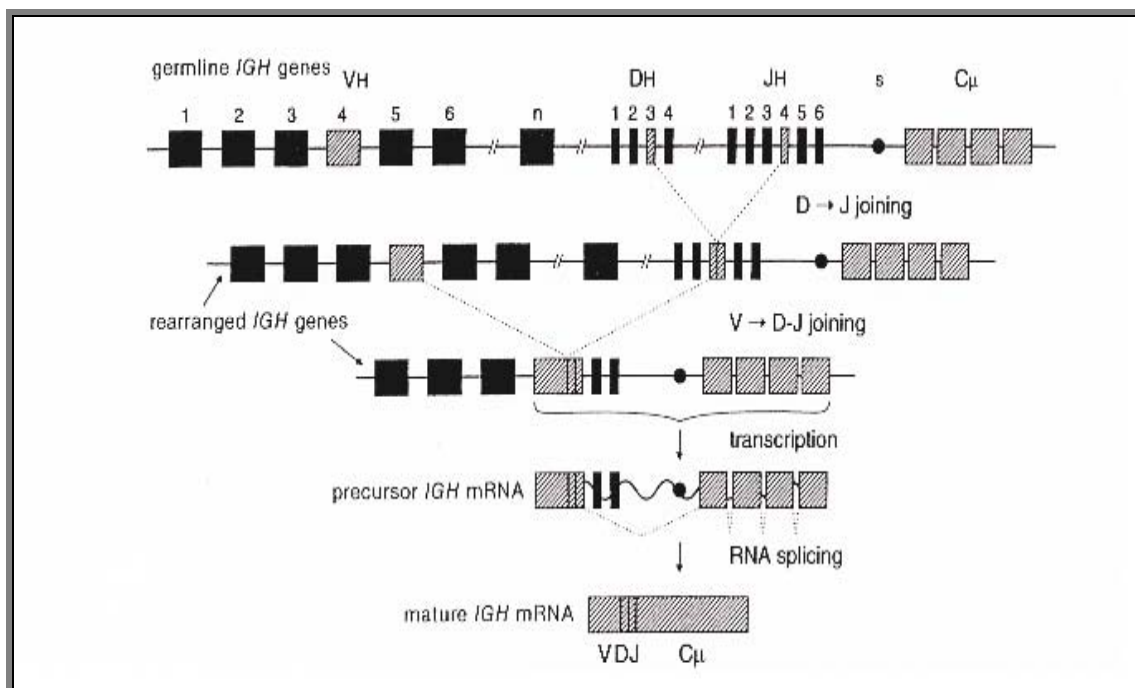
Der TCR $\delta$  Locus befindet sich auf Chromosom 14q11 innerhalb des TCR $\alpha$  Locus. Für ihn sind 8 V $\delta$ , 4 D $\delta$  und 3 J $\delta$ -Gensegmente bekannt. Auf Chromosom 7p14 findet sich der TCR $\gamma$  Locus. Von den 14 bekannten V $\gamma$ -Gensegmenten sind nur 10 funktionell und somit von Bedeutung.<sup>144</sup> Es existieren zwei Pseudogene, die an der Bildung von Rearrangements bei der ALL beteiligt sind.<sup>30</sup> Man unterteilt die V-Gensegmente in die Gruppen V $\gamma$  I-IV. Zudem existieren 5 J $\gamma$  Gensegmente.<sup>144</sup>

### ***Gen-Rearrangement***

Während der Reifung der B- und T-Zellen kommt es zu einer Neuordnung der diskontinuierlich angeordneten Germline V-, D- und J- Gensegmente durch den Prozess des Rearrangements. Der Rearrangementprozess wird mit Hilfe

zweier Rekombinase-Enzyme, die durch die „recombinase activating genes“ RAG-1 und RAG-2 kodiert werden, gesteuert. Der Rekombinase-Enzymkomplex erkennt sogenannte spezifische RSS- Sequenzen (recombination signal sequences), die jedes V- D- und J- Gensegment flankieren. Diese RSS-Sequenz besteht aus einer heptamer-Sequenz und einer nonamer-Sequenz, die durch eine Spacer-Sequenz getrennt werden. Zuerst kommt es zu einer Anlagerung der heptamer und nonamer Sequenzen der verschiedenen Gensegmente und damit zur Entstehung einer DNA-Schleife. Die RAG-Enzyme induzieren Strangbrüche innerhalb der RSS-Sequenzen und die zwischen den neu angeordneten Gensegmenten liegenden Sequenzen werden herausgeschnitten. Eine DNA-Ligase verbindet am Schluß die freien Enden der zwei so neu zusammengefügte Gensegmente.<sup>75,92,109,143</sup>

In Abbildung 1 ist der Rearrangementprozess am Beispiel des IgH-Lokus dargestellt.



**Abbildung 1: Darstellung des Rearrangementprozesses am Beispiel des IgH Lokus**

Entnommen mit freundlicher Genehmigung des Verlages aus Leukemia 6 th edition,chapter 6 immunobiology of leukemia, van Dongen JJ, Adriaansen HJ, Seite 100, Abb. 6-14; Herausgeber Henderson ES, Lister TA, Greaves MF; WB Saunders Company 1996

Die Rearrangementprozesse beginnen früh in der Lymphozytendifferenzierung und erscheinen in hierarchischer Ordnung. Während der B-Zell Differenzierung kommt es zuerst zum Rearrangement der IgH Gene, dann der Igk und Igλ Gene. Im Falle der T-Zellen erscheinen zunächst Rearrangements der TCRD Gene, nachfolgend der TCRG Gene, gefolgt von TCRD Deletionen mit daraus folgenden TCRA Rearrangements.<sup>143</sup> Der Rearrangementprozess findet nicht nur in gesunden B- und T-Vorläuferzellen statt, sondern läuft auch in den Leukämieblasten ab. Bei der ALL kommt es gehäuft zu sogenannten "cross-lineage rearrangements" und auch außergewöhnliche Rearrangements sind beschrieben worden.<sup>19,99,116-119</sup>

Nach Abschluss des Rearrangementprozesses kann es auch zu späteren Zeitpunkten noch einmal zu einer Neuordnung der Gensegmente kommen, was dann als sekundäres Gen-Rearrangement bezeichnet wird. Es gibt drei verschiedene Typen von sekundären Rearrangements, abhängig vom betreffenden Ig oder TCR Komplex und den bereits existierenden Rearrangements<sup>63,77,102,103,143</sup>.

- D-J replacement: IgH,
- V-J replacement: TCRA, TCRG,
- V replacement: IgH, TCRB

Durch die Möglichkeit der verschiedenen Kombination der V-, D- und J-Gensegmente untereinander und der Kombination der verschiedenen Proteinketten mit ihren variablen Domänen, ergibt sich die sogenannte combinatorial diversity. Sie beträgt etwas  $2 \times 10^6$  für die Immunglobuline,  $3 \times 10^6$  für die TCRαβ Moleküle und  $5 \times 10^3$  für die TCRγδ Moleküle.<sup>36,74,124,139</sup> Zusätzlich existiert noch eine sogenannte junctional diversity. Diese beruht auf der Tatsache, dass es durch Trimmen der Enden der neu angeordneten Gensegmente zu Deletionen, sowie zu Insertionen von Nukleotiden zwischen den zusammengefügt Gensegmenten kommt. Die Insertion von Nukleotiden an den junction sites (N region insertion) wird durch das Enzym Terminale desoxynucleotid Transferase (TdT) initiiert, welches in der Lage ist Nukleotide am 3' Ende ohne DNA-Template einzufügen.<sup>40,71,143</sup> Die junctional regions

kodieren für den sogenannten third complementary complex (CDR3), der an der Antigenerkennung durch den variablen Teil beteiligt ist. Deshalb erhöhen diese Insertionen drastisch die Vielfalt der Antigenrezeptoren ( $>10^{12}$ ).<sup>143</sup>

Die zufällige Insertion und Deletion von Nucleotiden an den junction sites der neu angeordneten Gensegmente macht die junctional regions zu „fingerprint-like“ Sequenzen, die in jedem Lymphozyten einzigartig sind, also auch in den Leukämieblasten, die aus einem einzigen Zellklon entstehen. Somit besitzen alle Leukämieblasten eines Patienten dasselbe einzigartige Gen-Rearrangement, so dass man von einem „Leukämiefingerprint“ sprechen kann.<sup>139,143</sup> Die Basenabfolge der junctional regions kann also als Target für das MRD-Monitoring nach allogener SZT dienen. Dies ist gegenwärtig die weit verbreitetste Methode zur Messung der MRD.

Die klinische Bedeutung der Messung der minimalen Resterkrankung bei Kindern mit ALL ist heute durch mehrere Studien anerkannt.<sup>28,33,65,93,121,135,141</sup> Dies gilt vor allem für die Messung der MRD zur Beurteilung des Ansprechens auf die Ersttherapie, was eine Einteilung der Patienten in high-risk an low-risk Patienten ermöglicht und somit eine Intensivierung oder Reduzierung der Therapie erlaubt.<sup>23,28,33,41,91,93,128,141,146</sup> Zudem haben Studien gezeigt, dass die Messung der MRD vor der Stammzelltransplantation ein wichtiger und bedeutender prognostischer Faktor für den Erfolg der Transplantation ist.<sup>11,50,51,65,68,135</sup> Daraus wurden mittlerweile klinische Konsequenzen gezogen. Die Höhe der MRD-Last wird künftig bereits im Rezidiv Studie Protokoll ALL-Rez-2004 berücksichtigt. Hochrisikokinder erhalten eine an die MRD-Last adaptierte Therapie.

Über die Bedeutung der Messung der MRD nach allo-SZT existieren noch nicht so viele Daten.<sup>64,107,134</sup>

***Fragenstellung und Zielsetzung der Arbeit***

Ziel der Arbeit ist es herauszufinden, ob es mit Hilfe der Messung der submikroskopisch messbaren MRD im peripheren Blut möglich ist, Rezidivvorausagen bei Patienten nach allo-SZT machen zu können und somit eine Patientengruppe identifizieren zu können, die ein hohes Rezidivrisiko aufweist. Diese Patientengruppe könnte dann einer präventiven adjuvanten Immuntherapie zugeführt werden, um ein offenes hämatologisches Rezidiv zu verhindern. Desweiteren soll die Höhe und Dynamik der MRD-Werte im Blut beobachtet werden, um die Bedeutung dieser Parameter für das Auftreten eines Rezidives zu bestimmen. Dabei soll darauf geachtet werden, ob eine kritische MRD-Grenzkonzentration oder eine MRD-Konzentrationszunahme pro Zeit existiert, die für das Rezidiv nach allo-SZT prädiktiv ist.

Bis jetzt wurden zur Messung der MRD vor allem Knochenmarkproben herangezogen. Es gibt nur wenige Studien in denen eine Messung im peripheren Blut erfolgte.<sup>24,34,70,78,137,145</sup> Wenn die Überwachung der MRD nach allogener SZT im peripheren Blut möglich wäre, könnte den Patienten die traumatische und schmerzhafteste Knochenmarkpunktion erspart werden. Zudem können Knochenmarkpunktionen nicht in beliebig hoher Frequenz durchgeführt werden, so dass es im Einzelfall nicht immer möglich ist, das entstehende Rezidiv im Knochenmark frühzeitig zu entdecken. Zu diesem Zweck sollen die im Knochenmark bereits gemessenen MRD-Werte mit denen im peripheren Blut verglichen werden.

## 2. Material

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Zum Monitoring der minimalen Resterkrankung nach allogener Stammzelltransplantation im Peripherblut wurde die DNA aus mononukleären Zellen der Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der allo-SZT auf den quantitativen Nachweis der vorher identifizierten klonalen patientenspezifischen Rearrangements untersucht. Die DNA wurde aus mit EDTA ungerinnbar gemachten Peripherblutproben der Patienten gewonnen. Insgesamt wurden im Untersuchungszeitraum 1044 Peripherblutproben von 90 Patienten mit Hilfe der Real-time PCR gemessen.

### 2.2 Reagenzien

#### 2.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Biocoll Separating Solution	BiochromAG, Berlin
Densitiy 1.077	
PBS Dulbecco's	Gibco/BRL, Eggenstein

#### 2.2.2 DNA-Isolation

QIAamp® DNA Blood Mini Kit (250)	Qiagen GmbH, Hilden
QIAamp® DNA Blood Midi Kit (20)	
QIAamp® DNA Blood Maxi Kit (50)	
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg



### 2.2.3 Screening-PCR

AmpliTaq Gold® Polymerase	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneAmp 10x PCR Gold Buffer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Magnesiumchlorid Solution (25mM)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Nukleotide: d TTP-Li-salt (25µmol)	Roche Applied Science, Mannheim
d GTP-Li-salt (25µmol)	
d ATP-Li-salt (25µmol)	
d CTP-Li-salt (25µmol)	
LiChrosolv® Aqua	Merck, Darmstadt
Screening Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg

### 2.2.4 Gelelektrophorese und Gelentwicklung

Acrylamid, Rotiphorese® Gel 30,	Roth GmbH, Karlsruhe
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	
TBE-Puffer pH8	Universitätsapotheker, Tübingen
1000ml enthalten:	
108,0g TRIS	
70,9g Borat	
7,44g EDTA Dinatrium	
TEMED	Roth GmbH, Karlsruhe
(N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin)	
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau-Auftragspuffer für PCR	
Glycerol 99%	Sigma GmbH, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
Bromphenolblau 2,5% (Na-Salt)	Serva, Heidelberg
DNA Molecular Weight Marker VIII (19-1114bp)	Roche Applied Science, Mannheim
Ethidiumbromid 1% (10mg/ml)	Roth GmbH, Karlsruhe

## 2.2.5 Sequenzanalyse

### 2.2.5.1 Aufreinigung der DNA

E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit:	Peqlab Biotechnologie GmbH,
HiBind®-DNA-Säulen	Erlangen
2ml Sammel-Tubes	
CP-Puffer	
DNA-Waschpuffer	
Elutionspuffer	

### 2.2.5.2 Sequenzierreaktion

BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
--	---------------------------------

### 2.2.5.3 Ethanolfällung

Ethanol 100%	Universitätsapotheker, Tübingen
Ethanol 70%	Universitätsapotheker, Tübingen
NaAc	Merck, Darmstadt
LiChrosolv® Aqua	Merck, Darmstadt

## 2.2.6 Real-time PCR

TaqMan® Universal Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Synthetisierte Oligonukleotide:	MWG-Biotech AG, Ebersberg
patientenspezifische Forward Primer	
Reverse Primer	
TaqMan Sonden	
LiChrosolv® Aqua	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### **2.3 Kunststoff- und Glasartikel**

LeucoSep Röhrchen für 3-6ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5ml und 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
PP-Test tubes 15ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Combitips plus 0,5ml, 1ml, 5ml, 10ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 100µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10µl, 30µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stripetten 5ml, 10ml	Costar, New York
MicroAmp®Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Weiterstadt
Optical Tubes	Applied Biosystems, Weiterstadt
Optical Caps	Applied Biosystems, Weiterstadt
Glasplatten	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spacer Mate	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kämme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SafeSkin-Latex-Handschuhe	Kimberly-Clark, Roswell/USA
Laborwischtücher Kimwipes®	Kimberly-Clark, Roswell/USA

## 2.4 Geräte und Computerprogramme

Accu-jet®	Brand, Wertheim
Pipetten 2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Gilson, Bad Camberg
Multipipette® pro	Eppendorf AG, Hamburg
Hoefer Electrophoresis Unit SE 600 Series	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Mikro-Zentrifuge für Reaktionsgefäße oder PCR-Strips	Neolab, Heidelberg
Tischzentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotixa 50RS	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge RVC 2-18	Christ; Osterode am Harz
Membran-Vakuumpumpe	Vaccubrand, Wertheim
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York/USA
Vortex Reax top	Neolab, Heidelberg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Photometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Präzisions-Küvette aus Quarzglas Suprasil®	Hellma, Müllheim
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Weiterstadt
ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Cellcounter Cobas Micros	Roche Applied Science, Mannheim
Geldokumentationssystem mit Diana Software	Raytest GmbH; Straubenhardt
Sequence Navigator	Perkin Elmer, Wellesley MA/USA
Primer Express™ 1.5	Perkin Elmer, Wellesley MA/USA
ABI Prism Sequence Detector v1.7	Perkin Elmer, Wellesley MA/USA
ABI PRISM 310 Collection	Perkin Elmer, Wellesley MA/USA

## 3. Methoden

### 3.1 Methoden im Überblick

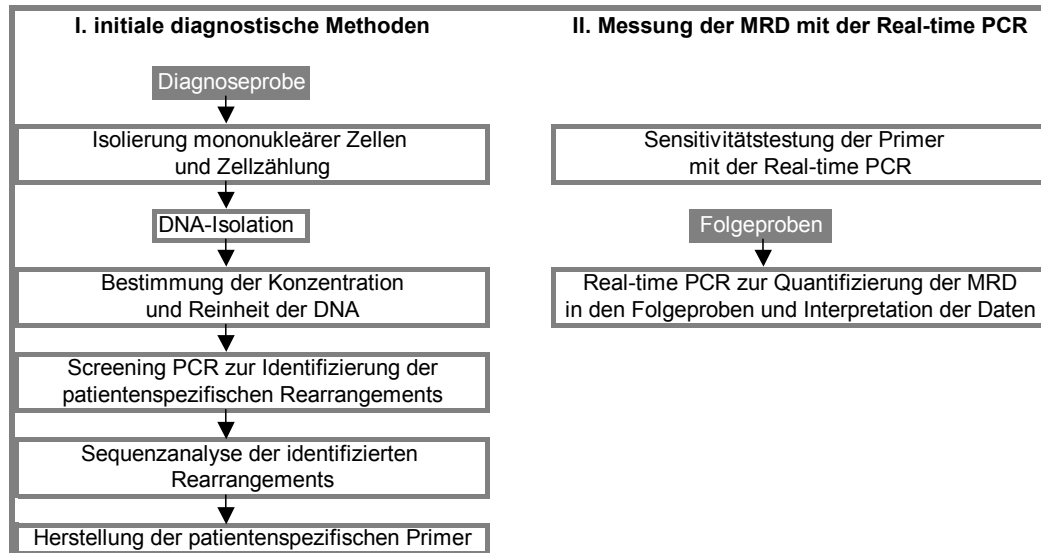


Abbildung 2: Methoden im Überblick

### 3.2 Isolierung mononukleärer Zellen (MNC) durch Dichtegradientenzentrifugation und Zellzählung

Bei der Dichtezentrifugation wird ein Dichtegradient erzeugt, mit dessen Hilfe es möglich ist, durch Zentrifugation Zellen nach ihrer Größe und Dichte aufzutrennen. Zur Erzeugung des Dichtegradients wird eine Ficoll-Isopaque Lösung mit einem spezifischen Gewicht von 1,077g/ml verwendet. Ziel der Dichtezentrifugation ist die Gewinnung mononukleärer Zellen, d.h. von Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, welche für die Leukämiepathogenese von Bedeutung sind und somit in gereinigter Form für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Die mononukleären Zellen können aufgrund ihres spezifischen Gewichtes, welches kleiner ist als 1,077 g/ml nicht durch den generierten Dichtegradienten wandern, wohingegen die polymorphkernigen Granulozyten und Erythrozyten durch ihr höheres spezifisches Gewicht den Gradienten durchwandern und auf den Boden des Reaktionsgefäßes

sedimentieren. Die sich an der Phasengrenze zwischen Plasma und Ficoll-Isopaque-Lösung befindlichen mononukleären Zellen können nun abgenommen werden und stehen zur Weiterverarbeitung zur Verfügung.

**Reaktionsprotokoll:**

- Zuerst erfolgt eine Verdünnung der Blutprobe 1:2 mit PBS
- In ein 15 ml Falcon-Röhrchen werden 4 ml Ficoll-Isopaque Lösung vorgelegt
- Die mit PBS verdünnte Blutprobe wird nun vorsichtig auf die Ficoll-Isopaque Lösung aufpipettiert
- Austarieren des Röhrchens
- Zentrifugation für 20 Min. bei 800g
- Die an der Phasengrenze zwischen Ficoll-Isopaque Lösung und Plasma als Ring sichtbaren mononukleären Zellen werden mit einer Pasteurpipette abgetragen und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt
- Die Zellen werden mit PBS auf 10 ml resuspendiert
- Zentrifugation für 12 Min. bei 450g
- Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert. In ein Eppendorfgefäß werden 450µl PBS vorgelegt und mit 50µl der mit PBS verdünnten Zellsuspension vermischt. Hiermit wird die sich im Zellpellet befindliche Zellzahl unter Verwendung des Cellcounter Cobas Micros von Roche bestimmt
- Die restliche Zellsuspension wird mit PBS auf 10 ml resuspendiert
- Zentrifugation für 12 Min. bei 350g
- Der Überstand wird wieder abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Anhand der vorher bestimmten Zellzahl wird die Zellsuspension auf mehrere Aliquots verteilt. Dabei ist zu beachten, dass ein Aliquot mindesten  $5 \times 10^6$  Zellen beinhalten sollte
- Anschließend werden die gewonnenen Zellen gleich weiterverarbeitet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren

### **3.3 DNA-Isolation**

Ziel der DNA-Isolation ist die schnelle und möglichst mit wenig Aufwand durchführbare Gewinnung genomischer DNA optimaler Größe. Die DNA sollte möglichst frei von Proteinen und anderen Verunreinigungen sein, die in den weiteren Untersuchungsschritten inhibitorisch wirken können.

Die DNA-Isolation erfolgt mit Hilfe von QIAamp® DNA Blood Kits gemäß den Herstellerangaben. Zur Verfügung stehen je nach in der Probe befindlicher Zellzahl 3 verschiedene Kits:

QIAamp® DNA Blood Mini Kit (250) : maximal  $5 \times 10^6$  Zellen/ml

QIAamp® DNA Blood Midi Kit (20) : maximal  $20 \times 10^6$  Zellen/ml

QIAamp® DNA Blood Maxi Kit (50) : mehr als  $20 \times 10^6$  Zellen/ml

Das Prinzip dieser Isolationsmethode beruht auf der reversiblen Bindung der DNA an einer Silikamembran. Nachdem die anderen Bestandteile der Probe, wie RNA oder Proteine, durch Veränderung des pH-Wertes und der Salzkonzentrationen nicht mehr an die Membran binden können und ausgewaschen werden, kann in einem letzten Schritt die reine DNA gewonnen werden.

Zuerst erfolgt durch Zugabe der QIAGEN Protease zur Probe eine Lyse der Zellen. Nach Zugabe eines Puffers zum Lysat wird dieses in ein Eluatröhrchen pipettiert, in dem sich eine Membran befindet, an welche die Bestandteile binden. In den nun folgenden 2 Waschschritten mit Zentrifugation werden durch Verwendung von zwei verschiedenen Puffern der pH-Wert und die Salzkonzentration so verändert, dass nur die DNA an der Membran gebunden bleibt. In einem letzten Schritt wird mit Hilfe eines Eluationspuffers die DNA von der Membran freigesetzt.

### **3.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA**

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur Kalibrierung des Photometers erfolgt vor der Messung der Proben eine Messung gegen Wasser. Um optimale Messwerte zu erhalten, sollte die Absorption Werte zwischen 0,1 und 1,0 aufweisen. Um eine Aussage über die

einheit der DNA machen zu können, ist eine zweite Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm nötig. Bildet man den Quotienten aus beiden Messungen (Absorption bei 260 nm/ Absorption bei 280 nm) erhält man einen Wert, der als Reinheitsmaß der DNA dienen kann. Dieser Quotient sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen.

Die isolierte und gemessene DNA kann nun gleich weiterbearbeitet werden oder wird bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und aufbewahrt.

### ***3.5 Screening-PCR zur Identifizierung der patientenspezifischen Rearrangements***

Zu Beginn der MRD-Analyse steht die Identifizierung eines oder mehrerer patientenspezifischer Ig- bzw. TCR- Rearrangements in den Diagnoseproben der Patienten, um geeignete Targets für das MRD-Monitoring zu finden.

Die Identifizierung erfolgt mit Hilfe der PCR-Methode. Die PCR-Methode wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt und hat das molekularbiologische Arbeiten revolutioniert. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, selbst geringe Mengen einer spezifischen Basensequenz eines DNA-Doppelstranges zu amplifizieren. Die Methode nutzt Mechanismen der DNA-Replikation. Ein DNA-Einzelstrang dient als Template für die Synthese eines neuen komplementären Stranges durch das Enzym DNA-Polymerase. Voraussetzung für die Amplifizierung eines spezifischen DNA-Abschnittes ist, dass die Basensequenz Up- und Downstream des DNA-Targets bekannt ist. Komplementär zu diesen Sequenzen können dann zwei Oligonukleotide (Primer) synthetisiert werden. Nach Trennung des DNA-Doppelstranges durch Temperaturerhöhung (Hitzdenaturation) binden diese Oligonukleotide an die, die Target-DNA umgebenden bekannten Sequenzen (Primerannealing). Die beiden Oligonukleotide dienen als Primer für die Taq-Polymerase. Die Taq-Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym, welches die DNA-Synthese unter Verwendung der Target-DNA als Template katalysiert (Extension).



Die PCR besteht aus Zyklen sich wiederholender Schritte:

Zunächst erfolgt durch Erwärmung des Ansatzes auf 94°C die Trennung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge. Danach wird schnell für 30 Sekunden auf 55°C - 65°C heruntergekühlt; um eine Rückbildung der Doppelhelix zu verhindern und ein Anlagern der Primer zu ermöglichen. Im nächsten Schritt wird die Temperatur für 2-5 Minuten auf 72°C erhöht, was der Optimaltemperatur der Taq-Polymerase entspricht, die nun die DNA-Synthese durchführt.

Erhöht man nun die Temperatur kurz wieder auf 94°C, trennt sich die neu-synthetisierte DNA von der Template-DNA und steht nun im nächsten Zyklus als Template zur Verfügung. Dies bedeutet, dass sich in jeden folgenden Zyklus die PCR-Produktmenge verdoppelt.

So gelingt es mit Hilfe spezifischer Primer, die Up- und Downstream des Rearrangements an Germlinesequenzen hybridisieren, für jeden Patienten ein spezifisches Rearrangement zu identifizieren und zu amplifizieren. Dieses kann dann sequenziert werden und steht als PCR-Target für das Monitoring der MRD mit der Real-time PCR zur Verfügung.

Ein Nachteil bei der Verwendung der Ig und TRC Rearrangements als PCR-Targets besteht darin, dass es durch klonale Evolution während des Krankheitsverlaufes zu Veränderungen innerhalb des Rearrangements kommen kann. Durch persistierende Aktivität des Rekombinase-Enzym-Systems kommt es z.B. zu sekundären Rearrangements. Dies führt dann zum Verlust des Targets und zu einem falsch negativen Ergebnis. Die Stabilität unterscheidet sich jedoch innerhalb der verschiedenen Ig- und TCR- Rearrangements, so gelten IgK Rearrangements als sehr stabil.<sup>18</sup> Dies sollte bei der Auswahl der Targets berücksichtigt werden. Ziel ist es für jeden Patienten mindestens 2 unabhängige monoklonale Ig bzw. TCR PCR-Targets zu identifizieren.<sup>97,138,144</sup>

### 3.5.1 Primerkombinationen

In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl von Primersystemen entwickelt. Von der BIOMED-1 und -2 Concerted Action: "Investigation of minimal residual disease in acute leukemia"<sup>97,144</sup> wurden PCR-Primer und Primerprotokolle

entwickelt und veröffentlicht mit dem Ziel, das Verfahren zu standardisieren, vergleichbare Ergebnisse zu bekommen und eine Qualitätskontrolle zwischen den verschiedenen Laboratorien zu ermöglichen. Deshalb wurden für unsere Untersuchungen die Primer und Primerprotokolle aus dieser Kollektion verwendet.

Mit einem limitierten Set von Primerkombinationen für multiple Targets ist es möglich, mit einer hohen Sensitivität und Spezifität bei über 90% der ALL-Patienten ein MRD-Monitoring durchzuführen und falsch negative Resultate zu vermeiden.

Die Primer binden an Germlinesequenzen, die sich Up- oder Downstream der patientenspezifischen junctional regions befinden. Es werden 25 Primerpaare eingesetzt:

Für komplette IgH Rearrangements werden VH-family-specific framework region 1 (FR1) Primer, VH1/7, VH2, VH3, VH4, VH5 und ein consensus FR3 Primer in Kombination mit einem consensus joining Primer (JH cons) verwendet.

Da IgH Rearrangements häufig oligoklonal und relativ instabil sind, werden bei Patienten mit precursor-B-ALL Igkappa Rearrangements als alternatives PCR-Target eingesetzt. Die Genrearrangements auf diesem Locus gelten als end-stage-rearrangements und gehen nicht im weiteren Krankheitsverlauf als Target verloren. Es stehen Primer für das kappa-deleting-element (kde) und Segmente, die damit rekombinieren zur Verfügung (consensus Vkappa-family und Jkappa-Ckappa intron Primer).

Zusätzlich werden Primer für alle V-, D-, und J-Segmente der TCRD und TCRG Rearrangements verwendet, da sie sowohl bei precursor-B-ALL und T-ALL zu finden sind.<sup>97,144</sup>

Eine Besonderheit stellt die TAL1 Deletion dar, die in 5-15% aller T-ALL's erscheint. Die Deletion führt zur Fusion des SIL Gens mit dem TAL-1 Gen, wodurch eine einzigartige Gensequenz entsteht, die als PCR-Target dient.<sup>21,22</sup>

Tabelle 3: Primer für die Screening-PCR und Sequenzanalyse

Darstellung der für die Screening-PCR und Sequenzanalyse verwendeten Primer für IgH-, TCRD-, TCRG und IgK Genrearrangements und TAL1 Gendelektionen

Erläuterungen: bp = Basenpaare; Ig = Immunglobulin; TCR = T-Zellrezeptor

Target	Forward Primer		Reverse Primer		Größe PCR-Produkt in bp
	Name	Sequenz	Name	Sequenz	
IgH	VH1/7	5'TCTGGGGCTGAGGTGAAGAA <sup>3</sup>	JH cons	5'ACCTCTCCCAGGA <sup>3</sup>	-340
	VH2	5'ACCTTGAAGGAGTCTGGTCCT <sup>3</sup>	JH cons	5'ACCTCTCCCAGGA <sup>3</sup>	-380
	VH3	5'GGGGTCCCTGAGACTCTC <sup>3</sup>	JH cons	5'ACCTCTCCCAGGA <sup>3</sup>	-320
	VH4	5'GCCCAGGACTGGTGAAGC <sup>3</sup>	JH cons	5'ACCTCTCCCAGGA <sup>3</sup>	-320
	VH5	5'CTGGTGCAGTCTGGTGAAGC <sup>3</sup>	JH cons	5'ACCTCTCCCAGGA <sup>3</sup>	-360
	FR3 A	5'ACACGGYSTGTATTACTGT (S=G,C/Y=C,T) <sup>3</sup>	JH cons	5'ACCTCTCCCAGGA <sup>3</sup>	-100
IgK	Vkl-5'	5'GTAGGAGACAGAGTCACCATCACT <sup>3</sup>	Kde-3'	5'CCCTTCATAGACCCCTCAGGCAC <sup>3</sup>	-431
	VkII-5'	5'TGGAGAGCCGGCCTCCATCTC <sup>3</sup>	Kde-3'	5'CCCTTCATAGACCCCTCAGGCAC <sup>3</sup>	-447
	VkIII-5'	5'GGGAAAGAGCCACCCTCTCTG <sup>3</sup>	Kde-3'	5'CCCTTCATAGACCCCTCAGGCAC <sup>3</sup>	-429
	VkIV-5'	5'GGCGAGAGGGCCACCATCAAC <sup>3</sup>	Kde-3'	5'CCCTTCATAGACCCCTCAGGCAC <sup>3</sup>	-445
	Intron-5'	5'GTTATTCCCAAAGCTCAATCTCAAAG <sup>3</sup>	Kde-3'	5'CCCTTCATAGACCCCTCAGGCAC <sup>3</sup>	-511
TCRG	VgI-5'	5'CAGCCGACTGGGTCACTGC <sup>3</sup>	Jg1.1/2.1-3'	5'TTACCAGGTGAAGTTACTATGAGC <sup>3</sup>	-329
	VgI-5'	5'CAGCCGACTGGGTCACTGC <sup>3</sup>	Jg1.3/2.1-3'	5'CCGTATATGCACAAAGCCAAATC <sup>3</sup>	-533
	VgII-5'	5'CAGCCCGCTGGAATGTGTGG <sup>3</sup>	Jg1.1/2.1-3'	5'TTACCAGGTGAAGTTACTATGAGC <sup>3</sup>	-318
	VgII-5'	5'CAGCCCGCTGGAATGTGTGG <sup>3</sup>	Jg1.3/2.1-3'	5'CCGTATATGCACAAAGCCAAATC <sup>3</sup>	-522
	VgIII-5'	5'GACATACCTTGCAAGATATCGAGC <sup>3</sup>	Jg1.3/2.1-3'	5'CCGTATATGCACAAAGCCAAATC <sup>3</sup>	-522
	VgIV-5'	5'CTGAAATATCTATTTCCAGACCAGC <sup>3</sup>	Jg1.1/2.1-3'	5'TTACCAGGTGAAGTTACTATGAGC <sup>3</sup>	-357
	VgIV-5'	5'CTGAAATATCTATTTCCAGACCAGC <sup>3</sup>	Jg1.3/2.1-3'	5'CCGTATATGCACAAAGCCAAATC <sup>3</sup>	-561
TCRD	Vd1-5'	5'ACTCAAGCCAGTCATCAGTATCC <sup>3</sup>	Jd1-3'	5'ACCTCTCCCAGGAGTCTCC <sup>3</sup>	-452
	Vd2-5'	5'ACCAAACAGTGCCTGTGCAATAGG <sup>3</sup>	Dd3-3'new	5'CTTCTGCTATCCCTCCAGG <sup>3</sup>	-501
	Vd2-5'	5'ACCAAACAGTGCCTGTGCAATAGG <sup>3</sup>	Jd1-3'	5'ACCTCTCCCAGGAGTCTCC <sup>3</sup>	-443
	Vd3-5'	5'GACCAGACGGTGGCGAGTGGC <sup>3</sup>	Jd1-3'	5'ACCTCTCCCAGGAGTCTCC <sup>3</sup>	-440
	Dd2-5'n	5'ACTCCATGTTCAAATAGATATAGTATT <sup>3</sup>	Dd3-3'new	5'CTTCTGCTATCCCTCCAGG <sup>3</sup>	-608
	Dd2-5'n	5'ACTCCATGTTCAAATAGATATAGTATT <sup>3</sup>	Jd1-3'	5'ACCTCTCCCAGGAGTCTCC <sup>3</sup>	-550
TAL-1	SliDb-5'	5'AAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA <sup>3</sup>	Tal1db1-3'	5'AGAGCCTGTCGCAAGAA <sup>3</sup>	-300

### 3.5.2 Ablauf der Screening-PCR

Bei der Screening-PCR wird die Template-DNA mit 25 Primerkombinationen getestet. Somit müssen 25 Reaktionsansätze pipettiert werden. Ein Reaktionsansatz setzt sich zusammen aus einem Mastermix, der auch die Template-DNA beinhaltet, und dem jeweiligen Primermix.

Zusammensetzung Mastermix für einen Reaktionsansatz pro Primerpaar:

Reagenzien	Volumen pro Reaktion
10x PCR Gold Buffer	10,0 µl
dNTP	4,0 µl
Magnesiumchlorid (25mM)	6,0 µl
AmpliTaGoldPolymerase	0,5 µl
DNA Template in Aqua	59,5 µl
Reaktionsvolumen	80,0 µl

In der PCR sollten pro Reaktion mindestens 50 bis 100 ng DNA eingesetzt werden.

Der Primermix setzt sich zusammen aus jeweils 10 µl der Forward Primer und 10 µl der Reverse Primer, beide in einer Konzentration von 5pmol/µl.

Nach Durchnummerierung der PCR-Gefäße (Streifen) werden nacheinander 80µl Mastermix und 20 µl der jeweiligen Primerkombination pipettiert. Anschließend werden die Gefäße verschlossen und können nun zur Amplifizierung in den PCR-Cycler gestellt werden.

PCR-Reaktionsbedingungen:

Zyklen		Temperatur	Zeit
Initialer Denaturierungsschritt		95°C	11 min
		96°C	1 min
8	Denaturation	94°C	45 sek
	Annealing	63°C	30 sek
	Extension	70°C	45 sek
37	Denaturation	90°C	30 sek
	Annealing	56°C	30 sek
	Extension	70°C	45 sek
Finaler Extensionsschritt		72°C	7 min

Ein Risiko, der auf der PCR-Technik basierenden Analyse monoklonaler Rearrangements besteht in der Möglichkeit der Generierung falsch positiver Ergebnisse, aufgrund der Amplifikation ähnlicher Rearrangements, die von polyklonalen Lymphozyten stammen.<sup>72</sup> Deshalb erfolgt nach dem finalen Extensionsschritt eine Heteroduplexanalyse der amplifizierten PCR-Produkte. Dabei werden die PCR-Produkte bei 95° für 5 Minuten denaturiert und hinterher, durch

Abkühlen auf 4°C, renaturiert. PCR-Produkte monoklonaler Herkunft erzeugen Homoduplexe, wohingegen Heteroduplexe im Falle polyklonaler Zellen ausgebildet werden. Nach Auftrennung der Produkte durch Gelelektrophorese kann anhand der unterschiedlichen Laufeigenschaften der Homo- bzw. Heteroduplexe eine Unterscheidung zwischen Produkten monoklonaler und polyklonaler Lymphozytenpopulationen getroffen werden.

### 3.5.3 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

#### 3.5.3.1 Herstellung der Gele

Um ein Gel herzustellen, benötigt man einen Gelrahmen, in welche die zunächst flüssige Gelmasse gegossen werden kann. Dieser besteht aus 2 Glasplatten und Spacern. Die Spacer halten einen Raum für das flüssige Gel zwischen den Glasplatten frei.

Die Gelmasse wird aus folgenden Bestandteilen pipettiert:

Reaktionsprotokoll für ein 8% iges Polyacrylamidgel:

Reagenzien	Volumen pro Reaktion
Acrylamid	13,3 ml
TBE-Puffer pH 8	5,0 ml
Aqua	31,5 ml
TEMED	60,0 µl
(N,N,N',N'- tetramethylethyldiamin)	
APS 10%	350,0 µl
(Ammoniumpersulfat)	
Reaktionsvolumen	50,21 ml

Tetramethyl-ethylenediamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) werden zuletzt hinzugefügt. Durch das TEMED kommt es zur Quervernetzung der Polyacrylamidstränge, katalysiert vom APS. Nun sollte die Gelmasse möglichst schnell, in noch flüssigem Zustand und blasenfrei, in die Einfassung gegossen werden. Am oberen Ende der Glasplatten wird ein Kamm eingebracht. Nach einer Wartezeit von ungefähr einer halben Stunde ist das Gel fest geworden.

Der Kamm, der zur Ausbildung von Taschen geführt hat, in welche später die Proben eingebracht werden, kann entfernt werden.

Da ein Gel Platz für 15 Taschen bietet, aber pro Patient 25 verschiedene Primerkombinationen getestet werden, werden pro Patient 2 Gele benötigt.

### **3.5.3.2 Gelelektrophorese**

Die eigentliche Elektrophorese erfolgt in einer Elektrophoresekammer für eine Stunde bei einer Spannung von 450 Volt und TBE-Puffer als leitendem Element. Bevor die Proben in die Taschen pipettiert werden, werden sie mit einer Bromphenolblaulösung versetzt. Die Lösung setzt sich zusammen aus Bromphenolblau 2,5% (Na-Salt), Glycerol 99% und Ampuwa.

Jeweils 14 µl der Bromphenolblaulösung werden mit 50µl der in der vorherigen PCR amplifizierten Proben-DNA vermischt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. In die erste Tasche des Gels wird anstelle einer Probe, ein DNA High Molecular Weight Marker pipettiert. Mit Hilfe dieses Molekulargewichtsmarkers ist es später möglich die Größe der Proben-DNA einzuschätzen.

### **3.5.3.3 Färben der Gele**

Die Gele werden nun in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt. Diese wird durch Verdünnen einer 1%igen Ethidiumbromidstammlösung 1:10 000 mit destilliertem Wasser hergestellt. Nach dem Lösen der Glasplatten von den Gelen werden diese vorsichtig in eine Färbeschale, in der sich die Ethidiumbromidlösung befindet, überführt und für 7 bis 10 Minuten darin belassen. Um ein optimales Ergebnis zu bekommen, sollten die Gele komplett vom Ethidiumbromid umgeben sein und die Färbeschale mehrmals während der Färbezeit leicht bewegt werden.

### **3.5.3.4 Fotodokumentation der Gele**

Abschließend werden die fertigen Gele mit einem Geldokumentationssystem der Firma Raytest unter UV-Licht fotografiert und zusätzlich digital gespeichert. Abbildung 3 zeigt das Ergebnis einer Screening-PCR.



PCR anschließenden Kapillarelektrophorese wandern die DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe durch das Sequenziergel und emittieren nach Anregung durch eine Laser, eine für den jeweiligen Farbstoff spezifische Fluoreszenz. Ein Laserphotometer misst diese und ordnet sie den jeweiligen Basen zu, so dass die Basenabfolge am Ende direkt abgelesen werden kann.

### 3.6.1 Aufreinigung der Target-DNA

Vor der Sequenzanalyse sollte die DNA gereinigt werden, um inhibitorische Einflüsse zu entfernen, die sich negativ auf die Qualität und Quantität der nachfolgenden Sequenzierreaktion auswirken können. Dies sind z.B. mit den ddNTP's konkurrierende residuelle dNTP's (Desoxynukleotidtriphosphate), residuelle Primer (Bildung von Dimeren), Salze (Inaktivierung von Enzymen), Proteine und Rearrangements von nicht-leukämischen Lymphozyten (erzeugen einen Hintergrund).

Zur Aufreinigung wird das E.Z.N.A.<sup>®</sup> Cycle-Pure-Kit der Firma PEQ-LAB gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das Grundprinzip entspricht dem der DNA-Isolierung. Die DNA bindet spezifisch und reversibel, je nach pH- und Salzbedingungen an eine Silikamatrix und inhibitorische Stoffe können schrittweise ausgewaschen werden. Am Schluss kann dann die gereinigte DNA von der Matrix eluiert und in der anschließenden Sequenzierreaktion eingesetzt werden.

Reaktionsansatz zur Aufreinigung:

Reagenzien	Volumen pro Reaktion
DNA-Probe	50,0 µl
CP-Puffer	200,0 µl
Waschpuffer	500,0 µl
Elutionspuffer	40,0 µl

#### Reaktionsprotokoll:

- Zur Proben-DNA (50 µl) werden 200 µl CP-Puffer pipettiert und das Gemisch gevortext



- Auftragen der Suspension auf die Silikamatrix und Zentrifugation für 1 Min. bei 10 000g
- In den nun folgenden 2 Waschschritten werden je 250 µl Waschpuffer zugefügt mit anschließender Zentrifugation für je 1 min bei 10 000g
- Trockenzentrifugation für 1 min bei 10 000g
- Durch Zugabe von 40 µl Eluationspuffer und Zentrifugation für 1 Min. bei 10 000g wird die DNA von der Matrix abgelöst
- Zum Schluss wird die DNA für 15 Min. bei 40°C in einer Vakuumzentrifuge getrocknet

### 3.6.2 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierung erfolgt mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems gemäß den Herstellerangabe im Gene Amp PCR-System 9700. Der gebrauchsfertige BigDye Terminator ready reaction mix enthält eine AmpliTaq DNA-Polymerase, Magnesiumchlorid, Desoxynucleotidtriphosphate, BigDye terminator (fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtrisphosphate) und einen Reaktionspuffer. Die für die PCR-Reaktion verwendeten Primer sind dieselben, die auch in der Screening-PCR eingesetzt wurden, nur in einer niedrigeren Konzentration (1 pmol/µl).

Reaktionsansatz der Sequenzierreaktion:

Reagenzien	Volumen pro Reaktion
BigDye Terminator ready reaction mix	2,0 µl
DNA Template	4,0 µl
Sequenzierprimer (1 pmol/µl)	2,0 µl
Reaktionsvolumen	8,0 µl

PCR-Reaktionsbedingungen:

Zyklen	Temperatur	Zeit
Initialer Denaturationsschritt	94°C	10 sek
25	Denaturation	96°C
	Annealing	55°C
	Extension	60°C
Finaler Extensionsschritt	jeweils 2 Holds bei 72°C	5 min

Nach der PCR-Reaktion werden die Proben sogleich weiterverarbeitet oder bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.6.3 Ethanolfällung

Ziel der Ethanolfällung ist es, die in der vorherigen PCR-Reaktion entstandenen DNA-Fragmente von residuellen Basen, vor allem der ddNTP's, Polymerasen und anderen inhibitorisch wirksamen Komponenten zu befreien. Somit wird eine gut lesbare und eindeutige Sequenzierung ermöglicht.

Reaktionsansatz zur Ethanolfällung:

Reagenzien	Volumen pro Reaktion
Wasser	80,0 $\mu\text{l}$
Ethanol (EtOH) 100%	250,0 $\mu\text{l}$
Natriumacetat (NaAc) 3M, pH4,6	10,0 $\mu\text{l}$
Ethanol (EtOH) 70%	750,0 $\mu\text{l}$

#### Reaktionsprotokoll:

- Zunächst wird die PCR-Probe mit 80  $\mu\text{l}$  Wasser verdünnt
- Nun werden 250  $\mu\text{l}$  100% EtOH und 10  $\mu\text{l}$  NaAc (3M, pH 4,6) hinzugegeben und das Gemisch vorsichtig gevortext
- Inkubation für mindestens 15 Min. bei Raumtemperatur
- Zentrifugation für 15 Min. bei 15 000g
- Verwerfen des Ethanolüberstandes, wobei darauf zu achten ist, dass nicht sichtbare DNA-Pellet nicht zu verlieren
- Das Pellet wird nun mit 750  $\mu\text{l}$  70% EtOH versetzt und für 5 Min. bei 15g zentrifugiert
- Verwerfen des Ethanolüberstandes und nachfolgende Trocknung in der Vakuumzentrifuge für 15 Min. bei  $50^{\circ}\text{C}$

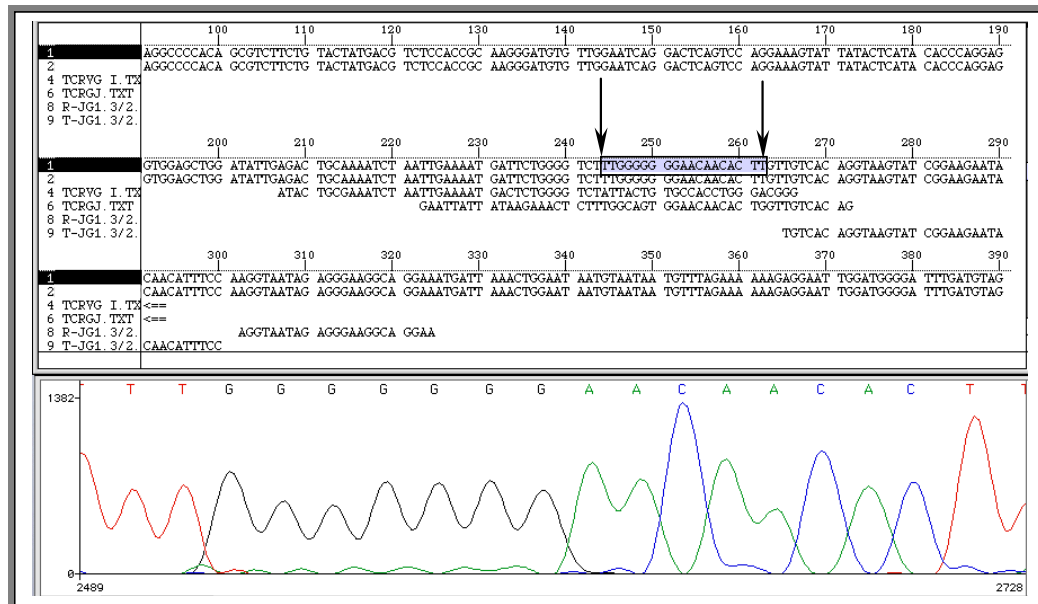
Nachdem das DNA-Pellet in 16  $\mu\text{l}$  Wasser resuspendiert wurde, kann es für die Sequenzanalyse im ABI™ Prism 310 Genetic Analyzer eingesetzt werden.

