

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Die prognostische Relevanz der durchflusszytometrisch bestimmten
minimalen Resterkrankung bei Patienten mit Akuter Myeloischer
Leukämie zum Zeitpunkt der Aplasie**

Dissertation

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

vorgelegt von

Katharina Mariam Ringel

aus

München

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Marion Subklewe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Marcus Hentrich
Priv. Doz. Dr. Oliver Stötzer

**Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter:** Dr. Daniela Sauter
Dr. Thomas Köhnke

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

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2017

Eidesstattliche Versicherung

Ringel Katharina

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Die prognostische Relevanz der durchflusszytometrisch bestimmten minimalen Resterkrankung bei Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie zum Zeitpunkt der Aplasie“

selbstständig 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, 2017

**Die prognostische Relevanz der durchflusszytometrisch bestimmten
minimalen Resterkrankung bei Patienten mit Akuter Myeloischer
Leukämie zum Zeitpunkt der Aplasie**

Gewidmet meiner geliebten Oma,

Mahin Rafizadeh

Inhalt

Inhalt	VIII
Abkürzungen	X
1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen der AML	1
1.2 Epidemiologie	2
1.3 Ätiologie	3
1.4 Klinische Symptomatik und Komplikationen	5
1.5 Diagnostik	7
1.6 Klassifikationen	7
1.7 Therapie	10
1.8 Prognostische Faktoren und Risikostratifizierung	13
1.8.1 Zytogenetik	13
1.8.2 Alter	14
1.8.3 Leukozytenzahl, LDH und weitere klinische Faktoren	14
1.8.4 Molekulargenetische Marker	15
1.9 Minimale Resterkrankung	18
1.9.1 Methode der Durchflusszytometrie	21
1.9.2 Immunphänotypisierung	21
1.9.3 Durchflusszytometrisch erhobene minimale Resterkrankung	22
2 Zielsetzung	25
3 Patienten, Material und Methoden	26
3.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Patienten	26
3.2 Therapieprotokolle	27
3.3 Diagnostische Verfahren	27
3.4 Relevante Zeitpunkte der Untersuchungen	27
3.5 Durchflusszytometrie	28
3.6 Statistische Analysen	29
4 Ergebnisse	31
4.1 Patientenkollektiv	31
4.2 Cut-off-Werte zur Festlegung des MRD-Status	36

4.3 Uni- und multivariate Analysen von Prognosefaktoren.....	39
4.4 Prognostische Aussagen von MRD und Zytogenetik	42
4.5 Prognostische Aussagen von MRD und Molekulargenetik	44
4.6 Prognostische Aussagen von MRD und morphologischer Blastenzahl	46
4.7 Korrelation zwischen MRD-Status „während Aplasie“ und „nach Induktion“ ..	47
5 Diskussion.....	50
5.1 Methoden der LAIP-Bestimmung.....	50
5.2 Cut-off-Werte der durchflusszytometrischen MRD-Bestimmung	51
5.3 Prognostische Signifikanz des MRD-Status	52
6 Zusammenfassung	54
7 Verzeichnisse.....	55
7.1 Tabellenverzeichnis.....	55
7.2 Abbildungsverzeichnis	56
7.3 Literaturverzeichnis.....	57
Danksagung	69

Abkürzungen

abn	Abnormalität
add	Zugewinn unbekanntes Material
ALL	akute lymphatische Leukämie
alloSCT	allogene Stammzelltransplantation
AML	akute myeloische Leukämie
AMLCOG	Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group
APL	Akute Promyelozytenleukämie
Ara-C	Cytosin-Arabinosid
As ₂ O ₃	Arsentrioxid
ATRA	All-trans-Retinsäure
bzw.	beziehungsweise
CBF	core-binding factor
CD	cluster of differentiation
C/EBP α	CCAAT/enhancer binding protein alpha – Gen
CI	confidence interval, Konfidenzintervall
CML	chronische myeloische Leukämie
CR	complete remission, komplette Remission
del	Deletion
DFS	disease free survival
DNR	Daunorubicin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECD	energy-coupled dye
ED	Erstdiagnose
EFS	event free survival
ELN	European LeukemiaNet

FAB	French-American-British
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT3-ITD	FMS-like tyrosine kinase 3 – internal tandem duplication
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
HAM	Hochdosis-Ara-C (3g)/Mitoxantron
HAM-HAM	Doppelinduktion HAM
HLA	human leucocyte antigen
inv	Inversion
i. v.	Intravenös
KM	Knochenmark
LAIP	leukemia associated immunophenotype, leukämieassoziiertes Immunphänotyp
LD	log difference
LDH	Laktatdehydrogenase
LSC	leukemic stem cell, leukämische Stammzelle
MLL	mixed lineage leukemia
MNC	mononuclear cells, mononukleäre Zellen
MRC	Medical Research Council
MRD	minimal residual disease, minimale Resterkrankung
NK	Normaler Karyotyp
NOS	not otherwise specified, nicht anderweitig spezifiziert
NPM	Nucleophosmin
OS	overall survival, Gesamtüberleben
PB	peripheres Blut
PC5	Phycoerythrin-CY5

PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
p. o.	per os
ppm	parts per million, Teile pro Million
qRT-PCR	quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion
RFS	relapse free survival, rezidivfreies Überleben
RUNX	Runt-related transcription factor
SAL	Study Alliance Leukemia
sAML	sekundäre AML
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
S-HAM	zeitlich modifiziertes sequenzielles HAM
SSC	sideward scatter, Seitwärtsstreulicht
syn	Synonym
t	Translokation
TAD	Cytarabin plus Daunorubicin und Thioguanin
TAD-HAM	Doppelinduktion TAD und HAM
tAML	therapieassoziierte AML
vs.	versus
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

Die Pioniere in der frühen Geschichte der Leukämie waren berühmte Ärzte des 19. Jahrhunderts:

- 1811 beschrieb Peter Cullen einen Fall mit „splenitis acutus“ und unerklärbar milchigem Serum.
- 1825 beobachtete Alfred Velpeau leukämieassoziierte Symptome, wie Hepatosplenomegalie, Fieber, Schwäche sowie „Eiter“ in den Blutgefäßen.
- 1844 entdeckte Alfred Donné mikroskopisch die unzureichende Differenzierung der weißen Blutkörperchen.
- 1845 benannte John Bennett die Erkrankung als Leukozytämie, basierend auf der Ansammlung der Leukozyten.
- 1845 veröffentlichte Rudolf Virchow sein Manuskript „Weißes Blut“ und wies auf die Dysbalance zwischen weißen und roten Blutzellen hin.
- 1847 bezeichnete er die Erkrankung als Leukämie, abgeleitet von den griechischen Wörtern „leukós“ (weiß) und „haima“ (Blut) ab.
- 1846 diagnostizierte Henry Fuller mittels Mikroskopie eine Leukämie erstmals am lebenden Patienten [1].

1.1 Grundlagen der AML

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine heterogene Erkrankung, deren Pathogenese noch nicht vollständig geklärt ist. Sie ist auf eine maligne Entartung hämatopoetischer Progenitorzellen der myeloischen Zellreihe im Knochenmark zurückzuführen. Durch die Deregulierung von Wachstum, Differenzierung und Apoptose expandieren teilungsfähige, aber abnorme, funktionell unreife myeloische Zellen im Blut und Knochenmark. Durch die unkontrollierte Infiltration der leukämischen Blasten wird die physiologische Hämatopoese verdrängt. Die Entwicklung einer AML ohne assoziierte Vorerkrankung bezeichnet man als De-novo-AML. Entsteht die Leukämie aus einer vorbestehenden klonalen Erkrankung der Hämatopoese oder nach einer vorangegangenen zytostatischen Chemo- oder Radiotherapie, spricht man von einer sekundären beziehungsweise (bzw.) therapieassoziierten AML [2].

Die leukämischen Zellen können von kompletter Aufhebung der Ausreifung bis hin zu einer abnormen megakaryozytären Ausreifung variieren. Über den Ursprung dieser Zellen gibt es verschiedene Modelle. Das weitverbreitetste Modell geht von einer leukämischen Stammzelle (LSC) aus, welche sich potenziell unbegrenzt selbst erneuern kann und damit die Persistenz und ggf. die Proliferation an leukämischen Blasten sichert. Es wird vermutet, dass die Entstehung der LSC auf einer beliebigen Stufe der normalen hämatopoetischen Entwicklung zwischen Stammzelle und linienspezifischer Vorläuferzelle stattfinden kann, was die morphologische Heterogenität erklären würde [3, 4].

1.2 Epidemiologie

Die akute myeloische Leukämie macht in den westlichen Nationen rund 25 % aller Leukämien und 80 % aller akuten Leukämien im Erwachsenenalter aus [5] und ist damit die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter [6]. Nach einer Schätzung beläuft sich die Inzidenz in Deutschland auf jährlich 3600 Neuerkrankungen [2]. Alle Altersgruppen sind betroffen, doch ist die AML überwiegend eine Erkrankung im höheren Alter mit einem medianen Alter von 72 Jahren bei Diagnosestellung [7]. Die Erkrankungsrate nimmt bei über 65-Jährigen mit 15 Neuerkrankungen pro 100000 stark zu [8]. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (4,4 vs. 2,8 laut amerikanischem Krebsregister, SEER) [2]. In Abbildung 1-1 werden die geschätzten altersgruppenabhängigen Inzidenzen der AML pro Jahr in Deutschland dargestellt.

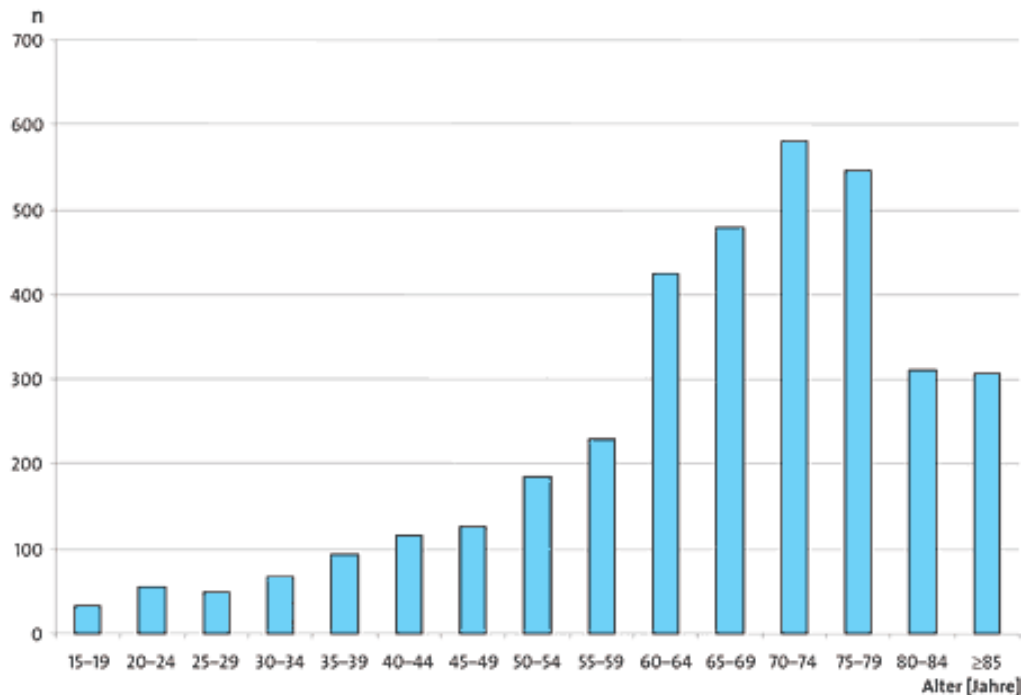


Abbildung 1-1: Geschätzte altersgruppenabhängige Inzidenzen der AML pro Jahr in Deutschland (Stand: 2000) [2]

1.3 Ätiologie

Die Ursache für die Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie kann bei der Mehrzahl der Patienten nicht eruiert werden. Zu den prädisponierenden Einflussgrößen zählen genetische Faktoren sowie die Exposition mit schädigenden physikalischen und chemischen Noxen.

Als genetischer Risikofaktor ist die Trisomie 21 bekannt. Bei Kindern mit Trisomie 21, die an einer AML erkranken, tritt die Erkrankung meist vor dem 4. Lebensjahr auf. Die Prävalenz ist mit 1:300 auf das 15-Fache erhöht. Fast die Hälfte dieser Leukämien ist als akute Megakaryoblastenleukämie (nach FAB-Klassifikation M7) klassifiziert, ein verhältnismäßig seltener Subtyp der AML. Die Mehrheit weist eine Mutation des GATA1-Transkriptionsfaktors auf, welcher einen für die Megakaryopoese essenziellen Transkriptionsfaktor darstellt [9, 10].

In einer Studie von Smith et al. [11] wurde eine seltene Form, die familiäre AML, beschrieben, welche durch eine Keimbahnmutation im Gen CCAAT enhancer binding protein alpha (C/EBP α) begründet ist. Der Transkriptionsfaktor C/EBP α reguliert die Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen in reife Granulozyten. Sporadische Mutationen

des C/EBP α -Gens sind weitaus häufiger und bei 10–15 % aller AML-Patienten nachweisbar [12, 13].

Weitere genetische Erkrankungen wie das Klinefelter-Syndrom [14], die Fanconi-Anämie [15] und die Neurofibromatose [16, 17] weisen aufgrund ihrer genetischen Instabilität am ehesten ein erhöhtes Risiko für das Entstehen einer Leukämie auf.

Zu den externen Einwirkungen gehört ionisierende Strahlung, welche mit einem erhöhten Risiko, an AML zu erkranken, verknüpft ist. Eine Studie von Ichimaru et al. untersuchte die Inzidenz von Leukämien nach den Atombombenexplosionen im August 1945 in Hiroshima und Nagasaki. Hierzu wurden 82 000 Überlebende und 27 000 nicht betroffene Menschen im Zeitraum 1950–1972 in die Studie einbezogen. 7 Jahre nach der Atombombenexplosion wurde die größte Inzidenz von akuten Leukämien bei Überlebenden, welche einer hohen Strahlenbelastung ausgesetzt waren, festgestellt (8 neue Fälle unter 6046 Personen). Unter den Betroffenen wurde bis 1971 eine erhöhte Erkrankungsrate abhängig von der Strahlenbelastung und dem Alter zum Zeitpunkt der Atombombenexplosion nachgewiesen [18]. Der am häufigsten erfasste Leukämietyp ist die AML [19].

Auch eine therapeutische Strahlentherapie erhöht das Erkrankungsrisiko [20, 21].

Des Weiteren im Rahmen einer Chemotherapie verabreichten Substanzen, wie Alkylanzien oder Topoisomerase-II-Hemmer, können eine AML hervorrufen. 10–20 % aller AML-Erkrankungen sind potenziell auf eine frühere Chemotherapie zurückzuführen [22]. Eine therapieassoziierte AML durch Exposition mit Alkylanzien tritt typischerweise nach 4–7 Jahren auf. Durch das Einbauen von Alkylgruppen in die Desoxyribonukleinsäure (DNS) werden Strangbrüche hervorgerufen, die eine korrekte Replikation der betroffenen DNS verhindern und zur Apoptose der Zelle führt. Eine mit Topoisomerase-II-Hemmer assoziierte AML hat eine kürzere Latenzperiode mit einem Median von 2–3 Jahren. Unter Ausbildung einer Enzym-DNA-Bindung werden Doppelstrangbrüche erzeugt, welche bei dem Versuch der Reparatur zu chromosomalen Translokationen führen, meist zu 11q23 oder 21q22. Die Rate einer therapieassoziierten AML nach einer autologen Stammzelltransplantation wird in der Literatur zwischen 1,1 % und 24,3 % nach 5 Jahren beschrieben [23, 24].

Zu den kanzerogenen Umwelttoxinen zählen Lösungsmittel, am bekanntesten Benzol. Im Jahr 1897 wurde in Paris der erste Fallbericht veröffentlicht, der einen Zusammenhang

zwischen der Exposition von Benzol und hämatologischen Erkrankungen zeigte [25]. Eine Studie von Hayes et al. bestätigte bei 74 828 benzolexponierten Arbeitern und 35 805 Kontrollpersonen ein dosisabhängiges, erhöhtes Erkrankungsrisiko für myelodysplastische Syndrome und AML (relatives Risiko: 3,2; 95%-Konfidenzintervall: 1,0–10,1). Das relative Risiko stieg für Personen, die an der Arbeitsstätte dauerhaft einer Benzolkonzentration von 25 ppm (parts per million, Teile pro Million) oder höher ausgesetzt waren, auf 7,1 an (95%-Konfidenzintervall: 2,1–23,7) [2, 26].

Kürzlich wurde eine Korrelation zwischen inhalativem Nikotinkonsum und AML in einer Metanalyse bestätigt, welche 17 Studien zwischen 1993 und 2013 mit insgesamt 7500 Patienten einschloss. Hierbei konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung je nach Menge und Zeit des Nikotinkonsums festgestellt werden. Raucher mit weniger als 10 pack-years (Anzahl der Zigarettenschachteln pro Tag \times Anzahl der Jahre) hatten ein 13%ig höheres Risiko. Bei über 30 pack-years stieg das Risiko um bis zu 71 % an [27]. Das Gesamtüberleben (OS, overall survival) bei Patienten, die rauchen oder geraucht haben, ist kürzer (30,89 Monate) als bei AML-Erkrankten ohne Nikotinkonsum (60,32 Monate; $p=0,005$) [28]. Womöglich ist der Inhaltsstoff Benzol im Zigarettenrauch mitverantwortlich.

1.4 Klinische Symptomatik und Komplikationen

Das Zeitintervall zwischen dem Beginn der Symptome und der Diagnosestellung beschränkt sich bei der AML in der Regel auf wenige Wochen [29]. Durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese kommt es zu einem Mangel an Erythrozyten, Thrombozyten und funktionellen Leukozyten, was zu den aus der Knochenmarkinsuffizienz resultierenden Symptomen führt.

Müdigkeit, hervorgerufen durch eine Anämie, ist eines der häufigsten Symptome der AML und in Studien mit einer Häufigkeit von 47 % [30] bis 83 % [31] bei AML-Patienten beschrieben. Eine Anämie kann sich des Weiteren durch Blässe der Haut und Schleimhäute, Tachypnoe, verminderte Leistungsfähigkeit, Schwindel sowie durch Palpitationen bemerkbar machen.

Aus der Thrombozytopenie resultiert eine erhöhte Blutungsneigung, die sich in Epistaxis, Zahnfleischblutungen, Menorrhagie oder auch Organeinblutungen manifestieren kann. Petechien treten typischerweise mit Thrombozytenzahlen von $<20\,000/\mu\text{l}$ auf.

Die verminderte Zahl der funktionstüchtigen Leukozyten führt zu einer erhöhten Infektanfälligkeit, insbesondere gegen Bakterien und Pilze. Prädisponierende Infektionsstellen sind der Rachen und die Lunge (Tonsillitis, Pneumonie) [2].

Zu den selteneren Symptomen zählt ein kutaner Befall, der sich bei etwa 10–20% der Patienten mit myelomonozytärer AML unspezifisch im Sinne von Erythem, Papeln, Plaques, Urticaria oder Knötchen manifestiert [32]. Durch Infiltration von monozytären oder myelomonozytären Zellen ist bei etwa 5% aller AML-Patienten eine Gingivahyperplasie nachweisbar, welche sich bei 66,7% aller AML-Patienten mit der Klassifikation M5 und bei 18,5% der AML-Patienten mit der Klassifikation M4 entwickelt [33]. Eine fokale extramedulläre Ansammlung von Blasten, ein sogenanntes Chlorom (3% der AML-Patienten), kann sich in der Augenhöhle, den Nasennebenhöhlen, der Haut oder den Knochen, aber auch in anderen Geweben wie dem Darm einlagern [34]. Neurologische Beschwerden wie Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit und Photophobie können Zeichen einer Meningeosis leukaemica sein, welche allerdings bei nur etwa 2% der AML-Erkrankten bei Erstdiagnose vorkommt. Schmerzhaftes Lymphadenopathien sind bei AML-Patienten deutlich seltener als bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL). Knochenschmerzen aufgrund einer intramedullären Proliferation sind selten, Arthralgien dagegen häufiger [29]. Das Symptom Schmerz nimmt über den zeitlichen Verlauf der AML-Erkrankung zu und wird von 24% [30] bis 50% [35] der AML-Patienten angegeben.

