

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik III,
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. Michael von Bergwelt-Baildon

**Optimierung und Validierung der durchflusszytometrischen Detektion und
Quantifizierung der minimalen Resterkrankung bei Patienten mit akuter
lymphatischer Leukämie**

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

Vorgelegt von
Theresa Maria Isert

aus
Würzburg

Jahr
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Marion Subklewe
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Torsten Haferlach
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Thomas Köhnke
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	29.10.2020

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Theresa Maria Isert, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Optimierung und Validierung der durchflusszytometrischen Detektion und Quantifizierung der minimalen Resterkrankung bei Patienten mit akuter lymphatischer 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, 2019

Bern, 11.11.2020 Theresa Maria Isert

Optimierung und Validierung der durchflusszytometrischen Detektion und
Quantifizierung der minimalen Resterkrankung bei Patienten mit akuter lymphatischer
Leukämie

Gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	11
Abbildungsverzeichnis	12
Tabellenverzeichnis.....	14
1 Einleitung.....	15
1.1 Ätiologie	15
1.2 Epidemiologie.....	15
1.3 Diagnostik.....	16
1.4 Klassifikation.....	16
1.4.1 Die FAB – Klassifikation	16
1.4.2 Die EGIL und WHO-Klassifikation	17
1.4.3 Immunphänotypisierung	17
1.4.4 Zytogenetik / Molekulargenetik	18
1.5 Klinische Manifestation.....	19
1.6 Prognose und Risikostratifikation der akuten lymphatischen Leukämie.....	19
1.7 Therapie der akuten lymphatischen Leukämie	20
1.8 Minimale Resterkrankung	22
1.8.1 Molekulargenetische MRD-Bestimmung.....	22
1.8.2 Durchflusszytometrische MRD-Bestimmung	23
1.8.2.1 Aberrantes Antigenprofil und „different from normal - Strategie“ zur MRD-Bestimmung	24
1.8.2.2 Gating mittels Leukämie-assoziiertem Immunphänotyp	25
2 Zielsetzung.....	27
3 Methodik.....	28
3.1 Einschlusskriterien der Patienten.....	28
3.2 Untersuchungstechniken.....	28
3.2.1 Zytomorphologische Diagnostik	28
3.2.2 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	29
3.2.2.1 Theoretische Grundlagen	29
3.2.2.2 Auswertung	30
3.2.3 Durchflusszytometrie.....	30
3.2.3.1 Auswertung	31
3.3 Statistik	34
4 Ergebnisse.....	35

4.1	Patientenkollektiv	35
4.2	Morphologische Diagnostik im Vergleich zur MRD Diagnostik mittels Durchflusszytometrie und PCR bei BCR-ABL negativer ALL	37
4.3	MRD Diagnostik mittels Durchflusszytometrie im Vergleich zu molekulargenetischer PCR Diagnostik bei BCR-ABL negativen Proben.....	39
4.4	BCR - ABL negative ALL mittels "LAIP - Strategie"	43
4.5	Morphologische Diagnostik im Vergleich zur MRD Diagnostik mittels Durchflusszytometrie und PCR bei BCR-ABL positiven Proben	46
4.6	MRD Diagnostik mittels Durchflusszytometrie im Vergleich zu molekulargenetischer PCR Diagnostik bei BCR-ABL positiven Proben.....	48
4.7	BCR - ABL positive ALL mittels "LAIP - Strategie"	51
5	Diskussion	54
6	Zusammenfassung	59
7	Danksagung	62
8	Literaturverzeichnis	63

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Allophycocyanin
BCR-ABL	Philadelphia Chromosom
CD	Cluster of differentiation
CR	Complete remission
ECD	Energy coupled dye
EGIL	European Group for the Immunological Characterization of Akute Leukemias
FAB	French-American-British
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
flowMRD	durchflusszytometrische erhobener Status der Minimalen Resterkrankung
GMALL	German Multicenter Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia
GPOH	Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
KrOrange	Krome Orange
LAIP	Leukämie-assoziiertes Immunphänotyp
LR	Low risk
IR	Intermediate risk
HR	High risk
MLL	Mixed lineage leukemia
MPAL	Mixed-phenotype acute leukemia
MRD	Minimale Resterkrankung
MRDflow	Bestimmung der MRD mittels Durchflusszytometrie
PacBlue	Pacific blue
PC5	Phycoerythrin-CY5 (PC5)
PE	Phycoerythrin
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
IGH	Immunglobuline heavy chain
WBC	White blood cell
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der Risikogruppen der ALL nach GMALL modifiziert nach GMALL Therapieempfehlung für ALL bis 55 Jahre, Version 1 (2012), Seite 8	20
Abbildung 2: Physiologisches Antigenexpressionsprofil im Rahmen der B-Zell-Ausreifung (Bendall SC, et al. Cell 2014)	25
Abbildung 3: MRD flow bei Erstdiagnose, Detektion des LAIP	32
Abbildung 4: MRD flow, Verlaufsuntersuchung 4	33
Abbildung 5: MRD flow, Verlaufsuntersuchung 6, Rezidiv	34
Abbildung 6: Morphologie im Vergleich zur flow MRD Evaluation durch „different from normal - Strategie“ bei BCR-ABL negativen Proben	38
Abbildung 7: molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu flow MRD Evaluation durch „different from normal - Strategie“ bei BCR-ABL negativen Proben.....	40
Abbildung 8: Übereinstimmung zwischen molekularer MRD Diagnostik im Vergleich zu der flow MRD Evaluation mittels „different from normal - Strategie“ bei BCR-ABL negativen Proben, MRD negativ	41
Abbildung 9: Übereinstimmung zwischen molekularer MRD Diagnostik im Vergleich zu flow MRD Evaluation durch „different from normal - Strategie“ bei BCR-ABL negativen Proben.....	42
Abbildung 10: molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu „LAIP - Strategie“ MRD Evaluation bei BCR-ABL negativen Proben	44
Abbildung 11: Übereinstimmung zwischen molekularer MRD Diagnostik im Vergleich zur MRD Evaluation mittels „LAIP - Strategie“ bei BCR-ABL negativen Proben	45
Abbildung 12: flow MRD mittels „different from normal - Strategie“ im Vergleich zur „LAIP - Strategie“	46
Abbildung 13: Morphologie im Vergleich zur „different from normal“ flow MRD Evaluation bei BCR-ABL positiven Proben	47
Abbildung 14: molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu der „different from normal“ flow MRD Evaluation bei BCR-ABL positiven Proben.....	49
Abbildung 15: Übereinstimmung zwischen molekularer MRD Diagnostik im Vergleich zu der „different from normal“ flow MRD Evaluation bei BCR-ABL positiven Proben	50
Abbildung 16: Übereinstimmung zwischen molekularer MRD Diagnostik im Vergleich zu der „different from normal“ flow MRD Evaluation bei BCR-ABL positiven Proben unterhalb des quantifizierbaren Bereiches	51

Abbildung 17: molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zur „LAIP - Strategie“ bei
BCR-ABL positiven Proben52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Immunologische Einteilung der ALL modifiziert nach der Einteilung der European Group for the Immunological Characterization of Akute Leukemias (EGIL)	17
Tabelle 2: modifiziert nach der WHO Klassifikation (Arber, Orazi et al. 2016).....	18
Tabelle 3: Inzidenz und Zytogenetik der häufigsten B-Zelllinien ALL Subtypen, modifiziert nach akute Leukämien Gökbuget, Ganser, Schlenk.....	19
Tabelle 4: Antigenpanel, in Verwendung bis Juni 2015	30
Tabelle 5: Antigenpanel, in Verwendung ab Juni 2015	31
Tabelle 6: Anzahl der Proben.....	35
Tabelle 7: Patientenkollektiv.....	36
Tabelle 8: Korrelationskoeffizienten.....	39
Tabelle 9:Übersichtstafel, molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu „different - from normal - Strategie“ bei BCR-ABL negativen Proben	40
Tabelle 10: Korrelationskoeffizienten.....	43
Tabelle 11: Übersichtstafel, molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu „LAIP- Strategie“ MRD Evaluation bei BCR-ABL negativen Proben	44
Die „LAIP- Strategie“ zeigt im Vergleich zur „different from normal Strategie“ einen starken Anstieg der falsch-positiven und einen geringen Anstieg der falsch-negativen Ergebnisse. Dies ist in Abbildung 10 dargestellt.	45
Tabelle 12: Übersichtstafel, molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu der „different from normal“ flow MRD Evaluation bei BCR-ABL positiven Proben.....	49
Tabelle 13: Übersichtstafel, molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu MRD Evaluation mittels „LAIP - Strategie“ bei BCR-ABL positiven Proben	53

1 Einleitung

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine Erkrankung, die lymphatische Vorläuferzellen des Knochenmarks betrifft. Es kommt zur autonomen Proliferation lymphatischer Vorläuferzellen der B- oder T-Zellreihe. In der Regel ist die ALL durch ein akutes Auftreten und eine schnelle Progredienz mit begleitender Störung und Verdrängung des gesunden Knochenmarks gekennzeichnet (Herold and Mitarbeiter 2015). Der Nachweis der submikroskopischen minimalen Resterkrankung (minimal residual disease - MRD) konnte als einer der wichtigsten Parameter zur Evaluation des Therapieansprechens identifiziert werden. Daher hat die MRD-Detektion in den vergangenen Jahren einen zentralen Stellenwert in der ALL-Therapie eingenommen. Die Validierung der zur MRD-Detektion verwendeten Methoden ist von zunehmender Bedeutung. Ziel dieser Arbeit ist daher die Validierung der durchflusszytometrischen MRD-Bestimmung bei erwachsenen Patienten mit ALL.

1.1 Ätiologie

Die Ätiologie der ALL verbleibt in der Mehrzahl der Fälle ungeklärt. Es findet sich jedoch eine Häufung nach Strahlen- und Zytostatikaexposition (insbesondere Alkylanzien) sowie Exposition gegenüber Benzol (Greaves 1997), (Preston, Kusumi et al. 1994). Polymorphismen in den Genen ARID5B, IKZF1 und CDKN2A sind mit einem erhöhten Risiko einer ALL verbunden (Trevino, Yang et al. 2009), (Papaemmanuil, Hosking et al. 2009), (Sherborne, Hosking et al. 2010). Diesen Genen wird eine Funktion in der lymphatischen Differenzierung zugeordnet (Rudent, Orsi et al. 2015). Zudem wird für die ALL ein gehäuftes Auftreten bei bestimmten syndromalen Erkrankungsbildern (unter anderem Trisomie 21, Neurofibromatose Typ 1) beobachtet (Roy, Cowan et al. 2013).

1.2 Epidemiologie

Die ALL zählt mit einer Inzidenz von 1,1/100.000 (Bassan and Hoelzer 2011) zu den seltenen Krebserkrankungen. Während sie nach den Erhebungen des Deutschen Kinderkrebsregisters mit etwa 32% die häufigste maligne Neoplasie bei Kindern unter 15 Jahren ausmacht (Kaatsch, Spix et al. 2018), ist sie im Erwachsenenalter wesentlich seltener. Es finden sich im zwei Altersgipfel: bei Adoleszenten unter dem 20. Lebensjahr

und über dem 75. Lebensjahr. Der Mittelwert der Inzidenz liegt bei etwa 1,4/100.000, die gesamte Erkrankungszahl beträgt in Deutschland pro Jahr etwa 700 Fälle (Kompetenznetz Leukämie 2018).

1.3 Diagnostik

Bei Verdacht auf ALL wird eine hämatologische Spezialdiagnostik einschließlich Zytomorphologie, Zytochemie, Zytogenetik, Immunphänotypisierung und molekularbiologische Initialdiagnostik sowie Knochenmarkshistologie durchgeführt. Diagnostisch hinweisend ist der Nachweis unreifer lymphatischer Vorläuferzellen, sogenannter Blasten, im Knochenmark. Morphologisch kann bei Nachweis von über 20% Blasten die Diagnose einer akuten Leukämie gestellt werden (Hoelzer, Bassan et al. 2016). Die Abgrenzung der ALL zur akuten myeloischen Leukämie in der Regel durch die zytochemische Klassifizierung des Knochenmarkaspirats. Mit Ausnahme der „Mature B-ALL“ ist zur Diagnosestellung die Bestimmung des Immunphänotyps mittels Durchflusszytometrie unabdingbar.

1.4 Klassifikation

Die akute lymphatische Leukämie kann entsprechend des Immunphänotyps und der Zytogenetik klassifiziert werden. Grundsätzlich unterscheidet man die ALL der B-Zell Reihe und der T-Zell Reihe. In ca. 2/3 der Fälle lässt sich die Erkrankung der B-Zell Reihe zuordnen (Dores, Devesa et al. 2012).

1.4.1 Die FAB – Klassifikation

Zytomorphologisch lässt sich die ALL entsprechend der French-American-British Working Group for Leukemia Classification (FAB) in die Subtypen L1-L3 einteilen. Die Unterscheidung zwischen L1 und L2 ist von untergeordneter Bedeutung, von klinischer Relevanz ist jedoch der Subtyp L3. Dieser klassifiziert eine reifzellige B-Zell-ALL.

1.4.2 Die EGIL und WHO-Klassifikation

Mit Hilfe der Immunphänotypisierung und Zytogenetik können die Subtypen der akuten lymphatischen Leukämie nach der Klassifikation der „European Group for the Immunological Characterization of Akute Leukemias“ (EGIL) bestimmt werden. Dies ist in Tabelle 1 dargestellt. Von dieser Einteilung geht besondere klinische Relevanz aus, da die immunphänotypische Klassifikation der ALL wesentlichen Einfluss auf die Therapie hat (Gökbuget, Ganser et al. 2005).

