

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

**Validierung der durchflusszytometrischen Messung der
Minimalen Resterkrankung bei Patienten mit Akuter Myeloischer
Leukämie**

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

vorgelegt von
Sandra Rechkemmer
aus Stuttgart
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin:	Prof. Dr. med. Marion Subklewe
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Albert Prof. Dr. med. Christoph Salat
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. T. Köhnke
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	24.10.2019

Eidesstattliche Erklärung

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

„Validierung der durchflusszytometrischen Messung der Minimalen Resterkrankung bei Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie“

selbständig 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, 24. Oktober 2019

Sandra Rechkemmer

*Gewidmet
meiner Familie*

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	DIE AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE	7
1.1.1	EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE	7
1.1.2	PATHOGENESE UND KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD	8
1.1.3	DIAGNOSTIK	8
1.1.4	KLASSIFIKATION	9
1.1.5	PROGNOSTISCHE FAKTOREN BEI ERSTDIAGNOSE	10
1.1.6	THERAPIE	12
1.1.7	ERFASSUNG DES THERAPIEANSPRECHENS	13
1.1.8	PROGNOSE	14
1.2	DIE METHODE DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	16
1.2.1	MESSPRINZIP	16
1.2.2	ANWENDUNGSGEBIETE	17
1.3	DIE MINIMALE RESTERKRANKUNG IN DER AML	18
1.3.1	IMMUNPHÄNOTYPISCHE ERFASSUNG DER MRD	18
1.3.2	MOLEKULARGENETISCHE ERFASSUNG DER MRD	22
2	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	23
3	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN DER PATIENTEN	24
3.2	DIAGNOSTIK	24
3.3	THERAPIEPROTOKOLLE	24
3.4	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE	26
3.4.1	PROBENGEWINNUNG	26
3.4.2	PROBENAUFBEREITUNG	26
3.4.3	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG	27
3.5	GATINGSTRATEGIE ZUR BESTIMMUNG DER MRD	28
3.6	DIE IN DER STUDIE ERHOBENEN PARAMETER	30
3.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG	32
4	ERGEBNISSE	33
4.1	DAS PATIENTENKOLLEKTIV	33
4.2	DIE PROGNOSTISCHEN FAKTOREN IN DER UNIVARIATEN ANALYSE	36
4.2.1	STRATIFIZIERUNG DER PATIENTEN NACH DEN PROGNOSTISCHEN FAKTOREN BEI ERSTDIAGNOSE	36
4.2.2	STRATIFIZIERUNG DER PATIENTEN NACH ERFASSUNG DES THERAPIEANSPRECHENS	40
4.2.3	STRATIFIZIERUNG DER PATIENTEN NACH MFC-MRD-STATUS ZUM ZEITPUNKT NACH INDUKTION	46
4.2.4	STRATIFIZIERUNG DER PATIENTEN NACH MFC-MRD-STATUS ZUM ZEITPUNKT DER APLASIE FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
4.2.5	STRATIFIZIERUNG DER PATIENTEN NACH KOMBINIERTEN MFC-MRD-STATUS MIT DER PROGNOSE	52
4.3	DIE PROGNOSTISCHEN FAKTOREN IM MULTIVARIATEN MODELL	54
4.3.1	DER MFC-MRD-STATUS ZUM ZEITPUNKT NACH INDUKTION IM MULTIVARIATEN MODELL	54
4.3.2	DER MFC-MRD-STATUS ZUM ZEITPUNKT DER APLASIE IM MULTIVARIATEN MODELL	55
4.3.3	DER KOMBINIERTER MFC-MRD-STATUS IM MULTIVARIATEN MODELL	58
5	DISKUSSION	60
5.1	DISKUSSION DER METHODEN	60
5.1.1	STUDIENAUFBAU	60

5.1.2	DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE GENIEßT EINEN HOHEN STELLENWERT ALS METHODE ZUR MESSUNG DER MRD IN DER AML	61
5.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	65
5.2.1	PATIENTENCHARAKTERISTIKA	65
5.2.2	DIE PROGNOSTISCHE AUSSAGEKRAFT DER UNTERSUCHTEN VARIABLEN IST BEI ZENSIERUNG DER PATIENTEN ZUM ZEITPUNKT DER SZT STÄRKER AUSGEPRÄGT	65
5.2.3	DAS ALTER IST BEI VORHANDENEM MFC-MRD-STATUS ZUM ZEITPUNKT DER APLASIE ODER ZUM ZEITPUNKT NACH INDUKTION KEIN UNABHÄNGIGER PROGNOSTISCHER FAKTOR	65
5.2.4	DIE ELN-KLASSIFIKATION 2017 BEINHÄLTET ZUM TEIL UNABHÄNGIGE PROGNOSTISCHE AUSSAGEKRAFT	66
5.2.5	DER EBC-STATUS IST BEI VORHANDENEM MFC-MRD-STATUS ZUM ZEITPUNKT DER APLASIE KEIN UNABHÄNGIGER PROGNOSTISCHER FAKTOR	66
5.2.6	DER MFC-MRD-STATUS ZUM ZEITPUNKT NACH INDUKTION IST EIN UNABHÄNGIGER PROGNOSTISCHER FAKTOR	67
5.2.7	DER MFC-MRD-STATUS ZUM ZEITPUNKT DER APLASIE IST EIN UNABHÄNGIGER PROGNOSTISCHER FAKTOR	67
5.2.8	DER KOMBINIERTER MRD-STATUS IST EIN UNABHÄNGIGER PROGNOSTISCHER FAKTOR	68
5.3	AUSBLICK: DIE FRÜHE DURCHFLUSSZYTOMETRISCH GEMESSENE MRD ALS STEUERNDER EINFLUSS IN DER THERAPIE DER AML	69
6	ZUSAMMENFASSUNG	71
I.	TABELLENVERZEICHNIS	72
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	73
III.	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	74
IV.	LITERATURVERZEICHNIS	75
	LEBENS LAUF	83
	DANKSAGUNG	84

1 Einleitung

1.1 Die Akute Myeloische Leukämie

Leukämien werden je nach Art der entarteten Vorläuferzelle in Akute Lymphatische Leukämie (ALL), Akute Myeloische Leukämie (AML), Chronisch Myeloische Leukämie (CML) und Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) unterteilt (1). Bei der AML handelt es sich um eine bösartige Entartung der Myelopoese. Die Myelopoese gehört zu dem Teil des blutbildenden Systems, das für die Bildung von Granulozyten, Monozyten, Megakaryozyten und Erythrozyten zuständig ist. Es kommt zur malignen klonalen Neoplasie myeloischer Vorläuferzellen im Knochenmark mit Ausschwemmung unreifzelliger Blasten ins Blut.

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die AML ist mit 80% die häufigste Form der akuten Leukämie des Erwachsenenalters und nach der CLL die am zweit häufigsten vorkommende Form der Leukämie überhaupt (2). Jährlich erkranken 3 von 100 000 Einwohner an einer AML (3). Zwischen den Jahren 1999 und 2012 verzeichnete das Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert Koch Instituts relativ stabile altersstandardisierte Erkrankungsraten. Mit einem medianen Erkrankungsalter von 63 Jahren handelt es sich bei der AML überwiegend um eine Erkrankung des älteren Menschen (2).

Die Ätiologie der AML bleibt weitgehend ungeklärt, allerdings sind einige Risikofaktoren bekannt, die mit einer erhöhten Inzidenz der AML einhergehen. Dazu gehört eine Knochenmarksschädigung durch Benzol, Zytostatika (u.a. Topoisomerase-II-Hemmer und Alkylantien) und ionisierender Strahlung. Des Weiteren sind mehrere genetische Erkrankungen (u.a. Down-Syndrom, Klinefelter-Syndrom und Fanconi-Anämie) mit einer erhöhten Inzidenz der AML assoziiert. Weiterhin kann eine AML aus einer bereits bestehenden hämatologischen Erkrankung (u.a. Myelodysplastisches Syndrom, Chronische Myeloische Leukämie, Polycythaemia vera, Osteomyelofibrose, essentielle Thrombozythämie, aplastische Anämie, paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie) entstehen (1).

1.1.2 Pathogenese und klinisches Erscheinungsbild

Während der Leukämogenese kommt es zur malignen Entartung und zur raschen unkontrollierten Proliferation der myeloischen Vorläuferzellen. Diese verdrängen die normale Hämatopoese im Knochenmark, welches ein Großteil der Symptomatik der AML bedingt. Die Verdrängung der roten Blutreihe verursacht eine Anämie, die mit Symptomen wie Leistungsminderung, Dyspnoe, Tachykardie und Blässe einhergeht. Die Verdrängung der thrombozytären Vorläuferzellen führt zu Thrombopenie mit erhöhter Blutungsneigung, die sich in Form von Petechien, Ekchymosen, Menorrhagien und Epistaxis klinisch manifestieren kann. Die Verdrängung der weißen Blutreihe führt zu Granulopenie mit erhöhter Infektanfälligkeit bis hin zur Sepsis. Seltener kommt es in der AML des Erwachsenen zu einer Infiltration extramedullärer Organe (u.a. Leber, Milz, Haut, Gingiva und zentrales Nervensystem) durch leukämische Blasten. Extrem hohe Leukozytenzahlen können Zirkulationsstörungen bedingen (Leukostase). Die Symptomatik beginnt meist akut und führt innerhalb weniger Wochen zur Diagnose der AML.

1.1.3 Diagnostik

Besteht aufgrund einer typischen Anamnese, körperlichen Untersuchung und eines Blut- und Differentialblutbildes der Verdacht auf eine AML, erfolgt die Diagnosesicherung anhand einer Knochenmarksprobe. Diese wird durch eine Knochenmarksaspiration aus dem Beckenkamm gewonnen. Im Falle einer Punctio sicca kann auch ein Abrollpräparat einer Knochenmarksstanzbiopsie untersucht werden. Zur Routinediagnostik der Knochenmarksprobe gehört die Zytomorphologie, Zytogenetik, Molekulargenetik, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und die Immunphänotypisierung (3, 4). Laut den Diagnosekriterien der World Health Organization (WHO) ist um eine AML diagnostizieren zu können ein Nachweis von blastären Zellen mit einem Anteil von mindestens 20% der kernhaltigen Zellen im Knochenmark nötig (von diesem Diagnosekriterium ausgenommen ist die AML mit t(15;17), t(8;21), inv16, oder t(16;16)) (5).

Neben der Diagnosesicherung gehört die Erfassung von Grunderkrankungen, krankheitsbedingter Komplikationen und der Therapiefähigkeit des Patienten zur Routinediagnostik. Erscheint aufgrund des Allgemeinzustandes des Patienten eine allogene Knochenmarkstransplantation eine mögliche Therapieoption, sollte unmittelbar bei Diagnosestellung eine Humane Leukozyten Antigene (HLA)-Typisierung des Patienten und seiner Kernfamilie erfolgen (3, 6).

1.1.4 Klassifikation

Bei der AML handelt es sich um ein sehr heterogenes Krankheitsbild, das sich aus verschiedenen Subgruppen zusammenstellt, die sich in Hinblick auf die Krankheitsbiologie, dem klinischen Verlauf und der Prognose sehr stark unterscheiden (3).

Im Jahre 1976 veröffentlichte die French-American-British-Kooperationsgruppe (FAB) einen Vorschlag zur Einteilung der akuten Leukämien nach hauptsächlich morphologischen und zytochemischen Gesichtspunkten (Tabelle 1.1). Da sich aus dieser Einteilung kaum Rückschlüsse auf den klinischen Verlauf der Erkrankung ziehen lassen, verliert diese immer mehr an Bedeutung, wird allerdings immer noch häufig parallel zur WHO-Klassifikation erhoben.

M0	Minimal differenzierte AML
M1	AML ohne Ausreifung
M2	AML mit Ausreifung
M3	Akute Promyelozytenleukämie
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M5	Akute monozytäre Leukämie
M6	Akute Erythroleukämie
M7	Akute megakaryozytäre Leukämie

Tabelle 1.1: FAB-Klassifikation der AML(7)

Seit 2001 liegt die zwischenzeitlich mehrmals überarbeitete WHO-Klassifikation vor, die klinische, morphologische, immunphänotypische, zytogenetische und molekulargenetische Merkmale zur Unterteilung der AML in verschiedene Subgruppen miteinbezieht (Tabelle 1.2). Ziel dieser Klassifikation ist die Einteilung mit möglichst hoher klinischer Relevanz (5, 8).

1. AML mit rekurrenten genetischen Veränderungen
<p>AML mit t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> APL mit <i>PML-RARA</i> AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> AML mit t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i> AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i> Provisorische Entität: AML mit <i>BCR-ABL1</i> AML mit mutiertem NPM1 AML mit biallelischen Mutationen von CEBPA Provisorische Entität: AML mit mutiertem <i>RUNX1</i></p>
2. AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen
3. Therapieassoziierte myeloische Neoplasien
4. AML, nicht anderweitig klassifizierbar
<p>Minimal differenzierte AML AML ohne Ausreifung AML mit Ausreifung Akute myelomonozytäre Leukämie Akute monoblastäre und monozytäre Leukämie Akute Erythrozytenleukämie Akute Megakaryoblastenleukämie Akute Basophilenleukämie Akute Panmyelose mit Myelofibrose</p>
5. Myeloides Sarkom
6. Myeloide Proliferationen assoziiert mit dem Down-Syndrom
<p>Transiente anormale Myelopoese Mit dem Down-Syndrom assoziierte myeloische Leukämie</p>

Tabelle 1.2: AML und verwandte Neoplasien nach WHO-Klassifikation 2016(5)

1.1.5 Prognostische Faktoren bei Erstdiagnose

Aufgrund der bedeutenden interindividuellen Unterschiede im Therapieansprechen und im Überleben der AML-Patienten sind prognostische Faktoren zur besseren Einschätzung des individuellen Risikos unabdingbar. Die Prognose eines AML-Patienten kann bei Erstdiagnose (ED) anhand patientenspezifischer und krankheitsspezifischer Faktoren geschätzt werden und somit ein prätherapeutisches Risikoprofil der Erkrankung erstellt werden. In Studien wurde die jeweilige prognostische Relevanz klinischer und genetischer Variablen für die Vorhersage des ereignisfreien Überlebens (EFS) und des Gesamtüberlebens (OS) untersucht (9-12).

Aktuell gilt die Zytogenetik und die Molekulargenetik als wichtigster und aussagekräftigster prognostischer Faktor bei Erstdiagnose (9-11, 13-17). Die großen Fortschritte in der Entschlüsselung zytogenetischer und molekulargenetischer Läsionen in den letzten Jahren, führen nicht nur zu einem besseren Verständnis der Biologie der Krankheit, sondern liefern auch wichtige Information bezüglich Risikostratifizierung (15, 18). Auf Basis dieser

Erkenntnisse hat die European LeukemiaNet (ELN) im Jahr 2010 eine Klassifikation zur Einteilung in verschiedene Risikogruppen erstellt. Eine Überarbeitete Version wurde im Jahr 2017 veröffentlicht und ist in der Tabelle 1.3 dargestellt.

Risikogruppe	Genetische Anomalie
Günstig	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 mutiertes NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD ^{low} Biallelisches mutiertes CEBPA
Intermediär	mutiertes NPM1 und FLT3-ITD ^{high} wildtyp NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD ^{low} (ohne als ungünstig klassifizierte genetische Anomalie) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Zytogenetische Anomalien, die weder als günstig noch als ungünstig klassifiziert sind
Ungünstig	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); KMT2A rearrangiert t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EV11) 25 oder del(5q); 27; 217/abn(17p) komplexer Karyotyp, monosomaler Karyotyp wildtyp NPM1 und FLT3-ITD ^{high} mutiertes RUNX1 mutiertes ASXL1 mutiertes TP53

Tabelle 1.3: ELN-Klassifikation 2017

Neben der Zytogenetik und Molekulargenetik hat das Alter des Patienten bei Erstdiagnose einen unabhängigen Einfluss auf die Prognose. Das schlechtere Therapieansprechen unter den älteren Patienten (>60 Jahre) lässt sich unter anderem auf den relativ höheren Anteil prognostisch ungünstiger Karyotypen, den häufiger vorhanden Komorbiditäten und die häufigere Expression von Multidrug-Resistance-Proteinen zurückführen (3). Weitere Faktoren, die einen unabhängigen negativen prognostischen Einfluss ausüben sind eine hohe Leukozytenzahl bei Erstdiagnose, sowie eine bestehende sekundäre AML (3, 15, 19).

Anhand dieser prognostischen Faktoren erfolgt bei Erstdiagnose die Einteilung der Patienten in Risikogruppen. Prognostische Aussagen für ein Individuum lassen sich aus dieser Einteilung allerdings sehr eingeschränkt ziehen, da die Prognose einzelner Patienten innerhalb dieser Subgruppen stark variiert (20). Dies lässt darauf schließen, dass weitere Faktoren einen

großen Einfluss auf die Prognose ausüben. Diese Faktoren zu identifizieren ist Bestandteil der aktuellen Forschung. Im Fokus liegt die Identifikation weiterer prognostischer Faktoren bei Erstdiagnose und die Erfassung des Therapieansprechens (4), worauf im Kapitel 1.1.7. und im Kapitel 1.3 näher eingegangen wird.

1.1.6 Therapie

Die Therapie der AML-Patienten sollte in spezialisierten Zentren innerhalb von Studiengruppen nach Therapieprotokollen erfolgen. Die Therapie erfolgt risikoadaptiert (21). Der kurative Ansatz der AML-Therapie beinhaltet die systemische intravenöse Chemotherapie und die eventuell daran anschließende allogene Stammzelltransplantation (SZT) (Abbildung 1.1) (3, 22).

Die systemische intravenöse Chemotherapie erfolgt durch Applikation verschiedener Kombinationen antileukämischer Zytostatika (u.a. Cytosin-Arabinosid, Mitoxantron, Daunorubicin und Thioguanin) nach Protokollen von AML-Studiengruppen. Sie gliedert sich in verschiedene aufeinanderfolgende Therapiephasen. Zunächst erfolgt die intensive Induktionstherapie, mit dem Ziel eine Komplette Remission (CR) zu erreichen. Mittels dieser intensiven Chemotherapie werden Remissionsraten von 60-80% erreicht (23). Anschließend wird in der Regel eine Postremissionstherapie in Form der Konsolidierungstherapie verabreicht. Um eine möglichst dauerhafte Krankheitsfreiheit zu erzielen erhalten Patienten in manchen Protokollen zudem eine Erhaltungstherapie als zyklische Polychemotherapie über 3 Jahre (3).

Je nach Spenderverfügbarkeit, Risikoprofil, Alter, Komorbiditäten und Patientenwunsch kommt alternativ zur konventionellen Konsolidierungstherapie eine allogene Stammzelltransplantation als Postremissionstherapie in Betracht (24). Studien haben gezeigt, dass Patienten mit ungünstigem Risikoprofil die eine allogene SZT erhalten ein signifikant besseres Gesamtüberleben und Rezidivfreies Überleben aufwiesen. Patienten mit günstigem Risikoprofil scheinen allerdings nicht von einer regelhaften Transplantation zu profitieren (25-29). Die allogene SZT bringt für Hochrisikopatienten die höchsten Heilungsraten, allerdings auch potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkungen mit sich, weshalb eine Indikation sorgfältig gestellt werden sollte (6). Patienten der günstigen Risikogruppe sollten nicht transplantiert werden, da das Risiko eine gefährliche Nebenwirkung zu erleiden höher ist, als der Nutzen, den der Patienten aus diesem Eingriff ziehen würde (30). Die allogene

SZT wird nach Konditionierung (unter anderem durch intensive Chemotherapie und/oder anschließende Ganzkörperbestrahlung) durchgeführt. Potentiell schwerwiegende Komplikationen die mit einer Stammzelltransplantation einhergehen können sind u.a. Pneumonie und Sepsis durch die längerfristige Immunsuppression, sekundäre Malignome, Leukämierезидиве, eine Graft-versus-Host-Reaktionen, die bis hin zur therapieassoziierten Mortalität führen können (31).



Abbildung 1.1: Therapieüberblick für medizinisch fitte AML-Patienten

Die Therapie der AML bleibt aufgrund der in einem erheblichen Anteil der Patienten auftretenden Therapieresistenz und rezidivierenden Erkrankung trotz intensiver Chemotherapie und allogener SZT immer noch eine Herausforderung. Eine dauerhafte Krankheitsfreiheit wird bisher nur in 25-40% der Fälle erreicht (3, 14, 32-36).

1.1.7 Erfassung des Therapieansprechens

Die Erfassung des Therapieansprechens gewinnt für die Risikostratifizierung der Patienten immer mehr an Bedeutung. Studien haben gezeigt, dass die Risikostratifizierung durch die bei Erstdiagnose (ED) erhobenen Parameter durch Miteinbeziehung von Parametern, die das Therapieansprechen erfassen, verbessert werden kann (37).

Die komplette Remission (CR) war über mehrere Jahrzehnte die einzige Möglichkeit der Erfassung des Therapieansprechens und somit der Effektivität der Chemotherapie. Die heute noch verwendete Standardmethode um die CR zu erfassen ist die Zytomorphologie. Die morphologische CR gilt als erreicht, wenn eine KM-Probe mit normaler Hämatopoese aller Zelllinien und unter 5% Myeloblasten vorliegt und gleichzeitig das periphere Blutbild regeneriert erscheint (definiert als $>1.500/\mu\text{l}$ Neutrophile und $>100.000/\mu\text{l}$ Thrombozyten). Zudem darf kein Nachweis extramedullärer Herde bestehen. Es wurde gezeigt, dass Patienten die eine CR erreichen länger leben und dass die Dauer der CR mit der Dauer des Überlebens korreliert (38). Es wurden CR basierte Therapieanpassungen durchgeführt (39). Patienten, die eine CR nicht erreichen haben, haben eine schlechtere Prognose und erhalten in der Regel

eine intensiviertere Therapie. Zu den Nachteilen der morphologischen Messung des Therapieansprechens gehört die relativ geringe Sensitivität von 5%, der relativ späte Zeitpunkt der Erfassung und die Subjektivität der Beurteilung. Zudem ist es nach ausschließlich morphologischen Kriterien in manchen Fällen nicht möglich zwischen normalen und leukämischen Blasten zu unterscheiden. Aufgrund der geringen Sensitivität der Methode, könnten trotz erreichter morphologischer CR bis zu 10^{10} leukämische Blasten persistieren, die nicht detektiert werden (40). Dies äußert sich darin, dass viele Patienten die eine CR erreicht haben, ein Rezidiv erleiden.

Ein weiterer Parameter zur Erfassung des Therapieansprechens ist die sogenannte early Blast Clearance (eBC) (41, 42). Sie erfasst den relativen Anteil der verbliebenen Blasten im Knochenmark an Tag 16 nach Start der intensiven Induktionstherapie (eine Woche nach Ende der ersten intensiven Induktionsphase). Die Erhebung dieser residuellen Blasten im Knochenmark zeigte unabhängige prognostische Relevanz (14, 37). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten, die eine eBC nicht erreicht haben, eine schlechte Prognose haben, selbst wenn sie sich in morphologischer CR befinden (37, 43, 44).

Ein vielversprechender neuerer therapieabhängiger Faktor ist die Minimale Resterkrankung, auf die im Kapitel 1.3 näher eingegangen wird.

1.1.8 Prognose

Trotz Rückgang der altersstandardisierten Sterberaten in den letzten Jahren ist eine dauerhafte Heilung der AML-Patienten nur selten zu erzielen (2), auch wenn groß angelegte AML-Therapiestudien seit den achtziger Jahren graduelle Fortschritte in der Therapie der AML zeigen (14). Moderne intensive Induktionstherapien erzielen CR-Raten von 60-80% (23). Allerdings erleiden 40-60% dieser Patienten ein Rezidiv innerhalb von 1 bis 2 Jahren (45, 46). Eine dauerhafte Krankheitsfreiheit wird nur in 25-40% der Fälle erreicht (3, 14).

Als Ursache für das Auftreten von Rezidiven wird der Verbleib einiger leukämischer Zellen angesehen, die die intensive Induktionstherapie überleben. Da angenommen wird, dass von diesen in der kompletten Remission persistierenden leukämischen Zellen aus das Wachstum der leukämischen Klone wieder ausgeht (47), ist es von größter Bedeutung diese Zellen zu identifizieren und zu quantifizieren (48). Die herkömmlichen Parameter zur Beurteilung des Therapieansprechens erweisen sich hierzu als nicht sensitiv genug, daher sind sensitivere

Methoden nötig um das Therapieansprechen und damit die Prognose der Patienten zu erfassen. Molekulargenetische und durchflusszytometrische Methoden zeigen sich hierzu als sehr vielversprechend (49-51).

