

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Michael von Bergwelt

**Molekulares Monitoring der minimalen Resterkrankung mittels quantitativer  
Real-Time-PCR bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie nach  
allogener Stammzelltransplantation**

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

vorgelegt von  
Christina Zeber  
aus Radolfzell  
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Karsten Spiekermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Albert  
Prof. Dr. Christoph Walz  
Prof. Dr. Daniel Teupser

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Max Hubmann

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2019

# Inhalt

1	Einleitung .....	6
1.1	Definition und Beschreibung der akuten myeloischen Leukämie.....	6
1.2	Pathogenese, Epidemiologie und Klinik der akuten myeloischen Leukämie.....	6
1.3	Molekular- und zytogenetische Marker als Risikofaktoren.....	8
1.3.1	Nucleophosmin 1 .....	10
1.3.2	<i>FLT3</i> -Interne Tandem Duplikation.....	10
1.3.3	<i>FLT3</i> -Tyrosin-Kinase-Domäne .....	11
1.3.4	<i>CBFB-MYH11</i> - und <i>RUNX1-RUNX1T1</i> - Fusionsgene .....	11
1.3.5	Partielle Tandemduplikation im Mixed Lineage Leukemia – Gen .....	11
1.3.6	<i>DEK-CAN</i> - Fusionsgen .....	12
1.3.7	<i>CEBPA</i> ( <i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i> ).....	12
1.3.8	<i>MDS-EVI1</i> ( <i>MDS-ecotropic viral integration site-1</i> ).....	12
1.4	Diagnostik und Therapie der akuten myeloischen Leukämie.....	13
1.5	Die allogene Stammzelltransplantation als Baustein in der Therapie der AML ....	14
1.5.1	Indikationsstellung .....	14
1.5.2	Auswahl von Stammzellspender und Stammzellquelle .....	15
1.5.3	Konditionierungstherapie .....	16
1.5.4	Begleitende Therapiemaßnahmen während der Stammzelltransplantation..	18
1.5.5	Komplikationen nach der Stammzelltransplantation .....	18
1.5.6	Immuntherapie nach allogener Stammzelltransplantation .....	23
1.6	Monitoring der minimalen Resterkrankung nach allogener Stammzelltransplantation.....	23
2	Zielsetzung .....	25
3	Material und Methoden .....	27
3.1	Patientenkollektiv .....	27
3.2	Datenerhebung und Zeitpunkte der MRD-Messung .....	29
3.3	Labormethoden.....	30

3.3.1	Quantitative Real-Time-PCR.....	30
3.3.2	Chimärismusanalysen.....	35
3.3.3	Schwellenwerte zur Interpretation der MRD-Werte der verschiedenen RT-PCRs	35
3.4	Statistische Tests und klinische Endpunkte.....	36
3.4.1	Überlebenszeitanalysen.....	36
3.4.2	Berechnung der kumulativen Rezidivinzidenz .....	37
3.4.3	Statistische Auswertungen im weiteren Krankheitsverlauf.....	38
3.4.4	Endpunkt Gesamtüberleben .....	38
3.4.5	Endpunkt Rezidiv-freies Überleben .....	38
3.4.6	Endpunkt Rezidiv .....	39
4	Ergebnisse .....	40
4.1	Patientencharakteristik.....	40
4.2	Überlebenszeitanalysen.....	42
4.2.1	Einflüsse von Baseline-Parametern auf das OS, RFS, das Auftreten eines Rezidivs und die CIR.....	43
4.2.2	Einflüsse von peritherapeutischen Parametern und Risikofaktoren an Tag +30 nach Stammzelltransplantation .....	55
4.2.3	Einflüsse von peritherapeutischen Parametern und Risikofaktoren an Tag +100 nach Stammzelltransplantation .....	57
4.2.4	Einflüsse von Parametern und Risikofaktoren im Verlauf ab Tag +100 nach allogener Stammzelltransplantation .....	68
4.2.4.3	Analysen zur MRD im weiteren Verlauf nach allogener Stammzelltransplantation .....	68
4.3	Subgruppenanalyse .....	70
4.3.1	Patienten in kompletter Remission zum Zeitpunkt der Transplantation .....	70
4.3.2	Patienten ohne Remission zum Zeitpunkt der Transplantation.....	71
5	Diskussion .....	79
5.1	Fallzahl .....	79

5.2	MRD-Messungen als Prognoseparameter .....	80
5.3	Chimärismusanalysen.....	82
5.4	Thrombozytenanzahl .....	84
5.5	Zeitpunkte der MRD-Messungen .....	85
5.6	Prognoseeinschätzung nach ELN-Klassifikation und HCT-CI.....	85
5.7	Krankheitsstatus vor Stammzelltransplantation .....	87
5.8	HLA-Status .....	88
5.9	Spenderlymphozytengabe .....	89
6	Zusammenfassung .....	91
7	Literaturverzeichnis .....	93
8	Danksagung.....	101
9	Lebenslauf .....	102
10	Abkürzungsverzeichnis.....	103
11	Abbildungsverzeichnis .....	106
12	Tabellenverzeichnis .....	108
13	Anhang.....	110
13.1	Patientencharakteristik.....	110
13.2	Erhebungsbogen HCT-CI.....	115
14	Eidesstattliche Versicherung .....	117

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition und Beschreibung der akuten myeloischen Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine auf maligner Entartung der primitiven hämatopoetischen Zellen beruhende Erkrankung. Von der Entartung sind überwiegend die hämatopoetischen Stammzellen betroffen. Man spricht von einer AML, wenn der Anteil der unreifen Zellen, der sogenannten Blasten, im Knochenmark mehr als 20% der kernhaltigen Zellen ausmacht. Häufig ist der Grund der Entartung eine oder mehrere genetische Veränderungen der hämatopoetischen Stammzellen. Folglich proliferieren undifferenzierte und pathologische myeloische Zellvorstufen zunächst im Knochenmark und werden dann ins periphere Blut ausgeschwemmt. Die Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) klassifiziert die unterschiedlichen Formen der AML nach zytogenetischen, molekulargenetischen, immunphänotypischen und morphologischen Merkmalen, sowie klinischen Faktoren. [1]

## 1.2 Pathogenese, Epidemiologie und Klinik der akuten myeloischen Leukämie

Nach heutigem Wissensstand geht man von einem mehrstufigen Prozess in der Entwicklung einer gesunden myeloischen Vorläuferzelle zu einer pathologischen Tumorzelle aus. Außerdem ist davon auszugehen, dass in mindestens zwei Signalwegen, die für die Differenzierung der myeloischen Vorläuferzellen entscheidend sind, eine genetische Aberration vorliegen muss, damit eine leukämische Tumorzelle entsteht. Dabei betreffen die Mutationen zum einen häufig eine Rezeptortyrosinkinase oder deren Signalmodulatoren (z.B. *FLT3*) und zum anderen bestimmte für die AML spezifische Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *RUNX1-RUNX1T1* oder *CBFB-MYH11*. Die Mutation im Rezeptortyrosinkinaseweg scheint dabei die Zellproliferation zu fördern und die Mutationen, die den Zellkern betreffen, verhindern offenbar die Zelldifferenzierung. [2, 3]

Inwieweit Umwelteinflüsse zu den genannten genetischen Veränderungen führen, ist nicht im Detail bekannt. Man weiß jedoch, dass bestimmte Faktoren in der Pathogenese der AML eine Rolle spielen. So konnte beispielsweise aufgezeigt werden, dass folgende Faktoren ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AML darstellen:

- ionisierende Strahlen
- chemische Substanzen wie Benzol und andere flüchtige Kohlenwasserstoffe
- Zytostatika, z.B. Alkylantien (häufig bei der therapie-assoziierten AML)

Eine AML kann sich zudem auch aus einem Myelodysplastischen Syndrom (MDS), einer aplastischen Anämie oder einer myeloproliferativen Erkrankung, wie beispielsweise der

Osteomyelofibrose oder der Polycythamia vera, entwickeln. Diese Form der AML wird dann auch sekundäre AML genannt. [4]

Die AML wird nach der FAB (French-American-British-Group) - Klassifikation morphologisch und zytochemisch in verschiedene Subtypen eingeteilt (Tabelle 1).

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML nach morphologischen Kriterien				
Klassifikation	Subtyp (nach Differenzierungsrichtung und Reifegrad)	Häufigkeit in %	Zytochemie: Peroxidase	Zytochemie: Unspezifische Esterase
<b>M0</b>	Minimal differenzierte AML	5	-	-
<b>M1</b>	Myeloblastische AML ohne Ausreifung	15	+	-
<b>M2</b>	Myeloblastische AML mit Ausreifung	25	+	-
<b>M3</b>	Akute Promyelozyten-Leukämie (APL)	10	+	-
<b>M3V</b>	Variante mikrogranuläre APL		+	-
<b>M4</b>	Akute myelomonozytäre Leukämie	25	+	+
<b>M4Eo</b>	Akute Myelomonozytäre L. mit Eosinophilie		+	+
<b>M5</b>	Akute monozytäre Leukämie a) undifferenziert b) differenziert	10	-	+
<b>M6</b>	Akute Erythroleukämie	5	-	-
<b>M7</b>	Akute megakaryozytäre Leukämie	5	-	-

Modifiziert nach [4] und [5]

Mit 80 – 90 % macht die AML den größten Anteil der akuten Leukämien im Erwachsenenalter aus. Nach aktuellen Erkenntnissen liegt die Inzidenz der Erkrankung bei 3,7 / 100 000 Männern und Frauen pro Jahr. Bei Diagnosestellung einer Leukämie beträgt das mediane Alter 66 Jahre. [6]

Das klinische Erscheinungsbild der AML ist vielseitig und unterschiedlich ausgeprägt. Der Patient wird hauptsächlich durch die Symptome der Knochenmarkinsuffizienz auf seine Krankheit aufmerksam. Die Unterdrückung der Reifung der drei Zellreihen (Erythropoese, Leukopoese und Thrombopoese) durch die ungehemmte Proliferation des leukämischen Klons im Knochenmark äußert sich vor allem durch Anämie und somit durch Müdigkeit und Schwäche, Infektanfälligkeit und Blutungsneigung bei Bagateltraumata. Bei vielen Patienten findet man durch die Ausschwemmung der unreifen Blasten ins periphere Blut

eine erhebliche Leukozytose. Es kann auch zu einer B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß und nicht beabsichtigtem 10%-igen Gewichtsverlust innerhalb der letzten sechs Monate) oder Knochenschmerzen durch die Tumordinfiltration im Knochenmark kommen. Bei fortschreitender Infiltration der Leukämiezellen in das zentrale Nervensystem kommt es in einigen Fällen zu Kopfschmerzen und/oder Hirnnervenlähmungen. [5]

### 1.3 Molekular- und zytogenetische Marker als Risikofaktoren

In der Diagnostik der AML werden immer mehr zytogenetische und molekulargenetische Aberrationen entdeckt, die physiologische Mechanismen der Proliferation, DNA-Reparatur und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen verändern. So bekommt man durch die Fortschritte in der Genomtechnik und das „next generation sequencing“ einen immer größeren Einblick in die Komplexität und Heterogenität der Erkrankung. Bei Diagnosestellung einer AML werden molekular- und zytogenetische Untersuchungen durchgeführt, um das Risiko-Profil eines jeden Patienten, ein Rezidiv zu erleiden, zu erfassen. Diese Untersuchungen haben sowohl für die Therapie als auch für die Prognose große Bedeutung. So können beispielsweise bei Patienten mit einer *FLT3*-Mutation gezielt Tyrosinkinaseinhibitoren zur Therapie eingesetzt werden. Die Quantifizierung molekulargenetischer Marker können zudem entscheidende Hinweise auf ein beginnendes Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation liefern. Diese Aberrationen werden mittels der quantitativen Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) und/oder der Multiparameterdurchfluss-Zytometrie quantifiziert. Über 90% der AML-Patienten können auf Basis der zytogenetischen oder molekulargenetischen Kriterien eingeteilt werden. Seit 2016 werden AML-Patienten auch durch die WHO anhand genetischer Marker klassifiziert (Tabelle 2). [7, 8]



Tabelle 2: WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie, 2016

**Akute Leukämie mit rekurrenten genetischen Veränderungen (Translokationen und Inversionen)**

- AML mit t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
- AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
- APL (Akute Promyelozyten Leukämie) mit *PML-RARA*
- AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*
- AML mit t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
- AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*
- AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*
- provisorische Entität: AML mit *BCR-ABL1*
- AML mit *NPM1*-Mutation
- AML mit biallelischer Mutation von *CEBPA*
- provisorische Entität: AML mit mutierter *RUNX1*

**Akute myeloische Leukämie mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen**

**Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien**

**Akute myeloische Leukämie ohne weitere Spezifizierung**

- AML mit minimaler Differenzierung
- AML ohne Ausreifung
- AML mit Ausreifung
- Akute myelomonozytäre Leukämie
- Akute monoblastische / monozytäre Leukämie
- Reine erythroide Leukämie
- Akute megakaryoblastische Leukämie
- Akute basophile Leukämie
- Akute Panmyelose mit Myelofibrose

**Myeloides Sarkom**

**Myeloische Proliferation assoziiert mit dem Down-Syndrom**

- Transiente abnormale Myelopoese
- Myeloische Leukämie assoziiert mit dem Down-Syndrom

**Blastische plasmazytoide dendritische Zellneoplasien**

**Akute Leukämie unklarer Linienzugehörigkeit**

- Akute undifferenzierte Leukämie
- Akute Leukämie, gemischter Phänotyp mit t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*
- Akute Leukämie, gemischter Phänotyp mit t(v;11q23.3); *KMT2A* rearranged
- Akute Leukämie, gemischter Phänotyp, B-myeloid, NOS
- Akute Leukämie, gemischter Phänotyp, T-myeloid, NOS

Modifiziert nach [1] und [8]

### 1.3.1 Nucleophosmin 1

Nucleophosmin 1 (*NPM1*) ist ein nukleoläres Phosphoprotein, was eine wichtige Rolle im beim Transport von mRNA während des Zellzyklus spielt. Durch Mutationen in seinem Gen kommt es zu abnormen Positionen des Nucleophosmin-Proteins im Zytoplasma, sodass seine Transportfunktion zum Zellkern eingeschränkt ist. Das Nucleophosmin-Protein hat eine multifunktionale Rolle in der Zelle und fungiert unter anderem auch als Proto-Onkogen aber auch als Tumor-Suppressor. Außerdem spielt Nucleophosmin eine Schlüsselrolle in der ribosomalen Biogenese und ist somit maßgeblich an der Proteintranslation beteiligt. Hierdurch ist der Zusammenhang zwischen *NPM*-Expression und Zellproliferation zu erklären, denn es wurde gezeigt, dass im Knochenmark die *NPM1*-Expression während der Reifung von Pro-Erythroblasten zu Normoblasten stufenweise ansteigt. Bei Patienten mit mutiertem *NPM1*-Protein und einer Leukämie kann man sich so den positiven Effekt dieser Mutation erklären. Die Zellproliferation der pathologischen Leukämiezellen ist auf Grund des nicht funktionierenden Nucleophosmin-Proteins gestört. Eine Mutation im *NPM1*-Gen tritt ungefähr bei einem Drittel aller Patienten mit de-novo AML, d.h. mit einer neu aufgetretenen primären AML, und bei ca. 45-60% der AML-Patienten mit normalem Karyotyp (NK) auf. Somit kommt diese Mutation bei Erwachsenen Patienten mit de-novo NK-AML am häufigsten vor. Diese Mutation ist häufig mit anderen molekulargenetischen Veränderungen, wie der *FLT3-ITD*, der *IDH1/2* oder der *DNMT3A*-Mutation vergesellschaftet. Allgemein wurde beobachtet, dass Patienten mit einer isolierten *NPM1*-Mutation eine bessere Prognose mit höheren Remissions- und längeren Überlebensraten, sowie einem reduzierten Rezidivrisiko haben. Mehrere Studien haben bis heute gezeigt, dass die Quantifizierung der *NPM1*-Mutation bei den betroffenen Patienten als Monitoring der minimalen Resterkrankung (MRD) geeignet ist und ein beginnendes Rezidiv anzeigen kann. 95 % der Patienten mit einer *NPM1*-Mutation weisen einen von drei Mutationstypen *A*, *B* oder *D* auf. Daher ist das Mutationsmuster sehr homogen und eignet sich gut als Zielsequenz in der MRD-Diagnostik. [7, 9, 10, 11]

### 1.3.2 FLT3-Interne Tandem Duplikation

*FLT3* bezeichnet eine Klasse-III-Rezeptortyrosinkinase. Diese wird auf gesunden hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation. Die interne Tandemduplikation (ITD) ist eine molekulargenetische Aberration, die eine Domäne des *FLT3*-Tyrosinkinase-Rezeptors betrifft, die für die Regulierung der Aktivierung des Tyrosinkinasekomplexes wichtig ist. Diese Längenmutation führt zu einer Aktivierung des Rezeptors, die wiederum die Proliferation von Leukämiezellen fördert. Studien haben gezeigt, dass Patienten mit einer Mutation im *FLT3*-Rezeptor ein signifikant schlechteres Outcome im Vergleich zu Patienten

ohne diese Mutation haben. Außerdem ist die Rezidivrate bei diesem Patientenkollektiv erhöht. Die *FLT3-ITD* ist mit einer hohen Anzahl an Leukozyten und erhöhten LDH-Werten bei Diagnosestellung assoziiert. Ca. 20-27% der AML-Patienten zwischen 18 und 60 Jahren und 30-50% der Patienten mit einer AML mit normalem Karyotyp sind von einer *FLT3*-Mutation betroffen. [7]

### 1.3.3 *FLT3*-Tyrosin-Kinase-Domäne

Bei der *FLT3*-TKD-Punktmutation ist die Aktivierung der Tyrosinkinase im Tyrosinkinasekomplex auf hämatopoetischen Stammzellen gestört. Die Mutation tritt bei 6-8% aller AML-Fälle mit normalem Karyotyp auf und ist somit seltener als die *FLT3-ITD*.

Die *FLT3*-TKD ist häufig mit einer Mutation im *NPM1* oder im *CEBPA*-Gen vergesellschaftet. Patienten, bei denen das der Fall ist, haben eine bessere Prognose. Wenn die *FLT3*-TKD zusammen mit der *FLT-ITD* oder der *MLL-PTD* auftritt, ist die Prognose dieser Patienten schlechter. [12]

### 1.3.4 *CBFB-MYH11*- und *RUNX1-RUNX1T1* - Fusionsgene

Diese beiden zytogenetischen Aberrationen betreffen jeweils den Core-Binding Faktor (CBF), ein Transkriptionsfaktorkomplex, der eine wichtige Rolle in der Hämatopoese spielt. Die balancierte Translokation t(16;16)(p13.1;q22) und die Inversion inv(16)(p13.1;q22) führen zu einer Fusion des *CBFB*- und des *MYH11*-Gens. Die Translokation t(8;21)(q22;q22.1) ist ebenfalls balanciert und betrifft das *RUNX1*- und das *RUNX1T1*-Gen, die durch die Mutation zum *RUNX1-RUNX1T1*-Fusionsgen (auch *AML1-ETO*) verschmelzen. Diese Fusionsgene verhindern durch Störung der Transkriptionsprozesse die Ausdifferenzierung von gesunden hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen im Knochenmark. Leukämien, die diese zytogenetischen Aberrationen aufweisen, bezeichnet man auch als Core-Binding-Faktor-Leukämien. Sie weisen im klinischen Verlauf und in der Zytomorphologie typische Merkmale auf. Wenn beim Verdacht auf eine AML die oben genannten Mutationen nachgewiesen werden, ist die Diagnose unabhängig von der Blastenzahl gesichert. Die Prognose für eine akute Leukämie mit Nachweis eines *RUNX1-RUNX1T1*-Fusionsgens oder eines *CBFB-MYH11*-Fusionsgens ist günstig. Bei Diagnosestellung sollte die Expression dieser Fusionsgene quantifiziert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine solche Quantifizierung von prognostischer Relevanz bezüglich der Erkrankung ist. [13, 14]

### 1.3.5 Partielle Tandemduplikation im Mixed Lineage Leukemia – Gen

In 8% aller NK-AML Patienten kann eine partielle Tandemduplikation (PTD) im mixed lineage leukemia-Gen (*MLL*) nachgewiesen werden. Dieses Gen liegt auf Chromosom 11q23 und ist in einer Vielzahl maligner hämatologischer Erkrankungen geschädigt. Das

MLL-Gen codiert für ein Protoonkogen, das der DNA-Verpackung dient. Es spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Prägung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen während der Embryogenese. In Tierexperimenten wurde bewiesen, dass Zellen mit einem Defizit im *MLL*-Gen nicht in der Lage waren, sich zu reifen lymphatischen und myeloischen Zellen weiterzuentwickeln. Studien haben gezeigt, dass Patienten mit einer *MLL*-PTD-Mutation eine schlechte Prognose im Hinblick auf eine komplette Remission und des Gesamtüberlebens haben. Detektiert wird die *MLL*-PTD mittels qRT-PCR. Im Verlauf der Erkrankung dient sie als quantifizierbarer Marker für die minimale Resterkrankung. [15, 16]

#### 1.3.6 *DEK-CAN* - Fusionsgen

Das *DEK-CAN*-Fusionsgen kommt durch eine Translokation zwischen den Chromosomen 6 und 9 zustande ( $t(6;9)$ ) und ist somit eine zytogenetische Aberration. Das *DEK*-Gen wurde früher auch als Protoonkogen bezeichnet und ist an der Umstrukturierung der DNA während des Zellzyklus beteiligt. Das *CAN*-Gen spielt eine wichtige Rolle beim nukleär-zytoplasmatischen Transport. Myeloische Zellen, die das *DEK-CAN*-Fusionsgen transkribieren, weisen eine erhöhte allgemeine Proteinsynthese auf. Dieser Effekt ist nicht auf eine fehlerhafte Transkription sondern eher auf eine erhöhte Translation zurück zu führen. Das *DEK-CAN*-Fusionstranskript ist mit einer Rate von 1% aller AML-Patienten sehr selten. Die Prognose für AML-Patienten mit dieser genetischen Aberration ist schlecht. Die Überlebensraten und Rezidiv-freien Intervalle sind sehr kurz. Dieses Fusionsgen dient als MRD-Marker zur Krankheitsüberwachung. Es wird mittels qRT-PCR quantifiziert. [17, 18].

#### 1.3.7 *CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein alpha)*

Das *CEBPA*-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Expression von Genen steuert, die für die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen wichtig sind. Bei einem Funktionsverlust dieses Transkriptionsfaktors durch eine genetische Veränderung wird die Differenzierung der Stammzellen blockiert.

#### 1.3.8 *MDS-EVI1 (MDS-ecotropic viral integration site-1)*

*EVI1* ist ein Protoonkogen, das durch eine Translokation  $t(3;3)(q21.3;q26.2)$  bzw. Inversion  $inv(3)(q21.3;q26.2)$  überexprimiert wird. Dadurch kommt es zu Fehlern in der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen. Diese Mutation kommt in 8-10% der AML-Fälle bei Erwachsenen vor. Patienten, bei denen diese Mutation vorliegt, haben eine schlechte Prognose. Die *EVI1*-Überexpression kommt gehäuft bei Patienten vor, bei denen auch ein genetisches Rearrangement des *Mixed Lineage Leukemia*-Gens vorliegt. [1, 19]

#### 1.4 Diagnostik und Therapie der akuten myeloischen Leukämie

Es gibt verschiedene Kriterien, die zur Diagnose einer AML herangezogen werden. Man spricht dann von einer AML, wenn im Knochenmark oder im peripheren Blut ein Blastenanteil von  $> 20\%$  nachgewiesen wird. Bei Vorliegen der balancierten Translokationen  $t(15;17)$ ,  $t(8;21)$ ,  $inv(16)$  oder  $t(16;16)$  oder einigen speziellen Leukämieformen, kann man in Unabhängigkeit vom Blastenanteil im Knochenmark von einer AML sprechen. Im Knochenmarkausstrich zeigt sich typischerweise eine erhöhte Zelldichte. Es überwiegen die unreifen Blasten. Die Erythropoese und die Megakaryopoese werden von den leukämischen Zellklonen verdrängt. Weitere Untersuchungen wie die Zytochemie durch verschiedene Zellfärbungen, die Zytogenetik durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder die Polymerasekettenreaktion (PCR), sowie die Immunphänotypisierung sind wegweisend für die weitere Einteilung des Leukämie-Subtyps. Die Klassifikation in die verschiedenen Leukämie-Subtypen wird zum einen durch die Einteilung der FAB-Gruppe (French-American-British-Group), zum anderen durch die aktuellen Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) vorgenommen (Tabellen 1 und 2). [4, 8]

Initial wird eine zytologische Untersuchung und eine Immunphänotypisierung durchgeführt. Eine immer größere Rolle in der Diagnostik spielen die neu entdeckten molekular- und zytogenetischen Aberrationen, die inzwischen von der WHO als Diagnosekriterien berücksichtigt werden. Vor einer Therapieeinleitung wird neben zytomorphologischen und zytochemischen Untersuchungen von Blut- und Knochenmarkausstrichen zunächst ein molekulares Screening durchgeführt. Dieses sollte Untersuchungen auf die Fusionsgene *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1* und *CBFB-MYH11* sowie die Suche nach Mutationen in den Genen *NPM1*, *FLT3* und *CEBPA* beinhalten.

Das therapeutische Vorgehen bei der AML hat sich in den letzten Jahren wenig verändert. Als Therapieziel gilt die komplette Remission, also die Normalisierung von Blutbild und Knochenmark, das heißt weniger als 5% blastäre Zellen im Knochenmark, mehr als 1000 neutrophile Granulozyten/ $\mu\text{l}$  bzw. mehr als 100.000 Thrombozyten/ $\mu\text{l}$  im peripheren Blut und fehlende extramedulläre Manifestationen. Bei der Behandlung der Leukämie gibt es mehrere Therapiestufen:

- 1) Induktionstherapie zur Verminderung der Zahl maligner Zellen
- 2) Konsolidierungstherapie und/oder allogene Stammzelltransplantation
- 3) ggf. Erhaltungstherapie

Als Induktionstherapie wird die Kombination aus einer 3-tägigen Anthrazyklin-Applikation und einer 7-tägigen Cytarabin-Dauerinfusion als Therapiestandard angesehen.

Während der Standardkonsolidierungstherapie bekommt der Patient wiederholt (drei bis vier Zyklen) hochdosiertes Cytarabin. Alternativ bzw. zusätzlich kann eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt werden. Mit den dargestellten Standardtherapien können 40-45% der 18-60-jährigen geheilt werden. Bei den Patienten, die älter als 60 Jahre sind, sinkt diese Rate auf 15-20%. [5, 8, 20]

Zurzeit werden neue Therapieansätze entwickelt. Diese beinhalten:

- die medikamentöse Hemmung von mutierten oder in ihrer Expression deregulierten molekularen Zielstrukturen,
- die Hemmung aktivierter Signalwege oder Proteine, die den Zellzyklus beeinflussen,
- die Verwendung von myelopoeseassoziierten Antikörpern.

Das molekulare Screening wird mit dem Ziel einer möglichen Differenzierung und Anpassung der Therapie durchgeführt. [8]

## 1.5 Die allogene Stammzelltransplantation als Baustein in der Therapie der AML

### 1.5.1 Indikationsstellung

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) stellt für eine Vielzahl von Patienten mit AML die einzige kurative Therapieoption dar. Die Indikation zur HSCT wird nach dem Krankheitsverlauf sowie der individuellen Risikostratifizierung gestellt. Entscheidend sind dabei folgende Kriterien: Zytomorphologie, Zytogenetik, Molekulargenetik, Immunphänotypisierung, Ansprechen auf Chemotherapie, Spenderverfügbarkeit, Alter, Allgemeinzustand und Komorbidität. Im Jahr 2010 wurde eine neuere Einteilung, das European LeukemiaNet (ELN) Standardized Reporting System, entwickelt, welche die verschiedenen molekular- und zytogenetischen Aberrationen mit dem zu erwartenden Therapieergebnis (Überlebensraten und Remissionszeiten bei konventioneller Chemotherapie) korreliert. Das nun bisher geltende ELN System von 2010 teilte Patienten mit AML unter Einbezug molekularer Aberrationen in vier Risikogruppen ein. Diese Einteilung stellt eine Hilfestellung bei der Indikationsstellung zur allogenen Stammzelltransplantation dar. Diese bisher geltenden Empfehlungen des European LeukemiaNet wurden 2017 neu überarbeitet und dem neuesten Wissensstand angepasst. Nach dem ELN-Reporting System von 2017 werden die Patienten nun in drei Risikogruppen eingeteilt: favorable, intermediate, adverse (Tabelle 3). [14, 21]

Tabelle 3: Standardisiertes Bewertungssystem des European LeukemiaNet 2017 (ELN) nach Korrelation von Zyto- und Molekulargenetik und klinischen Daten von AML-Patienten

Genetische Gruppe	Einteilung
Favorable	<ul style="list-style-type: none"> <li>t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></li> <li>inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></li> <li><i>NPM1</i>-Mutation ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD<sup>low</sup></i></li> <li>biallelische <i>CEBPA</i>-Mutation</li> </ul>
Intermediate	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>NPM1</i>- Mutation und <i>FLT3-ITD<sup>high</sup></i></li> <li><i>NPM1</i> Wild-Typ ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD<sup>low</sup></i> (ohne genetische Läsionen mit ungünstigem Risikoprofil)</li> <li>t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i></li> <li>Zytogenetische Anomalitäten, die weder als „favorable“ noch als „adverse“ klassifiziert werden.</li> </ul>
Adverse	<ul style="list-style-type: none"> <li>t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i></li> <li>t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged</li> <li>t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></li> <li>inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM (EVI1)</i></li> <li>-5 oder del(5q); -7, -17/abn(17p)</li> <li>Komplexer Karyotyp<sup>1</sup>, monosomaler Karyotyp<sup>2</sup></li> <li>Wildtyp-<i>NPM1</i> und <i>FLT3-ITD<sup>high</sup></i></li> <li><i>RUNX1</i>-Mutation<sup>3</sup></li> <li><i>ASXL1</i>-Mutation<sup>3</sup></li> <li><i>TP53</i>-Mutation<sup>4</sup></li> </ul>

*FLT3<sup>low</sup>*, niedrige allelische Ratio <0.5  
*FLT3<sup>high</sup>*, hohe allelische Ratio ≥0.5

<sup>1</sup> Der Begriff „Komplexer Karyotyp“ ist definiert als drei oder mehr nicht in Verbindung stehende chromosomale Anomalitäten, die keine der folgenden von der WHO definierten rekurrenten Translokationen oder Inversionen beinhaltet: t(8;21), inv(16) oder t(16;16), t(15;17), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) oder t(3;3); AML mit *BCR-ABL1*

<sup>2</sup> Definiert durch das Vorliegen einer einzigen Monosomie (Monosomie X oder Y ausgeschlossen) in Verbindung mit mind. einer zusätzlichen Monosomie oder strukturellen Chromosomen-Anomalität (ausgenommen Core-Binding-Factor AML)

<sup>3</sup> Diese Marker sollten nicht als ungünstiger prognostischer Marker genutzt werden, wenn sie mit einem AML-Subtyp aus der favorable-Risk-Gruppe auftreten

<sup>4</sup> TP53-Mutationen sind signifikant mit AML mit komplexem und monosomalem Karyotyp assoziiert

Modifiziert nach [14]

### 1.5.2 Auswahl von Stammzellspender und Stammzellquelle

Wenn nach sorgfältiger und individueller Indikationsstellung sowie Risikostratifizierung die Entscheidung für eine allogene Stammzelltransplantation (HSZT) getroffen wurde, kann mit der Suche nach einem hämatopoetischen Stammzellspender begonnen werden. Grundsätzlich kommen Spender aus der Familie, die HLA-identisch oder HLA-haploidentisch sein können, und HLA-kompatible Fremdspender, die idealerweise in 10/10 HLA-Merkmalen übereinstimmen, in Betracht. In besonderen Fällen kommen

Blutstammzellen aus Nabelschnurblut in Frage. Jede Körperzelle trägt auf ihrer Oberfläche HLA-(Human-Leukocyte Antigen) Moleküle, die den T-Zellen Antigene präsentieren. Sie sind beim Menschen Teil des MHC-Komplexes (Major Histocompatibility Complex), der aus mehreren Genen besteht und einen wesentlichen Bestandteil der individuellen Immunabwehr darstellt. Die HLA-Moleküle sind auf humanen Leukozyten mit serologischen oder molekulargenetischen Methoden relativ einfach zu bestimmen. Mit Hilfe dieser Antigene können die humanen T-Zellen als Bestandteile des Immunsystems erkennen, ob Peptide körpereigen oder körperfremd sind, und diese gegebenenfalls eliminieren. HLA-identische Geschwister stellen die optimale Spender-Empfänger-Konstellation dar. Faktoren wie Alter, Geschlecht, Infektionsstatus sowie Schwangerschaften sind im Einzelnen zu berücksichtigen. Die umfangreichen Datenanalysen des „National Marrow Donor Program“ (NMDP) und des „Center for International Blood and Marrow Transplant Research“ (CIBMTR) zeigen den negativen Einfluss auf das Überleben bei Verwendung eines nicht komplett in den HLA-Merkmalen übereinstimmenden Stammzellspenders, v.a. bei unverwandten Fremdspendern (MMURD). Je größer die HLA-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger, je größer also die Zahl der unterschiedlichen HLA-Antigene, umso höher ist das Risiko immunologischer Reaktionen und ihr negativer Einfluss auf Mortalität und Morbidität. Diese Reaktionen können in einer Abstoßungsreaktion, vermittelt durch T-Zellen des Empfängers gegenüber dem Transplantat, oder in einer Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD), vermittelt durch T-Zellen des Spenders bestehen. Sie können auch bei vollständiger Übereinstimmung der HLA-Loci auftreten. Dafür vermutet man ‚minor antigens‘ als Ursache [22, 23, 24, 25]

Die Blutstammzellen für ein Transplantat können auf unterschiedliche Weise gewonnen werden. Stammzellen, die zuvor mit Granulozytenkolonien-stimulierendem Faktor (G-CSF) aus dem Knochenmark mobilisiert wurden, können aus dem peripheren Blut gesammelt werden. Hämatopoetische Stammzellen können auch direkt aus dem Knochenmark oder aus Nabelschnurblut gewonnen werden. Heute werden überwiegend periphere Blutstammzellen zur allogenen Transplantation verwendet. [22]

### 1.5.3 Konditionierungstherapie

Die Übertragung von allogenen Blutstammzellen erfolgt nach einer Konditionierungstherapie. Der Begriff „Konditionierung“ bedeutet hier die Vorbereitung des Patienten für die Annahme des neuen Knochenmarks an Stelle seines kranken blutbildenden Systems. Die dazu eingesetzte „myeloablative“, toxische und nebenwirkungsreiche Chemotherapie hat drei wesentliche Ziele:



- Zum Einen soll „Platz“ für die neue Blutbildung im Knochenmark geschaffen werden,
- Gleichzeitig sollen die Leukämiezellen und die krankhafte Blutbildung eradiziert werden.
- Auf diese Weise kann das erfolgreiche Anwachsen (Engraftment) der Blutstammzellen des Spenders mit Erreichen eines vollen Spenderchimärismus gewährleistet werden.