### 3.6.4 DNA-Sequenzierung im ABI™Prism 310 Genetic Analyzer und Sequenzanalyse

Im ABI™Prism 310 erfolgt nun eine Kapillarelektrophorese der DNA-Fragmente bei einer Spannung von 15 Kilovolt und einer Laufzeit von 30 Minuten.

Die mit 4 verschiedenen fluoreszierenden ddNTP's markierten DNA-Fragmente wandern gemäß ihrer Kettenlänge durch das Sequenziergel und emittieren dabei nach Anregung durch einen Laser, eine für sie spezifische Fluoreszenz. Das Gerät ordnet diese den jeweiligen Basen zu und trägt den Verlauf der gemessenen Spektrallinien gegen die Zeit auf. Die Basenabfolge kann so direkt abgelesen werden, wobei getrennt eine Vorwärts- und eine Rückwärtssequenzierung des Targets erfolgt.

Die gefundenen Sequenzen werden anschließend mit Hilfe des Programms Sequence Navigator der Firma Perkin Elmer ausgewertet. Die aus dem ABIPrism gewonnene Sequenz wird mit den Germlinesequenzen verglichen um das Rearrangement genau zu identifizieren.

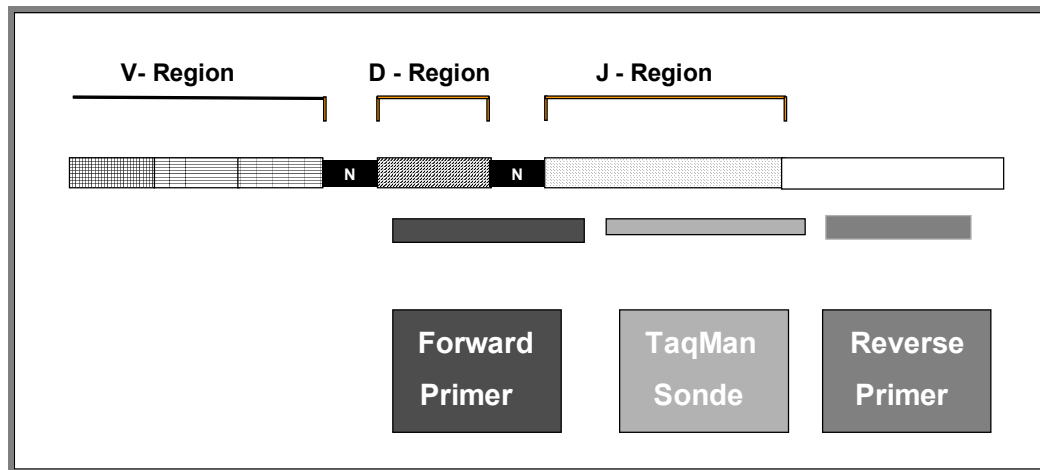


**Abbildung 4: Sequenzanalyse eines patientenspezifischen Rearrangements**  
Die Basenabfolge des patientenspezifischen Rearrangements ist mit zwei Pfeilen gekennzeichnet.

### **3.7 Herstellung der patientenspezifischen Primer**

Durch die vorangegangene Analyse der genauen DNA-Basenabfolge des patientenspezifischen Rearrangements ist es nun möglich, patientenspezifische Forward Primer, sogenannte Allel-spezifischen Oligonukleotide (ASO's), zu generieren. Dies geschieht mit Hilfe der Primer Express Software. Um später möglichst gute Ergebnisse in der Real-time PCR zu erhalten, sollten bei der Herstellung der ASO's bestimmte Punkte berücksichtigt werden<sup>96,97,144</sup>:

- Der Primer sollte in der junctional region liegen und die dort eingefügten Nukleotide und Deletionen um 2 Basen überlappen
- Primer und Sonde dürfen sich nicht überlappen, aber so nahe wie möglich beieinander liegen
- Die Schmelztemperatur sollte zwischen 57°C und 61°C betragen
- Der GC-Gehalt sollte zwischen 30-80% liegen
- Idealerweise sollten palindromische Sequenzen und sich hintereinander wiederholende Abfolgen derselben Base umgangen werden, dies gilt vor allem für die Base Guanin
- Die letzten 5 Basen des 3'-Endes sollten nicht mehr als zwei Guanin und oder Cytosin-Basen enthalten
- Die Ausbildung von Sekundärstrukturen, wie Haarnadel- oder Dimerbildung sollte vermieden werden
- Die verwendeten Primer sollten innerhalb der letzten 3' terminalen Basen ein Purin/Pyrimidin Verhältnis von 2:3 aufweisen



**Abbildung 5: Position des Forward Primers, der TaqMan Sonde und des Reverse Primers innerhalb des Rearrangements**  
 TaqMan Sonde und Reverse Primer binden an Germlinesequenzen, der Forward Primer an die patientenspezifische Sequenz der junctional region.

Erläuterungen: N = junctional region

### **3.8 Messung der minimalen Resterkrankung mit der Real-time PCR**

#### **3.8.1 Funktionsprinzip der Real-time PCR**

Die Einführung der Real-time PCR war ein großer Fortschritt in der Weiterentwicklung bisher verfügbarer PCR-Methoden. Sie ermöglicht die Messung, der sich ansammelnden PCR-Produkte während der kompletten PCR-Reaktion, also in ‚real-time‘. Diese Methode ist in der Lage, einfach und in kurzer Zeit quantitative Daten innerhalb eines großen Detektionsbereiches zu liefern. Die bisher notwendige aufwendige und zeitintensive Nachbearbeitung der PCR-Produkte entfällt und das nicht zu vernachlässigende Risiko einer Kontamination nimmt rapide ab, da es sich bei der Real-time PCR um ein geschlossenes System handelt.

Die Real-time PCR bedient sich der 5' Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase. Zu den essentiellen Bestandteilen der Real-time PCR gehört außerdem ein patientenspezifischer Forward Primer (ASO primer), eine mit 2 Fluoreszenzfarbstoffen markierte Probe (TaqSonde) und ein Reverse Primer. Der Forward

Primer ist komplementär zur patientenspezifischen junctional region des Rearrangements und hybridisiert in diesem Bereich. Die Sonde und der Reverse Primer hingegen sind komplementär zur Germlinesequenz des Targets. Die Verwendung eines patientenspezifischen Forward Primers (ASO primer) anstatt einer patientenspezifischen Sonde (ASO probe) bietet zwei große Vorteile. Zum einen entfällt die Konkurrenz des Forward Primers mit der Amplifikation in Zellen mit normalen nicht-leukämischen Rearrangements, und es muss nur eine Sonde pro Rearrangement und nicht pro Patient generiert werden, was eine große Kostenersparnis bedeutet.

Am 5' Ende der Sonde befindet sich ein fluoreszierender Reporterfarbstoff (6-FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende ein fluoreszierender Quencherfarbstoff (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine). Wenn die Sonde an ihre Zielsequenz zwischen den beiden Primern gebunden und intakt ist, emittieren nach Anregung durch einen Argonlaser beide Farbstoffe ein für sie spezifisches Fluoreszenzsignal (6-FAM: Emissionsmaximum 518 nm; TAMRA: Emissionsmaximum 582 nm), wobei die Emission des Reporterfarbstoffes vom Quencherfarbstoff absorbiert wird. Deshalb kann nur das Fluoreszenzsignal des Quencherfarbstoffes zu diesem Zeitpunkt der Reaktion detektiert werden. Während der PCR-Reaktion werden beide Primer so lange mit Hilfe der Taq-Polymerase verlängert bis sie auf die Sonde stoßen. Die Sonde wird vom DNA-Strang gelöst und durch die 5'Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten, und die beiden Farbstoffe werden voneinander getrennt. Die vom Reporterfarbstoff emittierte spezifische Fluoreszenz wird nun nicht mehr absorbiert, sondern kann gemessen werden. Abbildung 6 zeigt das Funktionsprinzip der Real-time PCR.

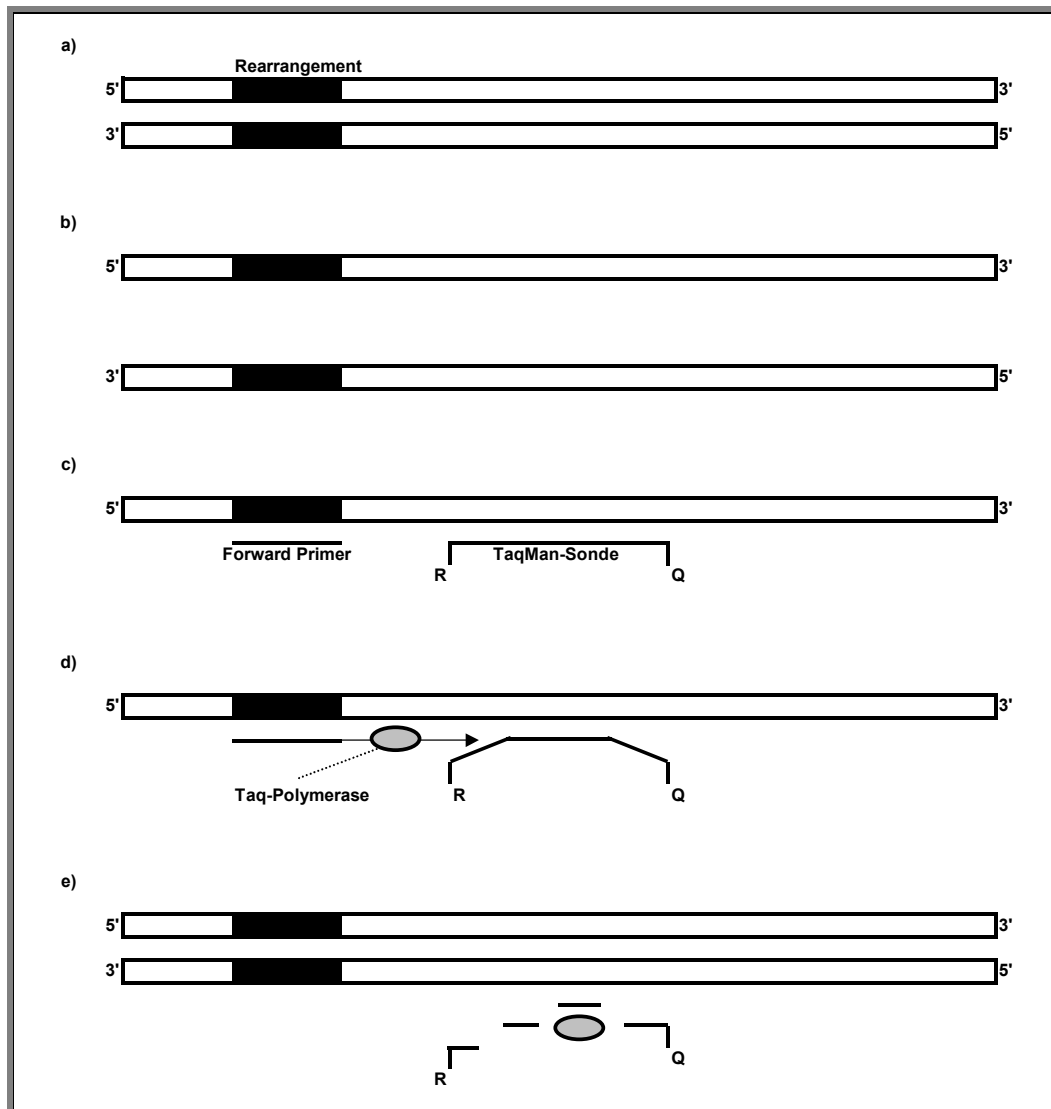


Abbildung 6: Funktionsprinzip der Real-time PCR

**Erläuterung:**

- a) DNA-Doppelstrang mit dem zu amplifizierenden Rearrangement
- b) Trennung des DNA-Doppelstranges durch Hitzedenaturierung
- c) Anlagerung der Forward Primer und der TaqMan Sonde am Beispiel des 5'-3' Stranges (Annealing)
- d) Amplifizierung der DNA durch die Taq-Polymerase und Ablösen der TaqMan Sonde vom DNA-Strang
- e) Spaltung der TaqMan Sonde durch die 5' Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase

Erläuterungen: R = Reporterfarbstoff; Q = Quencherfarbstoff

Die Intensität dieses Fluoreszenzsignals verhält sich proportional zur gebildeten DNA-Menge, die während jedem abgelaufenen Zyklus ansteigt. Generell wird nur ein Fluoreszenzsignal generiert, wenn sowohl die Sonde als auch der ASO

primer mit der DNA hybridisieren, was zu einer hohen Sensitivität führt, weil unspezifisch amplifizierte PCR-Produkte nicht detektiert werden.

Die gemessene Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes wird mit Hilfe einer passiven Referenz normalisiert. Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff, der im TaqMan Master Mix enthalten ist und unbeeinflusst von der Taq-Polymerase an der PCR teilnimmt. Bildet man den Quotienten aus der Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffs und derjenigen des Referenzfarbstoffes, erhält man das sogenannte normalisierte Reportersignal ( $R_n$ ). Um eine genaue Aussage über die Menge der amplifizierten PCR-Produkte machen zu können, wird vom normalisierten Reportersignal ( $R_n$ ) die detektierte Signalintensität der ersten paar Zyklen subtrahiert. Der so erhaltene Wert wird  $\Delta R_n$  genannt. Die Sequence Detection Software misst die  $\Delta R_n$ -Werte für jeden Zyklus und trägt sie gegen die Zyklusanzahl auf. Der PCR-Zyklus, bei dem zuerst ein statistisch signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität gemessen wird, dient als Grundlage für die Quantifizierung. Dieser Zyklus ist der sogenannte Cycle Threshold (Ct) und ist umgekehrt proportional zu der Template-DNA-Menge, die in der Probe enthalten ist. Der Ct-Wert der Probe wird zur Quantifizierung mit den Ct-Werten einer Standardkurve verglichen. Diese Standardkurve wird hergestellt durch serielle Verdünnung einer Probe des Patienten mit bekannter DNA-Konzentration in polyklonaler DNA von Spendern. Trägt man die Konzentrationen der jeweiligen Verdünnungsstufe logarithmisch gegen die gemessenen Ct-Werte auf, so erhält man eine Gerade, die eine lineare Korrelation zwischen der Konzentration und dem Ct-Wert darstellt. Der Korrelationskoeffizient sollte  $> 0,98$  sein und die Steigung (slope) der Geraden einen Wert zwischen  $-3,1$  und  $-3,9$  aufweisen. Durch eine lineare Regressionsanalyse der Standardkurve wird der Target-DNA-Gehalt der zu bestimmenden Probe ermittelt.

Abbildung 7 zeigt die Ct-Werte der Verdünnungsstufen der Standardreihe und in Abbildung 8 ist die daraus resultierende Standardgerade dargestellt.

Abbildung 9 zeigt die Auswertung der Ergebnisse von 5 Folgeproben eines Patienten mit der Sequence Detector v1.7 Software.



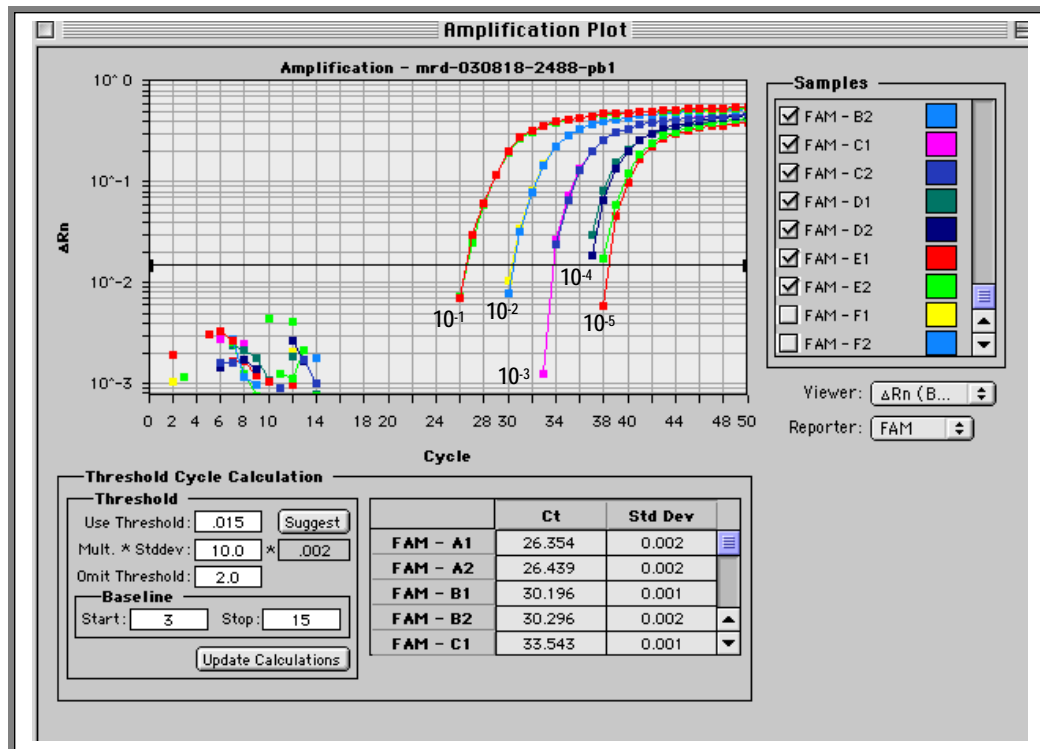


Abbildung 7: Ct-Werte der Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$  der Standardreihe  
Die Messung erfolgte mit Doppelbestimmungen.

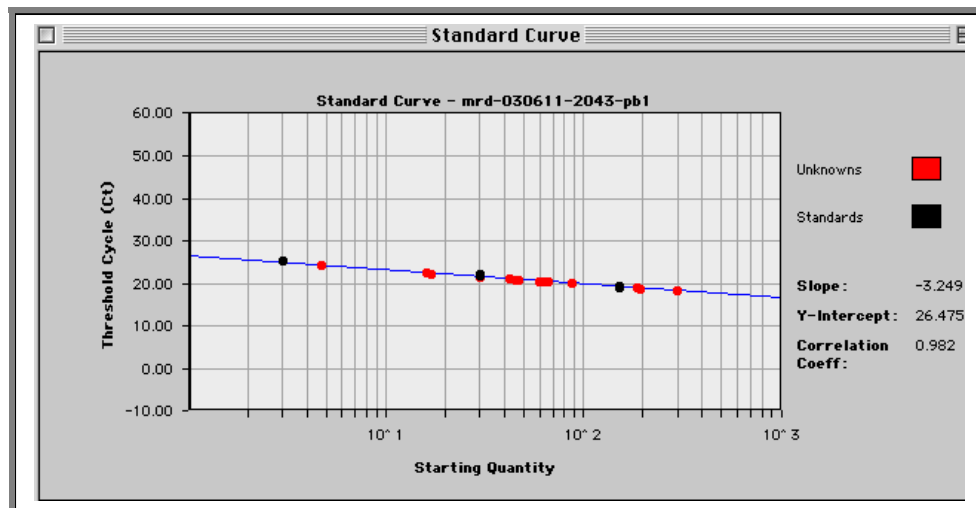


Abbildung 8: Standardgerade

Die Ct-Werte der zu bestimmenden Proben werden zur Quantifizierung der MRD mit den Ct-Werten der Standardkurve verglichen.

<b>PE Applied Biosystems</b>		<b>Sequence Detection Systems</b>					
		<b>1.7</b>					
<b>File Name</b> : mrd-030804-2295-pb1	<b>Plate Type</b> : 7700 Single Reporter						
<b>User</b> :	<b>PCR Volume</b> : 20						
<b>Date</b> : Die, 15. Jun 2004	<b>Comments</b> :						
<b>Thermal Cycle Conditions</b>							
<b>Cycle</b>	<b>Temperature</b>	<b>Time</b>	<b>Repeat</b>	<b>Ramp Time</b>	<b>Auto Increment</b>		
Hold	50.00	2:00		Auto			
Hold	95.00	10:00		Auto			
Cycle	95.00	0:15	50	Auto			
	60.00	1:00		Auto			
<b>Standard Curve</b>							
<b>Slope</b> : -3.52		<b>Threshold</b> : 0.11					
<b>Intercept</b> : 22.54		<b>Baseline Range</b> : (3 , 15)					
<b>Fit R</b> : 1.00							
<b>Sample Information</b>							
<b>Well</b>	<b>Type</b>	<b>Sample Name</b>	<b>Replicate</b>	<b>Ct</b>	<b>Quantity</b>	<b>Std. Dev.</b>	<b>Mean</b>
A1	STND	p3		26.22	1.0e-01	0.00	0.10
A2	STND	p3		26.09	1.0e-01	0.00	0.10
B1	STND	p3		29.43	1.0e-02	0.00	0.01
B2	STND	p3		29.56	1.0e-02	0.00	0.01
C1	STND	p3		33.01	1.0e-03	0.00	0.00
C2	STND	p3		33.11	1.0e-03	0.00	0.00
D1	STND	p3		36.69	1.0e-04	0.00	0.00
D2	STND	p3		36.74	1.0e-04	0.00	0.00
E1	STND	p3		50.00	1.0e-05	0.00	0.00
E2	STND	p3		50.00	1.0e-05	0.00	0.00
F1	STND	p3		50.00		0.00	0.00
F2	STND	p3		50.00		0.00	0.00
D5	UNKN	20027	04	50.00		0.00	0.00
D6	UNKN	20027	04	50.00		0.00	0.00
E5	UNKN	20253	05	50.00		0.00	0.00
E6	UNKN	20253	05	50.00		0.00	0.00
F5	UNKN	21345	06	35.04	2.9e-04	0.00	0.00
F6	UNKN	21345	06	35.44	2.2e-04	0.00	0.00
G5	UNKN	21862	07	21.32	2.2e+00	1.14	1.54
G6	UNKN	21862	07	21.35	2.2e+00	1.14	1.54
H5	UNKN	21977	08	22.19	1.3e+00	0.60	0.95
H6	UNKN	21977	08	22.11	1.3e+00	0.60	0.95
G1	NTC	p3	NTC	50.00		0.00	0.00

Abbildung 9: Auswertung der Daten mit der Sequence Detector v1.7 Software am Beispiel von 5 Folgeproben eines Patienten

Die Menge und die Qualität der DNA der Folgeproben, die eingesetzt werden, weist oft Differenzen auf. Um diese zu normalisieren wird eine aktive Referenz benützt, in Form eines housekeeping Gens, dem Albumingen. Die Produkte des Gens werden ebenfalls, mit Hilfe eines verfügbaren Sets an Primern und einer Sonde, während der PCR gemessen. Der erhaltende Wert wird anhand einer

Albuminstandardkurve quantifiziert. Dividiert man den Wert, den man für die zu messende Target-DNA erhalten hat, durch den Wert für das Albumin so erhält man einen Wert, der unabhängig von der Ausgangsmenge der DNA in der Probe ist. Abbildung 10 zeigt die Ct-Werte des Albuminstandards und Abbildung 11 die dazugehörige Auswertung.

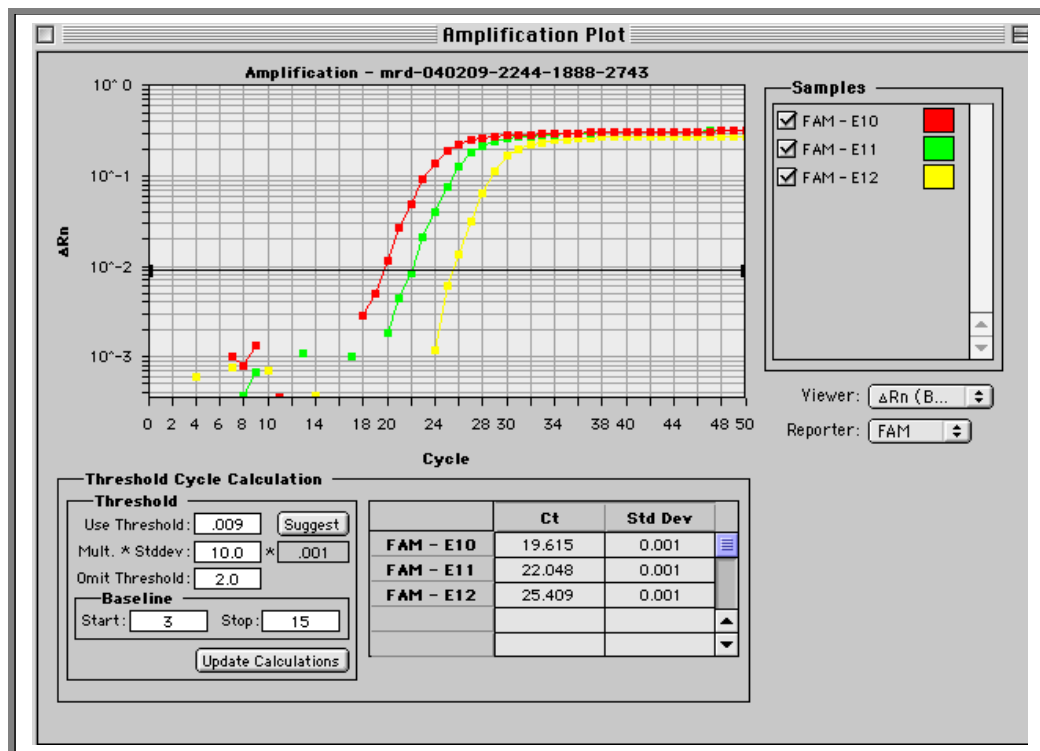


Abbildung 10: Ct-Werte des Albuminstandards

<b>PE Applied Biosystems</b>		<b>Sequence Detection Systems</b>					
		<b>1.7</b>					
<b>File Name :</b>	mrd-040209-2244-1888-27	<b>Plate Type :</b>	7700 Single Reporter				
<b>User :</b>		<b>PCR Volume :</b>	20				
<b>Date :</b>	Die, 15. Jun 2004	<b>Comments :</b>					
<b>Thermal Cycle Conditions</b>							
<b>Cycle</b>	<b>Temperature</b>	<b>Time</b>	<b>Repeat</b>	<b>Ramp Time</b>	<b>Auto Increment</b>		
Hold	50.00	2:00		Auto			
Hold	95.00	10:00		Auto			
Cycle	95.00	0:15	50	Auto			
	60.00	1:00		Auto			
<b>Standard Curve</b>							
<b>Slope :</b>	-3.45	<b>Threshold :</b>	0.01				
<b>Intercept :</b>	26.61	<b>Baseline Range :</b>	(3 , 15)				
<b>Fit R :</b>	1.00						
<b>Sample Information</b>							
<b>Well</b>	<b>Type</b>	<b>Sample Name</b>	<b>Replicate</b>	<b>Ct</b>	<b>Quantity</b>	<b>Std. Dev.</b>	<b>Mean</b>
E10	STND	albumin		19.16	1.5e+02	0.00	150.00
E11	STND	albumin		21.40	3.0e+01	0.00	30.00
E12	STND	albumin		25.00	3.0e+00	0.00	3.00

Abbildung 11: Auswertung des Albuminstandards mit der Sequence Detector v1.7 Software

Die Real-time PCR wurde mit dem TaqMan-System ABI 7700, in welches ein PCR-Prozessor der Firma Perkin Elmer vom Typ 9600 integriert ist, durchgeführt.

Für die PCR-Reaktionen wurde ein auf das TaqMan-System optimal abgestimmter gebrauchsfertiger TaqMan Universal PCR Master Mix verwendet. Dieser beinhaltet eine AmpliTaq Gold DNA-Polymerase, dNTPs mit dUTP (Desoxyuraciltriphosphat), eine passive Referenz (ROX), eine AmpErase uracil-N-glycosylase (UNG) und Pufferkomponenten. Die verwendeten TaqMan Sonden und Reverse Primer sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: Darstellung der verwendeten Primer und TaqMan Sonden für die Real-time PCR**  
**Erläuterungen: F = Forward Primer; Ig = Immunglobulin; R = Reverse Primer; T = TaqMan Sonde; TCR = T-Zellrezeptor**

Target	Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3' Richtung
IgH	T-JH1.2.4.5.	CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG
	T-JH3	CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
	T-JH6	CACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAA
	R-JH1-intron	CGCTATCCCCAGACAGCAGA
	R-JH2-intron	GGTGCCTGGACAGAGAAGACT
	R-JH3-intron	AGGCAGAAGGAAAGCCATCTTAC
	R-JH4-intron	CAGAGTTAAAGCAGGAGAGAGGTTGT
	R-JH5-intron	AGAGAGGGGGTGGTGAGGACT
	R-JH6-intron	GCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGT
IgK	T-Kde-cons1	AGCTGCATTTTTGCCATATCCACTATTTGGAGT
	R-Kde-cons2	TACAGACAGGTCCTCAGAGGTCAG
TCRD	T-JD1-cons1	CCCGTGTGACTGTGGAACCAAGTAAGTAACTC
	R-JD1-cons1	TTAGATGGAGGATGCCTTAACCTTA
	T-DD3-cons	ATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCT
	R-DD3-cons4	TTGCCCTGCAGTTTTTGTAC
TCRG	T-JG1.3/2.3-cons3	TGTCACAGGTAAGTATCGGAAGAATACAACATTTCC
	R-JG1.3/2.3-cons2	TTCTGCCTTCCCTCTATTACCT
	Tr-JG1.1/2.1-cons1	ACCAGGTGAAGTTACTATGAGCTTAGTCCCTTCAG
	R-JG1.1/2.1-cons1	TATACTGAGGCCAGGAATGTGACATA
Albumin	T-Albumin	TGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGA
	F-Albumin	TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT
	R-Albumin	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT

### 3.8.2 Sensitivitätstestung der Primer

Bevor die eigentliche Messung der minimalen Resterkrankung in den Folgeproben der Patienten erfolgt, werden die ASO's auf ihre Sensitivität für das patientenspezifische Rearrangement mit der Real-time PCR getestet. Die Primer sollten idealerweise eine Sensitivität von  $10^{-4}$  oder  $10^{-5}$ , aber mindestens von  $10^{-3}$ , aufweisen.

Zuerst wird eine Verdünnungsreihe mit einer Diagnoseprobe angefertigt, die vorher auf eine Konzentration von 100 ng/μl eingestellt wurde. Die Verdünnung

erfolgt in polyklonaler Spender-DNA, welche sich aus einem DNA-Gemisch mehrerer gesunder Personen zusammensetzt und die ebenfalls in einer Konzentration von 100 ng/µl vorliegt. In vorher 5 gekennzeichnete Eppendorfgefäße werden je 22,5 µl der Spender-DNA pipettiert. In das erste Gefäß werden nun 2,5 µl der Diagnoseprobe zugegeben und gut gemischt. Somit erhält man eine 1:10 ( $10^{-1}$ ) Verdünnung. Von dieser Verdünnung werden nun wieder 2,5 µl abgenommen und in das nächste Gefäß überführt, was einer Verdünnung 1:100 ( $10^{-2}$ ) entspricht. Wiederholt man diese Schritte erhält man am Ende im fünften und letzten Gefäß eine 1:100 000 Verdünnung ( $10^{-5}$ ). Die Verdünnungsschritte  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  sowie die Spender DNA, die als Negativkontrolle dient, werden als DNA-Template in der Sensitivitätstestung eingesetzt. Es sollte eine Doppelbestimmung erfolgen.

Danach wird ein Primermix aus dem ASO (Forward Primer), der entsprechenden TaqSonde und dem Reverse Primer hergestellt.

Reaktionsansatz per Well:

Reagenzien	Volumen per Well
TaqMix	10,00 µl
Primermix:	6,00 µl
F-Primer 900nm	0,17 µl (100 pmol/µl)
R-Primer 900nm	0,17 µl (100 pmol/µl)
TaqSonde 100nm	0,38 µl (5 pmol/µl)
Wasser	5,08 µl
BSA	0,20 µl (2%)
DNA-Template (400ng)	4,00 µl
Reaktionsvolumen	20,00 µl

#### Reaktionsprotokoll:

- Zuerst werden 10 µl TaqMan Master Mix in jedes Well vorgelegt.
- Anschließend werden jeweils 4 µl der Verdünnungsschritte  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  bzw. der Spender-DNA hinzugegeben. Zum Schluss werden 6 µl des Primermixes hinzupipettiert. Dabei ist zu beachten, dass die DNA nicht von einem Well in ein anderes verschleppt wird.
- Die Reaktionsgefäße werden gut verschlossen und im ABI Prism 7700 Sequence Detection System analysiert.

Reaktionsbedingungen der Real-time PCR für die Sensitivitätstestung:

Zyklen	Temperatur		Zeit
Erster Hold		50°C	2 min
Zweiter Hold		95°C	10 min
50	Denaturation	95°C	15 sek
	Annealing/Extension	60°C	60 sek

### 3.8.3 Ablauf einer Real-time PCR zur Analyse der minimalen Resterkrankung

Nach erfolgreicher Testung der Primer kann eine Messung der minimalen Resterkrankung in den peripheren Folgeblutproben erfolgen. Die zu untersuchenden Proben sollten vorher photometrisch auf eine Konzentration von 100 ng/ $\mu$ l eingestellt werden.

Zunächst wird, wie bereits im Protokoll für die Real-time PCR der Sensitivitätstestung der Primer beschrieben, mit der Diagnoseprobe des Patienten eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungsschritten  $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$  erstellt.

Da für jede Probe eine Albuminkontrolle durchgeführt wird, muss zusätzlich noch eine Albuminverdünnungsreihe generiert werden. Zur Herstellung dieser Albuminverdünnungsreihe werden Spenderproben mit einer Konzentration von 150 ng/ $\mu$ l, 30 ng/ $\mu$ l sowie 3 ng/ $\mu$ l als DNA-Template eingesetzt.

Danach wird für jeden Primer ein Primermix aus dem ASO (Forward Primer), der entsprechenden TaqSonde und dem Reverse Primer pipettiert. Zusätzlich wird ein Albuminprimermix hergestellt, für den die entsprechenden Primer und die TaqSonde als Set zu Verfügung stehen.

Die Messung der Standardreihen, der Folgeproben und der Albuminkontrollen der Folgeproben erfolgt in Doppelbestimmungen, die der Albuminstandardreihe in Einzelbestimmung.

## Reaktionsansatz per Well:

Reagenzien	Volumen per Well
TaqMix	10,00 $\mu$ l
Primermix:	6,00 $\mu$ l
F-Primer 900nm	0,17 $\mu$ l (100 pmol/ $\mu$ l)
R-Primer 900nm	0,17 $\mu$ l (100 pmol/ $\mu$ l)
TaqSonde 100nm	0,38 $\mu$ l (5 pmol/ $\mu$ l)
Wasser	5,08 $\mu$ l
BSA	0,20 $\mu$ l (2%)
DNA-Template (400ng)	4,00 $\mu$ l
Reaktionsvolumen	20,00 $\mu$ l

**Reaktionsprotokoll:**

- Zuerst werden 10  $\mu$ l TaqMan Master Mix in jedes Well vorgelegt.
- Anschließend werden 4  $\mu$ l Template-DNA dazu pipettiert. In vier Wells der Reaktionsplatte erfolgt eine Non-Template Kontrolle (NTC = no template control). Das bedeutet, dass in diese vier Wells keine Template-DNA, sondern stattdessen 4  $\mu$ l HPLC Wasser pipettiert werden.
- Zum Schluss werden 6  $\mu$ l des jeweiligen Primermixes hinzugefügt. Dabei ist wieder zu beachten, dass die DNA nicht von einem Well in ein anderes verschleppt wird.

Abschließend wird die Reaktionsplatte gut verschlossen und mit dem ABI Prism 7700 Sequence Detection System analysiert.

Die nachfolgende Abbildung 12 zeigt ein mögliches Pipettierschema einer 96-Well-Reaktionsplatte, mit der die Messung der minimalen Resterkrankung einer peripheren Folgeblutprobe mit zwei verschiedenen ASO's durchgeführt wird



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe		
B	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>								
C	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>								
D	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>								
E	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>								
F	Spender	Spender	Spender	Spender								
G	NTC	NTC	NTC	NTC								
H	150	30	3									

ASO 1 Primermix
  ASO 2 Primermix
  Albumin Primermix

**Abbildung 12: Pipettierschema einer 96-Well-Reaktionsplatte zur Messung der MRD am Beispiel einer Patientenprobe, welche mit den Primern ASO 1 und ASO 2 untersucht wird**

**Erläuterungen:**

**NTC (no template control) = Non-Template Kontrolle**

Reaktionsbedingungen der Real-time PCR:

Zyklen	Temperatur	Zeit
Erster Hold	50°C	2 min
Zweiter Hold	95°C	10 min
50	Denaturation	95°C
	Annealing/Extension	60°C

### 3.8.4 Interpretation der mit der Real-time PCR generierten Daten

Bis jetzt gibt es noch keine gemeinsamen offiziellen internationalen Richtlinien zur Auswertung der Real-time PCR MRD-Daten. Aber in der Zwischenzeit sind mehrere europäische Netzwerke entstanden, innerhalb derer gemeinsame Richtlinien für die Datenanalyse und Darstellung der Ergebnisse entwickelt wurden und werden. Wir haben uns bei der Datenanalyse an den Richtlinien der European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL) orientiert, welche nachfolgend aufgeführt sind.<sup>138</sup>

#### **Sensitivität:**

a) reproduzierbare Sensitivität oder reproduzierbarer Bereich (Bereich in dem die Daten präzise quantifiziert werden können)

niedrigste Verdünnungsstufe:

- welche eine spezifische Amplifikation zeigt, erkennbar anhand der Gestalt der Kurve

- in welcher die Abweichung innerhalb der Ct-Werte der Mehrfachbestimmungen weniger als 1,5 beträgt
- in welcher der höchste Ct-Wert mehr als 3 niedriger ist als der niedrigste Ct des background
- in welcher die Differenz der Ct-Werte zur vorherigen Verdünnungsstufe 3 bis 4 beträgt
- welche eine Standardkurve mit einer Steigung (slope) zwischen  $-3,1$  und  $-3,9$  erzeugt und bei welcher der Korrelationskoeffizienten größer oder gleich  $0,98$  ist.

b) maximale Sensitivität (Bereich in dem die Daten noch detektiert werden können, der aber nicht reproduzierbar ist)

niedrigste Verdünnungsstufe:

- welche eine spezifische Amplifikation zeigt, erkennbar anhand der Gestalt der Kurve
- in welcher mindestens ein Well positiv ist; die Differenz zwischen den Ct-Werten ist nicht von Bedeutung
- in welcher der höchste Ct mindestens um 1 niedriger ist als der niedrigste Ct des background.

### **Quantifizierung der Daten**

Allgemein:

- eine Quantifizierung ist nur innerhalb des reproduzierbaren Bereichs möglich
- eine Korrektur der DNA-Qualität und Quantität erfolgt durch ein Kontrollgen
- die Quantifizierung erfolgt anhand der Standardkurve.

Eine Probe wird als positiv bewertet, wenn

- der Ct-Wert von einer oder mehreren Mehrfachbestimmungen der Probe mindestens 1 Ct niedriger ist als der niedrigste Ct des background und innerhalb eines Bereichs von 4 Ct der maximalen Sensitivität liegt.

Eine Probe wird als negativ bewertet, wenn

- überhaupt keine Amplifizierung stattgefunden hat
- wenn der niedrigste Ct-Wert der Probe innerhalb eines Bereichs von 1 Ct des backgrounds liegt
- wenn alle Ct-Werte mehr als 4 Cycles vom höchsten Ct der maximalen Sensitivität entfernt sind.

Liegt bei einer Probe ein Ct-Wert außerhalb des reproduzierbaren Bereichs, sollte diese als positiv bewertet werden, mit einem maximalen MRD-Level niedriger als die reproduzierbare Sensitivität.

## 4. Patienten

### 4.1 *Patientenkollektiv*

In die Untersuchung wurden 90 Patienten mit einer Akuten Lymphatischen Leukämie eingeschlossen, die eine allogene Stammzelltransplantation bekommen hatten. Die Patienten wurden nicht nur in Tübingen transplantiert, sondern auch an verschiedenen Transplantationszentren innerhalb ganz Deutschlands. Die entnommenen Peripherblutproben wurden dann nach Tübingen zur MRD-Analyse geschickt.

Überblick über die externen Transplantationszentren:

- Universitätskinderklinik Freiburg
- Universitätsklinik für Kinder und Jugendliche Erlangen
- Universitätskinderklinik Essen
- Medizinische Hochschule Hannover – Kinderklinik
- Universitätskinderklinik Jena
- Universitätskinderklinik und Poliklinik Ulm
- Kinderklinik der TU München
- Kinderklinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Dr. von Haunersches Kinderhospital München
- Universitätskinderklinik Halle-Wittenberg
- Universität Frankfurt am Main
- Kinderklinik Düsseldorf
- Kinderklinik Münster
- Universitätsklinikum Leipzig
- Zentrum für Kinderheilkunde Gießen

Nach der Identifizierung und Sequenzierung mit anschließender Analyse der patientenspezifischen Rearrangements konnten patientenspezifische Oligonukleotide (ASO's) synthetisiert werden, mit denen der quantitative Nachweis der MRD in den Folgeblutproben der Patienten möglich war. Es wurden für

jeden Patienten mehrere Proben, welche zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation entnommen worden waren, untersucht. Insgesamt wurden 1044 Peripherblutproben gemessen, mit einem Median von 8 Proben pro Patient. Der Median der Untersuchungszeiträume lag bei 276,5 Tagen, mit einem Minimum von 15 Tagen (Patient verstarb an TRM) und einem Maximum von 1464 Tagen nach der allo-SZT.

#### ***4.2 Patiententabellen***

Die folgenden zwei Tabellen zeigen wichtige Daten zur Charakterisierung der Patienten. Tabelle 5 enthält Angaben zu den einzelnen Patienten wie das Alter und das Geschlecht, die Art der Konditionierung, die Herkunft und Art des Transplantates, den Verlauf nach Transplantation und der Zugehörigkeit zur MRD-Gruppe sowie den höchsten gemessenen MRD-Wert im Peripherblut. In Tabelle 6 sind die wichtigsten Daten aller Patienten zusammengefasst im Überblick dargestellt.

