

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
Hämatologie und Onkologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

**Untersuchungen zur Asparagin Synthetase-Expression als Surrogatparameter für das
Therapieansprechen auf L-Asparaginase und für L-Asparaginase Toxizität**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Claudia Stern
aus Herford
2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr.med. H.Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. J. Boos
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. H. Serve

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 2004

Aus der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
Hämatologie und Onkologie
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. J. Boos
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. H. Serve

Zusammenfassung

Untersuchungen zur Asparagin Synthetase-Expression als Surrogatparameter für das Therapieansprechen auf L-Asparaginase und für L-Asparaginase Toxizität

Claudia Stern

Das Enzym L-Asparaginase ist Bestandteil der Behandlungsprotokolle in der Chemotherapie der akuten lymphatischen Leukämie und des Non-Hodgkin-Lymphoms. Es katalysiert die Hydrolyse der Aminosäure L-Asparagin, über deren Depletion im Extrazellularraum es zytotoxisch auf neoplastische Zellen wirkt, für die sie eine essentielle Aminosäure darstellt. Normale Körperzellen besitzen das Enzym Asparagin Synthetase (ASYN), das die Eigensynthese des L-Asparagins ermöglicht. Eine erhöhte Expression der ASYN kann zur Entwicklung einer Resistenz neoplastischer Zellen gegenüber Asparaginase führen. Der Grad der ASYN-Expression stellt also einen wichtigen Parameter für die Beurteilung der Sensitivität gegenüber L-Asparaginase dar.

Für eine Subgruppe der ALL mit der Translokation t(12;21), aus der das Fusionsgen TEL/AML 1 resultiert, konnte im MTT-Test eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber Asparaginase im Vergleich zu anderen untersuchten Kollektiven nachgewiesen werden. Die Bestimmung der m-RNA-Konzentration mit Hilfe der RT-PCR in Subgruppen mit und ohne Translokation konnte auf molekulargenetischer Ebene bestätigen, dass es in der TEL/AML1 positiven Gruppe zu einer verminderten Expression der ASYN kommt, welche die hohe Sensitivität dieser Subgruppe gegenüber L-Asparaginase bedingt.

Neben der Bedeutung der ASYN für die Chemosensitivität leukämischer Zellen wurde auch seine Rolle im Zusammenhang mit unerwünschten Wirkungen der L-Asparaginase überprüft. Eine unzureichende Expression der ASYN in normalen Körperzellen könnte über ähnliche Mechanismen wie in neoplastischen Zellen zu einer Störung der Proteinbiosynthese und damit der DNA- und RNA-Synthese führen. Ein matched-pair Vergleich von Patienten mit und ohne Nebenwirkungen unter der Therapie mit L-Asparaginase ergab jedoch eine ausgeprägte Variabilität der Expression in beiden Gruppen, so dass eine prognostische Aussage hinsichtlich möglicher Nebenwirkungen mit Hilfe des Grades der ASYN-Expression nicht möglich ist.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2004

Meinen Eltern

Inhalt

1.0	Einführung in die Thematik	1
1.1	L-Asparaginase	1
1.1.1	Entdeckung	1
1.1.2	Chemische Eigenschaften	1
1.1.3	Wirkungsmechanismus	2
1.1.4	Nebenwirkungen der Therapie mit L-Asparaginase	4
1.1.5	Anwendungsgebiete	8
1.2	Akute lymphatische Leukämien (ALL) im Kindesalter	9
1.2.1	Diagnostik und Klassifizierung	9
1.2.2	Prognostische Marker bei der ALL	10
1.3	Translokation t(12;21) und TEL/AML 1-Fusionsgen	13
1.3.1	Inzidenz und molekulargenetische Bedeutung des Fusionsgens	13
1.3.2	Klinische Bedeutung von TEL/AML 1	14
1.3.3	TEL/AML 1 als mögliches Stratifikierungskriterium für eine risikoadaptierte Therapie	14
1.4	Bedeutung der L-Asparaginase als Therapieelement in den Behandlungsprotokollen der ALL	16
1.5	Therapieprotokoll der ALL/NHL-BFM-2000 Studie	17
1.6	Asparagin Synthetase (ASYN)	18
1.7	Ätiologie der Nebenwirkungen	21
1.8	Zielsetzung der eigenen Untersuchung	22
2.0	Eigene Untersuchung	23
2.1	Untersuchungen zur ASYN-m-RNA-Expression in leukämischen Blasten	23
2.1.1	Patientenkollektiv	23
2.2	Asparagin Synthetase als prognostischer Parameter für L-Asparaginase Toxizität	23
2.2.1	Studiendesign	23

2.2.2	Patientenkollektiv	24
2.2.2.1	Einschlusskriterien	24
2.2.2.2	Patienten	26
2.3	Material und Methoden	28
2.3.1	RNA-Isolation aus leukämischen Blasten	28
2.3.2	Isolierung der RNA aus Vollblut unter Verwendung des kommerziell erhältlichen QIAamp RNA Blood Mini Kits	28
2.3.3	Erststrangsynthese	29
2.3.4	Quantitative PCR am Lightcycler	30
2.3.4.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.3.4.2	Herstellung der Kalibrationsgeraden	34
2.3.4.3	Überprüfung der Reinheit des PCR-Produktes	36
3.0	Ergebnisse	38
3.1	Methodenvalidierung	38
3.1.1	m-RNA-Expression in Leukozyten als Surrogatparameter für die ASYN-Expression	38
3.1.2	Untersuchungen zur Stabilität der m-RNA in Leukozyten	40
3.2	ASYN-Expression in c-ALL und T-ALL	42
3.3	ASYN-Expression in peripheren Leukozyten	45
3.3.1	Untersuchungskollektiv	45
3.3.2	ASYN-Expression in Patienten mit ALL und gesunden Personen	48
3.3.3	Vergleich der ASYN-Expression in leukämischen Blasten und peripheren Leukozyten	55
4.0	Diskussion	56
4.1	Methodenvalidierung	56
4.2	TEL/AML 1 als Marker für das Ansprechen auf eine Therapie mit L-Asparaginase	56
4.3	ASYN-Expression als Surrogatparameter für die Entstehung von	62

	Nebenwirkungen unter L-Asparaginase	
5.0	Zusammenfassung	65
6.0	Literaturverzeichnis	67
7.0	Lebenslauf	74
8.0	Danksagung	75

Anhang

I	Daten der Studienteilnehmer zur Untersuchung zur ASYN-m-RNA-Expression in leukämischen Blasten	I
II	Ergebnisse der RT-PCR	II
III	Daten der Studienteilnehmer zur Untersuchung der ASYN-Expression in peripheren Leukozyten	IV
III-I	Patienten und Kontrollpersonen	IV
III-II	Probenmaterial von erwachsenen Personen	VII
III-III	Probenmaterial von pädiatrischen Patienten	VIII
	Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme	IX
	Altersverteilung der erwachsenen Kontrollpersonen	IX
	Altersverteilung der Patienten aus der Pädiatrie	IX
	Abstand nach Therapieende	XI
IV	Ergebnisse der RT-PCR	XI
V	Einverständniserklärung	XIV
VI	Eltern- und Patientenaufklärung	XV

1.0 EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK

1.1 L-Asparaginase

1.1.1 Entdeckung

Die Entdeckung der wachstumshemmenden Wirkung von L-Asparaginase wurde 1953 von Kidd gemacht. Er fand heraus, dass Meerschweinchenserum das Wachstum von Lymphomen in Mäusen und Ratten hemmt [11]. Aus vergleichenden Versuchen mit Pferde- und Kaninchenserum, die diese Wirkung nicht besitzen, folgerte Broome, dass das Enzym L-Asparaginase für diesen antineoplastischen Effekt verantwortlich ist. Auf der Suche nach ergiebigeren Enzymquellen für den therapeutischen Einsatz der L-Asparaginase fanden Mashburn und Wriston heraus, dass das Enzym aus dem Bakterium *Escherichia coli* (*E.coli*) ähnliche antileukämische Eigenschaften besitzt. Mit diesem Wissen wurde es möglich, größere Mengen für den klinischen Gebrauch zu gewinnen. Heutzutage existieren Präparate von *Escherichia coli* (*E.coli*), nativ oder gekoppelt an Polyethylenglykol, und von *Erwinia chrysanthemi* [11]. Auch andere Mikroorganismen (*Bacillus coagulans*, *Fusarium tricinctum*), Pflanzen und Vertebraten besitzen das Enzym, die antineoplastische Potenz ist jedoch nicht bei allen vorhanden [40; 46; 80].

1.1.2 Chemische Eigenschaften

Das Enzym L-Asparaginase hat ein Molekulargewicht von 130.000 Dalton [80]. Es besteht aus vier Untereinheiten mit einem Gewicht von 32.500 Dalton [23], die jeweils ein aktives Zentrum besitzen und über nichtkovalente Bindungen miteinander verknüpft sind. Nach intravenöser oder intramuskulärer Applikation hydrolysiert L-Asparaginase das L-Asparagin im Serum und Extrazellulärraum zu L-Asparaginsäure und Ammoniak (siehe Abb.1).

Auch die Aminosäure L-Glutamin wird durch das Enzym gespalten, jedoch hat es zu dieser nur eine wesentlich niedrigere Affinität. Da das L-Asparagin schon innerhalb weniger Minuten abgebaut ist, kommt es aber bei der Gabe hoher Dosen auch zum vollständigen Abbau des L-Glutamins.

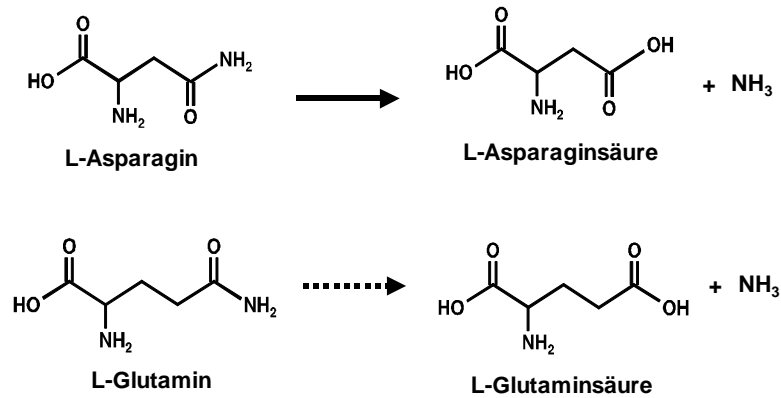


Abbildung 1 Hydrolyse von L-Asparagin und L-Glutamin durch L-Asparaginase

1.1.3 Wirkungsmechanismus

L-Asparagin stellt nur für solche Zellen eine essentielle Aminosäure dar, die nicht oder in nur unzureichender Aktivität über das Enzym Asparagin Synthetase (ASYN) verfügen, welches normalen Körperzellen unter L-Asparaginmangel eine ausreichende Eigensynthese aus L-Asparaginsäure und L-Glutamin als Aminogruppendonator ermöglicht.

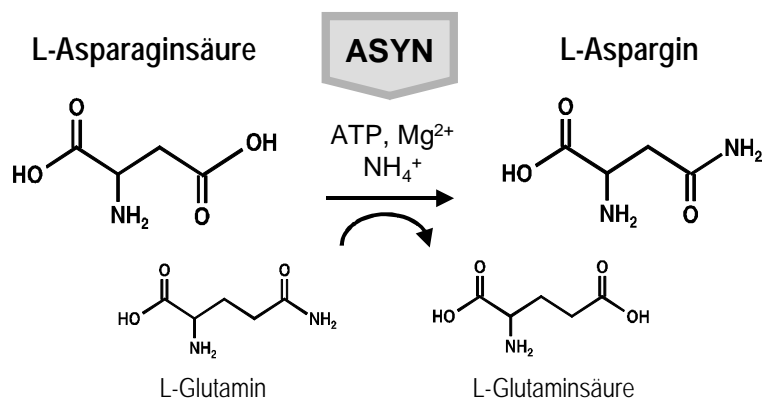


Abbildung 2 Katalytische Aktivität der Asparagin Synthetase

Solche Tumorzellen, die sensibel auf eine L-Asparaginase Therapie reagieren, sind auf einen extrazellulären L-Asparagin Pool angewiesen [9; 30; 80]. Die Gabe des Enzyms L-Asparaginase, welches nicht in die Zelle gelangt, führt bei diesen durch die Reduktion des verfügbaren L-Asparagins im Extrazellulärraum in kurzer Zeit zu einer verminderten Proteinbiosynthese und zu einer Hemmung der DNA- und RNA-Synthese. Es kommt zu DNA-Strangbrüchen und zur Apoptoseinduktion [2; 40; 74].

Da normale Zellen über das Enzym ASYN verfügen, kann das Enzym L-Asparaginase bei Tumorzellen mit unzureichender ASYN-Aktivität als selektive antineoplastische Substanz wirken.

1.1.4 Nebenwirkungen der Therapie mit L-Asparaginase

Entgegen den Erwartungen traten unter der Behandlung mit L-Asparaginase trotz ihres gezielten und selektiven Wirkungsmechanismus zahlreiche Nebenwirkungen auf, die in den meisten Fällen reversibel sind. Die Art und Schwere der Reaktion variiert deutlich von Patient zu Patient, was nicht allein durch die unterschiedliche Wahl der Dosierung und Applikationsform ausreichend zu erklären ist [10; 29; 42].

Folgende Nebenwirkungen werden im Zusammenhang mit einer L-Asparaginase Therapie beobachtet.

Immunologische Reaktionen

Als immunologische Reaktion kommt es bei einem großen Teil der Patienten (ca. 70%) zur Bildung spezifischer Antikörper, die die Grundlage unterschiedlicher Reaktionen sein können. Diese hängt jedoch nicht mit der Wirkung von Endotoxinen zusammen, die durch Kontamination von aus E. coli gewonnenen Präparaten bedingt sein könnte. Eine gehäufte Inzidenz wurde bei gleichzeitiger intravenöser Gabe von Vincristin und Prednison beobachtet [29; 42]. Die klinische Symptomatik reicht von Schmerzen an der Injektionsstelle über lokale Erythembildung, generalisierte Urtikaria, Larynxödemen und Bronchospasmus bis zum systemischen anaphylaktischen Schock. Die Inzidenz liegt bei 5- 35% (davon sind etwa 10% schwerwiegende Reaktionen), wobei bei einem Großteil der Fälle lokale Reaktionen und/oder Urtikaria auftreten [10]. Sie steigt mit der Anzahl der Gaben innerhalb eines Behandlungszyklus, bei erneuter Gabe

nach längerer Therapiepause und wird bei Kombinationschemotherapien vermutlich durch den immunsuppressiven Effekt der Begleitmedikation seltener beobachtet. Intravenöse Gaben führen häufiger zu Reaktionen als intramuskuläre Injektionen [10]. Diskutiert wird, ob die Antikörper, welche gegen unterschiedliche Determinanten des Enzyms gerichtet sind, die Ursache für eine erhöhte Rate von Enzyminaktivierung darstellen. In einigen Fällen tritt ein sehr früher Aktivitätsabfall der L-Asparaginase auf, der ohne Zeichen einer anaphylaktischen Reaktion abläuft ("silent inactivation"). Dies könnte auch ein Grund für eine (erworbene) Resistenz gegen eine L-Asparaginase-Therapie sein [11; 43]. Es konnte ein klarer Zusammenhang zwischen Symptomen einer allergischen Reaktion, der Enzymaktivität und dem Vorkommen von Antikörpern hergestellt werden.

Neben immunogener beobachtet man auch eine immunsuppressive Wirkung der L-Asparaginase durch Hemmung der Knochenmarksfunktion [33; 75]. Dieses kann zu einer vermehrten Infektanfälligkeit führen [8; 11; 75].

Gastrointestinale Störungen

Gastrointestinale Störungen in Form von Übelkeit und Erbrechen, Diarrhoen und Appetitverlust, oft begleitet von Fieber [29; 75], treten neben Gewichtsverlusten bei mehr als der Hälfte aller Patienten auf. Generell wird eine Häufung bei Erwachsenen, insbesondere bei älteren Patienten beobachtet [10; 75].

Toxische Effekte auf die Mund- und Darmschleimhaut und auf Haarfollikel werden dagegen nicht gefunden [10; 29; 75].

Gerinnungsstörungen

Eine Affektion des Gerinnungssystems kann sowohl als Hyperkoagulobilität mit Thrombosen als auch als Hämorrhagien und dissimierter intravasaler Gerinnung in Erscheinung treten. Bedingt sind diese Zwischenfälle durch einen Mangel oder durch eine Imbalance verschiedener Faktoren der Gerinnungskaskade. Häufig kann eine verminderte Konzentration des Fibrinogens (in 50-100% der Fälle), der Faktoren IX und XI (in 75-100% der Fälle), des Antiithrombin III und des Plasminogens gemessen werden. Eine klinische Manifestation bleibt aber trotz der hohen Inzidenz der Laborveränderungen in den ersten 3-4 Wochen der Behandlung selten. Von den

Laborveränderungen Rückschlüsse auf die Wahrscheinlichkeit eines Zwischenfalls zu ziehen, ist nicht möglich [8]. Diese Veränderungen sind in den meisten Fällen auch bei Fortsetzung der Therapie innerhalb weniger Wochen reversibel. Nur 1- 2% der Patienten entwickeln schwere Komplikationen [49]. Auch hier bleiben zusätzliche Faktoren, die eine eindeutige Zuordnung nicht möglich machen, zu berücksichtigen. Gerade im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium treten Thrombozytopenien auf, die ein erhöhtes Hämorrhagierisiko bewirken können. Eine genetische Disposition z.B. in Form einer APC-Resistenz führt zu einer erhöhten Inzidenz von thrombembolischen Zwischenfällen [41].

Beschrieben sind aber auch direkte Effekte auf das Knochenmark, die von milder bis zu vollständiger Suppression aller drei Zelllinien reichen können.

Neurotoxizität

Selten bei Kindern, jedoch gehäuft bei Erwachsenen kommt es zu einer Beeinträchtigung der Funktionen des zentralen Nervensystems, die sich als Agitation, Depression, Halluzination, Desorientiertheit, Konvulsion und Somnolenz bis hin zum Koma manifestieren können [10; 29]. Die Inzidenz dieser Nebenwirkungen steigt nur bei der Gabe sehr hoher Dosen (1000-5000IU/kg/d). Ausgeprägte klinische neurologische Läsionen treten nicht auf. Die Dysfunktion wird im Zusammenhang mit metabolischen Veränderungen des Liquors bedingt durch die Depletion des L-Asparagins und L-Glutamins gesehen. Beschrieben wurde ein Zusammenhang zwischen neurologischen Symptomen und einem ausgeprägtem Anstieg des Ammoniakspiegels. EEG-Veränderungen in Form eines Abfalls der alpha-Wellen-Aktivität und eines vermehrtem Auftretens von delta- und theta-Wellen wurden bei 33% von 147 behandelten pädiatrischen Patienten beobachtet [42].

Stoffwechselstörungen

Der Lipidmetabolismus zeigt ebenfalls Veränderungen unter L-Asparaginase in Form von Hypo- oder Hyperlipidämien, die ebenso im Zusammenhang mit der Glukokortikoidgabe stehen könnten. Einige Autoren beschreiben einen Abfall des Serumcholesterins, der nicht dosisabhängig stattfand. Bei anderen Patienten des selben Kollektivs entwickelte sich eine Hypercholesterinämie, eine Erhöhung der Phospholipide sowie der Triglyzeride [20; 40]. Die

Aktivität der Lipoproteinlipase wurde niedrig gemessen. Die Befunde entsprechen dem biochemischen Muster einer Typ V Hyperlipoproteinämie [42]. Andere Autoren beobachteten einen zum Teil massiven Anstieg der Triglyzeride. Hohe Serumspiegel der VLDL-Fraktion sind assoziiert mit einem Abfall der LDL-Lipoproteinfraktion und erhöhter Lipoproteinlipaseaktivität.

Veränderungen der Serumproteine

Die beeinträchtigte Proteinbiosynthese kann zu einem Abfall der Serumproteine führen. Oettgen et al. beobachteten bei 80% der Patienten einen verringerten Albuminspiegel, außerdem erniedrigte alpha-2- und beta-Globuline, während die alpha-1-Globuline keine signifikante Veränderung zeigten. Die Fraktion der gamma-Globuline war bei einem Teil der Patienten erhöht. Hypoproteinämische Ödeme unter L-Asparaginase treten nur selten auf (5- 7% der Fälle) [40].

Lebertoxizität

Einschränkungen der Leberfunktion unter der Behandlung tauchen häufig auf, bleiben aber in einem Großteil der Fälle klinisch inapparent. In 30-40% der Fälle werden im Serum erhöhte Spiegel der alkalischen Phosphatase und der Aspartat Aminotransferase gemessen, desweiteren sind Bilirubin- (30-60% der Patienten) und 5'-Nukleotidase-Anstiege und eine erhöhte Bromsulphthaleinretention zu beobachten. Eine signifikante Dosisabhängigkeit dieser Veränderungen konnte nicht festgestellt werden. Der Mechanismus dieser Dysfunktion liegt vermutlich einerseits in der Störung der Proteinsynthese und andererseits in einer fettigen Degeneration des Parenchyms, die bei über 70% der Patienten bei der Autopsie diagnostiziert wird [8; 10; 20; 29].

Pankreastoxizität

Bei ca. 3-16% der Patienten kommt es zu akuten Pankreatitiden mit Übelkeit, Erbrechen und Anorexie, die zum Teil zu lebensbedrohlichen Zuständen [4; 75; 80]. Über Todesfälle wurde mehrfach berichtet. Die Enzymdiagnostik ergibt häufig erhöhte Amylase- und Lipasespiegel, kann aber auch unauffällig bleiben [38; 77]. Die histologische Aufarbeitung von Autoptaten zeigt fokale Nekrosen und Zeichen einer abgelaufenen Entzündung. Eine Zuordnung zu der applizierten

L-Asparaginase Dosis ist jedoch nicht möglich [8; 10]. Ein Zusammenhang mit der Einnahme von Steroiden wird kontrovers diskutiert [4; 5; 77]. Die Veränderungen können auch Wochen bis Monate nach Beendigung der Therapie auftreten.

Störungen der endokrinen Pankreasfunktion

Als verminderte Glukosetoleranz manifestiert sich bei ca. 11% der Patienten eine Schädigung der endokrinen Pankreasfunktion [77]. Ein direkter Zusammenhang mit einer parallel bestehenden Pankreatitis ist nicht gesichert [15]. Dabei treten sowohl Hypoglykämien als auch schwere Ketoazidosen und nicht ketoazidotische hyperosmolare Hyperglykämien, die auf exogenes Insulin gut ansprechen, auf. Zurückgeführt werden hyperglykämische Zustände häufig auf eine verminderte Insulinverfügbarkeit [12; 78]. Andere Autoren postulieren eine eingeschränkte Insulinsekretion [30; 77; 78], eine strukturelle Änderung des Insulinmoleküls und eine Verringerung der Insulinrezeptordichte aufgrund einer Hypoglykämie bzw. eine Veränderung dessen Konformation und Aktivität [12]. Außerdem könnte ein Effekt auf alpha- und beta-Zellen zu einem Insulindefizit in Kombination mit einer Hyperglukagonämie führen [55]. Die Hyperglykämien wurden in einer schweren und prolongierten Form bei einer kombinierten Gabe mit Glukokortikoiden beobachtet [14]. Manche Autoren beschreiben keine Veränderungen bei einer Kombinationstherapie. Eine Dosisabhängigkeit wurde beschrieben [78]. Die Wahrscheinlichkeit für derartige Zwischenfälle ist abhängig vom Alter des Patienten, von dessen Gewicht, der Familienanamnese und von einem etwaigen Down-Syndrom bei Kindern über 10 Jahren [8; 51].

Nephrotoxizität

Die Nierenfunktion kann in unterschiedlichem Ausmaß affiziert sein. Dabei kommt es häufig zu einer Erhöhung des Harnstoffspiegels im Blut, die auch im Zusammenhang mit einem erhöhten Ammoniakspiegel stehen könnte. Sie ist unabhängig von der applizierten L-Asparaginase Dosis. Fälle von Hypertension und akutem Nierenversagen sind ebenfalls beschrieben. Wird die Behandlung im Fall einer Azotämie, die oft von prärenalen Störungen begleitet ist, fortgeführt, kommt es innerhalb von zwei bis drei Wochen zu einer Normalisierung des Harnstoffspiegels. Eine transiente Proteinurie leichten Grades taucht bei nur etwa 10% der Patienten auf [8].