Angestrebt ist grundsätzlich die längerfristige Krankheitskontrolle, die zum Einen über die Intensität der Konditionierungsbehandlung und zum anderen über den durch Spenderzellen vermittelten „graft-versus-leukemia“ Effekt (GvL-Effekt) (s.u.) erreicht werden kann [22].

Die Konditionierungstherapie mit myeloablativer Dosis kann bei Patienten, die älter sind, wegen ihrer Toxizität im Allgemeinen nur sehr eingeschränkt angewandt werden. Für Patienten, für die eine myeloablative Hochdosis-Chemotherapie auf Grund von Alter oder Komorbidität nicht in Frage kommt, gibt es die Möglichkeit eine Konditionierungstherapie mit reduzierter Dosis, also eine „Reduced Intensity Conditioning“ (RIC), anzuwenden. Bei diesem Konzept spielt der durch die Immunzellen des Spenders verursachte GvL-Effekt eine Hauptrolle: Die körperfremden Spender T-Zellen sollen verbliebene Leukämiezellen eliminieren. Bei der RIC wird das erkrankte hämatopoetische System des Empfängers nicht durch zytotoxische/myeloablativen Dosen vernichtet, sondern durch Modulation und Unterstützung der Immunreaktionen bekämpft. Insgesamt konnte jedoch ein Vorteil der RIC gegenüber der Standard-Konditionierung im Hinblick auf das Langzeitüberleben insbesondere bei Patienten mit aktiver maligner Erkrankung nicht eindeutig gezeigt werden. Zwar werden frühe myelotoxische Effekte vermindert, gleichzeitig waren jedoch Komplikationen wie GvHD oder Infektionen nicht positiv beeinflusst. Hinzu kommt ein höheres Rezidivrisiko im Verlauf [20, 22, 26].

Die Konditionierungstherapie und die allogene Stammzelltransplantation erfolgen in spezialisierten Stationen mit hohem hygienischem und pflegerischem Standard. In der Zeit vor der allogenen HSCT (Konditionierungsbehandlung), während der Transplantation und in den darauffolgenden Wochen in der Aplasie bei gleichzeitiger Immunsuppression müssen die Patienten wegen ihres geschwächten Immunsystems in Umkehrisolation behandelt werden.

#### 1.5.4 Begleitende Therapiemaßnahmen während der Stammzelltransplantation

Während einer HSCT sind verschiedenen Maßnahmen notwendig, um Komplikationen und Nebenwirkungen vorzubeugen, sie abzumildern und zu kontrollieren. Infolge der intensiven, möglicherweise myeloablativen sowie immunsuppressiven Chemotherapie und der länger anhaltenden Panzytopenie sind die Patienten in dieser Phase sehr anfällig für Infektionen. Um diesen vorzubeugen versucht man, ihre Umgebung möglichst keimarm zu halten. Auf Grund der fehlenden Immunabwehr können auch Mikroorganismen letale Infektionen verursachen, die für gesunde Menschen ungefährlich wären. Deshalb sind grundlegende Maßnahmen wie regelmäßige Händedesinfektion aller Kontaktpersonen und Umkehrisolation, sowie Infektisolierung bei Problemkeimen der Patienten von höchster Bedeutung. Alle Kontaktpersonen sollten ausreichend geimpft sein. Personen mit Infektionszeichen sollten nicht in Kontakt mit den Transplantationspatienten treten.

Während der Transplantationsphase kann es zu einer schmerzhaften Mukositis im Mundbereich sowie zu Übelkeit, Erbrechen und Fieber ohne Keimnachweis („fever of unknown origin“; FUO) kommen. Da die Chemotherapeutika bei fast allen Patienten Übelkeit und Erbrechen hervorrufen, bekommen sie schon vor Beginn der Konditionierungstherapie prophylaktisch Antiemetika [22].

#### 1.5.5 Komplikationen nach der Stammzelltransplantation

Infektionen stellen nach einer allogenen HSCT eine Hauptkomplikation dar. In der frühen Phase nach Transplantation von hämatopoetischen Blutstammzellen (v.a. Tag 0 bis Tag +30) treten hauptsächlich Infektionen durch Gram-negative und Gram-positive Bakterien, sowie Aspergillus species und Candida species auf. Risikofaktoren sind hier insbesondere die Neutropenie, die Unterbrechung der natürlichen Hautbarriere durch Bestrahlung und/oder Mukositis, sowie die fehlerhafte zelluläre und humorale Immunabwehr durch eine unterdrückte Funktion der B- und T-Lymphozyten. Diese Faktoren rufen in dieser Phase insbesondere Bakteriämien, Pneumonien und Infektionen der oberen Atemwege hervor. In der Neutropenie werden die meisten Infektionen durch Bakterien der Darmflora verursacht. Um dem entgegen zu wirken, wird der Darm während der neutropenischen Phase mit oralen Antibiotika systematisch dekontaminiert. Auch eine antimykotische Prophylaxe wird routinemäßig in der frühen Phase eingesetzt.

In der mittleren Phase nach Transplantation (Tag +30 bis Tag +100) haben sich die neuen Blutstammzellen in der Regel angesiedelt und Neutropenie und Mukositis klingen ab. Die Immunschwäche besteht allerdings weiter. Bei vielen Patienten tritt in dieser Phase eine Graft-versus-Host-Disease (GvHD) unterschiedlichen Schweregrades auf, die mit

immunsuppressiven Medikamenten behandelt wird. Zu dieser Zeit sind die Patienten besonders durch virale und Pilzinfektionen gefährdet.

Die GvHD als immunologische Transplantatreaktion ist spezifisch für die allogene Stammzelltransplantation und tritt bei anderen Organtransplantationen nur bedingt auf. Dabei werden die T-Lymphozyten des Spenders durch den Kontakt mit den Oberflächenantigenen des Empfängers immunologisch aktiviert und es kann zu einer akuten alloreaktiven Reaktion gegen Haut, Darm oder Leber des Empfängers [22], sowie bei ausbleibender Toleranz zu einer chronischen Reaktion mit einer fibrosierenden Entzündung aller Organe führen. [27] Diese Reaktion kann sowohl akut als auch chronisch die normale Regeneration der zellulären und humoralen Immunabwehr stören. Dabei werden die T-Lymphozyten des Spenders durch den Kontakt mit dem Empfänger immunologisch aktiviert und es kommt insbesondere akut zu einer alloreaktiven Reaktion gegen Haut, Darm oder Leber des Empfängers [22].

Tritt die GvHD bis zum 100. Tag nach der Transplantation auf, spricht man historisch gesehen von einer akuten Reaktion (ca. 50% der Fälle) (aGvHD). Die chronische GvHD (cGvHD) tritt klassischerweise ab Tag 100 nach Transplantation auf und ist in ihrer Häufigkeit seltener als die akute Form. Sie betrifft häufig die Haut und die Schleimhäute, sehr selten auch die Lunge, und ähnelt in ihrem Erscheinungsbild einer chronisch fibrosierenden Entzündung, entsprechend einer Kollagenose. [5, 22]

Etwa 40% der Transplantationspatienten entwickeln eine aGvHD. Da diese Erkrankung durch immunologische Effekte bedingt ist, steigt das Risiko einer alloimmunen Reaktion mit dem Grad der HLA-Disparität: Je stärker also der HLA-Status von Spender und Empfänger differiert, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer aGvHD. Die Erkrankung manifestiert sich in erster Linie, wie bereits angemerkt, an Haut, Leber und Verdauungstrakt. Sie ist die Haupttodesursache in den ersten 100 Tagen nach der HSCT. [22]

Die aGvHD wird je nach Ausprägung der klinischen Manifestationen in verschiedene Stadien eingeteilt (Tabellen 4 und 5).

Tabelle 4: Einteilung der akuten GvHD in Abhängigkeit vom Organbefall			
Stadium	Hautbefall durch papulomakulöses Erythem	Befall der Leber (Bilirubin im Serum)	Gastrointestinal-Trakt (Diarrhoe)
+	< 25 % der Körperoberfläche	34-50 µmol/L	>500 <1000 ml
++	25-50% der Körperoberfläche	51-102 µmol/L	>1000 <1500 ml
+++	Generalisiertes Erythem	103-255 µmol/L	>1500 ml
++++	Generalisiertes Erythem mit Blasen und Schuppung	>255 µmol/L	Starke abdominelle Schmerzen mit oder ohne Ileus

modifiziert nach [22]

Tabelle 5: Einteilung der akuten GvHD in Grad I bis IV	
Grad	Organ und Stadium des Organbefalls
I	Haut + bis ++
II	Haut + bis +++ Gastrointestinaltrakt und/oder Leber + Geringe AZ-Verschlechterung
III	Haut ++ bis +++ Gastrointestinaltrakt und/oder Leber ++ bis +++ Deutliche AZ-Verschlechterung
IV	Haut ++ bis ++++ Gastrointestinaltrakt und/oder Leber ++ bis ++++ Extreme AZ-Verschlechterung

modifiziert nach [22]

Es gibt mehrere Möglichkeiten um einer aGvHD vorzubeugen. Die Aktivität der Spender-T-Zellen, die für diese Reaktion verantwortlich sind, kann medikamentös unterdrückt werden. Dazu werden vor und nach der allogenen HSCT immunsuppressive Medikamente wie z.B. Cyclosporin und Methotrexat oder Mycophenolat Mofetil (MMF) und Sirolimus eingesetzt.

Zum anderen gibt es die Möglichkeit der T-Zell Depletion, das bedeutet z.B. die „ex vivo Entfernung“ der Spender T-Zellen aus dem Stammzelltransplantat oder auch die „in vivo Entfernung“ der T-Zellen durch z.B. Medikamente (z.B. Antithymozytenglobulin; ATG).

Bei der chronischen GvHD ist die Funktion des Immunsystems durch alloreaktive T-Zellen gestört. Diese Erkrankung ähnelt in ihrem Erscheinungsbild teilweise derer einer Autoimmunkrankung wie dem Sjögren-Syndrom, der Sklerodermie oder der primären

Biliären Zirrhose. Die Hauptrisikofaktoren für eine cGvHD sind vorausgegangene aGvHD, höhergradige HLA-Disparität, höheres Patientenalter, vorausgegangene Splenektomie, positiver CMV-Status, weiblicher Spender für männlichen Empfänger und durch G-CSF mobilisierte Stammzellen aus dem peripheren Blut als Transplantat.

Der klinische Verlauf einer cGvHD variiert in der Intensität und der Art des Organbefalls sehr stark. Filipovich et al. haben 2005 im Rahmen des „NIH consensus development project on cGVHD“ neue Diagnose- und Staging-Kriterien für die cGvHD veröffentlicht, die in Tabelle 6 und 7 aufgelistet sind. Diese erweitern nicht nur, sondern lösen auch bezüglich ihrer prognostischen Wertigkeit die bisher geltende klassische Einteilung der cGvHD in „limited“ und „extensive disease“ ab. [28] So ist nach neuerer Klassifikation bei Vorliegen eines der in Tabelle 7, erste Spalte, aufgelisteten diagnostischen Zeichens die Diagnose einer cGvHD gesichert. Bei klinischen Manifestationen, die auf eine cGvHD hindeuten, (Tab. 7, zweite Spalte) sollte weitere Diagnostik, z. B. in Form einer Biopsie durchgeführt werden. Die unter „andere Merkmale“ aufgelisteten Symptome sind nicht spezifisch für eine cGvHD. [22]

Beide Formen der GvHD werden initial mit Corticosteroiden behandelt. Zu den unerwünschten Folgen und Nebenwirkungen der Steroidbehandlung gehören Infektionen, Osteoporose, Hypertension, Hyperglykämie, Hyperlipidämie und Niereninsuffizienz. [22, 29]

Tabelle 6: NIH consensus for global grading of chronic graft-versus-host disease (NIH global scoring system)			
Anzahl der befallenen Organe	Mild	Mäßig	Stark
1 Organ	Score 1	Score 2	Score 3
2 Organe	Score 1	Score 2	Score 3
3 oder mehr Organe		Score 1	Score 3
Beteiligung der Lunge		Score 1	Score 2

modifiziert nach [22]

Tabelle 7: Klinische Manifestation und Symptome der chronischen GvHD

Organ	Diagnostische Zeichen	Klinische Manifestationen, die für eine cGvHD sprechen	Andere Merkmale*	Gemeinsame Merkmale (akut und chronisch)
<b>Haut</b>	Poikilodermie, Lichen ruber -artige Veränderungen, sklerotische Veränderungen	Depigmentierung	Störungen der Schweißsekretion Hypopigmentierung, Hyperpigmentierung	Erythem, Maculopapulö-ses Exanthem, Pruritus
<b>Nägel</b>		Dystrophie, Veränderungen des Nagels		
<b>Schädel/ Haare</b>		Alopezie	Frühzeitiges Ergrauen der Haare	
<b>Mund</b>	Lichen ruber artige-Veränderungen	Mundtrockenheit		Mukositis
<b>Augen</b>		Trockene Augen, Keratokonjunktivitis sicca	Photophobie, Blepharitis	
<b>Geschlechtsorgane</b>	Lichen ruber-artige Veränderungen	Erosionen, Fissuren, Ulzera		
<b>Gastrointestinal-Trakt</b>	Ösophageales Netz, Striktur oder Stenose des Ösophagus		Exokrine Pankreasinsuffizienz	Übelkeit, Erbrechen, Anorexie, Gewichtsverlust
<b>Leber</b>				Bilirubin oder alkalische Phosphatase, ASAT oder ALAT >2mal über dem Normalwert
<b>Lunge</b>	Bronchiolitis obliterans			Bronchiolitis obliterans mit organisierter Pneumonie
<b>Muskeln, Faszien, Gelenke</b>	Fasziitis, Sklerose und dadurch sekundäre Gelenkversteifung	Myositis, Polymyositis	Ödem, Muskelkrämpfe, Arthralgie, Arthritis	
<b>Hämatopoetisches System und Immunsystem</b>			Thrombozytopenie, Eosinophilie, Lymphopenie, Hypo- oder Hypergammaglobulinämie, Autoantikörper	
<b>Andere</b>			Periphere Neuropathie, Myasthenia gravis, Ascites, Pleura- oder Perikarderguss	

\*können als Teil der Symptomatik der cGvHD angesehen werden, wenn die Diagnose bestätigt wurde modifiziert nach [22]

### 1.5.6 Immuntherapie nach allogener Stammzelltransplantation

Nach der Stammzelltransplantation kann eine Gabe von T-Lymphozyten des Spenders, die „Donor Lymphocyte Infusion“ (DLI), eine Rezidiv-vorbeugende Wirkung haben. Die Spenderlymphozyten können im Empfänger eine sogenannte Graft-versus-Leukemia-Reaktion auslösen, durch die residuelle Leukämiezellen erkannt und eliminiert werden können. [30] Die DLI ist eine Therapiemöglichkeit bei Patienten mit refraktärer oder rezidivierter Leukämie nach HCST. Eine aktive Erkrankung, sowie ein vermehrtes Auftreten von GvHD und Aplasien limitieren die günstigen Effekte der Spenderlymphozyten. Die Herausforderung in der Transplantationsbehandlung maligner Erkrankungen der Hämatopoese besteht darin, eine GvHD möglichst zu vermeiden und dennoch den positiven GvL-Effekt nicht zu schmälern oder zu verlieren. Bisher wird die DLI nicht routinemäßig als Rezidiv-Prophylaxe angewendet. [31, 32, 33]. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass DLI bei Hochrisiko-AML-Patienten, die keine GvHD hatten und keine Immunsuppression erhielten, die Remissionszeit positiv beeinflusst [34].

### 1.6 Monitoring der minimalen Resterkrankung nach allogener Stammzelltransplantation

Als minimale Resterkrankung – Minimal Residual Disease (MRD) – bezeichnet man die nach der Transplantation bzw. sonstiger Therapie gegebenenfalls im Körper verbleibenden oder wieder auftretenden Leukämiezellklone, die morphologisch nicht nachweisbar sind. Der Nachweis der Leukämie-Restzellen gelingt jedoch mit den oben erwähnten Methoden durch die Aufdeckung von spezifischen molekularen Leukämiemarkern. Ziel des laufenden MRD-Monitorings ist es, ein molekulares Rezidiv vor seiner hämatologischen Manifestation aufzuspüren und frühzeitig mögliche therapeutische Weichen zu stellen. So wird der individuelle Therapieerfolg eines jeden Patienten unabhängig von zum Zeitpunkt der Diagnosestellung verfügbaren Risikomerkmale bewertet und ständig reevaluiert. Ein zukünftiges Ziel der MRD-Überwachung ist die Entwicklung von risikoadaptierten Therapieprotokollen in Abhängigkeit von der klinischen Bedeutung der verschiedenen molekulargenetischen Veränderungen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die minimale Resterkrankung nach HSCT zu überwachen. So nutzt man für tumorspezifische DNA-Veränderungen, wie beispielsweise die *MLL-PTD* oder die *NPM1*-Mutation, die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). Die Durchflusszytometrie detektiert immunphänotypische Veränderungen auf Tumorzellen. Das vollständige Anwachsen des transplantierten Präparates wird an Hand von Chimärismusanalysen (s.u.) überprüft. Chimärismusanalysen können als Surrogatmarker für das Vorhandensein von MRD herangezogen werden. [35]

MRD-Monitoring an Hand der qRT-PCR ist ein wichtiges Instrument zur Beurteilung des Therapieeffektes, zur Kontrolle des längerfristigen Therapieerfolgs, sowie zur frühzeitigen Erkennung eines Rezidivs. Diese Methode hat eine hohe Sensitivität bei der Detektion einer geringen Anzahl von Tumorzellen. Exemplarisch ist die *NPM1*-Mutation zu erwähnen. [36]

Krönke et al. (2011, „Deutsch-Österreichische AML-Studiengruppe“) werteten das MRD-Monitoring bei transplantierten *NPM1*-positiven Patienten mit normalem Karyotyp (NK-AML) aus. Dazu wurden Knochenmarkproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten, nämlich bei Diagnosestellung, während und nach den Induktions- und Konsolidierungszyklen, sowie nach Abschluss der Therapie auf den *NPM1*-Mutationstranskriptionswert untersucht. Dabei ergab sich, dass die nach jedem Behandlungszyklus durch qRT-PCR quantifizierten Transkriptionswerte der *NPM1*-Mutation signifikant mit der Prognose des Patienten korrelierten: Höhere Werte sind mit einem höheren Rezidivrisiko, einer kürzeren Remissionsdauer und einer kürzeren Überlebensrate (overall survival) assoziiert. [36]

Chimärismusanalysen führt man durch, um das Anwachsen (Engraftment) der transplantierten Stammzellen im Knochenmark zu überprüfen. Dabei werden die jeweiligen Anteile der hämatopoetischen Spender- und Empfängerzellen bestimmt. Das Ziel der HSCT ist der komplette Chimärismus, bei dem 100% der hämatopoetischen Zellen vom Spender stammen. Wenn neben der Spenderhämatopoese auch noch Spenderzellen nachweisbar sind, spricht man von einem gemischten Chimärismus. Dieser Befund kann in manchen Fällen auf eine Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat oder die Resistenz bzw. die Wiederkehr der Leukämie hinweisen, also das Rezidiv anzeigen. In einer Studie von Bader et al., 2004, konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit einer steigenden Anzahl von Empfängerzellen eine höhere Rezidivwahrscheinlichkeit haben, als Patienten mit sinkender Anzahl von Empfängerzellen. In der Studie von Huisman et al., 2007, wurde in einem Kollektiv von 96 Patienten 43 Rezidive einer AML beobachtet. Von diesen 43 Rezidiv-Patienten hatten jedoch nur acht vor dem Rezidiv einen Anstieg des gemischten Chimärismus. Dagegen hatten Patienten mit komplettem Chimärismus ein signifikant geringeres Rezidiv- und Mortalitätsrisiko. Ein weiteres Ergebnis dieser Studie war, dass Chimärismusanalysen nur dann ein Rezidiv vorhersagen können, wenn sie mit hochsensitiven Methoden und in sehr regelmäßigen Abständen innerhalb des ersten halben Jahres nach Transplantation durchgeführt werden. [37, 38, 39]



## 2 Zielsetzung

Zyto- und molekulargenetische Aberrationen sind wichtige Faktoren, die zur Entscheidung für oder gegen die Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen beitragen. Dies gilt insbesondere für Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und intermediärem zytogenetischen und molekulargenetischem Risikoprofil nach ELN Klassifikation; hier wird die Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation in ihrer prognostischen Wertigkeit kontrovers diskutiert. Bei Patienten mit Hochrisikoprofil jedoch und rezidivierter bzw. refraktärer AML ist und bleibt die allogene Stammzelltransplantation auch weiterhin die einzig kurative Option. Nach erfolgreicher allogener Stammzelltransplantation erfolgt die regelmäßige ambulante Nachsorge der transplantierten Patienten, die u.a. die klinische Untersuchung sowie eine regelmäßige zytomorphologische Remissionskontrolle (Blut- und Knochenmarkuntersuchungen) zu definierten Zeitpunkten umfasst.

Das Vorliegen einer kompletten klinischen sowie zytomorphologischen Remission ohne Leukämie-spezifische Symptome schließt das Vorhandensein von versteckten „Restleukämiezellen“, benannt als „Minimal residual disease“ (MRD), nicht aus. Mit den bisher herkömmlichen Nachweismethoden, der Morphologie und Zytogenetik, sind okkulte Leukämiezellen nicht sicher zu identifizieren. Zur Detektion einer MRD bedarf es neuerer, sensitiverer Methoden, wie beispielsweise der Real-time PCR (RT-PCR). Nur wenige Studien mit geringer Fallzahl liegen bisher zum Nachweis und Verlauf der MRD nach allogener Stammzelltransplantation vor. Gleichzeitig ist die Wertigkeit dieser Bestimmung der MRD nach allogener Stammzelltransplantation nicht ausreichend klar beschrieben.

In dieser Arbeit wird im Rahmen einer retrospektiven Analyse die Frage untersucht, ob die Detektion einer MRD bei AML Patienten nach allogener Stammzelltransplantation mit dem Auftreten eines hämatologischen Rezidivs korreliert werden kann. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden die mittels der RT-PCR quantitativ gemessenen Transkriptionswerte verschiedener molekular- und zytogenetischer Veränderungen mit den Ergebnissen der zytomorphologischen Remissionskontrollen nach allogener Stammzelltransplantation korreliert und die Behandlungsergebnisse dargelegt. Neben dem Faktor der MRD, der an Tag +30, +100 nach allogener Stammzelltransplantation untersucht wurde, werden weitere Faktoren wie u.a. der Remissionstatus vor allogener Stammzelltransplantation, die Ergebnisse der Chimärismusanalytik, die Thrombozytenzahl, die einzelnen Kategorien der ELN Klassifikation, der *NPM1*-Status sowie die Übertragung von Spenderlymphozyten (DLI) univariat und ggf. auch multivariat hinsichtlich ihres Einflusses auf das Gesamt- und

Rezidiv-freie Überleben sowie das Auftreten eines Rezidivs nach allogener Stammzelltransplantation geprüft.

Anhand der vorgelegten Untersuchung soll somit die prognostische Relevanz eines MRD-Nachweis nach allogener Stammzelltransplantation im Kontext mit anderen bisher bekannten und gut beschriebenen prognostischen Faktoren bei Patienten mit AML in einer umfangreichen Kohorte nach allogener Stammzelltransplantation bestimmt werden. Bei prädiktiver Relevanz kann die Detektion einer MRD dazu beitragen, Patienten mit drohendem hämatologischen Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation zu identifizieren. Eine frühzeitige präemptive Behandlungsstrategie ist vorstellbar und kann zur Verbesserung der Behandlungsergebnisse für diese Patienten beitragen.

## 3 Material und Methoden

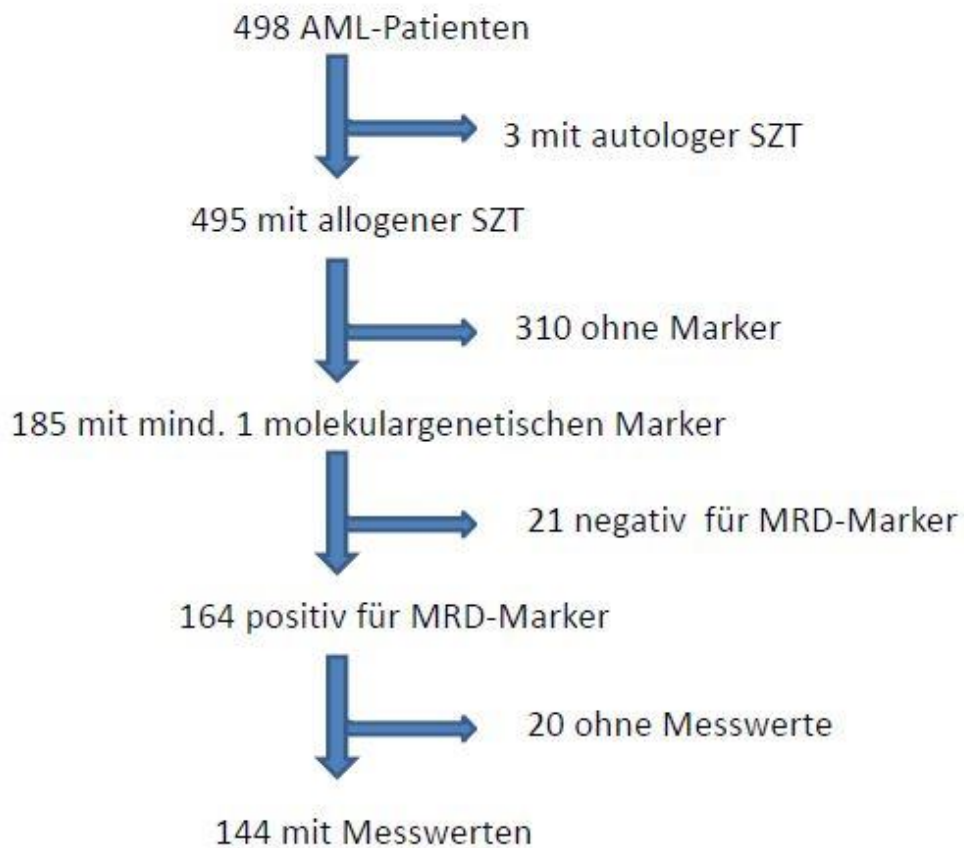
### 3.1 Patientenkollektiv

Zwischen Januar 2000 und September 2012 wurden insgesamt 498 Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie in der Knochenmark-Transplantations-Einheit der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern in München behandelt. Davon wurden für die Analysen bezüglich des Stellenwertes der Detektion der Minimalen Resterkrankung mittels quantitativer RT-PCR nach allogener Stammzelltransplantation Patienten mit den folgenden Einschlusskriterien ausgewählt:

- Diagnose einer AML
- Vorhandensein mindestens eines molekularen MRD-Markers (siehe Abschnitt 1.3)
- Mindestens eine quantitative Verlaufsprobe vor und/oder nach allogener Stammzelltransplantation

164 Patienten wurden für mindestens einen molekularen MRD-Marker positiv getestet, 144 davon hatten mindestens einen quantitativen MRD-Wert vor und/oder nach allogener Stammzelltransplantation. Eine bildliche Aufarbeitung kann dem Consort Diagram, Grafik 1, entnommen werden.

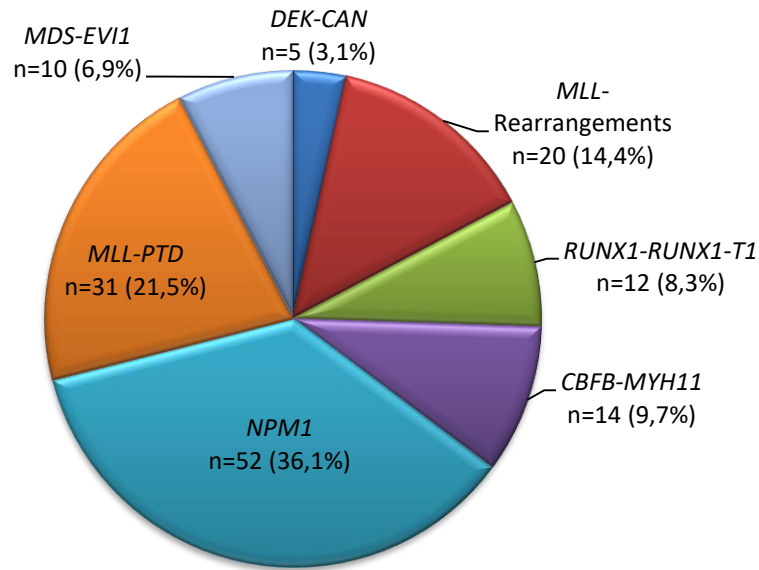
# Consort Diagram



Grafik 1: Zusammensetzung des Patientenkollektivs

AML=Akute myeloische Leukämie, SZT=Stammzelltransplantation, MRD=Minimale Resterkrankung

Von diesen 144 Patienten haben 52 (36,1%) eine *NPM1*-Mutation. Dies entspricht dem größten Anteil. Bei 31 von 144 Patienten (21,5%) konnte eine *MLL-PTD* nachgewiesen werden. Eine genaue Verteilung der MRD-Marker bei den 144 Patienten ist Grafik 2 zu entnehmen.



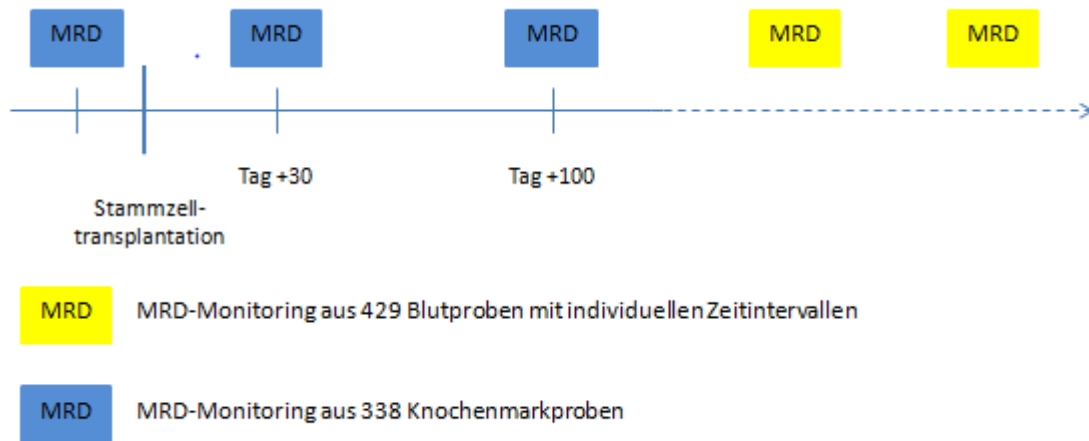
Grafik 2: Verteilung der verschiedenen MRD-Marker

Alle Patienten wurden vor der Einleitung der Therapie über die wissenschaftliche Auswertung der Daten aufgeklärt. Alle hier dargestellten Patienten stimmten schriftlich der Auswertung und der Veröffentlichung der Daten zu.

### 3.2 Datenerhebung und Zeitpunkte der MRD-Messung

Die Patientendaten entstammen Arztbriefen, Patientenakten, EDV-basierten Befunden des Instituts für klinische Chemie des Klinikums Großhadern und Befunden des rechtsmedizinischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München sowie Befunden des Labors für Leukämidagnostik.

Die minimale Resterkrankung (MRD) wurde in insgesamt 338 Knochenmarkproben vor Stammzelltransplantation, an Tag +30 und an Tag +100 nach Transplantation bestimmt. Die Untersuchungen der MRD im Verlauf wurden an Hand von insgesamt 429 Blutproben aus peripherem Blut durchgeführt.



Grafik 3: Darstellung der Zeitpunkte der MRD-Messungen

### 3.3 Labormethoden

Zwischen Januar 2000 und September 2012 wurden prospektiv und retrospektiv molekulargenetische MRD-Marker bei den Patienten bestimmt und der Transkriptionswert mittels qRT-PCR quantifiziert.

#### 3.3.1 Quantitative Real-Time-PCR

Bei der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) werden in-vitro definierte DNA-Sequenzen in einer durch DNA-Polymerase katalysierten Reaktion exponentiell vervielfältigt. Die quantitative Real Time-PCR gilt als sehr sensitive und spezifische Methode in der Erkennung von molekularen MRD-Markern. Sie ermöglicht die frühe Erkennung von genetischen Veränderungen in Rest-Leukämiezellen. [11]

Durch die quantitative Real Time- PCR (qRT-PCR) ist eine genaue Quantifizierung der PCR-Produkte während der exponentiellen Phase des Vervielfältigungsprozesses möglich. Die zu amplifizierenden Regionen der DNA werden durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Während der Vermehrung der DNA nimmt deshalb auch die Intensität der Fluoreszenzsignale zu. Diese werden während und/oder nach jedem Zyklus in Echtzeit gemessen. Die quantitativen Messungen können so in kurzer Zeit durchgeführt werden. Die fluoreszierenden Signale werden durch Sequenz-spezifische Taqman-Oligonucleotidsonden, die den Farbstoff tragen und in der Zielsequenz verankert sind, erzeugt. Durch die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs an die DNA nimmt die Intensität der Farbstoffe zu. Es besteht daher eine Korrelation der Zunahme der Ziel-DNA und der Intensität des Farbstoffs. Die Zyklus-Schwelle (cycle threshold oder crossing point), also

der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einen signifikanten Frequenzwert überschreitet, ist direkt proportional zu der Menge an spezifischer DNA-Sequenz in der Probe. [22, 35]

Es gibt drei verschiedene Kategorien von Leukämiezell-typischen molekularen Veränderungen, die an Hand einer RT-PCR amplifiziert werden können und somit für die MRD-Diagnostik eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören Regionen um die Bruchstellen von Fusionsgenen, Genüberexpressionen oder mutierte Genregionen oder Allele. Fast alle dieser Zielsequenzen sind hochspezifisch für maligne Zellklone und sind in gesunden Zellen in der Regel nicht vorhanden.

Um quantitative MRD-Werte zu erhalten, ist es unbedingt notwendig, Kontrollgene in die Analysen mit einzubeziehen, um die Quantität und Qualität der Nukleinsäuren zu korrigieren. In der PCR-Analyse der MRD sollten die Kontrollgene auf einem Chromosom lokalisiert sein, das in der untersuchten Erkrankung nicht häufig amplifiziert ist. Zu diesem Zweck wird häufig das *ABL1*-Gen auf Chromosom 4 verwendet. Die Anzahl der in der RT-PCR vervielfältigten MRD-Genomkopien werden dann auf die Anzahl der *ABL1*-Kopien normiert und als Prozentanteil an verbleibenden Leukämiezellen ausgedrückt. [22, 35]

Für die Quantifizierung der *NPM1*-Werte wurden die Analysen nach Papadaki et al., mit den Primern AAAGGTGGTTCTCTTCCCAAAGT (forward) und CTCCTCCACTGCCAGACAGA (reward) durchgeführt. Die Sensitivität der RT-PCR-Untersuchungen lag hier bei  $10^{-5}$ . Die quantitativen Bestimmungen zur Analyse der *MLL-PTD*-Mutation wurden nach Weisser et al., durchgeführt. Hierbei wurden folgende Primer verwendet: CTCCAGAGCAGAGCAAACAG (forward) und ACACAGATGGATCTGAGAGG (reward). Die Sensitivität bei diesen Analysen befand sich zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-5}$ . Weitere Primer und die zugehörigen Probesets sind in Tabelle 8 aufgelistet. [15, 40]

Für die Laboranalysen im Rahmen dieser Dissertation wurde mittels Reverser Transkriptase die messenger RNA (mRNA) aus Patientenzellen in copy-DNA umgewandelt und diese dann mittels qRT-PCR wie oben beschrieben amplifiziert. Die mRNA wurde aus Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) extrahiert. Die PBMCs wurden wiederum aus peripherem Patientenblut gewonnen.