**Tabelle 5: Patiententabelle**

**Erläuterungen zur Patiententabelle:**

**ALL = akute lymphatische Leukämie; c-ALL = common ALL; ALG = Anti-Lymphozyten-Globulin; ATG = Anti-Thymozyten-Globulin; Bus = Busulfan; CC = kompletter Chimarismus; CR = komplette Remission; Cyc = Cyclophosphamid; DecreasMC (decreasing mixed chimerism) = abnehmender gemischter Chimarismus; Eto = Etoposid; Flu = Fludarabin; GvHD = Graft-versus-Host Disease; Haplo = haploidentischer Spender; InceasMC (increasing mixed chimerism) = zunehmender gemischter Chimarismus; LowlevMC (Low-level mixed chimerism = konstanter gemischter Chimarismus auf niedrigem Niveau; Ltopo = Ltopophos; m = männlich; MFD (Matched Family Donor) = HLA-identischer Familienspender); MMFD (MisMatched Family Donor) = nicht-HLA-identischer Familienspender; MMUD (MisMatched Unrelated Donor) = nicht-HLA-identischer Fremdspender; MRD(minimal residual disease) = minimale Resterkrankung; MUD (Matched Unrelated Donor) = HLA-identischer Fremdspender; nb = nicht bekannt; OKT3 = monoklonale Lymphozyten-Antikörper; Pred = Prednison; Thio = Thiotepa; Stammzellquelle: 1 = Knochenmark; 2 = peripheres Blut; 3 = Nabelschnur; TRM (Treatment Related Mortality) = therapiessozierte Mortalität (GvHD, Infektion, Toxizität); UPN = Patientennummer; w = weiblich**

UPN	Geschlecht	Diagnose	Spender-Empfänger-Beziehung	Remissionsstatus vor KMT	S-Gruppen	KMT-Nr.	Stammzellquelle	Konditionierung	Radiatio	T-Zell-Depletion	MRD-Gruppe	max. MRD-Wert im Blut	Chimarismus	Immuntherapie	GvHD	klinischer Verlauf	Alter
1272	m	c-ALL	MUD	CR 2	2	1	1	TBI+Eto+Cyc+ATG	ja	nein	high	7,56E-02	CC	nein	nein	Rezidiv	10
1282	m	pre-B-ALL	MUD	> CR 2	4	1	1	TBI+Eto+Cyc	ja	nein	high	1,88E-03	CC	nein	ja	Rezidiv	3
1566	m	c-ALL	MMFD	> CR 2	4	1	2	Bus+Cyc+Thio+OKT3	nein	ja	neg	0,00E+00	CC	nein	nein	TRM	18
1615	w	c-ALL	MUD	CR 2	3	1	2	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	nein	high	1,14E-04	CC	nein	ja	CR	4
1718	w	c-ALL	MFD	CR 2	3	1	2	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	ja	low	4,22E-05	CC	nein	nein	CR	14
1737	w	c-ALL	MMUD	CR 2	3	1	2	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	ja	low	1,00E-05	InceasMC	ja	nein	CR	10
1753	w	T-ALL	MFD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto	ja	nein	low	1,00E-06	CC	nein	ja	CR	11
1756	w	c-ALL	Haplo	> CR 2	4	1	2	Bus+Cyc+Flu+OKT3	nein	ja	high	3,50E-02	InceasMC	ja	ja	Rezidiv	10
1776	w	pre-B-ALL	MUD	CR 2	4	1	2	Bus+Cyc+Eto+ATG	nein	ja	high	4,13E-01	InceasMC	ja	nein	Rezidiv	1
1793	m	c-ALL	MUD	CR 2	2	1	2	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	ja	high	1,61E-01	InceasMC	nein	nein	Rezidiv	10
1816	m	c-ALL	MFD	CR 2	2	1	1	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	DecreasMC	nein	ja	CR	10
1820	m	c-ALL	MMUD	> CR 2	4	1	2	TBI+Cyc+Eto	ja	ja	high	4,36E-03	CC	nein	ja	Rezidiv	11
1825	m	pre-B-ALL	MFD	CR 2	2	1	2	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	CR	6
1829	m	c-ALL	MFD	> CR 2	2	1	2	TBI+Flu	ja	ja	high	1,79E+00	DecreasMC	nein	ja	Rezidiv	11
1836	m	c-ALL	MFD	CR 2	2	1	2	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	ja	CR	15
1839	m	c-ALL	MFD	CR 2	4	1	1	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	DecreasMC	nein	ja	TRM	14
1849	2	c-ALL	MUD	> CR 2	2	1	2	TBI+Flu	ja	ja	neg	0,00E+00	DecreasMC	nein	ja	CR	14
1865	m	c-ALL	MUD	> CR 2	2	1	1	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	CR	9
1882	w	pre-B-ALL	MFD	CR 2	2	1	2	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	TRM	21
1888	m	T-ALL	MUD	CR 1	nb	1	2	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	ja	neg	0,00E+00	InceasMC	ja	nein	CR	6
1889	w	T-ALL	MUD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto	ja	nein	low	1,00E-04	CC	nein	nein	CR	11
1891	w	c-ALL	MFD	CR 2	3	1	2	TBI+Eto	ja	nein	high	1,16E-03	DecreasMC	nein	ja	TRM	14
1906	m	c-ALL	MFD	CR 1	nb	1	1	TDI+Cto	ja	nein	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	ja	CR	6
1908	m	T-ALL	MFD	CR 1	nb	1	3	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	CR	5
1913	m	T-ALL	MMFD	CR 1	nb	1	2	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	ja	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	ja	CR	17
1926	w	pre-B-ALL	MUD	> CR 2	nb	1	2	Bus+Thio+Cyc	nein	nein	high	9,98E-04	LowlevMC	nein	nein	TRM	10
1965	m	c-ALL	MUD	> CR 2	2	1	2	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	ja	high	6,18E-02	InceasMC	nein	nein	Rezidiv	22
1991	m	c-ALL	MUD	CR 1	nb	1	2	TBI+Cyc+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	ja	TRM	17
2014	m	c-ALL	MUD	CR 2	3	1	2	TBI+Eto+ALG	ja	nein	neg	0,00E+00	InceasMC	ja	ja	TRM	4
2018	w	c-ALL	MUD	CR 2	3	1	1	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	DecreasMC	nein	nein	TRM	4
2020	m	c-ALL	MUD	CR 2	2	1	1	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	InceasMC	ja	nein	TRM	12
2036	m	pre-B-ALL	MMUD	> CR 2	4	1	2	TBI+Eto+Flu+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	TRM	13
2043	m	c-ALL	MUD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto+Cyc+Pred+OKT3	ja	ja	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	nein	Rezidiv	12
2049	m	c-ALL	MFD	CR 2	3	1	1	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	ja	CR	5
2050	m	c-ALL	Haplo	> CR 2	4	1	2	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	ja	neg	0,00E+00	CC	nein	nb	CR	12
2052	m	c-ALL	Haplo	CR 2	3	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	ja	neg	0,00E+00	InceasMC	nein	nb	Abstoßung	4
2056	m	c-ALL	MMUD	CR 1	nb	1	2	Eto+Thio+ATG	nein	ja	high	3,00E-01	InceasMC	ja	nein	Rezidiv	12
2057	w	pre-B-ALL	MUD	CR 2	2	1	1	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	InceasMC	nein	ja	TRM	12
2059	m	T-ALL	MUD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto+Cyc+ATG	ja	nein	low	1,00E-05	InceasMC	ja	nein	CR	6
2060	w	T-ALL	MFD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto	ja	nein	low	1,00E-05	LowlevMC	nein	ja	CR	8
2061	m	pre-B-ALL	MMFD	CR 2	3	1	2	TBI+Eto+ALG	ja	ja	neg	0,00E+00	keine Analyse	nb	nein	Abstoßung	21
2064	w	c-ALL	MFD	CR 2	2	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	ja	neg	0,00E+00	InceasMC	ja	nein	CR	19
2071	m	c-ALL	MMUD	CR 1	nb	1	2	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	DecreasMC	nein	nein	TRM	7
2077	m	T-ALL	MUD	CR 1	nb	1	1	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	nein	CR	9
2087	m	T-ALL	MFD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	DecreasMC	nein	ja	CR	7
2101	m	c-ALL	MFD	CR 2	2	1	1	TBI+Eto+Flu+OKT3	ja	nein	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	nein	CR	7
2102	m	c-ALL	MMFD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto+Cyc+OKT3	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	TRM	16
2105	m	T-ALL	MFD	CR 2	4	1	2	TBI+Eto	ja	nein	high	2,67E-04	DecreasMC	nein	ja	Rezidiv	15

UPN	Geschlecht	Subgruppe	Spender-Empfänger-Beziehung	Remissionsstatus vor KMT	S-Gruppen	KMT-Nr.	Stammzellquelle	Konditionierung	Radiatio	T-Zell-Depletion	MRD-Gruppe	max. MRD-Wert im Blut	Chimärismus	Immuntherapie	GvHD	klinischer Verlauf	Alter
2114	m	c-ALL	Haplo	CR 2	3	1	2	TBI Flu ATG Eto	ja	ja	high	4,63E-03	IncreasMC	ja	nein	Rezidiv	10
2116	m	c-ALL	MMFD	CR 2	3	1	2	TBI+Eto+Flu+OKT3	ja	ja	high	3,02E+00	IncreasMC	nein	nein	Rezidiv	5
2119	m	c-ALL	MFD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto	ja	nein	high	9,04E-04	IncreasMC	ja	nein	Rezidiv	8
2123	m	c-ALL	MUD	CR 1	nb	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	CR	4
2125	m	pre-B-ALL	Haplo	> CR 2	4	1	2	TBI+Thio+Eto+ATG+Pred+OK	ja	ja	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	nein	TRM	17
2130	m	T-ALL	MMUD	CR 1	nb	1	3	TBI + Eto	ja	nein	high	1,04E-03	LowlevMC	nein	ja	Rezidiv	5
2208	m	T-ALL	Haplo	CR 1	nb	1	2	TBI+Thio+Eto+Flu+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	CR	18
2217	m	pre-B-ALL	MMUD	> CR 2	4	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	ja	high	2,73E-03	CC	nein	ja	Rezidiv	6
2237	m	pre-B-ALL	MFD	> CR 2	4	1	1	TBI+Eto	ja	nein	high	1,13E-03	LowlevMC	nein	ja	Rezidiv	8
2239	m	c-ALL	MUD	> CR 2	4	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	ja	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	CR	15
2244	m	pre-B-ALL	MUD	> CR 2	2	1	1	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	ja	neg	0,00E+00	IncreasMC	ja	ja	CR	23
2266	w	c-ALL	Haplo	CR 2	4	1	2	TBI+Flu+ATG+Eto	ja	ja	high	1,01E-01	IncreasMC	ja	nb	Rezidiv	11
2276	w	pre-B-ALL	MFD	CR 2	4	1	1	TBI+Eto	ja	nein	low	1,00E-04	DecreasMC	nein	ja	CR	6
2287	m	c-ALL	Haplo	CR 1	nb	1	1	TBI+Thio+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	nein	TRM	15
2295	w	c-ALL	MUD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto+ATG	ja	nein	high	2,40E-04	CC	nein	nein	Rezidiv	9
2298	m	T-ALL	Haplo	CR 1	nb	1	2	TBI+Flu+ATG+Eto	ja	ja	high	5,41E-03	LowlevMC	nein	nein	Rezidiv	9
2311	w	pre-B-ALL	MFD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto	ja	ja	neg	0,00E+00	CC	nein	nb	CR	5
2324	w	c-ALL	MMUD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	TRM	3
2342	m	T-ALL	MUD	CR 2	4	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	ja	CR	18
2346	w	c-ALL	MUD	CR 1	nb	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	nein	high	7,30E-02	LowlevMC	nein	nein	Rezidiv	6
2366	m	c-ALL	MFD	CR 2	2	1	1	TBI+Eto	ja	nein	high	1,45E-04	LowlevMC	nein	nein	CR	12
2387	m	c-ALL	MFD	CR 2	2	1	1	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	ja	TRM	17
2433	m	T-ALL	MUD	CR 2	4	1	1	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	nein	CR	8
2445	m	pre-B-ALL	MUD	CR 2	3	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	ja	high	5,67E-02	IncreasMC	nein	nein	Rezidiv	4
2451	m	c-ALL	MMFD	CR 2	2	1	2	TBI+Eto+Flu+ATG	ja	ja	high	6,21E-03	LowlevMC	nein	ja	Rezidiv	15
2478	w	pre-B-ALL	MFD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto	ja	nein	high	4,29E-03	CC	nein	nein	Rezidiv	7
2488	w	c-ALL	MFD	CR 2	2	1	2	TBI+ Ltopo	ja	ja	low	4,98E-05	DecreasMC	nein	ja	CR	14
2491	m	c-ALL	MFD	> CR 2	2	1	1	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	LowlevMC	nein	ja	CR	14
2495	w	c-ALL	MUD	CR 2	3	1	3	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	DecreasMC	nein	nein	CR	7
2504	w	c-ALL	MFD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	CR	7
2541	m	T-ALL	MMUD	CR 2	4	1	1	Eto+TBI+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	CR	4
2560	m	pre-B-ALL	MUD	CR 2	3	1	1	TBI+Eto+ATG	ja	nein	high	9,80E-03	CC	nein	ja	Rezidiv	12
2610	w	c-ALL	MMUD	CR 1	nb	1	1	TBI+Eto ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	nein	CR	13
2613	m	c-ALL	MFD	CR 2	4	1	1	TBI Eto	ja	nein	high	3,83E-03	CC	nein	nein	Rezidiv	14
2619	w	c-ALL	MUD	CR 1	nb	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	ja	neg	0,00E+00	IncreasMC	ja	ja	CR	9
2643	w	c-ALL	MUD	CR 1	nb	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	nein	CR	15
2657	m	c-ALL	MUD	CR 1	nb	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	ja	CR	14
2671	m	c-ALL	MFD	CR 2	2	1	1	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	IncreasMC	ja	nein	CR	12
2688	m	c-ALL	MMUD	CR 2	2	1	1	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	IncreasMC	ja	nein	CR	21
2701	w	c-ALL	MFD	CR 2	2	1	1	TBI+Eto	ja	nein	neg	0,00E+00	keine Analyse	nb	nein	CR	10
2743	m	c-ALL	MUD	CR 2	2	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	CC	nein	nein	CR	18
2794	m	c-ALL	MUD	CR 2	2	1	2	TBI+Eto+ATG	ja	nein	neg	0,00E+00	IncreasMC	ja	ja	CR	5

Tabelle 6: Überblick über wichtige Kenndaten des gesamten Patientenkollektives

## Erläuterungen:

ALL = akute lymphatische Leukämie; CC = kompletter Chimärismus; CR = komplette Remission; DecreasMC (decreasing mixed chimerism) = abnehmender gemischter Chimärismus; GvHD = Graft-versus-Host Disease; InceasMC (increasing mixed chimerism) = zunehmender gemischter Chimärismus; LowlevMC (Low-level mixed chimerism) = konstanter gemischter Chimärismus auf niedrigem Niveau; m = männlich; MFD (Matched Family Donor) = HLA-identischer Familienspender; MMFD (MisMatched Family Donor) = nicht-HLA-identischer Familienspender; MMUD (MisMatched Unrelated Donor) = nicht-HLA-identischer Fremdspender; MUD (Matched Unrelated Donor) = HLA-identischer Fremdspender; SZ = Stammzellen; TBI (Total Body Irridation) = Ganzkörperbestrahlung; TRM (Treatment Related Mortality) = therapieassoziierte Mortalität (GvHD, Infektion, Toxizität); w = weiblich

<b>Patienten:</b>	n = 90	<b>Konditionierung</b>		<b>GvHD</b>	
<b>Geschlecht:</b>	m = 61	TBI basiert	n = 85	ja	n = 46
	w = 29	Busulfan basiert	n = 4	nein	n = 40
<b>Alter:</b>	Median = 10,24				
<b>Subgruppe</b>		<b>Stammzellquelle</b>		<b>Immuntherapie</b>	
pre-B-ALL:	n = 17	Knochenmark	n = 40	ja	n = 17
c-ALL	n = 57	periphere SZ	n = 47	nein	n = 70
T-ALL	n = 16	Nabelschnur	n = 3		
<b>Remissionsstatus vor KMT</b>		<b>Spender-Empfänger Beziehung</b>		<b>Chimärismus</b>	
CR 1	n = 31	MFD	n = 30	CC	n = 32
CR 2	n = 42	MMFD	n = 6	LowlevMC	n = 21
CR > 2	n = 17	MUD	n = 34	DecreasMC	n = 12
		MMUD	n = 11	InceasMC	n = 23
		haploidentisch	n = 9		
<b>S-Gruppen</b>		<b>T-Zell-Depletion</b>		<b>Verlauf</b>	
S 2	n = 25	ja	n = 31	Rezidiv	n = 26
S 3	n = 14	nein	n = 59	TRM	n = 17
S 4	n = 19			CR	n = 45
				Abstoßung	n = 2

### 4.3 Statistische Methoden und Tests

Neben der rein beschreibenden Statistik wurde die Kaplan-Meier-Methode zur Schätzung des Ereignisfreien Überlebens (EFS) sowie des Rezidivfreien Überlebens (RFS) verwendet. Die Kaplan-Meier-Methode hat den großen Vorteil, dass sie auch angewendet werden kann, wenn nicht alle Patienten des Kollektives, aus unterschiedlichen Gründen, über eine gleich lange Zeitspanne beobachtet werden können. Sie berücksichtigt die Informationen der Patienten so lange, wie diese beobachtet wurden. Somit können auch sogenannte zensierte Daten, wie sie bei unserer Untersuchung vorlagen, ausgewertet



werden. Als Test wurde der Logranktest angewendet. Mit ihm konnten Aussagen darüber gemacht werden, ob die beobachteten Unterschiede in den Überlebenskurven statistisch signifikant waren.

Bei Betrachtung der Höhe der MRD-Werte im Peripherblut im Vergleich zum Knochenmark wurde eine Korrelationsanalyse und eine Regressionsanalyse durchgeführt, mit deren Hilfe die Beziehung zwischen zwei Größen deutlich gemacht und quantifiziert werden kann. Der Korrelationskoeffizient ermöglicht es Aussagen zu machen, wie eng der statistische Zusammenhang zwischen den beiden Größen ist. Mit Hilfe der Regressionsanalyse kann man Aussagen darüber treffen, inwiefern sich Schlüsse von einer Größe auf die andere ziehen lassen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Sensitivität der Real-time PCR

Die MRD-Bestimmung in den Folgeblutproben nach der SZT erfolgte mit allelspezifischen Oligonukleotiden (ASO's), welche nach dem Screening der Patientendiagnoseproben und der Sequenzierung der Rearrangements, individuell für jeden Patienten hergestellt wurden. Verwendet wurden ASO's für die Genloki IgH, IgK-kde, TCRG und TCRD. Vor der Untersuchung der Folgeproben wurde eine Sensitivitätstestung der ASO's durchgeführt, um zu erkennen, ob eine ausreichende Sensitivität von  $1 \times 10^{-4}$  bis  $1 \times 10^{-5}$ , aber von mindestens  $1 \times 10^{-3}$  erzielt werden konnte.

Bei den 90 Patienten, die untersucht wurden, standen für 60 Patienten (66,7%) zwei ASO's mit ausreichender Sensitivität zur Verfügung, bei 30 Patienten (33,3%) erfolgte die Messung der MRD mit einem ASO.

In der folgenden Abbildung ist die maximale Sensitivität, welche mit den ASO's für jeden Patienten erreicht werden konnte dargestellt.

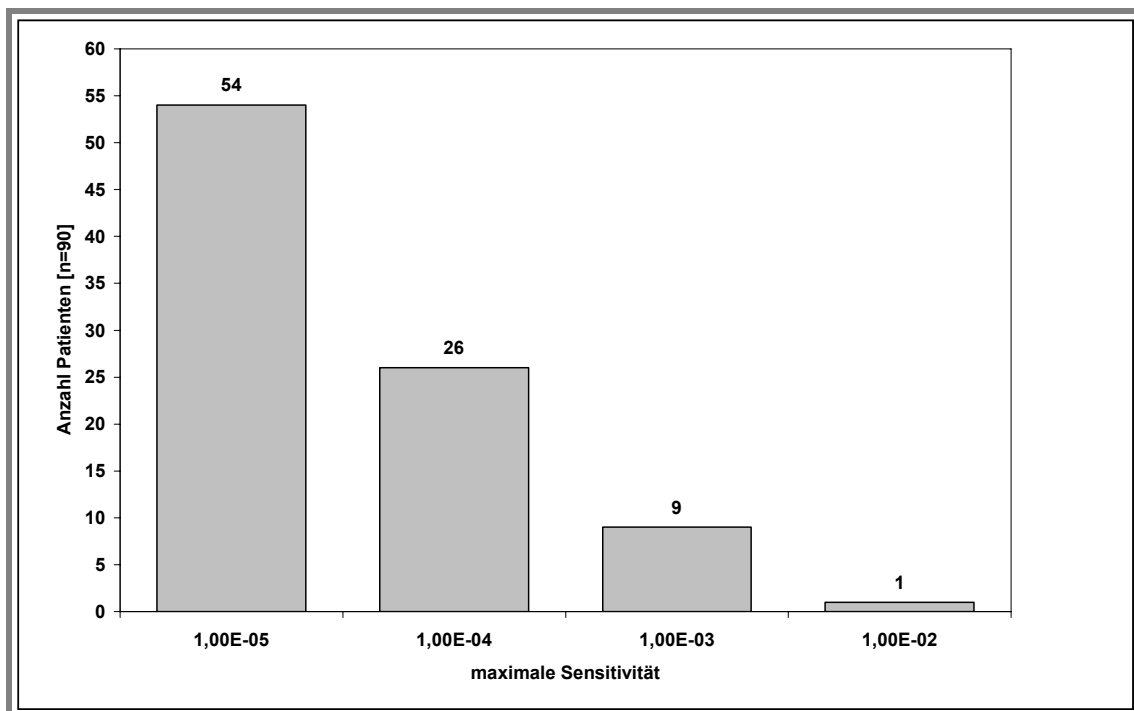


Abbildung 13: Darstellung der erzielten maximalen Sensitivitäten

Bei 89 Patienten (96,67%) konnte die Messung der MRD mit einer Sensitivität von mindestens  $1 \times 10^{-3}$  durchgeführt werden. Von diesen 89 Patienten wurde bei 54 Patienten (60,0%) eine Sensitivität von  $1 \times 10^{-5}$ , bei 26 Patienten (28,9%) eine Sensitivität von  $1 \times 10^{-4}$  und bei 9 Patienten (10,0%) eine Sensitivität von  $1 \times 10^{-3}$  erreicht. Bei einem Patienten (1,1%) gelang es nur eine Sensitivität von  $1 \times 10^{-2}$  zu erzielen. Bei Vorhandensein von 2 MRD-Targets mit unterschiedlicher Sensitivität, wurde das Target verwendet, mit welchem die höhere maximale Sensitivität erzielt werden konnte.

## 5.2 Einteilung der Patienten in MRD-Gruppen

Die 90 Patienten des Kollektives wurden in drei MRD-Gruppen eingeteilt. Die Einteilung in die Gruppen erfolgte während des Beobachtungszeitraumes anhand folgender festgelegter MRD-Grenzwerte im Peripherblut:

- MRD high: MRD-Wert  $> 1 \times 10^{-4}$
- MRD low: MRD-Wert  $\leq 1 \times 10^{-4}$
- MRD negativ: MRD-Wert im gesamten Untersuchungszeitraum negativ

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Verteilung der MRD-Gruppen innerhalb des gesamten Patientenkollektivs

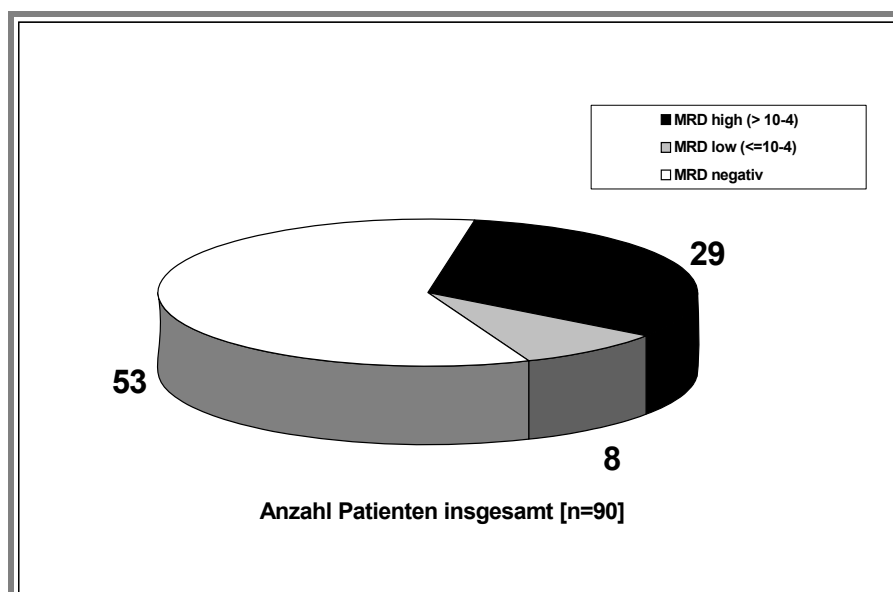


Abbildung 14: Verteilung der MRD-Gruppen innerhalb des Patientenkollektivs

Von den 90 untersuchten Patienten waren 53 (58,9%) während des gesamten Untersuchungszeitraumes immer MRD negativ in den untersuchten Peripherblutproben. Bei 8 Patienten (8,9%) konnte im Verlauf eine MRD-Wert von  $\leq 1 \times 10^{-4}$  im Blut gemessen werden und sie werden im Folgenden als MRD low Gruppe bezeichnet. 29 Patienten (32,2%) wiesen einen MRD-Wert  $> 1 \times 10^{-4}$  im Blut auf und werden als MRD high Gruppe bezeichnet.

### 5.3 Verteilung der MRD-Gruppen innerhalb der ALL-Subgruppen

In folgender Abbildung soll die Verteilung der MRD-Gruppen innerhalb der ALL-Subgruppen c-ALL, pre-B-ALL und T-ALL dargestellt werden.

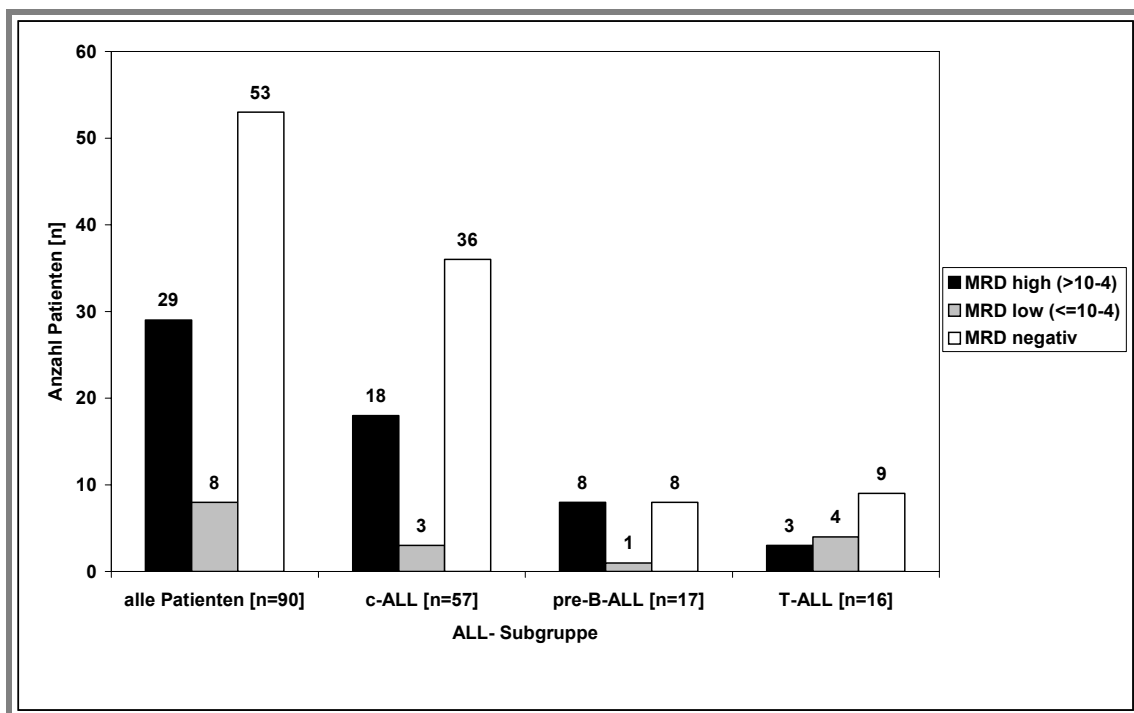


Abbildung 15: Verteilung der ALL-Subgruppen innerhalb des Patientenkollektives

Die ALL lässt sich weiter anhand des Immunphänotyps in Subgruppen unterteilen. In unserem Patientenkollektiv war es möglich die Patienten drei Subgruppen zuzuordnen. Von den 90 Patienten gehörten 57 (63,3%) zu der Gruppe der c-ALL, 17 Patienten (18,9%) zu der Gruppe der pre-B-ALL und 16 Patienten

(17,8%) zur Gruppe der T-ALL. Wobei die c-ALL und die pre-B-ALL beide zu den B-Vorläufer-ALL's gehören. Die Unterteilung ist wichtig für die Prognose der Patienten.

Innerhalb der Patienten mit der Diagnose c-ALL waren 18 Patienten (31,6%) der MRD high Gruppe, 3 Patienten (5,3%) der MRD low Gruppe und 36 Patienten (63,1%) der MRD negativ Gruppe zuzuordnen. Bei der Gruppe der pre-B-ALL waren 8 Patienten (47,0%) MRD high, nur ein Patient (6,0%) MRD low und wiederum 8 Patienten (47,0%) MRD negativ im Peripherblut. Bei den Patienten mit der Diagnose T-ALL gehörten 3 Patienten (18,8%) zu Gruppe MRD high, 4 Patienten (25,0%) zur Gruppe MRD low und 9 Patienten (56,2%) zur Gruppe MRD negativ.

#### ***5.4 Betrachtung des klinischen Verlaufes der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation***

Im folgenden Abschnitt soll der klinische Verlauf der untersuchten Patienten nach allo-SZT genauer betrachtet werden. Als Möglichkeiten des klinischen Verlaufes kommen das Wiederauftreten der Grunderkrankung, also das Rezidiv, die TRM, die Abstoßung und die komplette Remission (CR) in Betracht. Zuerst wird der klinische Verlauf aller Patienten beobachtet, nachfolgend soll dann der klinische Verlauf innerhalb der MRD-Gruppen und der ALL-Subgruppen dargestellt werden.

##### **5.4.1 Klinischer Verlauf aller untersuchten Patienten**

Der klinische Verlauf des gesamten Patientenkollektives soll anhand der Betrachtung des Rezidivfreien Überlebens (RFS) und des Ereignisfreien Überlebens (EFS) mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse dargestellt werden.

## Rezidivfreies Überleben aller untersuchten Patienten

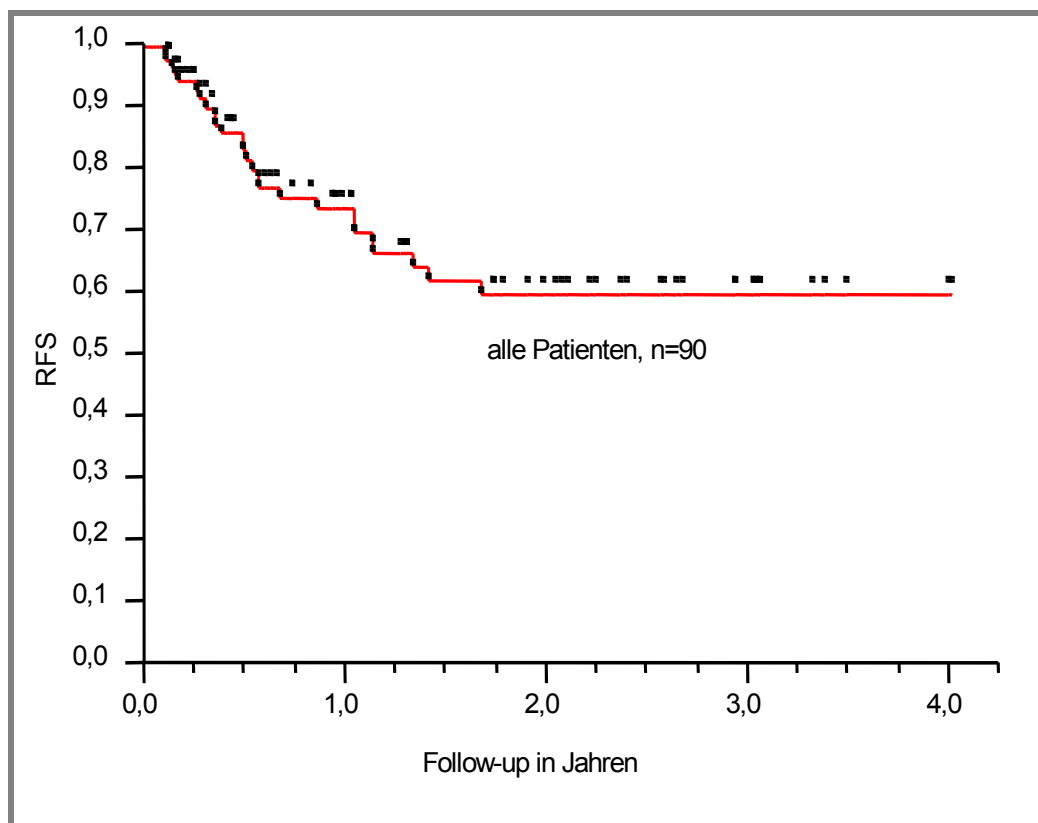


Abbildung 16: Darstellung des Rezidivfreien Überlebens (RFS) des Patientenkollektives

Von den 90 Patienten erlitten im weiteren Krankheitsverlauf 26 Patienten (28,9%) ein Rezidiv. Die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidivfreies Überleben betrug nach einem Jahr 73,7% und fiel nach 3 Jahren auf einen Wert von 59,8% ab.

## Ereignisfreies Überleben aller untersuchten Patienten

Als Ereignis werden folgende Vorkommnisse in Betracht gezogen:

- das Wiederauftreten der Grunderkrankung, also das Rezidiv
- die TRM, welche Toxizität, Infektion und GvHD beinhaltet
- die Abstoßung des Transplantates

Trat kein Ereignis ein, so befanden sich die Patienten in kompletter Remission (CR) nach der allo-SZT. Diese Annahmen gelten auch für alle nachfolgenden Abbildungen und Betrachtungen.

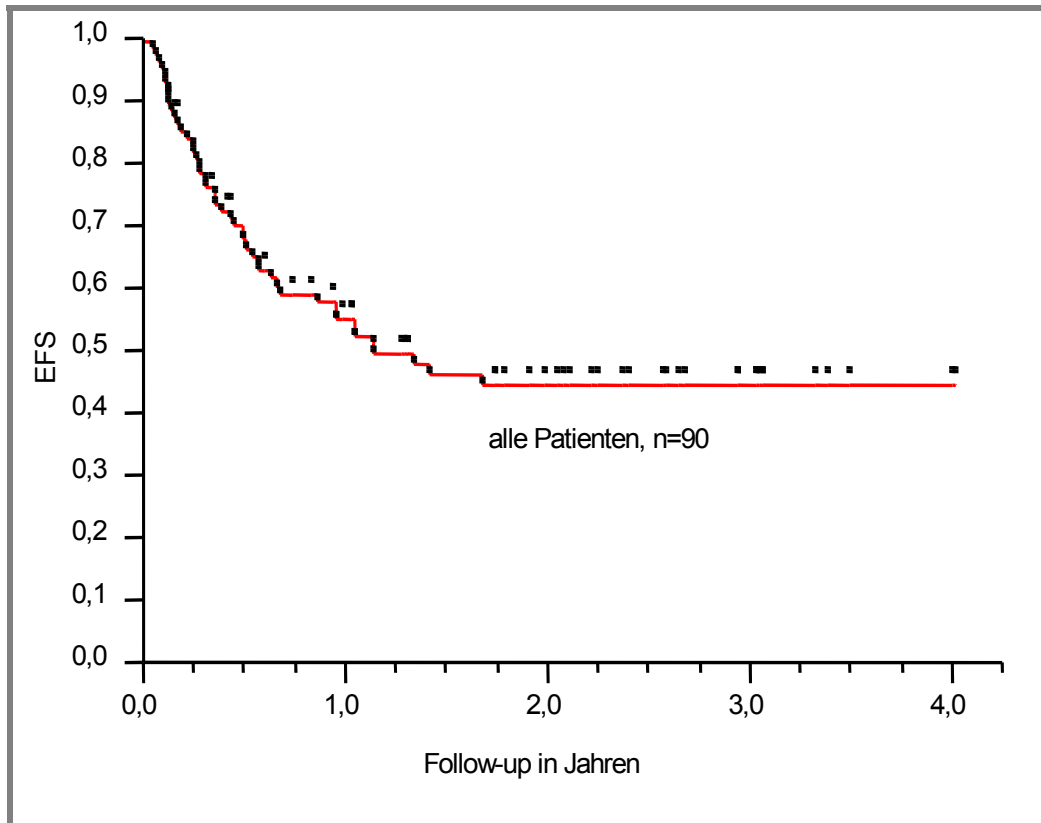


Abbildung 17: Darstellung des Ereignisfreien Überlebens (EFS) des Patientenkollektives

Bei 45 Patienten (50,0%) des Gesamtkollektives kam es im Verlauf nach der allo-SZT zu einem Ereignis. 26 Patienten (28,9%) erlitten ein Rezidiv, 17 Patienten (18,9%) verstarben aufgrund der TRM und 2 Patienten (2,2%) stießen das Transplantat ab. Die restlichen 45 (50,0) Patienten verblieben in kompletter Remission.

Die Wahrscheinlichkeit für ein Ereignisfreies Überleben lag nach einem Jahr bei 55,4% und fiel dann bei der Betrachtung nach 3 Jahren auf 44,9% ab.

Der Median betrug 1,1507 Jahre.

### 5.4.2 Klinischer Verlauf der Patienten in Abhängigkeit der MRD-Gruppe

Im nachfolgenden Säulendiagramm ist der klinische Verlauf der Patienten innerhalb der MRD-Gruppen dargestellt.

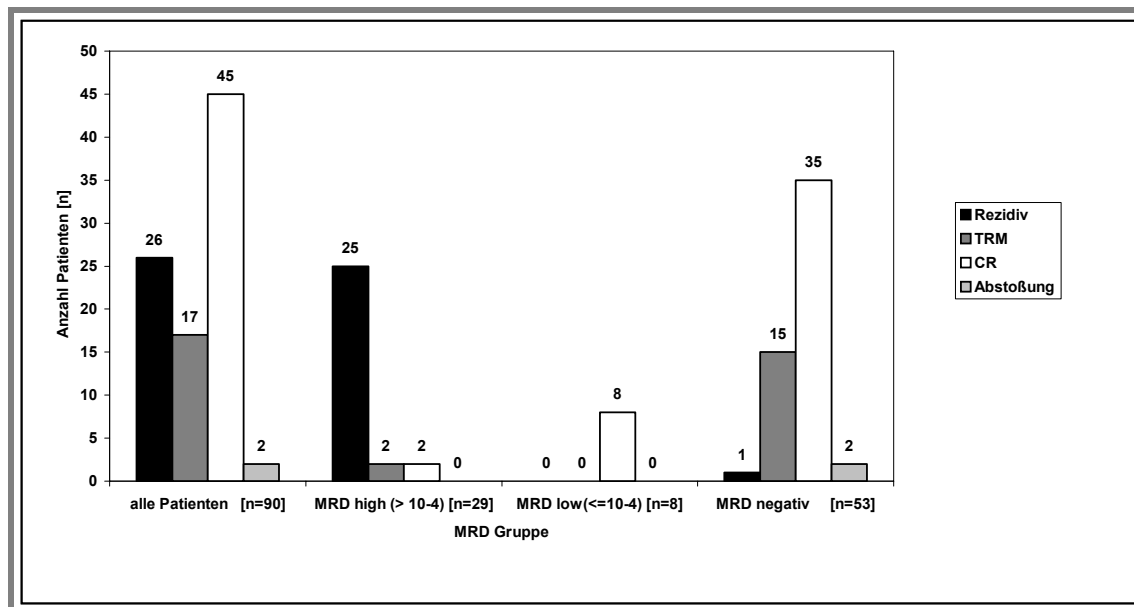


Abbildung 18: Klinischer Verlauf in Abhängigkeit von der MRD-Gruppe

Auffällig ist die sehr hohe Rezidivrate innerhalb der MRD high Gruppe im Gegensatz zu den beiden anderen MRD-Gruppen. In der MRD high Gruppe erlitten 25 Patienten (86,2%) der insgesamt 29 Patienten ein Rezidiv, wohingegen nur 2 Patienten (6,9%) in kompletter Remission verblieben und zwei Patienten (6,9%) an der TRM verstarben.

Im Gegensatz dazu scheinen die beiden anderen Gruppen eine wesentlich günstigere Prognose zu haben. In der MRD low Gruppe, welche allerdings nur 8 Patienten umfasst, verblieben alle Patienten (100,0%) in kompletter Remission. In der Gruppe der MRD Negativen befand sich der größte Teil der Patienten (66,0%) in kompletter Remission zum Zeitpunkt der Auswertung. Hier trat nur in einem Fall (1,9%) ein Rezidiv auf und das Transplantat wurde von 2 Patienten (3,8%) abgestoßen. Auffallend ist das Vorkommen der TRM bei insgesamt 15 Patienten (28,3%) innerhalb dieser Gruppe. Die Patienten



verstarben meist an einem Multiorganversagen oder aufgrund einer Pilz- oder Virusinfektion.

Zur genaueren Betrachtung innerhalb der MRD-Gruppen wurde das Ereignisfreie Überleben (EFS) und das Rezidivfreie Überleben (RFS) der untersucht.

In den folgenden Abbildungen wurde zusätzlich zu der Einteilung in die 3 MRD-Gruppen high ,low und negativ noch eine weitere Einteilung der Patienten durchgeführt. Die beiden Gruppen MRD high und MRD low wurden zur Gruppe MRD positiv zusammengefasst und der Gruppe MRD negativ gegenübergestellt.

Rezidivfreies und Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit von der Einteilung in die Gruppen MRD positiv und MRD negativ.

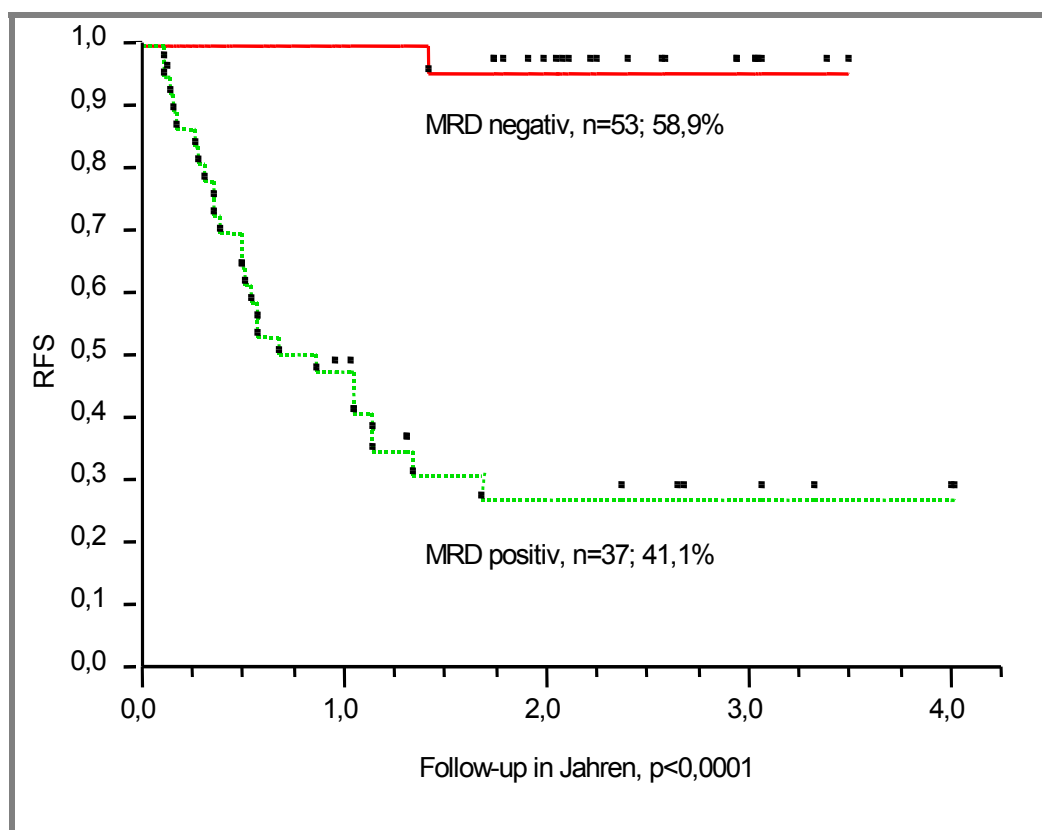
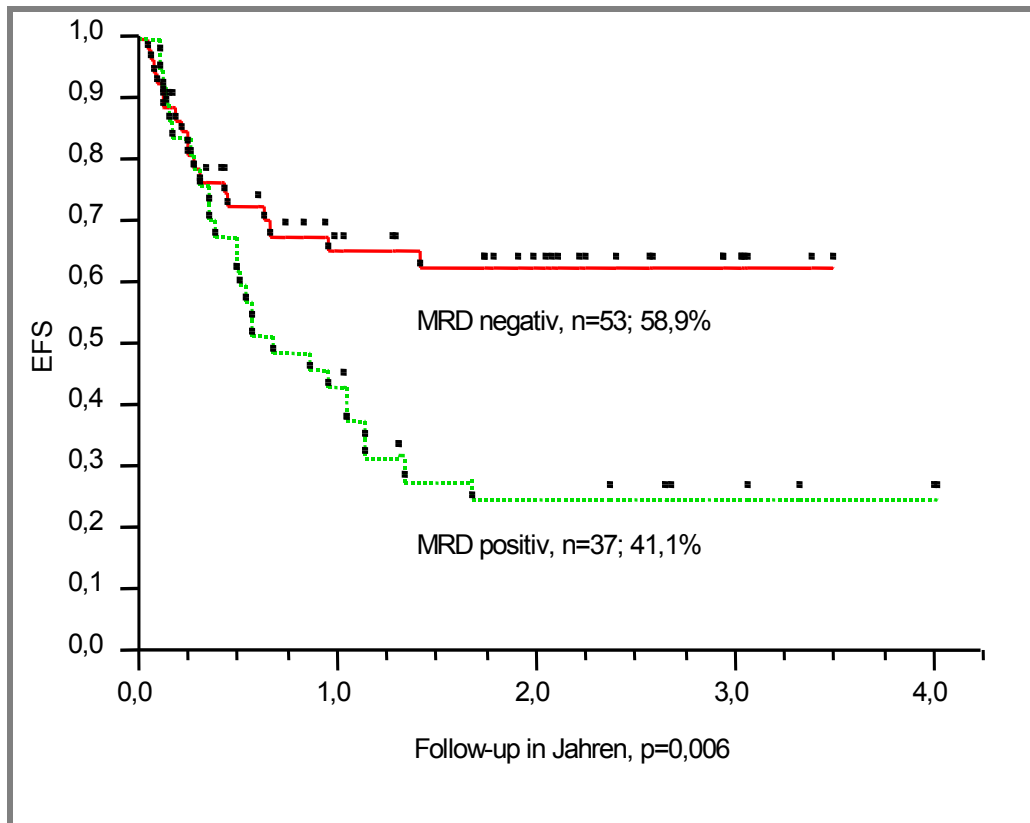


Abbildung 19: Darstellung des Rezidivfreien Überlebens (RFS) der Gruppen MRD positiv und MRD negativ



**Abbildung 20:** Darstellung des Ereignisfreien Überlebens (EFS) der Gruppen MRD positiv und MRD negativ

Von den 90 untersuchten Patienten waren 53 Patienten (58,9%) MRD negativ und 37 Patienten (41,1%) MRD positiv innerhalb des Untersuchungszeitraumes.

Die beiden Gruppen unterscheiden sich hoch signifikant in Bezug auf das RFS, was der durchgeführte log-rank test mit einem Wert von  $p < 0,0001$  zeigt. Die Gruppe MRD positiv hat eine viel schlechtere Prognose gegenüber der Gruppe MRD negativ bezüglich des Rezidives. Bei der Gruppe MRD negativ liegt die Wahrscheinlichkeit nach einem Jahr noch kein Rezidiv zu haben bei 100,0%, im Gegensatz zur Gruppe MRD positiv, bei welcher der Wert bei 47,3% liegt. Das bedeutet das Risiko ein Rezidiv zu bekommen ist in der Gruppe MRD positiv innerhalb des ersten Jahres doppelt so hoch. Das RFS nach 3 Jahren beträgt in der Gruppe MRD negativ noch 95,5%, wohingegen das RFS bei der Gruppe MRD positiv nur noch 27,0% beträgt.

Betrachtet man das EFS der beiden Gruppen, so ist auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar. Der log-rank test ergab hier einen Wert von  $p = 0,007$ . Auch beim EFS hat die Gruppe MRD negativ eindeutig die günstigere Prognose. Nach einem Jahr beträgt das EFS in der Gruppe MRD negativ 65,2%, im Gegensatz zur Gruppe MRD positiv, in welcher noch 43,2% der Patienten ohne Ereignis überleben. Deutlicher wird der Unterschied wenn man das EFS nach 3 Jahren betrachtet. In der Gruppe MRD negativ fällt die EFS um 2,9 % ab auf 62,3%, wohingegen die EFS in der Gruppe MRD positiv um 18,5% auf 24,7% zurückgeht.

Rezidivfreies und Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit von der Einteilung in die Gruppen MRD high, MRD low, und MRD negativ.

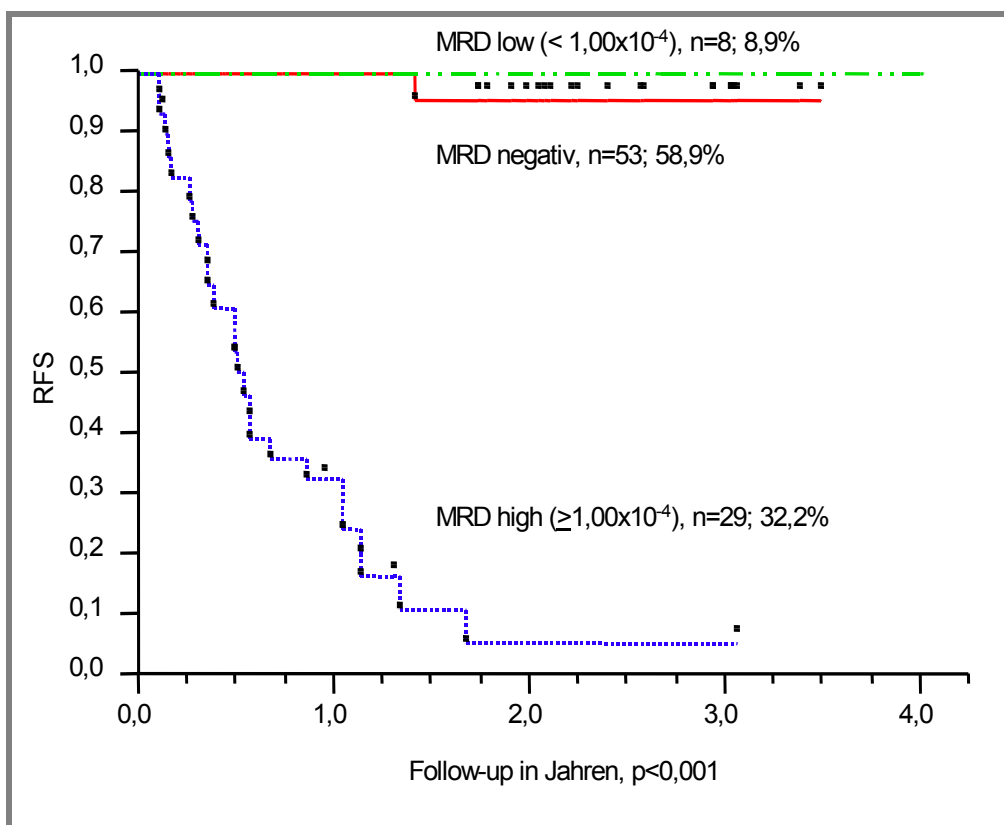


Abbildung 21: Darstellung des Rezidivfreien Überlebens (RFS) der Gruppen MRD high, MRD low und MRD negativ

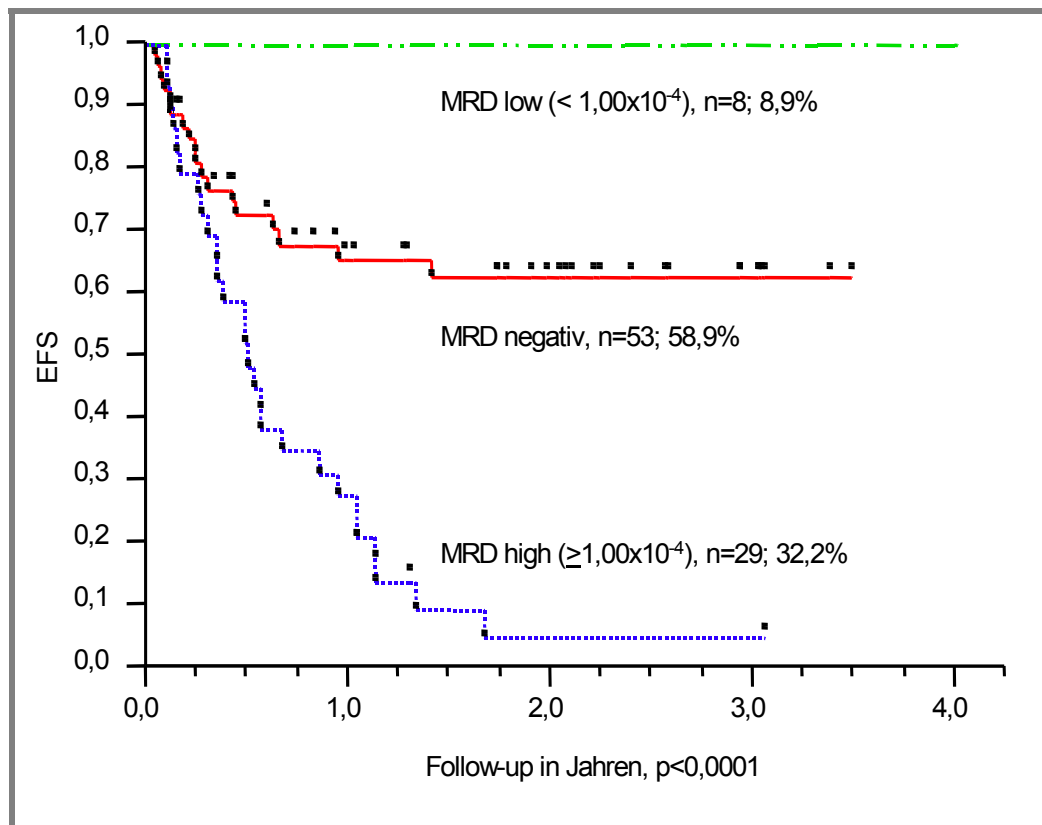


Abbildung 22: Darstellung des Ereignisfreien Überlebens (EFS) der Gruppen MRD high, MRD low und MRD negativ

Sowohl im RFS, wie auch im EFS besteht ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den 3 MRD-Gruppen, was der log rank test mit jeweils einem Wert von  $p < 0,001$  zeigt.