1.2 Die Methode der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der automatisierten Untersuchung von Zellsuspensionen. Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie wurde an der Westfälischen Wilhelms-Universität von Wolfgang Göthe entwickelt und im Jahr 1968 zum Patent angemeldet. Seitdem hat sie sich als Methode in der medizinischen Forschung und Diagnostik etabliert und findet auch darüber hinaus zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten (52). Die Durchflusszytometrie erfasst die Form, Struktur und Färbung von Zellen und ermöglicht dadurch die Analyse einer hohen Anzahl an Zellen innerhalb von sehr kurzer Zeit.

1.2.1 Messprinzip

Die zu untersuchenden Zellen werden durch einen Hüllstrom fokussiert, sodass sie einzeln hintereinander durch eine dünne Küvette fließen. Dort werden sie von einem Laser angestrahlt und das dabei entstehende Streulicht wird von zwei Detektoren wahrgenommen.

Bei der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie können zudem bestimmte Oberflächenantigene und zytoplasmatische Antigene der Zellen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern markiert werden. Das auf die Fluorochrome treffende Laserlicht regt deren Fluoreszenz an, die von verschiedenen Detektoren erfasst werden. Die Intensität des wahrgenommenen Fluoreszenzsignals korreliert mit der Anzahl an spezifischen fluoreszenz-markierten Antikörpern und somit mit der Anzahl der markierten Oberflächenantigene und zytoplasmatischen Antigene der jeweiligen Zelle. Durch Kenntnisse der Expressionsprofile der verschiedenen Zellen kann die jeweilige Zelle den verschiedenen Gruppen zugeteilt und quantifiziert werden (52).

Innerhalb weniger Sekunden können so weit über 50 000 Zellen vermessen werden (52). Durch die stetige Weiterentwicklung der Methode sind heute multiparameter-Fluoreszenz-Durchflusszytometer (MFC) erhältlich, die 30 oder mehr verschiedene Fluoreszenzen gleichzeitig messen können. Die Auswertung des Durchflusszytometrischen Datensatzes erfolgt mittels spezifischer Softwareprogramme am Computer. Gängig ist die Darstellung der Zellen in sogenannten Dot-plots, wobei jede Zelle in einem zweidimensionalen System dargestellt wird.

1.2.2 Anwendungsgebiete

Zu den Hauptanwendungsgebieten gehört die Routinediagnostik von Zellsuspensionen (u.a. Blut, Knochenmark, Liquor und Lungenerguss) u.a. in der Hämatologie, Infektiologie und Immunologie und in der medizinischen und biologischen Grundlagenforschung. Weiterhin wird die Durchflusszytometrie in der Biotechnologie und in der Lebensmittelanalytik angewendet (52).

1.3 Die Minimale Resterkrankung in der AML

Der Begriff der Minimalen Resterkrankung (MRD) wurde in den 80er Jahren geprägt (48). Aus der Beobachtung, dass die Mehrheit der sich in morphologischer CR befindlichen AML-Patienten ein Rezidiv erleiden, entstand die Vermutung, dass einige leukämische Zellen die intensive Induktionstherapie überleben. Diese persistierenden Zellen werden durch die Zytomorphologie – der herkömmlichen Methode um den Remissionsstatus zu definieren – nicht erkannt. Eine durch zytomorphologische Methoden nicht identifizierbare leukämische Population wird als Minimale Resterkrankung (MRD) definiert. Die Entwicklung sensitiverer Methoden um die MRD zu identifizieren und zu quantifizieren ist somit von größter Bedeutung (48, 53). Ziel der MRD-Diagnostik ist es durch die sensitive Erfassung des Remissionsstatus, die Risikostratifizierung und somit das risikoadaptierte Management der AML-Patienten zu verbessern (31, 54-56). Weiterhin könnte die sequenzielle Erfassung der MRD im Krankheitsverlauf dabei helfen, ein beginnendes Rezidiv möglichst frühzeitig zu diagnostizieren.

Aktuell stehen zwei grundlegende Methoden zur MRD-Diagnostik in der AML zur Verfügung. Die eine basiert auf der multiparametrischen-Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (MFC), die andere auf molekulargenetische Methoden, darunter die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und das Next Generation Sequencing (NGS). Beide unterscheiden sich bezüglich Sensitivität und dem Anteil an Patienten an denen sie angewendet werden können.

1.3.1 Immunphänotypische Erfassung der MRD

1.3.1.1 Grundlagen: Antigenexpressionsmuster im Gesunden und in der AML

Ausgiebige durchflusszytometrische Analysen gesunden Knochenmarks ergaben, dass gesunde Zellen zu bestimmten Zeitpunkten in der Hämatopoese ein bestimmtes Antigenexpressionsmuster – den sogenannten Immunphänotypen – aufweisen (57-62). Diese Kenntnisse über die Antigenexpressionsmuster der gesunden myeloischen Zelllinie bilden die Basis der MFC-MRD-Diagnostik in der AML. Das zeitliche Auftreten der verschiedenen Marker im Verlauf der Myelopoese ist in der Abbildung 1.2 dargestellt.

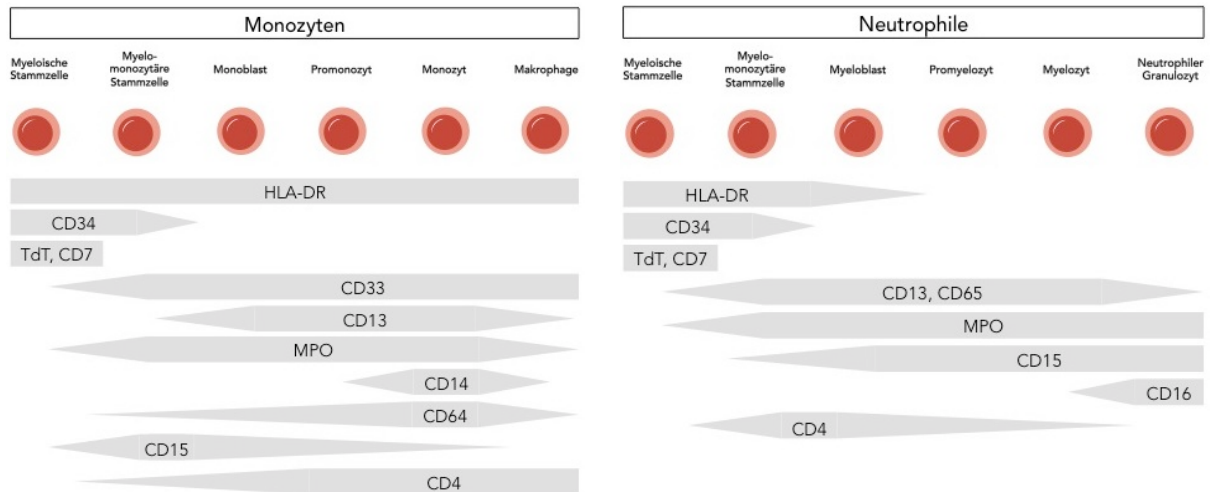


Abbildung 1.2: Überblick über die Antigenexpression im Verlauf der Myelopoese (59)(60-62)

AML-Zellen können aberrante Antigenexpressionsmuster aufweisen, die sich vom typischen Antigenexpressionsmuster normaler Zellen der gleichen Zelllinie und des gleichen Entwicklungsstadiums unterscheiden und die durchflusszytometrisch identifizierbar sind (47, 63, 64). Diese sogenannten Leukämie-assoziierten aberranten Immunphänotypen (LAIP) werden auf allen oder auf einer Subgruppe der leukämischen Zellen exprimiert. Eine sehr niedrige Expression des LAIPs lässt sich in wenigen Fällen auch auf gesunden Knochenmarkszellen identifizieren.

Es werden vier verschiedene Formen der aberranten Antigenexpression differenziert(54, 65-68):

1. Bei der Überexpression wird ein Antigen im Vergleich zur Antigenexpression im gesunden Knochenmark erhöht exprimiert.
2. Bei der Unterexpression kommt es im Vergleich zur normalen granulozytären und monozytären Differenzierung zur verminderten Expression eines Antigens.
3. Bei der zelllinienübergreifenden Expression werden linienfremde Antigene wie z.B. lymphatische Antigene (CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD19 oder CD30) oder NK-Zell-Antigene (CD56) auf den AML-Zellen exprimiert.
4. Die asynchrone Expression geht mit der Koexpression von Antigenen verschiedener Differenzierungsstufen einher, die in gesunden Zelllinien nur sequentiell aber nicht gleichzeitig auftreten (z.B. die Stammzellantigene CD34 und CD117 und die myeloischen Differenzierungsantigene CD13, CD14, CD15, CD33, CD65).

Beispiele für die verschiedenen Expressionsmuster sind in der Abbildung 1.3 dargestellt.

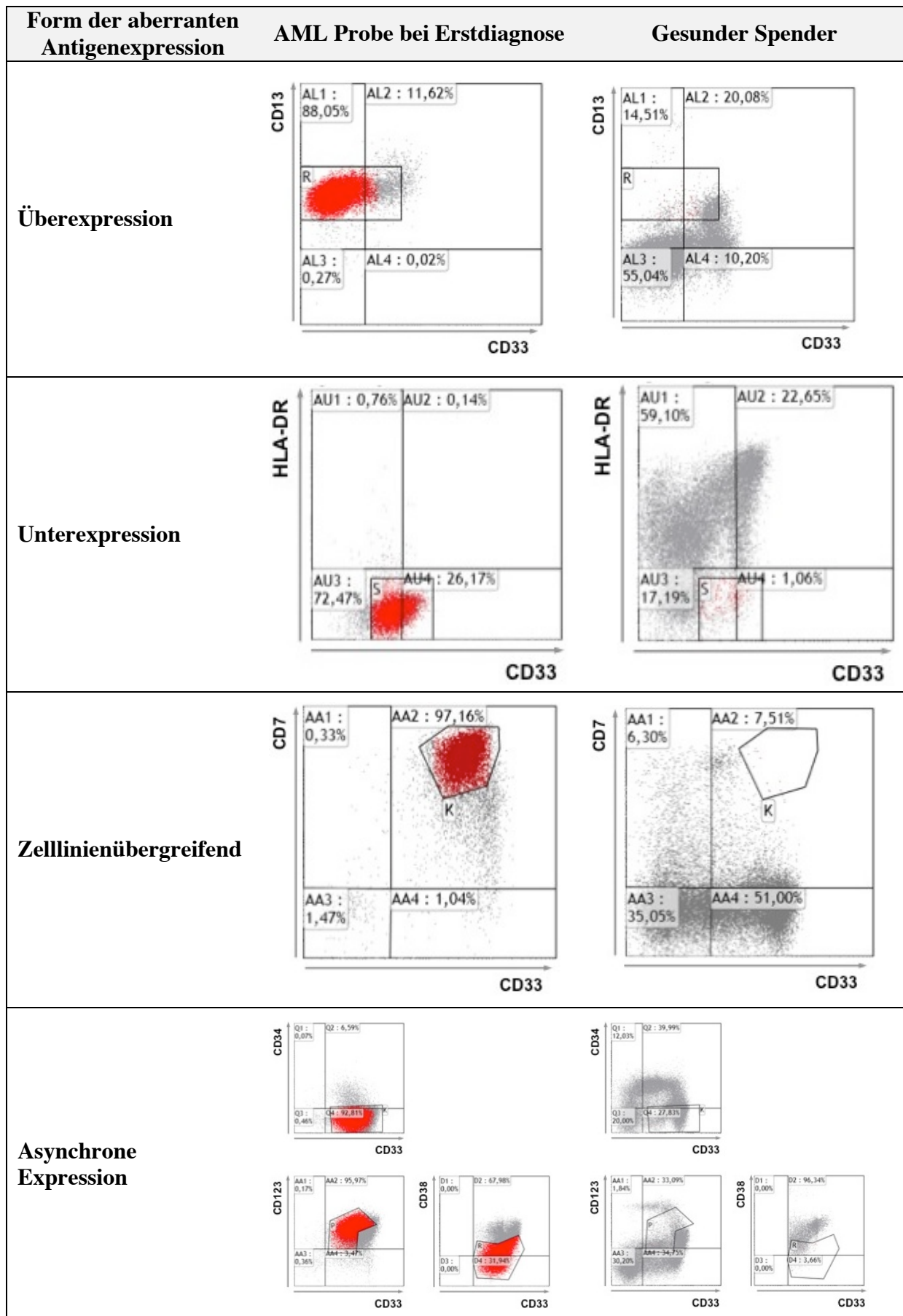


Abbildung 1.3: Formen aberranter Antigenexpression in der AML

1.3.1.2 Gatingstrategien

Aktuell gibt es zwei grundsätzlich unterschiedliche Gatingstrategien zur Erfassung der MRD. Bei beiden Methoden werden manuell sogenannte „Gates“ um maligne Zellpopulationen gesetzt, um diese zu definieren.

Bei der LAIP-gesteuerten Methode wird bei Erstdiagnose mindestens ein individueller LAIP des Patienten definiert. Diese bei Erstdiagnose bestimmten LAIPs werden im Verlauf der Krankheit beobachtet und Zellen die diesen LAIP exprimieren werden erhoben und quantifiziert (69, 70). Eine Limitation dieser Strategie ist das potentiell im Verlauf der Erkrankung auftretende Veränderungen des Antigenprofils („Antigen shift“) unerkannt bleiben können.

Bei der „different-from-normal“-Methode wird in jeder erhobenen KM-Probe aufs Neue nach jeweiligen Zellpopulationen mit aberrantem Expressionsmuster gescreent (71, 72).

1.3.1.3 Prognostische Bedeutung der MFC-MRD

Die prognostische Bedeutung der durchflusszytometrisch erfassten MRD in der AML des Erwachsenen- und des Kindesalters wird in aktuellen Studien evaluiert. Es wurde gezeigt, dass die MFC-MRD den Remissionsstatus sensitiver erfasst als die konventionelle morphologische CR und somit einen zuverlässigeren prognostischen Parameter als diese darstellt (55, 56, 73-77). Patienten mit einem positiven MRD-Status zu verschiedenen Zeitpunkten während der Therapie haben ein höheres Risiko ein Rezidiv zu erleiden, als Patienten mit einem negativen MRD-Test (53). Der MFC-MRD-Status stellt somit einen wichtigen unabhängigen prognostischen Faktor dar (50, 74, 78) und bringt bei Diagnostik zum Zeitpunkt nach Induktion und nach Konsolidierung für jede zytogenetisch und molekulargenetisch definierte Risikosubgruppe zusätzliche unabhängige prognostische Information (70, 74-76, 78, 79). So könnte die MFC-MRD Diagnostik dabei helfen, innerhalb der Subgruppen Patienten zu identifizieren, die unter hohem Rezidivrisiko stehen und sie von denen abzugrenzen, die in wahrscheinlich in CR verbleiben werden.

Bisherige Studien konzentrierten sich fast ausschließlich auf die MFC-MRD Diagnostik zum Zeitpunkt nach Induktion und auf spätere Zeitpunkte. Über die Bedeutung der MFC-Diagnostik zu einem früheren Zeitpunkt, z.B. zum Zeitpunkt der Aplasie ist noch sehr wenig

bekannt. Kern et al. und Köhnke et al. gehören zu den Pionieren der Untersuchung der MRD zu diesem frühen Zeitpunkt (Tabelle 1.4)(49, 80).

Zeitpunkt der MRD Messung	Studie	n	OR
Aplasie	Kern 2004	106	1.8
	Köhnke 2015	178	1.7
Nach Induktion	Kern 2004	58	2.9
	Al-Mawali 2009	25	4.7
	Freeman 2013	286	1.9
	Terwijn 2013	183	2.6
	Chen 2015	245	3.1
Nach Konsolidierung	Buccisano 2015	210	2.3
Vor allogener SZT	Walter 2013	253	4.9

Tabelle 1.4: Zeitpunkte der Erfassung der MFC-MRD in ausgewählten bisherigen Studien

1.3.2 Molekulargenetische Erfassung der MRD

Die molekulargenetische Erfassung der MRD beruht auf der Identifizierung und Quantifizierung von Mutationen und von Fusionsgenen, die ausschließlich in der AML vorkommen und die im normalen Knochenmark nicht vorzufinden sind (65). Solch ein leukämie-spezifisches Gen-Rearrangement kann allerdings nur in etwa 50% der Patienten nachgewiesen werden, sodass diese Methode nur bei diesem Anteil an Patienten anwendbar ist. Studien haben gezeigt, dass die molekulargenetische Erfassung der MRD zu einem frühen Zeitpunkt prognostische Aussagekraft besitzt (81-83).

Studien zum sequenziellen MRD-Monitoring zeigten, dass persistierend hohe PCR-Level oder ein steigendes Level an leukämischen Transkripten ein Rezidiv vorhersagen (54). Dadurch erhält man die Möglichkeit einer frühen Intervention. Ob diese auch von klinischen Nutzen ist, wird untersucht (4).

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Die hohen Rezidivraten in der AML stellen eine aktuelle therapeutische Herausforderung dar. Die heutzutage etablierten prognostischen Faktoren erfassen nur sehr eingeschränkt das Rezidivrisiko eines einzelnen Patienten. Somit ist die Suche nach neuen sensitiveren prognostischen Faktoren von großer Bedeutung.

Die durchflusszytometrisch gemessene Minimale Resterkrankung (MFC-MRD) kristallisiert sich immer weiter als bedeutende Methode zur Erfassung des Therapieansprechens heraus. Studien haben gezeigt, dass der MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion unabhängige prognostische Aussagekraft hat (74-76). Über die Bedeutung der MFC-MRD zu einem früheren Zeitpunkt ist sehr wenig bekannt. Dabei könnte eine möglichst frühe und genaue Risikostratifizierung der Patienten für das Therapiemanagement der AML wichtig sein (84).

Zentrales Ziel dieser Arbeit ist es zu evaluieren, ob die Messung der MFC-MRD zum Zeitpunkt der Aplasie die Risikostratifizierung der AML-Patienten verbessert. Hierzu wird zunächst untersucht, ob die prognostischen Faktoren bei Erstdiagnose und Parameter zur Erfassung des Therapieansprechens – unter anderem die MFC-MRD zum Zeitpunkt der Aplasie – mit dem Überleben korrelieren. Dann wird evaluiert, ob die MFC-MRD zum Zeitpunkt der Aplasie im Kontext dieser bereits existierenden prognostischen Faktoren zusätzliche prognostische Information beinhaltet.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Patienten

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten bei Erfüllung folgender Kriterien:

- am Labor für Leukämiediagnostik der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Klinikums der Universität München zwischen den Jahren 2012 und 2016 neu diagnostizierte AML (ausgenommen Promyelozytenleukämie),
- mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie analysierte KM-Probe bei Erstdiagnose und mindestens einer weiteren im Verlauf,
- Erhalt einer intensiven Induktionstherapie,
- Patientenalter bei Erstdiagnose über 18 Jahre,
- Vorliegende schriftliche Einwilligung der Patienten zur wissenschaftlichen Verwendung Ihrer Daten.

Patienten mit Promyelozytenleukämie wurden aufgrund der Einzigartigkeit der Therapie und der guten Prognose ihrer Erkrankung nicht mit in die Studie aufgenommen.

3.2 Diagnostik

Die routinemäßig durchgeführte Diagnostik bei Erstdiagnose umfasste die Zytomorphologie, Zytogenetik, Mutationsanalyse und die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung wie in vorherigen Studien beschrieben (14, 21, 85, 86). Die Risikostratifizierung der Patienten nach Genetik erfolgte entsprechend den Empfehlungen des European LeukemiaNet 2017 (4).

3.3 Therapieprotokolle

Intensive Induktionstherapie

Die intensive Induktionstherapie der Patienten erfolgte nach dem S-HAM- oder nach dem 7+3-Protokoll.

Das S-HAM-Protokoll wurde nach den Empfehlungen der AMLCG Studie 2008 durchgeführt (87). Die Patienten <60 Jahre erhielten 3g Cytosinarabinosid (AraC), die Patienten ≥ 60 Jahre 1g AraC zwei Mal täglich als kontinuierliche Infusion über 3 Stunden an den Tagen 1 – 2 und 8 – 9. Zusätzlich erhielten die Patienten Mitoxantron in einer Dosierung von 10 mg/m² als kontinuierliche Infusion über 30 Minuten an den Tagen 3 – 4 und 10 – 11 (Tabelle 3.1).

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11
AraC 3g (oder 1g) i.v.	■ ■	■ ■						■ ■	■ ■		
Mitoxantron 10mg/m ² i.v.			●	●						●	●

Tabelle 3.1: Das S-HAM-Protokoll im Überblick

Die nach dem 7+3-Protokoll behandelten Patienten erhielten 100 mg/m² pro Tag AraC als kontinuierliche Infusion über 7 Tage und Daunorubicin an den Tagen 1 – 3 (Tabelle 3.2) (19, 88).

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
AraC 100 mg/m ² i.v.	■	■	■	■	■	■	■
Daunorubicin 45 mg/m ² i.v.	◆	◆	◆				

Tabelle 3.2: Das 7+3-Schema im Überblick

Konsolidierung und Erhaltungstherapie

Die Konsolidierungstherapie und die Erhaltungstherapie erfolgte nach AMLCG Standard (44). Zwei bis vier Wochen nach dem Erreichen der CR wurden die Patienten nach dem TAD Schema behandelt. An den Tagen 1 und 2 erhielten die Patienten 100mg/m² AraC als kontinuierliche Infusion. An den Tagen 3 – 8 erhielten sie 100mg/m² AraC zwei Mal pro Tag als Infusion über eine Stunde. Zusätzlich erhielten sie an den Tagen 3 – 5 Daunorubicin 60mg/m² als Infusion über eine Stunde und an den Tagen 3 – 9 Thioguanin 100mg/m² zwei Mal pro Tag per os (Tabelle 3.3).

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9
AraC 100mg/m ² i.v.	■	■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	
Daunorubicin 60mg/m ² i.v.			◆	◆	◆				
Thioguanin 100mg/m ² p.o.			▲ ▲	▲ ▲	▲ ▲	▲ ▲	▲ ▲	▲ ▲	▲ ▲

Tabelle 3.3: Die chemotherapeutische Konsolidierungstherapie nach AMLCG-Standard im Überblick

Bei Patienten bei geeignetem Risikoprofil mit mittlerem oder hohem Rezidivrisiko wurde die Möglichkeit der allogenen Stammzelltransplantation als alternative Konsolidierungstherapie evaluiert und gegebenenfalls durchgeführt.

3.4 Durchflusszytometrische Analyse

3.4.1 Probengewinnung

Das Knochenmarkblut wurde durch Punktion des Beckenkammes gewonnen. Die Proben wurden von der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Klinikum Großhadern und deutschlandweit von Kliniken und niedergelassenen Ärzten an das Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität zur Aufbereitung und Analysierung übersandt.

3.4.2 Probenaufbereitung

Die Isolierung der mononukleären Zellen des restlichen Knochenmarkblutes erfolgte durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und Erythrozytolyse. Die Markierung von Oberflächenantigenen erfolgte mittels fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper. In dieser Arbeit wurden die Fluorochromen FITC-, PE-, ECD-, PC7-, APC, APCA750-, PacBlue- und KrOrange-konjugierte Antikörper verwendet. Es wurden 8 Panel mit jeweils Kombinationen von 6 – 8 verschiedenen monoklonalen Antikörpern zur Analyse des Knochenmarkblutes erstellt (Tabelle 3.4). Diese Kombination der verschiedenen monoklonalen Antikörper ermöglicht die Analyse der Expressionsmuster der Zellen und die Bestimmung der LAIPs.

	FITC	PE	ECD	PC7	APC	APCA 750	PacBlue	Kr- Orange
A1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	CD45
A2	CD34	CD64	CD14	CD33	CD2		CD65	CD45
A3	CD15	HVEM	CD34	CD33	CD117	CD11b		CD45
A4	CD33	CD34		CD13	CD56		HLA-DR	CD45
A5	CD34	7.1	CD3	CD33	CD7	CD19		CD45
A6	CD38	CD135	CD34	CD33	CD123			CD45
A7	CD38	CD44	CD34	CD33	CD47			CD45
A8	CD38	CD99	CD34	CD33	CLL-1			CD45

Tabelle 3.4: Übersicht über die in der Studie verwendeten Antikörperpanel

3.4.3 Durchflusszytometrische Messung

Die durchflusszytometrische Erfassung des Therapieansprechens wurde zum Zeitpunkt der Aplasie (Tag 15-18 nach Beginn der Induktionstherapie) und nach Induktion (25-129 Tage nach Erstdiagnose) gemessen. Die KM-Proben wurden mittels 10-Farben-Durchflusszytometer (NAVIOS 10/3 Beckman Coulter, Brea, CA, USA) analysiert. Die durchflusszytometrisch erhobenen Daten wurden mit Kaluza (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) analysiert.

