

**Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und –Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Ulrich Göbel**

**Untersuchung von GST T und M Polymorphismen
auf die Entstehung hämatoonkologischer Erkrankungen
im Kindesalter**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Arnhold Ostara Renner

(2005)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referentin: Priv.-Doz. Diirksen

Korreferent: Prof. Dr.-Ing. Ranft

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Leukämie	6
1.2 Schwere aplastische Anämie	11
1.3 Glutathion S-Transferase (GST)	12
1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
1.5 Thema der Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Reagenzien	17
2.1.1 DNA Isolierung	17
2.1.2 PCR	17
2.2 Proben	18
2.3 Genotypische Analyse	21
2.4 Statistische Analyse	23
3. Ergebnisse	25
3.1 GST Genfrequenz kaukasischer Patienten / Kontrollen	25
3.2 GST Genfrequenz kirgisischer Patienten / Kontrollen aus Kirgistan	31
4. Diskussion	37
5. Zusammenfassung	40
6. Literaturangaben	41
7. Lebenslauf	49

Abkürzungen

AA	erworbene aplastische Anämie
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AnL	akute nicht-lymphatische Leukämie
Bp	Basenpaare
C- ALL	common akute lymphatische Leukämie
CD	cluster destination
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CMML	chronische myeloische monozytäre Leukämie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
FAB	French American British
FACS	Fluorescence- activated cell sorting
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S- Transferase
GST M1	μ Allel positiver Genotyp
GST Mo	μ Null Genotyp

GST m1	μ1 Phänotyp
GST mo	μo Phänotyp
GST T1	theta Allel positiver Genotyp
GST To	theta Null Genotyp
GST t1	theta1 Phänotyp
GST t2	theta0 Phänotyp
Kb	Kilobasen
KMT	Knochenmarktransplantation
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MTX	Methotrexat
NAT	N-Acetyltransferasen
n. s.	nicht signifikant
NSAID	nicht steroidale Antiphlogistika
OR	Odds ratio
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
Prä- B- ALL	akute lymphatische Leukämie vom prä B Zelltyp
SAA	schwere aplastische Anämie
T- ALL	akute lymphatische Leukämie vom T Zelltyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Leukämie

35 – 40 % der bösartigen Erkrankungen des Kindesalters sind Leukämien, davon ist die akute lymphatische Leukämie (ALL) mit 80 % die häufigste Leukämieform. Die akute myeloische Leukämie (AML) macht 15 %, die chronische myeloische Leukämie (CML / CMML) 2 % aus, 3 % können nicht näher klassifiziert werden.

Der von Virchow geprägte Begriff Leukämie (weißes Blut) beschreibt die autonome Proliferation eines Zellklones des blutbildenden Systems. Sie kann mit einer generalisierten Ausbreitung im Knochenmark, mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Zellausschwemmung ins periphere Blut sowie mit einer Infiltration extramedullärer Organe einhergehen.

Die ALL ist eine maligne Erkrankung, die sich meist im Knochenmark, aber auch extramedullär zum Beispiel im peripheren lymphatischen Gewebe oder anderen Organen (Hoden, ZNS) manifestiert. Ihre Inzidenz liegt bei 1:100000. Am häufigsten tritt die ALL im Alter zwischen 2 – 5 Jahren auf. Jungen sind etwas häufiger betroffen als Mädchen (1,3 : 1) [Kinderkrebsregister, Mainz]. Der hohe Grad an Mutationen bzw. chromosomalen Veränderungen in leukämischen Zellen weisen darauf hin, dass DNA Schädigungen an der Entstehung der Leukämie beteiligt sind [Hemminki et al., (2002)]. Zu den bekannten DNA schädigenden Mechanismen im Kindesalter gehören radioaktive Strahlung [Noshchenko et al., (2002)] und mutagene Medikamente [Chaplain et al, (2000)]. Bei Erwachsenen konnten auch Assoziationen zur Exposition mit Benzolderivaten gezeigt werden [Guenel et al, (2002), Korte et al., (2000)]. Des weiteren tritt die ALL bei Grunderkrankungen auf, die mit erhöhter Chromosomenbrüchigkeit einhergehen, wie z.B. Trisomie 21 [Berger et al, (1997)], Fanconi Anämie [Janik-Moszant et al., (1998)] oder andere genetische Konstellationen [Pederson-Bjeregaard et al., (2002), Ching-Hon et al., (2002), Diekvoss et al., (2002)]. Entstehungsort der ALL ist das Knochenmark. Die Klassifikation erfolgt auf der Basis der Morphologie nach der French, American, British, FAB Klassifikation [Schrappe et al., (2002)]:

L1: kleine Lymphozyten, schmaler Zytoplasmasaum

L2: große Lymphozyten, polymorph, irreguläre Kerne

L3: tiefblaue große Lymphozyten, hell granulierter Kern (B-Zellen)

Heute hat die immunologische Klassifizierung der ALL große Bedeutung gewonnen [Schrappe et al., (2001)]. Hierzu werden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern, die sich gegen bestimmte Antigene der Zelle richten markiert (FACS = „Fluorescence- activated cell sorting“). Je nach Reifungsgrad und Zelltyp exprimieren die hämatopoetischen Zellen unterschiedliche Antigene auf der Zelloberfläche, so dass Reifungsgrad und Zelltyp exakt bestimmt werden können. Die leukämischen Zellen exprimieren keine leukämischen Marker, sondern Antigene, die während der normalen hämatopoetischen Reifung exprimiert werden. Diese werden zum Teil diskordant exprimiert. Aufgrund ihres Reaktionsmusters werden die Leukämiezellen klassifiziert. In der Regel gelingt die Unterscheidung zwischen ALL und AML und bei der ALL die Aufteilung in die B- Linien und T- Linien. In mehr als 80 % der Fälle wird eine ALL der B- Zellreihe diagnostiziert, seltener die T- Linien ALL [Bene et al., (1995)]. Veränderungen des Genoms sind bei mehr als 60 % der Patienten nachweisbar. In der Regel gelingt durch die Immunphänotypisierung die sichere Unterscheidung zwischen akuten lymphatischen und myeloischen Leukämien. Die Lymphoblasten können der T- bzw. B- Zellreihe zugeordnet werden. Da Leukämien klonale Erkrankungen sind, ist davon auszugehen, dass in sämtlichen leukämischen Zellen identische Rearrangements vorliegen. Diese stellen somit charakteristische Merkmale des Leukämiezellklons dar [Lai et al., (2000)]. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion ist der Nachweis bestimmter Translokationen möglich. Die immunologische Klassifizierung und chromosomale Veränderungen gelten als Faktoren der Risikoeinschätzung und sind somit Grundlage der Therapieplanung. Der Krankheitsverlauf ist abhängig von der Proliferationsrate der Blasten. Es gibt einige zum Zeitpunkt der Diagnose und im Verlauf der Therapie erhebbare Parameter, die es zum Diagnosezeitpunkt oder im Lauf der Therapie erlauben, das Rezidivrisiko eines Patienten abzuschätzen [Henze et al., (1991)]. Hierzu gehört die Leukämiezellmasse, die durch Leukozytenzählung und Größe von Leber und Milz abgeschätzt wird. Eine hohe Zellmasse ist mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet, wie z. B. die T-ALL oder die B-ALL, welche eine andere Therapie als die prä-B-ALL benötigt. Ebenfalls eine schlechtere Prognose haben männliche Patienten, die initial einen ZNS Befall haben, älter als 10 Jahre oder im Säuglingsalter sind und der schwarzen Rasse angehören. Eine gute Prognose hat die C-ALL

(CD10), ein hyperploider Chromosomensatz und das fehlende Philadelphia Chromosom. Das fehlende Ansprechen auf Chemotherapie an Tag 8 und Tag 15 weist auf eine schlechtere Prognose hin [Schrappe, Creutzig et al., (2002),].

Bei 2 / 3 der pädiatrischen Patienten ist der Verlauf akut, d.h. zwischen den ersten Symptomen und der Diagnose liegen weniger als 4 Wochen, 1 / 3 der Fälle verlaufen schleichend, dieses trifft vor allem bei der T-ALL mit hoher Zellzahl zu und ist somit mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet. Die ersten Symptome sind oft durch die hämatologische Insuffizienz bedingt. Es kommt zu einer Anämie mit Müdigkeit, Blässe, Tachykardie und Atemnot und / oder Thrombozytopenie mit Petechien, Hämatomen, Nasenbluten und zur erhöhten Infektneigung. Des weiteren kann eine extramedulläre Manifestation wie zum Beispiel die Infiltration des ZNS (Meningiosis leucemica), von Lymphknoten oder Hoden mit Blasten zu klinischen Symptomen führen. Bei Kleinkindern ist das erste Symptom nicht selten eine Laufverweigerung mit dem klinischen Bild der Coxitis fugax. Weiterhin können eine Hepatosplenomegalie, ein Exophthalmus, eine obere Einflusstauung und Knochenschmerzen (Coxitis) bestehen, die zur Diagnose Rheuma führen können [GPOH].

Um die Behandlung der pädiatrischen onkologisch erkrankten Patienten zu optimieren, werden seit über 20 Jahren von Mitgliedern der GPOH Therapiestudien durchgeführt. Für akute lymphatische Leukämien wird von den meisten Kliniken das BFM (=Berlin, Frankfurt, Münster)- Protokoll angewendet, von einer kleineren Gruppe das Co- ALL Protokoll. Beide Therapien bestehen aus Induktions- (Reduzierung der Tumormassen), Konsolidierungs- (Reduzierung von residuellen leukämischen Blasten), Reinduktions- und Erhaltungstherapie (Vorbeugung von Rezidiven). Bei der Induktionstherapie kommen Vincristin, Prednison, MTX intrathekal und C-ASP in Frage. Nach einem Reinduktionsblock folgt die 2 - 3 jährige Dauertherapie mit 6- Mercaptopurin und MTX [GPOH]. Eine Schädelbestrahlung erfolgt nur bei Hochrisikopatienten, da sich herausgestellt hat, dass diese mit einem signifikant erhöhtem Risiko der Entstehung von Hirntumoren vergesellschaftet ist. Als wichtigster prognostischer Faktor gilt die Prednison - Response am 15. Tag. Fehlt die Response, gelten die Patienten als Hochrisikopatienten und es ist eine Therapieintensivierung nötig [Schrappe et al., (2002)]. Die Prognose der ALL ist sehr gut und hat sich in den letzten 20 Jahren noch gebessert, die 5 Jahresüberlebensrate der ALL ist von 1980 bis 1999 von 76 % auf 86 % gestiegen [Dt. Kinderkrebsregister, (2003)].

Die Blasten der AML sind Klone von Progenitoren der granulozytären, monozytären, erythrozytären oder thrombozytären Reihe. Sie macht bei Kindern unter 15 Jahren 15 % aller Leukämien aus. Die AML tritt häufiger als die ALL als Zweitkrankheit bei Trisomie 21, Fanconi Anämie [Tischkowitz et al, (2003)], Blackfan-Diamond-Anämie [Greaves, (2002), Van Dijken, (1995)], Kostmann Syndrom [Smith et al., (1995)], Bloom Syndrom [Greaves, (2002), Barnard et al., (2002)], MDS [Barnard et al., (2002), Maeda et al., (1998)] und SAA [Waterhouse, (2003)] auf. Des weiteren tritt sie häufig als Sekundärmalignom nach Behandlung anderer maligner Erkrankungen auf [Kaletsch, (1999)]. Auch hier werden neben mutagenen Medikamenten Assoziationen mit ionisierender Strahlung oder Exposition gegenüber Benzolderivaten beschrieben. Entstehungsort der AML ist in der Regel das Knochenmark, aber es kann sich auch seltener in anderen Organen wie Milz oder Lymphknoten manifestieren. Die AML wird morphologisch durch die FAB (French American British) Klassifikation eingeteilt (Tabelle 1) [Schrappe M, Creutzig U, (2002)].

