

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**Oberflächen- und RNA-Expression von Herpes Virus Entry
Mediator (HVEM) bei Patienten mit Akuter Myeloischer
Leukämie und Korrelationen mit zytogenetischen sowie
molekulargenetischen Charakteristika und klinischem Verlauf
der Erkrankung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Isabell Nathalie Kondla

aus
Düsseldorf

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Marion Subklewe

Mitberichterstatter:
Prof. Dr. med. Oliver T. Keppler
Prof. Dr. med. Michael Albert

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Felix Lichtenegger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2017

Für meine Eltern

Publikation

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Lichtenegger, FS, **Kondla I**, Krempasky M, Weber AL, Herold T, Krupka C, Spiekermann K, Schneider S, Büchner T, Berdel WE, Wörmann BJ, Hiddemann W, Subklewe M. RNA and protein expression of herpes virus entry mediator (HVEM) is associated with molecular markers, immunity-related pathways and relapse-free survival of patients with AML. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2015; 64 (12): 1505-1515.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Die akute myeloische Leukämie	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.3 Klinik und Diagnostik	2
1.1.4 Klassifikation	4
1.1.5 Prognosekriterien	6
1.1.6 Therapie	9
1.1.6.1 Konventionelle Therapie der AML	9
1.1.6.2 Immuntherapie der AML	11
1.2 Kostimulierende und koinhibierende Moleküle	12
1.2.1 Überblick	12
1.2.2 HVEM	15
2. Zielsetzung der Arbeit	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Patientenkohorten	19
3.1.1 Kohorte_P	19
3.1.2 Kohorte_R	20
3.2 Untersuchungsmethoden	20
3.2.1 Datenerhebung und Quellen	20
3.2.1.1 Demographische und krankheitsbezogene Daten	20
3.2.1.2 Klinische Verlaufsdaten	21
3.2.1.3 Datenquellen	21
3.2.2 Durchflusszytometrie	22
3.2.2.1 Grundlegende Prinzipien	22
3.2.2.2 Durchführung	24
3.2.2.3 Auswertung	25
3.2.3 Mikroarrays	28
3.2.3.1 Grundlegende Prinzipien	28
3.2.3.2 Durchführung	29
3.3 Statistik	29

4. Ergebnisse.....	31
4.1 HVEM Expression.....	31
4.2 Korrelation der HVEM-Expression mit demographischen Daten	32
4.2.1 HVEM-Expression und Alter bei Erstdiagnose	33
4.2.2 HVEM-Expression und Geschlecht.....	34
4.3 Korrelation der HVEM-Expression mit krankheitsbezogenen Daten.....	36
4.3.1 HVEM-Expression und Zytomorphologie der AML.....	36
4.3.2 HVEM-Expression und Zytogenetik der AML	39
4.3.3 HVEM-Expression und Molekulargenetik der AML	41
4.3.3.1 NPM1 Mutationsstatus.....	42
4.3.3.2 FLT3 Mutationsstatus	44
4.3.3.3 CEBPA Mutationsstatus	46
4.3.3.4 AML Subtyp mit normalem Karyotyp, NPM1-Mutation und FLT3-Wildtyp	48
4.3.4 HVEM-Expression und ELN-Risikoklassifikation.....	49
4.4 HVEM-Expression und klinischer Verlauf der AML	51
4.4.1 Übersicht	51
4.4.2 Überleben im Zusammenhang mit den AML-Prognosefaktoren Alter bei Erstdiagnose, MRC- und ELN-Risikoklassifikation	52
4.4.2.1 Alter bei Erstdiagnose.....	52
4.4.2.2 MRC-Risikoklassifikation	54
4.4.2.3 ELN-Risikoklassifikation	56
4.4.3 Überleben im Zusammenhang mit der HVEM-Expression	58
4.4.4 Multivariate Analyse.....	62
5. Diskussion.....	68
5.1 Einführung	68
5.2 Diskussion der Methoden	69
5.2.1 Patientenkohorten und Datenerhebung	69
5.2.2 Durchflusszytometrie und Mikroarray-Genexpressionsanalyse	71
5.2.3 Statistische Auswertung: Überlebenszeitanalyse	73
5.3 Diskussion der Ergebnisse	73
5.3.1 HVEM Expression	73
5.3.2 Korrelation der HVEM-Expression mit demographischen und krankheitsbezogenen Daten.....	74
5.3.2.1 HVEM-Expression und demographische Daten	74
5.3.2.2 HVEM-Expression und Zytomorphologie der AML.....	75

5.3.2.3 HVEM-Expression und Zytogenetik der AML sowie Molekulargenetik der AML	75
5.3.3 HVEM-Expression und klinischer Verlauf der AML	78
5.3.3.1 Übersicht und Überleben im Zusammenhang mit den AML-Prognosefaktoren Alter, MRC-und ELN-Risikoklassifikation	78
5.3.3.2 Überleben im Zusammenhang mit der HVEM-Expression	79
5.3.3.3 HVEM als potentieller Prognosefaktor der AML und therapeutische Zielstruktur	81
5.4 Ausblick	83
6. Zusammenfassung	85
Anhang	86
A Fragebogen zur Erhebung klinischer Verlaufsdaten.....	86
Abbildungsverzeichnis.....	88
Tabellenverzeichnis.....	89
Literaturverzeichnis.....	91
Danksagung	105
Eidesstattliche Versicherung.....	106

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
AMLCG	AML Cooperative Group
APL	Akute Promyelozytenleukämie
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ATO	Arsentrioxid
ATRA	All-trans-Retinsäure
BTLA	<i>engl. für</i> B and T Lymphocyte Attenuator
CBF	<i>engl. für</i> Core Binding Factor
CD	<i>engl. für</i> Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA (<i>engl. für</i> complementary DNA)
cRNA	Komplementäre RNA (<i>engl. für</i> complementary RNA)
CDF	<i>engl. für</i> Custom Chip Definition File
CEBPA	<i>engl. für</i> CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha
CTLA4	<i>engl. für</i> Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CR	Komplette Remission (<i>engl. für</i> complete remission)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl. für</i> desoxyribonucleid acid)
DNMT3A	DNA Methyltransferase 3A
ELN	<i>engl. für</i> European LeukemiaNet
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (<i>engl. für</i> European Medicines Agency)
engl.	englisch
FAB-Klassifikation	<i>engl. für</i> French-American-British Klassifikation
FCS	<i>engl. für</i> Flow Cytometry Standard Format (Dateiformat)
FDA	Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der USA (<i>engl. für</i> Food and Drug Administration)
FLT3	<i>engl. für</i> Fms-like Tyrosine Kinase 3
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>engl. für</i> forward scatter)
GvHD	Graft-versus-Host-Erkrankung (<i>engl. für</i> graft versus host disease)
GvL	<i>engl. für</i> Graft-versus-Leukemia
HR	<i>engl. für</i> Hazard Ratio
HSV-1	Herpes simplex Virus Typ 1
HVEM	<i>engl. für</i> Herpes Virus Entry Mediator
IDH1	Isocitrat Dehydrogenase 1
IDH2	Isocitrat Dehydrogenase 2
Ig	Immunglobulin
ITD	Interne Tandemduplikation

KI	Konfidenzintervall
LfL	Labor für Leukämiediagnostik
LIGHT	<i>engl. für</i> Lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV gD for HVEM, a receptor expressed by T-lymphocytes
LT- α	Lymphotoxin- α
Mdn	Median
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl. für</i> Major Histocompatibility Complex)
MNZ	Mononukleäre Zellen
MPO	Myeloperoxidase
MRC	<i>engl. für</i> Medical Research Council
MRD	Minimale Resterkrankung (<i>engl. für</i> minimal residual disease)
n.b.	nicht bestimmt
NCT	<i>engl. für</i> National Clinical Trial
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NPM1	<i>engl. für</i> Nucleophosmin 1
OS	Gesamtüberleben (<i>engl. für</i> overall survival)
PC5	Phycoerythrin-Cyanin-5 (Fluoreszenzfarbstoff)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl. für</i> polymerase chain reaction)
PD-1	<i>engl. für</i> Programmed Cell Death-1
PD-L1	<i>engl. für</i> Programmed Death-ligand 1
PD-L2	<i>engl. für</i> Programmed Death-ligand 2
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)
PFS	Progressionsfreies Überleben (<i>engl. für</i> progression free survival)
PMT	Photomultiplier
RAS	<i>engl. für</i> Rat Sarcoma
RFS	Rezidivfreies Überleben (<i>engl. für</i> relapse-free survival)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl. für</i> ribonucleic acid)
RUNX1	<i>engl. für</i> Runt-Related Transcription Factor 1
sAML	Sekundäre akute myeloische Leukämie
SFI	Spezifischer Fluoreszenzindex
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>engl. für</i> side scatter)
SZT	Stammzelltransplantation
TET2	Tet Methylcytosin Dioxygenase 2
TNF-Rezeptor	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRM	Therapieassoziierte Mortalität (<i>engl. für</i> treatment related mortality)

TP53	Tumorprotein p53
TZR	T-Zell-Rezeptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>engl. für</i> world health organization)
WT1	Wilms-Tumor-Gen

1. Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems, bei der es zur Proliferation von leukämischen Blasten kommt. Bei diesen Zellen handelt es sich um funktionell unreife Vorläuferzellen der myeloischen Zellreihe. Physiologischerweise differenzieren sich die myeloischen Vorläuferzellen zu Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten. Bei der AML expandieren undifferenzierte leukämische Blasten im Knochenmark und werden in das periphere Blut ausgeschwemmt. Die physiologische Blutbildung (Hämatopoese) wird verdrängt und es kommt zur hämatopoetischen Insuffizienz [1].

Unter den akuten Leukämien im Erwachsenenalter macht die AML über 80% aller Fälle aus und ist damit die häufigste Form [2]. Die Inzidenz ist stabil und wird altersadjustiert mit drei bis vier Erkrankungsfällen/100.000/Jahr angegeben [3,4]. Mit steigendem Lebensalter nimmt die Inzidenz zu, insbesondere bei über 60-Jährigen ist sie deutlicher höher mit bis zu 24 Erkrankungsfällen/100.000/Jahr [2,3]. Mit einem medianen Erkrankungsalter zwischen 66 und 72 Jahren ist die AML eine Erkrankung des höheren Lebensalters [2-5].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die AML ist eine heterogene Erkrankung, bei der sich biologische Erkrankungsmerkmale und klinische Erscheinungsbilder zwischen individuellen Krankheitsfällen unterscheiden. Allen Fällen gemeinsam ist, dass Proliferations- und Differenzierungsfaktoren der Hämatopoese dereguliert sind [6]. Es wird angenommen, dass die Pathogenese von veränderten hämatopoetischen Vorläuferzellen, sogenannten leukämischen Stammzellen, ausgeht. Voraussetzung zur klonalen Expansion dieser Zellen sind mindestens zwei kritische Veränderungen auf genetischer Ebene [1,7]. Entscheidend ist ein Zusammentreffen von sogenannten Klasse I und Klasse II Mutationen. Klasse I Mutationen führen zu einem Proliferations- und/oder Überlebensvorteil der leukämischen Zellen. Beispiele hierfür sind interne Tandemduplikationen der Rezeptortyrosinkinase *Fms-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3)* und Mutationen des Protoonkogens *RAS*. Durch Klasse II Mutationen werden die funktionelle Ausreifung und die Apoptose der Zellen verhindert. Beispiele dafür sind Mutationen des *CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha (CEBPA)*-Gens und

balancierte Chromosomenanomalien, die den „Core Binding Factor“ (CBF)-Transkriptionsfaktor-Komplex betreffen (*CBFB-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*) [1,6-8].

Bei einem Teil der AML-Fälle (10-15%) handelt es sich um sogenannte sekundäre akute myeloische Leukämien (sAML). Die sAML entsteht als Folge einer zuvor bekannten hämatologischen Grunderkrankung, wie z. B. einem myelodysplastischen Syndrom, oder tritt mit Latenz nach einer durchgeführten Radio- oder Chemotherapie auf. Des Weiteren ist die Exposition gegenüber organischen Lösungsmitteln, wie z. B. Benzol, mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert [1].

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Die klinischen Symptome der AML sind wenig spezifisch. Sie sind auf die hämatopoetische Insuffizienz zurückzuführen, die einen Abfall aller drei Zellreihen der Blutbildung (Panzytopenie bestehend aus Anämie, Leukozytopenie und Thrombozytopenie) verursachen kann. Die häufigsten Symptome sind Schwäche und erhöhte Ermüdbarkeit als Zeichen der Anämie, persistierende Infektionen als Zeichen der Leukozytopenie sowie eine erhöhte Blutungsneigung als Ausdruck der Thrombozytopenie [1,9].

Besteht nach Anamnese und körperlicher Untersuchung der klinische Verdacht auf eine AML, werden periphere Blutproben entnommen und es wird eine Knochenmarkspunktion durchgeführt. Mit den gewonnenen Blut- und Knochenmarkproben wird eine hämatologische Diagnostik durchgeführt, die Untersuchungen der Morphologie, Zytochemie, Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulargenetik umfasst [10]. In den folgenden Abschnitten werden diese detailliert beschrieben.

Morphologie und Zytochemie

Ausstriche der Blut- und Knochenmarkproben werden angefertigt, um die enthaltenen Zellen morphologisch hinsichtlich Ausreifung und Differenzierung zu begutachten. Für die Diagnose einer AML muss der Anteil derblastären Zellen im Knochenmark mindestens 20% betragen [11]. Die Zugehörigkeit der Blasten zur myeloischen Zellreihe kann mithilfe zytochemischer Färbungen festgestellt werden. Durch Färbung mit Myeloperoxidase (MPO) können granulozytäre Zellen und durch Färbung mit unspezifischer Esterase monozytäre Zellen detektiert werden [10]. Daneben ist auch der Nachweis von kristallinen Strukturen in den Blasten, den sogenannten Auer-Stäbchen, ein Beweis dafür, dass die Blasten der myeloischen Zellreihe angehören [12]. Die morphologischen und zytochemischen Befunde werden zur Klassifikation der AML verwendet (vgl. Kapitel 1.1.4).

Immunphänotypisierung

Mithilfe der Immunphänotypisierung kann die Expression spezifischer myeloischer Antigene auf den leukämischen Blasten charakterisiert und quantifiziert werden. Dies ermöglicht eindeutige Zuordnungen zu myeloischen Zellreihen, die über die Möglichkeiten der Zytchemie hinausgehen [10,11]. Das Expressionsmuster wird nach Immunfluoreszenzmarkierung der Blasten mit einem Durchflusszytometer bestimmt. Dabei wird unter anderem die Expressionshöhe myeloischer Antigene (CD13, CD15, CD33, MPO), monozytärer Antigene (CD11, CD14), megakaryozytärer Antigene (CD41, CD61) und erythrozytärer Antigene (CD235a) bestimmt [11,13]. Die Ergebnisse der Immunphänotypisierung ergänzen die zytchemischen Befunde bei der Klassifikation der AML (vgl. Kapitel 1.1.4).

Zytogenetik

Die zytogenetische Untersuchung der leukämischen Blasten erfolgt mittels Chromosomenanalyse und/oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Der Anteil der AML-Patienten mit aberrantem Karyotyp wird bei 50% bis 60% angegeben [1,11,14,15]. Die Komplexität und Variabilität der zytogenetischen Befunde ist hoch, wobei etwa 200 assoziierte strukturelle und numerische Chromosomenanomalien bekannt sind [16]. Die Analyse ist ein wichtiger diagnostischer Schritt, da der Befund prognostische Bedeutung hat (vgl. Kapitel 1.1.5) und in der Klassifikation der AML berücksichtigt wird (vgl. Kapitel 1.1.4) [10]. Einen besonderen Stellenwert in der Diagnostik haben chromosomale Veränderungen des CBF-Transkriptionsfaktor-Komplexes, der wichtige Gene der Hämatopoiese reguliert. Dazu gehören die balancierte Translokation t(8;21), die Inversion inv(16) bzw. die Translokation t(16;16) und die Translokation t(15;17). Unabhängig von der Blastenzahl im Blut und Knochenmark ist ein Vorliegen einer dieser chromosomal Veränderungen beweisend für die Diagnose AML. Des Weiteren ist die Translokation t(15;17) ein direkter Beweis für das Vorliegen einer akuten Promyelozytenleukämie (APL), einer morphologisch und molekulargenetisch distinkten Subform der AML [1].

Molekulargenetik

Neben der komplexen Zytogenetik weist die AML auch auf molekularer Ebene eine große Heterogenität auf. Durch technische Fortschritte und Weiterentwicklung der Methoden zum Nachweis molekulargenetischer Veränderungen konnten in den letzten Jahren eine Vielzahl von Mutationen identifiziert werden [17]. Das Cancer Genome Research Network beobachtete bei der Sequenzierung des Genoms von 200 Patienten mit erstdiagnostizierter AML am häufigsten Veränderungen der folgenden Gene [18]:

- *Nucleophosmin 1 (NPM1)*
- *FLT3*
- *DNA Methyltransferase 3A (DNMT3A)*
- *Isocitrat Dehydrogenase 1 und 2 (IDH1, IDH2)*
- *K Rat Sarcoma (K-RAS) und N-RAS*
- *Runt-Related Transcription Factor 1 (RUNX1)*
- *Tet Methylcytosin Dioxygenase 2 (TET2)*
- *Tumorprotein p53 (TP53)*
- *CEBPA*
- *Wilms-Tumor-Gen (WT1)*

Für einen Teil der Mutationen liegen Hinweise für eine Assoziation zur Prognose und/oder zu zytogenetischen Subgruppen vor [19-21]. Als besonders bedeutsam haben sich die Gene *NPM1*, *FLT3* und *CEBPA* (vgl. Kapitel 1.1.5) herausgestellt [14,20,22]. Ein Screening mittels molekulargenetischer Methoden (Polymerasekettenreaktion, Nukleotidsequenzierung) auf Mutationen in diesen Genen wird daher empfohlen, insbesondere bei Patienten mit normalem Karyotyp [11]. Auch in der Klassifikation (vgl. Kapitel 1.1.4) wird der Mutationsstatus dieser Gene berücksichtigt. Im Hinblick auf den zunehmenden Einsatz moderner molekulargenetischer Methoden in der klinischen Praxis sowie wachsender Evidenz für die Vorteile einer Risikostratifizierung anhand molekulargenetischer Marker [23,24] wird erwartet, dass der Mutationsstatus weiterer Gene, wie z. B. *RUNX1* und *TP53*, in zukünftige Klassifikationssysteme mit aufgenommen wird [17].

1.1.4 Klassifikation

Zur Klassifikation der AML existieren zwei Systeme: die Klassifikation der French-American-British (FAB) Cooperative Group, die sogenannte FAB-Klassifikation, sowie die Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO), die sogenannte WHO-Klassifikation. Bei der früher entwickelten FAB-Klassifikation erfolgt die Unterscheidung der AML-Subtypen auf Basis morphologischer und zytochemischer Kriterien in Ergänzung mit dem immunphänotypischen Befund der leukämischen Zellen. Es werden die folgenden AML-Subtypen definiert [25-27]:

- FAB M0: AML mit minimaler Differenzierung
- FAB M1: AML ohne Ausreifung
- FAB M2: AML mit Ausreifung
- FAB M3: APL
 - Subgruppe FAB M3v: APL mit minimaler Granulation

- FAB M4: Akute myelomonozytäre Leukämie
 - Subgruppe FAB M4Eo: AML M4 mit Eosinophilie
- FAB M5a: Akute Monoblasten-Leukämie
- FAB M5b: Akute monozytäre Leukämie
- FAB M6: Akute erythrozytäre Leukämie
- FAB M7: Akute megakaryozytäre Leukämie

In der klinischen Praxis hat das FAB-System seine Bedeutung weitgehend verloren. Inzwischen wird überwiegend das Klassifikationssystem der WHO angewandt, das neben morphologischen Kriterien auch molekulargenetische und zytogenetische Befunde sowie klinische Kriterien berücksichtigt. Ziel bei der Entwicklung war es, eine Einteilung zu konzipieren, die AML-Subtypen anhand biologisch relevanter Charakteristika definiert. Es werden die folgenden vier Subgruppen unterschieden [28,29]:

1. AML mit rekurrenten genetischen Aberrationen
 - AML mit Translokation t(8;21)(q22;q22)
 - AML mit Inversion inv(16)(p13.1q22) oder Translokation t(16;16) (p13.1q22)
 - APL mit Translokation t(15;17)(q22;q12)
 - AML mit Translokation t(9;11)(p22;q23)
 - AML mit Translokation t(6;9)(p23;q34)
 - AML mit Inversion inv(3)(q21;q26.2) oder Translokation t(3;3)(q21;q26.2)
 - AML mit Translokation t(1;22)(p13;q13)
 - Vorläufige Entität: AML mit Mutation im *NPM1*-Gen
 - Vorläufige Entität: AML mit Mutation im *CEBPA*-Gen
2. AML mit Myelodysplasie-assozierten Eigenschaften
 - AML-Fälle mit vorbestehender myelodysplastischer/myeloproliferativer Erkrankung und/oder mit spezifischen, myelodysplastisch assoziierten zytogenetischen Veränderungen und/oder mit morphologischen Kriterien einer Dysplasie
3. Therapieassoziierte myeloische Dysplasien
 - AML-Fälle mit einer Chemotherapie oder Strahlentherapie in der Vorgeschichte
4. AML ohne weitere Spezifizierung
 - AML-Fälle, auf die keine der obigen Kriterien zutrifft. Diese werden weiter subklassifiziert anhand von morphologischen Kriterien, die

weitestgehend denen der FAB-Klassifikation entsprechen. Die folgenden Subgruppen werden unterschieden:

- AML mit minimaler Differenzierung
- AML ohne Ausreifung
- AML mit Ausreifung
- Akute myelomonozytäre Leukämie
- Akute Monoblasten-/Monozyten-Leukämie
- Akute erythrozytäre Leukämie
- Akute megakaryozytäre Leukämie
- Akute basophile Leukämie
- Akute Panmyelose mit Myelofibrose

1.1.5 Prognosekriterien

Die Prognose von AML-Patienten wird von patientenbezogenen und AML-bezogenen Risikofaktoren beeinflusst [11]. Der wichtigste patientenbezogene Risikofaktor ist das Alter bei Erstdiagnose. Die Prognose von älteren Patienten ist schlechter als die von jüngeren Patienten, unabhängig vom Vorliegen anderer Risikofaktoren [5,30,31]. Der Allgemeinzustand des Patienten sowie Komorbiditäten haben ebenfalls einen Einfluss auf die Prognose [11].

Zu den AML-bezogenen Prognosefaktoren zählt das Vorliegen einer sAML, das als prognostisch ungünstig gewertet wird [1]. Daneben sind zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen der leukämischen Zellen von hoher prognostischer Relevanz und bilden die Grundlage für risikoadaptierte Therapiestrategien. Die größte prognostische Aussagekraft wird dem Karyotyp zugeschrieben [14,15]. Anhand des zytogenetischen Befunds werden die Patienten in eine günstige, intermediäre und ungünstige Risikogruppe eingeteilt [11,14]. Das Medical Research Council (MRC) veröffentlichte 2010 eine revidierte zytogenetische Klassifikation der AML [15]. Die darin definierten Risikogruppen sind in Tabelle 1-1 zusammengefasst. Zu den am intensivsten untersuchten chromosomal Veränderungen zählen die balancierten Translokationen des CBF-Transkriptionsfaktor-Komplexes (vgl. Kapitel 1.1.3), die prognostisch günstig sind, sowie eine Reihe von unbalancierten Anomalien, die prognostisch ungünstig sind, wie z. B. Deletionen von Teilen der Chromosomen 3 und 5 sowie Monosomien der Chromosomen 5 und 7 [14]. Bei 9% bis 12% aller AML-Patienten liegt ein komplexer Karyotyp vor, der mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist [15,32]. In der revidierten MRC-Klassifikation ist ein komplexer Karyotyp durch das Vorliegen von vier oder mehr unabhängigen zytogenetischen Anomalien definiert. Bei 40% bis 50% aller AML-Patienten können

keine chromosomalen Veränderungen nachgewiesen werden. Diese Patienten mit normalem Karyotyp werden der intermediären Risikogruppe zugeordnet [15,33].

Tabelle 1-1: Revidierte MRC-Klassifikation

Tabelle aus [15].

Risikogruppe	Zytogenetischer Befund
Günstig	<p>t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/ t(16;16) (p13q22) t(15;17)(q22;q12)</p> <p><i>unabhängig vom Vorliegen zusätzlicher zytogenetischer Veränderungen</i></p>
Intermediär	Befunde, die nicht in die günstige oder in die ungünstige Risikogruppe fallen
Ungünstig	<p>abn(3q) [außer t(3;5)(q21~25;q31~35)] inv(3)(q21;q26)/ t(3;3)(q21;q26) add(5q), del(5q), -5 add(7q), del(7q), -7 t(6;11)(q27;q23) t(10;11)(p11~13;q23) t(11;q23) [außer t(9;11)(p21~22;q23) und t(11;19)(q23;p13)] t(9;22)(q34;q11) abn(17p), -17 Komplexer Karyotyp (vier oder mehr unabhängige Anomalien)</p>

Der molekulargenetische Befund wird neben der zytogenetischen Analyse zur Einschätzung der Prognose verwendet. Das Screening auf Genmutationen ist insbesondere für die weitere Risikostratifizierung der zytogenetischen Subgruppe mit normalem Karyotyp wichtig [19]. Als prognostisch bedeutend gelten Mutationen der Gene *NPM1*, *FLT3* und *CEBPA* [11], welche im Folgenden näher charakterisiert werden.

NPM1

NPM1-Mutationen sind die häufigsten molekulargenetischen Veränderungen bei AML-Patienten und liegen bei 25% bis 35% aller Patienten vor [19,21]. Die Mutation wird überwiegend bei Patienten mit normalem Karyotyp beobachtet und erreicht in dieser Subgruppe eine Häufigkeit von 45% bis 64% [19,20,34,35]. Das durch *NPM1* kodierte *NPM1*-Protein ist ein Shuttle-Protein mit wechselnder Lokalisation im Zellkern und Zytoplasma. Durch die Mutation kommt es zu einer dauerhaften Dislokation des Proteins in das Zytoplasma [36]. Mutationen im *NPM1*-Gen sind als Faktoren in der Pathogenese der AML anerkannt, jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen nach wie vor nicht hinreichend geklärt [7,36]. Das Vorliegen einer *NPM1*-Mutation wird

als prognostisch günstig bewertet. Insbesondere in der Subgruppe von Patienten mit *NPM1*-Mutation, normalem Karyotyp und Wildtyp des *FLT3*-Gens wird häufiger das Erreichen einer kompletten Remission (complete remission, CR) sowie ein längeres Gesamt- (overall survival, OS) und rezidivfreies Überleben (relapse-free survival, RFS) beobachtet [11,20,34].

FLT3

Die Rezeptortyrosinkinase *FLT3* wird von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und ist an der Regulation von deren Überleben und Proliferation beteiligt. Bei AML-Patienten wurden Mutationen des *FLT3*-Gens identifiziert, die zu einer konstitutiven Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase führen und damit an der Pathogenese der Leukämie beteiligt sind (vgl. Kapitel 1.1.2) [37]. Die häufigste Mutation ist dabei eine interne Tandemduplikation (ITD) des *FLT3*-Gens, die bei 20% bis 24% aller AML-Patienten bzw. bei 28% bis 38% der AML-Patienten mit normalem Karyotyp vorkommt [20-22,38]. Das Vorliegen einer *FLT3*-ITD ist prognostisch ungünstig und mit einem höheren Rezidivrisiko sowie einer schlechteren Gesamtüberlebensrate verbunden [20].

CEBPA

Mutationen des *CEBPA*-Gens sind bei 9% bis 10% [14,39,40] aller AML-Patienten vorhanden und kommen am häufigsten im Zusammenhang mit einem normalen Karyotyp vor [19,20]. Bei *CEBPA* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der an der Regulation der Differenzierung von Granulozyten beteiligt ist [39,41]. Die Mutation spielt eine Rolle in der molekulargenetischen Pathogenese der AML (vgl. Kapitel 1.1.2). Eine positive prognostische Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen konnte bei Patienten mit normalem Karyotyp nachgewiesen werden [20,22]. Dabei zeigten Untersuchungen, dass *CEBPA* nur im Fall einer biallelischen Mutation einen unabhängigen positiven Prognosefaktor darstellt [40,42-44].

Ein Expertenkomitee des European LeukemiaNet (ELN) veröffentlichte 2010 ein Klassifikationssystem, das sowohl die prognostisch bedeutsamen zytogenetischen als auch die molekulargenetischen Befunde berücksichtigt [11]. Es wird aktuell als bestes Instrument zur Einschätzung der Prognose gesehen, insbesondere bei jüngeren AML-Patienten [33]. Die Einteilung in Risikogruppen ist Tabelle 1-2 zu entnehmen.

Tabelle 1-2: ELN-Klassifikationssystem

Tabelle aus [11]. Definition von Risikogruppen anhand zytogenetischer und molekulargenetischer Befunde.

Risikogruppe	Zytogenetischer bzw. molekulargenetischer Befund
Günstig	t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/ t(16;16) (p13q22) <i>NPM1</i> Mutation ohne <i>FLT3</i> -ITD und normaler Karyotyp <i>CEBPA</i> Mutation und normaler Karyotyp
Intermediär I	<i>NPM1</i> Mutation und <i>FLT3</i> -ITD und normaler Karyotyp <i>NPM1</i> Wildtyp und <i>FLT3</i> -ITD und normaler Karyotyp <i>NPM1</i> -Wildtyp ohne <i>FLT3</i> -ITD und normaler Karyotyp
Intermediär II	t(9;11)(p22;q23) Zytogenetische Befunde, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft werden
Ungünstig	inv(3)(q21;q26)/ t(3,3)(q21;q26) t(6;9)(p23;q34) t(v;11)(v;q23) -5 oder del(5q) -7 abn(17p) Komplexer Karyotyp (drei oder mehr Anomalien mit Ausnahme der Veränderungen, die von der WHO als rekurrente genetische Aberrationen definiert wurden)

1.1.6 Therapie

1.1.6.1 Konventionelle Therapie der AML

Die Behandlung der AML umfasst zwei Therapiephasen: Die Induktionstherapie zur Remissionsinduktion und die Postremissionstherapie [11]. Das Ziel der Induktionstherapie ist die Reduktion der leukämischen Zellen und das Erreichen einer CR [1]. Die Phase der CR ist durch das Vorliegen der folgenden Kriterien definiert [11]:

- Nachweis von weniger als 5% Blasten im Knochenmark, kein Nachweis von Blasten mit Auer-Stäbchen
- Extramedullär kein Nachweis von Blasten
- Nachweis von mehr als 1000/ μ L neutrophilen Granulozyten und mehr als 100.000/ μ L Thrombozyten im Blut, keine Abhängigkeit von einer regelmäßigen Transfusion von Erythrozyten-Konzentraten

Die optimale spezifische Zusammensetzung und Dauer der Induktionstherapie wurden intensiv in zahlreichen Therapiestudien untersucht. Das seit über 40 Jahren etablierte Standard-Chemotherapieregime („3 + 7“-Schema), bestehend aus der dreitägigen Gabe eines Anthrazyklins (Daunorubicin, Idarubicin) in Kombination mit der

siebentägigen Gabe von Cytarabin, konnte bisher nicht von einem neueren, durchweg erfolgreicherem Therapiekonzept abgelöst werden [11,45]. Zu den intensiv untersuchten alternativen Therapiekonzepten zählt z. B. die von der deutschen AML Cooperative Group (AML CG) entwickelte Doppelinduktion, bei der jedem Patienten zwei Zyklen Chemotherapie verabreicht werden [1]. In einer Pilotstudie [46] konnten mit dem dosisdichten „S-HAM“-Regime (sequentielles hochdosiertes Cytarabin und Mitoxantron), bei dem die Dosis von Cytarabin erhöht und der Abstand zwischen den beiden Chemotherapie-Zyklen verkürzt wurde, eine hohe Rate (83%) an Remissionen erzielt werden. Eine randomisierte Studie zum Vergleich von S-HAM und der konventionellen Doppelinduktion befindet sich aktuell in der Phase der Nachbeobachtung [47,48].

Nach dem Erreichen einer CR kann eine gewisse Zahl an leukämischen Zellen verbleiben, die sogenannte minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD), wodurch ein Rezidiv entstehen kann [1,49]. Zur Elimination dieser Zellen ist eine Postremissionstherapie unerlässlich, die abhängig vom Risikoprofil des Patienten ausgewählt wird. Die Optionen umfassen eine Konsolidierung in Form von mehreren Zyklen einer Hochdosis-Chemotherapie, eine mehrjährige Erhaltungstherapie mit repetitiven Chemotherapie-Zyklen sowie eine Konditionierung mittels Chemotherapie mit anschließender allogener Stammzelltransplantation (SZT) [11,45]. Die niedrigsten Rezidivraten werden nach allogener SZT beobachtet, jedoch birgt diese Form der Postremissionstherapie eine sehr hohe therapieassoziierte Mortalität (treatment related mortality, TRM). In der Regel wird die autogene SZT bei Patienten mit ungünstigem Risikoprofil sowie bei Patienten mit intermediärem Risikoprofil und hoher Rezidivwahrscheinlichkeit durchgeführt [11]. Daneben müssen bei der Indikationsstellung das Alter sowie der Allgemeinzustand des Patienten und eventuelle Komorbiditäten berücksichtigt werden. Die Durchführbarkeit ist letztendlich abhängig von der Verfügbarkeit eines Spenders [1]. Es ist nach wie vor Gegenstand der Diskussion, welche Patienten am meisten von der SZT profitieren und in welchen Fällen die Transplantation als Postremissionstherapie indiziert ist oder erst im Fall eines Rezidivs durchgeführt werden sollte [45,50]. Generell wird empfohlen, AML-Patienten an spezialisierten Zentren und im Rahmen von Therapiestudien zu behandeln [1,50].