3.5 Gatingstrategie zur Bestimmung der MRD

Zur Bestimmung der MRD wurde die in vorherigen Studien bereits beschriebene LAIP-gesteuerte Gatingstrategie angewendet (70, 80). Die Bestimmung der LAIPs erfolgte an der Knochenmarksprobe bei Erstdiagnose der AML durch manuelle Inspektion. Es wurde nach Populationen mit aberranter Expression von Oberflächenproteinen gesucht. Diese wurden durch das manuelle Setzen von Gates und deren Kombination definiert. Als aberrant wurden Populationen angenommen, die in KM-Proben 5 verschiedener gesunder Spender auf $<0,1\%$ der Zellen exprimiert wurden. Um dies zu bestimmen, wurden die bei Erstdiagnose auf der AML-KM-Probe gesetzten und kombinierten Gates auf 5 KM-Proben gesunder Spender übertragen. Zur Messung der MRD wurden die bei ED gesetzten LAIP-definierenden Gates auf die Verlaufspalten angewendet. Ein LAIP-Wert von $\geq 0,1\%$ wurde als MRD positiv gewertet, ein LAIP-Wert $<0,1\%$ dementsprechend als MRD negativ. Pro Patient wurde mindestens ein LAIP bestimmt. Im Falle mehrerer LAIPs wurde zu den jeweiligen Messpunkten jeweils der LAIP zur MRD-Status-Bestimmung gewertet, der am höchsten exprimiert wurde. Die Gatingstrategie wurde beispielhaft in der Abbildung 3.1 dargestellt.

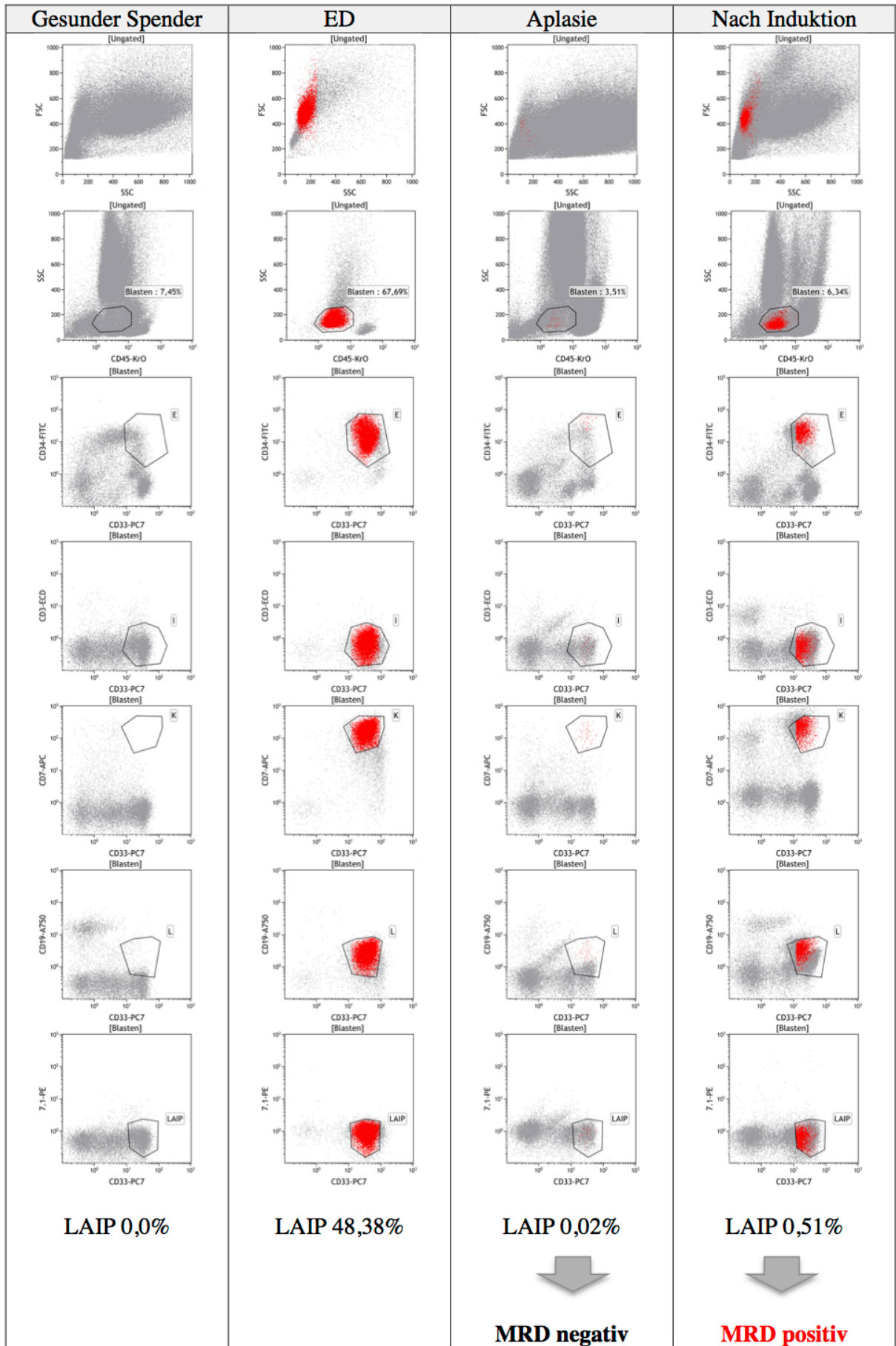


Abbildung 3.1: Beispielhafte Darstellung der angewandten LAIP-gesteuerten Gatingstrategie

3.6 Die in der Studie erhobenen Parameter

Erfassung des Therapieansprechens

Das Therapieansprechen wurde anhand verschiedener Parameter nach international anerkannten Empfehlungen erfasst (Tabelle 3.5) (37, 44, 89).

Parameter	Zu erfüllende Kriterien
morphologische Komplett Remission (CR)	<u>Knochenmark</u> : <5% Blasten, normale Hämatopoese aller Zelllinien <u>peripheres Blut</u> : Neutrophile >1.500/ μ l, Thrombozyten >100.000/ μ l <u>extramedullär</u> : keine nachweisbaren Herde
morphologische CR mit inkompletter Erholung der Blutwerte (CRi)	Erreichen der Kriterien für die CR mit Ausnahme der Erholung der Neutrophilen- und Thrombozytenzahlen im peripheren Blut
„early Blast Clearance“ (eBC)	<u>Knochenmark</u> : <10% Blasten am Tag 16 nach Beginn der Induktion

Tabelle 3.5: Definition der Parameter zur Beurteilung des Therapieansprechens

Endpunkte

Die Definitionen der erhobenen Endpunkte sind in der Tabelle 3.6 dargestellt.

Endpunkt	Definition
Rezidiv	<ul style="list-style-type: none"> • Wiederauftreten leukämischer Blasten im Knochenmark $\geq 5\%$ nach zuvor erreichter CR oder der CRi. • Gesicherte Infiltration extramedullären Gewebes durch leukämische Blasten, unabhängig von der Anzahl leukämischer Blasten im KM
Therapieversagen	<ul style="list-style-type: none"> • persistierende Leukämie • Tod innerhalb von 7 Tagen nach Ende des ersten Zyklus der Induktionstherapie (früher Tod) • Tod während der Therapie-induzierten Hypoplasie (hypoplasitischer Tod)
Tod	<ul style="list-style-type: none"> • Versterben des Patienten zu einem Zeitpunkt, der nicht unter die Definition des Therapieversagens fällt.

Tabelle 3.6: Definitionen der in der Studie erhobenen Endpunkte

Überlebenszeiten

Die Überlebenszeiten wurden wie zuvor in anderen Studien beschrieben berechnet (Tabelle 3.7) (4).

Überlebenszeit	Definition
Gesamtüberleben (OS)	Zeitraum vom Datum der Erstdiagnose bis zum Todesdatum
Ereignisfreies Überleben (EFS)	Zeitraum vom Datum der Erstdiagnose bis zum Tod, Rezidiv oder Therapieversagen, je nachdem welches Ereignis als erstes auftritt
Rezidivfreies Überleben (RFS)	Zeitraum zwischen dem Datum der erreichten kompletten Remission bis zum Rezidiv oder Tod

Tabelle 3.7: Definitionen der in der Studie berechneten Überlebenszeiten.

3.7 Statistische Auswertung

Sämtliche Erhebungsmerkmale wurden anhand skalenadäquater Maßzahlen beschrieben. Eine univariate Betrachtung der Effekte der einzelnen Variablen auf das Gesamtüberleben, Ereignisfreie Überleben und Rezidivfreie Überleben erfolgte anhand des Kaplan-Meier-Schätzers und dem zugehörigen Log-Rank-Test. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Eine multivariate Betrachtung erfolgte anhand von Cox-Regressions-Modellen. Die statistische Analyse wurde mit dem Computerprogramm „IBM SPSS Statistics Version 22“ durchgeführt.

Da eine SZT mit einer therapieassoziierten Mortalität einhergehen kann, wurden statistische Analysen durchgeführt, bei denen die Überlebensdaten der Patienten zum Zeitpunkt der SZT zensiert worden sind, mit dem Ziel, einen eventuellen krankheitsunabhängigen Einfluss der SZT auf das Überleben auszuschließen.

4 Ergebnisse

4.1 Das Patientenkollektiv

Von September 2012 bis Januar 2016 wurden 105 Patienten in die Studie aufgenommen und deren Knochenmarksproben im Labor für Leukämiediagnostik der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Klinikums der Universität München durchflusszytometrisch analysiert. Die MRD konnte bei vorhandener Knochenmarksprobe, die mittels passendem Antikörperpanel durchflusszytometrisch analysiert wurde, zum Zeitpunkt der Aplasie in 87 Fällen gemessen werden. Von der MRD-Analyse zum Zeitpunkt nach Induktion wurden die zur Induktionstherapie refraktären Patienten ausgeschlossen. Nur Patienten, die eine CR oder eine CRi erreicht haben wurden in die Analyse eingeschlossen, sodass in 72 Fällen die MRD zum Zeitpunkt nach Induktion analysiert werden konnte. 59 Patienten hatten zu beiden Zeitpunkten verfügbare MRD-Analysen (Abbildung 4.1).

Ein hohes Alter bei Erstdiagnose (≥ 60 Jahre) zeigte eine Assoziation mit MRD-Positivität zum Zeitpunkt der Aplasie (63,8% vs. 37,5% für MRD-Positivität vs. MRD-Negativität, Tabelle 4.1). Von den 105 Patienten konnte nach der intensiven Induktionstherapie bei 60 (57,1%) eine komplette Remission verzeichnet werden. 20 Patienten (19,0%) erreichten eine inkomplette Remission und 25 Patienten (23,8%) waren refraktär. Eine MRD-Positivität zum Zeitpunkt der Aplasie zeigte eine Assoziation mit der Refraktärität (36,2% vs. 10,0% für MRD-Positivität vs. MRD-Negativität, Tabelle 4.1). Eine MRD-Positivität zum Zeitpunkt nach Induktion war mit einer im Vergleich zu MRD-negativen Patienten mit einer niedrigeren Rate an CR und dafür einer höheren Rate an CRi assoziiert (64,1% vs. 87,9% und 35,9% vs. 12,1). 45 Patienten (42,9%) erhielten eine SZT (Tabelle 4.1).

Der Vorgang der Patientenselektion wurde in der Abbildung 4.1 und die Patientencharakteristika wurden in der Tabelle 4.1 wiedergegeben.

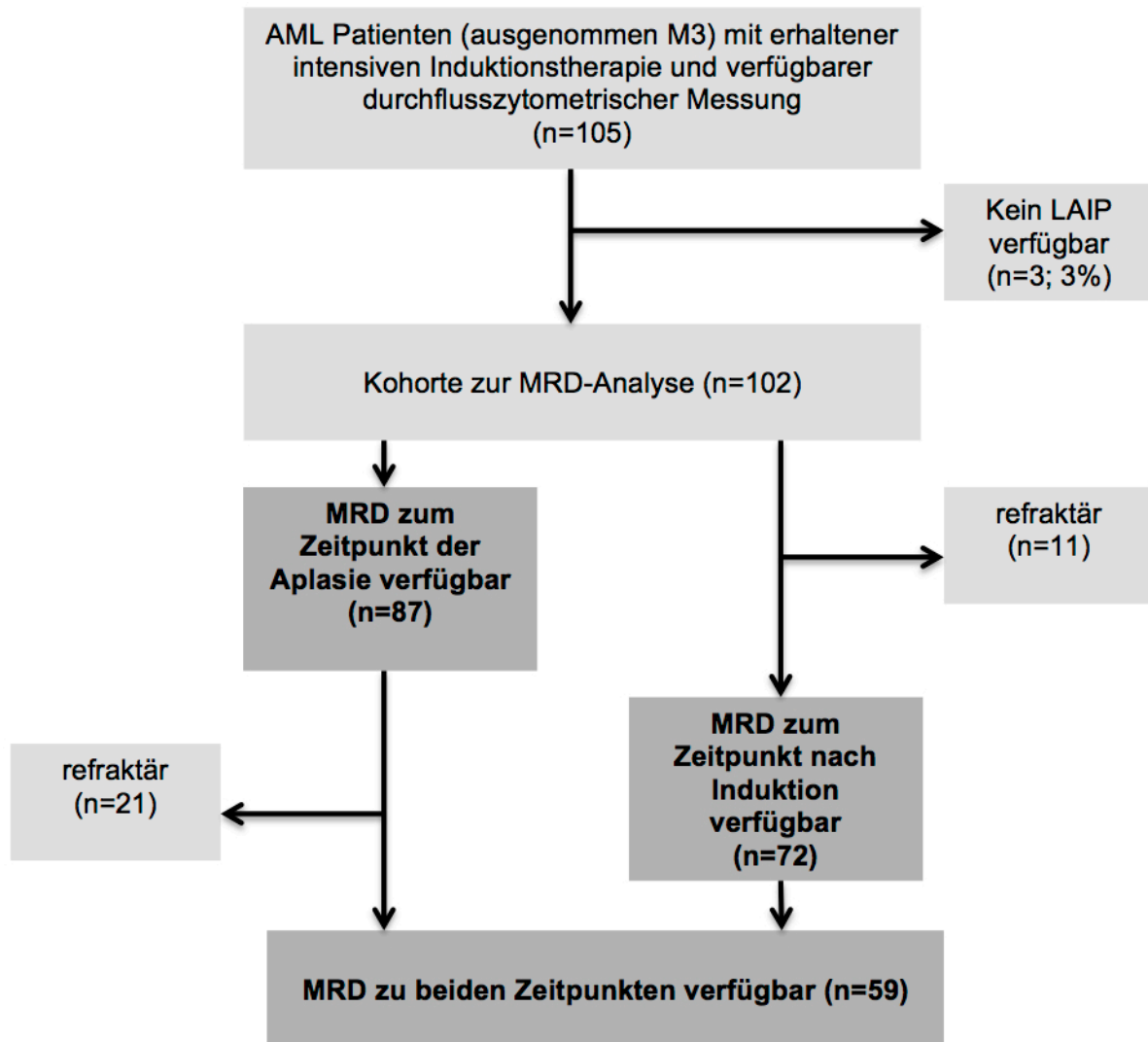


Abbildung 4.1: Vorgang der Patientenselektion im Überblick

	Kohorte zur MFC-MRD- Analyse (n=105)	MFC-MRD zum Zeitpunkt der Aplasia (n=87)		MFC-MRD zum Zeitpunkt nach Induktion (n=72)	
		MRD pos.	MRD neg.	MRD pos.	MRD neg.
Geschlecht					
Weiblich	51 (48,6%)	20 (42,6%)	22 (55,0%)	19 (48,7%)	20 (60,6%)
Männlich	54 (51,4%)	27 (57,4%)	18 (45,0%)	20 (51,3%)	13 (39,4%)
Alter bei Erstdiagnose					
<60 Jahre	51 (48,6%)	17 (36,2%)	25 (62,5%)	19 (48,7%)	22 (66,7%)
≥60 Jahre	54 (51,4%)	30 (63,8%)	15 (37,5%)	20 (51,3%)	11 (33,3%)
AML Typ					
de novo	82 (78,1%)	36 (76,6%)	33 (82,5%)	32 (82,1%)	28 (84,8%)
sAML	15 (14,3%)	8 (17,0%)	5 (12,5%)	6 (15,4%)	3 (9,1%)
tAML	8 (7,6%)	3 (6,4%)	2 (5,0%)	1 (2,6%)	2 (6,1%)
Zytopenetische Gruppe nach MRC Kriterien					
Günstig	10 (9,5%)	3 (6,4%)	7 (17,5%)	3 (7,7%)	7 (21,2%)
Intermediär	75 (71,4%)	33 (70,2%)	30 (75,0%)	31 (79,5%)	22 (66,7%)
Ungünstig	20 (19,0%)	11 (23,4%)	3 (7,5%)	5 (12,8%)	4 (12,1%)
Prognostische Gruppe nach ELN-Klassifikation 2017					
Günstig	34 (32,4%)	10 (21,3%)	18 (45,0%)	12 (30,8%)	16 (48,5%)
Intermediär	33 (31,4%)	18 (38,3%)	11 (27,5%)	18 (46,2%)	9 (27,3%)
Ungünstig	38 (36,2%)	19 (40,4%)	11 (27,5%)	9 (23,1%)	8 (24,2%)
Induktionstherapie					
sHAM	80 (76,2%)	32 (68,1%)	34 (85,0%)	32 (82,1%)	28 (84,8%)
7+3	23 (21,9%)	15 (31,9%)	6 (15,0%)	7 (17,9%)	5 (15,2%)
Ergebnis der Induktionstherapie					
CR	60 (57,1%)	22 (46,8%)	26 (65,0%)	25 (64,1%)	29 (87,9%)
CRi	20 (19,0%)	8 (17,0%)	10 (25,0%)	14 (35,9%)	4 (12,1%)
Refraktär	25 (23,8%)	17 (36,2%)	4 (10,0%)	N/A	N/A
Allogene SZT					
	45 (42,9%)	23 (48,9%)	17 (42,5%)	20 (51,3%)	14 (42,4%)
Follow-up (Monate)					
Median	9,8		9,0		11,0

Tabelle 4.1: Patientencharakteristika gruppiert nach Verfügbarkeit der durchflusszytometrisch erhobenen MRD zum Zeitpunkt der Aplasia und post-Induktion

4.2 Die prognostischen Faktoren in der univariaten Analyse

4.2.1 Stratifizierung der Patienten nach den prognostischen Faktoren bei Erstdiagnose

Es wurden univariate Analysen für die etablierten prognostischen Faktoren bei Erstdiagnose durchgeführt.

4.2.1.1 Alter

Die Patienten wurden nach Alter $<$ und ≥ 60 Jahre stratifiziert.

Die Stratifizierung der Patienten nach Alter $<$ und ≥ 60 Jahre zeigte eine statistisch signifikante Korrelation mit dem OS, EFS und RFS (Log-Rank-Test $p=0,001$, $p<0,001$, $p=0,003$, Abbildung 4.2). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 89% für Patienten <60 Jahre und 41% für Patienten ≥ 60 Jahre. Das mediane Gesamtüberleben wurde für Patienten <60 Jahre nicht erreicht und betrug 18,1 Monate für Patienten ≥ 60 Jahre (Abbildung 4.2, I a). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 43% für Patienten <60 Jahre vs. 14% für Patienten ≥ 60 Jahre. Das mediane EFS betrug 20,6 Monate für Patienten <60 Jahre vs. 5,6 Monate für Patienten ≥ 60 Jahre (Abbildung 4.2, II a). 2-Jahres-RFS-Raten betragen 44,1% für Patienten <60 Jahre vs. 20,4% für Patienten ≥ 60 Jahre. Das mediane RFS betrug 21,1 Monate für Patienten <60 Jahre und 7,8 Monate für Patienten ≥ 60 Jahre (Abbildung 4.2, III a).

Auch bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zeigte die Stratifizierung nach Alter $<$ und ≥ 60 Jahre eine statistisch signifikante Korrelation mit dem OS, EFS und RFS (Log-Rank-Test $p=0,007$, $p<0,001$, $p=0,011$, Abbildung 4.2). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 94% für Patienten <60 Jahre vs. 46% für Patienten ≥ 60 Jahre. Das mediane Überleben wurde für Patienten <60 Jahre nicht erreicht und betrug für Patienten ≥ 60 Jahre 18,1 Monate (Abbildung 4.2, I b). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 47% für Patienten <60 Jahre und 5% für Patienten ≥ 60 Jahre. Das mediane EFS betrug 12,0 Monate für Patienten <60 Jahre vs. 5,0 Monate für Patienten ≥ 60 Jahre (Abbildung 4.2, II b). 2-Jahres-RFS-Raten betragen 41% für Patienten <60 Jahre und wurden für Patienten ≥ 60 Jahre nicht erfasst. Das mediane RFS betrug 20,5 Monate für Patienten <60 Jahre und 7,1 Monate für Patienten ≥ 60 Jahre (Abbildung 4.2, III b).

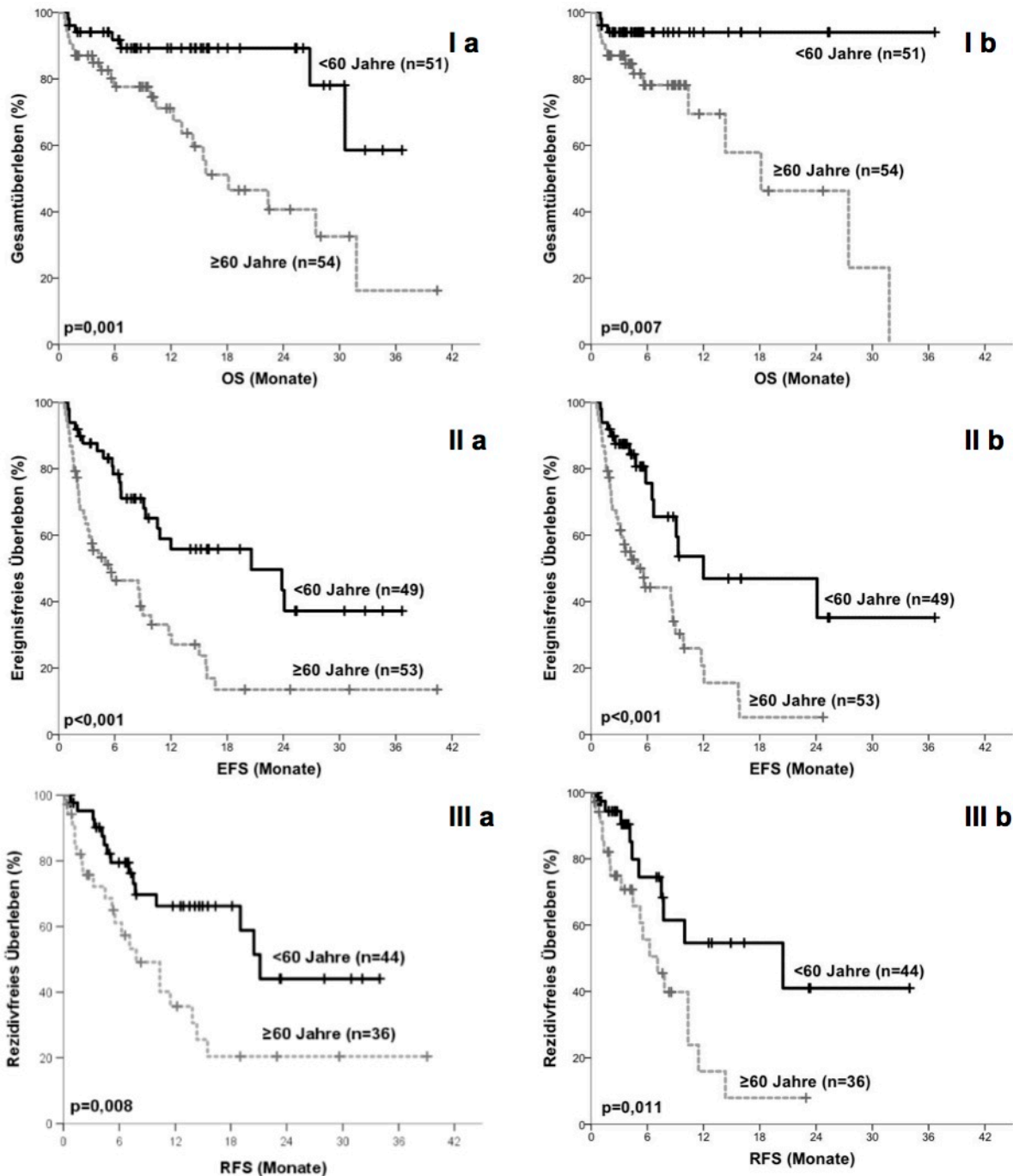


Abbildung 4.2: OS, EFS und RFS stratifiziert nach Alter < und ≥ 60 Jahre. (I b, II b, III b) Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert. (I a) OS stratifiziert nach Alter < und ≥ 60 Jahre (Log-Rank-Test $p=0,001$). (I b) OS stratifiziert nach Alter < und ≥ 60 Jahre. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,007$). (II a) EFS stratifiziert nach Alter < und ≥ 60 Jahre (Log-Rank-Test $p<0,001$). (II b) EFS stratifiziert nach Alter < und ≥ 60 Jahre. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p<0,001$). (III a) RFS stratifiziert nach Alter < und ≥ 60 Jahre (Log-Rank-Test $p=0,008$). (III b) RFS stratifiziert nach Alter < und ≥ 60 Jahre. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,011$).