Immunhämolytische Anämie

Unter der Therapie wird bei einer kleinen Anzahl von pädiatrischen Patienten eine klinisch manifeste akute hämolytische Anämie beobachtet. Dabei fällt der direkte Antikörpertest (Coombs) negativ aus, während der indirekte bei Vorhandensein von L-Asparaginase ein positives Ergebnis zeigt. Die Ätiologie bleibt ungeklärt, möglicherweise handelt es sich um eine sekundäre medikamenteninduzierte Immunhämolyse [8; 75].

1.1.5 Anwendungsgebiete

Die in vitro beobachtete Antitumoraktivität der L-Asparaginase ließ sich in vivo nur bei wenigen Tumorentitäten bestätigen. Fest in die Therapiepläne aufgenommen wurde das Enzym bei der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und des Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL) im Kindes- und Erwachsenenalter.

1.2 Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine maligne Erkrankung unreifer lymphatischer Vorläuferzellen aus Knochenmark, Thymus oder lymphatischem Gewebe. Das unkontrollierte Wachstum der lymphatischen Blasten führt zu einer Verdrängung des normalen blutbildenden Systems, was eine hämatopoetische Insuffizienz zur Folge hat. Außerdem kommt es zur Ausschwemmung lymphatischer Blasten in das periphere Blut und zur disseminierten Infiltration anderer Organe. Innerhalb der Leukämien ist die akute lymphatische Leukämie mit etwa 80% die häufigste Form. Die ALL tritt größtenteils im Kindesalter (1-5 Jahre) auf mit 5,3/100.000 Einwohnern im Jahr. Ein zweiter Häufigkeitsgipfel liegt im Alter von über 80 Jahren (2,3/100.000). Das männliche Geschlecht überwiegt leicht (Verhältnis 3:2) [25; 32].

1.2.1 Diagnostik und Klassifizierung

Zu den Routineuntersuchungen bei der Erstdiagnose der ALL gehört die lichtmikroskopische Beurteilung von Knochenmarksausstrichen. Die Blasten werden nach der FAB- (French-American-British-) Klassifikation je nach vorherrschender Zellart in drei Gruppen (L1 bis L3) eingeteilt.

Als biochemische Marker dienen neben der Desoxynukleotidyltransferase (TdT), der von diesen die größte Bedeutung zukommt, die Adenosindesaminase, desweiteren die 5' Nukleotidase und die Purinnukleosidphosphorylase, die bei der c-ALL die höchsten Aktivitäten aufweisen, sowie die unterschiedlichen Isoenzyme der Hexosaminidase.

Die Immunphänotypisierung stellt die wesentliche Untersuchung für die Diagnosebestätigung und Klassifizierung dar. Die Unterteilung erfolgt in der Durchflusszytometrie mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern in T- und B-Linien-ALL und ihre Subgruppen gemäß dem Differenzierungsstadium der Blasten. Die Antikörper sind gegen an der Zelloberfläche oder intrazellulär lokalisierte Antigene gerichtet. International werden die verschiedenen Antikörper mit CD-Codes (cluster designation) bezeichnet. Hybridleukämien, die sowohl lymphatische als auch myeloische Antigene exprimieren, können so ebenfalls identifiziert werden.

Prognostische Bedeutung kommt lediglich der Einteilung in B-Vorläufer-ALL, T-ALL und reife B-ALL zu [53].

Die wichtigsten Marker für die immunphänotypische Differentialdiagnostik bei der akuten lymphoblastischen Leukämie wurden von der „European Group for the Immunological Characterisation of Leukemias“ vereinheitlicht und sind in Tabelle 1 zusammengefasst [25; 32].

ALL der B-Zelllinie	CD19+ u/o CD79a+ u/o CD22+ positiv mind. zwei von drei der o.g. Antigene meist TdT+ und HLA-DR+
pro- B- ALL	keine Expression weiterer Differenzierungsantigene
c (common)- ALL	CD10+
prä- B- ALL	zytoplasmatisches IgM+
B-ALL/ B-NHL	sIgM+ (membranständig oder zytoplasmatisch)

ALL der T-Zelllinie	zytoplasmatisch (membranständig) CD3+ meist TdT+, HAL-DR- und CD34-
pro-T-ALL	CD7+
prä-T-ALL	CD2+u/o CD5+ u/o CD8+
intermediäre T-ALL	CD1a+
reife T-ALL	membranständig CD3+, CD1a-
a/β+ T-ALL	anti-TCR a/β+
?/d+ T-ALL	anti- TCR ?/d+

ALL mit Koexpression von myeloischen Antigenen (My+ALL)	CD13, CD33, CD65
--	------------------

Tabelle 1 Marker in der immunphänotypischen Differentialdiagnostik der ALL

1.2.2 Prognostische Marker bei der ALL

Innerhalb der ALL besteht eine große Heterogenität bezüglich prognostisch bedeutsamer Merkmale, aus der unterschiedliche Heilungsraten der Patienten resultieren. Durch die gezielte Intensivierung der Therapie der T- und B-ALL, sowie der Behandlung junger Erwachsener (16-21 Jahre) konnte das Rezidivrisiko der Patienten gesenkt werden [18; 53]. Auf der anderen Seite

kommt es bei einigen Kindern, die schon durch eine milde Chemotherapie geheilt werden können, aufgrund einer zu intensiven Behandlung zu vermeidbaren Nebenwirkungen [61].

Eine wichtige Aufgabe besteht also darin, klinische und biologische Merkmale zu definieren, die von prognostischer Bedeutung sind und zu einer Klassifizierung in unterschiedliche Risikogruppen führen [69]. Die Kenntnis bestimmter zum Zeitpunkt der Diagnose identifizierbarer Parameter ermöglicht es, das individuelle Rezidivrisiko eines Patienten abzuschätzen und ihn entsprechend einer modifizierten Behandlung zuzuführen.

Das wichtigste prognostische Kriterium ist das Erreichen einer kompletten Remission. Patienten, die kein Ansprechen auf die Therapie zeigen, haben eine extrem schlechte Prognose.

Als Standardrisiko-Kriterien wurden 1993 nach dem Cancer Therapy Evaluation Program (CTEP) ein Alter von 1,00 bis 9,99 Jahren und eine Leukozytenzahl (WBC) von weniger als 50.000/ μ L definiert. Dieser Gruppe gehören zwei Drittel aller Kinder mit B-Vorläufer-ALL an. Alle anderen Kombinationen dieser Merkmale führen zu einer Zuordnung in den Hochrisiko-Therapiearm (Die 4-Jahres-Überlebensrate für diese beiden Gruppen wird mit 80% bzw. 65% eingeschätzt) [69; 70]. Der DNA-Gehalt der Leukämiezellen besitzt ebenfalls Bedeutung für die Beurteilung des Rezidivrisikos. Hyperdiploidien, die häufig durch Trisomie der Chromosomen 4 und 10 entstehen, gelten als günstiger Parameter [64; 69]. Der Zeitpunkt des Ansprechens auf die Therapie (bewertet mittels Knochenmarkspunktion an Tag 14) stellt ein weiteres prognostisches Kriterium dar. Die BFM-Studie (Berlin-Frankfurt-Münster) bewertet die Prednison-Response an Tag 8 des Protokolls I bezogen auf die Anzahl der Blasten im peripheren Blut [53; 66; 69].

Als Marker auf molekulargenetischer Ebene gilt der Nachweis der Translokation t(9;22), bei der das BCR-ABL-Fusionstranskript nachgewiesen wird, als ungünstig. Sie weist eine Häufigkeit von 2-4% bei B-Vorläufer-ALL auf. Von ähnlicher Bedeutung ist die Translokation t(4;11) mit dem molekulargenetischen Äquivalent MLL/AF4. Sie zeigt eine Prävalenz von 1- 2% [69]. Das Fusionsgen TEL/AML1 (t[12,21]) wurde bisher nicht als diagnostisches Kriterium für die Evaluation des Rezidivrisikos aufgenommen. Es stellt die häufigste Translokation bei der ALL im Kindesalter dar (ca. 25%) [6; 62]. Zahlreiche Studien deuten auf seine positive prognostische Bedeutung hin [39]. Das Fusionsgen E2A/PBX1 gilt daneben für die B-Vorläufer-ALL als zweithäufigste Translokation mit einer Inzidenz von 5- 6%.

Die Bedeutung anderer Aberrationen wie Inversionen, Deletionen, überzählige oder fehlende Chromosomen sowie Hyper- und Hypodiploidien ist noch nicht vollständig geklärt.

Merkmal	günstige Prognose	ungünstige Prognose
Leukozytenzahl bei Diagnosestellung (WBC)	< 50.000/ μ L	> 50.000/ μ L
Manifestationsalter	1- 9,99 Jahre	Säuglingsalter >10 Jahre
Zyto-/ Molekulargenetik	t (12;21)	t (4;11); t(9;22)
Chromosomenzahl bzw. DNA- Index	> 50 Chromosomen DNA- Index > 1,16	< 46 Chromosomen
Zeitpunkt des Ansprechens auf die Therapie	z.B. Prednison – Response an Tag 8 < 1000 Blasten/ μ L	> 1000 Blasten/ μ L an Tag 8
in vitro- Verhalten	Niedrige LC ₅₀	Resistenz gegenüber der getesteten Substanz
extramedullärer Befall		ZNS- Befall

Tabelle 2 Prognostische Marker bei der ALL

Beim Auftreten eines Rezidivs treten andere prognostische Faktoren in den Vordergrund. Hier ist die Latenz der ersten Remission, der Immunphänotyp der leukämischen Zellen und ihr Ursprung von Bedeutung [67].

1.3 Translokation t(12;21) und TEL/AML 1-Fusionsgen

1.3.1 Inzidenz und molekulargenetische Bedeutung des Fusionsgens

Die Translokation t(12;21)(p13;q22), aus der das Fusionsgen TEL/AML 1 resultiert, stellte in den letzten Jahren einen Parameter von wachsendem Interesse und zunehmender Bedeutung für die Beurteilung der Prognose von Kindern mit ALL dar.

TEL/AML 1 kann bei ca. 22- 25% der pädiatrischen Patienten mit akuter lymphoblastischer B-Vorläufer Leukämie (ALL) gefunden werden (bei 18- 22% aller Kinder mit ALL) und ist damit die häufigste Genfusion bei kindlicher ALL [57; 61; 62; 73]. Bei Erwachsenen mit ALL wird es nur bei 1,5- 3% der Fälle diagnostiziert [38].

Das Fusionsgen wurde 1994 von Berger et al. entdeckt. Seine Prävalenz unter den pädiatrischen Patienten mit ALL wurde früher mit der herkömmlichen Routine-Zytogenetik bedingt durch die Ähnlichkeit des Bandenmusters des kurzen Arms von Chromosom 12 und des langen Arms von Chromosom 21 zum Teil erheblich unterschätzt [6; 58]. Durch die Detektion mit der Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH) und PCR-basierten Methoden ist eine exaktere Bestimmung möglich geworden [6; 62; 68].

Das TEL-Gen (TEL steht für translocation ets leukemia) auf Chromosom 12p13 gehört zu der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren und agiert als spezifischer DNA-bindender Regulator der Transkription [56; 62; 67]. Der TEL-abhängigen Regulierung bestimmter Zielgene kommt eine zentrale Bedeutung für die Hämatopoese aller Zelllinien zu, besonders in bezug auf die aus der Leber stammenden fetalen Vorläuferzellen [44].

Bei der Translokation t(12;21)(p13;q22) fusioniert TEL mit AML1, das auch als CBFA2 bekannt ist und sich auf Chromosom 21q22 befindet [62]. AML1 wurde erstmals entdeckt durch seine Fusion mit dem ETO-Gen in der Translokation t(8;21)(q22;q22), das mit der akuten myeloischen Leukämie assoziiert ist [27; 58]. Es stellt die DNA-bindende Untereinheit des AML-1/CBFB Transkriptionsfaktorenkomplexes dar und reguliert mit diesem in Verbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression Hämatopoese-spezifischer Gene wie der Myeloperoxidase, dem Rezeptor für CSF-1 und der Zytokine IL-3 und GM-CSF [44; 67; 68; 72].

Es konnten zwei Formen von Transkripten des Fusionsgens identifiziert werden. Ein langer Typ mit 267 Basenpaaren und ein kurzer, weniger häufig vorkommender mit 228 Basenpaaren. Dem kürzeren Fragment fehlt ein Exon, das im Bereich des AML1-Gens liegt [6; 38; 73]. TEL und AML

sind unabhängig voneinander an zahlreichen Translokationen in akuten und chronischen Leukämien und myelodysplastischen Syndromen beteiligt [7; 45; 72].

1.3.2 Klinische Bedeutung von TEL/AML 1

Pädiatrische Patienten, die das TEL/AML 1-Gen besitzen, zeigen phänotypisch häufig eine B-Vorläufer ALL (CD10+, CD19+, HLA DR+) bei einem Alter zwischen 1 und 12 Jahren, wobei der Häufigkeitsgipfel bei 1- 5 Jahren liegt [6; 62]. Ihr DNA-Gehalt ist nicht hyperdiploid [6; 73]. Bei der T- oder B-Zell-ALL konnte das Fusionstranskript nicht gefunden werden. Beschrieben wurde auch das Fehlen von Organvergrößerungen und Hyperleukozytosen in dieser Patientengruppe [13]. Eine statistisch signifikante Assoziation mit myeloischen Antigenen wie CD13, CD33 und CDw65 wurde beobachtet, der aber keine negative prognostische Wertigkeit wie bei Erwachsenen zugeschrieben wurde [6; 13; 53].

1.3.3 TEL/AML 1 als mögliches Stratifizierungskriterium für eine risikoadaptierte Therapie

Die Bedeutung der Translokation im Hinblick auf die Prognose der Patienten wird kontrovers diskutiert. Manche Autoren beschreiben einen sehr günstigen Verlauf mit 5 Jahres Überlebensraten (JÜR) von 91 +/- 5%, verglichen mit 65 +/- 5% bei Patienten ohne diese Translokation [6; 38; 59; 60; 61], während in anderen Studien nur ein verzögertes Einsetzen von Rezidiven beobachtet wird [28; 73; 81].

In vergleichenden Studien zur Beurteilung der prognostischen Aussagekraft der Translokation ist es wichtig, dass das Merkmal isoliert beurteilt wird. Da TEL-AML1 positive Patienten eine Subgruppe definieren, die unabhängig von der Translokation günstige prognostische Merkmale wie einen niedrigen WBC und ein Alter <10 Jahren besitzt, kommt es bei den Vergleichen teilweise zur Separierung einer TEL-AML 1 negativen Gruppe, die gleichzeitig andere Hochrisikofaktoren aufweist, so dass die Wertigkeit des Fusionsgens nicht definitiv einzuschätzen ist [6].

Eine Studie von Rubnitz et al. wählte die Patientenkollektive zusätzlich unter Berücksichtigung anderer prognostisch bedeutender Merkmale so aus, dass sich das Vorhandensein des Fusionsgens allein als aussagekräftig darstellte. Unabhängig von anderen Faktoren ergab der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne TEL/AML 1 einen signifikanten Unterschied im

Hinblick auf das ereignisfreie Überleben (Event-free-Survival [EFS]), während sich beim Vergleich mit Kindern mit Hyperdiploidie kein Vorteil herausstellte. Die Wahl des Therapieprotokolls ist dabei von großer Bedeutung. Die Translokation stellt laut dieser Studie unter der Therapie mit modernen Protokollen ein von anderen Merkmalen unabhängiges Kriterium für die Beurteilung der Prognose dar [61]. TEL/AML positive Patienten profitieren nicht von einer Reduktion der Therapieintensität [62], wie teilweise postuliert wurde. Dafür sprechen u.a. die Beobachtungen einer Studie aus Japan, in der nur für solche Patienten eine höhere EFS-Rate festgestellt werden konnte, die mit einem intensiveren Regime behandelt worden waren. Bestandteil dieser Therapie war auch das Enzym L-Asparaginase, welches in den ersten 4 Wochen in einer Dosierung von 20.000U/m² gegeben wurde [73]. Vorteile zeigen auch auf Antimetaboliten basierende Therapieregime [63].

Welche Veränderungen in den leukämischen Blasten durch die Fusion im Hinblick auf die Therapierbarkeit stattfinden, bleibt bisher nicht ausreichend geklärt. Die Translokation scheint einen Unterschied in der Sensitivität gegenüber bestimmten Chemotherapeutika zu generieren.

Die Toxizitätsprüfung unterschiedlicher Immunphänotypen der ALL in vitro mit Prednison und L-Asparaginase ergab eine signifikant höhere Ansprechrate der c-ALL und prä-B-ALL im Vergleich zur T-ALL [48; 54].

Die Veränderungen in diesen neoplastisch veränderten Zellen bedingt durch die Translokation TEL/AML 1 könnten zu einer veränderten Regulation von Genen führen, die Einfluss auf Vorgänge und Stoffwechselprozesse haben, die im Zusammenhang mit der Sensitivität und Resistenz der Zellen eine Rolle spielen. Unter anderem über die Affektion von Promotorregionen könnte es zu einer Beeinflussung der Transkriptionsrate bestimmter Genregionen kommen [21; 27; 44]. Die Beteiligung von Onkogenen, die im Rahmen der Translokation eine Veränderung in Form einer Aktivierung, Deaktivierung oder Dysregulierung erfahren, ist ebenfalls denkbar.

Eine erhöhte Sensitivität der Blasten, die die Translokation tragen, gegenüber dem Enzym L-Asparaginase wäre unter Umständen durch einen gezielten, intensivierten Einsatz bei dieser Subgruppe der ALL zu nutzen.

1.4 Bedeutung der L-Asparaginase als Therapieelement in den Behandlungsprotokollen der ALL

Noch vor 25 Jahren war die Prognose eines Kindes, das an akuter lymphatischer Leukämie erkrankte, infaust. Der Großteil starb innerhalb von 2-3 Monaten nach Diagnosestellung [6; 50; 52].

Mit den heutigen Chemotherapie-Protokollen erreichen mehr als 90% der Patienten eine komplette Remission, von denen wiederum die Mehrzahl rezidivfrei bleibt (continuous complete remission= CCR) [63].

Die Therapie der akuten lymphatischen Leukämie und des Non-Hodgkin Lymphoms im Kindesalter erfolgt derzeit nach den Protokollen multizentrischer Studiengruppen, an den Universitätskliniken Münster nach dem BFM-Protokoll. Die derzeitige ALL-BFM-2000 Studie basiert auf Erfahrungen der vorherigen Studien 81, 83, 86, 90 und 95.

Die Behandlung nach dem ALL-BFM-Protokoll erstreckt sich über einen Zeitraum von insgesamt zwei Jahren (104 Wochen) und ist in verschiedene Abschnitte unterteilt. Vor Therapiebeginn werden die Patienten nach bestimmten Kriterien (siehe Kapitel 1.2.2) Risikogruppen von SR (Standard Risiko) über MR (Mittleres Risiko) bis zu HR (Hoch Risiko) zugeordnet, um sie risikoadaptiert unterschiedlichen Therapieintensitäten auszusetzen.

Das Enzym L-Asparaginase stellt ein wichtiges Element in den Therapieprotokollen der ALL dar. Es ist Bestandteil der Protokolle I (Induktionsphase), II und III (Reinduktionsphase). Die intensivierte L-Asparaginase Gabe in der Konsolidierungsphase (Protokoll M-A) im MRG-Zweig des Therapieprotokolls ALL-BFM-90 zeigte keinen Vorteil [65]. In der Phase der Dauertherapie wird L-Asparaginase nicht verabreicht.

Die Patienten erhalten im Protokoll I acht Gaben mit je 5.000 E/m²/d pi (1h) E. coli Asparaginase (CO-SPAR® von Fa. MEDAC), in den Protokollen II und III 10.000E/m²/d pi (1h) an vier Tagen. Bei allergischen Reaktionen erfolgt die Umstellung auf ein Alternativpräparat, Erwinia-Asparaginase (Erwinase® von Fa. SPEYWOOD) oder PEG-Asparaginase (Oncaspar® von Fa. MEDAC). Ziel der Gabe ist es, eine Enzymaktivität zu erreichen, die eine vollständige L-Asparagin Depletion im Plasma über einen Zeitraum von mindestens 2 Wochen sicherstellt. Da L-Asparaginase nicht myelosuppressiv wirkt, ist es für Multichemotherapieregime zusammen mit potentiell hämatologisch toxischen Substanzen geeignet. Im ALL-BFM-Protokoll wird es mit

Dexamethason/Prednison, Vincristin, Methotrexat, 6-Mercaptopurin, Cytarabin, 6-Thioguanin, Cyclophosphamid und Daunorubicin kombiniert.

1.5 Therapieprotokoll der ALL/NHL-BFM-2000 Studie

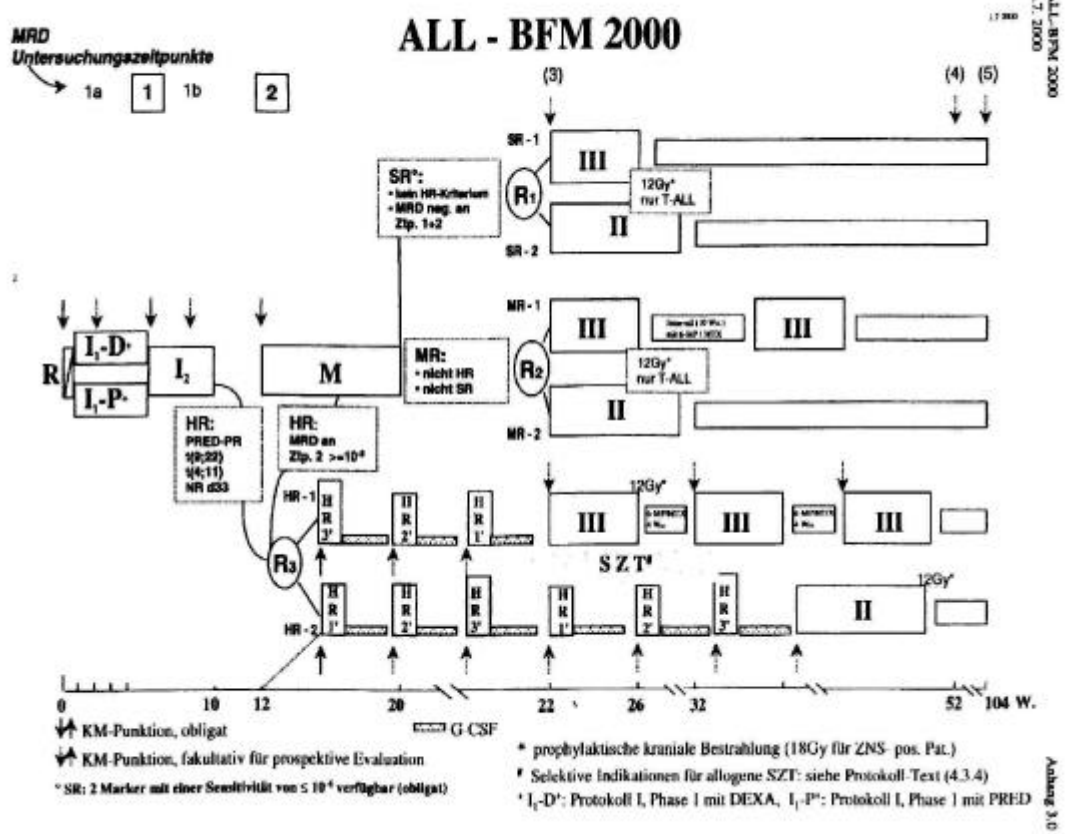


Abbildung 3 Therapieprotokoll ALL-BFM- 2000

1.6 Asparagin Synthetase (ASYN)

Schon 1969 konnte von Haskell et al. gezeigt werden, dass das Enzym Asparagin Synthetase (ASYN) von zentraler Bedeutung für das Ansprechen von Tumorzellen auf eine Therapie mit L-Asparaginase ist [30].

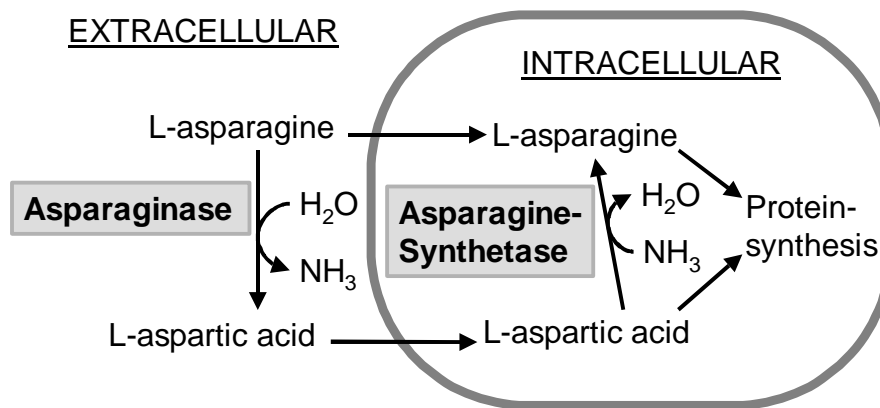


Abbildung 4 Wirkungsmechanismus der ASYN

Tumorzellen, die keine oder eine nicht ausreichende Aktivität der ASYN besitzen, reagieren sensibel auf eine Therapie mit L-Asparaginase. Diese Zellen sind nicht in der Lage, ausreichend L-Asparagin zu synthetisieren. Unter L-Asparaginmangel kommt es über die Induktion von Apoptosevorgängen zum Absterben der Zellen [33].