Betrachtet man das RFS der 3 Gruppen, so fällt auf das die Gruppe MRD low die beste Prognose besitzt. Innerhalb dieser Gruppe hat keiner der 8 Patienten ein Rezidiv erlitten, das RFS beträgt sowohl nach einem, wie auch nach 3 Jahren 100,0%. Auch die Gruppe MRD negativ hat eine günstige Prognose. Die Wahrscheinlichkeit nach einem Jahr noch kein Rezidiv zu bekommen liegt hier ebenfalls bei 100,0%, nach 3 Jahren noch bei 95,5%. Am schlechtesten schneidet die Gruppe MRD high ab. Das RFS nach einem Jahr beträgt nur 24,2%, das bedeutet die Wahrscheinlichkeit innerhalb des ersten Jahres ein Rezidiv zu bekommen, ist in dieser Gruppe dreimal so hoch wie in den beiden anderen MRD-Gruppen. Nach 3 Jahren beträgt das RFS nur noch 5,4%, was

bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit innerhalb der ersten 3 Jahre an einem Rezidiv zu erkranken, in dieser Gruppe 94,6% beträgt.

Auch bei der Betrachtung des EFS schneidet die Gruppe MRD low am Besten ab. Das EFS nach einem und nach 3 Jahren beträgt 100%, was bedeutet, dass alle 8 Patienten zu diesem Zeitpunkt in kompletter Remission waren. In der Gruppe MRD negativ lag das EFS nach einem Jahr bei 65,2% und nach 3 Jahren fällt der Wert leicht ab auf 62,3%. Die schlechteste Prognose der 3 Gruppen hat auch hier wieder die Gruppe MRD high. Die EFS nach einem Jahr liegt bei nur 20,7% und fällt nach 3 Jahren ab auf nur noch 4,6%.

### 5.4.3 Klinischer Verlauf der Patienten in Abhängigkeit von der ALL-Subgruppe

Im nachfolgenden Säulendiagramm ist der klinische Verlauf der Patienten innerhalb der 3 verschiedenen ALL-Subgruppen c-ALL, pre-B-ALL und T-ALL dargestellt.

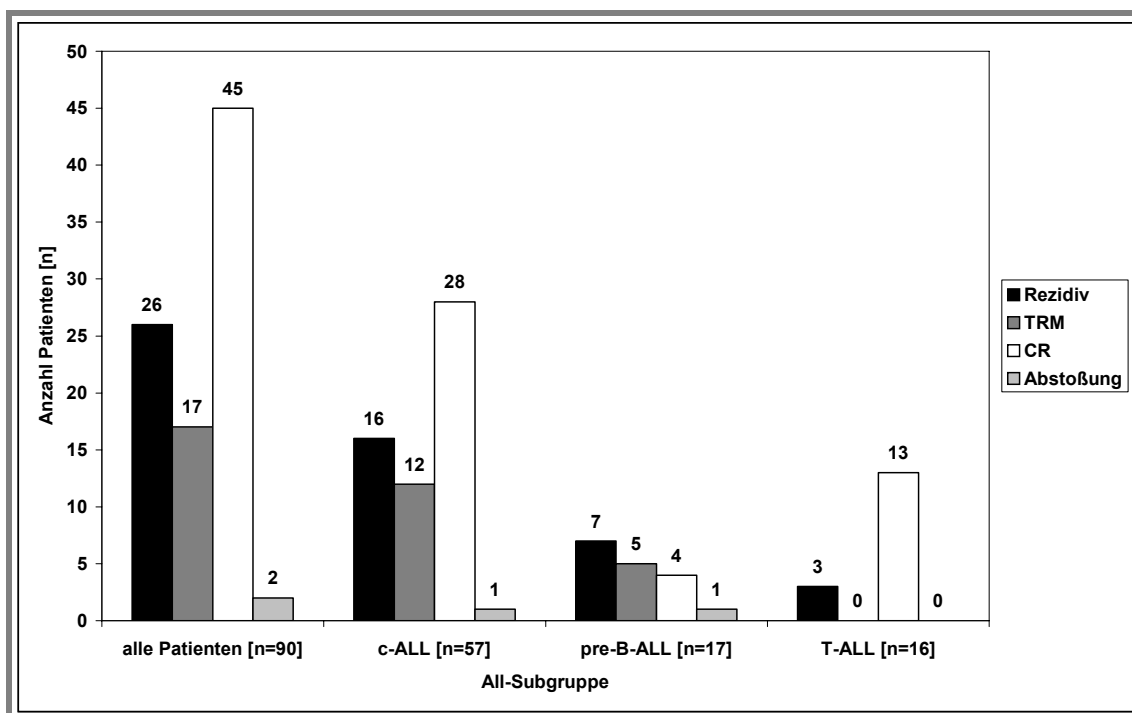


Abbildung 23: Klinischer Verlauf innerhalb der ALL-Subgruppen

Es fällt auf, dass sich die 3 ALL-Subgruppen in ihrem klinischen Verlauf deutlich unterscheiden. Ins Auge fällt, dass von den 16 Patienten mit T-ALL es bei nur 3 Patienten (18,8%) zur Entwicklung eines Rezidives kam. Innerhalb der Patientengruppe mit einer c-ALL erlitten dagegen 16 Patienten (28,1%) ein Rezidiv. Am schlechtesten bezüglich der Erkrankung an einem Rezidiv schneiden die Patienten mit einer pre-B-ALL ab. Von den 17 Patienten erkrankten 7 Patienten (41,2%) und somit fast die Hälfte an einem Rezidiv. Auch wenn man das Vorkommen einer TRM und einer Abstoßung näher betrachtet, hat die Subgruppe pre-B-ALL die schlechteste Prognose. In dieser Gruppe sind 5 Patienten (29,4%) an einer TRM verstorben und 1 Patient (5,9%) stieß das Transplantat ab. Bei den Patienten mit c-ALL verstarben 12 Patienten (21,1%) an der TRM und bei einem Patienten (1,8%) kam es zu einer Abstoßung des Transplantates. Bei den Patienten mit der Diagnose T-ALL dagegen verstarb keiner der Patienten an einer TRM oder stieß das Transplantat ab. In dieser Gruppe war der Anteil der Patienten, die in kompletter Remission verblieben, mit 13 Patienten (81,2%) am größten. Innerhalb der Subgruppe c-ALL verblieben 28 Patienten (49,0%) in CR, innerhalb der Gruppe pre-B-ALL nur 4 Patienten (23,5%).

Eine Darstellung des RFS und des EFS bei den ALL Subgruppen erfolgt mit der Kaplan-Meier-Methode.

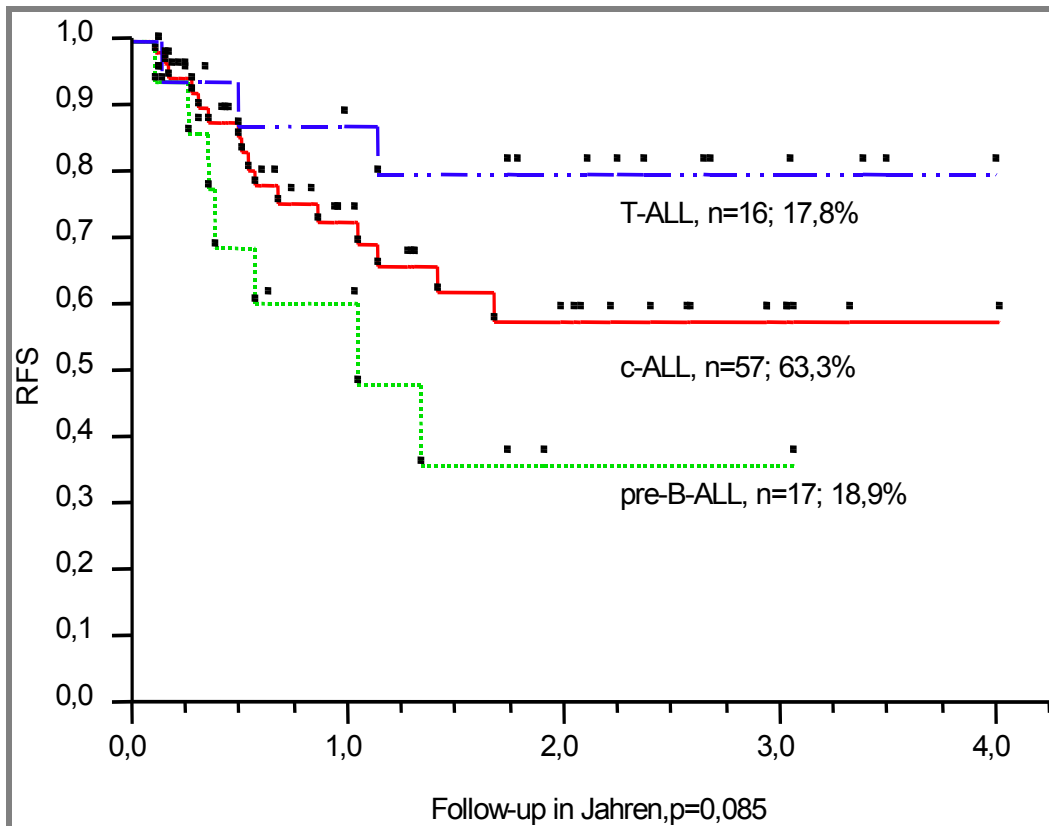


Abbildung 24: Darstellung des Rezidivfreien Überlebens (RFS) der ALL-Subgruppen

Die 3 ALL-Subgruppen unterscheiden sich im RFS signifikant, was der durchgeführte log rank test mit einem Wert von  $p = 0,085$  deutlich macht. Die beste Prognose besitzt die Subgruppe T-ALL. Das RFS nach einem Jahr liegt hier bei 87,1% und nach 3 Jahren bei 79,8%. Ebenfalls eine günstige Prognose weisen die Patienten mit der Diagnose c-ALL auf. Die Wahrscheinlichkeit nach einem Jahr noch kein Rezidiv bekommen zu haben, liegt hier bei 72,6%, nach 3 Jahren bei 57,7%. Eine eindeutig ungünstigere Prognose liegt bei den Patienten mit einer pre-B-ALL vor. Das RFS nach einem Jahr liegt hier bei 60,2% und geht nach 3 Jahren auf 36,1% zurück.

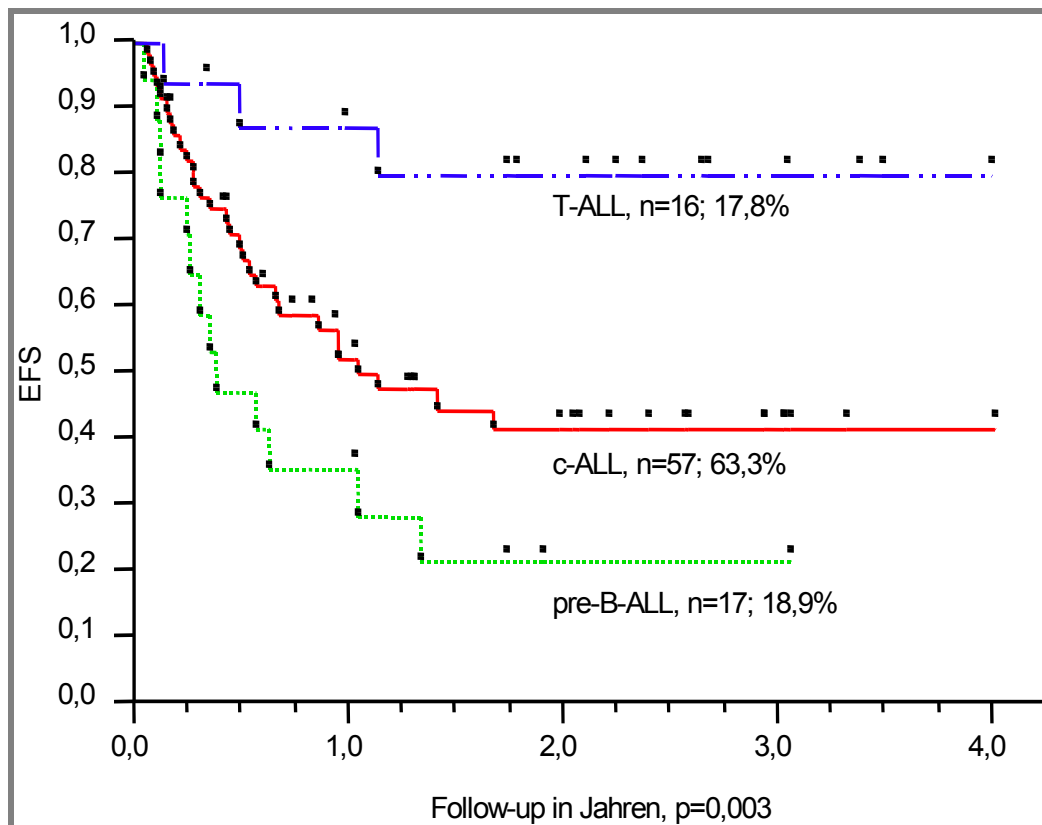


Abbildung 25: Darstellung des Ereignisfreien Überlebens (EFS) der ALL-Subgruppen

Auch bei Betrachtung der EFS besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den 3 ALL-Subgruppen. Der log rank test ergab hier einen Wert von  $p = 0,004$ . Die Subgruppe T-ALL besitzt auch hier die günstigste Prognose mit einer EFS von 87,1% nach einem Jahr und 79,8% nach 3 Jahren. Die Werte entsprechen denen der RFS dieser Gruppe. Dieser Umstand ist dadurch zu erklären, dass es innerhalb dieser Gruppe entweder zur Entwicklung eines Rezidives kam oder aber die Patienten in kompletter Remission verblieben. In der Gruppe c-ALL liegt das EFS nach einem Jahr bei 52,0%, nach 3 Jahren bei 44,4%. Wie bei der Betrachtung der RFS schneiden auch hier die Patienten mit einer pre-B-ALL am schlechtesten ab. Die Wahrscheinlichkeit das erste Jahr ohne Ereignis zu überstehen, liegt bei nur 35,3% und fällt nach 3 Jahren ab auf 21,2%.



### 5.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

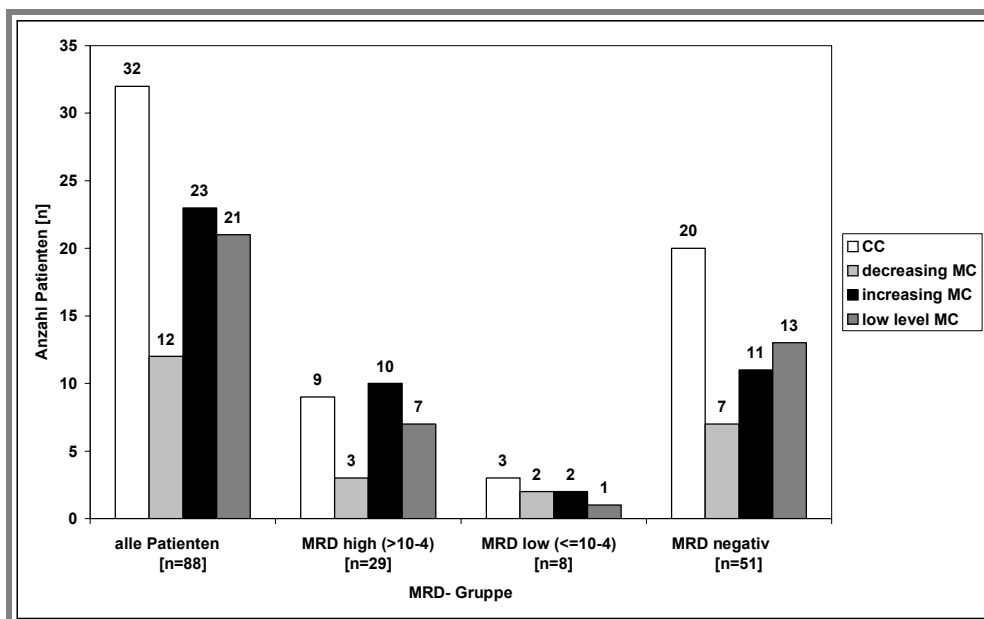
Die nachfolgende Tabelle 7 soll einen zusammenfassenden Überblick über den klinischen Verlauf anhand der Parameter Rezidivfreies Überleben (RFS) und Ereignisfreies Überleben (EFS) nach einem und drei Jahren geben.

**Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse**

Gruppe	Anzahl [n]	RFS nach 1 Jahr (%)	RFS nach 3 Jahren (%)	EFS nach 1 Jahr (%)	EFS nach 3 Jahren (%)
<b>alle Patienten</b>	90	73,7	59,8	55,4	44,9
<b>MRD-Gruppen</b>					
MRD positiv	37	47,3	27,0	43,2	24,7
MRD negativ	53	100,0	95,5	65,2	62,3
MRD high	29	24,2	5,4	20,7	4,6
MRD low	8	100,0	100,0	100,0	100,0
MRD negativ	53	100,0	95,5	65,2	62,3
<b>ALL-Subgruppe</b>					
c-ALL	57	72,6	57,7	52,0	44,4
pre-B-ALL	17	60,2	36,1	35,3	21,2
T-ALL	16	87,1	79,8	87,1	79,8

### 5.5 Betrachtung des Chimärismusstatus innerhalb der MRD-Gruppen

Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung des Chimärismusstatus im Gesamtpatientenkollektiv und innerhalb der 3 MRD-Gruppen.



**Abbildung 26: Verteilung des Chimärismusstatus des Patientenkollektives und der MRD-Gruppen**

Auf den ersten Blick fällt die große Anzahl der Patienten mit einem zunehmenden gemischten Chimärismus (increasing MC) in der MRD high Gruppe auf. Mit einer Anzahl von 10 Patienten (34,5%) machte sie den größten Anteil innerhalb dieser Gruppe aus. In den anderen beiden Gruppen hingegen war der Anteil der Patienten mit einem increasing MC geringer. In der Gruppe MRD low waren es 2 Patienten (25,0%), in der Gruppe MRD negativ 11 Patienten (21,6%).

Auf der anderen Seite wiesen auch 9 Patienten (31,0%) der MRD high Gruppe einen kompletten Chimärismus (CC) auf. Bei 3 Patienten (10,4%) dieser Gruppe bestand ein abnehmender gemischter Chimärismus (decreasing MC) und bei 7 Patienten (24,1%) ein konstanter gemischter Chimärismus auf niedrigem Niveau (lowlevel MC).

In der MRD low Gruppe bestehen keine großen Unterschiede in der Chimärismusverteilung. Bei 3 Patienten (37,5%) lag ein CC vor, jeweils 2 Patienten (25,0%) wiesen einen decreasing-bzw. einen increasing MC auf und bei einem Patienten (12,5%) bestand ein lowlevel MC.

Innerhalb der MRD negativ Gruppe wies der größte Teil der Patienten mit einer Anzahl von 20 (39,2%) einen CC auf. Darauf folgen 13 Patienten (25,5%) mit einem lowlevel MC, 11 (21,6%) Patienten mit einem increasing MC und 7 Patienten (13,7%) mit einem decreasing MC. Bei 2 Patienten in dieser MRD-Gruppe wurde keine Analyse des Chimärismus durchgeführt.

### ***5.6 Bedeutung der Messung der MRD im Peripherblut bei Patienten mit Rezidiv im Verlauf nach allogener Stammzelltransplantation***

Im folgenden Abschnitt werden die Patienten genauer betrachtet, die im Verlauf nach allo-SZT ein Rezidiv erlitten haben, um der Frage auf den Grund zu gehen, ob es mit der Messung der MRD im peripheren Blut möglich ist, ein Rezidiv vorhersagen zu können.

Hierzu wird zuerst allgemein der Zeitabstand bis zum Auftreten des Rezidives näher betrachtet, um zu erkennen, ob es eine gewisse Zeitspanne nach der Transplantation gibt, innerhalb derer die Rezidive gehäuft auftreten.

Nachfolgend wird dargestellt, ob bei den Rezidivpatienten vor der klinischen Manifestation eine MRD-Last im Peripherblut nachweisbar war, wie hoch dieser Wert war und wie viel Zeit zwischen der Messung der ersten positiven Peripherblutprobe und der Manifestation des Rezidives verging.

### 5.6.1 Betrachtung des Zeitabstandes zwischen allogener Stammzelltransplantation und Auftreten des Rezidives

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die Rezidivtage der einzelnen Patienten sowie das Auftreten der Rezidive innerhalb einer gewissen Zeitspanne nach allo-SZT aller untersuchten Patienten. Von den 26 Patienten, die ein Rezidiv erlitten haben, konnte von einem Patienten der genaue Rezidivtag nicht ermittelt werden, so dass er nicht in die folgenden Betrachtungen einbezogen werden konnte.

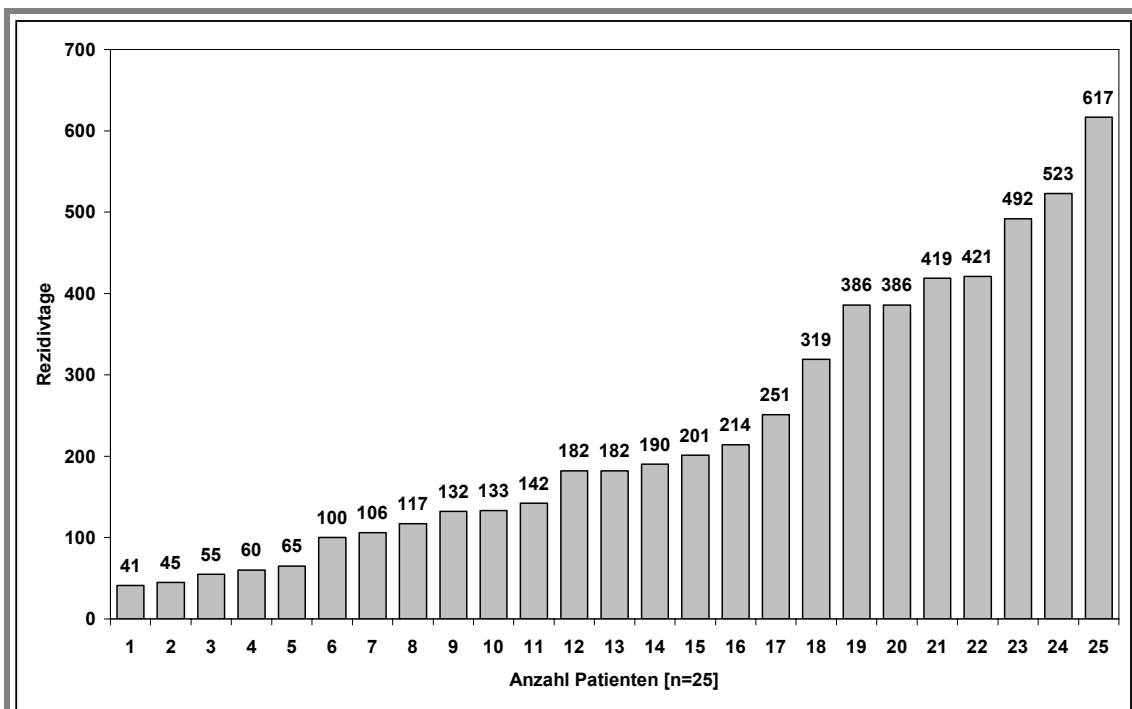


Abbildung 27: Darstellung der Rezidivtage der einzelnen Patienten

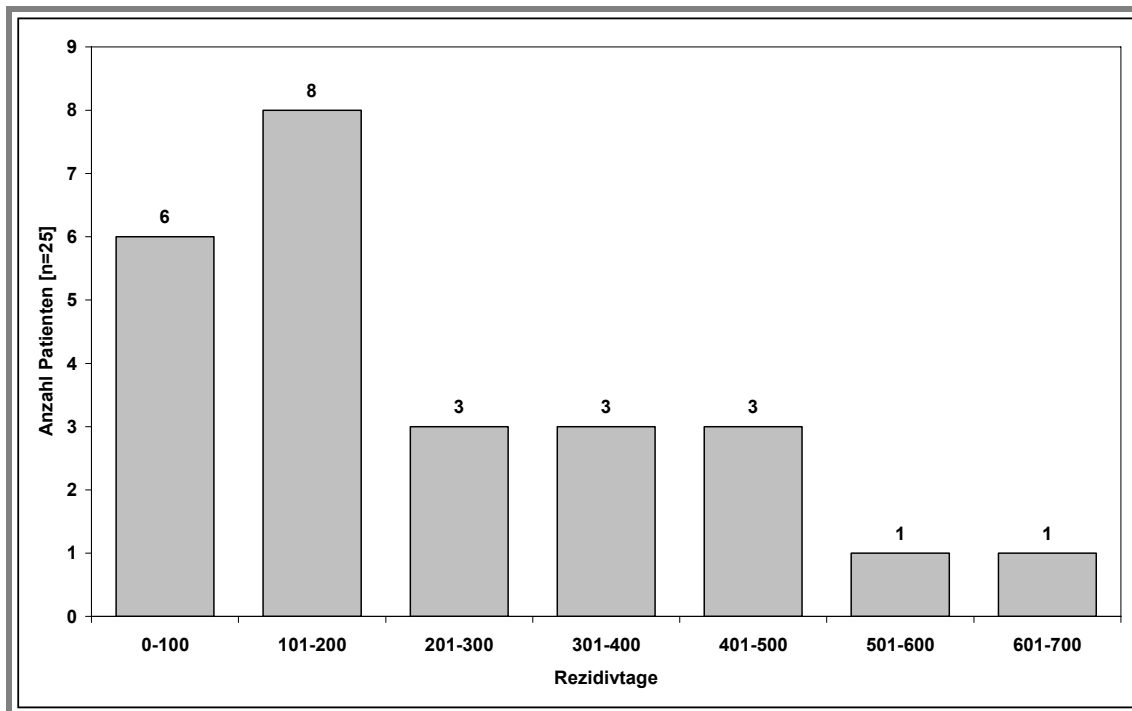


Abbildung 28: Darstellung der Rezidivtage innerhalb eines Zeitintervalls von 100 Tagen

Bei den 25 untersuchten Patienten, welche ein Rezidiv erlitten haben, reichte die Zeitspanne zwischen allo-SZT und Diagnose des Rezidives von 41 bis 617 Tagen. Aus Abbildung 27 wird ersichtlich, dass die Rezidive gehäuft in den ersten 100 bis 200 Tagen nach der allo-SZT auftraten. Innerhalb der ersten 100 Tage rezidierten 6 Patienten (24,0%), zwischen Tag 101 und 200 nach allo-SZT sogar 8 Patienten (32,0%). Somit kam es bei 14 Patienten (56,0%) innerhalb der ersten 200 Tage nach Transplantation zum Wiederauftreten der Grunderkrankung.

In den Zeiträumen zwischen Tag 201 bis 300, Tag 301 bis 400 und Tag 401 bis 500 kam es bei jeweils 3 Patienten (12,0%) zum Auftreten des Rezidives. Lediglich jeweils ein Patient (4,0%) rezidierte im Zeitraum zwischen Tag 501 bis 600, bzw. Tag 601 bis 700.

Nach 100 Tagen hatten 76,0% der Patienten noch kein Rezidiv entwickelt, wohingegen nach 200 Tagen nur noch 40% rezidivfrei waren. Der Median des Auftretens des Rezidives lag bei 182 Tagen nach allo-SZT.

### 5.6.2 Betrachtung des Intervalls zwischen MRD-Positivität im Peripherblut und Auftreten des Rezidives

Wie die folgende Abbildung verdeutlicht, war es bei 24 Patienten (96,0%) der insgesamt 26 Patienten möglich eine MRD-Last im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives nachzuweisen. Lediglich ein Patient war vor Ausbruch des Rezidives in den untersuchten Peripherblutproben durchgehend negativ.

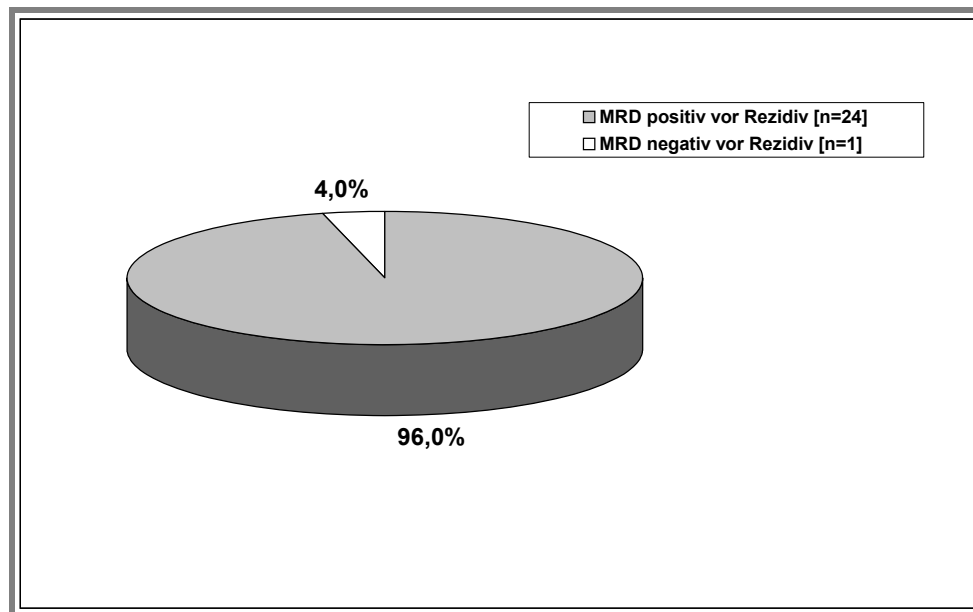


Abbildung 29: Vorkommen einer MRD-Last im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives

Bei den 24 Patienten, bei denen eine MRD-Last im Peripherblut gemessen wurde, soll nun dargestellt werden, wie viel Zeit zwischen der ersten positiven Probe und dem Auftreten des Rezidives vergangen ist. Abbildung 30 und 31 zeigen die Differenz der Tage zwischen erster positiver Probe und Auftreten des Rezidives einzeln für jeden Patienten und zusammengefasst nach einem Intervall von 30 Tagen.

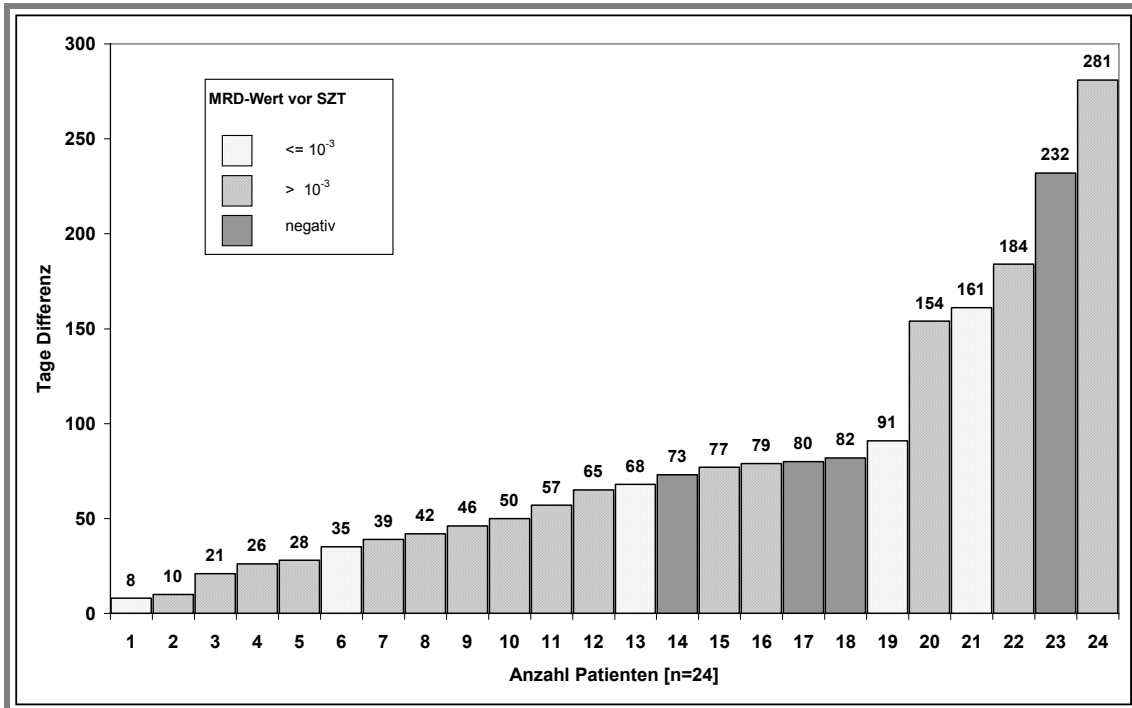


Abbildung 30: Darstellung der Tage Differenz zwischen erster positiver Probe und Auftreten des Rezidives der einzelnen Patienten

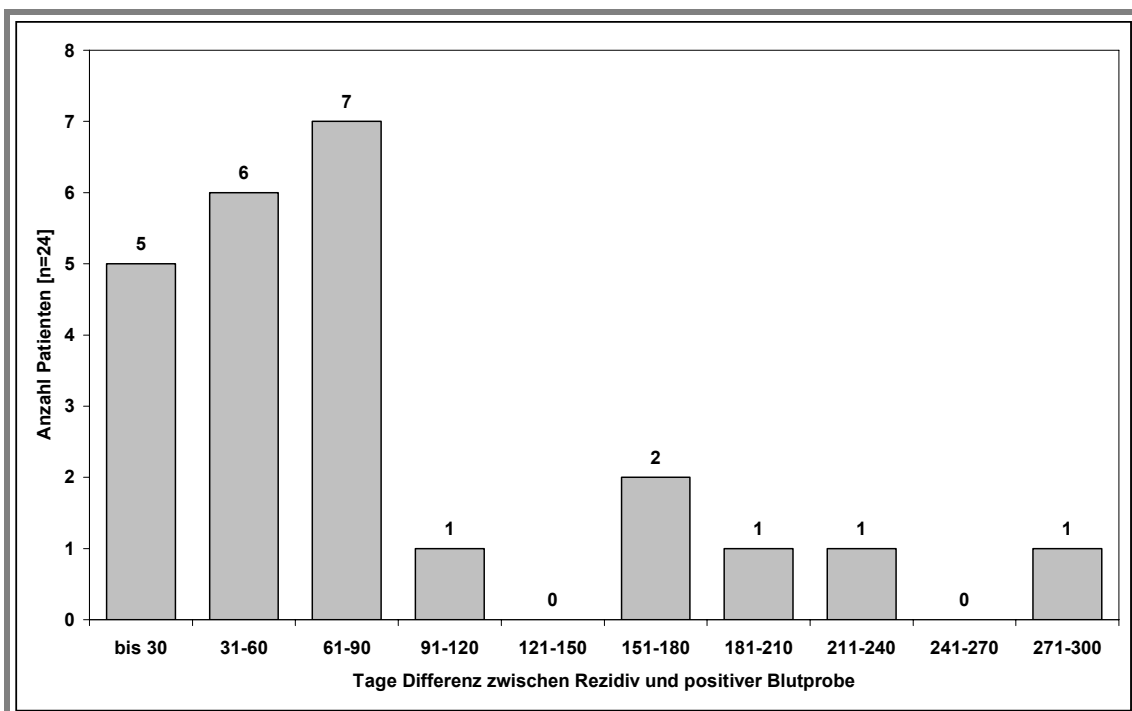


Abbildung 31: Darstellung der Tage Differenz zwischen erster positiver Probe und Auftreten des Rezidives in einem Intervall von 30 Tagen

Die Zeitspanne zwischen erster gemessener Probe und Auftreten des Rezidives betrug zwischen 8 und 281 Tagen.

Nach Abbildung 31 scheint es, als ob der Abstand zwischen erster positiver Probe und Rezidiv bei den meisten Patienten in einer Zeitspanne bis 90 Tagen zu liegt. Bei 5 Patienten (20,8%) lag der Abstand zwischen 8 und 30 Tagen, bei 6 Patienten (25,0%) zwischen 31 und 60 Tagen und bei 7 Patienten (29,1%) zwischen 61 und 90 Tagen.

Bei 6 Patienten (25,0%) betrug die Abstände mehr als 90 Tage.

Abschließend soll noch ein Überblick über die Höhe der ersten gemessenen MRD-Werte im Peripherblut gegeben werden.

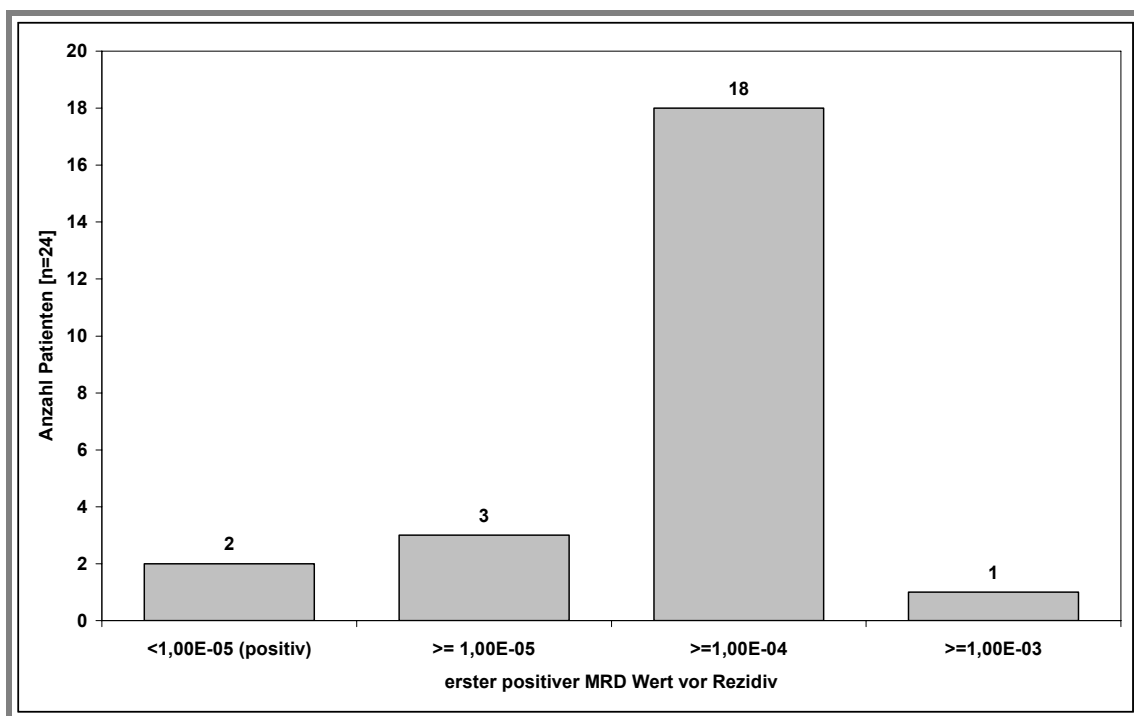


Abbildung 32: Höhe der ersten gemessenen MRD-Werte im Peripherblut

Die ersten gemessenen positiven Werte der Peripherblutproben, die vor Auftreten des Rezidives gemessen wurden, überspannen einen Bereich von maximal  $1,13 \times 10^{-3}$  bis zu Werten, die als  $< 1 \times 10^{-5}$  oder positiv bezeichnet werden, aber außerhalb des quantifizierbaren Bereiches liegen. Diese letzteren

Werte werden in der Abbildung und in allen folgenden Betrachtungen als  $< 1 \times 10^{-5}$  bzw. als positiv bezeichnet.

Bei der Großzahl, nämlich bei 18 Patienten (75,0%), lag der Wert in einem Bereich  $\geq 1 \times 10^{-4}$  und  $< 1 \times 10^{-3}$ .

Die MRD-Last der ersten positiven Probe betrug bei 3 Patienten (12,5%)  $\geq 1 \times 10^{-5}$ , bei 2 (8,3%) Patienten konnte nur die Aussage positiv gemacht werden und bei einem Patienten (4,2%) war ein Wert  $\geq 1 \times 10^{-3}$  detektierbar.

### ***5.7 Bedeutung der Höhe und Dynamik der MRD im Peripherblut nach allogener Stammzelltransplantation für die Wahrscheinlichkeit eines Rezidives***

In diesem Abschnitt geht es um die Frage, ob es möglich ist aus der Höhe und der Dynamik der MRD Aussagen über die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines Rezidives zu machen und somit Patienten zu identifizieren, die ein hohes Risiko tragen, ein Rezidiv zu erleiden. Zudem soll betrachtet werden, ob es eine kritische MRD-Grenzkonzentration bzw. -höhe oder eine MRD-Konzentrationszunahme pro Zeit (Dynamik) gibt, die für das Rezidiv nach allo-SZT prädiktiv ist.

#### **5.7.1 Übersicht über die gemessenen MRD-Werte der Patienten im Peripherblut**

In der Tabelle 8 sind die MRD-Werte des gesamten Patientenkollektives zu bestimmten Zeitpunkten nach der allo-SZT dargestellt. Als erster Messpunkt wurde der MRD-Wert am Tag 30 herangezogen. Von diesem Zeitpunkt an wurden die Werte in einem Intervall von 20 Tagen bis zum Tag 210 nach Transplantation aufgetragen. Ab Tag 210 wurde dann das Intervall auf 40 Tage vergrößert, aufgrund der Tatsache, dass es innerhalb der ersten 200 Tage nach allo-SZT am häufigsten zum Auftreten der Grunderkrankung kommt. Nicht bei allen Patienten standen für jeden Messpunkt Peripherblutproben zur Verfügung.

In dieser Übersichtsabbildung konnten nicht alle Werte, die pro Patient gemessen wurden, berücksichtigt werden, so dass bei Betrachtung aller Werte



pro Patient die Anzahl der positiven Proben vor Ausbruch des Rezidives bei vielen Patienten deutlich ansteigt und der Verlauf der MRD-Befunde wesentlich anschaulicher ist. Deshalb sind in der Tabelle 9 alle Werte, die pro Patient gemessen wurden dargestellt, unabhängig von einem gewissen Zeitintervall, wobei nur die Patienten die im Verlauf MRD positiv (MRD Gruppen high und low) waren und diejenigen Patienten, welche ein Rezidiv bekamen dargestellt sind.