Tabelle 8: Primer der jeweiligen MRD-Marker

Marker	Primer forward (5'→3')	Primer reverse (3'→5')	Sensitivität	Publikation
<b><i>NPM1</i></b> (Methode: RQ-PCR, Light Cycler)	AAAGGTGGTTCTCTTCCCAAAGT	CTTCCTCCACTGCCAGACAGA CTTCCGGATGACTGACCAAGAGGCTATTCA (Flourescent probe)	10 <sup>-5</sup>	Papadaki et al., British Journal of Haematology 144: 517-523, 2009
<b><i>MLL-PTD</i></b>	GTCCAGAGCAGAGCAAACAG	ACACAGATGGATCTGAGAGG	10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>-5</sup>	Weisser et al., Haematologica 90: 881-889, 2005
<b><i>DEK-CAN</i></b>	SET I: <i>DEK</i> : CCTACAGATGAAGAGTTAA SET II: <i>CAN</i> = AAGAGACCACAGAGTCG <i>DEK</i> = GGCCAGTGCTAACTTGG	SET I: <i>CAN</i> : CTGAAAACA ACTTACTTGA <i>CAN</i> : ACCAGGTGATTCAGCCT SETII: <i>CAN</i> = GTGTCTCTCGCTCTGG	10 <sup>-3</sup>	Soekarman et al., Blood 90: 2990-7, 1992
<b><i>RUNX1-RUNX1-T1</i></b>	CACCTACCACAGAGCCATCAAA	ATCCACAGGTGAGTCTGGCATT	10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>-4</sup>	Gabert et al., EAC, Leukemia 17: 2318-2357, 2003



<b>CBFB-MYH11</b>  (Methode: RQ-PCR, Light Cycler)	GCAGGCAAGGTATATTTGAAGG	Typ A: CTCTTCTCCTCATTCTGCTC Typ B: TTGAGCATTTTGTGGTCCG Typ C: CTTCCAGAGCTTCCACGGT Typ D: TCCCTGTGACGCTCTCAACT Typ E: GGCCAGGTCTGCGTTCTCT Typ F: GGCCAGGTCTGCGTTCTCT	$10^{-5} - 10^{-6}$	Schnittger et al., Blood 102: 2746-2755, 2003
<b>KMT2A-AFF1 (MLL-AF4)</b>	MLL int: CTTCCAGGAAGTCAAGCAAGCAGG AF4 int: AGCATGGATGACGTTTCTTGCTGAG	MLL int: CCTGCTTGCTTGACTTCCTGGAAG AF4 int: CTCAGCAAGGAACGTCATCCATGCT	$10^{-5}$	Repp et al., Leukemia 9: 210-215, 1995
<b>KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6)</b>	MLL int: CTTCCAGGAAGTCAAGCAAGCAGG AF6 int: CCA ATCTTCTTTCTCCGCTGACATG	MLL int: CCTGCTTGCTTGACTTCCTGGAAG AF6 int: CATGTCAGCGGAGAAAGAAGATTGG	$10^{-5}$	Repp et al., Leukemia 9: 210-215, 1995
<b>KMT2A-MLLT3 (MLL-AF9)</b>	MLL int: CTTCCAGGAAGTCAAGCAAGCAGG AF9 int: CGTGATGTAGGGGTGAAGAAGCAG	MLL int: CCTGCTTGCTTGACTTCCTGGAAG AF9 int: CTGCTTCTTACCCCTACATCAGC	$10^{-4}$	Repp et al., Leukemia 9: 210-215, 1995
<b>KMT2A-MLLT1 (MLL-ENL)</b>	MLL int: CTTCCAGGAAGTCAAGCAAGCAGG ENL int: CGGACAAACACCATCCAGTCGTG	MLL int: CCTGCTTGCTTGACTTCCTGGAAG ENL int: CACGACTGGATGGTGTGTTGTCCG		Repp et al., Leukemia 9: 210-215, 1995
<b>KMT2A-ELL (MLL-ELL)</b>	MLL int: CTTCCAGGAAGTCAAGCAAGCAGG ELL int: TGCCCTTGGCTTCTTGAAA	MLL int: CCTGCTTGCTTGACTTCCTGGAAG ELL int: TTTCAAGGAAGCCAAGGGCA		Repp et al., Leukemia 9: 210-215, 1995
<b>KMT2A-MLLT10 (MLL-AF10)</b>	AF10 5a: AACCACTCCTAGTGAGCCCAAG	AF10 29: TTCCAAGGAAGGTGTGTGCAG AF10 19: CTGGCTGCTTCTTGTGTTTCT		Chaplin et al., Blood 86: 2073-2076, 1995

<b><i>MDS-EVI1</i></b>	CGTCGAATCAAGACCTGCTTCAGAT	GACTGTAAGAGCTCACTGGCCTCA	10 <sup>-5</sup>	Weisser et al., Leukemia and Lymphoma 47(12): 2645 – 2647, 2006
<b><i>BCR-ABL1</i></b>	A2N: CCCAACCTTTTCGTTGCACTGT Na4: CGGCTCTCGGAGGAGACGTAGA	A2N: ACAGTGCAACGAAAAGGTTGGG Na4: TCTACGTCTCCTCCGAGAGCCG		

### 3.3.2 Chimärismusanalysen

Als Gesamtchimärismusanalysen werden die Untersuchungen bezeichnet, die in den unsortierten Zellen des hämatopoetischen Systems durchgeführt werden. T-Zell-Chimärismuswerte wurden im Rahmen dieser Dissertation an Hand der CD3-positiven T-Zellen bestimmt. Bei gegengeschlechtlicher Empfänger-Spender-Konstellation wurde der Chimärismus mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der X- und Y-Chromosomen im Labor für Leukämiediagnostik im Klinikum Großhadern durchgeführt. Wenn Spender und Empfänger gleichgeschlechtlich waren, wurden die Chimärismuswerte mittels Short-Tandem-Repeat-PCR (STR-PCR) im Institut für Rechtsmedizin der LMU München bestimmt. In den dieser Dissertation zu Grunde liegenden Datensätzen wurden die Chimärismusanalysen per Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) der geschlechtsspezifischen X- und Y-Chromosomen sowohl in T-Zellen, als auch in allen anderen myeloischen Zellen durchgeführt. Voraussetzung für diese Untersuchung ist allerdings eine gegengeschlechtliche Stammzelltransplantation. Das heißt, Spender und Empfänger dürfen nicht dasselbe Geschlecht haben, denn die FISH erkennt nur für die einzelnen Geschlechtschromosomen spezifische Gen-Loci und kann daher zwei gleichgeschlechtliche Chromosomen nicht voneinander unterscheiden. Um das korrekte Anwachsen des Transplantates nach gleichgeschlechtlicher Transplantation zu überprüfen, müssen die hämatopoetischen Zellen an Hand des genetischen Fingerabdrucks untersucht werden. Diese Analysen werden durch Bestimmung der für jedes Individuum spezifischen Mikrosatelliten in der DNA, die sogenannten Short Tandem Repeats (STR), durchgeführt. Vor der Transplantation werden eine Vielzahl von STR-Loci von Spender und Empfänger analysiert, um Stücke in der DNA zu identifizieren, die die beiden Individuen voneinander unterscheiden. Zur Überprüfung des korrekten Anwachsens des Transplantates werden diese STR-Loci zunächst durch die Polymerasekettenreaktion amplifiziert und die Produkte dann durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Der Anteil der Spender- und Empfänger-Produkte werden gezählt und ihr jeweiliger Prozentanteil bestimmt. Diese Analysen werden ebenfalls in den T-Zellen und in allen anderen myeloischen Zellen durchgeführt. [33]

### 3.3.3 Schwellenwerte zur Interpretation der MRD-Werte der verschiedenen RT-PCRs

Für die statistischen Tests wurden *NPM1*-Werte als positiv gewertet, wenn sie  $>0,00001$  waren und negativ, wenn die Werte  $\leq 0,00001$  lagen. [40]

Patienten mit einer *MLL-PTD* zählten als positiv für diese Mutation, wenn der quantitative *MLL-PTD*-Wert  $>0,07$  war und als negativ, wenn der Wert  $\leq 0,07$  betrug. [15]

Patienten mit einer *MDS-EVI1*-Mutation galten als positiv für diesen Marker, wenn der quantitative Wert >10 war und als negativ, wenn dieser ≤10 lag. [41]

Für die anderen MRD-Marker wie *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *DEK-CAN* und *MLL*-Rearrangements ist der Schwellenwert abhängig vom jeweiligen PCR Assay. [42, 43, 44]

Tabelle 9: Schwellenwerte der einzelnen MRD-Marker		
MRD-Marker	Positiv	Negativ
<i>NPM1</i>	>0,00001	≤0,00001
<i>MLL-PTD</i>	>0,07	≤0,07
<i>MDS-EVI1</i>	>10	≤10
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	>0,1	≤0,1
<i>DEK-CAN</i>	abhängig vom PCR Assay	abhängig vom PCR Assay
<i>CBFB-MYH11</i>	>0,1	≤0,1
<i>MLL-Rearrangements</i>	>0,1	≤0,1

### 3.4 Statistische Tests und klinische Endpunkte

#### 3.4.1 Überlebenszeitanalysen

Der Einfluss der einzelnen Faktoren auf die drei Endpunkte Gesamtüberleben, Rezidiv-freies Überleben und Auftreten eines Rezidivs wurde mit der univariaten und multivariaten Cox-Regression sowie dem Log-Rank-Test untersucht und an Hand von Kaplan-Meier-Kurven für einige Variablen graphisch dargestellt.

Mit Hilfe des Cox-Modells wurde der Therapieeffekt der allogenen Stammzelltransplantation auf die Überlebenszeit, unter Einfluss verschiedener anderer Faktoren, geschätzt. So konnte also unter Berücksichtigung der verschiedenen Einflussfaktoren das unmittelbare Risiko (Hazard Ratio) einer Person geschätzt werden, an einem Rezidiv der AML zu erkranken oder sogar zu sterben. Diese Ratio ließ darauf schließen, um wie viel höher das Risiko der einen Gruppe im Vergleich zur anderen Gruppe war, dass ein Ereignis eintritt. Damit wurden Gesamtüberlebenszeiten bzw. Rezidiv-freie-Überlebenszeiten zwischen zwei verschiedenen Gruppen deskriptiv

miteinander verglichen. Die Größe des Einflusses einer bestimmten Variablen hinsichtlich der Endpunkte, konnte so geschätzt werden. [45, 46]

Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode wurde die Wahrscheinlichkeit graphisch dargestellt, mit der ein Patient bis zu einem bestimmten Zeitpunkt überlebt. An Hand der Kaplan-Meier-Kurve können spezifische Überlebensraten oder Überlebenszeiten abgelesen werden. Der Log-Rank-Test ist eine nicht-parametrische Methode um Überlebenszeitanalysen verschiedener Gruppen miteinander zu vergleichen. Dieser Test wurde im Rahmen dieser Arbeit zur statistischen Überprüfung von Unterschieden bezüglich des Mortalitätsrisikos zweier oder mehrerer verschiedener Gruppen angewendet. [47, 48]

Die klinischen Endpunkte dieser Untersuchungen waren das Gesamtüberleben (overall survival = OS), das Rezidiv-freie Überleben (relapse free survival = RFS) und das Auftreten eines Rezidivs (Rezidiv ja/nein). Diese Überlebenszeitanalysen wurden mit uni- und multivariaten Cox-Modellen und dem Log-Rank-Test durchgeführt.

Für Baseline-Faktoren wie zum Beispiel das Alter oder das Geschlecht des Patienten, beginnt die Zeitvariable am Tag nach der Transplantation. Für alle peritherapeutischen Faktoren beginnt die Berechnung der Zeitvariablen zum Zeitpunkt deren Messung, z.B. Bestimmung der Thrombozyten im Blut.

#### 3.4.2 Berechnung der kumulativen Rezidivinzidenz

Die Berechnungen zur Analyse der kumulativen Rezidivinzidenz (CIR) waren komplizierter und umfassender als alle vorhergehenden Analysen und konnten nicht an Hand vom Cox-Modell oder dem Log-Rank-Test bzw. der Kaplan-Meier-Kurven durchgeführt werden. Grund hierfür ist das Auftreten zweier miteinander konkurrierender Ereignisse: Tod und Rezidiv. Als Zeitspanne für die CIR-Berechnung galt die Zeit ab Tag +100 nach Transplantation bis zum Eintreten eines Rezidivs. Bei Patienten ohne Rezidiv gilt als Endpunkt der Zeitspanne das Datum des letzten Kontakts. Für die Baseline-Faktoren, wie Alter oder Geschlecht, wurde die Zeitspanne ab Tag eins nach Transplantation verwendet. Die Berechnung zur kumulativen Rezidivinzidenz erfolgte mittels des Fine-and-Gray-Tests. Der Test analysiert einen Parameter hinsichtlich eines Ereignisses. Das andere Ereignis stellt das zum ersten Ereignis konkurrierende Risiko dar (z. Bsp. Tod versus Rezidiv). Die Kumulative Rezidivinzidenz ist die kumulative Wahrscheinlichkeit, mit der ein bestimmtes Ereignis (hier Tod oder Rezidiv) innerhalb einer gewissen Zeitspanne auftritt. Wenn ein Patient ohne vorausgegangenes Rezidiv stirbt, zählt der Tod als konkurrierendes Ereignis. [49]

### 3.4.3 Statistische Auswertungen im weiteren Krankheitsverlauf

Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt der Studie war die Betrachtung des MRD-Status während der Untersuchungen im weiteren Krankheitsverlauf. An Hand des Mantel-Byar- und des Simon-Makuch-Tests sollte überprüft werden, ob ein Wechsel vom negativen zum positiven MRD-Status während des Follow-ups ein Anzeichen für ein später auftretendes Rezidiv sein könnte.

Alle bisher beschriebenen statistischen Tests wurden mit IBM SPSS Statistics 20, Windows Software Package (IBM, Armonk, NY, USA), SAS (Statistical Analysis System), Version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) oder R (R Foundation for Statistical Computing), Version 3.0.3.3 (Institut für Statistik und Mathematik, Wirtschaftsuniversität Wien, Österreich) durchgeführt.

### 3.4.4 Endpunkt Gesamtüberleben

Zur Berechnung dieses Endpunktes wurde die Zeit zwischen dem Tag der Stammzelltransplantation und dem Todeszeitpunkt verwendet. Wenn der Tod bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht eingetreten war, wurde der letzte verzeichnete Patientenkontakt als Endpunkt der Zeitspanne verwendet. Als Ereignis wurde hier der Tod definiert. Für die peritherapeutischen Faktoren startete die Zeitvariable am Zeitpunkt +30 oder +100 Tage nach Stammzelltransplantation. Für die Analyse dieses Endpunktes, wurde das Modell der Cox-Regression, der statistischen Test nach Kaplan-Meier und der Log-Rank-Test verwendet.

### 3.4.5 Endpunkt Rezidiv-freies Überleben

Hier wurde die Zeitspanne zwischen dem Tag der Transplantation und dem Datum des Auftretens eines Rezidivs gewählt. Wenn der Patient nicht an einem Rezidiv erkrankte, wurde die Zeitspanne bis auf das Datum des Todes ausgedehnt. Bei Nichteintreten des Todes galt das Datum des letzten Patientenkontaktes als Endpunkt der Zeitspanne. Hier wurden entweder Rezidiv oder Tod als Ereignis definiert. Auch bei der Berechnung dieses Endpunktes begann das Zeitintervall einiger peritherapeutischer Faktoren an Tag +30 oder +100 nach Stammzelltransplantation. Diese Analysen wurden ebenfalls mit dem Modell der Cox-Regression, dem statistischen Test nach Kaplan-Meier und dem Log-Rank-Test durchgeführt.

#### 3.4.6 Endpunkt Rezidiv

Für die Berechnung dieses Endpunktes galt die Zeitspanne des Rezidiv-freien Überlebens, also die Zeit zwischen dem Tag der Stammzelltransplantation und dem Datum des Auftretens eines Rezidivs. Hier galt ebenfalls bei Nichteintreten des Ereignisses der letzte verzeichnete Patientenkontakt als Ende der Zeitspanne. Als Ereignis wurde hier das Auftreten eines Rezidivs definiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientencharakteristik

Das mediane Alter der Kohorte betrug 48 Jahre (18-73) und es waren 63 Männer (43,75%) und 81 Frauen (56,25%) vertreten.

111 Patienten wurden auf eine *NPM1*-Mutation untersucht, davon waren 52 (46,8%) *NPM1*-positiv. Am häufigsten war der Mutationstyp *A* mit 92,3% (48 aus 52). Außerdem konnte Typ *D* in 3 von 52 Fällen (5,8%) und Typ *AH* in 1 von 52 Fällen (1,9%) nachgewiesen werden. Bei 125 der Patienten wurden Analysen zum Nachweis einer *FLT3-LM* durchgeführt, die in 43 Fällen (34,4%) positiv ausfielen. Eine *FLT3-TKD* konnte in 13 (11,8%) aus 110 analysierten Patienten nachgewiesen werden. 120 Patienten untersuchte man auf eine *MLL-PTD*, die man in 31 (25,8%) Fällen nachweisen konnte. Die Translokation *RUNX1-RUNX1T1* untersuchte man bei 26 Patienten, davon wurde bei 12 (46,2%) diese Mutation nachgewiesen. Die *CBFB-MYH11* Mutation analysierte man bei 47 Patienten, von denen 14 (29,8%) für diese Mutation positiv waren. Ein *DEK-CAN*-Fusionstranskript konnte in 5 von 5 analysierten Patienten nachgewiesen werden. Eine *EVI1*-Mutation konnte bei 11 Patienten nachgewiesen werden (7,6%). 20 von 144 Patienten wurden auf ein *MLL*-Rearrangement untersucht. Bei 11 von diesen 20 Patienten konnte eine *MLL-AF9* Mutation nachgewiesen werden (55%).

Bei 140 Patienten wurde der Karyotyp analysiert, davon wiesen 72 Patienten (50%) einen normalen Karyotyp auf. Bei den übrigen 72 Patienten konnten verschiedene Aberrationen nachgewiesen werden. Eine genauere Auflistung der Veränderung des Karyotyps kann dem Anhang Nr. 1 entnommen werden.

135 Patienten ließen sich an Hand ihres Karyotyps und der molekulargenetischen Veränderungen nach der Risikostratifizierung des European Leukemia Network (ELN) von 2010 in die verschiedenen Risikogruppen einteilen (vgl. Kapitel 1.5.1). 34 Patienten (23,6%) fallen in die Kategorie „Favorable“, 45 (31,3%) werden der Kategorie „Intermediate-I“ und 28 (19,4%) der Kategorie „Intermediate-II“ zugeteilt. In die Gruppe mit der schlechtesten Prognose „Adverse“ fallen 28 Patienten (19,4%).

Den Patienten wurde anhand des „Hematopoietic cell transplantation -specific comorbidity index“ (HCT-CI) (Sorrer et al., 2005) ein Risiko-Score zugeteilt, der das 2-Jahres-Überleben und die Wahrscheinlichkeit für einen Rezidiv-unabhängigen Tod, also einen Tod bedingt durch verschiedene andere Erkrankungen, bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation beurteilen soll. Zur Einteilung werden unterschiedliche mortalitätsrelevante Komorbiditäten, wie zum Beispiel das Vorliegen einer chronisch



entzündlichen Darmerkrankung, kardiovaskuläre Erkrankungen oder verschiedene Organdysfunktionen nach Schweregrad mit Punkten bewertet. Das Risiko für einen Rezidiv-unabhängigen Tod steigt mit zunehmender Punktezahl an. Insgesamt können maximal 29 Punkte erreicht werden. Bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv wurden 135 Patienten nach dem HCT-CI bewertet. Nur in 2 Fällen betrug der Score 0 Punkte (1,5%), in 32 Fällen 1-2 Punkte (23,7%) und bei 101 Patienten (74,8%) wurde ein Score  $\geq$  3 Punkte erhoben. Näheres zur genauen Punktebewertung der mortalitätsrelevanten Komorbiditäten und zur Errechnung des Scores wird im anhängenden Erhebungsbogen des HCT-CI bzw. Sorrow-Score dargestellt (siehe Anhang Nr. 2). [50]

Der Karnofsky-Index ist eine Bewertungsskala anhand derer Patienten mit Krebserkrankungen eingeteilt werden können. Dieser Index konnte bei 112 Patienten erhoben werden. 98 Patienten wurden nach dem Karnofsky-Index als „good“ eingestuft, 14 als „poor“. Bewertet wird die Aktivität und Selbstversorgung des Patienten im Alltag im Hinblick auf seine Erkrankung. Der Index dient dazu, die Prognose des jeweiligen Patienten einzuschätzen. [51, 52]

Ein wichtiger Parameter, der voraussichtlich Einfluss auf den Ausgang der Erkrankung hat, ist das Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Transplantation. 49 (34%) der 144 transplantierten Patienten erhielten ihre erste Stammzelltransplantation in Remission. Die übrigen 95 Patienten (66%) befanden sich nach klinischer und zytomorphologischer Evaluation nicht in einem Remissionstatus, sondern befanden sich zum Zeitpunkt der Transplantation in einem refraktären Krankheitsstatus oder hatten ein Rezidiv.

43 (29,9%) der 144 transplantierten Patienten bekamen im Laufe des beobachteten Zeitraums ein Rezidiv und 61 Patienten (43%) starben.

Das Vorliegen eines HLA-kompatiblen Spenders ist ebenso bedeutend für ein erfolgreiches Gelingen der Transplantation. 106 (73,6%) der 144 betrachteten Patienten erhielten Stammzellen von einem HLA-identischen Spender. HLA-identisch bedeutet, dass alle 10 untersuchten HLA-Antigene bei Spender und Empfänger kompatibel sind. Bei 38 (26,4%) Patienten war der HLA-Status verschieden.

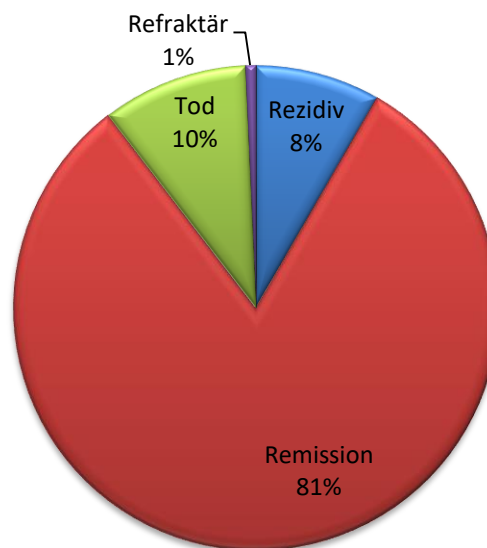
60 Patienten erhielten die Stammzellen von einem verwandten, 84 Patienten von einem nicht verwandten Spender.

Das Immunsystem des Empfängers muss auf die Gabe der fremden Stammzellen vorbereitet werden, um eine Abwehrreaktion zu vermeiden. In der hier begutachteten Patientenkohorte erhielten 142 Patienten (98,6%) eine Konditionierungstherapie mit reduzierter Intensität. Die Therapieschemata basierten zumeist auf der Gabe von

Fludarabin oder Clofarabin. Nur zwei Patienten erhielten eine myeloablative Konditionierungstherapie (1,4%).

Zur Prophylaxe einer GvHD-Reaktion erhielten 105 (72,9%) der Patienten eine Kombination aus Cyclosporin A (CsA) und Mycophenolat Mofetil (MMF). In 20 Fällen (13,9%) wurde CsA und Methotrexat (MTX) verabreicht. 12 Patienten (8,3%) bekamen eine Kombination aus MMF und Tacrolimus und in 5 Fällen (3,5%) wurde Sirolimus mit MMF kombiniert.

An Tag +100 nach der Transplantation befanden sich 117 Patienten (81%) in Remission und 12 (8%) hatten ein Rezidiv. Bei einem Patienten (1%) war die Krankheit weder wesentlich fortgeschritten noch deutlich zurückgegangen. 14 Patienten (10%) waren an Tag +100 nach Transplantation bereits verstorben (siehe Grafik 4).



Grafik 4: Verteilung des Krankheitsstatus an Tag 100 nach Stammzelltransplantation

Weitere detailliert aufgeführte Charakteristika des Patientenkollektivs können Anhang Nr. 1 entnommen werden.

#### 4.2 Überlebenszeitanalysen

Alle Ergebnisse der uni- und multivariaten Cox-Analysen sind in Tabelle 9 und 10 aufgeführt.

#### 4.2.1 Einflüsse von Baseline-Parametern auf das OS, RFS, das Auftreten eines Rezidivs und die CIR

Als Baseline-Parameter werden Faktoren bezeichnet, die vor der Transplantation erhoben wurden. Es gibt patientenspezifische und krankheitsspezifische Baseline-Faktoren. Jeder einzelne dieser Faktoren wurde hinsichtlich des Gesamtüberlebens, des Rezidiv-freien Überlebens und des Auftretens eines Rezidivs untersucht.

Im Folgenden werden die einzelnen Baseline-Faktoren aufgelistet und kurz näher beschrieben:

##### 4.2.1.1 Alter und Geschlecht des Patienten

Die univariaten Cox-Analysen für das Geschlecht des Patienten ergaben keine statistisch signifikanten Ergebnisse im Hinblick auf das Gesamtüberleben oder das Rezidiv-freie Überleben. Auch hinsichtlich des Eintretens eines Rezidivs konnten keine Zusammenhänge zwischen dem Geschlecht und einem Krankheitsrückfall festgestellt werden.

Bezüglich des Patientenalters wurden zwei verschiedene univariate Cox-Analysen durchgeführt. Zum einen wurde das Patientenalter in Dekaden als stetige Variable verwendet, zum anderen wurde ein Schwellenwert bei 60 Jahren ausgewählt und damit eine zweite Alters-Analyse mit einer binären Variable durchgeführt. Beide Rechnungen ergaben hinsichtlich des Alters keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Das bedeutet, dass die Überlebenschancen, die Länge des Rezidiv-freien Überlebens und das Auftreten eines Rezidivs nach allogener Stammzelltransplantation unabhängig vom Alter sind. Jüngere Patienten haben gegenüber Älteren keine Überlebenvorteile in dieser Auswertung.

##### 4.2.1.2 Molekulargenetische Prognosefaktoren

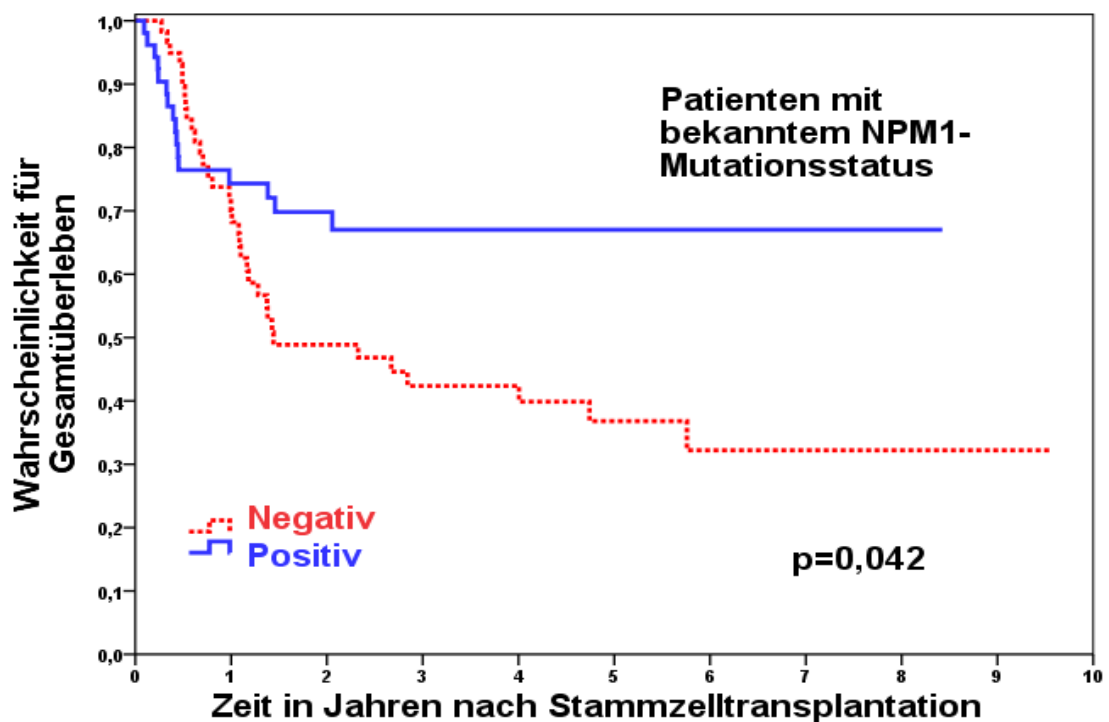
Jeder Patient wurde auf verschiedene molekulargenetische Marker hin untersucht. Zu den prognostisch relevanten molekularen Markern gehört der qualitative Nachweis einer *NPM1*-Mutation, einer *MLL-PTD*-, einer *FLT3-ITD*-, einer *FLT3-TKD*-, einer *CEBPA*- oder einer *c-kit*-Mutation.

Bei den univariaten Cox-Analysen ergab sich für vier dieser fünf Mutationen für keinen der drei Endpunkte ein statistisch signifikantes Ergebnis.

In der univariaten Analyse im Cox-Modell zeigte der Status der *NPM1*-Mutation eine deutliche Assoziation mit dem Auftreten eines Rezidives ( $p=0,019$ ). Auch bezüglich des Gesamtüberlebens und des Rezidiv-freien Überlebens war die univariate Cox-Analyse

hinsichtlich der *NPM1*-Mutation signifikant (OS:  $p=0,045$ ; RFS:  $p=0,01$ ). Patienten mit einer Mutation im *NPM1*-Gen zeigten ein vermindertes Risiko, ein Rezidiv zu bekommen ( $HR=0,4$ ) oder zu sterben ( $HR=0,54$ ). Patienten mit einer *NPM1*-Mutation hatten demnach insgesamt eine bessere Prognose. Dieser Effekt wurde in der multivariaten Analyse unter Einbeziehung verschiedener Cofaktoren (MRD-Status an Tag 100, Cut off der Thrombozyten Werte von Tag +100, HLA-Status, Krankheitsstatus bei Transplantation, *NPM1*-Mutationsstatus und der ELN-Klassifikation) nicht bestätigt (siehe Tab. 10 und 11). In weiteren Untersuchungen wurden die in der Cox-Analyse statistisch signifikanten Variablen an Hand von Kaplan-Meier-Kurven graphisch dargestellt und die dabei ermittelten Überlebenszeiten durch den Log-Rank-Test miteinander verglichen.

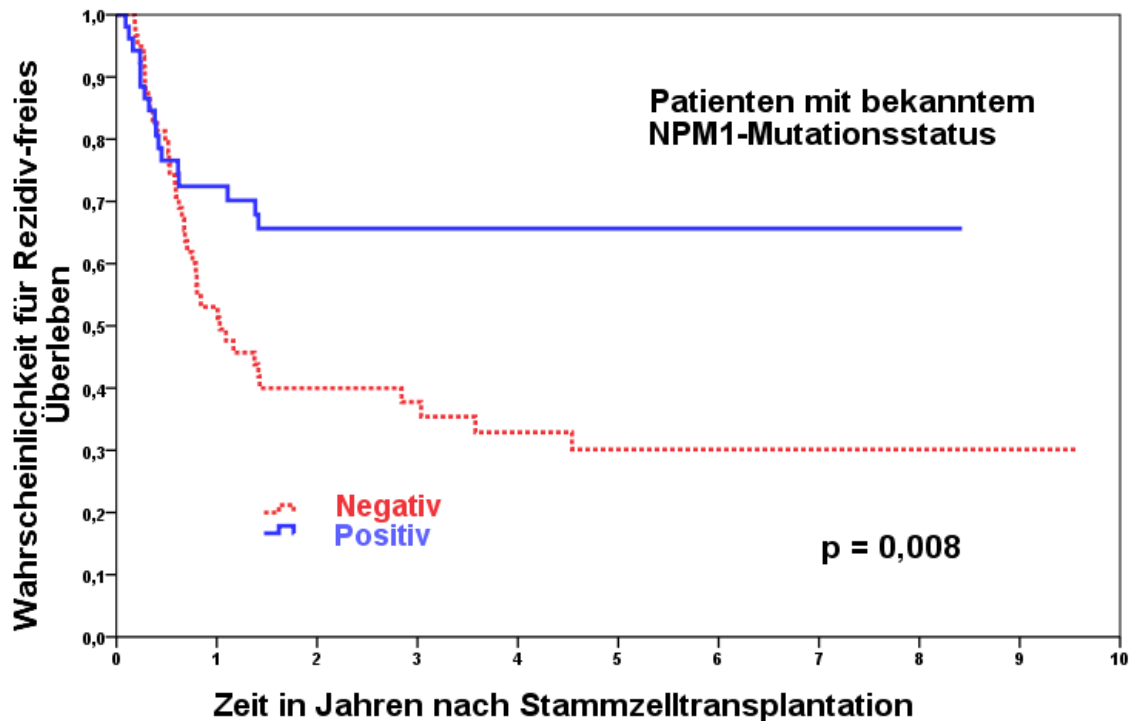
Hinsichtlich des *NPM1*-Mutations-Status zeigten die Überlebenskurven für *NPM1*-positive Patienten eine 2-Jahres Gesamtüberlebensrate von 70% (Konfidenzintervall (KI): 58-83%) gegenüber nur 48% für *NPM1*-negative Patienten (KI: 37-63%) (siehe Grafik 5).