Die Therapieergebnisse bei AML-Patienten haben sich in den letzten 40 Jahren kontinuierlich verbessert, insbesondere auch durch eine Optimierung der supportive Therapie [51]. Heutzutage können bei jüngeren Patienten unter 60 Jahren CR-Raten von 70% bis 80% erreicht werden. Nichtsdestotrotz erleidet die Mehrzahl der Patienten (50% bis 55%) ein Rezidiv und das 5-Jahres-Überleben beträgt nur 40% bis 45%.

Insbesondere die Prognose älterer Patienten ist nach wie vor ungünstig mit einem Rezidiv-Risiko von 85% und einem medianen OS von weniger als einem Jahr [45,52].

Eine Sonderrolle bei den Therapiestrategien kommt der APL zu. Für diesen Subtyp der AML stehen mit All-trans-Retinsäure (ATRA) und Arsentrioxid (ATO) molekulargenetisch zielgerichtete Therapieoptionen zur Verfügung, mit denen sehr gute Therapieergebnisse (Heilungsraten über 90%) erzielt werden [53,54].

1.1.6.2 Immuntherapie der AML

Um die Prognose von AML-Patienten insgesamt zu verbessern und insbesondere das Rezidiv-Risiko zu senken, werden neue Therapieoptionen entwickelt und getestet. Ein Ansatz ist der Einsatz von immuntherapeutischen Strategien im Therapiekonzept der AML. Die Erfolge der allogenen SZT mit deutlich reduzierten Rezidivraten stützen die Hypothese, dass Funktionen des Immunsystems maßgeblich an der Überwachung und Elimination von leukämischen Zellen beteiligt sind [55]. Die Wirksamkeit der SZT wird zum einen durch die vorher durchgeführte Hochdosis-Chemotherapie (Konditionierung) und zum anderen durch den sogenannten „Graft-versus-Leukemia“ (GvL) -Effekt erklärt [56,57]. Bei der GvL-Reaktion eliminieren Abwehrzellen des Spenders, vornehmlich T-Zellen und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), leukämische Zellen des Empfängers [56,57]. Problematisch ist die Assoziation des GvL-Effekts mit der sogenannten „Graft-versus-Host“-Erkrankung (graft versus host disease, GvHD), die maßgeblich die hohe TRM der SZT bedingt [56]. Im Fall der GvHD attackieren die Abwehrzellen des Spenders gesundes Gewebe des Empfängers und verursachen potentiell lebensbedrohlichen Schaden [56]. Die allogene SZT ist aufgrund der hohen TRM und der Voraussetzung der Spenderverfügbarkeit nicht für jeden AML-Patienten eine geeignete Therapie-Option. Daher ist die Entwicklung von neuen immuntherapeutischen Strategien wichtig, um das Potential des Immunsystems bei der Tumorabwehr weiter auszuschöpfen [55].

Die Basis für die Entwicklung neuer Ansätze in der Immuntherapie sind Erkenntnisse aus Untersuchungen der Wechselbeziehungen zwischen Immunzellen und Tumorzellen. Es ist bekannt, dass das Immunsystem generell fähig ist, Tumorzellen zu erkennen und den Tumorprogress über Eliminationsmechanismen einzudämmen [58,59]. Bei dieser sogenannten Immunüberwachung (immune surveillance) von Tumoren sind Funktionen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems von Bedeutung [60]. Andererseits sind diverse sogenannte Escape-Mechanismen bekannt, die es Tumorzellen ermöglichen, der Kontrolle des Immunsystems zu entgehen und die somit den Tumorprogress fördern [58,59]. Dabei können unterschiedliche Phasen der Immunantwort beeinträchtigt werden, z. B. die Erkennung der Tumorzellen durch das

Immunsystem sowie die Aktivierung und Funktionalität von Effektor-Zellen [59,61]. Aus den Untersuchungen der Beziehungen zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem können neue therapeutische Strategien abgeleitet werden, die den Einfluss des Immunsystems auf die Tumorentwicklung ausnutzen. Es werden sowohl Ansätze entwickelt, die auf eine Verbesserung der Immunüberwachung abzielen, als auch Strategien, die Escape-Mechanismen verhindern, um der daraus resultierenden Immunsuppressivität entgegenzuwirken [61]. Ein Faktor, der zur Effektivität der Immunantwort von T-Zellen beiträgt und im Rahmen von Escape-Mechanismen beeinflusst sein kann, ist die Signalgebung durch sogenannte kostimulierende und koinhibierende Moleküle [62]. Die spezifischen Mechanismen und deren Einfluss auf die Anti-Tumor-Immunität werden im nächsten Kapitel (vgl. Kapitel 1.2.1) ausführlich dargestellt.

Im Kontext der AML-Therapie werden derzeit verschiedene immuntherapeutische Ansätze klinisch erprobt [55,63]. Dazu zählen Antikörper-basierte Konzepte wie der Einsatz von Chemo- oder Radiotherapie-konjugierten Antikörpern, die gegen dasblastäre Oberflächenantigen CD33 gerichtet sind (z. B. Gemtuzumab Ozogamicin und SGN-CD33A) und bispezifische Antikörper (bispecific T-cell-engagers, BiTEs, z. B. AMG 330), die Oberflächenantigene auf zytotoxischen T-Zellen und auf Tumorzellen binden und dadurch eine T-Zell-vermittelte Elimination von Tumorzellen bewirken. Zudem werden der adoptive Transfer von tumorspezifischen T-Zellen und therapeutische Vakzinierungen mit tumorspezifischen Peptiden oder mit modifizierten dendritischen Zellen untersucht.

1.2 Kostimulierende und koinhibierende Moleküle

1.2.1 Überblick

T-Zellen spielen beim Aufbau einer effektiven Immunantwort eine tragende Rolle. Ihre Fähigkeiten umfassen sowohl das spezifische Erkennen von Antigenen, die direkte Elimination von infizierten Zellen über CD8-positive Effektor-Zellen, die sogenannten zytotoxischen T-Lymphozyten, als auch die Koordination, Regulation und Zusammenführung von Akteuren des angeborenen und des adaptiven Immunsystems über CD4-positive T-Helferzellen [64].

Naive T-Zellen, d. h. Zellen, die bisher noch keinen Antigenkontakt hatten, erkennen über ihren membranständigen T-Zell-Rezeptor (TZR) komplementäre Antigenfragmente, die zusammen mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, major histocompatibility complex) auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) dargeboten werden [65]. Dieser alleinige

Kontakt mit dem Antigen ist nicht ausreichend, um eine volle T-Zell-Aktivierung zu erzielen. Ein zweiter Stimulus ist dafür notwendig, der durch die Interaktion von kostimulierenden Rezeptoren auf T-Zellen und deren Liganden auf APZ vermittelt wird. Es handelt sich dabei um Oberflächenmoleküle, die die Signalgebung des TZR positiv, d.h. kostimulierend beeinflussen können [66]. Findet diese Stimulation nicht statt, geht die T-Zelle in einen inaktiven, als anerg bezeichneten Zustand über. Hierbei stellt die T-Zelle ihre Proliferation, Differenzierung und Effektorfunktionen ein. Sie zeigt auf Stimulation mit ihrem spezifischen Antigen keine Reaktion und ist damit diesem gegenüber tolerant [67,68]. Neben kostimulierenden existieren auch koinhibierende Moleküle bzw. Rezeptoren, die in der Lage sind, die Stärke einer Immunantwort einzudämmen. Damit bieten sie Schutz vor Gewebeschäden infolge von Immunreaktionen und Autoimmunität [64]. Kostimulierende und koinhibierende Moleküle regulieren verschiedene Stadien der T-Zell-Aktivierung und nehmen Einfluss auf das Wachstum und Überleben sowie auf die funktionelle Differenzierung und Ausreifung der T-Zelle [69].

Auf Grundlage ihres Rezeptortyps können kostimulierende und koinhibierende Moleküle in verschiedene Superfamilien und Familien eingeteilt werden. Die Mehrheit gehört der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie oder der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie an [66]. Zu der CD28-Rezeptor-Familie der Ig-Superfamilie zählen die intensiv untersuchten Rezeptoren CD28 und Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA4) [69]. CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen interagieren jeweils mit den Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) der B7-Familie der Ig-Superfamilie, die von APZ exprimiert werden [66]. Die Interaktion von B7-1 und B7-2 mit CD28 wirkt kostimulierend auf die T-Zell-Antwort. Dagegen werden bei Bindung von B7-1 bzw. B7-2 und CTLA-4 koinhibierende Signale vermittelt, die abschwächend auf die Immunantwort wirken [69].

Es sind zahlreiche weitere kostimulierende und koinhibierende Moleküle bekannt, die an der Regulation der T-Zell-Antwort beteiligt sind. Die Untersuchung der Signalwege führte zur Weiterentwicklung des Modells von der klassischen Einteilung in Rezeptor-Liganden-Beziehungen zu komplexeren Interaktionen. So kann zum Beispiel ein Rezeptor mit mehreren Liganden und über unterschiedliche Domänen interagieren. Bidirektionale Interaktionen, bei denen intrazelluläre Signale sowohl an die T-Zelle als auch an die APZ weitergegeben werden, sind möglich [66].

Neben T-Zellen und APZ wurden kostimulierende und koinhibierende Moleküle auf weiteren somatischen Zellen entdeckt [66]. Insbesondere wurde ihre Expression auf malignen Zellen und im Mikromilieu von Malignomen untersucht. Dabei wurde der

Hypothese nachgegangen, dass Tumore im Rahmen von Escape-Mechanismen ein Ungleichgewicht zugunsten inhibitorischer Stimuli aufbauen, um der Kontrolle des Immunsystems zu entgehen und gegen den Tumor gerichtete Immunantworten abzuschwächen [64]. Eine therapeutische Interventionsmöglichkeit ist die Entwicklung von Antikörpern, die entweder als Agonisten kostimulierende Signalwege verstärken oder als Antagonisten koinhibierende Signalwege blockieren [64]. Ziel dabei ist eine Interaktion mit dem Immunsystem, um die endogene Immunabwehr gegen Tumorzellen zu optimieren [64,70]. Diese Art von therapeutischen Antikörpern wird daher auch als immunstimulatorisch oder immunmodulierend bezeichnet [70]. Im Gegensatz dazu stehen eine Reihe bereits zugelassener Antikörper in der Tumortherapie, die kritische Signalwege der Tumorentstehung blockieren (z. B. Blockade des Epidermal Growth Factor-Rezeptors bei der Therapie solider Tumore [71]) oder Tumorzellen binden und deren Elimination über die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität bzw. über Phagozytose bewirken (z. B. der anti-CD20 Antikörper Rituximab zur Therapie maligner Lymphome [72,73]).

Aktuell befindet sich eine Reihe von immunstimulatorischen Antikörpern in der klinischen Testung zur Behandlung unterschiedlicher Tumorentitäten [74]. Der Einsatz von Ipilimumab, ein anti-CTLA4-Antikörper, erwies sich als besonders erfolgreich bei der Therapie des fortgeschrittenen Melanoms [64]. In zwei klinischen Phase-III-Studien konnte gezeigt werden, dass sich das OS der Patienten durch die Therapie mit Ipilimumab signifikant verbesserte [75,76]. Diese Erfolge führten 2011 zur Zulassung von Ipilimumab zur Therapie des fortgeschrittenen Melanoms durch die Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der USA (Food and Drug Administration, FDA) [77] und die europäischen Arzneimittel-Agentur (European Medicines Agency, EMA) [78]. Eine weitere Zielstruktur für therapeutische Interventionen, die sich in ersten klinischen Studien als vielversprechend herausgestellt hat, ist das Programmed Cell Death Protein-1 (PD-1) [64]. PD-1 findet sich auf der Zelloberfläche von aktivierten T-Zellen und bewirkt bei Interaktion mit seinen Liganden Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) und Programmed Death Ligand-2 (PD-L2) eine Abschwächung der T-Zell-Antwort [66]. Der Einsatz der anti-PD-1 Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab zur Tumortherapie wurde in mehreren klinischen Studien erfolgreich getestet. Bei Patienten mit metastasiertem Melanom zeigte die Therapie mit Nivolumab im Vergleich zur Chemotherapie eine höhere Ansprechraten [79], ein längeres progressionsfreies Überleben (progression free survival, PFS) sowie ein längeres OS [80]. Nivolumab wurde 2014 von der FDA [81] und 2015 von der EMA [82] zur Therapie des fortgeschrittenen Melanoms zugelassen. Ebenso vielversprechende Ergebnisse konnten beim Einsatz von Nivolumab zur Therapie des

fortgeschrittenen Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms beobachtet werden. Im Vergleich zur Chemotherapie zeigten sich bei der Therapie mit Nivolumab höhere Ansprechraten und ein verlängertes PFS sowie OS [83,84]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde Nivolumab 2015 in den USA zur Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem Nicht-kleinzeligen Lungenkarzinom [85,86] und in Europa zur Behandlung von Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Lunge [82,87] zugelassen. Die Therapie mit dem anti-PD-1 Antikörper Pembrolizumab bei Patienten Ipilimumab-refraktärem Melanom zeigte positive Ansprechraten [88] und im Vergleich zur Chemotherapie eine Verlängerung des PFS [89]. Im Vergleich zur Therapie mit Ipilimumab war bei der Therapie mit Pembrolizumab das PFS sowie das OS länger [90]. Diese Erkenntnisse führten zur Zulassung von Pembrolizumab zur Therapie des fortgeschrittenen therapierefraktären Melanoms 2014 von der FDA [91] und 2015 von der EMA [92]. Des Weiteren wurde bei Patienten mit fortgeschrittenem Nicht-kleinzeligen Lungenkarzinom eine positive Ansprechraten beim Einsatz von Pembrolizumab beobachtet [93]. Im Oktober 2015 erfolgte durch die FDA die Zulassung der Pembrolizumab-Therapie für Patienten mit Chemotherapie-refraktären und PD-L1 positiven Tumoren [94].

1.2.2 HVEM

Der Herpesvirus Entry Mediator (HVEM; auch bekannt als TNFRSF14) gehört zur TNF-Rezeptor-Superfamilie der kostimulierenden bzw. koinhibierenden Moleküle. HVEM ist ein Zelloberflächenprotein und wird von einem einzelnen Gen kodiert, das auf Chromosom 1 lokalisiert ist [95,96]. Ursprünglich wurde HVEM im Rahmen der Untersuchung des zellulären Eintritts-Mechanismus von Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) entdeckt [97]. Das virale Glykoprotein D von HSV-1 wurde als Ligand von HVEM identifiziert [98]. Mit der Entdeckung weiterer Bindungspartner und der Untersuchung des sich daraus ergebenden komplexen Signalsystems wurde die Bedeutung von HVEM für das Immunsystem deutlich [99,100]. HVEM besitzt regulatorische Funktionen bei der Homöostase von APZ sowie bei der Abwehr gegenüber Pathogenen und spielt eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Kostimulation [100].

Auf nicht-aktivierten B- und T-Zellen wurde eine hohe HVEM-Expression beobachtet. Des Weiteren wird HVEM auf hämatopoetischen Zellen, wie z. B. unreifen dendritischen Zellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen, und nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert [99]. Neben dem viralen Glykoprotein D interagiert HVEM mit vier weiteren Molekülen:

- Lymphotoxin- α (LT- α), Mitglied der TNF-Superfamilie

- LIGHT (Lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV gD for HVEM, a receptor expressed by T-lymphocytes), Mitglied der TNF-Superfamilie [101]
- B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA), Mitglied der Ig-Superfamilie [102]
- CD160, Mitglied der Ig-Superfamilie [103]

Eine Besonderheit liegt darin, dass HVEM nicht nur Interaktionen mit Mitgliedern seiner eigenen Superfamilie eingeht, sondern auch mit der Ig-Superfamilie [99,102]. Das Signalsystem ist komplex, da HVEM in trans- und in cis-Konfiguration Bindungen eingehen kann, als Rezeptor sowie als Ligand fungieren kann und bidirektionale Interaktionen möglich sind [100]. Bei der Interaktion von HVEM mit LT α oder LIGHT werden kostimulierende Signale vermittelt [99,104,105]. Im Gegensatz dazu entstehen koinhibierende Signale, wenn HVEM mit BTLA [102,106] oder CD160 interagiert [103]. Es wird angenommen, dass der über BTLA und CD160 vermittelte koinhibierende Stimulus dominierend im HVEM-Signalsystem ist. Hinweise darauf lieferten Versuche mit Mäusen bei denen das HVEM-Gen ausgeschaltet wurde (HVEM-Knockout-Mäuse) [107] und *in vitro*-Studien mit HVEM-Antikörpern [103].

Die HVEM-Signalwege bei der T-Zell-Kostimulation und deren Dysregulation wurden im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen untersucht [99], wobei sich zwei Forschungsschwerpunkte ergaben. Zum einen wurden sie als potentielle therapeutische Zielstrukturen bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen und bei Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen identifiziert [96]. Zum anderen liegt ein Fokus auf der Rolle von HVEM-Signalwegen im Zusammenhang mit der Immunabwehr von Tumoren und der Möglichkeit diese im Rahmen von Immuntherapien zu manipulieren [108]. Bei verschiedenen Tumorerkrankungen konnte die Expression von HVEM auf den malignen Zellen nachgewiesen werden: Bei Tumoren der B-Zell-Reihe [109,110] (Plasmazell-Leukämie, Burkitt-Lymphom, Chronische lymphatische Leukämie, Akute lymphatische Leukämie, Mantelzell-Lymphom), beim malignen Melanom [111], beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus [112], beim hepatozellulären Karzinom [113] sowie beim kolorektalen Karzinom [114].

Bis dato analysierten drei Studien die Expression von HVEM auf AML-Zelllinien sowie auf Knochenmarkproben von AML-Patienten, um eine potentielle Bedeutung des HVEM-Signalsystems bei der AML zu untersuchen [109,110,115]. Costello et al. [110] konnten die Expression von HVEM nur auf einer von sieben analysierten AML-Zelllinien nachweisen. Im Rahmen einer weiteren Studie beobachteten Pasero et al. [109] eine niedrige HVEM-Expression bei Leukämien myeloischen Ursprungs. Hobo et

al. [115] konnten die Expression von HVEM auf allen sieben untersuchten AML-Zelllinien nachweisen, wobei die weiter differenzierten AML-Subtypen (FAB Typ M5) eine etwas höhere HVEM-Expression zeigten als die unreifen AML-Subtypen (FAB Typ M0-M2). Im Rahmen der gleichen Untersuchung wurde HVEM auch auf leukämischen Zellen aus Knochenmarkproben von acht erstdiagnostizierten AML-Patienten nachgewiesen.

Zusammenfassend sind die Untersuchungen des HVEM-Signalsystems bei der AML bisher spärlich und in ihren Ergebnissen nicht eindeutig. Es fehlt eine systematische Untersuchung der HVEM-Expression auf leukämischen Zellen sowie eine Interpretation im Kontext von charakteristischen Merkmalen und klinischem Verlauf der AML, um eine potentielle Bedeutung des Moleküls bei neuen immuntherapeutischen Therapiestrategien sowie als Prognosefaktor der AML abzuschätzen.

2. Zielsetzung der Arbeit

Die AML ist eine heterogene Erkrankung, bei der die Identifizierung von prognostischen Subgruppen zur Anwendung risikoadaptierter Therapiestrategien von großer Bedeutung ist. Basierend auf der Beobachtung, dass die niedrigsten Rezidiv-Raten nach Durchführung einer allogener SQT erreicht werden, ist die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien ein vielversprechender Ansatz. Im Kontext der Tumor-Immuntherapie wurden koinhibierende und kostimulierende Moleküle bei verschiedenen soliden Tumoren als neue therapeutische Zielstrukturen identifiziert und in mehreren klinischen Studien bereits erfolgreich getestet. Ein Molekül dieser Familie, das im Rahmen der AML bisher kaum systematisch untersucht wurde, ist der Herpes Virus Entry Mediator (HVEM). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von HVEM auf leukämischen Blasen bei Patienten mit erstdiagnostizierter AML zu analysieren und eine potentielle Korrelation mit krankheitsbezogenen Charakteristika sowie klinischem Verlauf zu untersuchen. Dazu wurde das HVEM-Expressionslevel auf Proteinebene durchflusszytometrisch auf Knochenmarkproben von 169 Patienten gemessen. In einer zweiten unabhängigen Kohorte wurde die HVEM-Expression auf mRNA-Ebene im Rahmen einer Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays auf Knochenmarkproben von 512 Patienten bestimmt. Die HVEM-Expression wurde im Zusammenhang mit morphologischen, zytogenetischen und molekulargenetischen Charakteristika der AML betrachtet. Zudem wurde ein potentieller Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben und dem rezidivfreien Überleben der Patienten untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Erkenntnisse über HVEM als potentiellen prognostischen Faktor bei der AML, die unter anderem zur Einschätzung der Rolle des Moleküls bei neuen immuntherapeutischen Strategien verwendet werden können.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkohorten

Für die vorliegende Arbeit wurde die Expression von HVEM in zwei unabhängigen Patientenkohorten untersucht. Bei allen Patienten lag eine AML vor und die Expressionsanalyse fand jeweils zum Zeitpunkt der Erstdiagnose statt. Die Messung der Expression von HVEM erfolgte auf unterschiedlichen Ebenen. In einer Kohorte wurde die Expressionshöhe des HVEM-Proteins auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Diese Patientenkohorte wird im Folgenden als Kohorte_P bezeichnet. In der zweiten Kohorte wurde die HVEM-Expression auf mRNA-Ebene im Rahmen einer Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays bestimmt. Im Folgenden wird die Bezeichnung Kohorte_R für diese Patientenkohorte verwendet.

Alle Patienten beider Kohorten wurden darüber aufgeklärt und bekundeten schriftlich ihr Einverständnis, dass die klinischen Daten und das gewonnene Untersuchungsmaterial für wissenschaftliche Forschungsarbeiten verwendet werden darf. Zum Schutz der Patientendaten erfolgte die Auswertung der Daten für beide Kohorten in anonymisierter Form.

3.1.1 Kohorte_P

Für die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von HVEM wurden Knochenmarkproben von 169 Patienten mit Erstdiagnose AML verwendet, die zwischen April 2010 und November 2011 im Labor für Leukämiediagnostik (LfL, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum der Universität München, Campus Großhadern) untersucht wurden. Im Rahmen der standardmäßig durchgeführten Immunphänotypisierung wurde zusätzlich die Expression eines Panels an kostimulierenden und koinhibierenden Faktoren, unter anderen HVEM, auf denblastären Zellen bestimmt. Die Ergebnisse dieser zusätzlichen Messungen wurden gespeichert und die entsprechenden Dateien wurden regelmäßig im LfL abgerufen. Die Auswertung der Messdateien erfolgte auf Rechnern des Instituts für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrums München. Die Ergebnisse wurden mittels Microsoft Excel Version 2003 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) fortlaufend in einer Datenbank dokumentiert.

Von allen Patienten dieser Kohorte wurden 59 Patienten in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, Klinikum der Universität München, Campus Großhadern und 110 Patienten in auswärtigen Kliniken behandelt. Insgesamt nahmen 99 Patienten der

Kohorte_P an der AMLCG 2008 Studie der AMLCG teil und die Therapie erfolgte gemäß Studienprotokoll. Die Studie ist unter der National Clinical Trial (NCT) Nummer NCT01382147 auf der Webseite ClinicalTrials.gov registriert [48]. Die deutsche Studiengruppe AMLCG untersucht seit vielen Jahren in großen multizentrischen Therapiestudien die Wirksamkeit unterschiedlicher AML-Therapieprotokolle [116]. In der AMLCG 2008 Studie wurden konventionelle Induktionstherapien der AML mit der dosisdichten Induktionstherapie „S-HAM“ (sequentielles hochdosiertes Cytarabin und Mitoxantron) verglichen [47,48]. Die weiteren 70 Patienten der Kohorte_P wurden im Studienregister der AMLCG gelistet und nach den Therapieempfehlungen der Studiengruppe behandelt. Tabelle 3-1 gibt einen Überblick über Behandlungsorte und Studienteilnahme der Patienten.

Tabelle 3-1: Behandlungsorte und Studienteilnahme der Patienten der Kohorte_P

		Studienteilnahme AMLCG 2008	
		Ja	Nein
Behandlungsort	<i>Klinikum Großhadern</i>	23	36
	<i>Auswärtiges Klinikum</i>	76	34

3.1.2 Kohorte_R

Die Messung der Expression von HVEM auf RNA-Ebene erfolgte bei 512 AML-Patienten, deren Knochenmarkproben bei Erstdiagnose im Rahmen einer Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays [117,118] untersucht wurden. Der Zeitpunkt der Erstdiagnose der Patienten lag zwischen Juni 1999 und Februar 2005 [119]. Der gesamte Datensatz wurde in der „Gene Expression Omnibus“-Datenbank mit der GEO-ID GSE37642 hinterlegt. Alle Patienten dieser Kohorte waren Studienteilnehmer der AMLCG 99 Studie und wurden im Rahmen dieser behandelt. Die Studie ist unter der NCT-Nummer NCT00266136 auf der Webseite ClinicalTrials.gov registriert [120]. In der AMLCG 99 Studie wurden risikoadaptierte Therapiestrategien für Patienten mit erstdiagnostizierter AML, sAML und myelodysplastischem Syndrom untersucht [120].

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Datenerhebung und Quellen

3.2.1.1 Demographische und krankheitsbezogene Daten

Bei allen Patienten beider Kohorten wurden das Alter bei Erstdiagnose und das Geschlecht erfasst. Zudem wurden zytomorphologische, zytogenetische und

molekulargenetische Charakteristika der Erkrankung erhoben, die in der Regel routinediagnostisch bei der Erstdiagnose einer AML untersucht werden:

- Zytomorphologie:
 - FAB-Klassifikation der AML (außer bei sAML-Patienten)
- Zytogenetik:
 - Karyotyp
- Molekulargenetik:
 - Mutationsstatus des *NPM1*-Gens
 - Vorliegen einer internen Tandemduplikationen der Rezeptortyrosinkinase *FLT3*
 - Mutationsstatus des *CEBPA*-Gens

Die zyto- und molekulargenetischen Daten wurden verwendet, um die Patienten anhand der Klassifikationssysteme des MRC [15] und des ELN [11] in verschiedene Risikogruppen einzuteilen (vgl. Kapitel 1.1.5). Für die Auswertung der vorliegenden Arbeit wurden die intermediäre Risikogruppe I und II der ELN-Klassifikation in eine intermediäre Risikogruppe zusammengefasst.

Für diese Arbeit wurden Patienten mit APL aus beiden Kohorten ausgeschlossen, da sich die Erkrankung sowohl in Bezug auf biologische Merkmale als auch auf therapeutische Möglichkeiten stark von den anderen Subtypen der AML unterscheidet.

3.2.1.2 Klinische Verlaufsdaten

Für die Durchführung der Überlebenszeitanalyse wurden klinische Verlaufsdaten von den Patienten beider Kohorten benötigt. Folgende Informationen wurden erfasst:

- Durchführung einer intensiven Induktionstherapie
- Erreichen einer CR und, falls zutreffend, entsprechendes Datum
- Auftreten eines Rezidivs und, falls zutreffend, entsprechendes Datum
- Durchführung einer allogenen SZT und, falls zutreffend, entsprechendes Datum
- Patiententod und, falls zutreffend, entsprechendes Datum
- Durchführung der letzten klinischen Verlaufskontrolle mit Datum

3.2.1.3 Datenquellen

Für die Patienten aus Kohorte_P, die am Klinikum Großhadern betreut wurden, konnten die krankheitsbezogenen Daten und die klinischen Verlaufsdaten retrospektiv aus der Datenbank des LfL, aus der Klinikdatenbank KAS, aus elektronischen

Arztbriefen und aus dem Krankenblattarchiv erhoben werden. Vollständige klinische Verlaufsdaten konnten für 58 von 59 Patienten erhoben werden.

Von den Patienten aus Kohorte_P, die an Auswärtskliniken betreut wurden, nahmen 76 an der AMLCG Studie 2008 teil. Die krankheitsbezogenen Daten und die klinischen Verlaufsdaten wurden im Rahmen der Studie erhoben und, soweit vorhanden, für diese Arbeit übernommen. Es lagen vollständige klinische Verlaufsdaten für 71 von 76 Patienten vor.

Weitere 34 Patienten aus Kohorte_P nahmen nicht an der AMLCG 2008 Studie teil und wurden in auswärtigen Kliniken behandelt. Die benötigten klinischen Verlaufsdaten wurden mittels eines Fragebogens (vgl. Anhang A) erhoben, der an die entsprechenden Kliniken versandt wurde. Die zuständigen ärztlichen Betreuer wurden gebeten, in diesem die fehlenden Eckdaten der jeweiligen Patienten einzutragen oder alternativ einen aktuellen Arztbrief zu übersenden, aus dem die Daten übernommen werden konnten. Voraussetzung für die Datenweitergabe war dabei das Einverständnis der Patienten. Vollständige klinische Verlaufsdaten konnten für 28 von 34 Patienten erhoben werden. Die krankheitsbezogenen Daten dieser Patienten konnten teilweise bis vollständig aus der elektronischen Datenbank des LfL erhoben werden, da Knochenmarkproben bei Erstdiagnose in das LfL eingesandt wurden. Bei einigen Proben wurde jedoch nur die Immunphänotypisierung im LfL durchgeführt. Die fehlenden zytomorphologischen, zytogenetischen und molekulargenetischen Analysen konnten dann, falls sie extern untersucht wurden, aus den zugesandten Arztbriefen erhoben werden.

Alle Patienten der Kohorte_R waren Studienteilnehmer der AMLCG 99 Studie. Die krankheitsbezogenen Daten und die klinischen Verlaufsdaten wurden im Rahmen der Studie erhoben und wurden, soweit vorhanden, für diese Arbeit übernommen. Es lagen vollständige klinische Verlaufsdaten für 507 von 512 Patienten vor.

3.2.2 Durchflusszytometrie

3.2.2.1 Grundlegende Prinzipien

Die durchflusszytometrische Analyse von Zellen ermöglicht es, Expressionsmuster bestimmter Antigene auf der Zelloberfläche und im Zytoplasma zu charakterisieren und deren Expressionshöhe zu quantifizieren. Das methodische Prinzip besteht darin, fluoreszenzmarkierte Zellen an einem Laserstrahl vorbeizuführen und die entstehende Lichtstreuung und ausgehende Fluoreszenzsignale zu erfassen. Die Untersuchungen werden mit einem Durchflusszytometer durchgeführt, das mit einem oder mehreren

Lasern unterschiedlicher Wellenlänge ausgestattet ist. Zur Fluoreszenzmarkierung der Zellen werden monoklonale Antikörper verwendet, die gegen Oberflächen- und zytoplasmatische Zellantigene gerichtet sind und zuvor an Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) gekoppelt wurden. Die Helligkeit der Fluoreszenzsignale, in der Regel bezeichnet als Fluoreszenzintensität, korrespondiert mit der Anzahl gebundener Antikörper auf der Zelle. Die Antikörper binden nur dann, wenn sie das Antigen, gegen das sie gerichtet sind, auf den Zellen erkennen. Somit gibt die Fluoreszenzintensität direkt Aufschluss über die Expressionshöhe der Ziel-Antigene [121,122].

Im Durchflusszytometer werden die zu untersuchenden Zellen in einer Hüllflüssigkeit verdünnt und zentriert, damit sie einzeln am Laserstrahl vorbeifließen. Bei der Passage entsteht durch Ablenkung des Laserlichts Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC). Beide Messgrößen werden von Fluoreszenzdetektoren für jede Zelle erfasst. Das FSC gilt als Anhaltspunkt für die Zellgröße und das SSC hängt von der Granularität der Zellstruktur ab. Die Zahl an gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern bestimmt die Höhe des Lichtsignals der jeweiligen Zelle. Durch das Laserlicht findet eine Anregung (Exzitation) der Fluorochrome statt, das heißt es kommt zur Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses wird als fluoreszentes Licht mit einer längeren Wellenlänge wieder abgestrahlt (emittiert). Das Durchflusszytometer ist mit sogenannten Photomultipliern (PMT) ausgestattet, die diese Fluoreszenzsignale detektieren und sie in elektrische Signale umwandeln. In einem Messvorgang kann die Expression von mehreren Antigenen gleichzeitig untersucht werden. Dazu werden die antigenspezifischen Antikörper an verschiedene Fluorochrome gekoppelt, die sich in ihren jeweiligen Emissionsspektren unterscheiden [121]. Vor den PMT befinden sich optische Filter, die jeweils nur bestimmte Wellenlängenbereiche eindringen lassen. Dies ermöglicht eine Unterscheidung der Lichtsignale und die Zuordnung zu den verschiedenen Antikörpern [122].

Die Messparameter aller Einzelzellen werden gesammelt für einen Messdurchlauf im „flow cytometry standard format“-Dateiformat (FCS) gespeichert und können mithilfe eines geeigneten Softwarepaketes analysiert werden. Das Hauptprinzip der Auswertung besteht darin, sogenannte Populationen zu definieren. Dabei handelt es sich um Gruppen von Zellen, deren Eigenschaften, wie z. B. Größe und Granularität, Ähnlichkeiten aufweisen. Die Population kann dann weiter charakterisiert werden, indem der Anteil bestimmt wird, den sie an der Gesamtheit der untersuchten Zellen ausmacht, sowie durch Analyse der Fluoreszenzintensitäten untersuchter Antikörper auf den Zellen der Population [121].

3.2.2.2 Durchführung

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden vom medizinisch-technischen Personal des LfL im Rahmen der Routinediagnostik bei Patienten mit erstdiagnostizierter AML durchgeführt. Nach Entnahme wurden die Knochenmarkproben der Patienten mit Heparin antikoaguliert. Für die weiterführenden Analysen war es notwendig, die mononukleären Zellen (MNZ) aus der Knochenmarkprobe zu isolieren. Dazu wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt: Die Probe wurde mit der Biocoll 1.077 Trennlösung (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) versetzt, zentrifugiert und anschließend wurden die MNZ mit einer Pipette abgenommen. Um eine möglichst reine Zellsuspension zu erhalten und verbleibende Erythrozyten zu entfernen, wurde der Probe nachfolgend ein Erythrozyten-Lyse-Puffer pH 7.2 (Apotheke LMU München Innenstadt, München, Deutschland) zugefügt. Anschließend wurden die Proben zur Fluoreszenzmarkierung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern versetzt. Für die Detektion der Oberflächenexpression von HVEM wurde der anti-human-HVEM Antikörper Klon eBioHVEM-122 (eBioscience, San Diego, CA, USA) verwendet, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) konjugiert war. Um in der Auswertung möglichst isoliert die leukämischen Zellen analysieren zu können, wurden die Zellen auch auf Positivität für das myeloische Antigen CD33 geprüft. Dazu wurde der anti-human-CD33-Antikörper Klon D3HL60.251 (Beckman-Coulter, Krefeld, Germany) benutzt, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin-Cyanin-5 (PC5) konjugiert war. Nachdem die Zellen mit beiden Antikörpern markiert wurden, fand die durchflusszytometrische Messung am Durchflusszytometer des Typs FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San José, CA, USA) statt. Die Messung wurde im FCS-Dateiformat gespeichert. Im Folgenden wird diese als „Messdatei Oberflächenexpression HVEM und CD33“ bezeichnet.