Tabelle 8: MRD-Werte des gesamten Patientenkollektives

Erläuterungen:

CR = komplette Remission; d = Tag; MRD (minimal residual disease) = minimale Resterkrankung; RZ = Rezidiv; TRM (Treatment Related Mortality) = therapiessoziierte Mortalität; UPN = Patientennummer

UPN	MRD am Tag																Follow Up	Verlauf Status	Tag	MRD-Gruppe				
	d30	d50	d70	d90	d110	d130	d150	d170	d190	d210	d250	d290	d330	d370	d410	d450					d490	d530	d570	d610
1272	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	7,58E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-04	1,00E-04	951	RZ	190	high
1282	1,00E-04	7,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	49	RZ	45	high
1756	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,50E-02	2,10E-01	5,40E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	174	RZ	132	high
1776	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-05	1,16E-03	3,00E-03	4,13E-01	9,10E-04	0,00E+00	1,00E-05	4,48E-05	1,00E-05	9,48E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-05	1257	RZ	133	high
1793	2,77E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-04	1,33E-03	4,07E-03	1,22E-01	1,30E-01	1,45E-01	5,88E-03	9,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	300	RZ	182	high
1820	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	461	RZ	386	high
1829	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,100E-05	9,89E-03	1,52E-03	1,27E-01	1,29E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	209	RZ		high
1926	1,80E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	41	TRM	49	high
1965	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1126	RZ	617	high
2043	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	844	RZ	620	neg
2056	1,04E-04	1,00E-02	3,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	63	RZ	65	high
2105	6,100E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,86E-04	1,71E-04	1,71E-04	7,96E-04	5,69E-04	589	RZ	182	high
2114	0,00E+00	0,00E+00	8,86E-04	2,74E-03	4,63E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	101	RZ	117	high
2116	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,21E-04	1,88E-03	2,89E-03	1,32E-01	3,02E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	194	RZ	201	high
2119	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	650	RZ	421	high
2130	1,36E-04	3,69E-04	7,72E-05	1,09E-03	6,60E-05	2,15E-04	1,70E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	146	RZ	55	high
2130	8,48E-03	3,86E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	42	RZ		high
2217	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,73E-04	1,20E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	104	RZ	100	high
2237	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	427	RZ	492	high
2266	3,68E-03	5,21E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	52	RZ	41	high
2295	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	521	RZ	261	high
2298	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	507	RZ	419	high
2346	0,00E+00	0,00E+00	8,36E-04	9,78E-03	1,84E-01	1,48E-03	5,50E-03	2,44E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	170	RZ	106	high
2445	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	371	RZ	386	high
2451	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	404	RZ	319	high
2478	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-04	1,81E-03	1,77E+00	6,91E-01	7,75E-02	1,08E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	295	RZ	142	high
2660	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,48E-04	5,18E-04	4,98E-02	3,66E-03	4,00E-04	4,38E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	318	RZ	214	high
2613	9,33E-05	3,83E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	55	RZ	60	high
1615	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1464	CR		high
1710	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,21E-05	0,00E+00	0,00E+00	2,86E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1210	CR		low
1737	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1070	CR		low

UPN	MRD am Tag																	Follow Up	Verlauf		MRD-Gruppe		
	d30	d50	d70	d90	d110	d130	d150	d170	d190	d210	d250	d290	d330	d370	d410	d450	d490		d530	d570		d610	Status
1753	<1,00E-05	<1,00E-05	<1,00E-05	<1,00E-05	0,00E+00		0,00E+00	<1,00E-05	<1,00E-05	0,00E+00		<1,00E-05	0,00E+00				<1,00E-05				735	CR	low
1889	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00				1,00E-04				0,00E+00			1,00E-04						973	CR	low
1891	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00		0,00E+00								314	TRM	362 high
2059	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00					<1,00E-05		1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	870	CR	low
2060	0,00E+00	<1,00E-05						0,00E+00	0,00E+00	<1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00			<1,00E-05		0,00E+00			535	CR	low
2276	1,00E-04	1,00E-04			1,00E-04									0,00E+00							378	CR	low
2366	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		1,46E-04			0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		1,00E-04					420	CR	high
2488	1,90E-05	0,00E+00																			50	CR	low
1566	0,00E+00																				31	TRM	31 neg
1816	0,00E+00				0,00E+00							0,00E+00					0,00E+00			0,00E+00	1112	CR	neg
1825	0,00E+00			0,00E+00								0,00E+00			0,00E+00						391	CR	neg
1836	0,00E+00			0,00E+00				0,00E+00				0,00E+00			0,00E+00				0,00E+00		1078	CR	neg
1839	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00			0,00E+00		0,00E+00										0,00E+00	241	TRM	245 neg
1849	0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00			0,00E+00							0,00E+00					0,00E+00	742	CR	neg
1865			0,00E+00					0,00E+00			0,00E+00			0,00E+00							1256	CR	neg
1882	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00																		69	TRM	94 neg
1888	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00				0,00E+00						0,00E+00							889	CR	neg
1906	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00					0,00E+00						0,00E+00	1079	CR	neg
1908	0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00										0,00E+00						366	CR	neg
1913	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	346	CR	neg
1991	0,00E+00			0,00E+00				0,00E+00				0,00E+00		0,00E+00		0,00E+00					349	TRM	362 neg
2014	0,00E+00		0,00E+00		0,00E+00																105	TRM	159 neg
2018	0,00E+00																				34	TRM	83 neg
2020		0,00E+00		0,00E+00																	95	TRM	96 neg
2036	0,00E+00																				29	TRM	46 neg
2049	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00														155	CR	neg
2050	0,00E+00				0,00E+00							0,00E+00					0,00E+00				436	CR	neg
2052	0,00E+00	0,00E+00																			49	Abstoung	49 neg
2.K-MT	0,00E+00	0,00E+00																			49	Abstoung	
2057	0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00			0,00E+00			0,00E+00	0,00E+00										232	TRM	235 neg
2061	0,00E+00																				25	Abstoung	22 neg
2.K-MT	0,00E+00																				26	Abstoung	

MRD am Tag																	Follow Up	Verlauf		MRD-Gruppe					
UPN	d30	d50	d70	d90	d110	d130	d150	d170	d190	d210	d250	d290	d330	d370	d410	d450		d490	d530		d570	d610	Status	Tag	
2064	0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00				679	CR	neg		
2071	0,00E+00	0,00E+00																				54	TRM	72	neg
2077	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00			0,00E+00							352	CR	neg		
2087	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00					0,00E+00				0,00E+00								359	CR	neg	
2101	0,00E+00		0,00E+00					0,00E+00						0,00E+00						0,00E+00		948	CR	neg	
2102	0,00E+00																					39	TRM	39	neg
2123	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00					0,00E+00					0,00E+00							754	CR	neg	
2125	0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00																	113	TRM	115	neg
2208	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00													164	CR	neg	
2239	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00				0,00E+00				0,00E+00										253	CR	neg	
2244	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00			0,00E+00			0,00E+00											637	CR	neg	
2287	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00														140	TRM	165	neg
2311	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00				0,00E+00							0,00E+00							416	CR	neg	
2324	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00																	104	TRM	107	neg
2342	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00			0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		556	CR	neg	
2387	0,00E+00																					15	TRM	29	neg
2433	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00																125	CR	neg	
2491	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00																			63	CR	neg	
2495	0,00E+00		0,00E+00					0,00E+00				0,00E+00				0,00E+00	0,00E+00					499	CR	neg	
2504	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00				0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00			0,00E+00								365	CR	neg	
2541	0,00E+00	0,00E+00					0,00E+00															146	CR	neg	
2610	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00												201	CR	neg	
2619	0,00E+00	0,00E+00																				54	CR	neg	
2643	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00																			64	CR	neg	
2657	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00		0,00E+00														177	CR	neg	
2671	0,00E+00	0,00E+00			0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00															135	CR	neg	
2688			0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00																	95	CR	neg	
2701				0,00E+00		0,00E+00																154	CR	neg	
2743	0,00E+00		0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00																125	CR	neg	
2794	0,00E+00																					20	CR	neg	



UPN

1) MRD high (Vortsetzung)

2114	Tag 16	Tag 19	Tag 26	Tag 30	Tag 31	Tag 33	Tag 38	Tag 40	Tag 44	Tag 48	Tag 51	Tag 54	Tag 58	Tag 61	Tag 66	Tag 68	Tag 72	Tag 76	Tag 80	Tag 89	Tag 101	Tag 117					
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,75E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	8,86E-04	4,99E-04	6,13E-04	2,74E-03	4,63E-03	Rezidiv					
2116	Tag 17	Tag 31	Tag 101	Tag 132	Tag 145	Tag 160	Tag 174	Tag 186	Tag 194	Tag 201																	
	1,13E-04	1,00E-04	3,21E-04	1,86E-03	2,83E-03	1,36E-02	1,32E-01	2,31E+00	3,02E+00	Rezidiv																	
2119	Tag 27	Tag 189	Tag 231	Tag 261	Tag 300	Tag 344	Tag 421	Tag 430	Tag 450	Tag 456	Tag 461	Tag 486	Tag 514	Tag 548	Tag 562	Tag 602	Tag 650										
	0,00E+00	9,82E-05	9,04E-04	2,98E-05	0,00E+00	0,00E+00	3,63E-03	2,97E-03	7,50E-05	5,67E-05	<1,00E-05	2,88E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00										
2130	Tag 13	Tag 20	Tag 41	Tag 48	Tag 51	Tag 55	Tag 62	Tag 65	Tag 69	Tag 76	Tag 83	Tag 86	Tag 90	Tag 104	Tag 111	Tag 126	Tag 129	Tag 139	Tag 146								
	5,43E-04	1,36E-04	1,11E-04	1,04E-03	3,69E-04	1,65E-03	3,46E-04	4,01E-05	7,72E-05	2,97E-04	7,68E-04	8,54E-04	1,05E-03	3,38E-04	6,60E-05	1,05E-04	2,15E-04	4,99E-04	1,70E-04								
	Tag 16	Tag 21	Tag 28	Tag 35	Tag 38	Tag 42																					
	3,42E-05	6,28E-04	8,48E-03	8,48E-02	2,26E-01	3,96E-01																					
2217	Tag 20	Tag 27	Tag 34	Tag 41	Tag 48	Tag 55	Tag 62	Tag 69	Tag 83	Tag 90	Tag 97	Tag 100	Tag 104														
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,73E-04	2,73E-03	Rezidiv	1,20E-01														
2237	Tag 28	Tag 57	Tag 63	Tag 84	Tag 133	Tag 281	Tag 427	Tag 492																			
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,13E-03	Rezidiv																			
2266	Tag 20	Tag 24	Tag 27	Tag 31	Tag 34	Tag 38	Tag 41	Tag 46	Tag 48	Tag 52																	
	5,96E-04	1,43E-03	1,19E-03	3,68E-03	1,31E-02	1,01E-01	6,37E-01	2,75E-01	8,74E-01	6,21E-01																	
2295	Tag 48	Tag 55	Tag 122	Tag 132	Tag 146	Tag 216	Tag 251	Tag 254	Tag 307	Tag 485	Tag 521																
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,40E-04	6,75E-01	5,14E-01	1,06E-02	2,81E-01	1,02E+00																
2298	Tag 16	Tag 19	Tag 23	Tag 26	Tag 30	Tag 33	Tag 37	Tag 41	Tag 45	Tag 48	Tag 52	Tag 53	Tag 58	Tag 66	Tag 73	Tag 80	Tag 87	Tag 101	Tag 108	Tag 114	Tag 122	Tag 129	Tag 138	Tag 143	Tag 150	Tag 157	
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	<1,00E-05	1,80E-05	<1,00E-05	3,66E-05	
													Tag 475	Tag 468	Tag 465	Tag 454	Tag 447	Tag 434	Tag 419	Tag 375	Tag 296	Tag 265	Tag 233	Tag 199	Tag 192	Tag 171	Tag 164
													5,21E-01	4,61E-02	5,94E-02	9,68E-02	2,00E-01	8,29E-02	Rezidiv	5,41E-03	1,29E-04	7,48E-05	7,77E-05	7,69E-05	1,02E-04	2,99E-05	2,78E-05
2346	Tag 6	Tag 27	Tag 42	Tag 49	Tag 56	Tag 62	Tag 72	Tag 86	Tag 91	Tag 98	Tag 106	Tag 132	Tag 139	Tag 149	Tag 157	Tag 164	Tag 170										
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-04	2,47E-04	2,51E-04	8,36E-04	5,85E-03	9,78E-03	7,30E-02	1,64E-01	1,48E-03	5,74E-01	1,38E-03	5,50E-03	5,15E-02	2,44E-03										
2366	Tag 13	Tag 20	Tag 27	Tag 34	Tag 48	Tag 53	Tag 76	Tag 96	Tag 105	Tag 133	Tag 155	Tag 252	Tag 287	Tag 315	Tag 358	Tag 420	CR										
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,46E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-04											
2445	Tag 28	Tag 237	Tag 251	Tag 265	Tag 279	Tag 293	Tag 304	Tag 335	Tag 352	Tag 371	Tag 386																
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-04	4,26E-04	6,07E-04	5,67E-02	Rezidiv																
2451	Tag 26	Tag 33	Tag 40	Tag 47	Tag 51	Tag 61	Tag 65	Tag 72	Tag 82	Tag 94	Tag 101	Tag 124	Tag 131	Tag 152	Tag 177	Tag 185	Tag 200	Tag 214	Tag 291	Tag 318	Tag 319	Tag 348	Tag 404				
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,10E-05	6,21E-03	Rezidiv	3,80E-02	<1,00E-05			
2478	Tag 28	Tag 63	Tag 86	Tag 92	Tag 100	Tag 107	Tag 112	Tag 142	Tag 149	Tag 175	Tag 203	Tag 235															
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-04	2,01E-04	4,29E-03	1,81E-03	1,77E+00	6,91E-01	7,75E-03	1,08E+00	0,00E+00															
2560	Tag 17	Tag 27	Tag 38	Tag 52	Tag 68	Tag 81	Tag 94	Tag 109	Tag 130	Tag 139	Tag 146	Tag 152	Tag 159	Tag 166	Tag 173	Tag 180	Tag 185	Tag 192	Tag 201	Tag 208	Tag 214	Tag 234	Tag 278	Tag 318			
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,21E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,48E-04	5,52E-04	6,64E-04	5,18E-04	5,22E-03	9,80E-03	4,99E-02	3,66E-03	4,00E-04	4,38E-04			
2613	Tag 14	Tag 30	Tag 35	Tag 55	Tag 60																						
	4,11E-04	9,33E-05	0,00E+00	3,83E-03	Rezidiv																						

UPN

2) MRD low

1718	Tag 20	Tag 27	Tag 97	Tag 111	Tag 174	Tag 296	Tag 442	Tag 622	Tag 728	Tag 807	Tag 912	Tag 1218	CR
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,21E-05	2,86E-05	0,00E+00	4,22E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	

1737	Tag 63	Tag 91	Tag 99	Tag 196	Tag 1070	CR
	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-05	1,00E-05	0,00E+00	

1753	Tag 15	Tag 22	Tag 26	Tag 29	Tag 36	Tag 43	Tag 50	Tag 60	Tag 71	Tag 85	Tag 99	Tag 119	Tag 142	Tag 163	Tag 184	Tag 206	Tag 304	Tag 368	Tag 499	Tag 735	CR
	<1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	<1,00E-05	<1,00E-05	0,00E+00	<1,00E-05	<1,00E-05	<1,00E-05	<1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	<1,00E-05	<1,00E-05	0,00E+00	<1,00E-05	0,00E+00	<1,00E-05	<1,00E-05	

1889	Tag 14	Tag 22	Tag 26	Tag 42	Tag 49	Tag 56	Tag 77	Tag 84	Tag 176	Tag 283	Tag 394	Tag 973	CR
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-04	0,00E+00	1,00E-04	0,00E+00	

2059	Tag 16	Tag 20	Tag 27	Tag 34	Tag 43	Tag 48	Tag 55	Tag 62	Tag 69	Tag 72	Tag 76	Tag 83	Tag 85	Tag 92	Tag 98	Tag 104	Tag 111	Tag 118	Tag 125	Tag 132	Tag 139	Tag 160	Tag 168	Tag 181	Tag 202	Tag 401
	0,00E+00	<1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	<1,00E-05	<1,00E-05	<1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	<1,00E-05
																	CR	Tag 870	Tag 840	Tag 598	Tag 570	Tag 554	Tag 525	Tag 518	Tag 510	Tag 499
																		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	<1,00E-05	0,00E+00	1,00E-05

2060	Tag 14	Tag 21	Tag 24	Tag 28	Tag 31	Tag 35	Tag 42	Tag 44	Tag 50	Tag 52	Tag 57	Tag 59	Tag 161	Tag 170	Tag 203	Tag 218	Tag 231	Tag 245	Tag 260	Tag 288	Tag 343	Tag 443	Tag 535	CR
	1,86E-05	<1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-05	0,00E+00	<1,00E-05	<1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	<1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	<1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	<1,00E-05	0,00E+00	

2276	Tag 29	Tag 59	Tag 112	Tag 378	CR
	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	0,00E+00	

2468	Tag 14	Tag 16	Tag 21	Tag 28	Tag 31	Tag 38	Tag 50	CR
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,90E-05	4,98E-05	0,00E+00	

3) MRD negativ

2043	Tag 25	Tag 80	Tag 289	Tag 297	Tag 403	Tag 523	Tag 566	Tag 615	Tag 620	Tag 648	Tag 706	Tag 755	Tag 804	Tag 812	Tag 825	Tag 844
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,20E-02	7,72E-03	0,00E+00	1,00E-04	1,00E-04	8,18E-04	1,52E-03	2,00E-02	1,16E-02	3,01E-03	4,06E-02

## 5.7.2 Individuelle Verläufe

Anhand einzelner Patienten soll die individuelle Dynamik der MRD in Bezug auf die zeitliche Entwicklung und die Höhe der MRD-Last näher betrachtet werden.

Zuerst werden Beispiele für MRD-Verläufe bei Patienten, welche ein Rezidiv erlitten haben dargestellt. Nachfolgend werden individuelle Verläufe der MRD im Peripherblut von Patienten dargestellt, bei denen positive MRD-Befunde detektiert wurden, ohne dass es zum Auftreten eines Rezidives kam. Zusätzlich zu den MRD-Werten im Peripherblut wurde bei diesen Patienten der Chimärismusstatus im Untersuchungszeitraum beobachtet.

### 5.7.2.1 Individuelle Verläufe der MRD im Peripherblut bei Patienten, die ein Rezidiv erlitten haben

Im folgenden Abschnitt werden unterschiedliche MRD-Verläufe von Patienten mit einem Rezidiv beschrieben. Zum einen gab es Patienten, welche von Beginn der MRD-Untersuchung an positive Werte im Peripherblut aufwiesen. Bei einem Patienten waren von Beginn der Messung an immer negative MRD-Werte im Peripherblut bis zur Diagnose des Rezidives zu detektieren. Eine andere Gruppe zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der MRD-Werte im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives. Ein Teil der Patienten zeigte einen diskontinuierlichen Anstieg der MRD-Werte im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives, bei einem Patienten mit eingestreuten negativen MRD-Werten. Es gab auch Verläufe mit frühem positivem MRD-Wert im Peripherblut und nachfolgendem negativen MRD-Befund vor erneutem Anstieg der MRD-Werte. Auch Verläufe mit abnehmenden MRD-Werten im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives traten auf. Nachfolgend soll genauer darauf eingegangen werden.

Patienten, die von Beginn der MRD-Untersuchung an positive Werte im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives aufwiesen:



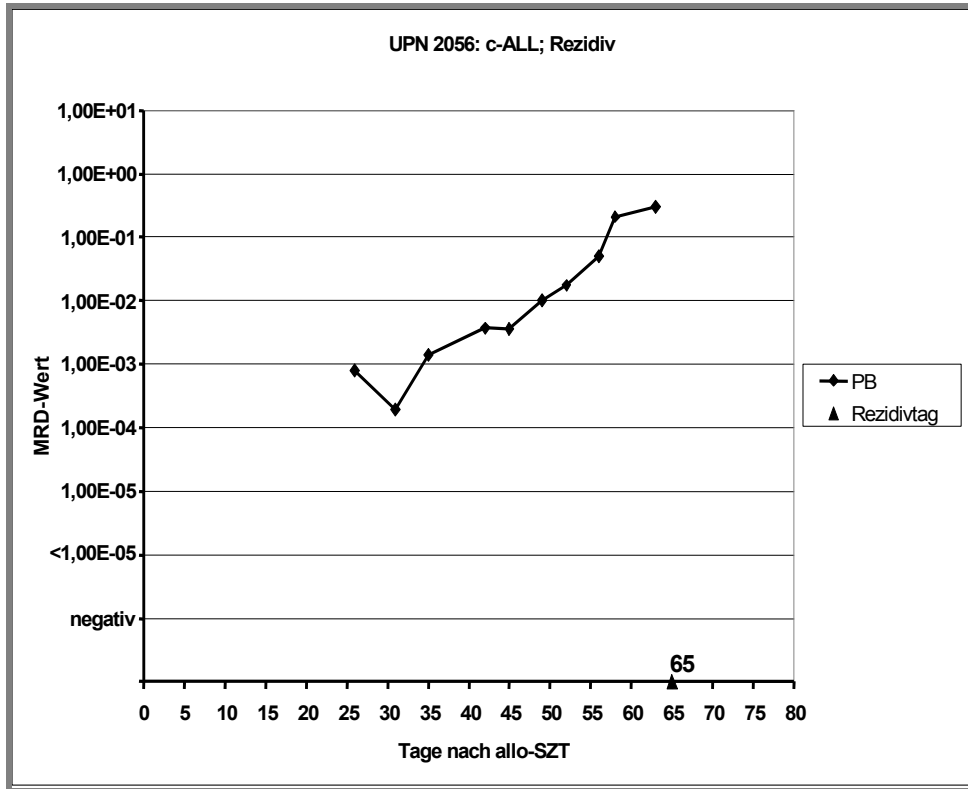


Abbildung 33: Patient UPN 2056

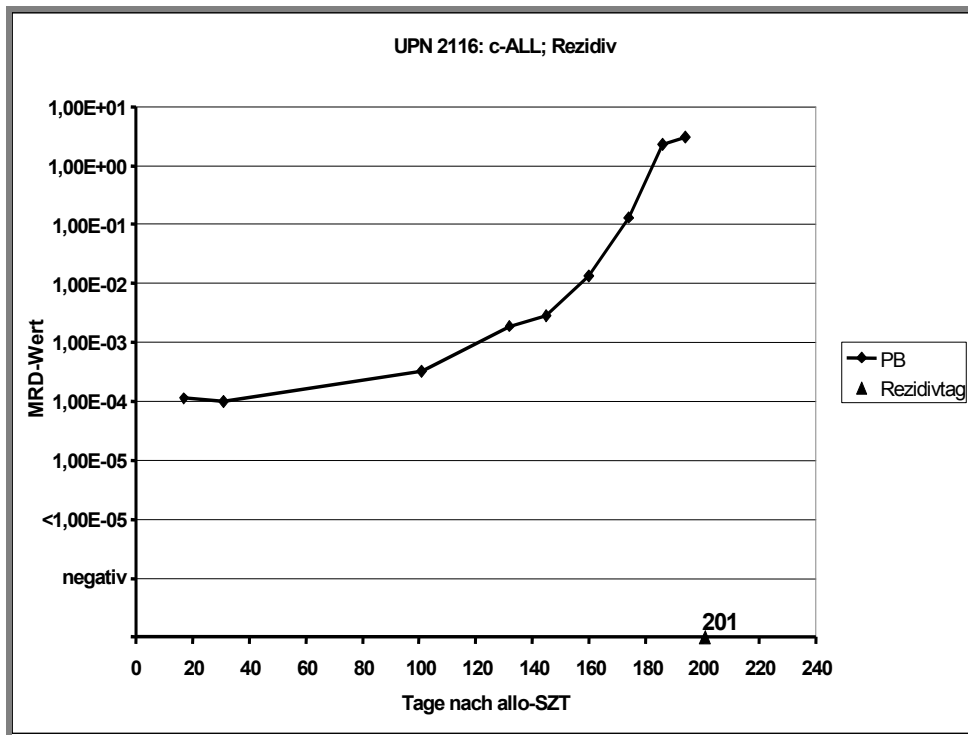


Abbildung 34: Patient UPN 2116

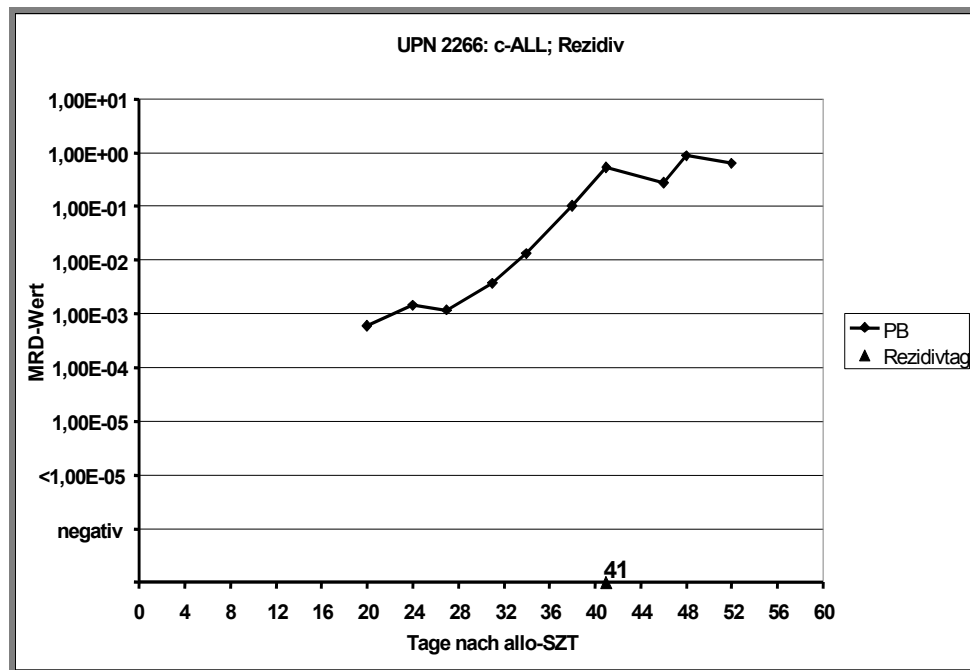


Abbildung 35: Patient UPN 2266

Die oben aufgeführten Abbildungen zeigen MRD-Verläufe von 3 Patienten, bei welchen während des gesamten Untersuchungszeitraumes positive MRD-Werte im Peripherblut nachgewiesen werden konnten und welche dann auch ein Rezidiv erlitten haben. Alle 3 Patienten waren im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives in den untersuchten Proben MRD high, d.h. die MRD-Last war  $> 1 \times 10^{-4}$ . Betrachtet man die Dynamik der MRD-Werte, so zeigt sich bei allen 3 Patienten ein Anstieg der MRD-Werte bis zum Ausbruch des Rezidives. Der erste positive MRD-Wert, der gemessen wurde liegt bei allen Patienten in einem Bereich zwischen  $< 1 \times 10^{-3}$  und  $> 1 \times 10^{-4}$ .

Patient UPN 2056 in Abbildung 33 weist am Tag 26 einen ersten MRD-Wert von  $7,80 \times 10^{-4}$  auf, der höher ist als der MRD-Wert der zweiten Probe an Tag 31 ( $1,96 \times 10^{-4}$ ). Danach kommt es aber wieder zu einem Anstieg der MRD-Werte. Dabei ist zu beachten, dass der Patient eine hohe MRD-Last in der Vorprobe aufwies ( $1,50 \times 10^{-3}$  am Tag 13 vor der allo-SZT). Am Tag 43 bekam der Patient eine Immuntherapie aufgrund eines zunehmenden gemischten Chimärismus in Form einer DLI. Einen Tag vor dieser Intervention betrug der

MRD-Wert  $3,70 \times 10^{-3}$ , am Tag 45 fiel der Wert minimal ab auf  $3,64 \times 10^{-3}$ , bevor er am Tag 49, aber bereits wieder auf  $1 \times 10^{-2}$  angestiegen war und am Tag 65 das Rezidiv diagnostiziert wurde.

Der Verlauf der MRD-Werte bei Patient UPN 2116 in Abbildung 34 zeigt einen Anstieg der Werte von Tag 17 an mit einem Wert von  $1,13 \times 10^{-4}$ , über einen langen Zeitraum von 177 Tagen bis zum Tag 194, an welchem eine MRD-Last in Höhe  $3,02 \times 10^0$  gemessen wurde.

Im Gegensatz dazu kommt es bei Patient UPN 2266, dessen MRD-Verlauf in Abbildung 35 dargestellt wird, innerhalb kurzer Zeit von Beginn der Messung am Tag 22 an mit einem MRD-Wert von  $5,96 \times 10^{-4}$  zu einem fulminanten Rezidiv an Tag 41, wobei auch hier ein stetiger Anstieg der MRD-Werte in den gemessenen Proben zu beobachten ist. Am Tag 30 nach allo-SZT bekam dieser Patient eine Immuntherapie in Form einer DLI. Am Tag 27 wurde ein MRD-Wert von  $1,19 \times 10^{-3}$  im Peripherblut detektiert der am Tag 31 auf einen Wert von  $3,68 \times 10^{-3}$  angestiegen war.

Patient, der von Beginn der Messung an immer negative MRD-Werte im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives aufwies:

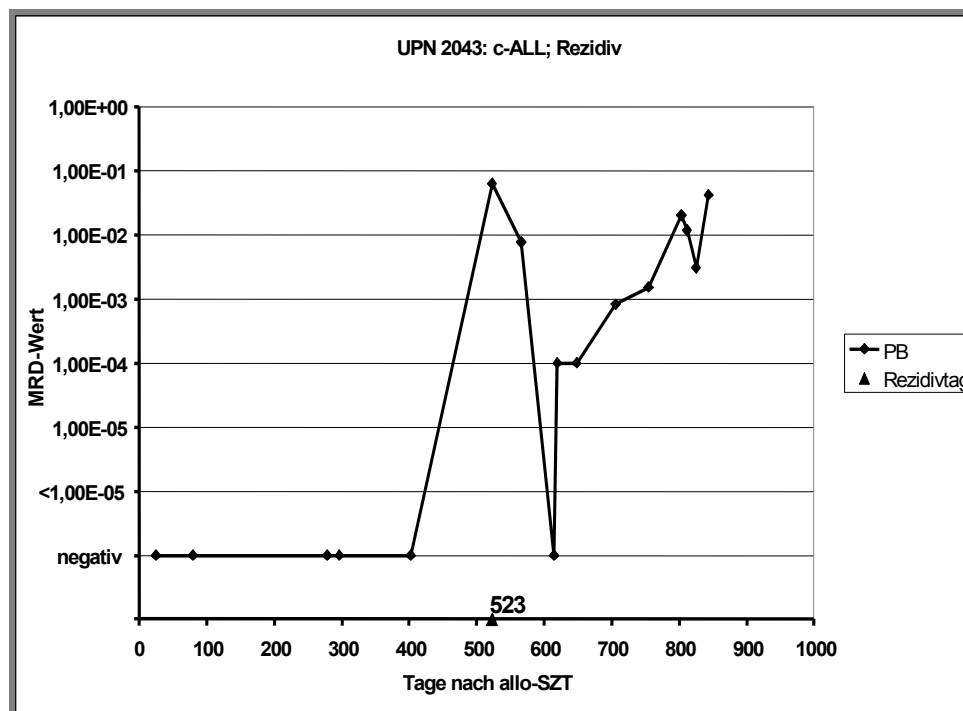


Abbildung 36: Patient UPN 2043

Wie aus der oben dargestellten Abbildung entnommen werden kann, war es bei diesem Patienten nicht möglich eine MRD-Last in den gemessenen 5 Peripherblutproben vor Ausbruch des Rezidives detektieren zu können. Erst am Tag des Rezidives (Tag 523) wurde der Patient MRD positiv im Peripherblut ( $6,20 \times 10^{-2}$ ) gemessen. Wobei festzuhalten ist, dass zwischen der letzten gemessenen Peripherblutprobe und dem Rezidiv ein Intervall von 100 Tagen bestand, in welchem keine Probe zur Untersuchung zur Verfügung stand. Auch bei Betrachtung des MRD-Wertes der Vorprobe, der MRD-Werte im Knochenmark nach der allo-SZT (beide ebenfalls negativ) und des Chimärismusstatus (CC) ergab sich kein Hinweis auf die Entwicklung eines möglichen Rezidives.

Patienten mit einem kontinuierlichen Anstieg der MRD-Werte im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives:

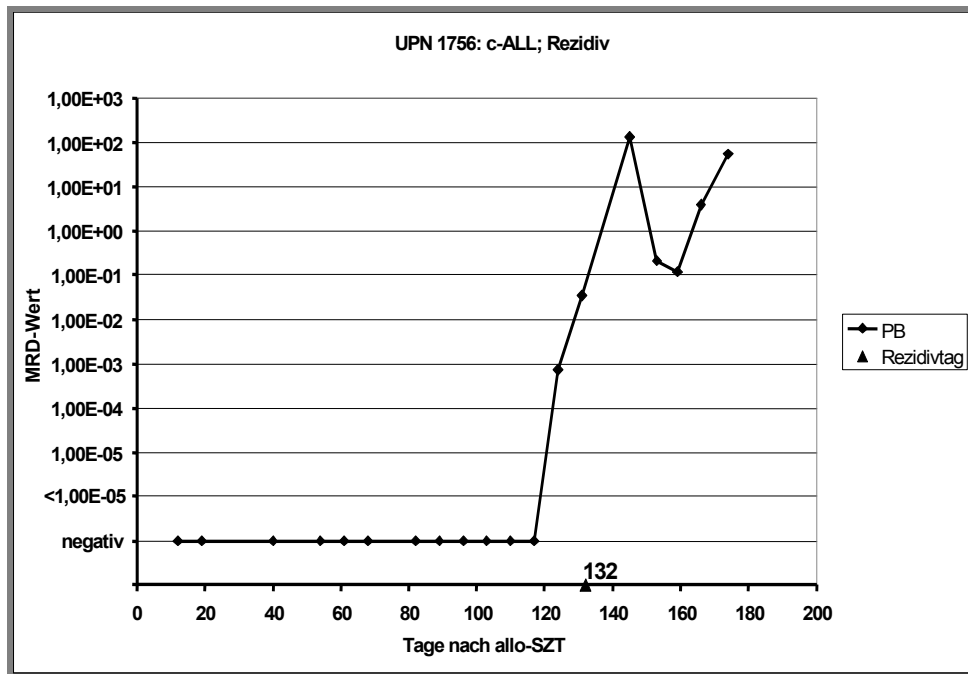


Abbildung 37: Patient UPN 1756

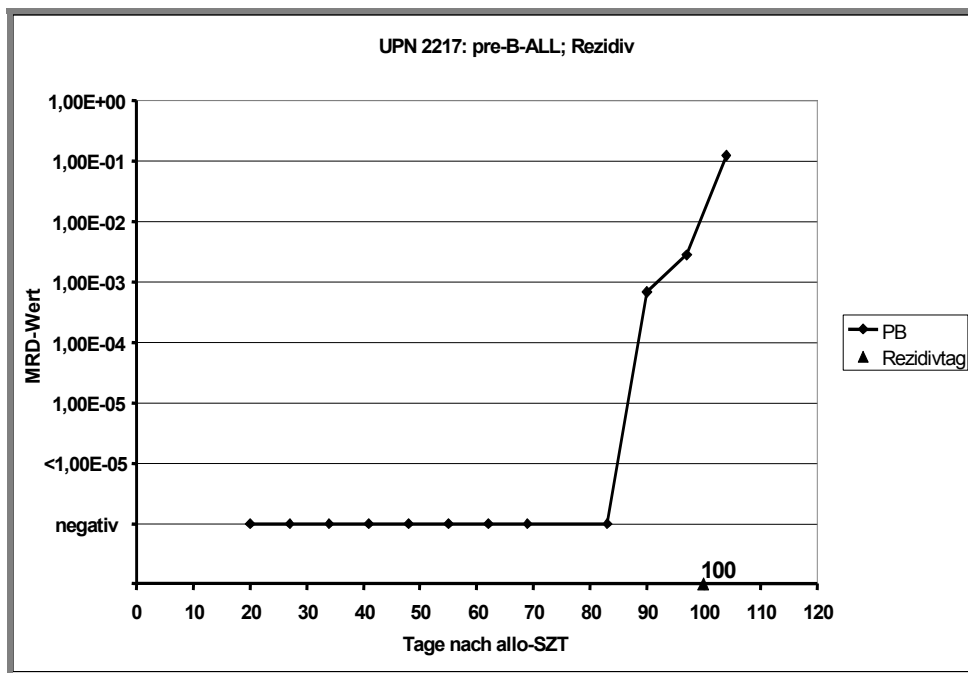


Abbildung 38: Patient UPN 2217

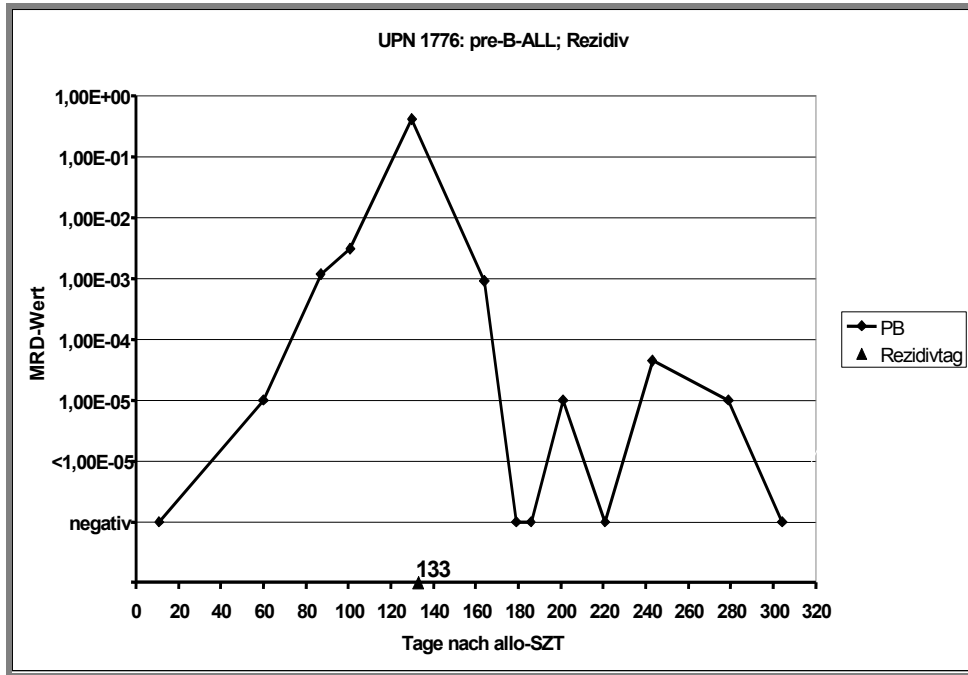


Abbildung 39: Patient UPN 1776

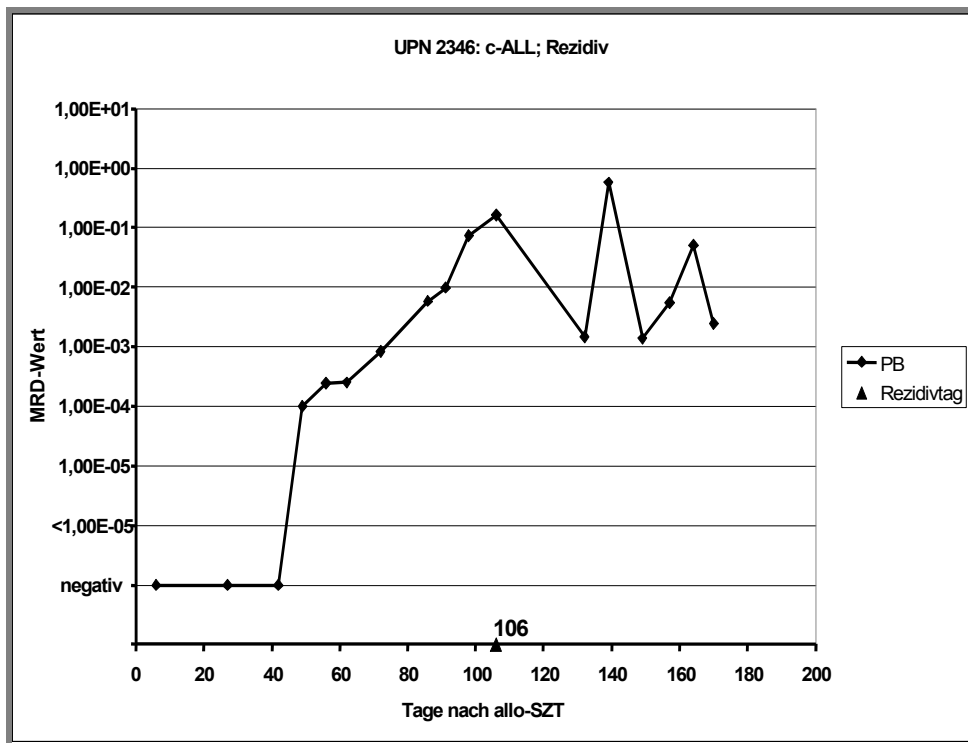


Abbildung 40: Patient UPN 2346

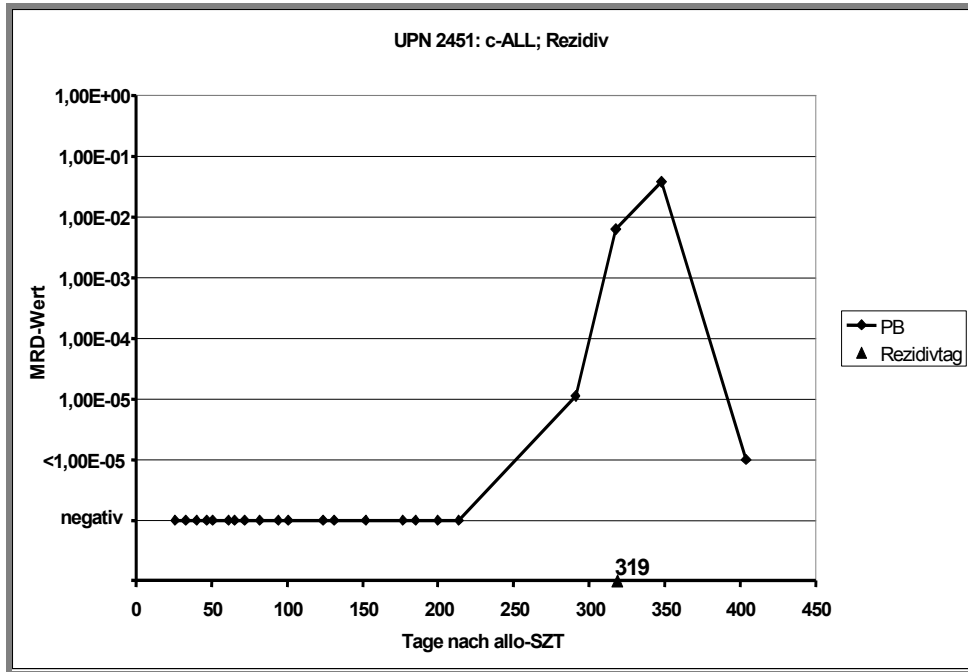


Abbildung 41: Patient UPN 2451

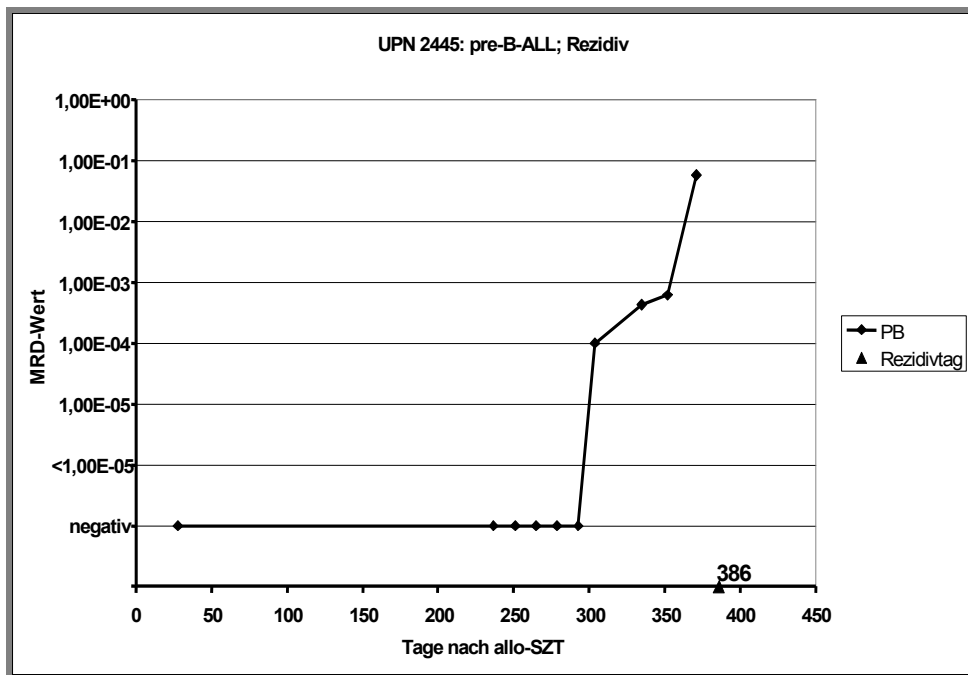


Abbildung 42: Patient UPN 2445

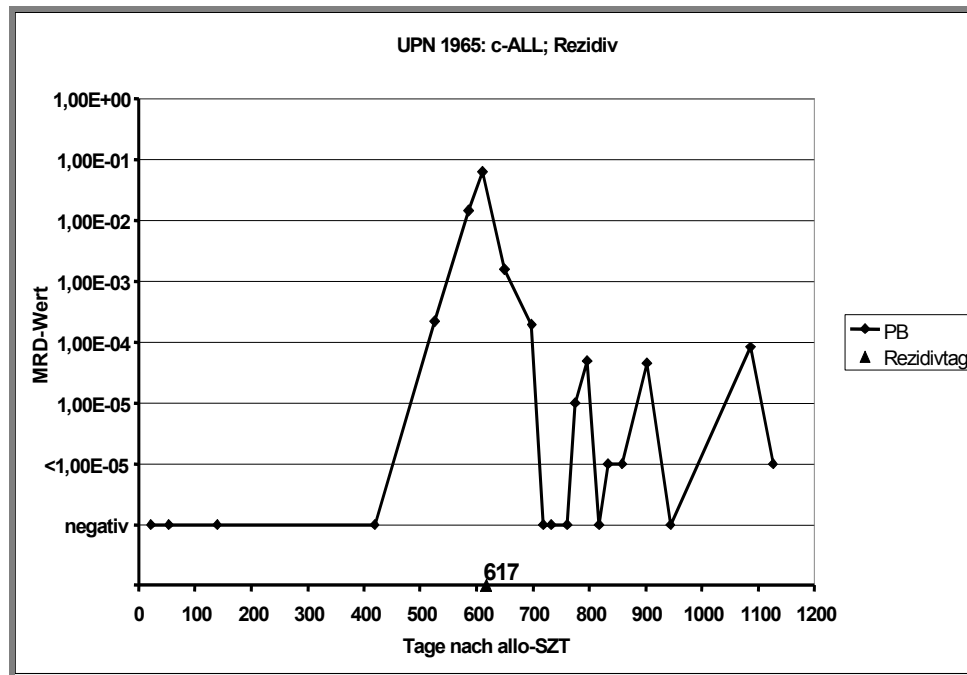


Abbildung 43: Patient UPN 1965

In allen oben dargestellten MRD-Verläufen der 7 untersuchten Patienten kommt es nach einer Phase, in der die Patienten keine MRD-Last im Peripherblut aufwiesen, zu einem kontinuierlichen Anstieg der Werte vor Diagnose des Rezidives. Betrachtet man die Höhe der MRD-Werte, so wurden alle Patienten vor Ausbruch des Rezidives im Peripherblut MRD high gemessen, d.h. sie wiesen einen Wert  $> 1 \times 10^{-4}$  auf.

Die ersten beiden Abbildungen zeigen MRD-Verläufe von Patienten, in denen es innerhalb eines kurzen Zeitraumes zu einem fulminanten Rezidiv kam. Patient UPN 1756 zeigte beim MRD-Monitoring von Tag 12 nach allo-SZT an bis zum Tag 117 immer keine MRD-Last im Peripherblut. Nur 7 Tage später konnte eine MRD-Last von  $7,31 \times 10^{-4}$  detektiert werden und weitere 7 Tage später stieg dieser Wert auf  $3,50 \times 10^{-2}$  an bevor am Tag 132 das Rezidiv diagnostiziert wurde. Der Patient bekam am Tag 33 nach allo-SZT eine Immuntherapie in Form einer DLI. Bei Patient UPN 2217 in Abbildung 38 konnte erst 10 Tage vor Diagnose des Rezidives eine MRD-Last von  $6,73 \times 10^{-4}$  nachgewiesen werden. Auch bei diesem Patienten war die eine Woche vorher



gemessene Probe negativ, ebenso wie die vorherigen Proben nach der allo-SZT.

In den nächsten beiden Abbildungen (39 und 40) sind 2 MRD-Verläufe dargestellt, in denen es bei den Patienten ebenfalls zu einem frühen Rezidiv innerhalb der ersten 200 Tage kam. Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Patienten konnte bei den Patienten aber ein kontinuierlicher Anstieg der MRD-Last im Peripherblut über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Bei Patient UPN 1776 konnte nach einmaliger Messung eines negativen Befundes am Tag 11 nach allo-SZT, eine ansteigende MRD-Last in den folgenden Proben an den Tagen 60 ( $1 \times 10^{-5}$ ), 87 ( $4,17 \times 10^{-5}$ ), 101 ( $1,16 \times 10^{-3}$ ) und 130 ( $4,13 \times 10^{-1}$ ) nachgewiesen werden, bevor es am Tag 133 zum Rezidiv kam. Der Patient bekam am Tag 60 nach allo-SZT eine Immuntherapie in Form einer DLL. Bei Patient UPN 2346 ist ein ähnlicher Verlauf beobachtbar. Hier war es an Tag 49 nach allo-SZT zum ersten Mal möglich, einen positiven Befund zu erheben ( $1 \times 10^{-4}$ ). In den folgenden 57 Tagen, die bis zur Diagnose des Rezidives vergingen, konnte in den fast immer wöchentlich durchgeführten Messungen, ein stetiger Anstieg der Höhe der MRD-Werte detektiert werden.