1.4.3 Immunphänotypisierung

Subtyp	Inzidenz in %	Immunphänotypisierung
pro-B-ALL	11	CD10-
c-B-ALL	49	CD10+
prä-B-ALL	12	zytoplasmatisches IgM+
reife B-ALL	4	membranständiges/ zytoplasmatisches IgM+, CD10-, kappa/lambdaLeichtketten-restriktion
prä/pro T-ALL	6	CD2-, membranständig CD3-, CD1a-
thymische T-ALL	12	membranständig CD3+/-, CD1a+
reife T-ALL	6	membranständig CD3+, CD1a-

Tabelle 1: Immunologische Einteilung der ALL modifiziert nach der Einteilung der European Group for the Immunological Characterization of Akute Leukemias (EGIL)

Die Immunphänotypisierung der ALL-Blasten stellt den zentralen Baustein der Diagnosestellung dar, da hierdurch die Linienzuordnung erfolgt. Die Zellen werden mittels fluoreszenz-markierten Antikörpern angefärbt und anschließend durch das erhaltene Muster der Subtyp der Leukämie und der Differenzierungsgrad nach der Klassifikation nach der European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL) eingeteilt (Bene, Castoldi et al. 1995).

Es kann zudem eine Klassifikation der ALL nach Einteilung der World Health Organization (WHO) vorgenommen werden. Tabelle 2 zeigt diese Einteilung.

Neoplasie	Unterform
• B-Zelllinien Leukämie oder Lymphom, nicht weiter klassifiziert	
• B-Zelllinien Leukämie/Lymphom mit rekurrenter genetischer Anomalien	- Translokation t(9;22), (q34.1;q11.2), BCR-ABL1
	- t(v;11q23.3); rearrangiertes KMT2A
	- t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
	- Hyperdiploide ALL
	- Hypodiploide ALL
	- t(5;14)(q31;q32);IL3-IGH
	- t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1
	- Vorläufer B-Zelllinien Leukämie, BCR-ABL1
	- Vorläufer B-Zelllinien Leukämie, iAMP21
• T-Zelllinien Leukämie/Lymphom	
	- Vorläufer T-Zelllinien Leukämie
	- Natürliche Killerzellleukämie
• reife B-Zell Neoplasie	
	- Burkitt-Lymphom

Tabelle 2: modifiziert nach der WHO Klassifikation (Arber, Orazi et al. 2016)

1.4.4 Zytogenetik / Molekulargenetik

In der Mehrzahl der Fälle finden sich strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen, die prognostische und therapeutische Bedeutung haben und innerhalb der immunologischen Subgruppen gehäuft auftreten. Dies ist in Tabelle 3 dargestellt.

Subtyp	Inzidenz in %	Zytogenetik	
		Fusionspartner	Aberration
pro-B-ALL	11	ALL1-AF4	t(4;11)
c-B-ALL	49	BCR-ABL	t(9;22)
prä-B-ALL	12	E2A-PBX1, BCR-ABL	t(1;19), t9;22)
reife B-ALL	4	cMYC	t(8;14)

Tabelle 3: Inzidenz und Zytogenetik der häufigsten B-Zelllinien ALL Subtypen, modifiziert nach akute Leukämien Gökbuget, Ganser, Schlenk

1.5 Klinische Manifestation

Das klinische Bild der ALL zeigt häufig seit Kurzem bestehende, nicht charakteristische Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Leistungsschwäche und Skelettbeschwerden. Häufig treten zudem Fieber und Nachtschweiß auf (Herold and Mitarbeiter 2015). Die Ausbreitung der malignen lymphatischen Zellen führt zu einer zunehmenden Knochenmarksinsuffizienz. Typisch sind Anämie, Thrombozytopenie oder Granulozytopenie. Es zeigen sich je nach Organbefall spezifische Symptome. Betroffen sind zunächst vor allem lokale Lymphknoten, außerdem Milz und Leber. Im Verlauf kann es zur Verbreitung auf weitere Organsysteme, wie zum Beispiel durch einen kutanen Befall kommen. Seltener sind die Hoden betroffen. Die Meningeosis leucemica, welche eine Infiltration der entarteten Zellen in die Hirnhaut bezeichnet, stellt eine weitere schwerwiegende Komplikation dar (Gökbuget, Ganser et al. 2005).

1.6 Prognose und Risikostratifikation der akuten lymphatischen Leukämie

Im Erwachsenenalter zählt die ALL zu den selteneren Erkrankungen und ist mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 50%, mit Erleiden eines Rezidives liegt das Langzeitüberleben bei unter 10% (Marks and Rowntree 2017). Im Kindesalter ist die Prognose der ALL durch die Gabe einer intensiven Polychemotherapie die ALL mit 5-Jahres-Überlebensraten von über 80% ausgesprochen gut (Bassan and Hoelzer 2011).

Zur Prognoseabschätzung werden verschiedene Risikogruppen der akuten lymphatischen Leukämien unterschieden. In Deutschland erfolgt die Risikogruppeneinteilung und Therapie bei erwachsenen Patienten mit ALL in der Regel nach den Protokollen der Deutschen Multizentrischen ALL-Studien-Gruppe (GMALL). Entsprechend erfolgt nach Diagnosesicherung die Zuordnung zu verschiedenen Subtypen nach den Kriterien des GMALL Therapieprotokolls, wie in Abbildung 1 gezeigt.

Hier werden prätherapeutische Parameter wie die Nachweise von zytogenetischen Aberrationen (BCR-ABL), immunphänotypischen Merkmale (EGIL-Klassifikation) und Laborparametern (Zahl der Leukozyten im peripheren Blut) verwendet. Zudem ist auch

das Therapieansprechen (Ansprechen an den Tagen 26 bzw. 46) für die endgültige Risikostratifikation ausschlaggebend. Anhand dieser Informationen wird die Einteilung in Standardrisiko oder Hochrisiko vorgenommen. Ein zentrales Unterscheidungsmerkmal mit therapeutischen Konsequenzen ist insbesondere der Nachweis der Ph / BCR-ABL Aberration. Eine Übersicht über die aktuelle Risikoeinteilung ist in Abbildung 1 dargestellt.

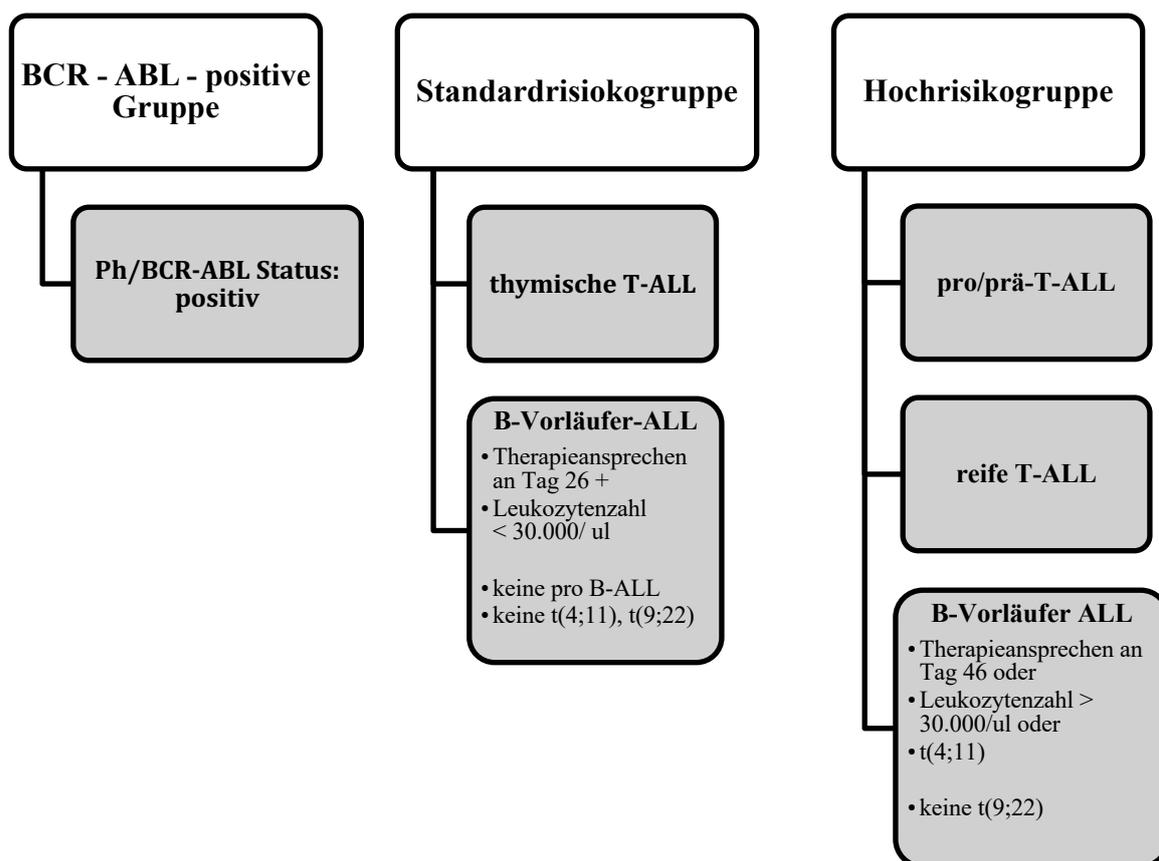


Abbildung 1: Einteilung der Risikogruppen der ALL nach GMALL modifiziert nach GMALL Therapieempfehlung für ALL bis 55 Jahre, Version 1 (2012), Seite 8

1.7 Therapie der akuten lymphatischen Leukämie

Bei pädiatrischen Patienten erfolgt die Therapie in der Regel im Rahmen multizentrischer Studien. Eine international prospektive Studie zur Optimierung der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie führt die Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) durch. In Zusammenarbeit mit Studiengruppen aus Deutschland, der Schweiz und Österreich verläuft die Studie ALL-BFM 2000 (Berlin-Frankfurt-Münster Studie), in der die Behandlung von Kindern nach einem einheitlichen Studienprotokoll durchgeführt wird (Schrappe).

Die Therapie der ALL bei Erwachsenen wird in Deutschland nach den Protokollen der GMALL durchgeführt. Dem Therapieplan einer akuten lymphatischen Leukämie liegt eine Polychemotherapie in intensivierter Form zugrunde. Die Therapie erfolgt stets anhand der Einteilung nach Risikofaktoren.

Es erfolgt zu Beginn eine Vorphase. Sie besteht aus der Gabe von ein bis zwei Chemotherapeutika über die Dauer von etwa einer Woche. Die Vorphase wird von allen Patienten mit dem Ziel der Vermeidung eines Tumorlyse-Syndroms durchlaufen (Bassan and Hoelzer 2011).

In der darauffolgenden Induktionstherapie, welche etwa fünf Wochen andauert, wird eine intensivierte Chemotherapie verabreicht. Das Ziel der Induktionstherapie ist es so früh wie möglich eine komplette Remission zu erreichen.

Ziel der gesamten Therapie ist das Erreichen einer andauernden Remission und somit einer Heilung.

Im mikroskopischen Knochenmarksausstrich werden diejenigen Zellen der Hämatopoese betrachtet, welche als unreif und maligne entartet klassifiziert werden können. Sobald weniger als fünf Prozent Blasten nachweisbar sind, spricht man von einer kompletten Remission. Weitere Parameter sind ein Fehlen von Blasten im peripheren Blut, eine Thrombozytenzahl im Bereich von 80.000 bis 100.000 pro Mikroliter, eine Granulozytenzahl von über 1000 pro Mikroliter und keine Notwendigkeit zur Erythrozytentransfusion. 80-85% der Patienten erreichen im Verlauf eine komplette Remission ihrer Erkrankung.

Darauffolgend wird die Konsolidierungsphase durchlaufen. Reinduktionen oder Intensivierungen können ergänzt werden. Angeschlossen ist eine Erhaltungsphase. Das Ziel ist stets die Erhaltung der Remission. Mit Durchlaufen der heute möglichen komplexen Therapieschemata kann 30-40% der Patienten ein leukämiefreies Überleben ermöglicht werden (Hoelzer, Gökbuget et al. 2002).

Eine wichtige therapeutische Möglichkeit in der Behandlung stellt die Stammzelltransplantation dar. Diese kann bei Patienten mit sehr schlechten prognostischen Faktoren und hoher Rezidivwahrscheinlichkeit durchgeführt werden. Im Rahmen des GMALL-Therapieprotokolls wird nach der Konsolidation I bei Patienten aus der Hochrisikogruppe eine Stammzelltransplantation angestrebt (Gökbuget and Hoelzer 2012).

Bei Patienten aus der Standardrisikogruppe wird die Entscheidung, ob eine Transplantation im Therapieverlauf angebracht ist, anhand der minimalen Resterkrankung getroffen (Gökbuget, Ganser et al. 2005).

Zudem kann bei Patienten, die nicht auf die bereits angewendeten Therapiemöglichkeiten ansprechen (sogenannte Non-Responder), oder bei Rezidiv der Erkrankung eine Stammzelltransplantation angestrebt werden.