Für beide verwendeten Antikörper erfolgten sogenannte Isotypkontrollen. Dafür wurden Fluoreszenzmarkierungen mit nicht-antigenspezifischen Antikörpern des gleichen Isotyps und der gleichen Fluorochromkonjugation durchgeführt. Die Isotypkontrolle wurde benötigt, um in der Auswertung eine Korrektur für unspezifische Fluoreszenzsignale durchzuführen und um zu definieren, ab welcher minimalen Fluoreszenzintensität eine Zelle als positiv für die Expression eines bestimmten Antigens gilt (vgl. Kapitel 3.2.2.3).

Für die Isotypkontrolle der HVEM-Expression wurden Antikörper des Isotyps IgG1 konjugiert mit PE (Beckman-Coulter, Krefeld, Germany) verwendet. Für die Isotypkontrolle der CD33-Expression wurden Antikörper des Isotyps IgG2a konjugiert mit PC5 (Beckman-Coulter, Krefeld, Germany) eingesetzt. Nach der

Antikörpermarkierung fand die durchflusszytometrische Messung der Zellen statt und die Messdaten wurden im FCS-Dateiformat gespeichert. Im Folgenden wird diese als „Messdatei Isotypkontrolle“ bezeichnet.

3.2.2.3 Auswertung

Die FCS-Dateien wurden vom LfL bereitgestellt. Die Auswertung der Daten für die vorliegende Arbeit erfolgte separat. Dazu wurde das Softwarepaket FlowJo Version 8.8.6 (Treestar Inc., Ashland, OR, USA) auf Rechnern des Instituts für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrums Münchens verwendet. Das Ziel der Auswertung war, die myeloischen Blasten zu identifizieren und die mittlere Fluoreszenzintensität des HVEM-Antikörpers auf diesen Zellen zu bestimmen.

Zunächst wurde die Blastenpopulation in beiden Messdateien bestimmt (Messdatei Isotypkontrolle; Messdatei Oberflächenexpression HVEM und CD33). Wie in der Beispieldaten in Abbildung 3-1 (A) dargestellt, wurden das FSC und das SSC der Zellen zweidimensional in einem Punktwolkendiagramm (Dot Plot) aufgetragen. Myeloische Blasten zeichnen sich durch ein niedriges SSC aus [123]. Um die Zellen mit niedrigem SSC auszuwählen, wurde ein sogenanntes Gate generiert. Dabei handelt es sich um eine bestimmte Region im Diagramm, die eingegrenzt wird (*Blasten* in Abbildung 3-1 (A)). Das Gate fungiert als eine Art Datenfilter, der es ermöglicht, aus allen untersuchten Zellen eine definierte Region für die weitere Analyse auszuwählen [121]. In der Beispieldaten in Abbildung 3-1 (A) wurden durch Anwendung des Gates dieblastären Zellen eingegrenzt, die 74,8% aller gemessenen Zellen ausmachten.

Für die weiteren Analysen wurden aus der zuvor eingegrenzten Blastenpopulation die Zellen mit myeloischer Linienzugehörigkeit über Positivität für das myeloische Antigen CD33 ausgewählt. Dabei musste zunächst festgelegt werden, ab welcher Fluoreszenzintensität eine Zelle als positiv für die Expression von CD33 gewertet wird. Diese Grenz-Fluoreszenzintensität wurde mithilfe der Isotypkontrolle des CD33-Antikörpers festgelegt. Für die Messdatei Isotypkontrolle wurde ein Histogramm erstellt, bei dem auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität des IgG2a-Antikörpers (Isotypkontrolle CD33) aufgetragen wurde und auf der y-Achse die Zellzahl (Abbildung 3-1 (B)). In diesem Histogramm werden nur die Zellen dargestellt, die durch das zuvor erstellte Blastengate ausgewählt wurden. Ein weiteres Gate wurde generiert, um die minimale Fluoreszenzintensität festzulegen, die eine Zelle aufweisen muss, um als positiv für die Antikörpermarkierung definiert zu werden (*IgG2a+* in Abbildung 3-1 (B)). Das Gate wurde so gesetzt, dass die oberen 1 % der Zellen mit den höchsten Fluoreszenzintensitäten der Isotypkontrolle als positiv und die übrigen 99% der Zellen

als negativ definiert sind. Die gewählte 1%-Grenze wird in den durchflusszytometrischen Auswertungen des LfL standardmäßig verwendet und wurde daher für diese Auswertung übernommen.

Für die Bestimmung der CD33-positiven Zellen wurde die in der Isotypkontrolle ermittelte Grenz-Fluoreszenzintensität mithilfe von FlowJo auf die Messung der CD33-Oberflächenexpression übertragen. Dazu wurde für die Messdatei Oberflächenexpression HVEM und CD33 ein weiteres Histogramm (Abbildung 3-1 (C)) erstellt, bei dem die Fluoreszenz des CD33-Antikörpers auf der x-Achse aufgetragen wurde. Es werden nur die Zellen dargestellt, die zuvor durch das Blastengate ausgewählt wurden. Das übertragene Gate *CD33+* befindet sich auf Höhe der gleichen Fluoreszenzintensität wie im Histogramm der Isotypkontrolle (Abbildung 3-1 (B)). Mit Setzen des Gates *CD33+* wurde die Zielpopulation, die CD33-positiven Blasten, definiert. In der Beispielauswertung in Abbildung 3-1 (C) exprimierten 94,7% aller durch das Blastengate ausgewählte Zellen das myeloische Antigen CD33.

Um die Höhe der HVEM-Expression zu quantifizieren, wurde der spezifische Fluoreszenzindex (SFI) für den HVEM-Antikörper berechnet. Dazu wurde zunächst die Höhe der Fluoreszenzsignale bestimmt, die nicht durch Antikörper-Antigen-Bindung zustande kommen. Diese unspezifischen Signale können entstehen, wenn zum Beispiel der Fc-Rezeptor der Antikörper auf der Zelloberfläche bindet oder gewisse Zellstrukturen mit dem Fluorochrom interagieren [121]. Um die Höhe dieser unspezifischen Hintergrundsignale zu bestimmen, wurde auf den Zellen des Blastengates die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des HVEM-Isotypkontrollen-Antikörpers (IgG1) mithilfe von FlowJo berechnet. Zur Berechnung der MFI wurde das arithmetische Mittel der Fluoreszenzsignale verwendet. Dann wurde der MFI-Wert des HVEM-Antikörpers auf der Zielpopulation, den CD33-positiven Blasten, bestimmt. Zur Berechnung des SFI wurde der MFI-Wert des HVEM-Antikörpers durch den der Isotypkontrolle dividiert. Folglich bedeutet ein SFI-Wert größer als 1,0, dass HVEM auf den untersuchten Zellen exprimiert wird, und je höher der SFI-Wert, desto stärker ist diese Expression.

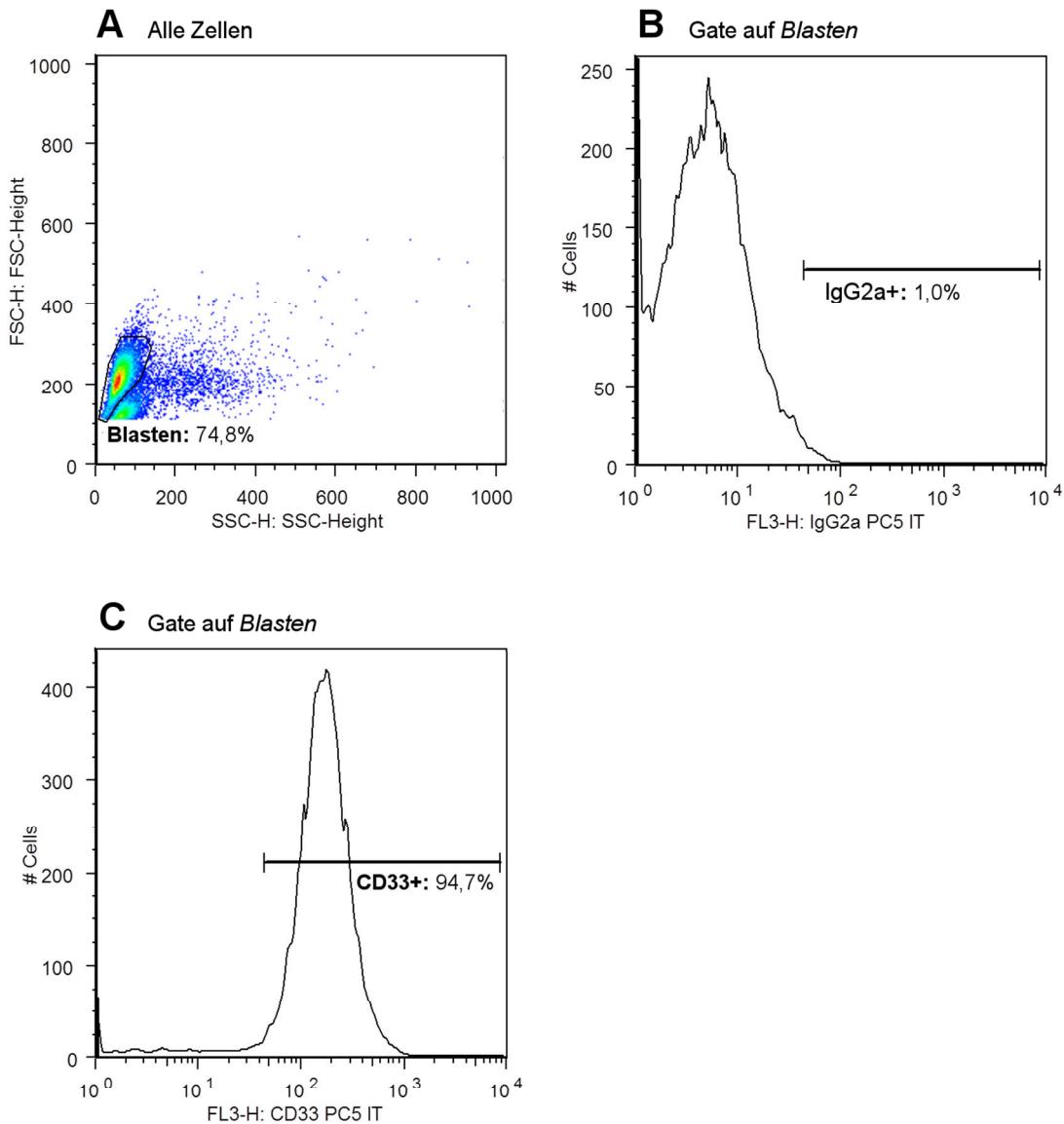


Abbildung 3-1: Beispieldaten aus FlowJo

A SSC-FSC Dotplot mit Darstellung aller gemessenen Zellen. Blastengate, das die Blastenpopulation mit niedrigem SSC eingrenzt. Durchführung für Messdatei Isotypkontrolle und Messdatei Oberflächenexpression HVEM und CD33. **B** Histogramm der Fluoreszenzintensität des CD33-Isotypkontrollen-Antikörpers (IgG2a) auf den Zellen des Blastengates mit Gate *IgG2a+*, das 1% der Zellen mit den höchsten Fluoreszenzintensitäten eingrenzt. Durchführung für Messdatei Isotypkontrolle. **C** Histogramm der Fluoreszenzintensität des CD33-Antikörpers auf den Zellen des Blastengates mit Gate *CD33+*, das die CD-33-positiven Zellen eingrenzt. Durchführung für Messdatei Oberflächenexpression HVEM und CD33. Das Gate *CD33+* (Messdatei Oberflächenexpression HVEM und CD33) entspricht dem Gate *IgG2a+* (Messdatei Isotypkontrolle).

3.2.3 Mikroarrays

3.2.3.1 Grundlegende Prinzipien

Mikroarrays ermöglichen die gleichzeitige Analyse der Expression von mehreren tausend Genen in einem Messvorgang und damit die Erstellung eines genetischen Profils der zu untersuchenden Zellen [124]. Diese Ergebnisse sind insbesondere bedeutsam für die Erforschung der molekularen Tumorphagenese sowie für die Entwicklung neuer Risikoklassifikationen und Prognoseparameter bei Tumorerkrankungen [125,126].

Der Ausgangspunkt einer Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays ist die RNA-Extraktion aus den zu untersuchenden Zellen. Die RNA-Konzentration dient als Maß für die Genexpression, da sie Aufschluss darüber gibt, wie häufig ein bestimmtes Gen abgelesen wird [125]. Mikroarrays, häufig als Chips bezeichnet, sind Glasoberflächen mit fest verankerten Sonden. Bei den Sonden handelt es sich um cDNA-Fragmente (cDNA-Mikroarrays) oder Oligonukleotide (Oligonukleotid-Mikroarrays), deren Sequenzen genspezifisch sind [124]. Jedes Gen wird durch eine Gruppe unterschiedlicher Sonden auf dem Array repräsentiert, die sich in ihren jeweiligen Sequenzen unterscheiden, jedoch alle komplementär zu Abschnitten des Zielgens sind. Die einzelnen Sonden liegen jeweils in tausendfacher Kopie auf dem Array vor [127].

Bei der cDNA-Mikroarray-Technik werden auf einem Chip gleichzeitig zwei RNA-Proben gemessen: die gesamte extrahierte RNA der zu untersuchenden Zellen und die RNA einer Kontrollprobe. Beide RNA-Proben werden zunächst in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription). Danach erfolgt eine *in vitro* Transkription, bei der die cDNA mit zwei unterschiedlichen Fluorochromen markiert und in cRNA umgeschrieben wird. Dann werden beide Proben vermischt und zur Hybridisierung auf einen cDNA-Mikroarray aufgebracht [124]. Bei der Hybridisierung handelt es sich um die spezifische Bindung zwischen den Sonden auf dem Array und komplementären cRNA-Sequenzen der aufgebrachten Proben. Bevor die Fluoreszenzintensitäten gemessen werden, wird die nicht gebundene cRNA abgewaschen. Laser-Scanner mit Spezialsoftware erstellen eine Aufnahme der Fluoreszenzsignale und berechnen die Intensität an den verschiedenen Sonden. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz an einer Sonde abhängig von der Menge an gebundener cRNA. Die Genexpression wird dann abgeschätzt als Verhältnis zwischen den Signalintensitäten von Probe und Kontrolle [125].

Bei der Oligonukleotid-Mikroarray-Technik wird pro Chip jeweils nur eine RNA-Probe gemessen. Die extrahierte DNA wird wie oben beschrieben zunächst in cDNA und dann in cRNA umgeschrieben. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt erst nach der Hybridisierung [124]. Um bei Oligonukleotid-Arrays Rückschlüsse auf die Expressionshöhe eines Gens zu ziehen, muss die Signalintensität der gemessenen Probe mit den entsprechenden Signalintensitäten anderer Proben, die auf weiteren Chips gemessen wurden, verglichen werden [127].

Bei beiden Verfahren muss vor der statistischen Datenanalyse eine Normalisierung durchgeführt werden, um die Datenwerte von Messabweichungen zu bereinigen, die durch Störfaktoren und Unterschiede in Versuchsvorbereitung und -durchführung verursacht wurden [127,128].

3.2.3.2 Durchführung

Die Untersuchung der HVEM-Expressionshöhe in Kohorte_R erfolgte im Rahmen einer Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays [117]. Routinediagnostisch wurde bei allen Patienten eine Knochenmarkpunktion durchgeführt. Aus den Knochenmarkproben wurden die MNZ mittels Dichtegradientenzentrifugation mit der NycoPrep 1.077A-Lösung (Axis Shield, Oslo, Norway) nach Herstelleranweisung isoliert. Zur nachfolgenden RNA-Extraktion wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) verwendet. Die Mikroarray-Analyse wurde mit den Oligonukleotid-Arrays Affymetrix HG-U133 A+B und Affymetrix U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Sogenannte Custom Chip Definition Files (CDF) wurden verwendet, um Gruppen von Oligonukleotid-Sonden auf den Arrays den spezifischen Genen zuzuordnen, die durch sie repräsentiert werden [129]. Die Arbeitsschritte der Probenpräparation, Hybridisierung, Waschung und Färbung sowie die Bildaufnahme und -analyse der Signalintensitäten erfolgten gemäß den offiziellen Affymetrix-Anleitungen. Um vergleichbare Expressionswerte zu erhalten, wurden die Signalintensitätsdaten mittels der „Robust Multichip Average“-Methode (RMA) normalisiert [128]. Die Expressionswerte wurden als Logarithmen zur Basis 2 angegeben.

3.3 Statistik

Zur Beschreibung der Verteilung der Expression wurden als Lageparameter der Median und die Quartile sowie als Streuungsparameter die Standardabweichung und die Spannweite bestimmt. Die grafische Darstellung der Verteilung der Expression erfolgte mithilfe von sogenannten Box-und-Whisker-Plots. Das untere Quartil bildet das untere Ende der Box, das obere Quartil stellt das obere Ende der Box dar. Mit einer

Länge entsprechend dem Interquartilsabstand stellt die Box die mittleren 50% der Daten dar. Der Median teilt die Box in zwei Hälften. Die senkrechten Linien mit Querbalken unter- und oberhalb der Box (Whisker) zeigen das Minimum und das Maximum der Datenwerte an, vorausgesetzt, sie liegen nicht weiter als das 1,5-fache der Boxlänge entfernt. Ausreißer, die 1,5 bis 3 Boxlängen vom Rand der Box entfernt sind, werden als kleine Kreise dargestellt. Alle weiter entfernten Datenwerte sind Extremwerte und werden durch einen kleinen Stern gekennzeichnet [130]. Innerhalb der Kohorten wurde die Höhe der medianen HVEM-Expression zwischen verschiedenen Subgruppen verglichen und es wurde mittels eines statistischen Tests geprüft, ob signifikante Unterschiede in der HVEM-Expressionshöhe zwischen den Gruppen bestehen. Da die Expressionswerte nicht normalverteilt waren, wurde als statistischer Test der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Patienten beider Kohorten, für die vollständig dokumentierte klinische Verlaufsdaten vorlagen, wurden in die Überlebenszeitanalyse mit einbezogen. Dies traf für 157 Patienten aus Kohorte_P und für 507 Patienten aus Kohorte_R zu. Als OS wurde für beide Kohorten die Zeit ab dem Datum der Erstdiagnose bis zum Eintreten des Todes aus jedweder Ursache definiert. Das RFS wurde in Kohorte_P bei Patienten mit erreichter CR als Zeitspanne zwischen dem Datum der Erstdiagnose und dem Auftreten eines Rezidivs oder dem Eintreten des Todes aus jedweder Ursache festgelegt. In Kohorte_R wurde das RFS ab dem Datum der CR berechnet. Für OS und RFS gilt: Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der letzten klinischen Dokumentation weder Tod noch Rezidiv eingetreten war, wurden ab diesem Datum censiert. Für das RFS gilt: Wurde bei einem Patienten eine allogene SZT durchgeführt, wurde der Patient ab dem Transplantationsdatum censiert. Die Überlebenszeiten wurden mittels der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Der Vergleich der Überlebenszeitverteilungen erfolgte mit dem Logrank-Test. Die Cox-Regression wurde zur multivariaten Analyse der Überlebenszeiten verwendet. Bei allen Auswertungen wurden p-Werte kleiner als 0,05 als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS Version 22 für Microsoft Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 HVEM Expression

Für die vorliegende Arbeit wurde die HVEM-Expression auf leukämischen Zellen in Kohorte_P bei 169 Patienten und in Kohorte_R bei 512 Patienten bestimmt. In Kohorte_P wurde die HVEM-Expression auf Protein-Ebene analysiert. Die Expressionshöhe wurde durchflusszytometrisch ermittelt und mit dem spezifischen Fluoreszenzindex (SFI) quantifiziert. Der mediane SFI für alle untersuchten Fälle lag bei 1,7. Die SFI-Werte variierten zwischen 0,3 und 11,0. Dabei lagen 25% aller SFI-Werte über 3,2 (oberes Quartil). Bei SFI-Werten kleiner gleich 1,0 wird das HVEM-Protein nicht exprimiert (vgl. Kapitel 3.2.2.3). Dies traf für insgesamt 40 der 169 Fälle (23,6%) zu. In Kohorte_R wurde die HVEM-Expression auf mRNA-Ebene bestimmt. Die Expressionslevel wurden im Rahmen einer Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays ermittelt und sind in logarithmischer Form angegeben. Die Expressionslevel lagen zwischen 6,6 und 10,1 mit einem Median von 8,0. Dabei waren 25% aller Werte größer als 8,4 (oberes Quartil). Tabelle 4-1 fasst die Lage- und Streuungsparameter der HVEM-Expression für beide Kohorten zusammen. In Abbildung 4-1 ist die Verteilung der HVEM-Expressionslevel graphisch dargestellt.

Tabelle 4-1: Lage- und Streuungsparameter der HVEM-Expression

	Kohorte_P HVEM (SFI)	Kohorte_R HVEM Expression (log2)
Fallzahl (n)	169	512
Median	1,7	8,0
Mittelwert (arithmetisch)	2,4	8,1
Standardabweichung	2,1	0,5
Minimum	0,3	6,6
Maximum	11,0	10,1
Unteres Quartil (0,25-Quantil)	1,0	7,7
Oberes Quartil (0,75-Quantil)	3,2	8,4

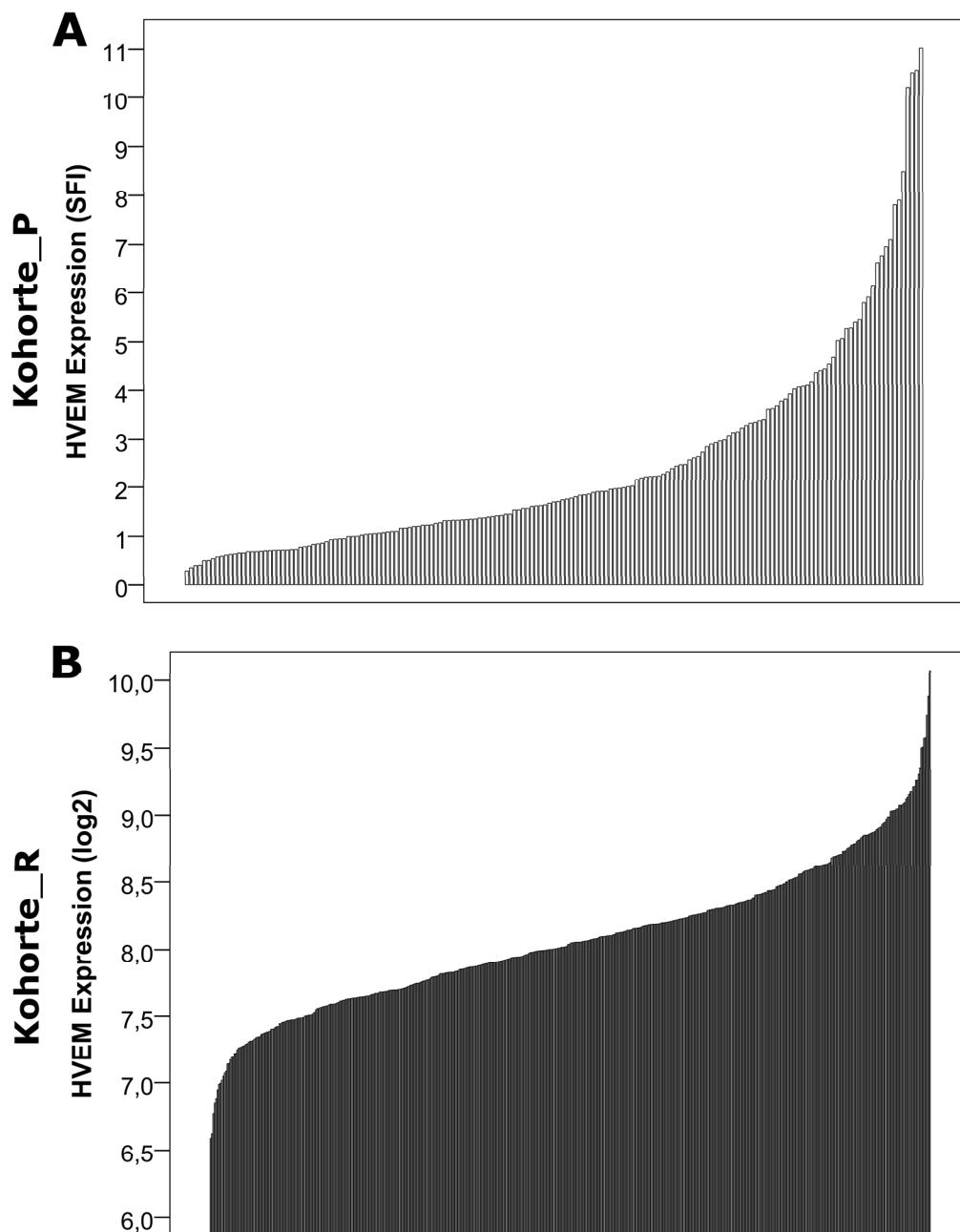


Abbildung 4-1: HVEM-Expressionslevel

Verteilung der HVEM-Expressionslevel auf leukämischen Zellen bei allen Patienten der Kohorte_P (A) und der Kohorte_R (B).

4.2 Korrelation der HVEM-Expression mit demographischen Daten

Um eine Assoziation der HVEM-Expression mit demographischen Daten der Patienten auszuschließen, wurde die Expressionshöhe im Zusammenhang mit dem Alter bei Erstdiagnose und dem Geschlecht der Patienten untersucht.

4.2.1 HVEM-Expression und Alter bei Erstdiagnose

Das mediane Alter bei Erstdiagnose der Patienten in Kohorte_P lag bei 59 Jahren und in Kohorte_R bei 58 Jahren. Dabei waren der jüngste und der älteste Patient in Kohorte_P 20 bzw. 92 Jahre und in Kohorte_R 28 bzw. 85 Jahre alt. Die Patienten beider Kohorten wurden in vier Altersgruppen eingeteilt, in Patienten über 70 Jahren, Patienten zwischen 60 und 69 Jahren, Patienten zwischen 40 und 59 Jahren sowie Patienten unter 40 Jahren. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Altersgruppe und deren prozentualer Anteil ist für Kohorte_P in Abbildung 4-2 (A) und für Kohorte_R in Abbildung 4-2 (C) dargestellt. Im Vergleich zeigt sich eine ähnliche Altersstruktur in beiden Kohorten. Etwa 50% aller Patienten in Kohorte_P und in Kohorte_R waren bei Erstdiagnose älter als 60 Jahre alt, wobei der Anteil der über 70-Jährigen in Kohorte_P (26%) etwas höher war als in Kohorte_R (16%).

Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde die mediane HVEM-Expression jeder Altersgruppe einer Kohorte mit der medianen HVEM-Expression in den jeweils anderen Altersgruppen der Kohorte zusammen verglichen, um eine Korrelation der Expressionshöhe mit dem Alter bei Erstdiagnose zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-2 (B) für Kohorte_P und in Abbildung 4-2 (D) für Kohorte_R dargestellt. In beiden Kohorten konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter bei Erstdiagnose und der Höhe der HVEM-Expression festgestellt werden.

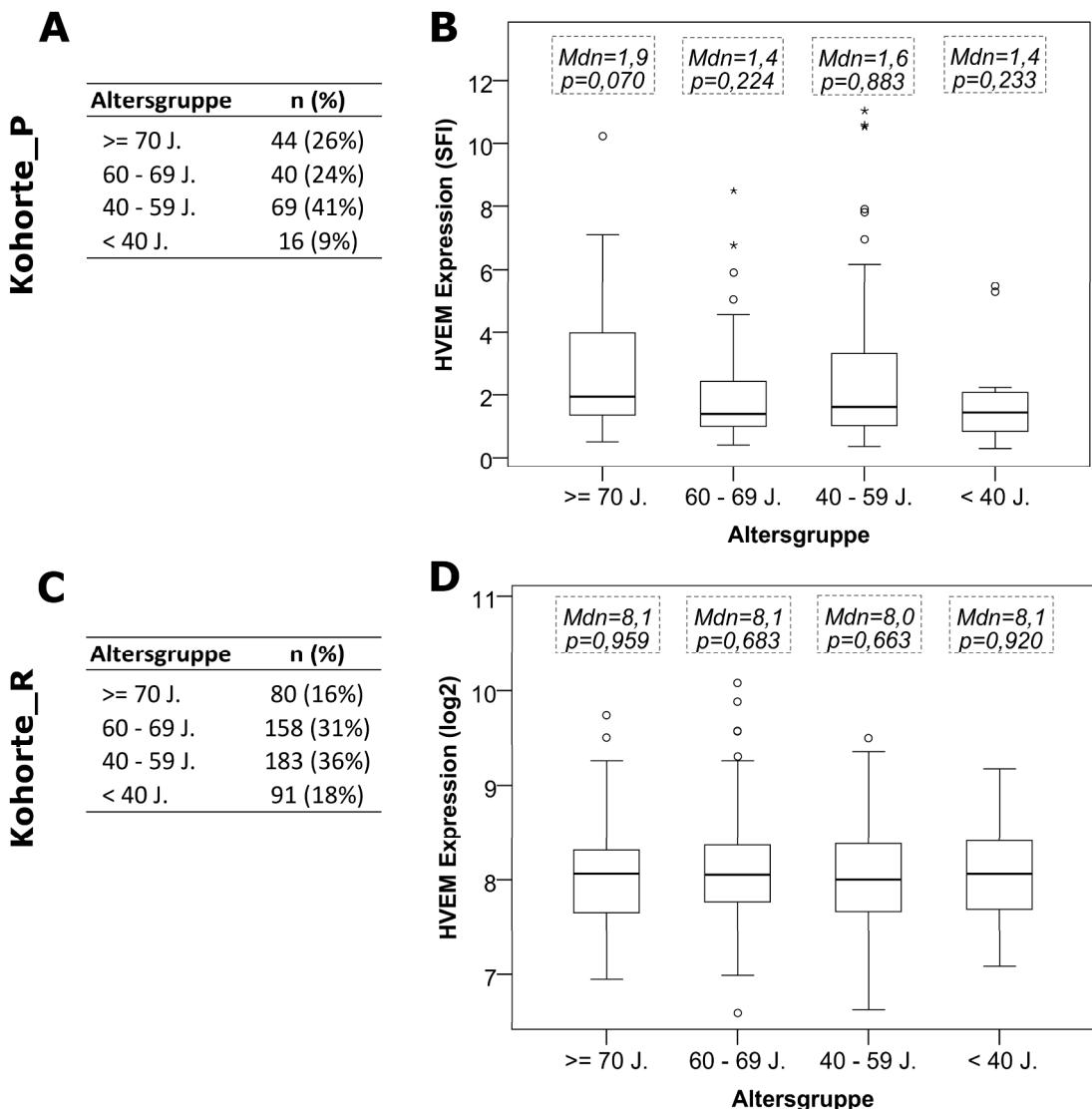


Abbildung 4-2: HVEM-Expression und Alter bei Erstdiagnose

Verteilung der Patienten auf Altersgruppen (Alter bei Erstdiagnose): (A) + (C) Tabellen mit Anzahl der Patienten je Altersgruppe und prozentualen Anteil. (B) + (D) Boxplots der HVEM-Expression in verschiedenen Altersgruppen. p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der medianen HVEM-Expression in einer Altersgruppe mit der medianen HVEM-Expression in den jeweils anderen Altersgruppen zusammen. (A) + (B): Kohorte_P. (C) + (D): Kohorte_R. Abkürzungen: J.=Jahre; Mdn=Median.

4.2.2 HVEM-Expression und Geschlecht

Eine mögliche Korrelation mit der HVEM-Expression wurde neben dem Alter auch für das Geschlecht der Patienten untersucht. Die Anzahl und der prozentuale Anteil männlicher und weiblicher Patienten ist für Kohorte_P in Abbildung 4-3 (A) dargestellt und für Kohorte_R in Abbildung 4-3 (C). Die mediane HVEM-Expression wurde zwischen männlichen und weiblichen Patienten verglichen. Dabei konnte in beiden

Kohorten kein signifikanter Unterschied in der Expressionshöhe zwischen männlichen und weiblichen Patienten festgestellt werden (Abbildung 4-3 (B) und (D)).