In den beiden Abbildungen 41 und 42 der Patienten UPN 2451 und UPN 2445 zeigt sich, dass es auch bei spät auftretenden Rezidiven, nach Tag 300, möglich war, vorher eine MRD-Last im Peripherblut zu messen. Bei Patient UPN 2451, der bis zum Tag 214 immer negativ im Peripherblut gemessen wurde, kam es am Tag 291 zum ersten Mal zum Auftreten einer MRD-Last in Höhe von  $1,10 \times 10^{-5}$ . Leider stand erst am Tag 318 wieder eine Peripherblutprobe zu Verfügung, also einen Tag vor Diagnosestellung des Rezidives. Diese wies dann schon einen Wert von  $6,21 \times 10^{-3}$  auf, so dass der dazwischen liegende Verlauf nicht beurteilt werden kann.

Bei Patient UPN 2445 war es möglich 82 Tage vor Ausbruch des Rezidives zum ersten mal eine MRD-Last in Höhe von  $1 \times 10^{-4}$  im Peripherblut nachzuweisen. Im weiteren Verlauf zeigt sich eine ansteigende Dynamik der MRD-Last mit Werten von  $4,26 \times 10^{-4}$  am Tag 335,  $6,07 \times 10^{-4}$  am Tag 352 und  $6,07 \times 10^{-4}$  am Tag 371 nach allo-SZT.

Die letzte der 7 Abbildungen zeigt den MRD-Verlauf eines Patienten, der erst sehr spät, am Tag 617 nach allo-SZT, an einem Rezidiv erkrankte. Auch bei ihm konnte eine MRD-Last vor Diagnose des Rezidives im Peripherblut detektiert werden. Am Tag 526, 91 Tage vor dem Rezidiv, konnte eine MRD-Wert in Höhe von  $2,16 \times 10^{-4}$  (MRD high) nachgewiesen werden, welche am Tag 586 auf einen Wert von  $1,41 \times 10^{-2}$  angestiegen war. Auch hier standen leider zwischen diesen beiden Tagen keine weiteren Peripherblutproben zur Verfügung, anhand deren die Dynamik der MRD eventuell deutlicher beurteilbar wäre.

Patienten mit einem diskontinuierlichen Anstieg der MRD-Werte im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives:

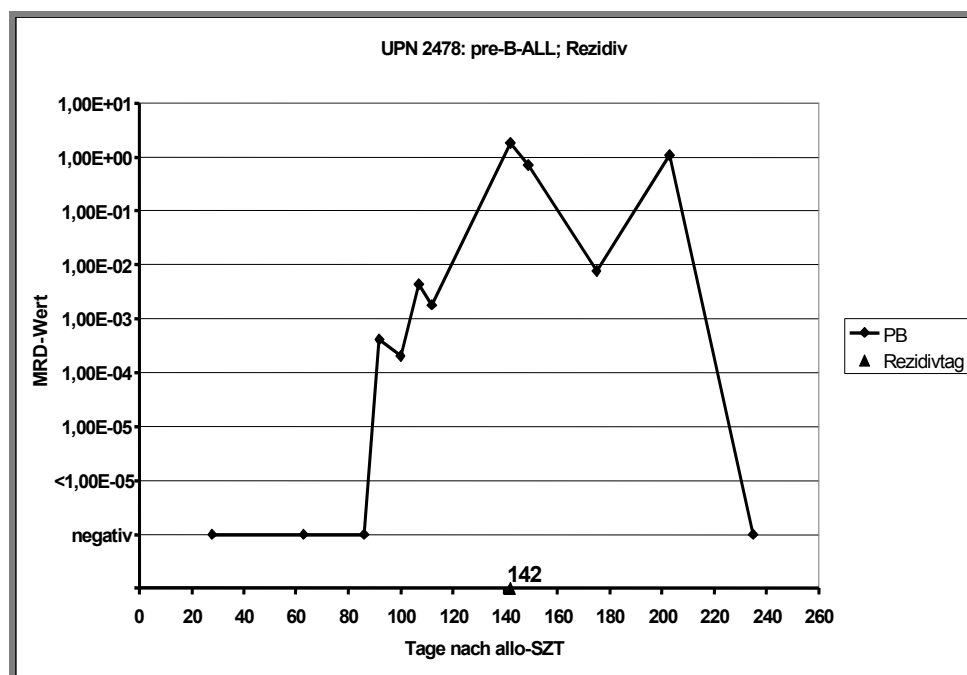


Abbildung 44: Patient UPN 2478

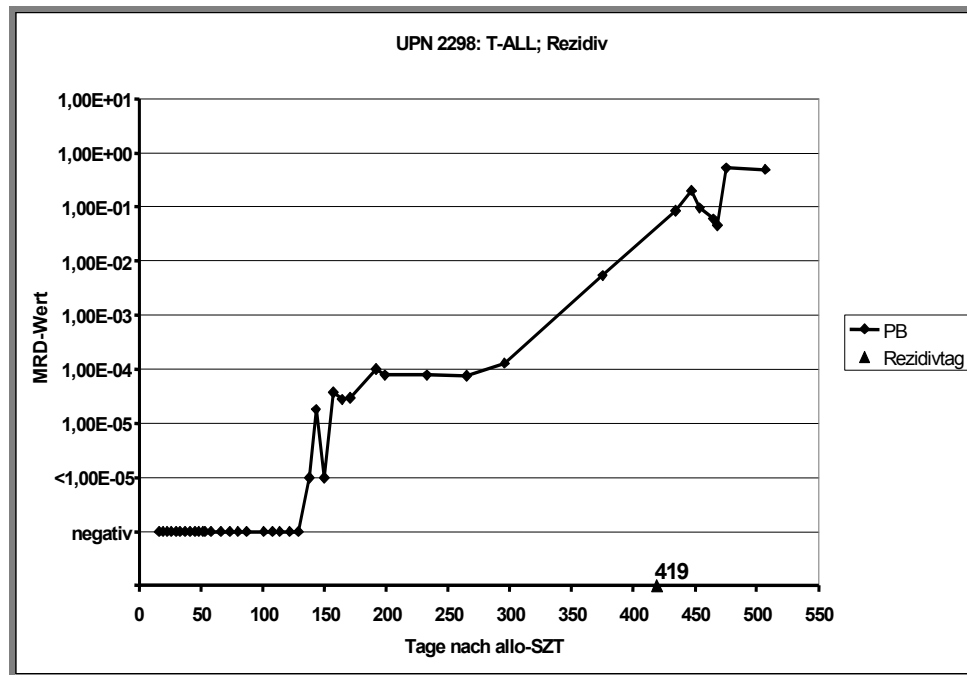


Abbildung 45: Patient UPN 2298

Aus den beiden Abbildungen 44 und 45 wird deutlich, dass die MRD-Verläufe im Peripherblut nicht immer einen stetigen Anstieg der Werte aufweisen. Jedoch sind bei beiden Patienten MRD-Werte in einem Bereich  $> 1 \times 10^{-4}$  vor Diagnose des Rezidives im Peripherblut nachweisbar, so dass beide der MRD high Gruppe zugeordnet werden konnten.

Bei Patient UPN 2478 war am Tag 92, 50 Tage vor Rezidivdiagnose, zum ersten Mal eine MRD-Last detektierbar in Höhe von  $4,09 \times 10^{-4}$ . Dieser Wert fiel dann in der nächsten Probe, etwas über eine Woche später, ab auf  $2,01 \times 10^{-4}$ . Danach erfolgte wieder ein Anstieg auf  $4,29 \times 10^{-3}$  an Tag 107, worauf der Wert in der letzten gemessenen Probe vor dem Rezidiv wieder auf  $4,29 \times 10^{-3}$  an Tag 112 abfiel. Patient UPN 2298 zeigte anfangs einen vergleichbaren Verlauf, wobei die ersten MRD-Werte im Peripherblut auf einem niedrigeren Level liegen. Nach einem initialen Anstieg der Werte von  $< 1 \times 10^{-5}$  an Tag 138 nach allo-SZT auf  $1,80 \times 10^{-5}$  an Tag 143 fiel der Wert wieder auf das Anfangsniveau ab. Danach waren bis zum Tag 265 Werte in einem Bereich zwischen  $2,78 \times 10^{-5}$  und  $1 \times 10^{-4}$  detektierbar. Ab Tag 296 stiegen die Werte dann kontinuierlich

an von  $1,29 \times 10^{-4}$  am Tag 296 auf  $5,41 \times 10^{-3}$  am Tag 375, bevor der Patient am Tag 419 ein Rezidiv erlitt.

Patient mit diskontinuierlichem Anstieg und Vorkommen eingestreuter negativer MRD-Werte im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives:

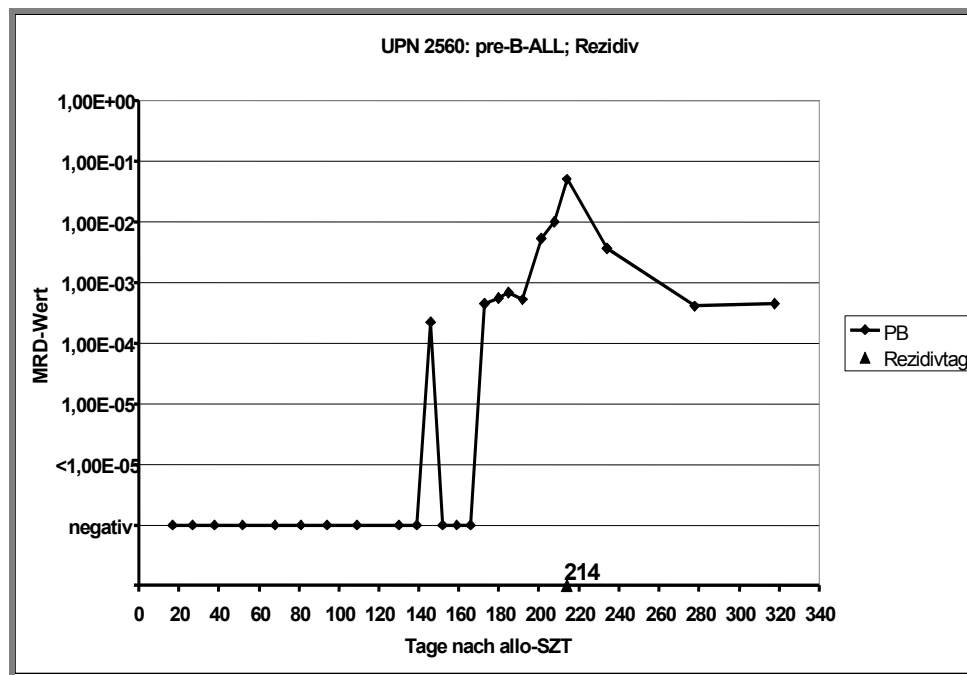


Abbildung 46: Patient UPN 2560

Die Dynamik der MRD-Last im Verlauf vor Diagnose des Rezidives zeigt bei dem oben dargestellten Patienten, dass es auch zur Messung negativer MRD-Befunde nach Messung positiver Befunde kommen kann, bevor das Rezidiv auftritt. Es war aber möglich eine MRD-Last  $> 1 \times 10^{-4}$  vor Diagnose des Rezidives im Peripherblut zu detektieren, so dass er zur Gruppe MRD high zählt.

Patient UPN 2560 wurde am Tag 146 MRD high gemessen ( $2,21 \times 10^{-4}$ ). Danach konnte in den nächsten 3 Folgeproben an den Tagen 152, 159 und 166 nach allo-SZT keine MRD-Last mehr detektiert werden. Ab Tag 173 waren dann mehrere Werte in einem Bereich von  $5 \times 10^{-4}$  bis  $9,80 \times 10^{-3}$  am Tag 208 nachweisbar vor Rezidivdiagnose am Tag 214.

Patienten mit frühem positivem MRD-Wert im Peripherblut und nachfolgendem negativen MRD-Befund vor erneutem Anstieg der MRD-Werte vor Diagnose des Rezidives.

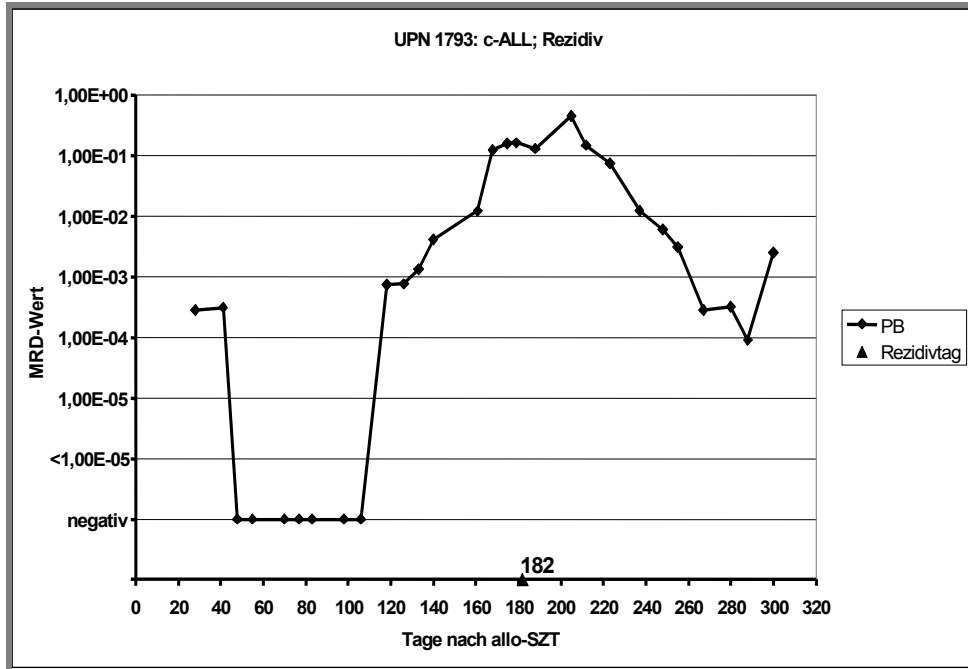


Abbildung 47: Patient UPN 1793

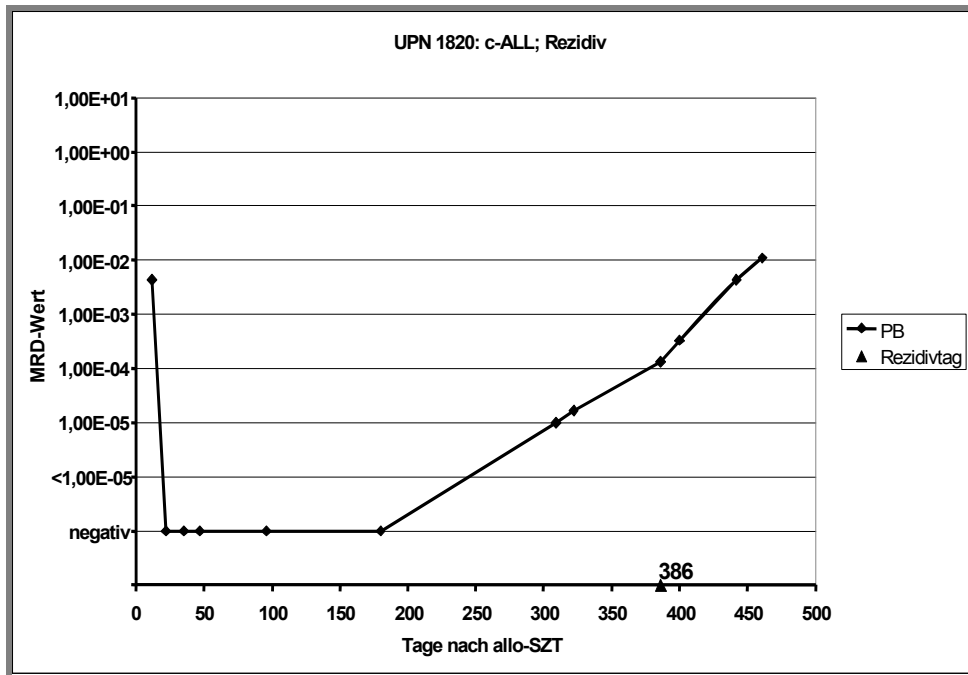


Abbildung 48: Patient UPN 1820

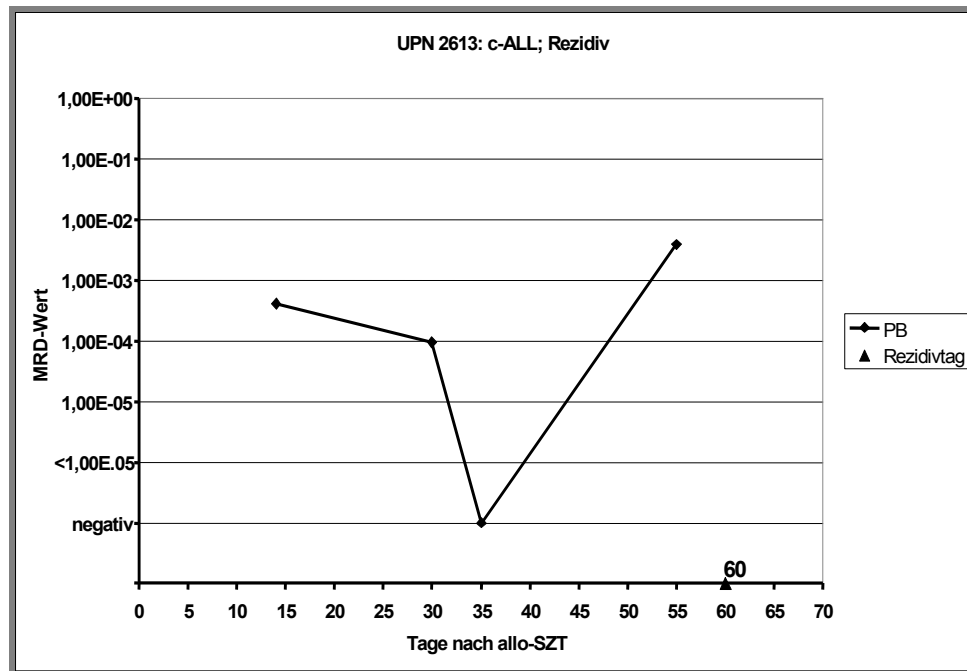


Abbildung 49: Patient UPN 2613

Bei den oben dargestellten drei Patienten konnte kurz nach allo-SZT eine hohe initiale MRD-Last mit Werten deutlich  $> 1 \times 10^{-4}$  (UPN 1793:  $2,77 \times 10^{-4}$  am Tag 28; UPN 1820:  $4,36^{-3} \times 10$  am Tag 12; UPN 2613:  $4,11 \times 10^{-4}$  am Tag 14) detektiert werden. Danach kam es zur Messung negativer MRD-Befunde vor erneutem Anstieg der Werte vor Diagnose des Rezidives. Bei den Patienten UPN 1793 und UPN 1820 erfolgt der Anstieg nach einer längeren Phase in der keine MRD-Last detektierbar war. Bei Patient UPN 1793 ist am Tag 118 zum ersten Mal eine MRD-Last in Höhe von  $7,38 \times 10^{-4}$  nachweisbar, die bis zum Tag 182 an welchem das Rezidiv auftrat kontinuierlich bis auf einen Wert von  $1,61 \times 10^{-1}$  am Tag 179 anstieg. Bei Patient UPN 1820 erfolgt der Anstieg der Werte von Tag 309 an auf einem niedrigeren MRD-Level mit einem Wert von  $1 \times 10^{-5}$  bis zum Auftreten des Rezidives am Tag 386.

Bei Patient UPN 2613 spielt sich der Verlauf in einem kürzeren Zeitintervall nach allo-SZT ab. Nach den ersten beiden MRD high gemessenen Peripherblutproben zeigt die Probe am Tag 35 (sowohl im Blut als auch im Knochenmark) keine nachweisbare MRD-Last. Die nächste verfügbare Peripherblut-

probe am Tag 55, 5 Tage vor der Rezidivdiagnose, weist dann aber schon einen Wert von  $3,83^{-3} \times 10$  auf.

Sehr wichtig bei allen 3 Patienten ist die Beobachtung, dass in der Vorprobe, kurz vor der allo-SZT, eine hohe MRD-Last vorlag. Bei Patient UPN 1793 war eine MRD-Last von  $1,02 \times 10^{-3}$  (Tag 8 vor allo-SZT), bei Patient UPN 2613 von  $1,41^{-2} \times 10$  (Tag 21 vor allo-SZT) und bei Patient 1820 sogar von  $1,50 \times 10^{-1}$  (Tag 13 vor allo-SZT) detektierbar.

Patienten mit abnehmenden MRD-Werten im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives.

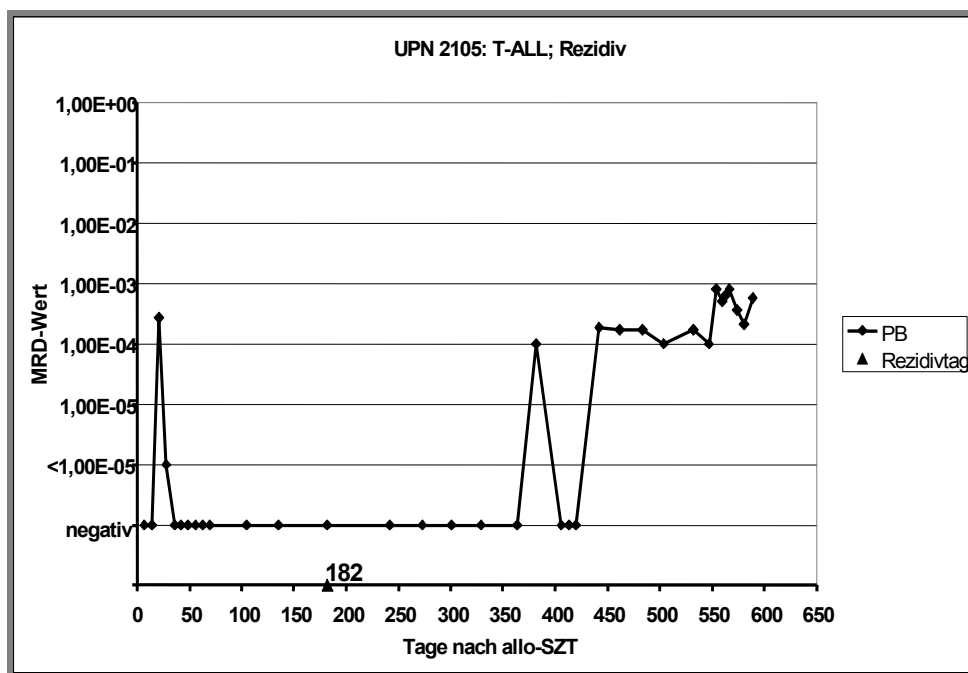


Abbildung 50: Patient UPN 2105

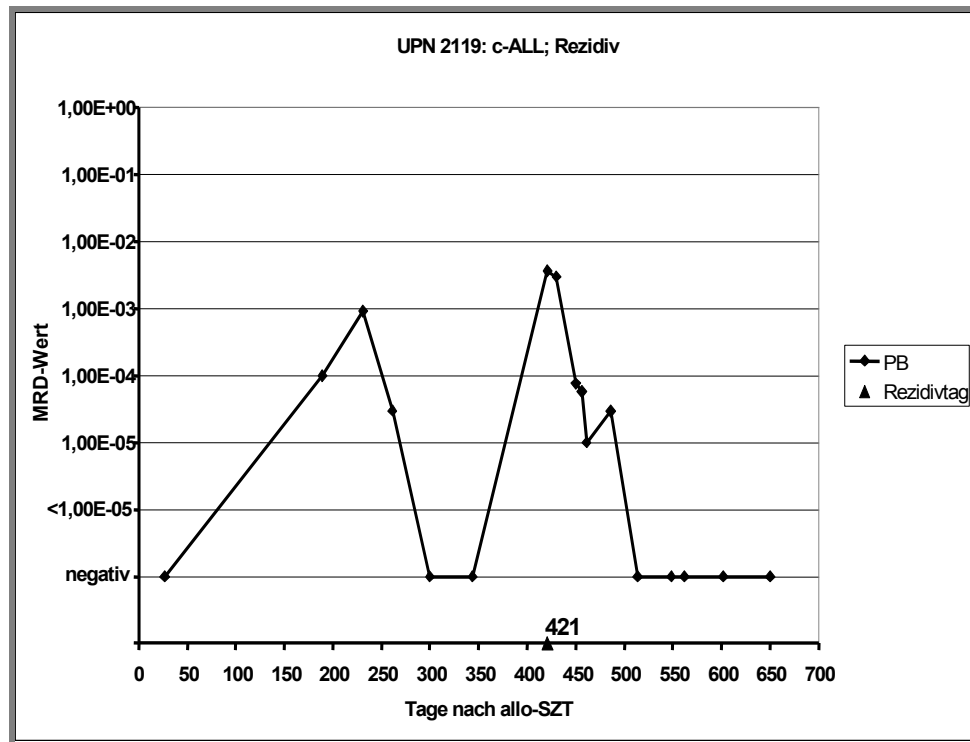


Abbildung 51: Patient UPN 2119

Bei den oben dargestellten Verläufen der beiden Patienten kommt es nach Messung einer MRD-Last im Peripherblut zu einem Abfall der MRD-Werte ohne erneuten Anstieg vor Auftreten des Rezidives. Sowohl bei Patient UPN 2105, als auch bei Patient UPN 2119 konnten im Verlauf MRD-Werte  $> 1 \times 10^{-4}$  detektiert werden, d.h. sie konnten der MRD high Gruppe zugeordnet werden.

Im Verlauf bei Patient UPN 2105 war es möglich, nachdem in den ersten beiden Proben keine MRD-Last nachgewiesen werden konnte, am Tag 21 einen Wert von  $2,67 \times 10^{-4}$  zu messen, der dann aber 7 Tage später abfiel auf einen Wert  $< 1 \times 10^{-5}$ . Im weiteren Verlauf blieb der Patient MRD negativ bis zur Diagnose des Rezidives am Tag 182 nach der Transplantation.

Bei Patient UPN 2119 kam es nach einmaligem negativen MRD-Befund am Tag 27 zu einem Anstieg der Werte zwischen Tag 189 ( $9,82 \times 10^{-5}$ ) und Tag 231 mit einem maximalen MRD-Wert von  $9,04 \times 10^{-4}$ . In den folgenden Peripherblutproben fiel der Wert wieder ab, so dass an den Tagen 300 und 344 keine MRD-Last mehr detektierbar war. In den folgenden 77 Tagen bis zum Auftreten des Rezidives am Tag 421 stand keine Probe zur Detektion der MRD



Last zur Verfügung. Bei diesem Patienten wurde am Tag 40 das CSA abgesetzt.

### 5.7.2.2 Individuelle Verläufe der MRD im Peripherblut bei Patienten mit positiven MRD-Befunden ohne Auftreten eines Rezidives

Bei insgesamt 12 Patienten des gesamten Kollektivs konnten positive MRD-Befunde detektiert werden, ohne dass es zum Auftreten eines Rezidives kam. Davon stammten 8 Patienten aus der Gruppe MRD low und 4 Patienten aus der Gruppe MRD high. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die wichtigsten Daten dieser Patienten. In den nachfolgenden Abbildungen werden dann die individuellen Verläufe dargestellt, wobei zusätzlich zu den MRD-Werten im Peripherblut der Chimärismusstatus der Patienten im Untersuchungszeitraum beobachtet wurde.

**Tabelle 10: Übersicht Patienten mit positiven MRD-Befunden ohne Auftreten eines Rezidives**

**Erläuterung:** CC = kompletter Chimärismus; CR = komplette Remission; DecreasMC (decreasing mixed chimerism) = abnehmender gemischter Chimärismus; IncreasMC (increasing mixed chimerism) = zunehmender gemischter Chimärismus; IT = Immuntherapie; LowlevMC (Low-level mixed chimerism) = konstanter gemischter Chimärismus auf niedrigem Niveau

UPN	MRD-Gruppe	Chimärismus	Immuntherapie		Verlauf	
			Status	MRD Wert bei IT	letzter MRD-Wert	klinischer Verlauf
1718	low	CC	nein	-	0,00E+00	CR
1737	low	IncreasMC	ja	1,00E-05	0,00E+00	CR
1753	low	CC	nein	-	<1,00E-5	CR
1889	low	CC	nein	-	0,00E+00	
2059	low	IncreasMC	ja	1,00E-05	0,00E+00	CR
2060	low	LowlevMC	nein	-	0,00E+00	CR
2276	low	DecreasMC	nein	-	0,00E+00	CR
2488	low	DecreasMC	nein	-	0,00E+00	CR
1615	high	CC	nein	-	0,00E+00	CR
1891	high	DecreasMC	nein	-	0,00E+00	TRM
1926	high	LowlevMC	nein	-	0,00E+00	TRM
2366	high	LowlevMC	nein	-	1,00E-04	CR

Patienten mit initial positiver MRD-Last im Periphererblut ohne Auftreten eines Rezidives:

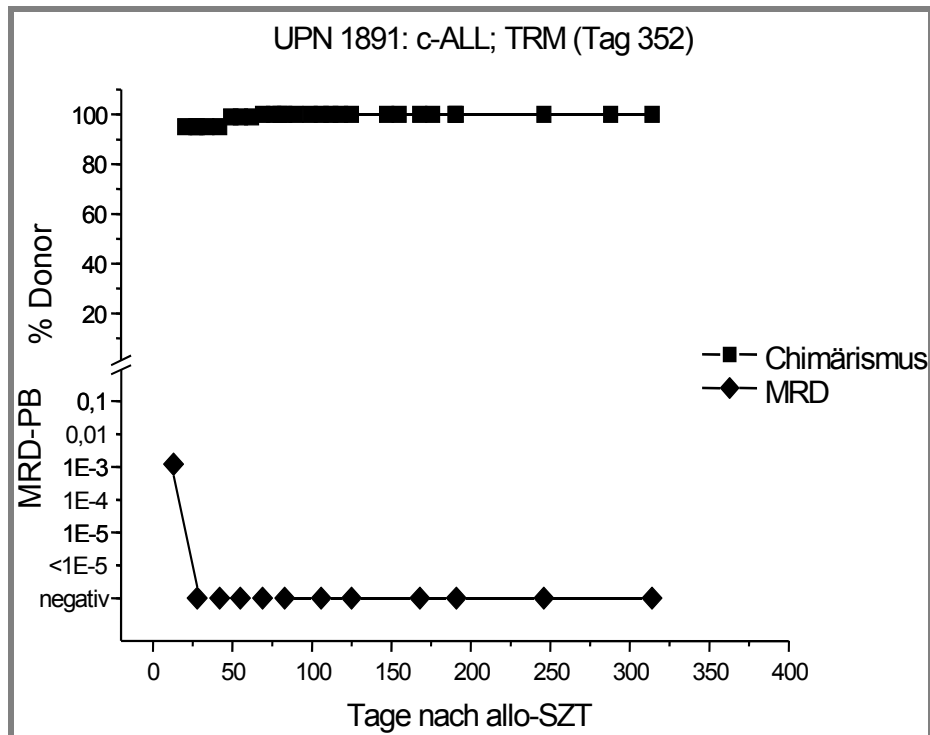


Abbildung 52: Patient UPN 1891

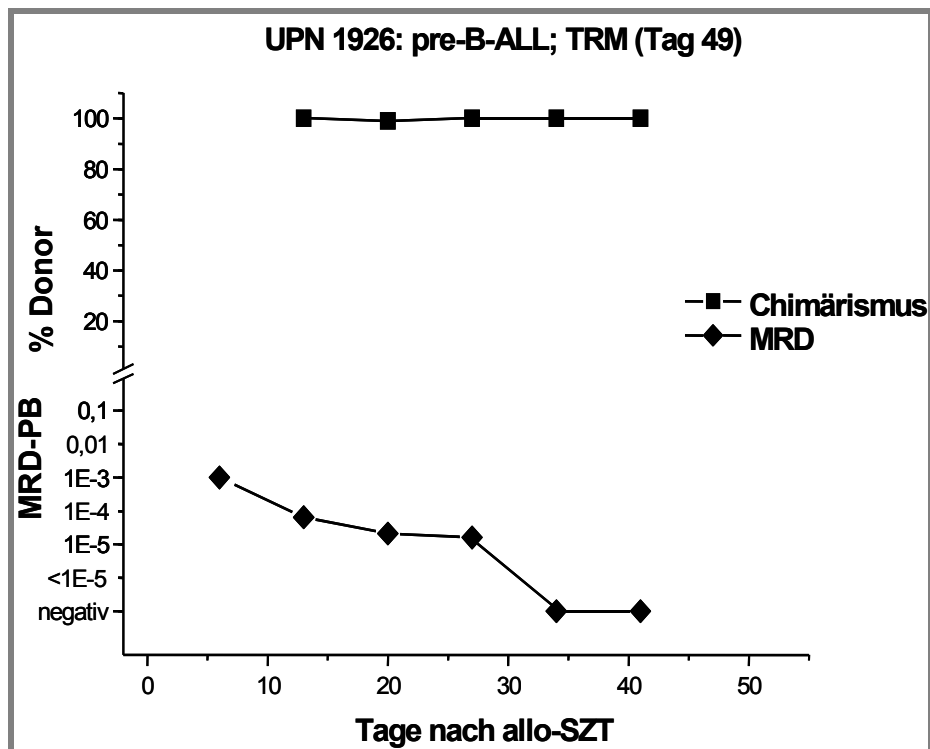


Abbildung 53: Patient UPN 1926

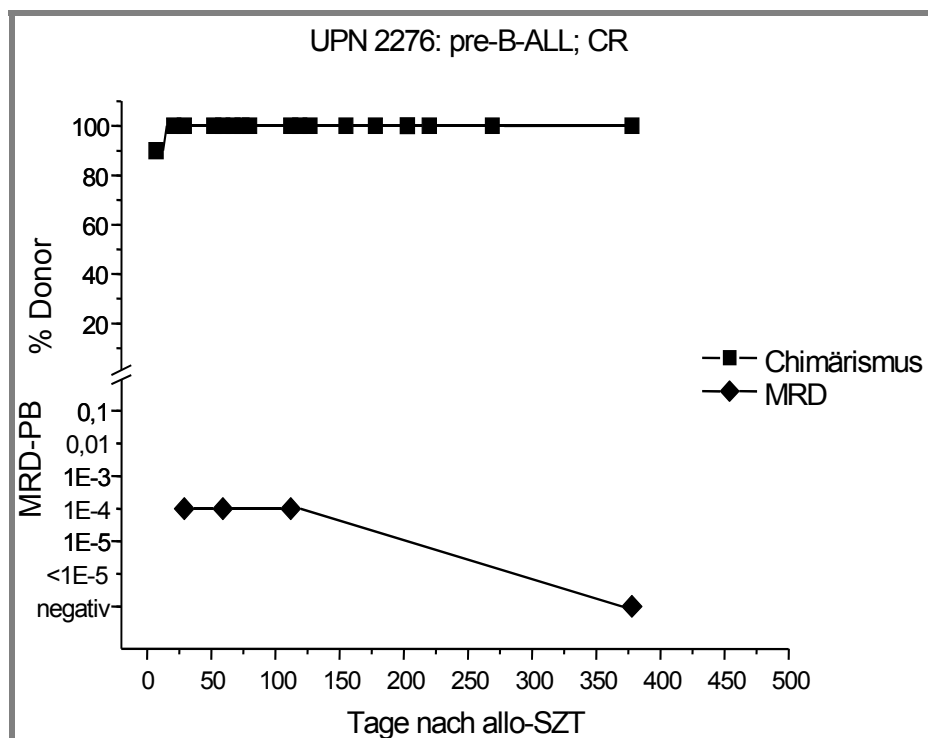


Abbildung 54: Patient UPN 2276

Bei Patient UPN 1891 kam es trotz der Detektion einer MRD-Last von  $1,16 \times 10^{-3}$  am Tag 13 nach der allo-SZT nicht zum Auftreten eines Rezidives. Dabei ist zu beachten, dass in der Vorprobe 5 Tage vor der Transplantation eine MRD-Last von  $3,52 \times 10^{-4}$  nachgewiesen werden konnte. Im weiteren Verlauf wurde der Patient immer MRD negativ gemessen und verstarb dann aber am Tag 352 an der TRM, nachdem an den Tagen 114 und 115 nach der allo-SZT eine Retransplantation wegen einer KM Aplasie nötig war. Betrachtet man den Verlauf des Chimärismus im Peripherblut so zeigt sich ab Tag 20 ein zunehmender gemischter Chimärismus von 1-5% bis zum Tag 42, dieser fällt dann aber bis zum Tag 62 wieder ab. In den folgenden Proben betrug der Spenderanteil dann wieder 100%.

Bei Patient UPN 1926 waren von Beginn der Messung nach der allo-SZT an am Tag 6 abnehmende MRD-Werte detektierbar, bis schließlich am Tag 34 keine MRD-Last mehr nachweisbar war. Am Tag 20 bestand ein gemischter

Chimärismus in Höhe von 1%, sonst betrug der Spenderanteil immer 100%. Am Tag 49 nach der Transplantation verstarb der Patient an der TRM.

Im Verlauf der Messung der MRD bei Patient UPN 2276 konnte in den ersten 3 untersuchten Proben eine MRD-Last von jeweils  $1 \times 10^{-4}$  nachgewiesen werden (MRD low), bevor im weiteren Verlauf keine MRD-Last mehr detektiert werden konnte. Auch der Chimärismusstatus zeigte an Tag 7 einen abnehmenden Spenderanteil von 90%, bevor es in den nachfolgenden Proben wieder zur Entwicklung eines kompletten Chimärismus mit einem Spenderanteil von 100% kommt.

Patienten mit zunehmenden MRD-Werten ohne Auftreten eines Rezidives:

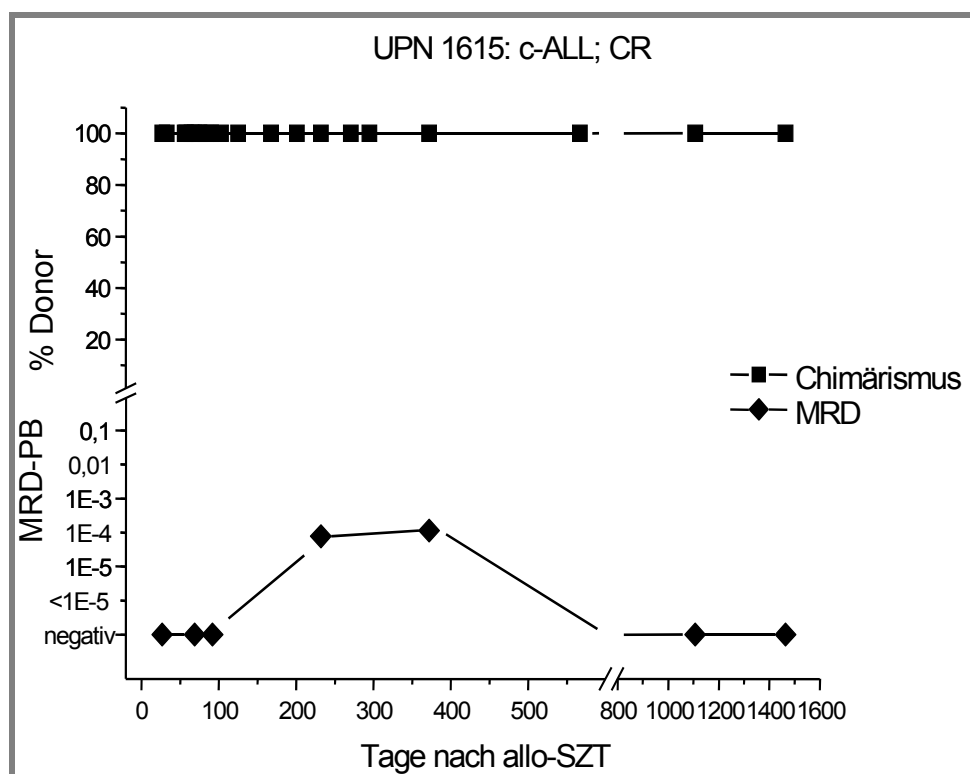


Abbildung 55: Patient UPN 1615

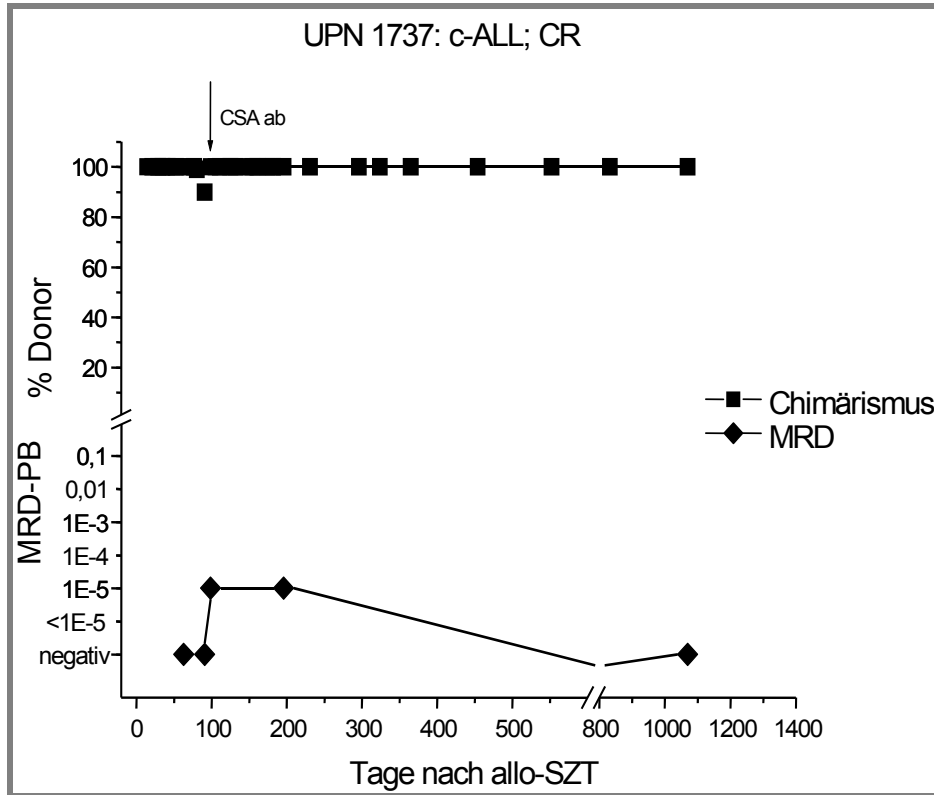


Abbildung 56: Patient UPN 1737

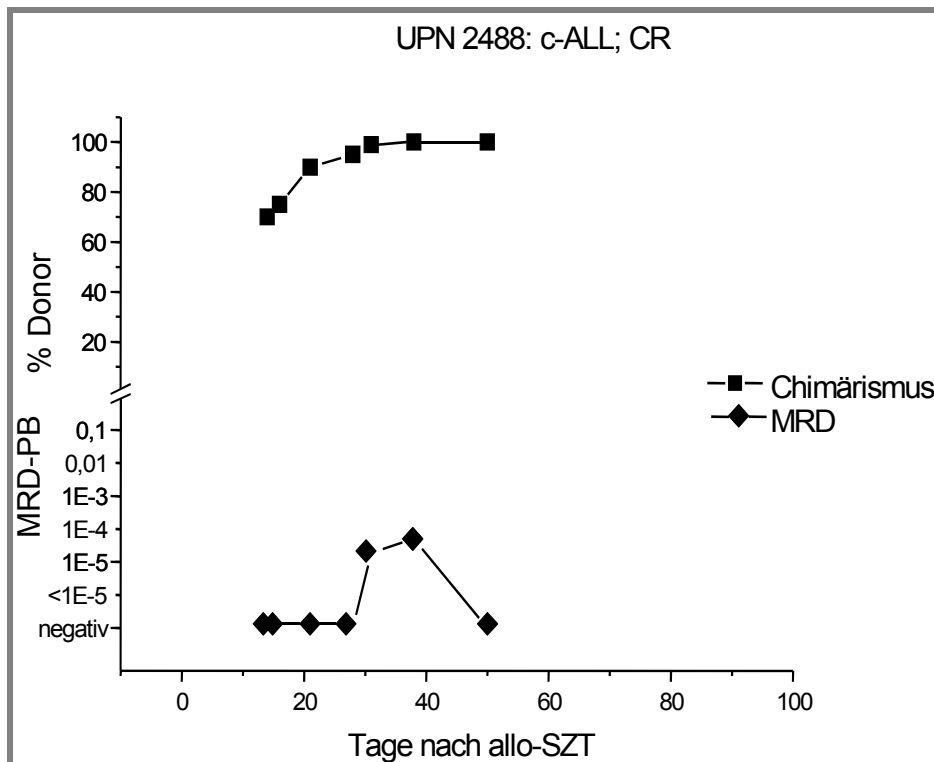


Abbildung 57: Patient UPN 2488

Bei den drei oben dargestellten MRD-Verläufen im Peripherblut der Patienten UPN 1615, UPN 1737 und UPN 2488 kam es im Verlauf zu einem einmaligen Anstieg der MRD-Werte mit nachfolgendem Abfall der MRD-Last bis keine MRD-Last mehr detektierbar war. Alle Patienten blieben in kompletter Remission. Betrachtet man die Höhe der gemessenen Werte, so zeigt Patient UPN 1615 eine maximale MRD-Last von  $1,14 \times 10^{-4}$  am Tag 372, nachdem am Tag 232 ein Wert von  $7,74 \times 10^{-5}$  detektiert wurde. Der Patient fällt somit in die Gruppe der MRD high Patienten (MRD-Last im Peripherblut  $> 1 \times 10^{-4}$ ). Der Chimärismusstatus des Patienten zeigte innerhalb des gesamten Untersuchungszeitraumes einen Spenderanteil von 100%.

Im Gegensatz dazu weisen die Patienten UPN 1737 und UPN 2488 nur Werte  $< 1 \times 10^{-4}$  auf und wurden der MRD low Gruppe zugeordnet.

Bei Patient UPN 1737 wurde an Tag 99 und in der nachfolgend gemessenen Probe an Tag 196 jeweils eine MRD-Last von  $1 \times 10^{-5}$  detektiert. An Tag 84 wurde ein zunehmender Chimärismus von 0-1% festgestellt, der an Tag 99 auf 5-10% angestiegen war. Deshalb wurde an Tag 93 das CSA abgesetzt. Im weiteren Verlauf wurde der Patient immer MRD negativ gemessen und zeigte durchgehend einen Spenderanteil von 100%.

Bei Patient UPN 2488 wurde in 2 Proben an Tag 31 und Tag 38 eine MRD-Last von  $1,90 \times 10^{-5}$  bzw.  $4,98 \times 10^{-5}$  nachgewiesen. In der letzten zur Verfügung stehenden Probe an Tag 50 konnte keine MRD-Last mehr detektiert werden. Betrachtet man den Verlauf des Chimärismus, so hatte der Patient an Tag 14 einen gemischten Chimärismus von 20-30%. Im weiteren Verlauf bis zum Tag 38 entwickelte der Patient dann einen kompletten Chimärismus mit einem Spenderanteil von 100%.