4.2.1.2 ELN-Klassifikation 2017

Die Patienten wurden nach ELN-Klassifikation 2017 stratifiziert.

Die Stratifizierung der Patienten nach ELN-Klassifikation 2017 zeigte bei einem p-Wert $<0,2$ einen Trend zur Korrelation mit dem OS und EFS (Log-Rank-Test $p=0,067$, $p=0,140$, Abbildung 4.3). Die Stratifizierung der Patienten nach ELN-Klassifikation 2017 zeigte keine statistisch signifikante Korrelation mit dem RFS (Log-Rank-Test $p=0,984$, Abbildung 4.3). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 65%, 75% und 54% für die als günstig, intermediär und ungünstig klassifizierten Patienten. Das mediane Gesamtüberleben betrug 31,8 Monate für die günstige Risikogruppe, wurde für die intermediäre Risikogruppe nicht erreicht und betrug 26,8 Monate für die ungünstige Risikogruppe (Abbildung 4.3, I a). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 26%, 38% und 22% für die als günstig, intermediär und ungünstig klassifizierten Patienten. Das mediane EFS betrug 9,9 Monate für die günstige, 16,7 Monate für die intermediäre und 4,2 Monate für die ungünstige Risikogruppe (Abbildung 4.3, II a). 2-Jahres-RFS-Raten betragen 33%, 42% und 28% für die als günstig, intermediär und ungünstig klassifizierten Patienten. Das mediane RFS betrug 10,3 Monate für die günstige, 15,5 Monate für die intermediäre und 20,5 Monate für die ungünstige Risikogruppe (Abbildung 4.3, III a).

Bei Zensurierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zeigte die Stratifizierung nach ELN-Klassifikation 2017 eine statistisch signifikante Korrelation mit dem OS und dem EFS (Log-Rank-Test $p=0,018$, $p=0,046$). Es konnte ein Trend zur Korrelation mit dem RFS beobachtet werden (Log-Rank-Test $p=0,089$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 75%, 94% und 51% für die als günstig, intermediär und ungünstig klassifizierten Patienten. Das mediane Gesamtüberleben betrug 31,8 Monate für die günstige Risikogruppe, wurde für die intermediäre Risikogruppe nicht erreicht und betrug 27,5 Monate für die ungünstige Risikogruppe (Abbildung 4.3, I b). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 26%, 20% und 20% für die als günstig, intermediär und ungünstig klassifizierten Patienten. Das mediane EFS betrug 9,9 Monate für die günstige, 6,7 Monate für die intermediäre und 4,2 für die ungünstige Risikogruppe (Abbildung 4.3, II b). Die 2-Jahres-RFS-Rate betrug 36% für die als günstig klassifizierten Patienten und wurde für die als intermediär und ungünstig klassifizierten Patienten nicht erreicht. Das mediane RFS betrug 10,3 Monate für Patienten der günstigen Risikogruppe vs. 4,4 Monate für Patienten der intermediären Risikogruppe und 11,5 Monate für Patienten der ungünstigen Risikogruppe (Abbildung 4.3, III b)

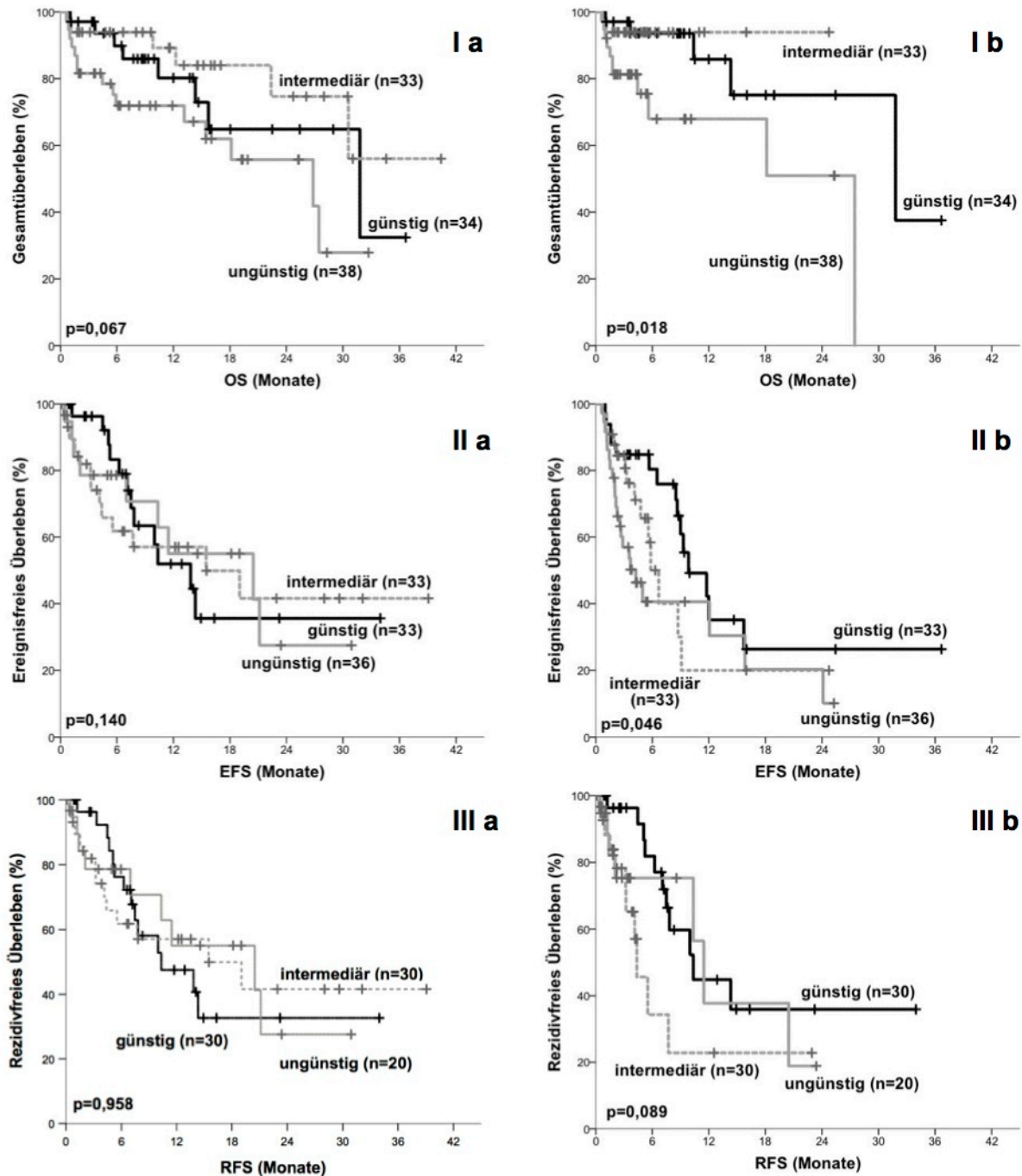


Abbildung 4.3: OS, EFS und RFS stratifiziert nach ELN-Klassifikation 2017. (I b, II b, III b) Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert. **(I a)** OS stratifiziert nach ELN-Klassifikation 2017. (Log-Rank-Test $p=0,067$). **(I b)** OS stratifiziert nach ELN-Klassifikation 2017. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,018$). **(II a)** EFS stratifiziert nach ELN-Klassifikation 2017 (Log-Rank-Test $p=0,140$). **(II b)** EFS stratifiziert nach ELN-Klassifikation 2017. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,046$). **(III a)** RFS stratifiziert nach ELN-Klassifikation 2017 (Log-Rank-Test $p=0,958$). **(III b)** RFS stratifiziert nach ELN-Klassifikation 2017. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,089$).

4.2.2 Stratifizierung der Patienten nach Erfassung des Therapieansprechens

Es wurden univariate Analysen für die Parameter zur Erfassung des Therapieansprechens durchgeführt.

4.2.2.1 CR-Status

Die Patienten wurden nach CR-Status stratifiziert.

Die Stratifizierung der Patienten nach CR-Status zeigte eine statistisch signifikante Korrelation mit dem OS und EFS (Log-Rank-Test $p < 0,001$, $p < 0,001$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 73% und 36% für Patienten mit erreichter und nicht erreichter CR. Das mediane Gesamtüberleben betrug 30,6 Monate für Patienten mit erreichter CR vs. 5,6 Monate für Patienten mit nicht erreichter CR (Abbildung 4.4, I a). 2-Jahres EFS-Raten betragen 36% und 0% für Patienten mit erreichter und nicht erreichter CR. Das mediane EFS betrug 15,7 Monate für Patienten mit erreichter CR vs. 1,5 Monate für Patienten mit nicht erreichter CR (Abbildung 4.4, II a).

Auch bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zeigte die Stratifizierung nach CR-Status eine statistisch signifikante Korrelation mit dem OS und dem EFS (Log-Rank-Test $p < 0,001$, $p < 0,001$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 75% und 35% für Patienten mit erreichter und nicht erreichter CR. Das mediane Gesamtüberleben betrug 27,5 Monate für Patienten, die eine CR erreicht haben vs. 4,4 Monate für Patienten, die eine CR nicht erreicht haben (Abbildung 4.4, I b). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 29% und 0% für Patienten mit erreichter und nicht erreichter CR. Das mediane EFS betrug 9,9 Monate für Patienten, die eine CR erreicht haben und 1,5 Monate für Patienten, die eine CR nicht erreicht haben (Abbildung 4.4, IIb).

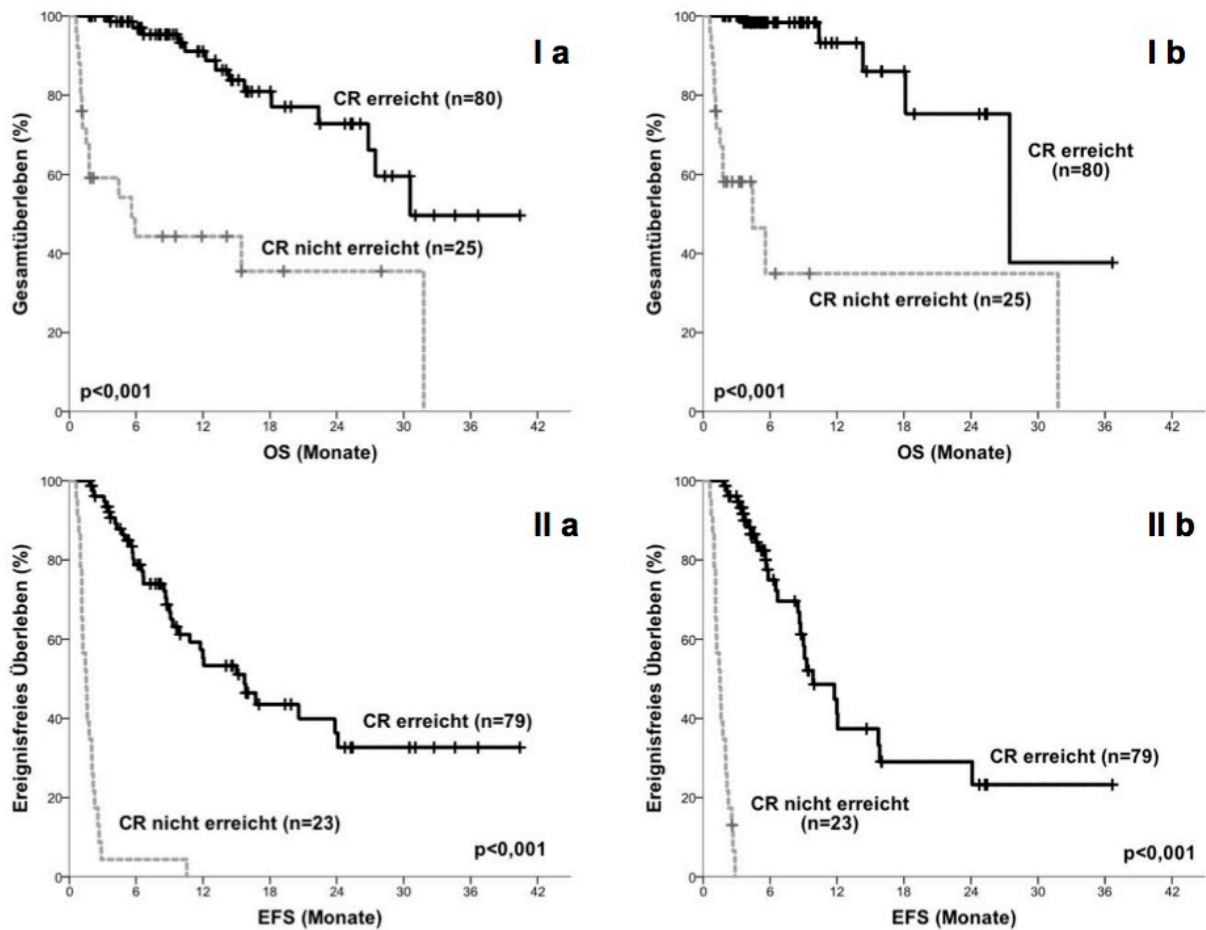


Abbildung 4.4: OS und EFS stratifiziert nach CR-Status. (I b, II b) Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert. (I a) OS stratifiziert nach CR-Status (Log-Rank-Test $p < 0,001$). (I b) OS stratifiziert nach CR-Status. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p < 0,001$). (II a) EFS stratifiziert nach CR-Status (Log-Rank-Test $p < 0,001$). (II b) EFS stratifiziert nach CR-Status. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p < 0,001$).

4.2.2.2 eBC-Status

Die Patienten wurden nach eBC-Status $<$ und $\geq 10\%$ stratifiziert.

Die Stratifizierung der Patienten nach eBC-Status $<$ und $\geq 10\%$ zeigte eine statistisch signifikante Korrelation mit dem EFS (Log-Rank-Test $p=0,011$) aber keine statistisch signifikante Korrelation mit dem OS oder RFS (Log-Rank-Test $p=0,667$, $p=0,551$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 61% und 78% für adäquate und inadäquate eBC. Das mediane Gesamtüberleben betrug 27,5 Monate für Patienten mit adäquater eBC und wurde für Patienten mit inadäquater eBC nicht erreicht (Abbildung 4.5, I a). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 29% und 19% für adäquate und inadäquate eBC. Das mediane EFS betrug 11,8 Monate für Patienten mit adäquater eBC und 3,1 Monate für Patienten mit inadäquater eBC (Abbildung 4.5, II a). 2-Jahres-RFS-Raten betragen 31% und 44% für adäquate und inadäquate eBC. Das mediane RFS betrug 14,3 Monate für Patienten mit adäquater eBC vs. 5,5 Monate für Patienten mit inadäquater eBC (Abbildung 4.5 III a).

Bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zeigte die Stratifizierung der Patienten nach eBC-Status $<$ und $\geq 10\%$ eine stärker ausgeprägte statistisch signifikante Korrelation mit dem EFS (Log-Rank-Test $p=0,005$) aber keine statistisch signifikante Korrelation mit dem OS oder RFS (Log-Rank-Test $p=0,292$, $p=0,365$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 66% und 74% für adäquate und inadäquate eBC. Das mediane Gesamtüberleben betrug 27,5 Monate für Patienten mit adäquater eBC und wurde für Patienten mit inadäquater eBC nicht erreicht (Abbildung 4.5, I b). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 24% und 18% für adäquate und inadäquate eBC. Das mediane EFS betrug 9,1 Monate für Patienten mit adäquater eBC vs. 3,1 Monate für Patienten mit inadäquater eBC (Abbildung 4.5, II b). 2-Jahres-RFS-Raten betragen 22% für Patienten mit adäquater eBC und wurde für Patienten mit inadäquater eBC nicht erfasst. Das mediane Überleben betrug 10,0 Monate für Patienten mit adäquater eBC vs. 3,2 Monate für Patienten mit inadäquater eBC (Abbildung 4.5, III b).

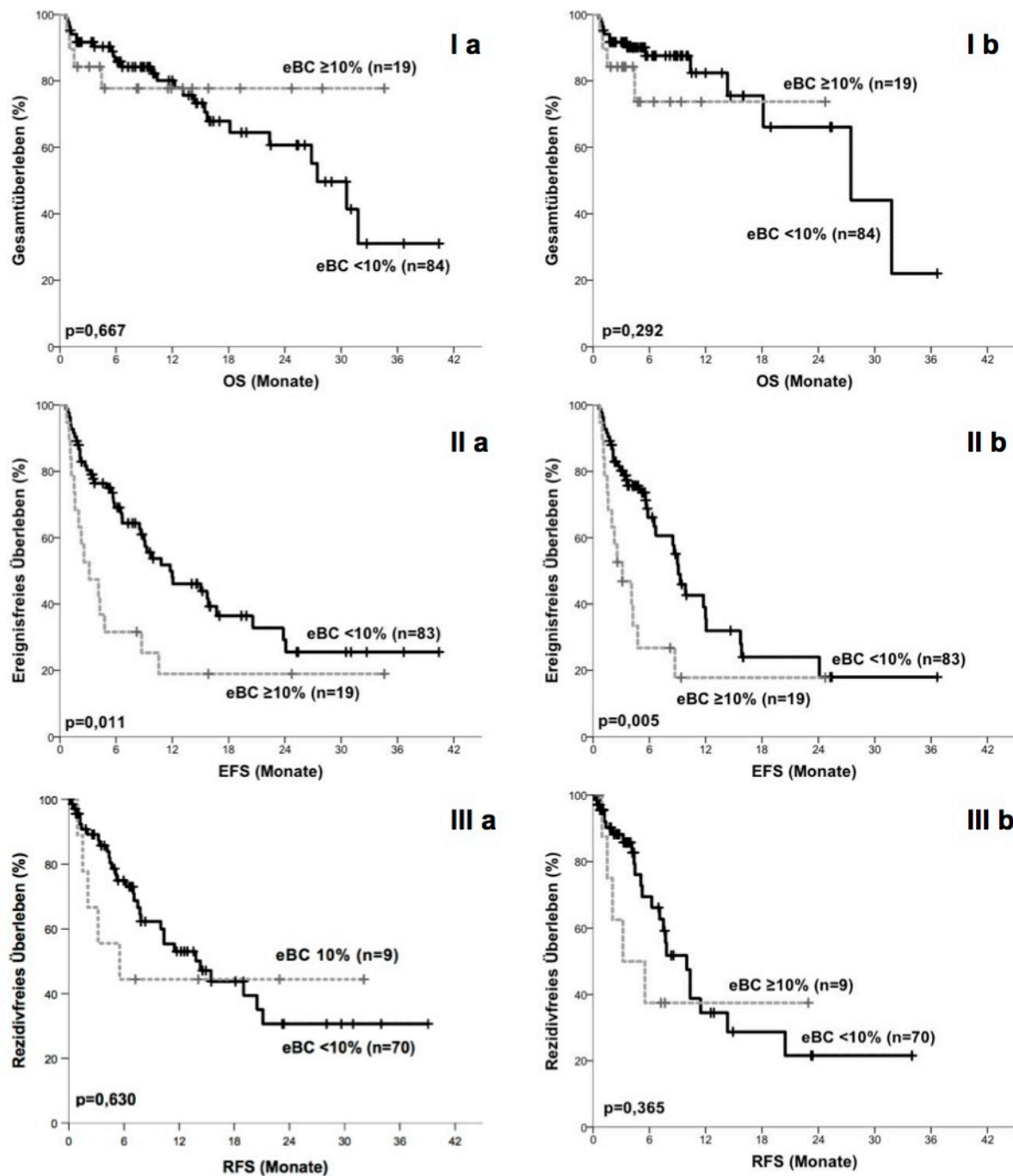


Abbildung 4.5: OS, EFS und RFS stratifiziert nach eBC-Status. (I b, II b, III b) Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert. (I a) OS stratifiziert nach eBC-Status (Log-Rank-Test $p=0,667$). (I b) OS stratifiziert nach eBC-Status. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,292$). (II a) EFS stratifiziert nach eBC-Status (Log-Rank-Test $p=0,011$). (II b) EFS stratifiziert nach eBC-Status. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,005$). (III a) RFS stratifiziert nach eBC-Status (Log-Rank-Test $p=0,630$). (III b) RFS stratifiziert nach eBC-Status. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,365$).

4.2.3 Stratifizierung der Patienten nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie

Es wurden univariate Analysen für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie durchgeführt.

4.2.3.1 Stratifizierung aller Patienten nach MFC-MRD zum Zeitpunkt der Aplasie

Die Patienten wurden nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie stratifiziert.

Die Stratifizierung der Patienten nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie zeigte eine statistisch signifikante Korrelation mit dem OS und EFS (Log-Rank-Test $p=0,036$ $p=0,011$). Für das RFS zeigte sich ein Trend zur Korrelation (Log-Rank-Test $p=0,135$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 87% und 48% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane Gesamtüberleben wurde von MRD-negativen Patienten nicht erreicht und betrug 22,4 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.7, I a). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 44% und 18% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das Mediane Überleben betrug 15,7 Monate für MRD-negative Patienten vs. 5,8 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.7, II a). 2-Jahres-RFS-Raten betragen 34% und 28% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane Überleben betrug 20,5 Monate für MRD-negative Patienten vs. 10,3 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.7, III a).

Bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zeigte sich eine stärker ausgeprägte statistisch signifikante Korrelation mit dem OS und EFS (Log-Rank-Test $p=0,014$, $p=0,001$) und sogar eine statistisch signifikante Korrelation mit dem RFS (Log-Rank-Test $p=0,047$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 92% und 51% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane Gesamtüberleben wurde weder von MRD-positiven, noch von MRD-negativen Patienten erreicht (Abbildung 4.7, I b). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 29% und 11% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane EFS betrug 12,0 Monate für MRD-negative Patienten und 5,0 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.7, II b). 2-Jahres-RFS-Raten weder für MRD-negative, noch für MRD-positive Patienten erfasst. Das mediane Überleben betrug 14,3 Monate für MRD-negative Patienten und 5,5 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.7, III b).

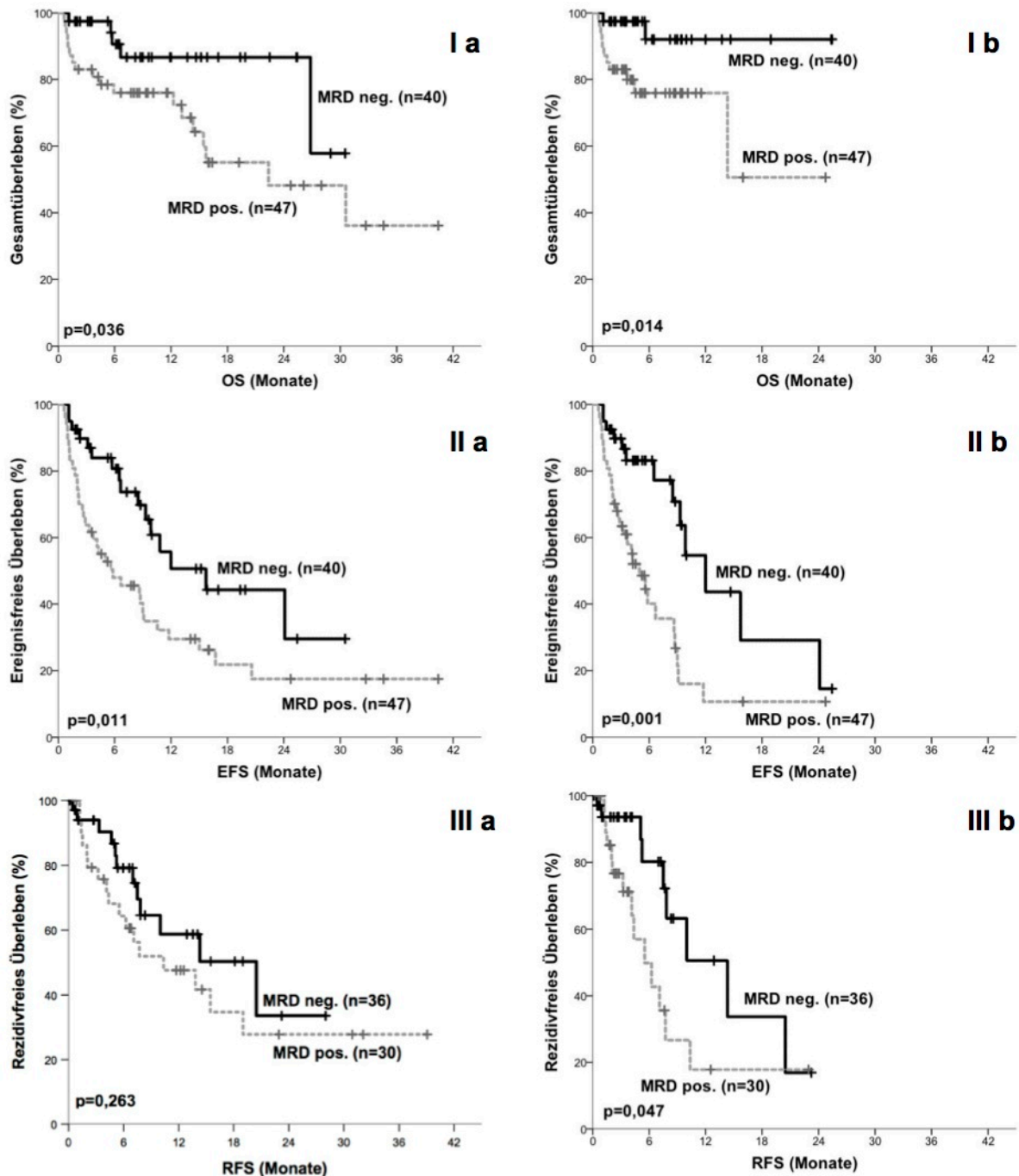


Abbildung 4.6: OS, EFS und RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie. (I b, II b, III b) Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert. (I a) OS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie (Log-Rank-Test $p=0,036$). (I b) OS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der SZT zensiert. (Log-Rank-Test $p=0,014$). (II a) EFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie (Log-Rank-Test $p=0,011$). (II b) EFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,001$). (III a) RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie (Log-Rank-Test $p=0,263$). (III b) RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,047$).