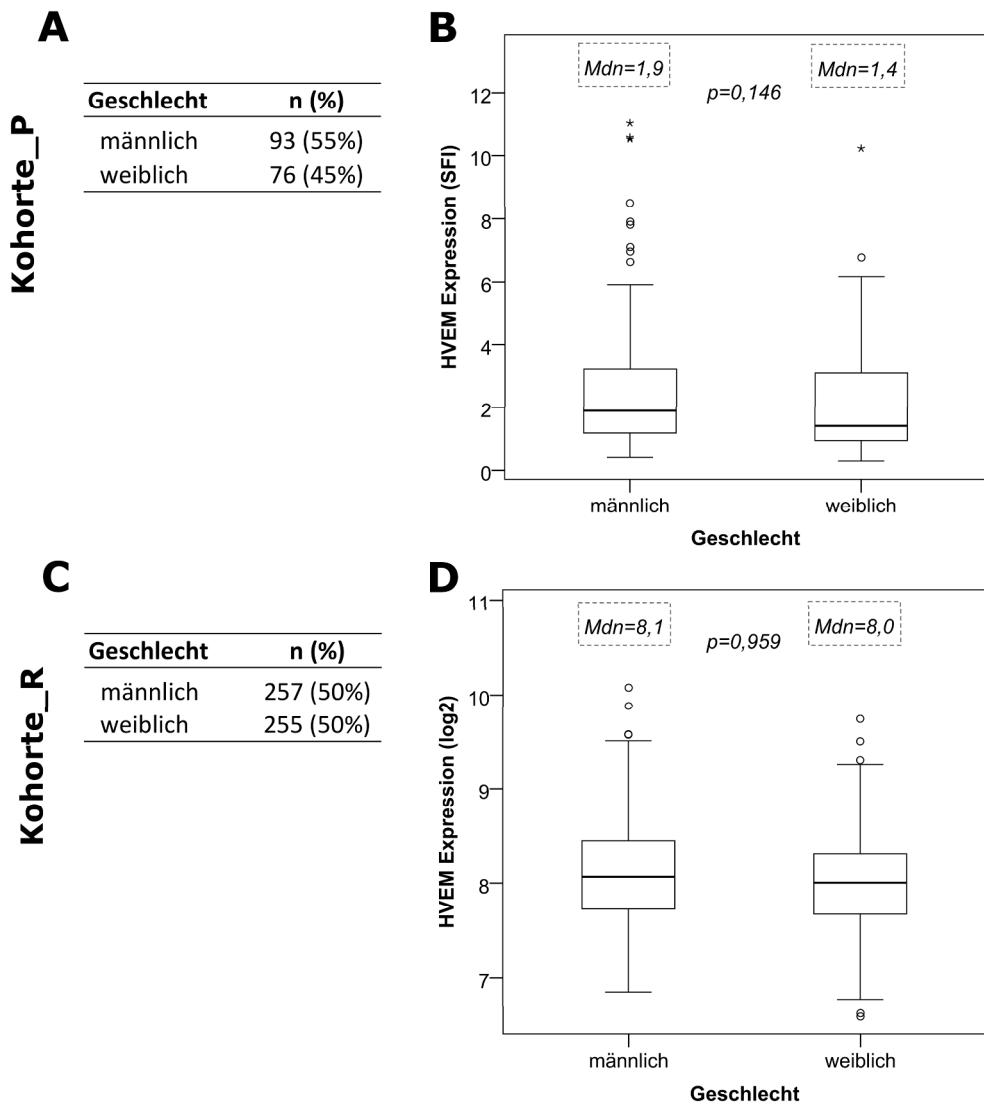


Abbildung 4-3: HVEM-Expression und Geschlecht

(A) + (C) Tabellen mit Anzahl und prozentualem Anteil männlicher und weiblicher Patienten. (B) + (D) Boxplots der HVEM-Expression bei männlichen und weiblichen Patienten. p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der medianen HVEM-Expression. (A) + (B): Kohorte_P. (C) + (D): Kohorte_R. Abkürzungen: Mdn=Median.

4.3 Korrelation der HVEM-Expression mit krankheitsbezogenen Daten

4.3.1 HVEM-Expression und Zytomorphologie der AML

Um eine Assoziation der HVEM-Expression mit morphologischen Kriterien der AML zu untersuchen, wurde die Expressionshöhe in verschiedenen morphologischen Subgruppen verglichen. Dazu wurde die FAB-Klassifikation herangezogen (vgl. Kapitel 1.1.4). Der FAB-Typ der AML konnte in Kohorte_P für 138 Patienten (82%) und in Kohorte_R für 429 (86%) erhoben werden. Die Fälle von sAML wurden in beiden Kohorten als separate morphologische Subgruppe betrachtet, der FAB-Typ wurde nicht erhoben. Die Verteilung der Patienten auf die verschiedenen morphologischen Subgruppen ist für Kohorte_P in Abbildung 4-4 (A) und für Kohorte_R in Abbildung 4-4 (C) dargestellt.

Im Vergleich zeigten sich bei beiden Kohorten ähnliche prozentuale Anteile der morphologischen Subgruppen. Die prozentual größten Unterschiede bestanden im Anteil des FAB-Subtyps M1 (27% in Kohorte_P und 19% in Kohorte_R) und im Anteil des FAB Subtyps M2 (15% in Kohorte_P und 25% in Kohorte_R). Zusammengefasst machten AML-Subtypen mit monozytärer Komponente (M4 und M5) in beiden Kohorten circa ein Drittel aller Fälle aus (33% in Kohorte_P und 32% in Kohorte_R).

Für beide Kohorten wurde die mediane HVEM-Expression in allen morphologischen Subgruppen berechnet. Die mediane Expressionshöhe in einer morphologischen Subgruppe wurde jeweils mit der medianen Expressionshöhe in allen anderen Subgruppen zusammen verglichen. Die Analyse erfolgte getrennt für Kohorte_P und Kohorte_R. Die Verteilung der HVEM-Expressionslevel in den verschiedenen morphologischen Subgruppen sowie die Ergebnisse der Signifikanztests sind für Kohorte_P in Abbildung 4-4 (B) und für Kohorte_P in Abbildung 4-4 (D) dargestellt.

In Kohorte_P konnte eine höhere HVEM-Expression bei AML-Fällen mit FAB-Typ M2 mit statistischer Signifikanz nachgewiesen werden (Median 2,3 versus 1,6; $p=0,035$). Daneben zeigte sich eine hohe HVEM-Expression in den Subgruppen FAB-Typ M6 und FAB-Typ M7 mit medianen SFI-Werten von jeweils 4,4. Im Vergleich mit allen anderen Subgruppen konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden, da die Fallzahlen in den Subgruppen M6 und M7 sehr gering waren.

In Kohorte_R konnte ein Trend zu höherer HVEM-Expression bei AML-Fällen mit FAB-Subtyp M2 (Median 8,1 versus 8,0; $p=0,090$) und M7 (Median 8,5 versus 8,0; $p=0,087$) festgestellt werden. Im Gegensatz zum Trend in Kohorte_P wurde in dieser Kohorte

bei AML M6-Fällen eine statistisch signifikant niedrigere HVEM-Expression beobachtet (Median 7,7 versus 8,1; $p=0,010$).

Bei allen weiteren morphologischen Subgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der HVEM Expression. Somit konnte insgesamt über beide Kohorten hinweg kein konsistenter und statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen HVEM-Expression und AML Morphologie festgestellt werden.

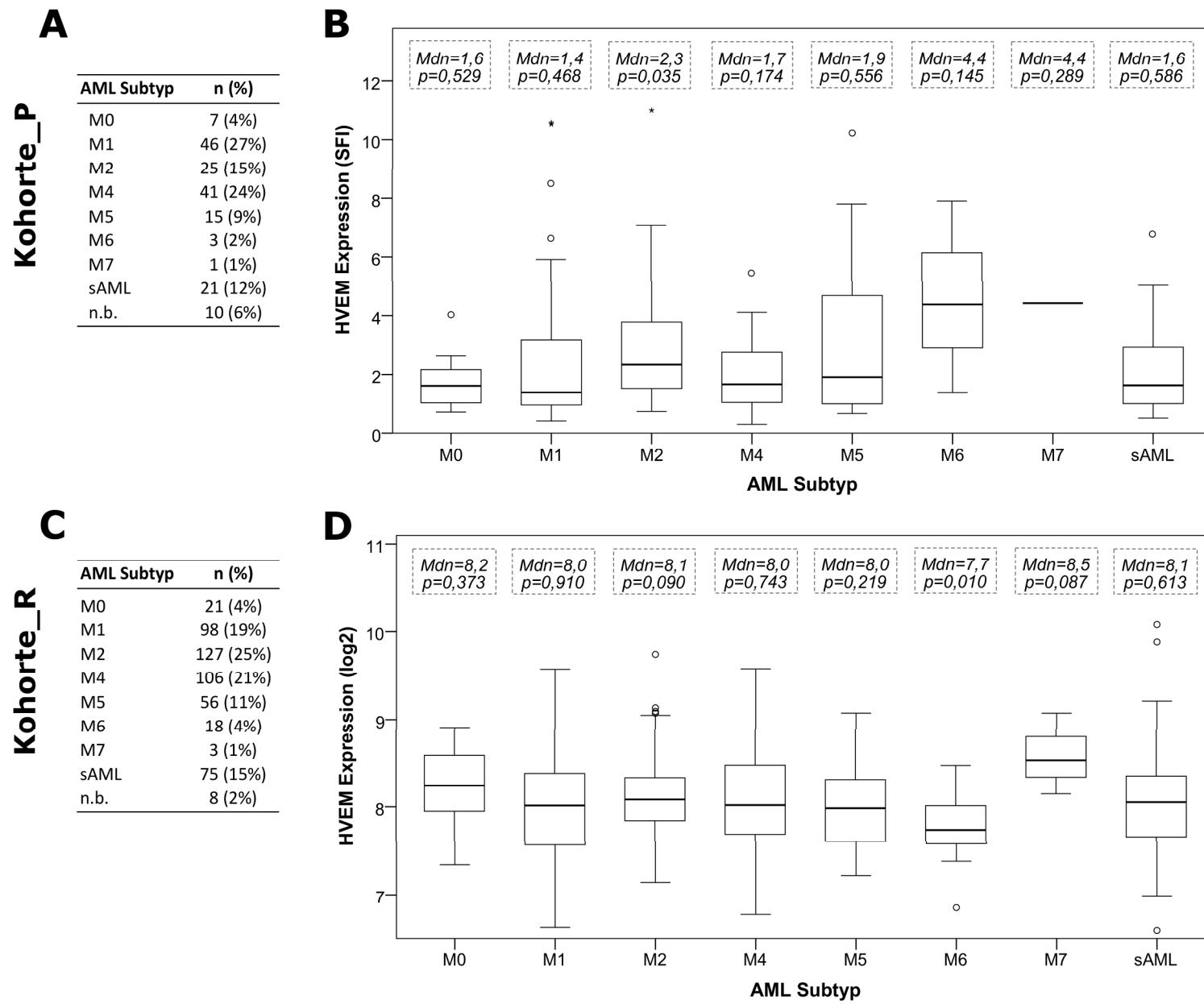


Abbildung 4-4: HVEM Expression und AML-Morphologie

(A)+(C) Tabellen der Verteilung der Patienten auf morphologische Subgruppen nach der FAB-Klassifikation. sAML als separate Subgruppe. (B)+(D) Boxplots der HVEM-Expression in den Subgruppen. p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der medianen Expression in einer Subgruppe mit der in den jeweils anderen Subgruppen zusammen. (A)+(B) Kohorte_P. (C)+(D): Kohorte_R. Mdn= Median; n.b.=nicht bestimmt

4.3.2 HVEM-Expression und Zytogenetik der AML

Um einen Zusammenhang zwischen der HVEM-Expression und zytogenetischen Veränderungen bei der AML zu untersuchen, wurde die HVEM-Expressionshöhe bei verschiedenen chromosomal Veränderungen analysiert. Der Karyotyp konnte für 159 Patienten in Kohorte_P und für 506 Patienten in Kohorte_R erhoben werden. Tabelle 4-2 gibt einen Überblick über Art und Häufigkeit der zytogenetischen Befunde.

Tabelle 4-2: Zytogenetische Befunde der Patienten beider Kohorten

Die Einteilung erfolgte auf Basis rekurrenter zytogenetischer Veränderungen bei AML-Patienten nach den Definitionen der revidierten MRC-Klassifikation [15].

Zytogenetik	Anzahl Patienten (% Kohorte)	
	Kohorte_P	Kohorte_R
Normaler Karyotyp	90 (53%)	209 (41%)
t(8;21)	4 (2%)	30 (6%)
inv(16) oder t(16;16)(p13;q22)	4 (2%)	38 (%)
t(9;11)(p21-22;q23) oder t(11;19)(q23;p13)	5 (3%)	22 (4%)
Nicht als günstig oder ungünstig eingestufte Veränderungen	20 (12%)	85 (17%)
Komplexer Karyotyp (vier oder mehr unabhängige Anomalien)	16 (10%)	69 (14%)
Andere ungünstige Veränderungen	20 (12%)	53 (10%)

Auf Basis der zytogenetischen Befunde wurden die Patienten nach den Kriterien der revidierten MRC-Klassifikation [15] in drei Risikogruppen eingeteilt (vgl. Kapitel 1.1.5). Für Kohorte_P ist die Verteilung der Patienten auf die MRC-Risikogruppen in Abbildung 4-5 (A) dargestellt, für Kohorte_R in Abbildung 4-5 (B). In beiden Kohorten wurde über die Hälfte der Patienten in die Gruppe mit intermediärem Risiko eingestuft (68% in Kohorte_P; 61% in Kohorte_R). Der Anteil an Patienten mit günstigem Risikoprofil war in Kohorte_R (13%) etwas höher als in Kohorte_P (8%).

In beiden Kohorten wurde für jede Risikogruppe der Median der HVEM-Expression bestimmt und mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests jeweils mit dem Median der beiden anderen Risikogruppen zusammen verglichen (Kohorte_P: Abbildung 4-5 (B); Kohorte_R: Abbildung 4-5 (C)). In Kohorte_P wurde HVEM in der ungünstigen

Prognosegruppe signifikant höher exprimiert als in der günstigen und der intermediären Prognosegruppe zusammen (Median 2,1 versus 1,5; $p=0,023$). Beim direkten Vergleich der ungünstigen Gruppe mit der intermediären Gruppe konnte diese Beobachtung bestätigt werden (Median 2,1 versus 1,4; $p=0,015$), nicht jedoch beim direkten Vergleich der ungünstigen Gruppe mit der günstigen Gruppe (Median 2,1 versus 1,9; $p=0,917$). In Kohorte_R bestand kein Unterschied in der HVEM-Expression beim Vergleich der ungünstigen Gruppe mit den beiden anderen Prognosegruppen (Median 8,1 versus 8,0; $p=0,936$). Es konnte jedoch eine signifikant höhere HVEM-Expression in der günstigen Risikogruppe festgestellt werden, sowohl beim Vergleich mit intermediären und der ungünstigen Risikogruppe zusammen (Median 8,2 versus 8,0; $p=0,004$), als auch beim direkten Vergleich mit der intermediären Gruppe (Median 8,2 versus 8,0; $p=0,003$) und beim direkten Vergleich mit der ungünstigen Gruppe (Median 8,2 versus 8,1; $p=0,036$). In beiden Kohorten wurde HVEM in der intermediären Risikogruppe signifikant niedriger exprimiert als in den beiden anderen Risikogruppen zusammen (Median 1,4 versus 2,0; $p=0,006$ in Kohorte_P; Median 8,0 versus 8,1; $p=0,039$ in Kohorte_R).

Insgesamt konnte somit als konsistenter und statistisch signifikanter Zusammenhang eine niedrigere HVEM-Expression in der intermediären MRC-Risikogruppe im Vergleich mit der günstigen und der ungünstigen MRC-Risikogruppe festgestellt werden.

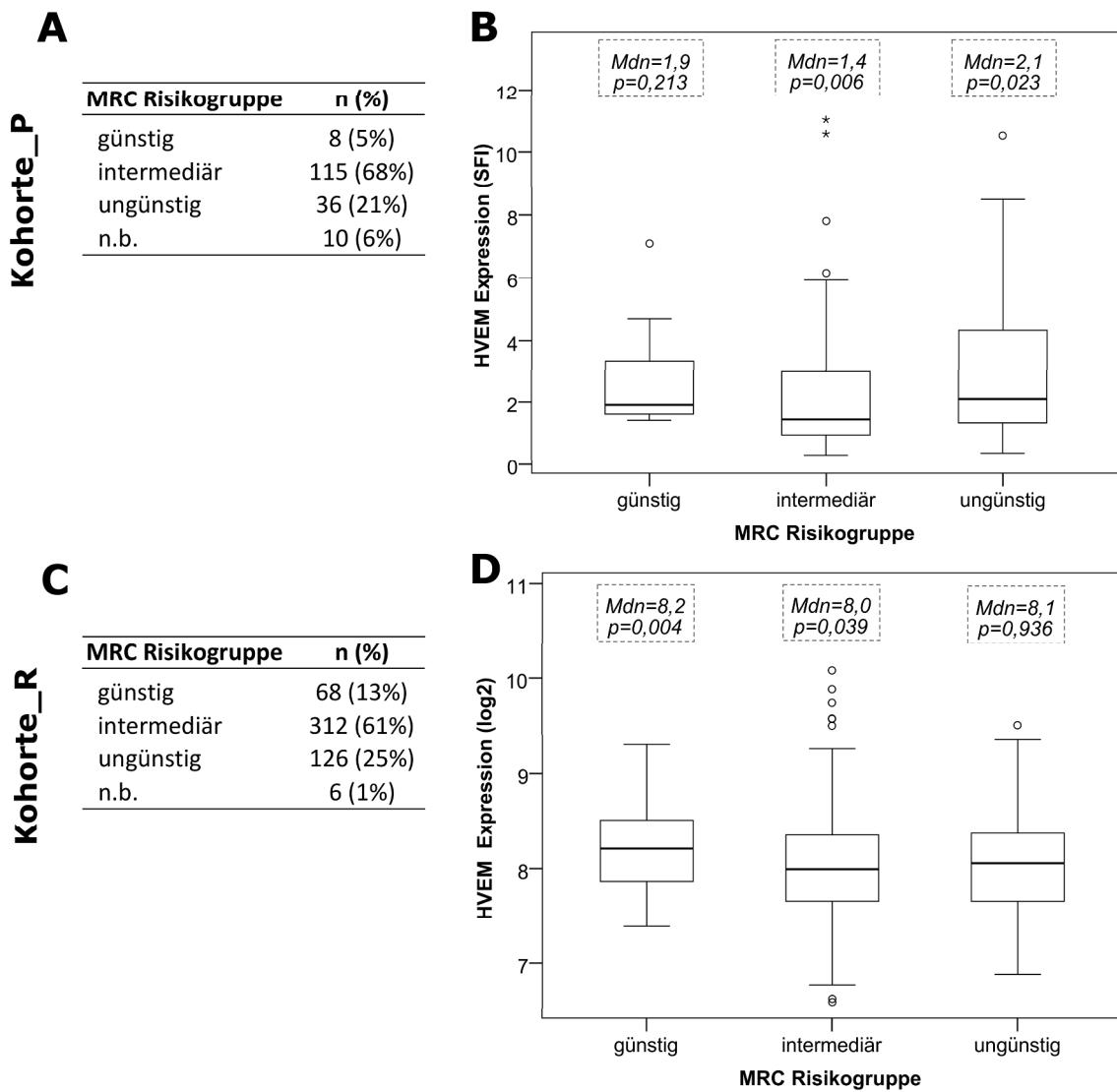


Abbildung 4-5: HVEM-Expression und MRC-Risikoklassifikation

(A) + (C) Tabellen der Verteilung der Patienten auf Risikogruppen nach den Kriterien der revidierten MRC-Klassifikation [15]. (B) + (D) Boxplots der HVEM-Expression in den Risikogruppen. p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der medianen HVEM-Expression in einer Risikogruppe mit der in den jeweils anderen Risikogruppen zusammen. (A) + (B): Kohorte_P. (C) + (D): Kohorte_R. Abkürzungen: Mdn=Median; n.b.=nicht bestimmt.

4.3.3 HVEM-Expression und Molekulargenetik der AML

Um eine potentielle Assoziation zwischen der HVEM-Expression und spezifischen molekularen Veränderungen der leukämischen Zellen zu untersuchen, wurde der Mutationsstatus der prognostisch relevanten Gene *NPM1*, *FLT3* und *CEBPA* in beiden Kohorten erhoben.

4.3.3.1 *NPM1* Mutationsstatus

Der Mutationsstatus von *NPM1* konnte in Kohorte_P bei 166 Patienten (98%) und in Kohorte_R bei 287 Patienten (56%) erhoben werden. Die Häufigkeitsverteilung von Fällen mit *NPM1*-Mutation, *NPM1*-Wildtyp und Fällen mit unbekanntem Mutationsstatus ist für Kohorte_P in Abbildung 4-6 (A) und für Kohorte_R in Abbildung 4-6 (C) dargestellt. Das Verhältnis von mutierten zu Wildtyp-Fällen war in beiden Kohorten ähnlich und betrug etwa 2:3 (40% und 58% in Kohorte_P; 23% und 33% in Kohorte_R).

Für beide Kohorten wurde die mediane HVEM-Expression bei Patienten mit *NPM1*-Mutation und *NPM1*-Wildtyp bestimmt. In Kohorte_P (Abbildung 4-6 (B)) konnte bei Patienten mit Mutation im *NPM1*-Gen eine signifikant niedrigere HVEM-Expression festgestellt werden (Median 1,3 versus 2,0; $p=0,001$). Diese Beobachtung konnte in Kohorte_R (Abbildung 4-6 (D)) bestätigt werden (Median 7,8 versus 8,2; $p<0,001$).

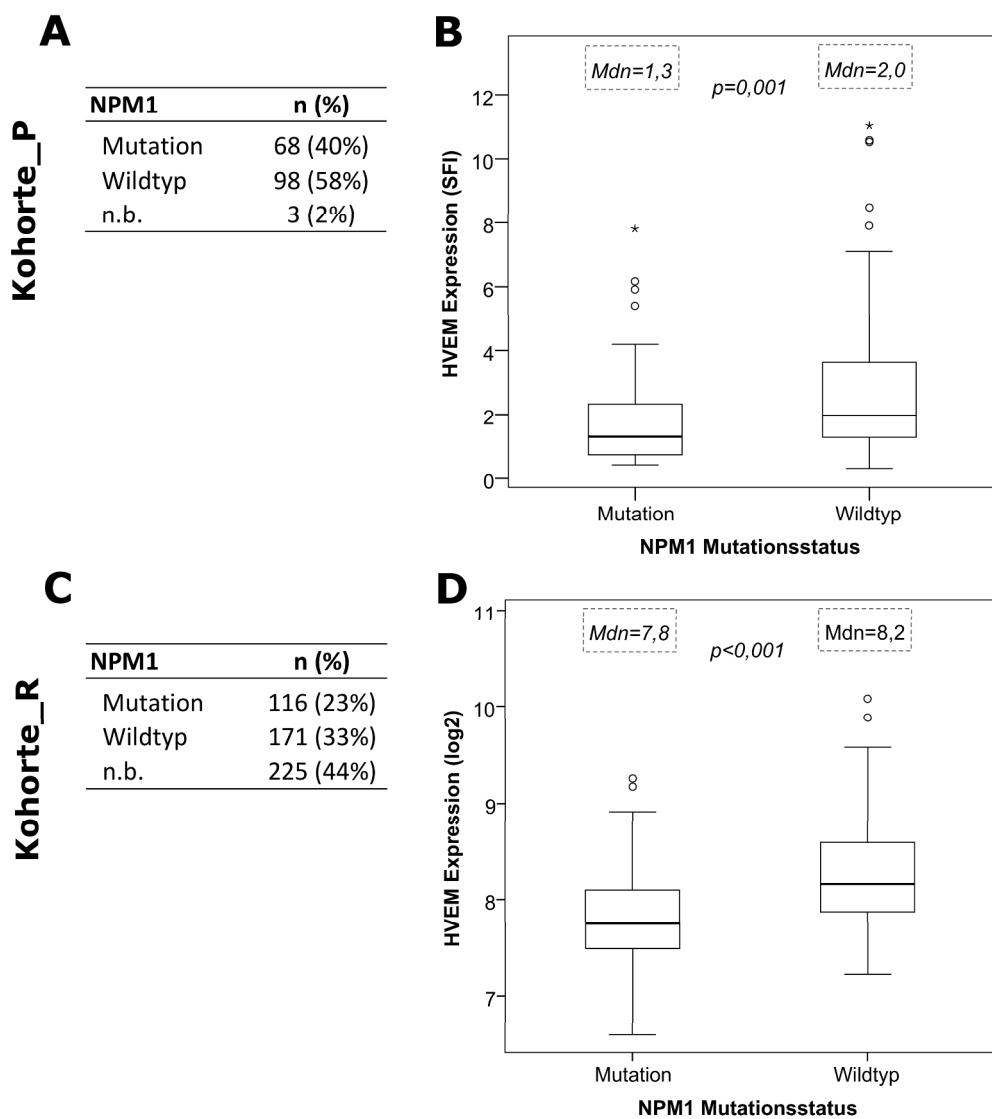


Abbildung 4-6: HVEM-Expression und NPM1-Mutationsstatus

(A) + (C) Tabellen mit Häufigkeitsverteilung von Fällen mit *NPM1*-Mutation, *NPM1*-Wildtyp und unbekanntem Mutationsstatus. (B) + (D) Boxplots der HVEM-Expression bei *NPM1*-mutierten und *NPM1*-Wildtyp Fällen. p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der medianen HVEM-Expression bei Fällen mit *NPM1*-Mutation und *NPM1*-Wildtyp. (A) + (B): Kohorte_P. (C) + (D): Kohorte_R. Abkürzungen: Mdn=Median; n.b.=nicht bestimmt.

Bei Beschränkung der Analyse auf Patienten mit normalem Karyotyp und bekanntem *NPM1*-Mutationsstatus konnten die Beobachtungen in beiden Kohorten bestätigt werden (Tabelle 4-3). In Kohorte_P ($p=0,003$) und in Kohorte_R ($p<0,001$) wurde HVEM bei Patienten mit *NPM1*-Mutation signifikant niedriger exprimiert als bei Patienten mit *NPM1*-Wildtyp.

Tabelle 4-3: HVEM-Expression und *NPM1*-Mutationsstatus bei Fällen mit normalem Karyotyp

Häufigkeiten der Mutationen (n), mediane HVEM Expression und p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der medianen HVEM-Expression.

Fälle mit normalem Karyotyp		Kohorte_P			Kohorte_R		
		n	Mediane HVEM-Expression (SFI)	p-Wert	n	Mediane HVEM-Expression (log2)	p-Wert
NPM1	Mutation	53	1,3	0,003	108	7,8	<0,001
	Wildtyp	36	2,6		94	8,2	

4.3.3.2 *FLT3* Mutationsstatus

Der Mutationsstatus von *FLT3* bezüglich ITD konnte in Kohorte_P bei 165 Patienten (98%) und in Kohorte_R bei 502 Patienten (98%) erhoben werden. Die Häufigkeitsverteilung ist für Kohorte_P in Abbildung 4-7 (A) und für Kohorte_R in Abbildung 4-7 (C) dargestellt. Der prozentuale Anteil von Patienten mit *FLT3*-ITD und mit *FLT3*-Wildtyp war in beiden Kohorten ähnlich (27% und 70% in Kohorte_P; 24% und 74% in Kohorte_R).

Die mediane Expressionshöhe von HVEM wurde in beiden Kohorten zwischen Patienten mit *FLT3*-ITD und *FLT3*-Wildtyp verglichen. Dabei konnte eine signifikant niedrigere HVEM-Expression bei Patienten mit *FLT3*-ITD sowohl in Kohorte_P (Median 1,2 versus 1,9; p=0,001; Abbildung 4-7 (B)), als auch in Kohorte_R (Median 7,9 versus 8,2; p<0,001; Abbildung 4-7 (D)) festgestellt werden.

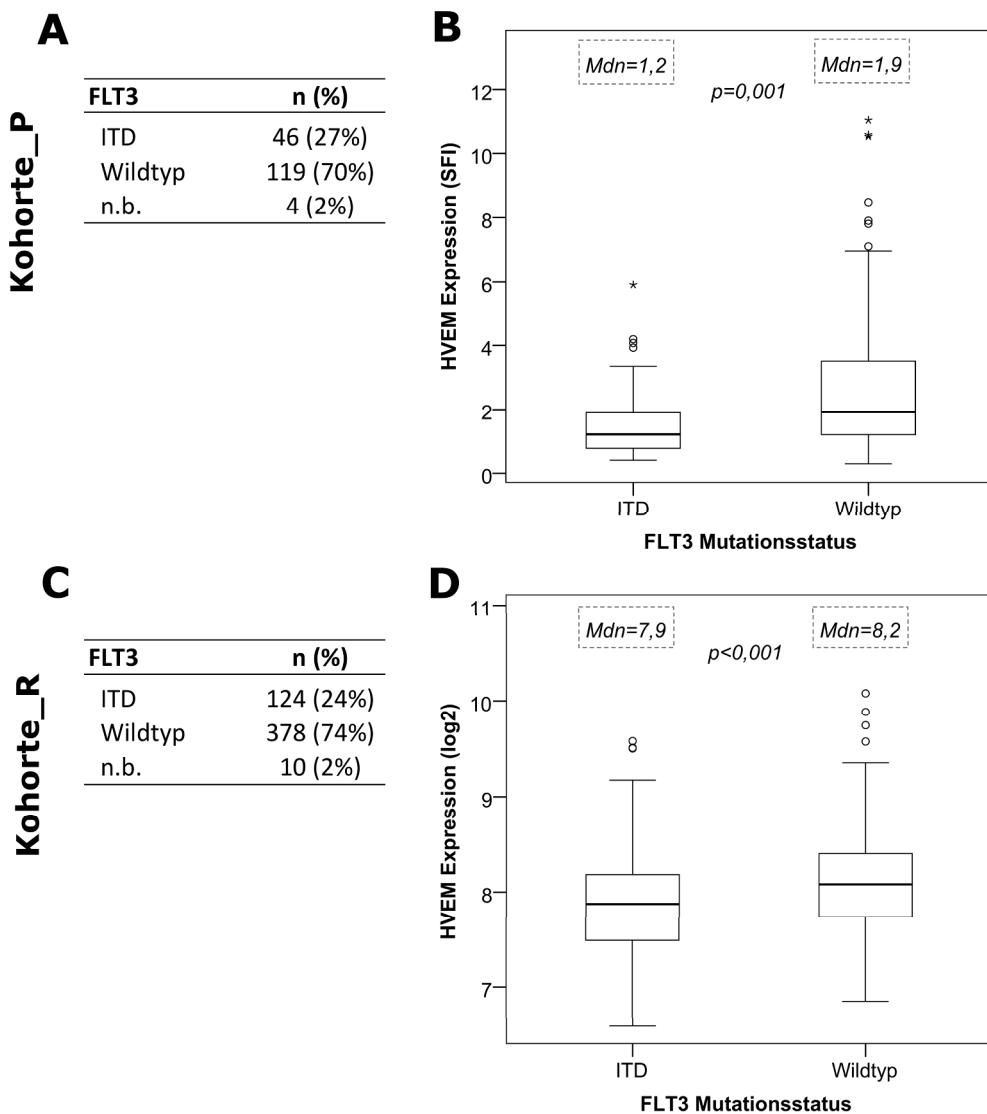


Abbildung 4-7: HVEM-Expression und *FLT3*-Mutationsstatus

(A) + (C) Tabellen mit Häufigkeitsverteilung von Fällen mit *FLT3*-ITD, *FLT3*-Wildtyp und unbekanntem Mutationsstatus. (B) + (D) Boxplots der HVEM-Expression bei *FLT3*-ITD- und *FLT3*-Wildtyp-Fällen. p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der medianen HVEM-Expression bei Fällen mit *FLT3*-ITD und *FLT3*-Wildtyp. (A) + (B): Kohorte_P. (C) + (D): Kohorte_R. Abkürzungen: Mdn=Median; n.b.=nicht bestimmt.

Bei Beschränkung der Analyse auf Patienten mit normalem Karyotyp und bekanntem *FLT3*-Mutationsstatus konnte in Kohorte_P kein signifikanter Unterschied in der HVEM-Expression zwischen Patienten mit *FLT3*-ITD und *FLT3*-Wildtyp nachgewiesen werden ($p=0,285$). In Kohorte_R konnte bestätigt werden, dass HVEM bei Patienten mit *FLT3*-ITD signifikant niedriger exprimiert wird ($p<0,001$). Tabelle 4-4 fasst die Ergebnisse der Analyse bei Patienten mit normalem Karyotyp zusammen.

Tabelle 4-4: HVEM-Expression und *FLT3*-Mutationsstatus bei Fällen mit normalem Karyotyp

Häufigkeiten der Mutationen (n), mediane HVEM Expression und p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der medianen HVEM-Expression.

Fälle mit normalem Karyotyp		Kohorte_P			Kohorte_R		
		n	Mediane HVEM-Expression (SFI)	p-Wert	n	Mediane HVEM-Expression (log2)	p-Wert
FLT3	ITD	28	1,5	0,285	82	7,9	<0,001
	Wildtyp	61	1,7		127	8,1	

4.3.3.3 *CEBPA* Mutationsstatus

Der *CEBPA*-Mutationsstatus war in Kohorte_P bei 88 Patienten (52%) und in Kohorte_R bei 184 Patienten (36%) bekannt. Die Anteile an Patienten mit biallelischer und monoallelischer Mutation waren in beiden Kohorten ähnlich (3% biallelisch und 1% monoallelisch in Kohorte_P; 2% biallelisch und 2% monoallelisch in Kohorte_R). Die Häufigkeitsverteilungen sind für Kohorte_P in Abbildung 4-8 (A) und für Kohorte_R in Abbildung 4-8 (C) dargestellt.

Beim Vergleich der HVEM-Expression wurden die Patienten mit biallelischer *CEBPA*-Mutation denen mit monoallelischer *CEBPA*-Mutation und *CEBPA*-Wildtyp gegenübergestellt. In Kohorte_P (Median 4,4 versus 1,3; p=0,015; Abbildung 4-8 (B)) und in Kohorte_R (Median 8,8 versus 7,9; p<0,001; Abbildung 4-8 (D)) wurde HVEM bei Patienten mit biallelischer *CEBPA*-Mutation signifikant höher exprimiert.