1.8 Minimale Resterkrankung

Die minimale Resterkrankung (minimal residual disease = MRD) ist definiert als die Zahl der nachweisbaren Leukämiezellen unterhalb der Nachweisgrenze von fünf Prozent im Knochenmark des Patienten. Basierend auf diesem Grenzwert können bei Patienten in zytomorphologischer Remission bis zu 10^{10} Blasten undetektiert persistieren (Campana and Pui 1995). Die Quantifizierung der verbliebenen Leukämiezellen unterhalb der Sensitivitätsgrenze der Zytomorphologie hat daher das Ziel, den Erkrankungsstatus besser abzubilden. In mehreren Studien konnte mittels dieser Strategie nachgewiesen werden, dass der Nachweis von MRD bei Patienten mit ALL nach Therapie mit der Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs der Erkrankung und mit dem Gesamtüberleben korreliert. Verglichen mit prätherapeutischen Risikofaktoren gilt die Bestimmung der MRD als stärkerer prognostischer Faktor nach der Durchführung einer Chemotherapie (Short and Jabbour 2017) und erlaubt zudem ein Rezidiv der Erkrankung frühzeitig zu erkennen sowie eine individualisierte Therapie einzuleiten (Cavé, van der Werff ten Bosch et al. 1998), (Brüggemann, Raff et al. 2006).

Die Bestimmung der MRD wird mit Hilfe verschiedener Verfahren durchgeführt. Die gebräuchlichsten Methoden zur MRD Bestimmung sind die Durchflusszytometrie (flow MRD) und die quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) (Short and Jabbour 2017). Beide Methoden weisen eine höhere Sensitivität als die Zytomorphologie auf (Schrappe 2012).

1.8.1 Molekulargenetische MRD-Bestimmung

Die molekulargenetische Methode der quantitativen real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wird zur Detektion und Analyse residueller Zellen verwendet. Mit Hilfe der qRT-PCR werden bestimmte Fragmente der DNA exponentiell amplifiziert. Während der Amplifikation des Genproduktes entsteht ein proportionales fluoreszierendes Signal, welches detektiert wird. Bei dieser Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird die Messung der entstehenden Fluoreszenzsignale in Echtzeit durchgeführt. Unter der Annahme, dass es in jedem Zyklus der PCR zu einer Verdopplung der Kopien eines

Abschnittes kommt, kann die ursprüngliche Anzahl der Kopien ermittelt werden. Die qRT-PCR wird zur molekularen Klassifikation der ALL zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und im Verlauf zur MRD Detektion eingesetzt (van Dongen, Macintyre et al. 1999).

Für die Verwendung der qRT-PCR zur Detektion der MRD werden patientenspezifisches klonales Immunglobulin und T-Zell-Rezeptor Genveränderungen (Pongers-Willemsse, Verhagen et al. 1998), sowie BCR/ABL-Fusionstranskripte als Ansatzpunkt der PCR verwendet. Man geht davon aus, dass die Analyse des patientenspezifischen Immunglobulins und der T-Zell-Rezeptor Genveränderungen einen für den Patienten spezifischen Marker der leukämischen Zellen darstellen. Hier gilt unter anderem das T-Zell-Rezeptorgen delta als Ansatzpunkt (Hansen-Hagge, Yokota et al. 1989). In einer Studie der ALL bei Kindern konnte gezeigt werden, dass mutierte Anteile des T-Zell-Rezeptors, wie das T-Zell-Rezeptorgen beta ebenfalls zur Bestimmung der MRD genutzt werden können (Bruggemann, van der Velden et al. 2004).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es weitere Ansatzpunkte, wie zum Beispiel IGH (immunglobuline heavy chain) Mutationen zu einer genauen und sensitiven MRD Diagnostik führen (Verhagen, Willemsse et al. 2000).

Zusammengefasst kann mittels qRT-PCR eine Sensitivität von 1:100.000 erreicht werden. Hiermit ist es möglich für die ALL spezifische Mutationen von Genen zu detektieren (Šálek, F. et al. 2016). Die qRT-PCR basierte MRD-Diagnostik erfolgt im Rahmen der GMALL Therapieprotokolle zentralisiert in entsprechend spezialisierten Laboren in Kiel (BCR/ABL-negative ALL) bzw. Frankfurt (BCR/ABL-positive ALL).

1.8.2 Durchflusszytometrische MRD-Bestimmung

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse ist eine genaue Analyse von Antigenen auf der Zelloberfläche auf Einzelzellebene möglich. Es ist eine Verwendung vielfacher Markerkombinationen möglich. In den meisten Fällen werden Fluoresceinisothiodyanat (FITC), Phycoerythrin-CY5 (PC5), „energy-coupled dye“ (ECD), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Pacific Blue (PacBlue) und Krome Orange (KrOrange) als Fluoreszenzfarbstoffe benutzt.

Die im Knochenmark proliferierenden malignen ALL-Blasten sind genetisch identisch und verfügen in der Regel über ein spezifisches Antigenexpressionsprofil, welches sich von physiologischen Vorläuferzellen der B- und T-Zell-Reihe unterscheidet (Campana and Coustan-Smith 1999). Diese Eigenschaft der Leukämiezellen kann nicht nur zur

Diagnosestellung genutzt werden, sondern dient auch als Grundlage der durchflusszytometrischen MRD-Bestimmung. Hierdurch ist mit einer Sensitivität von $\geq 1:10.000$ die durchflusszytometrische Bestimmung der MRD möglich. Es konnte gezeigt werden, dass die MRD Bestimmung mittels Durchflusszytometrie einen signifikanten Vorhersagewert auf den Verlauf der ALL bieten kann (Garcia Vela, Monteserin et al. 2000).

Die durchflusszytometrische MRD Diagnostik für die Patienten im Rahmen dieser Untersuchung erfolgte im Leukämielabor der Universität München. Verwendet wurde eine standardisierte 8-Farben Durchflusszytometrie (siehe 3.2.2. Durchflusszytometrie).

1.8.2.1 Aberrantes Antigenprofil und „different from normal - Strategie“ zur MRD-Bestimmung

Durch die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Kenntnisse über immunphänotypische Aberrationen wird eine Unterscheidung zwischen physiologischen und pathologischen zellulären Strukturen ermöglicht (Ciudad, San Miguel et al. 1998). Hierzu konnten Weir, Cowan et al in 1999 darstellen, dass die physiologische Antigenexpression eine deutliche Reproduzierbarkeit aufweist und es deshalb möglich ist anhand der Oberflächenexpression von Antigenen abnorme Populationen frühzeitig zu erkennen (Weir, Cowan et al. 1999).

Eine potentielle Hürde in der durchflusszytometrischen MRD-Bestimmung ist die Notwendigkeit eines erfahrenen Befunders zur Beurteilung des Antigenprofils und insbesondere zur Abgrenzung einer potentiellen residuellen Leukämiepopulation gegenüber physiologischen hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Im Rahmen dieser Arbeit wird diese Strategie bei Erkennung möglicher residueller Leukämiepopulationen als „different from normal - Strategie“ bezeichnet. Als Grundlage gilt die Kenntnis über die Antigenexpression während der lymphatischen Ausreifung (Abbildung 2). Im Rahmen der MRD Diagnostik der B-ALL kommt zudem insbesondere die aberrante Überexpression der Oberflächenantigene CD58 und CD9 eine Bedeutung zu. Hier konnte bereits Lee et al. zeigen, dass CD58 häufig auf leukämischen Zellen der B-Zellreihe höher exprimiert wird (Veltroni, De Zen et al. 2003). In ähnlicher Weise konnte eine Überexpression von CD9 in B-ALL nachgewiesen werden (Weir, Cowan et al. 1999). Grundsätzlich ist jedoch zu beachten, dass beide Antigene auch auf physiologischen B-Vorläuferzellen nachzuweisen sind. Die Unterscheidung zwischen physiologischen und malignen Zellen erfolgt daher immer in der Kombination der

Antigenexpressionsprofile, sodass letztlich kein einzelnes Antigen ausreichend ist, um eine Unterscheidung zwischen benignen und malignen B-Zellen zu ermöglichen. In Abbildung 2 ist die jeweilige Ausprägung der Oberflächenexpression von Antigenen während der lymphatischen Zellreifung abgebildet.

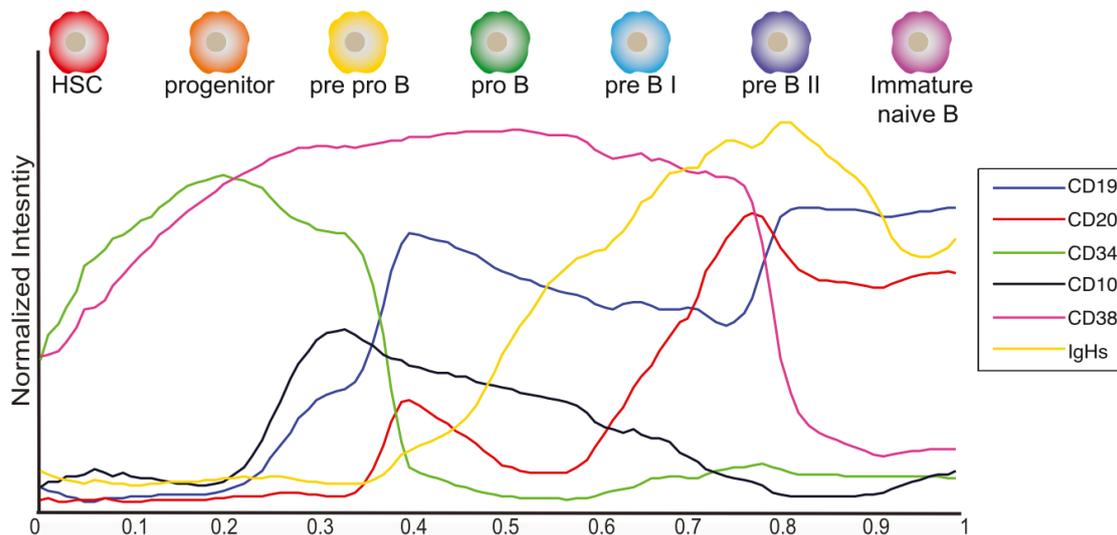


Abbildung 2: Physiologisches Antigenexpressionsprofil im Rahmen der B-Zell-Ausreifung (Bendall SC, et al. Cell 2014)

1.8.2.2 Gating mittels Leukämie-assoziiertem Immunphänotyp

Im Rahmen dieser Arbeit soll bestimmt werden, ob eine alternative Gatingstrategie die Notwendigkeit eines erfahrenen Befunders zur MRD-Diagnostik bei erwachsenen Patienten mit ALL ersetzen kann. Das Prinzip dieser Strategie basiert auf der Tatsache, dass sich die Antigenexpression von physiologischen Vorläuferzellen und leukämischen Zellen unterscheidet. Im Gegensatz zur Strategie mit Erkennung möglicher residueller Leukämiepopulationen, welche als „different from normal - Strategie“ bezeichnet wird, soll die MRD Bestimmung jedoch nicht durch die erfahrungsbasierte Identifikation aberranter Zellpopulationen erfolgen, sondern mittels „LAIP - Strategie“ (Leukämie-assoziiertes Immunphänotyp) des bei Erstdiagnose nachweisbaren Immunphänotyps. Bereits in einer im Jahr 1999 publizierten Studie konnte gezeigt werden, dass in 90% der Fälle dieser Leukämie-assoziierte Immunphänotyp (LAIP) nachgewiesen werden konnte (Griesinger, Pirò-Noack et al. 1999). Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von >1% LAIP positiven Zellen und dem Auftreten eines Rezidivs aufgezeigt werden (Griesinger, Pirò-Noack et al. 1999). Im Rahmen dieser Arbeit möchten wir überprüfen, ob mit Hilfe einer spezifischen „LAIP - Strategie“,

welche bei Erstdiagnose erstellt und auf die Verlaufsuntersuchungen übertragen wird, residuelle Leukämiepopulationen auch ohne die primäre Beurteilung durch einen geschulten Befunder effizient identifiziert werden können und ob dies im Vergleich zur „different from normal - Strategie“ nicht unterlegen ist.

Im Vergleich zur „different from normal – Identifikation“ kann die „LAIP - Strategie“ von einer Person vorgenommen werden, welche weniger Erfahrung bezüglich des immunphänotypischen Musters der B- und T-Zell-Reifung besitzt. Es wird bei der „LAIP - Strategie“ der jeweilige Phänotyp bei Erstdiagnose für alle phänotypischen Merkmale festgehalten. Die festgelegten Gates werden gespeichert und später auf die bei den Verlaufsmessungen erhaltenen Proben übertragen (siehe Kapitel 3.2.3.1). Ein potentieller Nachteil dieser Strategie stellt jedoch dar, dass durch die Interpretation durch einen erfahrenen Befunder technische Artefakte und benigne Vorläuferzellen gegebenenfalls besser erkannt werden können, welche durch die „LAIP – Strategie“ eine Fehlinterpretation hervorrufen können.

2 Zielsetzung

Von der Minimalen Resterkrankung (minimal residual disease = MRD) bei akuter lymphatischer Leukämie geht eine große prognostische Relevanz hinsichtlich der Persistenz und Prognose der Erkrankung aus (van Dongen, Breit et al. 1992); (Brüggemann, Raff et al. 2012).

Ziel dieser Arbeit ist die Validierung der durchflusszytometrischen MRD-Bestimmung bei erwachsenen Patienten mit ALL. Es soll eine Korrelation zwischen dem durchflusszytometrischen und dem zytomorphologischen Erkrankungsstatus erstellt werden, um festzustellen, ob die submikroskopische MRD-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie der morphologischen Diagnostik überlegen ist. Zweitens soll ermittelt werden, ob die durchflusszytometrische MRD Messung mit der molekularen qRT-PCR MRD Messung korreliert.