Eine hohe ASYN-Aktivität dagegen verleiht den Zellen Resistenz, da der L-Asparaginmangel durch Eigensynthese kompensiert werden kann. In MOLT-4 Leukämiezellen konnte gezeigt werden, dass über eine retrovirale Transformation die Expression der ASYN allein ausreichend ist, eine Resistenz der Zellen gegenüber L-Asparaginase zu induzieren [1].

Einen Mechanismus, der über eine erniedrigte Expression der ASYN zu einer Sensitivität der Blasten gegenüber dem Enzym L-Asparaginase führt, kann die Methylierung der Promotorregion des ASYN-Gens darstellen. In Abhängigkeit vom Methylierungsstatus von Zytosin-Basen in der 5' Region verschiedener Gene kommt es zu einer veränderten Expression dieser Genregion. Der Grad der Methylierung verhält sich dabei umgekehrt proportional zu der Transkriptionsaktivität des Genabschnittes. In chinesischen Hamster-Ovarialzelllinien N3, die keine ASYN-Aktivität besitzen und damit sensitiv gegenüber einer L-Asparaginase Therapie sind, konnte durch die

Gabe von 5-Azacytidin, welches eine direkte Hemmung der Methyltransferase bewirkt, und ebenso durch die Gabe von L-Asparaginase eine Demethylierung der 5' Region des ASYN-Gens erzeugt werden, die zu einer vermehrten ASYN-m-RNA-Expression führte. Die Zellen wurden dadurch resistent gegenüber einer Therapie mit L-Asparaginase [79].

In einigen Tumorzellen, die zunächst sensibel auf das Enzym L-Asparaginase reagiert haben, könnte es im Laufe der Therapie zur Entwicklung einer Resistenz gegenüber der L-Asparaginase kommen. Dazu kommt es über die Induktion einer erhöhten Expression des ASYN-Gens. Unter L-Asparaginmangel vermögen diese Zelle die Eigensynthese zu adaptieren. Untersuchungen bezüglich des Mechanismus dieser Hochregulation der ASYN-Aktivität ergaben, dass aus der Inkubation in Medien, denen bestimmte Aminosäuren fehlen, ebenfalls eine erhöhte Aktivität des Enzyms resultiert. Aus diesen Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die ASYN-Expression über den Mangel an Aminosäuren induziert wird. Eine andere Untersuchung fand einen Zusammenhang der Expression mit der Kohlenhydratversorgung der Zellen. In Abwesenheit von Glukose wurde die Aktivierung des ASYN-Gens ebenfalls beobachtet [3; 26; 35]. Bisher ist eine Wirksamkeit der L-Asparaginase nachgewiesen in der Behandlung der ALL und des NHL, akute myeloische Leukämien gelten als resistent.

Entgegen diesen Erwartungen stellten Dübbers et al. bei der Bestimmung der ASYN-Aktivität unterschiedlicher leukämischer Blasten eine große Heterogenität fest [19]. Sowohl in der Gruppe der ALL als auch in der AML existierte eine weite Spannbreite von sehr niedrigen bis zu hohen Aktivitäten des Enzyms. Die nähere Untersuchung von Subgruppen wiederum ergab bei der B-Linien-ALL sowie bei dem Subtyp AML-M5 eine deutlich niedrigere Expression mit einer geringeren Streubreite.

Auch monozytäre Leukämiezellen besitzen eine niedrige basale ASYN-Expression und auch nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden mit L-Asparaginase in vitro konnte keine Induzierbarkeit des Genabschnittes festgestellt werden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass L-Asparaginase bei diesen Subtypen der ALL möglicherweise eine therapeutische Option eröffnet.

Entsprechende Ergebnisse zeigten die Untersuchungen von Ramakers-van Woerden et al., die sich mit der in vitro Sensitivität frisch gewonnener Knochenmarkszellen von Kindern mit B-Vorläufer-ALL vor Therapiebeginn beschäftigten. Besonderes Augenmerk wurde auf die Translokation t(12;21)(p13;q22) gelegt, aus der das Fusionsgen TEL/AML 1 resultiert. Mittels MTT-Test konnte gezeigt werden, dass bei den Leukämiezellen, die das Fusionsgen TEL/AML 1

besitzen, gegenüber L-Asparaginase eine signifikant höhere Sensitivität besteht als bei der Gruppe, die die Translokation nicht trägt [54].

Kritisch zu bewerten sind Schlussfolgerungen dieser Ergebnisse für die Therapie mit L-Asparaginase. Von den Autoren wird postuliert, dass TEL/AML 1 positive Patienten von einem intensiveren Einsatz der L-Asparaginase profitieren würden, weil diese Blasten *in vitro* eine höhere Sensitivität besaßen.

Zu berücksichtigen bleibt aber, dass bei *in vitro* Untersuchungen andere Einflüsse, die nicht mit denen *in vivo* übereinstimmen, bedeutsamen Einfluss nehmen können. Die Tatsache, dass auch L-Glutamin ein Substrat des Enzyms L-Asparaginase ist, könnte von großer Wichtigkeit sein. Vor allem in L-Asparagin-freiem Medium kommt es schnell zum kompletten Abbau des L-Glutamins. So wird *in vitro* nach Abbau von L-Asparagin, welches eine höhere Affinität zur L-Asparaginase hat, L-Glutamin zu L-Glutaminsäure und Ammoniak abgebaut [11].

Fumarola et al. konnten zeigen, dass in CEM und HL-60 Zellen durch akuten L-Glutaminmangel die CD95-abhängige Apoptose induziert wird. L-Glutaminmangel bewirkt in einigen Leukämiezellen einen intrazellulären Mangel an Osmolyten und damit aufgrund der verringerten Spannung der Zelloberfläche eine Zellschrumpfung. Durch diese kommt es zur Multimerisation von CD95-Rezeptoren an der Zelloberfläche. Aus dieser Aggregation der Rezeptoren resultiert die Initiation einer Signaltransduktion ins Zellinnere, durch die Apoptose induziert wird

Dieser L-Glutaminmangel konnte auch durch die Gabe von L-Asparaginase erzeugt werden und hatte denselben Effekt. Die Depletion des L-Asparagins spielte in diesem Zusammenhang keine Rolle, in L-Asparagin-freiem Medium kam es nicht zur Induktion von Apoptosevorgängen [24].

Rama Krishna Narla et al. untersuchten die Expression des pro-apoptotischen Proteins Fas/CD 95 und des anti-apoptotischen Proteins Bcl2. Der CD95/Fas-Rezeptor gehört zu der Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren und ist einer der Hauptregulatoren der Apoptose in zahlreichen Zelltypen. Sie fanden heraus, dass TEL/AML 1 positive Blasten im Vergleich mit TEL/AML 1 negativen vermehrt CD95/Fas exprimieren und eine niedrigere Bcl2-Expression zeigen und machten diese Tatsache für die Chemosensitivität dieses Subtyps der ALL verantwortlich [36].

Außerdem entsteht bei der Hydrolyse des L-Asparagins neben L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure auch Ammoniak, welches ebenfalls zytotoxisch wirkt. Die *in vitro* Bedingungen entsprechen daher nicht denen *in vivo*, denn die verschiedenen Stoffe stellen im Körper unter

Gleichgewichtsbedingungen Substrate und Produkte unterschiedlicher Stoffwechselfvorgänge dar. Durch Veränderungen im Kulturmedium könnte es so zu zusätzlichen zytotoxischen Effekten kommen [76].

Um zu prüfen, ob die erhöhte Sensitivität analog zu den Beobachtungen von Dübbers et al. mit einer auf molekularbiologischer Ebene nachweisbaren erniedrigten Expression des ASYN-Gens assoziiert ist, wurde in dieser Untersuchung der m-RNA-Gehalt des entsprechenden Genabschnitts bestimmt.

1.7 Ätiologie der Nebenwirkungen

Zusammenhänge zwischen den Pharmaka und ihren Nebenwirkungen sind im Rahmen der Kombinationschemotherapie schwer zu definieren. Die genauen Mechanismen, die im Rahmen einer L-Asparaginase Therapie zu der Funktionsstörung der Gewebe führen, bleiben bisher unklar. Neben immunologischen Reaktionen auf das fremde Makromolekül kommt es in gesundem Gewebe zur Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese.

Ein möglicher Erklärungsansatz beschreibt die Ursache für unerwünschte Wirkungen der L-Asparaginase in einer unzureichenden Aktivität der ASYN in den betroffenen Geweben, die in einer zu niedrigen Basisexpression oder einer zu geringen Induzierbarkeit begründet liegt. In Organen mit erhöhtem Proteinumsatz könnte während der Therapie nach dem gleichen Mechanismus wie in L-Asparaginase-sensiblen Tumorzellen die Depletion der Aminosäure im Extrazellularraum nicht ausreichend kompensierbar sein. Die Hemmung der Proteinsynthese würde in solchen Geweben zu toxischen Effekten durch die Beeinträchtigung der DNA- und RNA-Synthese und gegebenenfalls nachfolgende Apoptoseinduktion führen.

Dieser unzureichenden Aktivität des Enzyms ASYN könnte ein defekter Regulationsmechanismus zugrunde liegen, der zu einer verminderten Konzentration des Enzyms und/oder zu einer gestörten Induzierbarkeit führt. Unter dieser Annahme wäre die genetische Disposition einer niedrigen ASYN-Aktivität in Mangelsituationen als Risikofaktor für die Entstehung von Nebenwirkungen zu bewerten. Besonders anfällig für Störungen ihrer Funktion sind solche Organe, die einen erhöhten Proteinumsatz besitzen wie die Leber und das Pankreas. Die Beobachtung, dass vor allem in diesen Organen die Rate und Gravität der unerwünschten Wirkungen besonders hoch ist, unterstützt diese Hypothese.

1.8 Zielsetzung der eigenen Untersuchung

L-Asparaginase stellt ein zentrales Element bei der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie dar. Im Rahmen der Optimierung einer Zytostatikatherapie wird eine risikoadaptierte Behandlung für Patienten angestrebt, die einerseits vorhandene Sensitivitäten von Untergruppen der leukämischen Blasten optimal nutzt, andererseits aber wegen der Gefahr von unerwünschten Wirkungen des Medikamentes nur so intensiv wie notwendig gewählt wird.

Das Enzym Asparagin Synthetase stellt in diesem Zusammenhang einen entscheidenden Parameter dar. Die Aktivität des Enzyms in leukämischen Blasten gilt als Maß für das Ansprechen von Tumorzellen auf eine Therapie mit L-Asparaginase.

Unter der Fragestellung ,ob auf molekularbiologischer Ebene die in vitro beobachtete Sensitivität der TEL/AML 1 positiven Blasten gegenüber einer L-Asparaginase Therapie zu bestätigen ist, wurde in Blasten unterschiedlicher leukämischer Untergruppen die m-RNA-Expression als Surrogatparameter für die Aktivität der ASYN gemessen.

Im Zusammenhang mit der Entstehung von L-Asparaginase-bedingten Nebenwirkungen besteht zweitens die Hypothese, dass sich in solchen Zellen des Körpers unerwünschte Wirkungen manifestieren, in denen aufgrund einer unzureichenden Aktivität der ASYN der L-Asparaginmangel nicht kompensiert werden kann.

In dieser Studie sollte die Frage beantwortet werden, ob sich über die ASYN-mRNA-Expression eine genetische Disposition für das Auftreten von Nebenwirkungen im Rahmen der L-Asparaginase Therapie identifizieren ließe. Korrelierte eine verminderte ASYN-Aktivität mit dem Auftreten von Nebenwirkungen, könnte diese als Risikofaktor bzgl. einer L-Asparaginase Therapie für den Patienten gewertet werden.

2.0 EIGENE UNTERSUCHUNG

2.1 Untersuchungen zur ASYN-m-RNA-Expression in leukämischen Blasten

2.1.1 Patientenkollektiv

Untersucht wurden Knochenmarksproben von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL), speziell mit B-Vorläufer-ALL und T-lymphozytärer Leukämie (T-ALL). Diese Biopsate wurden routinemäßig bei der Erstdiagnose entnommen.

Aus den verfügbaren Proben, die freundlicherweise von der Pathologie der WWU Münster in vollständig und irreversibel anonymisierter Form zur Verfügung gestellt wurden, ergab sich folgendes Patientenkollektiv:

Diagnose	TEL/AML1 positive ALL	TEL/AML1 negative ALL	T-ALL
Anzahl der Patienten	11	9	4

Tabelle 3 Patientenkollektiv für ASYN-Expression in leukämischen Blasten

Die Daten der Patienten sind im Anhang aufgeführt.

2.2 Asparagin Synthetase als prognostischer Parameter für L-Asparaginase-Toxizität

2.2.1 Studiendesign

Es handelt sich um eine klinisch-pharmakologische Verträglichkeitsstudie, die retrospektiv durchgeführt wurde.

Untersucht wurden Patienten, die im Rahmen einer akuten lymphatischen Leukämie oder eines Non-Hodgkin-Lymphoms mit L-Asparaginase nach den ALL/NHL-BFM-Protokollen behandelt wurden/werden.

Die Asparagin Synthetase-Aktivitäten von Kindern, deren Behandlung ohne Komplikationen hinsichtlich der Funktion von Pankreas und Leber verlief, wurden mit denen von Kindern mit durch L-Asparaginase induzierten Nebenwirkungen wie Hepatotoxizität, Pankreatitis oder einer

transitorischen insulinpflichtigen Hyperglykämie während der Therapie verglichen. Zwei Kontroll-Patienten wurden jedem Patienten mit Nebenwirkungen zugeordnet. Für die Studie vorgesehen waren 16 Kinder, die in Münster im Zeitraum von 1977 bis 2001 therapiert wurden. Die Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe gab am 09.06.2000 ihr uneingeschränktes positives Votum für die Durchführung der Studie. Die Erziehungsberechtigten bzw. im Falle der Einwilligungsfähigkeit die Patienten selbst erhielten eine schriftliche Aufklärung über die Zielsetzung und den Ablauf der Studie. Die Einverständnis über die Aufnahme in die Studie wurde schriftlich gegeben (siehe Anhang). Die ärztliche Schweigepflicht und die derzeit gültigen Datenschutzbestimmungen wurden beachtet.

2.2.2 Patientenkollektiv

2.2.2.1 Einschlusskriterien

Als Einschlusskriterien galten die Erkrankung an einer akuten lymphatischen Leukämie oder einem Non-Hodgkin-Lymphom. Die Therapie musste nach dem Protokoll der ALL/NHL-BFM-Studie erfolgen/erfolgt sein. Desweiteren war eine der folgenden Nebenwirkungen obligat:

✍ Hepatotoxizität Grad III /IV
✍ Pankreatitis Grad III /IV
✍ Transitorische insulinpflichtige Hyperglykämie

Tabelle 4 Einschlusskriterien

Die Toxizitätsgrade sind in den Protokollen der ALL-BFM-2000 Studie wie folgt definiert. Sie sind an die Studienzentrale Hannover zu melden.

Lebertoxizität	Grad III	Bilirubin 3,0- 10,0x N
		SGOT/SGPT: 5,0- 20,0 x N
	Grad IV	Bilirubin > 10,0 x N
		SGOT/SGPT: > 20,0 x N
Pankreastoxizität	Grad III	S-Lipase > 2,0- 5,0 x N
		S-Amylase > 2,0- 5,0 x N
		Pankreassonographie: Echogenität generalisiert ?
		S-Glukose (mmol/l) > 13,9- 27,8
	Grad IV	S-Lipase > 5 x N
		S-Amylase > 5 x N
		Pankreassonographie: Pseudozyste, Blutung
		S-Glukose (mmol/l) > 27,8 oder Azidose

Tabelle 5 Toxizitätsgrade der L-Asparaginase

Andere Nebenwirkungen, die auch im Zusammenhang mit der L-Asparaginase-Therapie beobachtet werden, sind in der Zuordnung ihrer Entstehung nicht ausreichend eindeutig und wurden deshalb als Kriterien für diese Studie ausgeschlossen.

Jedem Patienten, der im Laufe seiner Behandlung Nebenwirkungen entwickelte, wurden nach den im folgenden beschriebenen Kriterien zwei Kontrollpatienten zugeordnet.

Die Auswahl erfolgte nach:

☞ dem Geschlecht
☞ der Diagnose
☞ dem Alter zu Erkrankungsbeginn
☞ dem Studienprotokoll und Therapiezeitpunkt

Tabelle 6 Zuordnungskriterien der Kontrollpatienten

Die Therapie dieser Patienten sollte ohne unerwünschte Wirkungen der L-Asparaginase sowie der anderen verabreichten Medikamente verlaufen sein.

2.2.2.2 Patienten

Retrospektiv konnten 16 Patienten identifiziert werden (9 weibliche, 7 männliche), die in einem Beobachtungszeitraum von 1977 bis 2002 an den Universitätskliniken Münster behandelt wurden und im Rahmen ihrer Therapie L-Asparaginase bedingte Nebenwirkungen entwickelten.

Die Patienten wurden nach den folgenden Therapieprotokollen behandelt:

Name des Protokolls	Anzahl der Patienten
Westberliner Therapieprotokoll (1977)	1
ALL-BFM-79	2
ALL/NHL-BFM-90	9
ALL-BFM-95	3
ALL-BFM 95 + AML-BFM-93 (Hybridleukämie)	1

Tabelle 7 Angewandte Therapieprotokolle

Gemäß den oben genannten Kriterien wurden 32 Kontrollpatienten zugeordnet.

Die Suche der entsprechenden Kontrollpatienten wurde freundlicherweise von der Studienzentrale in Hannover übernommen.

Die Daten der Studienteilnehmer sind im Anhang tabellarisch aufgeführt.

Folgende Nebenwirkungen wurden beobachtet:

Art der Nebenwirkung	Anzahl der Patienten
Transitorische insulinpflichtige Hyperglykämie	7
Pankreatitis	1
Pankreatitis und Hepatotoxizität Grad III	2
Hepatotoxizität Grad III	1
Hepatotoxizität Grad IV	5

Tabelle 8 Aufgetretene Nebenwirkungen unter der Therapie

Insgesamt wurden 7 Patienten mit transitorischer insulinpflichtiger Hyperglykämie, ein Patient mit Pankreatitis und zwei Patienten mit Pankreatitis und gleichzeitiger Hepatotoxizität in die Studie aufgenommen. Hepatotoxizität Grad III trat bei einem Patienten, Hepatotoxizität Grad IV bei 5 Patienten während der Therapie auf.

Zusätzlich sollte ein Vergleich mit Personen angestellt werden, die nicht an einer akuten lymphatischen Leukämie oder einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt waren.

Hierfür wurden zelluläre Bestandteile aus Restblut, das freundlicherweise von der Abteilung der Transfusionsmedizin der Universitätskliniken Münster in vollständig und irreversibel anonymisierter Form zur Verfügung gestellt worden war, untersucht. Die Ergebnisse des Materials von 32 Personen wurden für die Studie verwendet. Ebenso konnte vollständig irreversibel anonymisiertes Restmaterial von 8 pädiatrischen Patienten, das von dem Zentrallabor der pädiatrischen Klinik der Universitätskliniken Münster zur Untersuchung freigegeben worden war, untersucht werden. Dieser Ansatz ermöglichte es, auch das Alter der Probanden im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang mit der ASYN-Aktivität zu berücksichtigen.

2.3 Material und Methoden

2.3.1 RNA-Isolation aus leukämischen Blasten

Die RNA-Proben, die für die Untersuchung der Translokation TEL/AML1 verwendet wurden, waren aus der Pathologie der WWU-Münster freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Sie waren aus Knochenmarks-Biopsaten mit einem Blastenanteil von 90% gewonnen worden. Die RNA-Isolation erfolgte nach Chomczynski [16; 17].

Die weitere Aufarbeitung der RNA für diese Studie erfolgte wie unten beschrieben.

2.3.2 Probenaufarbeitung

2.3.2.1 Isolierung der RNA aus Vollblut unter Verwendung des kommerziell erhältlichen QIAamp RNA blood Mini Kits

RNA wurde aus Leukozyten im peripheren Blut gewonnen. Zur Lyse der Erythrozyten wurden maximal 1,5 ml Vollblut mit der dreifachen Menge ? 7,5ml Erythrozytenlysepuffer EL (Puffer EL) versetzt. Der Ansatz wurde für 10-15 Minuten auf Eis inkubiert und dabei zweimal durch Vortexen gemischt. Durch Zentrifugieren für zehn Minuten bei 4°C und 400x g wurde ein erstes Zellpellet gewonnen und der Überstand verworfen. Die Lyse wurde mit der zweifachen Menge des Puffers EL wiederholt, wobei das Pellet durch Vortexen resuspendiert wurde. Durch die Zugabe eines mit β -Mercaptoethanol (β -MC) versetzten Puffers RLT (Verhältnis BMC: RLT= 1:100) wurde die Membran der Leukozyten zerstört. Zur Homogenisierung des lysierten Gemisches diente eine QIAshredder Säule. Nach Zentrifugation für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit, bei der das Lysat durch die Membran gepresst wurde, wurde es mit demselben Volumen an Ethanol (70%) versetzt und die Mischung auf eine QIAamp Silikagel-Säule aufgetragen. Proteine, DNA, Phospholipide und Zellmembranen wurden durch die Silikagel-Membran von der RNA abgetrennt. Als hydrophiles Molekül adhierte die RNA auf der Säule, während die übrigen Bestandteile beim Zentrifugieren durch die Silikagelmembran gespült wurden. Durch verschiedene Waschschrte wurde die an der Membran haftende RNA weiter aufgereinigt. Reste der DNA, die ebenfalls hydrophile Anteile besitzt und somit an die Silikagelmembran bindet,

wurden durch DNase-Behandlung (Rnase-Free DNase Set Protocol) enzymatisch abgebaut. Die Säule wurde anschließend bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Die RNA wurde mit 30µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugieren für eine Minute aus der Membran eluiert.

2.3.2.2 Erststrangsynthese

Die Synthese einer cDNA aus der isolierten RNA für die Weiterverarbeitung im Lightcycler wurde mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) der Firma Roche® durchgeführt.

Folgenden Reagenzien wurden mit 6,2µl der eluierten RNA vermischt:

Eingesetzte Substanzen	Menge
? 10xReaktionspuffer, 100mM Tris, 500mM KCl; pH 8,3	2,0µl
? 5mM Magnesiumchlorid	4,0µl
? Deoxinukleotidmix (dMTP)- dATP,dCTP, dTTP,dGTP; je 10mM	2,0µl
? Primer Asparaginsynthetase (1:10)	2,0µl
? Primer GAPDH (1:10)	2,0µl
? RNase Inhibitor- 50 units/µl	1,0µl
? AMV Reverse Transkriptase	0,8µl

Tabelle 9 Verwendete Substanzen für die Erststrangsynthese

Die Erststrangsynthese erfolgte sequenzspezifisch für die beiden zu analysierenden Gene.

Folgende Primer wurden für die Synthese der c-DNA eingesetzt:

? GAPDH:

Primer: 5'-ACGGCAGGTCAGGT-3'

GenBank Accession No.: M33197

? ASNS:

Primer: 5'-GCGGAGTGCTTCAA-3'

GenBank Accession No. M27396.1

Der Ansatz wurde zunächst für 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Während der ersten Inkubation konnte der Primer an die RNA binden, um dann während der 60 Minuten bei 42°C durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben zu werden. Durch fünfminütiges Erhitzen auf 99°C wurde die AMV Reverse Transkriptase denaturiert und damit die Reaktion beendet. Anschließend wurde die Probe für 5 Minuten bei 4°C abgekühlt. Die Lagerung konnte bei -20°C erfolgen.