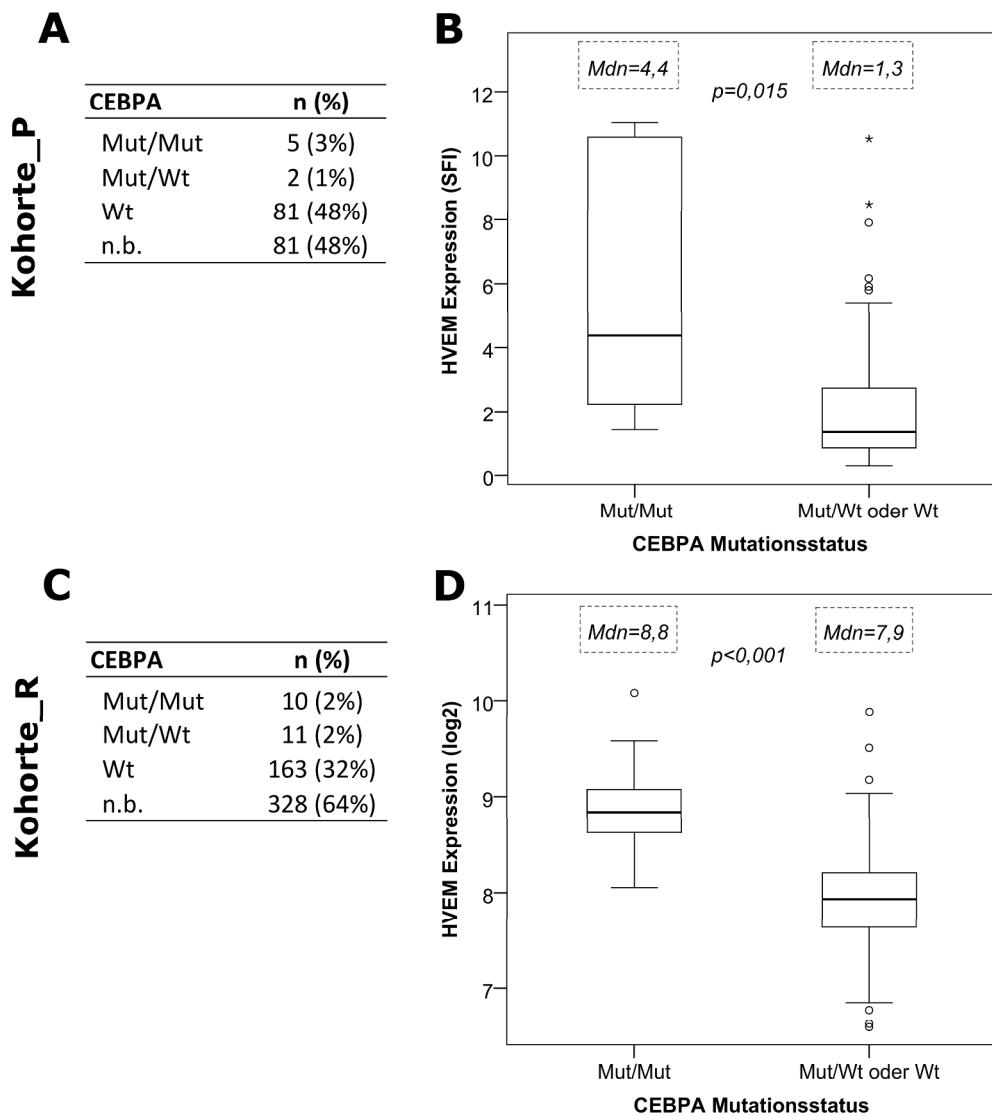


Abbildung 4-8: HVEM-Expression und CEBPA-Mutationsstatus

(A) + (B) Tabellen mit Häufigkeitsverteilung von Fällen mit biallelischer *CEBPA*-Mutation, monoallelischer *CEBPA*-Mutation, *CEBPA*-Wildtyp und unbekanntem Mutationsstatus. (B) + (D) Boxplots zum Vergleich der HVEM-Expression zwischen Fällen mit biallelischer *CEBPA*-Mutation und Fällen mit monoallelischer *CEBPA*-Mutation oder *CEBPA*-Wildtyp. p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der medianen HVEM-Expression zwischen den beiden Gruppen. (A) + (B): Kohorte_P. (C) + (D): Kohorte_R. Abkürzungen: Mdn=Median; Mut/Mut=biallelische Mutation; Mut/Wt=monoallelische Mutation; Wt=Wildtyp; n.b.=nicht bestimmt.

Bei Beschränkung der Analyse auf Patienten mit normalem Karyotyp konnten die Ergebnisse in beiden Kohorten reproduziert werden (Tabelle 4-5). HVEM wurde bei Patienten mit biallelischer *CEBPA* Mutation sowohl in Kohorte_P ($p=0,008$), als auch in Kohorte_R ($p<0,001$) signifikant höher exprimiert.

Tabelle 4-5: HVEM-Expression und *CEBPA*-Mutationsstatus bei Fällen mit normalem Karyotyp

Häufigkeiten der Mutationen (n), mediane HVEM Expression und p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der medianen HVEM-Expression. Abkürzungen: Mut/Mut=biallelische Mutation; Mut/Wt=monoallelische Mutation; Wt=Wildtyp.

Fälle mit normalem Karyotyp		Kohorte_P			Kohorte_R		
		n	Mediane HVEM-Expression (SFI)	p-Wert	n	Mediane HVEM-Expression (log2)	p-Wert
CEBPA	Mut/Mut	5	4,4	0,008	10	8,8	<0,001
	Mut/Wt oder Wt	65	1,3		174	7,9	

4.3.3.4 AML Subtyp mit normalem Karyotyp, *NPM1*-Mutation und *FLT3*-Wildtyp

Wegen seiner besonderen prognostischen Relevanz wurde ergänzend isoliert der AML-Subtyp mit normalem Karyotyp, Mutation im *NPM1*-Gen und *FLT3*-Wildtyp untersucht. Dieser Subtyp lag in Kohorte_P bei 30 Patienten und in Kohorte_R bei 54 Patienten vor. Beim Vergleich mit allen anderen Patienten mit normalem Karyotyp und bekanntem Mutationsstatus der jeweiligen Kohorte war die HVEM-Expression bei diesen Patienten signifikant niedriger (Median 1,3 versus 1,9; p=0,049 in Kohorte_P und Median 7,8 versus 8,0; p=0,050 in Kohorte_R). Tabelle 4-6 fasst die Ergebnisse der Analyse zusammen.

Tabelle 4-6: HVEM-Expression und AML-Subtyp mit normalem Karyotyp, *NPM1*-Mutation und *FLT3*-Wildtyp

HVEM-Expression bei Fällen mit normalem Karyotyp, *NPM1*-Mutation und *FLT3*-Wildtyp im Vergleich mit allen anderen Fällen mit normalem Karyotyp und bekanntem Mutationsstatus. Fallzahl der jeweiligen Subgruppe (n), mediane HVEM-Expression und p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests für Kohorte_P und Kohorte_R.

Fälle mit normalem Karyotyp	Kohorte_P			Kohorte_R		
	n	Mediane HVEM-Expression (SFI)	p-Wert	n	Mediane HVEM-Expression (log2)	p-Wert
NPM1 Mutation und <i>FLT3</i> Wildtyp	30	1,3	0,049	54	7,8	0,050
Anderer <i>NPM1</i> - bzw. <i>FLT3</i> -Mutationsstatus	59	1,9		148	8,0	

4.3.4 HVEM-Expression und ELN-Risikoklassifikation

In diesem Abschnitt wird die HVEM-Expression in den verschiedenen Risikogruppen der ELN-Klassifikation [11] betrachtet. Diese Klassifikation berücksichtigt zytogenetische und molekulargenetische Befunde (vgl. Kapitel 1.1.5).

Eine Einteilung nach der ELN-Klassifikation konnte in Kohorte_P für 158 Patienten (93%) und in Kohorte_R für 492 Patienten (96%) durchgeführt werden. Die Verteilung auf die drei Risikogruppen ist für Kohorte_P in Abbildung 4-9 (A) und für Kohorte_R in Abbildung 4-9 (C) dargestellt. Der Anteil an Patienten in den unterschiedlichen Risikogruppen war in beiden Kohorten ähnlich. Die intermediäre Risikogruppe machte jeweils etwas weniger als die Hälfte aus (46% in Kohorte_P und 43% in Kohorte_R). Die günstige und die ungünstige Risikogruppe umfassten in beiden Kohorten jeweils ungefähr ein Viertel aller Patienten (24 % und 24% in Kohorte_P; 28% und 25% in Kohorte_R).

In den einzelnen Risikogruppen wurde die mediane HVEM-Expression ermittelt und mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests jeweils mit dem Median in den beiden anderen Risikogruppen der Kohorte verglichen. In Kohorte_P konnte eine signifikant höhere HVEM-Expression in der ungünstigen Risikogruppe beim Vergleich mit der günstigen und der intermediären Risikogruppe zusammen nachgewiesen werden (Median 1,9 versus 1,5; p=0,025). Beim direkten Vergleich der ungünstigen mit der günstigen Risikogruppe (Median 1,9 versus 1,4; p=0,019) konnte die Beobachtung bestätigt

werden. Beim direkten Vergleich der ungünstigen mit der intermediären Risikogruppe (Median 1,9 versus 1,6; $p=0,072$) war ein Trend zu höherer HVEM-Expression in der ungünstigen Gruppe auszumachen. In Kohorte_R konnte kein eindeutiger und signifikanter Trend zu hoher oder niedriger HVEM-Expression in einer der Risikogruppen ausgemacht werden.

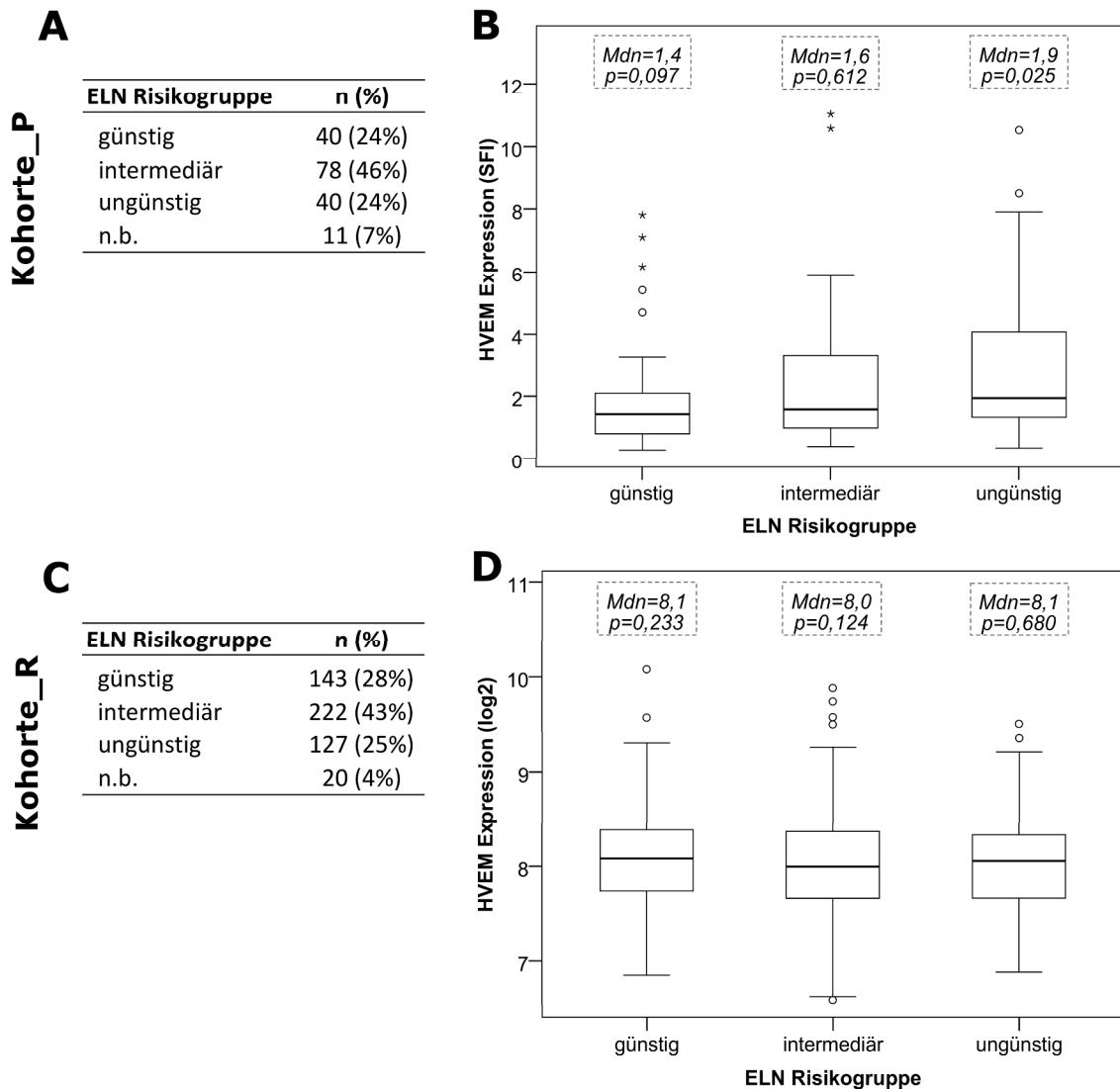


Abbildung 4-9: HVEM-Expression und ELN-Risikoklassifikation

(A) + (C) Tabellen der Verteilung der Patienten auf Risikogruppen nach den Kriterien der ELN-Klassifikation [11]. (B) + (D) Boxplots der HVEM-Expression in den Risikogruppen. p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der medianen HVEM-Expression in einer Risikogruppe mit der in den jeweils anderen Risikogruppen zusammen. (A) + (B): Kohorte_P. (C) + (D): Kohorte_R. Abkürzungen: Mdn=Median; n.b.=nicht bestimmt.

Zusammenfassend fanden sich bei Betrachtung der HVEM-Expression im Zusammenhang mit krankheitsbezogenen Charakteristika der AML in beiden Kohorten konsistente und signifikante Assoziationen der HVEM-Expressionshöhe mit der MRC-Risikoklassifikation, mit dem Vorliegen einer *NPM1*-Mutation, einer *FLT3*-ITD sowie einer biallelischen *CEBPA*-Mutation und mit dem AML-Subtyp mit normalem Karyotyp, Mutation im *NPM1*-Gen und *FLT3*-Wildtyp. Es konnte kein konsistenter und statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen HVEM-Expression und AML-Morphologie sowie zwischen HVEM-Expression und ELN-Risikoklassifikation nachgewiesen werden.

4.4 HVEM-Expression und klinischer Verlauf der AML

4.4.1 Übersicht

In beiden Kohorten wurde bei Patienten mit vollständigen klinischen Verlaufsdaten der AML eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt. Die mittlere Beobachtungszeit lag in Kohorte_P bei 328 Tagen und in Kohorte_R bei 846 Tagen. Es wurden das OS bei allen Patienten, das OS bei Patienten mit erreichter CR sowie das RFS betrachtet. Die Anzahl an Patienten mit verfügbaren klinischen Verlaufsdaten sowie das mediane OS bei allen Patienten, das mediane OS bei Patienten mit erreichter CR und das mediane RFS sind Tabelle 4-7 zu entnehmen. Der Anteil der Patienten mit erreichter CR war in Kohorte_P (97 von 157 Patienten; 62%) höher als in Kohorte_R (281 von 507 Patienten, 55%).

Tabelle 4-7: Anzahl an Patienten mit verfügbaren klinischen Daten und mediane Überlebenszeiten in beiden Kohorten

	Kohorte_P		Kohorte_R	
	n	Medianes Überleben (Tage)	n	Medianes Überleben (Tage)
OS (alle Patienten)	157	632	507	344
OS (Patienten mit erreichter CR)	97	Nicht erreicht nach 1012 Tagen (Anteil Überlebende: 59%)	281	807
RFS	97	420	275	381

Um die Repräsentativität der Kohorten und der zugehörigen Überlebensdaten in Bezug auf die Gesamtheit der AML-Patienten zu zeigen, wurden das OS bei allen Patienten,

das OS bei Patienten mit erreichter CR sowie das RFS im Zusammenhang mit den AML-Prognosefaktoren Alter bei Erstdiagnose, MRC-Risikoklassifikation und ELN-Risikoklassifikation betrachtet (Kapitel 4.4.2). Anschließend erfolgte die Analyse einer potentiellen Assoziation der HVEM-Expression mit dem klinischen Verlauf der AML (Kapitel 4.4.3). Dazu wurden das OS bei Patienten mit erreichter CR und das RFS im Zusammenhang mit der HVEM-Expressionshöhe betrachtet. Der Fokus lag darauf zu untersuchen, ob eine Korrelation der HVEM-Expressionshöhe mit der Länge der CR besteht und nicht mit dem Erreichen einer CR an sich. Aus diesem Grund wurden nur Patienten mit erreichter CR in diese Auswertung eingeschlossen (vgl. Kapitel 5.3.3.2).

4.4.2 Überleben im Zusammenhang mit den AML-Prognosefaktoren Alter bei Erstdiagnose, MRC- und ELN-Risikoklassifikation

4.4.2.1 Alter bei Erstdiagnose

In beiden Kohorten wurde die prognostische Bedeutsamkeit des Patientenalters bei Erstdiagnose untersucht. Dafür wurde analysiert, ob sich die Überlebenszeiten von über 60-jährigen und unter 60-jährigen Patienten signifikant unterscheiden. Abbildung 4-10 fasst die Ergebnisse für Kohorte_P und Kohorte_R zusammen. Die Prognose war für die Gruppe der unter 60-Jährigen in beiden Kohorten besser. In Kohorte_P waren das OS (Medianes OS nach 1012 Tagen nicht erreicht versus 479 Tage; $p=0,011$) und das RFS (617 Tage versus 316 Tage, $p=0,035$) bei unter 60-Jährigen signifikant länger als bei über 60-Jährigen. Bei Beschränkung der Analyse auf Patienten, die eine CR erreicht hatten, konnte für die Dauer des OS kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen nachgewiesen werden ($p=0,169$). In Kohorte_R war die Überlebensdauer der unter 60-jährigen Patienten bei Analyse des OS bei allen Patienten (Medianes OS 609 Tage versus 252 Tage, $p<0,001$), bei Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR (Medianes OS 2296 Tage versus 462 Tage, $p<0,001$) sowie bei Analyse des RFS (Medianes RFS 589 Tage versus 245 Tage; $p<0,001$) hochsignifikant länger.

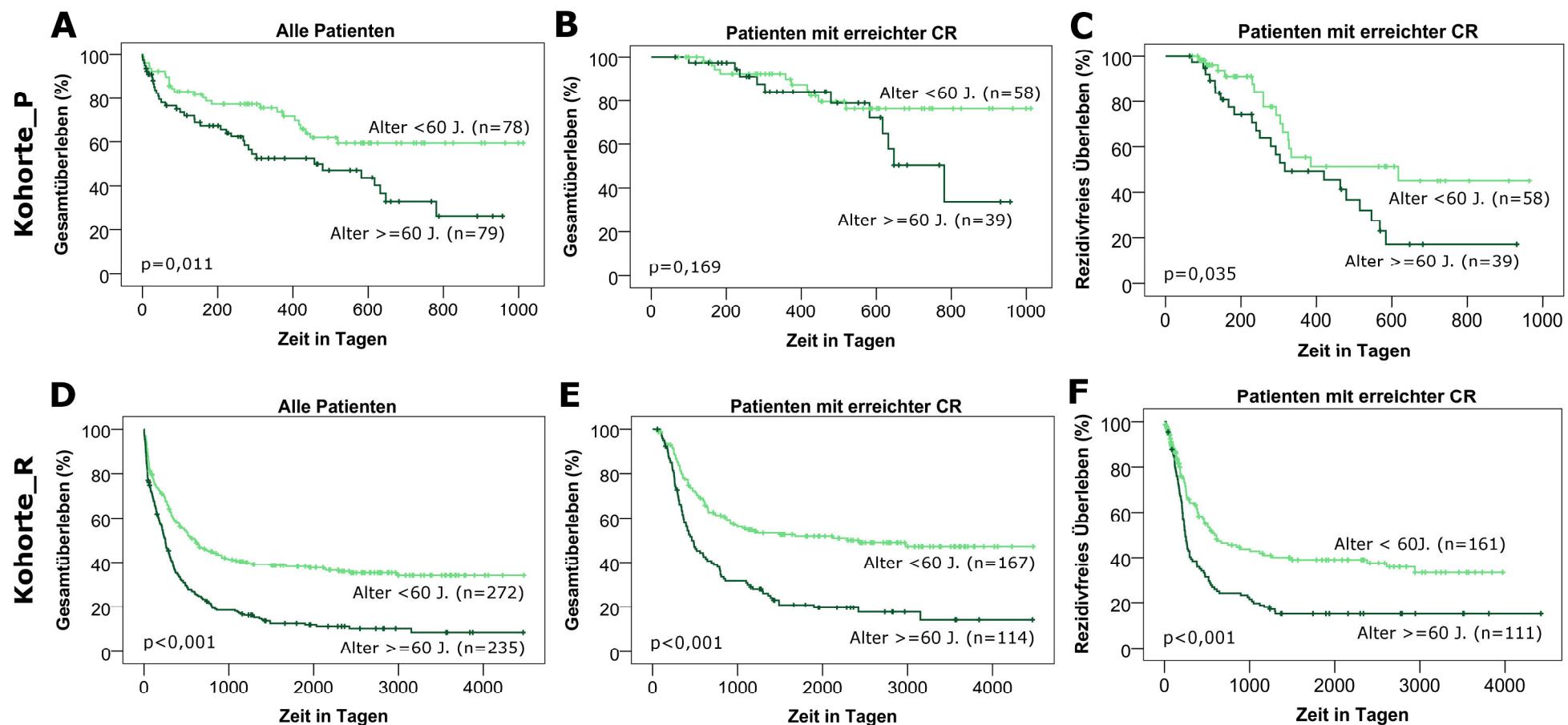


Abbildung 4-10: Überleben im Zusammenhang mit dem Alter bei Erstdiagnose

Vergleich des OS bei allen Patienten, des OS bei Patienten mit erreichter CR und des RFS zwischen über 60-Jährigen und unter 60-Jährigen. p-Werte des Log-Rank-Tests zum Vergleich der Überlebenszeiten. (A) – (C) Kohorte_P. (D) – (F) Kohorte_R.

4.4.2.2 MRC-Risikoklassifikation

In beiden Kohorten wurde analysiert, ob signifikante Unterschiede in den Überlebenszeiten beim Vergleich der drei Risikogruppen der revidierten MRC-Klassifikation nachgewiesen werden können (Abbildung 4-11). Hinsichtlich der Dauer des OS bei allen Patienten konnte in beiden Kohorten ein signifikanter Unterschied zwischen der günstigen, intermediären und ungünstigen MRC-Risikogruppe nachgewiesen werden (p jeweils $<0,001$). In Kohorte_P wurde das mediane OS sowohl in der günstigen als auch in der intermediären Risikogruppe nicht erreicht. In der günstigen Gruppe betrug der Anteil der Überlebenden nach 805 Tagen 75% und in der intermediären Risikogruppe nach 1012 Tagen 54%. In der ungünstigen Risikogruppe lag das mediane OS bei 85 Tagen. In Kohorte_R war das mediane OS in der günstigen Risikogruppe länger (nicht erreicht nach 3710 Tagen; Anteil Überlebende: 55%) als in der intermediären (396 Tage) und der ungünstigen Risikogruppe (182 Tage). In dieser Kohorte konnten sowohl bei der Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR als auch bei Analyse des RFS vergleichbare Ergebnisse festgestellt werden (p jeweils $<0,001$; mediane Überlebenszeiten in der günstigen jeweils länger als in der intermediären und der ungünstigen Gruppe). In Kohorte_P bestand kein signifikanter Unterschied in der Dauer des OS bei Patienten mit erreichter CR ($p=0,130$). In Bezug auf das RFS konnte ebenso kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Risikogruppen nachgewiesen werden ($p=0,624$).

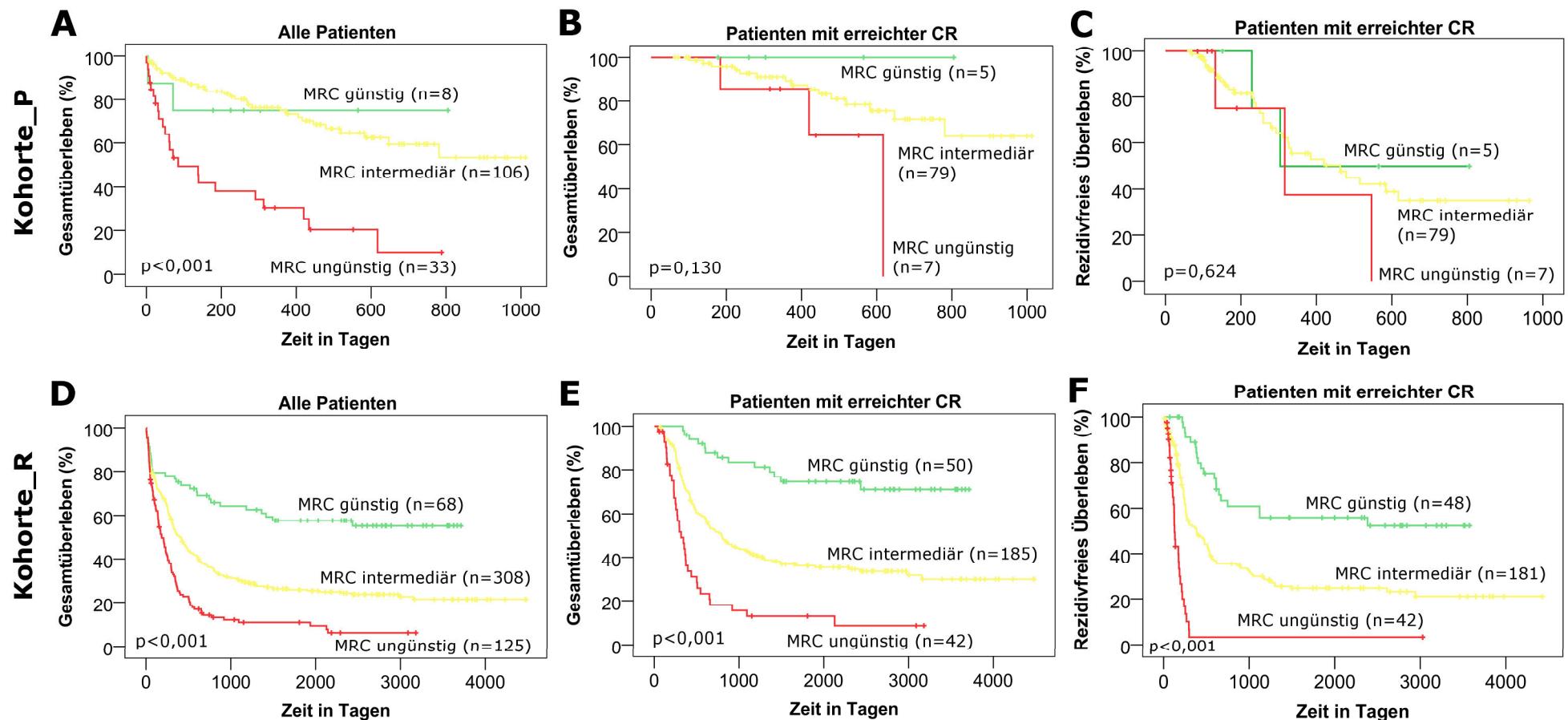


Abbildung 4-11: Überleben im Zusammenhang mit der MRC-Risikoklassifikation

Vergleich des OS bei allen Patienten, des OS bei Patienten mit erreichter CR und des RFS zwischen Patienten der günstigen, intermediären und ungünstigen Risikogruppe. p-Werte des Log-Rank-Tests. (A) – (C) Kohorte_P. (D) – (F) Kohorte_R.

4.4.2.3 ELN-Risikoklassifikation

In beiden Kohorten wurde überprüft, ob sich die Überlebenszeiten in den verschiedenen Risikogruppen der ELN-Klassifikation unterscheiden (Abbildung 4-12). Bei Betrachtung der Dauer des OS bei allen Patienten konnte in beiden Kohorten ein signifikanter Unterschied zwischen den drei ELN-Risikogruppen nachgewiesen werden (p jeweils $<0,001$). In Kohorte_P wurde das mediane OS in der günstigen Risikogruppe nach 1012 Tagen (Anteil Überlebende: 58%) und in der intermediären Risikogruppe nach 957 Tagen (Anteil Überlebende: 55%) noch nicht erreicht. In der ungünstigen Risikogruppe war das mediane OS mit 85 Tagen am kürzesten. In Kohorte_R war das mediane OS in der günstigen Risikogruppe länger (3151 Tage), als in der intermediären Risikogruppe (299 Tage) und der ungünstigen Risikogruppe (204 Tage). In dieser Kohorte konnten die Ergebnisse bei Betrachtung des OS bei Patienten mit erreichter CR und beim RFS in ähnlicher Form bestätigt werden (p jeweils $<0,001$; mediane Überlebenszeiten in der günstigen jeweils länger als in der intermediären und der ungünstigen Gruppe). In Kohorte_P konnte bei Beschränkung der Analyse auf Fälle mit erreichter CR kein Unterschied in der Dauer des OS zwischen den ELN-Risikogruppen festgestellt werden ($p=0,357$). Ebenso war das RFS in den Risikogruppen nicht signifikant verschieden ($p=0,139$).

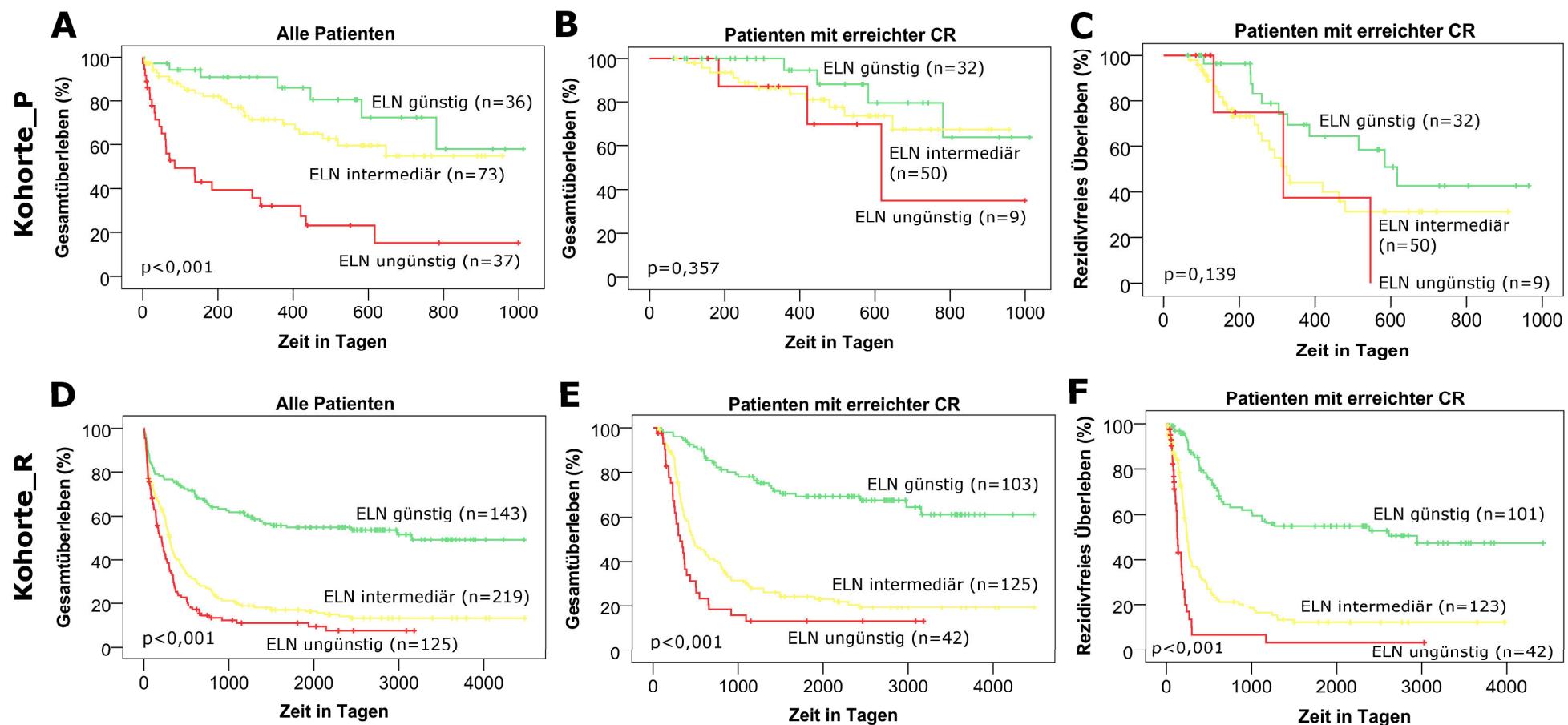


Abbildung 4-12: Überleben im Zusammenhang mit der ELN-Risikoklassifikation

Vergleich des OS bei allen Patienten, des OS bei Patienten mit erreichter CR und des RFS zwischen Patienten der günstigen, intermediären und ungünstigen Risikogruppe. p-Werte des Log-Rank-Tests. (A) – (C) Kohorte_P. (D) – (F) Kohorte_R.

Zusammenfassend konnten die gängigen AML-Prognosefaktoren in Kohorte_P für das OS bei allen Patienten und in Kohorte_R für das OS bei allen Patienten, für das OS bei Patienten mit erreichter CR sowie für das RFS als statistisch signifikant nachgewiesen werden. In Kohorte_P war zusätzlich das Alter bei Erstdiagnose als Prognosefaktor beim RFS statistisch signifikant. Bei den übrigen Analysen in Kohorte_P konnte die nach den Prognosefaktoren erwartete Verteilung der Überlebenszeiten nicht mit statistischer Signifikanz nachgewiesen werden.

4.4.3 Überleben im Zusammenhang mit der HVEM-Expression

In beiden Kohorten wurde untersucht, ob eine Assoziation der HVEM-Expression mit dem klinischen Verlauf der AML besteht. Dazu wurden das OS bei Patienten mit erreichter CR und das RFS im Zusammenhang mit der gemessenen HVEM-Expressionshöhe analysiert. Indem nur Patienten mit erreichter CR in diese Analyse eingeschlossen wurden, konnte gezielt untersucht werden, ob die HVEM-Expressionshöhe mit der Länge der Remissionserhaltung korreliert (vgl. Kapitel 5.3.3.2). Auf Basis der Expressionshöhe wurden die Patienten beider Kohorten in Quartile eingeteilt. Das OS und das RFS wurden zwischen der Gruppe mit der höchsten HVEM-Expression (25% der Patienten mit den höchsten Expressionswerten, oberes Quartil) und der Gruppe mit niedrigerer HVEM-Expression (75% der Patienten mit niedrigeren Expressionswerten, untere drei Quartile) verglichen (vgl. Kapitel 5.3.3.2). Für das OS und das RFS erfolgte jeweils eine Analyse, bei der alle Patienten mit erreichter CR eingeschlossen wurden, und weitere Analysen, bei denen jeweils nur die Patienten der günstigen, intermediären bzw. ungünstigen ELN-Risikogruppe betrachtet wurden. Alle Analysen erfolgten für Kohorte_P und Kohorte_R getrennt.

Bei der Analyse des OS konnte in Kohorte_P kein Unterschied in der Überlebenszeit zwischen Patienten mit hoher und niedriger HVEM-Expression festgestellt werden ($p=0,545$). Das mediane OS wurde in der Gruppe mit hoher Expression nach 931 Tagen (Anteil Überlebende: 64%) bzw. in der Gruppe mit niedriger Expression nach 1012 Tagen (Anteil Überlebende: 54%) noch nicht erreicht (Abbildung 4-13 (A)). In Kohorte_R wiederum zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zu einem längeren OS bei Patienten mit hoher HVEM-Expression ($p=0,080$). Die Dauer des OS betrug 1420 Tage in der Gruppe mit hoher HVEM-Expression gegenüber 720 Tagen in der Gruppe mit niedriger HVEM-Expression (Abbildung 4-13 (B)). Bei Analyse des RFS zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Überlebenszeiten zwischen den Gruppen in Kohorte_P ($p=0,358$; Abbildung 4-13 (B)) und in Kohorte_R ($p=0,484$; Abbildung 4-13 (D)).

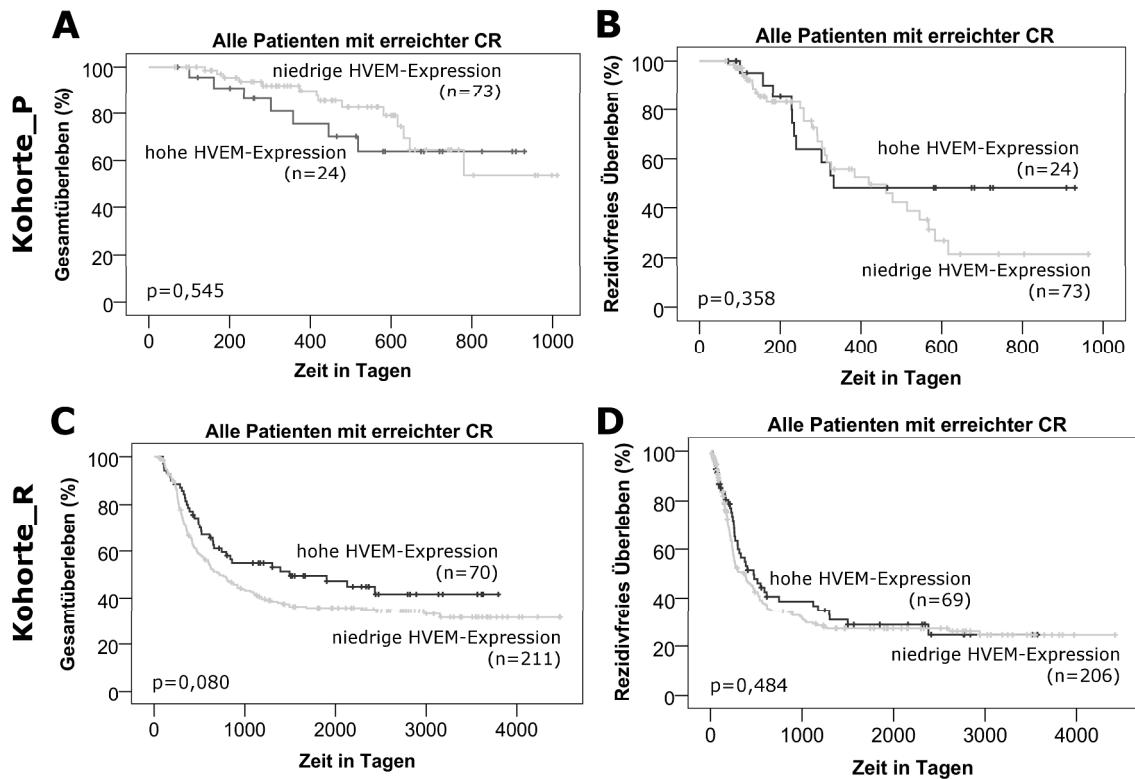


Abbildung 4-13: Überleben im Zusammenhang mit der HVEM-Expression

(A) + (B) OS bei Patienten mit erreichter CR. (C) + (D) RFS. Vergleich der Überlebenszeiten zwischen Patienten mit hoher HVEM-Expression (oberes Quartil) und niedriger HVEM-Expression (untere drei Quartile). p-Werte des Log-Rank-Tests. (A) + (B) Kohorte_P. (C) + (D) Kohorte_R.

Anschließend wurde die Analyse spezifiziert und es wurden jeweils nur Patienten einer ELN-Risikogruppe betrachtet. In der günstigen Risikogruppe konnte in beiden Kohorten kein Unterschied im OS und RFS zwischen den Gruppen mit hoher und niedriger HVEM-Expression festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-8 zusammengefasst.

Tabelle 4-8: Überleben im Zusammenhang mit der HVEM-Expression bei Patienten der günstigen ELN-Risikogruppe

Dargestellt sind OS (Patienten mit erreichter CR) und RFS. Vergleich der Überlebenszeiten zwischen Patienten mit hoher HVEM-Expression (oberes Quartil) und niedriger HVEM-Expression (untere drei Quartile). p-Werte des Log-Rank-Tests.

ELN günstig	HVEM Expression	Kohorte_P			Kohorte_R		
		n	Medianes Überleben (Tage)	p- Wert	n	Medianes Überleben (Tage)	p- Wert
OS	hoch	8	<i>nicht erreicht nach 964 Tagen</i>	0,175	25	<i>nicht erreicht nach 3625 Tagen</i>	0,817
	niedrig	24	<i>nicht erreicht nach 1012 Tagen</i>		78	<i>nicht erreicht nach 4470 Tagen</i>	
RFS	hoch	8	515	0,919	25	2381	0,811
	niedrig	24	584		76	2941	

In der intermediären ELN-Risikogruppe konnte in beiden Kohorten ein nicht-signifikanter Trend zu längerem OS bei Patienten mit hoher HVEM-Expression festgestellt werden ($p=0,142$ für Kohorte_P versus $p=0,156$ für Kohorte_R). In Kohorte_P wurde das mediane OS in der Gruppe mit hoher HVEM-Expression nach 910 Tagen (Anteil Überlebende: 91%) bzw. in der Gruppe mit niedriger HVEM-Expression nach 957 Tagen (Anteil Überlebende: 58%) nicht erreicht (Abbildung 4-14 (A)). In Kohorte_R betrug das mediane OS in der Gruppe mit hoher HVEM Expression 657 Tage gegenüber 421 Tagen in der Gruppe mit niedriger HVEM Expression (Abbildung 4-14 (C)). Bezuglich der Dauer des RFS konnte in Kohorte_P ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit hoher und niedriger HVEM-Expression festgestellt werden ($p=0,005$). Dabei wurde das mediane RFS in der Gruppe mit hoher Expression nach 910 Tagen nicht erreicht (Anteil Überlebende: 70%). In der Gruppe mit niedriger HVEM-Expression betrug das mediane RFS 279 Tage (Abbildung 4-14 (B)). Diese Beobachtung konnte in Kohorte_R nicht bestätigt werden ($p=0,417$). Es konnte kein Unterschied in der Dauer des RFS zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (Abbildung 4-14 (D)).

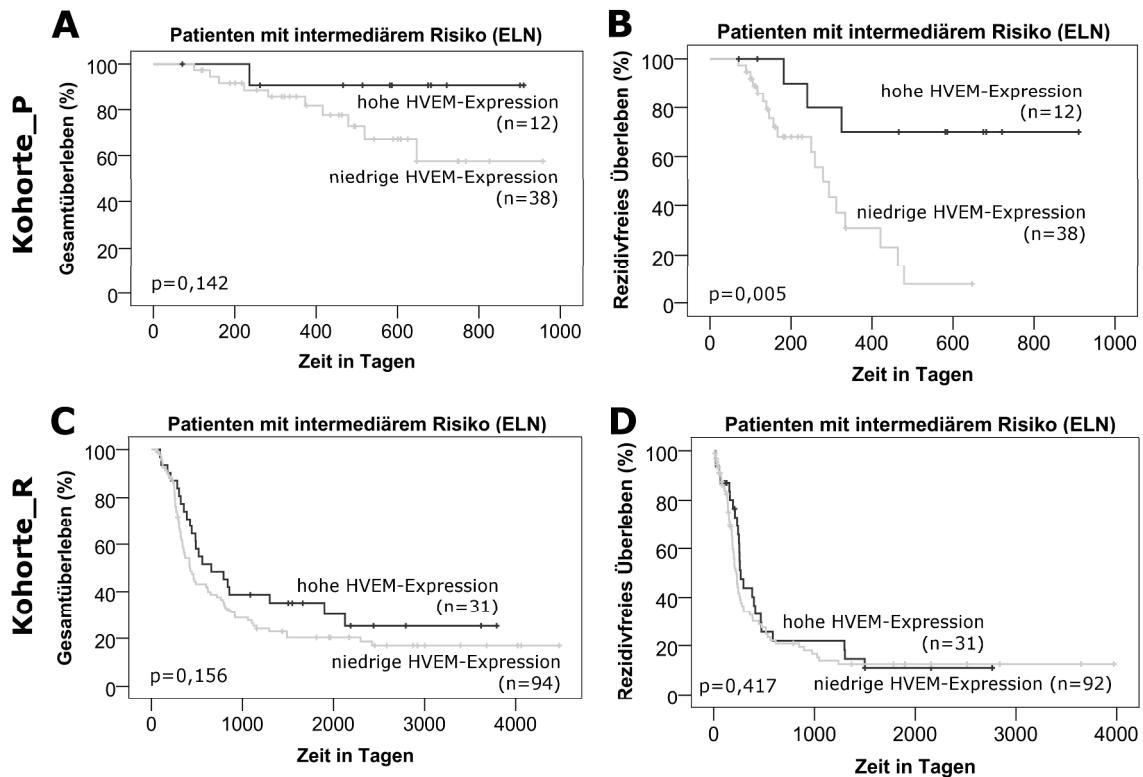


Abbildung 4-14: Überleben im Zusammenhang mit der HVEM-Expression bei Patienten der intermediären ELN-Risikogruppe

(A) + (B) OS bei Patienten mit erreichter CR. (C) + (D) RFS. Vergleich der Überlebenszeiten zwischen Patienten mit hoher HVEM-Expression (oberes Quartil) und niedriger HVEM-Expression (untere drei Quartile). p-Werte des Log-Rank-Tests. (A) + (B) Kohorte_P. (C) + (D) Kohorte_R.

In der ungünstigen ELN-Risikogruppe konnte in Kohorte_P keine Analyse durchgeführt werden, da die Fallzahl (n=9) zu gering war. In Kohorte_R konnte in dieser Risikogruppe weder für das OS noch für das RFS ein Unterschied zwischen den Gruppen mit hoher und niedriger HVEM-Expression festgestellt werden (Tabelle 4-9).

Tabelle 4-9: Überleben im Zusammenhang mit der HVEM-Expression bei Patienten der ungünstigen ELN-Risikogruppe

Dargestellt sind OS (Patienten mit erreichter CR) und RFS. Vergleich der Überlebenszeiten zwischen Patienten mit hoher HVEM-Expression (oberes Quartil) und niedriger HVEM-Expression (untere drei Quartile). p-Werte des Log-Rank-Tests.

ELN ungünstig	HVEM Expression	Kohorte_P			Kohorte_R		
		n	Medianes Überleben (Tage)	p-Wert	n	Medianes Überleben (Tage)	p-Wert
OS	hoch	<i>Fallzahl zu gering</i>			10	370	0,203
	niedrig	<i>Fallzahl zu gering</i>			32	271	
RFS	hoch	<i>Fallzahl zu gering</i>			10	100	0,442
	niedrig	<i>Fallzahl zu gering</i>			32	129	

4.4.4 Multivariate Analyse

Um zu untersuchen, ob eine potentielle Assoziation der HVEM-Expression mit dem klinischen Verlauf unabhängig von anderen, bereits etablierten Prognosefaktoren der AML ist, wurden verschiedene multivariate Analysen des OS und des RFS für beide Kohorten durchgeführt. Dies war insbesondere interessant, da in der Subgruppen-Analyse der intermediären ELN-Risikogruppe die Assoziation zwischen hoher HVEM-Expression und längerem OS bzw. RFS besonders ausgeprägt erschien (vgl. Kapitel 4.4.3). In der multivariaten Analyse wurde die HVEM-Expression sowohl in Form einer kategorialen Variable „hohe versus niedrige Expressionshöhe“ (25% der Patienten mit den höchsten Expressionswerten versus 75% der Patienten mit niedrigeren Expressionswerten) als auch in Form einer kontinuierlichen Variable betrachtet.

In Kohorte_P konnte univariat und multivariat kein Einfluss der HVEM-Expression auf die Länge des OS bei Patienten mit erreichter CR festgestellt werden (Tabelle 4-10–Tabelle 4-15). Im Hinblick auf das RFS konnte univariat ebenso kein signifikanter Einfluss beobachtet werden (Tabelle 4-16, Tabelle 4-17). In der multivariaten Analyse des RFS zeigte sich der Trend, dass eine hohe HVEM-Expression als kategoriale sowie als kontinuierliche Variable mit einem längeren RFS assoziiert ist ($p=0,091$ bzw. $p=0,052$; Tabelle 4-20 bzw. Tabelle 4-21). In diesen Analysen wurde neben der HVEM-Expression die ELN-Risikoklassifikation als Einflussfaktor betrachtet. In den weiteren multivariaten Analysen des RFS (Tabelle 4-18–Tabelle 4-19) war die HVEM-Expressionshöhe neben dem *NPM1*- und dem *FLT3*-Mutationsstatus sowie dem Karyotyp (normal versus abnormal) als Einflussfaktor nicht signifikant.

In Kohorte_R wurde in der univariaten Analyse des OS der Trend beobachtet, dass eine hohe HVEM-Expression als kategoriale sowie als kontinuierliche Variable mit einem längeren OS assoziiert ist ($p=0,081$ bzw. $p=0,102$; Tabelle 4-10 bzw. Tabelle 4-11). In der multivariaten Analyse des OS mit den Variablen HVEM-Expression (kontinuierlich), *NPM1*-und *FLT3*-Mutationsstatus sowie Karyotyp (normal versus abnormal) zeigte sich der Trend, dass eine hohe HVEM-Expression mit einem längeren OS korreliert ($p=0,118$; Tabelle 4-13). Dieser Trend war ebenso in der multivariaten Analyse des OS mit den Variablen HVEM (kategorial) und ELN-Risikoklassifikation nachweisbar ($p=0,050$; Tabelle 4-14). In den weiteren multivariaten Analysen des OS (Tabelle 4-12, Tabelle 4-15) sowie in der univariaten und multivariaten Analyse des RFS (Tabelle 4-16–Tabelle 4-21) war die HVEM-Expressionshöhe als Einflussfaktor nicht signifikant.

**Tabelle 4-10: Univariate Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR:
HVEM-Expression als kategoriale Variable**

Abkürzungen: HR=Hazard Ratio; KI=Konfidenzintervall.

OS	Kohorte_P			Kohorte_R		
	p-Wert	HR	95%-KI für HR	p-Wert	HR	95%-KI für HR
HVEM hoch/niedrig	0,547	1,324	0,532 3,297	0,081	0,723	0,502 1,041

**Tabelle 4-11: Univariate Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR:
HVEM-Expression als kontinuierliche Variable**

Abkürzungen: HR=Hazard Ratio; KI=Konfidenzintervall.

OS	Kohorte_P			Kohorte_R		
	p-Wert	HR	95%-KI für HR	p-Wert	HR	95%-KI für HR
HVEM	0,728	1,030	0,871 1,219	0,102	0,854	0,575 1,051

**Tabelle 4-12: Multivariate Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR:
Karyotyp normal versus abnormal, *NPM1* Wildtyp versus Mutation, *FLT3*
Wildtyp versus ITD und HVEM-Expression als kategoriale Variable**

Signifikanzen der Gesamtmodelle $p=0,805$ für Kohorte_P und $p<0,001$ für Kohorte_R. Abkürzungen: HR=Hazard Ratio; KI=Konfidenzintervall; CN=normaler Karyotyp; C abn=abnormaler Karyotyp.

OS	Kohorte_P			Kohorte_R		
	p-Wert	HR	95%-KI für HR	p-Wert	HR	95%-KI für HR
Karyotyp CN/C abn	0,720	1,233	0,392 3,877	<0,001	0,353	0,204 0,608
NPM1	0,722	0,834	0,306 2,270	0,006	0,531	0,339 0,832
FLT3	0,268	1,789	0,640 5,003	<0,001	2,771	1,836 4,182
HVEM hoch/niedrig	0,489	1,480	0,488 4,485	0,205	0,721	0,435 1,196

**Tabelle 4-13: Multivariate Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR:
Karyotyp normal versus abnormal, *NPM1* Wildtyp versus Mutation, *FLT3*
Wildtyp versus ITD und HVEM-Expression als kontinuierliche Variable**

Signifikanzen der Gesamtmodelle $p=0,885$ für Kohorte_P und $p<0,001$ für Kohorte_R. Abkürzungen: HR=Hazard Ratio; KI=Konfidenzintervall; CN=normaler Karyotyp; C abn=abnormaler Karyotyp.

OS	Kohorte_P			Kohorte_R		
	p-Wert	HR	95%-KI für HR	p-Wert	HR	95%-KI für HR
Karyotyp CN/C abn	0,910	1,067	0,351 3,239	<0,001	0,337	0,195 0,584
NPM1	0,615	0,771	0,280 2,124	0,004	0,501	0,314 0,799
FLT3	0,333	1,654	0,598 4,578	<0,001	2,719	1,802 4,102
HVEM	0,958	0,994	0,793 1,246	0,118	0,713	0,467 1,090

Tabelle 4-14: Multivariate Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR: ELN-Risikoklassifikation günstig versus intermediär versus ungünstig und HVEM-Expression als kategoriale Variable

Signifikanzen der Gesamtmodelle: $p=0,532$ für Kohorte_P und $p<0,001$ für Kohorte_R. Abkürzungen: HR=Hazard Ratio; KI=Konfidenzintervall.

OS	Kohorte_P			Kohorte_R		
	p-Wert	HR	95%-KI für HR	p-Wert	HR	95%-KI für HR
ELN	0,351			<0,001		
-günstig						
-intermediär	0,423	1,615	0,500 5,211	<0,001	4,207	2,821 6,273
-ungünstig	0,149	3,066	0,670 14,023	<0,001	6,976	4,283 11,360
HVEM	0,616	1,312	0,454 3,796	0,050	0,685	0,469 1,000
hoch/niedrig						

Tabelle 4-15: Multivariate Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR: ELN-Risikoklassifikation günstig versus intermediär versus ungünstig und HVEM-Expression als kontinuierliche Variable

Signifikanzen der Gesamtmodelle: $p=0,575$ für Kohorte_P und $p<0,001$ für Kohorte_R. Abkürzungen: HR=Hazard Ratio; KI=Konfidenzintervall.

OS	Kohorte_P			Kohorte_R		
	p-Wert	HR	95%-KI für HR	p-Wert	HR	95%-KI für HR
ELN	0,381			<0,001		
-günstig						
-intermediär	0,351	1,732	0,546 5,489	<0,001	4,135	2,774 6,164
-ungünstig	0,170	2,867	0,637 12,905	<0,001	6,713	4,113 10,956
HVEM	0,850	0,980	0,793 1,211	0,291	0,854	0,638 1,144

Tabelle 4-16: Univariate Analyse des RFS: HVEM-Expression als kategoriale Variable

Abkürzungen: HR=Hazard Ratio; KI=Konfidenzintervall.

RFS	Kohorte_P			Kohorte_R		
	p-Wert	HR	95%-KI für HR	p-Wert	HR	95%-KI für HR
HVEM	0,360	0,713	0,345 1,472	0,484	0,884	0,627 1,248
hoch/niedrig						

Tabelle 4-17: Univariate Analyse des RFS: HVEM-Expression als kontinuierliche Variable

Abkürzungen: HR=Hazard Ratio; KI=Konfidenzintervall.

RFS	Kohorte_P			Kohorte_R		
	p-Wert	HR	95%-KI für HR	p-Wert	HR	95%-KI für HR
HVEM	0,234	0,916	0,793 1,058	0,442	0,888	0,656 1,202

Tabelle 4-18: Multivariate Analyse des RFS: Karyotyp normal versus abnormal, NPM1 Wildtyp versus Mutation, FLT3 Wildtyp versus ITD und HVEM-Expression als kategoriale Variable

Signifikanzen der Gesamtmodelle $p=0,060$ für Kohorte_P und $p<0,001$ für Kohorte_R. Abkürzungen: HR=Hazard Ratio; KI=Konfidenzintervall; CN=normaler Karyotyp; C abn=abnormaler Karyotyp.

RFS	Kohorte_P			Kohorte_R		
	p-Wert	HR	95%-KI für HR	p-Wert	HR	95%-KI für HR
Karyotyp CN/C abn	0,588	0,769	0,297 1,990	<0,001	0,376	0,221 0,640
NPM1	0,518	0,775	0,357 1,681	0,002	0,494	0,316 0,773
FLT3	0,004	2,943	1,413 6,130	<0,001	2,438	1,614 3,683
HVEM hoch/niedrig	0,361	0,684	0,304 1,543	0,834	0,951	0,591 1,529

Tabelle 4-19: Multivariate Analyse des RFS: Karyotyp normal versus abnormal, NPM1 Wildtyp versus Mutation, FLT3 Wildtyp versus ITD und HVEM-Expression als kontinuierliche Variable

Signifikanzen der Gesamtmodelle $p=0,032$ für Kohorte_P und $p<0,001$ für Kohorte_R. Abkürzungen: HR=Hazard Ratio; KI=Konfidenzintervall; CN=normaler Karyotyp; C abn=abnormaler Karyotyp.

RFS	Kohorte_P			Kohorte_R		
	p-Wert	HR	95%-KI für HR	p-Wert	HR	95%-KI für HR
Karyotyp CN/C abn	0,543	0,752	0,301 1,880	<0,001	0,374	0,220 0,635
NPM1	0,402	0,721	0,336 1,548	0,002	0,484	0,307 0,765
FLT3	0,005	2,853	1,369 5,945	<0,001	2,432	1,610 3,675
HVEM	0,156	0,878	0,733 1,051	0,671	0,916	0,612 1,372

Tabelle 4-20: Multivariate Analyse des RFS: ELN-Risikoklassifikation günstig versus intermediär versus ungünstig und HVEM-Expression als kategoriale Variable

Signifikanzen der Gesamtmodelle: $p=0,069$ für Kohorte_P und $p<0,001$ für Kohorte_R. Abkürzungen: HR=Hazard Ratio; KI=Konfidenzintervall.

RFS	Kohorte_P			Kohorte_R		
	p-Wert	HR	95%-KI für HR	p-Wert	HR	95%-KI für HR
ELN	0,059			<0,001		
-günstig						
-intermediär	0,019	2,523	1,164 5,469	<0,001	3,696	2,561 5,333
-ungünstig	0,225	2,223	0,612 8,075	<0,001	8,493	5,255 13,728
HVEM	0,091	0,492	0,216 1,119	0,711	0,934	0,653 1,338
hoch/niedrig						

Tabelle 4-21: Multivariate Analyse des RFS: ELN-Risikoklassifikation günstig versus intermediär versus ungünstig und HVEM-Expression als kontinuierliche Variable

Signifikanzen der Gesamtmodelle: $p=0,031$ für Kohorte_P und $p<0,001$ für Kohorte_R. Abkürzungen: HR=Hazard Ratio; KI=Konfidenzintervall.

RFS	Kohorte_P			Kohorte_R		
	p-Wert	HR	95%-KI für HR	p-Wert	HR	95%-KI für HR
ELN	0,061			<0,001		
-günstig						
-intermediär	0,021	2,414	1,144 5,094	<0,001	3,688	2,556 5,321
-ungünstig	0,170	2,473	0,678 9,018	<0,001	8,658	5,315 14,105
HVEM	0,052	0,839	0,703 1,002	0,829	1,033	0,768 1,390

5. Diskussion

5.1 Einführung

HVEM nimmt in der Gruppe der kostimulierenden und koinhibierenden Moleküle eine besondere Stellung ein. Das Molekül interagiert mit mehreren Bindungspartnern aus zwei Superfamilien (TNF-Rezeptor- und Ig-Superfamilie) [99,102] und ist sowohl an kostimulierenden als auch an koinhibierenden Signalwegen beteiligt [99]. Daraus ergibt sich ein komplexes System von Signalwegen, das im Kontext der Immunabwehr von Tumoren eine zunehmende Beachtung erfährt. In diesem Zusammenhang werden HVEM und seine Bindungspartner als potentielle neue Zielstrukturen in der Tumor-Immuntherapie diskutiert [108]. Das generelle Potential von kostimulierenden und koinhibierenden Molekülen im Rahmen von immuntherapeutischen Ansätzen wurde deutlich durch die großen klinischen Erfolge mit den Antikörpern gegen CTLA-4 (Ipilimumab [75,76]) und PD-L1 (Nivolumab [79,80,83,84], Pembrolizumab [89,90,93]), die zur Therapie des fortgeschrittenen malignen Melanoms (Ipilimumab [77,78], Nivolumab [81,82] und Pembrolizumab [91,92]) bzw. des fortgeschrittenen Nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms (Nivolumab [85-87], Pembrolizumab [94]) zugelassen wurden. Die potentielle Wirksamkeit einer Modulation des HVEM-Signalwegs im Rahmen der Tumor-Immuntherapie wurde bisher nur im Zusammenhang mit soliden Tumoren betrachtet [108,112-114].

Die Integration von immuntherapeutischen Strategien in das Therapiekonzept der AML gilt als erfolgsversprechender Ansatz [55,63]. Der Hintergrund ist, dass nach der initialen Chemotherapie von der Mehrzahl der AML-Patienten zwar eine CR erreicht wird, in diesem Stadium jedoch in der Regel noch zurückbleibende leukämische Zellen nachweisbar sind und die sogenannte MRD bilden [49]. Als Postremissionstherapie zur Elimination der MRD erwies sich die allogene SZT mit den niedrigsten Rezidivraten als besonders erfolgreich [11]. Damit wurde die zentrale Rolle des Immunsystems bei der Abwehr der Leukämie verdeutlicht, da eine effektive Immunantwort durch das Abwehrsystem des Spenders, der sogenannte GvL-Effekt (vgl. Kapitel 1.1.6.2), maßgeblich zur Wirksamkeit der SZT beiträgt [55-57]. Da die allogene SZT nicht für jeden Patienten geeignet ist (vgl. Kapitel 1.1.6.1), werden alternative immuntherapeutische Strategien gesucht, die aktivierend auf das Immunsystem wirken. Damit soll der Umfang und die Effektivität von endogenen, gegen die Leukämie gerichteten Immunantworten gesteigert werden [55]. Vorteilhaft ist, dass die AML als hämatologische Neoplasie mit Ausbreitung in Blut und Knochenmark besonders gut durch Effektoren des Immunsystems erreicht werden kann.

Auch im Kontext der AML sind kostimulierende und koinhibierende Moleküle als therapeutische Angriffspunkte potentiell interessant. Dies zeigten Mausmodelle sowie erste klinische Tests, in denen die Moleküle CTLA-4 [131,132], PD-1 bzw. seine Liganden PD-L1 und PD-L2 [133-135] sowie Tim-3 bzw. sein Ligand Galektin-9 [136] als mögliche therapeutische Zielstrukturen identifiziert wurden. Das Expressionsmuster sowie der Einfluss auf die Tumor-Immunabwehr von HVEM wurden im Zusammenhang mit der AML bisher nicht systematisch untersucht. Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Expression von HVEM auf leukämischen Zellen zu charakterisieren und potentielle Zusammenhänge mit zytomorphologischen, zytogenetischen und molekulargenetischen Charakteristika sowie dem Erkrankungsverlauf der AML zu identifizieren.

Dazu wurde die HVEM-Expression auf Knochenmarkproben von AML-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gemessen und im Zusammenhang mit krankheitsbezogenen Charakteristika sowie klinischen Verlaufsdaten analysiert. Die HVEM-Expressionshöhe wurde hierbei in zwei unabhängigen Patientenkohorten auf Protein- (Kohorte_P, n=169) bzw. mRNA-Ebene (Kohorte_R, n=512) bestimmt. Die Ergebnisse der Analyse zeigen erstmals, dass HVEM in Abhängigkeit von molekulargenetischen Veränderungen unterschiedlich stark exprimiert wird (vgl. Kapitel 4.3). In beiden Kohorten wurde HVEM bei Patienten mit Mutation im *NPM1*-Gen (vgl. Kapitel 4.3.3.1) und bei Patienten mit einer ITD des *FLT3*-Gens (vgl. Kapitel 4.3.3.2) signifikant niedriger exprimiert als bei Patienten mit dem jeweiligen Wildtyp-Gen. Bei Patienten mit biallelischer *CEBPA*-Mutation (vgl. Kapitel 4.3.3.3) zeigte sich in beiden Kohorten eine signifikant höhere HVEM-Expression als bei Patienten mit monoallelischer *CEBPA*-Mutation und *CEBPA*-Wildtyp. Zudem zeigte sich bei der Analyse des OS und des RFS der Trend, dass eine höhere HVEM-Expression mit einem besseren klinischen Verlauf der AML assoziiert ist (vgl. Kapitel 4.4.3).

In den folgenden Abschnitten werden zunächst die angewandten Methoden kritisch betrachtet und nachfolgend die Ergebnisse der Arbeit im Kontext des aktuellen Forschungsstands diskutiert.

5.2 Diskussion der Methoden

5.2.1 Patientenkohorten und Datenerhebung

Für die vorliegende Arbeit wurde die HVEM-Expression in zwei unabhängigen Patientenkohorten und mit unterschiedlichen Messmethoden bestimmt. Der Vorteil bei der Betrachtung von zwei unabhängigen Patientenkohorten liegt darin, dass ein direkter Vergleich der Beobachtungen möglich ist und dadurch eine orientierende

Aussage zur Reliabilität der Ergebnisse gemacht werden kann. Die Voraussetzung dafür ist, dass eine Vergleichbarkeit sowohl der Patientenkollektive als auch der Messmethoden gegeben ist und dass bestehende Unterschiede in der Auswertung berücksichtigt werden.

In Kohorte_P erfolgte die Messung der HVEM-Expression auf Proteinebene bei 169 Patienten mittels Durchflusszytometrie. In Kohorte_R wurde die HVEM-Expression auf mRNA-Ebene bei 512 Patienten im Rahmen einer Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays bestimmt. Neben der HVEM-Expressionshöhe wurden in beiden Kohorten demographische (Alter, Geschlecht) und krankheitsbezogene Daten (Daten zu Zytomorphologie, Zytogenetik und Molekulargenetik der AML) sowie Daten zum klinischen Verlauf der Erkrankung erhoben. Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die erhobenen Daten im Zusammenhang mit der HVEM-Expressionshöhe zu untersuchen (vgl. Kapitel 4.3 und 5.3.2). Es wurde zudem geprüft, ob die krankheitsbezogenen Daten und die klinischen Verlaufsdaten in Bezug auf die Gesamtheit der AML-Patienten repräsentativ sind, ob die beiden Kohorten hinsichtlich der Parameter vergleichbar sind und die Patienten ähnliche Charakteristika aufweisen (vgl. Kapitel 5.3.2).

Die Messung der HVEM-Expression erfolgte immer zum gleichen Zeitpunkt (Erstdiagnose) und gewährleistet damit vergleichbare Bedingungen zwischen beiden Kohorten. Die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Messmethoden der HVEM-Expressionshöhe wird ausführlich im folgenden Kapitel (Kapitel 5.2.2) diskutiert. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Kohorten bestand in der Fallzahl der Patienten. In Kohorte_R (n=512) wurden mehr als dreimal so viele Patienten betrachtet wie in Kohorte_P (n=169). Insbesondere bei Subgruppenanalysen stellte die geringe Größe der Kohorte_P teilweise einen Nachteil dar, weil gewisse Auswertungen aufgrund kleiner Fallzahlen nicht durchgeführt werden konnten (vgl. Kapitel 4.4.3) bzw. die Aussagekraft eingeschränkt war (vgl. Kapitel 5.3.3.1). Daneben waren auch die Erstdiagnosezeitpunkte und -räume unterschiedlich: In Kohorte_R waren diese über einen längeren Zeitraum verteilt (1999–2005) und fanden zeitlich vor jenen der Kohorte_P (2010–2011) statt. Dies hatte zur Folge, dass gewisse krankheitsbezogene Daten, die in späteren Jahren bereits mit zur Routinediagnostik gehörten, für frühere Jahre nicht mitbestimmt wurden und daher für die Analysen nicht zur Verfügung standen (z. B. *NPM1*-Mutationsstatus). Für den Vergleich der klinischen Verlaufsdaten war es wichtig, dass die Qualität der Behandlung sowie die Therapieschemata innerhalb und zwischen den Kohorten vergleichbare Standards erfüllen. Dies kann als gegeben angesehen werden, da alle Patienten beider Kohorten im Rahmen von Studien der AMLCG-Studiengruppe (Kohorte_P: 99 von 169 Patienten; Kohorte_R:

512 von 512 Patienten) bzw. nach Therapieempfehlungen dieser (Kohorte_P: 70 von 169 Patienten) behandelt wurden. Bei der AMLCG handelt es sich um eine deutsche Studiengruppe, die seit vielen Jahren im Rahmen von multizentrischen Studien AML-Therapieprotolle untersucht [116].

Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie (APL) wurden aus beiden Kohorten für die Analysen ausgeschlossen, da es sich um eine morphologisch (FAB Typ M3) und molekulargenetisch (Translokation t(15;17)) definierte Subform der AML handelt, die aufgrund ihrer Pathogenese und der Verfügbarkeit einer molekulargenetisch zielgerichteten Therapie von den anderen AML-Subtypen abzugrenzen ist [1]. Aus diesem Grund ist der FAB-Subtyp M3 in den Ergebnissen nicht aufgeführt. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die günstigen Prognosegruppen der ELN- und der MRC-Risikoklassifikation definitionsgemäß auch die APL-Patienten enthalten und in der vorliegenden Arbeit dahingehend reduziert sind.

5.2.2 Durchflusszytometrie und Mikroarray-Genexpressionsanalyse

Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Messmethoden zur Quantifizierung der HVEM-Expressionshöhe in Kohorte_P und Kohorte_R wirft die Frage auf, inwieweit die gemessenen Werte miteinander vergleichbar sind. In diesem Kontext ist zunächst wichtig, dass die HVEM-Expressionshöhe auf unterschiedlichen Ebenen betrachtet wurde: In Kohorte_P auf Protein-Ebene und in Kohorte_R auf mRNA-Ebene. Eine Überprüfung der Korrelation zwischen der Höhe der HVEM-Expression auf Protein- sowie auf mRNA-Ebene war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da die jeweiligen Messungen zum Zeitpunkt der Auswertung nur für Kohorte_P bzw. nur für Kohorte_R vorlagen. Um eine Aussage bezüglich der Vergleichbarkeit der Werte machen zu können, ergibt sich zunächst die zentrale Frage, ob die Höhe der mRNA-Expression eines Gens mit der Menge des Genprodukts, also der Protein-Konzentration, korreliert.

In der Literatur wird diese Frage kontrovers diskutiert. Es herrscht Konsens darüber, dass generell eine Korrelation zwischen der Menge an mRNA und dem korrespondierendem Protein besteht. Deren Höhe sowie die beeinflussenden Faktoren sind jedoch nach wie vor Gegenstand der Diskussion [137-140]. Neben der Regulation der Transkription, die die Höhe der mRNA-Konzentration bestimmt, beeinflussen weitere, nachgeschaltete Regulationsmechanismen die Höhe der Proteinkonzentration. Dazu zählen post-transkriptionelle Regulationsmechanismen, die Regulation der Protein-Translation sowie die Regulation des Protein-Abbaus [139]. Zudem wird vermutet, dass die Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Konzentration variiert, je

nachdem welches Gen betrachtet wird [137]. Im Kontext der AML wurden zwei Studien durchgeführt, bei denen die Korrelation zwischen Protein- und mRNA-Expressionshöhe von diagnostisch relevanten Genen analysiert wurde [141,142]. Die Messung der Protein-Expressionshöhe erfolgte in beiden Arbeiten durchflusszytometrisch und die Gen-Expressionshöhe wurde jeweils mittels Mikroarray-Analysen bestimmt. In beiden Studien wurde eine hochsignifikante Korrelation zwischen Protein- und mRNA-Expressionshöhe festgestellt [141,142].

In der vorliegenden Arbeit wurde die HVEM-Expressionshöhe in Kohorte_P durchflusszytometrisch und in Kohorte_R im Rahmen einer Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays bestimmt. In einer nachfolgenden Untersuchung wurden diese Daten erweitert, um die Korrelation zwischen der HVEM-Expression auf Protein- und auf mRNA-Ebene zu analysieren [143]. Mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Analyse wurde die HVEM-Expression bei 14 Patienten der Kohorte_P zusätzlich auf mRNA-Ebene bestimmt. Es handelte sich dabei um 6 Patienten mit besonders hoher und um 8 Patienten mit besonders niedriger HVEM-Expression auf Protein-Ebene. Die Höhe der HVEM-Expression auf mRNA-Ebene wurde zwischen diesen beiden Patientengruppen verglichen. Dabei konnte eine signifikant höhere HVEM-Expression auf mRNA-Ebene bei den Patienten mit hoher HVEM-Expression auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen sowie auf den Untersuchungen von Kern et al. [141,142] kann daher die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine Korrelation zwischen der HVEM-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene wahrscheinlich und ein Vergleich der Messergebnisse der beiden Methoden zulässig ist.

Beim Vergleich der Expressionswerte von Kohorte_P und von Kohorte_R muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass ein Unterschied zwischen den betrachteten Zellpopulationen bestand. Bei allen Patienten beider Kohorten wurde bei Erstdiagnose eine Knochenmarkpunktion durchgeführt und die MNZ aus der Probe isoliert. In Kohorte_P erfolgte zur möglichst spezifischen Charakterisierung des HVEM-Expressionsmusters auf leukämischen Zellen anschließend durchflusszytometrisch die Identifizierung der CD33-positiven Blasten aus allen MNZ, und die HVEM-Expression wurde selektiv auf dieser Zellpopulation bestimmt. In Kohorte_R wurde zum Zeitpunkt der Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays keine weitere Zellselektion durchgeführt. Zur Genexpressionsanalyse wurde die RNA von allen MNZ der Knochenmarkprobe verwendet. Für die vorliegende Arbeit bestand keine Möglichkeit, eine spezifischere Selektion leukämischer Zellen für diese Messungen nachzuholen. Durch Betrachtung der jeweils identischen Zellpopulationen hätte eine bessere Vergleichbarkeit der HVEM-Expressionshöhen zwischen den beiden Kohorten erreicht werden können. Es

war jedoch nicht Ziel der vorliegenden Arbeit, die Vergleichbarkeit der beiden Kohorten zu optimieren, sondern möglichst akkurat das HVEM-Expressionsmuster auf leukämischen Zellen zu beschreiben. Aus diesem Grund wurde in Kohorte_P die spezifische Selektion der leukämischen Zellen aus allen MNZ durchgeführt und auf eine Optimierung der Vergleichbarkeit verzichtet.

5.2.3 Statistische Auswertung: Überlebenszeitanalyse

Für beide Kohorten wurden klinische Verlaufsdaten der Patienten erhoben und ausgewertet (Kohorte_P: n=157; Kohorte_R: n=507). Das OS wurde in beiden Kohorten auf gleiche Weise berechnet (Zeit ab Erstdiagnose, vgl. Kapitel 3.3), jedoch bestanden Unterschiede bei der Berechnung des RFS. Für Kohorte_P wurde das RFS ab dem Zeitpunkt der Erstdiagnose, für Kohorte_R ab dem Zeitpunkt der CR berechnet. Für Patienten der Kohorte_P war bei der retrospektiven Erhebung der klinischen Verlaufsdaten das exakte Datum der CR in vielen Fällen nicht bestimmbar. Es konnte nur erhoben werden, ob eine CR erreicht worden war oder nicht. Daher wurde für die Patienten mit erreichter CR das RFS ab dem Datum der Erstdiagnose berechnet. Für die Patienten der Kohorte_R wurden die klinischen Verlaufsdaten im Rahmen der prospektiven AMLCG 99-Studie dokumentiert und das RFS wurde dabei ab dem Datum der CR berechnet. Der Unterschied in der Berechnung ist für die Auswertungen in der vorliegenden Arbeit vernachlässigbar, da die Länge des RFS nur zwischen Patienten innerhalb der jeweiligen Kohorte verglichen wurde. Ein direkter Vergleich der absoluten Länge des RFS zwischen Kohorte_P und Kohorte_R wäre aufgrund der unterschiedlich langen Beobachtungszeiträume (vgl. Kapitel 5.3.3.2) ohnehin nicht möglich.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 HVEM Expression

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals in zwei großen, unabhängigen Patientenkollektiven nachgewiesen werden, dass HVEM auf leukämischen Zellen von AML-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose unterschiedlich stark exprimiert wird. Bis dato wurde die HVEM-Expression im Kontext der AML nicht systematisch und im Kontext von großen Patientenkollektiven untersucht. Es existieren nur drei Studien, im Rahmen derer die HVEM-Expression auf AML-Zelllinien [110,115] sowie bei einer sehr kleinen Anzahl von AML-Patienten betrachtet wurde (n=2 [109] bzw. n=8 [115]). Eine aussagekräftige Charakterisierung des Expressionsverhaltens ist mit derart kleinen Fallzahlen nicht möglich. Zudem wurde in diesen Analysen nur die Expressionshöhe

als solche und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, der Zusammenhang mit krankheitsbezogenen Charakteristika und dem klinischen Verlauf der AML betrachtet.

5.3.2 Korrelation der HVEM-Expression mit demographischen und krankheitsbezogenen Daten

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die HVEM-Expressionshöhe im Zusammenhang mit krankheitsbezogenen Charakteristika der AML zu betrachten und potentielle Assoziationen aufzudecken. Im diesem Kapitel werden die Ergebnisse dieser Analysen diskutiert. Hierbei werden nachfolgend zunächst die demographischen (Alter, Geschlecht) und krankheitsbezogenen Daten (Daten zu Zytomorphologie, Zytogenetik und Molekulargenetik der AML) zum einen zwischen den beiden Kohorten verglichen und zum anderen im Hinblick auf ihre Repräsentativität in Bezug auf die Gesamtheit der AML-Patienten betrachtet. Danach wird jeweils ein potentieller Zusammenhang dieser Daten mit der HVEM-Expressionshöhe diskutiert. Die Häufigkeitsverteilung der demographischen und krankheitsbezogenen Daten ist besonders relevant für den im nächsten Kapitel (Kapitel 5.3.3) diskutierten Zusammenhang der HVEM-Expression mit dem klinischen Verlauf der AML. Es soll ausgeschlossen werden, dass beim Vergleich der Überlebensdaten beider Kohorten im Zusammenhang mit der HVEM-Expression eine systematische Verzerrung durch unterschiedliche Altersstrukturen und/oder eine Über- bzw. Unterrepräsentation von bestimmten Prognosegruppen auftritt.

5.3.2.1 HVEM-Expression und demographische Daten

Das mediane Alter bei Erstdiagnose war in beiden Kohorten annähernd identisch und lag dabei mit 59 Jahren in Kohorte_P und 58 Jahren in Kohorte_R deutlich unterhalb des in der Literatur beschriebenen medianen Erkrankungsalters von 66 bis 72 Jahren [2-5] (vgl. Kapitel 1.1.1). Dies lässt sich darauf zurückführen, dass Patienten, die im Rahmen klinischer Studien behandelt werden bzw. an eine universitäre Klinik angebunden sind, in der Regel durchschnittlich jünger sind als die Gesamtheit der Patienten einer Erkrankung. Die Geschlechterverteilung war in Kohorte_R vollständig und in Kohorte_P annähernd ausgeglichen, mit einem etwas höheren Anteil männlicher Patienten. Diese Beobachtungen liegen im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Geschlechterverteilungen bei AML-Patienten [3,4]. Somit können die demographischen Daten der Kohorten als vergleichbar und in Bezug auf die Gesamtheit der AML-Patienten als weitestgehend repräsentativ angesehen werden.

Ein signifikanter Zusammenhang mit der HVEM-Expression wurde weder für das Alter bei Erstdiagnose noch für das Geschlecht festgestellt. Lediglich in Kohorte_P wurde bei über 70-Jährigen ein nicht-signifikanter Trend zu einer leicht erhöhten HVEM-

Expression ermittelt. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die betrachtete Subgruppe sehr klein war ($n=16$) und die Aussagekraft daher eingeschränkt ist. Für die weiteren Analysen war es wichtig, eine Assoziation zwischen dem Alter bei Erstdiagnose und der HVEM-Expression auszuschließen, da das Alter einen wichtigen Prognosefaktor darstellt (vgl. Kapitel 1.1.5). Ein möglicher Zusammenhang hätte bei der Auswertung der Überlebenszeiten im Zusammenhang mit der HVEM-Expression berücksichtigt werden müssen.

5.3.2.2 HVEM-Expression und Zytomorphologie der AML

Die FAB-Klassifikation wurde verwendet, um die morphologischen Charakteristika der AML zwischen beiden Kohorten zu vergleichen und im Zusammenhang mit der HVEM-Expression zu untersuchen. Die beobachtete prozentuale Verteilung der Patienten beider Kohorten auf die FAB-Subgruppen deckte sich weitestgehend mit in der Literatur beschriebenen Häufigkeitsverteilungen [144,145]. In Kohorte_P waren lediglich die FAB-Subgruppen M1 (27%) und M2 (15%) geringfügig über- bzw. unterrepräsentiert im Vergleich mit den in Kohorte_R beobachteten (M1: 19%; M2: 25%) und in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten (M1: 15-25%; M2: 25-30%) [144,145].

Ein signifikanter und übereinstimmender Zusammenhang der FAB-Subtypen mit der Höhe der HVEM-Expression konnte in beiden Patientenkollektiven nicht gezeigt werden. Insbesondere konnte die auf Untersuchung von sieben Zelllinien basierende Hypothese von Hobo et al. [115], dass HVEM auf reiferen FAB-Subtypen (M5) stärker exprimiert wird als auf weniger differenzierten FAB-Subtypen (M0-M2), übereinstimmend in beiden untersuchten Patientenkollektiven nicht bestätigt werden.

5.3.2.3 HVEM-Expression und Zytogenetik der AML sowie Molekulargenetik der AML

Das zytogenetische Risikoprofil der Patienten beider Kohorten wurde mithilfe der revidierten MRC-Risikoklassifikation analysiert. Patienten mit normalem Karyotyp werden dabei der intermediären Risikogruppe zugeordnet. Der Anteil der Patienten mit normalem Karyotyp lag in Kohorte_P (53%) etwas oberhalb und in Kohorte_R (41%) an der unteren Grenze der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit von 40% bis 50% [15,33]. Der prozentuale Anteil der MRC-Risikogruppen war in beiden Kohorten ähnlich und stellte sich entsprechend der erwarteten Verteilung dar, bei der die Mehrheit der Patienten der intermediären MRC-Risikogruppe zugeordnet wird (MRC intermediär: Kohorte_P 68%; Kohorte_R 61%) [15,33].

In beiden Kohorten wurde der Mutationsstatus der prognostisch relevanten Gene *NPM1*, *FLT3* und *CEBPA* erhoben. Die prozentualen Häufigkeiten der Mutationen lagen im Fall von *NPM1* und *FLT3* jeweils im Bereich der in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten bzw. knapp ober- oder unterhalb dieser (vgl. Tabelle 5-1). In Kohorte_R wurde eine *NPM1*-Mutation seltener beobachtet als in Kohorte_P. Hier ist zu berücksichtigen, dass in Kohorte_R bei einem großen Anteil der Patienten der *NPM1*-Mutationsstatus nicht bekannt war (*NPM1* n.b.: Kohorte_P 2%; Kohorte_R 44%). Die Erstdiagnosezeiträume der Patienten der Kohorte_R lagen zeitlich vor denen der Kohorte_P und die Untersuchung des *NPM1*-Mutationsstatus war in früheren Jahren nicht Teil der Routinediagnostik (vgl. Kapitel 5.2.1). Die prozentuale Häufigkeit der *CEBPA*-Mutation war in beiden Kohorten identisch, lag jedoch etwas unterhalb der in der Literatur beschriebenen Werte (vgl. Tabelle 5-1). Es muss berücksichtigt werden, dass der Anteil der Patienten mit unbekanntem Mutationsstatus (*CEBPA* n.b.: Kohorte_P 48%; Kohorte_R 64%) in beiden Kohorten sehr hoch war. Dies ist zum einen dadurch bedingt, dass die Bestimmung des *CEBPA*-Mutationsstatus in früheren Jahren, analog wie im Fall von *NPM1*, noch nicht Teil der Diagnostik war. Zum anderen liegt auch aktuell keine Empfehlung vor, den *CEBPA*-Mutationsstatus bei jedem AML-Patienten zu bestimmen. Die Bestimmung erfolgt nur, falls aufgrund nicht vorliegender Mutationen im *NPM1*- und *FLT3*-Gen eine weitere Risikostratifizierung notwendig ist [40].

Tabelle 5-1: Vergleich der prozentualen Häufigkeit von *NPM1*-, *FLT3*- und *CEBPA*-Mutationen

Vergleich von Literaturangaben zur Häufigkeit von Mutationen der Gene *NPM1* [19,21], *FLT3* [21,38] und *CEBPA* [14,39,40] mit der jeweils beobachteten Häufigkeit in Kohorte_P und Kohorte_R. Abkürzungen: Mut/Mut=biallelische Mutation; Mut/Wt=monoallelische Mutation; Wt=Wildtyp.

	Häufigkeit Mutation (%)		
	Kohorte_P	Kohorte_R	Literaturangaben
NPM1	40	23	25 -35
FLT3	27	24	20 – 24
CEBPA Mut/Mut+Mut/Wt	4	4	9 -10

Anhand der zytogenetischen und molekulargenetischen Befunde wurden die Patienten in die Risikogruppen der ELN-Klassifikation eingeteilt. In beiden Kohorten wurde etwas weniger als die Hälfte der Patienten der intermediären Risikogruppe zugeordnet und jeweils etwa ein Viertel der Patienten der günstigen bzw. der ungünstigen

Risikogruppe. Damit stellte sich die Häufigkeitsverteilung in beiden Kohorten übereinstimmend mit in der Literatur beschriebenen Verteilungen dar [33,146].

Bei Betrachtung der HVEM-Expression in Zusammenhang mit dem Risikoprofil der Patienten anhand der MRC- und der ELN-Klassifikation konnte in der vorliegenden Arbeit kein eindeutiger und in beiden Kohorten übereinstimmender Zusammenhang festgestellt werden. Generell besteht bei der Einteilung von AML-Patienten in Risikogruppen anhand dieser Klassifikationssysteme das Problem, dass die Mehrzahl der Patienten in die intermediäre Risikogruppe eingestuft wird [15,33,146]. Nichtsdestotrotz liegt die Rezidivwahrscheinlichkeit in dieser großen, heterogenen Gruppe bei über 50% [33] und es existieren derzeit keine weiteren Parameter, um die Hochrisiko-Patienten innerhalb dieser Gruppe zu identifizieren. Aus diesem Grund war es besonders relevant festzustellen, ob durch eine Subgruppenanalyse der HVEM-Expression innerhalb der jeweiligen Risikogruppe eine weitere Risikostratifizierung möglich ist (vgl. Kapitel 4.4.3 und 5.3.3)

Bei Analyse des Mutationsstatus der Gene in Zusammenhang mit der HVEM-Expressionshöhe konnte in beiden Kohorten übereinstimmend gezeigt werden, dass die HVEM-Expression bei Patienten mit Mutation im *NPM1*-Gen und bei Patienten mit einer ITD des *FLT3*-Gens signifikant niedriger ist als bei Patienten mit dem Wildtyp des jeweiligen Gens. Bei Patienten mit biallelischer *CEBPA*-Mutation wurde in beiden Kohorten eine signifikant höhere HVEM-Expression festgestellt im Vergleich zu Patienten mit monoallelischer *CEBPA*-Mutation und *CEBPA*-Wildtyp. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass HVEM in Abhängigkeit von molekulargenetischen Veränderungen bei AML-Patienten unterschiedlich stark exprimiert wird. Die Tatsache, dass die Analysen in Kohorte_P und in Kohorte_R übereinstimmende Ergebnisse lieferten und es sich um unabhängige Kohorten handelt, bei denen unterschiedliche Messmethoden verwendet wurden, stärkt die Aussagekraft und Reliabilität dieser Ergebnisse.

Der Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus und der HVEM-Expression wurde für alle drei Gene nochmals separat in der Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp betrachtet. Der Hintergrund ist, dass die Mutationen jeweils am häufigsten in dieser Subgruppe beobachtet werden bzw. für die Risikostratifizierung dieser von großer Bedeutung sind (vgl. Kapitel 1.1.5). Dabei konnten die beobachteten Assoziationen im Fall von *NPM1* und *CEBPA* in beiden Kohorten und im Fall von *FLT3* in Kohorte_R signifikant bestätigt werden. Zudem konnte in beiden Kohorten übereinstimmend gezeigt werden, dass eine Assoziation der HVEM-Expression mit

dem prognostisch günstigen AML Subtyp mit normalem Karyotyp, *NPM1*-Mutation und *FLT3*-Wildtyp besteht.

Die betrachteten Gene sind allesamt Einflussfaktoren in der Pathogenese sowie von Bedeutung für die Prognose der AML [7,11]. Die beobachtete Assoziation mit der HVEM-Expression legt die Vermutung nahe, dass HVEM über aktuell noch unbekannte Mechanismen ebenfalls eine Rolle in diesem funktionellen Kontext einnimmt. In diesem Zusammenhang ist zunächst von Interesse, ob eine Korrelation zwischen der HVEM-Expression und dem klinischen Verlauf der AML besteht und inwieweit diese unabhängig von den bereits etablierten Prognosefaktoren ist, worauf im folgenden Kapitel eingegangen wird (Kapitel 5.3.3).

5.3.3 HVEM-Expression und klinischer Verlauf der AML

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der HVEM-Expressionshöhe und dem klinischen Verlauf der AML besteht, um das Potential von HVEM als Prognosefaktor bzw. neue Zielstruktur für immuntherapeutische Strategien im Kontext der AML abschätzen zu können. In diesem Kapitel werden die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Zusammenhänge diskutiert und interpretiert. Zunächst wird für beide Kohorten der Einfluss der etablierten Prognosefaktoren auf den klinischen Verlauf der Erkrankung diskutiert, um abschätzen zu können, inwieweit die in der vorliegenden Arbeit betrachteten Patienten repräsentativ in Bezug auf die Gesamtheit der AML-Patienten sind (Kapitel 5.3.3.1). Dann werden die beobachteten Assoziationen zwischen der HVEM-Expressionshöhe und dem klinischen Verlauf der AML analysiert (Kapitel 5.3.3.2) und die Bedeutung sowie Konsequenzen der Ergebnisse interpretiert (Kapitel 5.3.3.3).

5.3.3.1 Übersicht und Überleben im Zusammenhang mit den AML-Prognosefaktoren Alter, MRC- und ELN-Risikoklassifikation

Bei Patienten mit vollständigen klinischen Verlaufsdaten wurde in beiden Kohorten eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt. Bei Betrachtung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Erstdiagnosezeitpunkte der Patienten der Kohorte_R (1999–2005) zeitlich deutlich vor denen der Kohorte_P (2010–2011) lagen und die Patienten der Kohorte_R über einen längeren Zeitraum nachverfolgt wurden (Mittlere Beobachtungszeit Kohorte_R: 846 Tage; Kohorte_P: 324 Tage). Aus diesem Grund ist ein Vergleich der absoluten Überlebenszeiten zwischen den beiden Kohorten nur eingeschränkt möglich. Ein auffälliger Unterschied zwischen den Kohorten konnte bezüglich der Länge des medianen OS festgestellt werden (vgl. Kapitel 4.4.1). Dieses war in Kohorte_P (632 Tage) deutlich länger als in Kohorte_R (344 Tage). Zur Erklärung ist zu beachten, dass auch der Anteil der Patienten mit erreichter CR in

Kohorte_P größer war (62%) als in Kohorte_R (55%). Zusätzlich könnte es eine Rolle spielen, dass die Patienten der Kohorte_R zeitlich vor denen der Kohorte_P erstdiagnostiziert und behandelt wurden. Es ist denkbar, dass die Patienten der Kohorte_P von verbesserten Therapiestandards, die im Falle der AML-Therapie insbesondere die supportiven Maßnahmen betreffen, profitiert haben (vgl. Kapitel 1.1.6.1). Letztlich ist nicht auszuschließen, dass weitere Faktoren, die in der vorliegenden Arbeit nicht betrachtet wurden, die unterschiedliche Länge des OS bedingen.

Im Hinblick auf die etablierten Prognosefaktoren der AML konnten in Kohorte_R das Alter bei Erstdiagnose, die MRC- und die ELN-Risikoklassifikation als Prognosefaktoren für das OS und das RFS signifikant bestätigt werden. In Kohorte_P waren die Prognosefaktoren nur bei Betrachtung des OS aller Patienten signifikant. Bei Beschränkung der Analyse auf Patienten mit erreichter CR konnte im Hinblick auf das OS keiner der Prognosefaktoren bestätigt werden und es zeigte sich bei Betrachtung des RFS nur das Alter bei Erstdiagnose als prognostisch wirksam. Hier ist zu berücksichtigen, dass ein erheblicher Zusammenhang zwischen der MRC- bzw. der ELN-Risikoklassifikation und dem Erreichen einer CR besteht. Die Beschränkung der Analyse auf Patienten, die eine CR erreicht haben, stellt eine Präselektion dar und führt zu einem verminderten Einfluss dieser Faktoren. Ebenso muss beachtet werden, dass die betrachteten Subgruppen der MRC- und ELN-Klassifikation in Kohorte_P bei Patienten mit erreichter CR sehr klein waren und die Aussagekraft insofern als eingeschränkt anzusehen ist (MRC günstig n=5; MRC ungünstig n=7, ELN ungünstig n=9). Zudem waren die Beobachtungszeiten in Kohorte_P deutlich kürzer als in Kohorte_R. Bei längerer Beobachtungszeit wäre ein deutlicherer Einfluss der Prognosefaktoren zu erwarten gewesen. Mrozek et al. [146] empfehlen, die Aufteilung auf die Prognosegruppen getrennt für Patienten über und unter 60 Jahren zu betrachten, da sich die Verteilung auf die Prognosegruppen zwischen den Altersklassen signifikant unterscheidet. Dies war jedoch aufgrund der kleinen Fallzahlen, insbesondere in Kohorte_P, in der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Bei größeren Fallzahlen wäre bei einer getrennten Betrachtung der beiden Altersgruppen eine prognostische Aussagekraft der ELN-Klassifikation in beiden Kohorten wahrscheinlich signifikant gewesen.

5.3.3.2 Überleben im Zusammenhang mit der HVEM-Expression

Um einen potentiellen Zusammenhang zwischen der HVEM-Expressionshöhe und dem klinischen Verlauf der AML zu identifizieren, wurde analysiert, inwieweit sich die Länge des OS sowie des RFS bei Patienten mit hoher und niedriger HVEM-Expression

unterscheidet. Im Kontext der AML sind Effektorzellen des Immunsystems, die mit kostimulierenden und koinhibierenden Molekülen wie HVEM und seinen Bindungspartnern interagieren, bedeutsam für die Remissionserhaltung und können dem Auftreten eines Rezidivs entgegenwirken [147] (vgl. Kapitel 1.2.1). Das Erreichen einer CR ist dagegen primär von einer erfolgreichen Induktionstherapie abhängig (vgl. Kapitel 1.1.6.1). Daher wurden bei der Analyse eines potentiellen Einflusses der HVEM-Expression auf das Überleben nur Patienten mit bereits erreichter CR betrachtet.

Zu Vergleichszwecken erfolgte die Bestimmung der Quartile der HVEM-Expressionswerte und es wurden jeweils die 25% der Patienten mit den höchsten Expressionswerten der Kohorte („hohe HVEM-Expression“, oberes Quartil) mit den übrigen 75% der Patienten mit niedrigeren Expressionswerten („niedrige HVEM-Expression“, untere drei Quartile) verglichen (vgl. Kapitel 4.4.3). Die Festlegung dieser Grenze zwischen hoher und niedriger Expression orientierte sich an der Verteilung der Expressionswerte (vgl. Kapitel 4.1). Speziell in Kohorte_P zeigte sich deutlich, dass HVEM bei vielen Patienten nicht oder nur gering exprimiert wurde. Dagegen wurden bei einem kleineren Teil der Patienten, näherungsweise repräsentiert durch das obere Quartil, deutlich höhere Expressionswerte nachgewiesen. Aufgrund der Einfachheit der Berechnung und der Praktikabilität zum Vergleich der Expression innerhalb und zwischen den Kohorten wurde diese Grenze zwischen oberem Quartil und den unteren drei Quartilen für beide Kohorten übernommen.

In der zusätzlich durchgeführten Cox-Regression wurde der Einfluss der HVEM-Expressionshöhe auf das OS und das RFS sowohl in der Einteilung „hohe versus niedrige HVEM-Expression“ als auch in Form einer kontinuierlichen Variable untersucht. Die Mechanismen, die hinter einem potentiellen prognostischen Einfluss der HVEM-Expression stehen, sind unbekannt. Aus diesem Grund ist es nicht möglich abzuleiten, ob ein Effekt auf die Prognose ab einem gewissen Schwellenwert der HVEM-Expressionshöhe eintritt, wie durch die Einteilung „hoch versus niedrig“ modelliert, oder ob der Einfluss der Expressionshöhe kontinuierlich ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte in beiden Kohorten eine Korrelation zwischen hoher HVEM-Expression und längerem RFS (Kohorte_P) bzw. längerem OS nach erreichter CR (Kohorte_R) beobachtet werden. In Kohorte_P war das RFS in der intermediären ELN-Risikogruppe bei Patienten mit hoher HVEM-Expression signifikant länger als bei Patienten mit niedriger HVEM-Expression ($p=0,005$) (vgl. Kapitel 4.4.3). In der multivariaten Analyse des RFS zusammen mit der ELN-Risikoklassifikation war die HVEM-Expressionshöhe als unabhängiger Einflussfaktor nicht signifikant, es zeigte

sich jedoch ein deutlicher Trend ($p=0,091$ HVEM hoch/niedrig bzw. $p=0,052$ HVEM kontinuierlich) (vgl. Kapitel 4.4.4). In Kohorte_R konnte bei Betrachtung des OS ein Trend zu längerem Überleben bei Patienten mit hoher HVEM-Expression ($p=0,080$) beobachtet werden (vgl. Kapitel 4.4.3). Sowohl in der univariaten ($p=0,081$ HVEM hoch/niedrig bzw. $p=0,102$ HVEM kontinuierlich) als auch in der multivariaten Analyse des OS zusammen mit der ELN-Risikoklassifikation ($p=0,050$ HVEM hoch/niedrig) bzw. zusammen mit dem *NPM1*- und *FLT3*-Mutationstatus sowie dem Karyotyp ($p=0,118$ HVEM kontinuierlich) war die HVEM-Expressionshöhe als Einflussfaktor nicht signifikant, es zeigte sich jedoch ein deutlicher Trend (vgl. Kapitel 4.4.4).

Bei Analyse der HVEM-Expressionshöhe in Zusammenhang mit etablierten zyto- und molekulargenetischen Prognosefaktoren der AML (vgl. Kapitel 4.3 und 5.3.2) zeigte sich in der vorliegenden Arbeit einerseits eine hohe HVEM-Expression bei prognostisch günstigen Faktoren (biallelische *CEBPA* Mutation) und eine niedrige HVEM-Expression bei prognostisch ungünstigen Faktoren (*FLT3*-ITD). Andererseits war die HVEM-Expression bei AML-Subtypen, die mit einer günstigen Prognose einhergehen, signifikant erniedrigt (*NPM1*-Mutation; AML Subtyp mit normalem Karyotyp, *NPM1*-Mutation und *FLT3*-Wildtyp). In der Überlebenszeitanalyse konnte jedoch in beiden Kohorten der Trend beobachtet werden, dass eine hohe HVEM-Expression mit einem besseren klinischen Verlauf korreliert und dass dieser Einfluss unabhängig von anderen, bereits etablierten Prognosefaktoren der AML zu sein scheint. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern damit Hinweise auf einen potentiellen prognostisch günstigen Effekt einer hohen HVEM-Expression bei AML-Patienten.

5.3.3.3 HVEM als potentieller Prognosefaktor der AML und therapeutische Zielstruktur

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass eine hohe HVEM-Expression mit einem besseren OS und RFS bei AML-Patienten mit erreichter CR einhergeht. Diese Erkenntnisse könnten darauf hinweisen, dass HVEM an einer potentiellen, gegen zurückbleibende AML-Zellen gerichteten Immunantwort beteiligt ist, die sich günstig auf die Länge der Remissionserhaltung auszuwirken scheint. Die Beobachtung, dass der auf Immunantworten vorwiegend koinhibierend wirkende Faktor HVEM mit einem besseren klinischen Verlauf der AML assoziiert ist, erscheint im Kontext der bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse, dass kostimulierende Moleküle einen positiven und koinhibierende Moleküle einen negativen Effekt auf die Anti-Tumor-Immunität haben [62,64], zunächst überraschend. Zudem stehen die Ergebnisse im Widerspruch zu den Erkenntnissen einer japanischen Forschungsgruppe, die eine Assoziation zwischen hoher HVEM-Expression auf

Tumorzellen und Tumorprogress sowie ungünstiger Prognose bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus [112], hepatzellulären Karzinomen [113] und kolorektalen Karzinomen [114] fanden. Bei allen drei Tumorentitäten war eine hohe HVEM-Expression mit fortgeschrittenem Tumor-Stadium, reduziertem OS sowie einer geringen Anzahl von tumorinfiltrierenden Lymphozyten assoziiert. Zudem war die HVEM-Expressionshöhe als unabhängiger negativer Prognosefaktor für das OS signifikant [112-114]. Vor diesem Hintergrund stellten die Autoren die Hypothese auf, dass eine hohe HVEM-Expression ein Mechanismus von Tumorzellen ist, der Kontrolle des Immunsystems zu entgehen [112-114]. In diesem Zusammenhang untersuchten Migita et al. [112] die Inaktivierung des HVEM-Gens in Tumorzellen einer Kolonkarzinom-Zelllinie im Mausmodell. Als Folge der HVEM-Inaktivierung konnte eine reduzierte Tumorzellproliferation *in vivo* und *in vitro* sowie eine Verbesserung der lokalen Immunantwort mit verstärkter Rekrutierung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten *in vivo* beobachtet werden [112].

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Beobachtungen der prognostisch ungünstigen Wirkung einer hohen HVEM-Expression bei soliden Tumoren wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass eine hohe HVEM-Expression bei AML-Patienten mit einem besseren klinischen Verlauf assoziiert ist. Die Mechanismen, die hinter dem Einfluss von HVEM auf die Tumor-Immunabwehr stehen, sind bis dato unbekannt. Es ist denkbar, dass sich die Mechanismen zur Tumor-Immunabwehr zwischen hämatologischen Neoplasien wie der AML und soliden Tumoren unterscheiden. Die Wachstumsbedingungen und die Erreichbarkeit durch Zellen des Immunsystems sind verschieden, da hämatologische Neoplasien durch die Möglichkeit der Zirkulation im Gefäßsystem einer anderen Dynamik unterworfen sind als solide Tumore, die in gewisser Weise abhängig vom umgebenden Stroma und der Versorgung mit Blutgefäßen sind [134]. Dies könnte zur Erklärung der unterschiedlichen Effekte einer hohen HVEM-Expression bei der AML und bei soliden Tumoren, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, beitragen.