4.2.4 Stratifizierung der Patienten nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion

Die Patienten wurden nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion stratifiziert.

Die Stratifizierung der Patienten nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation mit dem EFS und RFS (Log-Rank-Test $p=0,032$, $p=0,007$), aber keine statistisch signifikante Korrelation mit dem OS (Log-Rank-Test $p=0,759$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 77% und 70% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane Gesamtüberleben wurde für MRD-negative Patienten nicht erreicht und betrug 30,6 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.6, I a). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 49% und 18% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane EFS betrug 15,7 Monate für MRD-negative Patienten vs. 10,8 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.6, II a). 2-Jahres-RFS-Raten betragen 50% und 19% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane RFS wurde von MRD-negativen Patienten nicht erreicht und betrug 7,7 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.6, III a).

Bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zeigte sich eine stärker ausgeprägte statistisch signifikante Korrelation mit dem EFS und RFS (Log-Rank-Test $p=0,002$, $p=0,001$), aber keine statistisch signifikante Korrelation mit dem OS (Log-Rank-Test $p=0,357$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 90% und 32% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane Gesamtüberleben betrug 27,5 Monate für MRD-negative und 18,1 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.6, I b). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 44% und 8% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane EFS betrug 15,7 Monate für MRD-negative Patienten und 8,5 Monate für MRD-negative Patienten (Abbildung 4.6, II b). 2-Jahres-RFS-Raten wurden für MRD-negative Patienten nicht erfasst und betragen 8% für MRD-positive Patienten. Das mediane RFS betrug 14,3 Monate für MRD-negative Patienten und 5,2 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.6, III b).

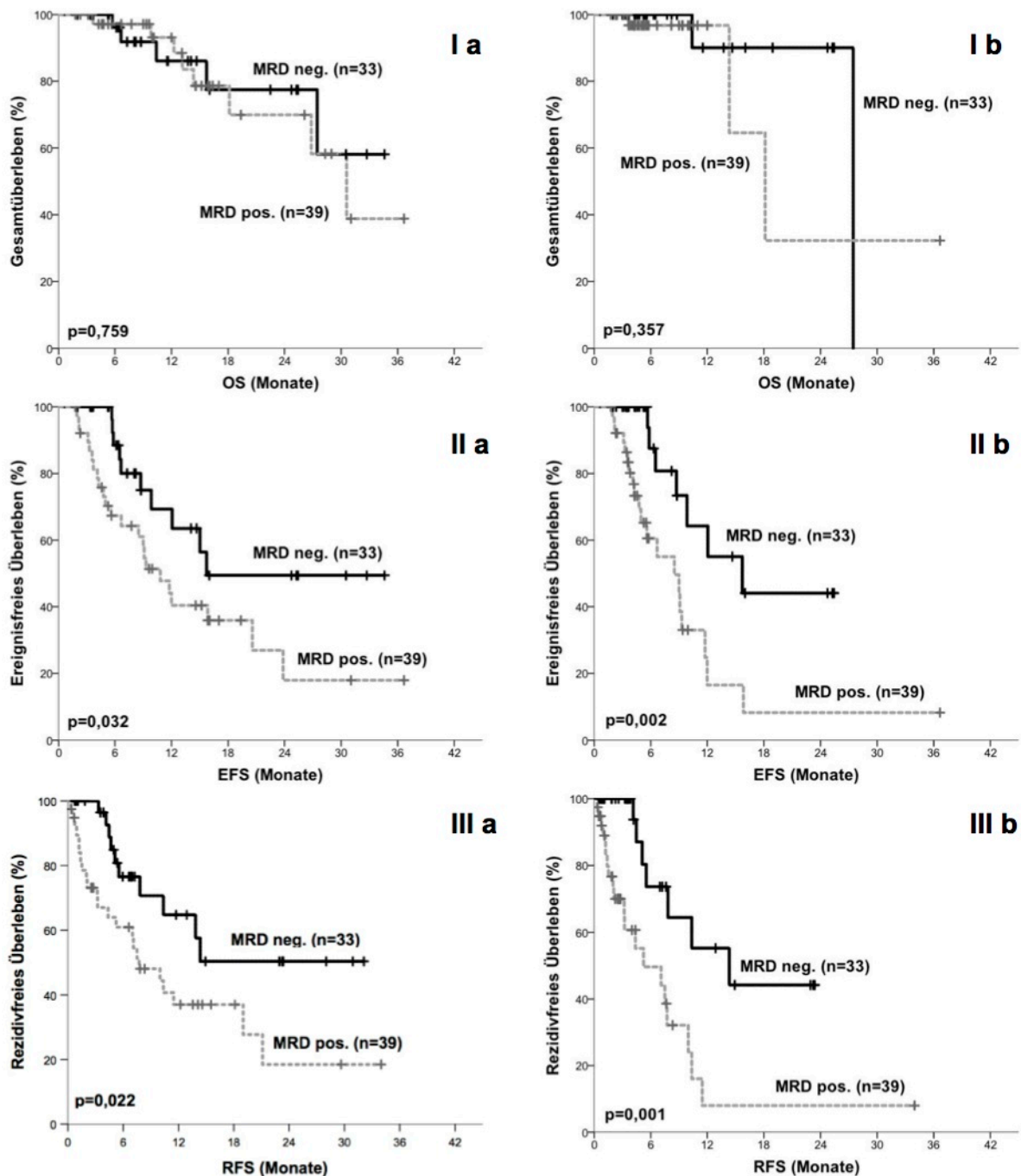


Abbildung 4.7: OS, EFS und RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion. (I b, II b, III b) Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert. (I a) OS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion (Log-Rank-Test $p=0,759$). (I b) OS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,357$). (II a) EFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion (Log-Rank-Test $p=0,032$). (II b) EFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,002$). (III a) RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion (Log-Rank-Test $p=0,022$). (III b) RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,001$).

4.2.4.1 Stratifizierung der Subgruppe an Patienten, die eine eBC erreicht haben nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie

Die Subgruppe an Patienten die eine eBC erreicht haben wurden nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie stratifiziert.

Die Stratifizierung der Subgruppe an Patienten die eine eBC erreicht haben nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie zeigte eine statistisch signifikante Korrelation mit dem EFS (Log-Rank-Test $p=0,040$) und einen Trend zur Korrelation mit dem OS und RFS (Log-Rank-Test $p=0,057$, $p=0,125$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 85% und 40% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane Gesamtüberleben wurde für MRD-negative Patienten nicht erreicht und betrug 22,4 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.8, I a). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 44% und 15% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane EFS betrug 15,7 Monate für MRD-negative vs. 8,6 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.8, II a). 2-Jahres-RFS-Raten betragen 33% und 20% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane RFS betrug 14,3 Monate für MRD-negative und 10,3 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.8., III a).

Bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zeigte sich eine stärker ausgeprägte statistisch signifikante Korrelation mit dem EFS und eine statistisch signifikante Korrelation mit dem RFS (Log-Rank-Test $p=0,002$, $p=0,020$). Der Trend zur Korrelation mit dem OS war stärker ausgeprägt (Log-Rank-Test $p=0,055$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 91% für MRD-negative Patienten und wurden für MRD-positive Patienten nicht erfasst. Das mediane Gesamtüberleben wurde von MRD-negativen Patienten nicht erreicht und betrug 14,3 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.8, I b). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 30% für MRD-negative Patienten und wurden für MRD-positive Patienten nicht erfasst. Das mediane EFS betrug 12,0 Monate für MRD-negative Patienten vs. 5,8 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.8, II b). 2-Jahres-RFS-Raten wurden weder für MRD-positive, noch für MRD-negative Patienten erfasst. Das mediane Überleben betrug 14,3 Monate für MRD-negative Patienten und 6,2 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.8, III b).

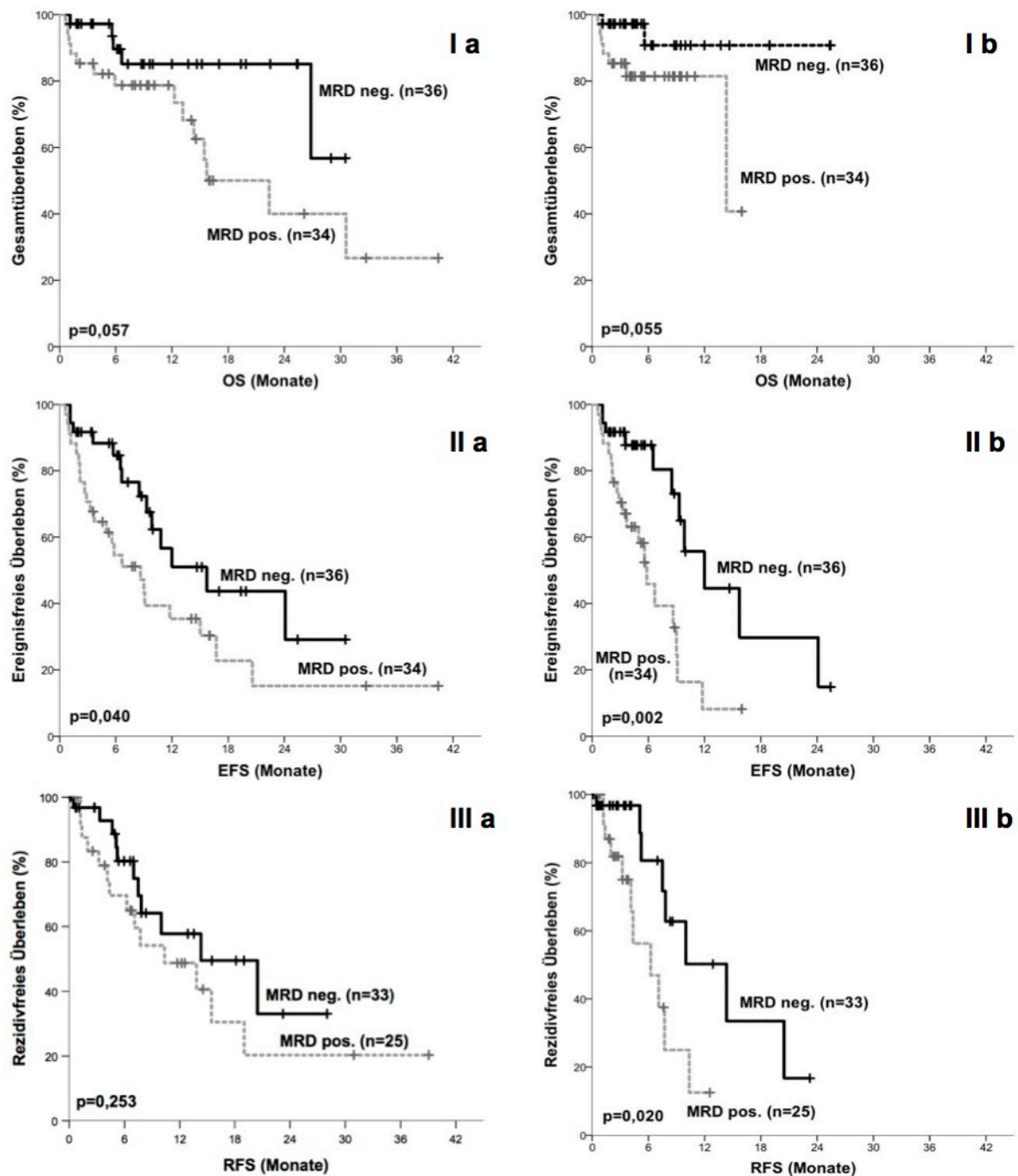


Abbildung 4.8: OS, EFS und RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie für Patienten, die eine eBC erreicht haben. (I b, II b, III b) Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert. (I a) OS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie (Log-Rank-Test $p=0,057$). (I b) OS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,055$). (II a) EFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie (Log-Rank-Test $p=0,040$). (II b) EFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,002$). (III a) RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie (Log-Rank-Test $p=0,253$). (III b) RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,020$).

4.2.4.2 Stratifizierung der Patienten, die eine eBC nicht erreicht haben nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie

Die Subgruppe an Patienten, die eine eBC nicht erreicht haben, wurde nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie stratifiziert.

Die Stratifizierung der Subgruppe an Patienten die eine eBC nicht erreicht haben, zeigte bei kleiner Fallzahl (n=17, 17, 8) keine statistisch signifikante Korrelation mit dem OS, EFS oder RFS (Log-Rank-Test $p=0,247$, $p=0,303$, $p=0,678$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten wurden für MRD-negative Patienten nicht erfasst und betragen 68% für MRD-positive Patienten. Das mediane Gesamtüberleben konnte nicht ausgewertet werden (Abbildung 4.9, I a). 2-Jahres-EFS-Raten wurden für MRD-negative Patienten nicht erfasst und betragen 15% für MRD-positive Patienten. Das mediane EFS betrug 3,1 Monate für MRD-negative vs. 2,6 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.8, II a). 2-Jahres-RFS-Raten wurden von MRD-negativen Patienten nicht erreicht und betragen 40% für MRD-positive Patienten. Das mediane RFS wurde für MRD-negative Patienten nicht erreicht und betrug 5,5 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.8, III a).

Bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zeigte sich ein Trend zur Korrelation mit dem OS (Log-Rank-Test $p=0,189$) und keine statistisch signifikante Korrelation mit dem EFS und RFS (Log-Rank-Test $p=0,265$, $p=0,499$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten wurden für MRD-negative Patienten nicht erfasst und betragen 58% für MRD-positive Patienten. Das mediane Überleben konnte nicht ausgewertet werden (Abbildung 4.9, I b). 2-Jahres-EFS-Raten wurden für MRD-negative Patienten nicht erfasst und betragen für MRD-positive Patienten 12%. Das mediane EFS betrug 3,1 Monate für MRD-negative Patienten vs. 2,6 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.9, II b). 2-Jahres-RFS-Raten wurden weder von MRD-negativen, noch von MRD-positiven Patienten erreicht. Das mediane RFS wurde von MRD-negativen Patienten nicht erreicht und betrug 2,1 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.9, III b).

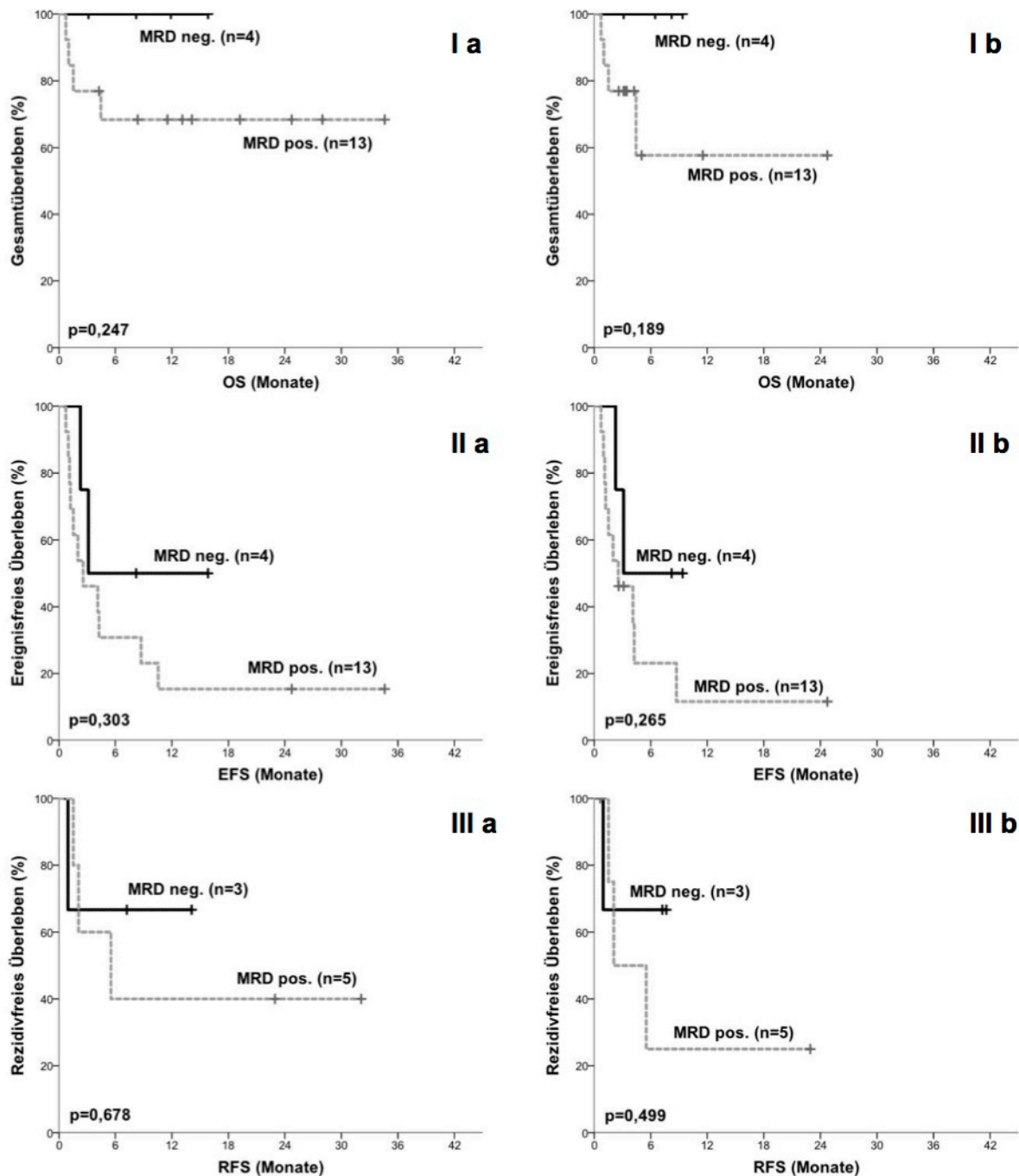


Abbildung 4.9: OS, EFS und RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie für Patienten, die eine eBC nicht erreicht haben. (I b, II b, III b) Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert. (I a) OS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie (Log-Rank-Test $p=0,247$). (I b) OS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,189$). (II a) EFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie (Log-Rank-Test $p=0,303$). (II b) EFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,265$). (III a) RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie (Log-Rank-Test $p=0,678$). (III b) RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,499$).

4.2.5 Stratifizierung der Patienten nach kombinierten MFC-MRD-Status mit der Prognose

Die Patienten wurden nach kombiniertem MFC-MRD-Status stratifiziert. Hierfür wurden die Patienten mit bestätigter MRD-Positivität (MRD-Positivität zum Zeitpunkt der Aplasie und zum Zeitpunkt nach Induktion) allen anderen Patienten gegenübergestellt (bestätigter oder inkonstanter MRD-negativer Status).

Die Stratifizierung der Patienten nach kombinierten MFC-MRD-Status zeigte eine statistisch signifikante Korrelation mit dem EFS und dem RFS (Log-Rank-Test $p=0,003$, $p=0,002$). Mit dem OS zeigte sich ein Trend zur Korrelation (Log-Rank-Test $p=0,081$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 86% für Patienten mit negativem oder inkonstantem MRD-Status vs. 60% für Patienten mit bestätigt positivem MRD-Status. Das mediane Gesamtüberleben wurde für Patienten mit negativem oder inkonstantem MRD-Status nicht erreicht und betrug 30,6 Monate für Patienten mit bestätigtem positiven MRD-Status (Abbildung 4.10, I a). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 47% für Patienten mit negativem oder inkonstantem MRD-Status vs. 0% für Patienten mit bestätigtem positivem MRD-Status. Das mediane EFS betrug 15,7 Monate für Patienten mit negativem oder inkonstantem MRD-Status vs. 6,7 Monate für Patienten mit bestätigtem positiven MRD-Status (Abbildung 4.10, II a). 2-Jahres-RFS-Raten betragen 48% und 0% für Patienten mit bestätigt positivem MRD-Status. Das mediane RFS betrug für Patienten mit negativem oder inkonstantem MRD-Status 14,3 Monate und 4,4 Monate für Patienten mit bestätigtem positiven MRD-Status (Abbildung 4.10, III a).

Bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation mit dem OS und eine stärker ausgeprägt statistisch signifikante Korrelation mit dem EFS und RFS (Log-Rank-Test $p=0,020$, $p<0,001$, $p<0,001$). 2-Jahres-Gesamtüberlebensraten betragen 100% für Patienten mit negativem oder inkonstantem MRD-Status und 0% für Patienten mit bestätigt positivem MRD-Status. Das mediane Gesamtüberleben konnte nicht ausgewertet werden (Abbildung 4.10, I b). 2-Jahres-EFS-Raten betragen 28% für Patienten mit negativem oder inkonstantem MRD-Status vs. 0% für MRD-negative und MRD-positive Patienten. Das mediane EFS betrug 12,0 Monate für MRD-negative Patienten und 5,6 Monate für MRD-positive Patienten (Abbildung 4.10, II b). 2-Jahres-RFS-Raten wurden für Patienten mit negativem oder inkonstantem MRD-Status nicht erfasst und betragen für Patienten mit bestätigt positivem MRD-Status 0%. Das mediane RFS betrug 10,0 Monate für Patienten mit negativem oder inkonstantem MRD-Status vs. 3,2 Monate für Patienten mit bestätigtem positiven MRD-Status (Abbildung 4.10, III b).

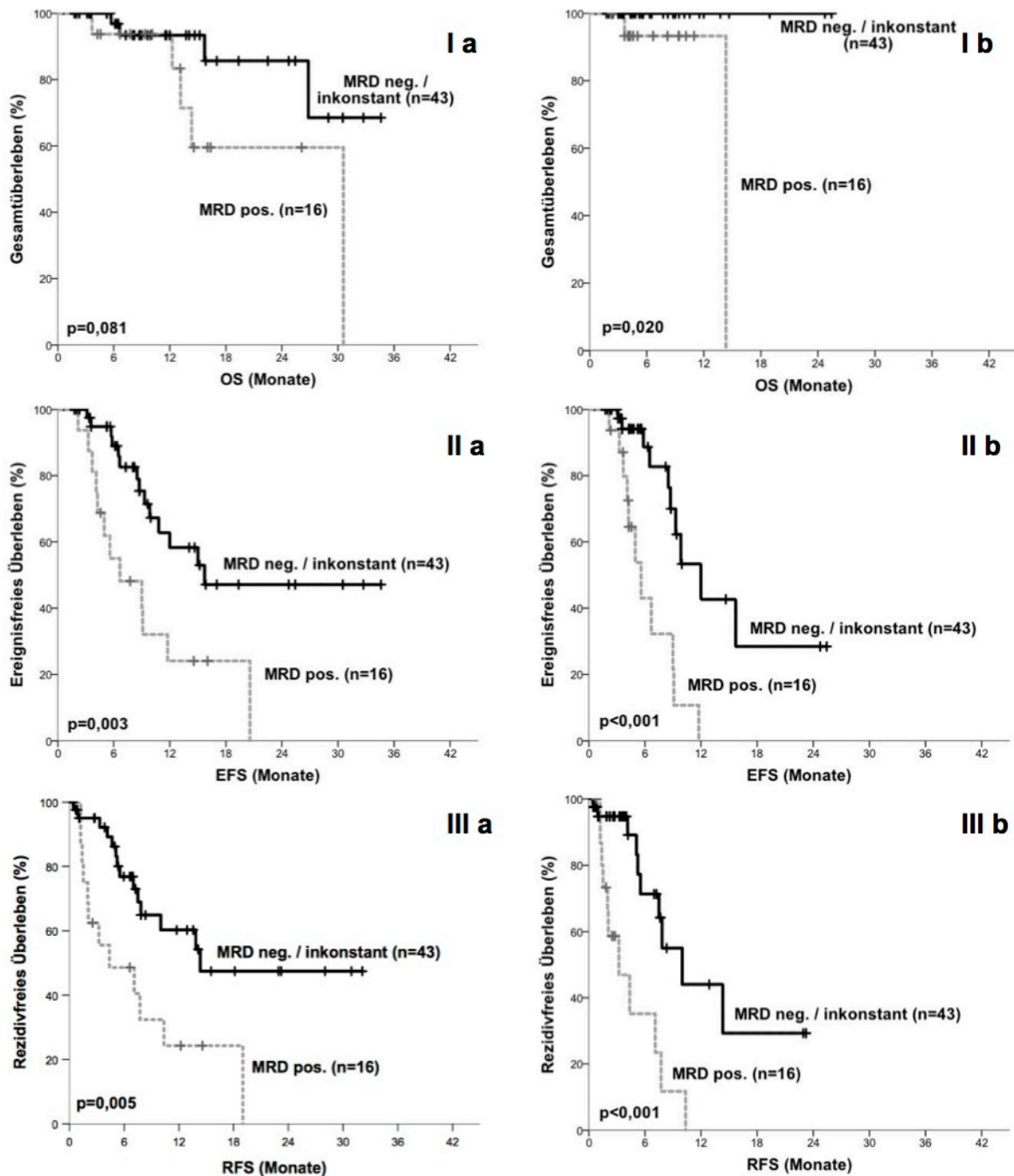


Abbildung 4.10: OS, EFS und RFS stratifiziert nach kombinierten MFC-MRD-Status. (I b, II b, III b) Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert. **I a)** OS stratifiziert nach kombinierten MFC-MRD-Status (Log-Rank-Test $p=0,081$). **(I b)** OS stratifiziert nach kombinierten MFC-MRD-Status. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p=0,020$). **(II a)** EFS stratifiziert nach kombiniertem MFC-MRD-Status (Log-Rank-Test $p=0,003$). **(II b)** EFS stratifiziert nach kombiniertem MFC-MRD-Status. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p<0,001$). **(III a)** RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status (Log-Rank-Test $p=0,005$). **(III b)** RFS stratifiziert nach kombiniertem MFC-MRD-Status. Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT zensiert (Log-Rank-Test $p<0,001$).