Schließlich soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob mit Hilfe des leukämie-assoziierten Immunphänotyps (LAIP) die Interpretation der durchflusszytometrischen Befunde durch die „different from normal - Strategie“ mittels eines erfahrenen Befunders ersetzt werden kann.

3 Methodik

3.1 Einschlusskriterien der Patienten

Eingeschlossen wurden ALL-Patienten, für die im Zeitraum von März 2012 bis Oktober 2016 Knochenmarksblutproben von mindestens zwei Zeitpunkten (Erstdiagnose und im Therapieverlauf) im Labor für Leukämiediagnostik der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Klinikums der Universität München in Großhadern für eine durchflusszytometrische Analyse zu Verfügung standen. Es wurden nur Patienten eingeschlossen, die nach dem GMALL Therapieprotokoll oder analog dazu behandelt wurden.

3.2 Untersuchungstechniken

Bei Erstdiagnose wurden Knochenmarksblutproben mittels Morphologie und Zytochemie, Immunphänotypisierung, Zytogenetik, sowie molekularbiologischer Diagnostik untersucht (Hoelzer, Bassan et al. 2016).

Die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Ergebnisse der Immunphänotypisierung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie im Therapieverlauf wurden von erfahrenen Befundern innerhalb gesichtet und ausgewertet.

Die gleichen Messdaten wurden im Rahmen dieser Arbeit erneut nach dem Konzept der „LAIP - Strategie“ ausgewertet. Diese Strategie wurde nach einer Instruktionsphase selbstständig durchgeführt. Es waren keine Vorkenntnisse vorhanden. Es wurde zum Ziel gesetzt, jeweils den leukämie-assoziierten Immunphänotyp (LAIP) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zu bestimmen. Dazu wurde die Methodik der „LAIP – Strategie“ angewendet. Dies wurde jeweils auf die folgenden Verlaufsuntersuchungen übertragen.

3.2.1 Zytomorphologische Diagnostik

Es erfolgt bei der Diagnosestellung einer akuten lymphatischen Leukämie als hämatologische Erkrankung die Basisdiagnostik im Rahmen der Zytomorphologie. Als Untersuchungsmaterial werden peripheres Blut und Knochenmark verwendet. Es gilt jeweils den Zellgehalt und die Zellmorphologie zu bestimmen.

3.2.2 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

Die molekulargenetischen Untersuchungen wurden für BCR-ABL negative Proben in Kiel und für BCR-ABL positive Proben in Frankfurt durchgeführt.

3.2.2.1 Theoretische Grundlagen

Die molekulargenetische Methode der quantitativen real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wird zur Detektion und Analyse residueller Zellen verwendet. Mit Hilfe der qRT-PCR werden bestimmte Fragmente der DNA exponentiell amplifiziert. Während der Amplifikation des Genprodukts entsteht ein proportionales fluoreszierendes Signal, welches detektiert wird. Bei dieser Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird die Messung der entstehenden Fluoreszenzsignale in Echtzeit durchgeführt. Unter der Annahme, dass es in jedem Zyklus der PCR zu einer Verdopplung der Kopien eines Abschnittes kommt, kann die ursprüngliche Anzahl der Kopien ermittelt werden.

Die qRT-PCR wird zur molekularen Klassifikation der ALL zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und im Verlauf zur MRD Detektion eingesetzt (van Dongen, Macintyre et al. 1999).

Für die Verwendung der qRT-PCR zur Detektion der MRD werden patientenspezifisches klonales Immunglobulin und T-Zell-Rezeptor Genveränderungen als Ansatzpunkt der PCR verwendet (Pongers-Willemsse, Verhagen et al. 1998), ebenso wie BCR/ABL-Fusionstranskripte.

Man geht davon aus, dass die Analyse des patientenspezifischen Immunglobulins und der T-Zell-Rezeptor Genveränderungen einen für den Patienten spezifischen Marker der leukämischen Zellen darstellen. Hier gilt unter anderem das T-Zell-Rezeptorgen delta als Ansatzpunkt (Hansen-Hagge, Yokota et al. 1989). In einer Studie der ALL bei Kindern konnte gezeigt werden, dass mutierte Anteile des T-Zell-Rezeptors, wie das T-Zell-Rezeptorgen beta ebenfalls als Ansatzpunkte der MRD Diagnostik genutzt werden können (Bruggemann, van der Velden et al. 2004).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es weitere Ansatzpunkte, wie zum Beispiel IGH (immunglobuline heavy chain) Mutationen zu einer genauen und sensitiven MRD Diagnostik führen (Verhagen, Willemsse et al. 2000).

3.2.2.2 Auswertung

Die Bewertung der molekularen MRD war für 318 Proben möglich. Davon wurden 51 als BCR/ABL positiv getestet und in 267 Proben konnte eine klonale IG/TR Genumlagerung nachgewiesen werden. In Deutschland basieren klinische Entscheidungen in der Diagnostik der akuten lymphatischen Leukämie auf der Methode der PCR (van der Velden, Cazzaniga et al. 2007), (Garand, Beldjord et al. 2012). Deshalb wird diese Methode als Referenzdiagnostik verwendet.

3.2.3 Durchflusszytometrie

Die Messungen mittels Durchflusszytometer, auch FACS (fluorescence-activated cell sorting) genannt, wurden im Leukämielabor des Klinikums der Universität München in Großhadern durchgeführt. Im Rahmen der Präanalytik erfolgte mittels Ficoll und Lyse der Erythrozyten eine Isolation der mononukleären Zellen.

Anschließend wurden die Proben mit entsprechenden Antikörper-Kombinationen angefärbt. Die nachfolgende Tabelle 4 bildet zunächst das bis Juni 2015 verwendete Antigenpanel ab.

Fluorochrom	Antigen	
	B-ALL	T-ALL
FITC	CD34	CD8
PE	CD58	CD4
ECD	CD38	CD3
PC7		CD13/33
APC	CD10	CD7
APCA750	CD19	CD5
PacBlue	CD20	
KrOrange	CD45	CD45

Tabelle 4: Antigenpanel, in Verwendung bis Juni 2015

Nach Juni 2015 wurden geringfügige Veränderungen durchgeführt. Die folgende Tabelle 5 stellt das aktuell verwendete Antigenpanel dar.

Fluorochrom	Antigen	
	B-ALL	T-ALL
FITC	CD34	CD8
PE	CD58	CD4
ECD	CD38	CD3
PC7	CD20	CD13/33
APC	CD10	CD7
APCA750	CD19	CD5
PacBlue	CD9	
KrOrange	CD45	CD45

Tabelle 5: Antigenpanel, in Verwendung ab Juni 2015

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein Beckman Coulter Navios Durchflusszytometer genutzt. Bei Erstdiagnose wurden ≥ 20.000 Ereignisse gemessen, in den Verlaufsmessungen ≥ 100.000 . Hierdurch wird eine Sensitivität von einer Zielzelle in 10^4 bis 10^5 Zellen erreicht (Campana and Coustan-Smith 1999). Dies entspricht der Detektion von einer leukämischen Zelle in 10.000 bis 100.000 physiologischen Zellen.

3.2.3.1 Auswertung

Im Rahmen der „different from normal - Strategie“ galt es die Antigenexpression während der lymphatischen Ausreifung (Abbildung 3) genau zu betrachten. Mithilfe der vermehrten Expression der Oberflächenantigene CD9 und CD58 konnten maligne Zellen identifiziert werden. Da diese Oberflächenantigene auch auf physiologischen Vorläuferzellen nachweisbar sind, wurde ein besonderes Augenmerk auf die Kombinationen der Antigenexpressionen und der somit entstehenden Profile gelegt.

Im Rahmen der „LAIP-Strategie“ erfolgte ein immunologisches Gating um die Zielpopulation abzugrenzen. Somit konnte ein leukämieassoziiertes Phänotyp (LAIP) erstellt werden. Dieser wurde auf die jeweiligen Verlaufsmessungen übertragen, mit dem Ziel ein Rezidiv der verdächtigen Population so früh wie möglich zu detektieren.

In Abbildung 3 ist die „LAIP-Strategie“ einer B-Zelllinien-ALL zum Zeitpunkt der Erstdiagnose dargestellt. Der LAIP ist hier beispielhaft zusammengesetzt aus den mit K, P, L, N und O benannten Markierungen. Diese umfassen eine Oberflächensatzung aus CD10, CD20, CD34, CD58 und CD38.

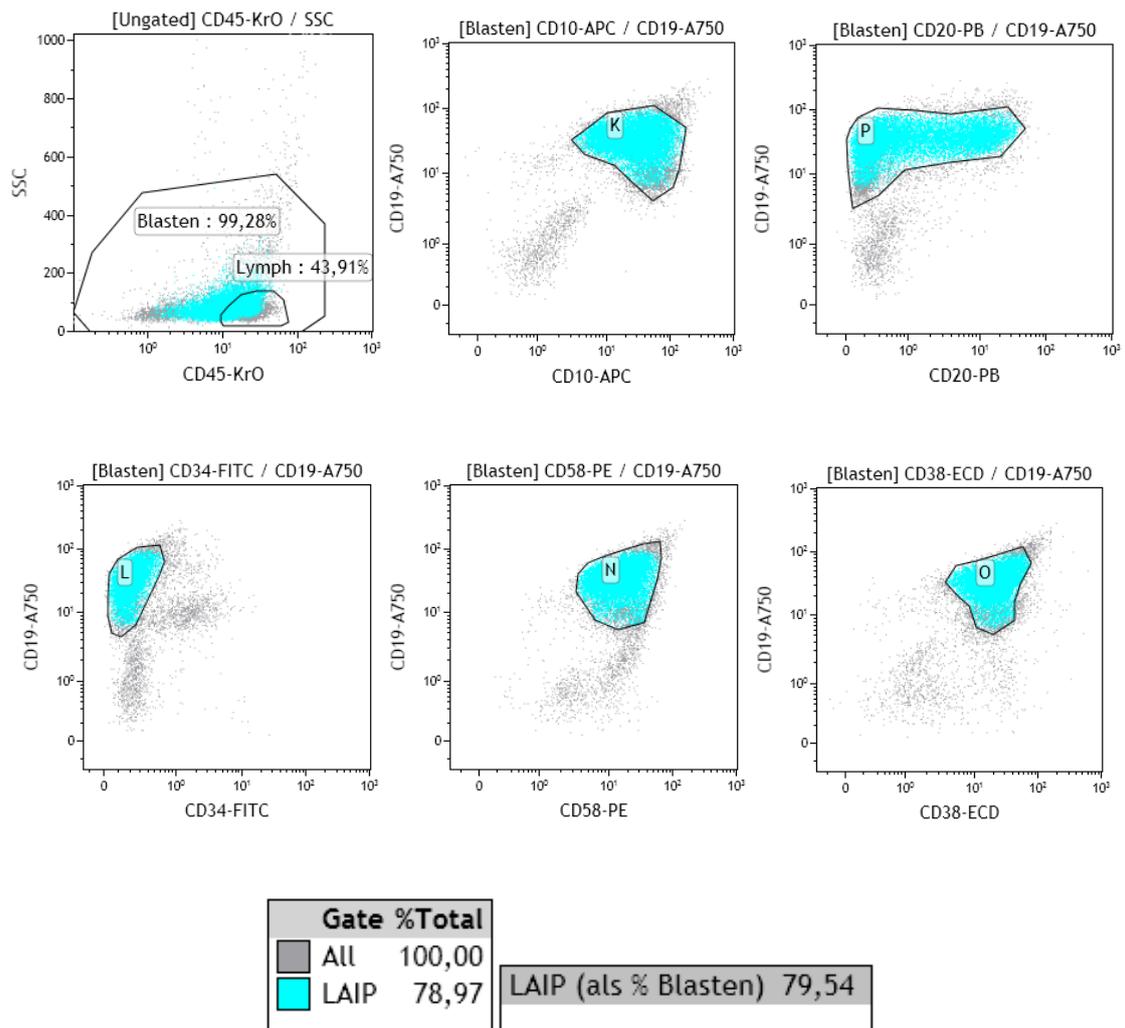
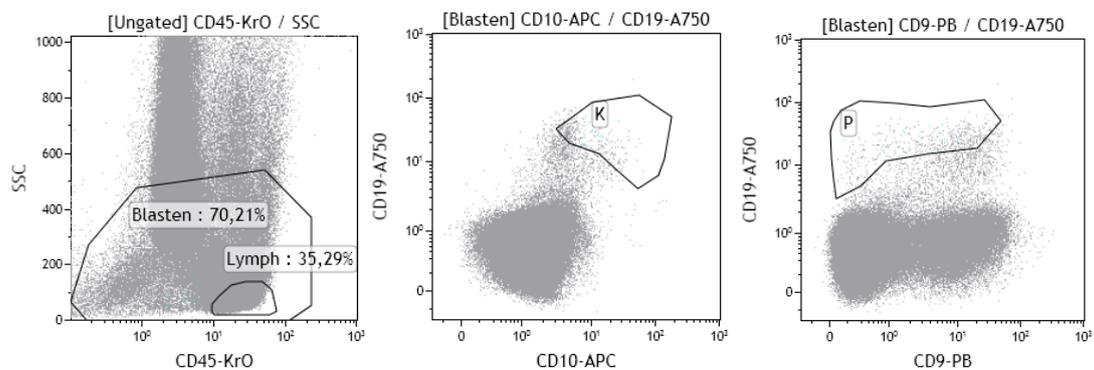
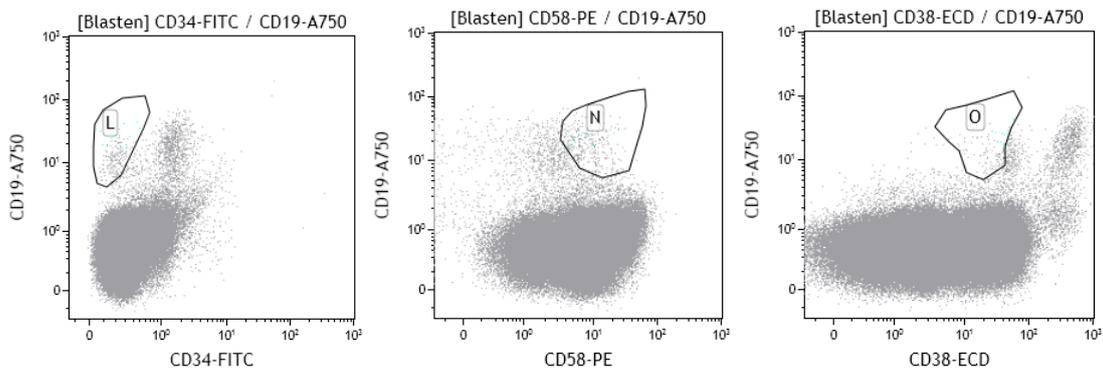


Abbildung 3: MRD flow bei Erstdiagnose, Detektion des LAIP

Es folgt Abbildung 4. Diese zeigt den vorher erstellten LAIP in Projektion auf eine später durchgeführte Verlaufsuntersuchung. Hier ist zu sehen, dass zum durchgeführten Zeitpunkt keine leukämischen Zellen nachweisbar sind.