Patienten mit diskontinuierlichem Verlauf der MRD-Werte im Peripherblut ohne Auftreten eines Rezidives:

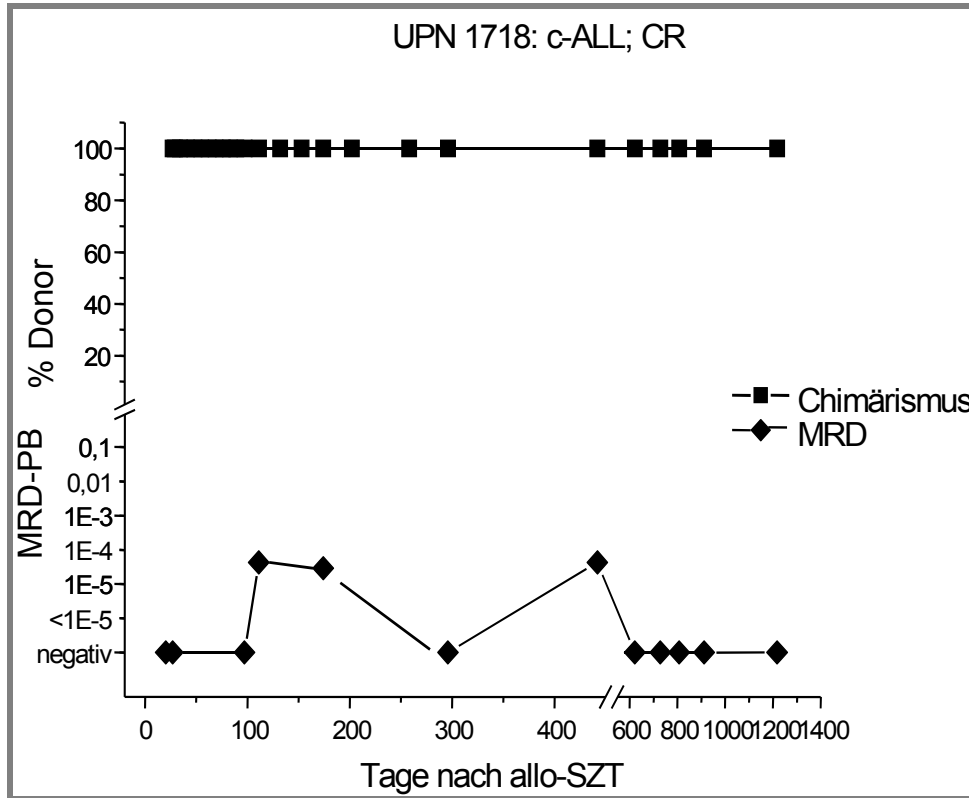


Abbildung 58: Patient UPN 1718

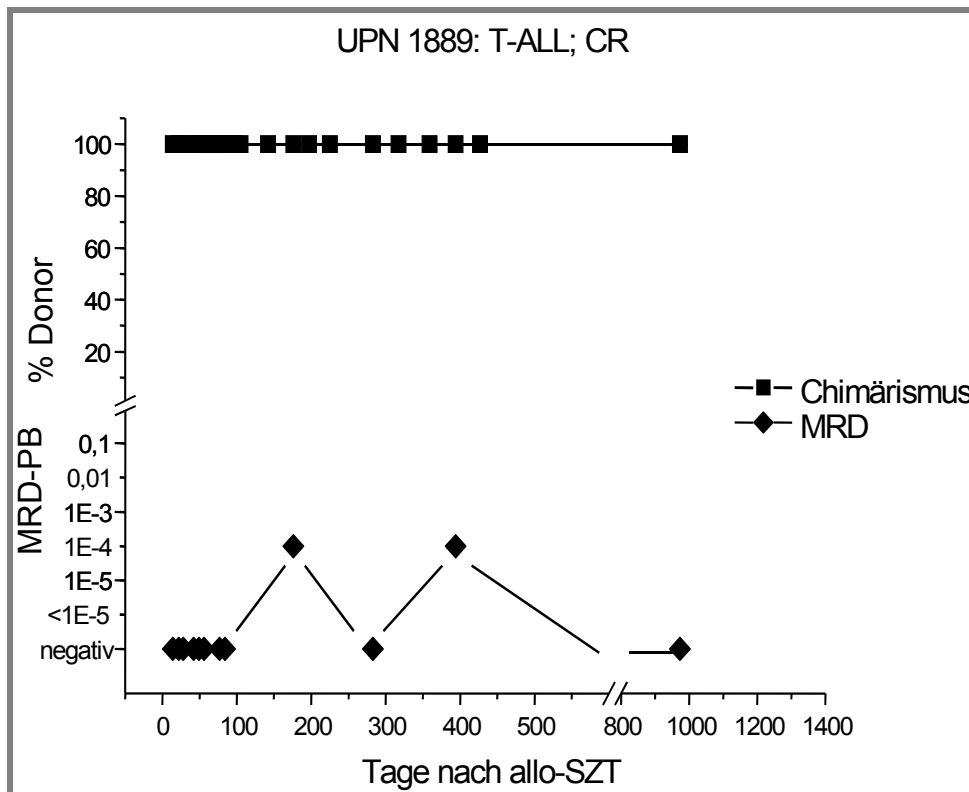


Abbildung 59: Patient UPN 1889

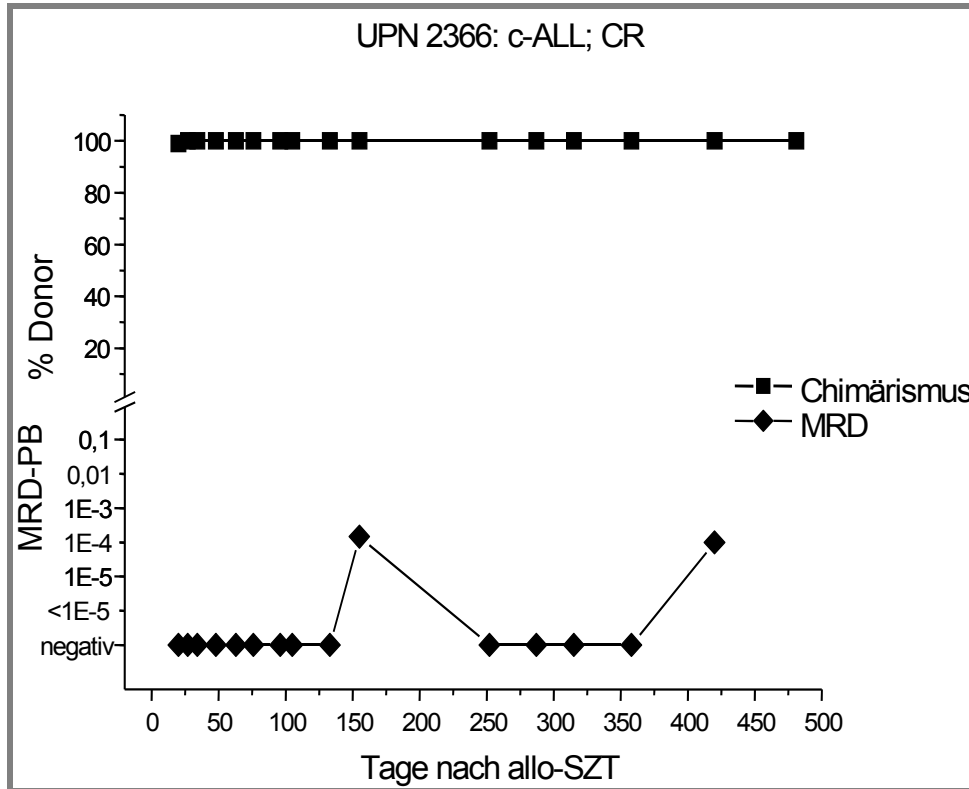


Abbildung 60: Patient UPN 2366

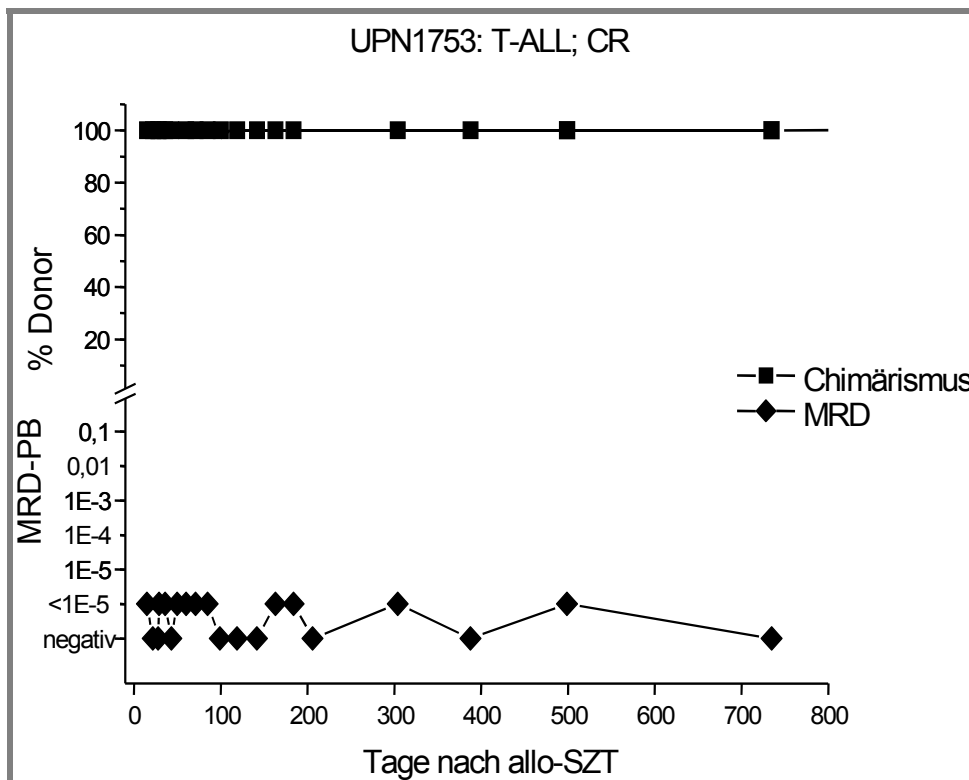


Abbildung 61: Patient UPN 1753



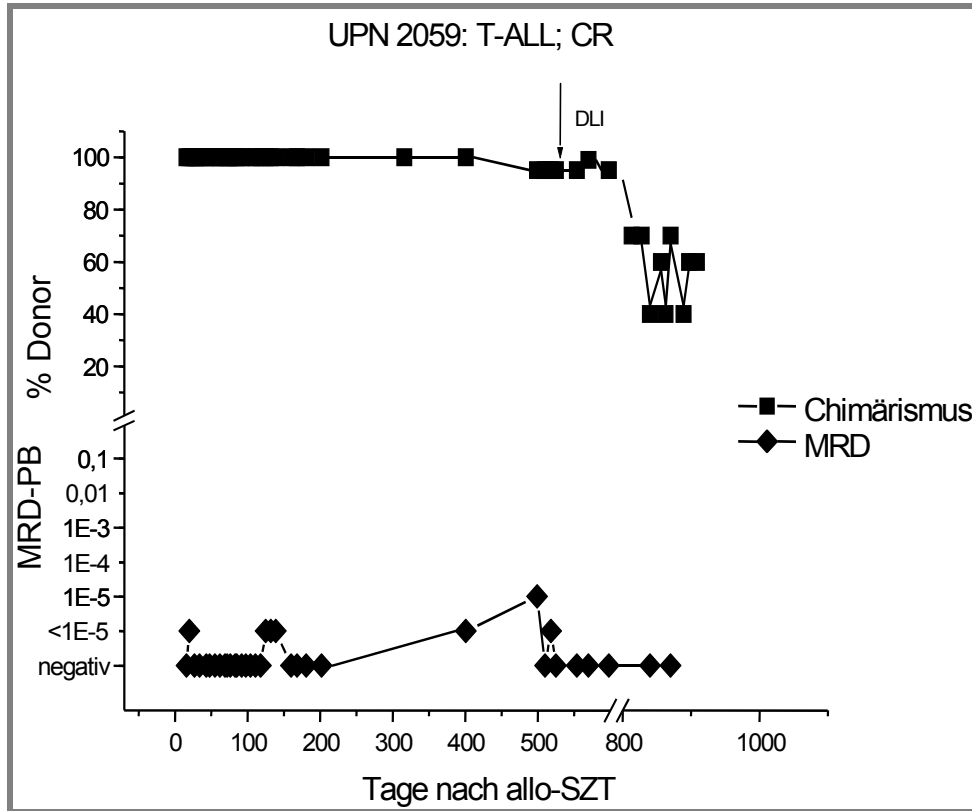


Abbildung 62: Patient UPN 2059

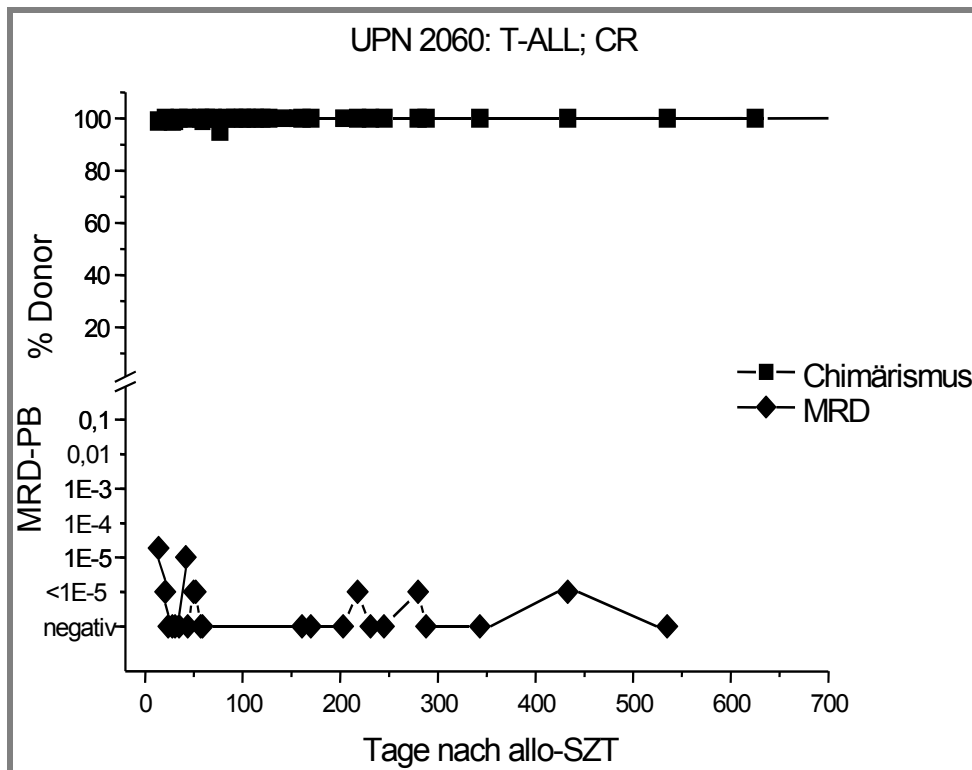


Abbildung 63: Patient UPN 2060

Bei den oben dargestellten 6 Beispielen für die Dynamik der MRD-Verläufe im Peripherblut konnten bei allen Patienten mehrmals positive MRD-Werte im Untersuchungszeitraum nachgewiesen werden. Jedoch befinden sich die gemessenen Werte bei 5 Patienten in einem Bereich  $\leq 1 \times 10^{-4}$ . Dies bedeutet, dass diese 5 Patienten zur Gruppe MRD low gehören. Bei Patient UPN 2366 war ein gemessener Wert in einem Bereich  $\geq 1 \times 10^{-4}$ , weswegen er zur Gruppe MRD high gehört. Bis zum Zeitpunkt der Untersuchung blieben alle Patienten in kompletter Remission.

Im Verlauf der Untersuchung der MRD kam es bei Patient UPN 1718 zweimal zum Anstieg der MRD-Werte in den ersten 600 Tagen nach stattgefundenener allo-SZT, wobei ein maximaler Wert von  $4,22 \times 10^{-5}$  an Tag 442 nachweisbar war. Im weiteren Verlauf blieb der Patient MRD negativ. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes konnte ein kompletter Chimärismus nachgewiesen werden.

Bei Patient UPN 1889 konnten zweimal innerhalb der ersten 400 Tage nach Transplantation Werte im Bereich von  $1 \times 10^{-4}$  detektiert werden. Auch hier bestand während des Untersuchungszeitraumes durchgehend ein kompletter Chimärismus in den Peripherblutproben.

Im Verlauf der Untersuchung konnten bei Patient UPN 2366 an 2 Tagen positive MRD-Werte detektiert werden. An Tag 155 wurde eine MRD-Last von  $1,45 \times 10^{-4}$  und an Tag 420 von  $1 \times 10^{-4}$  gemessen. Der Chimärismustatus des Patienten zeigt nur an Tag 20 einen gemischten Chimärismus von 0-1%, ansonsten konnte immer ein kompletter Chimärismus nachgewiesen werden.

Patient UPN 1753 zeigt in seiner MRD-Dynamik im Peripherblut mehrmals Werte in einem Bereich von  $< 1 \times 10^{-5}$ , d.h. Werte die MRD positiv, aber nicht quantifizierbar, sind in einem Beobachtungszeitraum von 735 Tagen und auch er verblieb in kompletter Remission. Die Chimärismusuntersuchung im Peripherblut ergab über den ganzen Untersuchungszeitraum hinweg einen Spenderanteil von 100%.

Auch bei Patient UPN 2059 können im gesamten Untersuchungszeitraum wiederholt MRD-Werte von  $< 1 \times 10^{-5}$  beobachtet werden, wobei einmal am Tag

499 nach Transplantation ein Wert von  $1 \times 10^{-5}$  detektierbar war. Bis dahin zeigt der Patient einen Spenderanteil von 100%. An Tag 499 ist dann ein gemischter Chimärismus von 1-5% nachweisbar. Daraufhin bekam der Patient eine Immuntherapie in Form einer DLI. Danach sank auch die MRD-Last wieder ab und der Spenderanteil stieg wieder auf 99% an. Im weiteren Verlauf wurde der Patient MRD negativ gemessen. Der Chimärismusverlauf im Gegensatz zeigt allerdings einen gemischten Chimärismus mit einem maximalen Wert von 40-60%.

Bei Patient UPN 2060 war initial eine MRD-Last von  $1,86 \times 10^{-5}$  am Tag 14 nach allo-SZT detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt bestand auch ein gemischter Chimärismus von 0-1%. An den Tagen 24 bis 35 war keine MRD-Last mehr nachweisbar. Der Patient entwickelte nachfolgend dann bis zum Tag 35 einen kompletten Chimärismus. Hinzuzufügen ist, dass der Patient in der Probe 17 Tage vor Transplantation einen MRD-Wert von  $3,00 \times 10^{-4}$  aufwies. Am Tag 42 konnte noch mal eine MRD-Last von  $1 \times 10^{-5}$  detektiert werden. Ein gemischter Chimärismus ließ sich wieder an Tag 59 (0-1%) und an Tag 77 (1-5%) nachweisen. Im gesamten weiteren Untersuchungszeitraum konnten mehrmals zwischen negativen MRD-Befunden MRD-Werte  $< 1 \times 10^{-5}$  nachgewiesen werden, während sich bei Betrachtung des Chimärismusstatus immer ein Spenderanteil von 100% nachweisen ließ.

## ***5.8 Vergleich der gemessenen MRD-Befunde im Peripherblut mit den MRD-Befunden im Knochenmark***

### **5.8.1 Vergleich der Höhe und des Vorkommens der MRD-Last zwischen Peripherblut und Knochenmark**

Insgesamt konnten 289 korrespondierende Peripherblut- und Knochenmarkprobenpaare hinsichtlich des Vorkommens und der Höhe der MRD-Last untersucht werden. In der Überzahl der korrespondierenden Paare wurden die Proben am gleichen Tag entnommen. War dies nicht der Fall wurde eine

Differenz der Probenentnahmetage von höchstens 7 Tagen in Kauf genommen. Der Median der Tage Differenz war 0 Tage.

Bei 138 Knochenmarkproben (47,8%) und bei 71 Peripherblutproben (24,6%) der untersuchten 289 Probenpaare konnte eine MRD-Last nachgewiesen werden. Die gemessenen MRD-Werte lagen bei den Knochenmarkproben in einem Bereich zwischen  $< 1 \times 10^{-5}$  und  $6,50 \times 10^0$ . Der Median der Werte, die innerhalb des quantifizierbaren Bereiches gemessen wurde, lag bei  $1,10 \times 10^{-3}$ . Die MRD-Werte der Peripherblutproben lagen in einem Bereich zwischen  $< 1 \times 10^{-5}$  und  $1,02 \times 10^0$ . Der Median der quantifizierbaren Werte betrug  $3,15 \times 10^{-4}$ . Von den 289 Probenpaaren waren 65 Paare sowohl im Peripherblut als auch im Knochenmark positiv. Bei 73 Probenpaaren konnte im Knochenmark eine MRD-Last detektiert werden, das Peripherblut wurde dagegen MRD negativ gemessen. Der umgekehrte Fall trat nur bei 6 Probenpaaren auf. In den verbleibenden 145 Probenpaaren war im Peripherblut sowie im Knochenmark keine MRD-Last detektierbar. Abbildung 64 zeigt die Verteilung der MRD im Peripherblut und Knochenmark bei allen untersuchten Patienten.

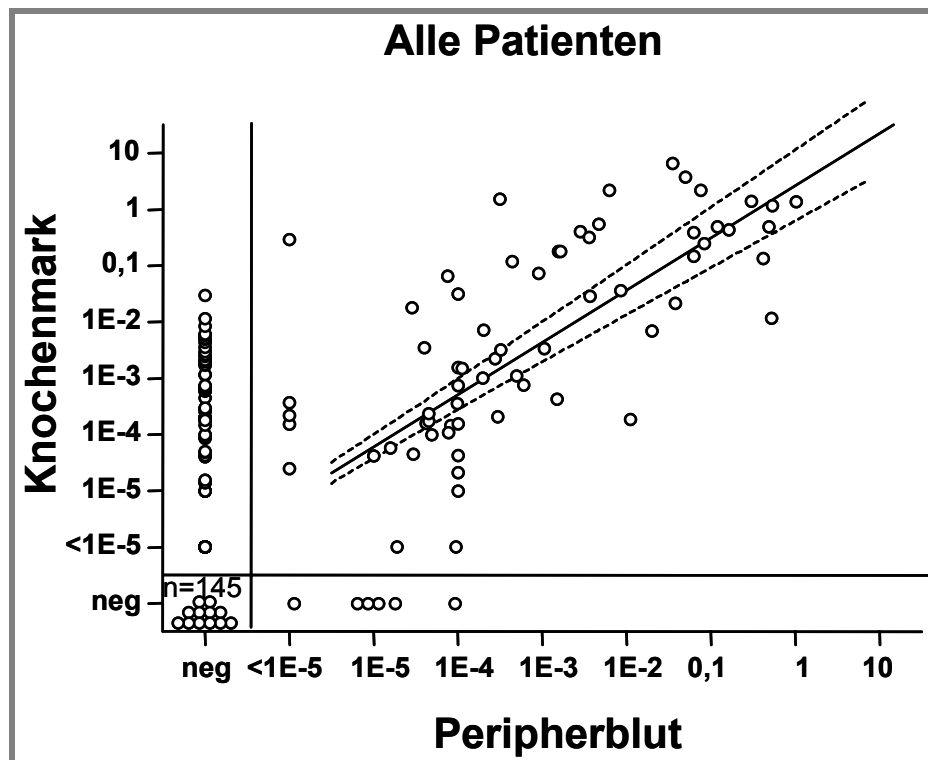


Abbildung 64: Darstellung der Verteilung der MRD-Werte aller Patienten im Knochenmark und im Peripherblut

---

In einigen Studien wurde beschrieben, dass sich die Verteilung der MRD-Werte zwischen den Patienten mit einer T-ALL und den Patienten mit einer Vorläufer B-ALL unterscheiden. Nachfolgend soll nun die Verteilung der MRD zwischen Peripherblut und Knochenmark bei Patienten mit T-ALL und einer Vorläufer-B-ALL getrennt betrachtet werden.

Vergleich der Höhe und des Vorkommens der MRD-Last zwischen Peripherblut und Knochenmark bei Patienten mit einer T-ALL.

Bei den Patienten mit der Diagnose T-ALL konnten 65 korrespondierende Probenpaare untersucht werden. Insgesamt war in 15 Peripherblutproben (23,1%) und in 18 Knochenmarkproben (24,6%) eine MRD-Last detektierbar.

In 13 Probenpaaren war sowohl im Peripherblut als auch im Knochenmark eine MRD-Last nachweisbar. Von den restlichen 52 Probenpaaren war in 45 keine MRD-Last sowohl im Peripherblut als auch im Knochenmark nachweisbar. In zwei Probenpaaren war das Peripherblut MRD positiv und das Knochenmark MRD negativ. In fünf Probenpaaren war es umgekehrt. Bei diesen 5 Probenpaaren handelte es sich um Proben eines einzigen Patienten (UPN 1889). Trotz gemessener hoher positiver MRD-Befunde im Knochenmark blieb der Patient in kompletter Remission.

Abbildung 65 zeigt die Verteilung der MRD im Peripherblut und Knochenmark bei Patienten mit einer T-ALL.

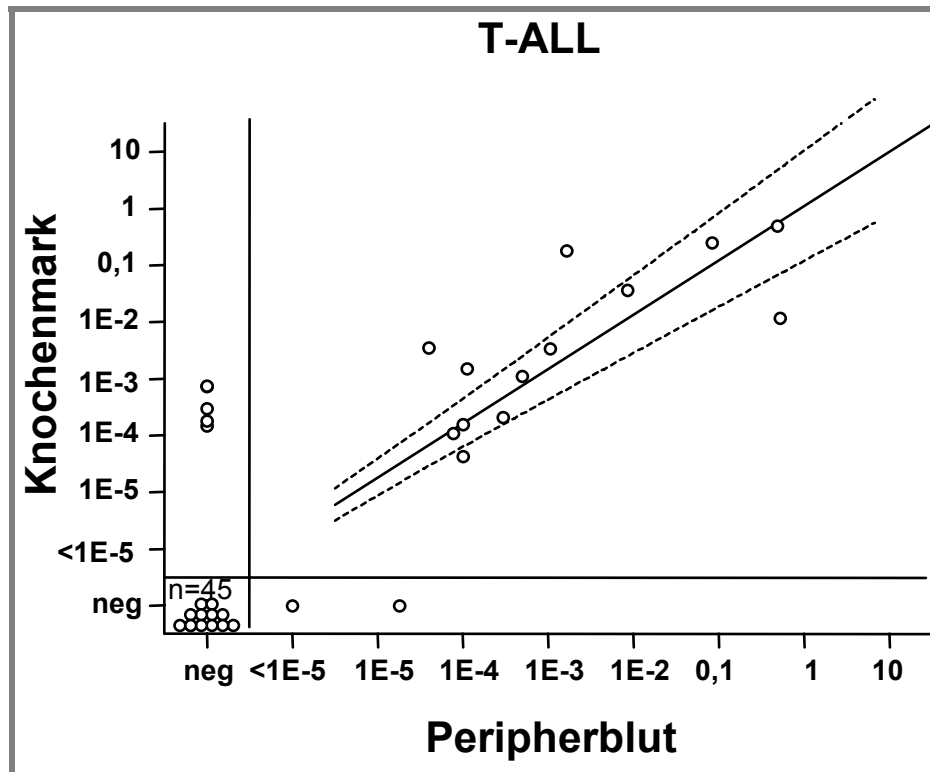


Abbildung 65: Darstellung der Verteilung der MRD im Knochenmark und im Peripherblut bei Patienten mit einer T-ALL

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass sich die gemessene MRD-Last bezüglich der Höhe der Werte zwischen Peripherblut und Knochenmark nicht groß unterscheidet.

Nach der Korrelationsanalyse ergab sich für den Korrelationskoeffizienten  $r$  nach Pearson ein Wert von 0,85 (95% Konfidenzintervall: 0,76 bis 0,90) und für das Bestimmtheitsmaß ein Wert von 0,71 ( $p < 0,0001$ ). Zusätzlich wurde noch eine Regressionsanalyse durchgeführt. Die Steigung der Regressionsgeraden betrug 0,96 (95% Konfidenzintervall 0,81 bis 1,11). Der Wert für  $P$  war  $< 0,0001$ .

Nur in drei Proben waren die gemessenen Werte im Knochenmark mehr als eine Logarithmusstufe höher. Bei einem Probenpaar war der MRD-Wert im Peripherblut sogar mehr als eine Logarithmusstufe höher als der entsprechende Wert im Knochenmark.

Vergleich der Höhe und des Vorkommens der MRD-Last zwischen Peripherblut und Knochenmark bei Patienten mit einer Vorläufer B-ALL

Bei den Patienten mit einer Vorläufer B-ALL zeigte sich eine im Gegensatz zu den Patienten mit einer T-ALL deutlich andere Verteilung der MRD-Werte. Das Vorkommen der MRD überwiegt eindeutig im Knochenmark. Von den 224 Probenpaaren waren 120 der Knochenmarkproben MRD positiv (53,6%), hingegen konnte nur in 56 Peripherblutproben (25,0%) eine MRD-Last detektiert werden.

In 52 korrespondierenden Probenpaaren, war sowohl das Peripherblut als auch das Knochenmark MRD positiv. In 7 Probenpaaren war entweder der MRD-Wert im Peripherblut ( $n = 5$ ) oder im Knochenmark ( $n = 2$ ) positiv, aber außerhalb des quantifizierbaren Bereiches. Abbildung 66 zeigt die Verteilung der MRD im Peripherblut und im Knochenmark bei Patienten mit einer Vorläufer-B-ALL.

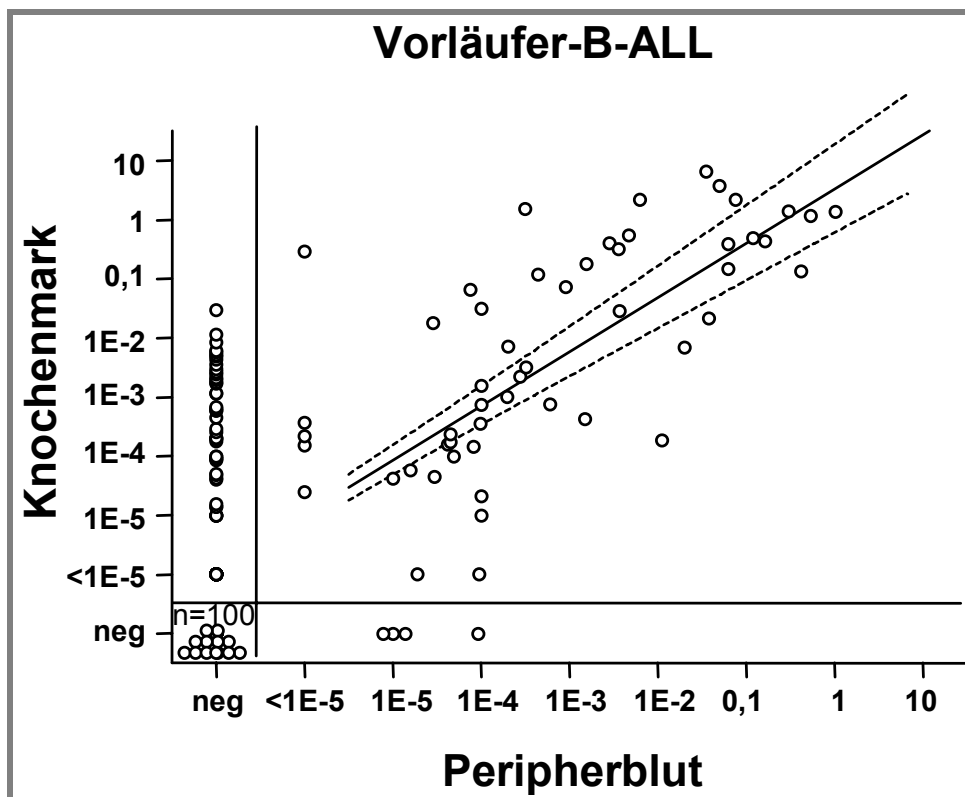


Abbildung 66: Darstellung der Verteilung der MRD im Knochenmark und im Peripherblut bei Patienten mit einer Vorläufer B-ALL

Aus der Abbildung wird deutlich, dass bei der überwiegenden Zahl der Proben der MRD-Wert im Peripherblut eindeutig niedriger ist als der entsprechende Wert im Knochenmark.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson betrug hier 0,72 (95% Konfidenzintervall: 0,64 bis 0,77). Das Bestimmtheitsmaß nahm einen Wert von 0,51 an. Die Regressionsanalyse ergab eine Steigung von 0,92 für die Regressionsgerade (95% Konfidenzintervall: 0,80 bis 1,04). Der p-Wert war  $< 0,0001$ .

Bei 38 Probenpaaren (84,4%) lag der MRD-Wert im Knochenmark über dem Wert im Peripherblut. In 15 dieser 38 Probenpaare war der Wert im Knochenmark mindestens 1 Logarithmusstufe höher, wobei in einem Probenpaar eine maximale Wertedifferenz von mehr als 3 Logarithmusstufen gemessen werden konnte. Lediglich in 7 Probenpaaren (15,6%) lag der MRD-Wert im Peripherblut über dem MRD-Wert im Knochenmark, wobei in 2 Probenpaaren der Wert 1 bis 2 Logarithmusstufen höher war.

In den restlichen 172 der 224 Probenpaare war in 100 Probenpaare sowohl im Peripherblut als auch im Knochenmark keine MRD-Last detektierbar. Bei 68 Paaren war ein positiver MRD-Wert im Knochenmark nachweisbar, aber das Peripherblut wurde MRD negativ gemessen. Der umgekehrte Fall trat nur bei 4 Probenpaaren auf.

### **5.8.2 Vergleich des Zeitpunktes des Nachweises der MRD im Peripherblut und im Knochenmark bei Patienten mit Rezidiv**

Die Peripherblutproben und Knochenmarkproben zur Untersuchung der MRD wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der allo-SZT entnommen. Da die zur Probengewinnung des Knochenmarkes notwendige Punktion nicht in beliebigen Abständen durchgeführt werden kann, standen meist an den Tagen 30, 60, 100 und nachfolgend in größeren Intervallen MRD-Befunde zur Verfügung. Hierin liegt der Vorteil der Messung der MRD im Peripherblut, bei welcher in kurzen Abständen die Proben gewonnen werden können. Es soll nun betrachtet werden inwiefern sich dies als Vorteil für die sensitive und frühzeitige Entwicklung eines Rezidives erweist.



Bei den 25 Patienten, welche im weiteren Verlauf nach der allo-SZT ein Rezidiv entwickelten, waren bei einem Patienten keine Knochenmarkbefunde erhoben worden. Bei einem Patienten (UPN 2043) war es weder im Peripherblut noch im Knochenmark möglich gewesen, vor Ausbruch des Rezidives eine positive MRD-Last in den untersuchten Proben nachzuweisen. In drei Fällen wurde zum gleichen Zeitpunkt in der Peripherblutprobe und der korrespondierenden Knochenmarkprobe erstmals ein positiver MRD-Befund detektiert. Ein Vorteil durch die Messung der MRD im Peripherblut ergab sich bei 9 Patienten. Bei diesen Patienten war die Peripherblutprobe vor der Knochenmarkprobe MRD positiv. Die Zeiträume, die zwischen der ersten positiven Peripherblutprobe und der Knochenmarkprobe liegen, reichten von einem Minimum von 3 Tagen bis zu einem Maximum von 57 Tagen, mit einem Median von 14 Tagen. Vor allem bei 3 Patienten, welche ein frühes Rezidiv erlitten haben, war es möglich schon in den frühen Peripherblutproben einen positiven MRD-Befund zu messen, bevor dann in der ersten Probe um den Tag 30 im Knochenmark eine positive MRD-Last nachweisbar war. Bei 6 Patienten war die Knochenmarkprobe vor der Peripherblutprobe MRD positiv. Bei 2 dieser Patienten waren die ersten Peripherblutproben MRD positiv worauf nachfolgende Proben MRD negativ gemessen wurden, bevor es dann zu einem Anstieg der MRD-Last bis zum Auftreten des Rezidives kam.

Bei den restlichen 5 Patienten sind der Verlauf und damit der Vergleich zwischen den Peripherblutproben und den Knochenmarkproben nicht einfach beurteilbar. Bei einem Patienten zeigten sich im Knochenmark immer positive, nicht quantifizierbare Werte, wohingegen sich im Peripherblut nach Messung von negativen MRD-Befunden, dann ein Anstieg der MRD-Last vor Ausbruch des Rezidives nachweisen ließ. In einem weiteren Fall war lediglich einmal ein positiver, nicht quantifizierbarer Knochenmarkbefund erhoben worden, bevor sich dann etwas später in den Peripherblutproben ein Anstieg der MRD-Werte detektieren ließ. Des Weiteren zeigte sich bei einem Patienten eine abnehmende MRD-Last im Peripherblut und im Knochenmark positive, nicht quantifizierbare Werte vor Diagnose des Rezidives. Der fast umgekehrte Fall zeigte sich bei einem Patienten, bei welchem die MRD-Werte im Knochenmark

rückläufig waren und sogar negativ wurden und die Peripherblutproben später einen Anstieg der MRD-Last zeigten. Bei einem Patienten mit frühem Rezidiv am Tag 60 ließen sich in den Proben an Tag 14 und 30 im Peripherblut positive MRD-Werte detektieren, die Knochenmarkprobe am Tag 31 war dagegen MRD negativ, wie auch die nachfolgende Peripherblutprobe an Tag 35. In der nächsten zur Verfügung stehenden Probe am Tag 55, welche aus dem Peripherblut stammte, war dann eine hohe MRD-Last messbar gewesen.

## 6. Diskussion

### 6.1 Methode

Durch die Entwicklung neuer sensitiver Methoden in den letzten Jahren, wurde es möglich, die unter der lichtmikroskopischen Nachweisgrenze liegende Tumorlast, die sich noch im Körper des Patienten befindet, die sogenannte minimale Resterkrankung (MRD), zu quantifizieren. Zu den drei klinisch bedeutendsten Methoden gehört, neben der flowzytometrischen Immunophänotypisierung und der PCR-Analyse chromosomaler Anomalien, die PCR-Analyse klonspezifischer DNA-Rearrangements der Immunglobulin (Ig)- und T-Zellrezeptor (TCR) Gene. Diese Methode beruht auf der Entdeckung, dass es im Laufe der Differenzierung der B- und T-Vorläuferzellen zu einem Rearrangement der Ig und TCR Gene kommt, wobei durch Deletionen und Insertionen von Nukleotiden sogenannte junctional regions entstehen, die in jedem Lymphozyten einzigartig sind und sogenannte fingerprint-like Sequenzen darstellen. Der Rearrangementprozess läuft auch in Leukämieblasten ab, die aus einem einzigen Zellklon entstehen. Somit besitzen alle Leukämieblasten eines Patienten dasselbe einzigartige Gen-Rearrangement, so dass man von einem „Leukämiefingerprint“ sprechen kann. Ist die genaue Basenabfolge dieser Sequenzen bekannt, so können diese als Target für das Monitoring der MRD dienen. Zur Identifizierung der Rearrangements in den Diagnoseproben der Patienten wurden Primersysteme gemäß den Protokollen der BIOMED-1 und 2 Concerted Action<sup>97,144</sup> verwendet. Mit Hilfe dieser limitierten Primerkombinationen (die verwendete Kollektion bestand aus 25 Primerkombinationen: 6 IgH, fünf Ig K, sieben  $\gamma$ TCR, sechs  $\delta$ TCR und ein TAL-1 Primerpaar) ist es möglich, für fast alle Patienten ein oder mehrere Rearrangements in der Screening-PCR zu identifizieren.

Ein Nachteil der PCR-Analyse von Ig und TCR Genen ist das Risiko von falsch positiven Ergebnissen aufgrund der Tatsache, dass nicht nur klonale Rearrangements der Ig und TCR Gene in der Screening-PCR amplifiziert

werden, sondern auch ähnliche Rearrangements normaler polyklonaler Zellen.<sup>136,138</sup> Um dieses Background-Problem zu lösen, wurde nach der Screening-PCR eine Heteroduplexanalyse durchgeführt.<sup>72</sup> Mit der Heteroduplexanalyse ist es möglich, PCR-Produkten monoklonaler und polyklonaler Lymphozyten zu unterscheiden. Des Weiteren können die Ig und TCR Rearrangements zur Bildung von Subklonen neigen. Besteht dieses Problem der Oligoklonalität schon bei Diagnosestellung, ist es schwierig zu entscheiden, welcher Klon für ein eventuelles Rezidiv verantwortlich sein wird und somit überwacht werden soll.<sup>16,17,37,87,138</sup> Auch sekundäre Rearrangements und sogenannte continuing Rearrangements, welche zwischen Diagnosestellung und Rezidiv auftreten können, führen zu einem Verlust des MRD-Targets und somit zu falsch negativen Ergebnissen.<sup>115,122,138</sup> Das Vorkommen der Oligoklonalität und der klonalen Evolution nach Diagnose betrifft nicht alle Rearrangements in gleichem Maße. So gelten z.B. TCRG Rearrangements und Rearrangements des Ig kappa Locus als end-stage Rearrangements, die im Krankheitsverlauf stabil bleiben.<sup>18,120</sup> Bei der Auswahl der MRD-Targets wurden diese Faktoren berücksichtigt. Zudem besteht die Übereinkunft in den meisten MRD-Studien mindestens zwei MRD-Targets pro Patient zu überwachen, um die Anzahl der falsch negativen Ergebnisse weiter zu reduzieren.

Nach der Sequenzierung und der Generierung von patientenspezifischen Oligonukleotiden (ASO's), erfolgte die Überwachung der MRD im Peripherblut der Patienten nach allo-SZT mit Hilfe der Real-time PCR, einer relativ neuen PCR-Methode, die eine exakte quantitative Messung der PCR-Produkte während des Amplifizierungsprozesses ermöglicht. Somit fällt das zeitaufwendige Nachbearbeiten der PCR-Produkte, wie es bei der üblichen semiquantitativen PCR-Analyse nötig war, weg und die Daten stehen sofort zur Verfügung. Zudem verringert sich auch die Gefahr der Kontamination der PCR-Produkte, da es sich bei der Real-time PCR um ein geschlossenes System handelt. Es gibt viele PCR-Instrumente und verschiedene Prinzipien und Ansätze können angewandt werden.

In unserem Labor wurde die Real-time PCR mit der TaqMan-Technologie etabliert, welche international anerkannt ist und somit einen Vergleich der

Ergebnisse und eine Qualitätskontrolle mit anderen Laboratorien ermöglicht. Für jeden Patienten wurden allelspezifische Oligonukleotide (ASO's) generiert, die sich in der junctional region befinden und diese kombiniert mit einer TaqMan Sonde und einem Reverse Primer, welche an Germlinesequenzen binden. Zur Korrektur der Quantität und Qualität wurde das Albuminogen als aktive Referenz eingesetzt. Die Bestimmung der Sensitivität und die Auswertung der Daten erfolgte anhand der Richtlinien der European Study Group on Detection in ALL (ESG-MRD-ALL).<sup>138</sup> Gemäß diesen Richtlinien sollten pro Patient wenn möglich zwei MRD-Targets zur Verfügung stehen, die eine Sensitivität von mindestens  $1 \times 10^{-3}$ , besser von  $1 \times 10^{-4}$  oder  $1 \times 10^{-5}$  aufweisen. Vor jeder Messung der Folgeproben erfolgte eine Sensitivitätstestung der Primer. Bei der Untersuchung der 90 Patienten war es möglich 60 Patienten mit zwei Ig/TCR-Targets mit einer ausreichenden Sensitivität zu überwachen. Die restlichen 30 Patienten wurden mit einem MRD-Target gemessen. Betrachtet man die Sensitivität so konnte bei 89 Patienten (96,7%) ein Monitoring der MRD mit einer ausreichenden Sensitivität von mindestens  $1 \times 10^{-3}$  durchgeführt werden und somit war eine zuverlässige Auswertung möglich. Bei der Großzahl der Patienten konnte sogar eine Sensitivität von  $1 \times 10^{-5}$  erzielt werden, was bedeutet, dass eine 1 Blastenzelle in 100 000 Zellen detektiert werden konnte.

## **6.2 Allgemeine Bedeutung der MRD bei Kindern mit ALL**

Die Bedeutung der Messung der MRD bei Kindern mit ALL für den weiteren Krankheitsverlauf wurde bereits in mehreren retrospektiven und prospektiven Studien untersucht und als wichtiger prognostischer Faktor anerkannt.<sup>28,33,65,93,121,135,141</sup> Dies gilt vor allem für die Messung der MRD zur Bewertung des Ansprechens auf die Ersttherapie, welche eine Einteilung der Patienten in high-risk an low-risk Patienten ermöglicht und somit eine Intensivierung oder Reduzierung der Therapie erlaubt.<sup>23,28,33,41,91,93,128,141,146</sup> Zudem haben mehrere Studien gezeigt, dass zwischen der MRD-Last vor allogener Stammzelltransplantation und dem Erfolg der Transplantation eine starke Korrelation besteht.<sup>11,50,51,65,68,135</sup> In Konsequenz dieser Ergebnisse wird die MRD-Last vor allo-SZT im Rezidiv Studie Protokoll ALL-Rez-2004

berücksichtigt und Hochrisikopatienten erhalten eine an die MRD-Last adaptierte Therapie.

### **6.3 Bedeutung der MRD bei Kindern mit ALL nach allogener Stammzelltransplantation**

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob es mit Hilfe der Messung der submikroskopisch messbaren MRD im peripheren Blut bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation möglich ist, Rezidivvoraussagen machen zu können. Somit wäre es möglich eine Patientengruppe identifizieren zu können, die ein hohes Rezidivrisiko aufweist. Diese Patientengruppe könnte dann rechtzeitig einer präventiven adjuvanten Immuntherapie zugeführt werden, um ein offenes hämatologisches Rezidiv zu verhindern. Um dies herauszufinden wurden die Höhe und Dynamik der MRD-Werte im Blut beobachtet, um die Bedeutung dieser Parameter für das Auftreten eines Rezidives zu bestimmen. Dabei sollte darauf geachtet werden, ob eine kritische MRD-Grenzkonzentration oder eine MRD-Konzentrationszunahme pro Zeit existiert, die für das Rezidiv nach allo-SZT prädiktiv ist.

Über die Bedeutung der MRD nach allogener Stammzelltransplantation sind bis heute wenige Studien veröffentlicht worden.<sup>64,107,134</sup> In der Studie von Knechtli et al., 1998 bei 71 Kindern mit ALL konnte gezeigt werden, dass ein positiver Nachweis einer MRD-Last nach Transplantation im allgemeinen eine schlechtes prognostisches Zeichen ist.<sup>64</sup> In der Studie von Uzunel et al., 2003 in der 23 Kinder und 9 Erwachsene eingeschlossen wurden, konnte in einer multivarianten Untersuchung gezeigt werden, dass nur die Detektion der MRD nach allo-SZT signifikant mit dem Rezidivrisiko assoziiert war.<sup>134</sup>

### **6.4 Ergebnisse der Untersuchung der MRD im Peripherblut**

Auch diese Untersuchung bestätigt die prognostische Bedeutung der MRD nach allo-SZT für das Auftreten des Rezidives. Von den untersuchten 90 Patienten erlitten 26 ein Rezidiv. Bei 96,0% dieser Patienten war es möglich eine MRD-Last vor Diagnose des Rezidives im Peripherblut zu detektieren. Die

90 Patienten des Kollektives wurden im Beobachtungszeitraum in drei MRD-Gruppen anhand bestimmter festgelegter MRD-Werte eingeteilt. Betrachtet man das Rezidivfreie Überleben bei den 3 MRD-Gruppen, stellt sich ein statistisch signifikanter Unterschied heraus.

#### **6.4.1 Betrachtung der Patienten der MRD high Gruppe**

Von den 29 Patienten der MRD high Gruppe, die eine MRD-Last  $> 1 \times 10^{-4}$  aufwiesen, bekamen 26 der Patienten (89,7%) ein Rezidiv im weiteren Krankheitsverlauf. Die ungünstige Prognose wird noch deutlicher bei Betrachtung des Rezidivfreien Überlebens mit der Kaplan-Meier-Methode (RFS nach einem Jahr: 31,0%; RFS nach 3 Jahren: 5,2%). Der zur Einteilung der Patienten in die Gruppen MRD high und MRD low in dieser Untersuchung verwendeten Grenzwert von  $1 \times 10^{-4}$  scheint als möglicher kritischer MRD-Grenzwert geeignet zu sein, um die Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko zu identifizieren.

Bei Betrachtung der Dynamik und der Höhe der MRD im Peripherblut zeigen sich individuelle Unterschiede. Bei 20 der 25 Rezidivpatienten (bei Patient UPN 1829 konnte der genaue Rezidivtag nicht ermittelt werden) war es möglich einen Anstieg der MRD-Last im Peripherblut bis zur Diagnose des Rezidives zu beobachten. Bei 2 Patienten (UPN 2237 und UPN 2295) konnte nur in einer Probe vor Diagnose des Rezidives eine MRD-Last nachgewiesen werden. Nach dieser positiven gemessenen Probe standen in den folgenden 65 bzw. 35 Tagen bis zum Auftreten des Rezidives leider keine Proben mehr zur Verfügung. Zudem bestand ein großer Abstand zwischen der gemessenen positiven Probe zur vorherigen Probe (146 bzw. 70 Tage). Aus diesen Gründen kann die Dynamik der Werte dieser beiden Patienten nicht beurteilt werden. Hierbei zeigt sich das Problem des zu wählenden Intervalles zur Messung der MRD. Beide Patienten erlitten zudem zu einem relativ späten Zeitpunkt ein Rezidiv (Tag 251 bzw. 492). Der Median des Auftretens des Rezidives lag bei allen untersuchten Rezidivpatienten bei 182 Tagen.

Betrachtet man die Dynamik der Werte von den 20 Patienten zeigt sich, dass es Patienten gibt, die schon von Beginn der Untersuchung der MRD im

Peripherblut bis zur Rezidivdiagnose immer eine MRD-Last aufwiesen (UPN 2056, UPN 2116; UPN 2130 und UPN 2266). Bei diesen Patienten trat das Rezidiv innerhalb kurzer Zeit nach der allo-SZT auf. Bei drei der Patienten geschah dies innerhalb der ersten 65 Tage nach Transplantation.

Die Großzahl der Patienten (n = 13) wies nach einer Phase, in der keine MRD-Last detektierbar war einen Anstieg der MRD-Werte im Peripherblut auf. Bei 2 Patienten (UPN 2114 und UPN 2560) waren nach der Messung eines positiven MRD-Befundes, negative MRD-Befunde detektierbar. Trotzdem wies dann aber ein ansteigender Verlauf der MRD-Werte auf das kommende Rezidiv hin.

Auffallend war bei den Patienten UPN 1793, UPN 1820 und UPN 2610 das Vorkommen einer hohen MRD-Last in einer frühen Probe nach allo-SZT mit späterer Messung negativer Proben. Alle drei Patienten erlitten dann im weiteren Krankheitsverlauf ein Rezidiv, welches sich auch vorher in einem Anstieg der MRD-Last ankündigte. Eine Erklärung für das Vorkommen der MRD-Last in den ersten Proben könnte darin liegen, dass bei allen drei Patienten in der letzten Probe vor der Transplantation eine hohe MRD-Last detektiert werden konnte. Diese könnte in den ersten Proben noch vorhanden gewesen und somit detektiert worden sein.

Bei zwei Patienten UPN 2105 und UPN 2119 zeigte sich eine Abnahme der MRD-Werte vor Diagnose des Rezidives.

Nur 4 Patienten der MRD high Gruppe entwickelten im weiteren Krankheitsverlauf kein Rezidiv. Zwei Patienten verblieben in kompletter Remission und zwei Patienten (UPN 1891 und UPN 1926) verstarben an einer TRM. Bei den beiden Patienten UPN 1615 und UPN 2366, welche in kompletter Remission verblieben lagen die gemessenen positiven MRD-Werte allerdings nur knapp über der Grenze, die zur Einteilung in die MRD high Gruppe führte und es wurden in nur jeweils 2 Proben eine MRD-Last nachgewiesen, die restlichen gemessenen Proben waren immer MRD negativ. Über das Vorkommen positiver MRD-Befunde ohne Entwicklung eines Rezidives wurde schon früher berichtet.<sup>64</sup>



Abschließend lässt sich sagen, dass die Patienten der MRD high Gruppe allgemein eine sehr schlechte Prognose haben. Es ist wichtig bei diesen Patienten bei der Einschätzung des Rezidivrisikos nicht nur nach der Höhe einzelner gemessener MRD-Werte zu gehen, sondern die Dynamik der MRD-Werte zu betrachten. Dies wird deutlich bei den 2 Patienten, welche in kompletter Remission verblieben. Sie zeigen im Gegensatz zu den Patienten, welche dann im weiteren Verlauf ein Rezidiv entwickelt haben keinen ansteigenden Verlauf der Werte in mehr als zwei aufeinanderfolgenden Proben und es lassen sich mehrmals Befunde mit einer negativen MRD-Last detektieren.

#### **6.4.2 Betrachtung der Patienten der MRD low Gruppe**

Bei 8 Patienten konnte ein MRD-Last in einem Bereich  $\leq 1 \times 10^{-4}$  in den untersuchten Proben detektiert werden. Keiner dieser Patienten erlitt ein Rezidiv und alle Patienten verblieben trotz des Auftretens positiver MRD-Befunde in kompletter Remission. Sie zeigen bei Betrachtung des Rezidivfreien und des Ereignisfreien Überlebens von allen 3 MRD Gruppen die günstigste Prognose. Das Auftreten von MRD-Werten in einem Bereich  $\leq 1 \times 10^{-4}$  scheint bei diesen 8 Patienten also keine prognostische Bedeutung bezüglich des Auftretens eines Rezidives im weiteren Krankheitsverlauf zu haben.

Bei den Patienten UPN 2276, UPN 2488 und UPN 2060 konnten innerhalb der ersten 120 Tage nach der Transplantation positive MRD-Befunde detektiert werden. Zum Zeitpunkt der Messung der positiven MRD-Proben bestand bei allen Patienten ein gemischter Chimärismus und bei allen Patienten kam es zu einer akuten GvHD. Im weiteren Verlauf kam es bei Patient UPN 2276 und UPN 2488 dann zur Messung negativer MRD-Befunde und zur Entwicklung eines kompletten Chimärismus. Hier scheint die akute GvHD einen GvL Effekt induziert zu haben. Der Effekt der Induktion einer GvL Reaktion durch die akute und chronische GvHD wurde durch mehrere Studien bestätigt<sup>54,59,104,133</sup>. Nur bei Patient 2060 konnten zu einem späteren Zeitpunkt noch drei positive MRD-Befunde detektiert werden, die aber alle außerhalb des quantifizierbaren Bereiches und zwischen denen MRD negative Proben lagen. Bei Patient UPN

1737 wurde gleichzeitig mit der Messung positiver MRD-Werte im Peripherblut ein zunehmender gemischter Chimärismus festgestellt, aufgrund dessen das CSA abgesetzt wurde, woraufhin sich wieder ein kompletter Chimärismus entwickelte und die nachfolgenden MRD-Werte negativ waren. Ähnlich zeigt sich der Verlauf bei Patient 2059. Zwar konnten in den ersten 200 Tagen 4 Werte in einem Bereich  $< 1 \times 10^{-5}$  detektiert werden, wobei diese Werte aber zwischen mehreren Proben mit negativer MRD-Last liegen. Zu einem späteren Zeitpunkt am Tag 400 kam es hier zum Ansteigen der MRD-Last gleichzeitig, mit einer Zunahme des gemischten Chimärismus. Nach Gabe einer DLI fiel die MRD-Last dann wieder ab und es entwickelte sich ein kompletter Chimärismus. Bei diesen 5 beschriebenen Patienten scheint also die akute GvHD mit der Induktion eines GvL-Effektes und die Immuntherapie aufgrund eines zunehmenden gemischten Chimärismus das Rezidivrisiko gesenkt zu haben. Bei den restlichen 3 Patienten dieser Gruppe kam es nicht zum Auftreten einer GvHD oder zur Durchführung einer Immuntherapie. Die Patienten blieben trotz des Auftretens positiver MRD-Werte auf niedrigem Level in kompletter Remission. Alle Patienten wurden zwischen den positiven Proben MRD negativ gemessen und zeigten keinen Anstieg der Werte in aufeinander folgenden Proben.

#### **6.4.3 Betrachtung der Patienten der MRD negativ Gruppe**

Bei den Patienten, die sich in der MRD negativ Gruppe befanden, kam es nur in einem Fall zum Auftreten eines Rezidives. Patient UPN 2043 wurde mehrmals im Peripherblut vor Diagnose des Rezidives MRD negativ gemessen. Auch die Messungen im Knochenmark waren durchgehend negativ. Ebenso wenig ergab sich aus dem Chimärismusstatus ein Hinweis für das Auftreten eines Rezidives. Eine Erklärung für die negativen MRD-Befunde könnte darin liegen, dass es im Verlauf bis zum Auftreten des Rezidives zu einer klonalen Evolution der Ig/TCR Gene gekommen sein könnte. Dadurch könnten das bei Diagnose bestimmten PCR-Target verlorengegangen sein. Bei der ALL kann dies im Krankheitsverlauf in 10-40% der Fälle vorkommen, abhängig vom verwendeten PCR-Target.<sup>122</sup> Bei diesem Patienten war es nur möglich das MRD-Monitoring mit

einem PCR-Target durchzuführen. Dies unterstreicht den Vorteil der Überwachung der Patienten mit 2 PCR-Targets.

#### **6.4.4 Möglichkeiten der Intervention in Form einer adjuvanten Immuntherapie basierend auf den MRD-Daten**

Die Patientengruppe MRD high scheint eine Risikogruppe darzustellen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidives nach allo-SZT. Diese Gruppe würde von einer rechtzeitig durchgeführten Immuntherapie profitieren. Die Bedeutung einer präventiven Immuntherapie mit dem Effekt der Induktion eines GvL-Effektes wurde bereits von Kolb et al., 1990 beschrieben.<sup>66</sup> Bei der CML konnten Remissionsraten bei 70% der Patienten erzielt werden. Bei der ALL war dies jedoch nur bei weniger als 20% der Fälle möglich.<sup>26,31,67</sup> Ein Grund dafür könnte darin liegen, dass sich das Rezidiv bei der ALL innerhalb eines kürzeren Zeitraumes entwickelt und deshalb die Therapie zu spät begonnen wurde und die MRD-Last schon zu hoch war.<sup>89</sup> Dennoch wurden einige Fälle beschrieben in denen mit der Immuntherapie bei der ALL vielversprechende Resultate erzielt werden konnten.<sup>9,82,85,107</sup> Eine Voraussetzung für das rechtzeitige Einsetzen der Immuntherapie ist eine genügend lange Zeitspanne zwischen der ersten Detektion der MRD-Last in den Peripherblutproben und dem Auftreten des Rezidives. In unserer Untersuchung betrug der Median 68 Tage. Innerhalb dieses Zeitfensters könnte eine Immuntherapie zur Induktion eines GvL-Effektes führen und das Rezidivrisiko minimieren. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Höhe der MRD-Last in den ersten gemessenen Proben, da die Immuntherapie zu einem Zeitpunkt einsetzen sollte, in dem die Tumorlast noch niedrig ist. In unserer Studie lagen die Werte der ersten positiven MRD-Probe bei 96,0% der Patienten in einem Bereich  $\leq 1 \times 10^{-3}$ .

Weitere prospektive Studien mit einem größeren Patientenkollektiv müssen zeigen, ob es möglich ist basierend auf der Dynamik und der Höhe der MRD eine erfolgversprechende Immuntherapie durchzuführen.

## **6.5 Vergleich der gemessenen MRD-Befunde im Peripherblut mit den MRD-Befunden im Knochenmark**

In den meisten Studien, die sich mit der Bedeutung und Messung der MRD beschäftigt haben, wurden Knochenmarkproben zur Analyse der MRD eingesetzt. Für die kleinen Patienten ist jede Knochenmarkpunktion eine traumatische, invasive und körperliche Schmerzen verursachende Erfahrung. Diese bleibt den Patienten auch noch nach überstandener Krankheit in Erinnerung, obwohl die Punktionen meist in einer Kurznarkose stattfinden. Zudem besteht klinisch gesehen ein Nachteil darin, dass die Knochenmarkpunktionen nicht in beliebig kurzen Abständen durchführbar sind, wie es vielleicht für die Überwachung der MRD für den einzelnen Patienten nötig wäre. Somit könnte ein sich entwickelndes Rezidiv nicht rechtzeitig entdeckt werden. Wäre es möglich das Knochenmark als Probenmaterial durch das Peripherblut zu ersetzen, könnte diesen Patienten die dafür nötigen traumatischen und schmerzhaften Knochenmarkpunktionen erspart werden. Zudem könnten die Patienten in kürzeren Intervallen beobachtet werden und die Dynamik der MRD-Last ließe sich besser beurteilen.

### **6.5.1 Vergleich der Höhe und des Vorkommens der MRD-Last zwischen Peripherblut und Knochenmark**

Bisher gibt es nur wenige MRD-Studien in denen Peripherblutproben zur Messung der MRD herangezogen wurden und in denen die Peripherblutwerte mit denen im Knochenmark verglichen wurden.<sup>24,34,70,78,137,145</sup> Die Studien, die gegen Mitte und Ende der 90-er Jahre veröffentlicht wurden, kamen zu dem Ergebnis, dass sich der Nachweis der MRD im Peripherblut und im Knochenmark parallel verhält, aber die Höhe der Werte im Peripherblut geringer ist. Die Interpretation der Ergebnisse dieser Studien wurden unter anderem limitiert durch die geringe Anzahl der Patienten, die untersucht wurden und die Tatsache, dass nur Patienten mit einer B-ALL eingeschlossen worden waren.<sup>34</sup> In der Zwischenzeit wurden zwei Studien veröffentlicht, in denen die MRD-Werte zwischen Knochenmark und Peripherblut bei Patienten mit T-ALL's und

B-Linien ALL's verglichen wurden.<sup>34,137</sup> Beide Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die Höhe der MRD-Werte im Knochenmark und im Peripherblut bei Patienten mit einer T-ALL vergleichbar sind und es bei dieser Patientengruppe möglich wäre das MRD-Monitoring im Peripherblut durchzuführen. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die MRD-Werte im Knochenmark und Peripherblut bei den Patienten mit einer B-Linien ALL stark. In vielen Peripherblutproben war keine MRD-Last nachweisbar oder die Werte waren um ein vielfaches niedriger als in der korrespondierenden Knochenmarkprobe. Diese Resultate passen zu der Annahme, dass die Leukämieblasten der T-ALL von Vorläuferzellen abstammen, die sich normalerweise im Thymus befinden und nicht im Knochenmark.<sup>20,53</sup> Im Gegensatz dazu stammen die Leukämieblasten der B-Linien ALL's von Vorläuferzellen ab, die sich im Knochenmark aufhalten.<sup>53,61</sup> Deshalb sind die gemessenen MRD-Werte im Knochenmark höher als im Peripherblut.

Auch in unserer Untersuchung zeigte sich beim Vergleich des Auftretens und der Höhe der MRD-Last in korrespondierenden Peripherblut- und Knochenmarkproben des Gesamtpatientenkollektives ein Unterschied zwischen Patienten mit einer T-ALL und einer Vorläufer-B-ALL. Bei den Patienten mit einer T-ALL war das Auftreten der MRD und die Höhe der Werte zwischen Knochenmark und Peripherblut vergleichbar. Im Gegensatz dazu wiesen die Patienten mit einer B-ALL eine unterschiedliche Verteilung der MRD-Werte zwischen Peripherblut und Knochenmark auf. In vielen Proben, in denen sich im Knochenmark eine MRD-Last nachweisen ließ, konnte im Peripherblut keine MRD-Last detektiert werden. Der umgekehrte Fall trat nur vier Mal auf. Zudem zeigte ein Vergleich der Höhe der gemessenen MRD-Werte, dass die Werte im Knochenmark in der Überzahl der untersuchten Probenpaare (84,4%) über dem gemessenen Wert im Peripherblut lag. Die Wertedifferenzen waren sehr variabel (zwischen einer und fast vier Logarithmusstufen). Es ließ sich keine klare Aussage über die Beziehung zwischen der unterschiedlichen Höhe der MRD-Werte im Peripherblut und im Knochenmark in den Probenpaaren der Patienten mit einer Vorläufer-B-ALL machen. Diese Beobachtung wurde auch in der Studie von van der Velden et al., 2002 beschrieben.<sup>137</sup>

Die beschriebenen Ergebnisse, ebenso wie die Ergebnisse der berichteten Studien implizieren, dass es bei den Patienten mit der Diagnose T-ALL möglich ist das MRD-Monitoring im Peripherblut mit einer vergleichbaren Sensitivität wie im Knochenmark durchzuführen. Dieser Patientengruppe könnten somit mehrmalige, psychische und körperlich traumatische Knochenmarkpunktionen erspart werden. Zudem könnte die Probengewinnung im Peripherblut in kürzeren Abständen stattfinden und das Monitoring der MRD in engeren Intervallen erfolgen.

### **6.5.2 Vergleich des Zeitpunktes des Nachweises der MRD im Peripherblut und im Knochenmark bei Patienten mit Rezidiv**

Bei alleiniger Betrachtung des Auftretens und der Höhe der MRD bei allen Patienten in korrespondierenden Peripher- und Knochenmarkproben, wie im oberen Abschnitt beschrieben, scheint das Knochenmark, vor allem bei den Patienten mit einer Vorläufer-B-ALL, zum Monitoring der MRD besser geeignet zu sein. Dabei werden jedoch die Peripherblutproben zu denen keine korrespondierenden Knochenmarkproben existieren und die Bedeutung der Dynamik der MRD-Werte außer Acht gelassen. Bei genauer Beobachtung der MRD-Verläufe der Patienten, welche im weiteren Verlauf ein Rezidiv erlitten haben, zeigte sich, dass bei 9 der 23 Rezidivpatienten, bei denen ein Vergleich der MRD zwischen Peripherblut und Knochenmark möglich war, die Peripherblutprobe vor der nächsten Knochenmarkprobe eine positive MRD-Last aufwies. Bei 6 Patienten war die Knochenmarkprobe vor den Peripherblutproben MRD positiv. Bei allen 6 Patienten war es aber möglich gewesen vor Diagnose des Rezidives auch im Peripherblut Hinweise auf ein drohendes Rezidiv in Form eines Anstieges der MRD-Last zu detektieren. In drei Fällen waren die korrespondierenden Proben zur gleichen Zeit MRD positiv gemessen worden und bei 5 Patienten war der Vergleich nicht einfach zu beurteilen, weil sich im Knochenmark z.B. nur positive aber nicht quantifizierbare MRD-Werte nachweisen ließen oder sich rückläufige MRD-Werte zeigten. In diesen Fällen konnte die Dynamik der MRD im Peripherblut besser beurteilt werden.

Die Auswertung ergibt, dass sich die Dynamik der MRD besser in den Peripherblutproben beurteilen lässt, welche in wesentlich kürzeren Abständen gewonnen werden können, was den Vorteil der Messung der höheren Werte im Knochenmark auszugleichen vermag. Bei keinem Patienten kam es zu der Situation, dass nur im Knochenmark eine MRD-Last nachgewiesen werden konnte und im Peripherblut keine MRD-Last gemessen werden konnte.

## 7. Zusammenfassung

Die allogene Stammzelltransplantation (allo-SZT) ist heute eine erfolgreiche und etablierte Therapieoption bei vielen malignen und nicht-malignen Erkrankungen. Auch in der Therapie der ALL bei pädiatrischen Patienten hat sie einen großen Stellenwert.

Das Wiederauftreten der Grunderkrankung ist bei den Patienten mit kindlichen Leukämien die Hauptursache für das Misslingen der Transplantation. Die Erfolgsaussichten für die Therapie des Rezidives sind wesentlich schlechter im Vergleich zur Erstbehandlung. Daher liegt das Ziel darin, das Auftreten des Rezidives zu verhindern.

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob es möglich ist, mit Hilfe der Überwachung der minimalen Resterkrankung (MRD) in Peripherblutproben bei Patienten nach allo-SZT eine Patientengruppe zu identifizieren, welche ein hohes Risiko trägt ein Rezidiv zu erleiden. Diese Patientengruppe könnte von einer rechtzeitig durchgeführten adjuvanten Immuntherapie profitieren und somit ein offenes hämatologisches Rezidiv verhindert werden. Zusätzlich wurde noch untersucht, inwiefern sich die gemessenen Werte zwischen Knochenmark und Peripherblut unterscheiden. Bisher wurden zumeist Knochenmarkproben zur Analyse der MRD eingesetzt. Wäre es möglich das Knochenmark als Probenmaterial durch das Peripherblut zu ersetzen, könnte den kleinen Patienten die psychisch und physisch traumatisierende Knochenmarkpunktion erspart werden. Außerdem könnte die Überwachung der MRD im Peripherblut in wesentlich kürzeren Intervallen stattfinden, was bei der Verwendung von Knochenmark als Probenmaterial nicht durchführbar ist. Ein sich entwickelndes Rezidiv könnte somit frühzeitiger entdeckt werden.

Die Messung der minimalen Resterkrankung erfolgte durch die PCR-Analyse klonspezifischer DNA-Rearrangements der Immunglobulin (Ig)- und T-Zellrezeptor (TCR) Gene mit der Real-time PCR unter Verwendung der TaqMan-Technologie, welche in unserem Labor etabliert wurde. Mit dieser Methode war es möglich bei 96,7% der Patienten eine geforderte Sensitivität vom mindestens  $1 \times 10^{-3}$  zu erreichen. Bei der Großzahl der Patienten konnte eine maximale



Sensitivität von  $1 \times 10^{-5}$  erzielt werden, d.h. Detektion eines Leukämieblasten in 100 000 Blutzellen.

Von den 90 untersuchten Patienten erlitten 26 Patienten im weiteren Verlauf nach der allo-SZT ein Rezidiv. Bei 25 dieser 26 Patienten konnte vor Diagnose des Rezidives eine MRD-Last im Peripherblut festgestellt werden. Diese 25 Patienten gehörten alle zur Gruppe MRD high, welche definiert wurde durch eine MRD-Last in einem Bereich  $> 1 \times 10^{-4}$ . Im Median konnte 68 Tage vor Diagnose des Rezidives der erste positive MRD-Befund erhoben werden. Von den 8 Patienten, welche ebenfalls eine positive MRD-Last aufwiesen, aber in einem Bereich  $\leq 1 \times 10^{-4}$ , verblieben alle in kompletter Remission.

Mit Hilfe der Analyse der Dynamik und Höhe MRD im Peripherblut unter Verwendung der Real-time PCR, kann also eine Patientengruppe identifiziert werden, die MRD high Gruppe, welche eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidives nach allo-SZT besitzt. Inwiefern diese Patienten von einer auf der Dynamik und Höhe der MRD basierenden adjuvanten Immuntherapie profitieren, müssen weitere prospektive Studien zeigen. Der Nutzen einer Immuntherapie bei Kindern mit ALL wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen.<sup>9,82,85,107</sup>

Beim Vergleich des Vorkommens und der Höhe der MRD zwischen Peripherblut und Knochenmark des gesamten Patientenkollektives zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Patienten mit einer T-ALL und einer Vorläufer B-ALL. Im Falle der Patienten mit einer T-ALL war der Nachweis und die Höhe der MRD zwischen Knochenmark und Peripherblut vergleichbar. Dies führt zur Annahme, dass es möglich ist, bei den Patienten mit einer T-ALL die Überwachung der MRD im Peripherblut mit vergleichbarer Aussagekraft wie im Knochenmark durchzuführen. Diesen Kindern könnte somit eine mehrmalige Knochenmarkpunktion erspart werden.

Bei den Patienten mit einer Vorläufer-B-ALL waren im Gegensatz dazu die MRD-Werte bei 84,4% der Probenpaare im Knochenmark deutlich höher. Hierbei läßt sich keine klare Beziehung zwischen der unterschiedlichen Höhe der Werte im Peripherblut und Knochenmark nachvollziehen.

Aber auch bei dieser Patientengruppe lässt sich eine Vorhersage im Peripherblut machen, wenn die Dynamik der MRD-Werte und auch die Peripherblutproben, zu denen keine korrespondierende Knochenmarksproben existieren, mit einbezogen werden.

Bei genauer Betrachtung der MRD-Verläufe der Patienten, welche ein Rezidiv erlitten haben, zeigte sich, dass sich die Dynamik der MRD besser in den Peripherblutproben beurteilen lässt, welche in wesentlich kürzeren Abständen gewonnen werden können. Bei 9 Patienten war es so möglich die MRD-Last im Peripherblut früher als im Knochenmark zu detektieren. Bei 6 Patienten wies die Knochenmarkprobe früher eine positive MRD-Last auf. Bei keinem der Patienten trat der Fall ein, dass nur im Knochenmark eine MRD-Last nachweisbar war und sich im Peripherblut keine MRD-Last nachweisen ließ.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Überwachung der MRD im Peripherblut geeignet zu sein scheint, rechtzeitig Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko zu erkennen. Die Indikation für eine weitere Therapie wurde bei den untersuchten Patienten auf der Basis der Chimärismusuntersuchung gestellt. Die Überwachung der MRD im Peripherblut könnte ein wichtiger ergänzender Baustein sein, um zusammen mit der Untersuchung des hämatopoetischen Chimärismus dem Ziel näherzukommen, das Auftreten des Rezidives nach der allo-SZT zu verhindern.

## Literaturverzeichnis

- 1 ALL-REZ BFM 2002; Protokoll zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie.
- 2 Anasetti C, Amos D, Beatty PG et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia and lymphoma. *N Engl J Med.* 1989;320:204.
- 3 Appelbaum FR. The use of bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of cancer. *CA Cancer J Clin.* 1996;46:142-164.
- 4 Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1994;330:827-838.
- 5 Aversa F, Tabilio A, Velardi A et al. Treatment of high-risk acute Leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med.* 1998;339:1186-1193.
- 6 Bader P, Hölle W, Klingebiel T et al. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant.* 1997 a;19:697-702.
- 7 Bader P, Beck J, Schlegel PG et al. Additional immunotherapy on the basis of increasing mixed hematopoietic chimerism after allogeneic BMT in children with acute leukemia: is there an option to prevent relapse? *Bone Marrow Transplant.* 1997 b;20:79-81.
- 8 Bader P, Beck J, Frey A et al. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant.* 1998;21:487-495.
- 9 Bader P, Klingebiel T, Schaudt A et al. Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. *Leukemia.* 1999;13:2079-2086.

- 10 Bader P, Stoll K, Huber S et al. Characterization of lineages specific chimerism in patients with acute leukaemia and MDS after allogeneic SCT before and after relapse. *Br J Haematol.* 2000;4:761-769.
- 11 Bader P, Hancock J, Kreyenberg H et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia.* 2002;16:1668-1672
- 12 Barnes DWH, Corp MJ, Loutit JF et al. Treatment of murine leukemia with x-rays and homologous bone marrow. Preliminary communication. *Br Med J.* 1956;2:626-627.
- 13 Bearman S, Appelbaum FR, Buckner C. Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. *J Clin Invest.* 1988;6:1562-1568.
- 14 Bearman S. The syndrome of hepatic veno-occlusive disease after bone marrow transplantation. *Blood.* 1995;85:3005-3020.
- 15 Beck JF, Klingebiel T, Kreyenberg H et al. Relapse of childhood ALL, AML and MDS after allogeneic stem cell transplantation can be prevented by donor lymphocyte infusion in a critical stage of increasing mixed chimerism. *Klin Padiatr.* 2002;214:201-205.
- 16 Beishuizen A, Hahlen K, van Wering ER, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in childhood leukemia with the polymerase chain reaction. *N Engl J Med.* 1991;324:772-775.
- 17 Beishuizen A, Hahlen K, Hagemeijer A et al. Multiple rearranged immunoglobulin genes in childhood acute lymphoblastic leukemia of precursor B-cell origin. *Leukemia.* 1991;5:657-667.
- 18 Beishuizen A, de Bruijn MC, Pongers-Willems MJ et al. Heterogeneity in junctional regions of immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in B cell leukemias: a new molecular target for detection of minimal residual disease. *Leukemia.* 1997;11:2200-2207.
- 19 Boeckx N, Willems MJ, Szczepanski T et al. Fusion gene transcripts and Ig/TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR-based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2002;16:368-375.

- 20 Bradstock KF, Janossy G, Pizzolo G et al. Subpopulations of normal and leukemic human thymocytes: an analysis with the use of monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst.* 1980;65:33-42.
- 21 Breit TM, Mol EJ, Wolvers-Tettero IL et al. Site-specific deletions involving the tal-1 and sil genes are restricted to cells of the T cell receptor alpha/beta lineage: T cell receptor delta gene deletion mechanism affects multiple genes. *J Exp Med.* 1993 a;177:965-977.
- 22 Breit TM, Beishuizen A, Ludwig WD et al. tal-1 deletions in T-cell acute lymphoblastic leukemia as PCR target for detection of minimal residual disease. *Leukemia.* 1993 b;7:2004-2011.
- 23 Brisco MJ, Condon J, Hughes E et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet.* 1994;343:196-200.
- 24 Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E et al. Monitoring minimal residual disease in peripheral blood in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 1997;99:314-319.
- 25 Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood.* 1995;85:1416-1434.
- 26 Carlens S, Remberger M, Aschan J & Ringden O. The role of disease stage in the response to donor lymphocyte infusion as treatment for leukemic relapse. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2001;7:31-38.
- 27 Carreras E, Granena A, Rozman C. Hepatic veno-occlusive disease after bone marrow transplantation. *Blood Rev.* 2005;7:43-51.
- 28 Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suci S et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med.* 1998;339:591-598.
- 29 Chen JS, Coustain-Smith E, Suzuki T et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2001;97:2115-2120.

- 30 Chen Z, Font MP, Loiseau P et al. The human T-cell V gamma gene locus: cloning of new segments and study of V gamma rearrangements in neoplastic T and B cells. *Blood*. 1988;72:776-783.
- 31 Collins RH, Jr., Shpilberg O, Drobyski WR et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1997;15:433-444.
- 32 Coustain-Smith E, Behm FG, Sanchez J et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1998;351:550-554.
- 33 Coustain-Smith E, Sancho J, Hancock ML et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96:2691-2696.
- 34 Coustain-Smith E, Sancho J, Hancock ML et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Blood*. 2002;100:2399-2402.
- 35 Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol*. 1958;20:156-166.
- 36 Davis MM, Björkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988;334:395-402.
- 37 de Haas V, Verhagen OJ, von dem Borne AE et al. Quantification of minimal residual disease in children with oligoclonal B-precursor acute lymphoblastic leukemia indicates that the clones that grow out during relapse already have the slowest rate of reduction during induction therapy. *Leukemia*. 2001 a;15:134-140.
- 38 de Haas V. Quantitative analysis of minimal residual disease by PCR in childhood acute lymphoid leukemia. 2001 b.
- 39 de Lima M, Bonamino M, Vasconcelos Z et al. Prophylactic donor lymphocyte infusions after moderately ablative chemotherapy and stem cell transplantation for hematological malignancies: high remission rate among poor prognosis patients at the expense of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27:73-78.

- 40 Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M et al. Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B-cells. *Nature*. 1984;311:752-755.
- 41 Dibenedetto SP, Lo Nigro L, Mayer SP, 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.
- 42 Dini G, Cornish JM, Gardner H et al. Bone marrow transplant indications for childhood leukemias: achieving a consensus. The EBMT Pediatric Diseases Working Party. *Bone Marrow Transplant*. 1996;18:4-7.
- 43 Doney K, Fisher LD, Appelbaum FR et al. Allogeneic bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia in remission: Prolonged survival associated with acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1991;7:453-459.
- 44 Ebell W, Reiter A, Riehm H. Chemotherapy versus bone marrow transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. BFM Study Group. *Eur J Pediatr*. 1992;151 Suppl 1:50-54.
- 45 Eden OB, Lilleyman JS, Richards S, Shaw MP, Peto J. Results of Medical Research Council Childhood Leukaemia Trial UKALL VIII (report to the Medical Research Council on behalf of the Working Party on Leukaemia in Childhood). *Br J Haematol*. 1991;78:187-196.
- 46 Efros M, Ahmed T, Choudhury M. Cyclophosphamide induced pyelitis and urethritis associated with cystitis in marrow transplantation. *J Urol*. 1991;144:1232-1234.
- 47 Feig SA, Harris RE, Sather HN. Bone marrow transplantation versus chemotherapy for maintenance of second remission of childhood acute lymphoblastic leukemia: a study of the Children's Cancer Group (CCG-1884). *Med Pediatr Oncol*. 1997;29:534-540.
- 48 Ford CE, Hamerton JL, Barnes DWH et al. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. 1956;177:452-454.
- 49 Forman SJ. Stem cell transplantation in acute leukemia. *Curr Opin Oncol*. 1998;10:10-16.

- 50 Goulden N, Steward C. Clinical relevance of MRD in children undergoing allogeneic stem cell transplantation for ALL. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2002;15:59-70.
- 51 Goulden N, Bader P, van der Velden VH et al. Minimal residual disease prior to stem cell transplant for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;122:24-29.
- 52 Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B et al. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood.* 2002;100:2374-2386.
- 53 Greaves MF. Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. *Science.* 1986;234:697-704.
- 54 Gustafsson Jernberg A, Remberger M, Ringden O, Winiarski J. Graft-versus-leukemia effect in children: chronic GVHD has a significant impact on relapse and survival. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31:175-181.
- 55 Gutjahr P. *Krebs bei Kindern und Jugendlichen, Klinik und Praxis der Pädiatrischen Onkologie.* 5. Auflage. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2003.
- 56 Helg C, Starobinski M, Jeannet M, Chapuis B. Donor lymphocyte infusion for the treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma.* 1998;29:301-313.
- 57 Herold G. *Innere Medizin.* 2004.
- 58 Hoelzer D, Gokbuget N, Ottmann O et al. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2002;162-192.
- 59 Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;75:555-562.
- 60 Jacobson LO, Marks EK, Robson MJ et al. Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. *J Lab Clin Med.* 1949;34:1538-1543.
- 61 Janossy G, Bollum FJ, Bradstock KF et al. Terminal transferase-positive human bone marrow cells exhibit the antigenic phenotype of common acute lymphoblastic leukemia. *J Immunol.* 1979;123:1525-1529.



- 62 Keil F, Prinz E, Kalhs P et al. Treatment of leukemic relapse after allogeneic stem cell transplantation with cytoreductive chemotherapy and/or immunotherapy or second transplants. *Leukemia*. 2001;15:355-361.
- 63 Kleinfeld R, Hardy RR, Tarlinton D et al. Recombination between an expressed immunoglobulin heavy-chain gene and a germline variable gene segment in a Ly 1+ B-cell lymphoma. *Nature*. 1986;322:843-846.
- 64 Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP et al. Minimal residual disease status as a predictor of relapse after allogeneic bone marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1998 a;102:860-871.
- 65 Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP et al. 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 b;92:4072-4079.
- 66 Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990;76:2462-2465.
- 67 Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood*. 1995;86:2041-2050.
- 68 Krejci O, van der Velden VH, Bader P et al. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:851.
- 69 Kreuzer KA, Saborowski A, Lupberger J et al. Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumor gene (WT1) mRNA: implications for monitoring human leukaemias. *Br J Haematol*. 2001;114:313-318.
- 70 Lal K, Kwan E, Haber M, Norris MD, Marshall GM. Detection of minimal residual disease in peripheral blood prior to clinical relapse of childhood acute lymphoblastic leukaemia using PCR. *Mol Cell Probes*. 2001;15:99-103.

- 71 Landau NR, Schatz DG, Rosa M, Baltimore D. Increased frequency of N-region insertion in a murine pre-B-cell line infected with a terminal deoxynucleotidyl transferase retroviral expression vector. *Mol Cell Biol.* 1987;7:3237-3243.
- 72 Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia.* 1997;11:2192-2199.
- 73 Leahey AM, Bunin NJ. Recombinant human tissue plasminogen activator for the treatment of severe hepatic veno-occlusive disease in pediatric bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant.* 1996;17:1101-1104.
- 74 Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C et al. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:209-212.
- 75 Lieber MR. The mechanism of V(D)J recombination: a balance of diversity, specificity, and stability. *Cell.* 1992;70:873-876.
- 76 Lorenz E, Uphoff D, Reid TR et al. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst.* 1951;12:197-201.
- 77 Marolleau JP, Fondell JD, Malissen M et al. The joining of germ-line V alpha to J alpha genes replaces the preexisting V alpha-J alpha complexes in a T-cell receptor alpha, beta positive T-cell line. *Cell.* 1988;55:291-300.
- 78 Martin H, Atta J, Bruecher J et al. In patients with BCR-ABL-positive ALL in CR peripheral blood contains less residual disease than bone marrow: implications for autologous BMT. *Ann Hematol.* 1994;68:85-87.
- 79 Martin P. Overview of marrow transplantation immunology. In : Thomas ED, Blume K, Forman S, eds. *Hematopoietic stem cell transplantation.* Oxford: Blackwell Science; 1999;19-27.
- 80 Martinelli G, Trabetti E, Zaccaria A et al. In vitro amplification of hypervariable DNA regions for the evaluation of chimerism after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant.* 1993;12:115-112.
- 81 Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P et al. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med.* 1998;188:2151-2162.

- 82 Matsue K, Tabayashi T, Yamada K, Takeuchi M. Eradication of residual bcr-abl-positive clones by inducing graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29:63-66.
- 83 Mc Donald GB, Hinds MS, Fisher LD et al. Veno-occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Ann Intern Med.* 1993;118:255-267.
- 84 Meyers J, Flournoy N, Thomas E. Nonbacterial pneumonia after allogeneic marrow transplantation: a review of ten years' experience. *Rev Infect Dis.* 1982;4:119-1132.
- 85 Miglino M, Berisso G, Grasso R et al. Allogeneic bone marrow transplantation (BMT) for adults with acute lymphoblastic leukemia (ALL): predictive role of minimal residual disease monitoring on relapse. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30:579-585.
- 86 Moppett J, Burke GA, Steward C, Oakhill A, Goulden NJ. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol.* 2003;56:249-253.
- 87 Moreira I, Papaioannou M, Mortuza FY et al. Heterogeneity of VH-JH gene rearrangement patterns: an insight into the biology of B cell precursor ALL. *Leukemia.* 2001;15:1527-1536.
- 88 Mrsic M, Horowitz MM, Atkinson K et al. Second HLA-identical sibling transplants for leukemia recurrence. *Bone Marrow Transplant.* 1992;9:269-275.
- 89 Naparstek E, Nagler A, Kapelushnik J, Slavin S. Allogeneic cell-mediated immunotherapy using donor lymphocytes for prevention of relapse in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for hematological malignancies. *Clin Transplant.* 1996;281-290.
- 90 Niethammer D, Klingebiel T, Ebell W et al. Which children do benefit from bone marrow transplant? The EBMT Paediatric Diseases Working Party. *Bone Marrow Transplant.* 1996;18:43-46.
- 91 Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP et al. 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.

- 92 Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*. 1990;248:1517-1523.
- 93 Panzer-Grümayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95:790-794.
- 94 Park SJ, Min WS, Yang IH et al. Effects of mixed chimerism and immune modulation on GVHD, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for hematologic malignancies. *Korean J Intern Med*. 2000;15:224-231.
- 95 Patton DF, Harper JL, Wooldridge TN et al. Treatment of veno-occlusive disease of the liver with bolus tissue plasminogen activator and continuous infusion antithrombin III concentrate. *Bone Marrow Transplant*. 1996;17:443-447.
- 96 Pongers-Willemse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ et al. 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.
- 97 Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13:110-118.
- 98 Popat U, Carrum G, Heslop HE. Haematopoietic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Treatment Reviews*. 2003;29:3-10.
- 99 Przybylski G, Oettle H, Ludwig WD, Siegert W, Schmidt CA. Molecular characterization of illegitimate TCR delta gene rearrangements in acute myeloid leukemia. *Br J Haematol*. 1994;87:301-307.
- 100 Pulla B, Barri YM, Anaissie E. Acute renal failure following bone marrow transplantation. *Ren Fail*. 1998;20:421-435.

- 101 Ramirez M, Diaz MA, Garcia-Sanchez F et al. Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1996;18:1161-1165.
- 102 Reth MG, Gehrman P, Petrac E, Wiese P. A novel VH to VHDJH joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B-cells result in heavy-chain production. *Nature.* 1986 a;322:840-842.
- 103 Reth MG, Jackson S, Alt FW. VHDJH formation and DJH replacement during pre-B differentiation: non-random usage of gene segments. *EMBO J.* 1986 b;5:2131-2138.
- 104 Ringden O, Labopin M, Gluckman E et al. Graft-versus-leukemia effect in allogeneic marrow transplant recipients with acute leukemia is maintained using cyclosporin A combined with methotrexate as prophylaxis. *Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.* *Bone Marrow Transplant.* 1996;18:921-929.
- 105 Rivera GK, Pinkel D, Simone J, Hancock ML, Crist W. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. 30 Years' experience at St. Jude Children's Hospital. *N Engl J Med.* 1993;329:1289-1295.
- 106 Rozman C, Carreras E, Qian C et al. Risk factors for hepatic veno-occlusive disease following HLA-identical sibling bone marrow transplants for leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1996;17:75-80.
- 107 Sanchez J, Serrano J, Gomez P et al. Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic transplantation. *Br J Haematol.* 2002;116:686-694.
- 108 Sander JE, Buckner CD, Clift A et al. Second marrow transplants in patients with leukemia who relapse after allogeneic marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1988;3:11-19.
- 109 Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell.* 1989;59:1035-1048.
- 110 Schlegel PG, Haber HP, Beck J et al. Hepatic veno-occlusive disease in pediatric stem cell recipients: successful treatment with continuous infusion of prostaglandin E1 and low-dose heparin. *Ann Hematol.* 1998;76:37-41.
- 111 Schwab G. Die schönsten Sagen des klassischen Altertums. Gondrom Verlag GmbH&Co.KG; 1974.

- 112 Seto BG, Kim M, Wolinsky L, Mito RS, Champlin R. Oral mucositis in patients undergoing marrow transplantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;60:493-497.
- 113 Sheperd JD, Pringle LE, Barnett MJ et al. Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. *J Clin Oncol.* 1991;9:2016-2020.
- 114 Socie G, Lawler M, Gluckman E, McCann SR, Brison O. Studies on hemopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular biology era. *Leuk Res.* 1995;19:497-504.
- 115 Steward CG, Goulden NJ, Katz F et al. 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;83:1355-1362.
- 116 Szczepanski T, Langerak AW, van Dongen JJ, van Krieken JH. Lymphoma with multi-gene rearrangement on the level of immunoglobulin heavy chain, light chain, and T-cell receptor beta chain. *Am J Hematol.* 1998;59:99-100.
- 117 Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ et al. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia.* 1999 a;13:196-205.
- 118 Szczepanski T, Pongers-Willemse MJ, Langerak AW, van Dongen JJ. Unusual immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemias. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999 b;246:205-215.
- 119 Szczepanski T, Pongers-Willemse MJ, Langerak AW et al. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. *Blood.* 1999 c;93:4079-4085.
- 120 Szczepanski T, Langerak AW, Willemse MJ et al. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T cell acute lymphoblastic leukemia reflect 'end-stage' recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia.* 2000;14:1208-1214.

- 121 Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VHJ, San Miguel JF, van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukemia patients. *Lancet Oncol.* 2001;2:409-417.
- 122 Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B et al. 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.
- 123 Thomas ED. Bone marrow transplantation: a review. *Semin Hematol.* 1999;36:95-103.
- 124 Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* 1983;302:575-581.
- 125 Toren A, Rechavi G, Nagler A. Minimal residual disease post-bone marrow transplantation for hemato-oncological diseases. *Stem Cells.* 1996;14:300-311.
- 126 Torres A, Martinez F, Gomez P et al. Allogeneic bone marrow transplantation versus chemotherapy for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in second complete remission. *Bone Marrow Transplant.* 1989;4:609-612.
- 127 Trigg ME. Milestones in the development of pediatric hematopoietic stem cell transplantation -- 50 years of progress. *Pediatr Transplant.* 2002;6:465-474.
- 128 Uckun FM, Stork L, Seibel N et al. Residual bone marrow leukemic progenitor cell burden after induction chemotherapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3123-3130.
- 129 Uderzo C, Valsecchi MG, Bacigalupo A et al. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission with allogeneic bone marrow transplantation and chemotherapy: ten-year experience of the Italian Bone Marrow Transplantation Group and the Italian Pediatric Hematology Oncology Association. *J Clin Oncol.* 1995;13:352-358.
- 130 Uderzo C, Dini G, Locatelli F, Miniero R, Tamaro P. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia after the first relapse: curative strategies. *Haematologica.* 2000;85(11 Suppl):47-53.

- 131 Uderzo C, Balduzzi A. Allogeneic bone marrow transplantation versus chemotherapy in childhood very high risk acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: a controversial issue. *Haematologica*. 2002;87(8 Suppl):47-50.
- 132 Ugozzoli L, Yam P, Petz LD et al. Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation. *Blood*. 1991;77:1607-1615.
- 133 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 leukaemia. *Blood*. 2001;98:1982-1984.
- 134 Uzunel M, Jaksch M, Mattsson J, Ringden O. Minimal residual disease detection after allogeneic stem cell transplantation is correlated to relapse in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;122:788-794.
- 135 van der Velden VH, Joosten SA, Willemse MJ et al. Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2001;15:1485-1487.
- 136 van der Velden VH, Wijkhuijs JM, Jacobs DC, van Wering ER, van Dongen JJ. T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia*. 2002 a;16:1372-1380.
- 137 van der Velden VH, Jacobs DC, Wijkhuijs AJ et al. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukaemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. *Leukemia*. 2002 b;16:1432-1436.
- 138 van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003;17:1013-1034.
- 139 van Dongen JJ, Wolvers-Tettero ILM. Analysis of immunoglobulin and T-cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta*. 1991;198:1-91.



- 140 van Dongen JJ, Breit TM, Adriaansen HJ, Beishuizen A, Hooijkaas H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. *Leukemia*. 1992;6:47-59.
- 141 van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998;352:1731-1738.
- 142 van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13:1901.
- 143 van Dongen JJ, Szczepanski T, Adriaansen HJ. Immunobiology of leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, eds. *Leukemia*. Philadelphia: WB Saunders Company; 2002:85-129.
- 144 van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17:2257-2317.
- 145 van Rhee F, Marks DI, Lin F et al. Quantification of residual disease in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison of blood and bone marrow. *Leukemia*. 1995;9:329-335.
- 146 van Wering ER, van der Linden-Schrevel BE, Szczepanski T et al. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: implications for monitoring of minimal residual disease. *Br J Haematol*. 2000;110:139-146.
- 147 Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*. 1979;300:1068-1073.
- 148 Weisdorf DJ, Bostrom B., Raether D et al. Oropharyngeal mucositis complicating bone marrow transplantation: prognostic factors and the effect of chlorhexidine mouth rinse. *Bone Marrow Transplant*. 1989;4:89-95.

149 Yumura-Yagi K, Hara J, Horibe K et al. Outcome after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol.* 2002;76:61-68.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders danke ich Herrn Professor Dr. med. P. Bader sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die bestmögliche Betreuung und die motivierende Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Kreyenberg für die ausgezeichnete und geduldige Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die immerzu freundliche und unermüdliche Anleitung und Hilfestellung bei den Laboruntersuchungen.

Ein aufrichtiger Dank gilt allen Mitarbeitern des Chimärismuslabors für die gute Zusammenarbeit, die andauernde Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie und meinen engen Freunden für die moralische Unterstützung, den Rückhalt und die aufmunternden Worte bedanken.

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name	Yvonne Wanner
Geburtsdatum	29.07.1979
Geburtsort	Böblingen

### **Schulbildung**

27.08.1996 - 18.07.1990	Joseph-Haydn-Grundschule, Gärtringen
04.09.1990 - 03.07.1991	Theodor-Heuss-Realschule, Gärtringen
26.08.1991 - 31.07.1999	Schickhardt-Gymnasium, Herrenberg

### **Studium**

27.09.1999	Immatrikulation und Studium an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
06.09.2001	Ärztliche Vorprüfung
29.08.2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
23.03.2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
25.04.2005 - 26.03.2006	Praktisches Jahr im Kreiskrankenhaus in Böblingen
18.05.2006 - 19.05.2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 01.07.2006	Assistenzärztin in der Frauenklinik in Böblingen