4.3 Die prognostischen Faktoren im multivariaten Modell

Es wurden multivariate Analysen für den MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie und zum Zeitpunkt nach Induktion und die prognostischen Faktoren durchgeführt.

4.3.1 Der MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion im multivariaten Modell

Der MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion, der eBC-Status, das Alter und die Risikogruppen nach ELN-Klassifikation 2017 wurden als kategoriale Variablen in die Cox-Regressionsanalyse aufgenommen. In diesem Modell bewies sich der MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion als von den anderen Variablen unabhängiger prognostischer Faktor für das EFS (Hazard Ratio 2,359, 95% Konfidenzintervall 1,087 – 5,115, $p=0,030$) und das RFS (Hazard Ratio 3,168, 95% Konfidenzintervall 1,360 – 7,383, $p=0,008$). Das Alter bewies zum Zeitpunkt nach Induktion den höchsten Einfluss auf das OS (Hazard Ratio 5,212, Hazard Ratio 1,504 – 18,061), EFS (Hazard Ratio 2,667, 95% Konfidenzintervall 1,087 – 5,115, $p=0,006$) und das RFS (Hazard Ratio 3,146, 95% Konfidenzintervall 1,501 – 6,595, $p=0,002$). Der eBC-Status und die Risikogruppen nach ELN-Klassifikation stellen in diesem multivariaten Modell keine unabhängigen prognostischen Faktor für das OS, EFS und RFS dar ($p=0,403$, $p=0,963$, $p=0,784$, $p=0,883$). Die Ergebnisse wurden in der Tabelle 4.2 zusammengefasst.

	Hazard Ratio (95% CI)		
	OS (n=64)	EFS (n=71)	RFS (n=72)
MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion	1,367 (0,403 – 4,644) $p=0,616$	2,359 (1,087 – 5,115) $p=0,030$	2,496 (1,151 – 5,413) $p=0,021$
eBC (<10% vs. ≥10%)	N/A $p=0,983$	1,547 (0,556 – 4,300) $p=0,403$	1,599 (0,579 – 4,418) $p=0,365$
Alter (<60 vs. ≥60)	5,212 (1,504 – 18,061) $p=0,009$	2,667 (1,32 5,385) $p=0,006$	2,659 (1,313 – 5,382) $p=0,007$
ELN-Klassifikation 2017			
• günstig*	$p=0,394$	$p=0,963$	$p=0,945$
• intermediär	0,341 (0,071 – 1,624) $p=0,176$	0,892 (0,395 – 2,016) $p=0,784$	0,901 (0,399 – 2,034) $p=0,801$
• ungünstig	0,636 (0,172 – 2,352) $p=0,498$	0,935 (0,382 – 2,289) $p=0,883$	1,046 (0,429 – 2,549) $p=0,922$
*Referenz Kategorie			

Tabelle 4.2: Multivariate Analyse für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion

Bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT ist die unabhängige prognostische Aussagekraft des MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion für das EFS stärker ausgeprägt (Hazard Ratio 4,232, 95% Konfidenzintervall 1,602 – 11,183, $p=0,004$) und stellt sogar den einzigen unabhängigen prognostischen Faktor dar (Tabelle 4.3). Aufgrund des hohen Anteils zensierter Fälle ist die Berechnung einer COX-Regression für das Gesamtüberleben für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion für Patienten, die zum Zeitpunkt HSCT zensiert worden sind, nicht möglich.

	Hazard Ratio (95% CI)	
	EFS (n=71)	RFS (n=72)
MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion	4,232 (1,602 – 11,183) $p=0,004$	4,553 (1,725 – 12,021) $p=0,002$
eBC (<10% vs. ≥10%)	1,268 (0,404 – 3,984) $p=0,684$	1,295 (0,418 – 4,013) $p=0,654$
Alter (<60 vs. ≥60)	2,142 (0,934 – 4,909) $p=0,072$	2,105 (0,924 – 4,796) $p=0,077$
ELN-Klassifikation 2017		
• günstig*	$p=0,076$	$p=0,073$
• intermediär	3,057 (1,150 – 8,128) $p=0,0,25$	3,136 (1,178 – 8,350) $p=0,022$
• ungünstig	1,351 (0,459 – 3,970) $p=0,585$	1,667 (0,581 – 4,783) $p=0,342$

*Referenz Kategorie

Tabelle 4.3: Multivariate Analyse für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion für zum Zeitpunkt der SZT zensierte Überlebensdaten

4.3.2 Der MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie im multivariaten Modell

Bei verfügbaren MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie hat der eBC-Status keine zusätzliche prognostische Aussagekraft für das EFS ($p=0,029$ vs. $p=0,168$, Tabelle 4.4).

	Hazard Ratio (95% CI)		
	OS (n=87)	EFS (n=87)	RFS (n=64)
MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie	2,966 (1,080 – 8,143) $p=0,035$	1,972 (1,074 – 3,623) $p=0,029$	1,537 (0,725 – 3,255) $p=0,262$
eBC (<10% vs. ≥10%)	0,668 (0,224 – 1,994) $p=0,470$	1,579 (0,825 – 3,022) $p=0,168$	0,921 (0,313 – 2,710) $p=0,881$

Tabelle 4.4: Multivariate Analyse für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie und den eBC-Status

Bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT wird dieser Effekt verstärkt ($p=0,005$ vs. $p=0,205$, Tabelle 4.5).

	Hazard Ratio (95% CI)		
	OS (n=87)	EFS (n=87)	RFS (n=64)
MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie	5,013 (1,091 – 23,036) p=0,038	2,635 (1,342 – 5,173) p=0,005	2,355 (0,981 – 5,655) p=0,055
eBC (<10% vs. ≥10%)	1,515 (0,458 – 5,010) p=0,496	1,565 (0,783 – 3,131) p=0,205	0,890 (0,282 – 2,805) p=0,842

Tabelle 4.5: Multivariate Analyse für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie und den eBC-Status für zum Zeitpunkt der SZT zensierte Überlebensdaten

Der MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie, die eBC, das Alter und die Risikogruppen nach ELN-Klassifikation 2017 wurden als kategoriale Variablen in die Cox-Regressionsanalyse aufgenommen. In diesem Modell bewies sich der MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie als von den anderen Variablen unabhängiger prognostischer Faktor für das EFS (Hazard Ratio 1,906, 95% Konfidenzintervall 1,008 – 3,607, p=0,047). Auch das Alter (Hazard Ratio 2,487, 95% Konfidenzintervall 1,351 – 4,577, p=0,003) und die günstige Risikogruppe nach ELN-Klassifikation 2017 (p=0,004) bewies unabhängige prognostische Aussagekraft. Der eBC-Status und die intermediäre und die ungünstige Risikogruppe nach ELN-Klassifikation 2017 stellen in diesem multivariaten Modell keine unabhängigen prognostischen Faktoren für das EFS dar (p=0,111, p=0,151, p=0,080)(Tabelle 4.6).

	Hazard Ratio (95% CI)		
	OS (n=87)	EFS (n=87)	RFS (n=64)
MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie	2,789 (0,966 – 8,055) p=0,058	1,906 (1,008 – 3,607) p=0,047	1,520 (0,670 – 3,448) p=0,317
eBC (<10% vs. ≥10%)	0,703 (0,230 – 2,153) p=0,537	1,733 (0,882 – 3,406) p=0,111	1,081 (0,352 – 3,320) p=0,892
Alter (<60 vs. ≥60)	2,437 (0,934 – 6,360) p=0,069	2,487 (1,351 – 4,577) p=0,003	2,209 (1,011 – 4,827) p=0,447
ELN-Klassifikation 2017			
• günstig*	p=0,049	p=0,004	p=0,447
• intermediär	0,393 (0,107 – 1,443) p=0,160	0,552 (0,246 – 1,243) p=0,151	0,558 (0,220 – 1,417) p=0,220
• ungünstig	1,539 (0,556 – 4,260) p=0,407	1,861 (0,928 – 3,733) p=0,080	0,932 (0,339 – 2,566) p=0,892

*Referenz Kategorie

Tabelle 4.6: Multivariate Analyse für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie.

Bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT ist die unabhängige prognostische Aussagekraft des MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie für das EFS stärker ausgeprägt (Hazard Ratio 2,633, 95% Konfidenzintervall 1,246 – 5,562, p=0,011). Auch die unabhängige prognostische Aussagekraft der günstigen Risikogruppe nach ELN-

Klassifikation 2017 nimmt zu ($p=0,001$) und die ungünstige Risikogruppe nach ELN-Klassifikation 2017 stellt einen unabhängigen prognostischen Faktor dar (Hazard Ratio 3,467, 95% Konfidenzintervall 1,554 – 7,735, $p=0,002$). Der eBC-Status stellt in diesem Modell keinen unabhängigen prognostischen Faktor dar ($p=0,364$)(Tabelle 4.7).

	Hazard Ratio (95% CI)		
	OS (n=87)	EFS (n=87)	RFS (n=64)
MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie	4,645 (0,958 – 22,531) $p=0,057$	2,633 (1,246 – 5,562) $p=0,011$	2,177 (0,777 – 6,098) $p=0,139$
eBC (<10% vs. ≥10%)	1,388 (0,396 – 4,862) $p=0,608$	1,416 (0,669 – 2,999) $p=0,364$	0,673 (0,172 – 2,632) $p=0,569$
Alter (<60 vs. ≥60)	1,878 (0,492 – 7,169) $p=0,357$	1,945 (0,979 – 3,864) $p=0,058$	2,053 (0,789 – 5,345) $p=0,141$
ELN-Klassifikation 2017			
• günstig*	$p=0,116$	$p=0,001$	$p=0,356$
• intermediär	0,520 (0,079 – 3,441) $p=0,498$	0,904 (0,355 – 2,301) $p=0,833$	1,358 (0,412 – 4,471) $p=0,615$
• ungünstig	2,514 (0,597 – 10,587) $p=0,209$	3,467 (1,554 – 7,735) $p=0,002$	2,323 (0,736 – 7,330) $p=0,151$
*Referenz Kategorie			

Tabelle 4.7: Multivariate Analyse für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie für zum Zeitpunkt der SZT zensierte Überlebensdaten

4.3.3 Der kombinierte MFC-MRD-Status im multivariaten Modell

Der Kombinierte MFC-MRD-Status, das Alter und die Risikogruppen nach ELN-Klassifikation 2017 wurden als kategoriale Variablen in die Cox-Regressionsanalyse aufgenommen. Um die Genauigkeit des Modells bei der niedrigen Fallzahl zu gewährleisten wurde der eBC-Status nicht als Variable in das Modell mit aufgenommen. In diesem Modell bewies sich der Kombinierte MFC-MRD-Status als von den anderen Variablen unabhängiger prognostischer Faktor für das EFS (Hazard Ratio 2,688, 95% Konfidenzintervall 1,195 – 6,045, $p=0,017$). Auch das Alter bewies unabhängige prognostische Aussagekraft (Hazard Ratio 2,643, 95% Konfidenzintervall 1,127 – 6,197, $p=0,025$). Die Risikogruppen nach ELN-Klassifikation 2017 stellen in diesem multivariaten Modell keine unabhängigen prognostischen Faktoren für das EFS dar ($p=0,789$, $p=0,630$, $p=0,799$)(Tabelle 4.8).

	Hazard Ratio (95% CI)	
	EFS (n=57)	RFS (n=58)
Kombinierter MFC-MRD-Status (pos. vs. neg./inkonstant)	2,688 (1,195 – 6,045) $p=0,017$	2,555 (1,142 – 5,715) $p=0,022$
Alter (<60 vs. ≥ 60)	2,643 (1,127 – 6,197) $p=0,025$	2,618 (1,119 – 6,124) $p=0,026$
ELN-Klassifikation 2017		
• günstig*	$p=0,789$	$p=0,758$
• intermediär	0,801 (0,324 – 1,981) $p=0,630$	0,824 (0,334 – 2,032) $p=0,675$
• ungünstig	1,158 (0,375 – 3,578) $p=0,799$	1,253 (0,409 – 3,837) $p=0,693$
*Referenz Kategorie		

Tabelle 4.8: Multivariate Analyse für den kombinierten MFC-MRD-Status

Bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT ist die unabhängige prognostische Aussagekraft des kombinierten MFC-MRD-Status für das EFS stärker ausgeprägt (Hazard Ratio 3,833, 95% Konfidenzintervall 1,482 – 9,914, $p=0,006$). Die ungünstige Risikogruppe nach ELN-Klassifikation 2017 zeigt sich als unabhängiger prognostischer Faktor (Hazard Ratio 5,428, 95% Konfidenzintervall 1,138 – 25,886, $p=0,001$) und die ungünstige Risikogruppe nach ELN-Klassifikation 2017 stellt einen unabhängigen prognostischen Faktor dar (Hazard Ratio 3,467, 95% Konfidenzintervall 1,554 – 7,735, $p=0,034$). Der Alter und die günstige und intermediäre Risikogruppe nach ELN-Klassifikation 2017 stellen in diesem Modell keinen unabhängigen prognostischen Faktor dar ($p=0,273$, $p=0,073$, $p=0,096$)(Tabelle 4.9).

	Hazard Ratio (95% CI)	
	EFS (n=57)	RFS (n=58)
Kombinierter MFC-MRD-Status (pos. vs. neg./inkonstant)	3,833 (1,482 – 9,914) p=0,006	3,501 (1,407 – 8,707) p=0,007
Alter (<60 vs. ≥60)	1,686 (0,662 – 4,291) p=0,273	1,785 (0,699 – 4,553) p=0,226
ELN-Klassifikation 2017		
• günstig*	p=0,073	p=0,050
• intermediär	2,354 (0,860 – 6,443) p=0,096	2,395 (0,876 – 6,553) p=0,089
• ungünstig	5,428 (1,138 – 25,886) p=0,034	5,938 (1,332 – 26,477) p=0,020
*Referenz Kategorie		

Tabelle 4.9: Multivariate Analyse für den kombinierten MFC-MRD-Status für zum Zeitpunkt der SZT zensierte Überlebensdaten

5 Diskussion

Die Therapie der AML stellt aufgrund der heute noch vorhandenen hohen Rezidivraten eine aktuelle Herausforderung dar. Durch die heutzutage etablierten prognostischen Faktoren kann ein Rezidiv und somit eine schlechte Prognose eines Individuums nur sehr eingeschränkt vorhergesagt werden. Aus diesem Grund ist die Suche nach neuen sensitiveren prognostischen Faktoren von größter Bedeutung. Eine verbesserte Risikostratifizierung würde ermöglichen den Patienten eine individuelle risikoadaptierte Therapie zukommen zu lassen. In Zukunft könnte so möglicherweise das Überleben der AML-Patienten verbessert werden. Ziel dieser Arbeit war es, die prognostische Bedeutung der durchflusszytometrisch gemessenen MRD zum Zeitpunkt der Aplasie und nach Induktion im Kontext der bereits existierenden prognostischen Faktoren zu evaluieren.

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Studienaufbau

In dieser Studie wurden die Knochenmarksproben von 105 Patienten in Hinblick auf die durchflusszytometrisch gemessene MRD analysiert. 87 Proben wurden zum Zeitpunkt der Aplasie, 72 zum Zeitpunkt nach Induktion und 59 zu beiden Zeitpunkten ausgewertet. Die mediane Nachverfolgungszeit der Patienten betrug 9,8 Monate. Die Knochenmarksproben wurden nach standardisierten Methoden gewonnen und in dem spezialisiertem Labor für Leukämiediagnostik routinemäßig aufgearbeitet und analysiert. Für die Identifizierung der LAIPs wurden standardisierte Antikörperpanel angewendet.

Über die Relevanz der durchflusszytometrisch gemessenen MRD zum Zeitpunkt der Aplasie wurden bisher nur wenige Studien durchgeführt. Erste Untersuchungen wurden 2004 von Kern et al. veröffentlicht (49). Die durchflusszytometrische Messung von 106 Knochenmarksproben von AML-Patienten zeigte signifikante prognostische Aussagekraft für das OS, EFS und RFS. Zudem war die durchflusszytometrisch gemessene MRD in der multivariaten Analyse ein unabhängiger prognostischer Faktor für EFS und RFS. Auch Köhnke et al. konnte in der 2015 veröffentlichten Studie in einer größeren Kohorte von 178 Patienten die prognostische Bedeutung der MFC-MRD zum Zeitpunkt der Aplasie nachweisen (80). Beide Studien verwendeten ein 3-Farben-Antikörperpanel. In der von Köhnke et al. durchgeführten Studie wurden nur die Patienten eingeschlossen, die eine CR

erreicht haben. Diese Studie ist die erste, die mit 8-fach kombiniertem Antikörperpanel die Relevanz der MFC-MRD zum Zeitpunkt Aplasie für alle Patienten (inklusive der Patienten, die eine CR nicht erreicht haben) untersucht. Trotz der relativ kleinen Fallzahl und der relativ kurzen medianen Nachverfolgungszeit von 9,8 Monaten konnte in dieser Kohorte ein signifikanter prognostischer Einfluss der MFC-MRD gezeigt werden. Zur Validierung der Ergebnisse werden weitere Studien größeren Umfangs benötigt werden.

5.1.2 Die Durchflusszytometrie genießt einen hohen Stellenwert als Methode zur Messung der MRD in der AML

Die ideale Methode zur Identifizierung einer kleinen Anzahl leukämischer Zellen, die nach Chemotherapie im Knochenmark oder im Blut persistieren, sollte folgende Kriterien erfüllen:

1) Die Methode sollte für die meisten Krankheitsfälle anwendbar sein. 2) Die Methode sollte spezifisch für die neoplastischen Zellen sein. 3) Die Methode sollte sensitiv sein. 4) Die Methode sollte die Quantifizierung der Tumorlast ermöglichen. 5) Die Ergebnisse der Methode sollten reproduzierbar sein (53).

Die Methode der Immunphänotypisierung

Die Methode der Durchflusszytometrie ist eine der zwei aktuell eingesetzten Methoden zur Messung der MRD und könnte aufgrund Ihrer Eigenschaften für die spezifische und sensitive Detektion einer MRD als gut geeignet angesehen werden (90):

- Ein bedeutender Vorteil der multiparametrischen Immunphänotypisierung ist die breite Anwendbarkeit der Methode auf die meisten AML-Patienten, inklusive aller Subgruppen der Erkrankung. Studien haben gezeigt, dass mit passendem Antikörperpanel bei über 90% der Patienten ein leukämieassoziierter Immunphänotyp (LAIP) identifiziert werden kann und somit die Methode für fast alle AML-Patienten zur MRD Diagnostik angewendet werden kann (47, 49, 70, 74). In dieser Studie konnte von den 105 Patienten bei 102 Patienten ein LAIP bestimmt werden, also in >97% der Fälle, was mit früheren Berichten übereinstimmt.
- Eine weitere Stärke der Methode ist ihre Schnelligkeit (1 – 2 Tage). Diese ermöglicht die MRD-Status-Erhebung zu einem sehr frühen Zeitpunkt und somit eine mögliche Basis für eine frühe risikoadaptierte Therapieanpassung.
- Weiterhin ermöglicht die Durchflusszytometrie die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen (46).

- Eine Quantifizierung von Zellen ist gut durchführbar.
- Eine Analyse einzelner Zellen ist möglich.
- Es können auch gesunde Zellen analysiert werden.
- Die Methode geht mit einer Sensitivität von bis zu 10^{-4} (also 1 in 10 000 Zellen) einher (91).
- Die Einholung einer Zweitmeinung ist durch das einfache Verschieben der elektronischen Datensätze möglich.
- Die Methode ist günstig (90).
- Theoretisch könnte sie in Zukunft auch für die Identifizierung von Mutationen die für Genprodukte in Form von neo-Antigenen verantwortlich sind herangezogen werden (53).

Allerdings bringt die Methode auch einige Herausforderungen mit sich:

- Die Fähigkeit mittels Durchflusszytometrie aberrante Zellen zu identifizieren beruht auf dem Grad der Unterscheidung des Antigenexpressionsmusters leukämischer Zellen von gesunden Zellen. In der AML zeigt der aberrante Phänotyp öfters enge Beziehung zum physiologischen Phänotypen und die meisten Antigenexpressionsmuster sind in geringer Konzentration auch in normalem, insbesondere aber auch in regenerierendem Knochenmark vorzufinden. Dieses erschwert die immunphänotypische Identifizierung von malignen Blasten in der AML (64). Im Gegensatz dazu lassen sich in der B-Linien-ALL typischerweise klar von gesunden Zellen abgrenzbare verdächtige Populationen identifizieren, was zur Etablierung der Methode der MFC-MRD-Analyse als Indikator für die Qualität des Therapieansprechens in der ALL und insbesondere in der ALL des Kindesalters geführt hat (45).
- Eine weitere Herausforderung stellt ein möglicher sogenannter „Antigenshift“, bei dem sich die Antigenexpression der malignen Blasten im Verlauf der Therapie verändern dar (92).
- Die adäquate Anwendung der MFC benötigt ein hohes Maß an Expertise und Erfahrung, Die Analyse und Interpretation der Daten beinhaltet subjektive Elemente und somit einen potentiellen Untersucher-abhängigen Bias, welches es schwierig macht die Methode laborübergreifend zu standardisieren (93).
- Die Sensitivität der Methode ist aktuell etwas niedriger als die von molekulargenetischen Herangehensweisen.

Aktuell gibt es noch keinen Konsensus auf eine standardisierte Gatingmethode zur immunphänotypischen Erfassung der MRD. Die „different-from-normal“-Methode hat den Vorteil, dass keine Knochenmarksprobe bei Erstdiagnose benötigt wird und dass keine falsch-negativen MRD-Ergebnisse durch einen Antigenshift entstehen (54). Bei der LAIP-gesteuerten Methode werden die bei ED definierten LAIPs im Verlauf beobachtet und benötigt somit eine Knochenmarksprobe bei Erstdiagnose und die Anwendung eines patienten-spezifischen Antikörperpanels für die Verlaufsproben. Studien haben gezeigt, dass die „different-from-normal“-Methode aus einer Kohorte an Patienten, die eine CR erreicht haben eine niedrigere Rate an MRD-positiven Patienten identifiziert als die Methode der LAIP-gesteuerten MRD-Messung (20% vs. 34-42%) (71, 72, 94). Dieses deutet auf eine womöglich höhere Sensitivität der Methode der LAIP-gesteuerten MRD-Messung, weshalb in dieser Studie diese Methode angewendet wurde. In dieser Studie wurden bei 54,0% der Patienten zum Zeitpunkt der Aplasie und bei 54,2% der Patienten zum Zeitpunkt nach Induktion ein positiver MRD-Status identifiziert, also eine leicht höhere Rate als in bisherigen Studien nachgewiesen werden konnte (94). Eine weitere Gatingstrategie wurde von Terwijn et al vorgeschlagen, die zum Ziel hat eine verminderte Sensitivität durch eine mögliche Dilution des Knochenmarkblutes durch peripheres Blut auszuschließen. Diese Methode ist allerdings nur bei Vorhandensein eines primitiven Markes (CD34, CD117, CD133) anwendbar (95). Ob in Zukunft eine automatisierte Herangehensweise seltene aberrante Zellpopulationen identifizieren könnte wird in aktuellen Studien untersucht (96-99).