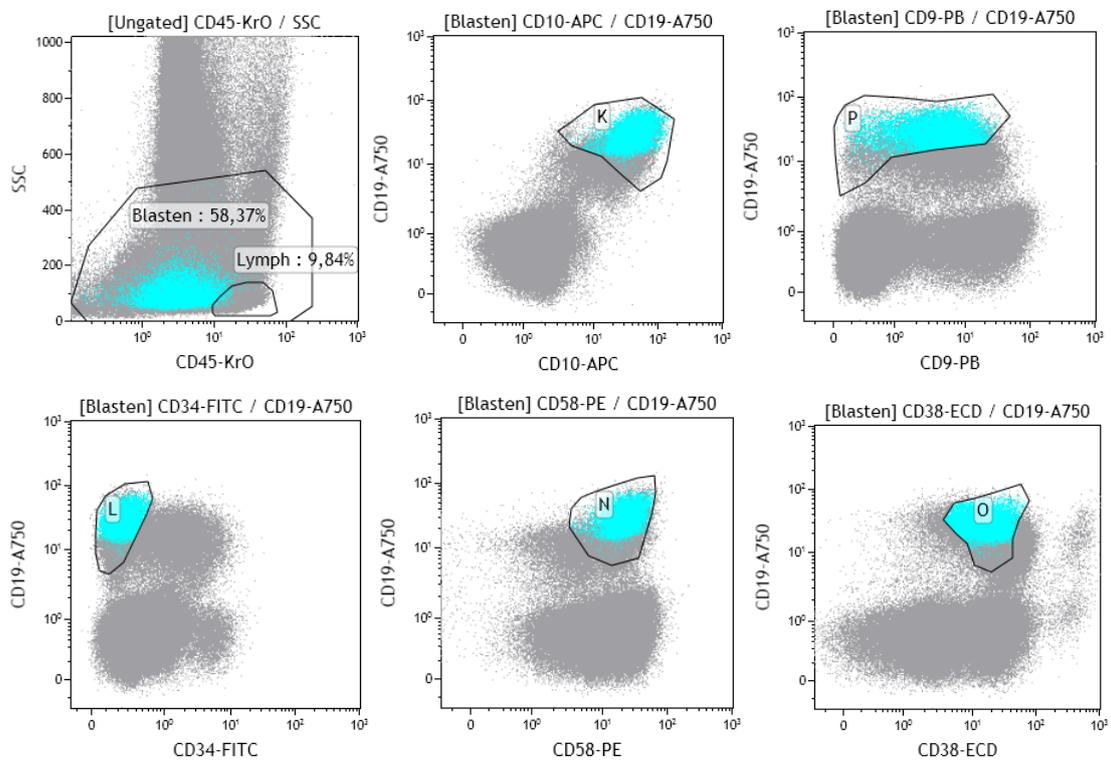


Gate %Total	
All	100,00
LAIP	0,00

LAIP (als % Blasten)	0,00
----------------------	------

Abbildung 4: MRD flow, Verlaufsuntersuchung 4

Anschließend zeigt Abbildung 5 eine weitere Verlaufsuntersuchung, auf die der vorher erstellt LAIP projiziert wurde. Es erfolgt ein Nachweis von leukämischen Zellen. Der Patient erlitt ein Rezidiv.



Gate %Total	
All	100,00
LAIP	3,00

LAIP (als % Blasten)	5,14
----------------------	------

Abbildung 5: MRD flow, Verlaufsuntersuchung 6, Rezidiv

3.3 Statistik

Hauptinteresse der Studie war der Vergleich drei verschiedener Methoden der Verlaufsuntersuchungen der MRD Diagnostik der ALL (morphologisch, flow MRD mittels „different from normal - Strategie“ und „LAIP – Strategie“) für alle vorhandenen Proben (n = 287). Diese wurden separat für die Gruppen BCR-ABL positiv und negativ jeweils im Bezug zur Referenzdiagnostik mittels PCR analysiert.

Berechnet wurde daher für jede Methode separat die Prävalenz (Prävalenz der MRD positiven Proben), Spezifität, Sensitivität der Methoden, der positive und negative Likelihoodquotient sowie der positive und negative prädiktive Wert. Außerdem wurde die Übereinstimmung der diagnostischen Methoden (Anzahl der mit Hilfe der Diagnoseverfahren als falsch positiv oder falsch negativ erkannten Proben) bestimmt. Diese Analysen wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS erhoben. Tabelle 7 stellt die zu Grunde liegenden Patientencharakteristika dar. Angegeben werden jeweils die Anzahl, der Prozentanteil und das Konfidenzintervall (CI). Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Abbildungen und Korrelationen der Vergleiche (Anzahl MRD positiver und negativer Proben) der Diagnosemethoden jeweils im Vergleich zur Referenzdiagnostik mit Hilfe von SPSS erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

83 Patienten und Patientinnen erfüllten die Einschlusskriterien und konnten in diese Arbeit eingeschlossen werden. Es waren 33 weibliche Patientinnen (40%) und 50 männliche Patienten (60%). Das mediane Alter lag bei 50 Jahren. Bei Diagnosestellung lag die Leukozytenzahl im Median bei 8.950/ μ l (800/ μ l - 616.000/ μ l). Immunphänotypisch zeigte sich bei 66 Patienten eine B-Zelllinien-ALL und bei 14 Patienten eine T-Zelllinien-ALL. In 3 Fällen zeigte sich eine Mixed-phenotype acute leukemia (MPAL). 28 Patienten (34,6%) wurden der Standardrisikogruppe und 23 (28,4%) der Hochrisikogruppe zugeordnet. 30 (36,1%) Patienten waren BCR-ABL positiv. Bei 6 Patienten konnte zudem eine MLL-AF4 (7,2%) Fusionsprotein mit der Translokation t(4;11) nachgewiesen werden. Die folgende Tabelle 6 bildet die verfügbaren Proben numerisch ab. Es erfolgt eine Unterscheidung der molekulargenetischen Untersuchungen für BCR-ABL negative Proben (TCR/Ig-PCR) und für BCR-ABL positive Proben (BCR/ABL-PCR).

	Anzahl der Proben
Zytomorphologische Diagnostik	311
TCR/Ig - PCR	267
BCR/ABL-PCR	51
„Different from normal – Identifikation“	311
„LAIP – Identifikation“	318
Total	318

Tabelle 6: Anzahl der Proben

Die folgende Tabelle 7 zeigt eine Übersicht der Patientencharakteristika.

ANZAHL DER PATIENTEN		83	
ALTER (IN JAHREN)			
	median	50	
	Min	15	
	Max	80	
GESCHLECHT			
	weiblich	33	40%
	männlich	50	60%
WBC (/μL)			
	median	8,95	
	Min	0,8	
	Max	616	
	keine Daten	5	
IMMUNPHÄNOTYP			
	pro-B-ALL	8	9,6%
	prä-B-ALL	4	4,8%
	common-ALL	50	60,2%
	reife B-ALL	3	3,6%
	pro-/prä- T-ALL	9	10,8%
	kortikale/thymische T-ALL	4	4,8%
	reife T-ALL	1	1,2%
	MPAL – my/b	3	3,6%
	B-Vorläufer-ALL NOS	1	1,2%
RISIKOGRUPPE			
	Standardrisiko	28	34,6%
	Hochrisiko	23	28,4%
	BCR-ABL positiv	30	37,0%
	keine Daten	2	
GENETIK			
	BCR-ABL	30	36,1%
	MLL-AF4	6	7,2%

Tabelle 7: Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv wird im Folgenden in eine BCR-ABL negative und eine BCR-ABL positive Gruppe eingeteilt. Hier erfolgte zunächst ein Vergleich zwischen der morphologisch feststellbaren Blastenzahl und der mittels Durchflusszytometrie gemessenen MRD.

Es schließt sich ein Vergleich zwischen der Diagnostik mittels Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie und der molekulargenetischen PCR Diagnostik an.

Des Weiteren erfolgte eine Gegenüberstellung zwischen der molekulargenetisch durchgeführten MRD Diagnostik und der „LAIP – Gating Strategie“. Analog dazu wurde mit der BCR-ABL positiven Gruppe verfahren.

4.2 Morphologische Diagnostik im Vergleich zur MRD Diagnostik mittels Durchflusszytometrie und PCR bei BCR-ABL negativer ALL

Zu Beginn stellten wir die morphologische Diagnostik der Diagnostik der MRD (PCR) sowie der Durchflusszytometrie durch den Experten bei BCR-ABL negativer ALL gegenüber.

Bei 21,3% der Proben war trotz fehlenden Nachweises einer Erkrankungsaktivität mittels Zytomorphologie die erkrankungsspezifische PCR Diagnostik positiv.

In 10,9% der Proben ergab sich eine positive Erkrankungsaktivität mittels Zytomorphologie bei negativer erkrankungsspezifischer PCR Diagnostik.

Im Detail wurde die morphologische Diagnostik bei 174 Proben mit der Referenzdiagnostik (PCR) verglichen. Davon waren in 147 Proben weniger als 5% Blasten nachweisbar. In 52 Proben waren größer gleich 5% Blasten nachweisbar (siehe Abbildung 5). Innerhalb der Proben mit weniger als 5% Blasten wurden durch die Referenzdiagnostik 37 Proben als MRD positiv identifiziert. Hingegen wurden diese Proben nicht durch die morphologische Untersuchung erkannt (37 von 174 falsch negativ). Innerhalb der Proben mit mehr als 5% Blasten wurden 19 durch die Referenzdiagnostik als negativ identifiziert. Hingegen zeigten diese Proben mittels Zytomorphologie eine positive Krankheitsaktivität. (19 von 174 falsch positiv durch die morphologische Untersuchung), (siehe Abbildung 6).

Außerdem konnten im Vergleich zur Durchflusszytometrie durch die „different from normal - Strategie“ 16,7% der Proben nicht mit positiver Krankheitsaktivität erkannt werden und 11,3% wurden fälschlicherweise als mit fehlender Krankheitsaktivität

identifiziert, was durch die „different from normal - Strategie“ mittels Durchflusszytometrie bestätigt wurde. Im Detail wurde die morphologische Diagnostik insgesamt bei 239 Proben mit der Durchflusszytometrie durch den Experten verglichen. Innerhalb der Proben mit weniger als 5% Blasten wurden durch die „different from normal - Strategie“ 40 Proben als MRD positiv identifiziert. Hingegen wurden diese Proben nicht durch die morphologische Untersuchung im Vergleich zur „different from normal - Strategie“ erkannt (40 von 239 falsch negativ). Innerhalb der Proben mit größer gleich 5% Blasten wurden 27 durch die „different from normal - Strategie“ als MRD negativ identifiziert. Hingegen wurden diese Proben morphologisch im Vergleich zur „different from normal - Strategie“ als fälschlicherweise ohne Krankheitsaktivität ($\geq 5\%$) klassifiziert (27 von 239 falsch positiv durch die morphologische Untersuchung).