Bereits im frühen Verlauf können schwerwiegende Komplikationen auftreten, wie die Hyperleukozytose. Diese ist durch eine Leukozytenzahl von $>100 \times 10^9/l$ definiert. In einer Kohorte der Study Alliance Leukemia (SAL) von 3510 neu diagnostizierten AML-Patienten fand sich bei 357 Patienten (10%) eine Hyperleukozytose [36]. Aufgrund der Hyperviskosität werden Symptome wie Dyspnoe, Hypoxie, Kopfschmerzen, epileptische Anfälle und Verwirrheitszustände hervorgerufen. Durch die sogenannte Leukostase kann es zu einer Verlegung der Kapillaren und folglich zu einem Multiorganversagen kommen. Am häufigsten sind die Lungen (in etwa 80% der Fälle), das Gehirn und die Nieren betroffen, mit meist schneller Progression und häufig tödlichen Folgen [37].

Ein Tumorlysesyndrom mit Hypokalzämie, Hyperkaliämie, erhöhter Laktatdehydrogenase(LDH)-Aktivität, Hyperphosphatämie, Hyperurikämie und folglich einem oligurischen Nierenversagen kann den Verlauf aggravieren [36].

Durch Aktivierung der Gerinnungskaskade und der Hyperfibrinolyse, ausgelöst durch AML-Blasten, kommt es zu komplexen Gerinnungsstörungen, wie der disseminierten intravasalen Koagulopathie, mit bedrohlichen Hämorrhagien.

Neben körperlichen Symptomen spielt die psychische Komponente eine erhebliche Rolle. Im Krankheitsverlauf treten zunehmend psychische Störungen wie Depressionen und Ängste [35, 38] und durch den schnellen Verlauf der akuten Leukämie auch posttraumatische Störungen auf. Eine Studie erhob bei 14 % aller Patienten, die an einer akuten Form der Leukämie litten, ein akutes Belastungssyndrom. Weitere 18 % erfüllten die Kriterien für ein subsyndromales Belastungssyndrom [39].

Die häufigsten Todesursachen sind Infektionen (75 %), Blutungen (24 %) und Organversagen (9 %) [40].

1.5 Diagnostik

Besteht anhand der Anamnese, der Klinik und des Blutbilds das Verdachtsmoment einer hämatologischen Systemerkrankung, folgt ein breites Spektrum an diagnostischen Verfahren. Mit einer Knochenmarkpunktion, typischerweise an der Spina iliaca posterior superior, kann die Diagnose in der Regel verifiziert werden. Das Knochenmarkaspirat wird mit den Methodiken der Zytomorphologie, Zytochemie, Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulargenetik untersucht. Bei nicht aspirierbarem Knochenmark, genannt *Punctio sicca*, können alternativ Abrollpräparate zytomorphologisch beurteilt werden. Die histologische Beurteilung einer Knochenmark-Stanzbiopsie sollte angestrebt werden, um mögliche Hinweise auf eine sekundäre Genese der AML zu erhalten. Neben der Diagnosesicherung helfen die zuvor genannten Methoden auch bei der prognostischen Einschätzung und bei der Einleitung einer adäquaten Therapie. Die Untersuchungen sollten in einem hämatologisch-onkologisch spezialisierten Zentrum und adäquat ausgestatteten Labor durchgeführt werden [41].

1.6 Klassifikationen

Zur Einteilung der AML werden die Zytomorphologie, Zytogenetik und Molekulargenetik herangezogen. Da die Klassifikation der French-American-British Cooperative Group (FAB) aus den Jahren 1976 und 1985 bei der Einteilung nur die Morphologie der AML

einschloss, entwickelte die World Health Organization (WHO) eine neue, an der Biologie und Zytogenetik orientierte Klassifikation.

FAB-Klassifikation

Die 11 unterschiedlichen Subgruppen der FAB-Klassen von M0 bis M7 spiegeln die verschiedenen AML-assoziierten Reifungsstörungen wider [3]. Die Differenzierung der Blasten erfolgt nach spezifischen Merkmalen, wie Zellform, Zellgröße, Chromatinstruktur und Anzahl der Nukleoli. Zytochemische Spezialfärbungen können Glykogen durch die Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) sowie durch die Enzyme Peroxidase (POX), saure Phosphatase oder Esterase nachweisen, wodurch eine weitere Differenzierung erreicht werden kann. Nach der FAB-Klassifikation liegt eine AML vor, wenn im Knochenmark der Anteil der myeloischen Blasten auf allen kernhaltigen Zellen $\geq 30\%$ beträgt.

WHO-Klassifikation

In die WHO-Klassifikation gehen die Morphologie, die Zytochemie, die Immunphänotypisierung, die Genetik und klinische Faktoren mit ein. Die AML wird in acht Gruppen eingeteilt, wobei die vierte Gruppe zum Teil die FAB-Klassifikation wiedergibt. Für die Diagnosestellung sind anders als bei der FAB-Klassifikation bereits 20 % Blasten im Knochenmark oder peripheren Blut ausreichend. Alternativ ist die Diagnose einer AML – unabhängig vom Anteil der Blasten – auch dann zu stellen, wenn im Rahmen der zytogenetischen und molekulargenetischen Analytik eine definierte Aberration gemäß der WHO-Klassifikation nachgewiesen wird [2]. Im Jahr 2008 wurde die vierte Version veröffentlicht [42].

- 1. AML mit rekurrenten zytogenetischen Veränderungen**
 - AML mit t(8;21)(q22;q22), RUNX1-RUNX1T1
 - AML mit abnormen Knochenmarkeosinophilen [inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22), CBFβ-MYH11]
 - Akute Promyelozytenleukämie [AML mit t(15;17)(q22;q11-12) und Varianten, PML/RARα]
 - AML mit t(9;11)(p22;q23), MLLT3-MLL oder anderen 11q23 (MLL)-Anomalien
 - AML mit t(6;9)(q23;q34), DEK-NUP214
 - AML mit inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2), RPN1-EVI1
 - AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13), RBM15-MKL1
 - Provisorische Entität: AML mit mutiertem NPM1
 - Provisorische Entität: AML mit mutiertem CEBPA
- 2. AML mit Myelodysplasie-assoziierten Eigenschaften**
 - AML mit vorausgegangenem myelodysplastischem Syndrom
 - AML mit myelodysplastisch assoziierter Zytogenetik
 - AML mit mindestens 50% Zellen aus 2 oder mehr myeloischen Reihen mit Dysplasie
- 3. Therapieinduzierte AML und therapieinduziertes myelodysplastisches Syndrom**
- 4. AML ohne weitere Spezifizierung**
 - Minimal differenzierte AML (FAB M0)
 - Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4)
 - Akute monoblastische und monozytäre Leukämie (FAB M5)
 - Akute Erythroleukämie (FAB M6)
 - Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7)
 - Akute Basophilenleukämie
 - Akute Panmyelose mit Myelofibrose
- 5. Myeloides Sarkom (syn.: extramedullärer myeloider Tumor, Chlorom)**
- 6. Myeloide Proliferationen, assoziiert mit Down-Syndrom**
 - Transiente abnormale Myelopoese
 - Myeloide Leukämie, assoziiert mit Down-Syndrom
- 7. Blastische, plasmazytoide dendritische Zellneoplasien**
- 8. Akute Leukämie mit unklarer Linienzugehörigkeit**
 - Akute undifferenzierte Leukämie
 - Gemischter Phänotyp der akuten Leukämie mit t(9;22)(q34;q11.2), BCR-ABL1
 - Gemischter Phänotyp der akuten Leukämie mit t(v;11q23), MLL rearranged
 - Gemischter Phänotyp der akuten Leukämie, B/myeloid, NOS
 - Gemischter Phänotyp der akuten Leukämie, T/myeloid, NOS

Tabelle 1-1: WHO-Klassifikation der AML [42]

1.7 Therapie

Seit Anfang der 1970er-Jahre werden AML-Patienten mit einer Polychemotherapie behandelt und damit eine Langzeitremission und Heilung ermöglicht [29]. Die Behandlung erfolgt in spezialisierten Kliniken, die sich nach nationalen oder internationalen Therapieprotokollen von kontrollierten Studien richten. Dadurch wird trotz der geringen Erkrankungsinzidenz gewährleistet, dass alle Patienten eine standardisierte Therapie erhalten und Erkenntnisse über den Erfolg einer Therapie erlangt werden können.

Nach Diagnosestellung sollte frühzeitig mit der Therapie begonnen werden. Eine retrospektive Studie stellte bei jüngeren Patienten fest, dass eine längere Zeitdauer zwischen Diagnosestellung und Therapiebeginn mit einem schlechteren Langzeitergebnis assoziiert ist [43].

Die kurative Therapie hat die Intention, eine komplette Remission (CR) zu erreichen. Diese ist definiert durch die morphologische Abwesenheit leukämischer Blasten ($<5\%$ Blasten im Knochenmark), die Abwesenheit von extramedullären Leukämiemanifestationen und durch die Regeneration des peripheren Blutbildes (>1000 Neutrophile/ μl und $\geq 100\,000$ Thrombozyten/ μl) [44].

Die initiale Therapie wird Induktionstherapie genannt und hat das Ziel eine CR zu erreichen. Die darauffolgende Therapie wird bezeichnet als Postremissionstherapie und soll die CR erhalten.

Im Jahr 1973 wurden von Yates et al. erste Ergebnisse zum derzeitigen Standard der Induktionstherapie nach dem sogenannten 3+7-Schema veröffentlicht [45]. Es besteht aus einer 3-tägigen Applikation eines Anthrazyklins (Daunorubicin 60 mg/m^2 , Idarubicin 12 mg/m^2 oder Mitoxantron $10\text{--}12\text{ mg/m}^2$) mit einer 7-tägigen Dauerinfusion von Cytarabin ($100\text{--}200\text{ mg/m}^2$). Dadurch wird bei $60\text{--}80\%$ der AML-Patienten zwischen 18 und 60 Jahren und bei $40\text{--}60\%$ der AML-Patienten >60 Jahre eine komplette Remission erreicht. Bis heute gilt dieses Schema als Standard der Induktionstherapie; durch Substitution mit anderen Substanzen konnte bislang kein besseres klinisches Langzeitergebnis erzielt werden [46]. Allerdings zeigte sich, dass durch Dosiserhöhung von Daunorubicin (45 mg/m^2 vs. 90 mg/m^2) ein besserer klinischer Outcome erreicht wird. Nebenwirkungen, wie die kardiale Toxizität von Daunorubicin, waren in den Studien nicht signifikant erhöht [47, 48]. In Studien der Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group (AMLCG)

wurde die Gabe von hochdosiertem Cytarabin im Rahmen der Induktionstherapie etabliert. Patienten <60 Jahren werden nach dem Schema der AMLCG sequenziell mit Cytarabin-Arabinosid (AraC) und Mitoxantron (sHAM) oder mit zweifacher Induktionstherapie (TAD-HAM oder HAM-HAM) behandelt. Die Kombination aus einer Standarddosis Cytarabin-Arabinosid, Danorubicin (DNR) und Thioguanin wird als TAD-9 bezeichnet. HAM ist durch die Verbindung aus einer Hochdosistherapie Cytarabin-Arabinosid mit Mitoxantron definiert. Die Therapie der über 60-Jährigen besteht aus einer Induktionstherapie in reduzierter Dosis. Nach Regeneration der physiologischen Blutzellen wird durch eine erneute Knochenmarkpunktion das Erreichen einer CR bestätigt. Anschließend folgt eine Postremissionstherapie. Die Wahl zwischen einer Konsolidierungstherapie mittels Chemotherapie und einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (alloSCT) orientiert sich an Risikoprofil, Komorbiditäten, Alter, Spenderverfügbarkeit und Patientenwunsch [49]. Für jüngere Patienten mit günstigem Risikoprofil, die im Rahmen der Induktionstherapie Hochdosis-Cytarabin erhalten haben, ist eine Konsolidierungstherapie mit TAD-9 und nachfolgender Erhaltungstherapie vorgesehen. Patienten mit mittlerem oder hohem Rezidivrisiko anhand zytogenetischer oder molekularer Kriterien und einem human-leucocyte-antigen(HLA)-kompatiblen Familien- oder Fremdspender erhalten stattdessen eine alloSCT [50–53]. Für diese Patientenkohorte wird im Vergleich zur konsolidierenden Chemotherapie ein verbessertes rezidivfreies Überleben (RFS) erreicht, allerdings wird sie durch die hohe Mortalitätsrate (zwischen 15 % und 50 % schwankend), häufig bedingt durch eine Graft-versus-Host-Reaktion, limitiert. Für die große Gruppe der Patienten mit intermediärem Risikoprofil ist die Wertigkeit der alloSCT nicht abschließend geklärt. Zusammenfassend müssen zur Therapieentscheidung daher einerseits das Risikoprofil der Leukämie mit den zytogenetischen und molekular-genetischen Eigenschaften sowie das Risiko der Transplantation mit den Folgen abgewogen werden, andererseits müssen zusätzliche prognostische Marker, die eine patientenindividuelle Therapieentscheidung ermöglichen, identifiziert werden [46, 49, 54].

Die gängigen Dosierungen der Therapien gemäß der AMLCG sind wie folgt:

HAM

- <60 J.: AraC $2 \times 3 \text{ g/m}^2$ i. v. (intravenös), Tage 1–3
- ≥ 60 J.: AraC $2 \times 1 \text{ g/m}^2$ i. v., Tage 1–3
- + Mitoxantron 10 mg/m^2 i. v., Tage 3, 4 und ggf. 5

TAD-9

- Thioguanin $2 \times 100 \text{ mg}$ p. o. (per os). Tage 3–9
- AraC 100 mg/m^2 i. v., Tage 1, 2
- AraC $2 \times 100 \text{ mg/m}^2$ i. v., Tage 3–8
- DNR 60 mg/m^2 i. v., Tage 3–5

sHAM

- <60 J.: AraC $2 \times 3 \text{ g/m}^2$ i. v., Tage 1, 2, 8, 9
- ≥ 60 J.: AraC $2 \times 1 \text{ g/m}^2$ i. v., Tage 1, 2, 8, 9
- + Mitoxantron 10 mg/m^2 , Tage 3, 4, 10, 11

Um Informationen über das Therapieansprechen zu gewinnen, wird zum Zeitpunkt der „Aplasie“ (je nach Studienprotokoll zwischen dem 15. und dem 28. Tag nach Beginn der Induktionstherapie) eine Knochenmarkpunktion durchgeführt, welche bei gutem Therapieansprechen keine Vermehrung myeloischer Blasten zeigt.

Bei älteren Patienten, schwerwiegenden Komorbiditäten und schlechtem Allgemeinzustand muss die hohe Toxizität und damit verbundene Mortalität der Standardtherapie bei der Therapieentscheidung mit in Betracht gezogen werden. In dieser Konstellation kann eine primär palliative oder rein supportive Therapie für den Patienten günstiger sein als eine intensive Induktionstherapie.

Bei erfolgreicher kurativer Therapie wird zur Nachsorge in den ersten 2 Jahren eine Knochenmarkuntersuchung alle 3 Monate empfohlen, da die meisten Rezidive 1 bis 3 Jahre nach Therapieende auftreten. Teilweise werden im Rahmen von Studien in den darauffolgenden 2 bis 3 Jahren alle 6 Monate Untersuchungen des Knochenmarks durchgeführt. Das periphere Blutbild sollte in den ersten 2 Jahren im Abstand von 1 bis 3 Monaten kontrolliert werden, danach alle 3 bis 6 Monate [49].

1.8 Prognostische Faktoren und Risikostratifizierung

Die Prognose und die Risikoeinteilung sind essenziell für die Wahl einer geeigneten Postremissionstherapie, um ein Rezidiv nach einer intensiven Induktionstherapie zu vermeiden und die CR zu erhalten. Es muss eine Entscheidung zwischen der Konsolidierungstherapie mittels Chemotherapie und der alloSCT, welche mit einer niedrigeren Rezidivrate, aber mit einer höheren Mortalitätswahrscheinlichkeit zusammenhängt, getroffen werden. Bei Patienten mit ungünstigem Risikoprofil wird bei passendem Spender eine alloSCT bevorzugt. Die Prognose wird von verschiedenen Faktoren wie der Zytogenetik, dem Alter und der Molekulargenetik bestimmt. Es wurden Risiko-Scores entwickelt, welche die Entscheidungsfindung einer geeigneten Therapie vereinfachen sollen.

1.8.1 Zytogenetik

Der Karyotyp der leukämischen Zellen ist der stärkste Parameter für die Prognose und stellt den Rahmen für die Risikostratifizierung und die risikoadaptierte Therapie dar. Bei etwa 60 % der AML-Patienten lässt sich eine zytogenetische Aberration nachweisen [55]. Mittlerweile sind über 100 balancierte, chromosomale Veränderungen (Translokationen, Insertionen, Inversionen) identifiziert [56]. Unter Einbezug der Ergebnisse der Studie von Grimwade et al. wurde im Jahr 2010 die prognostische Klassifikation bezogen auf den Karyotyp des Medical Research Council (MRC) in drei Untergruppen überarbeitet [57].

Günstiges Risikoprofil

- $t(15;17)(q22;q21)$
- $t(8;21)(q22;q22)$, unabhängig von anderen zytogenetischen Aberrationen
- $inv(16)(p13;q22)$, $t(16;16)(p13;q22)$

Mittleres Risikoprofil

- Entitäten, welche nicht als günstig oder ungünstig klassifiziert werden können

Ungünstiges Risikoprofil

- $abn(3q)$ [$t(3;5)(q21-25;q31-35)$ ausgeschlossen]
- $inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)$
- $add(5q)$, $del(5q)$, -5
- -7 , $add(7q)/del(7q)$

- t(6;11)(q27;q23)
- t(10;11)(p11~13;q23)
- t(11q23) [t(9;11)(p21–22;q23) und t(11;19)(q23;p13) ausgeschlossen]
- t(9;22)(q34;q11)
- -17/abn(17p)
- komplexer Karyotyp (≥ 4 Aberrationen)

1.8.2 Alter

Als einer der wichtigsten Patienten-bezogenen prognostischen Faktoren hat sich zudem das Erkrankungsalter herausgestellt. Unabhängig von anderen Faktoren wie der Zytogenetik oder der Molekulargenetik konnte in Studien belegt werden, dass das Alter einen unmittelbaren negativen prognostischen Einfluss auf das Erreichen einer CR, auf die Remissionsdauer und auf das OS hat [7, 49]. Dies resultiert aus einer mit dem Alter ansteigenden Rate an Komorbiditäten, einem damit einhergehenden schlechten Performance-Status und einer veränderten Pharmakokinetik und -dynamik, welche zu einer erhöhten Toxizität der Therapie führen kann [58]. Mit zunehmendem Alter verschiebt sich der zytogenetische Status von günstig zu ungünstig, mit einer höheren Rate an klonaler Heterogenität [59, 60]. Zusätzlich erschweren psychosoziale Faktoren wie kognitive Defizite und soziale Isolation den Verlauf der Erkrankung [61, 62].

1.8.3 Leukozytenzahl, LDH und weitere klinische Faktoren

Vor Therapiebeginn haben die Leukozytenzahl und die Konzentration an Laktatdehydrogenase (LDH) eine prognostische Aussagekraft. Eine Leukozytose wurde in Studien als unabhängiger ungünstiger Faktor bezüglich des Erreichens einer CR und des OS beschrieben [63, 64]. Eine Hyperleukozytose, definiert als eine Leukozytenzahl von $> 100 \times 10^9/l$, wurde mit einer höheren Sterblichkeit während der Induktionstherapie in Verbindung gebracht, hauptsächlich durch hämorrhagische Ereignisse, Tumorlysesyndrom und Infektionen [49, 65]. In einer Studie von Djunic et al. führte ein $> 1,5$ -fach höherer LDH-Wert im Vergleich zum Normwert ($> 600 U/l$) zu einer ungünstigen Prognose, was den in früheren Studien gefundenen Zusammenhang bestätigte [64, 66].