Grafik 5: Gesamtüberleben für Patienten mit bekanntem *NPM1*-Mutationsstatus

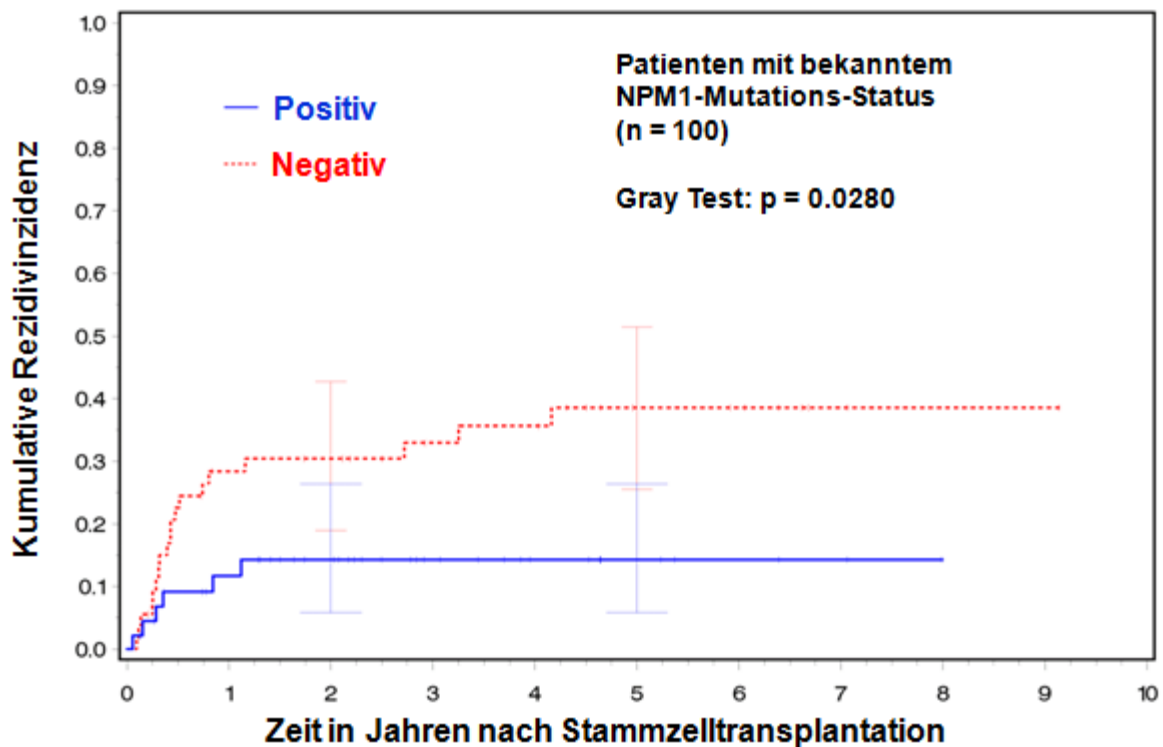
Von 52 *NPM1*-positiven Patienten sterben im Beobachtungszeitraum dieser Studie 16 Patienten, von 59 *NPM1*-Negativen sterben hingegen 34. Der *NPM1*-Mutationsstatus wurde ebenfalls bezüglich der Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv-freies Überleben untersucht. Die Untersuchungen ergaben ein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p=0,008$ ). Hier ergaben die Analysen, dass nach zwei Jahren bei 66% der *NPM1*-positiven Patienten noch kein Tod oder Rezidiv aufgetreten ist (KI: 56%-81%). Bei den *NPM1*-Negativen liegt

diese Rate nach zwei Jahren bei nur 40% (KI: 31%-57%). 38 der 59 Patienten ohne *NPM1*-Mutation haben nach Ende der Beobachtungszeit ein Ereignis (Tod oder Rezidiv) erfahren. Bei den Patienten mit *NPM1*-Mutation sind es 17 von 52 (siehe Grafik 6).



Grafik 6: Rezidiv-freies Überleben für Patienten mit bekanntem *NPM1*-Mutationsstatus

Es wurde die kumulative Rezidivinzidenz (CIR) für den *NPM1*-Mutations-Status graphisch dargestellt. Diese Analysen ergaben für die *NPM1*-positiven Patienten nach einem Jahr eine 14%-ige Rezidivinzidenz (KI: 6%-26%) gegenüber einer 30%-igen für die *NPM1*-negativen Patienten (KI: 19%-43%). In diesem Fall konnte der Gray-Test angewendet werden und ergab bezüglich der kumulativen Rezidivinzidenz einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p=0,028$ ). Die Fallzahl bei dieser Analyse betrug  $n=100$ . Diese Analyseergebnisse sind in Grafik 7 dargestellt.



Grafik 7: Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs bei Patienten mit positivem bzw. negativem *NPM1*-Mutationsstatus

Hinsichtlich des *MLL-PTD*-Mutationsstatus vor der Transplantation ergaben die Analysen in der univariaten Cox-Regression für keinen der drei vorgeschriebenen Endpunkte ein signifikantes Ergebnis. Das bedeutet, dass allein der *MLL-PTD*-Status keinen Hinweis auf das Auftreten eines Rezidivs gibt. Das Gesamtüberleben oder das Rezidiv-freie Überleben werden durch eine *MLL-PTD* nicht beeinflusst.

#### 4.2.1.3 MRD-Status vor allogener Stammzelltransplantation

Es wurde die MRD-Last als quantitativer Marker bestimmt. Nähere Informationen zum Schwellenwert der einzelnen MRD-Werte sind Tabelle 9 zu entnehmen. Für die MRD-Marker wurden uni- und teilweise auch multivariate Cox-Analysen durchgeführt, die im Folgenden beschrieben werden. Für die Endpunkte Gesamtüberleben und Rezidiv-freies Überleben ergaben sich hinsichtlich des MRD-Status vor Transplantation keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Patienten mit positivem MRD-Status vor Transplantation hatten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs als Patienten, die vor der Transplantation einen negativen MRD-Status hatten (HR=9,0; p=0,03) (siehe Tabelle 10).

#### 4.2.1.4 Sorrer-Score / Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index

Durch diesen Score werden das 2-Jahres-Überleben und die therapieassoziierte Mortalität in Zusammenschau mit etwaigen Komorbiditäten eines Patienten bewertet. Detailliertere Informationen sind in Kapitel 4.1 dargestellt.

Zum Sorrer-Score wurde eine univariate Cox-Analyse durchgeführt. Die Patientengruppe wurde in drei Untergruppen codiert: Patienten mit einem Score von 0, von 2 und von  $\geq 3$  bildeten jeweils eine Gruppe. Diese Analyse ergab keine statistisch signifikanten Ergebnisse hinsichtlich der drei Endpunkte. Die Fallzahl betrug hier  $n=135$ .

#### 4.2.1.5 Karyotyp

Bei jedem Patienten wurde bei Erstdiagnose der AML eine Chromosomenanalyse durchgeführt und der Karyotyp untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Karyotyp hinsichtlich der Endpunkte Gesamtüberleben, Rezidiv-freies Überleben und des Auftretens eines Rezidivs untersucht. Keine der Analysen ergab ein statistisch signifikantes Ergebnis. Die Patienten mit normalem Karyotyp wurden mit denjenigen, die eine Veränderung des Karyotyps aufwiesen, verglichen.

#### 4.2.1.6 Karnofsky-Index

Die Kriterien, die zur Bewertung nach dem Karnofsky-Index berücksichtigt werden, wurden im Kapitel 4.1 näher erläutert. Diese Variable wurde in eine Gruppe mit guter Prognose (Karnofsky-Index  $>50\%$ ) und eine Gruppe mit schlechter Prognose (Karnofsky Index  $<50\%$ ) eingeteilt. Die Fallzahl bei diesen Analysen betrug  $n=111$ .

Die univariate Cox-Analyse anhand der oben beschriebenen binären Variable erbrachte für keinen der drei Endpunkte ein statistisch signifikantes Ergebnis.

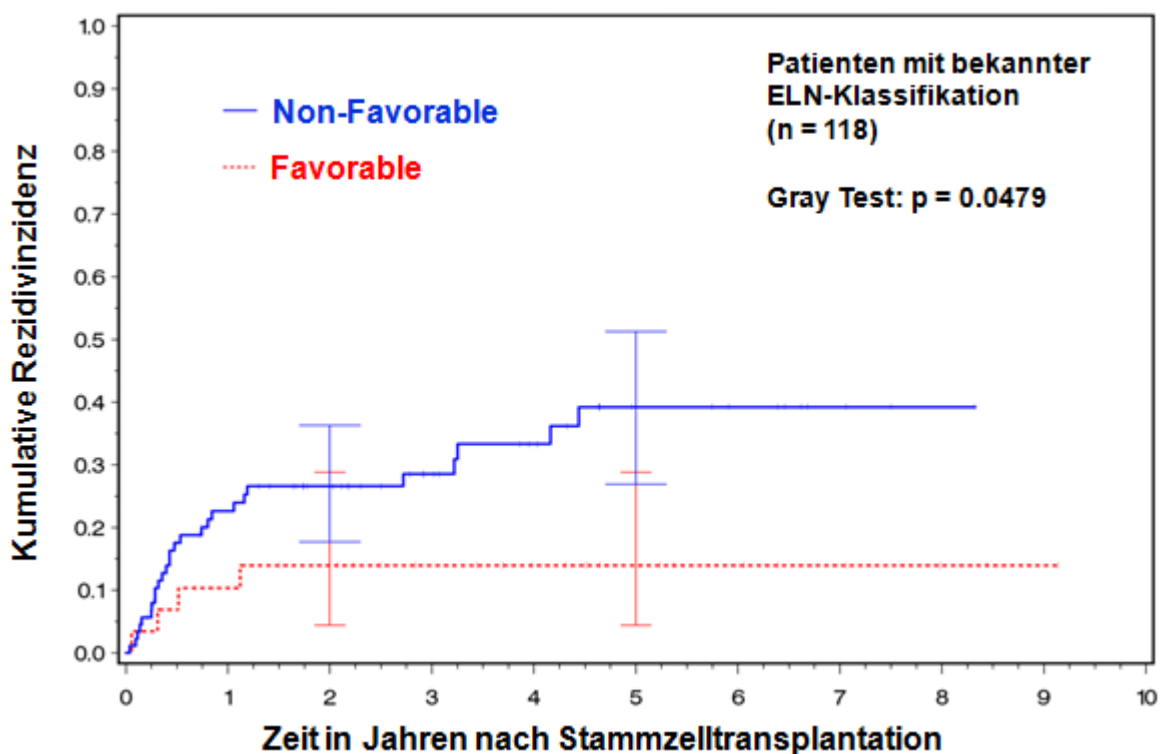
#### 4.2.1.7 ELN-Klassifikation

Das Patientenkollektiv wurde anhand der ELN-Klassifikation von 2010 nach Risikoprofil eingeteilt. Die gesamte Patientenkohorte wurde nach diesem System in vier Gruppen unterteilt: Favorable, Intermediate-I, Intermediate-II und Adverse. Die Studienpopulation wurde in zwei Gruppen unterteilt. In der einen Gruppe wurden die Patienten zusammengefasst, deren Risikoprofil nach dem ELN als „favorable“ eingestuft wird. Die andere Gruppe beinhaltete die Patienten, deren Profil nach dem ELN als „Intermediate-I“, „Intermediate-II“ oder „Adverse“ eingestuft wurde. Ausführliche Informationen zur ELN-Klassifikation sind in Kapitel 1.5.1 beschrieben.

Hinsichtlich des Auftretens eines Rezidivs zeigte die univariate Cox-Analyse ein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p=0,049$ ). Die Fallzahl bei diesen Berechnungen betrug  $n=135$ . Das

Auftreten eines Rezidivs ist für Patienten mit erhöhtem Risikoprofil (Gruppen Intermediate-I, Intermediate-II und Adverse) 2,4-mal wahrscheinlicher als für Patienten in der favorable-Risk-Gruppe (HR=2,395). Bezüglich der Endpunkte OS und RFS ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Es wurde auch die kumulative Rezidivinzidenz hinsichtlich der Einteilung nach dem European Leukemia Network analysiert. Hierbei wurden Patienten mit prognostisch günstigen und prognostisch ungünstigen Kriterien im Hinblick auf das Erlangen eines Rezidivs miteinander verglichen. Diese Analyse war bei 118 Patienten möglich. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs betrug bei Patienten mit Kriterien, die nach der ELN als prognostisch günstig eingestuft wurden, nach zwei Jahren 14% (KI: 4%-29%). Bei Patienten, die nach dem ELN eher eine ungünstige Prognose hatten, lag die Rezidivwahrscheinlichkeit zum selben Zeitpunkt bei 26% (KI: 18%-36%). Der Gray Test war hier mit  $p=0,0479$  statistisch signifikant. Die kumulative Rezidivinzidenz in Abhängigkeit der ELN-Klassifikation ist in Grafik 8 dargestellt.



Grafik 8: Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs in Abhängigkeit von der Einteilung nach der ELN-Klassifikation



#### 4.2.1.8 Alter des Spenders in Dekaden

Die univariate Cox-Analyse des Spenderalters in Dekaden ergab für keinen der drei Endpunkte ein statistisch signifikantes Ergebnis. Bei diesen Analysen betrug die Fallzahl n=131.

#### 4.2.1.9 Geschlecht des Spenders

Die Analysen bezüglich des Geschlechtes des Spenders ergaben keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Es macht also keinen Unterschied, ob der Spender weiblich oder männlich ist. Das Gesamtüberleben, das Rezidiv-freie Überleben und das Auftreten eines Rezidivs werden dadurch nicht beeinflusst. Bei diesen Analysen betrug die Fallzahl n=141.

#### 4.2.1.10 Stammzellquelle

Bezüglich des Ursprungsorts der Stammzellen wurden zwei verschiedene univariate Cox-Analysen durchgeführt. Einmal wurden alle Stammzellquellen, also Knochenmark, peripheres Blut, Nabelschnurblut und Stammzellen aus Knochenmark und peripherem Blut in die Analysen mit einbezogen (n=144). Für die andere Analyse wurde eine binäre Variable ausgewählt, nämlich periphere Stammzellen versus Stammzellen aus dem Knochenmark (n=128).

Die beiden Cox-Analysen bezüglich der Stammzellquellen ergaben für keinen Endpunkt ein statistisch signifikantes Ergebnis. Die Herkunft der Stammzellen hatte keine Auswirkung auf die Prognose der Erkrankung in dieser Auswertung.

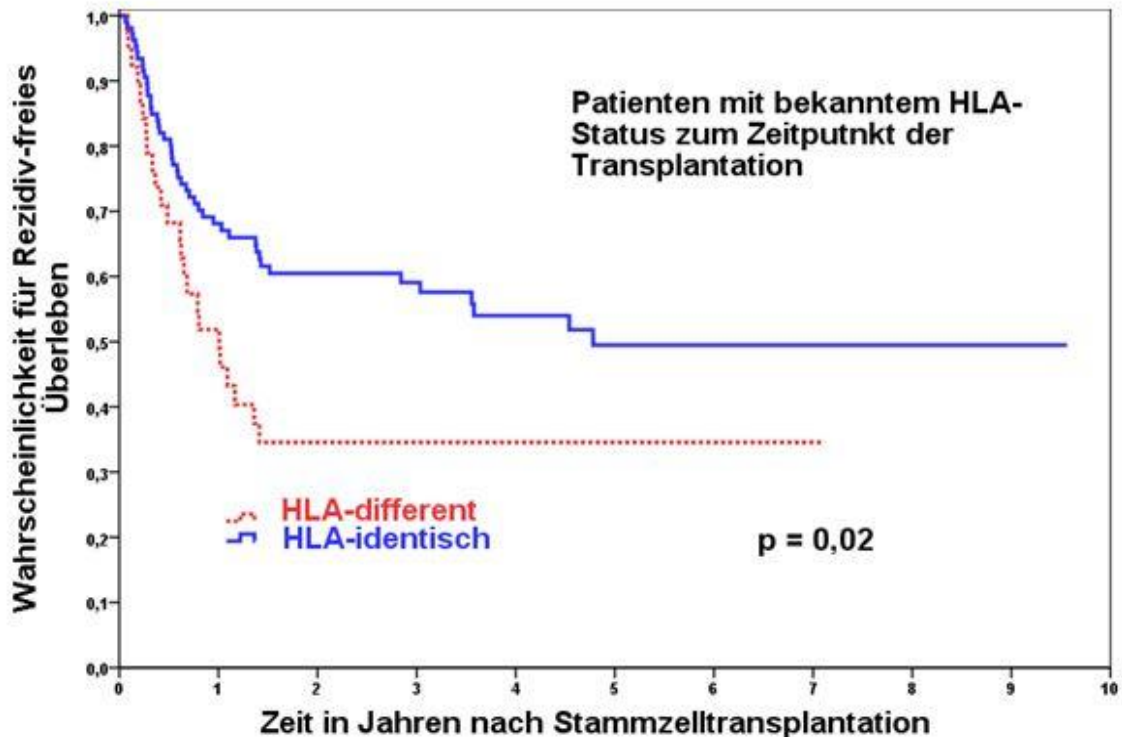
#### 4.2.1.11 HLA-Status des Spenders

Es wurde untersucht ob eine Spender-Empfänger-Konstellation mit identischem HLA-Status Vorteile gegenüber einem nicht übereinstimmenden HLA-Status im Hinblick auf das Gesamtüberleben, das Rezidiv-freie Überleben oder das Auftreten eines Rezidivs hat. Der HLA-Status ist dann identisch, wenn alle 10 zu bestimmenden Oberflächenantigene bei Spender und Empfänger übereinstimmen.

In der univariaten Cox-Analyse zeigte der HLA-Status eine deutliche Signifikanz bezüglich des RFS und des Auftretens eines Rezidivs (RFS:  $p=0,022$ ; Rezidiv ja/nein:  $p=0,025$ ). Patienten mit HLA-identischem Spender hatten eine geringere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs als Patienten mit HLA-differentem Spender (HR=0,491). Analysiert wurde hier die gesamte Patientenkohorte (n=144).

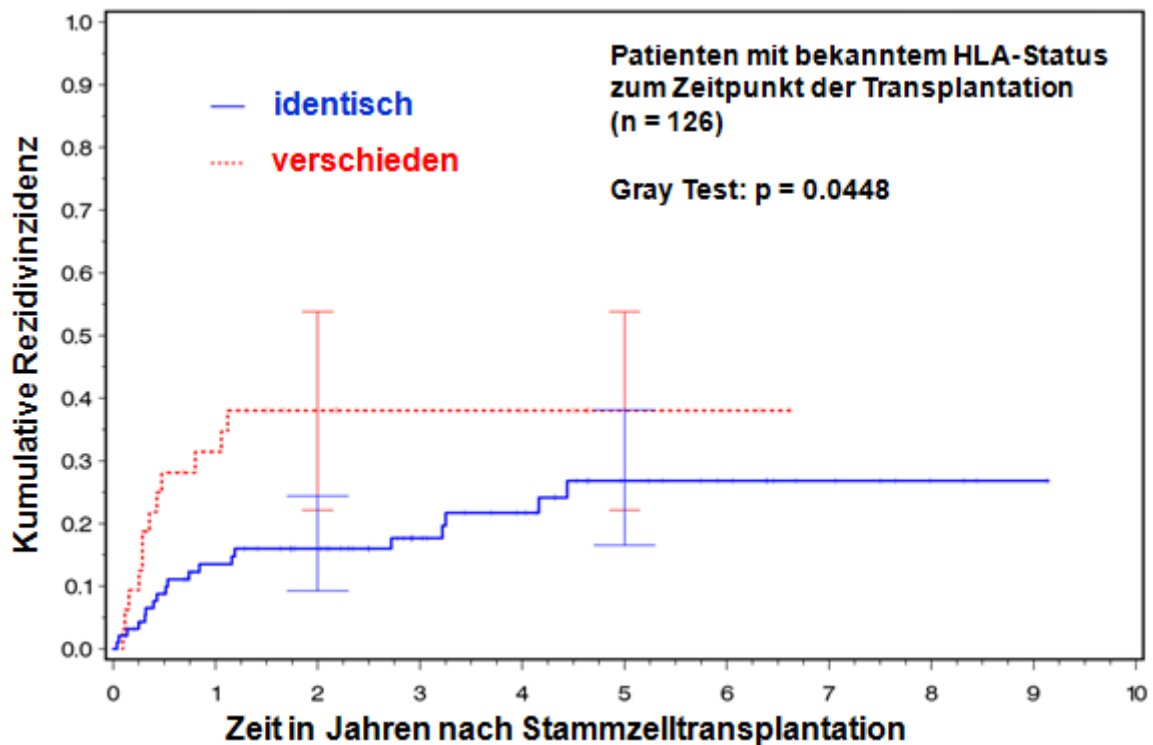
In den multivariaten Cox-Analysen hatte der HLA-Status keinen signifikanten Einfluss auf die drei Endpunkte.

Die Analysen nach Kaplan-Meier bezüglich des HLA-Status ergaben für die Patientengruppe mit identischem HLA-Status nach zwei Jahren eine RFS-Rate von 60% (KI: 54%-75%). Dem gegenüber steht die HLA-differente Gruppe mit einer statistisch signifikant niedrigeren Wahrscheinlichkeit für Rezidivfreiheit von nur 34% (KI: 22%-46%) nach zwei Jahren ( $p=0,02$ ) (Grafik 9). Im Hinblick auf die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant voneinander.



Grafik 9: Rezidiv-freies Überleben für Patienten mit bekanntem HLA-Status

Der HLA-Status bei Transplantation wurde ebenfalls mittels des Fine-and-Gray-Tests analysiert. Hierbei ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,0448$ ) zwischen HLA-identischer und HLA-differenter Spender-Empfänger-Konstellation. Nach zwei Jahren ergab sich für die Patienten mit HLA-identischem Spender eine Rezidivwahrscheinlichkeit von 15% (KI: 9%-24%). Patienten mit HLA-differentem Spender hatten zum selben Zeitpunkt eine Rezidivwahrscheinlichkeit von 38% (KI: 22%-54%). In diese Analyse konnten 126 Patienten mit einbezogen werden. Die graphische Darstellung der Analyseergebnisse sind Grafik 10 zu entnehmen.



Grafik 10: Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs bei Patienten mit bekanntem HLA-Status zum Zeitpunkt der Transplantation

#### 4.2.1.12 CMV-Status des Spenders und des Patienten

Der CMV-Status von Spender und Empfänger (positiv versus negativ) wurde ebenfalls auf seine statistische Signifikanz hinsichtlich des Gesamtüberlebens, des Rezidiv-freien Überlebens und des Auftretens eines Rezidivs untersucht. Keine dieser Cox-Analysen ergaben statistisch signifikante Ergebnisse. Die Fallzahl für diese Analysen betrug n=143.

#### 4.2.1.13 Blastenanzahl im peripheren Blut vor allogener Stammzelltransplantation

Vor der Stammzelltransplantation wurde bei 127 Patienten die Anzahl der unreifen blastären Zellen, also der pathologischen Leukämiezellen, im peripheren Blut bestimmt.

Analysiert wurde in der univariaten Cox-Analyse die Blastenanzahl in 10er Schritten im Blut. Für den Endpunkt Rezidiv ja/nein ergab die Analyse ein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p=0,012$ ). Hinsichtlich des OS und des RFS ergaben sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

#### 4.2.1.14 Blastenanzahl im Knochenmark vor allogener Stammzelltransplantation

Die Anzahl der Blasten wurde nicht nur im peripheren Blut, sondern bei einigen Patienten auch im Knochenmark bestimmt. Auch hier gilt: je mehr Blasten im Knochenmark nachgewiesen werden können, desto weiter ist die Leukämie fortgeschritten.

Im Hinblick auf das Rezidiv-freie Überleben und den Endpunkt Rezidiv ja/nein ergaben die univariaten Cox-Analysen einen statistisch signifikanten Unterschied (OS:  $p=0,038$ ,  $HR=1,089$ ; Rezidiv:  $p=0,036$ ,  $HR=1,113$ ).

Gerechnet wurde mit der Blastenanzahl in 10er Schritten. Die Fallzahl für diese Analysen betrug  $n=136$ .

#### 4.2.1.15 Remissionsstatus vor allogener Stammzelltransplantation

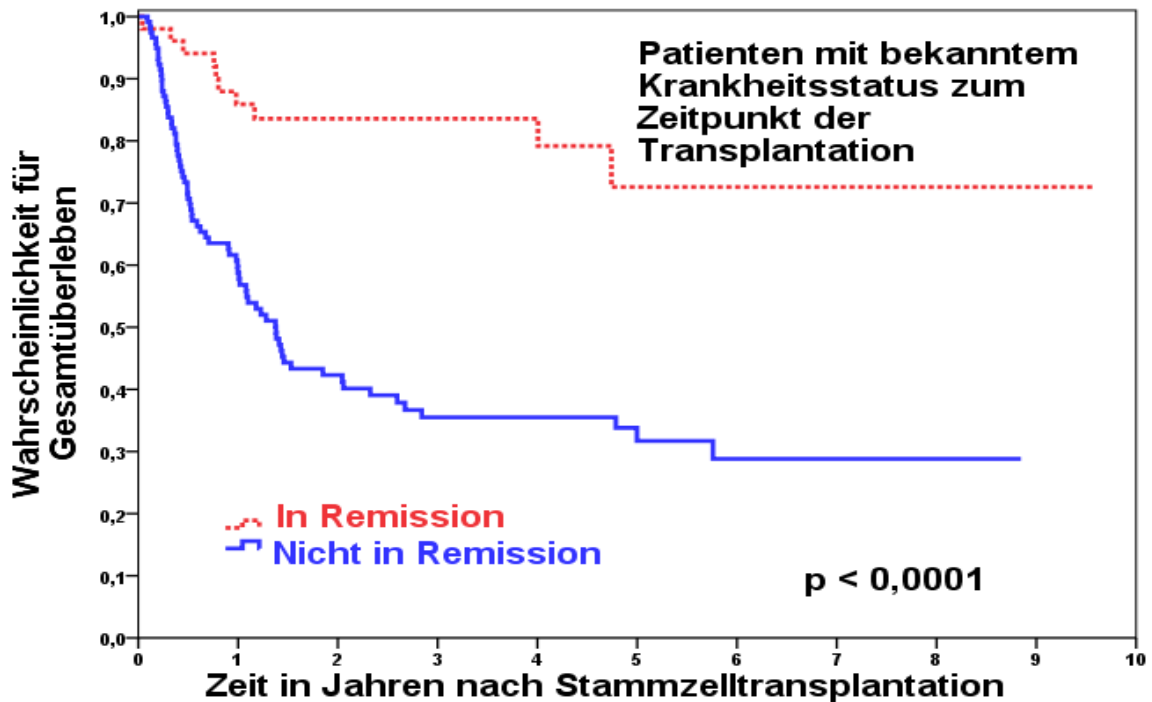
In dieser Variablen wurden Patienten nach dem Status der Erkrankung vor Transplantation bewertet. Für diese Dissertation wurde der Status der kompletten Remission wie folgt definiert: weniger als 5% blastäre Zellen im Knochenmark, mehr als 1000 neutrophile Granulozyten pro  $\mu\text{l}$  und mehr als 100.000 Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$  im peripheren Blut, sowie fehlende extramedulläre Manifestationen, wie Hautinfiltrate, Befall der Hirnhäute (Meningeosis leukaemica), Gingivahyperplasie oder Infiltrationen von Milz oder Leber.

Für diese Analysen wurde das Patientenkollektiv hinsichtlich des Remissionsstatus in zwei Gruppen aufgeteilt. Es wurden die Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation die oben genannten Kriterien erfüllten, und somit in Remission waren mit denjenigen Patienten, die diese Kriterien nicht erfüllten, also bereits ein Rezidiv hatten oder eine refraktäre Erkrankung aufwiesen, verglichen. Dieser Status lag für die gesamte Patientenkohorte ( $n=144$ ) vor.

In der univariaten Cox-Analyse mit dieser binären Variable zeigte sich, dass Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Transplantation nicht in Remission befanden, ein 3,6-fach erhöhtes Risiko hatten zu sterben oder an einem Rezidiv zu erkranken ( $HR$  für RFS= $3,613$ ). Die Sterbewahrscheinlichkeit ist für diese Patienten um 4,1 ( $HR$  für OS= $4,111$ ) und die Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu bekommen um 3,8 erhöht ( $HR$  für Rezidiv =  $3,837$ ). Hinsichtlich des Gesamtüberlebens, des Rezidiv-freien Überlebens und des Eintretens eines Rezidivs lieferten die univariaten Cox-Analysen statistisch signifikante Ergebnisse (RFS:  $p<0,0001$ ; OS:  $p<0,0001$ ; Rezidiv ja/nein:  $p=0,001$ ). Die multivariaten Cox-Analysen ergaben keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

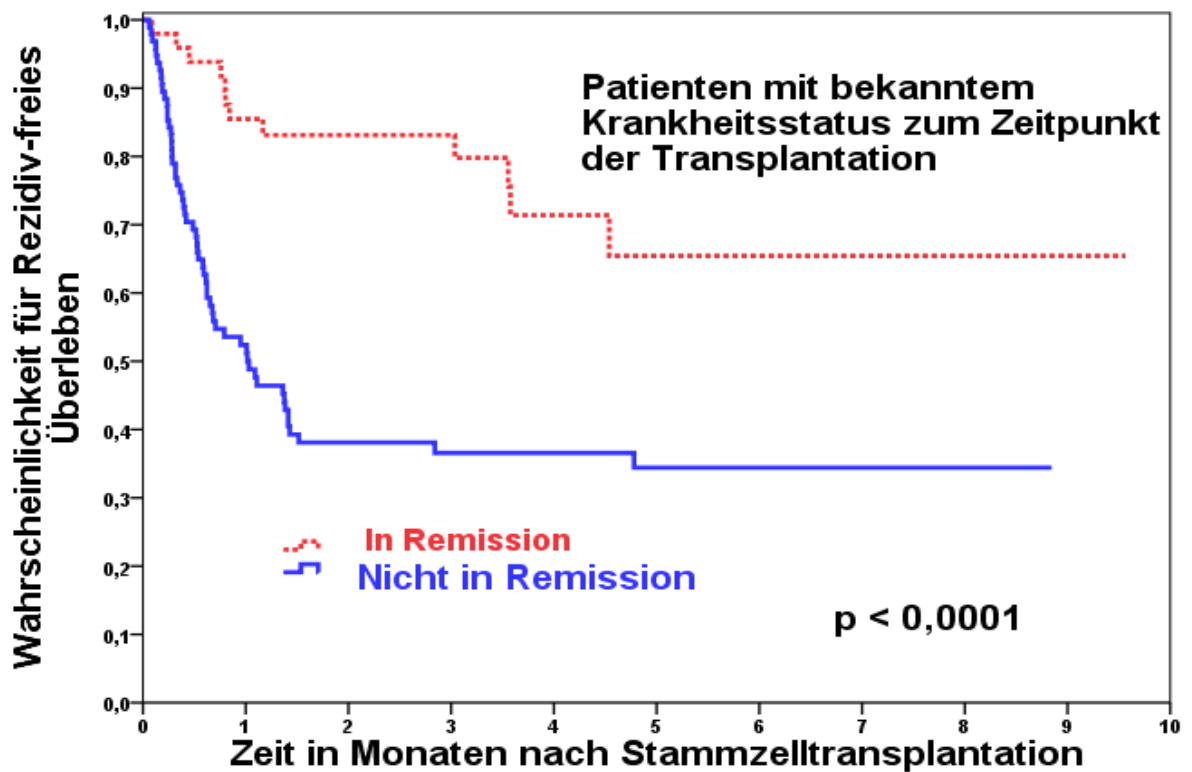
Hinsichtlich des Remissionsstadiums zum Zeitpunkt der Transplantation ergab die Analyse mittels der Kaplan-Meier-Methode für Patienten, die in Remission transplantiert wurden

eine 2-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 84% gegenüber 42% (KI: 33%-50%) für Patienten, die nicht in Remission transplantiert wurden. Von insgesamt 49 Patienten, die in Remission transplantiert wurden, starben während der gesamten Beobachtungszeit 9 Patienten. 95 Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Transplantation nicht in Remission. Von Ihnen starben 54. Die Analyse mittels des Log-Rank-Test ergab für den Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeiten der beiden Gruppen ein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p < 0,0001$ ) (Grafik 11).



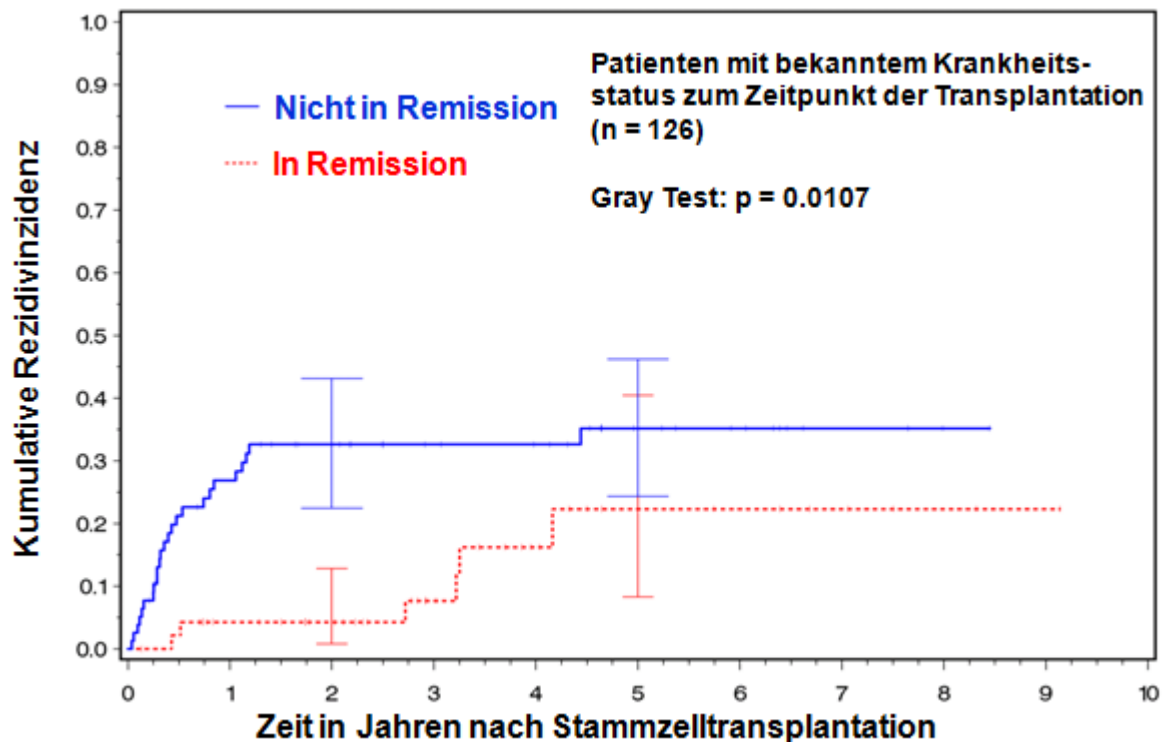
Grafik 11: Gesamtüberleben für Patienten mit bekanntem Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation

Für das Rezidiv-freie Überleben ergab diese Analyse nach zwei Jahren eine RFS-Rate von 83% (KI: 70%-99%) für die Gruppe der in Remission transplantierten Patienten. Die Gruppe der Patienten, die nicht in Remission transplantiert wurden, erzielte nach zwei Jahren eine RFS-Rate von 38% (KI: 33%-53%). Auch hier konnte der Log-Rank-Test angewendet werden und ergab einen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich des Rezidiv-freien Überlebens zwischen den beiden Gruppen ( $p < 0,0001$ ) (Grafik 12).



Grafik 12: Rezidiv-freies Überleben für Patienten mit bekanntem Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation

Der Remissionsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation war auch bezüglich der kumulativen Rezidivinzidenz statistisch signifikant ( $p=0,0107$ ). Patienten, die in Remission transplantiert wurden hatten zwei Jahre nach Stammzelltransplantation eine Rezidivwahrscheinlichkeit von 4% (KI: 1%-13%). Die Patienten hingegen, die sich zum Zeitpunkt der Transplantation nicht in Remission befanden hatten zum selben Zeitpunkt eine Rezidivwahrscheinlichkeit von 33% (KI: 22%-43%). Die Fallzahl bei dieser Analyse betrug  $n=126$  (Grafik 13).



Grafik 13: Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs bei Patienten mit bekanntem Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation

#### 4.2.2 Einflüsse von peritherapeutischen Parametern und Risikofaktoren an Tag +30 nach Stammzelltransplantation

In die folgenden Analysen wurden Patienten eingeschlossen, die an Tag 30 nach allogener Stammzelltransplantation leukämiefrei, also in Remission, waren (n=138).