Die molekulargenetischen Methoden

Auch molekularmethodische Methoden werden zu Detektion der MRD eingesetzt und bringen folgende positiven Eigenschaften mit sich:

- Der große Vorteil der molekulargenetischen Methoden liegt in deren hohen Sensitivität von 10^{-3} bis 10^{-7} (also 1 in 1 000 - 10 000 000 Zellen). Allerdings variiert die Sensitivität des Testverfahrens zwischen den Zielmarkern und zwischen den Patienten mit der gleichen Zielmutation, da sie von der relativen Expression des Zielmarkers in den leukämischen Blasten abhängig ist (54, 100).
- Die Methode ist relativ schnell durchführbar (innerhalb von 1 – 3 Tagen).
- Die molekularen Marker werden im Gesunden kaum exprimiert ($<10^6$) (90).

Zu den negativen Eigenschaften der molekulargenetischen Methoden gehören:

- Sie sind derzeit bei nur ca. 50% der Patienten anwendbar (90).
- Sie sind verhältnismäßig teuer.

Die Methoden im Überblick

Bisher verfügt kein MRD-Test über perfekte Sensibilität oder Spezifität um das Rezidivrisiko einer Kohorte oder klinisch relevanter eines Individuums vorauszusagen. Eine beachtliche Anzahl an MRD-Tests erweisen sich als „falsch-positiv“ oder als „falsch-negativ“. Dies drückt sich darin aus, dass manche Patienten mit einem negativen MRD-Test ein Rezidiv erleiden und dass andere Patienten mit einem positiven MRD-Test in CR verbleiben. Neben der unzureichenden Sensitivität der Methode könnte einer der Gründe hierfür in der instabilen Expression des untersuchten Markers liegen. Ein weiterer Grund könnte die ungleichmäßige Verteilung leukämischer Blasten im Knochenmark oder das relativ kleine Probenvolumen sein (101). Die Frequenz des MRD-Monitorings könnte von Bedeutung sein (101). Die Wiederholung eines MRD-Tests könnte dabei helfen die falsch-positiven und falsch-negativen Raten zu senken (53).

Schlussfolgerung

Die Etablierung und Standardisierung der immunphänotypischen MRD-Diagnostik hat einen hohen Stellenwert, da durch molekulargenetische Analysen nur ein Bruchteil der Patienten erfasst werden kann. Die Messung von sogenannten „Stammzellmarkern“ ermöglicht die Fokussierung auf die Stammzellen der AML und könnte somit die Spezifität und die prognostische Aussagekraft der durchflusszytometrisch gemessenen MRD verbessern.

Um das MRD-Monitoring in der AML als klinische Routinediagnostik zu etablieren, müssen die Methoden noch verbessert, standardisiert und validiert werden mit dem Ziel höchst reproduzierbare Ergebnisse zwischen verschiedenen Zentren zu erzielen.

Einige Probleme könnten durch die Standardisierung der Probengewinnung, Geräteeinstellungen, automatisierte Interpretationssoftware, zentrale Prüfung, kontinuierliche Qualitätssicherung verbessert, oder sogar gelöst werden (102-104).

MRD-gesteuertes Therapiemonitoring erfordert sequenzielle Knochenmarkpunktionen, welches für die Patienten ein invasives Verfahren bedeutet. Zeijlemaker et al. beschäftigt sich mit der Frage, ob in Zukunft auch peripheres Blut als Probematerial zur MRD-Diagnostik herangezogen werden könnte (105).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Patientencharakteristika

In dieser Studie konnte in 97% der Patienten die durchflusszytometrisch gemessene MRD erhoben werden, welches Berichten aus vorherigen Studien entspricht, in denen in >90% der Patienten LAIPs zur MRD-Bestimmung identifiziert werden konnten. In Übereinstimmung mit bisherigen Studien ist die Mehrheit der Patienten dieser Kohorte der intermediären zytogenetischen Gruppe nach MRC Kriterien zugehörig. Die Aufteilung in die günstige, intermediäre und ungünstige Risikogruppe nach ELN-Klassifikation 2017 ist mit 31,4%, 32,4% und 36,2% relativ ausgeglichen.

5.2.2 Die prognostische Aussagekraft der untersuchten Variablen ist bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT stärker ausgeprägt

In dieser Studie zeigten die untersuchten Variablen bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT in 24 von 26 univariaten Untersuchungen (92,3%) einen statistisch stärker ausgeprägten – oder bei einem p -Wert $< 0,001$ einen vergleichbaren – Einfluss auf die Prognose als bei Unterlassung der Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT. Einzig bei der Stratifizierung der Patienten nach Alter konnte dieser Effekt für das OS und RFS nicht beschrieben werden. In den multivariaten Modellen zeigte die MRD zu den verschiedenen Zeitpunkten bei Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT in 9 von 10 Fällen (90%) einen statistisch stärker ausgeprägten Einfluss auf die Prognose als bei Unterlassung der Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT. Diese Daten lassen sich vermutlich durch den ausgeschlossenen Störfaktor der SZT-assoziierten Mortalität erklären. Eine verminderte statistische Aussagekraft durch eine kürzere mediane Nachverfolgungszeit konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Daten suggerieren die Zensierung der Überlebensdaten zum Zeitpunkt der SZT um den Einfluss krankheitsassoziierter Variablen auf das Überleben zu untersuchen.

5.2.3 Das Alter ist bei vorhandenem MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie oder zum Zeitpunkt nach Induktion kein unabhängiger prognostischer Faktor

Das Alter ($<$ oder ≥ 60 Jahre) der AML-Patienten bei Erstdiagnose ist in dieser Kohorte in der univariaten Analyse ein prognostischer Faktor. Ein Alter ≥ 60 Jahre ist mit einem kürzeren OS, EFS und RFS assoziiert. Bei vorhandenem MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie und

nach Induktion ist das Alter bei Betrachtung der Daten der zum Zeitpunkt der SZT zensierten Patienten kein unabhängiger prognostischer Faktor.

5.2.4 Die ELN-Klassifikation 2017 beinhaltet zum Teil unabhängige prognostische Aussagekraft

Die Stratifizierung nach ELN-Klassifikation 2017 zeigte in der univariaten Analyse ausschließlich für das OS und EFS für zum Zeitpunkt der SZT zensierten Patienten signifikante prognostische Aussagekraft. Bezogen auf das Gesamtüberleben zeigte die intermediäre Risikogruppe einen Überlebensvorteil gegenüber der günstigen Risikogruppe. Bei vorhandenem MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion zeigt in der multivariaten Analyse ausschließlich die intermediäre Risikogruppe unabhängige prognostische Relevanz bezogen auf das EFS und RFS. Bei vorhandenem MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie zeigt die günstige und die ungünstige Risikogruppe unabhängige signifikante Assoziation mit dem EFS. Bei vorhandenem kombinierten MFC-MRD-Status zeigt die ungünstige Risikogruppe unabhängige Assoziation mit dem EFS und RFS.

5.2.5 Der eBC-Status ist bei vorhandenem MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie kein unabhängiger prognostischer Faktor

Der eBC-Status ist in dieser Kohorte in der univariaten Analyse ein signifikanter prognostischer Faktor für das EFS. Für das OS und RFS war eine prognostisch signifikante Stratifizierung der Patienten nach eBC-Status nicht möglich. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die niedrige Fallzahl an Patienten die eine eBC nicht erreicht haben (n=19) im Vergleich zu der Fallzahl an Patienten, die eine eBC erreicht haben (n=84) sein. Im multivariaten Modell zeigte der eBC-Status keine unabhängige prognostische Relevanz bezogen auf das OS, EFS und RFS, wenn ein MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie vorhanden war. Die morphologische eBC hat somit weniger Aussagekraft, als die durchflusszytometrische MRD Erhebung zum Zeitpunkt der Aplasie. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Daten zur AML des Kindesalters, die zeigen, dass die frühe zytomorphologische Blasten-Messung keine zusätzliche prognostische Information beinhaltet, wenn eine frühe (an Tag 22 der Induktionstherapie) durchflusszytometrische Messung der MRD vorhanden ist (73).

5.2.6 Der MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion ist ein unabhängiger prognostischer Faktor

Der MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion ist ein von der eBC, dem Alter und der ELN-Klassifikation 2017 unabhängiger prognostischer Faktor in Hinblick auf das EFS und RFS. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits in anderen Studien gezeigte prognostische Relevanz des MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion. Eine von Freeman et al. durchgeführte Studie hat gezeigt, dass die Erhebung der MRD zum Zeitpunkt nach Induktion (dem frühesten Zeitpunkt in der Studie) die wichtigste prognostische Information enthält (74). Auch Terwijn et al. haben nachgewiesen, dass eine frühe Messung der MRD (zum Zeitpunkt nach Induktion) große Bedeutung für die Risikostratifizierung der Patienten hat. Der Zeitpunkt der Aplasie wurde in diesen Studien nicht untersucht.

5.2.7 Der MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie ist ein unabhängiger prognostischer Faktor

In dieser Studie konnte in der univariaten und in der multivariaten Analyse der Einfluss des MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie auf das OS und EFS aller erwachsenen Patienten (ausgenommen Patienten mit Promyelozytenleukämie) gezeigt werden. Der MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie war ein vom eBC-Status, vom Alter und von der ELN-Klassifikation 2017 unabhängiger prognostischer Faktor.

Diese Daten bestätigen die in Studien von Kern et al. und Köhnke et al. nachgewiesene prognostische Relevanz des MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie (49, 80). Ähnliche Ergebnisse gibt es auch im Bereich der ALL. Es wurde gezeigt, dass ALL-Patienten, die ein frühes (an Tag 15 nach Induktionstherapie) durchflusszytometrisch gemessenes gutes Therapieansprechen zeigen, einen Überlebensvorteil gegenüber anderen Patienten haben (106, 107).

In der von Köhnke et al. durchgeführten Studie zeigte die durchflusszytometrisch gemessene MRD zum Zeitpunkt der Aplasie sogar einen stärker ausgeprägten Einfluss auf die Prognose, als die MRD zum Zeitpunkt nach Induktion (80). Auch Basso et al. haben in der ALL des Kindesalters gezeigt, dass die durchflusszytometrische Messung der MRD im Knochenmark an Tag 15 nach Beginn der Induktionstherapie den stärksten Faktor zur frühen Vorhersage des Rezidivrisikos darstellt (106). Dieses konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

Es wird vermutet, dass die Ursache für die in Studien teilweise beschriebene höhere Sensitivität der durchflusszytometrischen Messung des Therapieansprechens zum Zeitpunkt der Aplasie als zum Zeitpunkt nach Induktion unter Anderem darin liegen könnte, dass zum Zeitpunkt nach Induktion sich bereits vermehrt regenerierende Blasten im Knochenmark befinden, die aufgrund von teilweise ähnlichen Immunphänotypen nicht mit Sicherheit von AML-Blasten zu unterscheiden sind. Zum Zeitpunkt der Aplasie fällt diese Unsicherheit aufgrund der in diesem Stadium fehlenden regenerierenden Blasten weg.

5.2.8 Der kombinierte MRD-Status ist ein unabhängiger prognostischer Faktor

Um die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven oder eines falsch-negativen MRD-Tests zu senken, wird in der Literatur vorgeschlagen bei MRD-Positivität einen Konfirmationstest durchzuführen und nur bei Patienten mit konfirmiert positivem MRD-Test eine Intensivierung der Therapie in Betracht zu ziehen. So sollen Patienten bei einem falsch-Positiven MRD-Test vor unnötig toxischer Therapie geschützt werden (53, 108).

Der kombinierte MFC-MRD-Status der Zeitpunkte der Aplasie und nach Induktion (konfirmierte MRD-Positivität vs. inkonstante oder konfirmierte MRD-Negativität) zeigte signifikante unabhängige Korrelation mit der Prognose.

5.3 Ausblick: Die frühe durchflusszytometrisch gemessene MRD als steuernder Einfluss in der Therapie der AML

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die durchflusszytometrisch gemessene MRD zum Zeitpunkt der Aplasie einen starken unabhängigen prognostischen Faktor darstellt und zusätzlich zu den bisher etablierten prognostischen Faktoren wichtige prognostische Information enthält. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Risikostratifizierung der Patienten nicht nur auf der Risikoeinschätzung bei Erstdiagnose beruhen sollte, sondern auch auf die MRD als in vivo Marker für die Chemosensitivität.

Craddock et al haben gezeigt, dass eine verlängerte Zeit bis zur SZT mit einer schlechteren Prognose einhergeht (84). Bisher stellt in der Therapie der AML die frühe Durchführung einer allogenen SZT eine große Herausforderung dar, da sie mit einem erheblichen logistischen Aufwand einhergeht und die Identifikation eines passenden Spenders beträchtliche Zeit erfordert. Eine frühe MFC-MRD-gesteuerte Therapieanpassung könnte in Zukunft das Management der Postremissionstherapie verbessern. Die zum Zeitpunkt der Aplasie durchflusszytometrische Identifizierung der Patienten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer allogenen SZT profitieren würden, könnte dabei helfen, für diese Patienten frühzeitig eine intensiviertere Postremissionstherapie einzuleiten. Die frühe Identifizierung der Patienten mit guter Prognose wiederum, könnte Patienten, die sehr wahrscheinlich durch Therapie niedriger Intensität geheilt werden können, vor hoch toxischen Therapieelementen bewahren.

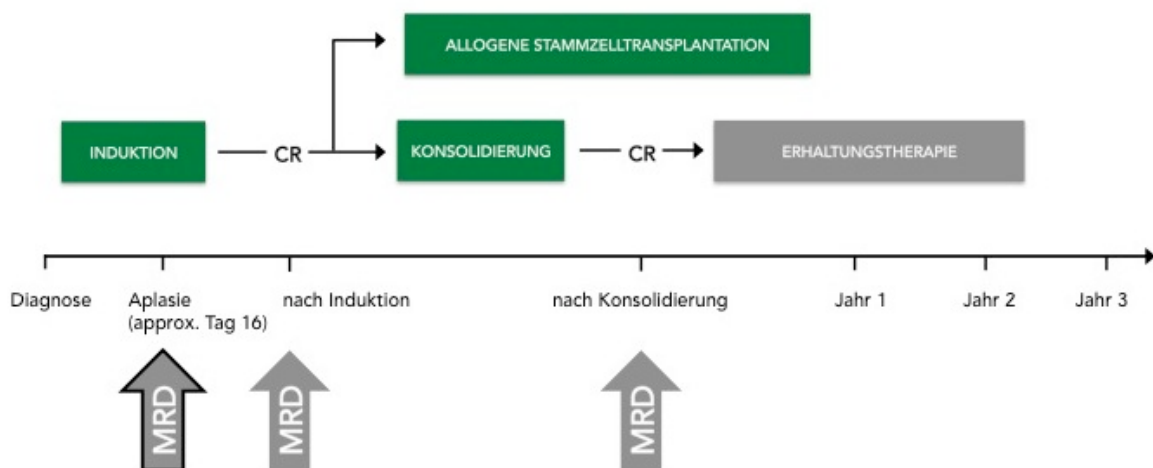


Abbildung 5.1: Die Rolle der MRD zum Zeitpunkt der Aplasie für die Gestaltung der Postinduktionstherapie

Die durchflusszytometrisch gemessene MRD zum Zeitpunkt der Aplasie könnte somit eine bedeutende Rolle für das Management der risikoadaptierten Postinduktionstherapie spielen und hoffentlich in Zukunft das Überleben von AML-Patienten verbessern. Um die MFC-

MRD-Testung in die Routinediagnostik der AML aufnehmen zu können, müssten weitere laborübergreifende Standardisierungen der Methode durchgeführt werden(103). Ob in Zukunft MFC-MRD-gesteuerte Anpassungen des Postinduktionstherapiemanagements tatsächlich einen klinischen Nutzen für AML-Patienten bringen, wird in randomisierten Studien untersucht werden müssen(53, 109).

7 Zusammenfassung

Ein Langzeitüberleben wird von vielen AML-Patienten nicht erreicht. Zwar werden durch eine intensive Induktionstherapie Remissionsraten von bis zu 80% erzielt, allerdings erleiden bis zu 60% dieser Patienten im späteren Verlauf ein Rezidiv (23). Diese Daten spiegeln das aktuell suboptimale Management der Postinduktionstherapie in der AML des Erwachsenenalters wieder. Das Überleben von AML-Patienten könnte möglicherweise durch eine individualisierte und besser risikoadaptierte Postinduktionstherapie verbessert werden. Allerdings lässt sich anhand der aktuell etablierten prognostischen Faktoren – die sich vor allem auf den Zeitpunkt der Erstdiagnose konzentrieren – die Prognose eines Individuums sehr eingeschränkt vorhersagen. Daher ist es von größter Bedeutung neuere, sensitivere prognostische Faktoren zu identifizieren.

Ziel dieser Arbeit war es, die prognostische Bedeutung der durchflusszytometrisch gemessenen MRD zum Zeitpunkt der Aplasie und nach Induktion als in vivo Marker für die Chemosensitivität der Erkrankung im Kontext der bereits existierenden prognostischen Faktoren zu evaluieren.

Es wurden 105 Patienten mit neu diagnostizierter AML des Erwachsenenalters (ausgenommen Promyelozytenleukämie), die eine intensive Induktionstherapie erhalten haben, in die Studie aufgenommen. Die Knochenmarksproben wurden durchflusszytometrisch anhand von 6-8-Farben-Panel untersucht. Der univariate und multivariate Einfluss der MRD auf das Überleben wurde anhand des Kaplan-Meier-Schätzers und dem zugehörigen Log-Rank-Test und anhand von Cox-Regressionsmodellen analysiert. Die MRD wurde nach der LAIP-gesteuerten Gatingmethode definiert.

Die MRD konnte in 87 Fällen zum Zeitpunkt der Aplasie (Tag 15-18 nach Beginn der Induktionstherapie), in 72 Fällen zum Zeitpunkt nach Induktion (Tag 25-129 nach Erstdiagnose) und in 59 Fällen zu beiden Zeitpunkten analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine MRD-Positivität zum Zeitpunkt nach Induktion mit einem signifikant kürzeren EFS und RFS (HR 4,232; $p=0,004$ und HR 4,553; $p=0,002$) assoziiert ist, unabhängig von eBC-Status, Alter und ELN-Klassifikation 2017. Auch der MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie war ein starker prognostischer Faktor für das EFS (HR 2,633; $p=0,011$) unabhängig von eBC-Status, Alter und ELN-Klassifikation 2017. Für das OS und RFS zeigte sich ein Trend (HR 4,645; $p=0,057$ und HR 2,177; $p=0,139$). Der eBC-Status zeigte bei vorhandenem MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie keine prognostische Relevanz für das OS, EFS und RFS (HR 1,515; $p=0,496$; HR 1,565; $p=0,205$; HR 0,890; $p=0,842$ vs. HR 5,013; $p=0,038$; HR 2,635; $p=0,005$; HR 2,355; $p=0,055$). Ein bestätigter MRD-positiver-Status zeigte eine von Alter und ELN-Klassifikation 2017 unabhängige Assoziation mit dem EFS und RFS (HR 3,833; $p=0,006$ und HR 3,501; $p=0,007$).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die durchflusszytometrisch gemessene MRD zum Zeitpunkt nach Induktion und zum Zeitpunkt der Aplasie starke prognostische Faktoren darstellen. Besondere Relevanz könnte die MRD-Messung zum Zeitpunkt der Aplasie haben, da die frühe Identifizierung der Patienten, die eine schlechte Prognose haben, die Möglichkeit eröffnet eine frühe individualisierte therapeutische Intervention – zum Beispiel in Form einer allogenen SZT – einzuleiten. Ob in Zukunft MFC-MRD-gesteuerte Therapieanpassungen zu einer Verbesserung des Überlebens in der AML führen, wird in klinischen Studien untersucht werden müssen.

I. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	FAB-Klassifikation der AML
Tabelle 1.2	AML und verwandte Neoplasien nach WHO-Klassifikation 2016
Tabelle 1.3	ELN-Klassifikation 2017
Tabelle 1.4	Zeitpunkte der Erfassung der MFC-MRD in ausgewählten bisherigen Studien
Tabelle 3.1	Das S-HAM-Protokoll im Überblick
Tabelle 3.2	Das 7+3-Schema im Überblick
Tabelle 3.3	Die chemotherapeutische Konsolidierungstherapie nach AMLCG-Standard im Überblick
Tabelle 3.4	Übersicht über die in der Studie verwendeten Antikörperpanel
Tabelle 3.5	Definitionen der Parameter zur Beurteilung des Therapieansprechens
Tabelle 3.6	Definitionen der in der Studie erhobenen Endpunkte
Tabelle 3.7	Definitionen der in der Studie berechneten Überlebenszeiten.
Tabelle 4.1	Patientencharakteristika gruppiert nach Verfügbarkeit der durchflusszytometrisch erhobenen MRD zum Zeitpunkt der Aplasie und post-Induktion
Tabelle 4.2	Multivariate Analyse für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion
Tabelle 4.3	Multivariate Analyse für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion für zum Zeitpunkt der SZT zensierte Überlebensdaten
Tabelle 4.4	Multivariate Analyse für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie und den eBC-Status
Tabelle 4.5	Multivariate Analyse für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie und den eBC-Status für zum Zeitpunkt der SZT zensierte Überlebensdaten
Tabelle 4.6	Multivariate Analyse für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie
Tabelle 4.7	Multivariate Analyse für den MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie für zum Zeitpunkt der SZT zensierte Überlebensdaten
Tabelle 4.8	Multivariate Analyse für den kombinierten MFC-MRD-Status
Tabelle 4.9	Multivariate Analyse für den kombinierten MFC-MRD-Status für zum Zeitpunkt der SZT zensierte Überlebensdaten

II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1 Therapieüberblick für medizinisch fitte AML-Patienten
Abbildung 1.2 Überblick über die Antigenexpression im Verlauf der Myelopoese
Abbildung 1.3 Formen aberranter Antigenexpression in der AML
Abbildung 3.1 Beispielhafte Darstellung der angewandten LAIP-gesteuerten Gatingstrategie
Abbildung 4.1 Vorgang der Patientenselektion im Überblick
Abbildung 4.2 OS, EFS und RFS stratifiziert nach Alter $<$ und ≥ 60 Jahre.
Abbildung 4.3 OS, EFS und RFS stratifiziert nach ELN-Klassifikation 2017
Abbildung 4.4 OS und EFS stratifiziert nach CR-Status
Abbildung 4.5 OS, EFS und RFS stratifiziert nach eBC-Status
Abbildung 4.6 OS, EFS und RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie
Abbildung 4.7 OS, EFS und RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt nach Induktion
Abbildung 4.8 OS, EFS und RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie für Patienten, die eine eBC erreicht haben
Abbildung 4.9 OS, EFS und RFS stratifiziert nach MFC-MRD-Status zum Zeitpunkt der Aplasie für Patienten, die eine eBC nicht erreicht haben
Abbildung 4.10 OS, EFS und RFS stratifiziert nach kombinierten MFC-MRD-Status
Abbildung 5.1 Die Rolle der MRD zum Zeitpunkt der Aplasie für die Gestaltung der Postinduktionstherapie

III. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
aPC	Aberrante primitive Zellen
CD	Cluster of differentiation
CI	Konfidenzintervall
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CR	Komplette Remission („Complete Remission“)
Cri	Komplette Remission mit inkompletter Regeneration des Blutes
eBC	Early Blast Clearance
ED	Erstdiagnose
EFS	Ereignisfreies Überleben („Event-free survival“)
ELN	European LeukemiaNet
FAB	French-American-British
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FSC	Vorwärtsstreulicht („forward scatter“)
HAM	Hochdosis-Ara-C, Mitoxantron
HD	Hoch-Dosis
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HR	Hazard Ratio
KM	Knochenmark
LAIP	Leukämie-assoziiertes aberrantes Immunphänotyp
MFC	Multiparametrische-Fluoreszenz-Durchflusszytometrie
MRD	Minimale Resterkrankung („Minimal residual disease“)
OS	Gesamtüberleben („Overall survival“)
PCR	Polymerasekettenreaktion
RFS	Rezidivfreies Überleben
S-HAM	Sequenzielles HAM
SSC	Seitwärtsstreulicht („side scatter“)
SZT	Stammzelltransplantation
WHO	World Health Organization