Etwa 50 % der älteren AML-Patienten (≥ 60 Jahre), welche sich in einem guten Gesundheitszustand befinden, erreichen nach der Induktionstherapie eine CR, jedoch ist im Vergleich zu jüngeren Patienten eine erhöhte Früh Todesrate (innerhalb von 60 Tagen nach

der Induktionstherapie) zu verzeichnen. Für das erwähnte Patientengut entwickelten Krug et al. einen Risiko-Score, welcher die Wahrscheinlichkeit des Erreichens einer CR und die Mortalitätswahrscheinlichkeit nach der Induktionstherapie errechnet. Einfluss auf diese Wahrscheinlichkeiten haben die Körpertemperatur, das Alter, De-novo-Leukämie vs. sekundäre Leukämie, der Hämoglobingehalt, die Thrombozytenzahl, der Fibrinogengehalt und der LDH-Wert. Zusätzliche Informationen über die zytogenetischen und molekulargenetischen Risikoprofile erhöhen die Aussagekraft des Scores. Dies gibt den Ärzten Hilfestellung, eine geeignete Therapie für den jeweiligen Patienten zu finden, z. B. auch bei Patienten mit zytogenetisch ungünstigem Risikoprofil [67].

Zur frühen Einschätzung des Krankheitsverlaufs konnten Kern et al. im Jahr 2003 evaluieren, dass der zytomorphologisch bestimmte Anteil der Blasten im Knochenmarkausstrich am Tag 16 nach Beginn der Induktionstherapie von prognostischer Relevanz ist. Ein erhöhter Blastenanteil ist selbst bei erzielter CR mit einem schlechteren Überleben assoziiert [68–70].

Die Erfassung der MRD mittels Durchflusszytometrie und quantitativer Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht es, weitere Aussagen über die Prognose im Verlauf der Therapie zu treffen, und wird in Abschnitt 1.9 – „Minimale Resterkrankung“ – näher erörtert.

1.8.4 Molekulargenetische Marker

Das prätherapeutische molekulare Screening untersucht das Vorhandensein von durch Translokation entstandenen Fusionsgenen PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1 und C/EBP α -MYH11 und von Mutationen in den Genen FLT3, C/EBP α und NPM1, welche aufgrund ihrer prognostischen Aussagekraft in die klinische Praxis Eingang gefunden haben und bei der Therapieentscheidung mitberücksichtigt werden. Die Bestimmung der MRD anhand leukämietypischer Mutationen erlaubt eine Einschätzung des molekularen Therapieansprechens während der intensiven Therapie und im Follow-up. Der prädiktive Wert für die frühzeitige Vorhersage eines Rezidivs ist bei einigen Markern sehr hoch. Eingeschränkt wird die Effektivität der Methode dadurch, dass nur in etwa einem Drittel aller Patienten Mutationen zum Monitoring nachweisbar sind [71–73].

CBF-AML

Der Core-binding-factor(CBF)-Komplex besteht aus einer β -Untereinheit, kodiert durch CBF β , und einer von drei Untereinheiten, vorwiegend kodiert durch RUNX1 (Runt-related transcription factor). Translokationen treten im Vergleich zu NPM1- und FLT3-Mutationen seltener auf und betreffen 15 % aller AML-Patienten [74]. Die CBF-AML Mutation korreliert mit einer besseren Prognose: 87 % erreichen eine CR und haben ein OS in 10 Jahren von 44 % [75]. Das Vorkommen von cKIT-Mutationen bei CBF-AML-Patienten variiert zwischen 6,6 % und 46,1 %. Die meisten, aber nicht alle Studien weisen bei cKIT-Mutation auf eine ungünstige Prognose hin [76, 77].

FLT3

Im Jahr 1996 wurde erstmals von Nakao et al. die FLT3-Mutation bei AML-Patienten beschrieben [78], die sich bei nahezu einem Drittel aller Patienten findet. Die aktivierenden Mutationen der Rezeptorkinase FLT3 werden von zwei Typen dominiert [79]:

- den internen Tandemduplikationen (ITD) von 3–400 Basenpaaren, in der Literatur auch als Längenmutationen bezeichnet, welche sich an verschiedenen Stellen der juxtamembranären Region eingliedern (23 % aller AML-Patienten), und
- den Punktmutationen, meistens die Domäne der Tyrosinkinase betreffend (8–12 % der AML-Patienten).

Das Vorliegen einer FLT3-ITD-Mutation ist mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden [80]. Ob dabei eine größere Menge an Insertionen einen negativen Einfluss auf die Prognose hat, wird derzeit kontrovers diskutiert [81, 82]. Studien gaben Hinweise darauf, dass die Proportion der mutierten Allele zu den Wildtyp-Allelen eine prognostische Relevanz hat [81, 83]. Interessanterweise scheint eine FLT3-Punktmutation keinen vergleichbar negativen Einfluss auf die Prognose zu haben wie eine FLT3-ITD-Mutation [80].

C/EBP α

Die C/EBP α -Mutation wird bei etwa 15 % aller AML-Patienten entdeckt. Dabei wird unterschieden zwischen einer Mutation auf einem Allel mit Expression des Wildtyps auf dem zweiten Allel (etwa 50 % der Patienten) und Mutationen auf beiden Allelen ohne Expression des Wildtyps. Nachdem Studien bei zytogenetisch intermediärem Risiko eine

günstige Prognose für die Mutation hatten belegen können [84], klassifizierte die WHO diese im Jahr 2008 als eine vorläufige Entität. Aktuelle Studien belegen allerdings nur eine bessere Prognose für eine Zweifach-Mutation des C/EBP α -Gens ohne zytogenetische Aberration und Abwesenheit einer FLT3-Mutation, so dass eine Anpassung der WHO-Klassifikation gefordert wird [12, 85, 86].

NPM1

Die NPM1-Mutation wurde in der AML erstmals im Jahr 2005 beschrieben [87] und darauffolgend im Jahr 2008 auch als vorläufige Entität in die WHO-Klassifikation aufgenommen. Eine Insertionsmutation – meist in Exon 12 von NPM1 – liegt bei fast einem Drittel aller AML-Patienten (FAB-Subtyp M3 ausgenommen) und in etwa 60 % aller Patienten mit normalem Karyotyp vor. Bis zu 55 verschiedene NPM1-Typen wurden beschrieben [88]. Die häufigste Form der Mutation (75–80 %) macht der Typ A aus, bei der durch eine Insertion von 4 Basenpaaren (TCTG) ein genetischer Shift generiert wird [87].

Nachdem die molekularen Marker essenziell für die Risikostratifizierung geworden sind, wurden sie in das Klassifikationsschema des European LeukemiaNet eingebunden, welches eine standardisierte Einteilung in Studien ermöglichen soll. Bei dieser Klassifikation wird zusätzlich unterschieden zwischen Intermediär-I und Intermediär-II [49].

Günstig

- t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
- inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBF β -MYH11
- NPM1-Mutation ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp)
- CEBP α -Mutation (normaler Karyotyp)

Intermediär-I

- NPM1- und FLT3-ITD-Mutation (normaler Karyotyp)
- Wildtyp-NPM1 und FLT3-ITD (normaler Karyotyp)
- Wildtyp-NPM1 ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp)

Intermediär-II

- t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
- nicht als „günstig“ oder „ungünstig“ klassifizierbare zytogenetische Aberrationen

Ungünstig

- inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
- t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
- t(v;11)(v;q23); MLL rearranged
- -5 oder del(5q); -7; abn(17p)
- komplexer Karyotyp

1.9 Minimale Resterkrankung

Nach erfolgter Therapie wird in einer zytomorphologischen Untersuchung routinemäßig der Anteil der Blasten bestimmt. Anhand der Blastenzahl können Aussagen über das Therapieansprechen und die Prognose getroffen werden (siehe Abschnitt 1.8 – „Prognose“). Die Verlässlichkeit ist jedoch durch die relativ geringe Sensitivität und die unterschiedliche Bewertung der Blasten in der subjektiven Beurteilung eingeschränkt. Eine Unterscheidung zwischen benignen und malignen Blasten ist anhand der Zytomorphologie nicht möglich. Es können bei Erreichen einer kompletten Remission noch bis zu 10^{10} leukämische Zellen vorhanden sein, welche mittels Zytomorphologie nicht erfasst werden können [89]. Als minimale Resterkrankung (MRD) wird dementsprechend das Vorhandensein leukämischer Blasten unterhalb der morphologischen Nachweisgrenze (Knochenmarkblasten $<5\%$) bezeichnet [90, 91]. Um die residuellen Leukämiezellen anderweitig als durch die morphologische Untersuchung zu detektieren und zu quantifizieren und somit die MRD zu erfassen, stehen zwei sensitivere Methoden zur Verfügung:

- die Durchflusszytometrie, welche die Identifizierung leukämieassoziierter aberranter Phänotypen ermöglicht (Sensitivität 1:10000), und
- die quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR), mit deren Hilfe leukämiespezifische Genfusionen oder -mutationen entdeckt und quantitativ gemessen werden können (Sensitivität 1:100000).

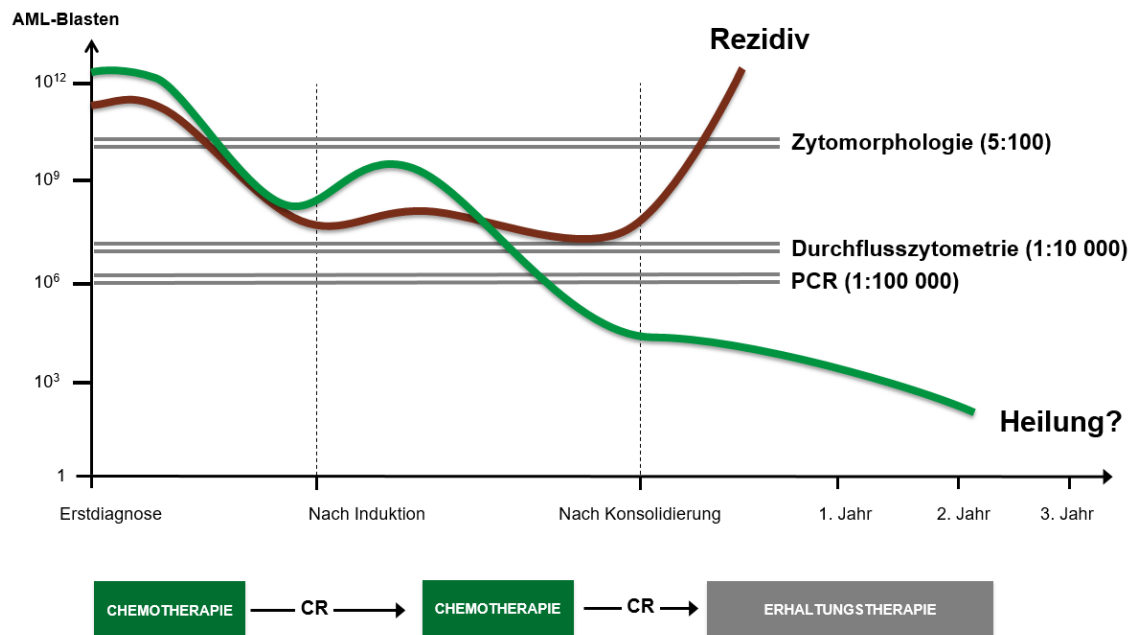


Abbildung 1-2: Minimale Resterkrankung im zeitlichen Verlauf

Die Bestimmung der MRD erlaubt zudem eine frühe Evaluation des Therapieansprechens. Abhängig von der Höhe des MRD-Wertes nach einer Therapie oder vor einer Stammzelltransplantation können prognostische Aussagen über das RFS und das OS gemacht werden [72, 92]. Ein weiterer Ansatzpunkt des MRD-Monitorings ist es, bei steigenden MRD-Messwerten einem Rezidiv durch eine präventive Therapie entgegenzuwirken.

Bislang gibt es noch kein standardisiertes Verfahren für die MRD-Analysen. Die Tabelle 1-2 zeigt eine Übersicht über veröffentlichte Studien zur durchflusszytometrisch bestimmten MRD und den zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhobenen cut-off-Werten. Eine prospektive Risikoeinteilung wird derzeit noch durch unterschiedliche Grenzwerte der MRD erschwert [71].

BM oder PB		Zeitpunkt der Untersuchung		Cutoff	MRD unabhängiger Risikofaktor in multivariaten Analysen		Endpunkte	Referenzen	Jahr	Zeitschrift
178	KM	Aplasia		0,15%	Ja (RFS)	RFS + OS	<i>Köhnke et al.</i>	2015	Leukemia	
106	KM	Tag 16		LD=2,11	Ja (EFS und RFS)	RFS + EFS + OS	<i>Kern et al.</i>	2004	Haematologica	
126	KM	Ende der Induktion		0,01 - 1%	Ja	RFS + OS	<i>San Miguel et al.</i>	2001	Blood	
100	KM	Ende der Induktion		0,035%	Ja (nach Konsolidierung)	RFS + OS	<i>Buccisano et al.</i>	2006	Leukemia	
53	KM	Ende der Induktion und nach Intensivierung		0,5% nach Induktion 0,2% nach Intensivierung	Ja	RFS + OS	<i>San Miguel et al.</i>	1997	Blood	
142	KM	Nach Induktion und nach Konsolidierung		0,035%	Ja (nach Konsolidierung)	RFS + OS	<i>Maurillo et al.</i>	2008	JCO	
56	KM	Nach Induktion und nach Konsolidierung		0,035%	Ja (nach Konsolidierung)	RFS + OS	<i>Venditti et al.</i>	2000	Blood	
517	KM	Nach Induktion und nach Konsolidierung		0,1%	Ja (nach dem 2. Zyklus)	RFS + OS	<i>Terwijn et al.</i>	2013	JCO	
1054	KM	Nach Induktion und nach Konsolidierung		75ste Perzentile von LD	Ja (RFS)	RFS + OS	<i>Kern et al.</i>	2004	Blood	
54	KM	Nach Induktion und nach Konsolidierung		0,15%	Ja (nach Induktion)	RFS + OS	<i>Al-Mawali et al.</i>	2009	Cytometry B Clin Cytom	
50	PB und KM	Nach Induktion und nach Konsolidierung		0,015%	Ja (nach Konsolidierung, RFS)	RFS + OS	<i>Maurillo et al.</i>	2007	Haematologica	
427	KM	Nach Induktion und nach Konsolidierung		0,1% - 0,2%	Ja	RFS + OS	<i>Freeman et al.</i>	2013	JCO	
210	KM	Nach Konsolidierung		0,035%	Ja	DFS + OS	<i>Buccisano et al.</i>	2015	Ann Hematol	

Tabelle 1-2: Übersicht über veröffentlichte Studien zur durchflusszytometrisch bestimmten MRD und deren cut-off-Werte

Literatur: [72, 93-104]

1.9.1 Methode der Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie lassen sich schnell und präzise Profile von Antigenen auf der Zelloberfläche oder zytoplasmatischen Antigenen auf Einzelzellebene analysieren. Als Ausgangsmaterial kommen antikoagulierte Blutproben und Knochenmarkaspirate zur Anwendung, deren Zellen mittels Ficoll-Präparation und Erythrozytenlyse isoliert werden. Antikörper werden mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen, welche an die passenden Antigene binden und durch Detektoren erfasst werden können. Die geläufigsten Fluoreszenzfarbstoffe sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), „energy-coupled dye“ (ECD) und Phycoerythrin-CY5 (PC5). Jede Zelle wird von einem oder mehreren Laserstrahlen beleuchtet. Aufgrund unterschiedlicher Emissionsspektren können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig zur Analyse eingesetzt werden, was die simultane Erfassung mehrerer Antigene auf einer Zelle ermöglicht. Die Unterscheidung der Zellen beruht auf den Streulichteigenschaften, durch welche die Zellgröße und die Heterogenität des Zellinneren bestimmt werden, sowie auf ihrem Antigenexpressionsmuster. Die Vorwärtsstreuung des Laserstrahls („forward scatter“, FSC) korreliert dabei mit der Zellgröße. Die Heterogenität der zellulären Binnenstruktur, die im Wesentlichen durch die Granularität der Zelle bedingt ist, wird durch die Seitwärtsstreuung („sideward scatter“, SSC) erfasst. Die mittlerweile weit ausgereifte Technologie der Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von 1000 bis 2000 Zellen pro Sekunde [105]. Zellen mit bis zu zwanzig verschiedenen Markern können detektiert werden. Die Komplexität steigt pro Marker an, so dass aktuell Antikörperkombinationen mit sechs bis zehn Farben gängig sind [106–108]. Zur Detektion von kleinen Zellpopulationen werden in der Regel hohe Eventzahlen erfasst. So ist in der Regel für eine Sensitivität von 1:10000 die Erfassung von mindestens 100000 Events, für eine Sensitivität von 1:100000 die Erfassung von mindestens 1000000 Events notwendig.

1.9.2 Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung besitzt bei der Diagnosestellung, insbesondere bei Vorliegen einer morphologisch undifferenzierten Leukämie und Subklassifikation der akuten Leukämie, einen hohen Stellenwert. Mittels der Durchflusszytometrie kann in schneller, präziser und maschineller Form das Oberflächenantigenprofil umfassend analysiert werden. Unter Verwendung von monoklonalen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern werden

spezifische Expressionsmuster sowohl membranständiger wie auch intrazellulärer Differenzierungsantigene (cluster of differentiation, CD) erfasst. Das Verfahren ermöglicht eine genaue Linienzuordnung, da die spezifischen Antigene bezeichnend für die Zellreihe sowie den Reifegrad der Zelle sind. Darüber hinaus kann mittels Durchflusszytometrie ein MRD-Monitoring durchgeführt werden, welches durch die quantitative Erfassung der Expression von leukämieassoziierten Immunphänotypen (LAIPs) prognostische Aussagekraft beinhaltet (siehe Unterabschnitt 1.9.3 – „Durchflusszytometrisch erhobene minimale Resterkrankung“). In über 90% aller Patienten lassen sich LAIPs erfassen [3, 109]. Der Nachweis von potenziellen Zielantigenen kann die Therapieplanung ergänzen, beispielsweise kann bei Expression von Antigen-CD33 eine darauf ausgerichtete Therapie mit Gemtuzumab-Ozogamicin erfolgen [2].

1.9.3 Durchflusszytometrisch erhobene minimale Resterkrankung

Die Sensitivität der Durchflusszytometrie hängt von der Anzahl der festgestellten Events ab. Die Identifikation einer leukämischen Zellpopulation ist bei >30–40 Events in der Regel möglich. Zur Erreichung einer Sensitivität von 10^{-4} (1 von 10000 Zellen) ist die Erfassung von mindestens 400000 Events erforderlich [71].

Leukämische Blasten werden gegenüber der gesunden Zellpopulation hinsichtlich qualitativer und quantitativer Expressionsunterschiede abgegrenzt. Es kann eine Überexpression von Antigenen („overexpression“) oder eine abgeschwächte Expression von für den Reifegrad der Zelle typischen Antigenen („loss of expression“) vorliegen. Des Weiteren zeichnen sich die Blasten durch eine aberrante Koexpression reifer und unreifer Marker – also nicht demselben Differenzierungsgrad entsprechend („asynchron“) – aus. Als Beispiel sei eine asynchrone Expression von Stammzellantigenen (CD34, CD117) mit myeloischen Differenzierungsantigenen (CD13, CD14, CD15, CD33, CD65) genannt. Bei einem Teil der Patienten lassen sich auch linienfremde Antigene auf den Zellen nachweisen („cross-lineage“), wie z. B. lymphatische Antigene (CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD19, CD30) oder Natürliche-Killerzell-Antigen (CD56) auf myeloischen Blasten [2, 110].

Im Wesentlichen gibt es zwei Strategien, um die MRD mittels Durchflusszytometrie zu detektieren:

Durch ein Screening mit festgelegten Antikörperkombinationen werden LAIPs bei Erst-diagnose selektiert, welche mindestens 5–10 % der leukämischen Zellen ausmachen und in weniger als 0,1 bzw. 0,01% im gesunden Knochenmark nachzuweisen sind, damit die Sensitivität von 10^{-3} bzw. 10^{-4} gewährleistet wird.