##### 4.2.2.1 MRD-Status an Tag +30 nach allogener Stammzelltransplantation

Hier wurde untersucht, ob der Patient an Tag 30 nach Stammzelltransplantation für seinen jeweiligen MRD-Marker positiv oder negativ war (Tabelle 10). Es wurden nur Patienten in diese Analyse einbezogen, bei denen vor Transplantation ein MRD-Marker nachgewiesen wurde und die zum Zeitpunkt der Untersuchung in Remission waren.

Die Cox-Analyse für den Status des MRD-Markers an Tag +30 ergab kein statistisch signifikantes Ergebnis.

Mit dieser Variablen wurde eine weitere univariate Cox-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde die Patientengruppe etwas mehr eingegrenzt. Einbezogen wurden nur Patienten, die auch zum Zeitpunkt der Transplantation und an Tag +30 nach Transplantation in Remission waren (n=39).

Die univariate Cox-Analyse mit dieser Patientengruppe erbrachte keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

#### 4.2.2.2 Gesamtchimärismus an Tag +30 nach allogener Stammzelltransplantation

Chimärismuswerte sind im Wesentlichen ein Parameter, der über das Anwachsen des Transplantates Auskunft gibt. Je höher der Chimärismuswert beim Empfänger, desto besser sind die genetisch differenten Blutstammzellen vom Körper des Empfängers angenommen worden. Ausführliche Informationen und Beschreibungen zur Chimärismusanalyse sind in Kapitel 1.6 dargestellt.

Es wurde der Chimärismus in allen myeloischen Zellen des Empfängers an Tag +30 nach Stammzelltransplantation analysiert. Der Schwellenwert wurde in diesem Fall bei 80% Spenderchimärismus festgelegt. Das heißt, dass ein Wert >80% als positiv und ein Wert ≤80% als negativ gewertet wurde. Die univariate Cox-Analyse mit diesen binären Variablen ergab keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Die Fallzahl für diese Analysen betrug n=107.

#### 4.2.2.3 T-Zell-Chimärismus an Tag +30 nach allogener Stammzelltransplantation

Bei diesen Analysen wurden, wie bereits beschrieben, die Chimärismuswerte in den T-Zellen bestimmt. Der Schwellenwert wurde hier ebenfalls bei 80% festgelegt.

Hier ergaben die univariaten Cox-Analysen für keinen der untersuchten Endpunkte statistisch signifikante Ergebnisse. Die Fallzahl betrug n=111.

#### 4.2.2.4 Leukozytenanzahl an Tag +30 nach allogener Stammzelltransplantation

Hier wurde die Leukozytenanzahl pro µl Blut an Tag +30 nach Stammzelltransplantation analysiert.

Diese Cox-Analysen ergaben keine statistisch signifikanten Ergebnisse im Hinblick auf das Gesamtüberleben, das Rezidiv-freie Überleben oder den Endpunkt Rezidiv ja/nein. Die Fallzahl bei diesen Analysen betrug n=119.

#### 4.2.2.5 Thrombozytenanzahl an Tag +30 nach allogener Stammzelltransplantation

Bei den Analysen bezüglich dieses peritherapeutischen Parameters wurden Patienten mit einer Thrombozytenanzahl größer 50.000 /µl Blut mit Patienten, deren Thrombozyten



≤ 50.000 /µl Blut betragen, verglichen.

Die Cox-Analysen mit diesen binären Variablen ergaben für keinen der drei Endpunkte ein statistisch signifikantes Ergebnis. Die Fallzahl bei diesen Analysen betrug n=119.

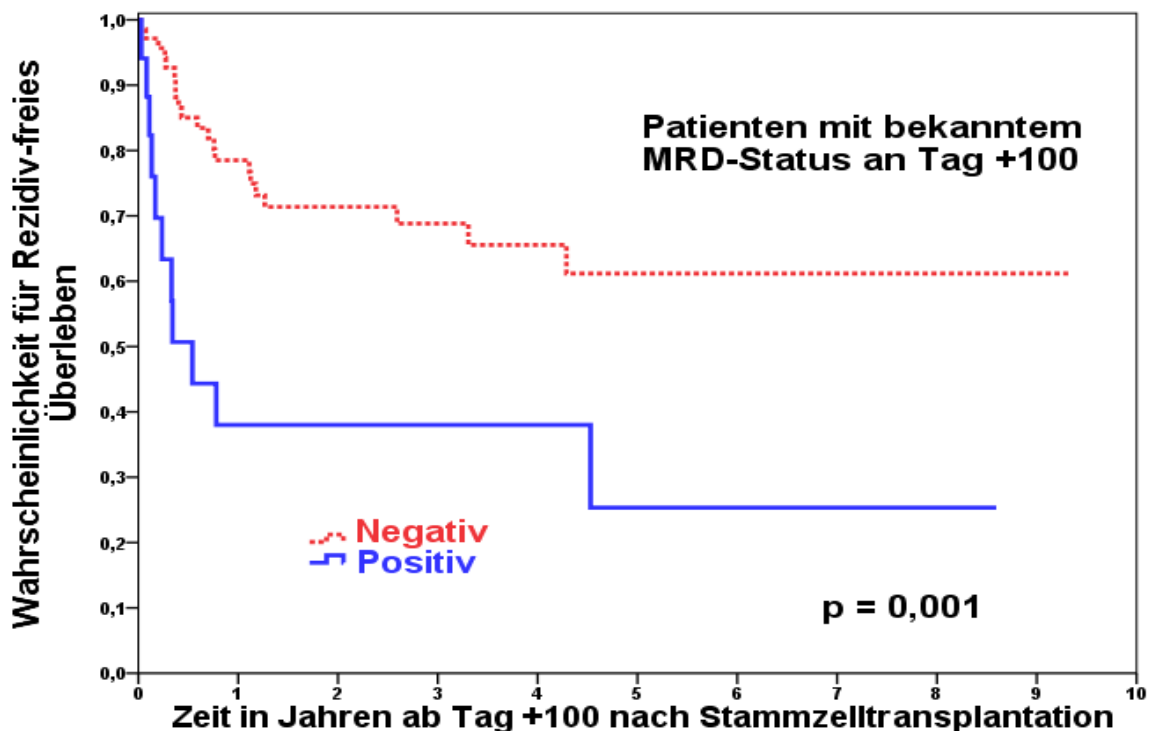
#### 4.2.3 Einflüsse von peritherapeutischen Parametern und Risikofaktoren an Tag +100 nach Stammzelltransplantation

In diese Analysen wurden Patienten einbezogen, die an Tag +100 nach allogener Stammzelltransplantation leukämiefrei (in Remission) waren (n=116).

##### 4.2.3.1 MRD-Status an Tag +100 nach Stammzelltransplantation

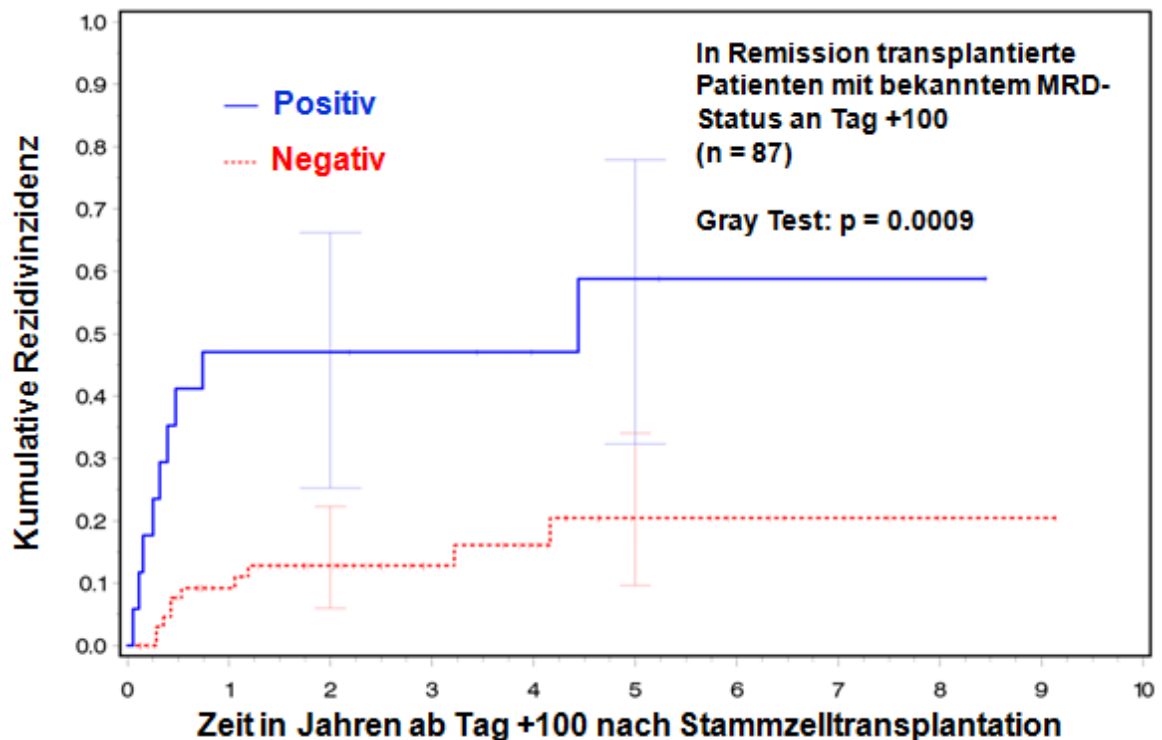
Einen signifikanten Einfluss auf alle drei Endpunkte zeigte der MRD-Status an Tag +100 nach Stammzelltransplantation. Bei Patienten mit einem positiven MRD-Status am Tag +100 ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs gegenüber Patienten mit negativen MRD-Status zu diesem Zeitpunkt um ein 5-faches erhöht (p=0,001, HR=4,983, n=83). Auch im Hinblick auf das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben zeigt sich eine deutliche Assoziation mit dem MRD-Status (RFS: p=0,004; OS: p=0,004). Patienten mit positivem MRD-Status an Tag +100 haben ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Rezidivs oder das Eintreten des Todes (HR für den Endpunkt RFS=3,062, n=83). Das Sterberisiko für Patienten mit einer positiven MRD-Ratio an Tag 100 ist demnach 3,2-mal so hoch wie das von Patienten mit negativen MRD-Werten zu diesem Zeitpunkt (HR für den Endpunkt OS=3,234, n=83) (Tabelle 10). Diese Effekte wurden in der multivariaten Cox-Analyse unter Einbeziehung anderer statistisch signifikanter Cofaktoren, wie NPM1-Status, Staging zum Zeitpunkt der Transplantation, den HLA-Status, den Thrombozytenwert an Tag 100 und die ELN-Klassifikation im Hinblick auf das Rezidiv-freie Überleben (RFS: p=0,013, HR=3,657) sowie das Vorliegen eines Rezidivs bestätigt (Rezidiv: p=0,003, HR=9,574). Bezüglich des Gesamtüberlebens ergab diese Analyse kein statistisch signifikantes Ergebnis (p=0,142) (Tabelle 11).

Patienten mit negativen MRD-Werten an Tag +100 haben eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu Patienten mit positivem MRD-Status ( $p=0,001$ ). Hinsichtlich des Rezidiv-freien Überlebens unterscheiden sich diese beiden Gruppen ebenfalls signifikant voneinander ( $p=0,001$ ). Es zeigte sich, dass Patienten mit positivem MRD-Status an Tag +100 nach zwei Jahren eine Wahrscheinlichkeit für Rezidiv-freies Überleben von 38% haben (KI: 12,8%-75,3%). Patienten mit negativem MRD-Status an Tag +100 hingegen haben nach zwei Jahren eine 71%-ige Wahrscheinlichkeit für Rezidiv-freies Überleben (KI: 61,7%-87,8%) (siehe Grafik 14).



Grafik 14: Rezidiv-freies Überleben für Patienten mit bekanntem MRD-Status an Tag +100

Der MRD-Status an Tag +100 wurde ebenfalls an Hand des Fine-and-Gray-Modells analysiert. Hier wurden Patienten mit bekanntem MRD-Status einbezogen, die sich an Tag +100 in Remission befanden. Für Patienten mit positivem MRD-Status an Tag +100 ergab sich eine Wahrscheinlichkeit von 47% (KI: 25%-66%) nach zwei Jahren ein Rezidiv der Erkrankung bekommen zu haben. Bei MRD-negativen Patienten an Tag +100 betrug die kumulative Rezidivinzidenz nach 2 Jahren nur etwa 13% (KI: 6%-22%). Die Analysen bezüglich dieses Endpunktes waren mit einem  $p$ -Wert von 0,0009 statistisch signifikant (siehe Grafik 15). In diese Analyse konnten 87 Patienten mit einbezogen werden.



Grafik 15: Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs in Abhängigkeit vom MRD-Status an Tag +100

#### 4.2.3.2 Akute Graft versus Host Disease

Die akute Graft-versus-Host-Disease (aGvHD) ist eine alloreaktive Reaktion von T-Lymphozyten des Spenders gegen das Körpergewebe des Empfängers. Die Krankheit kann sich an unterschiedlichen Körperorganen manifestieren. Klassischerweise spricht man von einer akuten GvHD, wenn diese vor Tag +100 nach Transplantation auftritt. Ausführliche Informationen zur GvHD sind Kapitel 1.5.5 zu entnehmen.

Das Patientenkollektiv wurde bezüglich der akuten GvHD folgendermaßen eingeteilt: Es wurden Patienten ohne aGvHD und mit aGvHD Grad I verglichen mit Patienten, die eine aGvHD Grad II, III oder IV hatten (Tabelle 5).

An Hand dieser binären Variablen berechneten wir die univariate Cox-Analyse. Weder für das Gesamtüberleben, noch für das Rezidiv-freie Überleben oder den Endpunkt Rezidiv ergaben sich statistisch signifikante Ergebnisse (RFS:  $p=0,685$ , OS:  $p=0,607$ , Rezidiv:  $p=0,757$ ). Die Fallzahl betrug  $n=137$ .

#### 4.2.3.3 Gesamtchimärismus an Tag +100 nach allogener Stammzelltransplantation

Hier wurden die Gesamtchimärismuswerte an Tag +100 nach Stammzelltransplantation analysiert. Für die Variable wurde ein Schwellenwert bei 80% ausgewählt. Das heißt, alle Werte >80% und alle Werte ≤80% wurden jeweils zusammengefasst. Mit dieser binären Variablen führten wir die univariate Cox-Analyse durch. Diese ergab für keinen der drei Endpunkte ein statistisch signifikantes Ergebnis. Die Fallzahl bei diesen Analysen betrug n=88.

#### 4.2.3.4 T-Zellchimärismus an Tag +100 nach allogener Stammzelltransplantation

Für diese Analysen wurden die Variablen wie schon im vorhergehenden Kapitel beschrieben codiert. Die univariate Cox-Analyse ergab für die T-Zellchimärismuswerte an Tag +100 nach Stammzelltransplantation, Schwellenwert bei 80%, für keinen der drei Endpunkte ein statistisch signifikantes Ergebnis. Die Fallzahl betrug hier n=95.

#### 4.2.3.5 Leukozytenanzahl an Tag +100 nach allogener Stammzelltransplantation

Hier wurde die Leukozytenzahl/μl Blut an Tag +100 nach Stammzelltransplantation analysiert. In diese Analyse gingen die Werte von 97 Patienten mit ein. Es wurde der Medianwert der Leukozytenanzahl von allen diesen Patienten ermittelt. Diese fixe Zahl wurde von denjenigen Absolutwerten subtrahiert. Die für diese Variable durchgeführten univariaten Cox-Analysen ergaben für den Endpunkt Rezidiv-freies Überleben ein grenzwertig statistisch signifikantes Ergebnis (p=0,045). Das bedeutet, dass das Auftreten eines Rezidivs oder das Eintreten des Todes für Patienten mit niedrigeren Leukozytenwerten erhöht ist (HR=1,169). Für die Endpunkte OS und Rezidiv lieferten die Analysen keine statistisch relevanten Ergebnisse. Bei diesen Analysen betrug die Fallzahl n=97.

#### 4.2.3.6 Thrombozytenanzahl an Tag +100 nach allogener Stammzelltransplantation

Ebenfalls signifikante Ergebnisse lieferte die univariate Cox-Analyse der Thrombozyten-Werte an Tag +100. Zur Berechnung dieser Variablen wurde ein Schwellenwert von 50 000 Thrombozyten /μl festgelegt. Patienten mit Werten < 50 000/μl hatten ein erhöhtes Risiko ein Rezidiv zu erleiden oder zu sterben als Patienten mit Werten > 50 000/μl (p=0,048, HR=2,044). Die Fallzahl bei diesen Analysen betrug n=97. In der multivariaten Cox-Analyse bestätigten sich diese Ergebnisse für die Endpunkte RFS (p=0,005, HR=5,022)

und OS ( $p=0,023$ ,  $HR=4,144$ ). Diese Analysen wurde unter Einbeziehung folgender Cofaktoren durchgeführt: *NPM1*-Mutations-Status, MRD-Status an Tag +100, Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation, HLA-Status, Thrombozytenwert an Tag +100 und der ELN-Klassifikation. Bei der multivariaten Cox-Analyse betrug die Fallzahl  $n=61$ .

**Tabelle 10: Ergebnisse der univariaten Analysen nach dem Cox-Modell für alle Patienten, unabhängig vom Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation.**

Variable	RFS			OS			Rezidiv ja/nein		
	N=	HR (95% KI)	P	N=	HR (95% KI)	P	N=	HR (95% KI)	P
<b>Geschlecht</b>	144	1,107 (0,691-1,772)	0,673	144	1,22 (0,744-2,001)	0,43	144	0,936 (0,51-1,716)	0,83
<b>Patientenalter (pro Dekade)</b>	144	1,007 (0,851-1,193)	0,931	144	1,022 (0,854-1,223)	0,814	144	1,043 (0,839-1,296)	0,704
<b>Patientenalter (Schwellenwert bei 60 Jahren)</b>	144	0,978 (0,565-1,69)	0,935	144	1,095 (0,62-1,935)	0,754	144	1,206 (0,618-2,354)	0,584
<b><i>NPM1</i></b>	111	<b>0,471 (0,266-0,836)</b>	<b>0,010</b>	111	<b>0,543 (0,299-0,987)</b>	<b>0,045</b>	111	<b>0,4 (0,186-0,863)</b>	<b>0,019</b>
<b><i>MLL-PTD</i></b>	119	1,590 (0,926-2,729)	0,092	119	1,556 (0,882-2,744)	0,127	119	1,866 (0,938-3,712)	0,076
<b><i>FLT3-LM</i></b>	125	1,312 (0,776-2,219)	0,311	125	1,482 (0,857-2,562)	0,159	125	1,798 (0,934-3,464)	0,079
<b><i>FLT3-TKD</i></b>	111	0,829 (0,355 - 1,936)	0,664	111	0,925 (0,394-2,172)	0,858	111	0,419 (0,1-1,756)	0,234
<b><i>CEPBA</i></b>	24	0,040 (0-102,912)	0,421	24	0,041 (0-305,865)	0,482	24	0,04 (0-846,958)	0,527
<b><i>c-kit</i></b>	47	0,796 (0,108 – 5,881)	0,823	47	0,925 (0,125-6,859)	0,925	47	1,39 (0,182-10,593)	0,75

<b>Remissionsstatus vor Transplantation (Remission vs. Rezidiv oder refraktär)</b>	144	<b>3,613 (1,937-6,742)</b>	<b>&lt;0,0001</b>	144	<b>4,111 (2,028-8,333)</b>	<b>&lt;0,0001</b>	144	<b>3,837 (1,703-8,647)</b>	<b>0,001</b>
<b>Blastenanzahl KM vor Tx pro 10</b>	136	<b>1,089 (1,005 – 1,181)</b>	<b>0,038</b>	136	1,084 (0,995-1,182)	0,064	136	<b>1,113 (1,007-1,231)</b>	<b>0,036</b>
<b>Blastenanzahl PB vor Tx pro 10</b>	127	1,094 (0,992 – 1,206)	0,072	127	1,068 (0,963-1,183)	0,213	127	<b>1,154 (1,032-1,29)</b>	<b>0,012</b>
<b>Spender (verwandt vs. unverwandt)</b>	144	0,787 (0,491 – 1,26)	0,318	144	0,772 (0,471-1,266)	0,305	144	0,846 (0,463-1,545)	0,586
<b>Alter des Spenders (pro Dekade)</b>	131	1,088 (0,907 – 1,306)	0,365	131	1,111 (0,915-1,348)	0,287	131	1,125 (0,894-1,416)	0,313
<b>Geschlecht des Spenders</b>	141	1,079 (0,884-1,318)	0,453	141	1,063 (0,864-1,308)	0,563	141	1,17 (0,976-1,402)	0,089
<b>HLA-Status</b>	144	<b>0,56 (0,342-0,92)</b>	<b>0,022</b>	144	0,606 (0,358-1,026)	0,062	144	<b>0,491 (0,264-0,914)</b>	<b>0,025</b>
<b>CMV-Status des Patienten</b>	143	1,09 (0,657-1,809)	0,738	143	1,021 (0,599-1,74)	0,94	143	1,484 (0,748-2,945)	0,259
<b>CMV-Status des Spenders</b>	143	0,82 (0,511-1,316)	0,41	143	0,778(0,472-1,282)	0,325	143	0,947 (0,52-1,725)	0,86
<b>Stammzellquelle</b>	144	1,255 (0,987-1,594)	0,063	144	1,197 (0,932-1,536)	0,159	144	1,160 (0,835-1,613)	0,376
<b>Stammzellquelle (KM vs. PB)</b>	128	2,596 (0,63-10,696)	0,187	128	2,341 (0,564-9,716)	0,242	128	24,05 (0,135-4285,666)	0,229

<b>Akute GVHD (keine und Grad I vs. Grad II und höher)</b>	137	1,107 (0,678 – 1,808)	0,685	137	1,138 (0,694-1,867)	0,607	137	0,904 (0,476-1,715)	0,757
<b>Chronische GVHD</b>	87	1,873 (0,763-4,599)	0,171	87	1,299 (0,581-2,907)	0,524	87	0,426 (0,057-3,202)	0,407
<b>DLI</b>	114	0,696 (0,341-1,419)	0,319	114	0,558 (0,253-1,231)	0,149	114	0,974 (0,419-2,261)	0,950
<b>Sorrow-Score</b>	135	1,326 (0,75-2,343)	0,331	135	1,429 (0,769-2,658)	0,259	135	1,391 (0,675-2,868)	0,371
<b>Karnofsky-Index (good vs. poor)</b>	111	0,641 (0,314-1,308)	0,221	111	0,759 (0,341-1,69)	0,5	111	0,555 (0,229-1,345)	0,192
<b>ELN-Klassifikation (favorable vs. andere)</b>	135	1,632 (0,889-2,996)	0,114	135	1,551 (0,822-2,924)	0,175	<b>135</b>	<b>2,395 (1,005-5,71)</b>	<b>0,049</b>
<b>Gesamtchimärismus Tag +30 (Schwellenwert bei 80%)</b>	107	1,431 (0,346-5,915)	0,621	107	1,266 (0,295-5,096)	0,779	107	1,165 (0,158-8,598)	0,881
<b>Gesamtchimärismus Tag +30 (Schwellenwert bei 90%)</b>	107	1,267 (0,392-4,093)	0,693	107	1,293 (0,398-4,198)	0,669	107	0,676 (0,092-4,985)	0,701
<b>Gesamtchimärismus Tag +30 (Schwellenwert bei 95%)</b>	107	1,156 (0,413-3,235)	0,782	107	1,305 (0,464-3,672)	0,613	107	0,936 (0,222-3,958)	0,929
<b>Gesamtchimärismus Tag +30 (Schwellenwert bei 100%)</b>	104	0,838 (0,414-1,694)	0,622	104	0,869 (0,412-1,833)	0,713	104	0,996 (0,422-2,35)	0,993
<b>Gesamtchimärismus Tag +100 (Schwellenwert bei 80%)</b>	88	1,934 (0,262-14,283)	0,518	88	1,168 (0,157-8,673)	0,880	88	3,773 (0,494-28,837)	0,201



<b>Gesamtchimärismus Tag +100 (Schwellenwert bei 90%)</b>	88	1,905 (0,451-8,051)	0,381	88	1,411 (0,33-6,037)	0,643	88	1,732 (0,228-13,169)	0,596
<b>Gesamtchimärismus Tag +100 (Schwellenwert bei 95%)</b>	88	2,463 (0,741-8,188)	0,141	88	1,993 (0,592-6,71)	0,265	88	2,971 (0,672-13,132)	0,151
<b>Gesamtchimärismus Tag +100 (Schwellenwert bei 100%)</b>	97	1,081 (0,438-2,668)	0,866	97	1,143 (0,456-2,866)	0,775	97	0,914 (0,26-3,211)	0,888
<b>T-Zell-Chimärismus Tag +30 (Schwellenwert bei 80%)</b>	111	1,0 (0,0-1020084113)	1,0	111	1 (0,0-1020084113)	1,0	111	-	-
<b>T-Zell-Chimärismus Tag +30 (Schwellenwert bei 90%)</b>	111	<b>8,956 (2,097-38,257)</b>	<b>0,003</b>	111	3,344 (0,8-13,978)	0,098	111	7,47 (0,977-57,128)	0,053
<b>T-Zell-Chimärismus Tag +30 (Schwellenwert bei 95%)</b>	111	1,266 (0,454-3,53)	0,652	111	1,269 (0,452-3,558)	0,651	111	1,062 (0,252-4,478)	0,935
<b>T-Zell-Chimärismus Tag +30 (Schwellenwert bei 100%)</b>	107	1,406 (0,725-2,728)	0,314	107	1,432 (0,714-2,87)	0,312	107	1,182 (0,473-2,954)	0,721
<b>T-Zell-Chimärismus Tag +100 (Schwellenwert bei 80%)</b>	95	-	-	95	-	-	95	-	-
<b>T-Zell-Chimärismus Tag +100 (Schwellenwert bei 90%)</b>	95	0,049 (0,0-173230,149)	0,695	95	0,049 (0,0-1408356,216)	0,73	95	0,049 (0,0-46347971,01)	0,775
<b>T-Zell-Chimärismus Tag +100 (Schwellenwert bei 95%)</b>	95	0,048 (0,0-2139,857)	0,578	95	0,048 (0,0-9477,629)	0,625	95	0,048 (0,0-113173,778)	0,685
<b>T-Zell-Chimärismus Tag +100 (Schwellenwert bei 100%)</b>	94	0,664 (0,202-2,186)	0,501	94	0,761 (0,228-2,546)	0,658	94	0,787 (0,181-3,427)	0,749

<b>MRD-Status vor Transplantation</b>	132	2,0 (0,4-3,1)	0,08	132	2,0 (0,4-2,6)	0,1	<b>132</b>	<b>9,0 (1,2-65,5)</b>	<b>0,03</b>
<b>MRD-Status an Tag +30 (Patienten, die sich an Tag 30 in Remission befanden)</b>	104	1,092 (0,593-2,013)	0,777	104	1,091 (0,578-2,058)	0,789	104	1,368 (0,630-2,974)	0,428
<b>MRD-Status an Tag +30 (Patienten, die sich an Tag 30 und bei Tx in Remission befanden)</b>	39	0,391 (0,048-3,161)	0,378	39	0,651 (0,074-5,7)	0,698	39	0,829 (0,085-8,121)	0,872
<b>MRD-Status an Tag +100 (Patienten, die sich an Tag 100 in Remission befanden)</b>	83	<b>3,062 (1,429-6,563)</b>	<b>0,004</b>	83	<b>3,234 (1,45-7,211)</b>	<b>0,004</b>	83	<b>4,983 (1,958-12,683)</b>	<b>0,001</b>
<b>MRD-Status an Tag +100 (für Patienten, die sich an Tag 100 und bei Tx in Remission befanden)</b>	32	0,046 (0,0-56105693,2)	0,772	32	0,047 (0,0-6,87E+13)	0,864	32	0,045 (0,0-120201369964)	0,816
<b>Leukozytenanzahl (Absolutwert-Median) an Tag +30</b>	119	1,021 (0,948-1,1)	0,587	119	1,03 (0,952-1,115)	0,456	119	0,886 (0,732-1,071)	0,211
<b>Thrombozytenanzahl an Tag +30 (Schwellenwert bei 50.000/µl)</b>	119	0,975 (0,562-1,692)	0,929	119	0,928 (0,510-1,69)	0,808	119	0,783 (0,377-1,625)	0,512
<b>Leukozytenanzahl (Absolutwert-Median) an Tag +100</b>	97	<b>1,169 (1,004-1,361)</b>	<b>0,045</b>	97	1,1 (0,910-1,330)	0,326	97	1,179 (0,966-1,44)	0,106
<b>Thrombozytenanzahl an Tag +100 (Schwellenwert bei 50.000/µl)</b>	97	<b>2,044 (1,008-4,146)</b>	<b>0,048</b>	97	2,043 (0,937-4,456)	0,073	97	1,948 (0,754-5,032)	0,169

Tabelle 11: Ergebnisse der multivariaten Analyse nach dem Cox-Modell für alle Patienten, unabhängig vom Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation.

Variable	RFS			OS			Rezidiv ja/nein		
	N=	HR (95% KI)	P	N=	HR (95% KI)	P	N=	HR (95% KI)	P
<b>NPM1</b>	61	0,388 (0,137-1,1)	0,075	61	0,532 (0,174-1,627)	0,268	61	0,727 (0,158-3,338)	0,682
<b>Krankheitsstatus bei Tx</b>		0,234 (0,628-6,736)	0,234		3,835 (0,826-17,812)	0,086		1,388 (0,234-8,226)	0,718
<b>HLA-Status</b>		0,951 (0,325-2,784)	0,927		0,73 (0,229-2,33)	0,595		0,657 (0,161-2,687)	0,559
<b>MRD-Status an Tag +100</b>		<b>3,657 (1,31-10,213)</b>	<b>0,013</b>		2,128 (0,776-5,839)	0,142		<b>9,574 (2,183-41,988)</b>	<b>0,003</b>
<b>Thrombozytenanzahl an Tag +100 (Schwellenwert bei 50.000/µl)</b>		<b>5,022 (1,611-15,657)</b>	<b>0,005</b>		<b>4,144 (1,214-14,147)</b>	<b>0,023</b>		4,84 (0,909-25,767)	0,065
<b>ELN-Klassifikation</b>		2,056 (0,422-10,006)	0,372		1,574 (0,323-7,682)	0,575		3,105 (0,261-36,972)	0,37

#### 4.2.4 Einflüsse von Parametern und Risikofaktoren im Verlauf ab Tag +100 nach allogener Stammzelltransplantation

116 Patienten in Remission konnten über einen Zeitraum von im Median 16,7 Monaten (0 - 111,4 Monate) beobachtet werden. In dieser Beobachtungsperiode nach Tag +100 wurden insgesamt 429 Blutproben bezüglich der MRD zu individuell gewählten Zeitintervallen untersucht.

##### 4.2.4.1 Chronische Graft versus Host Disease

Von einer chronischen Graft-versus-Host Disease spricht man, wenn diese nach Tag +100 nach Stammzelltransplantation auftritt. Bei dieser Erkrankung werden ähnlich wie bei Autoimmunerkrankungen eigene Körperzellen von autoreaktiven T-Zellen angegriffen. Getriggert wird diese Reaktion vermutlich durch die vorausgegangene Transplantation fremder Stammzellen. Mehr zur cGvHD ist Kapitel 1.5.5 zu entnehmen. Für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten statistischen Analysen, wurde die Patientenkohorte bezüglich der cGvHD in zwei Gruppen aufgeteilt. In einer Gruppe wurden alle Patienten ohne cGvHD berücksichtigt, in der anderen alle Patienten mit cGvHD.

In der univariaten Cox-Analyse ergab sich bezüglich keiner der drei Endpunkte ein statistisch signifikantes Ergebnis. Die Fallzahl bei diesen Analysen betrug n=87.

##### 4.2.4.2 Präemptive DLI-Gabe

Eine Gabe von spendereigenen Lymphozyten nach der allogenen Stammzelltransplantation sollen den Graft versus Leukemia-Effekt verstärken und dem Auftreten eines Rezidivs entgegenwirken. Nähere Informationen zur DLI-Gabe sind Kapitel 1.5.6 zu entnehmen.

31 Patienten erhielten Spenderlymphozyten. Die univariate Cox-Analyse bezüglich der Gabe von spendereigenen Lymphozyten ergab hinsichtlich keiner der drei Endpunkte ein statistisch signifikantes Ergebnis. Verglichen wurden Patienten, die DLIs nach der Transplantation erhielten mit denen, die keine Spenderlymphozyten erhalten hatten. Die Fallzahl bei diesen Analysen betrug n=114.

##### 4.2.4.3 Analysen zur MRD im weiteren Verlauf nach allogener Stammzelltransplantation

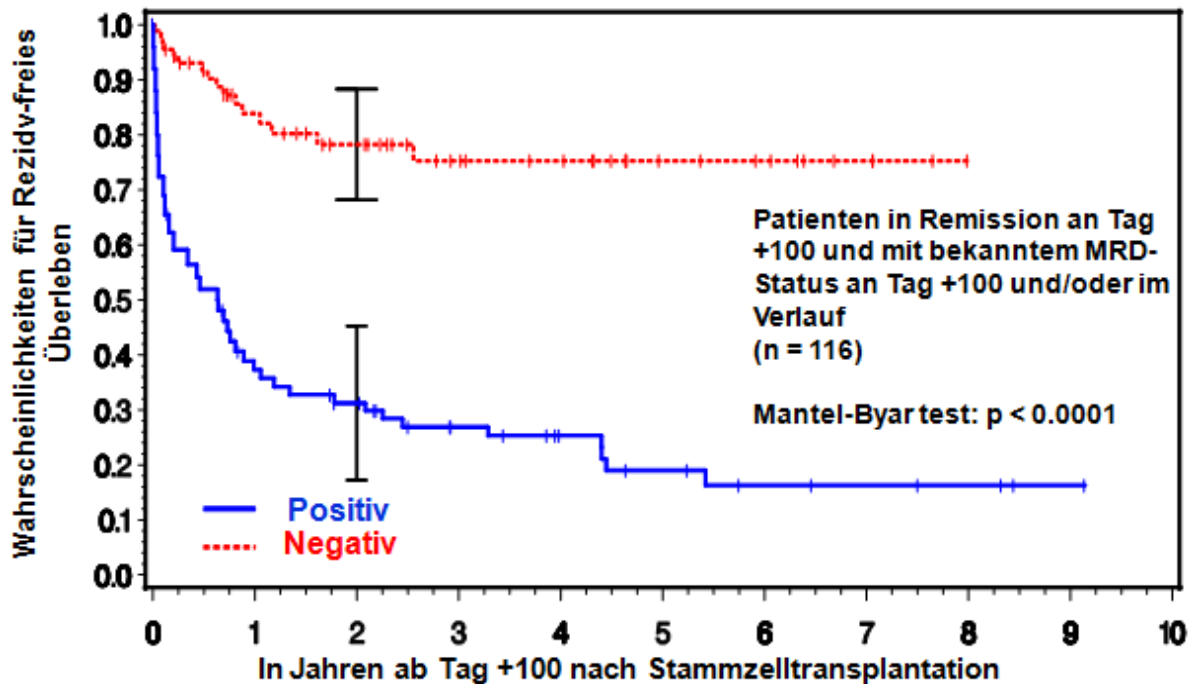
Im Verlauf nach Tag +100 nach Stammzelltransplantation wurde in individuellen Abständen die MRD-Last von insgesamt 116 Patienten im peripheren Blut bestimmt. Diese Daten stellten die Grundlage für die im Folgenden beschriebenen statistischen Analysen nach

dem Mantel-Byar- und dem Simon-Makuch-Test dar. Analysiert wurden insgesamt 429 Proben.