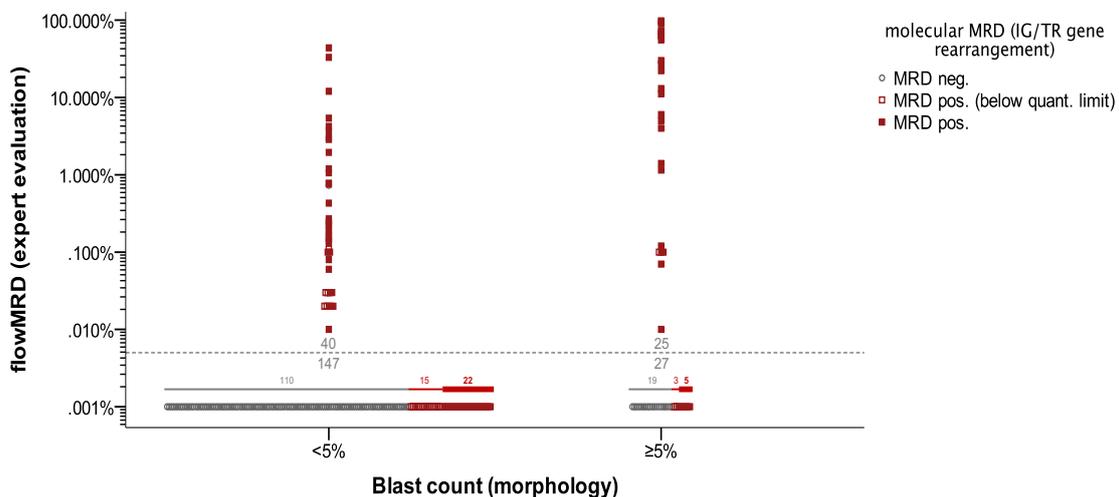


Abbildung 6: Morphologie im Vergleich zur flow MRD Evaluation durch „different from normal - Strategie“ bei BCR-ABL negativen Proben

Die morphologische Erhebung der Blastenzahl diskriminiert den Krankheitsfortschritt nur unzureichend. Insgesamt wurden 52 Proben mit $\geq 5\%$ Blasten klassifiziert. Mit Hilfe beider Verfahren (der morphologischen und flow MRD Evaluation mittels „different from normal -Strategie“) wurden morphologisch 27 Proben als mit $\geq 5\%$ Blasten klassifiziert. Mittels flow MRD Evaluation wurde bei 25 Proben ein positive Erkrankungsaktivität festgelegt. 19 Proben wurden mittels Referenzdiagnostik als negativ klassifiziert, 27 Proben wurden mittels „different from normal - Strategie“ als negativ klassifiziert. Es wurde also fälschlicherweise bei 19 von 52 mittels PCR (36,5%) und bei 27 von 52 mittels „different from normal - Strategie“ (51,9%) keine Krankheitsaktivität nachgewiesen. Diese stellen jeweils den Anteil der falsch positiven Proben dar.

4.3 MRD Diagnostik mittels Durchflusszytometrie im Vergleich zu molekulargenetischer PCR Diagnostik bei BCR-ABL negativen Proben

Als nächstes setzten wir die durchflusszytometrische MRD Diagnostik mit der molekulargenetischen PCR Diagnostik (als Referenzdiagnostik angenommen) in einen Vergleich. In der BCR-ABL negativen Kohorte konnte molekulargenetisch in 45,7 % der Fälle eine positive MRD nachgewiesen werden. Abbildung 7 zeigt die molekulargenetische Diagnostik aufgetragen im Vergleich zur MRD Diagnostik durch PCR. Wie in Tabelle 8 dargestellt, zeigt sich für die Korrelation „different from normal - Strategie“ im Vergleich zur TCR/Ig-PCR Diagnostik mit Probenzahl von 264 ein r^2 von 0,816. Es ist somit von einem hoch signifikanten Zusammenhang auszugehen.

Für die Korrelation „different from normal - Strategie“ vs. BCR/ABL-PCR mit kleinerer Probenzahl von 51 zeigt sich ein r^2 von 0,665. Dies bedeutet, dass 66,5% mittels „different from normal - Strategie“ im Vergleich zur BCR/ABL-PCR Diagnostik übereinstimmend klassifiziert wurden. Es zeigt sich dabei ebenfalls ein positives Signifikanzniveau.

Korrelationen	n	r^2	p	Methode
„different from normal - Strategie“ vs. TCR/Ig-PCR	264	0,816	<0,001	pearson
„different from normal - Strategie“ vs. BCR/ABL-PCR	51	0,665	<0,001	pearson

Tabelle 8: Korrelationskoeffizienten

Wie in Tabelle 9 dargestellt, ergab sich mit 99,2 % eine hohe Spezifität und mit 98,5% ein hoher positiv prädiktiver Wert für die „different from normal - Strategie“ im Vergleich zur Referenzdiagnostik. Das heißt 99,2 % wurden als korrekt negativ, also MRD negativ, gewertet und die Wahrscheinlichkeit tatsächlich eine MRD positive Probe zu haben lag bei 98,5 %. Die Sensitivität lag hingegen bei 57,7%, der negative prädiktive Wert bei 73,6%. Das heißt nur 57,7 % der Proben wurden verglichen mit der molekulargenetischen MRD-Bestimmung übereinstimmend als MRD positiv gewertet und die Wahrscheinlichkeit bei einem negativen Testergebnis tatsächlich eine MRD negativ Probe zu haben lag bei 73,6 %.

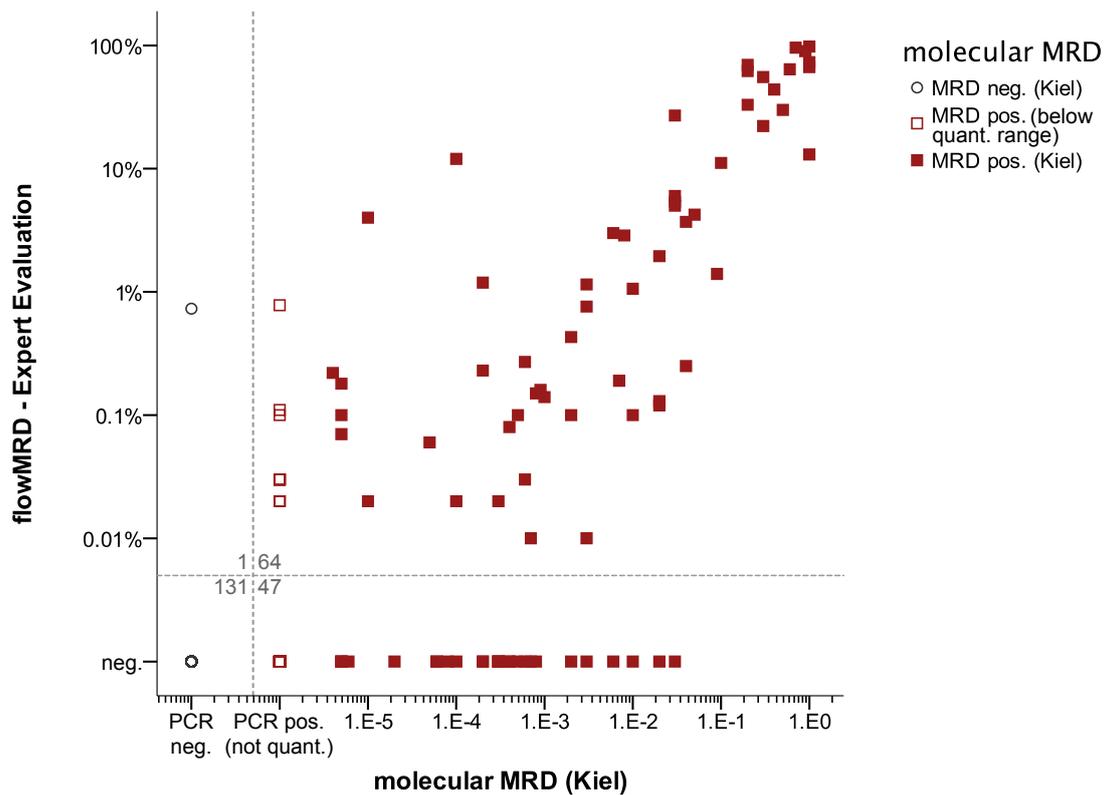


Abbildung 7: molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu flow MRD Evaluation durch „different from normal - Strategie“ bei BCR-ABL negativen Proben

Statistic	Formula	Value	95% CI
Sensitivity	$\frac{a}{a + b}$	57.66%	47.92% to 66.98%
Specificity	$\frac{d}{c + d}$	99.24 %	95.85% to 99.98%
Positive Likelihood Ratio	$\frac{Sensitivity}{100 - Specificity}$	76.11	10.73 to 539.81
Negative Likelihood Ratio	$\frac{100 - Sensitivity}{Specificity}$	0.43	0.34 to 0.53
Disease prevalence	$\frac{a + b}{a + b + c + d}$	45.68% (*)	39.30% to 52.17%
Positive Predictive Value	$\frac{a}{a + c}$	98.46% (*)	90.02% to 99.78%
Negative Predictive Value	$\frac{d}{b + d}$	73.60 % (*)	69.16% to 77.60%

Tabelle 9: Übersichtstafel, molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu „different from normal - Strategie“ bei BCR-ABL negativen Proben

Abbildung 7 stellt den Vergleich molekulare MRD Diagnostik und flow MRD Evaluation mittels „different from normal - Strategie“ numerisch dar. Es zeigte sich, dass eine große Anzahl von Proben mittels „different from normal - Strategie“ als korrekt MRD negativ identifiziert wurden. Im Detail wurden 131 von 132 MRD negativen Fällen durch die „different from normal - Strategie“ korrekt negativ bewertet. MRD positive Fälle wurden hingegen in 56 von 83 Fällen als korrekt positiv eingeschätzt.

In der hier nochmals aufgeschlüsselten Gruppe der positiven, aber nicht quantifizierbaren Messwerte fand außerdem eine korrekte Einschätzung nur in 8 von 28 Fällen statt.

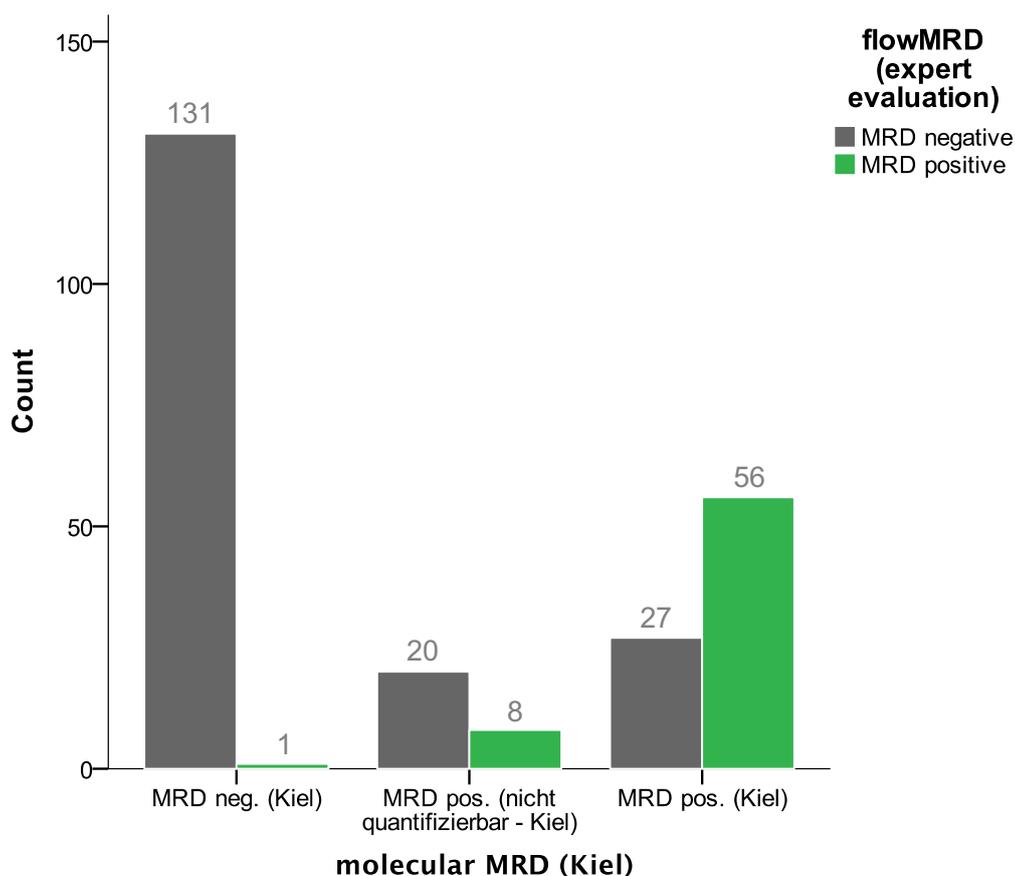


Abbildung 8: Übereinstimmung zwischen molekularer MRD Diagnostik im Vergleich zu der flow MRD Evaluation mittels „different from normal - Strategie“ bei BCR-ABL negativen Proben, MRD negativ

Darüber hinaus konnten mittels „different from normal - Strategie“ durch einen erfahrenen Befunder 131 von 132 MRD negativen Proben im Vergleich zur molekularbiologischen PCR Messung als korrekt negativ gewertet werden. Dies ist in Abbildung 8 zu sehen.

Abbildung 9 stellt zusätzlich die Ergebnisse der Untersuchung der Anzahl von Artefakten und nicht malignen Vorläuferzellen im Vergleich zwischen „different from normal - Strategie“ und molekularbiologischer PCR Messung dar. Manche Proben waren jeweils durch Autofluoreszenz gekennzeichnet, beziehungsweise sie enthielten eine erhöhte Anzahl von nicht malignen Vorläuferzellen. Verunreinigte Proben, beziehungsweise eine erhöhte Zahl von nicht malignen Vorläuferzellen war nur in 6 von 83 MRD positiven Fällen zu finden. In Hinblick auf falsch-negative Ergebnisse ist daher eine wegweisende Aussage an dieser Stelle nur schwer möglich.

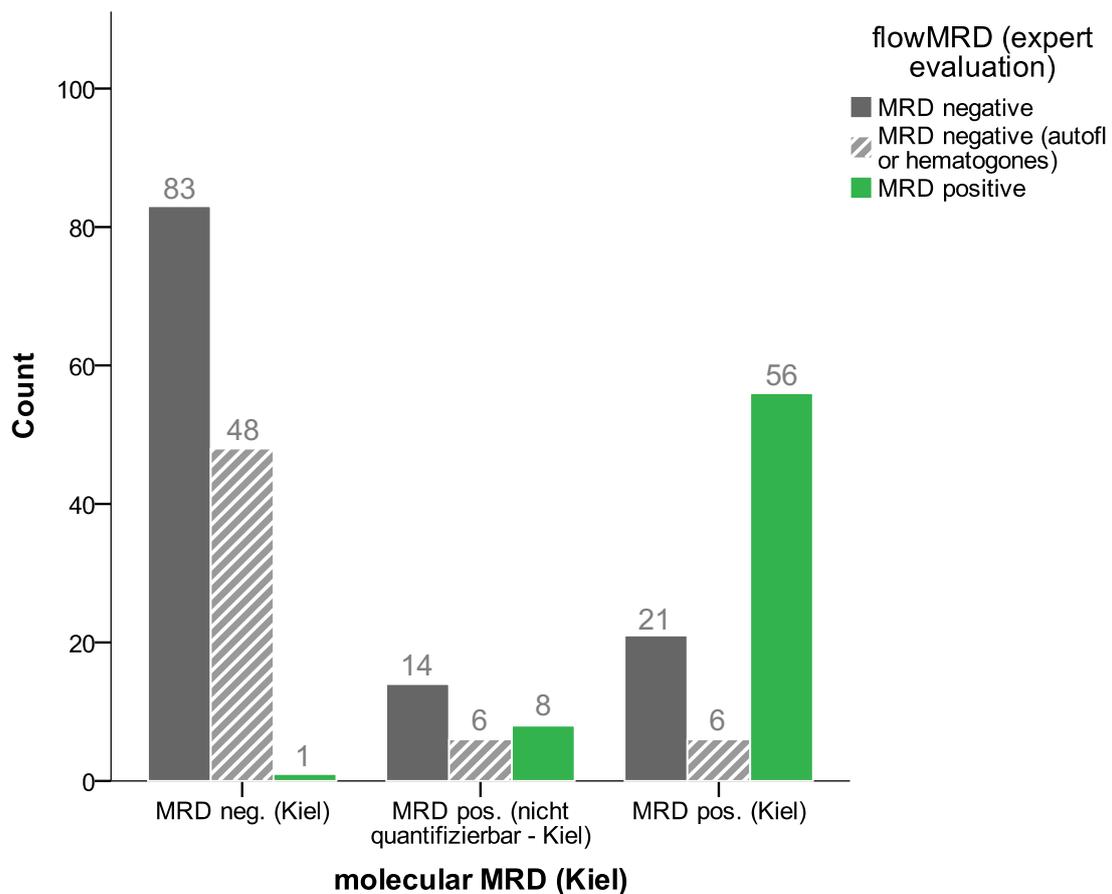


Abbildung 9: Übereinstimmung zwischen molekularer MRD Diagnostik im Vergleich zu flow MRD Evaluation durch „different from normal - Strategie“ bei BCR-ABL negativen Proben

4.4 BCR - ABL negative ALL mittels „LAIP - Strategie“

Als nächstes vergleichen wir die molekulargenetische MRD-Messung mit der Auswertung der durchflusszytometrischen MRD-Messung durch „LAIP - Strategie“.

Das molekulargenetische Verfahren der PCR wird als Referenzdiagnostik angenommen und es galt die durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnisse durch die „LAIP - Strategie“ hierzu in Vergleich zu setzen. In 46,3 % der Fälle konnte das molekulargenetisch gewonnene MRD Ergebnis als konkordant gewertet werden. In Abbildung 9 zeigt sich eine Streuung in der Übereinstimmung. Mittels „LAIP - Strategie“ ohne Evaluation durch einen erfahrenen Befunder zeigte sich eine geringere Spezifität von 66,7%. Der positiv prädiktive Wert lag bei 58,1 %.

Die Sensitivität lag bei 53,5 % und der negativ prädiktive Wert bei 62,4 %. Diese Werte können Tabelle 11 entnommen werden.

Wie in Tabelle 10 dargestellt, zeigt sich für die Korrelation „different from normal - Strategie“ im Vergleich zur „LAIP-Strategie“ mit Probenzahl von 315 ein r^2 von 0,439. Es zeigte sich dabei ein positives Signifikanzniveau. Für die Korrelation „LAIP- Strategie“ im Vergleich zur TCR/Ig-PCR Diagnostik mit Probenzahl von 267 ergab sich ein r^2 von 0,439. Es zeigte sich erneut ein positives Signifikanzniveau.

Für die Korrelation „LAIP - Strategie“ vs. BCR/ABL-PCR mit kleinerer Probenzahl von 51 ergab sich ein r^2 von 0,141. Es konnten nur 14,1% mittels „LAIP - Strategie“ im Vergleich zur BCR/ABL-PCR Diagnostik übereinstimmend klassifiziert werden. Es zeigte sich kein positives Signifikanzniveau.

Korrelationen	n	r^2	p	Methode
„different from normal - Strategie“ vs. „LAIP – Strategie“	315	0,439	<0,001	pearson
„LAIP – Strategie“ vs. TCR/Ig-PCR	267	0,439	<0,001	pearson
„LAIP – Strategie“ vs. BCR/ABL-PCR	51	0,141	0,323	pearson

Tabelle 10: Korrelationskoeffizienten

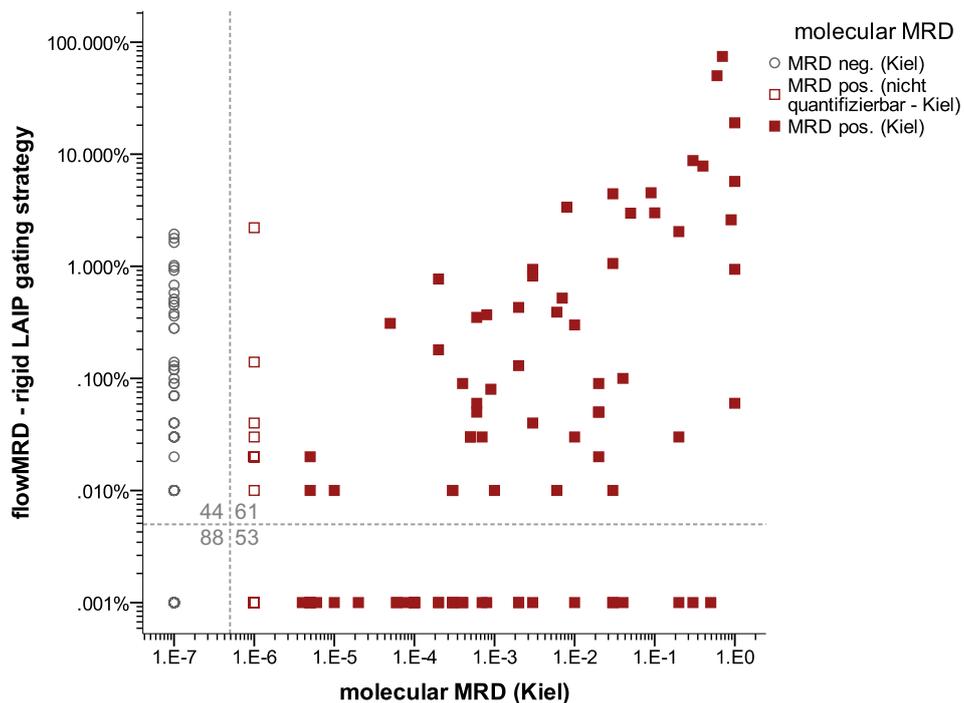


Abbildung 10: molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu „LAIP - Strategie“ MRD Evaluation bei BCR-ABL negativen Proben

Statistic	Formula	Value	95% CI
Sensitivity	$\frac{a}{a + b}$	53.51%	43.93% to 62.90%
Specificity	$\frac{d}{c + d}$	66.67 %	57.94% to 74.63%
Positive Likelihood Ratio	$\frac{\textit{Sensitivity}}{100 - \textit{Specificity}}$	1.61	1.19 to 2.16
Negative Likelihood Ratio	$\frac{100 - \textit{Sensitivity}}{\textit{Specificity}}$	0.70	0.55 to 0.88
Disease prevalence	$\frac{a + b}{a + b + c + d}$	46.34% (*)	39.98% to 52.79%
Positive Predictive Value	$\frac{a}{a + c}$	58.10% (*)	50.77% to 65.08%
Negative Predictive Value	$\frac{d}{b + d}$	62.41 % (*)	56.86% to 67.66%

Tabelle 11: Übersichtstafel, molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu „LAIP-Strategie“ MRD Evaluation bei BCR-ABL negativen Proben

Die „LAIP- Strategie“ zeigt im Vergleich zur „different from normal Strategie“ einen starken Anstieg der falsch-positiven und einen geringen Anstieg der falsch-negativen Ergebnisse. Dies ist in Abbildung 10 dargestellt.

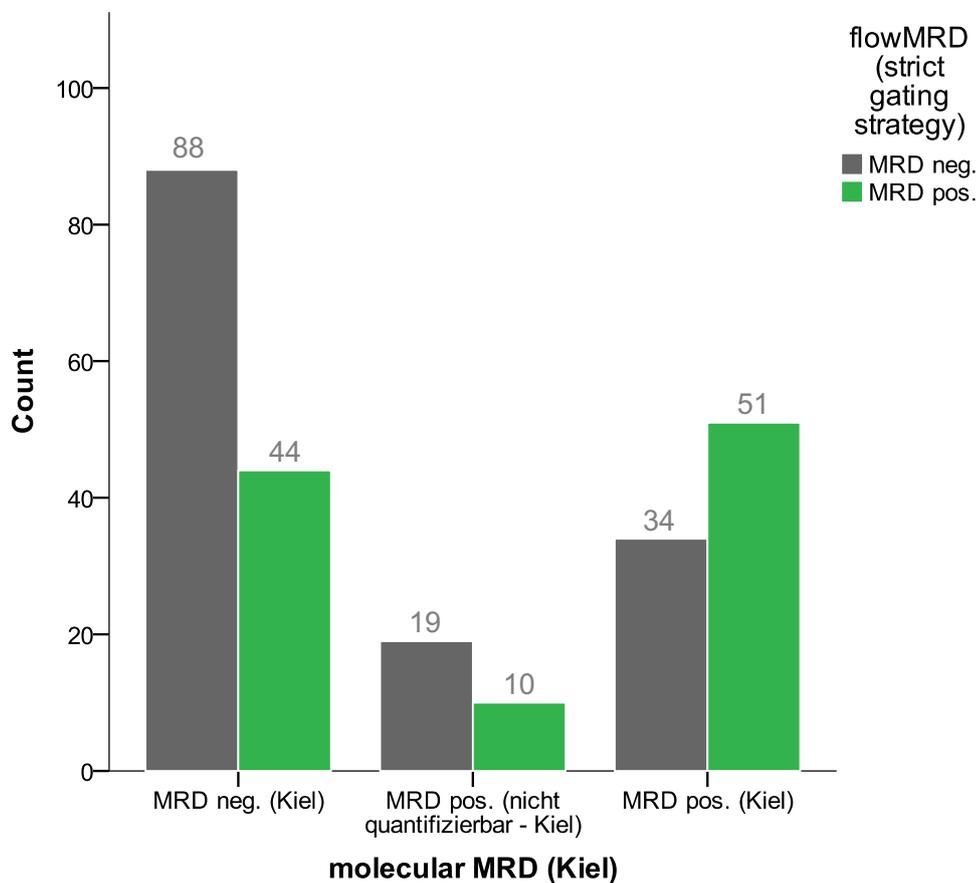


Abbildung 11: Übereinstimmung zwischen molekularer MRD Diagnostik im Vergleich zur MRD Evaluation mittels „LAIP - Strategie“ bei BCR-ABL negativen Proben

Abbildung 11 stellt den Vergleich molekulare MRD Diagnostik und flow MRD Evaluation mittels „LAIP- Strategie“ numerisch dar. Im Detail wurden 88 von 132 MRD negativen Fällen durch die „LAIP - Strategie“ korrekt negativ bewertet. MRD positive Fälle wurden hingegen in 51 von 85 Fällen als korrekt positiv eingeschätzt.

In der hier nochmals aufgeschlüsselten Gruppe der positiven, aber nicht quantifizierbaren Messwerte fand außerdem eine korrekte Einschätzung nur in 10 von 29 Fällen statt.

Abbildung 12 stellt die „LAIP-Strategie“ der „different from normal- Strategie“ graphisch gegenüber.