Eine alternative Vorgehensweise wird als „different from normal“ bezeichnet und wurde erstmals von der Children’s Oncology Group beschrieben [111, 112]. Hierbei werden die Blutproben auf immunphänotypische Profile überprüft, um leukämische Zellen von normalen Zellen zu unterscheiden, unabhängig vom leukämischen Immunphänotyp bei Erst-diagnose. Somit wird das Problem von falsch negativem MRD-Status aufgrund von phänotypischen Shifts durch ein festgesetztes Antikörper-Panel umgangen [108].

Limitiert wird das MRD-Monitoring mittels Durchflusszytometrie durch phänotypische Shifts zwischen Diagnose und Rezidiv, so dass die initial positiven LAIPs bei einem Rezidiv nicht ansteigen. Eine Studie von Voskova et al. konnte bei 24 % von insgesamt 49 eingeschlossenen Patienten den bei Erstdiagnose gemessenen LAIP während eines Rezidivs nicht mehr nachweisen [113]. Da einige Antigenexpressionsmuster auch im normalen, besonders aber im regenerierenden Knochenmark in geringer Konzentration nachweisbar sind, können die Sensitivität und die Spezifität der Immunphänotypisierung eingeschränkt sein [90].

Inwieweit die MRD mit morphologisch quantifizierten Blasten korreliert, untersuchten Inaba et al. in einer Studie mit 203 AML-Patienten. Sie stellten diskrepante Ergebnisse zwischen den zytomorphologisch und durchflusszytometrischen Werten her: Blutproben, welche morphologisch $<5\%$ Blasten hatten, wurden bei 8,2 % als MRD-positiv gewertet (Cut-off-Wert von $\geq 0,1\%$); dagegen besaßen 57,5 % der Proben mit $\geq 5\%$ der Blasten einen negativen MRD-Status. Das MRD-Monitoring mittels Durchflusszytometrie hatte dabei signifikante, prognostische Aussagekraft bezüglich eines Rezidivs, unabhängig von der Zytomorphologie [114].

Prognostische Aussagen durch durchflusszytometrische Messungen der MRD konnten für die Zeitpunkte „nach Induktion“ und „nach Konsolidierung“ erhoben werden [72, 92, 95, 99–101, 103, 115]. Zwei neuere Studien veranschaulichten den prognostischen Wert der durchflusszytometrisch bestimmten MRD anhand einer größeren jüngeren Kohorte (medianes Alter von 48 Jahren) [100] und einer älteren Kohorte (medianes Alter von 67 Jahren) [103]. In beiden Studien hatte der am frühesten bestimmte Zeitpunkt „nach Induktion“ gegenüber dem Zeitpunkt „nach Konsolidierung“ die größere prognostische Aussagekraft.

2 Zielsetzung

Bei AML-Patienten kann durch intensive Induktionstherapie in bis zu 80 % der Fälle eine komplette Remission erreicht werden. Allerdings erleiden trotzdem viele Patienten im Verlauf ein Rezidiv [116]. Die Abschätzung der Prognose der AML ist entscheidend für die Wahl der Postremissionstherapie. Beispielsweise ist die Identifikation von Hochrisikopatienten wichtig für eine frühzeitige Planung einer allogenen Stammzelltransplantation, welche zeitintensiv und umfangreich ist. Neben den schon bekannten klinischen und genetischen Faktoren wird zunehmend die MRD zur Prognoseeinschätzung miteinbezogen. Die Molekulargenetik erwies sich bei der Erfassung und Verlaufskontrolle der MRD als äußerst aussagekräftig. Allerdings findet sich nur bei etwa einem Drittel aller Patienten ein passender molekulargenetischer Marker. Die Durchflusszytometrie hingegen kann zum MRD-Monitoring bei ca. 90 % aller Patienten LAIPs detektieren. Bislang wurde das MRD-Monitoring mittels Durchflusszytometrie „nach Induktion“ und „nach Konsolidierung“ hinsichtlich seines prognostischen Einflusses untersucht. Inwieweit auch zu einem früheren Zeitpunkt wie z.B. „während Aplasie“ (Tage 16–18 nach Beginn der Induktionstherapie) die Beurteilung der MRD eine Rolle spielt, ist bei erwachsenen AML-Patienten derzeit nicht ausreichend bekannt. In dieser Arbeit wurde die prognostische Relevanz der MRD anhand von durchflusszytometrischen Messungen, insbesondere zu diesem frühen Zeitpunkt, untersucht. Zwischen den Jahren 2000 und 2011 waren 938 AML-Patienten innerhalb der AMLCG-Studie behandelt worden. In einer retrospektiven Analyse wurde eine Patientenkohorte gebildet, welche nach dem Therapieschema der AMLCG nach Induktionstherapie eine komplette Remission erreicht und durchflusszytometrische Messungen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und „während Aplasie“ oder „nach Induktion“ vorliegen hatte. Anhand dieses Kollektivs wurden Schwellenwerte (Cut-off-Werte) von LAIP-Messungen zu den Zeitpunkten „während Aplasie“ und „nach Induktion“ bestimmt und dadurch ein positiver oder negativer MRD-Status identifiziert. Dieser wurde hinsichtlich seiner prognostischen Wertigkeit untersucht und unter Einbezug der bereits gängigen prognostischen Faktoren in multivariate Analysen eingeschlossen, um seine Unabhängigkeit als prognostischer Faktor von anderen Einflussgrößen zu prüfen.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Patienten

Eingeschlossen wurden AML-Patienten aus den Jahren 2000 bis 2011, deren Knochenmarkproben durch das Labor für Leukämiediagnostik der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der Ludwig-Maximilians-Universität in Großhadern analysiert wurden. Diese Knochenmarkproben stammen einerseits von im Klinikum Großhadern behandelten Patienten und andererseits von deutschlandweit eingesendeten Proben aus anderen Kliniken oder von niedergelassenen Ärzten.

Alle Patienten waren über 18 Jahre alt und erklärten sich, nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung, schriftlich damit einverstanden, dass ihre Daten für wissenschaftliche Zwecke herangezogen werden. Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte gemäß der Deklaration von Helsinki.

Die Kriterien für und gegen die Aufnahme zur Untersuchung der MRD bei der akuten myeloischen Leukämie im Erwachsenenalter mittels Durchflusszytometrie und molekularer Marker sind im Folgenden zusammengefasst:

Einschlusskriterien:

- Diagnosezeitraum: 2000 bis 2011
- Alter: ≥ 18 Jahre
- Mindestens zwei Zeitpunkte mit durchflusszytometrischen Messungen, darin eingeschlossen unbedingt Erstdiagnose und eine Messung „während Aplasie“ oder „nach Induktion“
- Erreichen einer kompletten Remission

Ausschlusskriterien

- Promyelozytenleukämie (M3)
- Biphänotypische Leukämie

3.2 Therapieprotokolle

In die Studie wurden Patienten aufgenommen, welche mit einer intensiven Induktionstherapie nach Schemen der German AML Cooperative Group (AMLCG99, AMLCG2004, AMLCG2008) oder analog zu diesen Protokollen behandelt wurden. Die Behandlungsentscheidungen basierten auf Alter, Zytogenetik, molekularen Risikomarkern, sowie Begleiterkrankungen, Spenderverfügbarkeit und Wunsch des Patienten.

3.3 Diagnostische Verfahren

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wurden die Knochenmarkblutproben hinsichtlich der Zytomorphologie, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), Zytogenetik und Molekulargenetik untersucht [52, 87, 117, 118].

Es wurden alle AML-Proben auf das Vorhandensein molekularer MRD-Marker überprüft. Zum Screening auf NPM1-Mutationen wurden alle Proben einer Schmelzkurvenanalyse durch qRT-PCR mit dem System LightCycler 1.5 oder 2.0 (Roche Diagnostik) unter Zugabe der hybridisierten Proben unterzogen [87, 119]. Bei Vorliegen einer NPM1-A-Mutation folgte eine quantitative Messung mittels einer standardmäßig kalibrierten qRT-PCR. Diese wurde zu verschiedenen Zeitpunkten während der Therapie wiederholt [120].

Zur zytogenetischen Risikostratifizierung wurden die Kriterien des Medical Research Council angewandt [57].

3.4 Relevante Zeitpunkte der Untersuchungen

Mit Hilfe von Durchflusszytometrie und Molekulargenetik wurden Marker identifiziert, welche für das MRD-Monitoring geeignet sind. Der Fokus wurde auf die quantitativen Werte von Blasten, LAIPs und NPM1-Messungen gelegt und diese zu folgenden Zeitpunkten in dieser Arbeit analysiert: „während Aplasie“ (Tage 16–18 nach Beginn der Induktionstherapie), „nach Induktion“, „nach Konsolidierung“ und bei Auftreten eines Rezidivs. Für den Zeitpunkt „nach Induktion“ wurden Proben in einem Zeitraum von 25–129 Tagen (Median 64 Tage) nach Erstdiagnose berücksichtigt.

3.5 Durchflusszytometrie

Mononukleäre Zellen (MNC) wurden mittels Ficoll-Präparation und Erythrozytenlyse aus der Knochenmarkprobe isoliert. Jeweils drei Antigene aus insgesamt 31 fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden zusammengestellt (siehe Tabelle 3-1). Die multiparametrische Durchflusszytometrie wurde mit dem Gerät FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA) durchgeführt. Es wurden LAIPs bestimmt, welche eine aberrante Koexpression von Oberflächenantigenen oder zytoplasmatische Antigene besitzen, wie bei Kern et al. beschrieben [121]. Hierzu waren bei Erstdiagnose mindestens 20 000 positive Events für jede Dreier-Kombination erforderlich. Die Kombinationen der Antigene wurden zuvor an normalen Knochenmarkzellen von gesunden Spendern getestet. Die Population wurde als LAIP gewertet, wenn weniger als 0,1 % der MNC der gesunden Spender den entsprechenden Phänotyp aufwiesen. Falls diese Voraussetzung erfüllt war, wurde der prozentuale Anteil an MNC in den leukämischen Proben bestimmt [101]. Für die nachfolgenden regelmäßigen Kontrollen wurden die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bestimmten LAIPs gemessen. Um eine größtmögliche Sensitivität zu erreichen, waren 250 000 Events pro Messung erforderlich. Aufgrund der Heterogenität der AML lassen sich leukämische Zellen nicht in einem LAIP vereinen. Teilweise konnten pro Patient mehrere LAIPs bestimmt werden. Zu jedem Messzeitpunkt wurde der LAIP mit dem maximalen Wert als repräsentativ angesehen und für die Analysen herangezogen.

Die folgende Tabelle zeigt die unterschiedlichen Antigenkombinationen, anhand derer bei dem Patientenkollektiv LAIPs bestimmt wurden.

FITC	PE	PC-5
CD11b	CD117	CD34
CD14	CD13	CD4
CD15	CD34	CD33
CD34	7.1	CD33
CD34	CD116	CD33
CD34	CD13	CD19
CD34	CD135	CD117
CD34	CD15	CD33
CD34	CD19	CD13
CD34	CD2	CD33
CD34	CD56	CD33
CD36	CD235a	CD45
CD38	CD133	CD34
CD38	CD34	CD90
CD4	CD64	CD45
CD65	CD87	CD34
CD7	CD3	CD34
CD90	CD17	CD34
HLA-DR	CD33	CD34
MPO	LF	cCD15
TdT	cCD33	cCD45
TdT	cyCD2	cyCD3
TdT	cyCD79a	cyCD3

Tabelle 3-1: Liste der dreifach kombinierten gefärbten Antikörper

3.6 Statistische Analysen

Für die Berechnung des RFS wurde der Zeitraum zwischen kompletter Remission und dem hämatologischen oder extramedullären Rezidiv oder dem Tod verwendet, unabhängig von der Ursache [44, 49]. Das OS wurde als der Zeitraum zwischen der Erstdiagnose

der AML und dem Tod definiert, unabhängig von der Ursache. Die Überlebenszeitanalysen erfolgten durch den Kaplan-Meier-Schätzer und den Logrank-Test. Zur Bestimmung von Cut-off-Werten wurde mittels proportionaler Hazard-Regression nach Cox der kleinste p-Wert für einen positiven MRD-Status statistisch ermittelt. Der Test wurde zudem verwendet, um den Einfluss individueller Faktoren in univariaten und auch multivariaten Analysen zu ermitteln. Dabei wurde die zytogenetische Risikoeinteilung nach dem MRC als kategoriale Variable eingesetzt. Die Höhe der MRD wurde definiert durch den Logarithmus des Anteils an LAIP-positiven Zellen in Bezug auf die mononukleären Zellen. Der Kruskal-Wallis-Test wurde angewandt, um den Anteil der MRD-positiven Patienten innerhalb der zytogenetischen Risikogruppen zu unterscheiden. Um die Korrelation zwischen dem MRD-Status zu den Zeitpunkten der „Aplasie“ und „nach Induktion“ zu untersuchen, wurde der McNemar Test angewandt.

Die statistischen Analysen wurden mit der Software „IBM SPSS for Windows, Version 21“ (IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

Die auf den Daten dieser Arbeit basierenden Ergebnisse wurden im Juni 2014 online im Journal „Leukemia“ unter dem Titel „Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse“ publiziert [93].

T. Köhnke, D. Sauter, K. Ringel und M. Hubmann sammelten und analysierten die Daten; S.K. Bohlander, P.M. Kakadia, S. Schneider waren für die genetischen Analysen verantwortlich; A. Dufour und K. Spiekermann führten das Assessment von NPM1 durch; W.E. Berdel, T. Büchner, B. Wörmann, J. Braess und W. Hiddemann koordinierten die klinischen Studien der AMLCG; E. Horster, R.P. Laubender unterstützten die statistischen Analysen; T. Köhnke und D. Sauter schrieben das Manuskript; K. Spiekermann half bei der Supervision des Projekts; M. Subklewe leitet die Abteilung der Durchflusszytometrie des Leukämielabors und erstellte das Konzept der Studie, interpretierte die Daten und supervidierte die Arbeit.

4.1 Patientenkollektiv

Insgesamt standen aus dem Zeitraum vom 03.03.2000 bis zum 04.10.2011 Messungen von 938 AML-Patienten mit mindestens zwei durchflusszytometrisch gemessenen Knochenmarkblutproben zur Verfügung. Ausgeschlossen wurden 61 Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie und weitere 102 Patienten, welche keine intensive Induktionstherapie erhielten. Unter den restlichen 775 Patienten erreichten 80 Patienten lediglich eine inkomplette Remission, 40 verstarben während der Induktionstherapie und 121 Patienten hatten eine refraktäre Erkrankung. Ferner konnte bei 3 Patienten der Karyotyp nicht evaluiert werden. Bei 187 Patienten war eine LAIP-Messung weder „während Aplasie“ noch zum Zeitpunkt „nach Induktion“ verfügbar. Folglich waren 344 Patienten für die Analysen dieser Arbeit geeignet. Davon waren bei 178 Patienten LAIP-Werte zum Zeitpunkt „während Aplasie“ und bei 317 Patienten LAIP-Werte zum Zeitpunkt „nach Induktion“ vorhanden. Bei 53 % des Kollektivs wurde ein LAIP festgestellt, bei 35 % zwei LAIPs, bei 10 % drei LAIPs und bei 2 % vier LAIPs. Zu beiden Zeitpunkten vorliegende LAIP-Werte fanden sich bei 151 Patienten.

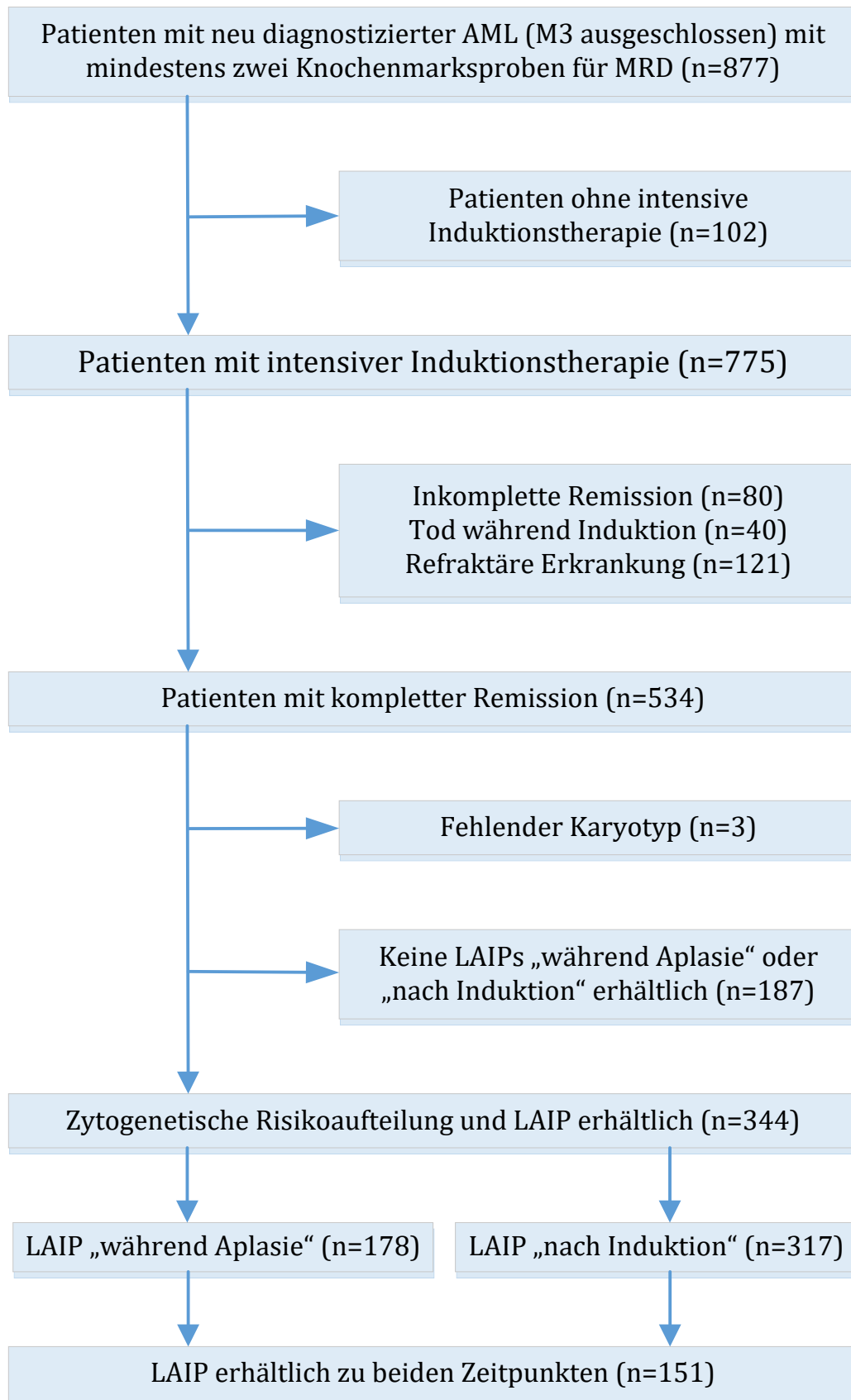


Abbildung 4-1: Akquirierung des Patientenkollektivs

	Alle analysier- ten Patienten (n=344)	LAIP „wäh- rend Aplasie“ (n=178)	LAIP „nach In- duktion“ (n=317)	LAIPs zu beiden Zeitpunkten (n=151)
GESCHLECHT				
Männer	186 (54 %)	96 (54 %)	171 (54 %)	81 (54 %)
Frauen	158 (46 %)	82 (46 %)	146 (46 %)	70 (46 %)
ALTER BEI ERSTDIAGNOSE				
<60 Jahre	205 (59 %)	105 (59 %)	190 (60 %)	92 (61 %)
≥60 Jahre	144 (41 %)	73 (41 %)	127 (40 %)	59 (39 %)
AML-TYP				
De novo	301 (87 %)	152 (85 %)	275 (87 %)	126 (83 %)
sAML	17 (5 %)	10 (6 %)	16 (5 %)	9 (6 %)
tAML	16 (5 %)	8 (5 %)	16 (5 %)	8 (5 %)
Hochrisiko-MDS	10 (3 %)	8 (5 %)	10 (3 %)	8 (5 %)
FAB				
M0	19 (6 %)	10 (6 %)	14 (4 %)	5 (3 %)
M1	72 (21 %)	44 (25 %)	69 (22 %)	41 (27 %)
M2	104 (30 %)	59 (33 %)	93 (29 %)	48 (32 %)
M4/M4eo	94 (27 %)	37 (21 %)	91 (29 %)	34 (23 %)
M5a/M5b	37 (11 %)	18 (10 %)	32 (10 %)	13 (9 %)
M6	12 (4 %)	7 (4 %)	12 (4 %)	7 (5 %)
M7	1 (<1 %)	1 (<1 %)	1 (<1 %)	1 (<1 %)
Nicht verfügbar	5 (2 %)	2 (1 %)	5 (2 %)	2 (1 %)
ZYTOGENETIK				
Günstig	56 (16 %)	27 (15 %)	52 (16 %)	23 (15 %)
Intermediär	238 (70 %)	127 (71 %)	220 (70 %)	109 (72 %)
Ungünstig	50 (15 %)	24 (14 %)	45 (14 %)	19 (13 %)

NPM1///				
Mutiert	114 (41 %)	63 (40 %)	109 (43 %)	58 (44 %)
Wildtyp	161 (58 %)	94 (60 %)	142 (57 %)	75 (66 %)
Nicht verfügbar	69	21	66	18
FLT3-ITD				
Positiv	99 (29 %)	45 (25 %)	93 (30 %)	39 (26 %)
Negativ	242 (71 %)	132 (75 %)	221 (70 %)	111 (74 %)
Nicht verfügbar	3	1	3	1
KLINISCHE STUDIEN				
AML CG99	257 (75 %)	132 (74 %)	234 (73 %)	109 (72 %)
AML CG2004	38 (11 %)	23 (13 %)	35 (11 %)	20 (13 %)
AML CG2008	21 (6 %)	7 (4 %)	21 (7 %)	7 (5 %)
Analoge Studien	28 (8 %)	16 (9 %)	24 (8 %)	15 (9 %)
Allogene SZT	133 (39 %)	68 (38 %)	124 (39 %)	59 (39 %)
ÜBERLEBEN				
5-Jahres-RFS	201 (31 %)	107 (33 %)	195 (31 %)	92 (34 %)
5-Jahres-OS	162 (44 %)	82 (47 %)	149 (45 %)	69 (48 %)

Tabelle 4-1: Patientencharakteristik, gruppiert nach der Verfügbarkeit von durchflusszytometrischen Werten zu den Zeitpunkten „Aplasie“ und „nach Induktion“

Im Kollektiv zeigte sich kein signifikanter Unterschied im RFS oder OS sowie im MRD-Status zwischen den Patienten, die hochdosiert Cytarabin (HAM, sHAM) erhielten, im Vergleich zu Patienten, welche die Standarddosis Cytarabin erhielten (TAD).