Bei den Analysen mit dem Mantel-Byar-Test wurden zwei unterschiedliche Patientengruppen untersucht. Zunächst wurden die Patienten, die sich an Tag +100 in Remission befanden und einen bekannten MRD-Status an Tag +100 und/oder mindestens einen MRD-Wert im Verlauf hatten, unabhängig vom Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Transplantation analysiert. Die Fallzahl in dieser Gruppe betrug n=116.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Grafik 16 dargestellt. Von den 57 MRD-positiven Patienten haben 34 Patienten ein Ereignis (Rezidiv oder Tod) und 23 werden ohne Ereignis zensiert. 59 Patienten bleiben während des gesamten Verlaufs negativ. Von diesen MRD-negativen Patienten haben nur 16 ein Ereignis und 43 werden ohne Ereignis zensiert. Die Analyseergebnisse des Mantel-Byar-Tests waren statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ).

Nach zwei Jahren und 100 Tagen nach Stammzelltransplantation hatten Patienten mit positivem MRD-Status an Tag +100 oder im Verlauf eine 31%-ige Wahrscheinlichkeit noch kein Rezidiv zu haben bzw. noch am Leben zu sein. Bei den MRD-negativen Patienten hingegen betrug diese Wahrscheinlichkeit zum selben Zeitpunkt 78% (Grafik 16).



Grafik 16: Wahrscheinlichkeit für Rezidiv-freies Überleben bei Patienten mit bekanntem MRD-Status in der Verlaufsperiode nach Tag 100 nach Transplantation

Rote Linie: Patienten, die im Laufe der Follow-up-Untersuchungen negative MRD-Werte hatten.

Blaue Linie: Patienten, die zum Zeitpunkt Tag 100 nach SZT entweder bereits einen positiven MRD-Status hatten oder während der Follow-up-Periode von negativem auf positiven MRD-Status wechselten.

#### 4.3 Subgruppenanalyse

Alle vorbeschriebenen Analysen wurden hinsichtlich des Remissionsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation untersucht.

Die Patientenkohorte wurde in zwei Untergruppen unterteilt. In einer Gruppe wurden die Patienten zusammengefasst, die sich zum Zeitpunkt der Transplantation in Remission befanden und rezidivfrei in die Transplantation gingen. Im Weiteren wird diese Gruppe als Gruppe A bezeichnet. Die Analyseergebnisse aus dieser Gruppe werden im Folgenden dargelegt. Die andere Untergruppe bezieht nur die Patienten mit ein, die zum Zeitpunkt der Transplantation ein Rezidiv der Leukämie hatten oder die refraktär auf die vorangegangene Therapie waren. Es werden nun die statistisch signifikanten Ergebnisse dargestellt.

##### 4.3.1 Patienten in kompletter Remission zum Zeitpunkt der Transplantation

Die univariate Cox-Analyse für die Remissions-Gruppe (n=37) zeigte lediglich für den Medianwert der Leukozytenanzahl an Tag 100 nach Stammzelltransplantation ein

statistisch signifikantes Ergebnis hinsichtlich des Rezidiv-freien Überlebens ( $p=0,049$ ,  $HR=1,288$ ) und des Endpunktes Rezidiv ( $p=0,043$ ,  $HR=1,427$ ).

#### 4.3.2 Patienten ohne Remission zum Zeitpunkt der Transplantation

Patienten, die in diese Analysen mit einbezogen wurden, waren zum Zeitpunkt der Stammzelltransplantation nicht in Remission, sondern wurden als therapierefraktär eingestuft oder hatten bereits ein Rezidiv ( $n=95$ ). Im Weiteren wird diese Patientengruppe als Gruppe B bezeichnet.

##### 4.3.2.1 NPM1-Mutationsstatus

Die univariaten Cox-Analysen zeigten, dass Patienten aus dieser Gruppe mit positiver NPM1-Mutation ein längeres Rezidiv-freies Überleben haben, als Patienten ohne NPM1-Mutation ( $p=0,042$ ,  $HR=0,0524$ ,  $n=73$ ) (Tabelle 12).

##### 4.3.2.2 Verwandtschaftsgrad des Spenders

Es wurde in dieser Patientengruppe getestet, ob sich der Verwandtschaftsgrad des Spenders auf den Krankheitsverlauf auswirkt. Hier ergaben die univariaten Cox-Analysen statistisch signifikante Ergebnisse im Hinblick auf das Rezidiv-freie Überleben ( $p=0,024$ ,  $HR=0,549$ ,  $n=95$ ). Patienten mit Stammzellspenden von einem verwandten Spender haben demnach eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für Rezidiv-freies Überleben, als Patienten mit unverwandten Spendern. In der multivariaten Cox-Analyse bestätigten sich diese Ergebnisse jedoch nicht.

##### 4.3.2.3 Stammzellquelle

In der Patientengruppe B ergaben sich bezüglich der Stammzellquelle hinsichtlich des Rezidiv-freien Überlebens und des Gesamtüberlebens statistisch signifikante Ergebnisse (RFS:  $p<0,0001$ ,  $HR=0,037$ ,  $n=81$ ; OS:  $p<0,0001$ ,  $HR=0,008$ ,  $n=81$ ). Das bedeutet, dass Patienten, die Stammzellen aus dem Knochenmark erhalten haben, eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für Rezidiv-freies Überleben und Gesamtüberleben haben.

##### 4.3.2.4 T-Zell-Chimärismus an Tag +30 nach allogener Stammzelltransplantation

Die Analysen bezüglich des T-Zell-Chimärismuswerten an Tag +30 nach Stammzelltransplantation (Schwellenwert bei 90%) ergaben hinsichtlich des Rezidiv-freien Überlebens statistisch signifikante Ergebnisse ( $p=0,015$ ,  $HR=6,153$ ,  $n=73$ ). Das bedeutet,

dass Patienten mit einem Chimärismuswert über 90% eine höhere Wahrscheinlichkeit für Rezidiv-freies Überleben haben, als Patienten mit Chimärismuswerten  $\leq 90\%$ .

#### 4.3.2.5 MRD-Status an Tag +100 nach Stammzelltransplantation

Der MRD-Status an Tag +100 nach Stammzelltransplantation wurde auch mit der univariaten Cox-Analyse untersucht. Hierbei ergab sich eine statistische Signifikanz der Ergebnisse bezüglich des Rezidiv-freien Überlebens ( $p=0,025$ ,  $HR=2,511$ ,  $n=51$ ) und des Endpunktes Rezidiv ( $p=0,005$ ,  $HR=4,354$ ,  $n=49$ ). Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation nicht in Remission waren und deren MRD-Status an Tag +100 nach Transplantation positiv war, haben ein höheres Risiko ein Rezidiv zu bekommen, als Patienten, deren MRD-Status an Tag 100 nach Transplantation negativ war.

Für den MRD-Status an Tag 100 ergaben sich auch in der multivariaten Cox-Analyse statistisch signifikante Ergebnisse. Als Kovariablen wurden hier der Spenderstatus und die Thrombozytenanzahl an Tag +100 einbezogen. Es ergaben sich für alle drei Kovariablen statistisch signifikante Ergebnisse im Hinblick auf das Rezidiv-freie Überleben (Spender verwandt vs. unverwandt:  $p=0,01$ ,  $HR=0,327$ ; MRD Status Tag +100:  $p=0,001$ ,  $HR=5,4$ ; Thrombozytenanzahl Tag +100:  $p<0,0001$ ,  $HR=6,984$ ). Die Fallzahl bei dieser Analyse betrug  $n=50$ . Hinsichtlich des Rezidiv-freien Überlebens waren die Patienten im Vorteil, die die Stammzellen von einem verwandten Spender erhielten, MRD-negativ an Tag +100 waren und Thrombozytenzahlen  $>50.000/\mu\text{l}$  an Tag +100 hatten. Auch hinsichtlich des Gesamtüberlebens und des Endpunktes Rezidiv wurden in dieser Analyse statistisch signifikante Ergebnisse erzielt. So hatten Patienten mit negativem MRD-Status und mit Thrombozytenzahlen  $>50.000/\mu\text{l}$  an Tag +100 eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit hinsichtlich des Gesamtüberlebens. Die Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu bekommen war für diese Patienten geringer (OS: MRD Status Tag +100:  $p=0,017$ ,  $HR=2,991$ ; Thrombozytenanzahl Tag+100:  $p=0,001$ ,  $HR 5,347$ ;  $n=50$ ; Rezidiv: MRD Status Tag +100:  $p<0,0001$ ,  $HR=10,227$ ; Thrombozytenanzahl Tag +100:  $p=0,004$ ,  $HR=7,546$ ;  $n=48$ ).

#### 4.3.2.6 Thrombozytenanzahl an Tag +100 nach allogener Stammzelltransplantation

Die Anzahl der Thrombozyten als binäre Variable wurde in Gruppe B auch im univariaten Cox-Modell analysiert. Hierbei wurden Thrombozytenwerte  $\geq 50.000/\mu\text{l}$  und  $< 50.000/\mu\text{l}$  unterschieden. Diese Analysen ergaben hinsichtlich aller drei Endpunkte statistisch signifikante Ergebnisse. Patienten mit Thrombozytenwerten  $\geq 50.000/\mu\text{l}$  hatten eine höhere Wahrscheinlichkeit für Rezidiv-freies und Gesamtüberleben, sowie eine geringere



Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu erleiden (RFS:  $p=0,001$ ,  $HR=3,663$ ,  $n=60$ ; OS:  $p=0,002$   $HR=3,610$ ,  $n=60$ ; Rezidiv:  $p=0,02$ ,  $HR=3,269$ ,  $n=60$ ). Auch in der multivariaten Cox-Analyse ergaben sich bezüglich dieser Variablen und allen drei Endpunkten Ergebnisse von statistischer Signifikanz (siehe Kapitel 4.3.2.5).

#### 4.3.2.7 Zeit zwischen Transplantation und erstem negativem MRD-Wert

Die Zeit zwischen Transplantation und erstem negativem MRD-Wert in Monaten wurde mittels univariater und multivariater Cox-Analyse analysiert. Die mediane Zeit zwischen Rezidiv und erstem negativem MRD-Wert betrug 1,03 Monate. In der univariaten Analyse waren die Ergebnisse bezüglich des Rezidiv-freien und des Gesamtüberlebens statistisch signifikant (RFS:  $p=0,045$ ,  $HR=0,747$ ,  $n=63$ ; OS:  $p=0,049$ ,  $HR=0,75$ ,  $n=63$ ). In der multivariaten Analyse ergaben sich keine statistisch relevanten Resultate.

Alle Ergebnisse der uni- und multivariaten Cox-Analysen für die Patientengruppe B sind Tabelle 12 zu entnehmen.

**Tabelle 12: Ergebnisse der uni- und multivariaten Cox-Regression für Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation nicht in Remission waren**

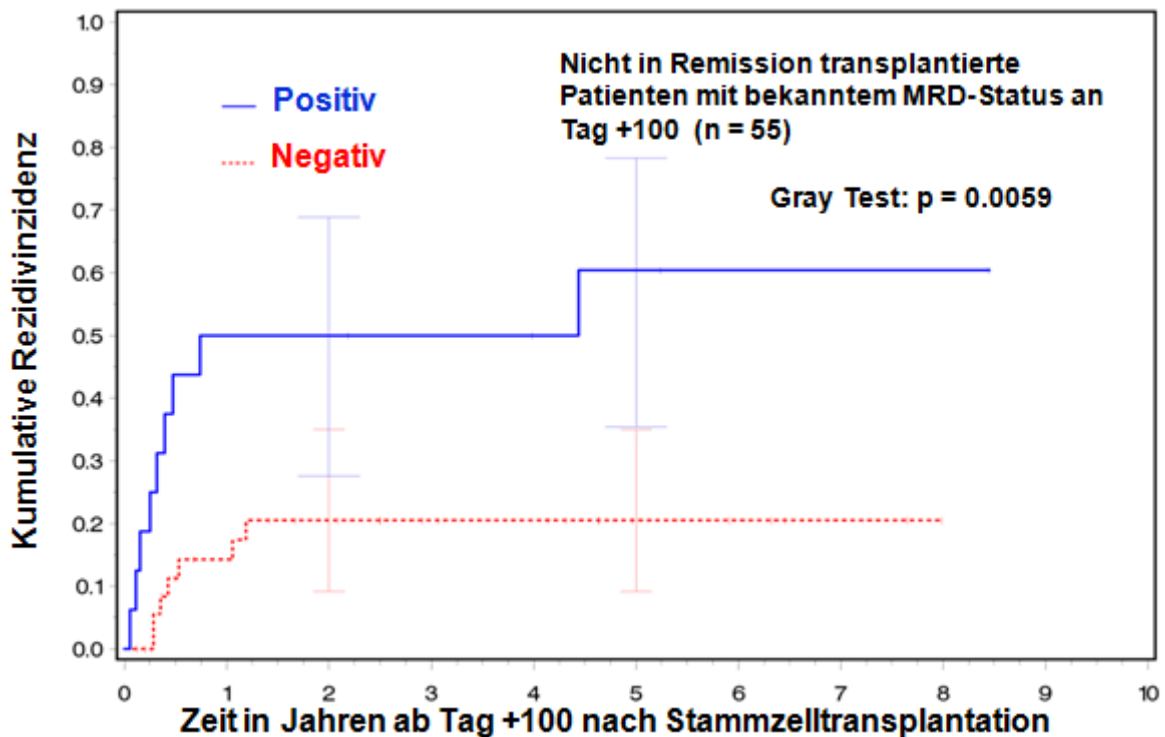
Variable	RFS			OS			Rezidiv ja/nein		
	N=	HR (95% KI)	P	N=	HR (95% KI)	P	N=	HR (95% KI)	P
<i>Univariate Analysen</i>									
<b><i>NPM1</i>-Mutation (negativ vs. positiv)</b>	73	<b>0,524 (0,281-0,978)</b>	<b>0,042</b>	73	0,606 (0,318-1,158)	0,130	71	0,507 (0,228-1,126)	0,095
<b>Spender (verwandt vs. unverwandt)</b>	95	<b>0,549 (0,327-0,923)</b>	<b>0,024</b>	95	0,591 (0,346-1,009)	0,054	95	0,597 (0,308-1,156)	0,126
<b>Stammzellquelle (KM vs. Peripher)</b>	81	<b>0,037 (0,007-0,209)</b>	<b>&lt;0,0001</b>	81	<b>0,008 (0,001-0,089)</b>	<b>&lt;0,0001</b>	81	20,783 (0,0-4,571E+16)	0,866
<b>T-Zell-Chimärismus Tag +30 (Schwellenwert bei 90%)</b>	73	<b>6,153 (1,431-26,466)</b>	<b>0,015</b>	73	2,167 (0,515-9,120)	0,291	72	4,611 (0,603-35,276)	0,141
<b>MRD-Status an Tag +100 (negativ vs. positiv)</b>	51	<b>2,511 (1,126-5,602)</b>	<b>0,025</b>	51	2,197 (0,962-5,019)	0,062	<b>49</b>	<b>4,354 (1,575-12,039)</b>	<b>0,005</b>

Thrombozytenanzahl an Tag +100 ( $<50.000/\mu\text{l}$ vs. $\geq 50.000/\mu\text{l}$ )	60	3,663 (1,726-7,775)	0,001	60	3,610 (1,588-8,207)	0,002	60	3,269 (1,203-8,886)	0,020
Zeit zwischen SZT und 1. negativem MRD-Wert in Monaten	63	0,747 (0,562-0,994)	0,045	63	0,75 (0,563-0,999)	0,049	62	0,774 (0,549-1,090)	0,142
Multivariate Analysen									
Spender (verwandt vs. unverwandt)	50	0,327(0,139-0,769)	0,01	50	0,566(0,24-1,336)	0,194	48	0,512 (0,159-1,650)	0,262
MRD-Status an Tag +100 (positiv vs. negativ)		5,4 (2,088-13,964)	0,001		2,991 (1,221-7,325)	0,017		10,227 (2,829-36,973)	$<0,0001$
Thrombozytenanzahl an Tag +100 ( $<50.000/\mu\text{l}$ vs. $\geq 50.000/\mu\text{l}$ )		6,984 (2,701-18,06)	$<0,0001$		5,347 (2,013-14,2)	0,001		7,546 (1,914-29,748)	0,004

#### 4.3.2.8 Kumulative Rezidivinzidenz

Für die Subgruppe der Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation nicht in Remission waren, führten wir ebenfalls Analysen mittels des Fine-and-Gray-Tests durch. Hier wurde ebenfalls das Auftreten eines Rezidivs als Ereignis und das Eintreten des Todes als konkurrierendes Risiko gewertet. Bei den univariaten Analysen in dieser Konstellation ergab sich nur die Variable MRD-Status an Tag +100 als statistisch signifikant ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ). Die Fallzahl für diese Analysen mit dieser Kohorte betrug  $n=78$ .

Für die Patientengruppe B, für die nicht in Remission transplantierten Patienten, wurde ebenfalls die kumulative Rezidivinzidenz ermittelt und grafisch dargestellt (Grafik 17). Hier betrug die Fallzahl  $n=55$ . Bei diesen Analysen ergab sich für die MRD-positiven Patienten an Tag +100 nach zwei Jahren eine Wahrscheinlichkeit von 50% (KI: 28%-69%) für das Auftreten eines Rezidivs. Für Patienten mit negativem MRD-Status an Tag +100 ergab sich eine Wahrscheinlichkeit von 20% (KI: 9%-35%) ein Rezidiv zu bekommen. Das bedeutet, dass Patienten, deren Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation nicht leukämiefrei war und die zusätzlich einen positiven MRD-Status hatten, ein deutlich höheres Risiko für das Auftreten eines Rezidivs hatten, als Patienten mit negativem MRD-Status. Die Analysen in dieser Gruppe ergaben ein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p=0,0059$ ) (siehe Grafik 17).



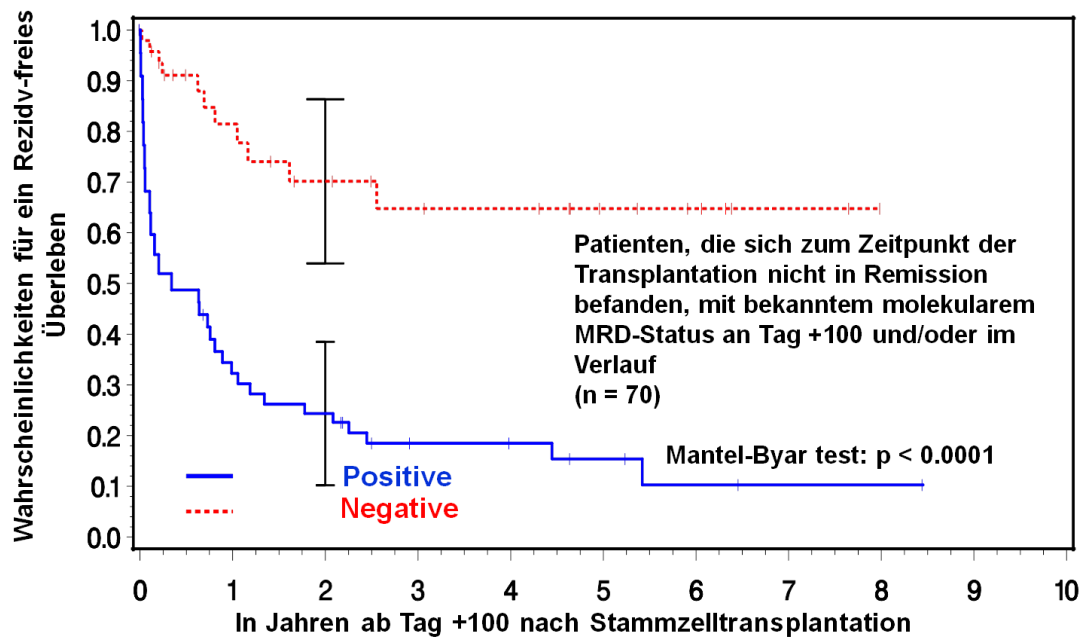
Grafik 17: Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs bei Patienten der Gruppe B

#### 4.3.2.9 Analysen nach dem Mantel-Byar- und Simon-Makuch-Test

Die Daten der Subgruppe wurden in einer zweiten Analyse mittels des Mantel-Byar-Tests analysiert. In Gruppe B dieser Kohorte betrug die Fallzahl  $n=70$ . Bei diesen Analysen ergaben sich folgende Ergebnisse: 38 Patienten dieser Gruppe waren schon zu Beginn MRD positiv oder wechselten im Verlauf von negativ zu positiv. 28 von diesen 38 Patienten hatten im Laufe der Zeit ein Ereignis (entweder Tod oder Rezidiv). 10 der MRD-positiven Patienten wurden ohne Ereignis zensiert. 32 Patienten aus dieser Gruppe hatten während der gesamten Beobachtungsperiode einen negativen MRD-Status. 11 aus den 32 MRD-negativen Patienten hatten ein Ereignis (Tod oder Rezidiv). 21 aus den 32 MRD-positiven Patienten wurden ohne Ereignis zensiert. Die Analyseergebnisse dieser Kohorte sind in Grafik 18 als Simon-Makuch-Kurve dargestellt.

Die MRD-negativen Patienten hatten zwei Jahre nach Tag +100 eine Wahrscheinlichkeit von 70% (KI: 54%-86%), dass noch kein Rezidiv eingetreten ist. Für die MRD-positiven Patienten dieser Gruppe liegt die Wahrscheinlichkeit nach zwei Jahren nach Tag +100 noch kein Rezidiv bekommen zu haben bei nur 24% (KI: 10%-38%). Diese Analysen mittels des Mantel-Byar-Tests sind mit einem p-Wert von  $<0,0001$  statistisch signifikant.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass MRD-Positivität an Tag +100 bzw. der Wechsel von negativem zu positivem MRD-Status während der Follow-up-Periode ein schlechter prognostischer Faktor im Hinblick auf das Auftreten eines Rezidivs oder das Eintreten des Todes ist.



Grafik 18: Wahrscheinlichkeit für Rezidiv-freies Überleben bei Patienten mit bekanntem MRD-Status in der Verlaufsperiode nach Tag 100 nach Stammzelltransplantation, die nicht in Remission transplantiert wurden

Durchgezogene Linie: Patienten, die entweder von vorne herein einen positiven MRD-Status hatten oder im Verlauf von negativem zu positivem MRD-Status wechselten

Gepunktete Linie: negativer MRD-Status während gesamtem Beobachtungszeitraum

## 5 Diskussion

Trotz des heutigen Wissensstands und der fortschrittlichen Therapiemöglichkeiten kann es bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie nach allogener Stammzelltransplantation zu einem Erkrankungsrezidiv kommen. Es konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass die MRD-Diagnostik mittels RT-PCR einen prädiktiven Wert bezüglich des Outcomes nach allogener Stammzelltransplantation hat. So ist es möglich ein Rezidiv schon früher als bisher zu erkennen und der Krankheit entgegen zu wirken, bevor sie sich voll ausbreiten kann.

### 5.1 Fallzahl

Die Anzahl der bislang publizierten Studien, die MRD-Monitoring bei AML-Patienten nach allogener Stammzelltransplantation untersucht haben ist gering. Zudem wird die MRD oft mittels Multiparameter Flowzytometrie (MFC) bestimmt und nicht mittels RT-PCR. Die MFC ist kostengünstiger und rasch umsetzbar, ist aber weniger sensitiv. Die Methode der RT-PCR ist zeitlich und finanziell aufwendiger, liefert aber sensitivere und spezifischere Ergebnisse. Zumeist werden bei Studien zum MRD-Monitoring nach Stammzelltransplantation nur wenige molekulare MRD-Marker untersucht. In den Untersuchungen dieser Arbeit konnten 144 AML-Patienten eingeschlossen werden, die alle den Nachweis für einen molekularen MRD-Marker erbrachten und eine allogene Stammzelltransplantation erhalten hatten. Die Fallzahl der ausgewerteten Patientendaten von insgesamt n=498 Patienten, ist verglichen mit anderen AML-Studien hoch. Andere vergleichbare Studien wie, Appelbaum et al., 2013, analysierten nur 253 Patienten mit AML nach allogener Stammzelltransplantation, davon hatten 54 einen MRD Marker nachgewiesen. Analysiert wurden in dieser Studie die minimale Resterkrankung (MRD) mittels Multiparameter Flowzytometrie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). [53]

In der Multi-Center Studie AML02 von Inaba, Coustan-Smith et al., 2012, wurden Knochenmarksproben von 238 Kindern und Jugendlichen zytomorphologisch und mittels MFC untersucht. Nur 77 Patienten waren positiv für einen MRD-Marker. Untersucht wurden insgesamt nur wenige MRD-Marker und die Bestimmung der minimalen Resterkrankung erfolgte zum größten Teil mittels MFC. Die Fallzahl von n=238 bzw. n=77 ist ebenfalls erheblich geringer, als die Anzahl der im Rahmen dieser Dissertation ausgewerteten Patienten. Die Kinder wurden nicht regelhaft einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen. Inaba, Coustan-Smith et al. konnten in ihrer Studie die hohe Sensitivität der Untersuchungen mittels RT-PCR bestätigen. [54]

Die Fallzahlen der bisher publizierten Studien bei adulten AML Patienten, mit MRD Bestimmung mittels molekularen Markern nach allogener Stammzelltransplantation, sind ebenfalls kleiner. In der Studie von Lange, Hubmann et al., 2011, wurden u.a. 68 Patienten mit AML untersucht. Als molekularer MRD-Marker wurde hier die krankheitsunspezifische WT1-Überexpression mittels RT-PCR bestimmt. Auch in anderen Studien konnten keine hohen Fallzahlen publiziert werden [Goswami], insbesondere mit krankheitsspezifischen molekularen MRD-Markern [Bacher]. [55, 56, 57]

## 5.2 MRD-Messungen als Prognoseparameter

Die Bestimmung der MRD im Krankheitsverlauf wurde hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft untersucht. Bei Patienten mit positivem MRD-Status an Tag +100 nach Stammzelltransplantation besteht eine kumulierte Wahrscheinlichkeit von 47%, an einem Rezidiv zu erkranken. Bei MRD-negativen Patienten zum selben Zeitpunkt betrug diese Wahrscheinlichkeit nur 13%. Die Fallzahl dieser Berechnungen betrug n=87 (siehe Kapitel 4). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Bestimmung der MRD-Last der molekulargenetischen Marker durch RT-PCR bei AML-Patienten zum Zeitpunkt Tag +100 nach Transplantation sinnvoll für die Erkennung eines Erkrankungsrezidivs ist. Patienten mit positivem MRD-Status an Tag +100 hatten insgesamt eine schlechtere Prognose. Im Median traten die Rezidive nach 6,9 Monaten ein. Das bedeutet, dass eine Erkennung eines möglichen Rezidivs durch eine positive MRD-Last an Tag +100 früh genug ist, um etwaige Schritte gegen die wiederkehrende Erkrankung einzuleiten. Zu bedenken ist, dass es natürlich auch Patienten mit positiver MRD zu diesem Zeitpunkt gibt, die später kein Rezidiv bekommen.

In der Studie von Yin, O'Brien et al., 2012, wurden 278 Patienten mit Core-binding-Factor (CBF)-AML untersucht. Diese Patienten wurden nicht stammzelltransplantiert. Bei dieser Studie ging es darum, an Hand der MRD-Last im Verlauf nach Abschluss der Therapie ein Rezidiv erkennen zu können. Es wurden bestimmte Schwellenwerte für die Fusionstranskripte von RUNX1-RUNX1T1 und inv(16) ermittelt, deren Überschreiten in allen Fällen mit dem Auftreten eines hämatologischen Rezidivs assoziiert war. Nach Yin, O'Brien et al. können CBF-AML Patienten mit hohem Risiko für ein Rezidiv durch regelmäßige Bestimmung der MRD-Last durch RT-PCR identifiziert werden. Die Autoren schlagen die MRD-Bestimmung in CBF-AML mittels RT-PCR nach Induktionstherapie, während der Konditionierungstherapie und im Verlauf während der ersten 18 Monate nach



Krankheitsbeginn im Drei-Monats-Intervall vor. Ihrer Meinung nach sollte man die MRD-Last im Verlauf im Blut und im Knochenmark bestimmen. [58]

Nach Dominietto, 2011, empfiehlt es sich, die MRD nach allogener Stammzelltransplantation früh und in hoher Frequenz zu bestimmen, nämlich im ersten Jahr nach Stammzelltransplantation monatlich. Diese Maßnahmen sollen helfen, Patienten mit hohem Risiko für ein Rezidiv der Erkrankung zu erkennen. In der Studie im Rahmen dieser Dissertation wurde der Status der MRD an Tag +30 nach Stammzelltransplantation im Hinblick auf das Eintreten eines Rezidivs, das Gesamtüberleben und das Rezidiv-freie Überleben untersucht. Dabei war das Vorliegen positiver MRD-Marker zu diesem Zeitpunkt nicht hinweisend für das Auftreten eines Rezidivs. [11]

In dem Review von Hokland und Ommen, 2011, werden Empfehlungen für die zeitlichen Intervalle der MRD-Untersuchungen nach Konsolidierung der AML in Abhängigkeit vom MRD-Marker vorgeschlagen. Die Behandlung der AML schließt hier nicht zwangsläufig eine allogene Stammzelltransplantation ein. Die von den Autoren vorgeschlagenen Zeitpunkte zur MRD-Bestimmung beginnen nach Erreichen einer Remission der vorbestehenden AML. Alle MRD-Untersuchungen sollten mittels RT-PCR erfolgen. Durch diese regelmäßigen MRD-Bestimmungen, soll ein molekulares Rezidiv möglichst früh erkannt werden. Der MRD-Status vor Transplantation zeigte in der hier vorgelegten Studie hinsichtlich keiner der untersuchten Endpunkte ein statistisch signifikantes Ergebnis. Bei Appelbaum et al., 2013, hingegen, war ein MRD-positiver Status vor Transplantation hinweisend für ein kürzeres Gesamtüberleben. Die MRD (hier Leukemia-associated-Immunophenotypes) wurde in der Studie von Appelbaum mittels Multiparameter-Flow-Cytometry bestimmt und nicht mittels RT-PCR. [53, 59]

In der Studie von Shayegi, Kramer et al., 2013, wurden 155 AML-Patienten hinsichtlich der MRD nach Abschluss der Therapie untersucht. Der einzige MRD-Marker, der hier untersucht wurde, war die Mutation im NPM1-Gen. 40 Patienten erhielten eine allogene und 19 eine autologe Stammzelltransplantation. Alle Patienten befanden sich nach Abschluss der Therapie in Remission. Die Bestimmung der MRD-Last erfolgte mittels RT-PCR. Die Kohorte der Patienten, die eine allogene oder autologe Stammzelltransplantation erhielten (n=59) wurde getrennt untersucht. Aus diesen Analysen ergab sich, dass die kumulative Rezidivinzidenz mit ansteigender MRD-Last größer wird. Wenn die NPM1-Mutations-Last eine Schwelle von >10% erreicht hat, ist das Gesamtüberleben und das Krankheits-freie Überleben signifikant schlechter. Die Bestimmung der NPM1-Mutations-Last als MRD ist eine interessante Methode, da die NPM1-Mutation bei AML-Patienten

sehr häufig ist, und weil ein Anstieg dieses Markers ein Rezidiv ziemlich zuverlässig voraussagen scheint. Diese Ergebnisse wurden durch die hier vorgelegte Studie bestätigt. Allerdings wurden hier nur Patienten mit allogener Stammzelltransplantation betrachtet. Autolog transplantierte Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen. [60]

Grunwald, Tseng et al., 2014, untersuchten 54 AML-Patienten mit einer *FLT3-ITD* (= *FLT3-LM*), die in Remission stammzelltransplantiert wurden. 28 Patienten kamen zur MRD-Untersuchung nach Stammzelltransplantation in Frage. Bei 7 von diesen 28 Patienten wurde die MRD detektiert. [61]

In der Studie von Krönke, Schlenk et al., 2011, wurden Knochenmark- und Blutproben von 245 AML-Patienten mittels RT-PCR auf eine *NPM1*-Mutation hin untersucht. Von diesen 245 Patienten erhielten 80 eine allogene Stammzelltransplantation. Nach 48 Monaten betrug die kumulative Rezidivinzidenz bei den Patienten, die nach Abschluss der Therapie *NPM1*-negativ waren, 15,7%. Bei den *NPM1*-positiven Patienten betrug sie 66,5%. Das Gesamtüberleben der *NPM1*-negativen Patienten lag bei 80% gegenüber 44% bei den *NPM1*-positiven Patienten. Die Ergebnisse von Krönke, Schlenk et al. werden durch die im Rahmen dieser Dissertation ermittelten Ergebnissen bestätigt. [36]

### 5.3 Chimärismusanalysen

Neben den molekulargenetischen MRD-Messungen wird routinemäßig der Chimärismus im Verlauf nach Transplantation bestimmt. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Werte des Gesamtchimärismus und des T-Zell-Chimärismus an Tag +30 und +100 nach allogener Stammzelltransplantation bei 144 AML-Patienten hinsichtlich des Gesamtüberlebens, des Rezidiv-freien Überlebens und des Auftretens eines Rezidivs analysiert. Es wurden verschiedene klinisch sinnvolle Schwellenwerte für Gesamtchimärismus und T-Zell-Chimärismus gewählt. Keine der statistischen Berechnungen ergab ein signifikantes Ergebnis. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Chimärismusanalysen bei gleichgeschlechtlicher Transplantation mittels PCR der Short Tandem Repeats (STR) und bei gegengeschlechtlicher Transplantation mittels FISH-Analyse durchgeführt. Diese Methoden entsprechen dem Standard der Chimärismusanalysen. Die Analyse des Gesamtchimärismus ist nicht so aussagekräftig wie die Chimärismusuntersuchung in einer bestimmten Leukozytenpopulation. [22, 62, 63]

Tang, Alatrash et al., 2014, zeigten in ihrer Studie mit 165 AML- und 41 MDS-Patienten, dass ein kompletter (100%-iger) Spender-Chimärismus und ansteigende

Chimärismuswerte der Spender-T-Zellen signifikant ein längeres Gesamtüberleben nach allogener Stammzelltransplantation voraussagen. Sinkende T-Zell-Chimärismuswerte hingegen, waren mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert. Ein hoher prozentualer Anteil an myeloischen Spender-Zellen an Tag +90 nach Transplantation hatte eine positive Auswirkung auf das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben. Hohe Anzahlen von Spenderchimärismus in myeloischen Zellen oder in T-Zellen an Tag +60 nach Transplantation hatten einen günstigen Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben, aber nicht auf das Gesamtüberleben. [64]

Barrios, Jiménez-Velasco et al. untersuchten 2003 den Chimärismusstatus nach allogener Stammzelltransplantation als prognostischen Marker für das Auftreten eines Rezidivs bei 133 Patienten mit Akuter Leukämie (ALL und AML). 29 Patienten hatten nach der Stammzelltransplantation ansteigende Chimärismuswerte und bekamen im Median 74 Tage nach Transplantation ein Rezidiv. Die übrigen Patienten hatten entweder abfallende Chimärismuswerte oder einen kompletten Spender-Chimärismus und bekamen kein Rezidiv. Diese Ergebnisse zeigten, dass die regelmäßige Bestimmung der Chimärismuswerte ein Rezidiv vorhersagen kann. [65]

Nach der Studie von Bornhäuser, Oelschlaegel et al., 2009, war die Bestimmung von Spenderchimärismus in CD34-positiven Zellen hinweisend für ein drohendes Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation. Es wurden 90 Patienten mit CD34-positiver AML, MDS oder ALL, die alle eine allogene Stammzelltransplantation erhalten hatten, in die Studie mit einbezogen. Patienten, bei denen der CD 34-positive Spender-Chimärismus unter 80% lag hatten eine signifikant höhere Inzidenz für das Auftreten eines Rezidivs verglichen mit den Patienten, deren Spender-Chimärismuswerte über 80% lagen. Außerdem bedingte ein Chimärismus über 80% eine signifikant geringere Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs oder des Todes. [66]

Die fehlende prognostische Aussagekraft der Chimärismusuntersuchungen im Rahmen dieser Dissertation könnte dadurch bedingt sein, dass 98,6% der Patienten eine Konditionierungstherapie mit reduzierter Intensität erhielten. Bei diesem Schema werden durch die geringere Intensität nicht alle Empfängerzellen (und damit auch Leukämiezellen) im Knochenmark vernichtet, wie es bei myeloablativen Konditionierungstherapien der Fall ist. Wenn von Beginn an noch hämatologische Zellen des Empfängers vorhanden sind, kann es über eine längere Zeit zu einem „mixed chimerism“ kommen, bis der „graft-versus-leukemia (GvL) Effekt“ alle Empfängerzellen verdrängt. Dieser GvL Effekt kann potentiell durch Spenderlymphozyten verstärkt werden. Eine weitere Ursache für die fehlende

Signifikanz der hier durchgeführten Chimärismusanalysen könnte das hochselektierte Patientengut sein. Alle Patienten haben eine AML und sind positiv für mindestens einen MRD-Marker und stellen somit nur einen kleinen Ausschnitt des breiten Spektrums der stammzelltransplantierten Patienten dar.

#### 5.4 Thrombozytenanzahl

Ein weiterer prognostischer Verlaufsparemeter ist der Verlauf der Thrombozytenzahl nach allogener Stammzelltransplantation.

In dieser Dissertation wurden unter anderem Analysen zum Thrombozytenwert an Tag +100 nach Transplantation durchgeführt. Patienten hatten mit einer Thrombozytenanzahl unter 50.000/ $\mu$ l eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs. In der multivariaten Cox-Analyse hatte diese Patientengruppe ein kürzeres Gesamtüberleben und Rezidiv-freies Überleben als Patienten mit Thrombozytenwerten über 50.000/ $\mu$ l. Die Bestimmung der Thrombozyten im Blut ist eine kostengünstige und schnelle Methode. In Zusammenschau mit dem Vorliegen einer *NPM1*-Mutation, dem MRD-Status an Tag +100 nach Transplantation, dem Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation, dem HLA-Status und der Einteilung nach der ELN-Klassifikation, konnten sogar Aussagen über das Gesamtüberleben und das Rezidiv-freie Überleben getroffen werden.

In der Studie von Lange, Hubmann et al. wurde ebenfalls die Thrombozytenanzahl hinsichtlich des Auftretens eines Rezidivs bis vier Monate nach Transplantation, des Rezidiv-freien Überlebens und des Gesamtüberlebens untersucht. Weder ein Thrombozytenwert unter 100.000/ $\mu$ l noch unter 50.000/ $\mu$ l waren in der univariaten Cox-Analyse statistisch signifikant für einen der drei beschriebenen Endpunkte. Ein über 50%-iger Abfall der Thrombozytenanzahl bis Tag +112 nach Transplantation war mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. Die kleinere Patientenanzahl, verglichen mit der im Rahmen dieser Studie analysierten Kohorte, könnte eine Erklärung für die fehlende statistische Signifikanz in der Analyse der Thrombozytenzahl <50.000/ $\mu$ l sein. Es ist anzumerken, dass Patienten, die Thrombozytentransfusionen nach der Stammzelltransplantation als supportive Therapie erhielten, die Meßergebnisse der Thrombozytenanzahl im Blut verfälscht sein können. [56]

### 5.5 Zeitpunkte der MRD-Messungen

Bezüglich der Zeitpunkte für eine optimale MRD-Bestimmung im Verlauf einer AML schlagen Döhner, Estey et al., 2010, vor, Blutproben alle 1 bis 3 Monate innerhalb der ersten zwei Jahre und im Verlauf alle 3 bis 6 Monate zu untersuchen. [67]

Die optimalen Zeitpunkte für die MRD-Bestimmung nach Beendigung der Therapie einer AML im Verlauf sind zu diskutieren. Die MRD-Last steigt in Abhängigkeit vom MRD-Marker bei drohendem Rezidiv unterschiedlich schnell an. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die MRD-Last im weiteren Verlauf nach Tag +100 bei jedem Patienten zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt und mit individuellen Intervallen bestimmt. Einzig die Probenentnahmen an Tag +30 und +100 nach Stammzelltransplantation waren regelhaft. Hier konnte nachgewiesen werden, dass die Bestimmung der MRD an Tag +100 nach Stammzelltransplantation prognostisch relevant ist. Dieser Zeitpunkt sollte regelhaft bei allen Patienten, die eine allogene Stammzelltransplantation erhalten, eingehalten werden. [68]

### 5.6 Prognoseeinschätzung nach ELN-Klassifikation und HCT-CI

Bei der AML wurden in den letzten Jahren eine große Anzahl verschiedener prognostischer Faktoren und Scores erarbeitet. Vor allem molekulargenetische Veränderungen in den Leukämiezellen konnten mehrfach als signifikante Prognosefaktoren bestätigt werden. Eine vorliegende *NPM1*-Mutation hat beispielsweise einen prognostisch positiven Effekt. In der Kohorte dieser Dissertation konnte bei 52 der 144 Patienten eine *NPM1*-Mutation nachgewiesen werden. Davon bekamen nur 9 Patienten ein Rezidiv. Das heißt, 43 der *NPM1*-positiven Patienten bekamen kein Rezidiv ihrer AML. Der positive prognostische Effekt einer *NPM1*-Mutation konnte bei dieser Studie bestätigt werden. [9, 69, 70, 71, 72, 67, 73]

Prognoseeinschätzungen wie die ELN-Klassifikation, teilen die Patienten in vier verschiedenen Risikogruppen „Favorable“, „Intermediate-I“, „Intermediate-II“ und „Adverse“ ein (nach ELN-Klassifikation von 2010). In der Auswertung dieser Arbeit konnte die prognostische Aussagekraft der ELN-Klassifikation bestätigt werden. Eine andere Evaluation des Klassifikationssystems des European LeukemiaNet von Alpermann, Kern et al., 2013, bestätigte die Abhängigkeit des Therapieergebnisses von den jeweiligen zytogenetischen und molekulargenetischen Eigenschaften des Patienten. [67, 74]

In der Studie von Oran, Jimenez et al., 2015, wurden 464 AML-Patienten, die alle eine allogene Stammzelltransplantation erhielten, nach zytogenetischen und molekulargenetischen Merkmalen in die vier verschiedenen Gruppen zur Risikostratifizierung des European LeukemiaNetworks von 2010 eingeteilt. Hierbei modifizierten die Autoren diese Einteilung leicht, indem sie Patienten mit zytogenetisch normalem Karyotyp nur hinsichtlich des *FLT3-ITD*-Mutationsstatus einteilten. Patienten mit zytogenetisch normalem Karyotyp (CN-AML) und negativer *FLT3-ITD* wurden der Gruppe „Favorable“ zugeordnet und Patienten mit CN-AML und positiver *FLT3-ITD* gehörten der Gruppe „Intermediate-I“ an. Die Studienkohorte wurde dem Alter nach eingeteilt. 354 Patienten unter 60 Jahren wurden mit 110 Patienten über 60 Jahren verglichen. Hierbei ergab sich, dass die jüngeren Patienten, die den Gruppen „Favorable“ und „Intermediate-II“ zugeordnet waren, einen besseren Ausgang der Erkrankung verzeichneten, als die Patienten, die der Gruppe „Intermediate-I“ zugeordnet waren. Dieses Ergebnis ergänzen die von Döhner et al., 2010, etablierte Einteilung. Insgesamt hatten ältere Patienten in der Studie von Oran, Jimenez et al., 2015, in allen Gruppen, außer der „Intermediate-I“-Gruppe, einen schlechteren Krankheitsverlauf, als die jüngeren Patienten. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass Oran, Jimenez et al. in ihrer Studie den prognostisch günstigeren Krankheitsverlauf bei Patienten aus der „Favorable“-Gruppe bestätigten. Diese Aussage wird durch die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Dissertation erhoben wurden, untermauert. [67, 75]

In einer Studie von Ahn, Kim et al., 2015, wurde bei 121 AML-Patienten mit normalem Karyotyp, die alle eine SCT erhielten, die prognostische Signifikanz des ELN-Klassifikationssystems von Döhner et al., 2010, untersucht. Hierbei ergab sich hinsichtlich des Gesamtüberlebens nach fünf Jahren kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der „Favorable“- und der „Intermediate-I“-Gruppe. Als die Autoren die Patienten ohne *NPM1*-Mutation und ohne *FLT3-ITD* als „Favorable“ klassifizierten, ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Hinblick auf das Gesamtüberleben nach fünf Jahren zwischen den beiden Gruppen. Durch die Überarbeitung des ELN-Klassifikationssystems anhand der in diesen beiden Studien neu erlangten Ergebnisse könnte die Risikoabschätzung bei AML-Patienten nach allogener Stammzelltransplantation noch weiter verbessert werden. [67, 76]

Neben den krankheitsspezifischen Prognoseeinschätzungen gibt es spezielle klinische krankheitsunspezifische Scores, die vor einer allogenen Stammzelltransplantation eine prognostische Einschätzung ermöglichen. Anhand des Haematopoietic Cell

Transplantation-Comorbidity Index (HCT-CI) kann eine Risikoabschätzung für Patienten nach Stammzelltransplantation in Abhängigkeit von Komorbiditäten hinsichtlich des weiteren Krankheitsverlaufs gegeben werden. Die Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit niedrigem Punktwert ist nach dem von Sorrow, Maris et al., 2005, etablierten Score-System höher als für Patienten mit mehreren Begleiterkrankungen und somit höherem Punktwert. Diese Effekte wurden in den statistischen Berechnungen im Rahmen dieser Dissertation nicht untermauert. Die fehlende Signifikanz der durchgeführten Analysen könnte durch das hoch selektierte Patientengut bedingt sein. Es wurden nur Patienten in die Studie mit einbezogen, die positiv für mindestens einen MRD-Marker waren. Das trifft jedoch nur für einen Teil aller AML-Patienten zu. Der Sorrow-Score wird jedoch nicht in Abhängigkeit von MRD-Marker angewendet, sondern dient zur Einteilung aller AML-Patienten, die eine Stammzelltransplantation erhielten. [50]

In der Studie von Nakaya, Mori et al., 2014, wurde die Aussagekraft des HCT-CI untersucht. Es wurden 243 Patienten mit hämatologischen Neoplasien, darunter 102 mit AML, nach Stammzelltransplantation nach dem HCT-CI bewertet. In dieser Kohorte war der Score hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der nicht mit einem Rezidiv assoziierten Mortalität nicht aussagekräftig. Die Autoren etablierten einen neuen „flexiblen HCT-CI“, indem sie Patienten, die 0 bis 3 Punkte erhielten, als Niedrig-Risikogruppe und Patienten mit Punktwerten ab 4 Punkten als Hoch-Risikogruppe klassifizierten. An Hand dieser neuen Einteilung konnte das 2-Jahres-Gesamtüberleben und die nicht mit einem Rezidiv assoziierte Mortalität nach zwei Jahren besser abgeschätzt werden als mit dem Original-Score-System. Die mangelnde Signifikanz der in dieser Studie ermittelten Ergebnisse bezüglich des Sorrow-Scores deckt sich mit den Ergebnissen von Nakaya, Mori et al. [77]

### 5.7 Krankheitsstatus vor Stammzelltransplantation

Der Remissionsstatus vor allogener Stammzelltransplantation war in diesen Analysen hinsichtlich des Gesamtüberlebens, des Rezidiv-freien Überlebens, im Hinblick auf das Auftreten eines Rezidivs und hinsichtlich der kumulativen Rezidivinzidenz signifikant. Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation die hier festgelegten Remissionskriterien erfüllten, hatten also hinsichtlich aller untersuchten Endpunkte eine bessere Prognose als Patienten, die bei Transplantation nicht in Remission waren.

Fiegl et al., untersuchten in ihrer randomisierten Multicenter Phase II Studie die Unterschiede zwischen einer hoch-dosierten Cytarabin-basierten Therapie mit oder ohne Fludarabin bei Patienten mit rezidivierter oder refraktärer AML. Es wurden insgesamt 326

Patienten untersucht. 77 Patienten aus beiden Kohorten erhielten eine allogene Stammzelltransplantation. Die Analysen ergaben, dass Patienten, die in kompletter Remission transplantiert wurden, kein signifikant besseres Überleben zeigten als Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Transplantation nicht in Remission befanden. Das mediane Gesamtüberleben bei Patienten, die in Remission transplantiert wurden, betrug 12 Monate. Patienten, die nicht in Remission transplantiert wurden, überlebten im Median 10 Monate. Diese Ergebnisse von Fiegl et al. spiegeln nicht die Ergebnisse wieder, die im Rahmen dieser Dissertation erlangt wurden. Das könnte zum einen durch das etwas höhere mediane Alter (57 und 52 Jahre gegenüber 48 Jahre) bedingt sein. Zum anderen ist die Fallzahl der transplantierten Patienten um die Hälfte geringer als die hier untersuchte Kohorte. [78]

### 5.8 HLA-Status

Die Analysen bezüglich des HLA-Status zum Zeitpunkt der Transplantation, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, zeigten, dass Patienten mit HLA-identischem Spender nach zwei Jahren eine kumulative Rezidivinzidenz von 15% hatten. Patienten mit einem Stammzellspender, dessen HLA-Status Unterschiede zu dem des Empfängers aufwies, hatten zum selben Zeitpunkt eine kumulative Rezidivrate von 38%. In den Analysen hinsichtlich des Gesamtüberlebens wurden diese Ergebnisse bestätigt. Patienten mit HLA-identischer Spender-Empfänger-Konstellation hatten eine längere Rezidiv-freie Zeit als Patienten mit HLA-differenter Spender-Empfänger-Konstellation.

In der Studie von Ottinger, Ferencik et al., 2003, wurde der Krankheitsverlauf nach Stammzelltransplantation von drei verschiedenen Patientengruppen verglichen. Die eine Gruppe erhielt Stammzellen von einem HLA-identischem Geschwister-Spender, die zweite Gruppe von einem nur teilweise HLA-passendem Familienspender und die dritte Gruppe von einem HLA-passenden unverwandten Spender. Die drei Gruppen unterschieden sich hinsichtlich des Gesamtüberlebens nicht signifikant voneinander. [79]

Valcarcel, Sierra et al., 2011, verglichen den Ausgang nach Stammzelltransplantation bei 789 Patienten, die auf Grund einer AML oder einer ALL transplantiert wurden. 89 Patienten erhielten die Stammzellen von einem unpassenden, verwandten Spender und die anderen 700 Patienten von einem 8/8 HLA-A, -B, -C, und -DRB1 passenden, unverwandten Spender. Diese beiden Patientengruppen zeigten in der univariaten und multivariaten Analyse keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gesamtüberlebens, des krankheitsfreien Überlebens, der Therapie-assoziierten Mortalität, im Hinblick auf ein



Rezidiv oder hinsichtlich des GvHD-Status an Tag +100. Die Patienten, die die Stammzellen von einem unpassenden, verwandten Spender erhielten, hatten eine geringere Rate einer chronischen GvHD nach einem Jahr. Die Autoren empfehlen, wenn es möglich ist, einen unpassenden verwandten Spender gegenüber einem HLA-passenden unverwandten Spender vorzuziehen, da bei ersterem die Inzidenz des Auftretens einer chronischen GvHD verringert ist. Die Prognose ist bei HLA-identischem Geschwisterspender am besten. [80]

Yu, Dai et al., 2014, untersuchten 174 Patienten mit bösartigen hämatologischen Erkrankungen nach allogener Stammzelltransplantation. Die Autoren verglichen 82 Patienten, die ihre Stammzellen von einem HLA-unpassenden, verwandten Spender bekamen, mit 92 Patienten, deren Stammzellen von einem HLA-passenden, unverwandten Spender kamen. Hinsichtlich des Alters, des Geschlechts, Krankheitsart und Krankheitsstatus vor Transplantation gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Inzidenz einer akuten GvHD war in beiden Gruppen ungefähr gleich. Das Auftreten einer chronischen GvHD war in der Gruppe mit HLA-identischem, unverwandtem Spender erhöht. [81]

Die Ergebnisse dieser beiden Studien spiegeln die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Dissertation erlangt wurden, nicht wieder. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass die Patientenkohorte dieser Dissertation nicht hinsichtlich des Verwandtheitsgrads des Spenders unterteilt wurde, sondern nur hinsichtlich HLA-identisch und HLA-different.

### 5.9 Spenderlymphozytengabe

Zusätzliche Spenderlymphozytengaben im Verlauf nach einer allogenen Transplantation werden bei Hochrisikopatienten zur Vermeidung eines Rezidivs eingesetzt. Die Analysen bezüglich des Effektes von Spenderlymphozytengaben (DLI) nach Transplantation ergaben hinsichtlich keiner der untersuchten Endpunkte statistisch signifikante Ergebnisse. Das könnte daran liegen, dass insgesamt nur 31 der hier untersuchten 144 Patienten diese Spenderlymphozyten nach Transplantation erhielten und somit die Patientenanzahl zu gering ist, um ein statistisch signifikantes Ergebnis zu ermitteln. Durch die Gabe von Spenderlymphozyten kann eine verstärkte GvHD ausgelöst werden, weswegen sie oft zurückhaltend gegeben werden. [32]

In der Studie von Yan, Liu et al., 2012, wurden 814 Patienten mit akuten Leukämien nach allogener Stammzelltransplantation untersucht. 56 Patienten bekamen modifizierte DLI mit

oder ohne Immunsuppression. Die kumulative Rezidivinzidenz dieser Patienten war günstiger als in der nicht-DLI Gruppe. In den multivariaten Analysen konnte bestätigt werden, dass der MRD-Status nach Transplantation und die Gabe von Spenderlymphozyten signifikant mit dem Auftreten eines Rezidivs und dem krankheitsfreien Überleben korreliert. Diese Studie legt nahe, dass der Krankheitsverlauf bei MRD-positiven Patienten mit akuten Leukämien durch die modifizierte Gabe von Spenderlymphozyten positiv beeinflusst werden konnte. [82]

In einer Studie von Schmid, Labopin et al., 2007, wurden 399 AML-Patienten retrospektiv analysiert. 171 davon bekamen in ihrem ersten hämatologischen Rezidiv eine Spenderlymphozytengabe. Hier lag das Gesamtüberleben bei den DLI-Patienten nach zwei Jahren bei 21% und bei den Patienten, die keine DLI erhielten, bei nur 9%. Das Gesamtüberleben nach zwei Jahren betrug 56% bei Patienten, die die DLI in Remission erhielten, während Patienten, die die Zellen in Aplasie oder in einem refraktärem Krankheitsstatus bekamen, nur eine 15%-ige Überlebenschance nach zwei Jahren hatten. [30]

So kann man folgern, dass durch die Gabe von Spenderlymphozyten bei Hochrisiko-Patienten, die diese in Remission ihrer Grunderkrankung erhalten, ein positiver Einfluss auf das Gesamtüberleben erzielt werden kann. In der in dieser Dissertation durchgeführten Auswertung wurden die Patienten, die Spenderlymphozyten erhielten, unabhängig vom Remissionsstatus der Leukämie untersucht. Die in der hier dargelegten Analyse fehlende prognostische Aussagekraft der DLI kann durch die geringe Fallzahl (n=31) und das hierfür nicht ausgelegte Studiendesign erklärt werden.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Detektion eines molekulargenetischen Markers für minimale Resterkrankung (MRD) und dem Auftreten eines hämatologischen Rezidiv bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation untersucht. Für diese Analyse wurden die Daten von 498 AML Patienten nach allogener Stammzelltransplantation retrospektiv ausgewertet, wobei 144 Patienten in die Untersuchungen mit einbezogen werden konnten.

Die MRD wurde quantitativ mittels RT-PCR (Real-Time PCR) bestimmt und mit den vorliegenden klinischen Behandlungsergebnissen korreliert. Die Analyse mittels RT-PCR stellt den Goldstandard in der MRD-Diagnostik dar. Diese Methode ist sensitiver aber aufwendiger als Analysen mittels der Multiparameter-Flow-Cytometry, die auch oft zur MRD-Diagnostik genutzt wird.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass der Nachweis eines molekulargenetischen MRD-Markers nach allogener Stammzelltransplantation bei Patienten, die an einer AML erkrankt sind, mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines hämatologischen Rezidivs einhergeht. Die am Tag 100 nach allogener Stammzelltransplantation bestimmten Werte hatten die größte prognostische Aussagekraft. So war der positive Nachweis eines MRD Markers zu diesem Zeitpunkt mit einer signifikant erhöhten Rezidivrate sowie einem signifikant niedrigeren Rezidiv-freien Überleben assoziiert. Somit zeigte sich in der vorliegenden, retrospektiven Untersuchung bei akzeptabler Fallzahl die Detektion einer MRD nach allogener Stammzelltransplantation als prognoserelevant.

Zusätzlich konnte dargelegt werden, dass auch andere, bereits bekannte Faktoren in Zusammenhang mit dem Auftreten eines Rezidivs nach allogener Stammzelltransplantation gebracht werden können. So spielt der Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation für den Krankheitsverlauf eine wesentliche Rolle: Patienten mit Remission der AML hatten erwartungsgemäß ein signifikant besseres Rezidiv-freies Überleben bei geringerer Rezidivinidenz. Weiterhin wurde bestätigt, dass die im Rahmen der geltenden ELN-Klassifikation erhobenen molekulargenetischen und zytomorphologischen Befunde hier in gleicher Weise belastbare Schlüsse auf die Prognose der AML-Erkrankung zulassen. Zudem wurde erneut gezeigt, dass die Thrombozytenanzahl nach allogener Stammzelltransplantation ebenfalls einen prognostisch belastbaren Hinweis auf den Verlauf der Erkrankung geben kann.

Grundsätzlich ist die Thrombozytenzahlbestimmung eine Methode, die einfach und kostengünstig ist; gleichzeitig ist diese schnell durchführbar und ubiquitär verfügbar. In der hier vorgelegten Analyse zeigten Patienten mit Thrombozyten  $>50\,000/\mu\text{l}$  ein signifikant höheres Rezidiv-freies Überleben bei erniedrigter Rezidivinzidenz. Lag der T-Zellchimärismus an Tag +30 nach allogener Stammzelltransplantation bei  $>90\%$  hatten auch diese Patienten ein signifikant besseres Rezidiv-freies Überleben zu erwarten.

Zur MRD-Diagnostik nach allogener Stammzelltransplantation liegen bei Patienten mit AML bisher relativ wenige Daten vor. Die vorliegende Arbeit ergänzt die bisherige Evidenzlage. Sie zeigt aber auch, dass eine einheitliche Vorgehensweise fehlt. Bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML), der akuten promyelozytären Leukämie (APL) und der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) ist die Bestimmung der MRD bereits akzeptierter Standard, während dieser bei der AML noch nicht etabliert ist. Weiterführende, möglichst prospektive Studien zur Ergänzung der Datenlage bezüglich der MRD-Diagnostik bei AML nach allogener Stammzelltransplantation zur Festigung der prognostischen Wertigkeit sind erforderlich.

Unter der Annahme, dass ein Rezidiv der AML durch den Nachweis einer MRD nach allogener Stammzelltransplantation zuverlässig vorhergesagt werden kann, ergibt sich die Vorstellung, dass bereits vor dem Auftreten von Leukämiezellen im Blut oder Knochenmark dem drohenden, hämatologischen Rezidiv frühzeitig entgegengewirkt werden kann. Demnach kann idealerweise durch eine regelmäßige MRD-Überwachung, eine „MRD-getriggerte“, frühzeitige und somit vermutlich effektivere Behandlung ermöglicht werden, die ein manifestes Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation mit konsekutiver infauster Prognose bei Patienten mit AML verhindert.

## 7 Literaturverzeichnis

1. D. A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola and J. W. Vardiman, *The 2016 revision to the world health organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*, Blood **127** (2016), no. 20, 2391-2405.
2. P. J. Fialkow, J. W. Janssen and C. R. Bartram, *Clonal remissions in acute nonlymphocytic leukemia: Evidence for a multistep pathogenesis of the malignancy*, Blood **77** (1991), no. 7, 1415-1417.
3. A. Neubauer, "Onkodin," 2008. URL: <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52389/e52472/>
4. H. Renz-Polster, S. Krautzig, J. Braun, S.-P. Aries, B. Bätge, M. Braun, A. Brüning, C. Dodt, J. Fischer, H.-J. Frercks, E. Giannitsis, V. Hach-Wunderle, R. Kurowski, V. Kurowski, R. Preuss, K. Schwabe, U. Stierle and P. Wellhoener, *Basislehrbuch Innere Medizin*, Vol. 3, Elsevier Urban & Fischer, München, 2004.
5. G. Herold and Mitarbeiter, *Innere Medizin* 2011.
6. Howlader N., Noone A.M., Krapcho M., Garshell J., Neyman N., Altekruse S.F., Kosary C.L., Yu M., Ruhl J., Tatalovich Z., Cho H., Mariotto A., Lewis D.R., Chen H.S., Feuer E.J. and Cronin K.A., "Surveillance epidemiology and end results, national cancer institute," 2012. URL: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>
7. A. Kuhn and D. Grimwade, *Molecular markers in acute myeloid leukaemia*, International journal of hematology **96** (2012), no. 2, 153-163.
8. R. F. Schlenk, K. Dohner and H. Dohner, [*acute myeloid leukemia. Genetic diagnostics and molecular therapy*], Der Internist **54** (2013), no. 2, 171-178.
9. P. Jain, H. Kantarjian, K. Patel, S. Faderl, G. Garcia-Manero, O. Benjamini, G. Borthakur, N. Pemmaraju, T. Kadia, N. Daver, A. Nazha, R. Luthra, S. Pierce, J. Cortes and F. Ravandi, *Mutated nucleophosmin-1 (NPM1) in patients with acute myeloid leukemia (AML) in remission and relapse*, Leukemia & lymphoma, **55** (2014) Jun; no. 6:1337-44.
10. B. Falini, I. Nicoletti, M. F. Martelli and C. Mecucci, *Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): Biologic and clinical features*, Blood **109** (2007), no. 3, 874-885.
11. A. Dominietto, *Minimal residual disease markers before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia*, Current opinion in hematology **18** (2011), no. 6, 381-387.
12. U. Bacher, C. Haferlach, W. Kern, T. Haferlach and S. Schnittger, *Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in aml: The combination matters--an analysis of 3082 patients*, Blood **111** (2008), no. 5, 2527-2537.
13. N. A. Sangle and S. L. Perkins, *Core-binding factor acute myeloid leukemia*, Archives of pathology & laboratory medicine **135** (2011), no. 11, 1504-1509.
14. H. Dohner, E. Estey, D. Grimwade, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Buchner, H. Dombret, B. L. Ebert, P. Fenaux, R. A. Larson, R. L. Levine, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, H. F. Tien, A. H. Wei, B. Lowenberg and C. D. Bloomfield, *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*, Blood **129** (2017), no. 4, 424-447.

15. M. Weisser, W. Kern, C. Schoch, W. Hiddemann, T. Haferlach and S. Schnittger, *Risk assessment by monitoring expression levels of partial tandem duplications in the MLL gene in acute myeloid leukemia during therapy*, *Haematologica* **90** (2005), no. 7, 881-889.
16. P. Ernst, J. K. Fisher, W. Avery, S. Wade, D. Foy and S. J. Korsmeyer, *Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene*, *Developmental cell* **6** (2004), no. 3, 437-443.
17. M. Ageberg, K. Drott, T. Olofsson, U. Gullberg and A. Lindmark, *Identification of a novel and myeloid specific role of the leukemia-associated fusion protein DEK-NUP214 leading to increased protein synthesis*, *Genes, chromosomes & cancer* **47** (2008), no. 4, 276-287.
18. L. Garcon, M. Libura, E. Delabesse, F. Valensi, V. Asnafi, C. Berger, C. Schmitt, T. Leblanc, A. Buzyn and E. Macintyre, *DEK-CAN molecular monitoring of myeloid malignancies could aid therapeutic stratification*, *Leukemia* **19** (2005), no. 8, 1338-1344.
19. E. M. Bindels, M. Havermans, S. Lugthart, C. Erpelinck, E. Wocjtowicz, A. V. Krivtsov, E. Rombouts, S. A. Armstrong, E. Taskesen, J. R. Haanstra, H. B. Beverloo, H. Dohner, W. A. Hudson, J. H. Kersey, R. Delwel and A. R. Kumar, *EVI1 is critical for the pathogenesis of a subset of MLL-AF9-rearranged amls*, *Blood* **119** (2012), no. 24, 5838-5849.
20. U. Hegenbart, D. Niederwieser, B. M. Sandmaier, M. B. Maris, J. A. Shizuru, H. Greinix, C. Cordonnier, B. Rio, A. Gratwohl, T. Lange, H. Al-Ali, B. Storer, D. Maloney, P. McSweeney, T. Chauncey, E. Agura, B. Bruno, R. T. Maziarz, F. Petersen and R. Storb, *Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors*, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24** (2006), no. 3, 444-453.
21. A. R. Zander, U. Bacher and J. Finke, *Allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia: Establishment of indications on the basis of individual risk stratification*, *Deutsches Arzteblatt international* **105** (2008), no. 39, 663-669.
22. J. Apperley, E. Carreras, E. Gluckman, T. Masszi and E. al., *The EBMT handbook - haematopoietic stem cell transplantation*, vol. 6, Forum Service Editore, Genoa, 2012.
23. S. J. Lee, J. Klein, M. Haagenson, L. A. Baxter-Lowe, D. L. Confer, M. Eapen, M. Fernandez-Vina, N. Flomenberg, M. Horowitz, C. K. Hurley, H. Noreen, M. Oudshoorn, E. Petersdorf, M. Setterholm, S. Spellman, D. Weisdorf, T. M. Williams and C. Anasetti, *High-resolution donor-recipient hla matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation*, *Blood* **110** (2007), no. 13, 4576-4583.
24. N. Flomenberg, L. A. Baxter-Lowe, D. Confer, M. Fernandez-Vina, A. Filipovich, M. Horowitz, C. Hurley, C. Kollman, C. Anasetti, H. Noreen, A. Begovich, W. Hildebrand, E. Petersdorf, B. Schmeckpeper, M. Setterholm, E. Trachtenberg, T. Williams, E. Yunis and D. Weisdorf, *Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome*, *Blood* **104** (2004), no. 7, 1923-1930.
25. M. Arora, D. J. Weisdorf, S. R. Spellman, M. D. Haagenson, J. P. Klein, C. K. Hurley, G. B. Selby, J. H. Antin, N. A. Kernan, C. Kollman, A. Nademanee, P. McGlave, M. M. Horowitz and E. W. Petersdorf, *HLA-identical sibling compared with 8/8 matched and mismatched unrelated donor bone marrow transplant for chronic phase chronic myeloid leukemia*, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27** (2009), no. 10, 1644-1652.

26. M. M. Horowitz, R. P. Gale, P. M. Sondel, J. M. Goldman, J. Kersey, H. J. Kolb, A. A. Rimm, O. Ringden, C. Rozman, B. Speck and et al., *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation*, *Blood* **75** (1990), no. 3, 555-562.
27. M. Arora, C. S. Cutler, M. H. Jagasia, J. Pidala, X. Chai, P. J. Martin, M. E. Flowers, Y. Inamoto, G. L. Chen, W. A. Wood, N. Khera, J. Palmer, H. Duong, S. Arai, S. Mayer, I. Pusic and S. J. Lee, *Late acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation*, *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **22** (2016), no. 3, 449-455.
28. S. J. Lee, *Classification systems for chronic graft-versus-host disease*, *Blood* **129** (2017), no. 1, 30-37.
29. A. H. Filipovich, D. Weisdorf, S. Pavletic, G. Socie, J. R. Wingard, S. J. Lee, P. Martin, J. Chien, D. Przepiorka, D. Couriel, E. W. Cowen, P. Dinndorf, A. Farrell, R. Hartzman, J. Henslee-Downey, D. Jacobsohn, G. McDonald, B. Mittleman, J. D. Rizzo, M. Robinson, M. Schubert, K. Schultz, H. Shulman, M. Turner, G. Vogelsang and M. E. Flowers, *National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report*, *Biology of blood and marrow transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **11** (2005), no. 12, 945-956.
30. C. Schmid, M. Labopin, A. Nagler, M. Bornhauser, J. Finke, A. Fassas, L. Volin, G. Gurman, J. Maertens, P. Bordigoni, E. Holler, G. Ehninger, E. Polge, N. C. Gorin, H. J. Kolb and V. Rocha, *Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: A retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the ebmt acute leukemia working party*, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25** (2007), no. 31, 4938-4945.
31. P. Krishnamurthy, V. T. Potter, L. D. Barber, A. G. Kulasekararaj, Z. Y. Lim, R. M. Pearce, H. de Lavallade, M. Kenyon, R. M. Ireland, J. C. Marsh, S. Devereux, A. Pagliuca and G. J. Mufti, *Outcome of donor lymphocyte infusion after T cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes*, *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **19** (2013), no. 4, 562-568.
32. Y. J. Chang and X. J. Huang, *Donor lymphocyte infusions for relapse after allogeneic transplantation: When, if and for whom?*, *Blood reviews* **27** (2013), no. 1, 55-62.
33. H. J. Kolb, *Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes*, *Blood* **112** (2008), no. 12, 4371-4383.
34. C. Schmid, M. Schleuning, G. Ledderose, J. Tischer and H. J. Kolb, *Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome*, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23** (2005), no. 24, 5675-5687.
35. V. H. van der Velden, A. Hochhaus, G. Cazzaniga, T. Szczepanski, J. Gabert and J. J. van Dongen, *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects*, *Leukemia* **17** (2003), no. 6, 1013-1034.
36. J. Kronke, R. F. Schlenk, K. O. Jensen, F. Tschurtz, A. Corbacioglu, V. I. Gaidzik, P. Paschka, S. Onken, K. Eiwen, M. Habdank, D. Spath, M. Lubbert, M. Wattad, T. Kindler, H. R. Salih, G. Held, D. Nachbaur, M. von Lilienfeld-Toal, U. Germing, D. Haase, H. G.