Das Signalsystem um HVEM und seine multiplen Bindungspartner ist von enormer Komplexität. Es wird angenommen, dass HVEM über die Interaktion mit BTLA und CD160 als vorwiegend koinhibierender Faktor auf Immunantworten wirkt [99], jedoch hängt der entstehende Stimulus auch von der Verfügbarkeit der Bindungspartner ab [148]. In Abwesenheit der koinhibierend wirkenden Bindungspartnern BTLA und CD160 könnte HVEM über die Interaktion mit LIGHT demnach auch kostimulierende Signale vermitteln. Des Weiteren beobachteten Sedy et al. [149], dass HVEM über die Interaktion mit CD160 kostimulierend auf NK-Zellen wirkt und deren Effektor-Funktionen steigert. Die Autoren spekulierten, dass dieser Mechanismus auch in der

Immunabwehr von Tumoren zum Einsatz kommt und Tumore mit niedriger HVEM-Expression der Kontrolle bzw. der Elimination durch NK-Zellen entgehen [149]. Dieser Mechanismus könnte die in der vorliegenden Arbeit beobachtete ungünstige Prognose von Patienten mit niedriger HVEM-Expression erklären. Im Kontext der AML gelten NK-Zellen neben T-Zellen als hochrelevante Effektoren des Immunsystems in der Abwehr der Leukämie [147,150]. Zudem ist bekannt, dass die NK-Zell-Funktion bei AML-Patienten in unterschiedlicher Weise beeinträchtigt ist und dies zu einem Tumorprogress sowie zu einer ungünstigen Prognose beiträgt [150].

Letztlich könnte eine erhöhte HVEM-Expression auch ein Anzeichen dafür sein, dass sich bereits eine gegen die Leukämie gerichtete Immunantwort ausgebildet hat, die ihrerseits prognostisch günstig wirkt. Diese Hypothese beruht auf der Beobachtung von Spranger et al. [151], dass aktivierte zytotoxische T-Lymphozyten im Tumormikromilieu die Rekrutierung von immunsuppressiven Mechanismen fördern. Übertragend auf die vorliegende Arbeit würde dies bedeuten, dass bei Patienten mit hoher HVEM-Expression eine stärkere antileukämische Immunantwort vorlag und daraufhin die Expression des vorwiegend koinhibierenden und damit immunsuppressiv wirkenden Faktors HVEM hochreguliert wurde.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Höhe der HVEM-Expression auf leukämischen Blasen von AML-Patienten mit spezifischen zytogenetischen und molekulargenetischen Subtypen der AML assoziiert ist. Daher ist es wahrscheinlich, dass HVEM eine Rolle im funktionellen Kontext einnimmt, der zur Entstehung und Aufrechterhaltung der AML beiträgt. Ein weiterer Hinweis dafür ist die Assoziation einer hohen HVEM-Expression mit einem besseren klinischen Verlauf der Erkrankung, die in beiden Kohorten aufgedeckt werden konnte. Abschließend konnte mit HVEM ein neuer Vertreter aus der Familie der kostimulierenden und koinhibierenden Moleküle ausgemacht werden, der im Kontext der AML eine Rolle als potentieller positiver Prognosefaktor sowie als mögliche Zielstruktur im Rahmen neuer immuntherapeutischer Strategien einnimmt.

5.4 Ausblick

Um die funktionellen Zusammenhänge des HVEM-Signalsystems im Kontext der AML zu erklären, sind weitere *in vitro* und *in vivo* Studien nötig. Im Rahmen dieser wäre es möglich, die Hintergründe der HVEM-Assoziation mit zytogenetischen und molekulargenetischen AML-Subtypen sowie die zugrundeliegenden Mechanismen der Korrelation einer hohen HVEM-Expression mit einem besseren klinischen Verlauf zu erklären, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurden. Dabei sollte untersucht

werden, mit welchem seiner Bindungspartner HVEM vorwiegend interagiert und wie Immunantworten des T-Zell- sowie des NK-Zell-Systems in Abhängigkeit von der Tumor-HVEM-Expression modifiziert werden. Die Auswirkungen einer möglichen therapeutischen Modulation des HVEM-Signalsystems könnten durch Analyse des Effekts blockierender Antikörper gegen HVEM oder seine Bindungspartner in Kokulturen von AML-Zellen mit T-Zellen oder NK-Zellen genauer untersucht werden. Zudem wäre die Bestimmung der HVEM-Expressionshöhe in unterschiedlichen Erkrankungsphasen, z. B. bei Auftreten eines Rezidivs, von Interesse, um die Dynamik der Expression analysieren zu können. Als Basis für die Etablierung neuer immuntherapeutischer Ansätze zur Behandlung der AML könnten in dieser Weise Angriffspunkte im HVEM-Signalsystem identifiziert und die Wirksamkeit einer therapeutischen Modulation getestet werden.

6. Zusammenfassung

HVEM ist ein Vertreter der kostimulierenden und koinhibierenden Moleküle, die eine zentrale Rolle bei der Modulation von Signalwegen des Immunsystems spielen. Diese Moleküle gelten als potentielle Prognosefaktoren sowie therapeutische Zielstrukturen im Rahmen der Immuntherapie von Tumoren. Über das HVEM-Signalsystem können in Abhängigkeit von den beteiligten Bindungspartnern sowohl kostimulierende als auch koinhibierende Stimuli vermittelt werden. Es wurde beobachtet, dass HVEM auf Tumorzellen von soliden Malignomen exprimiert wird und an der Tumor-Immunabwehr beteiligt ist. Eine systematische Analyse der Rolle von HVEM im Kontext der AML lag bisher nicht vor. Bei der AML-Therapie werden die besten Langzeitergebnisse mit der allogenen SZT erreicht. Dies unterstreicht das hohe Potential von immuntherapeutischen Ansätzen im Therapiekonzept der AML. Da die SZT nicht für jeden Patienten verfügbar und geeignet ist, bleibt die Suche nach Alternativen von großer Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von HVEM auf leukämischen Zellen aus Knochenmarkproben von AML-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zu analysieren und einen potentiellen Zusammenhang mit Erkrankungscharakteristika sowie klinischem Verlauf aufzudecken. Die HVEM-Expressionshöhe wurde in einer Patientenkohorte mittels Durchflusszytometrie auf Proteinebene (Kohorte_P, n=169) und in einer zweiten, unabhängigen Patientenkohorte im Rahmen einer Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays auf mRNA-Ebene (Kohorte_R, n=512) bestimmt. Die Ergebnisse der Analyse zeigten erstmalig, dass HVEM in Abhängigkeit von molekulargenetischen Veränderungen unterschiedlich stark exprimiert wird. In beiden Kohorten zeigte sich eine signifikant niedrigere HVEM-Expression bei Vorliegen einer Mutation im *NPM1*-Gen (p=0,001 bzw. p<0,001), bei einer ITD des *FLT3*-Gens (p=0,001 bzw. p<0,001) sowie beim AML-Subtyp mit normalem Karyotyp, *NPM1*-Mutation und *FLT3*-Wildtyp (p=0,049 bzw. p=0,050). Eine signifikant höhere HVEM-Expression wurde bei Vorliegen einer biallelischen *CEBPA*-Mutation (p=0,015 bzw. p<0,001) beobachtet. Zudem zeigte sich bei der Überlebenszeitanalyse eine Assoziation zwischen hoher HVEM-Expression und längerem Gesamt- bzw. rezidivfreiem Überleben. In der vorliegenden Arbeit konnte HVEM somit als potentieller Prognosefaktor und mögliche Zielstruktur für neue immuntherapeutische Strategien der AML identifiziert werden.

Anhang

A Fragebogen zur Erhebung klinischer Verlaufsdaten

Insgesamt 34 von 169 Patienten der Kohorte_P waren nicht Teilnehmer der AMLCG 2008 Studie und wurden nicht in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, Klinikum der Universität München, Campus Großhadern, behandelt. Die benötigten klinischen Verlaufsdaten dieser Patienten wurden mittels des folgenden Fragebogens erhoben, der an die entsprechenden auswärtigen Kliniken in denen die Patienten behandelt wurden, versandt wurde. Die zuständigen ärztlichen Betreuer wurden gebeten, in diesem die fehlenden Eckdaten der jeweiligen Patienten einzutragen oder alternativ einen aktuellen Arztbrief zu übersenden, aus dem die Daten übernommen werden konnten. Voraussetzung für die Datenweitergabe war dabei das Einverständnis der Patienten.

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

Hat der Patient/die Patientin eine intensive Induktionstherapie erhalten?

ja nein

Ist bei dem Patienten/der Patientin eine komplette Remission erreicht worden?

ja nein

Falls ja, Datum: _____

Hat der Patient/die Patientin eine allogene Stammzelltransplantation erhalten?

ja nein

Falls ja, Datum: _____

Ist bei dem Patienten/der Patientin ein Rezidiv aufgetreten?

ja nein

Falls ja, Datum: _____

Ist der Patient/die Patientin verstorben?

ja nein

Falls ja, Datum: _____

Wann hat bei dem Patienten/der Patientin die letzte Verlaufskontrolle stattgefunden?

Datum: _____

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Beispieldaten in FlowJo	27
Abbildung 4-1: HVEM-Expressionslevel	32
Abbildung 4-2: HVEM-Expression und Alter bei Erstdiagnose	34
Abbildung 4-3: HVEM-Expression und Geschlecht	35
Abbildung 4-4: HVEM Expression und AML-Morphologie	38
Abbildung 4-5: HVEM-Expression und MRC-Risikoklassifikation	41
Abbildung 4-6: HVEM-Expression und <i>NPM1</i> -Mutationsstatus	43
Abbildung 4-7: HVEM-Expression und <i>FLT3</i> -Mutationsstatus	45
Abbildung 4-8: HVEM-Expression und <i>CEBPA</i> -Mutationsstatus	47
Abbildung 4-9: HVEM-Expression und ELN-Risikoklassifikation	50
Abbildung 4-10: Überleben im Zusammenhang mit dem Alter bei Erstdiagnose	53
Abbildung 4-11: Überleben im Zusammenhang mit der MRC-Risikoklassifikation	55
Abbildung 4-12: Überleben im Zusammenhang mit der ELN-Risikoklassifikation	57
Abbildung 4-13: Überleben im Zusammenhang mit der HVEM-Expression	59
Abbildung 4-14: Überleben im Zusammenhang mit der HVEM-Expression bei Patienten der intermediären ELN-Risikogruppe	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Revidierte MRC-Klassifikation	7
Tabelle 1-2: ELN-Klassifikationssystem	9
Tabelle 3-1: Behandlungsorte und Studienteilnahme der Patienten der Kohorte_P	20
Tabelle 4-1: Lage- und Streuungsparameter der HVEM-Expression.....	31
Tabelle 4-2: Zytogenetische Befunde der Patienten beider Kohorten.....	39
Tabelle 4-3: HVEM-Expression und <i>NPM1</i> -Mutationsstatus bei Fällen mit normalem Karyotyp	44
Tabelle 4-4: HVEM-Expression und <i>FLT3</i> -Mutationsstatus bei Fällen mit normalem Karyotyp	46
Tabelle 4-5: HVEM-Expression und <i>CEBPA</i> -Mutationsstatus bei Fällen mit normalem Karyotyp	48
Tabelle 4-6: HVEM-Expression und AML-Subtyp mit normalem Karyotyp, <i>NPM1</i> -Mutation und <i>FLT3</i> -Wildtyp	49
Tabelle 4-7: Anzahl an Patienten mit verfügbaren klinischen Daten und mediane Überlebenszeiten in beiden Kohorten	51
Tabelle 4-8: Überleben im Zusammenhang mit der HVEM-Expression bei Patienten der günstigen ELN-Risikogruppe	60
Tabelle 4-9: Überleben im Zusammenhang mit der HVEM-Expression bei Patienten der ungünstigen ELN-Risikogruppe	62
Tabelle 4-10: Univariate Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR: HVEM-Expression als kategoriale Variable	63
Tabelle 4-11: Univariate Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR: HVEM-Expression als kontinuierliche Variable.....	63
Tabelle 4-12: Multivariate Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR: Karyotyp normal versus abnormal, <i>NPM1</i> Wildtyp versus Mutation, <i>FLT3</i> Wildtyp versus ITD und HVEM-Expression als kategoriale Variable.....	64
Tabelle 4-13: Multivariate Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR: Karyotyp normal versus abnormal, <i>NPM1</i> Wildtyp versus Mutation, <i>FLT3</i> Wildtyp versus ITD und HVEM-Expression als kontinuierliche Variable.....	64

Tabelle 4-14: Multivariate Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR: ELN-Risikoklassifikation günstig versus intermediär versus ungünstig und HVEM-Expression als kategoriale Variable.....	65
Tabelle 4-15: Multivariate Analyse des OS bei Patienten mit erreichter CR: ELN-Risikoklassifikation günstig versus intermediär versus ungünstig und HVEM-Expression als kontinuierliche Variable	65
Tabelle 4-16: Univariate Analyse des RFS: HVEM-Expression als kategoriale Variable	65
Tabelle 4-17: Univariate Analyse des RFS: HVEM-Expression als kontinuierliche Variable	66
Tabelle 4-18: Multivariate Analyse des RFS: Karyotyp normal versus abnormal, <i>NPM1</i> Wildtyp versus Mutation, <i>FLT3</i> Wildtyp versus ITD und HVEM-Expression als kategoriale Variable	66
Tabelle 4-19: Multivariate Analyse des RFS: Karyotyp normal versus abnormal, <i>NPM1</i> Wildtyp versus Mutation, <i>FLT3</i> Wildtyp versus ITD und HVEM-Expression als kontinuierliche Variable.....	66
Tabelle 4-20: Multivariate Analyse des RFS: ELN-Risikoklassifikation günstig versus intermediär versus ungünstig und HVEM-Expression als kategoriale Variable.....	67
Tabelle 4-21: Multivariate Analyse des RFS: ELN-Risikoklassifikation günstig versus intermediär versus ungünstig und HVEM-Expression als kontinuierliche Variable	67
Tabelle 5-1: Vergleich der prozentualen Häufigkeit von <i>NPM1</i> -, <i>FLT3</i> - und <i>CEBPA</i> -Mutationen	76

Literaturverzeichnis

- [1] Braess J, Schneider F, Buske C, et al. Akute myeloische Leukämie. In: Hiddemann W, Braess J (Eds). *Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 3. Auflage. München, Wien, New York: W. Zuckschwerdt Verlag, 2009, S. 19-70.
- [2] Schaich M. Epidemiologie. In: Ehninger G (Ed). *Akute myeloische Leukämie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 2008. Abgerufen von <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52389/e52390/>.
- [3] Howlader N, Noone A, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011, National Cancer Institute. Bethesda M (Ed). *Basierend auf der SEER Datenübermittlung bis November 2013, veröffentlicht auf der SEER Webseite April 2014*. Abgerufen am 17.11.2014 von http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/.
- [4] Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 2011;105(11):1684-1692.
- [5] Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009;113(18):4179-4187.
- [6] Reilly JT. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol*. 2005;128(1):18-34.
- [7] Renneville A, Roumier C, Biggio V, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. 2008;22(5):915-931.
- [8] Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):502-513.
- [9] Illmer T. Klinisches Bild. In: Ehninger G (Ed). *Akute myeloische Leukämie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 2008. Abgerufen von <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52518/>.
- [10] Adorf D, Henrich M, Schneider S, Christ O, Spiekermann K, Nerl C. Allgemeine Diagnostik. In: Hiddemann W, Braess J (Eds). *Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 3. Auflage. München, Wien, New York: W. Zuckschwerdt Verlag, 2009, S. 19-70.

- [11] Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453-474.
- [12] Haferlach T, Haferlach C, Kern W, Schnittger S, Bacher U. Diagnostik bei bestimmten hämatologischen Krankheitsbildern. In: Haferlach T (Ed). *Labordiagnostik in der Hämatologie - Vom Symptom zur Diagnose*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 2011, S. 3-82.
- [13] Baldus C, Thiel E. Immunphänotypisierung. In: Ehninger G (Ed). *Akute myeloische Leukämie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 2008. Abgerufen von <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52556/e52757/>.
- [14] Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:385-395.
- [15] Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116(3):354-365.
- [16] Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004;18(2):115-136.
- [17] Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-1152.
- [18] Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-2074.
- [19] Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2008;93(7):976-982.
- [20] Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007;109(2):431-448.
- [21] Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):475-486.

- [22] Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008;358(18):1909-1918.
- [23] Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2012;366(12):1079-1089.
- [24] Meyer SC, Levine RL. Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2014;15(9):e382-394.
- [25] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). *Br J Haematol.* 1991;78(3):325-329.
- [26] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1985;103(3):460-462.
- [27] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1985;103(4):620-625.
- [28] Swerdlow S, Campo E, Harris N, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon: IARC, 2008.
- [29] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114(5):937-951.
- [30] Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood.* 2006;107(9):3481-3485.
- [31] Büchner T, Berdel WE, Haferlach C, et al. Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 2009;27(1):61-69.
- [32] Mrozek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol.* 2008;35(4):365-377.
- [33] Röllig C, Bornhauser M, Thiede C, et al. Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet

recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *J Clin Oncol.* 2011;29(20):2758-2765.

[34] Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood.* 2006;107(10):4011-4020.

[35] Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med.* 2005;352(3):254-266.

[36] Falini B, Martelli MP, Bolli N, et al. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? *Blood.* 2011;117(4):1109-1120.

[37] Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 2002;100(5):1532-1542.

[38] Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood.* 2002;100(1):59-66.

[39] Nerlov C. C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(5):394-400.

[40] Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2739-2747.

[41] Eyholzer M, Schmid S, Wilkens L, Mueller BU, Pabst T. The tumour-suppressive miR-29a/b1 cluster is regulated by CEBPA and blocked in human AML. *Br J Cancer.* 2010;103(2):275-284.

[42] Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol.* 2010;28(4):570-577.

[43] Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood.* 2011;117(8):2469-2475.

- [44] Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*. 2009;113(13):3088-3091.
- [45] Burnett A, Wetzel M, Lowenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):487-494.
- [46] Braess J, Spiekermann K, Staib P, et al. Dose-dense induction with sequential high-dose cytarabine and mitoxantone (S-HAM) and pegfilgrastim results in a high efficacy and a short duration of critical neutropenia in de novo acute myeloid leukemia: a pilot study of the AMLCG. *Blood*. 2009;113(17):3903-3910.
- [47] Hiddemann W. Deutsches Leukämie-Studienregister Studie AMLCG 2008. *Kompetenznetz Leukämie*. Stand 06.11.2014, abgerufen am 04.09.2015 von <http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/trial/detail.html?id=334>.
- [48] Hiddemann W. Evaluation of "Dose-dense Therapy" by S-HAM in Comparison to Conventionally Timed Double Induction in Patients With Acute Myeloid Leukemia (AML) (AMLCG 2008). *US National Institutes of Health*. Stand 31.03.2015, abgerufen am 04.09.2015 von <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01382147>.
- [49] Paitetta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012:35-42.
- [50] Rowe JM, Tallman MS. How I treat acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;116(17):3147-3156.
- [51] Burnett AK. Treatment of acute myeloid leukemia: are we making progress? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012:1-6.
- [52] Roboz GJ. Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011:43-50.
- [53] Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2009;113(9):1875-1891.
- [54] Watts JM, Tallman MS. Acute promyelocytic leukemia: What is the new standard of care? *Blood Rev*. 2014;28(5):205-212.

- [55] Lichtenegger FS, Schnorfeil FM, Hiddemann W, Subklewe M. Current strategies in immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Immunotherapy*. 2013;5(1):63-78.
- [56] Jenq RR, van den Brink MR. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(3):213-221.
- [57] Barrett AJ. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol*. 2008;142(6):877-888.
- [58] Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):263-274.
- [59] Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 2008;27(45):5904-5912.
- [60] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-360.
- [61] Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-271.
- [62] Driessens G, Kline J, Gajewski TF. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev*. 2009;229(1):126-144.
- [63] Lichtenegger FS, Krupka C, Kohnke T, Subklewe M. Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Semin Hematol*. 2015;52(3):207-214.
- [64] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-264.
- [65] Murphy KP, Travers P, Walport M, Janeway C. Antigenerkennung durch B-Zell- und T-Zell-Rezeptoren. In: Janeway C (Ed). *Janeway Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009, S. 141-175.
- [66] Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):227-242.
- [67] Murphy KP, Travers P, Walport M, Janeway C. Die T-Zell-vermittelte Immunität. In: Janeway C (Ed). *Janeway Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009, S. 407-471.

- [68] Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:305-334.
- [69] Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(5):336-347.
- [70] Aranda F, Vacchelli E, Eggermont A, et al. Trial Watch: Immunostimulatory monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2014;3(1):e27297.
- [71] Yewale C, Baradia D, Vhora I, Patil S, Misra A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies. *Biomaterials*. 2013;34(34):8690-8707.
- [72] Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480(7378):480-489.
- [73] Maloney DG. Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2012;366(21):2008-2016.
- [74] Buque A, Bloy N, Aranda F, et al. Trial Watch: Immunomodulatory monoclonal antibodies for oncological indications. *Oncoimmunology*. 2015;4(4):e1008814.
- [75] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711-723.
- [76] Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2517-2526.
- [77] FDA approves new treatment for a type of late-stage skin cancer. *US Food and Drug Administration*. Stand 25.11.2011, abgerufen am 11.12.2015 von <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm1193237.htm>.
- [78] Yervoy (ipilimumab). *European Medicines Agency*. Stand 26.08.2015, abgerufen am 11.12.2015 von http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002213/human_med_001465.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
- [79] Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(4):375-384.

- [80] Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015;372(4):320-330.
- [81] FDA approves Opdivo for advanced melanoma. *US Food and Drug Administration.* Stand 22.12.2014, abgerufen am 11.12.2015 von <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm427716.htm>.
- [82] Opdivo (nivolumab). *European Medicines Agency.* Stand 02.12.2015, abgerufen am 11.12.2015 von http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003985/human_med_001876.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
- [83] Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(17):1627-1639.
- [84] Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(2):123-135.
- [85] FDA expands approved use of Opdivo to treat lung cancer. *US Food and Drug Administration.* Stand 04.03.2015, abgerufen am 11.12.2015 von <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm436534.htm>.
- [86] FDA expands approved use of Opdivo in advanced lung cancer. *US Food and Drug Administration.* Stand 09.10.2015, abgerufen am 11.12.2015 von <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm466413.htm>.
- [87] Nivolumab BMS (nivolumab). *European Medicines Agency.* Stand 27.07.2015, abgerufen am 11.12.2015 von http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003840/human_med_001887.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
- [88] Robert C, Ribas A, Wolchok JD, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet.* 2014;384(9948):1109-1117.
- [89] Ribas A, Puzanov I, Dummer R, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(8):908-918.

- [90] Robert C, Schachter J, Long GV, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2521-2532.
- [91] FDA approves Keytruda for advanced melanoma. *US Food and Drug Administration.* Stand 04.09.2015, abgerufen am 11.12.2015 von <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm412802.htm>.
- [92] Keytruda (pembrolizumab). *European Medicines Agency.* Stand 30.07.2015, abgerufen am 11.12.2015 von http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003820/human_med_001886.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
- [93] Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2018-2028.
- [94] FDA approves Keytruda for advanced non-small cell lung cancer. *US Food and Drug Administration.* Stand 02.10.2015, abgerufen am 11.12.2015 von <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm465444.htm>.
- [95] TNFRSF14 Gene. *GeneCards© Human Gene Database*, abgerufen am 13.11.2014 von <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNFRSF14&search=11a5af096957695d9479a41527aaa4f2>.
- [96] del Rio ML, Lucas CL, Buhler L, Rayat G, Rodriguez-Barbosa JI. HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation. *J Leukoc Biol.* 2010;87(2):223-235.
- [97] Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell.* 1996;87(3):427-436.
- [98] Whitbeck JC, Peng C, Lou H, et al. Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry. *J Virol.* 1997;71(8):6083-6093.
- [99] Pasero C, Speiser DE, Derre L, Olive D. The HVEM network: new directions in targeting novel costimulatory/co-inhibitory molecules for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12(4):478-485.
- [100] Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol Rev.* 2011;244(1):169-187.

- [101] Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI, et al. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity*. 1998;8(1):21-30.
- [102] Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG, et al. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol*. 2005;6(1):90-98.
- [103] Cai G, Anumanthan A, Brown JA, Greenfield EA, Zhu B, Freeman GJ. CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol*. 2008;9(2):176-185.
- [104] Duhen T, Pasero C, Mallet F, Barbarat B, Olive D, Costello RT. LIGHT costimulates CD40 triggering and induces immunoglobulin secretion; a novel key partner in T cell-dependent B cell terminal differentiation. *Eur J Immunol*. 2004;34(12):3534-3541.
- [105] Morel Y, Truneh A, Sweet RW, Olive D, Costello RT. The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *J Immunol*. 2001;167(5):2479-2486.
- [106] Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol*. 2003;4(7):670-679.
- [107] Wang Y, Subudhi SK, Anders RA, et al. The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *J Clin Invest*. 2005;115(3):711-717.
- [108] Pasero C, Olive D. Interfering with coinhibitory molecules: BTLA/HVEM as new targets to enhance anti-tumor immunity. *Immunol Lett*. 2013;151(1-2):71-75.
- [109] Pasero C, Barbarat B, Just-Landi S, et al. A role for HVEM, but not lymphotoxin-beta receptor, in LIGHT-induced tumor cell death and chemokine production. *Eur J Immunol*. 2009;39(9):2502-2514.
- [110] Costello RT, Mallet F, Barbarat B, et al. Stimulation of non-Hodgkin's lymphoma via HVEM: an alternate and safe way to increase Fas-induced apoptosis and improve tumor immunogenicity. *Leukemia*. 2003;17(12):2500-2507.
- [111] Derre L, Rivals JP, Jandus C, et al. BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8+ T cells that can be partially reversed by vaccination. *J Clin Invest*. 2010;120(1):157-167.

- [112] Migita K, Sho M, Shimada K, et al. Significant involvement of herpesvirus entry mediator in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2014;120(6):808-817.
- [113] Hokuto D, Sho M, Yamato I, et al. Clinical impact of herpesvirus entry mediator expression in human hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer*. 2015;51(2):157-165.
- [114] Inoue T, Sho M, Yasuda S, et al. HVEM expression contributes to tumor progression and prognosis in human colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2015;35(3):1361-1367.
- [115] Hobo W, Norde WJ, Schaap N, et al. B and T lymphocyte attenuator mediates inhibition of tumor-reactive CD8+ T cells in patients after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunol*. 2012;189(1):39-49.
- [116] Die AML Cooperative Group (AMLCG). *Universitätsklinikum Münster*, abgerufen am 31.05.2015 von <http://klinikum.uni-muenster.de/index.php?id=8335>.
- [117] Li Z, Herold T, He C, et al. Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: an international collaborative study. *J Clin Oncol*. 2013;31(9):1172-1181.
- [118] Metzeler KH, Hummel M, Bloomfield CD, et al. An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;112(10):4193-4201.
- [119] Büchner T, Berdel WE, Schoch C, et al. Double induction containing either two courses or one course of high-dose cytarabine plus mitoxantrone and postremission therapy by either autologous stem-cell transplantation or by prolonged maintenance for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2006;24(16):2480-2489.
- [120] Büchner T. Biology and Treatment Strategy of AML in Its Subgroups: Multicenter Randomized Trial by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group (AMLCG). *US National Institutes of Health*. Stand 25.10.2015, abgerufen am 04.09.2015 von <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00266136>.
- [121] Rothe G. Technische und Methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G (Eds). *Zelluläre Diagnostik - Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger, 2007, S. 27-70.

- [122] Tárnok A, Lenz D, Mittag A. Qualitätskontrolle und Standardisierung. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G (Eds). *Zelluläre Diagnostik - Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger, 2007, S. 157-177.
- [123] Ratei R, Nebe T, Schabath R, Kleine H-D, Karawajew L, Ludwig W-D. Akute Leukämien. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G (Eds). *Zelluläre Diagnostik - Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger, 2007, S. 946-1000.
- [124] Margalit O, Somech R, Amariglio N, Rechavi G. Microarray-based gene expression profiling of hematologic malignancies: basic concepts and clinical applications. *Blood Rev.* 2005;19(4):223-234.
- [125] Hofmann W-K, Ottmann OG, Hoelzer D. Globale Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays: Diagnostik und Klassifikation von Tumorerkrankungen. *Dtsch Arztbl International*. 2003;100(5):271-.
- [126] Grimwade D, Haferlach T. Gene-expression profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2004;350(16):1676-1678.
- [127] Tefferi A, Bolander ME, Ansell SM, Wieben ED, Spelsberg TC. Primer on medical genomics. Part III: Microarray experiments and data analysis. *Mayo Clin Proc.* 2002;77(9):927-940.
- [128] Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4(2):249-264.
- [129] Ferrari F, Bortoluzzi S, Coppe A, et al. Novel definition files for human GeneChips based on GeneAnnot. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:446.
- [130] Janssen J, Laatz W. Nichtparametrische Tests. In: Janssen J, Laatz W (Eds). *Statistische Datenanalyse mit SPSS - Eine anwendungsorientierte Einführung in das Basissystem und das Modul Exakte Tests*. 8. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013, S. 601-660.
- [131] Zhong RK, Loken M, Lane TA, Ball ED. CTLA-4 blockade by a human MAAb enhances the capacity of AML-derived DC to induce T-cell responses against AML cells in an autologous culture system. *Cytotherapy*. 2006;8(1):3-12.
- [132] Bashey A, Medina B, Corrington S, et al. CTLA4 blockade with ipilimumab to treat relapse of malignancy after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2009;113(7):1581-1588.

- [133] Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res.* 2008;14(10):3044-3051.
- [134] Zhang L, Gajewski TF, Kline J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood.* 2009;114(8):1545-1552.
- [135] Zhou Q, Munger ME, Highfill SL, et al. Program death-1 signaling and regulatory T cells collaborate to resist the function of adoptively transferred cytotoxic T lymphocytes in advanced acute myeloid leukemia. *Blood.* 2010;116(14):2484-2493.
- [136] Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2011;117(17):4501-4510.
- [137] Guo Y, Xiao P, Lei S, et al. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008;40(5):426-436.
- [138] Schwanhausser B, Busse D, Li N, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature.* 2011;473(7347):337-342.
- [139] Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):227-232.
- [140] Maier T, Guell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 2009;583(24):3966-3973.
- [141] Kern W, Kohlmann A, Schoch C, Schnittger S, Haferlach T. Comparison of mRNA abundance quantified by gene expression profiling and percentage of positive cells using immunophenotyping for diagnostic antigens in acute and chronic leukemias. *Cancer.* 2006;107(10):2401-2407.
- [142] Kern W, Kohlmann A, Wuchter C, et al. Correlation of protein expression and gene expression in acute leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2003;55(1):29-36.
- [143] Lichtenegger FS, Kondla I, Krempasky M, et al. RNA and protein expression of herpesvirus entry mediator (HVEM) is associated with molecular markers, immunity-related pathways and relapse-free survival of patients with AML. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(12):1505-1515.

- [144] Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341(14):1051-1062.
- [145] Walter RB, Othus M, Burnett AK, et al. Significance of FAB subclassification of "acute myeloid leukemia, NOS" in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood.* 2013;121(13):2424-2431.
- [146] Mrozek K, Marcucci G, Nicolet D, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2012;30(36):4515-4523.
- [147] Martner A, Thoren FB, Aurelius J, Hellstrand K. Immunotherapeutic strategies for relapse control in acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2013;27(5):209-216.
- [148] Soroosh P, Doherty TA, So T, et al. Herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) regulates the persistence of T helper memory cell populations. *J Exp Med.* 2011;208(4):797-809.
- [149] Sedy JR, Bjordahl RL, Bekiaris V, et al. CD160 activation by herpesvirus entry mediator augments inflammatory cytokine production and cytolytic function by NK cells. *J Immunol.* 2013;191(2):828-836.
- [150] Lion E, Willemen Y, Berneman ZN, Van Tendeloo VF, Smits EL. Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012;26(9):2019-2026.
- [151] Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med.* 2013;5(200):200ra116.

Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Marion Subklewe für die Möglichkeit diese Promotionsarbeit in ihrer Forschungsgruppe durchzuführen und im Besonderen für ihre herzliche und motivierende Betreuung.

Ein großer Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. med. Felix Lichtenegger für seine verlässliche, geduldige und engagierte Unterstützung sowie seinen kompetenten Rat.

Ich danke den Studienleitern der AMLCG Studiengruppe, Frau Sauerland aus dem Institut für Biometrie und Klinische Forschung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster und allen beteiligten Ärzten der teilnehmenden Zentren für die Patientenrekrutierung und die Akquisition der klinischen Verlaufsdaten.

Ein großer Dank geht an alle Mitarbeiter des LfL, insbesondere an Elke Habben, Karin Hecht und Ewelina Zientara, für ihre technische Unterstützung und den freundlichen Austausch.

Ich danke Anna Lena Weber und Michael Krempasky für ihre Arbeit beim Aufbau der Datenbank, die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Motivation.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner treuesten Leserin Simone für ihre hilfreichen Ratschläge und die vielen erheiternden Kommentare. Vielen Dank auch an Nina für den letzten Schliff.

Ich danke Karsten für den großen Motivationsschub, den technischen Support und den treuen Beistand.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium erst ermöglicht und mich immer unterstützt haben. Danke für die vielen lustigen Anekdoten, die mich immer wieder zum Lachen gebracht haben, und für den unerschütterlichen Optimismus.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Isabell Nathalie Kondla, an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Oberflächen- und RNA-Expression von Herpes Virus Entry Mediator (HVEM) bei Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie und Korrelationen mit zytogenetischen sowie molekulargenetischen Charakteristika und klinischem Verlauf der Erkrankung“

selbständige verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 03.06.2017

Isabell Nathalie Kondla