Tabelle 1: Die morphologische Einteilung der AML erfolgt nach den FAB-Kriterien, Einteilung von M0 bis M7

FAB M0	akute undifferenzierte myeloische Leukämie
FAB M1	akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung
FAB M2	akute myeloische Leukämie mit Ausreifung
FAB M3	akute Promyelozytenleukämie
FAB M3 variant	akute Promyelozytenleukämie, hypogranuläre Variante
FAB M4	akute myelomonozytäre Leukämie
FAB M4Eo	akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie
FAB M5	akute Monozytenleukämie
FAB M5a	akute Monoblastenleukämie
FAB M5b	akute promonozytäre-monozytäre Leukämie
FAB M6	akute Erythroblastenleukämie
FAB M7	akute Megakaryoblastenleukämie

Der Krankheitsverlauf bei den AML Patienten ist kurz und fulminant. Die Leitsymptome ergeben sich aus der Knochenmark Insuffizienz mit Müdigkeit, Blässe, Blutungsneigung und Infektanfälligkeit. Oft besteht eine Hepatosplenomegalie, z. T. haben die Patienten

vergrößerte Lymphknoten. Des weiteren treten Hauteinblutungen, Gingivahyperplasie, Parotisschwellung, Anorexie und Lymphadenopathie (dies besonders bei FAB M4 / M5) auf. Gefürchtet ist die disseminierte intravasale Gerinnung und eine meningeale Beteiligung, die bei 15 % der Patienten auftritt [GPOH]. Das Knochenmark ist in den meisten Fällen hyperzellulär. Die Klassifikation der AML erfolgt auf der Basis der Morphologie (FAB Einteilung), der Zytochemie, des Immunphänotyps und der zyto- und molekulargenetischen Befunde. Der Nachweis der Translokationen t (8; 21) oder t (15; 17), oder der Inversion 16 gilt als ein prognostisch günstiger Faktor [Schrappe M, Creutzig U, (2002)], während die Monosomie 7 oder komplexe Karyotypen eher auf eine schlechte Prognose hinweisen [Schrappe M, Creutzig U, (2002)]. Die Molekulargenetik kann bei Vorliegen eines Markers zur Remissionsüberwachung genutzt werden. Diese Faktoren werden in die Therapieplanung einbezogen. Die Standardtherapie nach dem BFM- Protokoll der GPOH besteht aus einer intensiven Induktionstherapie, anschließender Konsolidierung und Intensivierung über einen Zeitraum von vier bis sechs Monaten. Die Knochenmarktransplantation steht Hochrisikopatienten in erster Remission zur Verfügung [Schrappe et al., (2002)]. Die Prognose der AML ist schlechter als die der ALL. Aber auch hier konnte von 1980 bis 1999 die 5 Jahresüberlebensrate verbessert werden, und zwar von 39 % auf 57 % [Schrappe et al., (2002)].

Tabelle 2: 5- Jahresüberlebensrate und Rezidivrate von ALL, AML und SAA in %

	5-Jahresüberlebensrate in %	Rezidivrate in %
ALL	86	30
AML	57	61
SAA	60-90	28

1.2 Schwere aplastische Anämie

Die schwere aplastische Anämie (SAA) ist eine erworbene Knochenmarkaplasie, die mit einer Inzidenz von 0,2/100000 pro Jahr selten ist. Die Anamnese zeigt oft einen schleichenden Beginn über viele Wochen. In manchen Fällen geht der Panzytopenie eine Mono- oder Bizytopenie voraus (15 %). Bedingt durch die fehlende Hämatopoese leiden die Patienten unter Abgeschlagenheit, Infektneigung und Blutungsneigung [Young et al., (2002)]. Die Krankheit tritt in der Regel plötzlich aus voller Gesundheit auf. Auslösende Faktoren sind im Kindesalter selten auszumachen. Bei Erwachsenen finden sich Assoziationen mit Chemikalien wie Benzol oder Kontakt zu Chloramphenicol [Saita et al, (2001)], Medikamenten wie NSAID oder Antibiotika [Symeonidis et al, (2002)] und viralen Infektionen wie Hepatitisviren, Epstein-Barr-Virus und Parvovirus B19 [Safadi et al, (2001), Kojima et al., (2000)]. Die Ursache ist in den meisten Fällen aber nicht geklärt. Immunhämatologische Untersuchungen zeigen bei fast allen Patienten eine deutlich verminderte Zahl von Stammzellen. Dafür könnte ein intrinsischer Stammzelldefekt oder exogene stammzellschädigende Faktoren sein. Bei manchen Patienten kann eine vermehrte IFN gamma oder IL-5 Freisetzung nachgewiesen werden. Ein Indikator für die Rolle, die das Immunsystem bei der Pathogenese der AA spielt, ist die Wirksamkeit der immunsuppressiven Therapie. Die aplastische Anämie wird in Abhängigkeit von der Granulozytenzahl in drei Schweregrade eingeteilt:

NSAA (nicht schwere aplastische Anämie): Granulozyten $> 0,5 \text{ G/l}$

SAA (schwere aplastische Anämie): Granulozyten $< 0,5 \text{ G/l}$

VSAA (sehr schwere aplastische Anämie): Granulozyten $< 0,2 \text{ G/l}$

Die Knochenmarktransplantation ist eine kurative Therapie, die bei Vorhandensein haploidenten Geschwisterspender Methode der Wahl ist [Urbano-Ispizua, (2002)]. Des weiteren wird sie bei Versagen der Immunsuppression oder bei Risikopatienten mit Chromosomenaberration angewendet [Gluckman et al., (1991), Tisdale et al., (2000)]. Bei fehlendem Spender wird eine immunsuppressive Therapie mit Antilymphozytenglobulin, Cyclosporin und G-CSF für mindestens sechs Monate durchgeführt [Führer et al, (2003)].

Die Prognose der hämatoonkologischen Erkrankungen ist für Patienten mit ALL der B-Zell Reihe gut, während die T-Zell Leukämie, AML und aplastische Anämie eine schlechtere Prognose aufweisen. Mit Verbesserung der Therapiemöglichkeiten der Leukämien besteht ein 7,2 fach erhöhtes Risiko zur Normalbevölkerung, ein Zweitmalignom zu entwickeln [Bhatia, (2002)]. Um die Prognose zu verbessern und gegebenenfalls Prophylaxe betreiben zu können, ist es wichtig, mehr über die Erkrankungen und v. a. ihre genaue Pathogenese zu erfahren. In Deutschland gibt es keinen Hinweis auf einen Leukämie Cluster [Dt. Kinderkrebsregister, (2003)]. Bis auf die Kinder, die wegen einer Erkrankung mutagene Medikamente einnehmen müssen und / oder einer Bestrahlung ausgesetzt sind, ist in Deutschland keine vermehrte Exposition gegenüber mutagenen Noxen zu erwarten. Allerdings sind alle hier lebenden Personen ständig geringen Konzentrationen bekannter Noxen (z. B. Bezolderivate) ausgesetzt. Dies legt den Verdacht auf eine putative genetische Veranlagung zur Entwicklung hämatoonkologischer Krankheiten nahe, da es verschiedene Polymorphismen bei den für die Entgiftung relevanten Enzymen des menschlichen Körpers gibt, die unterschiedlich effektiv arbeiten. Interessant sind hierbei besonders die Phase I und Phase II Enzyme der Biotransformation, die bei der Entgiftung des menschlichen Körpers eine wichtige Rolle übernehmen.

1.3 Glutathion S- Transferase (GST)

Der Mensch ist täglich exogenen Fremd- und Schadstoffen ausgesetzt, die über die Haut, die Lunge oder den Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden. Hierzu gehören natürliche Pestizide, wie zum Beispiel Pflanzenphenole, Flavonoide oder Benzylacetate, Medikamente, ionisierende Strahlen und andere Umweltnoxen [Rossi et al., (1999)]. Auch endogen können für den Körper gefährliche Stoffe entstehen: bei aerober Atmung, bei Entzündungen oder Kontakt mit ionisierenden Strahlen entstehen intrazellulär Superoxidradikale oder Hydrogenperoxide, die mit Membranlipiden und DNA interagieren. Bei diesem multifaktoriellen Prozess scheinen individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Noxen eine Rolle zu spielen. Dies zeigt sich z. B. bei der Therapie von malignen Tumoren mit Chemotherapeutika. Patienten mit dem gleichen Risikoprofil sprechen unterschiedlich gut auf die Therapie an [Coles et al, (2003), Davies et al., (2001)]. Der menschliche Organismus begegnet vielen dieser Stoffe zum ersten Mal und ist trotzdem in der Lage, mit diesen Umwelteinflüssen durch Entgiftungsreaktionen (= Biotransformation)

adäquat umzugehen. Im Laufe der Evolution hat sich zur Elimination von Fremdstoffen ein komplexes System aus Entgiftungsenzymen mit großer individueller Variabilität entwickelt [Wormhoudt et al, (1999)]. Die Eliminierung erfolgt erst über die Umwandlung in wasserlösliche Stoffe [Hayes, Pulford, (1995)]. Diese besteht aus zwei Phasen, die im glatten endoplasmatischen Retikulum und im Cytosol ablaufen. In Phase I wird der Fremdstoff hydrolysiert, reduziert oder oxidiert [Hayes, Pulford, (1995)]. Zu diesen Phase I Enzymen gehören die Cytochrom P450- Monooxygenasen und N- Acetyltransferasen. In der Regel hat dieses eine Erhöhung der Polarität und eine Verringerung der biologischen Aktivität oder Toxizität zur Folge. Phase II Enzyme bauen Metaboliten aus Phase I weiter ab, und beinhalten häufig Konjugationsreaktionen, die durch Glutathion S- Transferasen, UDP- Glucuronosyl Transferasen und Sulfotransferasen katalysiert werden oder Reduktionsreaktionen, die durch Epoxidehydrolase und Quinonerduktase katalysiert werden [Hayes, Pulford, (1995)]. Die Konjugate werden entweder biliär (bei Molmassen > 300) oder renal (bei Molmassen < 300) eliminiert. Bei der Entgiftung durch enzymatische Transformation entstehen aber oft auch toxische Zwischenprodukte [Hayes, Pulford, (1995)]. Es gibt bis dato einige Untersuchungen, welche eine Assoziation zwischen bestimmten Entgiftungsreaktionen und Krankheiten wie z. B. Harnblasen- Ca [Harries et al, (1997)], Parkinson- Syndrom [Rahbar et al, (1999)], Colon Ca [Smits et al, (2003)], Ösophagus Ca [Tan et al., (2000)] u. v. a. zeigten. Die individuelle Fähigkeit, Noxen aus dem Körper zu entfernen, spielt anscheinend eine Rolle bei der Entstehung von Krankheiten [Hayes, Pulford, (1995)]. In den letzten Jahren wurden einige Studien durchgeführt, welche eine Assoziation zwischen malignen Erkrankungen und dem genetischen Polymorphismus der Biotransformationseenzymen, z. B. der Glutathion S- Transferasen untersuchten [Hayes, Pulford, (1995)]. Die Glutathion S- Transferasen bilden eine Superfamilie dimerer Enzyme, welche die Konjugation eines großen Spektrums elektrophiler Substanzen mit dem Tripeptid Glutathion (GSH) katalysiert. Die GST- Familie nimmt in der Phase II Biotransformation eine zentrale Rolle ein. Die GST- Genexpression ist ubiquitär und unterliegt komplexen regulatorischen Mechanismen (zellspezifische Umgebung, Hormone, Xenobiotika). Des weiteren kann GST die Induktion weiterer Enzyme wie zum Beispiel Hydroquinon Reduktase, Aflatoxin B1-Aldehydreduktase oder Y- glutamyl Transferase modulieren, und ist an der Aktivierung einer Vielzahl von Proteinen beteiligt [Hayes, Pulford, (1995)]. Die GST selbst wird durch mindestens 100 verschiedene Fremdstoffe induziert.

Die GST Enzymkonzentration ist besonders hoch im Zytoplasma von Leber-, Nieren- und Darmzellen. Die Substrate, die GST umwandelt, haben gemeinsam:

1. Sie sind hydrophob
2. Sie besitzen ein elektrophiles Atom
3. Sie reagieren nicht- enzymatisch mit Glutathion bei einer messbaren Geschwindigkeit (Abbildung 1).

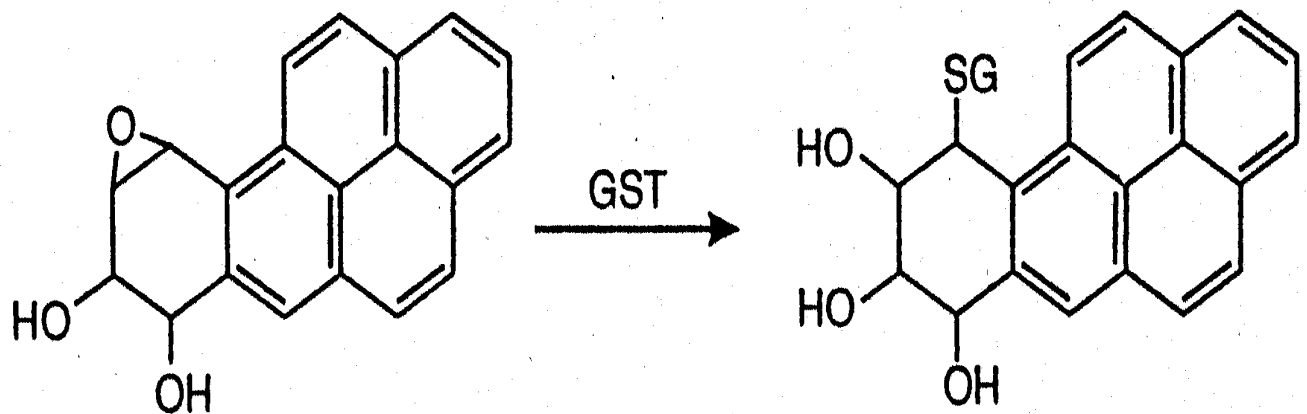


Abbildung 1: Entgiftung von Karzinogenen durch das GST Enzym: dargestellt ist der Metabolismus von Benzopyren-7,8-diol-9,10-oxid durch Glutathion (GSH), bei dem der Ring der Oxacyclopropangruppe nucleophil mit GST als katalysierendes Enzym geöffnet wird.

Es gibt zwei membrangebundene und fünf cytosolische GST Enzyme, die alpha, μ , pi, sigma und theta GST genannt werden und deren Gene auf verschiedenen Chromosomen beim Menschen liegen [Pemble et al, (1996); Strange et al., (1999); Autrup, (1999)]. Die Gene von GST alpha, μ , pi und sigma weisen untereinander eine Homologie von 20 % auf, mit theta aber nur 5 – 15 % [Hayes, Pulford, (1995)]. In einigen dieser Familien wurden verschiedene Allelvarianten identifiziert [Pearson, (1993)]. Auf zwei dieser Gruppen wird im Folgenden eingegangen:

A.) μ Gruppe

Das GST μ Gen ist beim Menschen auf Chromosom 1p13 lokalisiert und mit 8 Exons ungefähr 5 kb lang [Pearson, (1993)]. Die GST μ Gene sind auf einem 20 kb langen Gen Abschnitt in folgender Reihenfolge angeordnet 5' *GSTM4* - *GSTM2* - *GSTM1* - *GSTM5* - *GSTM3* 3' [XU et al, (1998)]. Es gibt drei GST M1 Allele, und zwar GST M1*0, GST M1*A und GST M1*B.

B.) Theta Gruppe

Im menschlichem Genom existieren 2 GST theta Gene. Das GST T1 Enzym ist auf dem Chromosom 22 lokalisiert. Es ist 4 kb lang und enthält 5 Exons [Strange et al., (2001)]. Das GST T1 Gen ist polymorph. Beim GST Genotyp wird das Gen exprimiert, beim GST 0 Genotyp, entstanden durch eine Gen Deletion, ist das Gen nicht vorhanden (null Allel). Bei 16 % der Kaukasiern liegt ein Null Genotyp vor, was mit der Aufhebung der enzymatischen Aktivität einhergeht [Hayes, Pulford, (1995)]. Das Fehlen der GST T Enzymaktivität führt zu einem geringerem Schutz gegenüber einer Reihe von Schadstoffen. So konnte gezeigt werden, dass GST T1 essentiell für die Inaktivierung von Stoffen wie Methylbromid, Dichloromethan und Ethylenoxid in Erythrozyten sind.

1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in-vitro*-Technik, mit der gezielt Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA- Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigt werden können. Als Starthilfe werden Oligonucleotidprimer, sogenannte Amplimer benötigt. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA- Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA- Matrize (= template) sind, welche die zu amplifizierende Sequenz umschließt [Mullis et al., (1987)]. Die Primer werden zusammen mit einem großen Überschuss freier Nukleotide zu dem zu untersuchenden DNA- Material zugegeben. Durch Erhitzen auf 95° C wird die doppelsträngige DNA aufgetrennt, und soweit abgekühlt, dass sich die hinzugegebenen Primer an die zu untersuchende DNA anlagern können, ohne dass sich die DNA wieder zu Doppelsträngen verbindet. Eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von

Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA- Matrize [Saiki et al., (1988)]. Sie synthetisiert so neue DNA- Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Diese neu synthetisierten DNA- Stränge dienen in jedem neuen Zyklus ebenfalls als Matrize. In der Multiplex PCR können gleichzeitig mehrere DNA- Stränge vermehrt werden [Mullis et al., (1990)]. Voraussetzung ist, dass die Primer in den gleichen Temperaturbereichen optimal anlagern und keine Interferenzen untereinander haben. Da die neu synthetisierten DNA- Stränge eine definierte Länge haben, stellen sie sich in der Gelelektrophorese als scharf gezeichnete Bande dar.

1.5 Thema der Arbeit

Die Fähigkeit eines Organismus mittels biotransformierender Enzyme Schadstoffe abzubauen, kann in der Pathogenese hämatoonkologischer Erkrankungen bedeutsam sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Polymorphismus der Glutathion S- Transferase bei Patienten mit ALL, AML und SAA untersucht. Es wurden Patientenblutproben von Kaukasiern und Kirgisen untersucht, die hämatoonkologisch (Leukämien, SAA, Tumoren) erkrankt waren, und in Deutschland bzw. im Kyrghyz Medical Institute (Bishkek, Kirgistan) behandelt wurden. Für die Länder wurden auch entsprechende Kontrollgruppen untersucht. Die Bevölkerung in Kirgistan ist asiatisch, und weist somit einen anderen genetischen Pool als die deutschen Patienten, die Kaukasier sind, auf. Die Inzidenz der AML und SAA ist in der asiatischen Bevölkerung gegenüber der kaukasischen Bevölkerung deutlich erhöht. Dieses mag zum einen auf eine höhere Schadstoffbelastung z. B. durch die in Kirgistan übliche Verwendung oder Lagerung nicht zugelassener Pestizide zurückzuführen sein, zum anderen am differenten Genpool liegen [Lee et al., (2001), Okada et al., (1997)].

Die Fragen, mit denen sich diese Untersuchung beschäftigte, waren:

- 1.) Treten bestimmte Genotypen präferenziell bei den Patienten (Leukämien, SAA, Tumoren) im Vergleich zu der Kontrollgruppe auf?
- 2.) Unterscheidet sich der GST Polymorphismus der kaukasischen gegenüber der kirgisischen Bevölkerung bei Patienten oder der Kontrollgruppe?
- 3.) Gibt es somit einen Hinweis auf einen genetischen Hintergrund für die Pathogenese einer der hämatoonkologischen Erkrankungen?

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien

2.1.1 DNA Isolierung

400 µl Vollblut von Patienten der Universität Düsseldorf oder Bishkek und freiwilliger kaukasischer oder asiatischer Blutspender

DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland):

20 µl Rnase (Stocklösung 20 mg / ml)

50 µl Proteinase

400 µl AL-buffer

420 µl ETOH (96 %)

500 µl AW buffer

100 µl AE buffer

2.1.2 PCR

Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim, Deutschland):

0, 29 µl Taq Polymerase (3, 5 U / µl)

2, 4 µl dNTP (2, 5 mM)

3 µl 10 x Expand HF

jeweils 1 µl Primer (20 µM), (MWG biotech, Ebersberg, Deutschland) (siehe Tabelle 6)

15, 3 µl HLPC

2.2 Proben

In dem Zeitraum vom 30.07.1999 bis 01.06.2002 wurden insgesamt 361 Blutproben (Kinderklinik der Universitätsklinik Düsseldorf, Co- ALL Studie, Kyrghyz Medical Institute, Bishkek, Kirgistan) untersucht. Davon waren 135 Proben kaukasischer Patienten, mit 57 Knochenmarksproben und 78 Blutproben. Alle 53 kirgisische Patientenproben waren aus einer peripheren Vene entnommen worden. Die Proben der kaukasischen Kontrollgruppe (n = 132) und der kirgisischen Kontrollgruppe (n = 41) wurden alle aus einer peripheren Vene entnommen. Von den Blutproben wurde sofort die DNA isoliert, und diese dann mittels PCR weiter untersucht.

Das Durchschnittsalter der kaukasischen Patienten entsprach 7,4 +/- 0,44 Jahre (Kontrolle: 24,4 +/- 2,18 Jahren, wobei nur 59 Personen die freiwillige Angabe machten), das der kirgisischen Patienten 19,5 +/- 4,1 Jahre. Bei der kirgisischen Kontrollgruppe lag das Durchschnittsalter bei 13,6 +/- 1,07 Jahre

Die kaukasische Patientengruppe bestand aus 83 männlichen und 49 weiblichen Patienten. Die entsprechende Kontrollgruppe bestand aus 67 männlichen und 55 weiblichen Personen.

Tabelle 3: Diagnosen der kaukasischen Patienten

Diagnose	Gesamt
Kontrolle	122
ALL gesamt	66
prä B- ALL	19
T- ALL	17
C- ALL+ AML	1
C-ALL	26
SAA	15
CML	5
AML	11
Rest*	38
Patienten gesamt	135

Die Tabelle 3 zeigt die Aufteilung in die verschiedenen Diagnosen bei den kaukasischen Patienten und die Kontrollgruppe (die ALL wurde einmal gesamt betrachtet, und nach Subtypen unterteilt).

Die Aufschlüsselung der Proben nach Diagnosen zeigt folgende Ergebnisse für die kaukasischen Patienten: Die ALL wurde insgesamt 66 mal diagnostiziert, davon war die prä-B- ALL 19 (7 = w, 12 = m), die C- ALL 26 (8 = w, 18 = m), die T- ALL 17 (6 = w, 8 = m) mal und eine biphänotypische Leukämie aus C- ALL + AML (1 = w) einmal vertreten. Bei 15 Patienten wurde eine SAA (7 = w, 8 = m) diagnostiziert, und bei 11 eine AML (5 = w, 6 = m) (Tabelle 3). 43 ALL Patienten waren männlich, 23 waren weiblich und hier lag das Durchschnittsalter bei 6,2 +/- 0,55 Jahren. Die Tabelle 4 zeigt die Aufteilung der verschiedenen Diagnosen (die ALL wurde einmal insgesamt als Gruppe betrachtet, und dann noch in die exakte Diagnose aufgeteilt), nach Geschlecht und nach Alter zum Diagnosezeitpunkt.

Tabelle 4 Charakteristik der kaukasischen Patienten

Diagnose	W	M		< 4 Jahre	4 -12 Jahre	> 12 Jahre
ALL gesamt	22	42		25	27	7
C-ALL	7	18		11	8	3
prä B-ALL	7	12		10	6	1
T-ALL	6	11		4	20	3
C-ALL+AML	1				1	
SAA	6	8		6	8	1
CML	3	2		1	1	3
AML	5	6		2	6	3
Andere Tumorentitäten	13	25		8	14	9
Summe	49	83				
Kontrolle	41	53				

Für die kirgisischen Patienten zeigt sich folgende Aufschlüsselung: Die ALL wurde bei 16 kirgisischen Patienten diagnostiziert, die AML und AA jeweils 8 bzw. 7 mal, und die SAA und CML jeweils 3 mal (Tabelle 5).

Tabelle 5: GST Genfrequenz bei den kirgisischen Patienten

Diagnose	Gesamt
Kontrolle	41
Leukämien gesamt	53
AA	7
AL	3
ALL	16
AML	8
AnL	6
C ALL	1
CML	3
SAA	3
Andere Tumorentitäten	6

Die Tabelle 5 zeigt die verschiedenen Diagnosen der kirgisischen Patienten und die Kontrollgruppe. Abkürzungen auf Seite 2 , Rest = ONL; MDS; ITP; T-Zell ALL; Immunzytopenie

2.3 Genotypische Analyse

Die DNA wurde unter Verwendung des Qiagen Blood Kits (Qiagen, Ratingen, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Zur Lyse der Zellbestandteile wurden 400 µl Blut mit 50 µl Protease und 400 µl AL- Puffer versetzt und 10 Minuten bei 70° C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 420 µl 96 % ETOH wurden die Proben in 2 Schritten auf die Qiamsäule gegeben und 1 Minute bei 14000 und 22° C zentrifugiert. Das Eluat wurde nachfolgend zweimal mit 500 µl AW buffer gewaschen und bei 14000 und 22° C zentrifugiert. Danach wurde auf das Eluat 100 µl AE buffer auf die Säule gegeben und 5 Minuten bei 70° C inkubiert. Durch Zentrifugation der beladenen Säule wurde die DNA gewonnen. Diese wurde bei –20° C in 0,5 mL Tubes gelagert.

Die GST Analysen wurden in einer Multiplex PCR durchgeführt, die es erlaubt, GST T, GST M und ein housekeeping Gen (Betaglobin), als positive Kontrolle, in einem Ansatz zu untersuchen. In die PCR Reaktion wurden je 1 µl GST T- und 1 µl GST M - spezifischer Primer, je 1 µl Betaglobinprimer als positiver Kontrollprimer (Tabelle 6) , 2, 4 µl dNTP, 3 µl 10 x Puffer, 0, 29 µl Enzym (Expand High Fidelity PCR System Kit, Roche, München, Deutschland) und 3 µl DNA zugefügt und dann mit 18, 71 µl HLPC ein 30 µl Ansatz erstellt.

Tabelle 6: Genfrequenz der verwendeten Primer

Primer	Genfrequenz
Betaglobin 1	5`CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3`
Betaglobin 2	5`GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3`
Theta 1	5`TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC 3`
Theta 2	5`TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA 3`
Mu 1	5`GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C 3`
Mu 2	5`GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G 3`

Die PCR Amplifikation wurde in einem Trio Thermoblock (Biometra Cyclers, Göttingen, Deutschland) wie folgt durchgeführt:

	Zeit (Minuten)	Temperatur (° C)
Vorlauf	4	94
34 Schleifen	1	94
	1	60
	1	72
Nachlauf	7	72

Das PCR Produkt wurde auf ein 2-prozentiges Agarosegel mit 1 µl Ethidiumbromid aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief bei 80 V circa 1h. Die Banden wurden auf UV-Schirm sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert (Abbildung 2).

Das GST T1 Allel stellt sich als 480 Bp Bande dar, das GST M1 Allel als 215 Bp Bande. Bei Fehlen des 480 Bp spezifischen GST T1 Produkts oder des GST M1 spezifischen 215 Bp Produkts kann vom korrespondierenden Nullgenotyp ausgegangen werden, wenn gleichzeitig die Positivkontrolle Betaglobin regelrecht bei 268 Bp detektiert werden kann. Als Negativkontrolle lief jedes Mal eine Wasserkontrolle mit.

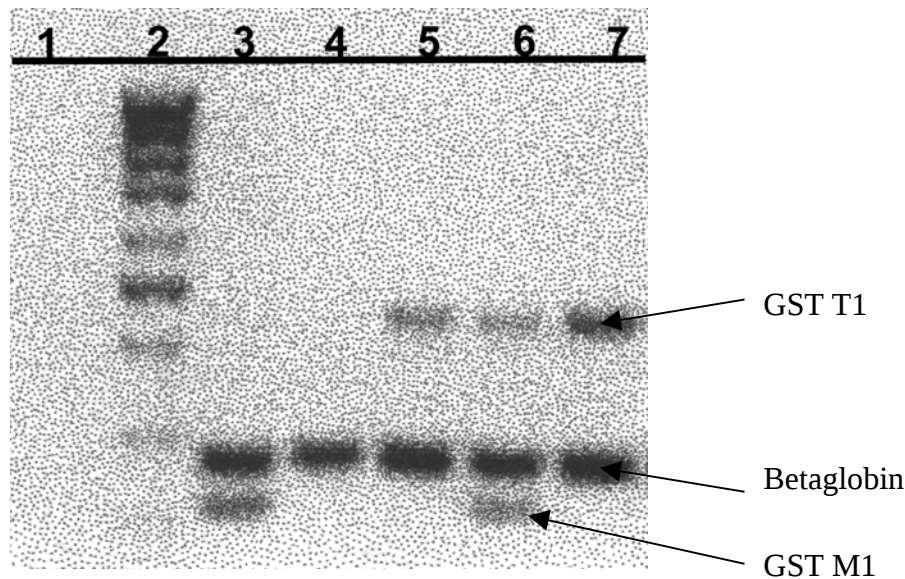


Abbildung 2: Darstellung der GST Banden mittels Elektrophorese auf einem Agarosegel

Als Positivkontrolle lief das 268 Bp spezifische Betaglobin mit, bei 215 Bp tritt eine GST M1 spezifische Bande auf, in Höhe 480 Bp eine GST T1 spezifische Bande. Nummer 1 zeigt die Negativkontrolle (Wasser), Nummer 2 zeigt die 100 Bp Leiter. Nummer 3 zeigt eine Patientenprobe, die bei 215 Bp eine GST M1 spezifische Bande aufweist. Nummer 4 zeigt die Positivkontrolle, sonst keine Banden, der Patient hat also den GST Mo +To Nulltyp. Nummer 5 und Nummer 7 sind Patienten, die den Genotyp GST T1 haben, da eine spezifische Bande bei 480 Bp sichtbar ist. Nummer 6 weist bei 480 Bp, 268 Bp und bei 215 Bp eine Bande auf, der Patient hat den Genotyp GST M1 / T1.

2.4 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurden die Genfrequenzen von GST T und M in folgende vier Kategorien eingeteilt:

- 1) GST M1 / T1 (von GST μ und von GST theta sind die jeweiligen Allele vorhanden)
- 2) GST Mo / T1 (GST μ Allel ist nicht vorhanden, GST theta Allel ist vorhanden)
- 3) GST M1 / To (GST μ Allel ist vorhanden, GST theta Allel ist nicht vorhanden)
- 4) GST Mo / To (GST μ und GST theta Allel sind beide nicht vorhanden).

Diese vier Kategorien wurden im kaukasischem bzw. kirgisischem Patientengut gegenüber der jeweiligen Kontrolle untersucht. Es wurden folgende statistische Tests herangezogen: Chi- Quadrat nach Pearson (Vierfeldertafel- Analyse) mit und ohne Yates Korrektur, exakter Test nach Fisher und die OR. Die OR (Odds ratio) stellt das relative Risiko der Erkrankung dar. Hiermit wird angegeben, inwieweit eine bestimmte Genkonstellation (s. o. Kategorieneinteilung) häufiger bei der Patientengruppe als bei der Kontrolle auftritt. Der Chi- Quadrat Test nach Pearson wird zur Überprüfung von Häufigkeitsverteilungen eingesetzt, bei Variablen mit nominalem Skalenniveau. Dieser Test überprüft, ob beobachtete Häufigkeiten sich signifikant von solchen unterscheiden, die aufgrund bestimmter theoretischer Annahmen erwartet werden. Auf die jeweilige theoretische Annahme wird im Ergebnisteil näher eingegangen. Die Yates Korrektur und der exakte Test nach Fisher sind bei kleineren Patientenhäufigkeiten genauer als der Chi- Quadrat Test. Die Ergebnisse wurden computer- und internetunterstützt mit dem Programm SPSS berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 GST Genfrequenz kaukasischer Patienten / Kontrollen

Aus den Blutproben der Patienten bzw. der Kontrollgruppen wurde die DNA isoliert, und danach eine Multiplex PCR durchgeführt (Kapitel 2.1.2). Innerhalb der kaukasischen pädiatrischen Patienten war die Genotypfrequenz für GST T1 und M1 folgendermaßen: GST Mo + To fand sich bei 16 von 135 untersuchten Patienten (12 %), bei der Kontrollgruppe waren das 22 von 122 (18 %). 19 von 135 kaukasischen Patienten (14 %) zeigten einen GST M1 / GST To Genotyp, während die Kontrollgruppe 19 von 122 (16 %) aufweist. 58 von 135 kaukasische Patienten (43 %) hatten den GST T1 / GST Mo Genotyp, bei der Kontrolle waren das 52 von 122 (42 %). Bei 42 von 135 Patienten (31 %), bei der Kontrolle 29 von 122 (24 %) konnte das GST M1 und GST T1 Allel detektiert werden (Abbildung 3).

kaukasische Patienten mit hämatoonkologischer Erkrankung

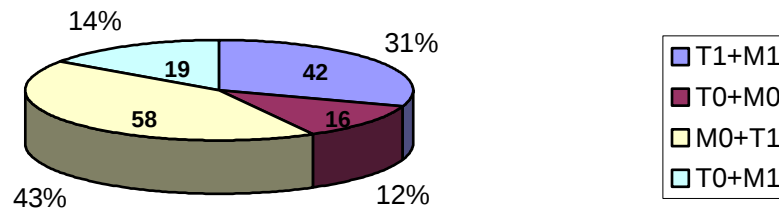


Abbildung 3: absolute und relative GST- Genverteilung der kaukasischen Patienten. Der GST T1 + M1 Genotyp war bei 42 / 135 (31 %), der GST To + Mo Genotyp bei 16 / 135 (12 %), der GST To + M1 Genotyp bei 19 / 135 (14 %) und der GST Mo + T1 Genotyp bei 58 / 135 (43 %) der kaukasischen Patienten vorhanden. Somit ist kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe feststellbar. Beim GST M1 und GST T1 Enzym sind beim Menschen Polymorphismen bekannt. Das Gen für GST M1 und GST T1 ist entweder homozygot auf beiden Allelen vorhanden, heterozygot oder homozygot auf beiden Allelen deletiert (= Nullgenotyp).

kaukasische Kontrollgruppe

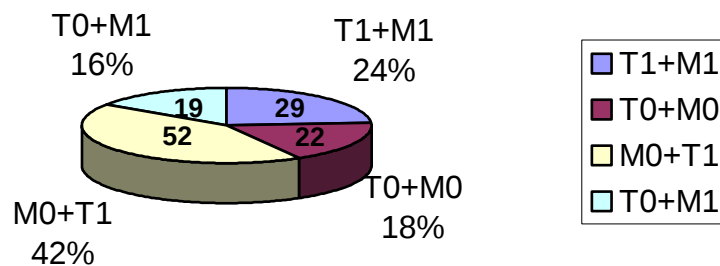


Abbildung 4: absolute und relative GST- Genverteilung der kaukasischen Kontrollgruppe. Der GST T1 + M1 Genotyp war bei 29 / 122 (24 %), der GST To + Mo Genotyp bei 22 / 122 (18 %), der GST To + M1 Genotyp bei 19 / 122 (16 %) und der GST Mo + T1 Genotyp bei 52 / 122 (42 %) der kaukasischen Kontrolle vorhanden.

Die Ergebnisse wurden in einer Vierfeldertafel- Analyse auf ihre Signifikanz überprüft. Dabei wurde der p- Wert bei 0,05 festgelegt. Die Ergebnisse lauten wie folgt: Beim kompletten Nulltyp (To + Mo) ergab sich im Chi- Quadrat ohne Yates- Korrektur 1,943 (p- Wert: 0,163; nicht signifikant (n. s.)), mit Yates- Korrektur 1,484 (p- Wert: 0,223; n. s. und der Fisher Test ergab p : 0,218; n. s. (OR = 0,611). Das relative Erkrankungsrisiko ist somit tendenziell erniedrigt. Die Yates- Korrektur gibt eine genauere Schätzung bei kleinen zu untersuchenden Gruppen ab. Bei einem GST M1 / GST To Genotyp ergab sich im Chi- Quadrat Test ohne Yates- Korrektur 0,114 (p- Wert: 0,74; n. s.), mit Korrektur ergab er 0,026 (p- Wert: 0,871; n. s.). Der Fisher Test p- Wert lag bei 0,86; n. s. und die OR lag bei 0,888. Das relative Erkrankungsrisiko war somit erniedrigt. Beim GST T1 / GST Mo Genotyp zeigte der Chi- Quadrat Test ohne Yates- Korrektur 0,003 (p- Wert: 0,956; n. s.), mit Korrektur 0,0 (p- Wert: 1,0; n. s.). Der Fisher Test p- Wert lag bei 1,100; n. s. und die OR lag bei 1,014. Das relative Erkrankungsrisiko war somit gering erhöht. Waren beide Allele (GST T1 + M1) vorhanden, kam es im Chi- Quadrat Test zu folgenden Werten: ohne Korrektur: 1,727 (p- Wert: 0,189; n. s.); mit Korrektur: 1,379 (p- Wert: 0,240; n. s.). Der p- Wert des Fisher Tests lag bei 0,210; n. s., und die OR bei 1,448 (siehe Tabelle 7). Das relative Erkrankungsrisiko war bei dieser Genkonstellation 1,4 fach erhöht.

Tabelle 7: Statistische Auswertung der GST- Polymorphismen kaukasischer Patienten im Vergleich zur Kontrolle

Kaukasische Patienten	T1+M1	To+Mo	T1+Mo	M1+To
Chi Quadrat ohne Yates Korrektur (p- Wert)	1,727 (0,189); n. s.	1,943 (0,163); n. s.	0,003 (0,956); n. s.	0,114 (0,74); n. s.
Chi Quadrat mit Yates Korrektur (p- Wert)	1,379 (0,240); n. s.	1,484 (0,223); n. s.	0,0 (1,0); n. s.	0,026 (0,871); n. s.
Fisher Test	0,210; n. s.	0,218; n. s.	1,100; n. s.	0,861; n. s.
OR	1,448	0,611	1,014	0,888

OR = Odds ratios, T1 + M1 = Allele vorhanden, To + Mo = Nullgenotyp, T1 + Mo = GST T1 Genotyp mit fehlendem GST M Genotyp, M1 + To = GST M1 Genotyp mit fehlendem GST T Genotyp, n. s. = nicht signifikant

Zur weiteren Auswertung wurden die 66 kaukasischen ALL- Patienten gesondert ausgewertet (Abb. 6). Hier ergab sich hinsichtlich der Genotypfrequenz für GST T1 und M1 bei den ALL- Patienten kein signifikanter Unterschied. 7 von 66 (11 %) untersuchten Patienten zeigten für beide untersuchten Gene einen GST Mo und GST To Genotyp, bei der Kontrollgruppe waren das 22 von 122 (18 %). 12 von 66 (18 %) kaukasischen ALL- Patienten zeigten einen GST M1 / GST To Genotyp, während die Kontrollgruppe 19 von 122 (16 %) aufweist. 28 von 66 (42 %) kaukasische ALL- Patienten hatten den GST T1 / GST Mo Genotyp, bei der Kontrolle waren das 52 von 122 (42 %). Bei 19 von 66 (29 %) ALL- Patienten, bei der Kontrolle 29 von 122 (24 %) konnte der GST M1 und GST T1 Genotyp nachgewiesen werden. Da die untersuchten Gruppen zu klein waren, konnten keine Signifikanzen berechnet werden.

Tabelle 8: GST Genfrequenz bei den kaukasischen Patienten

Diagnose	T1+M1	To+Mo	Mo(T1)	To(M1)	Gesamt
Kontrollen	29	22	52	19	122
C-ALL	10	3	10	3	26
prä B- ALL	6	3	9	1	19
T- ALL	2	1	8	6	17
C- ALL+ AML	0	0	0	1	1
ALL gesamt	18	7	27	11	63
SAA	4	5	6	0	15
CML	1	1	3	0	5
AML	4	1	4	2	11
Andere Tumorentitäten	14	2	17	5	38
Patienten gesamt	42	16	58	19	135

Die Tabelle 8 zeigt die Aufteilung in die verschiedenen Diagnosen bei den kaukasischen Patienten und die Kontrollgruppe (die ALL wurde einmal gesamt betrachtet, und dann nochmals genau unterteilt).

Als nächstes wurde der Einfluss des Geschlechts auf die GST- Genverteilung untersucht. Bei den männlichen Patienten trat der GST To + Mo Genotyp in der Kontrollgruppe (20,75 %, n = 11 / 53) häufiger auf, als bei den Patienten (13,25 %, n = 11 / 83). Der Genotyp M1 + T1 trat häufiger bei den Erkrankten auf (36,14 %, n = 30 / 83; Kontrolle: 20,75 %, n = 11 / 53).

Der GST M1 + To Genotyp war in der Kontrolle (20,75 %, n = 11 / 83) häufiger vertreten als bei den männlichen Patienten (13,25 %, n = 11 / 83). Der GST T1 + Mo Genotyp wiederum kam bei beiden Gruppen circa gleich häufig vor (Kontrolle: 37,74 %, n = 20 / 53; Patienten 37,35 %, n = 31 / 83). Bei den weiblichen Kontrollpersonen (29,27 %, n = 12 / 41) trat der Genotyp M1 + T1 vermehrt auf (Patienten: 24,49 %, n = 12 / 49). GST Mo + To trat in der Kontrolle (8,16 %, n = 6 / 41) häufiger auf als bei den weiblichen Patienten (14,63 %, n = 4 / 49). Der GST T1 + Mo Genotyp war bei der Kontrolle (43,9 %, n = 18 / 41) seltener vertreten als bei den weiblichen Patienten (51,02 %, n = 25 / 49). Den GST M1 + To Genotyp hatten 16,32 % (n = 8 / 49) der Patientinnen (Kontrolle: 12,2 %, n = 5 / 41). Es zeigte sich bei diesen Analysen kein signifikanter Unterschied der GST Verteilung zwischen den untersuchten Variablen (siehe Abbildung 5).

Verteilung der GST Varianten unter Berücksichtigung des Geschlechts bei kaukasischen Patienten

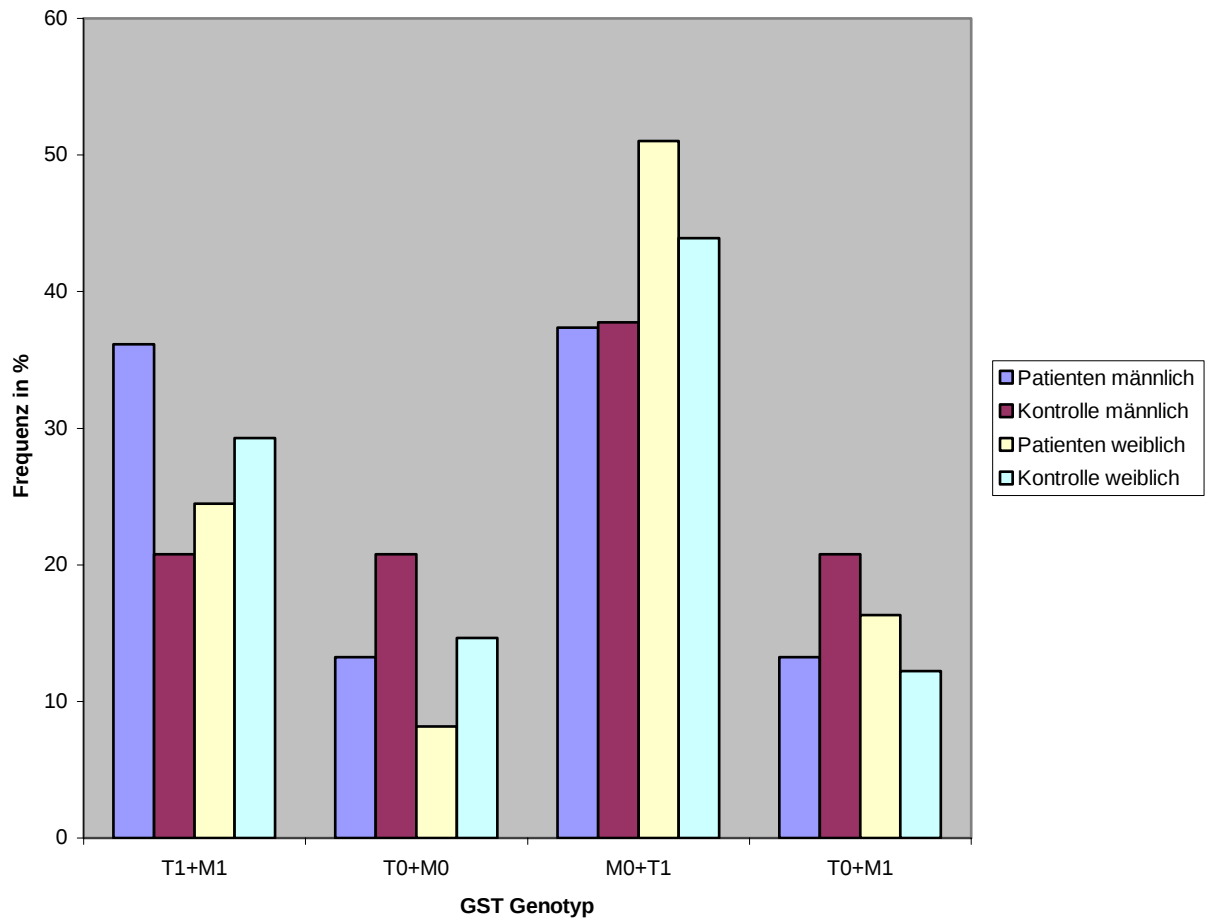


Abbildung 5 Die Abbildung zeigt die prozentualen Genfrequenzen für GST T1 + M1 der kaukasischen Patienten / Kontrollen, nach Geschlecht getrennt.

To = null Allel für GST T1, T1 = Nachweis des T1 Allels

Die Gesamtanzahl war wie folgt: Patienten männlich n = 83, Kontrollen männlich n = 53

Patienten weiblich n = 49, Kontrollen weiblich n = 41

Tabelle 9: GST Verteilung kaukasischer Patienten, aufgeteilt nach Geschlecht und Alter, (1) andere Tumorentitäten

Tabelle nach Geschlecht	T1+M1	To+Mo	Mo(T1)	To(M1)	Gesamt		T1+M1	To+Mo	Mo(T1)	To(M1)	Gesamt
M gesamt	30	11	31	11	83	W gesamt	12	4	25	8	49
C-ALL	8	3	4	3	18		2		5		7
prä B-ALL	4	2	6		12		2	1	3	1	7
T-ALL	1	1	7	2	11		1		1	4	6
C-ALL + AML										1	1
ALL gesamt	13	6	17	6	42		5	1	10	6	22
SAA	3	2	3		8		1	2	3		6
CML	1	1			2				3		3
AML	1		4	1	6		3	1		1	5
(1)	12	2	7	4	25		3		9	1	13
Kontrollen	11	11	20	11	53		12	6	18	5	41
Tabelle nach Alter											
C-ALL						CML					
<4 Jahre	4	1	4	2	11				1		1
4-12 Jahre	2	2	3	1	8		1				1
>12 Jahre	1		2		3			1	2		3
präB-ALL						SAA					
<4 Jahre	3	1	6		10		2	2	2		6
4-12 Jahre	1	1	3	1	6		2	3	3		8
>12 Jahre		1			1				1		1
T-ALL						AML					
<4 Jahre		1	2	1	4		2				2
4-12 Jahre	1		4	15	20		2	1	2	1	6
>12 Jahre	1		2		3				2	1	3
C-ALL + CML						(1)					
<4 Jahre							4		3	1	8
4-12 Jahre				1	1		5	2	7		14
>12 Jahre							4		2	3	9
ALL gesamt											
<4 Jahre	7	3	12	3	25						
4-12 Jahre	4	3	11	9	27						
>12 Jahre	2	1	4		7						

Verteilung der GST Polymorphismen bei kaukasischen Patienten im Vergleich zu der Kontrolle

Anzahl =

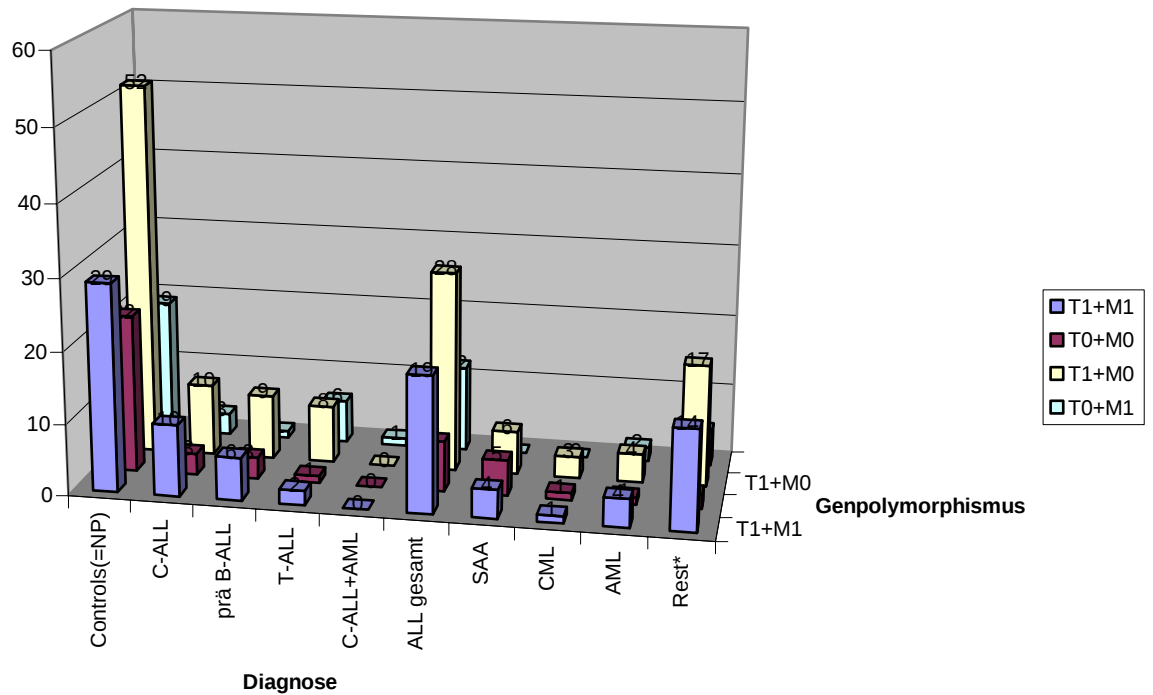


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt die Genfrequenzen für GST T1 + M1 der pädiatrischen kaukasischen Patienten und der Kontrollgruppe. Die Patienten sind nach Diagnosen geordnet. To = Nullgenotyp für GST theta; T1 = Nachweis des theta Allels; Mo = Nullgenotyp für GST M; M1 = Nachweis des M Allels

3.2 GST Genfrequenz kirgisischer Patienten / Kontrollen aus Kirgistan

Es wurden insgesamt 53 Proben von Leukämie erkrankten Patienten und 41 Proben hämatologisch gesunder kirgisischer Probanden untersucht. Wie in Abbildung 7 ersichtlich, gab es folgende genotypische Aufteilung:

14 von 53 untersuchten Patienten (26,4 %) zeigten für beide untersuchten Gene den GST Mo und GST To Genotyp, bei der Kontrollgruppe waren das 8 von 41 (19,5 %). 9 von 53 kirgisischen Patienten (17 %) zeigten einen GST M1 + GST To Genotyp, während die Kontrollgruppe 6 von 41 (14,6 %) aufweist. 14 von 53 kirgisische Patienten (26,4 %) hatten den GST T1 + GST Mo Genotyp, bei der Kontrolle waren das 16 von 41 (39,1 %). Bei 16 von 53 Patienten (30,2 %), bei der Kontrolle 11 von 41 (26,8 %) konnte das GST M1 und GST T1 Allel detektiert werden (Tabelle 10).

Tabelle 10: GST Genfrequenz bei den kirgisischen Patienten

Diagnose	T1+M1	To+Mo	Mo	To	Gesamt
Kontrollen	11	8	16	6	41
Leukämien gesamt	16	14	14	9	53
AA		3	4		7
AL	1	1		1	3
ALL	4	3	4	5	16
AML	2	3	2	1	8
AnL	3	2	1		6
c ALL		1			1
CML	2		1		3
SAA	2	1			3
Andere Tumorentitäten	2		2	2	6

Die Tabelle 10 zeigt die verschiedenen Diagnosen der kirgisischen Patienten und die Kontrollgruppe. Abkürzungen auf Seite 2

Tabelle 11: Darstellung der GST Verteilung kaukasischer / kirgisischer Patienten
(im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle)

<u>Diagnose</u>	<u>T1+M1</u>	<u>To+Mo</u>	<u>Mo+T1</u>	<u>To+M1</u>
Kontrollen Kaukasier	24 %	18 %	42 %	16 %
Patienten Kaukasier	30 %	12 %	43 %	15 %
Kontrollen Kirgistan	27 %	20 %	38 %	15 %
Patienten Kirgistan	31 %	26 %	26 %	17 %

Der Vergleich zwischen kaukasischen (30 %, n = 42 /135) und kirgisischen (31 %, n = 16 / 53) Patienten ergibt beim GST T1 + M1 Genotyp keinen Unterschied. Ebenso ist der GST To + M1 Genotyp bei beiden Patientengruppen circa gleich häufig vertreten (kaukasische Patienten: 15 %, n = 19 und kirgisische Patienten: 17 %, n = 9). Ein Unterschied zeigte sich beim GST Mo und GST To Genotyp: die kaukasischen Patienten (12 %, n = 16) zeigten seltener diesen Genotyp als die kirgisischen Patienten (26 %, n = 14). Der GST Mo + T1 Genotyp war bei den kaukasischen Patienten (43 %, n = 58) häufiger anzufinden als bei den kirgisischen Patienten (26 %, n = 14). Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Tabelle 11).

Vergleich Leukämien / Kontrollen (Kirgistan)

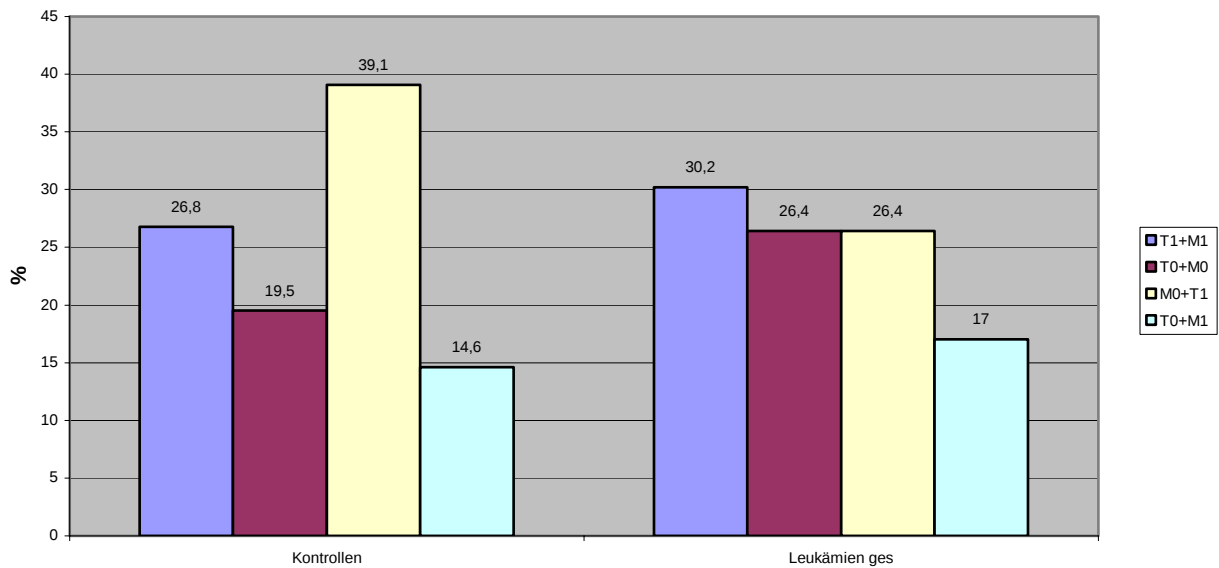


Abbildung 7: Vergleich der Kontrollgruppe mit dem Patientengut in Kirgistan (Angaben in prozentualen Zahlen). Auffällig ist die nicht signifikante Erhöhung des GST Mo + To Genotyps bei der Patientengruppe (26,4 %, Kontrolle: 19,5 %), und das gehäufte Auftreten des GST Mo + T1 Genotyps in der Kontrollgruppe (39,1 %, Patienten: 26,4 %).

Die Ergebnisse wurden in einer Vierfeldertafel- Analyse auf ihre Signifikanz überprüft. Dabei wurde der p- Wert auf 0,05 festgelegt. Es kam zu folgenden Ergebnissen (siehe Tabelle 12): Beim kompletten Nulltyp (To + Mo) ergab sich im Chi- Quadrat ohne Yates- Korrektur 0,614 (p- Wert: 0,433; n. s.), mit Yates- Korrektur 0,290 (p- Wert: 0,590; n. s.) und der Fisher Test ergab $p = 0,472$; n. s. (OR = 1,481). Es besteht also ein 1,4 fach erhöhtes relatives Risiko, bei Fehlen beider GST Gene an Leukämie zu erkranken.

Bei einem vorhandenen Allel (To + M1) ergab sich im Chi- Quadrat Test ohne Yates- Korrektur 0,095 (p- Wert: 0,758; n. s.), mit Korrektur ergab sich 0,006 (p- Wert: 0,981; n. s.). Ebenso war der Fisher Test p- Wert 1,0; n. s. und die OR lag bei 1,193. Beim GST T1+ GST Mo Genotyp lag der Chi- Quadrat Wert ohne Korrektur bei 1,691 (p- Wert: 0,193; n. s.), mit Korrektur lag er bei 1,161 (p- Wert: 0,281; n. s.). Der p- Wert des Fishertests war 0,265; n. s.

und die OR lag bei 0,561, d. h. das relative Risiko an einer Leukämie zu erkranken, ist mit diesem Genotyp fast halbiert.

Waren beide Allele (GST T1 + M1) vorhanden, kam es im Chi- Quadrat Test zu folgenden Werten: ohne Korrektur: 0,127 (p- Wert: 0,721; n. s.); mit Korrektur: 0,016 (p- Wert: 0,899; n. s.). Der p- Wert des Fisher Tests lag bei 0,820; n. s. und die OR bei 1,179. Das relative Erkrankungsrisiko war beim GST T1 + M1 und beim GST M1 + To Genotyp nur sehr gering erhöht.

Tabelle 12: Statistische Auswertung der GST Polymorphismen kirgisischer Patienten im Vergleich zu den Kontrollen

Kirgisische Patienten	T1+M1	To+Mo	T1+Mo	M1+To
Chi Quadrat ohne Yates Korrektur (p-Wert)	0,127(0,721),n. s.	0,615(0,433),n. s.	1,691(0,193),n. s.	0,095(0,758),n. s.
Chi Quadrat mit Yates Korrektur (p-Wert)	0,016(0,899),n. s.	0,290(0,590),n. s.	1,161(0,281),n. s.	0,001(0,981),n. s.
Fisher Test	0,820, n. s.	0,472, n. s.	0,265, n. s.	1, n. s.
OR	1,179	1,481	0,561	1,193

OR = Odds ratios, T1 + M1 = Allele vorhanden, To + Mo = Nullgenotyp, T1 + Mo = GST T1 Genotyp mit fehlendem GST M Genotyp, M1 + To = GST M1 Genotyp mit fehlendem GST T Genotyp, n. s. = nicht signifikant

4 Diskussion

Die Ätiologie hämatoonkologischer Erkrankungen im Kindesalter ist vielfältig. Eine wichtige Rolle scheint die Schadstoffexposition während des Heranwachsens zu spielen. Darüber hinaus sind Kinder unter Anderem wegen der noch nicht vollständig ausgebildeten Detoxifizierungskapazität weniger gut gegenüber Schadstoffexpositionen geschützt. In epidemiologischen und experimentellen Studien konnten Korrelationen zwischen der Exposition gegenüber Benzolderivaten [Guenel et al., (2002)], Medikamenten [Chaplain et al., (2000)] oder radioaktiver Strahlung [Noshchenko et al., (2002)] oder anderen mutagenen oder karzinogenen Substanzen und der Inzidenz hämatoonkologischer Erkrankungen nachgewiesen werden [Berger et al., (1997), Preudhomme et al., (1997)]. In Deutschland besteht keine vermehrte Exposition gegenüber solchen Noxen. Hier mögen Expositionen im häuslichen Umfeld über Pestizide, Tabakrauch und Ernährung relevant sein. Eine Ausnahme bilden Chemo- und strahlentherapeutische Behandlungen maligner Tumoren, die vermehrt zu Sekundärmalignomen, häufig AML führen [Kaletsch, (1999)]. Des weiteren treten diese Erkrankungen als Zweiterkrankung bei Personen mit erhöhter Chromosomenbrüchigkeit auf [Tischkowitz et al., (2003), Barnard et al., (2002)]. Bislang wurden wenige Studien über den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Entstehung hämatoonkologischer Erkrankungen bei Kindern durchgeführt. In dieser Studie untersuchten wir GST. Die Glutathion S-Transferasen spielen in der Phase II der Biotransformation eine wichtige Rolle. Sie katalysieren die Konjugation eines großen Spektrums elektrophiler Substanzen mit dem Tripeptid Glutathion, und tragen damit zur Detoxifikation des menschlichen Organismus bei.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der GST Mo + To Genotyp bei kaukasischen Patienten eine Prävalenz von 12 Prozent (Kontrollgruppe: 18 %) aufweist. Der GST To Genotyp zeigte sich insgesamt bei 55 %, der GST Mo Genotyp bei 26 % der hämatoonkologisch Erkrankten. Diese Ergebnisse unterscheiden sich nicht von denen, die Chen et al. in seiner Studie an US amerikanischen Kindern mit ALL festgestellt hat. Der GST Mo Genotyp wurde dort bei 55,2 % der weißen ALL Patienten entdeckt (Kontrolle: 53,5 %), der GST To Genotyp bei 14,1 % der weißen ALL Patienten und bei 15 % der Kontrolle [Chen et al., (1997)]. Eine weitere Studie von Crump et al. zeigte ebenfalls keine Assoziation zwischen Genotyp und Entstehen einer AML. Die gefundenen Genfrequenzen lagen in den

o.g. Bereichen. Er hatte eine Fall Kontroll- Studie mit 297 amerikanischen AML Patienten durchgeführt [Crump et al., (2000)].

In unseren Analysen zwischen GST Genotyp und wichtigen klinischen Risikofaktoren wie Alter und Geschlecht konnten wir keine signifikanten Unterschiede herausfinden. Bei den weiblichen Patienten kam der GST T1 + M1 Genotyp häufiger in der Kontrolle als bei der Patientengruppe (29,27 % vs. 24,4 %) vor. Bei den männlichen Patienten war die GST To + M1 Expression seltener als in der Kontrolle (13,25 % vs. 20,75 %). MH Woo et al. hat ebenfalls eine erhöhte Prävalenz des GST To + Mo Genotyps bei seinen männlichen Patienten herausgefunden, der bei den weiblichen Patienten nicht auftrat. In seiner Arbeit hat er 302 Kinder mit ALL untersucht, 57 davon haben eine sekundäre AML bzw. ein myelodysplastisches Syndrom entwickelt. Er konnte keinen signifikanten Unterschied herausfinden [Woo et al., (2000)]. In einer Studie von Hall et al. konnte keine besondere Assoziation zwischen GST Expression und rezidivfreiem Überleben bei kindlicher ALL entdeckt werden [Hall et al., (1994)].

In der asiatischen Bevölkerung ist die Inzidenz der AML und SAA gegenüber der kaukasischen Bevölkerung erhöht. Dies kann zum einen an einem anderen Genpool liegen oder an der erhöhten Schadstoffbelastung, z. B. durch Verwendung nicht zugelassener Pestizide in Kirgistan. In unserer Arbeit zeigte sich eine komplette Gendeletion (Mo + To) bei 26,42 % der kirgisischen Patientengruppe und bei 19,5 % in der Kontrolle. Bei den kaukasischen Patienten war der GST Mo + To Genotyp mit 12 % deutlich seltener vorhanden als bei den kirgisischen Patienten. Dies zeigt eine interessante Tendenz, die aber aufgrund der geringen Probenanzahl nicht signifikant war. Diese andere Genfrequenz kann die erhöhte Inzidenz der Leukämien, v.a. der AML in Kirgistan erklären. Allerdings gibt es auch eine erhöhte Exposition gegenüber Noxen wie z.B. Einsatz von verbotenen Pestiziden, Ablagerung von Uran, etc [Hamby et al., (1999), Meinert et al., (2000)]. Den Boer et al. konnte in seinen Untersuchungen bei Kindern mit ALL einen signifikanten Anstieg (1,3 fach) des GST T Nulltyps und zu einem geringeren Ausmaß (1,1 fach) auch bei dem GST M Nulltyps finden. Er hatte bei 132 Patienten Antikörper gegen GST Enzyme benutzt [Den Boer et al., (1999)].

In einer weiteren Studie von Stanulla et al. wurde ein Zusammenhang zwischen GST und Rezidivrisiko nach Chemotherapie bei kindlicher ALL untersucht. Er konnte feststellen, dass das Risiko, ein Rezidiv einer prä-B-ALL signifikant vom GST Genotyp abhängt. Der GST Mo oder GST To Genotyp bewirkte eine 2-fache bzw. 2,8-fache Abnahme des Rezidivrisikos.

Ein interessanter Aspekt zeigte sich in der Kontrollgruppe mit erstmals auftretender ALL. Sie wies bei der GST Expression keinen signifikanten Unterschied zur gesunden Normalbevölkerung auf [Stanulla et al., (2000)]. Dieses Ergebnis deckt sich mit den unseren. Wir konnten diesen interessanten Ansatz des Rezidivrisikos aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht weiter untersuchen. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Therapie der Leukämien ist die Frage der Prednison Response. Kinder, die initial gut auf die Prednisontherapie reagieren, haben eine bessere Prognose. Ob die unterschiedliche Response mit unterschiedlichen GST Genotypen einhergeht, ist zu klären. Schrappe et al. untersuchte bei Kindern mit ALL die initiale Antwort auf Prednison Monotherapie. Er konnte dabei keinen signifikanten Unterschied des GST Genotyps zur Kontrolle feststellen [Schrappe et al., (2000)].

Da die Pathogenese der hämatoonkologischen Erkrankungen sehr komplex ist, zeigen die unterschiedlichen Studienergebnisse. Krajinovic et al. fand bei der Untersuchung von 177 ALL Patienten ein erhöhtes Erkrankungsrisiko beim GST Mo Genotyp. Sie hatte eine französisch- kanadische Enklave untersucht, da dort ein founder effekt besteht. Eine Assoziation mit dem GST To Genotyp konnte sie nicht finden [Krajinovic et al., (1999)]. Die untersuchte Patientengruppe war sehr klein, so dass weitere Untersuchungen erforderlich sind. Es ist auch nicht geklärt, in wie weit in dieser Enklave weitere Faktoren Einfluss auf eine ALL Entstehung nehmen.

In Kirgistan zeigte sich tendenziell ein erhöhtes Risiko der Entstehung hämatoonkologischer Erkrankungen beim GST To + Mo Genotyp. Unsere Untersuchungen haben keinen signifikanten Unterschied bei den Patienten hämatoonkologischer Erkrankungen und der Kontrollgruppe bei der GST Expression gezeigt.

5 Zusammenfassung

Der menschliche Organismus ist täglich Schadstoffen ausgesetzt, die zum größten Teil im Körper abgebaut werden. Dieser Vorgang wird Biotransformation genannt. Er wird durch bestimmte Enzyme bewerkstelligt: In Phase I wird der Fremdstoff hydrolysiert, reduziert oder oxidiert, in Phase II konjugiert oder reduziert. GST ist ein Phase II Enzym, welches in verschiedenen Genvarianten vorkommt, z.B. als GST theta und μ . Eine Gendeletion (Nulltyp) führt zur fehlenden Expression der Gene.

Zu den häufig im Kindesalter auftretenden bösartigen Erkrankungen zählen die Leukämien, die unbehandelt zum Tod führen. Die Ätiologie ist noch nicht abschließend geklärt, aber es scheinen Schadstoffexposition (z.B. mit Benzol), Radioaktivität und DNA Fragilität eine Rolle dabei zu spielen.

In dieser Arbeit wurden die verschiedenen Genkonstellationen des GST theta / μ Enzyms bei leukämieerkrankten Kindern im Vergleich zur Normalbevölkerung untersucht. Es wurden Blutproben von Kaukasiern und Asiaten untersucht. Die Untersuchungen der DNA wurde mit Hilfe einer multiplex PCR durchgeführt.

Bei den kirgisischen Patienten war die komplette Gendeletion (Mo + To) mit 26,42 % tendenziell häufiger als bei der Kontrollgruppe mit 19,5 %. Des weiteren fiel in der kirgisischen Patientengruppe auf, dass der T1 + Mo Genotyp nur bei 26,42 %, in der Kontrollgruppe dagegen bei 39,02 % auftritt. Aufgrund der geringen Probenzahl konnte aber kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Der Zusammenhang zwischen Polymorphismen biotransformierender Enzyme und der daraus möglicherweise resultierenden Entstehung von hämatoonkologischen Erkrankungen wird weiter untersucht, da dies für das Verständnis der Ätiologie und der möglichen Therapie von Leukämien wichtig ist.

6 Literaturangaben

Barnard DR et al, (2002), AML and myelodysplastic syndrome in children treated for cancer: comparison with primary presentation, Blood 100, S. 427-34

Bene MC, (1995), Proposals for the immunological classification of acute leukemias, European Group for the Immunological characterization of leukemias (EGIL), Leukemia 9 (10) , S. 1783-86

Berger R, (1997), Acute lymphoblastic leukemia and chromosome 21, Cancer Genet Cytogenet. 94 (1), S. 8-12

Bhatia S, Sather HN, Pabustan OB, (2002), Low incidence of second neoplasms among children diagnosed with acute lymphoblastic leukemia after 1983, Blood 99 (12), S. 4257-64

Chaplain G, Milan C, Sgro C, (2000), Increased risk of acute leukemia after adjuvant chemotherapy for breast cancer, J Clin Oncol. 18 (15), S. 2836-42

Chen H, Sandler D, Taylor J, Shore D, Liu E, Bloomfield C, Bell D, (1997), Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect, Lancet. 347 (8997), S. 295-97

Chen CL, Liu P, Pui CH et al, (1997), Higher Frequency of Glutathione S-Transferase Deletions in Black Children with acute lymphoblastic leukemia, Blood 89, S. 1701-07

Ching-Hon P, Gaynon P, Boyett JM, Chessells JM, Baruchel A, Kamps W, Silverman LB, Biondi A, Harms DO, Vilmer E, Schrappe M, Camitta B, (2002), Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region, Lancet. 359 (9321), S. 1909-15

Coles B, Kadlubar F, (2003), Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-Transferase catalysis: Determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs?, Biofaktors 17 (1-4), S. 115-30

Crump C, Chen C, Appelbaum F, Kopecky K, Schwartz S, Willman C, Slovak M, Weiss N, (2000), Glutathione S-transferase theta 1 gene deletion and risk of acute myeloid leukemia, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 (5), S. 457-60

Davies S, Robison L, Buckley J, Tjoa T, Woods W, Radloff G, Ross J, Perentesis J, (2001), Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia, *J Clin Oncol.* 19 (5), S. 1279-87

Den Boer ML, Pieters R, Kazemier KM, Janka-Schaub G, Henze G, Creutzig U, Kaspers GJ, Kearns PR, Hall AG, Pearson AD, Veerman AJ, (1999), Different expression of glutathione S-Transferase alpha, mu and theta in childhood acute lymphoblastic and myeloid leukaemia, *British Journal of Haematology* 104, S. 321-27

Diekvoss BJ, Stanulla M, Schrappe M, Beier R, Zimmermann M, Welte K, Reiter A, (2002), Polymorphisms within Glutathione S-Transferase genes in pediatric non Hodgkin`s lymphoma, *Haematologica* 87, S. 709-13

Führer M, Waterhouse C, Kolb HJ, (2003), Schwere aplastische Anämie, *Manual Leukämien*, S. 144-53

Führer M, Burdach S, Ebell W, Gadner H, Haas R, Harbott J, Janka-Schaub G, Klingebiel T, Kremens B, Niemeyer C, Rampf U, Reiter A, Ritter J, Schulz A, Walther U, Zeidler C, Bender-Götze for the German/Austrian Pediatric Aplastic Anemia Working Group (1998), Relapse and clonal disease in children with aplastic anemia (AA) after immunosuppressive therapy (IST): the SAA 94 experience, *Klinische Pädiatrie* 210, S. 173-79

Gluckman E, Socie G, Devergie A, Bourdeau-Esprou H, Traineau R, Cosset JM, (1991), Bone marrow transplantation in 107 patients with severe aplastic anemia using cyclophosphamide and thoraco-abdominal irradiation for conditioning: long-term follow-up, *Blood* 78 (2), S. 277-79

Greaves M, (2002), Childhood leukemia, *BMJ* 324, S. 283

Guenel P, Imbernon E, Chevalter A, (2002), Leukemia in relation to occupational exposures to benzene and other agents: a case control study nested in a cohort of gas and electric utility workers, *Am J Ind Med.* 42 (2), S. 87-97

Hall AG, Autzen P, Cattani AR, (1994), Expression of μ class glutathione S-transferase correlates with event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Cancer Res.* 54, S. 5251

Hamby DM, Tynybekov A, (1999), A screening assessment of external radiation levels on the shore of Lake Issyk-Kyol in the Kyrgyz Republic, *Health Phys (United States)* 77 (4), S. 427-30

Harries L, Stubbins M, Forman D, Howard G, Wolf C, (1997), Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase π locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer, *Carcinogenesis* 18 (4), S. 641-44

Hayes J, Pulford D, (1995), The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST* and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30 (6), S. 445-600

Hemminki K, Li X, (2002), Cancer risks in twins: results from Swedish family cancer database, *Int. J Cancer* 99 (6), S. 873-8

Henze G, Fengler R, Hartmann R, Karnhuber B, Janke-Schaub G, Niethammer D, Riehn H, (1991), Six year experience with a comprehensive approach to the treatment of recurrent-childhood acute lymphatic leukemia (ALL-Rez BFM 85). A relapse study of the BFM group, *Blood* 78, S. 1166-72

Janik-Moszant A, Bubala H, Stojewska M et al, (1998), Acute lymphoblastic leukemia in children with Fanconi anemia. *Wiad Lek (Poland)* 51 (4), S. 285-88

Kaletsch U, Kaatsch P, Meinert R, Schüz J, Czarwinski R, (1999), Childhood cancer and residential radon exposure- results of a population-based case-control study in Lower Saxony (Germany), *Radiat. Environ. Biophys.* 38, S. 211-15

Kaletsch U, Schüz J, Meinert R, (2000), Risk of childhood leukemia and parental self-reported occupational exposure to chemicals, dusts and fumes: results from pooled analyses

of German population-based case-control studies, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 (8), S. 835-38

Kaletsch U, Kaatsch P, Meinert R, (1998), An extended study on childhood malignancies in the vicinity of German nuclear power plants, *Cancer Causes Control* 9 (5), S. 529-33

Kaatsch P, Spix C, Michaelis J, (2002), German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2002 (Jahresbericht 2002 des Deutschen Kinderkrebsregisters), Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik, Universität Mainz, S. 8-24

Kojima K, Hara M, Sawada T, Miyata A, (2000), Human T lymphotropic virus type I provirus and T-cell prolymphocytic leukemia, *Leuk Lymphoma* 38 (3-4), S. 381-86

Korte JE, Hertz-Picciotto I, Schulz MR, (2000), The contribution of benzene to smoking-induced leukemia, *Environ Health Perspect (United States)* 108 (4), S. 333-39

Krajinovic M, Labuda D, Richer H, Sinnett H, (1999), Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Influence of Cyp1A1, Cyp2D6, GSTM1, and GSTT1 Genetic Polymorphisms, *Blood* 93, S. 1496-501

Lai R, Hirsch Ginsberg C, Bueso Ramos C, (2000), Pathologic diagnosis of acute lymphocytic leukemia, *Clin North AM* 14 (6), S. 1209-35

Lee KA, Kim SH, Woo HY, Hong YJ, Cho HC, (2001), Increased frequencies of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) gene deletions in Korean patients with acquired aplastic anemia, *Blood* 98 (12), S. 3483-85

Maeda Y, Sumimoto Y, Nawata H, Matsuda M, Kanamaru A, (1998), Deleted mutation of GSTT-1 gene in patients with MDS, *Leukemia* 12 (12), S. 2039

Meinert R, Kaletsch U, Kaatsch P, (1999), Associations between childhood cancer and ionizing radiation: results of a population-based case-control study in Germany, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8 (9), S. 793-99

Meinert R, Schuz J, Kaletsch U, (2000), Leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a register-based case-control study in Germany, *Am J Epidemiol.* 151 (7), S. 639-50

Mullis KB, Faloona F, (1987), Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.* 155, S. 335

Mullis K, (1990), The unusual origin of the PCR, *Scientific American* 262 (4), S. 56-61

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H, (1986), Specific enzymatic amplification of DNA in Vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51, S. 263

Noshchenko AG, Zamostyan P, Bondar O, Drozdora V, (2002), Radiation- induced leukemia risk among those aged 0-20 at the time of the Chernobyl accident: a case control study in Ukraine, *Int. J Cancer* 99 (4), S. 609-18

Okada M, Lkamoto T, Wada H, Tademoto Y, Kakishita E, (1997), Glutathione S-transferase theta 1 gene defect in Japanese patients with myelodysplastic syndromes, *Int. J. Hematol.* 66, S. 393

Pearson WP, (1993), Identification of class mu glutathione Transferase genes GSTM1 – GSTM5 on human chromosome 1p13, *AM J Human Genetic* 53 (1), S. 220–33

Pedersen-Bjeregaard J, Christiansen DH, Andersen MK et al, (2002), Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities. *Leukemia (England)* 16 (11), S. 2177-84

Preudhomme C, Nisse C, Hebbar M, Vanrumbeke M, Brizard A, Lai JL , Fenaux P, (1997), Glutathione S-transferase theta 1 gene defects in myelodysplastic syndromes and their correlation with karyotype and exposure to potential carcinogens, *Leukemia* 11, S. 1580-82

Rahbar A., Kempkes M, Müller T, Reich S, Welter FL, Meves S, Przuntek H, Bolt HM, Kuhn W, (2000), Glutathione S-transferase polymorphism in Parkinson´s Disease, *J Neural Transm.* 107 (3), S. 331-34

Rossi A, Guarnieri C, Rovesti S, Gobba F, Ghittori S, Vivoli G, Barale R, (1999), Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans, *Pharmacogenetics* 9, S. 445-51

Safadi R, Or R, Ilan Y, (2001), Lack of known hepatitis virus in hepatitis-associated aplastic anemia and outcome after bone marrow transplantation, Bone Marrow Transplant (England) 27 (2), S. 183-90

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA, (1988), Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase, Science 230, S. 1350

Saita G, (2001), Aplastic myelosis and subsequent leukopenic leukemia, caused by benzene. 1945, Med Lav (Italy) 92 (6), S. 373-76

Schrapppe M, Reiter A, Ludwig W-D, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, Niemeier C, Henze G, Feldges A, Zintl F, Kornhuber B, Ritter J, Welte K, Gadner H, Riehm H, (2000), Improved outcome in childhood ALL despite reduced use of anthracyclines and of cranial radiotherapy: Results of trial ALLBFM 90, Blood 95, S. 3310-22

Schrapppe M, Lauten M, Matthias T, Stanulla M, Beger C, Welte K, (2002), Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes, Leukemia 16 (8), S. 1437-42

Schrapppe M, Reiter A, Sauter S, Ludwig W-D, Wörmann B, Harbott J, Bender-Götze C, Dörffel W, Dopfer R, Frey E, Havers W, Henze G, Köhl J, Richter R, Ritter J, Treuner J, Zintl F, Odenwald E, Welte K, Riehm H, (1994), Konzeption und Zwischenergebnis der Therapiestudie ALL-BFM 90 zur Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie bei Kindern und Jugendlichen: Die Bedeutung des initialen Therapieansprechens in Blut und Knochenmark, Klin Pädiatr 206, S. 208-21

Schrapppe M, Wuchter C, Ruppert V, Dörken B, Ludwig W, Karawajew L, (2002), In vitro susceptibility to dexamethasone- and doxorubicin-induced apoptotic cell death in context of maturation stage, responsiveness to interleukin 7, and early cytoreduction in vivo in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia, Blood 99, S. 4109-15

Schrapppe M, Stanulla M, Müller Brechlin A, Zimmermann M, Welte K, (2000), Polymorphisms within glutathione S-transferase gene (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study, Blood 95 (4), S. 1222-28

Schrapppe M, Anderer G, Müller Brechlin A, Lauten M, Muti P, Welte K, Stanulla M, (2000), Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia, *Cancer Res* 62, S. 4212-16

Smith OP, Reeves BR, Kempinski HM, Evans JP, (1995), Kostmann's disease, recombinant HuG-CSF, monosomy 7 and MDS/AML, *Br J Haematol.* 91 (1), S. 150-53

Smits K, Gaspari L, Strange R, (2003), Interaction between smoking, GST M1 deletion and colorectal cancer: results from the GSEC study, *Biomarkers* 8 (3-4), S. 299-310

Stanulla M, Schrapppe M, Müller Brechlin A, Zimmermann M, Welte K, (2000), Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study, *The American Society of Hematology, Blood* 95, S.1222-28

Stanulla M, Schrapppe M, Brechlin A, Zimmermann M, Welte K, (2000), Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study, *Blood* 95 (4), S. 1222-28

Strange R, Jones PW, Fryer A, (2000), Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology, *Toxicology Letters* 112-113, S. 357-63

Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran , Fryer AA, (2001), Glutathione S-Transferase family of enymes, *Mutat Res.* 482 (1-2), S. 21-26

Strange RC, Fryer AA, (1999), The glutathione S-Transferase: influence of polymorphism on cancer susceptibility, *IARC sci Publ.* 148, S. 231-49

Symeonidis A, Kouraklis-Symeonidis A, Seimeni U, (2002), Ticlopidine-induced aplastic anemia: two new case reports, review, and meta-analysis of 55 additional cases, *Am J Hematol (United States)* 71 (1), S. 24-32

Tischkowitz M, (2003), Fanconi Anaemia, *J Med Genet.* 40 (1), S. 1-10

Tisdale J, Dunn D, Geller N, Plante M, Nunez O, Dunbar C, Barrett A, Walsh T, Rosenfeld S, Young N, (2000), High-dose cyclophosphamide in severe aplastic anaemia: a randomised trial, *The Lancet*. 356, S. 1554-59

Urbano-Ispizua F, (2002), Allogenic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune disorders, definitions and current practice in Europe, *Bone marrow Transplant* 29, S. 639-46

Van Dijken PJ, Verwijns W, (1995), Diamond-Blackfan Anemia and malignancy. A case report and a review of the literature, *Cancer* 76 (3), S. 517-20

Wen T, Nan S, Gui-Qi W, (2000), Impact of Genetic Polymorphisms in Chytochrome P450 2E1 and Glutathione S-Transferase M1, T1, and P1 on Susceptibility to Esophageal Cancer among High-risk Individuals in China, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9, S. 551-56

Woo MH, Shuster JJ, Chen C, Bash RO, Behm FG, Camitta B, Felix CA, Kamen BA, Pui CH, Raimondi SC, Winick NJ, Amylon MD, Relling MV, (2000), Glutathione S-Transferase genotypes in children who develop treatment-related acute myeloid malignancies, *Leukemia* 14, S. 232-37

Wormhoudt LW, Commandeur JN, Vermeulen NP, (1999), Genetic Polymorphisms of Human N-Acetyltransferase, Cytochrome P450, Glutathione S-Transferase, and Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to Xenobiotic Metabolism and Toxicity, *Critical Reviews in Toxicology* 29 (1), S. 59-124

Young NS, (2002), Acquired aplastic anemia, *Ann Intern Med* 136 (7), S. 534-46

Young NS, (1999), Acquired aplastic anemia, *JAMA* 281, S. 271-78

7 Lebenslauf

Name: Arnhild Renner

Geboren: 06.10.1976 in Wuppertal

Schulbildung:

08/83 – 06/87 Grundschole Am Hofe, Wuppertal

08/87 – 05/96 Carl-Fuhlrott-Gymnasium, Wuppertal

06/96 Abitur

Studium:

WS 1996 Biologie und Mathematik an der HHU Düsseldorf

SS 1997 – WS 2001 Humanmedizin an der HHU Düsseldorf

Physikum: April / 1999

1. Staatsexamen: April / 2000

2. Staatsexamen: April / 2002

SS 2002 – WS 2003 praktisches Jahr im Marienhospital, Aachen

(Innere und Chirurgie)

Orthopädie in Altstätten, Schweiz

3. Staatsexamen: Mai / 2003

Seit Juli / 03 AiP im städtischen Krankenhaus Düren, Innere

Seit Januar / 04 AiP im Elisabeth Krankenhaus Recklinghausen, Innere