Darüber hinaus ergab sich kein Unterschied hinsichtlich klinischer Aspekte oder des Überlebens zwischen Patienten, bei denen Messungen „während Aplasie“ verfügbar waren, gegenüber Patienten mit nicht verfügbaren MRD-Messungen.

	LAIP-Werte „während Aplasie“ verfügbar (n = 178)	LAIP-Werte „während A-plasie“ nicht verfügbar (n = 166)	p (verfügbar vs. nicht verfügbar)
GESCHLECHT			0,96
Männlich	96 (54 %)	90 (54 %)	
Weiblich	82 (46 %)	76 (46 %)	
ALTER BEI ERSTDIAGNOSE			0,99
< 60 Jahre	105 (59 %)	98 (59 %)	
≥ 60 Jahre	73 (41 %)	68 (41 %)	
AML-TYP			0,29
De novo	152 (85 %)	149 (90 %)	
sAML	10 (6 %)	7 (4 %)	
tAML	8 (5 %)	8 (5 %)	
Hochrisiko-MDS	8 (5 %)	2 (1 %)	
ZYTOGENETIK			0,67
Günstig	27 (15 %)	29 (18 %)	
Intermediär	127 (71 %)	111 (67 %)	
Ungünstig	24 (14 %)	26 (16 %)	
NPM1			0,61
Mutiert	63 (40 %)	51 (43 %)	
Wildtyp	94 (60 %)	67 (57 %)	
Nicht verfügbar	21	48	
FLT3-ITD			0,13
Positiv	45 (25 %)	54 (33 %)	
Negativ	132 (75 %)	110 (67 %)	
Nicht verfügbar	1	2	

KLINISCHE STUDIEN			0,23
AML-CG99	132 (74%)	125 (75%)	
AML-CG2004	23 (13%)	15 (9%)	
AML-CG2008	7 (4%)	14 (8%)	
Analoge Studien	16 (9%)	12 (7%)	
ALLOGENE SZT			
Erhalten	68 (38%)	65 (39%)	0,86
ÜBERLEBEN			
5-Jahres-RFS	33%	28%	0,49
5-Jahres-OS	47%	42%	0,30

Tabelle 4-2: Analyse der Patientencharakteristik, aufgeteilt in die Verfügbarkeit der durchflusszytometrisch gemessenen Werte zum Zeitpunkt der „Aplasie“

4.2 Cut-off-Werte zur Festlegung des MRD-Status

Nachfolgend wurde die prognostische Aussagekraft der LAIP-Werte zu den Zeitpunkten „Aplasie“ und „nach Induktion“ untersucht. Hierzu wurden zunächst Hazard-Ratios mit Hilfe des Cox-Proportional-Hazard-Modells für verschiedene Cut-off-Werte berechnet. Für beide Zeitpunkte ergaben sich jeweils unterschiedliche Cut-off-Werte, welche eine prognostische Relevanz sowohl für das RFS als auch für das OS aufweisen.

Cut-off-Wert von 0,15 % „während Aplasie“ zur Definition des MRD-Status

Zum Zeitpunkt der „Aplasie“ wurden Hazard-Ratios, das RFS betreffend, für verschiedene Cut-off-Werte im Bereich von 0,01 % bis 1 % der MNC berechnet. Auf diesen Analysen basierend konnte ein Cut-off-Wert von $\geq 0,15\%$ für einen MRD-positiven Status zum Zeitpunkt der „Aplasie“ ermittelt werden.

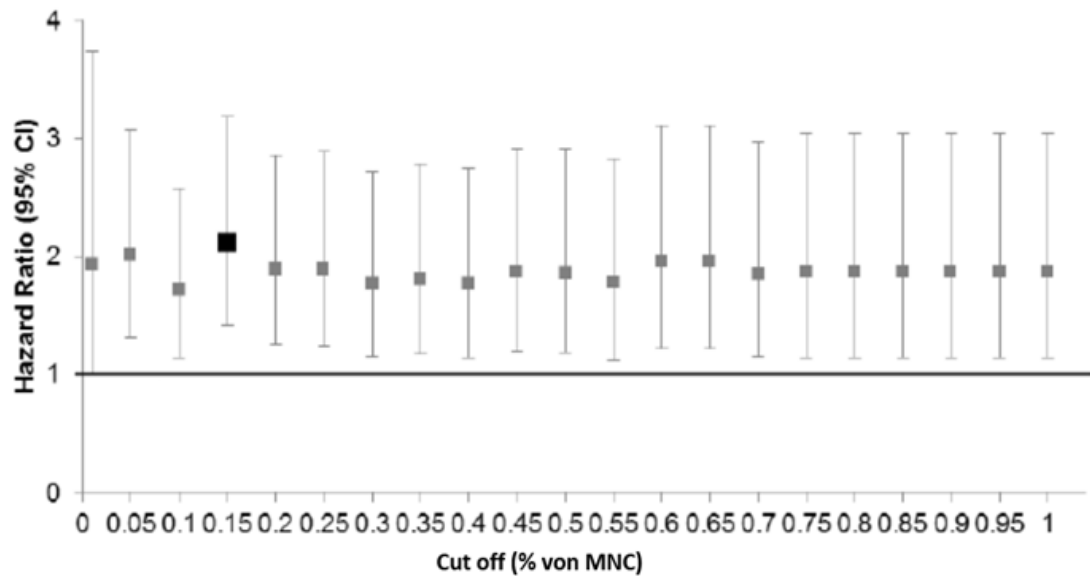
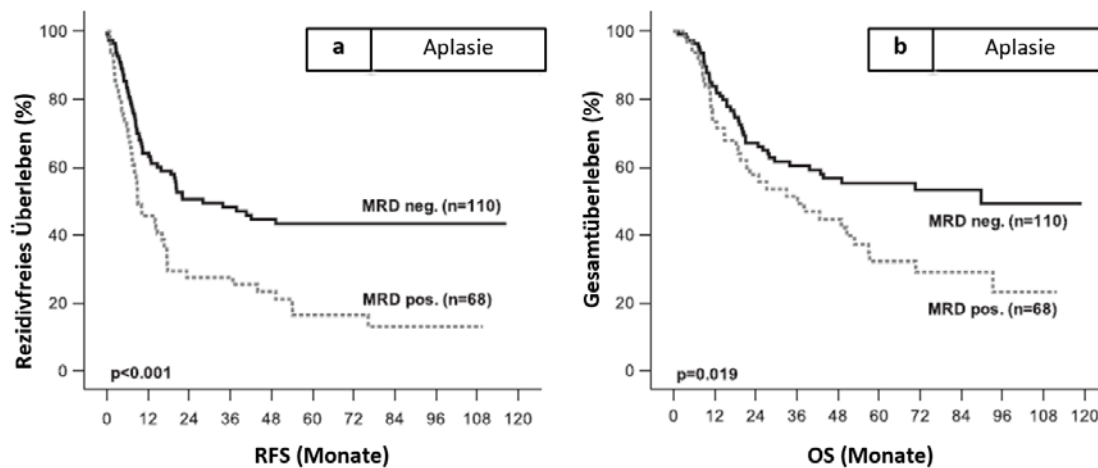


Abbildung 4-2: Bestimmung des Cut-off-Wertes zum Zeitpunkt der „Aplasie“ mittels Hazard-Ratio

Patienten, deren LAIP-Werte größer oder gleich dem Cut-off-Wert waren, wurden entsprechend als MRD-positiv definiert. Im Gegensatz hierzu wurden Patienten, deren LAIP-Werte unterhalb dieses Cut-off-Wertes lagen, als MRD-negativ bezeichnet. Mit diesem Cut-off-Wert waren 68 Patienten (38 %) MRD-positiv und 110 (62 %) MRD-negativ. Für die MRD-positiven Patienten lag das 5-Jahres-RFS bei 16 % und für die MRD-negativen Patienten bei 44 % ($p < 0,001$). Das 5-Jahres-OS lag bei 32 % vs. 54 % ($p = 0,019$).

Auch bei Verwendung eines kleineren Cut-off-Wertes von 0,1 % fand sich ein kürzeres RFS bei positivem MRD-Status (21 % vs. 42 %, $p = 0,005$). Demgemäß lag das 5-Jahres-OS bei 36 % vs. 55 % ($p = 0,053$). Bei Verwendung einer kontinuierlichen Variablen war der MRD-Status mit einem signifikanten Einfluss auf das RFS ($p = 0,004$) und das OS ($p = 0,028$) verknüpft.

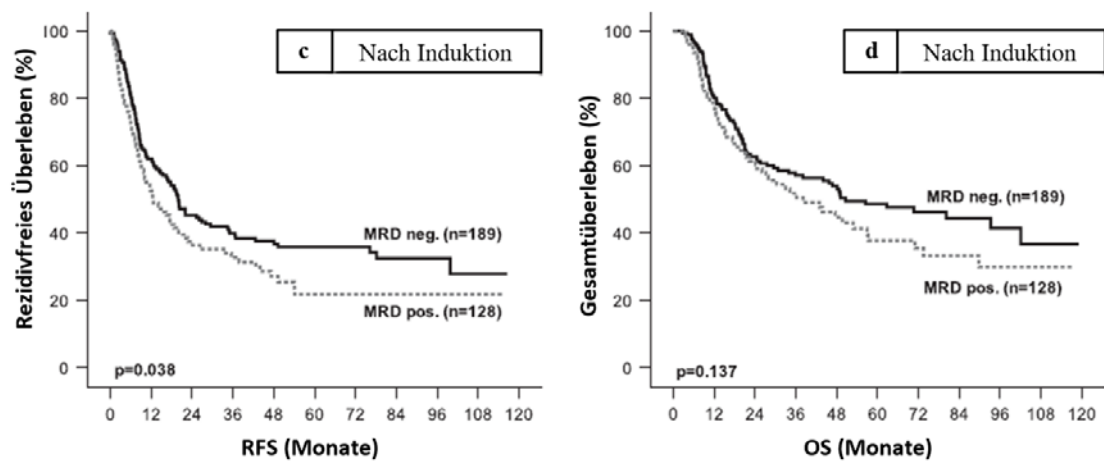


**Abbildung 4-3: RFS und OS für MRD-positive und MRD-negative Patienten
„während Aplasie“**

Cut-off-Wert von 0,3 % „nach Induktion“ zur Definition des MRD-Status

Mit derselben Methode konnte ein Cut-off-Wert von $\geq 0,3\%$ für den Zeitpunkt „nach Induktion“ ermittelt werden. Daraus resultierten 128 (40%) Patienten mit positivem MRD-Status und 189 (60%) mit negativem MRD-Status. Das 5-Jahres-Überleben bei positivem MRD-Status betrug 22% im Gegensatz zu 36% bei negativem MRD-Status ($p=0,038$). Auch das OS war bei den MRD-positiven Patienten mit 38% vs. 48% etwas kürzer ($p=0,137$).

Bei Änderung des Cut-off-Wertes auf 0,1% zum Zeitpunkt „nach Induktion“ resultierte keine signifikante Korrelation mit dem Überleben. Allerdings hatte der MRD-Status „nach Induktion“ als kontinuierliche Variable einen signifikanten Einfluss auf das RFS ($p=0,028$), aber nicht auf das OS.



**Abbildung 4-4: RFS und OS für MRD-positive und MRD-negative Patienten
„nach Induktion“**

4.3 Uni- und multivariate Analysen von Prognosefaktoren

Univariate Analysen wurden anhand aller bekannten Faktoren mit prognostischer Relevanz durchgeführt. Folgende Eigenschaften zeigten keine Korrelation in unserer Kohorte: die Leukozytenanzahl bei Erstdiagnose ($p=0,5$ bzw. $0,8$ für RFS und OS), der LDH-Wert bei Erstdiagnose ($p=0,6$ bzw. $0,7$) und der Prozentsatz der Blasten im Knochenmark zum Zeitpunkt der „Aplasie“ ($p=0,4$ bzw. $0,5$). In der multivariaten Analyse wurden Parameter berücksichtigt, welche eine signifikante Korrelation ($p<0,05$) mit dem RFS oder dem OS hatten.

Neben den LAIP-Werten „während Aplasie“ zeigten das Alter (<60 vs. ≥ 60 Jahre; $p<0,001$ für RFS und OS) sowie die zytogenetischen Risikogruppen (alle $p<0,01$) eine Korrelation mit dem Überleben und wurden somit in die multivariate Analyse eingeschlossen.

In der multivariaten Analyse war der MRD-Status zum Zeitpunkt der „Aplasie“ ein unabhängiger Faktor im Hinblick auf das RFS ($p=0,009$), zeigte aber keine unabhängige Korrelation mit dem OS ($p=0,3$) (siehe Tabelle 4-3).

	Hazard-Ratio (95%-CI, p)	
	RFS	OS
Durchflusszytometrisch bestimmter MRD-Status „während Aplasie“ verfügbar (n=178)		
Zytogenetik*	p=0,008	p=0,01
intermediär vs. günstig	1,84 (0,96–3,31; p=0,07)	2,49 (1,06–5,89; p=0,04)
ungünstig vs. günstig	3,36 (1,54–7,34; p=0,002)	4,46 (1,66–11,96; p=0,003)
MRD-Status während Aplasie: positiv ($\geq 0,15\%$) vs. negativ	1,71 (1,15–2,54; p=0,009)	1,29 (0,81–2,05; p=0,3)
Alter (< vs. ≥ 60 Jahre)	1,81 (1,22–2,68; p=0,003)	2,14 (1,36–3,36; p<0,001)
Durchflusszytometrisch bestimmter MRD-Status „nach Induktion“ verfügbar (n=317)		
Zytogenetik*	p<0,001	p<0,001
intermediär vs. günstig	2,59 (1,56–4,31; p<0,001)	3,11 (1,65–5,87; p<0,001)
ungünstig vs. günstig	5,88 (3,33–10,39; p<0,001)	6,26 (3,14–12,48; p<0,001)
MRD-Status „nach Induktion“: positiv ($\geq 0,3\%$) vs. negativ	1,23 (0,92–1,64; p=0,2)	1,13 (0,81–1,59; p=0,4)
Alter (< vs. ≥ 60 Jahre)	1,66 (1,24–2,21; p=0,001)	2,20 (1,46–2,81; p<0,001)
Durchflusszytometrisch bestimmter MRD-Status „während Aplasie“ und „nach Induktion“ verfügbar (n=151)		
Zytogenetik*	p<0,008	p=0,001
intermediär vs. günstig	1,95 (0,94–4,03; p=0,073)	3,31 (1,16–9,43; p=0,03)
ungünstig vs. günstig	3,94 (1,64–9,44; p=0,002)	6,19 (1,89–20,27; p=0,003)
MRD-Status „während Aplasie“: positiv ($\geq 0,15\%$) vs. negativ	1,65 (1,06–2,55; p=0,03)	1,17 (0,70–1,97; p=0,5)
MRD-Status „nach Induktion“: positiv ($\geq 0,3\%$) vs. negativ	1,37 (0,90–2,10; p=0,15)	1,42 (0,87–2,31; p=0,16)
Alter (< vs. ≥ 60 Jahre)	1,66 (1,24–2,21; p=0,001)	1,85 (1,34–3,01; p=0,01)

Tabelle 4-3: Multivariate Hazard-Regression nach Cox für RFS und OS

*Zytogenetik gemäß den Kriterien des MRC

Hinsichtlich eines kleineren Cut-off-Wertes von 0,1 % war in multivariaten Analysen der MRD-Status „während Aplasie“ mit dem RFS signifikant assoziiert ($p=0,03$) (siehe Tabelle 4-4).

	Hazard-Ratio (95%-CI, p)	
	RFS	OS
Durchflusszytometrisch bestimmter MRD-Status „während Aplasie“ verfügbar (n=178)		
Zytogenetik*	$p=0,004$	$p=0,008$
intermediär vs. günstig	1,83 (0,96–3,50; $p=0,07$)	2,50 (1,06–5,89; $p=0,04$)
ungünstig vs. günstig	3,56 (1,64–7,75; $p=0,001$)	4,55 (1,71–12,16; $p=0,002$)
MRD-Status „während Aplasie“:		
positiv ($\geq 0,1$ %) vs. negativ	1,53 (1,03–2,26; $p=0,03$)	1,26 (0,80–1,98; $p=0,3$)
Alter (< vs. ≥ 60 Jahre)	1,87 (1,26–2,76; $p=0,002$)	2,17 (1,38–3,40; $p=0,001$)

Tabelle 4-4: Multivariate Hazard-Regression nach Cox für RFS und OS mit einem Cut-off-Wert von $\geq 0,1$ % für einen MRD-positiven Status

*Zytogenetik gemäß den Kriterien des MRC

Da die Festlegung des Cut-off-Wertes ein starrer Wert ist, wurde auch eine Analyse mit MRD als kontinuierlicher Variable durchgeführt, welche ähnliche Ergebnisse erbrachte ($p=0,01$ für durchflusszytometrisch bestimmte MRD als kontinuierliche Variable „während Aplasie“ für RFS) (siehe Tabelle 4-5).

	Hazard-Ratio (95%-CI, p)	
	RFS	OS
Durchflusszytometrisch bestimmter MRD-Status „während Aplasie“ verfügbar (n = 178)		
Zytogenetik*	p=0,009	p=0,02
intermediär vs. günstig	1,75 (0,91–3,35; p=0,09)	2,37 (1,00–5,62; p=0,05)
ungünstig vs. günstig	3,31 (1,50–7,30; p=0,003)	4,12 (1,53–11,08; p=0,005)
MRD-Status „während Aplasie“ als kontinuierliche Variable (log)	1,23 (1,04–1,45; p=0,01)	1,20 (0,98–1,48; p=0,07)
Alter (< vs. ≥60 Jahre)	1,98 (1,33–2,94; p=0,001)	2,30 (1,46–3,61; p<0,001)
Durchflusszytometrisch bestimmter MRD-Status „nach Induktion“ verfügbar (n = 317)		
Zytogenetik*	p<0,001	p<0,001
intermediär vs. günstig	2,60 (1,57–4,31; p<0,001)	3,17 (1,68–5,97; p<0,001)
ungünstig vs. günstig	5,83 (3,30–10,31; p<0,001)	6,26 (3,14–12,51; p<0,001)
MRD-Status „nach Induktion“ als kontinuierliche Variable (log)	1,12 (0,98–1,28; p=0,11)	1,03 (0,88–1,20; p=0,77)
Alter (< vs. ≥60 Jahre)	1,66 (1,24–2,21; p=0,001)	2,03 (1,46–2,81; p<0,001)

Tabelle 4-5: Multivariate Hazard-Regression nach Cox für RFS und OS mit MRD als einer kontinuierlichen Variable

*Zytogenetik gemäß den Kriterien des MRC

4.4 Prognostische Aussagen von MRD und Zytogenetik

Um den prognostischen Einfluss des MRD-Status „während Aplasie“ näher auszuwerten, wurden die zytogenetischen Risikogruppen separat betrachtet. In der günstigen und der intermediären Risikogruppe weicht der Anteil an MRD-positiven Patienten nicht deutlich voneinander ab. Ein höherer Anteil an MRD-positiven Patienten befand sich in der ungünstigen Risikogruppe (26 % in der günstigen Gruppe, 36 % in der intermediären Gruppe, 63 % in der ungünstigen Gruppe, p=0,024).

In der günstigen Risikogruppe waren nur 7 Patienten MRD-positiv. Diese zeigten ein 5-Jahres-RFS von 36 %, die MRD-negativen Patienten (n=20) im Gegensatz dazu ein 5-Jahres-RFS von 70 % (p=0,071). Ähnliche Ergebnisse konnten für das 5-Jahres-OS

beobachtet werden (43 % für MRD-positive Patienten vs. 84 % für MRD-negative Patienten, $p=0,098$).

Für die intermediäre Risikogruppe war ein positiver MRD-Status mit einem kürzeren RFS assoziiert (5-Jahres-RFS von 15 % bei positivem MRD-Status vs. 84 % bei negativem MRD-Status, $p=0,016$). Im Hinblick auf das OS zeichnete sich eine Tendenz mit kürzerem Überleben bei Patienten mit positivem MRD-Status ab (5-Jahres-OS von 35 % vs. 49 %, $p=0,367$).

In der ungünstigen Risikogruppe zeigte sich allerdings kein Einfluss des MRD-Status auf die insgesamt schlechte Prognose.

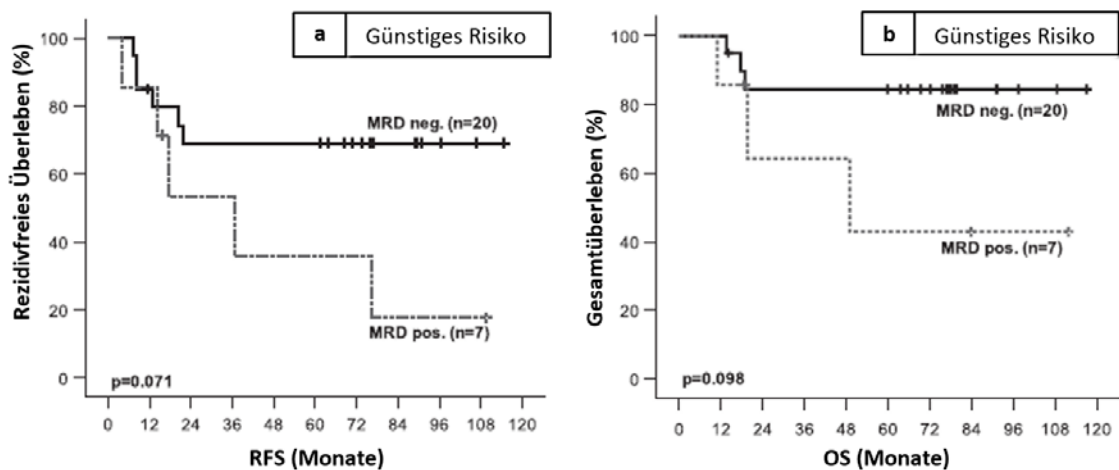


Abbildung 4-5: RFS und OS bei MRD-positivem und MRD-negativem Status in der Gruppe mit zytogenetisch günstigem Risikoprofil

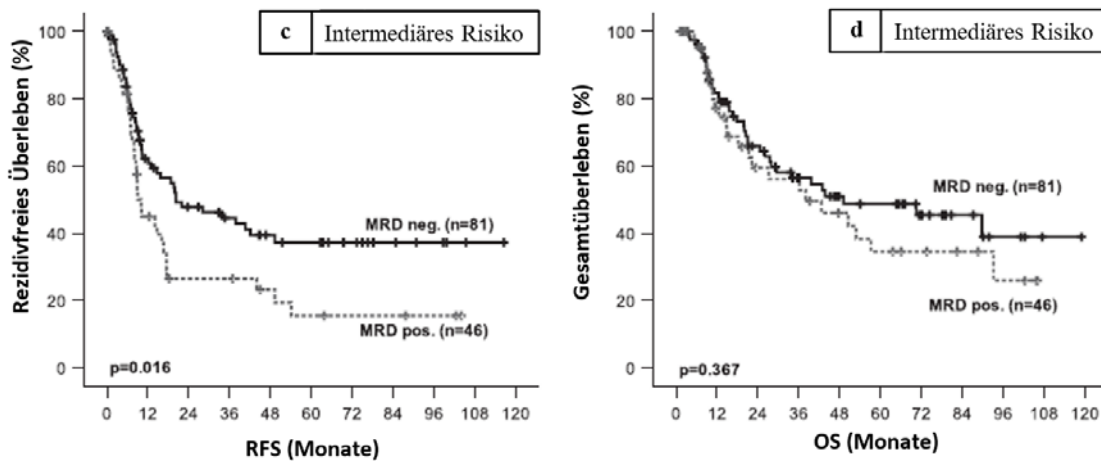


Abbildung 4-6: RFS und OS bei MRD-positivem und MRD-negativem Status in der Gruppe mit zytogenetisch intermediärem Risiko

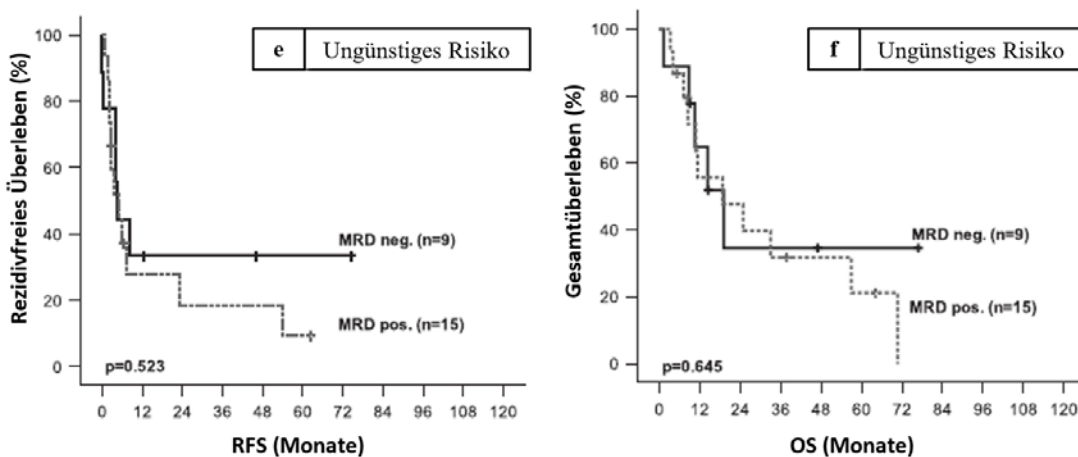


Abbildung 4-7: RFS und OS bei MRD-positivem und MRD-negativem Status in der Gruppe mit zytogenetisch ungünstigem Risiko

4.5 Prognostische Aussagen von MRD und Molekulargenetik

Bei Patienten mit normalem Karyotyp (NK) sind molekulare Aberrationen, insbesondere NPM1 und FLT3-ITD, häufig und haben eine prognostische Aussagekraft. Aufgrund dessen wurden beide Gruppen einzeln untersucht. Bei der NPM1-positiven Gruppe mit normalem Karyotyp bestand bei positivem MRD-Status zum Zeitpunkt der „Aplasie“ ein signifikant kürzeres RFS (5-Jahres-RFS von 13 % vs. 49 % bei negativem MRD-Status, $p=0,02$), wohingegen sich auf das OS keine Auswirkungen zeigten (5-Jahres-OS von 34 % vs. 62 %, $p=0,207$).

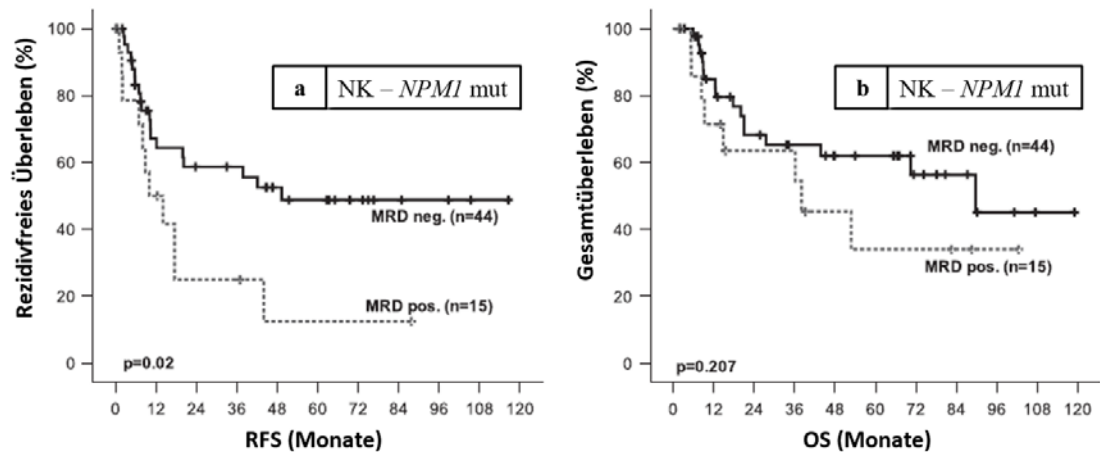


Abbildung 4-8: RFS und OS bei MRD-positivem und MRD-negativem Status von NPM1-positiven Patienten mit normalem Karyotyp

Für Patienten mit normalem Karyotyp und FLT3-ITD-Mutation stellte sich ähnliches Bild dar. Ein positiver MRD-Status „während Aplasie“ war mit signifikant kürzerem RFS (9 % vs. 39 %, $p=0,016$) assoziiert, jedoch ergab sich im Hinblick auf das OS kein signifikanter Unterschied (25 % vs. 50 %, $p=0,333$).

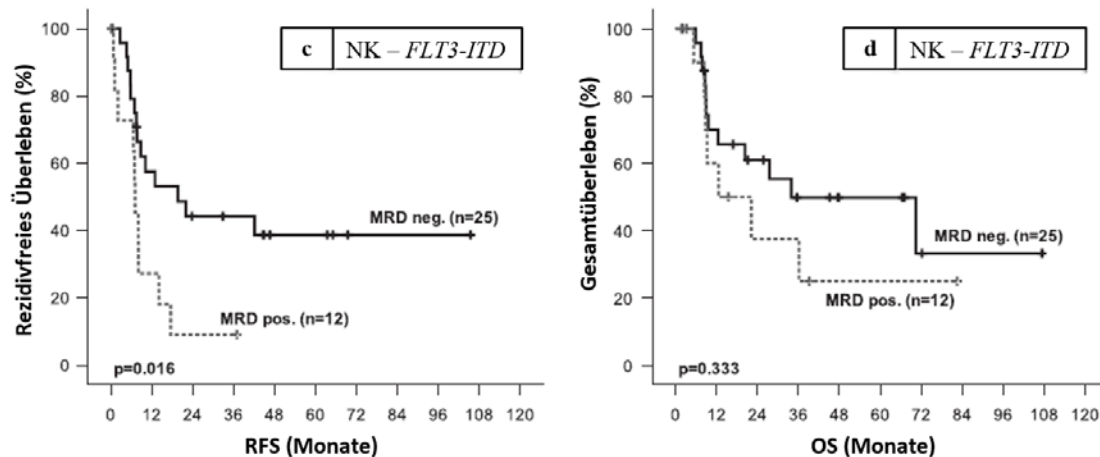


Abbildung 4-9: RFS und OS bei positivem und negativem MRD-Status von FLT3-ITD-positiven Patienten mit normalem Karyotyp

4.6 Prognostische Aussagen von MRD und morphologischer Blastenzahl

Bei 96 Patienten bestand zum Zeitpunkt der „Aplasie“ eine morphologische Blastenclearance (Anteil der Blasten von $<5\%$). Durch den MRD-Status konnten in diesem Patientenkollektiv zwei Gruppen unterteilt werden, welche eine Signifikanz bezüglich des RFS (13 % für MRD-positive vs. 43 % für MRD-negative Patienten, $p=0,003$) und des OS (29 % vs. 59 %, $p=0,024$) aufweisen.

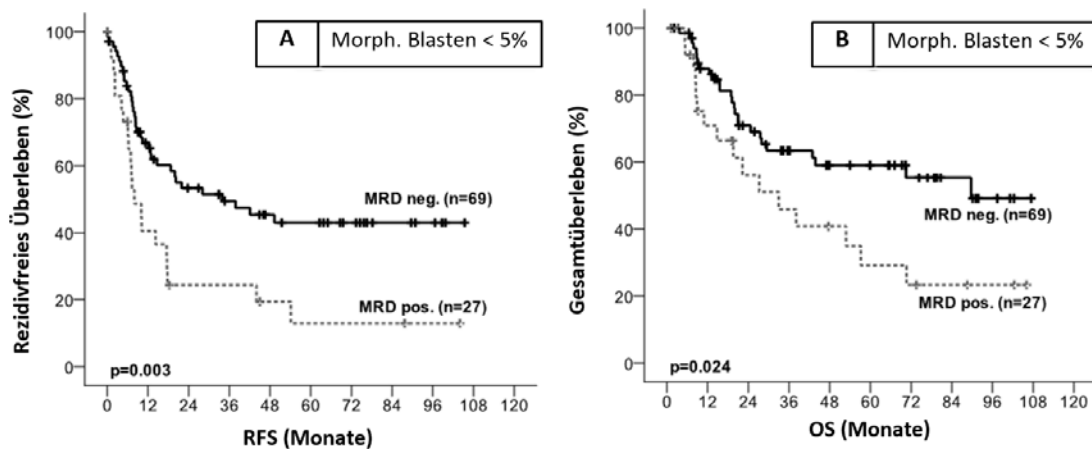


Abbildung 4-10: RFS und OS bei MRD-positivem und MRD-negativem Status von Patienten mit Blastenzahl $<5\%$ zum Zeitpunkt der „Aplasie“

Bei 96 Patienten war zum Zeitpunkt der „Aplasie“ morphologisch ein Blastenanteil von $\geq 5\%$ nachweisbar. Durch eine Stratifizierung in MRD-Positivität und MRD-Negativität wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den 34 MRD-negativen Patienten und den 35 MRD-positiven Patienten im Hinblick auf das RFS festgestellt (13 % vs. 49 %, $p=0,007$). Somit kann trotz morphologischer Blastenzahl von $\geq 5\%$ die Prognose bei MRD-negativem Status gut sein. Beim OS zeigte sich dahingehend eine Tendenz (30 % vs. 50 %, $p=0,215$).

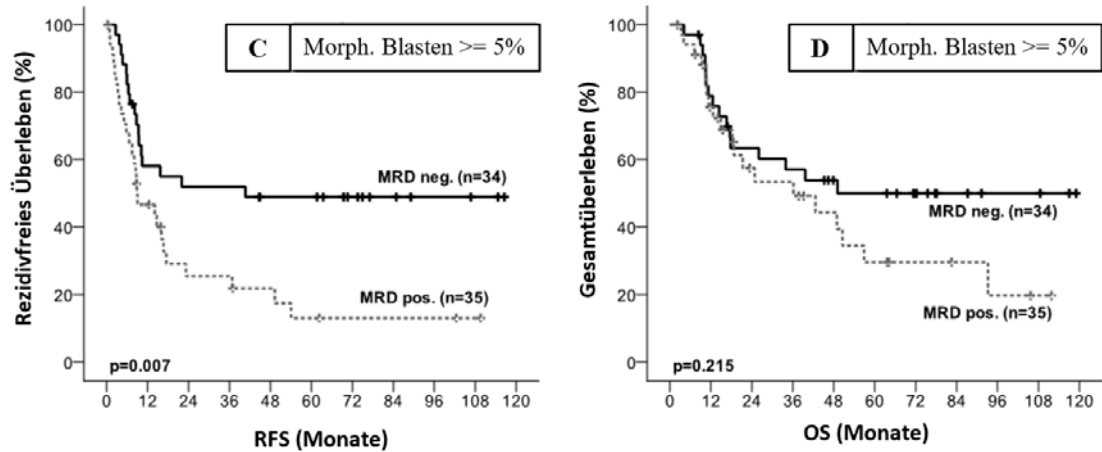


Abbildung 4-11: RFS und OS bei MRD-positivem und MRD-negativem Status von Patienten mit Blastenzahl $\geq 5\%$ zum Zeitpunkt der „Aplasie“

4.7 Korrelation zwischen MRD-Status „während Aplasie“ und „nach Induktion“

Nachfolgend wurde der prognostische Einfluss des MRD-Status „nach Induktion“ mit dem prognostischen Einfluss des MRD-Status „während Aplasie“ anhand des Kollektivs von 151 Patienten verglichen, bei denen zu beiden Zeitpunkten LAIP-Werte verfügbar waren.

Interessanterweise gab es keine signifikante Korrelation zwischen dem MRD-Status „während Aplasie“ und „nach Induktion“ (McNemar-Test $p=0,44$).

		MRD-Status „nach Induktion“	
		neg.	pos. ($\geq 0,3\%$)
MRD-Status „während Aplasie“	neg.	63 (42 %)	34 (23 %)
	pos. ($\geq 0,15\%$)	27 (18 %)	27 (18 %)

Tabelle 4-6: Kreuztabelle: MRD-Status „während Aplasie“ gegenüber MRD-Status „nach Induktion“

MRD-negative Patienten zum Zeitpunkt der „Aplasie“ hatten ungeachtet des MRD-Status „nach Induktion“ die beste Prognose. Das 5-Jahres-RFS und -OS betragen 46% bzw. 56% für diejenigen, welche zu beiden Zeitpunkten MRD-negativen Status hatten, und 38% bzw. 53% für Patienten, welche MRD-negativ „während Aplasie“, jedoch MRD-

positiv „nach Induktion“ waren. Die Gruppe der zu beiden Zeitpunkten MRD-positiven Patienten hatte die schlechteste Prognose. Diese Patienten (n=27) erlitten alle nach Erreichen der kompletten Remission innerhalb von 5 Jahren ein Rezidiv. Das 5-Jahres-OS lag bei 11 %. Bei der Kohorte mit positivem MRD-Status „während Aplasie“ und negativem MRD-Status „nach Induktion“ lag die Prognose mittig mit einem 5-Jahres-RFS von 32 % und einem 5-Jahres-OS von 58 %.

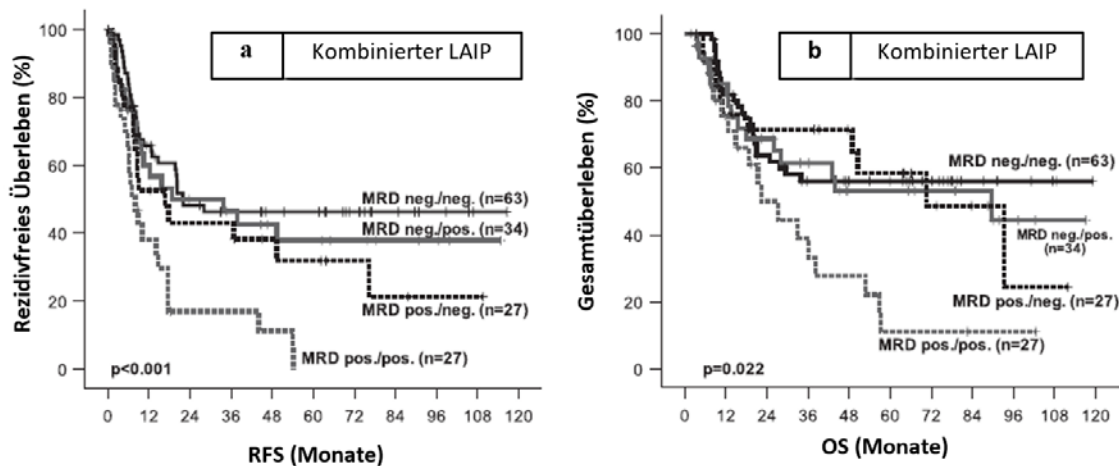


Abbildung 4-12: RFS und OS aus Kombinationen des MRD-Status zu den Zeitpunkten „Aplasie“ und „nach Induktion“

Wenn man den MRD-Status zu beiden Zeitpunkten in eine multivariate Analyse einbezieht, behält der MRD-Status „während Aplasie“ als unabhängiger Faktor neben Alter und Zytogenetik für das RFS seine prognostische Aussagekraft. Der MRD-Status „nach Induktion“ hatte allerdings keinen signifikanten Einfluss (siehe Tabelle 4-7).

Die Verbindung von positivem MRD-Status „während Aplasie“ und positivem MRD-Status „nach Induktion“ war kein signifikanter Risikofaktor unter Einbeziehung einer Interaktionsgröße in der multivariaten Analyse (Hazard-Ratio für die Interaktionsgröße 1,3 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,54–2,97, p=0,58).

	Hazard-Ratio (95%-CI, p)	
	RFS	OS
Verfügbarkeit des durchflusszytometrisch bestimmten MRD-Status „während Aplasie“ und „nach Induktion“ (n=151)		
Zytogenetik*	p=0,008	p=0,009
intermediär vs. günstig	1,93 (0,93–4,00; p=0,08)	3,27 (1,14–9,37; p=0,03)
ungünstig vs. günstig	3,88 (1,62–9,32; p=0,002)	6,21 (1,90–20,31; p=0,003)
MRD-Status „während Aplasie“: positiv ($\geq 0,15\%$) vs. negativ	1,47 (0,80–2,68; p=0,21)	0,90 (0,43–1,89; p=0,78)
MRD-Status „nach Induktion“: positiv ($\geq 0,3\%$) vs. negativ	1,23 (0,69–2,19; p=0,48)	1,14 (0,60–2,19; p=0,69)
MRD-Status „während Aplasie“ (positiv vs. negativ) / MRD-Status „nach Induktion“ (positiv vs. negativ)	1,27 (0,54–2,97; p=0,58)	1,68 (0,62–4,53; p=0,31)
Alter (< vs. ≥ 60 Jahre)	1,59 (1,04–2,44; p=0,03)	1,84 (1,13–3,01; p=0,01)

Tabelle 4-7: Multivariate Hazard-Regression nach Cox für RFS und OS, einschließlich der Interaktion von durchflusszytometrisch gemessenen MRD-Werten „während Aplasie“ und „nach Induktion“

*Zytogenetik gemäß den Kriterien des MRC

Mittels Likelihood-Ratio-Test wurden zwei Modelle verglichen. In das Ausgangsmodell wurden die Parameter Zytogenetik, Alter und MRD-Status „während Aplasie“ eingeschlossen. Das Vergleichsmodell enthielt zusätzlich das Kriterium MRD-Status „nach Induktion“. Im Hinblick auf das RFS ergab dies keinen zusätzlichen informativen Nutzen (-2 log likelihood von 798,8 für das erste Modell vs. 796,7 für das zweite Modell, $p=0,15$).

5 Diskussion

Das Risikoprofil bei erwachsenen AML-Patienten wird durch die aktuell herkömmlichen Klassifikationsschemata nicht optimal widerspiegelt. Nach einer Studie von Röllig et al. besitzen 67 % der Patienten gemäß der MRC- und 50 % gemäß der European-LeukemiaNet-Klassifikation ein intermediäres Risikoprofil [49, 57, 122]. Die Entscheidung bezüglich der optimalen Postremissionstherapie kann mit den bisherigen Einteilungen nicht zufriedenstellend geklärt werden. Nicht alle Patienten mit intermediärem Risikoprofil profitieren von einer alloSZT. Andererseits entwickeln etwa 40–60 % der Patienten in der günstigen Risikogruppe ein Rezidiv und würden möglicherweise von einer intensiveren Therapie profitieren.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war es, die mittels Durchflusszytometrie bestimmte MRD zum Zeitpunkt der „Aplasie“ unter Einbeziehung der bestehenden Risikofaktoren als Prognosefaktor zu evaluieren. Zudem wurde die mittels Durchflusszytometrie bestimmte MRD mit der zytomorphologisch bestimmten Blastenzahl „während Apasie“ und „nach Induktion“ verglichen.

5.1 Methoden der LAIP-Bestimmung

Bislang gibt es zwei verschiedene Vorgehensweisen, die durchflusszytometrisch bestimmte MRD zu erheben. Ein Ansatz wird als „different from normal“ betitelt. Da sich die Antigene der krankhaften Blasten von denen der normalen Blutzellen unterscheiden, werden unabhängig von der Erstdiagnose die Proben auf das Vorhandensein von leukämischen immunphänotypischen Profilen geprüft [111, 112]. Das andere Konzept, welches in dieser Arbeit angewandt wurde, beruht auf einer Überprüfung mit festgelegten Antikörperkombinationen zur Identifizierung von LAIPs bei Erstdiagnose [121]. Die nachfolgenden Messungen erfolgten unter Einsatz von patientenspezifischen Antikörper-Panels.

In der Studie von Loken et al., in der die Methode „different from normal“ angewandt wurde, war der Anteil an MRD-positiven Patienten „nach Induktion“ mit 24 % im Vergleich zur Methode, die in dieser Arbeit verwendet wurde, um 41 MRD-positiven Patienten geringer [111]. Dies könnte auf eine geringe Sensitivität der Methode „different from normal“ hinweisen. Limitiert wird die Methode der festgelegten LAIP-Bestimmung

hingegen durch das Auftreten von phänotypischen Shifts, wodurch bei einem Rezidiv falsch negative MRD-Werte resultieren können.

Da die leukämischen Zellen immunphänotypisch eine hohe Heterogenität aufweisen, ließ sich in dieser Arbeit bei 47 % der Patienten mehr als ein LAIP bestimmen. Der LAIP mit dem höchsten Wert zum Zeitpunkt der Analyse wurde als entscheidend betrachtet und in die Berechnungen einbezogen. In Übereinstimmung mit Ergebnissen von Rubitz et al. [115] waren 37 % aller Patienten „während Aplasie“ und 41 % der Patienten „nach Induktion“ MRD-positiv.

Anzumerken ist, dass die LAIPs mittels eines Drei-Farben-Panels ermittelt wurden. Die neueren Studien verfügen mittlerweile über ein Vier-Farben-Panel. Eine höhere Sensitivität kann durch ein Sechs- bis Zehn-Farben-Panel durch die Bestimmung von kleineren Subpopulationen erreicht werden [103, 123].

5.2 Cut-off-Werte der durchflusszytometrischen MRD-Bestimmung

In den bisherigen Studien zur durchflusszytometrischen MRD-Bestimmung bei der AML variieren die Cut-off-Werte zur Definition des MRD-Status und die Zeitpunkte der Erhebung [92, 95, 100, 101, 103]. Die Cut-off-Werte für die Definition des MRD-Status wurden zwischen 0,035 % und 1 % angesetzt, wobei in den meisten Studien ein Wert von 0,1 % verwendet wird [71, 100].

In unserer Kohorte wurde der optimale Cut-off-Wert für einen positiven MRD-Status bei $\geq 0,15\%$ LAIP-positiven Zellen zum Zeitpunkt der „Aplasie“ ermittelt. Ein signifikanter Einfluss eines positiven MRD-Status auf das RFS konnte mittels einer univariaten und einer multivariaten Analyse demonstriert werden. Ein positiver MRD-Status „während Aplasie“ erwies sich als ein vom Alter und von der Zytogenetik unabhängiger Risikofaktor. Zum Zeitpunkt „nach Induktion“ konnte ein Cut-off-Wert von 0,3 % als der optimale Wert für einen positiven MRD-Status eruiert werden, wodurch sich ein signifikanter Einfluss auf das RFS ermitteln ließ.

Von den in Studien unterschiedlichen vorherrschenden Cut-off-Werten wurde der am häufigsten angewandte Wert näher betrachtet. Eine Reduktion des Cut-off-Wertes auf 0,1 % änderte die prognostische Aussage des MRD-Status zum Zeitpunkt der „Aplasie“

in unserer Kohorte nicht. Hingegen verkleinerte die Reduktion des Cut-off-Wertes zum Zeitpunkt „nach Induktion“ auf 0,1 % den Einfluss des MRD-Status auf das Überleben.

Die Breite an Cut-off-Werten, welche bislang in den Studien berechnet wurden, könnte die unterschiedlichen Messmethoden zur Bestimmung von LAIPs in den Laboren widerspiegeln, aber auch die unterschiedlichen Therapien könnten einen Einfluss darauf haben. Wünschenswert wären eine Standardisierung der LAIP-Bestimmung und ein universaler Cut-off-Wert [3].

Unabhängig von einem starren Cut-off-Wert resultierte aus den Analysen mit MRD als kontinuierlicher Variable eine signifikante Korrelation mit dem Überleben.

5.3 Prognostische Signifikanz des MRD-Status

Die univariate Analyse des MRD-Status zum Zeitpunkt „nach Induktion“ erbrachte einen signifikanten Einfluss auf das RFS. Ein bedeutenderer Faktor im Hinblick auf die Prognose ist in unserem Kollektiv der MRD-Status zum Zeitpunkt der „Aplasie“. Es ist anzunehmen, dass die durchflusszytometrisch erhobene MRD „während Aplasie“ einen frühen und sensitiven Zeitpunkt als Prognosefaktor ergibt, der durch Messungen zu späteren Zeitpunkten nicht in diesem Maße ersetzt werden kann. Diese Erkenntnis findet sich in der Gruppe von Patienten mit zu beiden Zeitpunkten vorhandenen LAIP-Werten wieder. Der positive MRD-Status „während Aplasie“ war in der Analyse neben dem Alter und der Zytogenetik ein unabhängiger Risikofaktor, wohingegen ein positiver MRD-Status zum Zeitpunkt „nach Induktion“ keine unabhängige Variable war. Da Überschneidungen im Phänotyp zwischen normaler Hämatopoese und krankhaften Blasten existieren, könnte die hohe Sensitivität der durchflusszytometrischen Bestimmung des MRD-Status zum Zeitpunkt der „Aplasie“ auf die zu diesem Zeitpunkt niedrige Rate an sich normal regenerierenden Zellen zurückzuführen sein.

Kürzlich konnten zwei prospektive Studien die prognostische Relevanz des durchflusszytometrisch bestimmten MRD-Status bei Patienten im Alter von <60 [100] und >60 [103] Jahren darstellen. Betrachtet wurden hierzu der Zeitpunkt „nach Induktion“ und der anschließende Verlauf. Die Studie von Freeman et al. [103] hebt hervor, dass MRD-Daten, welche nach Induktionstherapie erfasst wurden, die informativsten sind. Auch Terwin et al. [100] zeigen auf, dass ein früher Zeitpunkt der MRD-Bestimmung für die Therapiewahl nach Remission ausschlaggebend ist. Beide Studien favorisieren den Zeitpunkt

„nach Induktion“. Der Bedeutung des MRD-Status zu einem früheren Zeitpunkt wie „während Aplasie“ wurde bislang nicht an einem großen Patientenkollektiv untersucht. Diese Untersuchung könnte jedoch bedeutend für eine risikoadaptierte Postremissions-therapie sein.

Ferner wurde die Prognose der Patienten mit negativem MRD-Status „während Aplasie“ oder „nach Induktion“ nicht durch die Blastenzahl oder die Zytogenetik beeinflusst. Bezüglich der Blastenclearance hatten Kern et al. [68] einen prognostischen Einfluss der Blastenzahl an Tag 16 festgestellt. Unseren Patienten, welche eine Blastenzahl von $\geq 5\%$ in Kombination mit einem negativen MRD-Status aufwiesen, hatten ein signifikant besseres RFS. Somit erlaubt die Bestimmung des MRD-Status auch bei Patienten mit prognostisch ungünstiger hoher Blastenzahl eine bessere Risikostratifizierung. Allerdings flossen in unser Kollektiv nur Patienten ein, welche eine komplette Remission erreicht hatten, was einen Effekt auf die prognostische Relevanz der Blastenclearance gehabt haben könnte. Die Ergebnisse stimmen mit Daten zur AML bei Kindern überein, bei denen der zytomorphologische Blastenzahl, neben der Erhebung der durchflusszytometrisch gemessenen MRD an Tag 22 der Induktionstherapie, keinen zusätzlichen prognostischen Wert hatte [114]. Ähnliche Daten, welche am Tag 15 nach Erstdiagnose keinen Hinweis auf eine MRD ergaben, konnten einen prognostischen Vorteil für Patienten mit ALL darlegen [124, 125]. Auch die Studie von Freeman et al. [103] konnte bei einem kleinen Kollektiv von 21 Patienten mit einer refraktären Blastenzahl, jedoch negativem MRD-Status ein besseres OS feststellen. Somit unterstützen mehrere Studien das Ergebnis, dass der MRD-Status neben der Zytomorphologie eine zusätzliche prognostische Information besitzt.

Die nach bisheriger Datenlage unterschiedlichen Cut-off-Werte zu verschiedenen Zeitpunkten erschweren den Ärzten im Alltag bislang die Nutzung und Interpretation der MRD-Werte. Eine Herausforderung wird es sein, das MRD-Monitoring mittels Durchflusszytometrie und deren Gewichtung in prospektiven Studien zu standardisieren und zu harmonisieren. Eine standardmäßige Akquirierung der Daten könnte zu einer besseren Auswertung in einem größeren Patientengut verhelfen und eine Optimierung der risikoadaptierten Therapiewahl ermöglichen [93].

6 Zusammenfassung

Trotz fortlaufend neuer Erkenntnisse in der Pathogenese und zielgerichteter Therapien erleidet weiterhin ein Großteil der Patienten mit AML ein Rezidiv. Ausschlaggebend für Therapieentscheidungen nach erreichter Remission ist neben dem Patientenalter bislang vor allem das prätherapeutische zytogenetische und molekulargenetische Risikoprofil der Erkrankung. In den vergangenen Jahren hat das Verständnis der prognostischen Relevanz der Bestimmung der minimalen Resterkrankung mittels Durchflusszytometrie zugenommen. In dieser Arbeit wurde die Wertigkeit der durchflusszytometrisch bestimmten MRD zu einem bislang wenig untersuchten, sehr frühen Zeitpunkt während der Therapie analysiert. Für die Analysen wurden insgesamt 344 Patienten eingeschlossen, welche nach Behandlung gemäß dem Therapieschema der AMLCG (AML Cooperative Group) eine komplette Remission erreicht hatten. Dabei lagen zum Zeitpunkt der „Aplasie“ bei 178 Patienten und zum Zeitpunkt „nach Induktion“ bei 317 Patienten MRD-Werte vor. Mittels Hazard-Regression nach Cox konnten Cut-off-Werte für die durchflusszytometrisch erhobenen Messungen zu den beiden Zeitpunkten bestimmt werden. Zum Zeitpunkt der „Aplasie“ wurde bei 178 Patienten ein Cut-off-Wert von 0,15 % und „nach Induktion“ bei 317 Patienten ein Cut-off-Wert von 0,3 % bestimmt und anhand dieser Werte ein MRD-Status definiert. Ein positiver MRD-Status „während Aplasie“ war mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben vergesellschaftet (5-Jahres-RFS von 16 % vs. 43 %, $p < 0,001$), welches unabhängig vom Alter (Hazard-Ratio von 1,81; $p = 0,003$) und den zytogenetischen Risikogruppen (Hazard-Ratio von 1,71; $p = 0,009$) war. Die Prognose von Patienten mit negativem MRD-Status zum Zeitpunkt der „Aplasie“ wurde weder von der zytomorphologisch quantifizierten Blastenzahl „während Aplasie“ noch vom MRD-Status „nach Induktion“ beeinflusst. Innerhalb der großen Gruppe der Patienten mit zytogenetisch intermediärem Risikoprofil, für die bislang kein Konsens über die optimale Postremissionstherapie vorliegt, war die MRD-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie ebenfalls relevant (5-Jahres-RFS von 15 % vs. 37 %, $p = 0,016$), wie auch bei Patienten mit normalem Karyotyp und NPM1-Mutationen (5-Jahres-RFS von 13 % vs. 49 %, $p = 0,02$) und bei FLT3-ITD-positiven Patienten (5-Jahres-RFS von 9 % vs. 44 %, $p = 0,016$). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die durchflusszytometrische MRD-Bestimmung zum Zeitpunkt der „Aplasie“ zusätzliche prognostische Informationen liefert, die möglicherweise zur Entscheidung über die optimale Therapie beitragen können.

7 Verzeichnisse

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: WHO-Klassifikation der AML [42]	9
Tabelle 1-2: Übersicht über veröffentlichte Studien zur durchflusszytometrisch bestimmten MRD und deren cut-off-Werte.....	20
Tabelle 3-1: Liste der dreifach kombinierten gefärbten Antikörper	29
Tabelle 4-1: Patientencharakteristik, gruppiert nach der Verfügbarkeit von durchflusszytometrischen Werten zu den Zeitpunkten „Aplasie“ und „nach Induktion“	34
Tabelle 4-2: Analyse der Patientencharakteristik, aufgeteilt in die Verfügbarkeit der durchflusszytometrisch gemessenen Werte zum Zeitpunkt der „Aplasie“	36
Tabelle 4-3: Multivariate Hazard-Regression nach Cox für RFS und OS.....	40
Tabelle 4-4: Multivariate Hazard-Regression nach Cox für RFS und OS mit einem Cut-off-Wert von $\geq 0,1$ % für einen MRD-positiven Status.....	41
Tabelle 4-5: Multivariate Hazard-Regression nach Cox für RFS und OS mit MRD als einer kontinuierlichen Variable.....	42
Tabelle 4-6: Kreuztabelle: MRD-Status „während Aplasie“ gegenüber MRD-Status „nach Induktion“	47
Tabelle 4-7: Multivariate Hazard-Regression nach Cox für RFS und OS, einschließlich der Interaktion von durchflusszytometrisch gemessenen MRD-Werten „während Aplasie“ und „nach Induktion“	49

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Geschätzte altersgruppenabhängige Inzidenzen der AML pro Jahr in Deutschland (Stand: 2000) [2].....	3
Abbildung 1-2: Minimale Resterkrankung im zeitlichen Verlauf	19
Abbildung 4-1: Akquirierung des Patientenkollektivs.....	32
Abbildung 4-2: Bestimmung des Cut-off-Wertes zum Zeitpunkt der „Aplasie“ mittels Hazard-Ratio.....	37
Abbildung 4-3: RFS und OS für MRD-positive und MRD-negative Patienten „während Aplasie“.....	38
Abbildung 4-4: RFS und OS für MRD-positive und MRD-negative Patienten „nach Induktion“	39
Abbildung 4-5: RFS und OS bei MRD-positivem und MRD-negativem Status in der Gruppe mit zytogenetisch günstigem Risikoprofil.....	43
Abbildung 4-6: RFS und OS bei MRD-positivem und MRD-negativem Status in der Gruppe mit zytogenetisch intermediärem Risiko	44
Abbildung 4-7: RFS und OS bei MRD-positivem und MRD-negativem Status in der Gruppe mit zytogenetisch ungünstigem Risiko.....	44
Abbildung 4-8: RFS und OS bei MRD-positivem und MRD-negativem Status von NPM1-positiven Patienten mit normalem Karyotyp	45
Abbildung 4-9: RFS und OS bei positivem und negativem MRD-Status von FLT3-ITD-positiven Patienten mit normalem Karyotyp.....	45
Abbildung 4-10: RFS und OS bei MRD-positivem und MRD-negativem Status von Patienten mit Blastenanzahl <5 % zum Zeitpunkt der „Aplasie“	46
Abbildung 4-11: RFS und OS bei MRD-positivem und MRD-negativem Status von Patienten mit Blastenanzahl $\geq 5\%$ zum Zeitpunkt der „Aplasie“	47
Abbildung 4-12: RFS und OS aus Kombinationen des MRD-Status zu den Zeitpunkten „Aplasie“ und „nach Induktion“	48

7.3 Literaturverzeichnis

1. Kampen, K.R., *The discovery and early understanding of leukemia*. Leuk Res, 2012. **36**(1): p. 6-13.
2. Ehninger G., L.H., Berdel W.E., *Akute myeloische Leukämie Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose*, ed. D.Ä.-V. GmbH. 2008.
3. Buccisano, F., et al., *Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **119**(2): p. 332-341.
4. Buss, E.C. and A.D. Ho, *Leukemia stem cells*. International Journal of Cancer, 2011: p. n/a-n/a.
5. Herold, G.u.M., *INNERE MEDIZIN*. 2011: Herold Verlag.
6. Deschler, B. and M. Lübbert, *Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology*. Cancer, 2006. **107**(9): p. 2099-2107.
7. Juliusson, G., 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): p. 4179-87.
8. Fritsch, S., et al., *Die Therapie der akuten myeloischen Leukämie (AML) bei „medically non-fit“ Patienten*. Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2007. **102**(4): p. 324-329.
9. Khan, I., S. Malinge, and J. Crispino, *Myeloid Leukemia in Down Syndrome*. Crit Rev Oncog, 2011. **16**(1-2): p. 25-36.
10. Roberts, I. and S. Izraeli, *Haematopoietic development and leukaemia in Down syndrome*. Br J Haematol, 2014. **167**(5): p. 587-99.
11. Smith, M.L., et al., *Mutation of CEBPA in Familial Acute Myeloid Leukemia*. New England Journal of Medicine, 2004. **351**(23): p. 2403-2407.
12. Fasan, A., et al., *The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML*. Leukemia, 2014. **28**(4): p. 794-803.
13. Pabst, T., et al., *Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-[alpha] (C/EBP[alpha]), in acute myeloid leukemia*. Nat Genet, 2001. **27**(3): p. 263-270.

14. Mamunes, P., et al., *ACUTE LEUKÆMIA AND KLINEFELTER'S SYNDROME*. The Lancet, 1961. **278**(7192): p. 26-27.
15. Alter, B.P., *Fanconi anemia and the development of leukemia*. Best Practice & Research Clinical Haematology, 2014. **27**(3-4): p. 214-221.
16. Miles, D., et al., *Patterns of hematopoietic lineage involvement in children with neurofibromatosis type 1 and malignant myeloid disorders*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4314-4320.
17. Side, L., et al., *Homozygous Inactivation of the NF1 Gene in Bone Marrow Cells from Children with Neurofibromatosis Type 1 and Malignant Myeloid Disorders*. New England Journal of Medicine, 1997. **336**(24): p. 1713-1720.
18. Ichimaru, M., T. Ishimaru, and J.L. Belsky, *Incidence of Leukemia in Atomic Bomb Survivors Belonging to a Fixed Cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950-71: Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia*. Journal of Radiation Research, 1978. **19**(3): p. 262-282.
19. Richardson, D., et al., *Ionizing radiation and leukemia mortality among Japanese Atomic Bomb Survivors, 1950-2000*. Radiat Res, 2009. **172**(3): p. 368-82.
20. Kossman, S.E. and M.A. Weiss, *Acute myelogenous leukemia after exposure to strontium-89 for the treatment of adenocarcinoma of the prostate*. Cancer, 2000. **88**(3): p. 620-4.
21. Darby, S.C., et al., *Long term mortality after a single treatment course with X-rays in patients treated for ankylosing spondylitis*. Br J Cancer, 1987. **55**(2): p. 179-90.
22. Smith, M.A., R.P. McCaffrey, and J.E. Karp, *The secondary leukemias: challenges and research directions*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(7): p. 407-18.
23. Bhatia, S., *Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia*. Semin Oncol, 2013. **40**(6): p. 666-75.
24. Howe, R., et al., *Secondary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia are significant complications following autologous stem cell transplantation for lymphoma*. Bone Marrow Transplant, 0000. **32**(3): p. 317-324.
25. LeNoir, e.a., *Sur un Cas de Purpura Attribué à l'intoxication par le Benzène*. Bull. Mem. Soc. Med. Hôp. Paris (14), 1897: p. 1251.

26. Hayes, R.B., et al., *Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. Chinese Academy of Preventive Medicine--National Cancer Institute Benzene Study Group.* J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(14): p. 1065-71.
27. Fircanis, S., et al., *The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: An updated meta-analysis of epidemiological studies.* American Journal of Hematology, 2014. **89**(8): p. E125-E132.
28. Varadarajan, R., et al., *Smoking adversely affects survival in acute myeloid leukemia patients.* International Journal of Cancer, 2012. **130**(6): p. 1451-1458.
29. Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann, P.D.J.B., *MANUAL, Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome.* 3 ed. 2009: Tumorzentrum München.
30. Johnsen, A.T., et al., *Health related quality of life in a nationally representative sample of haematological patients.* European Journal of Haematology, 2009. **83**(2): p. 139-148.
31. Priscilla, D., et al., *Quality of life among patients with hematological cancer in a Malaysian hospital.* Med J Malaysia, 2011. **66**(2): p. 117-20.
32. Sepp, N., et al., *SPECIFIC SKIN MANIFESTATIONS IN ACUTE-LEUKEMIA WITH MONOCYTIC DIFFERENTIATION - A MORPHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 11 CASES.* Cancer, 1993. **71**(1): p. 124-132.
33. Reenesh, M., S. Munishwar, and S.K. Rath, *Generalised leukaemic gingival enlargement: a case report.* J Oral Maxillofac Res, 2012. **3**(3): p. e5.
34. Smith, M., et al., *Adult acute myeloid leukaemia.* Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **50**(3): p. 197-222.
35. Albrecht, T.A., *Physiologic and psychological symptoms experienced by adults with acute leukemia: an integrative literature review.* Oncol Nurs Forum, 2014. **41**(3): p. 286-95.
36. Rollig, C. and G. Ehninger, *How I treat hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia.* Blood, 2015.
37. Pastore, F., et al., *The Role of Therapeutic Leukapheresis in Hyperleukocytotic AML.* PLoS ONE, 2014. **9**(4): p. e95062.

-
38. Wittmann, M., et al., *The relation between the experience of time and psychological distress in patients with hematological malignancies*. Palliat Support Care, 2006. **4**(4): p. 357-63.
 39. Rodin, G., et al., *Traumatic stress in acute leukemia*. Psychooncology, 2013. **22**(2): p. 299-307.
 40. Chang, H.Y., et al., *Causes of death in adults with acute leukemia*. Medicine (Baltimore), 1976. **55**(3): p. 259-68.
 41. Fritsch, S., et al., [*Diagnostics and therapy of acute myeloid leukemia*]. Dtsch Med Wochenschr, 2006. **131**(43): p. 2401-6.
 42. Vardiman, J.W., 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): p. 937-51.
 43. Sekeres, M.A., et al., *Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients*. Blood, 2009. **113**(1): p. 28-36.
 44. Cheson, B.D., et al., *Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia*. J Clin Oncol, 2003. **21**(24): p. 4642-9.
 45. Yates, J.W., et al., *Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia*. Cancer Chemother Rep, 1973. **57**(4): p. 485-8.
 46. Dohner, K., P. Paschka, and H. Dohner, [*Acute myeloid leukemia*]. Internist (Berl), 2015. **56**(4): p. 354-63.
 47. Lee, J.-H., et al., *A randomized trial comparing standard versus high-dose daunorubicin induction in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2011. **118**(14): p. 3832-3841.
 48. Fernandez, H.F., et al., *Anthracycline Dose Intensification in Acute Myeloid Leukemia*. New England Journal of Medicine, 2009. **361**(13): p. 1249-1259.

49. Döhner, H., 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): p. 453-474.
50. Braess, J., 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): p. 3903-3910.
51. Buchner, T., 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): p. 2480-9.
52. Büchner, T., et al., *Double Induction Strategy for Acute Myeloid Leukemia: The Effect of High-Dose Cytarabine With Mitoxantrone Instead of Standard-Dose Cytarabine With Daunorubicin and 6-Thioguanine: A Randomized Trial by the German AML Cooperative Group*. Blood, 1999. **93**(12): p. 4116-4124.
53. Buchner, T., 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): p. 61-9.
54. Stelljes, M., et al., *Allogeneic Transplantation Versus Chemotherapy as Postremission Therapy for Acute Myeloid Leukemia: A Prospective Matched Pairs Analysis*. Journal of Clinical Oncology, 2014. **32**(4): p. 288-296.
55. Grimwade, D. and R.K. Hills, *Independent prognostic factors for AML outcome*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 385-95.
56. Grimwade, D. and K. Mrozek, *Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia*. Hematol Oncol Clin North Am, 2011. **25**(6): p. 1135-61, vii.
57. Grimwade, D., 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, Vol. 116. 2010. 354-365.

-
58. Heiblig, M., et al., *Treatment patterns and comparative effectiveness in elderly acute myeloid leukemia patients (age 70 years or older): the Lyon-university hospital experience*. *Leukemia & Lymphoma*, 2016: p. 1-8.
 59. Medeiros, B.C., et al., *Cytogenetic heterogeneity negatively impacts outcomes in patients with acute myeloid leukemia*. *Haematologica*, 2015. **100**(3): p. 331-5.
 60. Appelbaum, F.R., et al., *Age and acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2006. **107**(9): p. 3481-5.
 61. Ossenkoppele, G. and B. Lowenberg, *How I treat the older patient with acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2015. **125**(5): p. 767-74.
 62. Pollyea, D.A., H.E. Kohrt, and B.C. Medeiros, *Acute myeloid leukaemia in the elderly: a review*. *British Journal of Haematology*, 2011. **152**(5): p. 524-542.
 63. de Jonge, H.J., et al., *Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD*. *Haematologica*, 2011. **96**(9): p. 1310-7.
 64. Djunic, I., et al., *Pretreatment risk factors and importance of comorbidity for overall survival, complete remission, and early death in patients with acute myeloid leukemia*. *Hematology*, 2012. **17**(2): p. 53-8.
 65. Ventura, G.J., et al., *Acute myeloblastic leukemia with hyperleukocytosis: risk factors for early mortality in induction*. *Am J Hematol*, 1988. **27**(1): p. 34-7.
 66. Ferrara, F. and S. Mirto, *Serum LDH value as a predictor of clinical outcome in acute myelogenous leukaemia of the elderly*. *Br J Haematol*, 1996. **92**(3): p. 627-31.
 67. Krug, U., et al., *Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes*. *The Lancet*. **376**(9757): p. 2000-2008.
 68. Kern, W., et al., *Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial*. *Blood*, 2003. **101**(1): p. 64-70.

69. Bertoli, S., et al., *Prognostic impact of day 15 blast clearance in risk-adapted remission induction chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: long-term results of the multicenter prospective LAM-2001 trial by the GOELAMS study group*. *Haematologica*, Vol. 99. 2014. 46-53.
70. Haferlach, T., et al., *A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group*. *Haematologica*, 2004. **89**(4): p. 408-18.
71. Paietta, E., *Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age*. *ASH Education Program Book*, 2012. **2012**(1): p. 35-42.
72. Al-Mawali, A., D. Gillis, and I. Lewis, *The Role of Multiparameter Flow Cytometry for Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia*. *American Journal of Clinical Pathology*, 2009. **131**(1): p. 16-26.
73. Garcés-Eisele, J., *Molecular biology strategies to detect residual disease*. *Hematology*, 2012. **17**: p. 66-68.
74. Grimwade, D., et al., *The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial*. *Blood*, 1998. **92**(7): p. 2322-2333.
75. Appelbaum, F.R., et al., *The clinical spectrum of adult acute myeloid leukaemia associated with core binding factor translocations*. *British Journal of Haematology*, 2006. **135**(2): p. 165-173.
76. Solh, M., et al., *Core-binding factor acute myeloid leukemia: Heterogeneity, monitoring, and therapy*. *Am J Hematol*, 2014. **89**(12): p. 1121-31.
77. Allen, C., et al., *The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of KIT, FLT3 and CBL mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2013. **27**(9): p. 1891-901.
78. Nakao, M., et al., *Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 1996. **10**(12): p. 1911-1918.
79. Griffith, J., et al., *The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain*. *Mol Cell*, 2004. **13**(2): p. 169-78.
80. Small, D., *FLT3 Mutations: Biology and Treatment*. *ASH Education Program Book*, 2006. **2006**(1): p. 178-184.

81. Gale, R.E., et al., *The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia*. Blood, Vol. 111. 2008. 2776-2784.
82. Stirewalt, D.L., et al., *Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3724-6.
83. Whitman, S.P., et al., *Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study*. Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7233-9.
84. Leroy, H., et al., *CEBPA point mutations in hematological malignancies*. Leukemia, 2005. **19**(3): p. 329-334.
85. Pabst, T., et al., *Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis*. Br J Cancer, 2009. **100**(8): p. 1343-1346.
86. Taskesen, E., 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): p. 2469-75.
87. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med, 2005. **352**(3): p. 254-66.
88. Rau, R. and P. Brown, *Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity*. Hematological Oncology, 2009. **27**(4): p. 171-181.
89. Kern, W., et al., *Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2005. **56**(2): p. 283-309.
90. Peters, J.M. and M.Q. Ansari, *Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis and Management of Acute Leukemia*. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2011. **135**(1): p. 44-54.

91. Paietta, E., *How to optimize multiparameter flow cytometry for leukaemia/lymphoma diagnosis*. Best Practice & Research Clinical Haematology, 2003. **16**(4): p. 671-683.
92. Buccisano, F., et al., *Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia*. Blood, Vol. 116. 2010. 2295-2303.
93. Kohnke, T., et al., *Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse*. Leukemia, 2015. **29**(2): p. 377-86.
94. Kern, W., et al., *Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2004. **89**(5): p. 528-540.
95. San Miguel, J.F., et al., *Immunophenotyping Investigation of Minimal Residual Disease Is a Useful Approach for Predicting Relapse in Acute Myeloid Leukemia Patients*. Blood, Vol. 90. 1997. 2465-2470.
96. San Miguel, J.F., et al., *Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1746-51.
97. Buccisano, F., et al., *The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2006. **20**(10): p. 1783-9.
98. Maurillo, L., et al., *Toward optimization of postremission therapy for residual disease-positive patients with acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2008. **26**(30): p. 4944-51.
99. Venditti, A., et al., *Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia*. Blood, Vol. 96. 2000. 3948-3952.
100. Terwijn, M., et al., *High Prognostic Impact of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia: Data From the HOVON/SAKK AML 42A Study*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(31): p. 3889-3897.

-
101. Kern, W., et al., *Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2004. **104**(10): p. 3078-3085.
 102. Maurillo, L., et al., *Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow*. *Haematologica*, 2007. **92**(5): p. 605-11.
 103. Freeman, S.D., et al., *Prognostic Relevance of Treatment Response Measured by Flow Cytometric Residual Disease Detection in Older Patients With Acute Myeloid Leukemia*. *Journal of Clinical Oncology*, 2013. **31**(32): p. 4123-4131.
 104. Buccisano, F., et al., *Minimal residual disease negativity in elderly patients with acute myeloid leukemia may indicate different postremission strategies than in younger patients*. *Ann Hematol*, 2015. **94**(8): p. 1319-26.
 105. Kern, W. and T. Haferlach, *[Quantification of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. From diagnosis to prognosis]*. *Med Klin (Munich)*, 2005. **100**(1): p. 54-9.
 106. Voskova, D., et al., *Use of five-color staining improves the sensitivity of multiparameter flow cytometric assessment of minimal residual disease in patients with acute myeloid leukemia*. *Leukemia & Lymphoma*, 2007. **48**(1): p. 80-88.
 107. Kern, W., et al., *Four-fold staining including CD45 gating improves the sensitivity of multiparameter flow cytometric assessment of minimal residual disease in patients with acute myeloid leukemia*. *Hematology Journal*, 2004. **5**(5): p. 410-418.
 108. Grimwade, D. and S.D. Freeman, *Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"?* *Blood*, 2014. **124**(23): p. 3345-55.
 109. DiNardo, C.D. and S.M. Luger, *Beyond morphology: minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia*. *Current Opinion in Hematology*, 2012. **19**(2): p. 82-8.

110. Heilmeier, B., et al., *Diagnostik, Klassifikation und Prognosefaktoren der akuten myeloischen Leukämie*. Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2007. **102**(4): p. 296-308.
111. Loken, M.R., et al., *Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group*. Blood, 2012. **120**(8): p. 1581-1588.
112. Sievers, E.L., et al., *Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia*. Blood, Vol. 101. 2003. 3398-3406.
113. Voskova, D., et al., *Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings*. Cytometry B Clin Cytom, 2004. **62**(1): p. 25-38.
114. Inaba, H., et al., *Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2012. **30**(29): p. 3625-32.
115. Rubnitz, J.E., et al., *Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial*. Lancet Oncol, 2010. **11**(6): p. 543-52.
116. Burnett, A., M. Wetzler, and B. Lowenberg, *Therapeutic advances in acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2011. **29**(5): p. 487-94.
117. Benthous, T., et al., *Rapid and sensitive screening for CEBPA mutations in acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2008. **143**(2): p. 230-9.
118. Dufour, A., 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): p. 570-7.
119. Schnittger, S., et al., *Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML*. Blood, Vol. 114. 2009. 2220-2231.

-
120. Papadaki, C., et al., *Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor*. Br J Haematol, 2009. **144**(4): p. 517-23.
 121. Kern, W., et al., *Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow*. Haematologica, 2003. **88**(6): p. 646-53.
 122. Röllig, 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*. Journal of Clinical Oncology, 2011. **29**(20): p. 2758-2765.
 123. Olaru, D., et al., *Multiparametric analysis of normal and postchemotherapy bone marrow: Implication for the detection of leukemia-associated immunophenotypes*. Cytometry Part B: Clinical Cytometry, 2008. **74B**(1): p. 17-24.
 124. Basso, G., et al., *Risk of Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Is Predicted By Flow Cytometric Measurement of Residual Disease on Day 15 Bone Marrow*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(31): p. 5168-5174.
 125. Schrappe, M., *Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient*. ASH Education Program Book, 2012. **2012**(1): p. 137-142.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Doktormutter Prof Dr. med. Marion Subklewe für die Überlassung dieses Themas und die jederzeit gewährte Betreuung und Supervision der Arbeit.

Dank ihr erhielt ich zwei engagierte Betreuer an meiner Seite, Dr. Daniela Sauter und Dr. Thomas Köhnke. Ich danke euch für die Begleitung der Arbeit, die ermöglichte Publikation, Korrekturen, Ratschläge und aufbauenden Worte. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Eva Horster und Herrn Rüdiger Laubender für die Unterstützung und Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Der größte Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Bruder, die mich mit unermüdlicher Ausdauer in jeder Phase dieser Arbeit motiviert haben.

Gewidmet ist diese Arbeit meiner 2007 verstorbenen Oma, Mahin Rafizadeh. Nachdem ihr ein Studium im Iran damals verwehrt wurde, hat sie besonderen Wert auf die Ausbildung ihrer fünf Kinder und ihrer Enkelkinder gelegt. Sie hat mich in der Entscheidung, den ärztlichen Beruf einzuschlagen, am meisten unterstützt.