- Mergenthaler, J. Krauter, A. Ganser, G. Gohring, B. Schlegelberger, H. Dohner and K. Dohner, *Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: A study from the german-austrian acute myeloid leukemia study group*, Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **29** (2011), no. 19, 2709-2716.
37. P. Bader, H. Kreyenberg, W. Hoelle, G. Dueckers, B. Kremens, D. Dilloo, K. W. Sykora, C. Niemeyer, D. Reinhardt, J. Vormoor, B. Gruhn, P. Lang, J. Greil, R. Handgretinger, D. Niethammer, T. Klingebiel and J. F. Beck, *Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective*, Bone marrow transplantation **33** (2004), no. 8, 815-821.
  38. N. Kroger, U. Bacher, P. Bader, S. Bottcher, M. J. Borowitz, P. Dreger, I. Khouri, H. A. Macapinlac, E. Olavarria, J. Radich, W. Stock, J. M. Vose, D. Weisdorf, A. Willasch, S. Giralt, M. R. Bishop and A. S. Wayne, *Nci first international workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Report from the committee on disease-specific methods and strategies for monitoring relapse following allogeneic stem cell transplantation. Part I: Methods, acute leukemias, and myelodysplastic syndromes*, Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation **16** (2010), no. 9, 1187-1211.
  39. C. Huisman, R. A. de Weger, L. de Vries, M. G. Tilanus and L. F. Verdonck, *Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia*, Bone marrow transplantation **39** (2007), no. 5, 285-291.
  40. C. Papadaki, A. Dufour, M. Seibl, S. Schneider, S. K. Bohlander, E. Zellmeier, G. Mellert, W. Hiddemann and K. Spiekermann, *Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: Clonal evolution is a limiting factor*, British journal of haematology **144** (2009), no. 4, 517-523.
  41. M. Weisser, W. Kern, C. Schoch, C. Tschulik, W. Hiddemann, T. Haferlach and S. Schnittger, *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction based quantification of the combined MDS-EV11/EV11 gene in acute myeloid leukemia*, Leukemia & Lymphoma **47** (2006), no. 12, 2645-2647.
  42. J. Gabert, E. Beillard, V. H. van der Velden, W. Bi, D. Grimwade, N. Pallisgaard, G. Barbany, G. Cazzaniga, J. M. Cayuela, H. Cave, F. Pane, J. L. Aerts, D. De Micheli, X. Thirion, V. Pradel, M. Gonzalez, S. Viehmann, M. Malec, G. Saglio and J. J. van Dongen, *Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a europe against cancer program*, Leukemia **17** (2003), no. 12, 2318-2357.
  43. S. Schnittger, M. Weisser, C. Schoch, W. Hiddemann, T. Haferlach and W. Kern, *New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CFBF-MYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts*, Blood **102** (2003), no. 8, 2746-2755.
  44. D. Soekarman, M. von Lindern, S. Daenen, B. de Jong, C. Fonatsch, B. Heinze, C. Bartram, A. Hagemeijer and G. Grosveld, *The translocation (6;9) (p23;q34) shows consistent rearrangement of two genes and defines a myeloproliferative disorder with specific clinical features*, Blood **79** (1992), no. 11, 2990-2997.
  45. A. Ziegler, S. Lange and R. Bender, *[survival analysis: Cox regression]*, Deutsche medizinische Wochenschrift (1946) **132 Suppl 1** (2007), e42-44.



46. I. Zwiener, M. Blettner and G. Hommel, *Survival analysis: Part 15 of a series on evaluation of scientific publications*, Deutsches Arzteblatt international **108** (2011), no. 10, 163-169.
47. A. Ziegler, S. Lange and R. Bender, [*survival analysis: Properties and kaplan-meier method*], Deutsche medizinische Wochenschrift (1946) **132 Suppl 1** (2007), e36-38.
48. *Survival analysis: Log rank test*, Deutsche medizinische Wochenschrift (1946) **132 Suppl 1** (2007), e39-41.
49. Y. S. Guixian Lin, Gordon Johnston, SAS Institute Inc., Cary NC, *Analyzing survival data with competing risks using SAS® software*, SAS Global Forum 2012, Statistics and Data Analysis **Paper 344-2012** (2012).
50. M. L. Sorrow, M. B. Maris, R. Storb, F. Baron, B. M. Sandmaier, D. G. Maloney and B. Storer, *Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: A new tool for risk assessment before allogeneic HCT*, Blood **106** (2005), no. 8, 2912-2919.
51. E. Verger, M. Salamero and C. Conill, *Can karnofsky performance status be transformed to the eastern cooperative oncology group scoring scale and vice versa?*, European journal of cancer (Oxford, England : 1990) **28a** (1992), no. 8-9, 1328-1330.
52. B. J. Karnofsky DA, *The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer*, Columbia Univ Press (1949).
53. F. R. Appelbaum, *Measurement of minimal residual disease before and after myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute leukemia*, Best practice & research. Clinical haematology **26** (2013), no. 3, 279-284.
54. H. Inaba, E. Coustan-Smith, X. Cao, S. B. Pounds, S. A. Shurtleff, K. Y. Wang, S. C. Raimondi, M. Onciu, J. Jacobsen, R. C. Ribeiro, G. V. Dahl, W. P. Bowman, J. W. Taub, B. Degar, W. Leung, J. R. Downing, C. H. Pui, J. E. Rubnitz and D. Campana, *Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia*, Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **30** (2012), no. 29, 3625-3632.
55. M. Goswami, K. S. McGowan, K. Lu, N. Jain, J. Candia, N. F. Hensel, J. Tang, K. R. Calvo, M. Battiwalla, A. J. Barrett and C. S. Hourigan, *A multigene array for measurable residual disease detection in aml patients undergoing sct*, Bone marrow transplantation **50** (2015), no. 5, 642-51.
56. T. Lange, M. Hubmann, R. Burkhardt, G. N. Franke, M. Cross, M. Scholz, S. Leiblein, H. K. Al-Ali, J. Edelmann, J. Thiery and D. Niederwieser, *Monitoring of wt1 expression in pb and cd34(+) donor chimerism of PM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning*, Leukemia **25** (2011), no. 3, 498-505.
57. U. Bacher, A. Badbaran, B. Fehse, T. Zabelina, A. R. Zander and N. Kroger, *Quantitative monitoring of npm1 mutations provides a valid minimal residual disease parameter following allogeneic stem cell transplantation*, Experimental hematology **37** (2009), no. 1, 135-142.
58. J. A. Yin, M. A. O'Brien, R. K. Hills, S. B. Daly, K. Wheatley and A. K. Burnett, *Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: Results of the united kingdom MRC AML-15 trial*, Blood **120** (2012), no. 14, 2826-2835.
59. P. Hokland and H. B. Ommen, *Towards individualized follow-up in adult acute myeloid leukemia in remission*, Blood **117** (2011), no. 9, 2577-2584.

60. N. Shayegi, M. Kramer, M. Bornhauser, M. Schaich, J. Schetelig, U. Platzbecker, C. Rollig, C. Heiderich, O. Landt, G. Ehninger and C. Thiede, *The level of residual disease based on mutant nrm1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in aml*, *Blood* **122** (2013), no. 1, 83-92
61. M. R. Grunwald, L. H. Tseng, M. T. Lin, K. W. Pratz, J. R. Eshleman, M. J. Levis and C. D. Gocke, *Improved flt3 internal tandem duplication pcr assay predicts outcome after allogeneic transplant for acute myeloid leukemia*, *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **20** (2014), no. 12, 1989-1995.
62. J. C. Hoffmann, K. Stabla, A. Burchert, T. Volkmann, M. Bornhauser, C. Thiede, A. Neubauer and C. Brendel, *Monitoring of acute myeloid leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation employing semi-automated cd34+ donor cell chimerism analysis*, *Annals of hematology* **93** (2014), no. 2, 279-285.
63. T. Lion, H. Daxberger, J. Dubovsky, P. Filipcik, G. Fritsch, D. Printz, C. Peters, S. Matthes-Martin, A. Lawitschka and H. Gadner, *Analysis of chimerism within specific leukocyte subsets for detection of residual or recurrent leukemia in pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation*, *Leukemia* **15** (2001), no. 2, 307-310.
64. X. Tang, G. Alatrash, J. Ning, H. Jakher, P. Stafford, M. Zope, E. J. Shpall, R. B. Jones, R. E. Champlin, P. F. Thall and B. S. Andersson, *Increasing chimerism after allogeneic stem cell transplantation is associated with longer survival time*, *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **20** (2014), no. 8, 1139-1144.
65. M. Barrios, A. Jimenez-Velasco, J. Roman-Gomez, M. E. Madrigal, J. A. Castillejo, A. Torres and A. Heiniger, *Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia*, *Haematologica* **88** (2003), no. 7, 801-810.
66. M. Bornhauser, U. Oelschlaegel, U. Platzbecker, G. Bug, K. Lutterbeck, M. G. Kiehl, J. Schetelig, A. Kiani, T. Illmer, M. Schaich, C. Theuser, B. Mohr, C. Brendel, A. A. Fauser, S. Klein, H. Martin, G. Ehninger and C. Thiede, *Monitoring of donor chimerism in sorted cd34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation*, *Haematologica* **94** (2009), no. 11, 1613-1617.
67. H. Dohner, E. H. Estey, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Buchner, A. K. Burnett, H. Dombret, P. Fenaux, D. Grimwade, R. A. Larson, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. A. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, B. Lowenberg and C. D. Bloomfield, *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the european leukemianet*, *Blood* **115** (2010), no. 3, 453-474.
68. H. B. Ommen, *Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: A review of the current evolving strategies*, *Therapeutic advances in hematology* **7** (2016), no. 1, 3-16.
69. Y. Liu, P. He, F. Liu, L. Shi, H. Zhu, J. Zhao, Y. Wang, X. Cheng and M. Zhang, *Prognostic significance of nrm1 mutations in acute myeloid leukemia: A meta-analysis*, *Molecular and clinical oncology* **2** (2014), no. 2, 275-281.
70. S. Schnittger, C. Schoch, W. Kern, C. Mecucci, C. Tschulik, M. F. Martelli, T. Haferlach, W. Hiddemann and B. Falini, *Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*, *Blood* **106** (2005), no. 12, 3733-3739.

71. S. Schnittger, W. Kern, C. Tschulik, T. Weiss, F. Dicker, B. Falini, C. Haferlach and T. Haferlach, *Minimal residual disease levels assessed by npm1 mutation-specific rq-pcr provide important prognostic information in aml*, *Blood* **114** (2009), no. 11, 2220-2231.
72. H. Becker, G. Marcucci, K. Maharry, M. D. Radmacher, K. Mrozek, D. Margeson, S. P. Whitman, Y. Z. Wu, S. Schwind, P. Paschka, B. L. Powell, T. H. Carter, J. E. Kolitz, M. Wetzler, A. J. Carroll, M. R. Baer, M. A. Caligiuri, R. A. Larson and C. D. Bloomfield, *Favorable prognostic impact of npm1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microrna-expression signatures: A cancer and leukemia group b study*, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28** (2010), no. 4, 596-604.
73. F. Pastore, A. Dufour, T. Benthous, K. H. Metzeler, K. S. Maharry, S. Schneider, B. Ksienzyk, G. Mellert, E. Zellmeier, P. M. Kakadia, M. Unterhalt, M. Feuring-Buske, C. Buske, J. Braess, M. C. Sauerland, A. Heinecke, U. Krug, W. E. Berdel, T. Buechner, B. Woermann, W. Hiddemann, S. K. Bohlander, G. Marcucci, K. Spiekermann, C. D. Bloomfield and E. Hoster, *Combined molecular and clinical prognostic index for relapse and survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **32** (2014), no. 15, 1586-1594.
74. T. Alpermann, W. Kern, S. Schnittger, C. Schmid, K. A. Kreuzer, H. Serve, H. J. Pielken, N. Schmitz, C. M. Wendtner, C. Haferlach and T. Haferlach, *Evaluation of the proposed reporting system of the european leukemianet and recommendations for prognosis of acute myeloid leukemia*, *Leukemia research* **37** (2013), no. 2, 197-200.
75. B. Oran, A. M. Jimenez, M. De Lima, U. R. Popat, R. Bassett, B. Andersson, G. Borthakur, Q. Bashir, J. Chen, S. O. Ciurea, E. Jabbour, J. Cortes, P. Kebriaei, I. F. Khouri, M. H. Qazilbash, F. Ravandi, G. Rondon, X. Lu, E. J. Shpall and R. E. Champlin, *Age and modified european leukemianet classification to predict transplant outcomes: An integrated approach for acute myelogenous leukemia patients undergoing allogeneic stem cell transplantation*, *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **21** (2015), no. 8: 1405-1412
76. H.-J. K. J.-S. Ahn, Y.-K. Kim, S.-H. Jung, D.-H. Yang, J.-J. Lee, N. Y. Kim, S. H. Choi, M. D. Minden, C. W. Jung, J.-H. Jang, H. J. Kim, J. H. Moon, S. K. Sohn, J.-H. Won, S.-H. Kim, D. D. H. Kim, *Transplant outcomes of the triple-negative NPM1/FLT3-ITD/CEBPA mutation subgroup are equivalent to those of the favourable ELN risk group, but significantly better than the intermediate-I risk group after allogeneic transplant in normal-karyotype AML : Annals of Hematology* **95** (2016), no. 4, 625-635
77. A. Nakaya, T. Mori, M. Tanaka, N. Tomita, C. Nakaseko, S. Yano, S. Fujisawa, H. Sakamaki, N. Aotsuka, A. Yokota, Y. Kanda, T. Sakura, Y. Nanya, T. Saitoh, H. Kanamori, S. Takahashi and S. Okamoto, *Does the hematopoietic cell transplantation specific comorbidity index (HCT-CI) predict transplantation outcomes? A prospective multicenter validation study of the kanto study group for cell therapy*, *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **20** (2014), no. 10, 1553-1559.
78. M. Fiegl, M. Unterhalt, W. Kern, J. Braess, K. Spiekermann, P. Staib, A. Gruneisen, B. Wormann, D. Schondube, H. Serve, A. Reichle, M. Hentrich, X. Schiel, C. Sauerland, A. Heinecke, C. Rieger, D. Beelen, W. E. Berdel, T. Buchner and W. Hiddemann, *Chemomodulation of sequential high-dose cytarabine by fludarabine in relapsed or refractory acute myeloid leukemia: A randomized trial of the AMLCG*, *Leukemia* **28** (2014), no. 5, 1001-1007.
79. H. D. Ottinger, S. Ferencik, D. W. Beelen, M. Lindemann, R. Peceny, A. H. Elmaagacli, J. Husing and H. Grosse-Wilde, *Hematopoietic stem cell transplantation: Contrasting the*

*outcome of transplantations from HLA-identical siblings, partially HLA-mismatched related donors, and HLA-matched unrelated donors*, Blood **102** (2003), no. 3, 1131-1137.

80. D. Valcarcel, J. Sierra, T. Wang, F. Kan, V. Gupta, G. A. Hale, D. I. Marks, P. L. McCarthy, M. Oudshoorn, E. W. Petersdorf, O. Ringden, M. Setterholm, S. R. Spellman, E. K. Waller, J. L. Gajewski, S. R. Marino, D. Senitzer and S. J. Lee, *One-antigen mismatched related versus HLA-matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation in adults with acute leukemia: Center for international blood and marrow transplant research results in the era of molecular HLA typing*, Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation **17** (2011), no. 5, 640-648.
81. S. Yu, M. Dai, J. Sun, Z. Fan, F. Huang, Y. Zhang, Q. Jiang, H. Zhou, D. Xu, F. Meng and Q. Liu, *[comparison of clinical efficacy between hla-mismatched related and HLA-matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for hematopoietic malignancies]*, **35** (2014), no. 9, 826-830.
82. C. H. Yan, D. H. Liu, K. Y. Liu, L. P. Xu, Y. R. Liu, H. Chen, W. Han, Y. Wang, Y. Z. Qin and X. J. Huang, *Risk stratification-directed donor lymphocyte infusion could reduce relapse of standard-risk acute leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*, Blood **119** (2012), no. 14, 3256-3262.

## 8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Max Hubmann für seine exzellente Betreuung dieser Promotionsarbeit, die stetige Unterstützung und die zahlreichen Treffen und Gespräche bedanken, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Promotion geführt haben.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. rer. biol. hum. Markus Pfirrmann herzlich für die gute Zusammenarbeit und hervorragende Unterstützung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Spiekermann möchte ich für die Betreuung und die Durchsicht dieser Arbeit, sowie für die Möglichkeit danken, unter seiner Schirmherrschaft die Promotion anfertigen zu dürfen.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Johanna Tischer für die abschließende gründliche Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung und Ermöglichung meines Studiums.

Meinen Freunden und meinem Partner danke ich für die moralische Unterstützung und Begleitung während des Studiums und dieser Promotionsarbeit.

## 9 Lebenslauf

## 10 Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson murine leukemia viral oncogen
aGvHD	Akute Graft-versus-Host-Disease
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
<i>AML1-ETO</i>	Acute myeloid Leukemia 1-Eight Twenty One
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
Ara-C	Cytarabin
ARF	Alternate Reading Frame Protein
ATG	Antithymozytenglobulin
<i>CBFB-MYH11</i>	Core Binding Factor Beta – Humanes Myosin 11
<i>CEBPA</i>	CCAAT-Enhancer-binding Protein Alpha
cGvHD	Chronische Graft-versus-Host-Disease
CIBMTR	Center for International Blood and Marrow Transplant Research
CIR	Cumulative Incidence of Relapse
CMV	Cytomegalie-Virus
Cy	Cyclophosphamid
<i>DEK-CAN</i>	DEK-Protoonkogen- CAN-Gen
<i>DEK-NUP214</i>	DEK-Nucleoporin 214
DLI	Donor Lymphocyte Infusion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>DNMT3A</i>	DNA-Methyl-Transferase 3A
ELN	European LeukemiaNet
<i>EVI1</i>	Ectropic viral integration site 1
FAB	French-American-British-Group
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLAMSA	Fludarabin, Cytarabin, Amsacrin, Cyclophosphamid, ATG

<i>FLT3-LM</i>	FMS-like tyrosine kinase 3 - Längenmutation
<i>FLT3-TKD</i>	FMS-like tyrosine kinase 3 - tyrosine kinase domain
<i>FLT3-ITD</i>	FMS-like tyrosine kinase 3–Interne Tandemduplikation
FUO	Fever of unknown origin
<i>GATA2</i>	Gata Bindeprotein 2
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukemia
GY	Gray
HCT-CI	Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index
HLA	Human Leukocyte Antigen
HR	Hazard Ratio
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation
ICE	Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid
<i>IDH 1/2</i>	Isozitat Dehydrogenase 1/2
KI	Konfidenzintervall
KM	Knochenmark
<i>KMT2A</i>	Histone-Lysine N-Methyltransferase 2A
LDH	Laktatdehydrogenase
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
<i>MECOM</i>	MDS1 und EVI1 Complex Locus
mRNA	Messenger RNA
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MFC	Multi-Parameter Flow Cytometry
MHC	Major Histocompatibility Complex
<i>MLL-PTD</i>	Partielle Tandemduplikation im Mixed Lineage Leukemia-Gen
<i>MLL3-KMT2A</i>	Mixed Lineage Leukemia Lysin Methyltransferase 2 A



MMF	Mycophenolat Mofetil
MRD	Minimale Residual Disease
NIH	National Institute of Health
NK-AML	AML mit normalem Karyotyp
NMDP	National Marrow Donor Program
NOS	No Other Specification
<i>NPM1</i>	Nucleophosmin 1
OS	Overall Survival
PB	Peripheres Blut
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>PML-RARA</i>	Promyelocytic Leukemia Retinoic Acid Receptor Alpha
RIC	Reduced Intensity Conditioning
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	Runt-Related Transcription Factor 1
RFS	Relapse Free Survival
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RQ-PCR	Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
STR	Short Tandem Repeats
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tissue necrosis factor
Tx	Transplantation
VZV	Varizella-Zoster-Virus
WHO	World Health Organisation

## 11 Abbildungsverzeichnis

Grafik 1: Zusammensetzung des Patientenkollektivs .....	28
Grafik 2: Verteilung der verschiedenen MRD-Marker .....	29
Grafik 3: Darstellung der Zeitpunkte der MRD-Messungen .....	30
Grafik 4: Verteilung des Krankheitsstatus an Tag 100 nach Stammzelltransplantation.....	42
Grafik 5: Gesamtüberleben für Patienten mit bekanntem <i>NPM1</i> -Mutationsstatus .....	44
Grafik 6: Rezidiv-freies Überleben für Patienten mit bekanntem <i>NPM1</i> -Mutationsstatus...	45
Grafik 7: Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs bei Patienten mit positivem bzw. negativem <i>NPM1</i> -Mutationsstatus .....	46
Grafik 8: Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs in Abhängigkeit von der Einteilung nach der ELN-Klassifikation.....	48
Grafik 9: Rezidiv-freies Überleben für Patienten mit bekanntem HLA-Status.....	50
Grafik 10: Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs bei Patienten mit bekanntem HLA-Status zum Zeitpunkt der Transplantation .....	51
Grafik 11: Gesamtüberleben für Patienten mit bekanntem Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation .....	53

Grafik 12: Rezidiv-freies Überleben für Patienten mit bekanntem Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation.....	54
Grafik 13: Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs bei Patienten mit bekanntem Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation .....	55
Grafik 14: Rezidiv-freies Überleben für Patienten mit bekanntem MRD-Status an Tag +100 .....	58
Grafik 15: Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs in Abhängigkeit vom MRD-Status an Tag +100.....	59
Grafik 16: Wahrscheinlichkeit für Rezidiv-freies Überleben bei Patienten mit bekanntem MRD-Status in der Verlaufsperiode nach Tag 100 nach Transplantation .....	70
Grafik 17: Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Rezidivs bei Patienten der Gruppe B .....	76
Grafik 18: Wahrscheinlichkeit für Rezidiv-freies Überleben bei Patienten mit bekanntem MRD-Status in der Verlaufsperiode nach Tag 100 nach Stammzelltransplantation, die nicht in Remission transplantiert wurden .....	78

## 12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML nach morphologischen Kriterien.....	7
Tabelle 2: WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie, 2016 .....	9
Tabelle 3: Standardisiertes Bewertungssystem des European LeukemiaNet 2017 (ELN) nach Korrelation von Zyto- und Molekulargenetik und klinischen Daten von AML-Patienten .....	15
Tabelle 4: Einteilung der akuten GvHD in Abhängigkeit vom Organbefall .....	20
Tabelle 5: Einteilung der akuten GvHD in Grad I bis IV .....	20
Tabelle 6: NIH consensus for global grading of chronic graft-versus-host disease (NIH global scoring system) .....	21
Tabelle 7: Klinische Manifestation und Symptome der chronischen GvHD.....	22
Tabelle 8: Primer der jeweiligen MRD-Marker .....	32
Tabelle 9: Schwellenwerte der einzelnen MRD-Marker .....	36
Tabelle 10: Ergebnisse der univariaten Analysen nach dem Cox-Modell für alle Patienten, unabhängig vom Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation. ....	62
Tabelle 11: Ergebnisse der multivariaten Analyse nach dem Cox-Modell für alle Patienten, unabhängig vom Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation. ....	67

Tabelle 12: Ergebnisse der uni- und multivariaten Cox-Regression für Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation nicht in Remission waren ..... 74

## 13 Anhang

### 13.1 Patientencharakteristik

Anhang Nr. 1		
Charakteristika	Patientenzahl (N=144)	%
<b>Alter, Jahre</b>		
<b>Median</b>	48	
<b>Range</b>	18-73	
<b>Geschlecht</b>		
<b>Männlich</b>	63	43,8
<b>Weiblich</b>	81	56,3
<b><i>NPM1</i> Mutation, analysiert in</b>	111	
<b>Negativ</b>	59	53,2
<b>Positiv</b>	52	46,8
<b>Typ A</b>	48 aus 52	92,3
<b>Typ D</b>	3 aus 52	5,8
<b>Typ AH</b>	1 aus 52	1,9
<b><i>FLT3-LM</i>, analysiert in</b>	125	
<b>Negativ</b>	82	65,6
<b>Positiv</b>	43	34,4
<b><i>FLT3-TKD</i>, analysiert in</b>	110	
<b>Negativ</b>	97	88,2
<b>Positiv</b>	13	11,8
<b><i>MLL-PTD</i>, analysiert in</b>	120	
<b>Negativ</b>	89	74,2
<b>Positiv</b>	31	25,8
<b><i>CEPBA</i>, analysiert in</b>	24	
<b>Negativ</b>	22	91,7
<b>Positiv</b>	2	8,3
<b><i>c-kit</i>, analysiert in</b>	48	
<b>Negativ</b>	46	95,8
<b>Postiv</b>	2	4,2
<b><i>RUNX1-RUNX1T1</i>, analysiert in</b>	26	
<b>Negativ</b>	14	53,8
<b>Positiv</b>	12	46,2
<b><i>CBFB-MYH11</i>, analysiert in</b>	47	
<b>Negativ</b>	33	70,2

<b>Positiv</b>	14	29,8
<b>DEK-CAN, analysiert in</b>	5	
<b>Positiv</b>	5	100
<b>MLL-Rearrangement, analysiert in</b>	20	
<i>KMT2A-MLLT3 (MLL-AF9)</i>	11	55
<i>KMT2A-MLLT10 (MLL-AF10)</i>	3	15
<i>KMT2A-AFDN (MLL-AF6)</i>	2	10
<i>KMT2A-MLLT1 (MLL-ENL)</i>	2	10
<i>KMT2A-AFF1 (MLL-AF4)</i>	1	5
<i>KMT2A-ELL (MLL-ELL)</i>	1	5
<b>EVI1</b>	144	
.... <b>Positiv</b>	11	7,6
<b>Karyotyp, analysiert in</b>	140	
<b>Normaler Karyotyp</b>	72	50
<b>Komplex aberranter Karyotyp</b>	8	5,6
<b>Zwei Aberrationen</b>	2	1,4
<b>Anderer Karyotyp</b>	17	11,8
t(6;9)(p23;p34)	4	2,8
t(9;11)(p22;q22)	12	8,3
t(8;21)(q22;q22)	7	4,9
inv16(p13.1;q22)	11	7,6
t(11;19)(q23;p13)	3	2,1
inv3(q21;q26)	4	2,8
<b>AML-Form</b>		
<b>De novo</b>	122	84,7
<b>Sekundär</b>	22	15,3
<b>Karnofsky-Index, erhoben in</b>	112	
<b>Poor</b>	14	9,7
<b>Good</b>	98	68,1
<b>Sorrer-Score, erhoben in</b>	135	
<b>Median</b>	4	
<b>Range</b>	0-12	
<b>Sorrer-Score codiert, erhoben in</b>	135	
<b>0</b>	2	1,5
<b>1-2</b>	32	23,7
<b>≥3</b>	101	74,8
<b>ELN-Einteilung</b>		
<b>Favorable</b>	34	23,6
<b>Intermediate-I</b>	45	31,3

<b>Intermediate-II</b>	28	19,4
<b>Adverse</b>	28	19,4
<b>Unbekannt</b>	9	6,3
<b>FAB-Klassifikation</b>		
<b>M0</b>	5	3,5
<b>M1</b>	26	18,1
<b>M2</b>	40	27,8
<b>M4</b>	43	29,9
<b>M5</b>	18	12,5
<b>M6</b>	2	1,4
<b>Hoch Risiko MDS</b>	6	4,2
<b>Sekundäre AML</b>	1	0,7
<b>Nicht bekannt</b>	3	2,1
<b>Rezidiv-freies Überleben, in Monaten</b>		
<b>Median</b>	13,75	
<b>Range</b>	0,73-114,77	
<b>Gesamtüberleben in Monaten</b>		
<b>Median</b>	18,05	
<b>Range</b>	1,1-114,77	
<b>Tod</b>		
<b>Anzahl</b>	61	43
<b>Rezidiv</b>		
<b>Anzahl</b>	43	29,9
<b>Stadium bei Transplantation</b>		
<b>Remission</b>	49	34
<b>Refraktär oder Rezidiv</b>	95	66
<b>Alter des Spenders</b>		
<b>Unbekannt</b>	13	
<b>Median</b>	36	
<b>Range</b>	0-76	
<b>Spender</b>		
<b>Unverwandt</b>	84	58,3
<b>Verwandt</b>	60	41,7
<b>Geschlecht des Spenders</b>		
<b>Männlich</b>	86	61
<b>Weiblich</b>	54	37,5
<b>Männlich, Männlich</b>	1	0,6
<b>unbekannt</b>	3	2,1
<b>Stammzellquelle</b>		
<b>Peripheres Blut</b>	119	82,6



<b>Knochenmark</b>	9	6,3
<b>Nabelschnurblut</b>	4	2,8
<b>Knochenmark und periphere Stammzellen</b>	12	8,3
<b>HLA-Status des Spenders</b>	144	
<b>Identisch</b>	106	73,6
<b>Different</b>	38	26,4
<b>CMV-Status des Patienten</b>		
<b>Positiv</b>	94	65,3
<b>Negativ</b>	49	34
<b>Status unbekannt</b>	1	0,7
<b>CMV-Status des Spenders</b>		
<b>Positiv</b>	72	50,3
<b>Negativ</b>	71	49,7
<b>Status unbekannt</b>	1	0,7
<b>Anzahl der präemptiven DLI, verabreicht an</b>	31	
<b>Eine DLI</b>	2	6,5
<b>Zwei DLI</b>	8	25,8
<b>Drei DLI</b>	15	48,4
<b>Vier DLI</b>	6	19,4
<b>Konditionierungstherapie</b>		
<b>RIC</b>	142	98,6
<b>12Gy-Cy-ATG</b>	1	0,7
<b>ICE</b>	1	0,7
<b>Graft-versus-Host-Prophylaxe</b>		
<b>Unbekannt</b>	2	1,4
<b>CsA-MMF</b>	105	72,9
<b>Rapa-MMF</b>	5	3,5
<b>CsA-MTX</b>	20	13,9
<b>MMF-Tacrolimus</b>	12	8,3
<b>Akute GvH-Reaktion</b>		
<b>Keine</b>	38	26,4
<b>Grad 1</b>	35	24,3
<b>Grad 2</b>	33	22,9
<b>Grad 3</b>	28	19,4
<b>Grad 4</b>	9	6,3
<b>Nicht bestimmt</b>	1	0,7
<b>Chronische GVH-Reaktion</b>		
<b>Keine</b>	98	68,1

Limited disease	26	18,1
Extended disease	12	8,3
Nicht bestimmt	8	5,6
<b>Response Tag +30</b>		
Refraktär	2	1,4
Rezidiv	4	2,8
Remission	138	95,8
<b>Response Tag +100</b>		
Rezidiv	12	8
Remission	117	81
Tod	14	10
Refraktär	1	1
<b>Engraftement</b>		
Ja	143	99,3
Nein	1	0,7
<b>CD34-Zellzahl Stammzelltransplantation</b>	<b>bei</b>	<b>N=124</b>
Median		8,03
Range		2,6-20,8
<b>MNCK bei KMT</b>		<b>N=19</b>
Median		2,5
Range		0-19
<b>Blasten im Knochenmark vor Transplantation</b>		<b>N=136</b>
Median		7,5
Range		0-95
<b>Blasten im peripheren Blut vor Transplantation</b>		<b>N=127</b>
Median		0
Range		0-89

13.2 Erhebungsbogen HCT-CI

Anhang Nr. 2:

Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index/ Sorrow-Score

für:

geb.:

<b>Mortalitätsrelevante Komorbidität</b>	<b>Definition</b>	<b>Score</b>
<b>Arrythmie</b>	Vorhofflimmern oder -flattern, Sick Sinus Syndrom, ventrikuläre Arrythmie	<b>1</b>
<b>Kardial</b>	Koronare Herzerkrankung, Myokardinfarkt, kongestive Herzinsuffizienz, Ejektionsfraktion ≤ 50%	<b>1</b>
<b>Entzündliche Darmerkrankung</b>	M. Crohn, Colitis Ulcerosa	<b>1</b>
<b>Diabetes</b>	Insulin oder orale Antidiabetika notwendig	<b>1</b>
<b>Cerebrovaskuläre Erkrankung</b>	Transiente Ischämien (TIA) oder Apoplex	<b>1</b>
<b>Psychiatrische Störung</b>	Depression oder Angstzustände mit psychiatrischer Behandlungsbedürftigkeit	<b>1</b>
<b>Hepatisch – leicht</b>	Chronische Hepatitis, Bilirubin erhöht bis 1,5 fach der Norm oder GOT/GPT erhöht bis 2,5 fache der Norm	<b>1</b>
<b>Adipositas</b>	Body Mass Index > 35 beim Erwachsenen	<b>1</b>
<b>Infektionen</b>	Nachgewiesene Infektionen, die eine antimikrobielle Therapie vor, während und nach der Konditionierungstherapie erfordern	<b>1</b>
<b>Rheumatologisch</b>	Systemischer Lupus Erythematodes, rheumatoide Arthritis, „mixed connective tissue disease“, Polymyalgia rheumatica	<b>2</b>
<b>Peptische Ulkus</b>	Behandlungsbedürftig	<b>2</b>
<b>Renal – mäßig bis schwer</b>	Serumkreatinin > 2mg/dl, Dialyse, vorangegangene Nierentransplantation	<b>2</b>
<b>Pulmonal – mäßig</b>	CO-Diffusionskapazität (DL <sub>CO</sub> ) oder FEV <sub>1</sub> 66 – 80% oder Dyspnoe bei leichter Belastung	<b>2</b>

<b>Solider Tumor in der Anamnese</b>	Jedweder Tumor (Ausnahme: Nicht-melanotischer Hauttumor)	<b>3</b>
<b>Herzklappenerkrankung</b>	Mit Ausnahme des asymptomatischen Mitralklappenprolaps	<b>3</b>
<b>Pulmonal – schwer</b>	CO-Diffusionskapazität (DL <sub>CO</sub> ) oder FEV <sub>1</sub> ≤ 65%	<b>3</b>
<b>Hepatisch – schwer</b>	Leberzirrhose, Bilirubin > 1,5 fache der Norm oder GOT/GPT > 2,5 fache der Norm	<b>3</b>
<b>Summe</b>		<b>Σ</b>
<b>Karnofski</b>		

Score	Therapie-assoz. Mortalität (TRM)		Gesamtüberleben	
	Hazard Ratio	TRM bei 2 Jahren	Hazard Ratio	Überleben bei 2 Jahren
0	1,00	<b>14 %</b>	1,00	<b>59 %</b>
1-2	1,42	<b>21 %</b>	1,32	<b>49 %</b>
≥ 3	3,54	<b>41 %</b>	2,78	<b>17 %</b>

**Tabelle 2:** Tabelle der zu erwartenden TRM (therapieassoziierten Mortalität) bzw. des zu erwartenden Gesamtüberlebens nach ermitteltem HCT-CI Score

(aus **Sorrer ML, Maris M, Storb R et al.** Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. Blood. 2005;106:2912-2919.)

## 14 Eidesstattliche Versicherung

Zeber, Christina

Name, Vorname

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

*Molekulares Monitoring der minimalen Resterkrankung mittels quantitativer Real-Time-PCR bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie nach allogener Stammzelltransplantation*

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, den 14.11.19

Ort, Datum

Christina Zeber

Unterschrift Doktorandin