IV. Literaturverzeichnis

1. G H. Innere Medizin. Köln 2012.
2. Leukämien: Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut; 2015 [updated 17.12.15]. Available from: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leukaemien/leukaemien_node.html.
3. Fritsch S, Metzeler K, Hiddemann W, et al. [Diagnostics and therapy of acute myeloid leukemia]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946). 2006;131(43):2401-6. Epub 2006/10/21. doi: 10.1055/s-2006-955022. PubMed PMID: 17054056.
4. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47. Epub 2016/11/30. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196. PubMed PMID: 27895058; PubMed Central PMCID: PMC5291965.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
6. Cornelissen JJ, van Putten WL, Verdonck LF, et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood*. 2007;109(9):3658-66. Epub 2007/01/11. doi: 10.1182/blood-2006-06-025627. PubMed PMID: 17213292.
7. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology*. 1976;33(4):451-8. Epub 1976/08/01. PubMed PMID: 188440.
8. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51. Epub 2009/04/10. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262. PubMed PMID: 19357394.
9. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2012;366(12):1079-89. Epub 2012/03/16. doi: 10.1056/NEJMoa1112304. PubMed PMID: 22417203; PubMed Central PMCID: PMC3545649.
10. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(23):2209-21. doi: 10.1056/NEJMoa1516192. PubMed PMID: 27276561.
11. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(5):686-98. Epub 2016/06/12. doi: 10.1182/blood-2016-01-693879. PubMed PMID: 27288520.
12. Walter RB, Othus M, Borthakur G, et al. Prediction of early death after induction therapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia with pretreatment risk scores: a novel paradigm for treatment assignment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(33):4417-23. Epub 2011/10/05. doi: 10.1200/jco.2011.35.7525. PubMed PMID: 21969499; PubMed Central PMCID: PMC3221524.
13. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998;92(7):2322-33. Epub 1998/09/25. PubMed PMID: 9746770.
14. Buchner T, Hiddemann W, Wormann B, et al. Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML

- Cooperative Group. *Blood*. 1999;93(12):4116-24. Epub 1999/06/11. PubMed PMID: 10361108.
15. Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2009:385-95. Epub 2009/12/17. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.385. PubMed PMID: 20008224.
 16. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29-41. Epub 2015/12/15. doi: 10.1182/blood-2015-07-604496. PubMed PMID: 26660431; PubMed Central PMCID: PMC4705608.
 17. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000;96(13):4075-83. Epub 2000/12/09. PubMed PMID: 11110676.
 18. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116(3):354-65. Epub 2010/04/14. doi: 10.1182/blood-2009-11-254441. PubMed PMID: 20385793.
 19. Preisler H, Davis RB, Kirshner J, et al. Comparison of three remission induction regimens and two postinduction strategies for the treatment of acute nonlymphocytic leukemia: a cancer and leukemia group B study. *Blood*. 1987;69(5):1441-9. Epub 1987/05/01. PubMed PMID: 3552076.
 20. Walter RB, Othus M, Burnett AK, et al. Resistance prediction in AML: analysis of 4601 patients from MRC/NCRI, HOVON/SAKK, SWOG and MD Anderson Cancer Center. *Leukemia*. 2015;29(2):312-20. Epub 2014/08/13. doi: 10.1038/leu.2014.242. PubMed PMID: 25113226; PubMed Central PMCID: PMC4318722.
 21. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(4):570-7. Epub 2009/12/30. doi: 10.1200/jco.2008.21.6010. PubMed PMID: 20038735.
 22. Bornhauser M, Ehninger G. [Diagnostics and therapy of acute myeloid leukemia]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*. 2009;134(39):1935-41. Epub 2009/09/18. doi: 10.1055/s-0029-1237534. PubMed PMID: 19760554.
 23. Kern W, Haferlach T, Schoch C, et al. Risk-adapted therapy of AML: the AMLCG experience. *Annals of hematology*. 2004;83 Suppl 1:S49-51. Epub 2004/05/06. doi: 10.1007/s00277-004-0849-8. PubMed PMID: 15124669.
 24. Suci S, Mandelli F, de Witte T, et al. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial. *Blood*. 2003;102(4):1232-40. Epub 2003/04/26. doi: 10.1182/blood-2002-12-3714. PubMed PMID: 12714526.
 25. Schetelig J, Schaich M, Schafer-Eckart K, et al. Hematopoietic cell transplantation in patients with intermediate and high-risk AML: results from the randomized Study Alliance Leukemia (SAL) AML 2003 trial. *Leukemia*. 2015;29(5):1060-8. Epub 2014/12/02. doi: 10.1038/leu.2014.335. PubMed PMID: 25434303.
 26. Schetelig J, Bornhauser M, Schmid C, et al. Matched unrelated or matched sibling donors result in comparable survival after allogeneic stem-cell transplantation in elderly patients with acute myeloid leukemia: a report from the cooperative German Transplant Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical*

- Oncology. 2008;26(32):5183-91. Epub 2008/09/05. doi: 10.1200/jco.2007.15.5184. PubMed PMID: 18768435.
27. Gupta V, Tallman MS, He W, et al. Comparable survival after HLA-well-matched unrelated or matched sibling donor transplantation for acute myeloid leukemia in first remission with unfavorable cytogenetics at diagnosis. *Blood*. 2010;116(11):1839-48. Epub 2010/06/12. doi: 10.1182/blood-2010-04-278317. PubMed PMID: 20538804; PubMed Central PMCID: PMC3173984.
28. Woolfrey A, Lee SJ, Gooley TA, et al. HLA-allele matched unrelated donors compared to HLA-matched sibling donors: role of cell source and disease risk category. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16(10):1382-7. Epub 2010/05/08. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.03.024. PubMed PMID: 20447462; PubMed Central PMCID: PMC32934755.
29. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *Jama*. 2009;301(22):2349-61. Epub 2009/06/11. doi: 10.1001/jama.2009.813. PubMed PMID: 19509382; PubMed Central PMCID: PMC3163846.
30. Fiegl M, Hiddemann W. Risikoadaptierte Therapie der akuten myeloischen Leukämie. *Der Internist*. 2012;53(4):392-9. doi: 10.1007/s00108-011-2986-1.
31. Walter RB, Buckley SA, Pagel JM, et al. Significance of minimal residual disease before myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for AML in first and second complete remission. *Blood*. 2013;122(10):1813-21. Epub 2013/07/13. doi: 10.1182/blood-2013-06-506725. PubMed PMID: 23847197; PubMed Central PMCID: PMC3765060.
32. Buchner T, Hiddemann W, Berdel WE, et al. 6-Thioguanine, cytarabine, and daunorubicin (TAD) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (HAM) for induction, TAD for consolidation, and either prolonged maintenance by reduced monthly TAD or TAD-HAM-TAD and one course of intensive consolidation by sequential HAM in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia (AML): a randomized trial of the German AML Cooperative Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(24):4496-504. Epub 2003/12/16. doi: 10.1200/jco.2003.02.133. PubMed PMID: 14673036.
33. Hiddemann W, Kern W, Schoch C, et al. Management of acute myeloid leukemia in elderly patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(11):3569-76. Epub 1999/11/05. doi: 10.1200/jco.1999.17.11.3569. PubMed PMID: 10550156.
34. Kern W, Aul C, Maschmeyer G, et al. Superiority of high-dose over intermediate-dose cytosine arabinoside in the treatment of patients with high-risk acute myeloid leukemia: results of an age-adjusted prospective randomized comparison. *Leukemia*. 1998;12(7):1049-55. Epub 1998/07/17. PubMed PMID: 9665189.
35. Appelbaum FR. Hematopoietic cell transplantation beyond first remission. *Leukemia*. 2002;16(2):157-9. Epub 2002/02/13. doi: 10.1038/sj.leu.2402345. PubMed PMID: 11840278.
36. Burnett AK. Current controversies: which patients with acute myeloid leukaemia should receive a bone marrow transplantation?--an adult treater's view. *British journal of haematology*. 2002;118(2):357-64. Epub 2002/07/26. PubMed PMID: 12139719.
37. Kern W, Haferlach T, Schoch C, et al. Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial. *Blood*. 2003;101(1):64-70. Epub 2002/10/24. doi: 10.1182/blood-2002-02-0532. PubMed PMID: 12393605.

38. Freireich EJ, Gehan EA, Sulman D, et al. The effect of chemotherapy on acute leukemia in the human. *Journal of chronic diseases*. 1961;14:593-608. Epub 1961/12/01. PubMed PMID: 13894982.
39. Yates J, Glidewell O, Wiernik P, et al. Cytosine arabinoside with daunorubicin or adriamycin for therapy of acute myelocytic leukemia: a CALGB study. *Blood*. 1982;60(2):454-62. Epub 1982/08/01. PubMed PMID: 6953986.
40. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*. 1995;85(6):1416-34. Epub 1995/03/15. PubMed PMID: 7888664.
41. Preisler HD, Priore R, Azarnia N, et al. Prediction of response of patients with acute nonlymphocytic leukaemia to remission induction therapy: use of clinical measurements. *British journal of haematology*. 1986;63(4):625-36. Epub 1986/08/01. PubMed PMID: 3460626.
42. Hiddemann W, Clarkson BD, Buchner T, et al. Bone marrow cell count per cubic millimeter bone marrow: a new parameter for quantitating therapy-induced cytoreduction in acute leukemia. *Blood*. 1982;59(2):216-25. Epub 1982/02/01. PubMed PMID: 7055637.
43. Bertoli S, Bories P, Bene MC, et al. Prognostic impact of day 15 blast clearance in risk-adapted remission induction chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: long-term results of the multicenter prospective LAM-2001 trial by the GOELAMS study group. *Haematologica*. 2014;99(1):46-53. Epub 2013/08/27. doi: 10.3324/haematol.2013.091819. PubMed PMID: 23975179; PubMed Central PMCID: PMC4007924.
44. Haferlach T, Kern W, Schoch C, et al. A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group. *Haematologica*. 2004;89(4):408-18.
45. Paietta E. Minimal Residual Disease in AML: Why Has It Lagged Behind Pediatric ALL? *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2015;15 Suppl:S2-6. Epub 2015/08/25. doi: 10.1016/j.clml.2015.02.009. PubMed PMID: 26297274; PubMed Central PMCID: PMC4548275.
46. Lister TA, Rohatiner AZ. The treatment of acute myelogenous leukemia in adults. *Seminars in hematology*. 1982;19(3):172-92. Epub 1982/07/01. PubMed PMID: 7051288.
47. Kern W, Schnittger S. Monitoring of acute myeloid leukemia by flow cytometry. *Current oncology reports*. 2003;5(5):405-12. Epub 2003/08/05. PubMed PMID: 12895393.
48. Martens AC, Hagenbeek A. Detection of minimal disease in acute leukemia using flow cytometry: studies in a rat model for human acute leukemia. *Cytometry*. 1985;6(4):342-7. Epub 1985/07/01. doi: 10.1002/cyto.990060411. PubMed PMID: 3860369.
49. Kern W, Voskova D, Schoch C, et al. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2004;89(5):528-40. Epub 2004/05/12. PubMed PMID: 15136215.
50. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood*. 2001;98(6):1746-51. Epub 2001/09/06. PubMed PMID: 11535507.
51. Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, et al. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(12):3948-52. Epub 2000/11/23. PubMed PMID: 11090082.
52. Durchflusszytometrie: Wikipedia; 2017 [12.04.2017]. Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Durchflusszytometrie>.
53. Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, et al. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2017. Epub 2017/04/08. doi: 10.1038/leu.2017.113. PubMed PMID: 28386105.

54. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2014;2014(1):222-33. Epub 2015/02/20. doi: 10.1182/asheducation-2014.1.222. PubMed PMID: 25696859.
55. Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. MRD in AML: it is time to change the definition of remission. *Best practice & research Clinical haematology*. 2014;27(3-4):265-71. Epub 2014/12/03. doi: 10.1016/j.beha.2014.10.008. PubMed PMID: 25455276.
56. Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;116(13):2295-303. Epub 2010/06/16. doi: 10.1182/blood-2009-12-258178. PubMed PMID: 20548095.
57. Terstappen LW, Huang S, Picker LJ. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. *Blood*. 1992;79(3):666-77. Epub 1992/02/01. PubMed PMID: 1370641.
58. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, et al. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood*. 1987;69(1):255-63. Epub 1987/01/01. PubMed PMID: 2947644.
59. Terstappen LW, Loken MR. Myeloid cell differentiation in normal bone marrow and acute myeloid leukemia assessed by multi-dimensional flow cytometry. *Analytical cellular pathology : the journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology*. 1990;2(4):229-40. Epub 1990/07/01. PubMed PMID: 1703434.
60. Terstappen LW, Safford M, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia*. 1990;4(9):657-63. Epub 1990/09/01. PubMed PMID: 2395385.
61. Terstappen LW, Safford M, Unterhalt M, et al. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia: IV. Comparison to the differentiation pathway of normal hematopoietic progenitor cells. *Leukemia*. 1992;6(10):993-1000. Epub 1992/10/01. PubMed PMID: 1383649.
62. Olweus J, Lund-Johansen F, Terstappen LW. Expression of cell surface markers during differentiation of CD34+, CD38-/lo fetal and adult bone marrow cells. *ImmunoMethods*. 1994;5(3):179-88. Epub 1994/12/01. PubMed PMID: 7540098.
63. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry*. 1999;38(4):139-52. Epub 1999/08/10. PubMed PMID: 10440852.
64. Stewart CC, Behm FG, Carey JL, et al. U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: selection of antibody combinations. *Cytometry*. 1997;30(5):231-5. Epub 1997/12/31 23:38. PubMed PMID: 9383096.
65. Kern W, Schoch C, Haferlach T, et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;56(2):283-309. Epub 2005/10/11. doi: 10.1016/j.critrevonc.2004.06.004. PubMed PMID: 16213150.
66. Ommen HB. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: a review of the current evolving strategies. *Therapeutic advances in hematology*. 2016;7(1):3-16. Epub 2016/02/03. doi: 10.1177/2040620715614529. PubMed PMID: 26834951; PubMed Central PMCID: PMC4713887.
67. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2016;90(1):47-53. Epub 2015/04/25. doi: 10.1002/cyto.b.21239. PubMed PMID: 25906832.
68. Smith LJ, Curtis JE, Messner HA, et al. Lineage infidelity in acute leukemia. *Blood*. 1983;61(6):1138-45. Epub 1983/06/01. PubMed PMID: 6404327.

69. Kern W, Haferlach C, Haferlach T, et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2008;112(1):4-16. Epub 2007/11/15. doi: 10.1002/cncr.23128. PubMed PMID: 18000811.
70. Kern W, Danhauser-Riedl S, Ratei R, et al. Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow. *Haematologica*. 2003;88(6):646-53. Epub 2003/06/13. PubMed PMID: 12801840.
71. Loken MR, Alonzo TA, Pardo L, et al. Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group. *Blood*. 2012;120(8):1581-8. Epub 2012/06/01. doi: 10.1182/blood-2012-02-408336. PubMed PMID: 22649108; PubMed Central PMCID: PMC3429302.
72. Sievers EL, Lange BJ, Alonzo TA, et al. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003;101(9):3398-406. Epub 2002/12/31. doi: 10.1182/blood-2002-10-3064. PubMed PMID: 12506020.
73. Inaba H, Coustan-Smith E, Cao X, et al. 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*. 2012;30(29):3625-32. Epub 2012/09/12. doi: 10.1200/jco.2011.41.5323. PubMed PMID: 22965955; PubMed Central PMCID: PMC3462046.
74. Freeman SD, Virgo P, Couzens S, et al. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(32):4123-31. Epub 2013/09/26. doi: 10.1200/jco.2013.49.1753. PubMed PMID: 24062403.
75. Terwijn M, van Putten WL, Kelder A, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(31):3889-97. doi: 10.1200/JCO.2012.45.9628. PubMed PMID: 24062400.
76. Chen X, Xie H, Wood BL, et al. Relation of clinical response and minimal residual disease and their prognostic impact on outcome in acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(11):1258-64. Epub 2015/03/04. doi: 10.1200/jco.2014.58.3518. PubMed PMID: 25732155.
77. Araki D, Wood BL, Othus M, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Time to Move Toward a Minimal Residual Disease-Based Definition of Complete Remission? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(4):329-36. Epub 2015/12/17. doi: 10.1200/jco.2015.63.3826. PubMed PMID: 26668349; PubMed Central PMCID: PMC34872033 online at <http://www.jco.org>. Author contributions are found at the end of this article.
78. Othus M, Wood BL, Stirewalt DL, et al. Effect of measurable ('minimal') residual disease (MRD) information on prediction of relapse and survival in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30(10):2080-3. Epub 2016/05/03. doi: 10.1038/leu.2016.120. PubMed PMID: 27133827; PubMed Central PMCID: PMC34872033.
79. Kern W, Voskova D, Schoch C, et al. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;104(10):3078-85. Epub 2004/07/31. doi: 10.1182/blood-2004-03-1036. PubMed PMID: 15284114.

80. Kohnke T, Sauter D, Ringel K, et al. Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse. *Leukemia*. 2015;29(2):377-86. doi: 10.1038/leu.2014.186.
81. Kohlmann A, Nadarajah N, Alpermann T, et al. Monitoring of residual disease by next-generation deep-sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease. *Leukemia*. 2014;28(1):129-37. Epub 2013/08/21. doi: 10.1038/leu.2013.239. PubMed PMID: 23958918.
82. Klco JM, Miller CA, Griffith M, et al. Association Between Mutation Clearance After Induction Therapy and Outcomes in Acute Myeloid Leukemia. *Jama*. 2015;314(8):811-22. doi: 10.1001/jama.2015.9643. PubMed PMID: PMC4621257.
83. Kotrova M, Muzikova K, Mejstrikova E, et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood*. 2015;126(8):1045-7. Epub 2015/08/22. doi: 10.1182/blood-2015-07-655159. PubMed PMID: 26294720; PubMed Central PMCID: PMC4551355.
84. Craddock C, Labopin M, Pillai S, et al. Factors predicting outcome after unrelated donor stem cell transplantation in primary refractory acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2011;25(5):808-13. Epub 2011/02/23. doi: 10.1038/leu.2011.13. PubMed PMID: 21339758.
85. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New England journal of medicine*. 2005;352(3):254-66. Epub 2005/01/22. doi: 10.1056/NEJMoa041974. PubMed PMID: 15659725.
86. Benthous T, Schneider F, Mellert G, et al. Rapid and sensitive screening for CEBPA mutations in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology*. 2008;143(2):230-9. Epub 2008/08/30. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07328.x. PubMed PMID: 18752591.
87. Braess J, Spiekermann K, Staib P, et al. Dose-dense induction with sequential high-dose cytarabine and mitoxantone (S-HAM) and pegfilgrastim results in a high efficacy and a short duration of critical neutropenia in de novo acute myeloid leukemia: a pilot study of the AMLCG. *Blood*. 2009;113(17):3903-10. Epub 2009/01/10. doi: 10.1182/blood-2008-07-162842. PubMed PMID: 19131552.
88. Burnett A, Wetzler M, Lowenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(5):487-94. Epub 2011/01/12. doi: 10.1200/jco.2010.30.1820. PubMed PMID: 21220605.
89. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(24):4642-9. Epub 2003/12/16. doi: 10.1200/jco.2003.04.036. PubMed PMID: 14673054.
90. Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *American journal of clinical pathology*. 2009;131(1):16-26. Epub 2008/12/20. doi: 10.1309/ajcp5tsd3dzxflx. PubMed PMID: 19095561.
91. Reinhardt D, Langebrake C, Creutzig U, et al. [Minimal residual disease in acute myeloid leukemia in children--standardization and evaluation of immunophenotyping in the AML-BFM-98 study]. *Klinische Padiatrie*. 2002;214(4):179-87. Epub 2002/08/08. doi: 10.1055/s-2002-33181. PubMed PMID: 12165899.
92. Zeijlemaker W, Gratama JW, Schuurhuis GJ. Tumor heterogeneity makes AML a "moving target" for detection of residual disease. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2014;86(1):3-14. Epub 2013/10/24. doi: 10.1002/cyto.b.21134. PubMed PMID: 24151248.

93. Keeney M, Halley JG, Rhoads DD, et al. Marked Variability in Reported Minimal Residual Disease Lower Level of Detection of 4 Hematolymphoid Neoplasms: A Survey of Participants in the College of American Pathologists Flow Cytometry Proficiency Testing Program. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2015;139(10):1276-80. Epub 2015/02/20. doi: 10.5858/arpa.2014-0543-CP. PubMed PMID: 25695342.
94. Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *The Lancet Oncology*. 2010;11(6):543-52. Epub 2010/05/11. doi: 10.1016/s1470-2045(10)70090-5. PubMed PMID: 20451454; PubMed Central PMCID: PMC3171799.
95. Terwijn M, Kelder A, Snel AN, et al. Minimal residual disease detection defined as the malignant fraction of the total primitive stem cell compartment offers additional prognostic information in acute myeloid leukaemia. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2012;34(4):432-41. doi: 10.1111/j.1751-553X.2012.01416.x.
96. Fiser K, Sieger T, Schumich A, et al. Detection and monitoring of normal and leukemic cell populations with hierarchical clustering of flow cytometry data. *Cytometry A*. 2012;81(1):25-34. Epub 2011/10/13. doi: 10.1002/cyto.a.21148. PubMed PMID: 21990127.
97. DiGiuseppe JA, Tadmor MD, Pe'er D. Detection of minimal residual disease in B lymphoblastic leukemia using viSNE. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2015;88(5):294-304. Epub 2015/05/15. doi: 10.1002/cyto.b.21252. PubMed PMID: 25974871.
98. Amir el AD, Davis KL, Tadmor MD, et al. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol*. 2013;31(6):545-52. doi: 10.1038/nbt.2594. PubMed PMID: 23685480; PubMed Central PMCID: PMC4076922.
99. Samusik N, Good Z, Spitzer MH, et al. Automated mapping of phenotype space with single-cell data. *Nat Methods*. 2016;13(6):493-6. doi: 10.1038/nmeth.3863. PubMed PMID: 27183440; PubMed Central PMCID: PMC4896314.
100. Hubmann M, Kohnke T, Hoster E, et al. Molecular response assessment by quantitative real-time polymerase chain reaction after induction therapy in NPM1-mutated patients identifies those at high risk of relapse. *Haematologica*. 2014;99(8):1317-25. Epub 2014/05/13. doi: 10.3324/haematol.2014.104133. PubMed PMID: 24816240; PubMed Central PMCID: PMC4116830.
101. Butturini A, Klein J, Gale RP. Modeling minimal residual disease (MRD)-testing. *Leukemia research*. 2003;27(4):293-300. Epub 2003/01/18. PubMed PMID: 12531219.
102. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986-2010. Epub 2012/09/06. doi: 10.1038/leu.2012.122. PubMed PMID: 22948490; PubMed Central PMCID: PMC3437409.
103. Finak G, Langweiler M, Jaimes M, et al. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium. *Scientific reports*. 2016;6:20686. Epub 2016/02/11. doi: 10.1038/srep20686. PubMed PMID: 26861911; PubMed Central PMCID: PMC4748244.
104. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;129(3):347-57. doi: 10.1182/blood-2016-07-726307. PubMed PMID: 27903527.
105. Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJ, et al. Peripheral blood minimal residual disease may replace bone marrow minimal residual disease as an immunophenotypic biomarker for impending relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30(3):708-15. Epub 2015/09/17. doi: 10.1038/leu.2015.255. PubMed PMID: 26373238.
106. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, et al. Risk of Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Is Predicted By Flow Cytometric Measurement of Residual Disease

- on Day 15 Bone Marrow. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(31):5168-74. doi: 10.1200/jco.2008.20.8934. PubMed PMID: 19805690.
107. Schrappe M. Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient. *ASH Education Program Book*. 2012;2012(1):137-42. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.137.
108. Hokland P, Ommen HB, Mule MP, et al. Advancing the Minimal Residual Disease Concept in Acute Myeloid Leukemia. *Seminars in hematology*. 2015;52(3):184-92. Epub 2015/06/27. doi: 10.1053/j.seminhematol.2015.04.001. PubMed PMID: 26111465; PubMed Central PMCID: PMC4484880.
109. Carlson K-SB, Guzman ML. Is Minimal Residual Disease Monitoring Clinically Relevant in Adults with Acute Myelogenous Leukemia? *Current hematologic malignancy reports*. 2013;8(2):109-15. doi: 10.1007/s11899-013-0157-2. PubMed PMID: PMC3661756.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Marion Subklewe für die stets anregende und intensive Leitung des Forschungsprojektes.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. med. Thomas Köhne für die vielfältigen Diskussionen und für seine Hilfe und Geduld bei zahlreichen Fragen bedanken.

Ein großer Dank gilt auch dem gesamten Team des Labors für Leukämiediagnostik der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Klinikums der Universität München.

Gerne möchte ich auch allen Patienten danken, ohne deren Einverständnis diese Arbeit niemals möglich geworden wäre.

Ganz herzlich danken möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben.