

Aus der Klinik für Innere Medizin  
II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael Kneba  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

„CHEMOTHERAPIERESISTENZ-ASSOZIIERTE GENETISCHE  
POLYMORPHISMEN BEI DER AKUTEN LYMPHATISCHEN LEUKÄMIE  
DES ERWACHSENEN UND DEREN KORRELATION MIT DER  
KINETIK DER MINIMALEN RESTERKRANKUNG“

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
MARIELENE KAISER  
aus Düsseldorf  
Kiel, 2012

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Monika Brüggemann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Stanulla

Disputation am: 02.10.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 02.10.2013

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Allgemeines.....	1
1.2 Diagnostik.....	2
1.2.1 Initiale Diagnostik .....	2
1.2.2 Untersuchung der minimalen Resterkrankung (minimal residual disease, MRD).....	2
1.3 Therapie .....	3
1.3.1 Risikostratifizierung .....	4
1.3.1.1 Konventionelle Risikofaktoren .....	4
1.3.1.2 MRD-basierte Risikostratifizierung .....	4
1.3.2 Ablauf der Therapie.....	4
1.4 Bedeutung von genetischen Polymorphismen bei der ALL.....	5
1.4.1 Einzelnukleotidpolymorphismus - Definition .....	5
1.4.2 Längenpolymorphismus - Definition .....	6
1.4.3 Zytostatikaresistenz-assoziierte Polymorphismen .....	7
1.4.4 Pharmakologischer Hintergrund .....	7
1.5 Untersuchungsmethoden der Polymorphismen .....	11
1.6 Aufgabenstellung.....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Untersuchungsmaterial .....	13
2.2 Bestimmung der MRD .....	13
2.3 Untersuchung der Genpolymorphismen.....	14
2.3.1 Primerdesign und -testung .....	15
2.3.2 PCR-Ansätze.....	15
2.4 Agarosegelelektrophorese .....	19
2.5 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	19
2.6 Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte .....	19
2.6.1 Auswahl der Sequenzierprimer .....	19
2.6.2 Sequenzierprotokolle.....	19
2.6.3 Fragmentanalyse.....	20
2.7 Geräte und Reagenzien .....	21
2.8 Statistische Auswertung .....	22
3 Ergebnisse .....	23
3.1 Charakteristika des Patientenkollektivs .....	23
3.2 Frequenz der nachgewiesenen Genpolymorphismen.....	23
3.2.1 Längenpolymorphismus-Analyse der Thymidylat-Synthase .....	23
3.2.2 SNP-Analyse von weiteren Enzymen des Folatmetabolismus.....	24
3.2.3 SNP-Analyse der Thiopurin-Methyltransferase (TPMT).....	24

3.3 Genpolymorphismen und Kinetik der minimalen Resterkrankung .....	25
3.3.1 Genpolymorphismen des MTX-Metabolismus .....	26
3.3.2 Genpolymorphismen des 6-MP-Metabolismus .....	29
3.4 Prognostische Bedeutung der Genpolymorphismen .....	31
3.4.1 Thiopurin-Methyltransferase.....	31
3.4.2 Enzyme des MTX- Metabolismus.....	34
3.5 Interaktionen der Genpolymorphismen .....	35
4 Diskussion .....	38
5 Zusammenfassung .....	45
6 Tabellenverzeichnis.....	48
7 Abbildungsverzeichnis.....	49
8 Anhang A.....	50
9 Referenzen.....	54
10 Danksagung .....	64
11 Curriculum vitae.....	65
12 Veröffentlichungen zum Dissertationsthema.....	66

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) des Erwachsenen ist eine maligne Erkrankung unreifer lymphatischer Vorläuferzellen aus Knochenmark, Thymus oder lymphatischem Gewebe. Entsprechend der physiologischen Differenzierung der Lymphozyten werden ALLs, die sich von B-lymphatischen Vorläuferzellen ableiten (B-Vorläufer-ALL, precursor-B-ALL) von denen mit T-Zell-Eigenschaften (T-ALL) unterschieden. Durch die autonome Proliferation der lymphatischen Blasten kommt es zu einer Verdrängung der normalen Blutbildung mit folgender hämatopoetischer Insuffizienz sowie Ausschwemmung der Blasten in das periphere Blut.

Die Gesamtinzidenz der ALL beträgt 1,6/100000/Jahr<sup>1</sup>, wobei sie mit 80% aller Leukämien die häufigste Leukämie bei Kindern in der ersten Lebensdekade darstellt, während bei Erwachsenen etwa 20% der von einer akuten Leukämie Betroffenen an einer ALL erkrankt sind. Fortschritte in der Therapie der ALL haben dazu geführt, dass zur Zeit mehr als 95% aller pädiatrischen und etwa 90% aller erwachsenen Patienten eine komplette morphologische Remission erreichen.

Die Ursachen der Erkrankung sind weitgehend unbekannt, es werden aber prädisponierende Faktoren wie eine hohe Strahlenexposition, Exposition gegenüber myelotoxischen Substanzen (Benzol, Chloramphenicol, Zytostatika), seltene hereditäre Erkrankungen wie zum Beispiel Trisomie 21 (18-fach erhöhtes Risiko) und Virusinfektionen (HTLV I und II, EBV) diskutiert.

Patienten mit ALL leiden zunächst an unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit und Abgeschlagenheit, gelegentlich Dyspnoe, später auch Blutungen und Infekten. Bei Beteiligung des Zentralnervensystems können auch Sensibilitätsstörungen und Paresen auftreten. Ursächlich hierfür sind sowohl die durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese bedingte Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie als auch lokale Krankheitsmanifestationen wie z.B. der Mediastinaltumor bei der T-ALL.

## 1.2 Diagnostik

### 1.2.1 Initiale Diagnostik

Die Grundlage der Diagnose einer ALL ist die zytomorphologische Beurteilung des Knochenmarks, gelegentlich kann auch eine Knochenmarkshistologie nötig sein, wenn bei einer punctio sicca kein ausreichendes Aspirat gewonnen werden konnte. Zur weiteren Klassifizierung erfolgt die durchflußzytometrische Immunphänotypisierung, wobei in Europa weiterhin in der Regel die EGIL-Klassifikation verwendet wird<sup>2</sup>. Zytogenetische Aberrationen lassen sich bei über 80% der kindlichen ALL und 60-70% der erwachsenen ALL<sup>3</sup> nachweisen. Im Erwachsenenalter hat derzeit im Wesentlichen die (molekular)genetische Detektion der Translokation t(9;22) *BCR-ABL* sowie der Translokationen des *MLL*-Gens auf Chromosom 11, am häufigsten die t(4;11) *MLL-AF4*, eine klinische Bedeutung, da diese unmittelbaren Einfluß auf die weitere Therapie haben<sup>4</sup>.

### 1.2.2 Untersuchung der minimalen Resterkrankung (minimal residual disease, MRD)

Die Tumorlast bei Diagnosestellung einer ALL beträgt etwa  $10^{10}$  bis  $10^{12}$  maligner Zellen im Körper, was einer Tumormasse von 10g bis 1kg entspricht<sup>4</sup>. Bei Erreichen einer kompletten klinischen Remission wird der Tumorzellanteil im Knochenmark definitionsgemäß auf unter 5% reduziert, was bedeutet, dass noch bis zu  $10^{10}$  Tumorzellen vorhanden sein können, die diesem diagnostischen Nachweis entgehen<sup>5</sup>. Nach gegenwärtiger Auffassung stellen diese verbliebenen Tumorzellen den Ausgangspunkt für ein späteres Rezidiv dar, so dass in den letzten Jahren unterschiedliche Methoden zur sensitiven Erfassung und Quantifizierung der als *minimale Resterkrankung* (minimal residuale disease, MRD) bezeichneten verbliebenen Tumorzellen entwickelt wurden. Methoden zum MRD-Nachweis sind die Multiparameter-Durchflußzytometrie und die quantitative Realtime-PCR wobei als Zielgene sowohl Fusionsgene als auch klonale Immungen-Rearrangments verwendet werden.

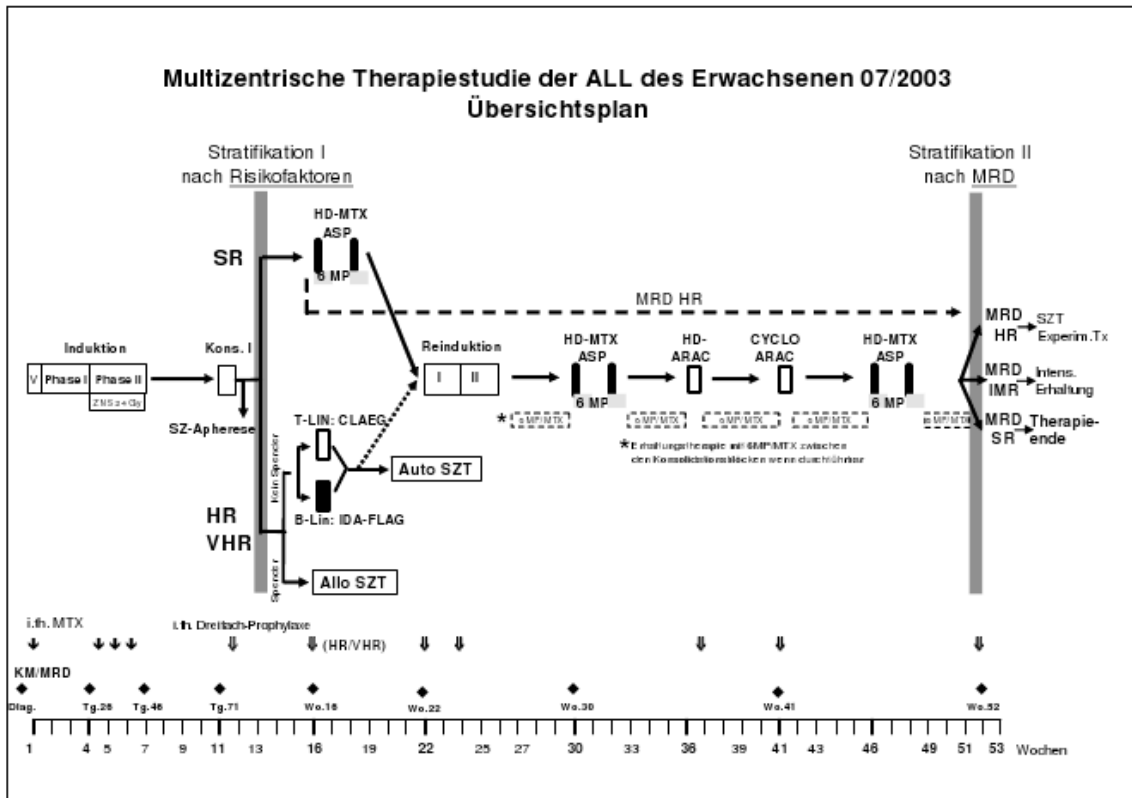


Abb. 1: **GMALL 07/2003-Protokoll**

Schematische Darstellung des GMALL 07/2003-Protokolls. Die Stratifikation II nach MRD zu Ende des 1. Therapiejahres teilt die Patienten entsprechend der Last der Resterkrankung keiner Erhaltung, intensivierte Erhaltungstherapie und Stammzelltransplantation zu. Zusätzlich werden bereits im ersten Therapiejahr Patienten bei MRD-Persistenz  $>10^{-4}$  nach Konsolidation I der Stammzelltransplantation zugeordnet.

### 1.3 Therapie

Die Standardtherapie der ALL im Rahmen der GMALL 07/2003-Studie (Rekrutierung bis 30.06.2011) bestand aus einer risikoadaptierten Chemotherapie mit wechselnden Zytostatikakombinationen, die durch eine spezifische Prophylaxe von ZNS-Rezidiven und bei ZNS- oder Mediastinalbefall durch Strahlentherapie ergänzt wurde (siehe Abb. 1 und Kurzprotokoll im Anhang A). Die Risikostratifikation fand in diesem Protokoll sowohl anhand konventioneller Risikofaktoren als auch anhand des MRD-Verlaufes statt.

### **1.3.1 Risikostratifizierung**

#### **1.3.1.1 Konventionelle Risikofaktoren**

In der GMALL 07/2003 galten als Hochrisikomerkmale (high risk, HR) der Immunphänotyp einer proB-ALL, einer prä/proT-ALL oder reifen T-ALL, eine Translokation mit Beteiligung des *MLL*-Gens, das Nichterreichen einer morphologischen Remission nach Induktion I, sowie im Fall einer B-Vorläufer-ALL eine initiale Leukozytenzahl von  $> 30/\text{nl}$ . Die Patienten mit  $t(9;22)$  wurden in einem eigenen Protokoll behandelt und traditionell als Höchststrisikogruppe (very high risk, VHR) bezeichnet. Aufgrund einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 50% bei konventioneller Therapie qualifizierten sich Patienten der Hoch- und Höchststrisikogruppe für eine allogene Stammzelltransplantation in erster klinischer Remission<sup>6,7</sup>. Patienten der Standardrisikogruppe (SR) erhielten dagegen eine konventionelle Chemotherapie.

#### **1.3.1.2 MRD-basierte Risikostratifikation**

Aufgrund der inzwischen sowohl für die kindliche als auch für die ALL des Erwachsenen nachgewiesene prognostische Bedeutung der MRD<sup>6,7,45,46</sup> fand in der GMALL 07/2003-Studie bei Standardrisikopatienten eine weitere Stratifikation in Abhängigkeit vom MRD-Niveau statt. Dabei erhielten Patienten mit niedriger MRD-Last ( $<1 \times 10^{-4}$  an Tag 71, MRD-Negativität zu allen folgenden Zeitpunkten) eine Therapiereduktion in Form eines Verzichts auf eine Erhaltungstherapie mit fortgesetztem MRD-Monitoring während Patienten mit hoher MRD-Last ( $>1 \times 10^{-4}$  an zwei aufeinanderfolgenden Meßzeitpunkten nach Therapietag 71) einer allogenen Stammzelltransplantation (SZT) zugeführt wurden. Die verbleibenden Patienten (Intermediärrisiko) erhielten eine 12-monatige intensivierete Erhaltungstherapie.

### **1.3.2 Ablauf der Therapie**

Alle Patienten erhielten zunächst eine einheitliche Induktionstherapie (Vorphase, Induktion I und II) und Konsolidation I, basierend auf den Chemotherapeutika Methotrexat (MTX), Dexamethason (DEXA), Cyclophosphamid (CYCLO), Vincristin (VC), Daunorubicin (DAUNO), pegylierter Asparaginase (ASP), Cytarabin (ARAC), 6-Mercaptopurin (6-MP), Vindesin (VD) und Etoposid (VP16). Bei Patienten mit B-Vorläufer-ALL und Expression von CD20 erfolgte darüberhinaus vor den ersten drei



Chemotherapiezyklen (Induktion I, II und Konsolidation I) je eine zusätzliche Immuntherapie mit dem monoklonalen anti-CD20-Antikörper Rituximab. Standardrisiko-Patienten erhielten bis Woche 49 alternierende Chemotherapiezyklen (Hochdosis-(HD-)MTX/ASP, Reinduktion, HDMTX/ASP, Hochdosis-(HD-)ARAC, CYCLO/ ARAC, HDMTX/ASP). Patienten mit B-Vorläufer-ALL und Expression von CD20 erhielten vor den Konsolidationsblöcken II bis V weitere 5 Gaben Rituximab. Bei Patienten mit MRD-Niedrigrisiko zum Ende des ersten Therapiejahres wurde die Therapie unter Fortsetzung der MRD-Kontrollen beendet, bei MRD-Hochrisiko intensiviert (Stammzelltransplantation). Patienten mit MRD-Intermediärrisiko bekamen eine intensivierte Erhaltungstherapie basierend auf einer Wiederholung der Konsolidationszyklen des ersten Therapiejahres mit zwischenzeitlicher Gabe von 6-MP und MTX. Hochrisiko-Patienten wurden nach Konsolidation I einer allogenen SZT (Familien- oder Fremdspender) zugeführt. Patienten ohne Spender erhielten die nach Subtyp unterschiedliche Konsolidation II (T-Linien-ALL: CLAEg, B-Vorläufer ALL: IDA-FLAG) und im Anschluß ggf. eine autologe SZT (siehe Kurzprotokoll im Anhang A).

#### **1.4 Bedeutung von genetischen Polymorphismen bei der ALL**

Genetische Polymorphismen sind in einer Population auftretende Genvarianten. Man unterscheidet verschiedene Arten von Polymorphismen, wobei in dieser Arbeit nur Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) und Längenpolymorphismen untersucht wurden. In Abgrenzung zur Mutation wird in der klassischen Definition eine minore Allelfrequenz (minor allele frequency, MAF), d.h. eine Häufigkeit des selteneren Allels, von > 1% gefordert.

##### **1.4.1 Einzelnukleotidpolymorphismus - Definition**

Ein Einzelnukleotidpolymorphismus ist eine Variation der DNA-Sequenz, die sich auf den Austausch eines einzelnen Nukleotids bezieht. In der Regel existieren für einen solchen Polymorphismus zwei Allele, gelegentlich aber auch mehr. Die öffentlichen Datenbanken wie dbSNP (build 124) enthalten mehr als 10 Millionen solcher Polymorphismen, deren Frequenz sich in unterschiedlichen ethnischen Gruppen unterscheiden kann.

Während SNPs, die zu einem Austausch der Aminosäure führen, offensichtlich die Funktion der entsprechenden Proteine beeinflussen können, ist dies bei stummen (silent oder synonymous) Polymorphismen weniger klar. Aber auch diese können über Beeinflussung der Stabilität der mRNA oder – wenn sie in nicht kodierenden Regionen liegen – über die Transkriptionsregelung, die Effektivität der RNA-Prozessierung, die Expression unterschiedlicher Isoformen oder die Induktion epigenetischer Veränderungen die Bildung des jeweiligen Proteins beeinflussen. SNPs werden mit der Ätiologie menschlicher Erkrankungen in Verbindung gebracht und haben auch hinsichtlich ihres Zusammenhangs mit der Vorhersage der Reaktion auf Medikamente, der Pharmakogenetik, eine zunehmende Bedeutung erlangt. Da SNPs definitionsgemäß evolutionär konserviert sind, werden sie als Marker zur Analyse von Regionen quantitativer Merkmale (quantitative trait loci, QTLs) und in genetischen Assoziationsstudien anstelle von Mikrosatellitenmarkern verwendet. Der Analyse der Gesamtheit der SNPs im menschlichen Genom widmet sich das HapMap project (<http://snp.cshl.org>).

#### **1.4.2 Längenpolymorphismus - Definition**

Eine weitere Form von Polymorphismen sind die sogenannten Längenpolymorphismen, bei denen es sich um Wiederholungen nichtkodierender DNA-Abschnitte handelt, die bei unterschiedlichen Menschen unterschiedlich häufig vorkommen. Regelmäßig treten diese im Genom in Form von Mikrosatelliten auf und werden z.B. für die Vaterschaftsdiagnostik genutzt. Es gibt allerdings auch Längenpolymorphismen im Bereich des Promotors von Genen, durch die das Expressionsniveau des jeweiligen Gens verändert wird<sup>8</sup>.

Mehrere Studien zur ALL im Kindesalter haben Hinweise für eine Bedeutung genetischer Polymorphismen hinsichtlich des Therapieansprechens gezeigt<sup>9-17</sup>. Allerdings ist bei der Untersuchung derartiger Kandidaten-Polymorphismen zu beachten, dass diese nicht notwendigerweise direkt für den beobachteten Effekt verantwortlich sein müssen, sondern unter Umständen lediglich in einem starken Gametenungleichgewicht (linkage disequilibrium) mit der kausalen genetischen Veränderung sind.

### 1.4.3 Zytostatikaresistenz-assoziierte Polymorphismen

Offensichtliche Kandidaten für therapierelevante Polymorphismen sind unter anderem solche, die einen Einfluß auf Enzyme in Zytostatika-metabolisierenden Stoffwechselwegen haben. Die Abb. 2 zeigt die zur Behandlung in der GMALL-Therapiestudie 07/2003 eingesetzten Chemotherapeutika für die ersten 16 Wochen der Behandlung. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Polymorphismen mit beschriebenem Einfluß auf den Metabolismus von Methotrexat und 6-Mercaptopurin hinsichtlich des Therapieansprechens bei der ALL des Erwachsenen untersucht. Dabei wurde neben den in Tab. 1 (Kapitel 2.3) aufgeführten Einzelnukleotidpolymorphismen auch der *Thymidylat-Synthase (TS 2R/3R)* Promotor-Längenpolymorphismus untersucht, der im MTX-Metabolismus eine Rolle spielt.

<b>Vorphase</b> Tag 1-5	<b>Methotrexat</b> , Dexamethason, Cyclophosphamid
<b>Induktionstherapie</b> Phase I: Tag 6-20 Phase II: Tag 26-46	Dexamethason, Vincristin, Daunorubicin, PEG-Asparaginase, Cyclophosphamid, Cytarabin, <b>6-Mercaptopurin</b> → <b>MRD-Kontrolle: Tag 26, Tag 46, Tag 71</b>
<b>Konsolidationsphase</b> Block I: Tag 71- 75	Dexamethason, Vindesin, <b>Hochdosis-Methotrexat</b> , Etoposid, Hochdosis-Cytarabin → <b>MRD-Kontrolle: Woche 16</b>

Abb. 2: Systemisch applizierte Chemotherapeutika der Standardrisikotherapie bis Therapietag 75.

### 1.4.4 Pharmakologischer Hintergrund

**6-Mercaptopurin (6-MP)** ist ein Purinantagonist und bewirkt eine kompetitive Hemmung von Enzymen der Purinsynthese. Es wird in der ALL-Therapie des Erwachsenen in allen Therapiezyklen, also in der Induktions-, Konsolidations- und Erhaltungstherapie, eingesetzt. Bei der Substanz handelt es sich um ein Prodrug, das durch eine mehrschrittige metabolische Aktivierung zu 6-Thioguanosin

Nukleotiden umgewandelt wird, die auf mehreren Stufen die Purinsynthese hemmen (siehe Abb. 3).

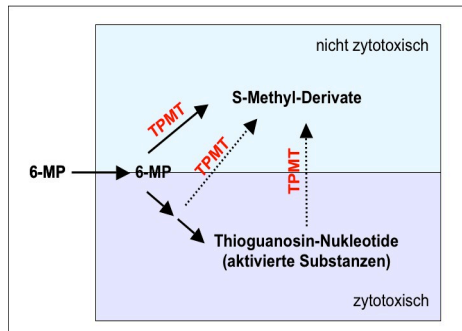


Abb. 3: **Metabolismus von 6-Mercaptopurin**

Die zytotoxische Wirkung des 6-Mercaptopurin (6-MP) beruht auf einer mehrschrittigen metabolischen Aktivierung zu 6-Thioguanosin-Nukleotiden. Die Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) kompetiert diesen Aktivierungsprozeß durch S-Methylierung der verschiedenen Metabolite.

Die **Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT)** ist ein Enzym, das die Detoxifikation von Mercaptopurinderivaten bewirkt<sup>12</sup>. Zum jetzigen Zeitpunkt sind mehr als zwanzig verschiedene allelische Varianten beschrieben, von denen die meisten im Vergleich zum Wildtyp-Allel eine verringerte enzymatische Aktivität aufweisen<sup>12</sup>.

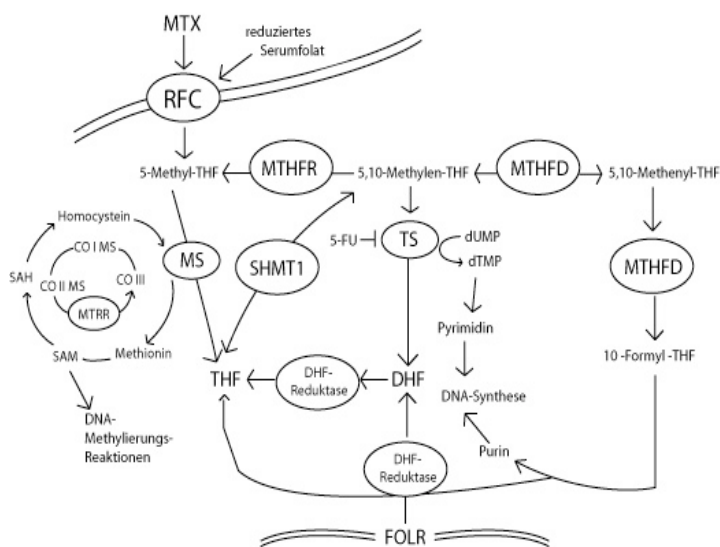
Allel	Genort 460	Genort 719
<b>TPMT *1</b> (Wildtyp) 93,9%-94,7% §	<b>G</b>	<b>A</b>
<b>TPMT *3A</b> 3,2%-5,7% §§	<b>A</b>	<b>G</b>
<b>TPMT *3B</b> sehr selten §§§	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>TPMT *3C</b> 0,2%-08% §	<b>G</b>	<b>G</b>

Abb. 4: Die vier häufigsten allelischen Varianten der Thiopurin-Methyltransferase (TPMT). Häufigkeiten nach §McLeod et al., Br J Haematol 1999<sup>28</sup>, §§McLeod et al., Leukemia 2000<sup>29</sup>, §§§Evans, W., J Pediatr Hematol Oncol, 2002<sup>30</sup>.

Dies führt bei für das variante Allel homozygoten Patienten zu kaum meßbarer TPMT-Aktivität und in der Folge bei Behandlung mit Standarddosen von 6-MP bzw. 6-TG (Thioguanin) zu einer schweren hämatopoetischen Toxizität<sup>10,18</sup>. Abbildung 4 zeigt die vier häufigsten und in dieser Arbeit untersuchten Varianten.

Die Rationale für die Untersuchung dieses SNP in unserem Kollektiv sind die Ergebnisse mehrerer Studien. Die Arbeit von Lennard et al.<sup>19</sup> zeigte eine höhere Rezidivrate bei Kindern mit ALL mit geringer Thioguanosin-Nukleotid-Konzentration in Erythrozyten. Stanulla et al.<sup>20</sup> zeigte für die ALL des Kindes, dass das Vorkommen von allelischen Varianten der TPMT einen signifikanten Einfluss auf den Abfall der minimalen Resterkrankung (MRD) nach Mercaptopurin-haltiger Konsolidierungstherapie hat. In einer vor kurzem erschienen Arbeit von Schmiegelow et al.<sup>21</sup> wurde deutlich, dass die Aktivität der TPMT mit dem Rezidivrisiko einer ALL bei Kindern korreliert.

**Hochdosis-Methotrexat (HD-MTX)** gilt neben Hochdosis-AraC als entscheidendes ZNS-gängiges Therapeutikum in der Postinduktionstherapie der ALL des Erwachsenen. MTX ist ein Folsäureantagonist, der durch aktiven Transport in die Zelle aufgenommen wird und intrazellulär in Form von MTX-Polyglutamaten akkumuliert. In der oxigenierten Form des 10-Formyl-Tetrahydrofolat (THF) stellt das THF einen wesentlichen Cofaktor der Purinsynthese dar, so dass diese bei einem Mangel gehemmt wird. Dabei dient THF in Form des 5,10-Methylen-THF als Methylgruppen-Donor für die Thymidinsynthese, dessen reduzierte Form 5-Methyl-THF zur Bildung des Methylgruppenüberträgers S-Adenosyl-Methionin (SAM) benötigt wird. Abb. 5 stellt schematisch die Enzyme des Folsäuremetabolismus dar.



- RFC: Reduced folat carrier
- MTRR: Methionin-Synthase-Reduktase
- MS (MTR): Methionin-Synthase (5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyltransferase)
- SHMT1: Serin-Hydroxymethyltransferase
- MTHFR: Methylen-THF-Reduktase
- TS: Thymidylat-Synthase
- MTHFD: Methylen-THF-Dehydrogenase
- FOLR: Folatrezeptor
- THF: Tetrahydrofolat
- DHF: Dihydrofolat
- MTX: Methotrexat
- Co(I)MS: Cob(I)alamin
- Co(II)MS: Cob(II)alamin
- Co(III): Cob(III)alamin
- SAM: S-Adenosylmethionin

Abb. 5: Schematische Darstellung des Folsäuremetabolismus

Für viele am Folsäuremetabolismus beteiligten Enzyme, sowie für den Transporter „**reduced folate carrier 1**“ (**RFC 1**), der für die Aufnahme von MTX und Folaten in die Zelle verantwortlich ist, sind Einzelnukleotidpolymorphismen beschrieben.

Der Transporter RFC1 ist verantwortlich für die Aufnahme von MTX und Folaten in die Zelle<sup>22</sup>. Von Chango et al.<sup>23</sup> ist ein Polymorphismus (*RFC1 G80A*) innerhalb der ersten Transmembrandomäne beschrieben, der an der Aminosäureposition 27 zum Ersatz von Arginin durch Histidin führt und in homozygoter Form zu einem höheren Plasmafolatspiegel führt. Der genaue Zusammenhang zwischen MTX-Resistenz und Plasmafolat-Gehalt ist jedoch nicht geklärt.

Die **Methylen tetrahydrofolat-Dehydrogenase (MTHFD1)** besitzt drei Enzymaktivitäten (Methylen-THF-Dehydrogenase, Methenyl-THF-Cyclohydrolase, 10-Formyl-THF-Synthetase). Der Polymorphismus *MTHFD1 G1958A* bewirkt eine Substitution von Arginin 653 durch Glutamin mit funktionellen Auswirkungen auf die 10-Formyl-THF-Synthetase-Aktivität.

Ein Dimorphismus der cytosolischen Serin-Hydroxymethyltransferase (**SHMT1**), *SHMT1 C1420T* (Leucin 474 Phenylalanin), führt in biallelischer Form zu einem erhöhten Homocystein-Gehalt und einem reduzierten Plasma-Folat-Gehalt.

Zwei Polymorphismen der Methylen tetrahydrofolat-Reduktase (**MTHFR**), *C677T* (Alanin 222 Valin) und *A1298C* (Glutamat 429 Alanin) bewirken eine verringerte Enzymaktivität und dadurch veränderte Anteile der intrazellulären Folat-Metabolite<sup>24-26</sup>. Der erste Polymorphismus liegt in der Bindestelle für den MTHFR Kofaktor FAD<sup>27</sup>. Der Genotyp *677TT* besitzt *in vitro* nur eine 30%ige Enzymaktivität der Wildtyp-Form<sup>24</sup>. Der zweite Polymorphismus ist in der SAM-regulatorischen Domäne lokalisiert, durch die die MTHFR bei hohem SAM-Gehalt in einer negativen Rückkopplung inhibiert wird. Beide Polymorphismen treten sehr selten zusammen auf<sup>26</sup>.

Für die **Thymidylat-Synthase (TS)** ist ein Promotorlängenpolymorphismus beschrieben, bei der eine 28 bp-Sequenz in der 5'-untranslatierten Region vor dem Startcodon doppelt oder dreifach vorliegt (*TS 2R/3R*), wobei der 2R-Genotyp im zellulären Expressionsassay mit einer geringeren Expression des Proteins einhergeht<sup>8</sup>.

**5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyltransferase (MTR)** katalysiert die Übertragung einer Methylgruppe von 5-Methyl-THF auf Homocystein wobei Methionin und THF gebildet wird. Der *A2756G* (Aspartat 919 Glycin-)

Polymorphismus ist wiederum mit einer Verringerung der Enzymaktivität assoziiert und der Genotyp AA ist mit einer Erhöhung des Homocystein-Gehalts verbunden.

Die Bedeutung des Polymorphismus A66G (Isoleucin 22 Methionin) der **Methionin-Synthase-Reduktase (MTRR)** ist mehrfach untersucht, aber sein Einfluss auf den Folat-Metabolismus ist noch umstritten.

### 1.5 Untersuchungsmethoden der Polymorphismen

Mit der zunehmenden Verbreitung der Untersuchung von SNPs einhergehend wurde auch eine Vielzahl von Methoden zu ihrer Analyse entwickelt, die sich hinsichtlich ihrer Durchsatzgeschwindigkeit und ihres Anwendungsgebietes unterscheiden.

Die traditionelle Sequenziermethode nach Sanger ist zwar ein relativ aufwendiges und teures Verfahren, es ist jedoch gut geeignet, um kurze DNA-Abschnitte verlässlich zu untersuchen. Für die Analyse größerer DNA-Abschnitte werden neue automatisierte Hochdurchsatz-Sequenziermethoden, das sogenannte Next Generation Sequencing, angewendet, z.B. die Pyrosequenzierung (pyrosequencing)<sup>31</sup>. Neben der Sequenzierung gibt es auch andere Methoden zum SNP-Nachweis, die aber in der vorliegenden Arbeit keine Anwendung finden und deshalb nur kurz beschrieben werden. Hier sei auf die ausführliche Literatur verwiesen<sup>31-44</sup>.

Bei allen **Hybridisierungsmethoden** (z. B. die dynamische allelspezifische Hybridisierung<sup>32</sup>, Nachweis mittels molecular beacons<sup>33</sup> oder hochdichte SNP-Arrays) werden die jeweiligen SNPs durch Anlagerung einer komplementären DNA-Sequenz nachgewiesen. Ebenfalls allen Hybridisierungsmethoden gemeinsam ist damit auch die technische Schwierigkeit, eine Kreuzhybridisierung der allelspezifischen Sonden durch Optimierung der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen zu vermeiden.

Auch **enzymbasierte Methoden** finden Anwendung<sup>34-40</sup>. Als älteste und einfachste Methode zum Nachweis von SNPs wird die Analyse von Restriktionslängenpolymorphismen (restriction length polymorphisms, RLFPs) angesehen. Weitere Methoden sind die tetraprimer amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR<sup>34</sup>, der Invader®-Assay<sup>35</sup>, die spezifische Primerextension oder 5'-Exonuclease (TaqMan®) Assay<sup>36-39</sup>.

Andere Detektionsmethoden nutzen spezifische **physikochemische DNA-Eigenschaften** wie die Schmelztemperatur des Amplikons oder Konformitätsänderungen der Einzelstränge, um verschiedene Amplifikate zu unterscheiden und so Polymorphismen zu erkennen. Beispiele hierfür sind die Einzelstrangkonnformations-Polymorphismen-Analyse <sup>41</sup>, die Temperaturgradienten-elektrophorese <sup>42</sup>, die denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie <sup>43</sup> oder die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse <sup>44</sup>. Gemeinsam ist allen diesen Methoden, dass sie sehr oft eine hohe Spezifität erreichen, jedoch dies um den Preis einer sorgfältigen Optimierung für jedes Assay, was sie zur parallelen Untersuchung einer größeren Anzahl von SNPs ungeeignet macht.

### **1.6 Aufgabenstellung**

Ziel dieser Arbeit war es, definierte genetische Polymorphismen mit einem potentiellen Einfluss auf die Effektivität bestimmter Elemente der ALL-Therapie zu analysieren.

Hierzu sollten gezielt Polymorphismen untersucht werden, für die ein möglicher Einfluss auf Enzyme des Methotrexat- oder 6-Mercaptopurin-Metabolismus beschrieben ist, da beide Chemotherapeutika wichtige Elemente der Standard-Chemotherapie der ALL darstellen. Für die einzelnen Polymorphismen sollten PCR- und Sequenzierungsassays etabliert werden, die anschließend auf prospektiv asservierte konsekutive Proben von erwachsenen ALL-Patienten angewendet werden sollten. Es wurde hierbei ein großes homogen behandeltes Kollektiv erwachsener ALL-Patienten, die im Standard-Therapiearm der Deutschen Multizentrischen ALL-Studie (GMALL) behandelt wurden, untersucht und der Einfluss des Genotyps auf das Therapieansprechen der Patienten analysiert.

Als Surrogatparameter des Therapieansprechens diene hierbei neben Überlebensdaten auch die minimale Resterkrankung (MRD) vor und nach Gabe der entsprechenden Chemotherapeutika. Dieses Vorgehen erlaubt eine bessere Beurteilung der isolierten Effektivität der Therapieelemente Methotrexat und 6-Mercaptopurin als die alleinige Korrelation mit dem Gesamtüberleben.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Die untersuchten Materialien stammten von Patienten der Standardrisikogruppe der Studien GMALL 06/99 oder 07/03, für die Material zur zentralen MRD-Diagnostik nach Kiel geschickt wurde und die der Verwendung des nach Durchführung der in der Studie vorgesehenen Diagnostik verbliebenen Materials für wissenschaftliche Untersuchungen zugestimmt hatten. Eingeschlossen wurden konsekutive Patienten mit Erstdiagnose ihrer Erkrankung zwischen dem 01.07.1999 und 30.06.2006. Die Studien wurden entsprechend der Deklaration von Helsinki durchgeführt und waren sowohl von der Ethikkommission der Studienzentrale in Frankfurt als auch den lokalen Ethikkommissionen der Studienzentren genehmigt.

### 2.2 Bestimmung der MRD

Die MRD wurde im Rahmen der GMALL 06/99 und 07/03-Studien für die Standardrisikopatienten mittels quantitativer realtime-PCR von leukämiespezifischen Immungen-Rearrangements untersucht.

Dazu wurde mittels Konsensus-PCRs das primärdiagnostische Material auf Umlagerungen des Immunglobulin-Schwerketten (*IGH*)-Gens, des Immunglobulin  $\kappa$ -Leichtkettengens mit dem  $\kappa$ -deleting element (*IGK-KDE*), der Gene der T-Zell Rezeptoren  $\beta$  (*TCRB*),  $\gamma$  (*TCRG*), und  $\delta$  (*TCRD*), sowie bei T-ALLs zusätzlich auf das Vorliegen einer *TAL1*-Deletion untersucht. Anschließend wurden klonale Rearrangements sequenziert und für die leukämiespezifische Sequenz ein Allel-spezifisches Oligonukleotid (ASO) designt, mit dessen Hilfe dann eine patientenspezifische quantitative realtime-PCR der junktionalen Region des rearrangierten Immungens anhand einer aus dem Primärmaterial erstellten Verdünnungsreihe durchgeführt wurde. Das klonenspezifische PCR-Produkt wird während der PCR („real time“) mit Hilfe einer Konsensus TaqMan<sup>®</sup>-Sonde quantitativ nachgewiesen. So wird eine exakte Bestimmung der residuellen Tumorzellen mit einer Empfindlichkeit von bis zu einer klonalen Zelle vor dem Hintergrund von  $10^4$  bis  $10^5$  polyklonaler Zellen erreicht. Die MRD-Bestimmungen erfolgten im Rahmen der Routinediagnostik entsprechend dem im GMALL-Protokoll vorgegebenen Schema (siehe Abb. 1, technische Details in <sup>45</sup>). Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte entsprechend der Richtlinien der European Study Group on MRD Detection in ALL

(ehemals ESG MRD-ALL, jetzt Euro MRD) <sup>46</sup>. Hierzu wurden zunächst für jeden etablierten klonspezifischen Assay die Nachweisgrenze und die Grenze des quantitativen Messbereichs bestimmt. Im Falle eines MRD-Nachweises im quantitativen Messbereichs wurde das jeweilige MRD-Niveau als relativer Wert (Zahl Leukämiezellen/Gesamtzahl untersuchter Zellen) angegeben. Im Falle eines MRD-Nachweises unterhalb des quantitativen Messbereichs (quantitative range, QR) des jeweiligen Assays lautete das Ergebnis positiv < QR. Im Falle eines fehlenden MRD-Nachweises lautete das Ergebnis MRD negativ (mit Angabe der Nachweisgrenze).

### 2.3 Untersuchung der Genpolymorphismen

Die in Tabelle 1 aufgeführten Einzelnukleotidpolymorphismen wurden durch Direktsequenzierung von mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) genomischer DNA amplifizierter Fragmente untersucht. Der *TS 2R/3R* Längenpolymorphismus wurde ebenfalls mittels PCR amplifiziert und anhand der unterschiedlichen Längen der Amplifikate in der Gelelektrophorese unterschieden.

Zielgen	Basenaustauschposition	Aminosäure-Austauschposition	Chromosom	Exon	Referenz	Häufigkeit der Allele	Heterozygote	Beeinflußter Zytostatikametabolismus
<i>RFC1</i>	A80G	His 27 Arg	21q22.3	3	rs1051266	G:0,509 A:0,491	0,500	MTX
<i>SHMT1</i>	C1420T	Leu 474 Phe	17p11.2	12	rs1979277	G:0,754 A:0,246	0,371	MTX
<i>MTHFD1</i>	G1958A	Arg 653 Gln	14q24	20	rs2236225	T: 0,654 C: 0,346	0,452	MTX
<i>MTHFR</i>	C677T	Ala 222 Val	1p36.3	4	rs1801133	C:0,676 T:0,324	0,438	MTX
<i>MTHFR</i>	A1298G	Glu 429 Ala	1p36.3	7	rs1801131	A:0,771 C:0,229	0,353	MTX
<i>MTR</i>	A2756G	Asp 919 Gly	1q43	26	rs1805087	A:0,807 G:0,193	0,311	MTX
<i>MTRR</i>	A66G	Ile 22 Met	5p15.3	2	rs1801394	A:0,623 G:0,377	0,470	MTX
<i>TPMT</i>	G460A	Ala 154 Thr	6p22.3	6	rs115680 60	G:0,983 A:0,017	0,033	6-MP
<i>TPMT</i>	A719G	Tyr 240 Cys	6p22.3	9	rs1142345	A:0,954 G:0,046	0,088	6-MP

Tab. 1: **Untersuchte Zytostatikaresistenz-assoziierte genetische Polymorphismen**

(nach "Reference SNP ID" der RefSNP-Datenbank (unter NCBI))

### 2.3.1 Primerdesign und -testung

Die Primer wurden entweder mit Hilfe der Website Mutation discovery <http://www.mutationdiscovery.com> neu designt oder es wurden bekannte Primersequenzen aus der Literatur verwendet (*SHMT1 C1420T*<sup>47</sup>, *MTHFR A1298C*<sup>25</sup>, *MTHFR C677T*<sup>24</sup>, *MTR A2756G*<sup>47</sup>, *TS 2R/3R*<sup>8</sup>). Anschließend wurden die Primersequenzen mit Hilfe des Programms Primer Express (Applied Biosystems) hinsichtlich einheitlicher Schmelztemperaturen und Vermeidung der Bildung von Primerdimeren optimiert.

Die Primer (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland) wurden im Anschluß zunächst in Singleplex-Ansätzen und anschließend im Multiplex-Ansatz getestet, wobei die Primer für die SNPs *SHMT1 C1420T*, *MTRR A66G*, *MTHFD 1* und *MTHFR A1298C* in einer Multiplex-PCR, die Primer für die SNPs *TPMT G460A*, *TPMT A719G* und *MTHFR C677T* in einer zweiten Multiplex-PCR kombiniert wurden. Die Untersuchung des *RFC 1 G80A-SNP* und des *MTR A2756G-SNP* wurden als Singleplex-PCRs durchgeführt, ebenso die Untersuchung des Längenpolymorphismus *TS 2R/3R*. Bei letzterem wurde die PCR unter Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) durchgeführt, da die ersten PCR-Ergebnisse Mehrfachbanden zeigten, was in Anbetracht der Amplifikation einer repetitiven Sequenz nicht erstaunt. Die optimale Konzentration (siehe Tab. 11) wurde durch schrittweise Optimierung der PCR ermittelt. Die Validierung dieses Assays erfolgte über einen Vergleich mit der Direktsequenzierung in 20 konsekutiven Fällen (Daten nicht gezeigt).

### 2.3.2 PCR-Ansätze

Jede Probe wurde in insgesamt fünf verschiedenen PCR-Ansätzen analysiert, von denen zwei als Multiplex-, drei als Singleplex-PCR durchgeführt wurden (siehe Tab. 2 bis 11).

Aufgrund der Detektion des Polymorphismus mittels Gelelektrophorese und einer Besonderheit im PCR-Ansatz wurde die PCR für den Polymorphismus der *TS 2R/3R* ebenfalls in einem Einzelansatz durchgeführt.

Tab. 2: **Primersequenzen der Multiplex-PCR I**

Primer	Oligonukleotidsequenz	PCR-Produkt
<i>SHMT 1 C1420T</i> forward*	5'- gTg Tgg ggT gAC TCA TTT gTg	290 bp
<i>SHMT 1 C1420T</i> reverse	5'- ggA gCA gCT CAT CCA TCT CTC	
<i>MTRR A66G</i> forward*	5'- Aag gCC ATT TCA TAT TAT gTg Tgg gTA	292 bp
<i>MTRR A66G</i> reverse	5'- CTg TAA Cgg CTC TAA CCT TAT Cgg ATT C	
<i>MTHFD 1 F1958A</i> forward	5'- CAC TCC AgT gTT TgT CCA Tg	329 bp
<i>MTHFD 1 F1958A</i> reverse*	5'- gCA TCT TgA gAg CCC TgA C	
<i>MTHFR A1298C</i> forward*	5'- CTT Tgg ggA gCT gAA ggA CTA	163 bp
<i>MTHFR A1298C</i> reverse	5'- CAC TTT gTg ACC ATT CCg gTT T	

Tabelle 2,4,6,8: Primer mit Einfachstern (\*) wurden zur Sequenzierung benutzt.

Tab. 3: **Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der Multiplex-PCR I**

Multiplex-PCR I	µl/ Ansatz	Konzentration/Ansatz	Temp.	Zeit	Zyklus
DNA	1	1 ng/µl			
dNTP'S (100mM)	0,4	0,2 mM	94°C	10 min	1
Puffer (10x)	5		94°C	45 sec	40
MgCl (25mM)	4	2 mM	63°C	60 sec	40
Primer-Mix I	1,6	2mM	72°C	45 sec	40
AmpliTaQ Gold (5U/µl)	0,25	1,25U/Ansatz	72°C	10 min	1
Aqua	ad 50		RT		

Tab. 4: **Primersequenzen der Multiplex-PCR II**

Primer	Sequenz	PCR-Produkt
<i>TPMT G460A</i> forward*	5'- gCA gAC gTg AgA TCC TAA TAC C	318 bp
<i>TPMT G460A</i> reverse	5'- TCC AAA CAT AAT AAC CTA TTT CAA AC	
<i>TPMT A719G</i> forward	5'- CCA AAg TgT Tgg gAT TAC Agg	244 bp
<i>TPMT A719G</i> reverse*	5'- CAT gTC AgT gTg ATT TTA TTT TAT CTA Tg	
<i>MTHFR C677T</i> forward	5'- TgA Agg AgA Agg TgT CTg Cgg	198 bp
<i>MTHFR C677T</i> reverse	5'- Agg Acg gTg Cgg TgA gAg Tg	
<i>MTHFR C677T</i> reverse 2**	5'- ggA gCT TAT ggg CTC TCC Tg	

Tabelle 4: Für die *MTHFR C677T* reverse 2 wurde ein separater Sequenzierprimer (\*\*) hergestellt.

Tab. 5: **Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der Multiplex-PCR II**

Multiplex-PCR II	µl/ Ansatz	Konzentration/Ansatz	Temp.	Zeit	Zyklus
DNA	1	1 ng/µl			
dNTP`S (100mM)	0,4	0,2 mM	94°C	10 min	1
Puffer (10x)	5		94°C	45 sec	40
MgCl (25mM)	4	2 mM	60°C	60 sec	40
Primer-Mix II	2	1,6 mM	72°C	45 sec	40
AmpITaq Gold (5U/µl)	0,25	1,25U/Ansatz	72°C	10 min	1
Aqua	ad 50		4°C	10 min	1

Tab. 6: **Primersequenzen der PCR MTR A2756G**

Primer	Sequenz	PCR-Produkt
<i>MTR A2756G forward</i>	5'- TgT TCC CAg CTg TTA gAT gAA AAT C	211 bp
<i>MTR A2756G reverse*</i>	5'- gAT CCA AAg CCT TTT ACA CTC CTC	

Tab. 7: **Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der PCR MTR A2756G**

PCR MS A2756G	µl/ Ansatz	Konzentration/Ansatz	Temp.	Zeit	Zyklus
DNA	1	1 ng/µl			
dNTP`S (100mM)	0,4	0,2 mM	94°C	10 min	1
Puffer (10x)	5		94°C	45 sec	40
MgCl (25mM)	4	2 mM	63°C	60 sec	40
<i>MTR A2756G forw.Primer</i>	0,5	0,2	72°C	45 sec	40
<i>MTR A2756G rev.Primer</i>	0,5	0,2 mM	72°C	10 min	1
AmpITaq Gold (5U/µl)	0,25	1,25U/Ansatz	4°C	10 min	1
Aqua	ad 50				

Tab. 8: **Primersequenzen der PCR RFC1 G80A**

Primer	Sequenz	PCR-Produkt
<i>RFC 1 G80A forward</i>	5'- CgT ggA ACC Tgg gCC TgA	162 bp
<i>RFC 1 G80A reverse*</i>	5'- CAC CCA CAT gCC TgC TCC	

Tab. 9: **Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der PCR RFC1 G80A**

PCR RFC1 G80A	µl/ Ansatz	Konzentration/Ansatz	Temp.	Zeit	Zyklus
DNA	1	1 ng/µl			
dNTP`S (100mM)	0,4	0,2 mM	94°C	10 min	1
Puffer (10x)	5		94°C	45 sec	40
MgCl (25mM)	4	2 mM	63°C	60 sec	40
RFC 1 G80A forw. Primer (10pmol/Ansatz)	0,2		72°C	45 sec	40
RFC 1 G80A rev. Primer (10pmol/Ansatz)	0,2	0,4 mM	72°C	10 min	1
AmpITaq Gold (5U/µl)	0,25	1,25U/Ansatz	4°C	10 min	1
Aqua	38,35				

Tab. 10: **Primersequenzen der PCR TS 2R/3R**

Primer	Sequenz	PCR-Produkt
TS 2R/3R forward	5`- gTg gCT CCT gCg TTT CCC CC	220 repeat: 2R 250 repeat: 3R
TS 2R/3R reverse	5`- gCT CCg AgC Cgg CCA Cag gCA Tgg CgC gg	

Tab. 11: **Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der PCR TS 2R/3R**

	µl/ Ansatz	Konzentration/Ansatz	Temp.	Zeit	Zyklus
DNA	0,5	0,5 ng/µl			
dNTP`S (100mM)	0,4	0,2 mM	94°C	10 min	1
Puffer (10x)	5		94°C	30 sec	35
DMSO	2,5	10,0%	60°C	30 sec	35
MgCl (25mM)	4	2 mM	72°C	60 sec	35
TS 2R/3R forward Primer (20pmol/Ansatz)	0,2	0,8 µM	72°C	10 min	1
TS 2R/3R reverse Primer (20pmol/Ansatz)	0,2	0,8 µM	4°C	10 min	1
AmpITaq Gold (5U/µl)	0,125	0,625U/Ansatz			
Aqua	ad 25				

## **2.4 Agarosegelelektrophorese**

Zur Darstellung des *TS 2R/3R*-Polymorphismus wurden 4 µl des nicht aufgereinigten PCR-Produktes mit 2 µl Gel-Auftragspuffer in einem Ethidiumbromid-gefärbeten 2%igen Agarosegel mit TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Als Längenstandard diente eine 100-Basenpaarleiter. Die Dokumentation der separierten PCR-Produkte geschah mittels Polaroid-Fotographie unter UV-Licht.

## **2.5 Aufreinigung der PCR-Produkte**

Für die Aufreinigung der Multiplex-Ansätze I-II und der Einzelansätze *RFC 1 G80A* und *MTR A2756G* wurden die 50µl-Ansätze auf eine sogenannte CleanUp-Platte aufpipettiert. Die DNA wird durch zwei Sepharose-Gelfiltrationen mittels Anlegen eines Vakuums an der CleanUp-Platte von nicht mehr benötigten Rückständen, den Nukleotiden, Puffer- und Magnesiumrückständen, sowie der AmpliTaq-Polymerase gereinigt.

## **2.6 Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte**

Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger (1977) durch Einbau fluoreszenzmarkierter Dideoxynukleotide und anschließender Auftrennung der entstandenen Amplifikate in einem Kapillarsequenzierer. Dabei wird das kettenabbrechende Nukleotid anhand des Fluoreszenzfarbstoffes erkannt und die Sequenz automatisch durch die Auswertesoftware ermittelt.

### **2.6.1 Auswahl der Sequenzierprimer**

Generell wurden für die Sequenzieransätze die gleichen Primer benutzt wie für die PCR-Ansätze (siehe Tab. 2 bis 10). Die Ausnahme bildete die Sequenzierung des *MTHFR 677* PCR-Produktes, für das ein separater Sequenzierprimer benutzt wurde (siehe Tab. 4).

### **2.6.2 Sequenzierprotokolle**

Alle Primer wurden in verschiedenen Sequenzierprotokollen getestet, um den Sequenzieransatz mit dem bestmöglichen Ergebnis herauszufiltern. Insgesamt

entstanden dadurch vier verschiedene Sequenzierprotokolle, die sich in der Menge der dem Ansatz zugefügten aufgereinigten PCR-Produkte unterscheiden.

Beispielhaft werden Ansatz und Cyclerprotokoll der Sequenzierreaktion für die Sequenz des *Thiopurin-Methyltransferase G460A*-Polymorphismus aufgeführt (Tab. 12).

Tab. 12: **Beispiel für eine Sequenzierreaktion (TPMT G460A)**

	<b>µl/ Ansatz</b>		<b>Temp.</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklus</b>
5x Puffer	7				
Aqua	7		96°C	5 min	1
Big Dye	1		96°C	10 sec	50
<i>TPMT G460A</i> forward (10 pmol/ µl)	1		55°C	5 sec	50
			60°C	4 min	1
Aufgereinigtes PCR-Produkt	4		4°C	10 min	1
Gesamt	20				

### 2.6.3 Fragmentanalyse

Die Aufreinigung der Sequenzieransätze erfolgte mittels Zentrifugation über eine Sepharose-Minisäule (Sephadex G50, Pharmacia). Die zu sequenzierende cDNA wurde in 10 µl eines HID-Formamid-Denaturierungspuffers aufgenommen. Die Fragmentanalyse erfolgte auf dem Kapillarsequencer 3100 der Firma Applied Biosystems, die anschließende Auswertung mittels der Analyse-Software SDS 2.0 derselben Firma.



## 2.7 Geräte und Reagenzien

Die für die Versuche benötigten Geräte und Reagenzien sind in den Tabellen 13 und 14 aufgelistet:

Tab. 13: Übersicht der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Thermocycler	Applied Biosystems	GeneAmp PCR System 9700
Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnology	40-2314
Spannungsgeber	BioRad	PoerPac 300
UV-Transilluminator	Spectroline	TC-312-A
Kamera, Film	Polaroid	Polaroid MP Land Camera, Polaroid 677
PCR-Aufreinigungsplatte	Millipore	MANU03010
Unterdruck-Rahmen	Millipore	Multi-Screen 384
Tisch-Kleinzentrifuge	Eppendorf	54150
Doppel-Plattenzentrifuge	Heraeus	Labofuge 400
Sepharose-System	Millipore	Multiscreen MAHVN4510
Automatischer Sequenzierer	Applied Biosystems	ABI-3100 Avant
Laborwaage	Sartorius	PT-1200
Rotations-Mischer	Scientific Industries	Vortex Gene 2 G560E

Tab. 14: Übersicht der eingesetzten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Anwendung
DNTP Mix	Carl Roth	PCR
GeneAmp 10xPCR Puffer	Applied Biosystems	PCR
MgCl		PCR
AmpliTaq Gold DANN Polymerase	Applied Biosystems	PCR
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich	PCR
Oligonukleotide (Primer, Sonden)	TIB Molbiol	PCR, Sequenzierung
Agarose	Life Technologies	Agarose-Gelelektrophorese
1xTBE-Puffer	Merck	Agarose-Gelelektrophorese
Ethidiumbromid, ~95% HPLC	Sigma-Aldrich	Agarose-Gelelektrophorese
Auftragspuffer (Bromphenolblau 0,2%)	Sigma-Aldrich	Agarose-Gelelektrophorese
Low-DNA-Mass-Ladder	Invitrogen Co.	Agarose-Gelelektrophorese
5xPuffer		Sequenzierung
BigDye1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	Sequenzierung
Sephadex G-50 Fine Sepharose	GE Healthcare	Sequenzierung
HiDi Formamid	Applied Biosystems	Sequenzierung
POP-6 Polymer for Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Sequenzierung

## 2.8 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Überlebensdaten erfolgte nach der Methode von Kaplan und Meier<sup>48</sup>, die Messung des Einflusses einer Variable auf das Überleben wurde mittels des logrank-Tests überprüft<sup>49</sup>. Sämtliche Ergebnisse wurden zunächst graphisch und deskriptiv analysiert, eine formale statistische Testung erfolgte nur, wenn sich aus diesen Analysen Hinweise für bedeutsame Unterschiede ergaben. Da für alle untersuchten SNPs bereits in anderen Arbeiten eine Assoziation mit den Behandlungsergebnissen der Erkrankung gezeigt wurde, betrachteten wir unsere Ergebnisse als individuelle Tests zum Bestätigen oder Verwerfen dieser Hypothese für das untersuchte Kollektiv. Die Tests wurden daher individuell mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% interpretiert und nicht auf eine Gesamtirrtumswahrscheinlichkeit von 5% korrigiert. Die Zahl der durchgeführten Tests wurde jedoch aufgrund der oben erwähnten deskriptiven und graphischen Analyse auf ein Minimum reduziert.

Die Interaktionen zwischen den einzelnen SNPs wurden mit Hilfe der logischen Regression auf der Basis des Quine-McCluskey-Algorithmus berechnet (siehe Schwender und Ickstadt<sup>50</sup>), wobei der Algorithmus automatisch für multiple Vergleiche korrigiert.

Die statistischen Berechnungen und Grafiken wurden mittels der statistischen Programmiersprache R (<http://www.r-project.org>, R version 2.10.1 (2009-12-14)) erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakteristika des Patientenkollektivs

Es wurden 367 Patienten mit Standardrisiko-ALL untersucht. Das Geschlechterverhältnis (weiblich/männlich) betrug 123 zu 244. 189 Patienten wurden im Rahmen der Studie 06/99, 177 im Rahmen der Studie 07/03 behandelt. Das mediane Alter der Patienten betrug 30 Jahre (15 - 64). 221 hatten eine prä-B/c-ALL, 146 eine thyT-ALL. Die mediane Leukozytenzahl zum Zeitpunkt der Diagnose betrug bei den Patienten mit prä-B/c-ALL 4700/ $\mu$ l (700 - 81800/ $\mu$ l), bei den Patienten mit thyT-ALL 41300/ $\mu$ l (1640 - 731100/ $\mu$ l).

### 3.2 Frequenz der nachgewiesenen Genpolymorphismen

#### 3.2.1 Längenpolymorphismus-Analyse der Thymidylat-Synthase mittels Agarosegelelektrophorese

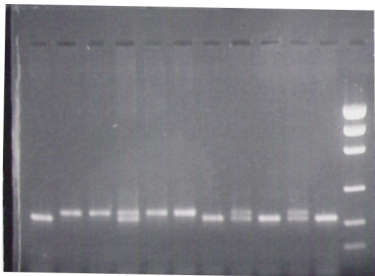


Abb. 6: Mögliche Ergebnisse der Analyse des TS-Längenpolymorphismus.

*Homozygot 2R*: Untere Einzelbande

*Homozygot 3R*: Obere Einzelbande

*Heterozygot 2R/3R*: Doppelbande

Von den 367 untersuchten Patienten waren 93 (25,3%) homozygot für *TS 2R*, 102 (27,8%) waren homozygot für *TS 3R* und 165 (45,0%) Patienten waren Träger der heterozygoten Variante *TS 2R/3R*. Bei 7 (1,9%) Patienten konnte der Typ des Längenpolymorphismus nicht identifiziert werden. Von 221 Patienten mit B-Vorläufer-ALL wiesen 56 (25,3%) den homozygoten *TS 2R*-Genotyp auf, 60 (27,1%) waren homozygot für den *TS 3R*-Genotyp und 103 (46,6%) waren heterozygot. Die Zahl der Patienten mit nicht bestimmbarem Genotyp betrug 2 (0,9%). Von den 146 T-ALL Patienten wurde bei 37 (25,3%) der homozygote *TS 2R*-Genotyp, bei 42 (28,8%) der homozygote *TS 3R*-Genotyp, bei 62 (42,5%) der heterozygote Genotyp nachgewiesen und bei 5 (3,4%) blieb die Untersuchung ohne Ergebnis.

### 3.2.2 SNP-Analyse von weiteren Enzymen des Folatmetabolismus

Die Verteilung der einzelnen Genotypen der den MTX-Metabolismus betreffenden SNPs *RFC1 G80A*, *SHMT1 C1420T*, *MTHFD1 G1958A*, *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTR A2756G* und *MTRR A66G* sind aufgrund einer besseren Übersicht in tabellarischer Form zusammengefasst (siehe Tab. 15).

SNP	Wildtyp (%)	Heterozygoter SNP (%)	Homozygoter SNP (%)	nicht bestimmbar (%)
<i>MTRR A66G</i>	83 (23%)	184 (50%)	93 (25%)	7 (2%)
<i>MTHFR A1298C</i>	159 (43%)	149 (41%)	51 (14%)	8 (2%)
<i>MTHFR C677T</i>	159 (43%)	156 (43%)	45 (12%)	7 (2%)
<i>MTHFD1 G1958A</i>	122 (33%)	180 (49%)	56 (15%)	9 (2%)
<i>RFC1 G80A</i>	119 (32%)	182 (50%)	57 (16%)	9 (2%)
<i>SHMT1 C1420T</i>	182 (50%)	147 (40%)	31 (8%)	7 (2%)
<i>MTR A2756G</i>	229 (63%)	115 (31%)	16 (4%)	7 (2%)

Tab.15: Verteilung der den MTX-Metabolismus beeinflussenden SNPs.

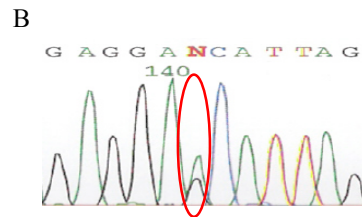
### 3.2.3 SNP-Analyse der Thiopurin-Methyltransferase (TPMT)

In Abb. 4 sind die in dieser Arbeit untersuchten 4 häufigsten allelischen Varianten der TPMT schematisch dargestellt. Da keine allelspezifische PCR durchgeführt wurde, ist es nicht möglich, den Genotyp *TPMT\*1/\*3A* vom Genotyp *TPMT\*3B/\*3C* zu unterscheiden. Beide zeigen an beiden SNPs ein heterozygoten Signal. Aufgrund der großen Seltenheit des *TPMT\*3B/\*3C*-Genotyps (siehe Abb. 4) wurde daher bei diesem Ergebnis das Vorliegen des Genotyps *TPMT\*1/\*3A* angenommen.

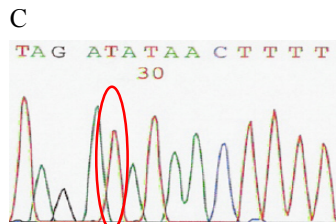
Abb. 7 a-d zeigt Beispiele jeweils eines homozygoten bzw. heterozygoten Sequenzierungsergebnisses. Die Sequenzierung des PCR-Produktes für den *TPMT 460-SNP* wurde mit einem vorwärtsgerichteten und die des PCR-Produktes für den *TPMT 719-SNP* mit einem rückwärtsgerichteten Primer durchgeführt.



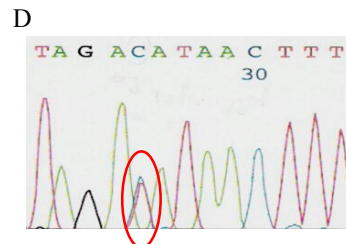
Beispiel eines homozygoten Sequenzierergebnisses mit einem vorwärtsgerichteten Primer. *TPMT* 460GG



Beispiel eines heterozygoten Sequenzierergebnisses mit einem vorwärtsgerichteten Primer. *TPMT* 460AG



Beispiel eines homozygoten Sequenzierergebnisses mit einem rückwärtsgerichteten Primer. *TPMT* 719AA.



Beispiel eines heterozygoten Sequenzierergebnisses mit einem rückwärtsgerichteten Primer. *TPMT* 719AG.

Abb. 7: Beispiele für Sequenzierergebnisse von SNPs des *TPMT*-Gens

Von den 367 Patienten ließ sich bei 333 (90,7%) der homozygote Wildtyp *TPMT*\*1/\*1 nachweisen, bei 18 (4,9%) der heterozygote Typ *TPMT*\*1/\*3A, bei 2 (0,5%) der heterozygote Typ *TPMT*\*1/\*3B und bei 4 (1,1%) der heterozygote Typ *TPMT*\*1/\*3C. Bei 10 (2,7%) ließ sich der Genotyp nicht bestimmen. Es fand sich kein Patient mit homozygot mutierter Variante.

Von 221 Patienten mit B-Vorläufer-ALL wiesen 200 (90,5%) den homozygoten Wildtyp *TPMT*\*1/\*1 auf, wohingegen 17 (7,7%) Patienten eine der heterozygoten Varianten, *TPMT*\*1/\*3A, \*1/\*3B, \*1/\*3C besaßen. Bei 4 (1,8%) Patienten konnte der Polymorphismus nicht bestimmt werden. Von den 146 T-ALL Patienten zeigten 133 (91,1%) den Wildtyp, 7 (4,8%) waren heterozygot und bei 6 (4,1%) Patienten konnte der Genotyp nicht bestimmt werden.

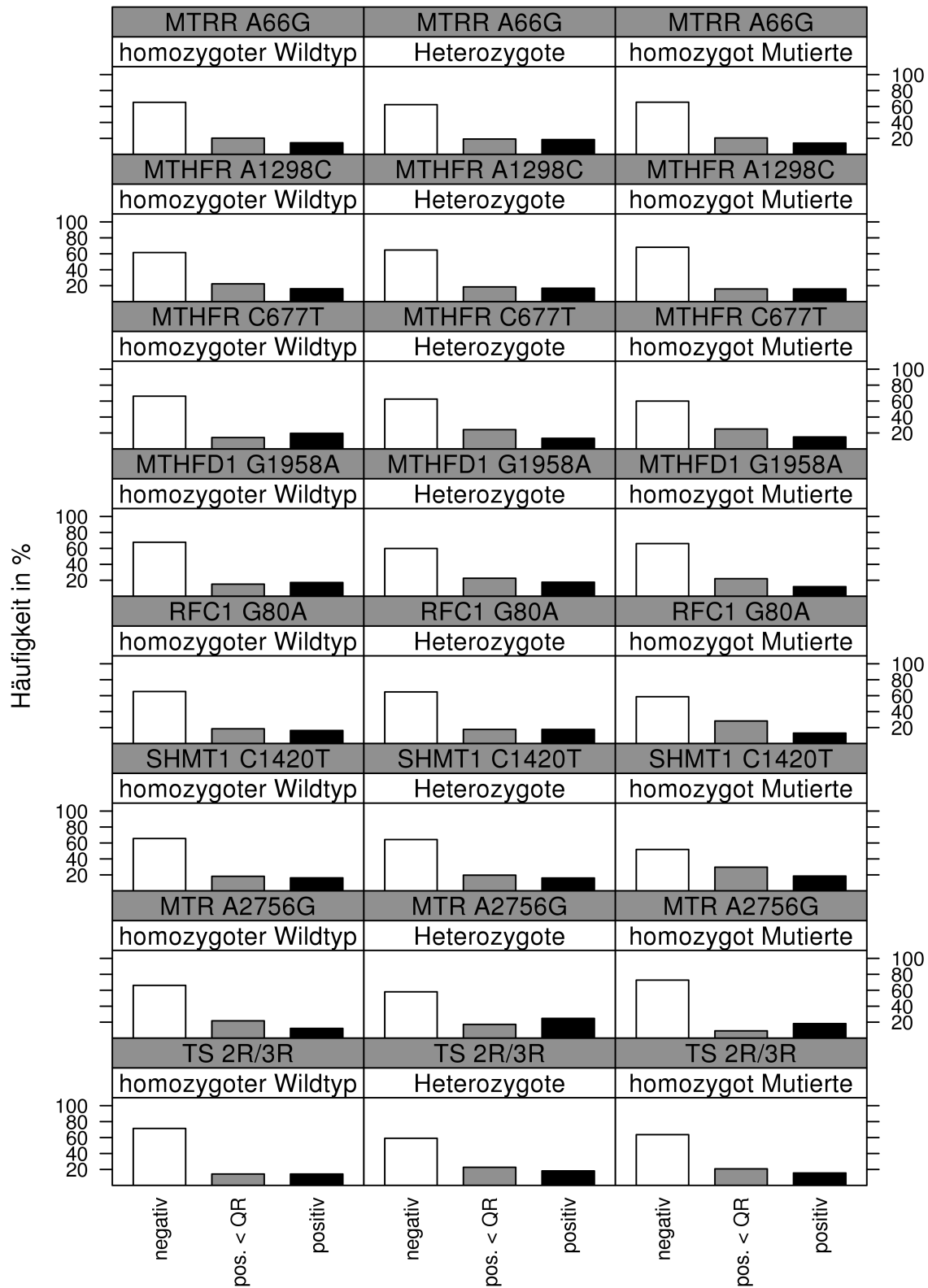
### 3.3 Genpolymorphismen und Kinetik der minimalen Resterkrankung

Die Bedeutung der Auswirkung des Vorliegens eines der untersuchten Genpolymorphismen auf die nachweisbare minimale Resterkrankung nach erstmaliger Gabe des vermutlich pharmakogenetisch beeinflussten Chemotherapeutikums wurde in zwei Gruppen untersucht: Die den Folatstoffwechsel

beeinflussenden Polymorphismen, deren Wirkung nach Gabe von MTX (ab Tag 71 im Protokoll), d.h. in der MRD-Messung von Woche 16 untersucht wurde und der den Metabolismus von 6-MP (ab Tag 33 im Protokoll) beeinflussenden TPMT, deren Wirkung bereits in der MRD-Messung an Tag 46 und 71 untersucht wurde. In diese Analysen einbezogen werden konnten alle Patienten der Ursprungsanalyse, für die zusätzlich zu den entsprechenden Verlaufszeitpunkten ein MRD-Resultat verfügbar war.

### **3.3.1 Genpolymorphismen des MTX-Metabolismus**

In die Analyse zur Bedeutung von Genpolymorphismen des MTX-Metabolismus für die MRD-Kinetik konnten 289 (MTHFD 1 G 1958A), 291 (RFC1 G80A), bzw. 293 (alle übrigen SNPs) der untersuchten Patienten herangezogen werden, für die neben einer aussagekräftigen SNP-Diagnostik des jeweiligen Zielgens auch informative MRD-Resultate zu Therapiewoche 16 verfügbar waren. Bei den Einzelanalysen der SNPs, die den Folatmetabolismus beeinflussen, war kein Genotyp zu identifizieren, der einen signifikanten prädiktiven Wert hinsichtlich des MRD-Niveaus besitzt (Abb. 8, Tab. 16). Dies spiegelt sich ebenfalls bei der Untersuchung der Polymorphismen bezüglich des Gesamt- und rezidivfreien Überlebens wider (Tab. 19).



MRD-Status nach MTX (Woche 16)

Abb. 8: Darstellung des MRD-Status nach MTX Gabe (Woche 16) in Abhängigkeit der SNPs des Folatmetabolismus. Unterteilung des MRD-Status in MRD negativ (negativ), MRD positiv unterhalb des quantitativen Messbereichs (pos.<QR) und MRD positiv im QR (pos), entsprechend den EuroMRD-Kriterien<sup>46</sup>.

**Tabelle 16: MRD nach MTX-Gabe (vor Therapiewoche 16) in Abhängigkeit der Genotypen von Enzymen des Folatmetabolismus. Unterteilung des MRD-Resultats in MRD positiv (pos.) und MRD negativ (neg.)**

SNP	MRD	Wildtypen	Heterozygoter SNP	Homozygoter SNP	p ( $\chi^2$ -Test)
MTRR A66G	pos.	24	55	27	0,9
	neg.	45	91	51	
MTHFR A1298C	pos.	50	42	14	0,7
	neg.	80	77	30	
MTHFR C677T	pos.	45	45	16	0,7
	neg.	88	75	24	
MTHFD1 G1958A	pos.	32	57	17	0,4
	neg.	67	85	33	
RFC1 G80A	pos.	32	54	19	0,7
	neg.	60	99	27	
SHMT1 C1420T	pos.	53	40	13	0,4
	neg.	101	72	14	
MTR A2756G	pos.	64	39	3	0,3
	neg.	125	54	8	
TS 2R/3R	pos.	24	54	28	0,2
	neg.	60	78	49	



### 3.3.2 Genpolymorphismen des 6-MP-Metabolismus

Das Vorliegen eines bestimmten *TPMT*-Allels war nicht mit einem signifikanten Einfluß auf das Überleben verbunden (siehe Tab. 17). Alle der unter 3.2.3 genannten, vom homozygoten Wildtyp *TPMT*\*1/\*1 abweichenden genetischen Varianten führen zu einer herabgesetzten Enzymaktivität der *TPMT*, so dass diese für die Analyse eines möglichen Einflusses auf das MRD-Niveau nach 6-MP-Therapie gemeinsam betrachtet wurden.

<i>TPMT</i> -Genotyp	N	5-Jahres Gesamtüberleben	5-Jahres rezidivfreies Überl.	
*1 / *1	333	64,1% (95%-CI 58,2-70,5%)	50,5% (95%-CI 44,1-57,9%)	
<i>TPMT</i> G460A (rs11568060)	*1 / *3A	18	79,9% (95%-CI 61,6-100%)	69,3% (95%-CI 47,0-100%)
+	*1 / *3B	2	n.d.	n.d.
<i>TPMT</i> A719G (rs1142345)	*1 / *3C	4	100%	100%
	n.d.	10		

n.d. = nicht definiert

Tabelle 17: 5-Jahres Gesamt- und rezidivfreies Überleben der Patienten in Abhängigkeit vom *TPMT* Genotyp. Referenz-IDs der SNPs (rs) entsprechend der RefSNP-database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Analog zu den Analysen von Stanulla et al.<sup>20</sup> wurde auch der Zusammenhang der MRD-Kinetik unter Therapie mit 6-MP und dem *TPMT*-Genotyp untersucht. Hierzu wurde die MRD vor und nach erstmaliger 6-MP-Gabe vergleichend analysiert. Die an Tag 11 und 26 gemessene MRD (vor erstmaliger Gabe von 6-MP) wurden zum höheren der beiden Meßwerte zusammengefaßt, die MRD von Tag 46 und 71 (nach Gabe von 6-MP) zum niedrigeren der beiden Meßwerte. Von 300 Patienten lagen informative MRD-Resultate der entsprechenden Untersuchungszeitpunkte für diese Analyse vor (181 mit B-Vorläufer-ALL, 119 mit T-ALL). Am zusammengefaßten Zeitpunkt vor 6-MP waren noch 239 der 300 Patienten MRD-positiv (79.7%), zum kombinierten Zeitpunkt nach 6-MP-Gabe waren es noch 103 (34%) der 300 Patienten (siehe Tab. 18).

Ergänzend wurde der initiale MRD-Abfall der Patienten mit homozygotem Wildtyp der untersuchten Genloci mit dem der *TPMT*-Heterozygoten verglichen. Zwar zeigte sich ein Trend zu einer erhöhten MRD-Positivität der Patienten mit *TPMT*-Wildtyp im Vergleich zu den Heterozygoten (MRD-Positivität nach 6-MP-Gabe in 35% versus 17%), dieses Ergebnis erreichte allerdings keine statistische Signifikanz ( $p=0,13$ ).

Auch bei getrennter Betrachtung der Patienten nach Immunphänotyp (Prä-B/c-ALL versus T-ALL) war ein Trend, aber keine statistischer Unterschied im MRD-Ergebnis zu sehen.

Die vergleichende Untersuchung des MRD-Niveaus VOR erstmaliger 6-MP-Gabe zeigte allerdings, dass der Trend zu einer höheren Rate an MRD-Positivität bei Patienten mit TPMT-Wildtyp bereits vor 6-MP-Gabe zu beobachten war.

Bei getrennter Betrachtung der prä-B/c-ALL und T-ALL Patienten erreichte dieser Unterschied für die Gruppe der prä-B/c-ALL-Patienten statistische Signifikanz (MRD-Positivität vor 6-MP in 136/167 (81%) der prä-B/c-ALL-Patienten mit TPMT-Wildtyp versus 8/14 (57%) der TPMT-Heterozygoten prä-B/c-ALL-Patienten (p=0,041, siehe Tabelle 18, Abbildung 9).

Diese höhere Rate MRD-negativer Patienten unter den heterozygoten Variantenträgern mit prä-B/c-ALL steht in Übereinstimmung mit einem besseren Gesamt- und rezidivfreien Überleben für diese Patientengruppe, während bei heterozygoten T-ALL-Patienten kein prognostischer Unterschied zu Wildtyp-Patienten erkennbar war (siehe 3.4.1, Abb 10).

Tabelle 18: MRD-Niveaus vor und nach Gabe von 6-MP in Abhängigkeit vom TPMT-Genotyp. Zusammenfassung der MRD positiven Messergebnisse im und unterhalb des QR

	Wildtyp		Heterozygote		
	MRD-pos. (% aller WT)	MRD-neg. (% aller WT)	MRD-pos. (% aller HZ)	MRD-neg (%aller HZ)	
vor 6-MP					
<b>Gesamtkohorte</b>	<b>227 (80%)</b>	<b>55 (20%)</b>	<b>12 (67%)</b>	<b>6 (33%)</b>	<b>p = 0,22</b>
prä-B/c-ALL	136 (81%)	31 (19%)	8 (57%)	6 (43%)	p = 0,041
T-ALL	91 (79%)	24 (21%)	4 (100%)	0 (0%)	p = 0,58
nach 6-MP					
<b>Gesamtkohorte</b>	<b>100 (35%)</b>	<b>182 (65%)</b>	<b>3 (17%)</b>	<b>15 (83%)</b>	<b>p = 0,13</b>
prä-B/c-ALL	72 (43%)	95 (57%)	3 (21%)	11 (79%)	p = 0,16
T-ALL	28 (24%)	87 (76%)	0 (0%)	4 (100%)	p = 0,57

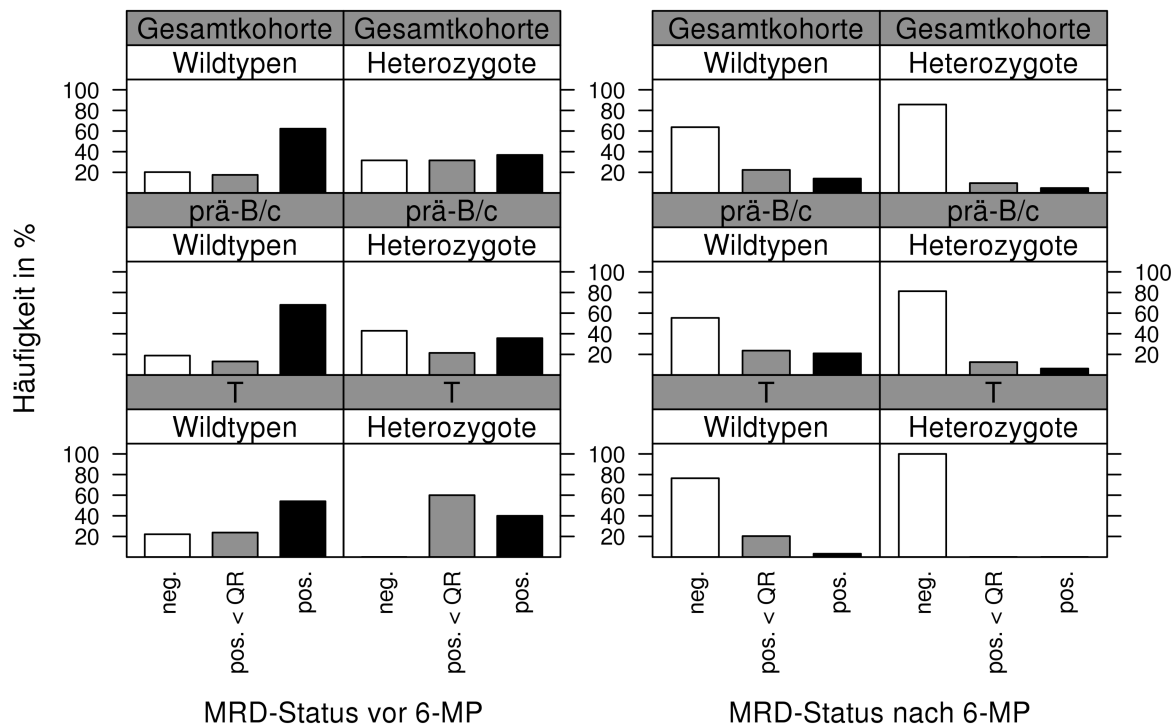


Abb. 9: Darstellung des MRD-Status nach 6-MP-Gabe bezogen auf die TPMT-SNP. Definition QR vgl. van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A<sup>46</sup>.

### 3.4 Prognostische Bedeutung der Genpolymorphismen

#### 3.4.1 Thiopurin-Methyltransferase

Die Abb. 10 zeigt die Kaplan-Meier-Schätzer für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit vom TPMT-Genotyp. In diese Analyse einbezogen werden konnten alle Patienten mit verfügbaren Daten zum Gesamt- und rezidivfreien Überleben (353 bzw. 357 Patienten). Dabei betrug das 5-Jahres-Gesamtüberleben der Gesamtkohorte 65,0% (95%-CI 59,4-71,1%), das 5-Jahres-rezidivfreie Überleben 52,1 % (95%-CI 46,0-59,1%).

Das Gesamtüberleben der homozygoten Wildtyp-Träger betrug 64,1% (95%-CI 58,2 - 70,5%), das der heterozygoten Allelträger 84,2% (95%-CI 69,0 - 100,0). Die entsprechenden Werte für das 5-Jahres-rezidivfreie Überleben sind für die homozygoten Wildtyp-Träger 57,2% (95%-CI 51,3-63,7%), für die heterozygoten Allelträger 77,0% (95%-CI 58,6 - 100,0%).

Abb. 10 stellt auch die Überlebens- bzw. Rezidivdaten differenziert nach B-Vorläufer- und T-ALL dar. Für die T-ALL zeigt sich hierbei kein Unterschied zwischen den Genotypen hinsichtlich des Gesamtüberlebens (5-Jahres-Gesamtüberleben der homozygoten Wildtypträger 65,3% (95%-CI 56,6 - 75,4%), der Heterozygoten 66,7% (95%-CI 37,9 - 100,0%,  $p = 1$ ). Auch das rezidivfreie Überleben ist identisch (5-Jahres-rezidivfreies Überleben der homozygoten Wildtypträger 57,3% (95%-CI 48,4 - 67,9%), der Heterozygoten 62,5% (95%-CI 32,0 - 100,0%,  $p = 1$ ). Dagegen besteht für die B-Vorläufer-ALL ein Unterschied sowohl hinsichtlich des Gesamtüberlebens (5-Jahres-Gesamtüberleben der homozygoten Wildtypträger 63,1% (95%-CI 55,5 - 71,8%), der Heterozygoten 93,3% (95%-CI 81,5 - 100,0%,  $p = 0,06$ ) als auch hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens (5-Jahres-rezidivfreies Überleben der homozygoten Wildtypträger 46,5% (95%-CI 38,2 - 56,6%), der Heterozygoten 82,0% (95%-CI 61,3 - 100,0%,  $p = 0,04$ ). Das heißt, für die Patienten mit B-Vorläufer-ALL war der Unterschied im Ergebnis für das rezidivfreie Überleben signifikant ( $p=0,04$ ), aber nicht für das Gesamtüberleben ( $p=0,06$ ).

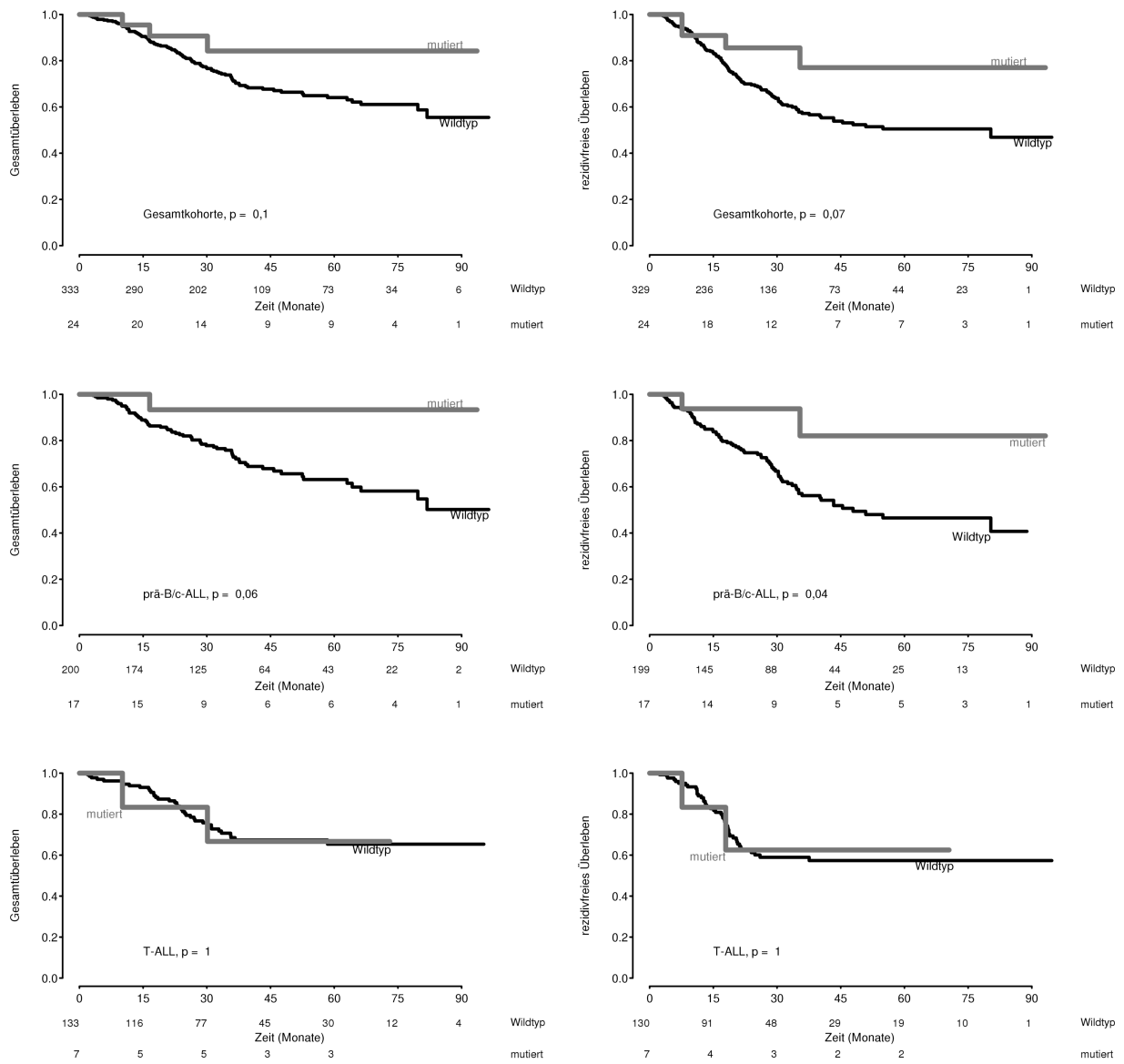


Abb. 10: Gesamt- und rezidivfreies Überleben der Kohorte ~ TPMT-SNP

### 3.4.2 Enzyme des MTX- Metabolismus

Die Ergebnisse zur prognostischen Bedeutung der übrigen untersuchten SNPs sind in Tab. 19 zusammengefaßt. Wie aus der Tabelle ersichtlich, ergeben sich aus den deskriptiven statistischen Daten keinerlei Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Genotyp und dem Gesamt- oder rezidivfreien Überleben der Patienten, so dass keine formale statistische Testung vorgenommen wurde. Dies gilt auch bei getrennter Betrachtung der immunologischen Subtypen (Daten nicht dargestellt).

SNP	Genotyp	N	5-Jahres Gesamtüberleben	5-Jahres rezidivfreies Überleben
<i>RFC1 G80A</i>	Wt	119	63,2% (95%-CI 53,2-75,1%)	53,5% (95%-CI 43,4-66,0%)
	Hz	182	66,1% (95%-CI 59,0-74,1%)	52,5% (95%-CI 44,2-62,3%)
	Mut	57	62,5% (95%-CI 46,6-83,9%)	45,1% (95%-CI 28,8-70,4%)
	n.b.	9		
<i>SHMT1 C1420T</i>	Wt	182	65,5% (95%-CI 57,8-74,2%)	52,2% (95%-CI 43,7-62,3%)
	Hz	147	65,9% (95%-CI 57,5-75,6%)	49,7% (95%-CI 40,4-61,3%)
	Mut	31	61,0% (95%-CI 43,9-84,8%)*	64,3% (95%-CI 45,4-91,1%)*
	n.b.	7		
<i>MTHFD1 G1958A</i>	Wt	122	72,0% (95%-CI 63,4-81,7%)	52,5% (95%-CI 42,1-65,6%)
	Hz	180	59,2% (95%-CI 51,2-68,5%)	50,5% (95%-CI 42,0-60,6%)
	Mut	56	71,0% (95%-CI 58,2-86,7%)	56,1% (95%-CI 42,3-74,5%)
	n.b.	9		
<i>MTHFR C677T</i>	Wt	159	63,5% (95%-CI 55,1-73,1%)	47,8% (95%-CI 38,5-59,4%)
	Hz	156	67,2% (95%-CI 59,1-76,3%)	57,8% (95%-CI 49,2-68,0%)
	Mut	45	61,4% (95%-CI 45,9-82,2%)	46,0% (95%-CI 30,4-69,7%)
	n.b.	7		
<i>MTHFR A1298C</i>	Wt	159	66,6% (95%-CI 58,4-75,9%)	54,0% (95%-CI 44,9-65,0%)
	Hz	149	63,2% (95%-CI 54,6-73,1%)	47,6% (95%-CI 38,6-58,7%)
	Mut	51	66,7% (95%-CI 53,4-83,3%)	60,6% (95%-CI 45,2-81,1%)
	n.b.	8		
<i>MTR A2756G</i>	Wt	229	63,9% (95%-CI 56,8-71,9%)	52,8% (95%-CI 45,1-61,8%)
	Hz	115	66,6% (95%-CI 57,4-77,3%)	50,9% (95%-CI 41,0-63,1%)
	Mut	16	69,6% (95%-CI 47,5-100,0%)	45,4% (95%-CI 18,0-100,0%)
	n.b.	7		
<i>MTRR A66G</i>	Wt	83	52,0% (95%-CI 38,9-69,4%)	51,3% (95%-CI 39,2-67,1%)
	Hz	184	71,8% (95%-CI 64,7-79,7%)	49,9% (95%-CI 41,1-60,6%)
	Mut	93	61,0% (95%-CI 50,9-73,1%)	55,9% (95%-CI 45,4-69,0%)
	n.b.	7		
<i>TS 2R/3R</i>	2R	93	59,4% (95%-CI 48,9-72,2%)	48,7% (95%-CI 37,1-64,0%)
	2R/3R	165	69,4% (95%-CI 61,5-78,3%)	49,4% (95%-CI 40,6-60,0%)
	3R	102	62,3% (95%-CI 51,7-75,1%)	60,2% (95%-CI 49,5-73,2%)
	n.b.	7		

Wt = homozygot Wildtyp, Hz = heterozygot, Mut = homozygot mutiert, n.b. = nicht bestimmbar  
 \* die anscheinende Diskrepanz zwischen OS und RFS ist durch 5 Patienten erklärt, die allogent transplantiert wurden und einen, der in CR verstorben ist und die daher bezüglich des RFS zensiert wurden.

Tab. 19: Gesamt- und rezidivfreies Überleben der Kohorte ~ von den untersuchten SNPs des MTX-Metabolismus.

### 3.5 Interaktionen der Genpolymorphismen

In Ergänzung zu den Einzelanalysen wurden Interaktionen zwischen den SNPs untersucht. Die dazu verwendete Methode der logischen Regression von Kombinationen Boole'scher Variablen erfordert, dass für alle analysierten Fälle sämtliche Ergebnisse vorliegen, d.h. keine Einzeluntersuchung ohne Ergebnis geblieben ist. Daher standen für diese Auswertung statt der initialen 367 Fälle nur 285 zur Verfügung.

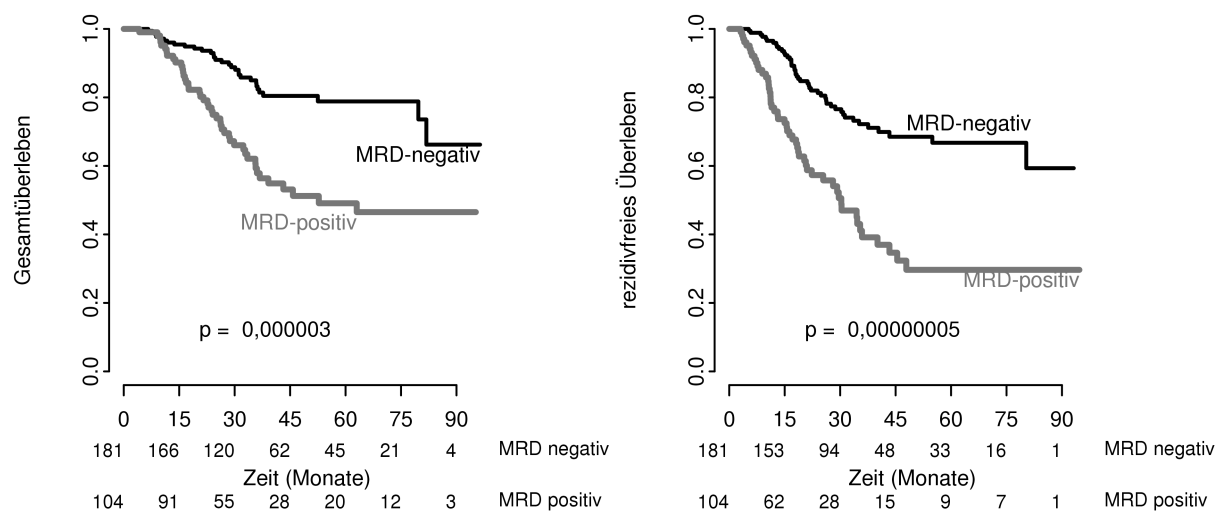


Abb. 11: Gesamt- und rezidivfreies Überleben der Kohorte ~ MRD an Woche 16

Als Statusvariable zur Zuordnung zur Fall- bzw. Kontrollgruppe wurde die MRD-Positivität bzw. Negativität zu Therapiewoche 16 gewählt, da dies der erste Zeitpunkt nach Gabe von MTX und Mercaptopurin ist. Die Therapiewoche 16 ist, wie aus Abb. 11 ersichtlich, hochsignifikant prädiktiv sowohl für das rezidivfreie wie auch für das Gesamtüberleben. Die in der anschließend durchgeführten logischen Regressionsanalyse ermittelten SNP-Kombinationen wurden dann hinsichtlich ihrer Bedeutung für das Gesamt- bzw. rezidivfreie Überleben überprüft. Die 5 in der Analyse als mit dem größten Einfluß auf die MRD identifizierte Kombinationen sind in Tab. 20 zusammengefaßt. Die dort identifizierte Gesamtzahl von 39 Vorkommen einer der Kombinationen entspricht jedoch nur 12 Patienten, da einzelne Patienten über mehr als eine Kombination identifiziert wurden. In Abb. 12 ist das Gesamt- und

rezidivfreie Überleben dieser Patienten im Vergleich zum Gesamtkollektiv dargestellt (5-Jahres-Gesamtüberleben: 46,7 % (95%-CI 24,4 - 89,3 %) gegenüber 69,0 % (95%-CI 62,7 - 75,8 %),  $p = 0,09$ ; 5-Jahres-rezidivfreies Überleben: 47,7 % (95%-CI 19,7 - 100,0 %) gegenüber 54,3 % (95%-CI 47,3 - 62,5 %),  $p = 0,8$ ).

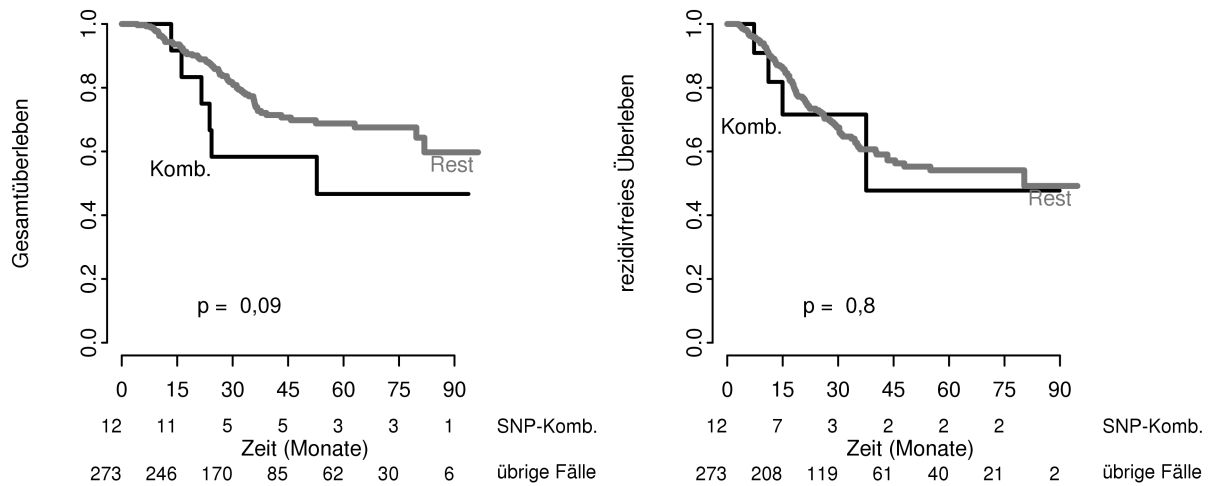


Abb. 12: **Gesamt- und rezidivfreies Überleben der Patienten mit mindestens einer der in Tab. 20 genannten SNP-Kombination.**



Genotyp		N	5-Jahres-RFS	5-Jahres-OS
SHMT1 C1420T mut MTRR A66G wt / hz TPMT G460A wt MTHFD1 G1958A wt / hz	Ja	9	72,9 % (95%-CI 46,8 - 100,0 %)	41,7 % (95%-CI 18,5 - 94,0 %)
			p = 0,7	p = 0,08
	Nein	358	53,8 % (95%-CI 46,7 - 61,9 %)	68,9 % (95%-CI 62,7 - 75,7 %)
SHMT1 C1420T mut MTRR A66G wt / hz TPMT_A719G wt RFC1 G80A hz	Ja	6	53,3 % (95%-CI 21,4 - 100,0 %)	66,7 % (95%-CI 37,9 - 100,0 %)
			p = 1	p = 1
	Nein	361	54,2 % (95%-CI 47,2 - 62,3 %)	67,4 % (95%-CI 61,0 - 74,4 %)
SHMT1 C1420T mut MTRR A66G wt / hz MTHFD1 G1958A wt / hz	Ja	9	85,7 % (95%-CI 63,3 - 100,0 %)	50,0 % (95%-CI 24,1 - 100,0 %)
			p = 0,3	p = 0,3
	Nein	358	53,5 % (95%-CI 46,4 - 61,6 %)	68,6 % (95%-CI 62,4 - 75,4 %)
MTHFR A1298C wt / hz	Ja	6	53,3 % (95%-CI 21,4 - 100,0 %)	66,7 % (95%-CI 37,9 - 100,0 %)
			p = 1	p = 1
	Nein	361	54,2 % (95%-CI 47,2 - 62,3 %)	67,4 % (95%-CI 61,0 - 74,4 %)
SHMT1 C1420T mut MTRR A66G wt / hz TPMT A719G wt MTHFD1 G1958A wt / hz	Ja	9	72,9 % (95%-CI 46,8 - 100,0 %)	41,7 % (95%-CI 18,5 - 94,0 %)
			p = 0,7	p = 0,08
	Nein	358	53,8 % (95%-CI 46,7 - 61,9 %)	68,9 % (95%-CI 62,7 - 75,7 %)

Tab. 20: SNP-Kombinationen für die Zuordnung zum Status MRD +/- in Woche 16 und ihre Bedeutung für rezidiefreies (RFS) bzw. Gesamtüberleben (OS, wt = homozygoter Wildtyp, hz = heterozygot, mut = homozygot mutiert).

## 4 Diskussion

Die Prognose von Patienten mit ALL im Kindes- und Erwachsenenalter verbesserte sich in den letzten Jahren stetig<sup>4-12,51-53</sup>.

Hier spielen individualisierte Therapiestrategien eine wichtige Rolle, bei denen versucht wird, die Therapie möglichst genau auf den Patienten und seine Erkrankung auszurichten<sup>104</sup>. Ein Beispiel für die Anwendung einer derartigen individualisierten Therapie ist die Therapiesteuerung mittels MRD<sup>54-59</sup>.

Obwohl 80-95% der erwachsenen ALL-Patienten eine komplette morphologische Remission (CR) erreichen, kommt es bei mehr als der Hälfte dieser Patienten im weiteren Verlauf zu einem Rezidiv<sup>5,61-64</sup>. Ursache der Rezidive sind residuelle maligne Zellen, die dem mikroskopischen Nachweis entgehen. Mehrere prospektive Studien haben gezeigt, dass sowohl bei erwachsenen als auch bei pädiatrischen ALL-Patienten der sensitive MRD-Nachweis mittels neuer molekularer und immunologischer Methoden einen unabhängigen Risikofaktor von hoher klinischer Relevanz darstellt, sowohl in der Primär- als auch der Rezidivtherapie und bei Patienten mit Stammzelltransplantation<sup>45,54,58,65-74</sup>. Deshalb wird die MRD-Messung inzwischen in viele Therapiestudien zur Risikostratifizierung und Therapieindividualisierung herangezogen<sup>75</sup>. Das MRD-Monitoring ermöglicht neben der Prognoseabschätzung aber auch eine verbesserte Beurteilung der Effektivität einzelner Therapieblöcke. So wird beispielsweise in einer aktuellen Studie von Conter et al.<sup>59</sup> gezeigt, dass die Patienten mit B-Vorläufer-ALL an Hand ihres MRD-Niveau bestimmten Risikogruppen zugeteilt werden können und so die Therapie erfolgreich individualisiert werden kann.

Gerade in der ALL-Chemotherapie ist die Bedeutung einzelner Therapeutika im Gesamttherapiekonzept oft unklar, da die Protokolle historisch gewachsen sind und eine Vielzahl verschiedener Medikamente in unterschiedlichen Kombinationen umfasst, die über einen Zeitraum von mehreren Jahren appliziert werden. Umso wichtiger ist die Erforschung des Beitrages einzelner Chemotherapeutika zum Gesamttherapiekonzept.

Einen weiteren vielversprechenden Ansatz, den Beitrag einzelner Zytostatika zur Therapie abzuschätzen und individuelle Toxizitäten vorherzusagen, liefert die Pharmakogenetik, die solche Vorhersagen aufgrund der genetischen Variabilität von Pharmakawirkungen trifft und somit gegebenenfalls eine Art biologische

Randomisierung der Pharmakodosierung nach genetischen Polymorphismen ermöglicht.

Eines der besten bislang untersuchten Beispiele ist in diesem Zusammenhang die Verstoffwechslung von 6-MP durch die TPMT. Bereits seit langem bekannt ist, dass ein TPMT-Defizit bei Behandlung mit Mercaptopurinen zu höheren Thioguanosin-Nukleotid(TGN)-Konzentrationen in Erythrozyten mit unter Umständen schwerer hämatopoetischer Toxizität führt<sup>76-78</sup>.

Die Daten von Stanulla et al.<sup>20</sup> legen einen Zusammenhang zwischen dem TPMT-Genotyp und dem therapeutischen Ansprechen von 6-MP, gemessen am MRD-Niveau an Therapietag 78, nahe. Kinder mit heterozygoten Allelvarianten der TPMT, die mit einer geringeren Enzymaktivität einhergehen, hatten durchschnittlich ein geringeres MRD-Niveau nach 6-MP-Gabe als solche mit dem homozygoten Wildtyp-Allel. Beide Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Therapietoxizität in dieser Behandlungsphase, so dass eine Dosisreduktion für heterozygote TPMT-Träger nach dieser Studie im Gegensatz zu Ergebnissen früherer Studien<sup>10,78</sup> nicht durchgeführt wurde. Stanulla et al. schlussfolgern aus der engen Korrelation der minimalen Resterkrankung mit dem Langzeitüberleben der ALL, dass der TPMT-Genotyp einen bedeutenden Einfluss auf die Prognose der kindlichen ALL hat und schreiben diesen Effekt der Modulation der Dosisintensität von Mercaptopurin zu, das ein zentrales Medikament nicht nur in der frühen Induktions-/Konsolidations-, sondern auch in der Erhaltungstherapie bei diesen Patienten ist. Beweisen ließe sich diese These mit einer Interventionsstudie, die bei der großen Mehrheit der Patienten, nämlich den homozygoten TPMT-Wildtyp-Trägern die Thiopurintherapie so steuert, dass auch diese Patienten die bei den heterozygoten Varianten-Trägern erreichten Wirkspiegel erzielen. Eine derartige Interventionsstudie wurde von Schmiegelow et al. mit dem Ergebnis publiziert<sup>79</sup>, dass eine an TGN- und MTX-Spiegeln orientierte pharmakologische Interventionstudie kein verbessertes Überleben durch eine individuell intensiviertere Erhaltungstherapie nachweisen konnte; es zeigte sich für die Gruppe der an ALL erkrankten Jungen kein verbessertes therapeutisches Ergebnis und für die Gruppe der Mädchen sogar eine signifikant gesteigerte Rezidivrate. Dies wurde auf eine erhöhte Rate von Neutropenien und damit verbundenen Therapieunterbrechungen bei zu starker Dosisadjustierung zurückgeführt, eine Vermutung, die in Anbetracht der Ergebnisse von Relling et al.<sup>100</sup>, wo bei 180

Kindern mit ALL zwar die Dosisintensität von 6-MP, nicht aber der TPMT-Genotyp an sich mit einem besseren rezidivfreien Überleben vergesellschaftet war und zweier weiterer Studien wahrscheinlich scheint <sup>28,80</sup>. Für die Entstehung von Zweitneoplasien gibt es differente Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung eines TPMT-Polymorphismus. Mehrere Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus und sekundären Neoplasien <sup>81,82</sup>. In einer vor kurzem von Stanulla et al. durchgeführten Studie zeigte sich, dass der TPMT-Genotyp wohl keine wichtige Rolle hinsichtlich der Ätiologie von Zweitmalignomen bei Kindern mit ALL hat <sup>83</sup>. Bei unserer Untersuchung der erwachsenen ALL-Patienten zeigte sich nach erstmaliger Thiopuringabe (Therapietag 46 und 71) eine Tendenz zu einer niedrigen Rate MRD-positiver Patienten in der Gruppe der TPMT-Heterozygoten. Auch ist bei unseren Untersuchungen eine deutliche Tendenz eines besseren Gesamtüberlebens sowie eines besseren rezidivfreien Überlebens für die heterozygoten Variantenträger im Gegensatz zu den homozygoten Wildtyp-Trägern zu sehen.

Bei getrennter Betrachtung der immunologischen Subtypen ist jedoch für die B-Vorläufer ALL ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens nachweisbar. Allerdings zeigt der Vergleich des initialen MRD-Abfalls zwischen beiden Gruppen, dass in der Gruppe der TPMT-Heterozygoten bereits früh im Therapieverlauf vor erstmaliger 6-MP-Gabe ein höherer Prozentsatz der Patienten MRD-negativ war als in der Gruppe der TPMT-Homozygoten. Bei unserer Untersuchung war dieser Unterschied signifikant. Es scheint somit, als ob die TPMT-Heterozygotengruppe generell bereits zu frühen Zeitpunkten ein niedriges MRD-Niveau erreicht und dadurch ein besseres Ansprechen aufweist als die TPMT-Wildtypträger. Ein Hinweis, dass dieses Ergebnis nicht nur für die von uns untersuchte Patientengruppe gilt, findet sich ebenfalls in der bereits oben zitierten Arbeit von Stanulla et al., da auch in dieser Untersuchung das frühe, anhand der Prednison-Response gemessene Ansprechen in der TPMT-Heterozygotengruppe mit einer Quote von nur 3,6% poor-Respondern tendenziell, wenn auch nicht statistisch signifikant, besser war als in der TPMT-Wildtypgruppe mit 10,5% poor-Respondern <sup>20</sup>.

Es ist aktueller Stand der Forschung, dass die TPMT-Aktivität für die Menge an TGN in Erythrozyten verantwortlich ist, dass aber auch andere Mercaptopurin-Metabolite wie Methylthioinosin-Monophosphat, das durch die TPMT gebildet wird, das Ausmaß

des Einbaus von TGN in die DNA und die daraus resultierende Zytotoxizität durch Hemmung der de novo Purinsynthese mit beeinflussen<sup>84</sup>. Eine Erklärung, warum bereits zu frühen Zeitpunkten, d.h. vor Gabe von 6-Mercaptopurin, die MRD in der TPMT-Heterozygotengruppe tendenziell niedriger ist, läßt sich daraus nicht ableiten. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine durch eine niedrigere TPMT-Aktivität bedingte Verschiebung der Verhältnisse intermediärer Produkte des Purinstoffwechsels auch zu veränderter Wirksamkeit anderer Zytostatika führt.

Von den zahlreichen weiteren Polymorphismen der am Metabolismus der bei der ALL eingesetzten Chemotherapeutika beteiligten Enzyme sind die des Folatmetabolismus von besonderem Interesse, da sie die Wirkung von MTX als Folsäureantagonist entscheidend beeinflussen und MTX zentraler Bestandteil nahezu jeden ALL-Protokolls ist.

Bei Gesunden korreliert die homozygote Wildtyp-Variante des *RFC1 G80A*-Polymorphismus mit einem geringeren Plasmafolatgehalt und hohem Homocysteingehalt<sup>23</sup> und wurde mit einer erhöhten Frequenz bei Kindern mit Neuralrohrdefekten gefunden<sup>85,86</sup>. Da die Folat- und Homocystein-Homeostase durch die MTX-Wirkung beeinflusst wird<sup>87,88</sup>, ist es möglich, dass Polymorphismen des *RFC1 G80A* das Outcome von mit MTX behandelten Patienten beeinflusst. So fanden Laverdière et al.<sup>16</sup>, dass die homozygot mutierte Variante des Polymorphismus *RFC1 G80A* bei der ALL des Kindes zu höheren MTX-Plasmaspiegeln und einer Verschlechterung der Prognose führt. Gorlick et al. zeigten, dass bei rezidierten ALL-Patienten nach der MTX-Behandlung die Expression des RFC 1 deutlich verringert ist<sup>9</sup>, wohingegen Kaufman keinen signifikanten Einfluss von Mutationen im RFC-Gen auf die intrinsische oder extrinsische Resistenz von MTX bei der kindlichen ALL fand<sup>89</sup>. In einer klinischen Studie von Kishi et al., in der viele Polymorphismen hinsichtlich der Toxizität bei der ALL untersucht wurden, war das *RFC1 80A-Allel* signifikant mit einer starken gastrointestinalen Toxizität assoziiert<sup>90</sup>, wohingegen in einer anderen Arbeit das *G-Allel* mit einer Hyperbilirubinämie und Übelkeit bei kindlichen ALL-Patienten assoziiert war<sup>91</sup>. Des Weiteren wurde bei Kindern, die an einer ALL oder einem malignen Lymphom erkrankten und Träger sowohl des *GSTM1* und *RFC1 G80* Allels

waren eine signifikant höhere Hepatotoxizität während einer Behandlung mit Hochdosis-Methotrexat festgestellt<sup>92</sup>. In unserer Patientengruppe ließ sich kein Einfluß des *RFC G80A*-Polymorphismus auf rezidivfreies oder Gesamtüberleben nachweisen.

Zwei Polymorphismen der Methylentetrahydrofolat-Reduktase, *MTHFR C677T* und *A1298C*, führen zu einer verringerte Enzymaktivität und verändern damit die Verhältnisse der intrazellulären Folat-Metabolite, was für die homozygot mutierte Variante des *C677T*-Polymorphismus zu einem erhöhten Homocystein-Gehalt<sup>24</sup> und einer Reduzierung der DNA-Methylierung führt<sup>93</sup>. In einer großen Studie von Aplenc et al.<sup>94</sup> bei Kindern mit ALL (n=520) war die *MTHFR 677T*-Variante statistisch signifikant mit einem gesteigerten Rezidivrisiko assoziiert, aber nicht mit gesteigerter Toxizität oder Infektionsrisiko. Für den *MTHFR A1298G* Polymorphismus fand sich keine Assoziation mit Rezidivrisiko, Toxizität oder Infektionsrisiko. Auch Costea<sup>95</sup> zeigte für die *MTHFR 677T*-Variante ein geringeres EFS, eine Abnahme der MTX-Sensitivität und eine geringere Toxizität. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen war die *677T*-Variante in mehreren Studien mit einer gesteigerten MTX-assoziierten Toxizität verbunden<sup>15,96-98</sup>, so dass davon auszugehen ist, dass die Bedeutung dieser Polymorphismen von der Dosierung des MTX, der Therapiedauer, weiteren Therapieelementen und anderen Unterschieden zwischen den einzelnen Studien abhängt. Beide Polymorphismen hatten in dem von uns untersuchten Kollektiv keinen nachweisbaren Einfluß auf das klinische Behandlungsergebnis. Dass der Polymorphismus auch im Rahmen der Behandlung anderer Erkrankungen eine Rolle spielen könnte, legen die Ergebnisse von Cohen et al.<sup>99</sup> nahe, die einen Zusammenhang zwischen Therapieansprechen auf 5-Fluoruracil und dem *MTHFR*-Polymorphismus beim Colocarzinom zeigten.

In unserer Gruppe ebenfalls nicht signifikant mit dem klinischen Outcome assoziiert war der *SHMT1 C1420T*-Polymorphismus, für dessen homozygoten Wildtyp eine höhere Homocysteinkonzentration und geringere Folatkonzentration<sup>102</sup> sowie ein erhöhtes Risiko berichtet wurden, an ALL zu erkranken<sup>47</sup>.

Die Bedeutung des Polymorphismus *MTRR A66G* der Methionin-Synthase-Reduktase ist mehrfach untersucht, aber sein Einfluss auf den Folat-Metabolismus ist noch umstritten<sup>18,91</sup>. In einer kürzlich von Gast et al.<sup>60</sup> veröffentlichten Studie, in

der mehrere den Folatmetabolismus betreffende SNPs untersucht wurden, zeigten nur Träger des *G-Allels* der MTRR ein marginal geringeres Risiko an einer ALL zu erkranken. Weiterhin ist für den MTRR-Polymorphismus ein gesteigertes Risiko von Neuralrohrdefekten und kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben<sup>102</sup>. Auch dieser Polymorphismus hatte in der Einzelanalyse bei unseren Patienten keine signifikante Bedeutung.

Gleiches gilt für den A2756G-Polymorphismus der Methionin-Synthase (MS, 5-Methyltetrahydrofolat- Homocystein-Methyltransferase (MTR)), dessen homozygoter Wildtyp-Genotyp wiederum mit einer Erhöhung des Homocystein-Spiegels verbunden ist und für den Skibola et al. im Fall der heterozygoten Ausprägung ebenfalls eine tendentielle Reduktion des ALL-Risikos beschrieben haben<sup>47</sup>.

Das letzte von uns untersuchte Enzym des Folatstoffwechsels, die Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase besitzt drei Enzymaktivitäten (Methylen-THF-Dehydrogenase, Methenyl-THF-Cyclohydrolase, 10-Formyl-THF-Synthetase). Der *MHFD1 G1958A*-Polymorphismus wird dabei mit der Rezidivhäufigkeit bei der kindlichen ALL assoziiert, wobei offensichtlich Zusammenhänge mit dem Promotor-Längenpolymorphismus der Thymidylat-Synthase bestehen<sup>17</sup>, der bei Colonicarcinom-Patienten mit homozygoter Triplevariante unter 5-Fluoruracil Therapie zu signifikant weniger Nebenwirkungen, aber auch einem deutlich schlechteren Therapieansprechen als bei Patienten mit homozygoter 2R Form bzw. Heterozygotie führt<sup>103</sup>. Bei der kindlichen ALL hingegen scheint es keine Assoziation zwischen Polymorphismen der TS und dem Rezidivrisiko zu geben<sup>105</sup>.

Der bei den bislang zitierten Arbeiten gewählte Ansatz, einzelne oder mehrere SNPs aufgrund ihrer bekannten Auswirkungen auf die Pharmakokinetik oder -dynamik von Chemotherapeutika zu testen, wird ergänzt durch die Analyse genomweiter Assoziationen von SNPs mit dem Auftreten von ALLs<sup>106</sup> bzw. deren Therapieansprechen<sup>107</sup>. Diesen Untersuchungen gemeinsam ist, dass sie aufgrund der Vielzahl der untersuchten Polymorphismen zunächst SNP-Genotypen identifizieren, wobei eine große Zahl der als bedeutsam identifizierten SNPs eine unbekannte oder keine Funktion haben und lediglich mit anderen funktionell bedeutsamen SNPs kosegregieren. Durch Korrelation mit weiteren Parametern (z.B. Kinetiken der Elimination von Chemotherapeutika) lassen sich dann einzelne oder Gruppen von SNPs näher analysieren. Die Analyse erfolgt dabei für die untersuchten

Polymorphismen gemeinsam und es werden keine a priori-Annahmen hinsichtlich ihrer Auswirkungen getroffen. Letztere Eigenschaften hat auch die Methode, mit der in dieser Arbeit die Interaktionen zwischen den einzelnen SNPs untersucht wurden. In ähnlicher Weise wie in der Arbeit von Yang et al.<sup>107</sup> wurde dabei die MRD an Woche 16 als Statusvariable benutzt, anhand derer mittels logischer Regression SNP-Kombinationen ermittelt wurden, die eine möglichst gute Zuordnung zu den Gruppen der MRD-positiven bzw. MRD-negativen Patienten erlauben<sup>101</sup>. Die über die fünf Kombinationen mit der besten Vorhersagewahrscheinlichkeit für eine hohe MRD-Last in Therapiewoche 16 identifizierten Fälle zeigten dann auch ein tendenziell schlechteres Gesamtüberleben. Interessanterweise identifizierten alle als bedeutsam erkannten Kombinationen Gruppen mit schlechterem rezidivfreien Überleben, was als Evidenz für die Zuverlässigkeit der Methode gewertet werden kann, da die MRD in Therapiewoche 16 in der GMALL 07/03-Studie vor allem Patienten mit einer schlechten Prognose zu identifizieren in der Lage ist<sup>45</sup>. Auch die beiden TPMT-Polymorphismen *G460A* und *A719G*, die bereits in der Einzelanalyse einen prädiktiven Wert hinsichtlich des Outcomes bei der B-Vorläufer-ALL zeigten, finden sich in der Analyse der SNP-Kombinationen als signifikante prädiktive Marker in der Form wieder, dass in dieser Analyse der Wildtyp mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist.

Insgesamt lassen sich die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen dahingehend interpretieren, dass es neben über verschiedene Studien hinweg als prognostisch bedeutsam identifizierten SNPs (TPMT-Genotyp) zahlreiche weitere Polymorphismen gibt, deren Bedeutung für die Prognose nur im Zusammenhang mit der jeweiligen in der Studie verabreichten Therapie und/oder in Kombination mit anderen Polymorphismen zu bestimmen ist. Einschränkend kommt hinzu, dass auch der Subtyp der Erkrankung (Effekt des TPMT-Genotyps bei B-Vorläufer, nicht jedoch bei T-ALL) als Kovariable zu berücksichtigen ist. Inwieweit eine erweiterte Datenbasis aufgrund der jetzt durchgeführten genomweiten SNP-Analysen zu einem Erkenntnisgewinn und möglicherweise einer Therapieoptimierung für den einzelnen Patienten führt, bleibt abzuwarten.



## 5 Zusammenfassung

Die Prognose von Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie verbesserte sich aufgrund der Ergebnisse zahlreicher Therapiestudien in den letzten Jahren stetig. Ansätze zur Therapieverbesserung sind immer häufiger individualisierte Therapiestrategien, bei denen versucht wird, die Therapie möglichst genau auf den Patienten und seine Erkrankung auszurichten.

Einen bedeutenden Beitrag liefert hier die Pharmakogenetik, die durch Erfassung genetischer Varianten den Beitrag einzelner Zytostatika zur Therapie ermitteln und mögliche individuelle Therapietoxizitäten vorhersagen kann.

Bei der ALL des Erwachsenen weisen selbst homogene Patientenkollektive zum Teil erhebliche Unterschiede im Therapieansprechen auf, die durch quantitative Messung der MRD-Kinetik dokumentiert werden können und deren Genese nicht vollständig geklärt ist.

Bekannte Mechanismen für Zytostatikaresistenzen sind Einzelnukleotidpolymorphismen, die zu einer Veränderung der enzymatischen Aktivität und somit zu einer veränderten Chemosensitivität durch Beeinflussung der Aufnahme und Verstoffwechslung des jeweiligen Chemotherapeutikums führen können.

Eines der bislang am besten untersuchten Beispiele ist in diesem Zusammenhang die Verstoffwechslung von 6-Mercaptopurin (6-MP) durch die Thiopurin-Methyltransferase (TPMT).

Weiterhin sind die Enzyme, die in den Folatmetabolismus eingreifen, von großem Interesse. Sie beeinflussen die Wirkung von Methotrexat (MTX) als Folsäureantagonist, wobei MTX ein wichtiger Bestandteil fast jeden ALL-Protokolls ist.

Der prognostische Wert dieser Polymorphismen für die ALL des Erwachsenen war bislang wenig untersucht, die bisher publizierten Ergebnisse waren häufig divergent. Insbesondere fehlten Korrelationen mit der Kinetik der minimalen Resterkrankung (MRD) unter und nach entsprechender Chemotherapie, um den konkreten Effekt der genetischen Variation auf das Therapieansprechen zu prüfen.

Ziel dieser Arbeit war es, Einzelnukleotidpolymorphismen, die die Verstoffwechslung von 6-MP und MTX beeinflussen, mittels Polymerasekettenreaktions (PCR)- Amplifikation genomischer DNA und

anschließender Direktsequenzierung zu untersuchen, um mögliche Unterschiede im Therapieansprechen zu offenbaren.

Des Weiteren ist eine Korrelation mit dem MRD-Niveau zu bestimmten Zeitpunkten der Therapie gemacht worden, um die unmittelbare Bedeutung der Einzelnukleotidpolymorphismen für die Wirksamkeit einzelner Therapieelemente besser beurteilen zu können und zukünftig eine mögliche frühzeitige individuelle Therapieoptimierung erzielen zu können.

Wir konnten bei der Untersuchung der erwachsenen ALL-Patienten nach der erstmaligen Gabe von 6-Mercaptopurin eine Tendenz zu einer niedrigeren Rate MRD-positiver Patienten, einem besseren Gesamtüberleben und rezidivfreien Überleben in der Gruppe der Patienten mit heterozygotem TPMT-Genotyp zeigen.

Bei Patienten mit einer B-ALL war dieser Unterschied signifikant und unterstreicht die bereits in früheren Studien erkannte Bedeutung des TPMT-Genotyps für das Therapieansprechen.

Interessanterweise zeigte sich in der im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Analyse eine niedrigere Rate MRD-positiver Patienten bereits in der Therapiephase vor erstmaliger 6-MP-Gabe, eine Beobachtung, die gegen die isolierte Bedeutung der TPMT-Polymorphismen ausschließlich für den 6-MP-Metabolismus spricht.

Hingegen konnte für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene von Enzymen des Folatmetabolismus, welche somit die Verstoffwechslung von MTX beeinflussen, kein signifikanter Einfluss auf das Therapieansprechen gezeigt werden.

Dies deckt sich mit den bereits in der Literatur stark divergenten und diskutierten Ergebnissen.

Ergänzend zu den Einzelanalysen wurde eine Gesamtanalyse der SNPs durchgeführt, um mögliche die Pharmakogenetik betreffenden SNP-Kombinationen zu erfassen.

Auch in dieser Analyse der SNP-Kombinationen fanden sich die TPMT-Genotypen G460A und A719G, die schon in den Einzelanalysen einen prädiktiven Wert hinsichtlich des Therapieansprechens zeigten, als Prädiktor für ein schlechteres Gesamtüberleben. Auch dies deutet auf die große Bedeutung des TPMT-Polymorphismus für das Therapieansprechen der ALL hin.

Ein solcher Einfluss einzelner SNPs auf das Therapieansprechen der ALL konnte für

Gene des Folatmetabolismus nicht gezeigt werden, möglicherweise aufgrund eines zu geringen Effektes innerhalb des Therapiegesamtkonzeptes, da viele Variablen einen Einfluss auf das Outcome einer Therapie besitzen.

Für eine „pharmakogenetisch“ gesteuerte individualisierte Therapie bedarf es noch weiterer, gegebenenfalls genomweiter Untersuchungen.

## 6 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:Untersuchte Zytostatikaresistenz-assoziierte Einzelnukleotidpolymorphismen .....	14
Tab. 2: Primersequenzen der Multiplex-PCR I.....	16
Tab. 3: Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der Multiplex-PCR I.....	16
Tab. 4: Primersequenzen der Multiplex-PCR II.....	16
Tab. 5: Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der Multiplex-PCR II.....	17
Tab. 6: Primersequenzen der PCR MS A2756G.....	17
Tab. 7: Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der PCR MS A2756G .....	17
Tab. 8: Primersequenzen der PCR RFC1 G80A.....	17
Tab. 9: Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der PCR RFC1 G80A .....	18
Tab. 10: Primersequenzen der PCR TYMS 2R/3R.....	18
Tab. 11: Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der PCR TYMS 2R/3R.....	18
Tab. 12: Beispiel für eine Sequenzierreaktion (TPMT G460A) .....	20
Tab. 13: Übersicht der verwendeten Geräte .....	21
Tab. 14: Übersicht der eingesetzten Chemikalien .....	21
Tab. 15: Verteilung der den MTX-Metabolismus beeinflussenden SNPs.....	24
Tab. 16: MRD nach MTX-Gabe (vor Therapiewoche 16) in Abhängigkeit der Genotypen des Folatmetabolismus.....	28
Tab. 17: 5-Jahres Gesamt- und rezidivfreies Überleben der Patienten in Abhängigkeit vom TPMTGenotyp.....	32
Tab. 18: MRD Niveaus vor und nach Gabe von 6-MP in Abhängigkeit vom TPMT-Genotyp.....	33
Tab. 19: Gesamt- und rezidivfreies Überleben ~ von den untersuchten SNPs (MTX-Metabolismus) ..	36
Tab. 20: SNP-Kombinationen für die Zuordnung zum Status MRD+/- an Woche 16 und ihre Bedeutung für rezidiefreies (RFS) bzw. Gesamtüberleben (OS).....	39

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: GMALL 07/2003-Protokoll.....	3
Abb. 2: Chemotherapeutika der Standardrisikotherapie .....	7
Abb. 3: Metabolismus von 6-Mercaptopurin .....	8
Abb. 4: Allelische Varianten der Thiopurin-Methyltransferase (TPMT).....	8
Abb. 5: Schematische Darstellung des Folsäuremetabolismus .....	9
Abb. 6: Mögliche Ergebnisse der Analyse des TS-Längenpolymorphismus.....	23
Abb. 7: Beispiele für Sequenzierergebnisse von SNPs des TPMT-Gens .....	25
Abb. 8: Darstellung des MRD-Status nach MTX Gabe (Woche 16) bezogen auf die SNPs des Folatmetabolismus.....	27
Abb. 9: Darstellung des MRD-Status nach 6-MP-Gabe bezogen auf den TPMT-SNP.....	31
Abb. 10: Gesamt- und rezidivfreies Überleben der Kohorte ~ TPMT-SNP .....	33
Abb. 11: Gesamt- und rezidivfreies Überleben der Kohorte ~ MRD nach Woche 16 .....	35
Abb. 12: Gesamt- und rezidivfreies Überleben ~ SNP-Kombination 1.....	36

## 8 Anhang A

<b>Multizentrische Therapieoptimierungsstudie der akuten lymphatischen Leukämie bei Erwachsenen und Adoleszenten ab 18 Jahren (GMALL 07/2003) -Therapieoptimierung durch Evaluation der minimalen Resterkrankung -</b>	
<b>Kurzprotokoll</b>	
<b>Studienleiter</b>	Prof.Dr.D.Hoelzer Universitätsklinikum, Med.Klinik II Theodor-Stern-Kai 7 60590 Frankfurt Tel: 069/ 650073-170 Fax:069/ 650073-180 e-mail: hoelzer@em.uni-frankfurt.de
<b>Studienzentrale</b>	Dr.N.Göckbuget Med.Klinik II Klinikum der J.W.Goethe Universität Theodor Stern Kai 7 60590 Frankfurt Tel: 069/ 6301 6365 Fax: 069/ 6301 7463 e-mail: goekbuget@em.uni-frankfurt.de
<b>Ziele</b>	<p><b>1. Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens (DFS) und des Gesamtüberlebens (ÜLZ) durch</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verkürzung und Intensivierung der Induktionstherapie und neue Konsolidationszyklen</li> <li>• Anwendung einer neuen Risikostratifizierung nach konventionellen Risikofaktoren (Standard-, Hoch- und Höchststrisiko- Gruppe)</li> <li>• Anwendung einer neuen Risikostratifizierung nach MRD bei Standard-Risiko-Patienten (MRD-Niedrig-, -Hoch- und -Intermediär-Risiko)</li> <li>• erweiterten, risikoadaptierten Einsatz von allogener Familienspender-, Fremdspender-, autologer und nicht myeloablativer Stammzelltransplantation</li> </ul> <p><b>2. Prospektive Erfassung der minimalen Resterkrankung (MRD) zur</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neudefinition der kompletten Remission i.S. einer molekularen Remission</li> <li>• Bestimmung des MRD-Verlaufs in Subgruppen der ALL</li> <li>• Messung der Effektivität einzelner Therapieelemente (z.B. Konsolidation)</li> <li>• Prüfung der prognostischen Bedeutung des MRD-Status vor und nach SZT</li> <li>• Anwendung einer MRD-adaptierten Risikostratifikation zur               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Identifikation von Patienten mit niedrigem Rezidivrisiko mit dem Ziel einer Therapieverkürzung von bisher 2 ½ Jahren auf 1 Jahr</li> <li>- frühen Identifikation von Patienten mit hohem Rezidivrisiko mit dem Ziel einer Therapieintensivierung (Stammzelltransplantation)</li> </ul> </li> </ul> <p><b>3. Prüfung der Durchführbarkeit und Wirksamkeit neuer Therapieelemente</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Induktionstherapie (verkürzt und intensiviert)</li> <li>• Konsolidation I (neuer Zyklus mit HDMTX und HDAC)</li> <li>• Konsolidation II (subgruppenspezifisch für B-/T-Linien-ALL bei Hoch-/Höchststrisikopatienten)</li> <li>• Allogene Fremdspender-SZT</li> <li>• Allogene nicht myeloablative SZT</li> </ul>
<b>Einschlußkriterien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Akute lymphatische Leukämie (alle Subtypen außer reifer B-ALL)</li> <li>• Alter 18-65* Jahre (*55-65 Jahre wenn biologisch jünger)</li> <li>• Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten</li> </ul>
<b>Ausschluß-Kriterien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwerwiegende leukämiebedingte Komplikation oder Zweiterkrankungen</li> <li>• Spätrezidiv einer kindlichen ALL</li> <li>• Zytostatische Vorbehandlung</li> <li>• Schwangerschaft</li> <li>• Schwerwiegende psychiatrische Erkrankung oder andere Umstände, die ein Verständnis der Aufklärung bzw. die Kooperation des Patienten bei der Therapie nicht erwarten lassen</li> <li>• Teilnahme an einer anderen klinischen Studie, die mit der Studientherapie interferiert</li> </ul>

<b>Zentrale Diagnostik</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Morphologie und Zytochemie</li> <li>• Immunphänotypisierung</li> <li>• Zytogenetik</li> <li>• Molekulargenetische Diagnostik</li> <li>• Diagnostik der minimalen Resterkrankung (MRD)</li> </ul>
<b>Studiendesign</b>	<p>Alle Patienten erhalten zunächst eine einheitliche <b>Induktionstherapie</b> (Vorphase, Induktion I und II) und <b>Konsolidation I</b> mit <b>Stammzellapherese</b> (alle Standardrisiko-Patienten, Hoch- und Höchststrisiko-Patienten ohne KM-Spender). Bei Erreichen einer CR nach der Induktionstherapie erfolgt die <b>Stratifikation I nach Risikofaktoren</b>.</p> <p>Patienten mit B-Vorläufer-ALL und Expression von CD20 erhalten vor den ersten drei Chemotherapiezyklen (Induktion I, II und Konsolidation I) je eine Gabe Rituximab.</p> <p><b>Standardrisiko</b>-Patienten erhalten bis Woche 49 alternierende Chemotherapiezyklen (HDMTX/ASP, Reinduktion, HDMTX/ASP, HDARAC, CYCLO/ARAC, HDMTX/ASP), begleitet von den unten aufgeführten MRD-Kontrollen. Patienten mit B-Vorläufer-ALL und Expression von CD20 erhalten vor den Chemotherapiezyklen Kons.II bis Kons.V weitere 5 Gaben Rituximab. Am Ende des 1. Jahres findet die <b>Stratifikation II nach MRD</b> statt. Bei <b>Patienten mit MRD-Niedrigrisiko</b> wird die Therapie unter Fortsetzung der MRD-Kontrollen <b>beendet</b>, bei <b>MRD-Hochrisiko intensiviert</b> (Stammzell-transplantation, intensivierte Erhaltung). Patienten mit <b>MRD-Intermediärrisiko</b> erhalten eine intensivierte Erhaltungstherapie.</p> <p><b>Hochrisiko</b>-Patienten erhalten nach Konsolidation I eine <b>allogene SZT</b> (Familien- oder Fremdspender). Patienten ohne Spender erhalten die nach <b>Subtyp unterschiedliche Konsolidation II</b> (T-Linien-ALL: CLAEg, B-Vorläufer ALL: IDA-FLAG ) und im Anschluß eine <b>autologe SZT</b>.</p> <p><b>Höchststrisiko</b>-Patienten: Patienten dieser Gruppe mit Ph/BCR-ABL-positiver ALL sollten ab Beginn der Induktionsphase I im Rahmen einer separaten Begleitstudie mit Imatinib (Glivec) behandelt werden.</p>
<b>Stratifikation I nach konventionellen Risikofaktoren</b>	<p>I. Standardrisiko (<b>SR</b>):                   <b>B-Vorläufer ALL</b>  - CR an Tag 26 (nach Induktion I) <u>und</u>  - WBC &lt; 30.000/<math>\mu</math>l  - keine proB- bzw. t(4;11)/ALL1-AF4 pos. ALL  - keine t(9;22)/BCR-ABL pos. ALL  <b>Thymische T-ALL</b></p> <p>II. Hochrisiko (<b>HR</b>):                       <b>B-Vorläufer ALL</b>  - CR erst an Tag 46 (nach Induktion II) <u>oder</u>  - WBC &gt; 30.000/<math>\mu</math>l <u>oder</u>  - pro B- bzw. t(4;11)/ALL1-AF4 pos.ALL  - keine t(9;22)/BCR-ABL pos. ALL  <b>Early T oder Mature T-ALL</b>  <b>Komplex aberranter Karyotyp *</b></p> <p><small>*Definition: <math>\geq</math>3 Aberrationen und mindestens 1 Strukturaberration (ausgenommen sind: modale Chromosomenzahl <math>&gt;</math>50, t(9;22), 11q23-Aberrationen, t(10;14), t(1;19), 8q24, t(14;18) oder t(11;14))</small></p> <p>III. Höchststrisiko (<b>VHR</b>):               <b>t(9;22)/BCR-ABL pos. ALL</b></p>
<b>MRD-Verlaufsuntersuchungen</b>	Knochenmarkkontrollen und Versand für die zentrale MRD-Bestimmung: Tag 1, 26, 46, 71; Woche 16, 30, 52; danach 4-monatlich bis Woche 104

<b>Studientherapie</b>			
<b>Einheitliche Vorphase, Induktionstherapie und Konsolidation I für alle Risikogruppen</b>			
<b>Vorphase</b> (Tag 1-5)	Methotrexat Dexamethason Cyclophosphamid	15 mg abs. i.th. 10 mg/m <sup>2</sup> p.o. (in 3 Gaben) 200 mg/m <sup>2</sup> c.i. (1 h)	1 1-5 3-5
Bei CD20+ B-Vorläufer-ALL: Rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> an Tag 6 der Beginn der Chemotherapie von Induktion I verschiebt sich um einen Tag auf Tag 7			
Bei Ph/BCR-ABL-positiver ALL: Befund muss während der Vorphase erstellt werden. Dann Gabe von Imatinib 600 mg parallel zu der Chemotherapie ab Beginn der Induktionsphase I durchgehend bis zur Stammzelltransplantation. Details zu Vorgehensweisen bei Toxizität sind dem Studienprotokoll zu entnehmen.			
<b>Induktionsphase I</b> (Tag 6-20)	Dexamethason Vincristin Daunorubicin > 55 Jahre PEG-Asparaginase > 55 Jahre G-CSF Bei Patienten mit initialer Granulozytenzahl < 500/µl	10 mg/m <sup>2</sup> p.o. (in 3 Gaben) 2 mg abs. i.v. (Bolus) 45 mg/m <sup>2</sup> i.v. (15 min) 30 mg/m <sup>2</sup> 2000 U/m <sup>2</sup> c.i. (2 h) 1000 U/m <sup>2</sup> 5 µg/kg s.c.	Tag 6-7 und 13-16 Tag 6, 13,20 Tag 6 + 7, 13+14 Tag 20 ab Tag 6 ab Tag 1
<b>Therapiedurchführung bei initialer Granulopenie:</b>	Patienten mit initialer Granulozytopenie < 500/µl (bei Diagnose oder Tag 1-5): Bei CR/PR Tag 11: ggf. Verschiebung der Therapie ab Tag 11 (DNR,VCR,DEXA) bis Granulozyten > 500/µl (maximal 1 Woche) Bei Therapieversagen/Progredienz: Therapiefortsetzung		
<b>Remissionskontrollen</b>	Tag 11 Tag 26 (Einsendung MRD)		
Bei CD20+ B-Vorläufer-ALL: Rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> am Tag vor Beginn von Induktion II Bei Ph/BCR-ABL-positiver ALL: durchgehende Gabe von Imatinib bis zur Stammzelltransplantation, auch in den Intervallen			
<b>Induktionsphase II</b> (Tag 26-46)	Methotrexat Cyclophosphamid Cytarabin 6-MP G-CSF ZNS-Bestrahlung	15 mg(abs.) i.th. 1000 mg/m <sup>2</sup> c.i. (1 Std.) 75 mg/m <sup>2</sup> c.i. (1 Std.) 60 mg/m <sup>2</sup> p.o. 5 µg/kg s.c. 24 Gy	Tag 28,35,42 Tag 26, 46 Tag 28-31, 35-38,42-45 Tag 33-53 ab Tag 26
<b>T-ALL mit MedTU</b>	Bei T-ALL-Patienten mit Mediastinal-Tumor erfolgt zu Beginn und am Ende der Induktionsphase II eine CT-Kontrolle. Bei Resttumor > 2 cm am Ende von Induktion II wird eine Mediastinalbestrahlung angeschlossen (s.Strahlentherapieprotokoll)		
<b>Remissionskontrolle</b>	Tag 46 (Einsendung MRD)		
Bei CD20+ B-Vorläufer-ALL: Rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> am Tag vor Beginn von Kons.I Bei Ph/BCR-ABL-positiver ALL: durchgehende Gabe von Imatinib bis zur Stammzelltransplantation, auch in den Intervallen			
<b>Konsolidation I</b> (Tag 71)	Dexamethason Vindesin  HD-Methotrexat > 55 Jahre VP16 (Etoposid) HD-Cytarabin > 55 Jahre G-CSF Triple-Prophylaxe	10 mg/m <sup>2</sup> p.o. (in 3 Gaben) 3 mg/m <sup>2</sup> i.v. (Bolus) (max. 5 mg ) 1,5 g/m <sup>2</sup> c.i. (24 Std.) 1 g/m <sup>2</sup> 250 mg/m <sup>2</sup> c.i. (1 Std.) 2 x 2 g/m <sup>2</sup> c.i. (12 stdl. , 3 Std.) 2 x 1 g/m <sup>2</sup> 5 µg/kg s.c. s.u. i.th.	Tag 1-5 Tag 1 Tag 1 Tag 4, 5 Tag 5 ab Tag 7 Tag 12
<b>Stammzellapherese</b>	alle SR-Patienten, alle HR/VHR-Patienten ohne Spender		
<b>Remissionskontrolle</b>	Tag 71 (Einsendung MRD)		
<b>Risikostratifizierte Postremissionstherapie</b>			
<b>Standardrisiko:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konsolidation II, Reinduktion, Konsolidation III – VI</li> <li>• Stratifikation II nach MRD</li> </ul>		
<b>Remissionskontrolle</b>	Woche 16 (Einsendung MRD)		
Bei CD20+ B-Vorläufer-ALL: Rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> am Tag vor Beginn von Kons.II			
<b>HDMTX/ASP</b> (Woche 16)	HD-Methotrexat > 55 Jahre PEG-Asparaginase > 55 Jahre 6-Mercaptopurin	1,5 g/m <sup>2</sup> c.i. (24 Std.) 1 g/m <sup>2</sup> 2000 U/m <sup>2</sup> c.i. (2 Std.) 1000 U/m <sup>2</sup> 60 mg/m <sup>2</sup> p.o.	Tag 1, 15 Tag 2, 16 Tag 1-7, 15-21



<b>Remissionskontrolle</b>			Woche 22
Bei CD20+ B-Vorläufer-ALL: Rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> am Tag vor Beginn von Reinduktion I			
<b>Reinduktion I</b> (Woche 22)	Prednisolon	3 x 20 mg/m <sup>2</sup>	p.o. (3 Gaben) Tag 1-14
	Vindesin	3 mg/m <sup>2</sup>	i.v. (Bolus) Tag 1, 7
	Adriamycin	50 mg/m <sup>2</sup>	i.v. (15 Min) Tag 1, 7
	Triple-Prophylaxe	s.u.	i.th. Tag 1, 15
<b>Reinduktion II</b>	Cyclophosphamid	1000 mg/m <sup>2</sup>	c.i. (1 Std.) Tag 15
	Cytarabin	75 mg/m <sup>2</sup>	c.i. (1 Std.) Tag 17-20, 24-27
	Thioguanin	60 mg/m <sup>2</sup>	p.o. Tag 15-28
<b>Remissionskontrolle</b>			Woche 30 (Einsendung MRD)
Bei CD20+ B-Vorläufer-ALL: Rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> am Tag vor Beginn von Kons. III			
<b>HDMTX/ASP</b> (Woche 30)	s.o.		
Bei CD20+ B-Vorläufer-ALL: Rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> am Tag vor Beginn von Kons. IV			
<b>HDARAC</b> (Woche 36)	Cytarabin	1000 mg/m <sup>2</sup>	c.i. (3 Std.) Tag 1, 3, 5
	Triple-Prophylaxe	s.u.	i.th. Tag 6
<b>Remissionskontrolle</b>			Woche 41
Bei CD20+ B-Vorläufer-ALL: Rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> am Tag vor Beginn von Kons. V			
<b>CYCLO/ARAC</b> (Woche 41)	Cyclophosphamid	1000 mg/m <sup>2</sup>	c.i. (1 Std.) Tag 1
	Cytarabin	500 mg/m <sup>2</sup>	c.i. (24 Std.) Tag 1
	Triple-Prophylaxe	s.u.	i.th. Tag 1
<b>HDMTX/ASP</b> (Woche 46)	s.o.		
<b>Triple-Prophylaxe</b> (Woche 52)	s.u. i.th.		
<b>Remissionskontrolle</b>			Woche 52 (Einsendung MRD)
<b>Erhaltungstherapie</b>	Zwischen den Konsolidationsblöcken III-VI (nach Reinduktion) und nach Konsolidation VI bis zur Stratifikation II: Erhaltungstherapie mit 6-MP/MTX		
<b>Triple-Prophylaxe</b>	Methotrexat	15 mg (abs)	i.th.
	Cytarabin	40 mg (abs)	i.th.
	Dexamethason	4 mg (abs)	i.th.
<b>Stratifikation nach MRD</b> (Wo 16 und Wo 52)	<u>Nach MRD-Status und Verlauf</u>		
	• MRD-Niedrigrisiko:	Therapieende	
	• MRD-Hochrisiko:	Stammzelltransplantation <u>oder</u> intensivierte Erhaltungstherapie <u>oder</u> subgruppenspezifische Therapie im Rahmen von Begleitstudien	
	• MRD-Intermediärrisiko:	Intensivierte Erhaltungstherapie	

## 9 Referenzen

1. SEER incidence rates, age adjusted and age-specific rates (1995 - 1999) by race and sex; (whites/total). Available at: <http://seer.cancer.gov/> [Zugegriffen Dezember 9, 2009].
2. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, u. a. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;9(10):1783-1786.
3. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998;91(11):3995-4019.
4. Pui C, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2006;354(2):166-178.
5. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*. 1995;85(6):1416-1434.
6. Stanulla M, Cario G, Meissner B, u. a. Integrating molecular information into treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia--a perspective from the BFM Study Group. *Blood Cells Mol. Dis.* 2007;39(2):160-163.
7. Gökbüget N, Hoelzer D. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:133-41.
8. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct. Funct.* 1995;20(3):191-197.
9. Gorlick R, Goker E, Trippett T, u. a. Defective transport is a common mechanism of acquired methotrexate resistance in acute lymphocytic leukemia and is associated with decreased reduced folate carrier expression. *Blood*. 1997;89(3):1013-1018.
10. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, u. a. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999;91(23):2001-2008.
11. Anderer G, Schrappe M, Brechlin AM, u. a. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics*. 2000;10(8):715-726.

12. McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000;14(4):567-572.
13. Stanulla M, Schrappe M, Brechlin AM, Zimmermann M, Welte K. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood*. 2000;95(4):1222-1228.
14. Krajcinovic M, Costea I, Chiasson S. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2002;359(9311):1033-1034.
15. Taub JW, Matherly LH, Ravindranath Y, u. a. Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methotrexate sensitivity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2002;16(4):764-765.
16. Laverdière C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajcinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100(10):3832-3834.
17. Krajcinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, u. a. Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2004;4(1):66-72.
18. Schwab M, Schäffeler E, Marx C, u. a. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2002;12(6):429-436.
19. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1990;336(8709):225-229.
20. Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, u. a. Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*. 2005;293(12):1485-1489.
21. Schmiegelow K, Forestier E, Kristinsson J, u.a. Thiopurine methyltransferase activity is related to the risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL- 92 study. *Leukemia* 2009;23(3):557-546.

22. Sierra EE, Goldman ID. Recent advances in the understanding of the mechanism of membrane transport of folates and antifolates. *Semin. Oncol.* 1999;26(2 Suppl 6):11-23.
23. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, u. a. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol. Genet. Metab.* 2000;70(4):310-315.
24. Frosst P, Blom HJ, Milos R, u. a. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* 1995;10(1):111-113.
25. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol. Genet. Metab.* 1998;64(3):169-172.
26. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, u. a. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am. J. Hum. Genet.* 1998;62(5):1044-1051.
27. Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, u. a. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat. Struct. Biol.* 1999;6(4):359-365.
28. McLeod HL, Coulthard S, Thomas AE, u. a. Analysis of thiopurine methyltransferase variant alleles in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1999;105(3):696-700.
29. McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2000;14(4):567-572.
30. Evans WE. Comprehensive assessment of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) alleles in three ethnic populations. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2002;24(5):335-336.
31. Index, in *Molecular Analysis and Genome Discovery*, John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, UK. 2004. doi:10.1002/0470020202.
32. Howell WM, Jobs M, Gyllensten U, Brookes AJ, *Nature Biotechnology* 1999;17(1): 87-88.
33. Tyagi S, Kramer FR, Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* 1996;14(3): 303 – 308,1996.

34. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(17):E88-8.
35. Olivier M. The Invader® assay for SNP genotyping. *Mutat Res.* 2005;573(1-2): 103–110.
36. Syvänen AC, Aalto-Setälä K, Harju L, Kontula K, Söderlund H. A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. *Genomics.* 1990;8(4):684-92.
37. Gunderson KL, Steemers FJ, Ren H, u.a. Whole-genome genotyping. *Methods Enzymol.* 2006;410:359-76.
38. Syvänen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet.* 2001;2(12):930-42.
39. McGuigan FE, Ralston SH. Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan. *Psychiatr Genet.* 2002;12(3):133-6.
40. Landegren U, Kaiser R, Sanders J, Hood L. A ligase-mediated gene detection technique. *Science.* 1988;241(4869):1077-80.
41. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(8):2766-70.
42. Costabile M, Quach A, Ferrante A. Molecular approaches in the diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Hum Mutat.* 2006;27(12):1163-73.
43. O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, u.a. Blind Analysis of Denaturing High-Performance Liquid Chromatography as a Tool for Mutation Detection. *Genomics.* 1998;52(1):44-9.
44. Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem.* 2004;50(7):1156-64.
45. Brüggemann M, Raff T, Flohr T, u. a. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2006;107(3):1116-23.

46. van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, u. a. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21(4):604-611.
47. Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, u. a. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(10):3786-3791.
48. Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*. 1958;53:457-481.
49. Cox D. Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. 34(2):187-220.
50. Schwender H, Ickstadt K. Identification of SNP interactions using logic regression. *Biostat*. 2008;9(1):187-198.
51. Arico M, Valsecchi MG, Rizzari C, u.a. Long-term results of the AIEOP-ALL-95 Trial for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: insight on the prognostic value of DNA index in the framework of Berlin-Frankfurt-Muenster based on chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2008;26(2):283-9.
52. Möricke A, Reiter A, Zimmermann M, u.a. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood*. 2008;111(9):4477-4489.
53. Moghrabi A, Levy DE, Asselin B, u.a. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007;109(3):896-904.
54. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grünmayer ER, u.a. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet*. 1998;352(9142):1731-8.
55. Dördelmann M, Reiter A, Borkhardt A, u.a. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1999;94(4):1209-17.
56. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, u.a. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*. 2007;109(3):926-35.
57. Gaynon PS, Desai AA, Bostrom BC, u.a. Early response to therapy and outcome childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. *Cancer*. 1997;80(9):1717-26.

58. Fronkova E, Mejstrikova E, Avigad S, u.a. Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 Protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? *Leukemia*. 2008;22(5):989-97.
59. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, u.a. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*. 2010;115(16):3206-14.
60. Gast A, Bermejo JL, Flohr T, u.a. Folat metabolic gene polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Leukemia*. 2007;21(2):320-325.
61. Gökbuget N, Hoelzer D, Arnold R, u.a. Treatment of Adult ALL according to protocols of the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL). *Hematol.Oncol.Clin.North Am*. 2000;14(6):1307-25.
62. Hoelzer D, Thiel E, Loffler H, u.a. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 1988;71(1):123-131.
63. Larson RA, Dodge RK, Burns CP, u.a. A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 8811. *Blood* 1995;85(8):2025-2037.
64. Rowe JM, Buck G, Burnett AK, u.a. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood* 2005;106(12):3760-3767.
65. Bader P, Kreyenberg H, Henze GHR, u.a. Prognostic Value of Minimal Residual Disease Quantification Before Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2009;27(3):377-384.
66. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, u.a. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2009;113(18):4153-4162.
67. Cave H, van der Werff ten Bosch, Suci S, u.a. 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(9):591-598.
68. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, u.a. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(8):2691-2696.

69. Lee S, Kim DW, Kim YJ, u.a. Minimal residual disease-based role of imatinib as a first-line interim therapy prior to allogeneic stem cell transplantation in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2003;102(8):3068-3070.
70. Mortuza FY, Papaioannou M, Moreira IM, u.a. Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. *J.Clin.Oncol.* 2002;20(4):1094-1104.
71. Raff T, Gökbuget N, Lüschen S, u.a. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials. *Blood* 2007;109(3):910-915.
72. Seyfarth J, Madsen HO, Nyvold C, u.a. Post-induction residual disease in translocation t(12;21)-positive childhood ALL. *Med.Pediatr.Oncol* 2003;40(2):82-87.
73. Spinelli O, Peruta B, Tosi M, u.a. Clearance of minimal residual disease after allogeneic stem cell transplantation and the prediction of the clinical outcome of adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2007;92(5):612-618.
74. Wassmann B, Pfeifer H, Goekbuget N, u.a. Alternating versus concurrent schedules of imatinib and chemotherapy as front-line therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Blood* 2006;108(5):1469-1477.
75. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, u.a. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia* 2010;24(3):521-535.
76. Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, Roberts WM. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J. Pediatr.* 1991;119(6):985-989.
77. McLeod HL, Miller DR, Evans WE. Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet.* 1993;341(8853):1151.
78. Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, u. a. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J. Clin. Oncol.* 2001;19(8):2293-2301.



79. Schmiegelow K, Björk O, Glomstein A, u. a. Intensification of mercaptopurine/methotrexate maintenance chemotherapy may increase the risk of relapse for some children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2003;21(7):1332-1339.
80. Rocha JCC, Cheng C, Liu W, u. a. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2005;105(12):4752-4758.
81. Relling MV, Yanishevski Y, Nemeč J, u.a. Etoposide and antimetabolite pharmacology in patients who develop secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998;12:346-352.
82. Thompson BJ, Schroder H, Kristinsson J, u.a. Possible carcinogenic effect of 6-mercaptopurine on bone marrow stem cells: relation to thiopurine metabolism. *Cancer* 1999; 86:1080-1086.
83. Stanulla M, Schaeffeler E, Möricke A, u.a. Thiopurine methyltransferase genetics is not a major risk factor for secondary malignant neoplasms after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia on Berlin-Frankfurt-Münster protocols. *Blood* 2009; 114(7):1341-8.
84. Bökkerink JP, Stet EH, De Abreu RA, u. a. 6-Mercaptopurine: cytotoxicity and biochemical pharmacology in human malignant T-lymphoblasts. *Biochem. Pharmacol.* 1993;45(7):1455-1463.
85. De Marco P, Calevo MG, Moroni A, u. a. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as risk factors for NTDs. *Eur J Pediatr Surg.* 2001;11 Suppl 1:S14-17.
86. Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H, u. a. Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida. *Am. J. Med. Genet.* 2002;108(1):1-6.
87. Seidel H, Andersen A, Kvaløy JT, u. a. Variability in methotrexate serum and cerebrospinal fluid pharmacokinetics in children with acute lymphocytic leukemia: relation to assay methodology and physiological variables. *Leuk. Res.* 2000;24(3):193-199.
88. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res.* 1991;51(3):828-835.
89. Kaufman Y, Drori S, Cole PD, u. a. Reduced folate carrier mutations are not the mechanism underlying methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2004;100(4):773-782.
90. Kishi S, Cheng C, French D, u. a. Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood.* 2007;109(10):4151-4157.

91. Shimasaki N, Mori T, Samejima H, u.a. Effects of methylenetetrahydrofolat reductase and reduced folate carrier 1 polymorphisms on high-dose methotrexate-induced toxicities in children with acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006;28:64-68.
92. Imanishi H, Okamura N, Yagi M, u.a. Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexat in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *J Hum Genet*. 2007;52:166-171.
93. Friso S, Choi S, Girelli D, u. a. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99(8):5606-5611.
94. Aplenc R, Thompson J, Han P, u. a. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2005;65(6):2482-2487.
95. Costea I, Moghrabi A, Laverdiere C, Graziani A, Krajinovic M. Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2006;91(8):1113-1116.
96. Chiusolo P, Reddiconto G, Casorelli I, u. a. Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Ann. Oncol*. 2002;13(12):1915-1918.
97. Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, u. a. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood*. 2001;98(1):231-234.
98. Toffoli G, Russo A, Innocenti F, u. a. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism on toxicity and homocysteine plasma level after chronic methotrexate treatment of ovarian cancer patients. *Int. J. Cancer*. 2003;103(3):294-299.
99. Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, u. a. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res*. 2003;9(5):1611-1615.
100. Relling MV, Hancock ML, Boyett JM, Pui C-H, Evans WE. Prognostic importance of 6-mercaptopurin dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1999;93:2817-2823.

101. Ruczinski I, Kooperberg C, LeBlanc M. Logic Regression. *Journal of Computational and Graphical Statistics*. 2003;12(3):475-511.
102. Lievers KJ, Kluijtmans LA, Blom HJ. Genetics of hyperhomocysteinaemia in cardiovascular disease. *Ann Clin Biochem*. 2003 Jan;40(Pt1):46-59.
103. Pullarcat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA u.a. Thymidylat synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapie. *Pharmacogenomics J*. 2002;1(1)65-70.
104. Cheok M H, Nicolas Pottier, Leo Karger, William E. Evans. Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2009; 46(1):39-51.
105. Lauten M, Asgedom G, Welte K, Schrappe M, Stanulla M. Thymidylate synthase gene polymorphism and its association with relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2003;88(3):353-354.
106. Treviño LR, Yang W, French D, u. a. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet*. 2009;41(9):1001-1005.
107. Yang JJ, Cheng C, Yang W, u. a. Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*. 2009;301(4):393-403.

## 10 Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die mich mit Rat und Tat bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich meiner Doktormutter Frau PD Dr. Monika Brüggemann für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Kneba für das Interesse an dieser Arbeit und die Unterstützung.

Herrn Dr. Thorsten Raff gilt besonderer Dank für die Hilfe zur Erstellung der statistischen Daten, Betreuung auf den Kongressen und das unermüdliche Beantworten aller Fragen.

Frau Dr. Silke Lüschen danke ich für die Einführung in das Thema und die praktischen Tipps und Tricks zum Erlernen der Laborarbeit.

Ich danke dem Laborteam für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der praktischen Versuche.

Von ganzem Herzen danke ich Ralf und meiner Familie, die mich während der Erstellung der Dissertation stets ermutigt haben und fest an meiner Seite standen.

## 11 Curriculum vitae

Name: Kaiser

Vorname: Marielene

Geburtstag: 04.11.1983

Geburtsort: Düsseldorf

Wohnort: Jahnstraße 27, 40215 Düsseldorf

Eltern: Dr. Klaus Jürgen Hubert Kaiser, Allgemeinmediziner  
Monika Kaiser geb. Schmitt, Kinderärztin

Geschwister: Valerie Antonia Kaiser  
Marie -Theres Kaiser

Konfession: römisch -katholisch

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung: 1990 –1994 Grundschule Rottsieper Höhe in Wuppertal  
1994 – 2003 Wilhelm –Dörpfeld –Gymnasium in  
Wuppertal, Abschluß : Abitur  
ab 2003 Christian –Albrechts –Universität zu Kiel ,  
Sommer 2005 : 1. Staatsexamen  
Dezember 2009: 2.Staatsexamen

Beruflicher Werdegang: ab 2010 Assistenzärztin im Dominikus Krankenhaus  
Düsseldorf Heerdt, Innere Medizin

## 12 Veröffentlichungen zum Dissertationsthema

Kaiser M, Lüschen S, Hölzer D, Kneba M, Brüggemann M. Bedeutung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) der Thiopurin-Methyltransferase (TPMT) für das Therapieansprechen bei der Akuten Lymphatischen Leukämie der Erwachsenen. NWGIM, Nordwestdeutsche Gesellschaft für Innere Medizin : 133. Tagung. - Hamburg 2007.

Kaiser M, Lüschen S, Gökbuget N, Raff T, Hoelzer D, Kneba M, Brüggemann M. Thiopurine Methyltransferase genotype, minimal residual disease and clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): Significant differences between B- and T- lineage ALL *Onkologie* 2008;31(suppl 4): 15; V33. Freier Vortrag auf der Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Wien.

Raff T\*, Kaiser M\*, Gökbuget N, Lüschen S, Ritgen M, Trautmann H, Reutzel R, Hoelzer D, Kneba M, Brüggemann M. Uncovering early, lineage-dependent effects of TPMT genotype in adult acute lymphoblastic leukemia by minimal residual disease. *Leukemia*. 2012 Sep 27. doi: 10.1038/leu.2012.275. [Epub ahead of print]

\*These authors contributed equally to this work.