2.3.2.3 Quantitative PCR am Lightcycler

2.3.2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion ist es möglich, spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Nach Trennung der komplementären Stränge der DNA durch Erhitzen können einzelsträngige Oligonukleotidprimer an bestimmte Regionen binden. Die zu amplifizierende Stelle der DNA (Template) wird so von den Primern eingerahmt, wobei die Primer jeweils an die verschiedenen DNA-Stränge binden. Bei Zugabe von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und DNA-Polymerase werden komplementäre Basen entlang der durch die Primer definierten Sequenz an das 5' Ende der Primer synthetisiert, so dass erneut Doppelstränge entstehen. Es ist ein exponentieller Prozess, da die amplifizierten Produkte aus dem vorherigen Reaktionszyklus in der nächsten Reaktion als Template dienen. In einer definierten Anzahl von Zyklen lassen sich so einzelne Sequenzen der DNA vermehren.

Bei der Messung mit dem Lightcycler benutzt man als Maß für die synthetisierte DNA-Menge die Emission eines Fluoreszenzmarkers-(SYBR™ Green). Dieser wird nur in doppelsträngige DNA eingelagert, was zu einer messbaren Verstärkung seiner Emission führt. Man erhält einen exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz, die gegen Ende der Reaktion, wenn die Reagenzien verbraucht sind, in eine Sättigungsphase übergeht. Der Zeitpunkt, an dem die Amplifikation in die exponentielle Phase übergeht, ist umgekehrt proportional zur Menge an Template in der Probe und wird zur Quantifizierung der m-RNA-Kopien in der Probe genutzt. Die Ausgangskonzentration kann mit geeigneten Eichgeraden bestimmt werden.

Zu Beginn der Messung wurde das Reaktionsgemisch auf 92°C erhitzt, wodurch der Antikörper gegen die Taq-Polymerase denaturiert wurde. Der Start der Reaktion war somit genau definiert. Es folgten 40 Reaktionszyklen, in denen zur Trennung der DNA-Doppelstränge auf 72°C (Extension Temperature) erhitzt und anschließend wieder auf 60°C (Annealing Temperature) abgekühlt wurde. Die Emission des Farbstoffes wurde jeweils in den Intervallen mit der niedrigsten Temperatur gemessen, da hier die Fragmente als Doppelstränge vorlagen (siehe Abb. 5).

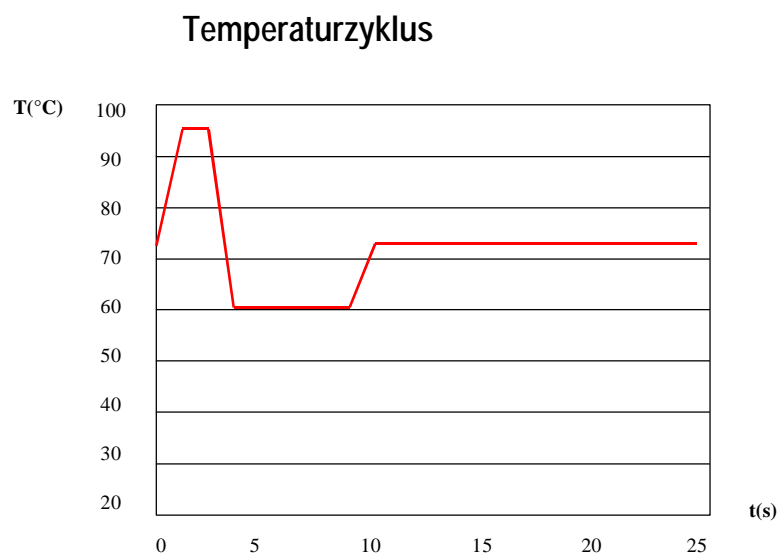


Abbildung 5 Temperaturzyklus einer Messperiode

Im Gegensatz zur konventionellen PCR, bei der nach Beendigung aller Zyklen die PCR-Fragmente auf einem Agarose- oder Acrylamidgel aufgetrennt und anschließend detektiert werden, misst der Lightcycler nach jedem Zyklus die Menge an synthetisierter DNA. Die quantitative PCR am Lightcycler stellt so eine genauere Methode dar.

Die Messung der GAPDH, der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, ermöglicht eine Aussage über die Menge und Integrität der isolierten m-RNA und über die Effizienz der Erststrangsynthese. Die GAPDH ist ein Enzym, das in jeder Zelle konstitutiv exprimiert wird. Ihre Konzentration wird in jeder Probe ermittelt. Indem die Ergebnisse als Quotient aus gemessener Konzentration des zu bestimmenden Fragments und der Konzentration der GAPDH angegeben

werden, kann es nicht zu Verzerrungen durch eine möglicherweise unterschiedliche Effizienz bei den oben genannten Reaktionsschritten kommen.

Eine PCR-Reaktion setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

Eingesetzte Substanzen	Menge
• SYBR-Green (enthält die DNA- Polymerase)	2,0µl
• Taq-Antikörper	0,16µl

Tabelle 10 Verwendete Substanzen für die PCR

Das Gemisch musste für 5 Minuten im Dunkeln gelagert werden, damit der Antikörper sich an die Polymerase anlagern konnte, wodurch das Enzym gehemmt wurde. Erst bei dem initialen Erhitzen des Ansatzes begann die PCR, da die Polymerase durch die Denaturierung des Antikörpers aktiviert wurde.

Die Ansätze für die Quantifizierung der Asparagin Synthetase und der GAPDH unterschieden sich in den Volumina des H₂O und des Magnesiumchlorids.

ASYN	GAPDH
• 10,84µl H ₂ O	• 12,04µl H ₂ O
• 3,0µl MgCl ₂	• 1,8µl MgCl ₂
• 1,0µl Primer S (Sense)	• 1,0µl Primer S (Sense)
• 1,0µl Primer AS (Antisense)	• 1,0µl Primer AS (Antisense)

Tabelle 11 Unterschiedliche Reaktionsansätze für ASYN und GAPDH

18,0µl des Gemisches wurden mit 2,0µl der DNA- Probe vermischt.

Folgende Primer wurden für die PCR verwendet:

? GAPDH:

PCR-Fragment: 297 Basenpaare

Primer: Sense 5'-CACCCATGGCAAATTCATGGC-3'
Reverse 5'-GCATTGCTGATGATCTTGAGGCT-3',

GenBank Position: 213 bis 234
509 bis 487

GenBank Accession No.: M33197

? ASNS:

PCR-Fragment: 396 Basenpaare

Primer: Sense 5'- GTTTGGCAGTGATGATTGC -3',
Reverse 5'- GTATCTCTACCCAGGAACAC -3'

GenBank Position: 199 bis 217
594 bis 575

GenBank Accession No. M27396.1

2.3.2.3.2 Herstellung der Kalibrationsgeraden

PCR-Fragmente der zu untersuchenden Genabschnitte (ASYN, GAPDH) wurden in Vektoren in Plasmide eingebaut und nach Transformation in *E. coli* Bakterien vermehrt. Die klonierten Abschnitte wurden isoliert und durch Sequenzierung auf ihre Identität überprüft.

Der Gehalt der isolierten Fragmente wurde photometrisch bestimmt. Über die Berechnung des molekularen Gewichts der Fragmente kann aus dem gemessenen Gehalt auf die Konzentration bzw. die Anzahl der Kopien geschlossen werden. Auf diese Weise lassen sich Proben bekannter Konzentrationen herstellen, die für die Herstellung von Kalibrationsgeraden für die RT-PCR genutzt werden können. Sie werden in demselben Lauf wie die zu untersuchenden Proben gemessen.

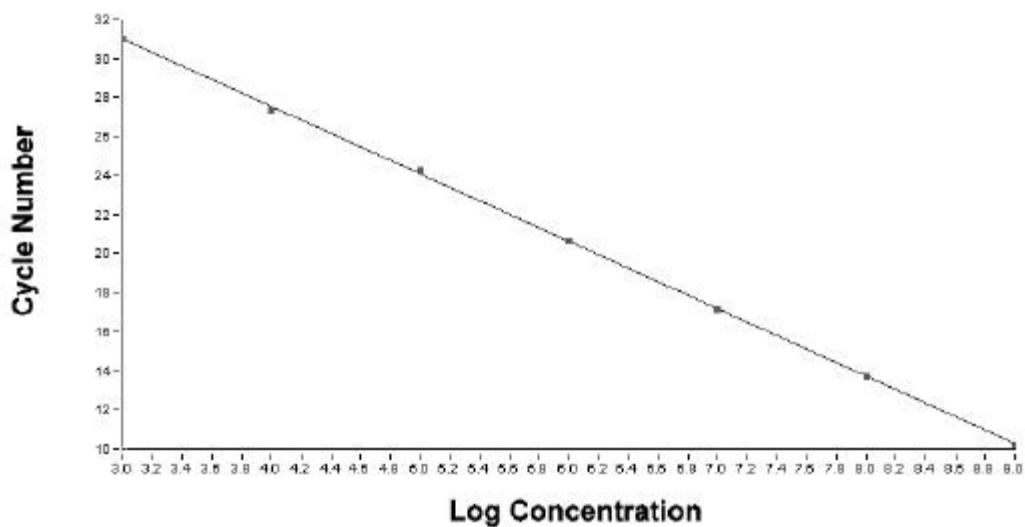


Abbildung 6 Kalibrationsgerade eines Lightcycler-Laufes

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen eine typische Lightcycler PCR.

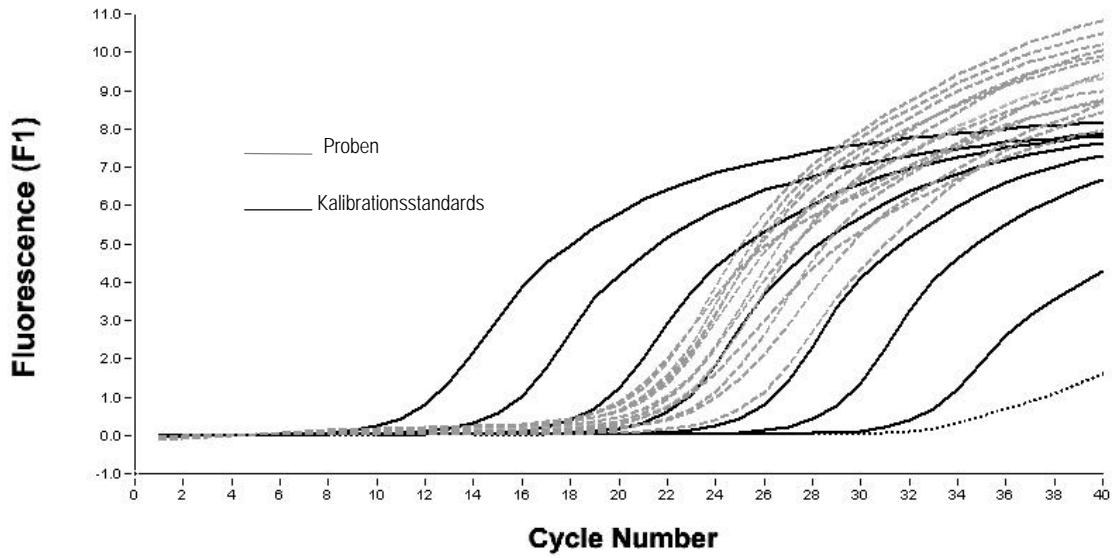


Abbildung 7 Lightcyclerlauf ASYN-Ergebnisse

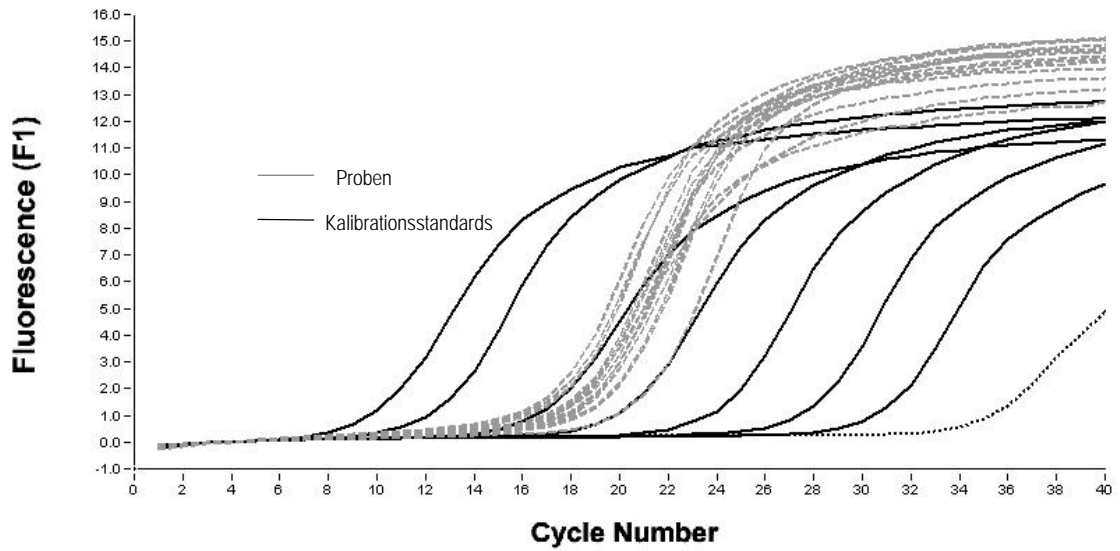


Abbildung 8 Lightcycler-Lauf GAPDH-Ergebnisse

2.3.2.3.3 Überprüfung der Reinheit des PCR-Produktes

Nach 40 Zyklen erfolgte eine langsame Erwärmung auf 95°C, bei der die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wurde. Man erhielt eine sogenannte „Schmelzkurve“. Jedes PCR-Produkt besaß eine spezifische Temperatur, bei der sich die komplementären Stränge voneinander lösten. Diese ließ sich über die Fluoreszenz des Markers genau bestimmen, da durch die Trennung der Doppelstränge der Farbstoff nicht mehr an die DNA band, woraus die Abnahme seiner Fluoreszenz resultierte. Für jedes amplifizierte Fragment konnte so ein spezifischer Schmelzpunkt bestimmt werden. Unerwünschte Reaktionsprodukte oder Verunreinigungen hätten zu additionalen Schmelzpunkten auf der Kurve geführt, deren Schmelzpunkt von dem der gewünschten PCR-Produkte abgewichen hätte.

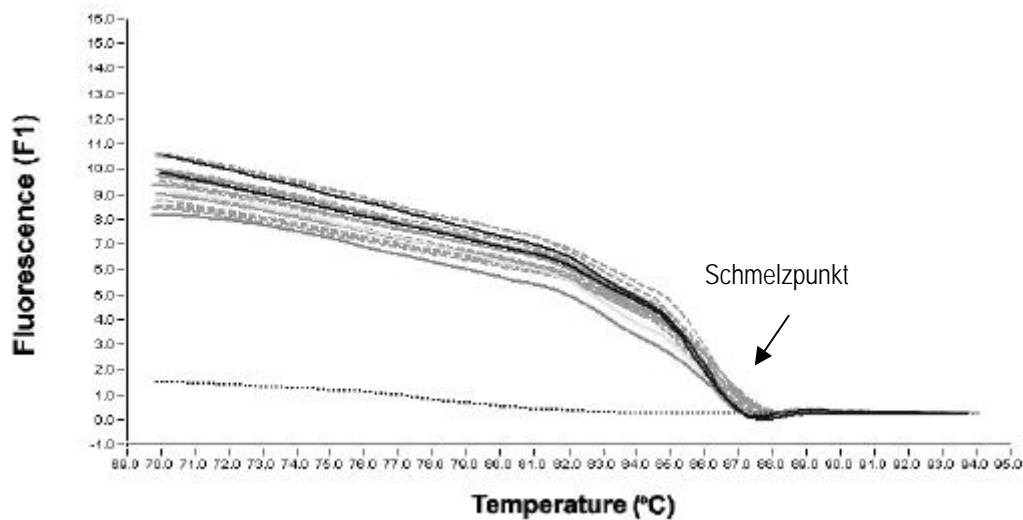


Abbildung 9 Schmelzkurve der PCR-Produkte

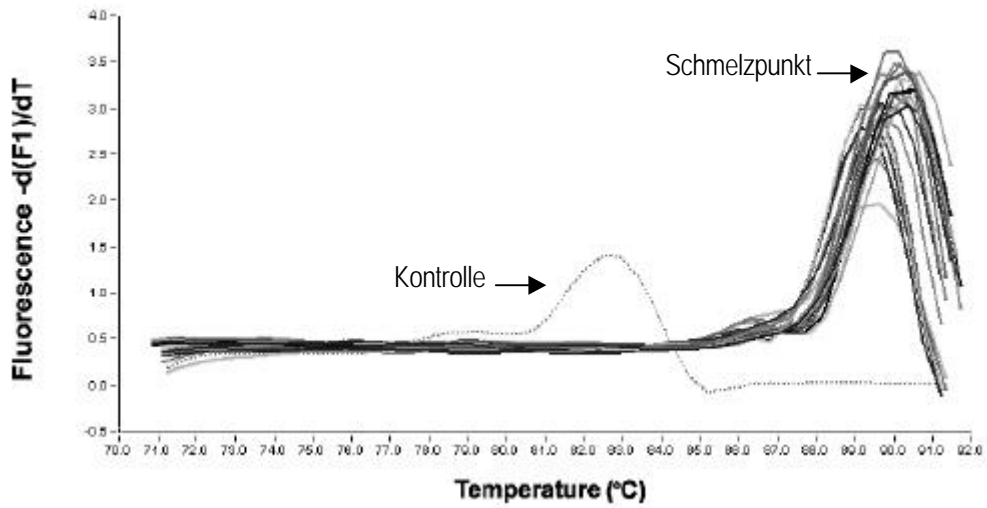


Abbildung 10 Schmelzkurve mit spezifischem Schmelzpunkt - ASYN

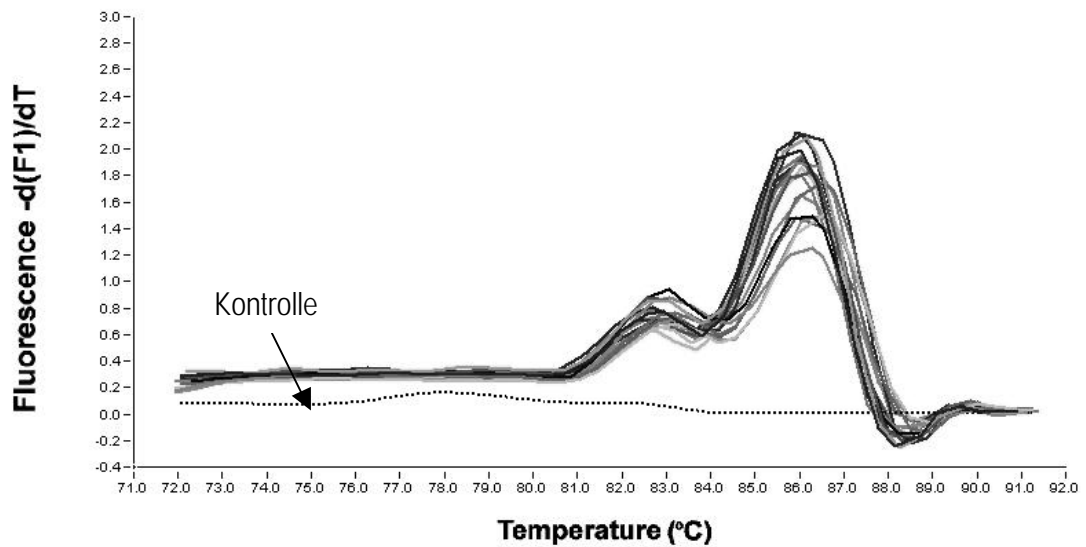


Abbildung 11 Schmelzkurve mit spezifischem Schmelzpunkt - GAPDH

3.0 ERGEBNISSE

3.1 Methodenvalidierung

3.1.1 m-RNA Expression in Leukozyten als Surrogatparameter für die ASYN-Aktivität

In der vorliegenden Studie wurde die m-RNA Expression in leukämischen Blasten und peripheren Leukozyten als Surrogatparameter für die Enzymaktivität der ASYN benutzt.

In der Vergangenheit gab es verschiedene Ansätze, die Aktivität der Asparagin Synthetase in unterschiedlichen Leukämieformen zu bestimmen. Eine Möglichkeit stellt die Messung der L-Asparaginbildung in Zellysaten in einem bestimmten Zeitintervall dar, bei der leukämische Blasten unter Substratsättigung und Cofaktorzusatz inkubiert werden. Nach verschiedenen Zeitintervallen wird die Bildung von L-Asparagin mittels HPLC bestimmt. Die Syntheseleistung wird als nM Asparagin/mg Protein/h angegeben. Diese Methode benötigt sehr viel Untersuchungsmaterial und ist sehr zeitaufwendig. Für die Messung der Enzymaktivität in peripher gewonnenen Leukozyten war sie damit nicht einsetzbar. Eine für diese Studie effektivere Analyse stellte die Messung der m-RNA-Expression mittels RT-PCR dar, bei der ein Probenvolumen von 1,5 ml Vollblut ausreichend war.

Um zu prüfen, ob die beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse generieren, wurde die ASYN -m-RNA von leukämischen Blasten, die bereits von Dübbers mit Hilfe der HPLC auf ihre L-Asparagin Synthese untersucht worden war, mit Hilfe der Lightcycler PCR quantifiziert.

Ergebnisse

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse beider Verfahren in einem Scatter-Plot abgebildet. Das gemessene Verhältnis der m-RNA Kopien ASYN/GAPDH wurde der Asparagin Synthese-Aktivität in den Blasten gegenübergestellt. Die Grafik zeigt eine hohe Korrelation zwischen den Resultaten beider Verfahren (Pearson Korrelation; $r = 0,751$; $P = 0,00767$).

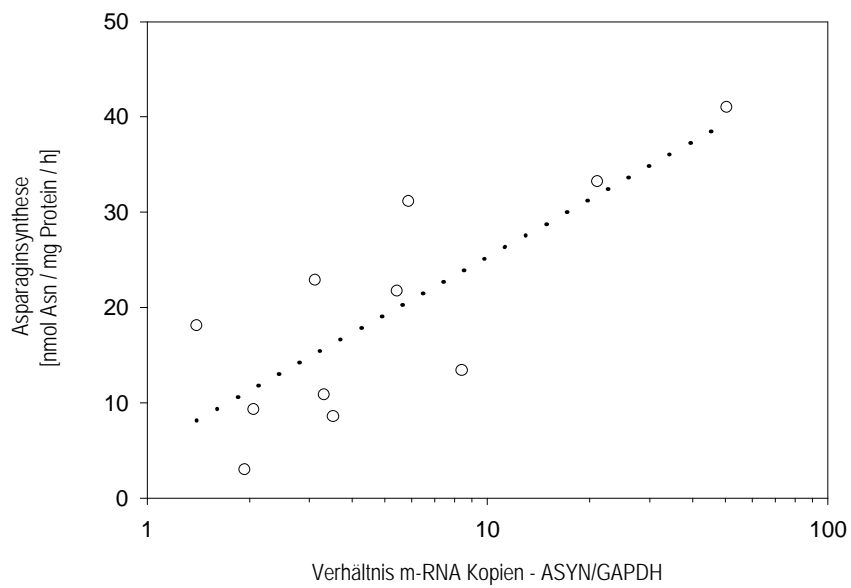


Abbildung 12: Korrelation der gemessenen Kopienzahl mit der Syntheseleistung in leukämischen Blasten

3.1.2 Untersuchungen zur Stabilität der m-RNA in Leukozyten

Da die Stabilität der m-RNA aufgrund von RNAsen und chemischer Hydrolyse kritisch zu bewerten ist, sollte vor Beginn der Messungen überprüft werden, in wieweit die Lagerung von peripherem Blut die Ergebnisse der quantitativen PCR beeinflussen. Dazu wurden zwei Proben direkt nach der Entnahme auf 4°C herunter gekühlt. Die Aufarbeitung erfolgte entweder direkt oder nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden bei 4°C.

In Probe 1 war nach 24 Stunden eine Reduktion der gemessenen Kopienzahl der ASYN um 43%, in Probe 2 um 50% zu beobachten. Bei der Messung der GAPDH nach 24 Stunden wurde eine Reduktion um 48% bzw. um 57% gefunden. In beiden Fällen kam es zu einer deutlichen Verminderung, die etwa in gleichem Ausmaß stattfand. Dadurch dass die GAPDH eine geringfügig größere Instabilität zeigte, ergab sich für das Kopienverhältnis ASYN/GAPDH, das als Ergebnis für diese Untersuchung verwendet wurde, für die Probe1 nach 24 Stunden ein Anstieg um 10%, für die Probe 2 um 16%.

Da die Ergebnisse der Stabilitätsprüfung der RNA für diese Untersuchung nicht als akzeptabel bewertet wurden, fand die Aufarbeitung der Blutproben immer direkt nach der Entnahme statt.

Abbildungen 13 und 14 zeigen die Stabilität der ASYN und GAPDH der Proben 1 und 2 bei direkter Aufarbeitung und nach Lagerung für 24 Stunden.

Ergebnisse

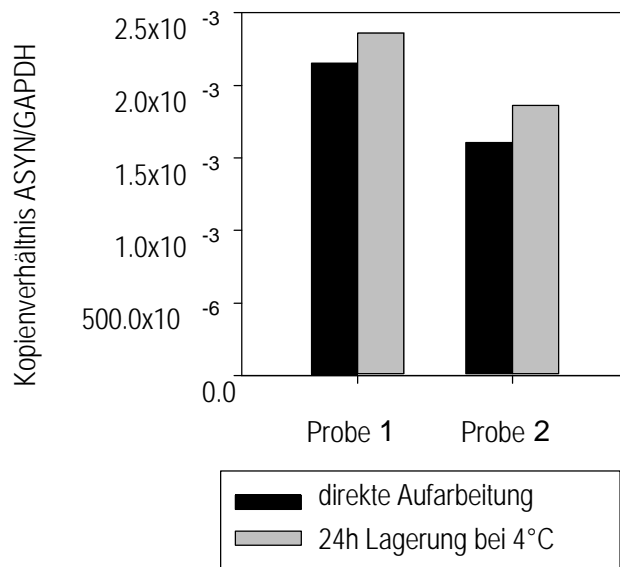
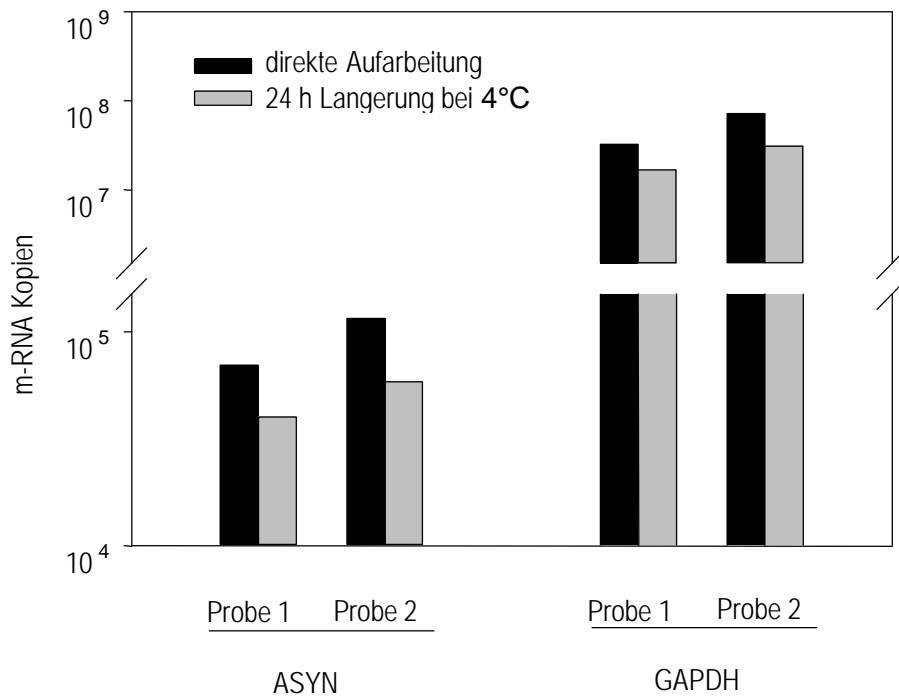


Abbildung 13 und 14: Stabilität der RNA in Leukozyten über 24h

3.2 ASYN-Expression in c-ALL und T-ALL

Aufgrund der geringen Fallzahl dieser Untersuchung wurde die Überprüfung auf Normalverteilung nicht für sinnvoll gehalten, so dass die statistische Auswertung mit nicht-parametrischen Tests erfolgte.

Die Abbildung 15 zeigt die ASYN-Expression der drei beschriebenen Subgruppen der ALL als Boxplots angegeben als Quotient aus gemessenem m-RNA-Gehalt der Asparagin Synthetase (ASYN) und der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Deutlich zu erkennen ist, dass die Gruppe der TEL/AML1 positiven Blasten die niedrigste Expression im Vergleich zu der TEL/AML 1 negativen und der Gruppe der T-ALL aufweist. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied in der ASYN-Expression der Patientengruppe der TEL/AML1 positiven gegenüber den TEL/AML1 negativen Patienten (Mann-Whitney Rank Sum Test; $P=0,048$).

Ebenfalls statistisch signifikant ist der Unterschied zwischen der Gruppe der TEL/AML1 positiven Patienten und den TEL/AML1 negativen und Patienten mit T-ALL als gemeinsames Vergleichskollektiv (Mann-Whitney Rank Sum Test ; $P=0,009$).

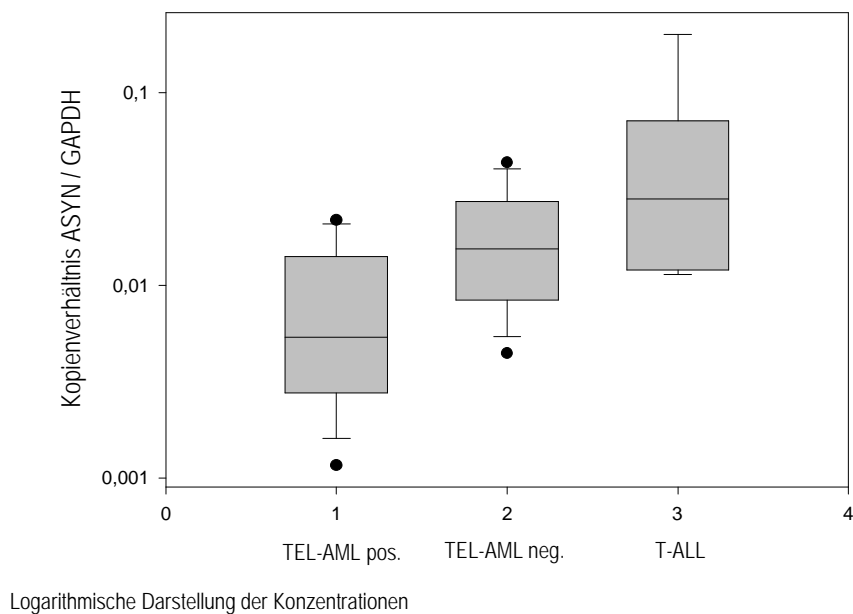


Abbildung 15 ASYN-Expression in Blasten unterschiedlicher Subtypen der ALL -Box-Plot

Ergebnisse

In Abbildung 16 sind die einzelnen Messergebnisse der Gruppen als Frequency Plot dargestellt.

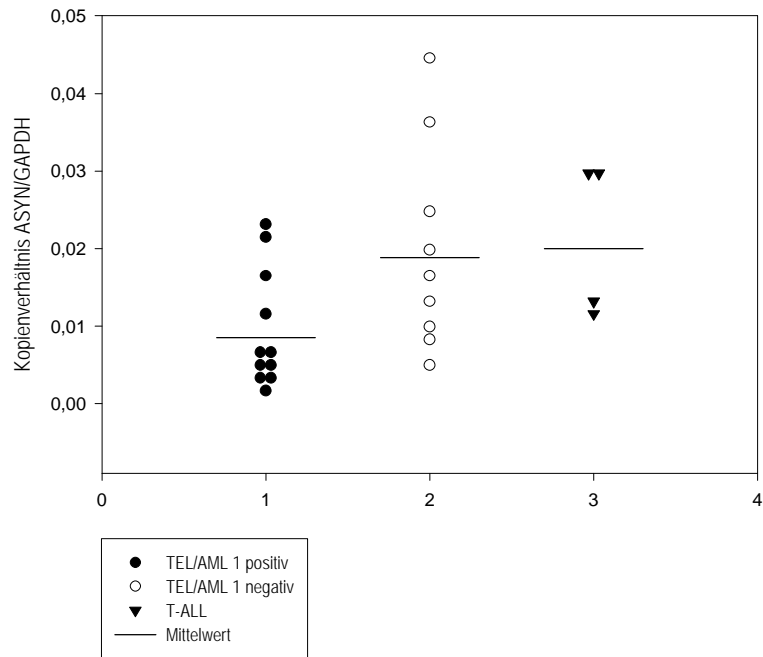


Abbildung 16 ASYN-Expression unterschiedlicher Subtypen der ALL - Frequency-Plot

Ergebnisse

In den Tabellen sind die Ergebnisse der Messungen in den entsprechenden Gruppen zusammengefasst aufgeführt.

TEL/AML 1 pos.		ASYN/GAPDH
	ANZAHL	n = 11
	Mw	0,0085
	STAW	0,0074
	MEDIAN	0,0054
	Vk	0,054

Tabelle 12 Ergebnisse der TEL/AML 1 positiven Blasten

TEL/AML 1 neg.		ASYN/GAPDH
	ANZAHL	N = 9
	Mw	0,0189
	STAW	0,0133
	MEDIAN	0,0155
	Vk	0,02

Tabelle 13 Ergebnisse der TEL/AML 1 negativen Blasten

T-ALL		ASYN/GAPDH
	ANZAHL	n = 4
	Mw	0,0563
	STAW	0,0815
	MEDIAN	0,0281
	Vk	0,66

Tabelle 14 Ergebnisse der Blasten der T-ALL

3.3 ASYN-Expression in peripheren Leukozyten

3.3.1 Untersuchungskollektiv

Die pädiatrischen Patienten in der Nachsorge der ALL erschienen alle 6-12 Monate in der Kinderonkologischen Ambulanz der Universitätskliniken Münster.

Innerhalb von 22 Monaten gelang es, Proben von 8 Patienten, die während ihrer Therapie Nebenwirkungen entwickelten, und von 13 Kontrollpatienten zu bekommen. Trotz zweimal wöchentlicher Überprüfung der laufenden Terminplanung gelang es u.a. durch kurzfristige Terminverschiebungen und Wechsel der Ärzte nicht, die anderen Patienten an ihrem Termin in der Ambulanz zu erreichen und Untersuchungsmaterial zu bekommen.

Aus dem Institut für Pathologie der UKM wurde freundlicherweise Material von Knochenmarksbiopsaten von 5 Patienten, die als Kontrollpersonen für die Studie ausgesucht worden waren, in vollständig und irreversibel anonymisierter Form zur Verfügung gestellt, das anstelle der Blutproben für die Untersuchung Verwendung fand.

Das endgültige Patientenkollektiv setzte sich folgendermaßen zusammen:

Patientengruppe	Identifikation	Probenherkunft	Geburtsjahr	Therapieprotokoll
M 67 M 39	toc	P	1992	ALL-BFM 95 SRG
M88 M39	aej	P	193	ALL-BFM 95 SRG
M 39 M 39	enn	A	1991	ALL-BFM 95 SRG
M 114 M 82	aav	A	1988	ALL-BFM 90 RG
M 48 M 82	aev	A	1984	ALL-BFM 90 RG
M 82 M 82	imj	A	1984	ALL-BFM 90 RG
M 44 XX1	oei	P	1987	ALL-BFM 95 RG
M 33 XX1	roc	A	1984	ALL-BFM 95 RG
XX1 XX1	run	A	1985	ALL-BFM 95 RG

Ergebnisse

M 82 M 42	iek	P	1987	ALL-BFM 95 RG
M 16 M 42	eie	P	1981	ALL-BFM 95 RG
M 42 M 42	asj	A	1980	ALL-BFM 95 RG
M 108 M 109	ltb	A	1991	ALL-BFM 90 RG
M 109 M 109	ueh	A	1992	ALL-BFM 90 RG
M 33 M 23	uef	A	1987	NHL-BFM 90
M 35 M 23	ues	A	1983	NHL-BFM 90 12
M 23 M 23	chd	A	1984	NHL-BFM 90 1
M33 HV33	ocd	A	1988	ALL-BFM 99 RG
HV33HV33	ydy	A	1988	ALL-BFM 99 RG
M 46	ocd	A	1983	ALL-BFM 90 SRG
M 58	ayy	A	1982	ALL-BFM 90 SRG

Tabelle 15 Endgültiges Patientenkollektiv

A = Ambulanz der Klinik und Poliklinik des UKM

P = Gerhard-DomagkInstitut für Pathologie

Die Untersuchung von zellulären Bestandteilen aus Restblut, das freundlicherweise von der Abteilung der Transfusionsmedizin der Universitätskliniken Münster in vollständig und irreversibel anonymisierter Form zur Verfügung gestellt worden war, hatte für diese Studie zwei Ziele.

Es konnte erstens ein Vergleich mit gesunden Personen angestellt werden, die nicht an einer akuten lymphatischen Leukämie erkrankt waren und sich somit nie einer Behandlung mit L-Asparaginase unterzogen haben. Desweiteren sollte auf eine gegebenenfalls vorhandene Altersabhängigkeit der Aktivität der ASYN untersucht werden.

Um die Altersspanne zu erweitern und einen direkten Altersvergleich zu den untersuchten Patienten zu ziehen, konnte vollständig und irreversibel anonymisiertes Restmaterial von 8 pädiatrischen Patienten, das von dem Zentrallabor der pädiatrischen Klinik der

Ergebnisse

Universitätskliniken Münster zur Untersuchung freigegeben worden war, als ein ergänzendes Kollektiv in die Studie aufgenommen.

Die Daten der Kinder sind im Anhang aufgeführt.

Die Ergebnisse der 3 Kollektive sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Ergebnisse der Patienten	ASYN/GAPDH
ANZAHL	n = 21
MW	0,13
STAW	0,06
MEDIAN	0,11
Vk	0,3

Tabelle 16 Ergebnisse der Patienten

Probenmaterial der erwachsenen Probanden	ASYN/GAPDH
ANZAHL	n = 31
MW	0,23
STAW	0,10
MEDIAN	0,22
Vk	1,02

Tabelle 17 Ergebnisse der erwachsenen Probanden

Untersuchungsmaterial aus der Pädiatrie	ASYN/GAPDH
ANZAHL	n = 8
MW	0,28
STAW	0,21
MEDIAN	0,24
Vk	4,29

Tabelle 18 Ergebnisse des Untersuchungsmaterials aus der Pädiatrie

3.3.2 ASYN-Expression in Patienten mit ALL und gesunden Personen

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der in der matched-pair Analyse gebildeten Gruppen als Balkendiagramm dargestellt. Die ASYN-Expression ist als Quotient aus der gemessenen Kopienanzahl der ASYN und der GAPDH angegeben. Es wird deutlich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den ASYN-Aktivitäten der Patienten (schwarzer Balken) und denen der Kontrollpersonen besteht (Wilcoxon Signed Rank Test; $P = 0,742$). Die Balken zeigen eine unsystematische Verteilung der Ergebnisse bei allen Probanden.

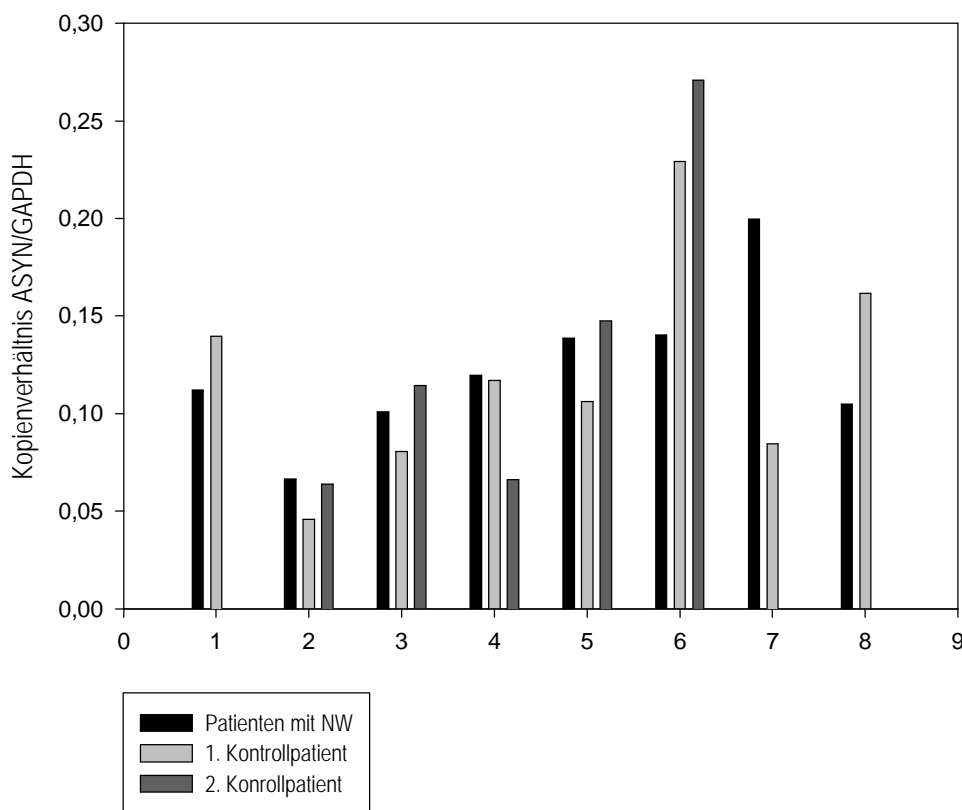


Abbildung 17 Matched-pair Vergleich der ASYN-Expression

Ergebnisse

Die Abbildung 18 zeigt den Vergleich der ASYN-Expression aller Patienten mit unerwünschten Wirkungen unter L-Asparaginase mit dem Kollektiv der Patienten, die keine Komplikationen unter der Therapie entwickelten. Die Werte sind als Box Plots und in Abbildung 19 als Frequency-Plot dargestellt.

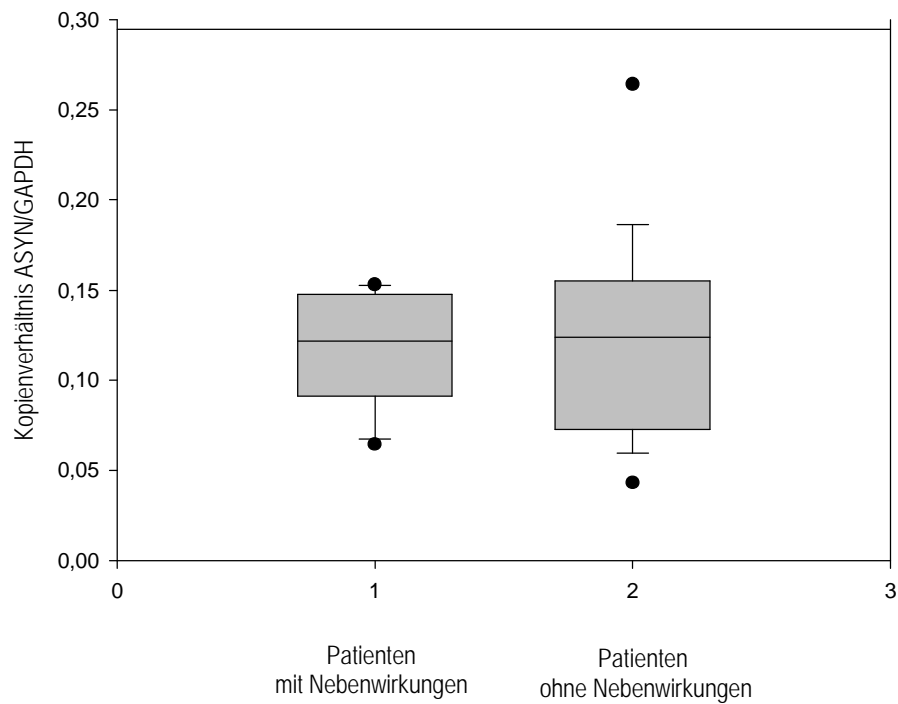


Abbildung 18 ASYN-Expression: Patienten und Kontrollpersonen

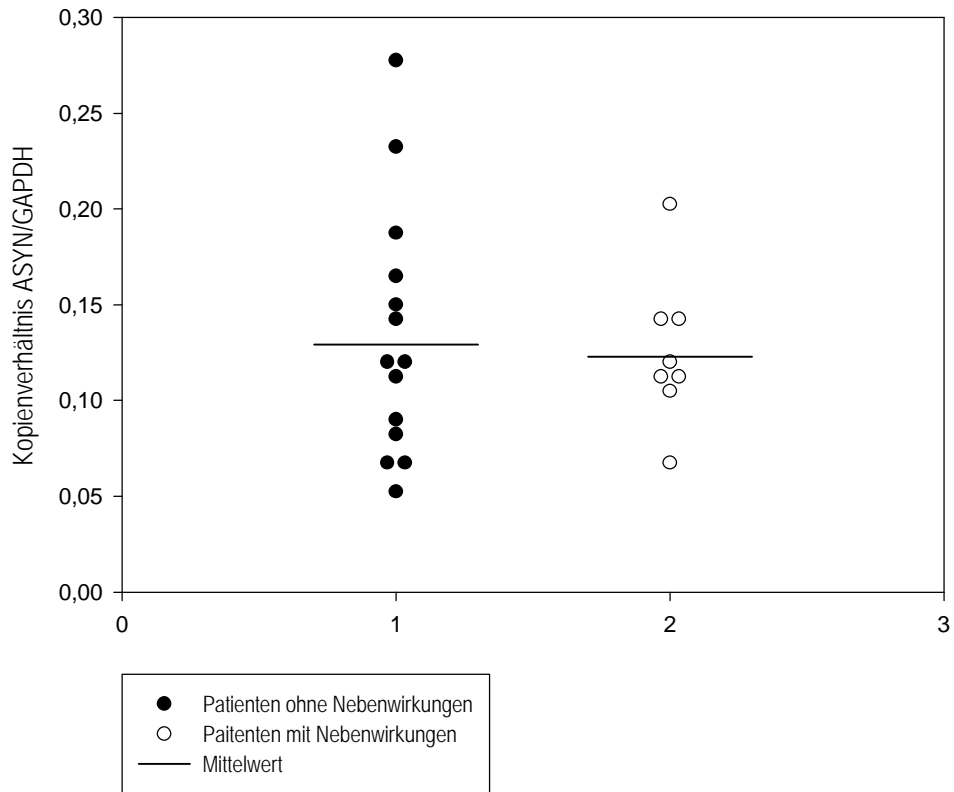


Abbildung 19 ASYN-Expression bei Patienten mit und ohne Nebenwirkungen

	Patienten mit NW	Patienten ohne NW
ANZAHL	n = 8	n = 13
MW	0,0130	0,0134
STAW	0,06	0,10
MEDIAN	0,113	0,106
Vk	0,0014	0,0126

Tabelle 19 Ergebnisse der Patienten mit und ohne Nebenwirkungen

Ergebnisse

In dem Frequency-Plot in der Darstellung 20 sind die Ergebnisse der drei Vergleichskollektive aufgeführt. Sowohl die Kinder (n= 8) als auch die Erwachsenen (n=30) zeigen eine signifikant höhere Aktivität der ASYN als die Gruppe der ALL-Patienten (n=21; mit und ohne Nebenwirkungen unter L-Asparaginase) ($P < 0,001$; Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks).

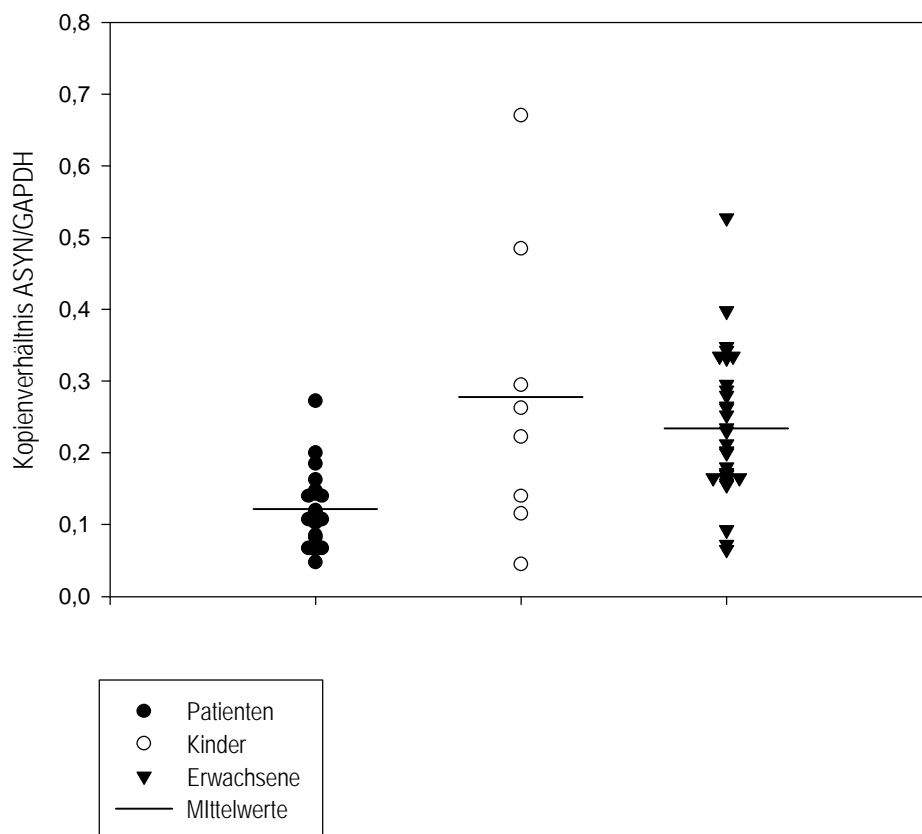


Abbildung 20 Vergleich der ASYN-Expression zwischen Patienten und gesunden Personen

In Abbildung 21 ist die ASYN-Expression in Abhängigkeit vom Alter der untersuchten Personen (Patienten und gesunde Probanden) dargestellt. Aufgrund der Fallzahl der einzelnen Gruppen wurde auch hier auf die Überprüfung auf Normalverteilung der Werte verzichtet. Die Auswertung erfolgte mit einem nicht-parametrischen Test. Eine Korrelation zwischen der ASYN-Aktivität in Leukozyten und dem Alter der Probanden und Patienten konnte jedoch nicht festgestellt werden (Spearman Rank Order Correlation; $r=0,329$; $P=0,0104$).

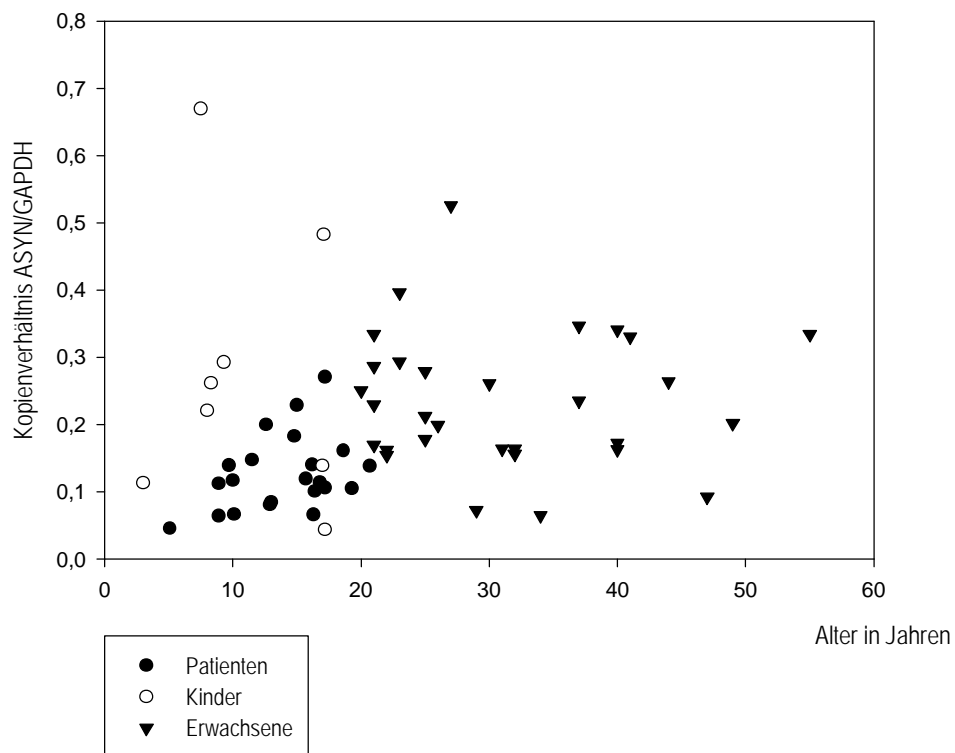


Abbildung 21 Altersabhängigkeit der ASYN-Expression bei Patienten und gesunden Probanden

In Abbildung 22 ist die ASYN-Expression in Abhängigkeit von dem Abstand (in Jahren) nach Beendigung der Therapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme aufgetragen. Eine statistisch signifikante Korrelation besteht nicht (Pearson Product Moment Correlation $P > 0,050$). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der ASYN-Aktivität der mit L-Asparaginase behandelten Patienten und der Länge des Zeitraumes nach Abschluss der Chemotherapie festgestellt werden.

Für diese Auswertung wurden nur die Daten der peripher gewonnenen Leukozyten verwendet, so dass sich die Fallzahl auf $n=16$ reduziert.

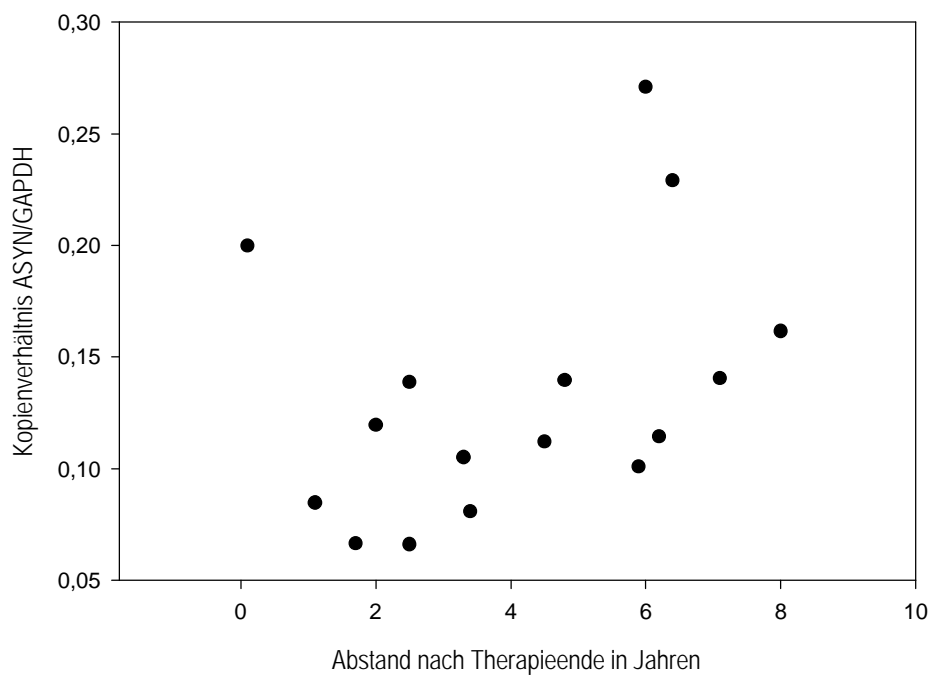


Abbildung 22 ASYN-Expression in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand nach Therapieende

Ergebnisse

Ein geschlechtsspezifischer Unterschied wurde nicht gefunden wie in Abbildung 23 dargestellt ist. Überprüft wurden die Ergebnisse der gesunden Probanden und die der Patienten (Frauen n= 22; Männer n=17) (Mann-Whitney Rank Sum Test P= 0,179).

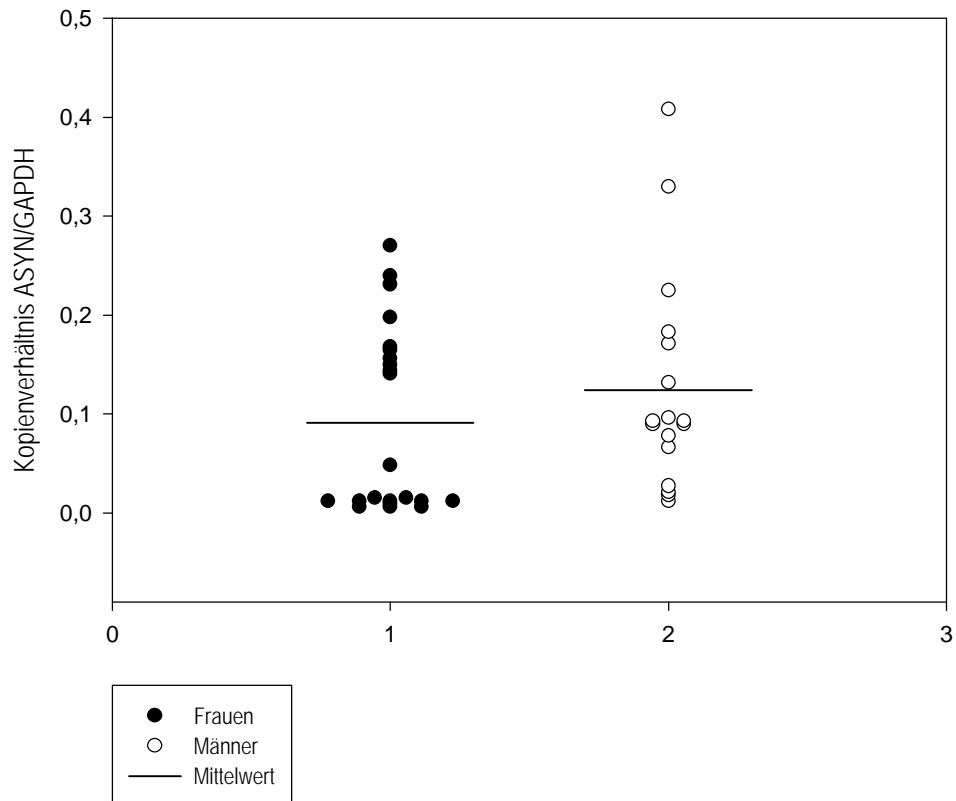


Abbildung 23 ASYN-Expression bei männlichen und weiblichen Probanden

3.3.3 Vergleich der ASYN-Expression in leukämischen Blasten und peripheren Leukozyten

Abschließend sei die Expression des ASYN-Gens in leukämischen Blasten (n= 25) und peripheren Leukozyten (n= 75; Ergebnisse der gesunden Probanden und der Patienten) in der Abbildung 24 gegenübergestellt. Alle Subgruppen der ALL weisen eine niedrigere ASYN-Aktivität auf als die Leukozyten der Patienten mit ALL. Der Unterschied ist statistisch signifikant (Mann-Whitney Rank Sum Test $P = < 0,001$).

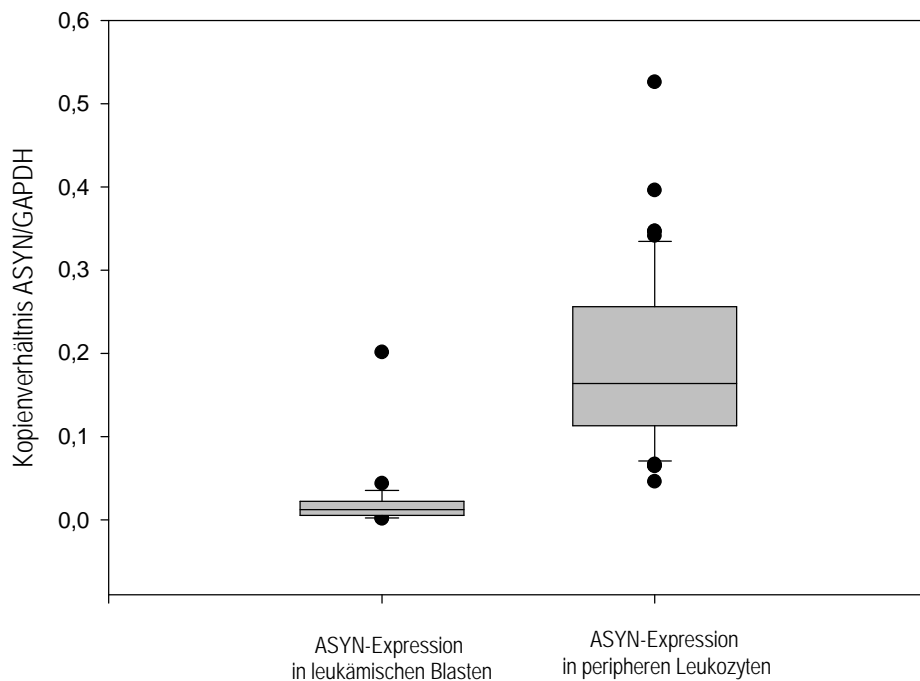


Abbildung 24 ASYN-Expression in leukämischen Blasten und peripheren Leukozyten

4.0 DISKUSSION

4.1 Methodenvalidierung

Bei dem Vergleich der Messungen der Enzymaktivität der ASYN in leukämischen Blasten bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie konnte eine hohe Korrelation ($0,7 < |r| < 0,9$) zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden festgestellt werden. Die Bestimmung der m-RNA Konzentration mit Hilfe der RT-PCR kommt zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Messung der Syntheseaktivität in Zellysaten.

Der Gebrauch der m-RNA Konzentration kann folglich als Parameter für die Enzymaktivität in Zellen herangezogen werden.

Diese Ergebnisse werden außerdem von Untersuchungen von Hutson et al. unterstützt, welche eine Äquivalenz der Expression der m-RNA im Northern Blot, des ASYN-Proteingehalts und der Enzymaktivität beschrieben [34].

4.2 TEL/AML1 als Marker für das Ansprechen auf eine Therapie mit L-Asparaginase

Eine in vitro Studie von Ramakers et al. postuliert, dass leukämische Zellen, die das Fusionsgen TEL/AML1 tragen, gegenüber einer L-Asparaginase Behandlung eine höhere Sensitivität besitzen als solche Blasten, bei denen die Translokation nicht nachgewiesen werden konnte bzw. als leukämische Blasten T-zellulären Ursprungs [53].

Konsequenzen für die Therapie der ALL allein auf der Basis der Ergebnisse der in vitro Studie erscheinen nicht akzeptabel. Aufgrund der möglichen Nebenwirkungen unter der Therapie mit L-Asparaginase ist eine validere Grundlage für die Entscheidung über eine Modifikation der L-Asparaginase Behandlung notwendig. Einflüsse der in vitro Bedingungen und Artefakte überlagern möglicherweise den Effekt der L-Asparaginase auf die Tumorzellen, so dass eine eindeutige Beurteilung der Wirkung der L-Asparaginase auf die leukämischen Blasten anhand von in vitro Versuchen nicht möglich ist.

In vitro kann es allgemein dadurch, dass die Stoffe im Kulturmedium nicht wie im Körper einem Gleichgewicht unterliegen, zu Veränderungen kommen, die bei der Untersuchung der Wirkungen von Zytostatika von Bedeutung sein können. Mögliche zytotoxische Effekte könnten in dieser

Studie u.a. dadurch entstanden sein, dass der bei der Hydrolyse der Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure entstehende Ammoniak eine toxische Substanz darstellt.

Von Bedeutung für die Beurteilung der in vitro Ergebnisse ist außerdem der Einfluss der L-Asparaginase auf die Aminosäure L-Glutamin. Bei der Gabe von L-Asparaginase kommt es, nachdem das L-Asparagin vollständig abgebaut ist, auch zur Hydrolyse des Glutamins im Kulturmedium [11; 78].

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Untersuchung von Rama Krishna Narla et al. zur Expression des pro-apoptischen Proteins Fas/CD95 und des anti-apoptischen Proteins Bcl2. Sie konnten die Involvierung der Aktivierung von CD95/Fas bei der Exposition von leukämischen Zellen mit Zytostatika beweisen. Sie fanden heraus, dass TEL/AML1 positive Blasten im Vergleich zu TEL/AML1 negativen vermehrt Fas/CD95 exprimieren, während sie eine niedrigere Bcl2-Expression zeigen. Diese Tatsache wurde für die Chemosensitivität dieses Subtyps der ALL verantwortlich gemacht [35]. Eine andere Studie konnte zeigen, dass ein Glutaminmangel in den leukämischen Zelllinien CEM und HL-60 Zellen, der auch durch die Gabe von L-Asparaginase in vitro erzeugt wird, CD95-abhängig Apoptose induziert [23].

In vitro könnte es folglich primär durch den dort entstehenden Glutaminmangel, der nicht wie in vivo nur vorübergehend besteht, über die Aktivierung des oben beschriebenen Mechanismus gerade in TEL/AML1 positiven Blasten zur Induktion der Apoptose kommen.

Ziel dieser Studie war es, die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen auf molekulargenetischer Ebene zu bestätigen, um Einflüsse der in vitro Untersuchungen auszuschalten und eine validere Aussage über die zugrundeliegenden Mechanismen der erhöhten Sensitivität der TEL/AML1 positiven Blasten treffen zu können. Gemäß der allgemein akzeptierten Vorstellung, dass für die Beurteilung der Sensitivität von leukämischen Blasten gegenüber einer Therapie mit L-Asparaginase die Aktivität der ASYN den entscheidenden Parameter darstellt, wurde die m-RNA-Expression des ASYN-Gens untersucht.

Diese wies in den unterschiedlichen Subgruppen der ALL tatsächlich einen signifikanten Unterschied auf. In Zellen, die das Fusionsgen TEL/AML1 tragen, wurde die Expression des ASYN-Gens niedriger bestimmt als in solchen, die keine Translokation besitzen. Ebenso ergab der Vergleich der Expression von Blasten mit translozierter DNA mit der von Blasten, die von Patienten mit einer T-Zell-Leukämie stammen, eine geringere ASYN-Expression bei den Blasten mit TEL/AML 1 Fusionsgen.

Stams et al. erstellten eine ähnliche Untersuchung ebenfalls mit der RT-PCR-Methode [70]. Sie verglichen eine Gruppe von 30 pädiatrischen Patienten, welche die Translokation $t(12;21)^+$ tragen, mit einer Kontrollgruppe von 17 $t(12;21)^-$, die nach folgenden Kriterien ausgewählt worden waren: Alter (zwischen 1 und 10 Jahren), Immunphänotyp, keine Hyperdiploidie (>50), kein MLL-Rearrangement, keine $t(9;22)$ Translokation.

Diese Untersuchung ergab überraschenderweise eine 5-fach höhere ASYN-Expression in der Gruppe der Patienten mit TEL/AML1 positiven Blasten im Vergleich zu denen mit TEL/AML1 negativen Blasten. Zwischen der $t(12;21)^-$ Gruppe und einer Kontrollgruppe mit gesunden Probanden ($n=11$) konnte kein Unterschied der m-RNA-Konzentration gefunden werden. Die Unterteilung des $t(12;21)^+$ Kollektivs bezüglich ihrer Therapierbarkeit mit L-Asparaginase in eine sensitive (14 Patienten), eine intermediär sensitive (10 Patienten) und eine resistente Untergruppe (6 Patienten) ergab keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse der ASYN-m-RNA-Konzentrationen. Weder beide Gruppen gemeinsam, noch die TEL/AML1 positive und negative getrennt betrachtet zeigten eine Korrelation zwischen ASYN-Expression und Sensitivität gegenüber L-Asparaginase.

Um die Induzierbarkeit der ASYN-Expression als möglichen Mechanismus der Resistenzentstehung beurteilen zu können, wurden von 3 Patienten mit $t(12;21)^+$ Blasten und 4 Patienten mit $t(12;21)^-$ Blasten Proben mit unterschiedlichen L-Asparaginase Konzentrationen inkubiert. Jeweils eine Probe aus jeder Gruppe zeigte keine Veränderung, während bei allen anderen eine Hochregulierung der m-RNA-Expression zu messen war.

Ebenso konnten die Autoren zwischen der ASYN-Expression in leukämischen Zellen und gesunden Knochenmarks- bzw. peripheren Blutzellen keinen Unterschied feststellen.

Durch diese Ergebnisse stellen die Autoren die seit vielen Jahren anerkannte Hypothese in Frage, dass eine erhöhte ASYN-Expression den entscheidenden Faktor für eine Resistenz gegenüber L-Asparaginase darstellt. Sie verneinen außerdem einen Zusammenhang zwischen der basalen ASYN-m-RNA-Expression bei Erstdiagnose und der L-Asparaginase Sensitivität bei pädiatrischer akuter lymphatischer Leukämie. Stams et al. widersprechen der allgemein anerkannten Meinung, dass neoplastisch veränderte Zellen einen Mangel an dem Enzym Asparagin Synthetase haben, durch den L-Asparaginase als antineoplastische Substanz wirken kann.

Diesen Aussagen widersprechen zahlreiche Studien, die durch verschiedene Analyseverfahren zu ähnlichen Ergebnissen gekommen sind, wie die vorliegende Untersuchung.

Scherf et al. fanden bei Genchip cDNA-Expressionsanalysen eine Korrelation zwischen ASYN-Expression in Zelllinien und der Sensitivität von L-Asparaginase im Sulphorhodamin B Assay. Eine Studie von Aslanian et al. stellte im Northern Blot dar, dass über die Induktion der ASYN-Expression in Molt 4-Zelllinien eine Resistenz gegenüber L-Asparaginase induziert werden kann [1]. Eigene weiterführende Arbeiten konnten einen Zusammenhang zwischen m-RNA-Expression und L-Asparagin Syntheseleistung in Zelllysaten ebenfalls nachweisen.

In der Untersuchung von Ramakers et al. geht im MTT-Test eine verminderte ASYN-m-RNA-Expression in TEL/AML 1 positiven Blasten mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber L-Asparaginase einher [54]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie entsprechen ebenfalls diesen Beobachtungen. Im Gegensatz zu den MTT- Daten von Ramakers et al. , die eine 10fach höhere Toxizität der L-Asparaginase bei TEL/AML1+ Blasten finden konnten, ergab die Bestimmung der ASYN-m-RNA-Konzentration nur einen ca. 2,5fachen Unterschied. Eine Begründung für die Abweichung der vorliegenden Ergebnisse von denen des MTT-Tests könnte darin liegen, dass wie oben beschrieben andere Faktoren wie die Glutamin-Depletion, die Ammoniak-Freisetzung und die Fas-Rezeptor-Aktivierung die L-Asparaginase Toxizität in vitro beeinflussen.

Die Diskrepanz der Ergebnisse der Untersuchung von Stams et al. könnte möglicherweise durch methodische Unterschiede zu erklären sein. Während in der vorliegenden Untersuchung die Erststrangsynthese mit sequenzspezifischen Primern durchgeführt wurde, verwendeten Stams et al. oligo dt-Primer und Hexanukleotide mit willkürlich ausgewählten Basenabfolgen. Bei der Etablierung der Methode zeigten sich bei der Erststrangsynthese mit oligo dt-Primern im SYBR-Green Format unspezifische Produkte bei aus Blasten isolierter RNA während spezifische Produkte bei der RNA-Amplifikation aus Zelllinien generiert werden konnten. Aus diesem Grund erfolgte bei der vorliegenden Untersuchung die Umstellung auf eine sequenzspezifische Erststrangsynthese.

Ein weiterer Unterschied liegt in der Art der Quantifizierung des PCR-Produktes. In der Analyse von Stams et al. erfolgte diese ausschließlich über den Vergleich mit GAPDH. In dieser Studie wurde mit Hilfe von Kalibrationsgeraden, die durch Amplifikation von linearisierten Plasmiden, die das zu amplifizierende Fragment enthielten, die Kopienzahl im Ansatz bestimmt und anschließend der Vergleich der Kopienzahl von ASYN und GAPDH durchgeführt.

Ob die methodischen Unterschiede die unterschiedlichen Ergebnisse bedingen, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung entsprechen den seit langem gefundenen und in jüngster Zeit in einer Reihe von Publikationen mit verschiedenen methodischen Ansätzen bestätigten Zusammenhang zwischen ASYN-Expression und L-Asparaginase Toxizität.

Diese Studie konnte somit auf molekularbiologischer Ebene belegen, dass die Translokation t(12;21)(p13;q22) eine verringerte Aktivität der ASYN bedingt. Es kann mit dieser Arbeit bestätigt werden, dass in Blasten, die das Fusionsgen tragen, eine unzureichende Aktivität der ASYN für die erhöhte Sensitivität gegenüber dem Enzym L-Asparaginase verantwortlich ist. Ein gezielter intensiver Einsatz der L-Asparaginase in dieser Subgruppe der ALL ist damit gerechtfertigt und könnte einen Profit für solche Patienten, die das Fusionsgen tragen, darstellen.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Veränderung der Expression dieses Gens in TEL/AML1 positiven Blasten ist, dass es durch die Translokation zu Veränderungen der Transkriptionsrate der entsprechenden Genregion kommt. Sowohl TEL als auch AML1 sind normalerweise an Transkriptionsfaktorkomplexen beteiligt. TEL spielt unter normalen Bedingungen eine Rolle bei der Regulierung bestimmter Zielgene, die bei der Hämatopoese beteiligt sind. Ähnlich hat AML1 Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von Genabschnitten, die für die Hämatopoese von großer Bedeutung sind [43; 55; 61]. Durch die Entstehung des Fusionsgens werden sie zu Repressoren der Transkription. Ein durch die Translokation veränderter Einfluss dieser Faktoren auf die Expression des ASYN-Gens ist damit gut vorstellbar. Möglicherweise entstehen durch das Fusionsgen Transkriptionsfaktoren, die durch eine veränderte oder neue Aktivität einen Einfluss auf die ASYN-Expression ausüben. Die Transkriptionsaktivität des ASYN-Gens könnte entweder direkt affektiert oder durch seine Wirkung auf andere Transkriptionfaktoren, die für die Regulation der ASYN-Expression verantwortlich sind, modifiziert werden.

Eine andere Erklärung für die erhöhte Sensitivität von TEL/AML1 positiven Blasten wäre, dass ein Einfluss auf die Transkriptionsaktivität über eine Veränderung des Acetylierungsstatus von Histonen besteht, der sowohl durch das translozierte AML1 und als auch durch TEL bedingt ist.

Eine Studie von Fenrick et al. weist darauf hin, dass es Beweise für einen Zusammenhang zwischen der Entstehung von Neoplasien und der transkriptionellen Kontrolle von Histonacetylierung und -deacetylierung gibt. Das gilt besonders in bezug auf akute Leukämien,

die durch chromosomale Translokationen zustande kommen. Aus genetischen Rearrangements, die den Retinsäure-Rezeptor-alpha oder das AML1 betreffen, resultieren Fusionsproteine, die die terminale Differenzierung von hämatopoetischen Zellen blockieren, indem sie die Transkription hemmen. Diese Fusionsproteine interagieren mit nukleären Hormon-Korepressoren wie N-CoR (Nuclear receptor corepressor), die wiederum dazu führen, dass es durch die Histon-Deacetylase zur Repression der Transkription kommt [21; 33]. Auch TEL benötigt als Repressor der transkriptionellen Aktivität Korepressor-Komplexe wie N-CoR und mSin3A, um seine maximale Wirkung zu erzeugen, so dass ein Zusammenspiel dieser Komponenten vorstellbar wäre. Die durch TEL/AML1 bedingte Repression der Transkription des ASYN-Gens könnte so eine erhöhte Sensitivität gegenüber L-Asparaginase generieren [26].

Ein weiterer Mechanismus, über den die Expression des ASYN-Gens möglicherweise beeinflusst wird, stellt die Methylierung der DNA dar. Der Grad der Methylierung von Promotorregionen verhält sich umgekehrt proportional zu der daraus resultierenden Transkriptionsaktivität der entsprechenden Genregionen. Vor allem CpG-reiche Sequenzen, die man gehäuft u.a. im Bereich des ASYN-Gens gefunden hat, agieren als Akzeptoren für Methylgruppen. In Hamster-Ovarialzelllinien N3 konnte über eine Demethylierung der DNA eine gesteigerte Transkription des ASYN-Gens bewirkt werden, die zur Resistenz der Zellen gegenüber einer Behandlung mit L-Asparaginase führte. Von den Autoren wurde postuliert, dass die Methylierung des ASYN-Promotors neben anderen Veränderungen den primären Grund für die unzureichende Expression der ASYN in L-Asparaginase sensiblen Leukämiezellen darstellt [46]. Möglicherweise kommt es bei TEL/AML1 positiven Leukämiezellen z.B. über die veränderte Expression von Transkriptionsfaktoren zu einer Beeinflussung des Methylierungsstatus des ASYN-Gens. Denkbar wäre eine Repression der Transkription von Enzymen, die bei der Methylierung der DNA eine Rolle spielen.

4.3 ASYN-Expression als Surrogatparameter für die Entstehung von Nebenwirkungen unter L-Asparaginase

In dieser Untersuchung wurde überprüft, ob eine genetische Disposition für die Entstehung von Nebenwirkungen unter der Therapie mit L-Asparaginase existiert. Dazu wurde die Expression der ASYN in peripheren Leukozyten als Surrogatparameter unter der Hypothese bewertet, dass durch eine unzureichende Aktivität der ASYN ein L-Asparaginmangel unter der Therapie mit L-Asparaginase nicht kompensiert werden kann. Dadurch könnte über ähnliche Mechanismen, die bei neoplastisch veränderten Zellen zur Apoptose führen, eine Schädigung von normalen Körperzellen zustande kommen. Erwartet wurde demzufolge eine niedrigere Aktivität bei den Patienten, die Nebenwirkungen während der L-Asparaginase-Therapie entwickelten, im Vergleich zu solchen Patienten, bei denen die Therapie ohne Komplikationen verlief.

Als Surrogatparameter wurde die ASYN-m-RNA Expression in peripheren Leukozyten gemessen unter der Annahme, dass eine unzureichende Aktivität in einzelnen Organsystemen, die für die Entstehung von Nebenwirkungen prädisponieren würde, sich auch in einer verminderten Expression in Leukozyten widerspiegeln würde.

Die Untersuchung konnte diese Hypothese nicht bestätigen. Es konnte kein Unterschied in der Expression des ASYN-Gens zwischen den Patienten mit und den Probanden ohne unerwünschte Wirkungen unter der Therapie mit L-Asparaginase gefunden werden. Die Expression des Enzyms ASYN in peripheren Leukozyten stellt somit keinen prognostischen Marker für das Auftreten von Nebenwirkungen bedingt durch L-Asparaginase dar.

Zu erklären wären diese Ergebnisse damit, dass die ASYN-Expression in Leukozyten nicht mit der Expression in anderen Organen korreliert. Damit können über die Höhe der ASYN-Expression in Leukozyten keine Rückschlüsse auf eine ggf. verminderte Expression in unter einer Therapie mit L-Asparaginase gefährdeten Organen wie Leber und Pankreas gezogen werden.

Eine andere Erklärung für die Entstehung von Nebenwirkungen durch L-Asparaginase wäre, dass nicht die Expression der ASYN den entscheidenden Faktor darstellt, sondern dass die Funktion dieses Proteins bei den Patienten, die unerwünschte Wirkungen entwickeln, gestört ist. Die entscheidenden Veränderungen, die bei ihnen zu finden wären, könnten auf DNA-Ebene

stattgefunden haben und nach dem Prozess der Transkription damit in dieser Untersuchung nicht festzustellen gewesen sein. Beschrieben ist der Austausch von Basen, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), innerhalb der Exone 4, 9 und 12 des ASYN-Gens, die bei der Translation zum Austausch von Aminosäuren führen. Das durch die Mutation veränderte Protein könnte bedingt durch eine modifizierte Struktur eine verringerte Aktivität besitzen. Die Kompensation des Asparaginmangels könnte dadurch nicht gewährleistet werden.

Desweiteren bleibt der Effekt der L-Asparaginase auf den Glutaminspiegel auch in diesem Kontext zu berücksichtigen. Nach vollständigem Abbau des L-Asparagins wird auch L-Glutamin hydrolysiert. Da Glutaminmangel Auswirkungen auf zahlreiche Vorgänge im Körper hat, bleibt es als wichtiger Einflussfaktor zu berücksichtigen.

Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass die Aminosäure genau wie L-Asparagin für den Menschen keine essentielle Aminosäure darstellt, da sie in Mangelsituationen mit Hilfe des Enzyms Glutamin Synthetase im Körper synthetisiert werden kann. Vorstellbar für die Entstehung von unerwünschten Wirkungen durch L-Asparaginase wäre also ein ähnlicher Mechanismus wie der für das Enzym ASYN postulierte. Nur solche Patienten würden unter der Therapie mit L-Asparaginase Nebenwirkungen entwickeln, die den Glutaminmangel nur unzureichend durch Eigensynthese kompensieren können. Eine temporär insuffiziente Glutaminversorgung der Zelle bedingt durch die Glutaminase-Aktivität der L-Asparaginase, könnte metabolische Störungen bis zur Apoptoseinduktion in normalen Körperzellen zur Folge haben.

Um diese Zusammenhänge zu überprüfen, müssten ähnliche Untersuchungen zur Expression und Aktivität der Glutamin Synthetase in gesunden Körperzellen durchgeführt werden.

Bei der Messung der ASYN-Aktivität in einem Kollektiv gesunder erwachsener Personen ergab sich überraschend eine signifikant höhere Aktivität des Enzyms im Vergleich zu der Gruppe der pädiatrischen Patienten. Eine altersabhängige Expression der ASYN-Expression konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Der Unterschied der beiden Kollektive in der ASYN-Aktivität könnte unter Umständen durch die L-Asparaginase Therapie, der sich die Patienten unterziehen mussten, zustande gekommen sein. Möglicherweise spielen andere Komponenten der Chemotherapie der ALL bzw. des NHL auch eine Rolle. Für diesen Erklärungsansatz spräche eine Veränderung der ASYN-Aktivität in Abhängigkeit von der Länge des Zeitraumes nach Beendigung der Chemotherapie.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte an den untersuchten Daten nicht nachgewiesen werden. Der Vergleich der einzelnen Aktivitätsbestimmungen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Therapieende ergab nur einen tendenziellen Anstieg der ASYN-Aktivität mit zunehmender Dauer der therapiefreien Zeit, eine statistisch signifikante Korrelation existiert nicht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten an einem größeren Patientenkollektiv abgesichert werden.

5.0 Zusammenfassung

Das Enzym L-Asparaginase ist Bestandteil der Therapieprotokolle zur Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und des Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL). Es katalysiert die Hydrolyse der Aminosäure L-Asparagin zu L-Asparaginsäure und Ammoniak. Über die Depletion des L-Asparagins im Extrazellularraum wirkt es zytotoxisch auf neoplastisch veränderte Zellen, für die L-Asparagin eine essentielle Aminosäure darstellt. Normale Körperzellen besitzen das Enzym Asparagin Synthetase (ASYN), das die Eigensynthese des L-Asparagins aus L-Asparaginsäure und einem Aminogruppendonator ermöglicht. Über die Induktion einer vermehrten Expression der ASYN kann es zur Entwicklung einer Resistenz von neoplastisch veränderten Zellen gegenüber L-Asparaginase kommen, so dass der Grad ihrer Expression einen wichtigen Parameter für die Beurteilung der Sensitivität gegenüber L-Asparaginase darstellt.

In vitro Studien mit verschiedenen Subtypen der ALL beschäftigten sich mit der Sensitivität von leukämischen Blasten gegenüber unterschiedlichen Zytostatika. Für eine Subgruppe der ALL mit der Translokation t(12;21), aus der das Fusionsgen TEL/AML 1 resultiert, konnte im MTT-Test eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber dem Enzym L-Asparaginase nachgewiesen werden. Da in vitro Untersuchungen zur Toxizität der L-Asparaginase die Gefahr von Fehlinterpretationen aufgrund von L-Asparaginase bedingten in vitro-Artefakten in sich bergen, wurden diese Ergebnisse auf molekulargenetischer Ebene geprüft. Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR am Lightcycler™ wurde die m-RNA Konzentration der ASYN in leukämischen Blasten gemessen. Es konnte bestätigt werden, dass das Fusionsgen mit einer verminderten Expression der ASYN assoziiert ist, wodurch es zu der höheren Sensitivität dieser Subgruppe der ALL gegenüber einer Therapie mit L-Asparaginase kommt (TEL/AML1⁺ Mw 0,0085, STAW 0,0074; TEL/AML1⁻ Mw 0,0189, STAW 0,0133).

Neben der Bedeutung des Enzyms ASYN für die Chemosensitivität von leukämischen Zellen wurde auch seine Rolle im Zusammenhang mit unerwünschten Wirkungen der L-Asparaginase, die trotz ihres selektiven Mechanismus auftreten, überprüft. Unter der Annahme, dass eine unzureichende Expression der ASYN in normalen Körperzellen über ähnliche Mechanismen wie in neoplastisch veränderten Zellen zu einer Störung der Proteinbiosynthese und damit der DNA- und RNA-Synthese führt, wurde die Aktivität der ASYN von 16 Patienten mit definierten Nebenwirkungen unter der Therapie (Pankreas- und Lebertoxizität Grad III und IV) in einer

matched-pair Analyse mit der doppelten Anzahl von Patienten ohne Komplikationen verglichen. Als Surrogatparameter diente die m-RNA Konzentration in peripheren Leukozyten.

Die Expression der ASYN in den untersuchten Leukozyten war durch eine ausgeprägte Variabilität charakterisiert. Es konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden ($MW_{PAT\ ASYN/GAPDH}=0,13$; $MW_{KONT}=0,23$), so dass über die Bestimmung ihrer Aktivität keine prognostische Aussage hinsichtlich einer genetischen Disposition für das Auftreten von Nebenwirkungen möglich ist. Eine Abhängigkeit der Expression von Alter oder Geschlecht konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Auch hat der zeitliche Abstand zwischen Beendigung der Chemotherapie und dem Zeitpunkt der Blutentnahme keinen Einfluss auf die ASYN-Aktivität.

6.0 Literaturverzeichnis

1. Aslanian, A.M., Fletcher, B.S. & Kilberg, M.S. Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce L-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem.J.* 2001 Jul 1; 357 (Pt 1): 321-8., **357**, 321-328.
2. Barbosa-Tessmann, I.P., Chen, C., Zhong, C., Schuster, S.M., Nick, H.S. & Kilberg, M.S. (1999) Activation of the unfolded protein response pathway induces human asparagine synthetase gene expression. *J.Biol.Chem.*, **274**, 31139-31144.
3. Barbosa-Tessmann, I.P., Pineda, V.L., Nick, H.S., Schuster, S.M. & Kilberg, M.S. (1999) Transcriptional regulation of the human asparagine synthetase gene by carbohydrate availability. *Biochem.J.*, **339**, 151-158.
4. Bertolone, S.J., Fuenfer, M.M., Groff, D.B. & Patel, C.C. (1982) Delayed pancreatic pseudocyst formations. Long-term complication of L-asparaginase treatment. *Cancer*, **50**, 2964-2966.
5. Bonetti, E., Abbondanza, A., Della, C.E. & Stirpe, F. (1969) The regulation of L-asparaginase activity in rats and mice. Effects of normal and malignant growth, of sex and of dietary changes. *Biochem.J.*, **115**, 597-601.
6. Borkhardt, A., Cazzaniga, G., Viehmann, S., Valsecchi, M.G., Ludwig, W.D., Burci, L., Mangioni, S., Schrappe, M., Riehm, H., Lampert, F., Basso, G., Maserà, G., Harbott, J. & Biondi, A. (1997) Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Blood*, **90**, 571-577.
7. Buijs, A., Sherr, S., van, B.S., van, B.S., van, d.P., Geurts, v.K., Riegman, P., Lekanne, D.R., Zwarthoff, E. & Hagemeijer, A. (1995) Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11. *Oncogene*, **10**, 1511-1519.
8. Cairo, M.S. (1982) Adverse reactions of L-asparaginase. *Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol.*, **4**, 335-339.
9. Capizzi, R.L., Bertino, J.R. & Handschumacher, R.E. (1970a) L-asparaginase. *Annu.Rev.Med.*, **21:433-44.**, 433-444.
10. Capizzi, R.L., Bertino, J.R. & Handschumacher, R.E. (1970b) L-asparaginase. *Annu.Rev.Med.*, **21:433-44.**, 433-444.
11. Capizzi, R.L., Bertino, J.R., Skeel, R.T., Creasey, W.A., Zanes, R., Olayon, C., Peterson, R.G. & Handschumacher, R.E. (1971) L-asparaginase: clinical, biochemical, pharmacological, and immunological studies. *Ann.Intern.Med.*, **74**, 893-901.

12. Carpentieri, U. & Balch, M.T. (1978) Hyperglycemia associated with the therapeutic use of L-asparaginase: possible role of insulin receptors. *J.Pediatr.*, **93**, 775-778.
13. Cayuela, J.M., Baruchel, A., Orange, C., Madani, A., Auclerc, M.F., Daniel, M.T., Schaison, G. & Sigaux, F. (1996) TEL-AML1 fusion RNA as a new target to detect minimal residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **88**, 302-308.
14. Cetin, M., Yetgin, S., Kara, A., Tuncer, A.M., Gunay, M., Gumruk, F. & Gurgey, A. (1994) Hyperglycemia, ketoacidosis and other complications of L-asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *J.Med.*, **25**, 219-229.
15. Charan, V.D., Desai, N., Singh, A.P. & Choudhry, V.P. (1993) Diabetes mellitus and pancreatitis as a complication of L-asparaginase therapy. *Indian Pediatr.*, **30**, 809-810.
16. Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, **15**, 532-537.
17. Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.*, **162**, 156-159.
18. Cortes, J.E. & Kantarjian, H.M. (1995) Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer*, **76**, 2393-2417.
19. Dubbers, A., Wurthwein, G., Muller, H.J., Schulze-Westhoff, P., Winkelhorst, M., Kurzknabe, E., Lanvers, C., Pieters, R., Kaspers, G.J., Creutzig, U., Ritter, J., Boos, J. (2000) Asparagine synthetase activity in paediatric acute leukaemias: AML-M5 subtype shows lowest activity. *Br J Haematol.*, **109(2)**, 427-9.
20. Durden, D.L., Salazar, A.M. & Distasio, J.A. (1983) Kinetic analysis of hepatotoxicity associated with antineoplastic asparaginases. *Cancer Res.*, **43**, 1602-1605.
21. Fenrick, R., Amann, J.M., Lutterbach, B., Wang, L., Westendorf, J.J., Downing, J.R. & Hiebert, S.W. (1999) Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol.Cell Biol.*, **19**, 6566-6574.
22. Fenrick, R. & Hiebert, S.W. (1998) Role of histone deacetylases in acute leukemia. *J.Cell Biochem.Suppl.*, **30-31:194-202.**, 194-202.
23. Frank, B.H., Pekar, A.H., Veros, A.J. & Ho, P.P. (1970) Crystalline L-asparaginase from *Escherichia coli* B. II. Physical properties, subunits, and reconstitution behavior. *J.Biol.Chem.*, **245**, 3716-3724.
24. Fumarola, C., Zerbini, A. & Guidotti, G.G. Glutamine deprivation-mediated cell shrinkage induces ligand-independent CD95 receptor signaling and apoptosis. *Cell Death.Differ.* 2001.Oct.;8.(10.):1004.-13., **8**, 1004-1013.

25. G.Henze (1993) Leukämien und spezielle Tumoren. In: *Krebs bei Kindern und Jugendlichen*, pp. 200-218. Ed. Peter Gutjahr Deutscher Ärzteverlag, Köln,
26. Guerrini, L., Gong, S.S., Mangasarian, K. & Basilico, C. (1993) Cis- and trans-acting elements involved in amino acid regulation of asparagine synthetase gene expression. *Mol.Cell Biol.*, **13**, 3202-3212.
27. Guidez, F., Petrie, K., Ford, A.M., Lu, H., Bennett, C.A., MacGregor, A., Hannemann, J., Ito, Y., Ghysdael, J., Greaves, M., Wiedemann, L.M. & Zelent, A. Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood* 2000.Oct.1.;96.(7.):2557.-61., **96**, 2557-2561.
28. Harbott, J., Viehmann, S., Borkhardt, A., Henze, G. & Lampert, F. (1997) Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood*, **90**, 4933-4937.
29. Haskell, C.M. (1981) L-Asparaginase: human toxicology and single agent activity in nonleukemic neoplasms. *Cancer Treat.Rep.*, **65 Suppl 4:57-9.**, 57-59.
30. Haskell, C.M. & Canellos, G.P. (1969) L-asparaginase resistance in human leukemia--asparagine synthetase. *Biochem.Pharmacol.*, **18**, 2578-2580.
31. Haskell, C.M., Canellos, G.P., Leventhal, B.G., Carbone, P.P., Block, J.B., Serpick, A.A. & Selawry, O.S. (1969) L-asparaginase: therapeutic and toxic effects in patients with neoplastic disease. *N.Engl.J.Med.*, **281**, 1028-1034.
32. Hersh, E.M. (1973) Immunosuppressive enzymes. *Transplant.Proc.*, **5**, 1211-1214.
33. Horowitz, B., Madras, B.K., Meister, A., Old, L.J., Boyes, E.A. & Stockert, E. (1968) Asparagine synthetase activity of mouse leukemias. *Science*, **160**, 533-535.
34. Huang, E.Y., Zhang, J., Miska, E.A., Guenther, M.G., Kouzarides, T. & Lazar, M.A. Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway. *Genes Dev.*2000.Jan.1.;14.(1.):45.-54., **14**, 45-54.
35. Hutson, R.G., Kitoh, T., Moraga, A.D., Cosic, S., Schuster, S.M. & Kilberg, M.S. (1997) Amino acid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells. *Am.J.Physiol.*, **272**, C1691-C1699
36. Krishna, N.R., Navara, C., Sarquis, M. & Uckun, F.M. Chemosensitivity of TEL-AML1 fusion transcript positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk.Lymphoma.*2001.May.;41.(5.-6.):615.-23., **41**, 615-623.
37. Land, V.J., Sutow, W.W., Fernbach, D.J., Lane, D.M. & Williams, T.E. (1972) Toxicity of L-asparaginase in children with advanced leukemia. *Cancer*, **30**, 339-347.
38. McLean, T.W., Ringold, S., Neuberger, D., Stegmaier, K., Tantravahi, R., Ritz, J., Koeffler, H.P., Takeuchi, S., Janssen, J.W., Seriu, T., Bartram, C.R., Sallan, S.E., Gilliland,

- D.G. & Golub, T.R. (1996) TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **88**, 4252-4258.
39. Muller, H.J. & Boos, J. (1998) Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit.Rev.Oncol.Hematol.*, **28**, 97-113.
40. N.Gökbuget & D.Hoelzer (1998) Akute lymphatische Leukämie. In: *Leukämitherapie*, pp. 66-78. Ed. Prof.Dr.Dieter Hoelzer & Dr.Gernot Seipelt UNI-MED Verlag AG,
41. Nowak-Gottl, U., Aschka, I., Koch, H.G., Boos, J., Dockhorn-Dworniczak, B., Deufel, T., Jurgens, H., Kohlhase, B., Kuhn, N. & Laupert, A. (1995) Resistance to activated protein C (APCR) in children with acute lymphoblastic leukaemia--the need for a prospective multicentre study. *Blood Coagul.Fibrinolysis*, **6**, 761-764.
42. Oettgen, H.F., Stephenson, P.A., Schwartz, M.K., Leeper, R.D., Tallai, L., Tan, C.C., Clarkson, B.D., Golbey, R.B., Krakoff, I.H., Karnofsky, D.A., Murphy, M.L. & Burchenal, J.H. (1970) Toxicity of E. coli L-asparaginase in man. *Cancer*, **25**, 253-278.
43. Ohnuma, T., Holland, J.F., Freeman, A. & Sinks, L.F. (1970) Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man. *Cancer Res.*, **30**, 2297-2305.
44. Okuda, T., van, D.J., Hiebert, S.W., Grosveld, G. & Downing, J.R. (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, **84**, 321-330.
45. Papadopoulos, P., Ridge, S.A., Boucher, C.A., Stocking, C. & Wiedemann, L.M. (1995) The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res.*, **55**, 34-38.
46. Patterson, M.K.J. & Orr, G.R. (1969) Regeneration, tumor, dietary, and L-asparaginase effects on asparagine biosynthesis in rat liver. *Cancer Res.*, **29**, 1179-1183.
47. Peng, H., Shen, N., Qian, L., Sun, X.L., Koduru, P., Goodwin, L.O., Issa, J.P. & Broome, J.D. Hypermethylation of CpG islands in the mouse asparagine synthetase gene: relationship to asparaginase sensitivity in lymphoma cells. Partial methylation in normal cells. *Br.J.Cancer* 2001.Sep.14.;85.(6.):930.-5., **85**, 930-935.
48. Pieters, R., Kaspers, G.J., van, W.E., Huismans, D.R., Loonen, A.H., Hahlen, K. & Veerman, A.J. (1993) Cellular drug resistance profiles that might explain the prognostic value of immunophenotype and age in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **7**, 392-397.
49. Priest, J.R., Ramsay, N.K., Steinherz, P.G., Tubergen, D.G., Cairo, M.S., Sitarz, A.L., Bishop, A.J., White, L., Trigg, M.E., Levitt, C.J., Cich, J.A. & Coccia, P.F. (1982) A syndrome of thrombosis and hemorrhage complicating L-asparaginase therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J.Pediatr.*, **100**, 984-989.
50. Pui, C.H. (1995) Childhood leukemias. *N.Engl.J.Med.*, **332**, 1618-1630.

51. Pui, C.H., Burghen, G.A., Bowman, W.P. & Aur, R.J. (1981) Risk factors for hyperglycemia in children with leukemia receiving L-asparaginase and prednisone. *J.Pediatr.*, **99**, 46-50.
52. Pui, C.H. & Crist, W.M. (1994) Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *J.Pediatr.*, **124**, 491-503.
53. Pui, C.H. & Evans, W.E. (1998) Acute lymphoblastic leukemia. *N.Engl.J.Med.*, **339**, 605-615.
54. Ramakers-van, W.N., Pieters, R., Loonen, A.H., Hubeek, I., van, D.E., Beverloo, H.B., Slater, R.M., Harbott, J., Seyfarth, J., van, W.E., Hahlen, K., Schmiegelow, K., Janka-Schaub, G.E. & Veerman, A.J. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000.Aug.1.;96.(3.):1094.-9., **96**, 1094-1099.
55. Rao, S.P. & Castells, S. (1986) Hyperglucagonemia in L-asparaginase induced diabetes mellitus. *Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol.*, **8**, 83-85.
56. Romana, S.P., Mauchauffe, M., Le, C.M., Chumakov, I., Le, P.D., Berger, R. & Bernard, O.A. (1995) The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood*, **85**, 3662-3670.
57. Romana, S.P., Poirel, H., Leconiat, M., Flexor, M.A., Mauchauffe, M., Jonveaux, P., Macintyre, E.A., Berger, R. & Bernard, O.A. (1995) High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **86**, 4263-4269.
58. Rowley, J.D. (1998) The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu.Rev.Genet.*, **32:495-519.**, 495-519.
59. Rubnitz, J.E. Molecular diagnostics in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J.Biol.Regul.Homeost.Agents* 2000.Jul.-Sep.;14.(3.):182.-6., **14**, 182-186.
60. Rubnitz, J.E., Behm, F.G., Wichlan, D., Ryan, C., Sandlund, J.T., Ribeiro, R.C., Rivera, G.K., Hancock, M.L., Relling, M.V., Evans, W.E., Pui, C.H. & Downing, J.R. (1999) Low frequency of TEL-AML1 in relapsed acute lymphoblastic leukemia supports a favorable prognosis for this genetic subgroup. *Leukemia*, **13**, 19-21.
61. Rubnitz, J.E., Downing, J.R., Pui, C.H., Shurtleff, S.A., Raimondi, S.C., Evans, W.E., Head, D.R., Crist, W.M., Rivera, G.K., Hancock, M.L., Boyett, J.M., Buijs, A., Grosveld, G. & Behm, F.G. (1997) TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. *J.Clin.Oncol.*, **15**, 1150-1157.
62. Rubnitz, J.E., Pui, C.H. & Downing, J.R. (1999) The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias. *Leukemia*, **13**, 6-13.
63. Rubnitz, J.E., Shuster, J.J., Land, V.J., Link, M.P., Pullen, D.J., Camitta, B.M., Pui, C.H.,

- Downing, J.R. & Behm, F.G. (1997) Case-control study suggests a favorable impact of TEL rearrangement in patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia treated with antimetabolite-based therapy: a Pediatric Oncology Group study. *Blood*, **89**, 1143-1146.
64. Scherf, U., Ross, D.T., Waltham, M., Smith, L.H., Lee, J.K., Tanabe, L., Kohn, K.W., Reinhold, W.C., Myers, T.G., Andrews, D.T., Scudiero, D.A., Eisen, M.B., Sausville, E.A., Pommier, Y., Botstein, D., Brown, P.O. & Weinstein, J.N. (2000) A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nature Genet.*, **24**, 236-244.
65. Schorin, M.A., Blattner, S., Gelber, R.D., Tarbell, N.J., Donnelly, M., Dalton, V., Cohen, H.J. & Sallan, S.E. (1994) Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Cancer Institute/Children's Hospital Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocol 85-01. *J.Clin.Oncol.*, **12**, 740-747.
66. Schrappe, M., Reiter, A., Ludwig, W.D., Harbott, J., Zimmermann, M., Hiddemann, W., Niemeyer, C., Henze, G., Feldges, A., Zintl, F., Kornhuber, B., Ritter, J., Welte, K., Gadner, H. & Riehm, H. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 2000.Jun.1.;95.(11.):3310.-22., **95**, 3310-3322.
67. Seeger, K., Adams, H.P., Buchwald, D., Beyermann, B., Kremens, B., Niemeyer, C., Ritter, J., Schwabe, D., Harms, D., Schrappe, M. & Henze, G. (1998) TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Blood*, **91**, 1716-1722.
68. Shurtleff, S.A., Buijs, A., Behm, F.G., Rubnitz, J.E., Raimondi, S.C., Hancock, M.L., Chan, G.C., Pui, C.H., Grosveld, G. & Downing, J.R. (1995) TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*, **9**, 1985-1989.
69. Smith, M., Arthur, D., Camitta, B., Carroll, A.J., Crist, W., Gaynon, P., Gelber, R., Heerema, N., Korn, E.L., Link, M., Murphy, S., Pui, C.H., Pullen, J., Reamon, G., Sallan, S.E., Sather, H., Shuster, J., Simon, R., Trigg, M., Tubergen, D., Uckun, F. & Ungerleider, R. (1996) Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J.Clin.Oncol.*, **14**, 18-24.
70. Stams, W.A., den Boer, M.L. & Beverloo, H.B. (2003) Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. *Blood*, **101**, 2743-7.

71. Steinherz, P.G., Siegel, S.E., Bleyer, W.A., Kersey, J., Chard, R.J., Coccia, P., Leikin, S., Lukens, J., Neerhout, R. & Nesbit, M. (1991) Lymphomatous presentation of childhood acute lymphoblastic leukemia. A subgroup at high risk of early treatment failure. *Cancer*, **68**, 751-758.
72. Strom, D.K., Nip, J., Westendorf, J.J., Linggi, B., Lutterbach, B., Downing, J.R., Lenny, N. & Hiebert, S.W. Expression of the AML-1 oncogene shortens the G(1) phase of the cell cycle. *J.Biol.Chem.*2000.Feb.4.;275.(5.):3438.-45., **275**, 3438-3445.
73. Takahashi, Y., Horibe, K., Kiyoi, H., Miyashita, Y., Fukuda, M., Mori, H., Nozaki, C., Hasegawa, S., Kawabe, T., Kato, K., Kojima, S., Matuyama, T. & Naoe, T. (1998) Prognostic significance of TEL/AML1 fusion transcript in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.*, **20**, 190-195.
74. Ueno, T., Ohtawa, K., Mitsui, K., Kodera, Y., Hiroto, M., Matsushima, A., Inada, Y. & Nishimura, H. (1997) Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia*, **11**, 1858-1861.
75. Uren, J.R. (1981) Pharmacology of L-asparaginase and the effects of host and enzyme modification. *Cancer Treat.Rep.*, **65 Suppl 4:47-55.**, 47-55.
76. Wagner, A. & Boos, J. (1998) Unphysiological effects contributing to asparaginase toxicity in vitro. *Am.J.Physiol.*, **274**, C1185-C1186
77. Weetman, R.M. & Baehner, R.L. (1974) Latent onset of clinical pancreatitis in children receiving L-asparaginase therapy. *Cancer*, **34**, 780-785.
78. Whitecar, J.P.J., Bodey, G.P., Hill, C.S.J. & Samaan, N.A. (1970) Effect of L-asparaginase on carbohydrate metabolism. *Metabolism*, **19**, 581-586.
79. Worton, K.S., Kerbel, R.S. & Andrulis, I.L. (1991) Hypomethylation and reactivation of the asparagine synthetase gene induced by L-asparaginase and ethyl methanesulfonate. *Cancer Res.*, **51**, 985-989.
80. Wriston, J.C.J. & Yellin, T.O. (1973) L-asparaginase: a review. *Adv.Enzymol.Relat.Areas.Mol.Biol.*, **39:185-248.**, 185-248.
81. Zuna, J., Hrusak, O., Kalinova, M., Muzikova, K., Stary, J. & Trka, J. (1999) TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group. *Leukemia*, **13**, 22-24.

7.0 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

NAME	Claudia Stern
GEBURTSDATUM	7. Dezember 1976
GEBURTSORT	Herford
FAMILIENSTAND	ledig
ELTERN	Dr. med. Gerhard Stern, Internist Konstanze Stern, MTA

AUSBILDUNGSWEG

SCHULBILDUNG

1984-1988	Grundschule Landsberger Straße Herford
1988-1996	Ravensberger Gymnasium Herford Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

HOCHSCHULBILDUNG

1996-2003	Studium der Humanmedizin an der Westfälischen- Wilhelms Universität Münster
1998	Ärztliche Vorprüfung
1999	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002/2003	Praktisches Jahr Innere Medizin (Kapstadt/ Südafrika) Chirurgie (Valencia/ Spanien) Pädiatrie an der UKM Münster
5/2003	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
seit 15.07.2003	AiP im St. Franziskus-Hospital, Münster Abteilung für Pädiatrie

8.0 DANKSAGUNG

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Boos für die Überlassung des interessanten Themas und für seine wertvollen Anregungen, Ideen und Diskussionen.

Mit unermüdlicher Zeit und Geduld, uneingeschränkter Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft, immer wieder neuen Ideen und Anregungen hat mich Frau Dr. C. Lanvers-Kaminsky betreut, der ich dafür sehr, sehr dankbar bin.

In Liebe danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung und Rücksichtnahme und insbesondere meinen Eltern, die mir Studium und Promotion ermöglicht haben und zu jedem Zeitpunkt und mit allen Mitteln meinen Werdegang unterstützt haben.

Die Erstellung der Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die vielen Hilfen und Gefallen von einer Vielzahl von Personen, deren Wissen, Handfertigkeit, und Organisationstalent ich für verschiedene Teile der Untersuchung in Anspruch nehmen durfte. All ihnen sei herzlich gedankt für ihr Bemühen.

ANHANG

I Daten der Studienteilnehmer zur Untersuchung zur ASYN-m-RNA-Expression in leukämischen Blasten

PCR-NR	Name	Geschlecht	Geburtsjahr	Diagnose	TEL/AML 1
TEL/AML 1 positiv					
1	ehd	m	1995	B-Vorl.-ALL	+
3	emk	w	1997	B-Vorl.-ALL	+
4	era	w	1991	B-Vorl.-ALL	+
5	orj	w	1990	B-Vorl.-ALL	+
7	rim	w	1995	B-Vorl.-ALL	+
20	ubd	m	1996	c-ALL	+
21	anp	w	1991	B-Vorl.-ALL	+
22	ass	w	1993	B-Vorl.-ALL	+
23	mim	m	1989	B-Vorl.-ALL	+
24	aec	m	1980	B-Vorl.-ALL	+
25	erd	m	1988	B-Vorl.-ALL	+
TEL/AML 1 negativ					
29	ocd	m	1995	B-Vorl.-ALL	-
30	ara	m	1986	B-Vorl.-ALL	-
31	iej	w	1988	B-Vorl.-ALL	-
32	iek	w	1987	B-Vorl.-ALL	-
14	osl	w	1995	B-Vorl.-ALL	-
15	aga	m	1998	B-Vorl.-ALL	-
16	enj	m	1994	B-Vorl.-ALL	-
17	üll	m	1994	B-Vorl.-ALL	-
18	ahf	m	1983	B-Vorl.-ALL	-

Anhang

T-ALL					
9	orm	m	1984	T-ALL	-
10	rir	w	1995	T-ALL	-
11	eim	m	1992	T-ALL	-
26	oka	m	1996	T-ALL	-
28	osd	m	1988	T-ALL	-

II Ergebnisse der RT-PCR

	ASYN	GAPDH	ASYN/GAPDH
TEL/AML1 positiv			
1	3020000	638500000	0,004729836
3	1111000	193100000	0,005753496
4	3563000	232600000	0,015318143
5	2242000	416600000	0,005381661
7	1159000	550700000	0,002104594
20	796600	39200000	0,020321429
21	622700	328600000	0,001895009
22	5281000	242900000	0,021741457
23	2230000	211000000	0,01056872
24	121700	105300000	0,001155745
25	1917000	388500000	0,004934363
TEL/AML1 negativ			
14	275700	14640000	0,01883197
15	3770000	309200000	0,01219276
16	4440000	287100000	0,01546499

Anhang

17	2876000	116900000	0,02460222
18	1663000	376900000	0,00441231
29	3923000	112100000	0,03499554
30	6626000	152500000	0,04344918
31	818400	119000000	0,00687731
32	2851000	322900000	0,00882936
T-ALL			
9	9055000	321900000	0,028129854
11	1130000	92740000	0,012184602
26	5138000	181400000	0,028324146
28	2148000	188500000	0,011395225

III Daten der Studienteilnehmer zur Untersuchung der ASYN-Expression in peripheren Leukozyten

III-I Patienten und Kontrollpersonen

Studnr.	Diagnose	Alter zu Erkr.-Beginn	Therapiestudie	Zweig	NW
M108	c-ALL	2,9	ALL-BFM-90	RG	
M119	c-ALL	2,9	ALL-BFM-90	RG	
M109	c-ALL	2,3	ALL-BFM-90	RG	Pankreatitis
M67	NB-ALL	5,7	ALL-BFM-95	SRG	
M81	NB-ALL	5,1	ALL-BFM-95	SRG	
M39	NB-ALL	5,6	ALL-BFM-95	SRG	trans.Hyperglykämie
M114	c-ALL	6,6	ALL-BFM-90	RG	
M48	c-ALL	7,7	ALL-BFM-90	RG	
M82	c-ALL	8,4	ALL-BFM-90	RG	trans.Hyperglykämie
M44	H-Leukämie	10	ALL-BFM-95	RG	
M33	H-Leukämie	11,8	ALL-BFM-95	RG	
XX1	Hybrid- leukämie	11,3	ALL-BFM-95	RG	Pankreatitis + Hepatotox.
M82	B-Vorl.-ALL	11,5	ALL-BFM-95	RG	
M16	B-Vorl.-ALL	14,8	ALL-BFM-95	RG	
M42	B-Vorl.-ALL	16,4	ALL-BFM-95	RG	Pankreatitis + Hepatotox.
M35	T-NHL	10,2	NHL-BFM-90	12	
M33	T-NHL	6,7	NHL-BFM-90	12	

Anhang

M23	T-NHL	8,4	NHL-BFM-90	12	trans.Hyperglykämie
M122	c-ALL	10,4	ALL-BFM-90	RG	
M25	c-ALL	13,7	ALL-BFM-90	RG	
M67	c-ALL	11,9	ALL-BFM-90	RG	Hepatotoxizität
M62	c-ALL	8	ALL-BFM-90	SRG	
M27	c-ALL	14,1	ALL-BFM-90	SRG	
M81	c-ALL	12,7	ALL-BFM-90	SRG	Hepatotoxizität
M120	c-ALL		ALL-BFM-90	RG	
M98	c-ALL	3,2	ALL-BFM-90	RG	
M87	c-ALL	4	ALL-BFM-90	RG	Hepatotoxizität
HV33		11,7	ALL-BFM-99	RG	
HV33		9,8	ALL-BFM-99	RG	
HV33	c-ALL	12,5	ALL-BFM-99	RG	Hepatotoxizität
M 90	c-ALL	4,9	ALL-BFM 90	SRG	
M 75	c-ALL	4,6	ALL-BFM 90	SRG	
M 97	c-ALL	4,4	ALL-BFM 90	SRG	Hepatotoxizität
M 104	c-ALL	5,8	ALL-BFM 90	SRG	
M 51	c-ALL	6,2	ALL-BFM 90	SRG	
M 8	c-ALL	8,9	ALL-BFM 90	SRG	
M 63	c-ALL	7,6	ALL-BFM 90	SRG	trans. Hyperglykämie
M 28	c-ALL	9,2	ALL-BFM 90	SRG	
M 46	c-ALL	8,6	ALL-BFM 90	SRG	
M 39	c-ALL	9,8	ALL-BFM 90	SRG	
M 58	c-ALL	10,5	ALL-BFM 90	SRG	Hepatotoxizität

Anhang

M13	c-ALL	4	ALL-BFM 76	SRG	
M38	c-ALL	3,7	ALL-BFM 76	SRG	
M5	c-ALL	4,3	ALL-BFM 76	SRG	
M34	c-ALL	3,9	ALL-BFM 76	SRG	trans. Hyperglykämie
M53	c-ALL	11,8	ALL-BFM 79	SRG	
M30	c-ALL	11	ALL-BFM 79	SRG	
M40	c-ALL	10,3	ALL-BFM 79	SRG	trans. Hyperglykämie
M31	c-ALL	6,5	ALL-BFM 79	RG	
M34	c-ALL	7	ALL-BFM 79	RG	
XX2	c-ALL	10	ALL-BFM 79	RG	trans. Hyperglykämie

III-II Probenmaterial der erwachsenen Probanden

Nummer	Geburtsjahrgang	Alter	Geschlecht
1	1952	49	m
2	1954	47	m
3	1964	37	m
4	1964	37	m
5	1967	34	m
6	1969	32	m
7	1969	32	m
8	1972	29	m
9	1974	27	m
10	1976	25	m
11	1976	25	m
12	1978	23	m
13	1979	22	m
14	1980	21	m

15	1946	55	w
16	1957	44	w
17	1960	41	w
18	1961	40	w
19	1961	40	w
20	1961	40	w
21	1970	31	w
22	1971	30	w
23	1975	26	w
24	1976	25	w
25	1978	23	w
26	1979	22	w
27	1980	21	w

28	1980	21	w
29	1980	21	w
30	1981	20	w

III-III Probenmaterial der pädiatrischen Patienten

Nummer	Geburtsjahrgang	Alter	Geschlecht
1	1985	17,1	w
2	1994	8,0	m
3	1993	8,3	w
4	1985	17,2	m
5	1984	7,5	m
6	17,0	7,0	m
7	9,3	9,3	m
8	3,0	3,0	m

Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme

MW	13,95
STAW	3,99
MEDIAN	14,90
RANGE	15,60
MIN	5,10
MAX	20,70
25%	10,10
75%	16,80

Altersverteilung der erwachsenen Kontrollpersonen:

MW	31,0
STAW	9,70
MEDIAN	29,0
RANGE	35,00
MIN	20,00
MAX	55,00
25%	22,30
75%	39,30

Altersverteilung der Patienten aus der Pädiatrie

MW	10,90
STAW	4,90
Median	9,40
Range	14,20
Min.	3,00
Max.	17,20
25%	8,00
75%	17,00

Anhang

Studiennummer	Abstand nach Therapieende in Jahren	Ergebnis ASYN/GAPDH
M108	4,8	0,13962766
M109	4,5	0,112039
M67	0	0,06405931
M81	0	0,04593805
M39	1,7	0,06643952
M114	3,4	0,08076696
M48	6,2	0,11430356
M82	5,9	0,10081824
M33	2,5	0,0660696
M44	0	0,11691542
XX1	2,0	0,11949344
M82	0	0,1474901
M16	0	0,18300211
M42	2,5	0,13865939
M35	6,0	0,27091804
M33	6,4	0,22916307
M23	7,1	0,1404737
M33	1,1	0,08467808
HV33	0,1	0,19984428
M 46	8,0	0,16151737
M 58	3,3	0,10503474

Abstand nach Therapieende

MW	4,094
STAW	2,350
MEDIAN	3,950
RANGE	7,900
MIN	0,1000
MAX	8,000
25%	2,250
75%	6,100

IV Ergebnisse der RT-PCR

	ASYN	GAPDH	ASYN/GAPDH
Patienten			
2	15750000	112800000	0,13962766
5	26430000	235900000	0,112039
6	15600000	234800000	0,06643952
7	13690000	169500000	0,08076696
8	10980000	96060000	0,11430356
9	1725000	17110000	0,10081823
10	12910000	195400000	0,0660696
11	26420000	221100000	0,11949344
12	17790000	128300000	0,13865939
13	12660000	46730000	0,27091804
14	6702000	47710000	0,1404737
19	1540000	7706000	0,19984428
20	4156000	49080000	0,08467808
23	4700000	40200000	0,11691542
24	9314000	63150000	0,1474901
25	5191000	113000000	0,04593805

Anhang

29	8656000	47300000	0,18300211
35	8616000	82030000	0,10503474
36	12530000	195600000	0,0640593
34Tr	17670000	109400000	0,16151737
1_1	5312000	23180000	0,22916307
Kontrollpersonen			
Pädiatrie			
1	2846000	5894000	0,48286393
2	1815000	8227000	0,22061505
3	2572000	9819000	0,26194113
4	2472000	56055000	0,04409955
5	2628000	3924000	0,66972477
6	1343000	9672000	0,13885443
7	2304000	7869000	0,29279451
8	1152000	10200000	0,11294118
Erwachsene			
Probanden			
1	3964000	19590000	0,20234814
2	858900	9337000	0,09198886
3	3677000	10610000	0,34655985
4	2093000	8909000	0,23493097
5	742600	11440000	0,06491259
6	1918000	11720000	0,16365188
7	638400	4095000	0,15589744
8	1115000	15440000	0,07221503
9	5059000	9615000	0,52615705
10	3143000	14810000	0,21222147
11	4537000	25440000	0,17834119
12	853000	2155000	0,39582367

Anhang

13	1168000	7561000	0,15447692
14	4671000	20350000	0,22953317
15	3212000	9609000	0,33426996
16	1009000	3824000	0,26385983
17	3013000	9125000	0,33019178
18	2680000	7859000	0,34101031
19	1143000	6646000	0,17198315
20	1386000	8493000	0,16319322
21	1874000	11440000	0,16381119
22	1336000	5114000	0,26124364
23	1631000	8180000	0,19938875
24	3447000	12360000	0,2788835
25	3416000	11640000	0,29347079
27	1518000	9352000	0,16231822
28	1502000	5241000	0,28658653
29	2803000	8386000	0,33424756
30	1394000	8214000	0,16971025
31	1800000	7180000	0,25069638

V

Einverständniserklärung

Name der Patientin/ des Patienten:

Geburtsdatum:

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meiner Tochter/ meinem Sohn einmalig eine bestimmte Menge Blut zusätzlich entnommen wird. Ich wurde darüber aufgeklärt, dass das Blut für eine wissenschaftliche Studie genutzt wird, wogegen ich keine Einwände habe. Über die Grundlagen des Forschungsvorhabens wurde ich ausreichend informiert. Mir wurde zugesichert, jederzeit weitere Fragen stellen zu können.

Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig, und ich kann meine Einverständniserklärung jederzeit rückgängig machen auch ohne Angaben von Gründen und ohne nachteilige Folgen.

Die ärztliche Schweigepflicht bleibt selbstverständlich gewahrt. Die Bestimmungen des Datenschutzes werden eingehalten.

Ich habe ein Exemplar des Aufklärungsformulars zum Mitnehmen erhalten.

Datum

Unterschrift der Mutter/ Sorgeberechtigten

Unterschrift des Vaters/ Sorgeberechtigten

Unterschrift der Ärztin/ des Arztes

Unterschrift des Patienten oder eines
Zeugen der Einwilligung

VI Eltern- und Patientenaufklärung

Sehr geehrte Frau _____, sehr geehrter Herr _____,

Ihr Kind wurde/ wird im Rahmen seiner Erkrankung nach dem Therapieprotokoll der Studie ALL-BFM-95 bzw. ALL-REZ-96 behandelt. Mit der Absicht die Risikofaktoren für Nebenwirkungen dieser Behandlung zu identifizieren und diese damit komplikationsloser zu gestalten, möchten wir Sie bitten, an der im folgenden beschriebenen Studie teilzunehmen.

Zweck der Studie

Im Rahmen der unterschiedlichen Therapieprotokolle wird eine bestimmte Anzahl von Medikamenten in einer bestimmten Reihenfolge und Dosierung verabreicht. Bestandteil des ALL-BFM- und des REZ-Protokolls ist unter anderem auch der Wirkstoff "Asparaginase".

Wie bei allen Chemotherapeutika treten auch im Rahmen der Therapie mit Asparaginase leider bei einigen Patienten Nebenwirkungen auf. Diese zeigen sich insbesondere in der Bauchspeicheldrüse, der Leber sowie im Magen- Darm- Trakt. Die Kinder leiden unter Entzündungen der Organe, Gerinnungsstörungen oder Durchfällen.

Mit der vorliegenden Studie versuchen wir herauszufinden, ob es persönliche Faktoren gibt, die das Auftreten solcher Nebenwirkungen begünstigen und eine Vorhersage ermöglichen. Bestimmte Faktoren könnten auf dem Erbmateriale festgelegt sein. Bestätigte sich diese Vermutung, könnte man das Risiko schon vor Beginn der Therapie besser abgeschätzen und bestimmte Patienten einer etwas veränderten und damit für sie risikoärmeren Behandlung zuführen.

Studienablauf

Es wird eine einmalige zusätzliche venöse Blutentnahme (6ml) notwendig sein. Aus dem Blut isolieren wir die weißen Blutkörperchen und untersuchen deren Erbmateriale.

Um eine Kontrolle zu haben, sollen auch Patienten ohne Nebenwirkungen während der Behandlung untersucht werden.