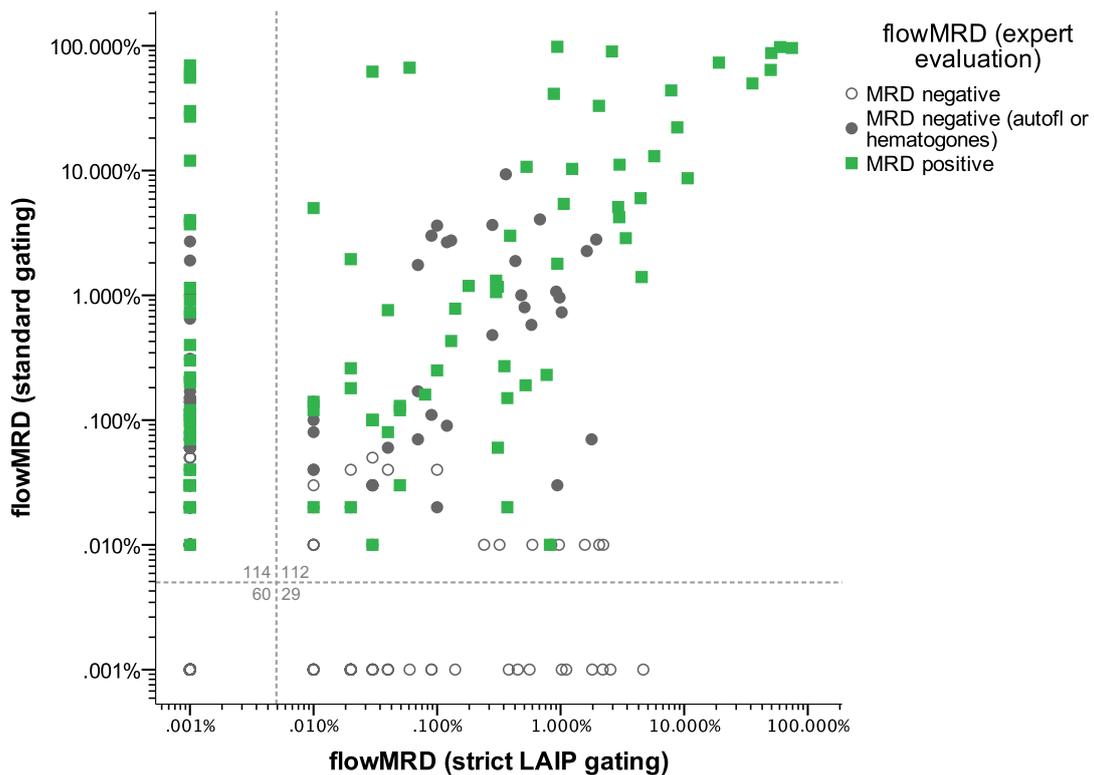


Abbildung 12: flow MRD mittels „different from normal - Strategie“ im Vergleich zur „LAIP - Strategie“

4.5 Morphologische Diagnostik im Vergleich zur MRD Diagnostik mittels Durchflusszytometrie und PCR bei BCR-ABL positiven Proben

Als nächstes verglichen wir die morphologische Diagnostik mit der Diagnostik der MRD (PCR) sowie der Durchflusszytometrie durch den Experten bei BCR-ABL positiver ALL. In der Evaluation der BCR-ABL positiven Gruppe durch „different from normal - Strategie“ lag aufgrund einer geringen Fallzahl eine eingeschränkte Aussagekraft vor.

Es wurden im Vergleich zur Referenzdiagnostik (PCR) 41,4% der Proben fälschlicherweise als mit fehlender Krankheitsaktivität klassifiziert und 10,3% der Proben wurden im Vergleich zur Referenzdiagnostik fälschlicherweise als nicht in Remission ($\geq 5\%$) klassifiziert.

Im Detail wurde insgesamt die morphologische Diagnostik bei 51 Proben mit der Referenzdiagnostik (PCR) verglichen. Davon waren in 41 Proben weniger als 5% Blasten nachweisbar. In 10 Proben waren größer gleich 5% Blasten nachweisbar (siehe Abbildung 13. Innerhalb der Proben größer gleich 5% Blasten wurden durch die

Referenzdiagnostik 7 Proben als MRD positiv identifiziert. Dies bestätigte sich ebenfalls durch in der Durchflusszytometrie MRD positive Ergebnisse. Innerhalb der Proben mit grösser gleich 5% Blasten wurden 3 durch die Referenzdiagnostik als MRD negativ identifiziert. Hingegen wurden 4 dieser Proben durch die Durchflusszytometrie als MRD negativ identifiziert (3 von 10 mittels PCR und 4 von 10 mittels Durchflusszytometrisch falsch positiv).

Es wurden 3 von 10 Proben morphologisch mit größer gleich 5% Blasten klassifiziert, welche dann mittels Referenzdiagnostik mit negativer Krankheitsaktivität klassifiziert wurden.

Im Vergleich der morphologischen Diagnostik im Vergleich zur Referenzdiagnostik wurden 3 von 51 Proben als fälschlicherweise mit positiver Krankheitsaktivität klassifiziert (3 von 51 falsch positiv durch die morphologische Untersuchung).

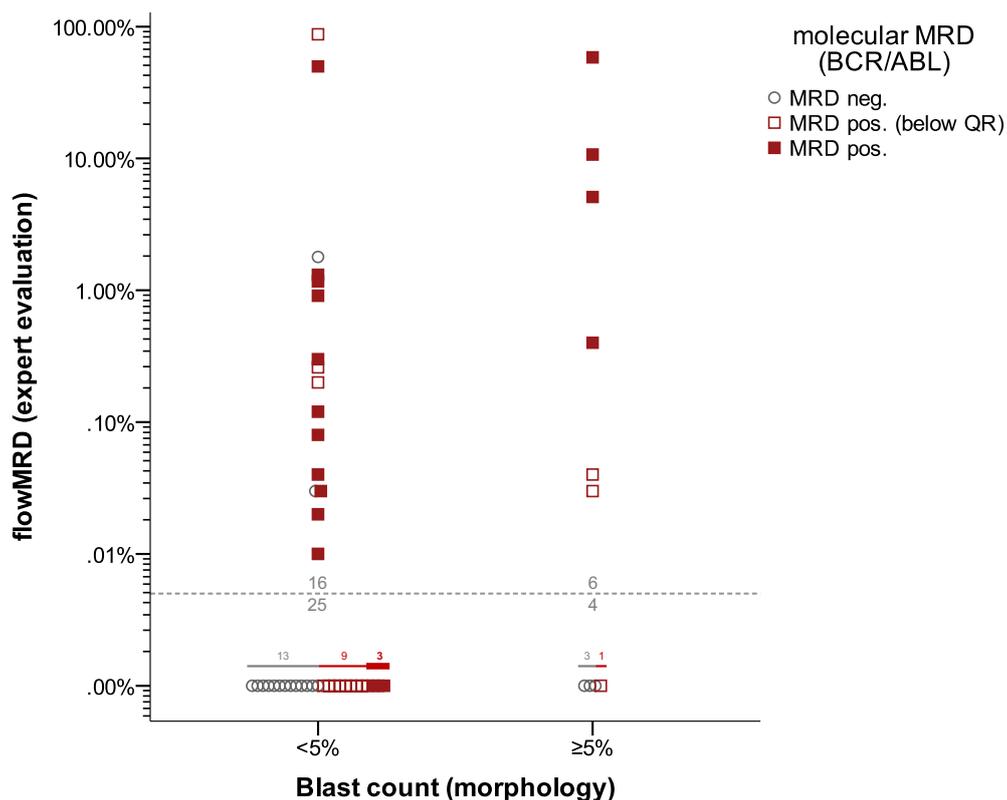


Abbildung 13: Morphologie im Vergleich zur „different from normal“ flow MRD Evaluation bei BCR-ABL positiven Proben

4.6 MRD Diagnostik mittels Durchflusszytometrie im Vergleich zu molekulargenetischer PCR Diagnostik bei BCR-ABL positiven Proben

Als nächstes setzten wir die durchflusszytometrische MRD Diagnostik mit der molekulargenetischen PCR Diagnostik (als Referenzdiagnostik angenommen) in einen Vergleich. In dieser BCR-ABL-positiven Kohorte wurde wie in Abbildung 14 zu entnehmen, in 43,1 % (22 von 51 Proben) und 64,7% (33 von 51 Proben) der Proben mittels MRD Immunphänotypisierung eine Krankheitspersistenz detektiert

Wie in Tabelle 12 dargestellt, ergibt sich mit 88,9 % eine hohe Spezifität und mit 90,9% ein hoher positiv prädiktiver Wert für die Experten Evaluation im Vergleich zur Referenzdiagnostik. Das heißt 88,9 % wurden als korrekt negativ, also MRD negativ, getestet und die Wahrscheinlichkeit tatsächlich eine MRD positive Probe zu haben lag bei 90,9 %. Die Sensitivität lag hingegen bei 60,6%, der negative prädiktive Wert bei 55,2%. Das heißt nur 60.6 % der Proben wurden korrekt als MRD positiv gewertet und die Wahrscheinlichkeit tatsächlich eine MRD negativ Probe zu haben lag bei 55,2 %.

In Vergleich dazu werden in Abbildung 13 die Ergebnisse gesetzt, welche durch molekularbiologische PCR-Diagnostik in Frankfurt gewonnen wurden. Für die Korrelation „different from normal - Strategie “ vs. BCR/ABL-PCR mit kleinerer Probenzahl von 51 mit r^2 von 0,665. Es zeigt sich dabei ein positives Signifikanzniveau.

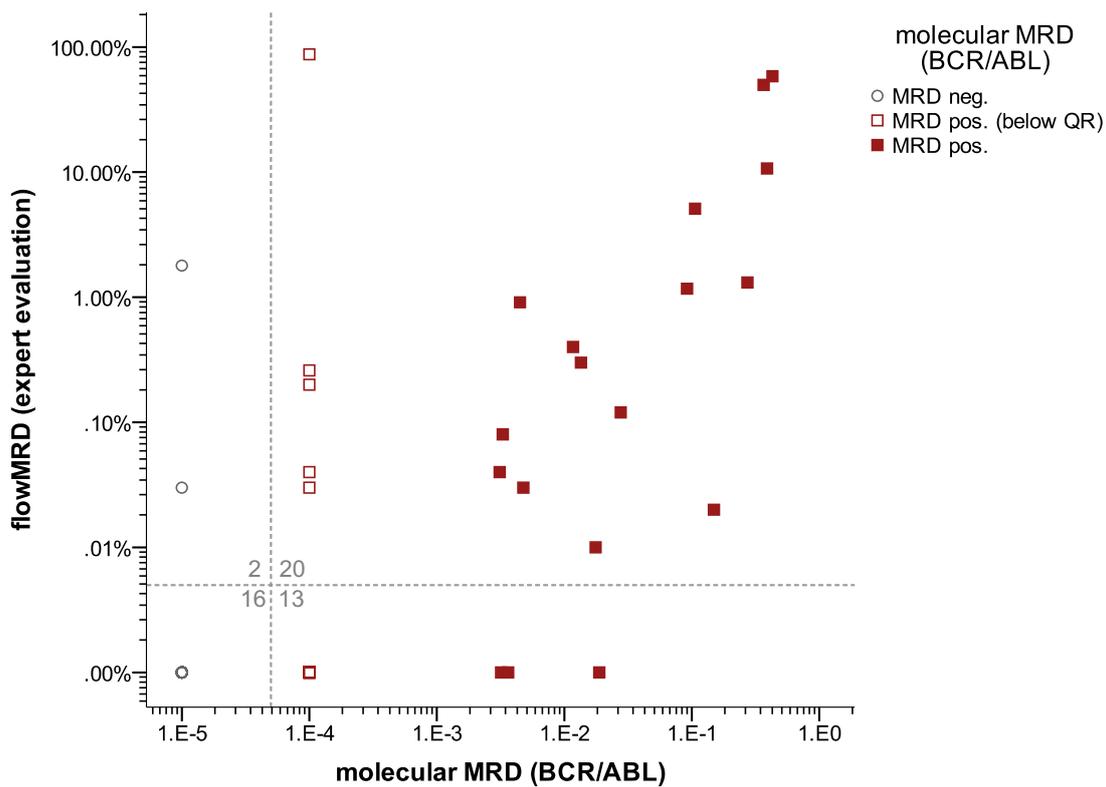


Abbildung 14: molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu der „different from normal“ flow MRD Evaluation bei BCR-ABL positiven Proben

Statistic	Formula	Value	95% CI
Sensitivity	$\frac{a}{a + b}$	60.61%	42.14% to 77.09%
Specificity	$\frac{d}{c + d}$	88.89 %	65.29% to 98.62%
Positive Likelihood Ratio	$\frac{\textit{Sensitivity}}{100 - \textit{Specificity}}$	5.45	1.43 to 20.73
Negative Likelihood Ratio	$\frac{100 - \textit{Sensitivity}}{\textit{Specificity}}$	0.44	0.28 to 0.70
Disease prevalence	$\frac{a + b}{a + b + c + d}$	64.71% (*)	50.07% to 77.57%
Positive Predictive Value	$\frac{a}{a + c}$	90.91% (*)	72.46% to 97.44%
Negative Predictive Value	$\frac{d}{b + d}$	55.17 % (*)	43.88% to 65.95%

Tabelle 12: Übersichtstafel, molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu der „different from normal“ flow MRD Evaluation bei BCR-ABL positiven Proben

Abbildung 14 stellt den Vergleich molekulare MRD Diagnostik und flow MRD Evaluation durch die „different from normal - Strategie“ dar. Es zeigte sich, dass die molekular MRD negativen Proben ohne Risiko durch die Experten Evaluation gut identifiziert wurde. Im Detail wurden 16 von 18 MRD negativen Fällen durch Experten-basierte Einschätzung der durchflusszytometrischen Messung im Vergleich zu den molekularbiologisch gewonnen PCR Ergebnissen als korrekt negativ bewertet. In der Gruppe der MRD positiven Fälle wurden hingegen 60,7% (20 von 33 Proben) als korrekt positiv eingeschätzt.

Für Proben mit einem positiven, aber nicht quantifizierbaren Ergebnis in der PCR Diagnostik, wurden 66,7% (10 von 15 Proben) mittels Durchflusszytometrie als MRD negativ bewertet.

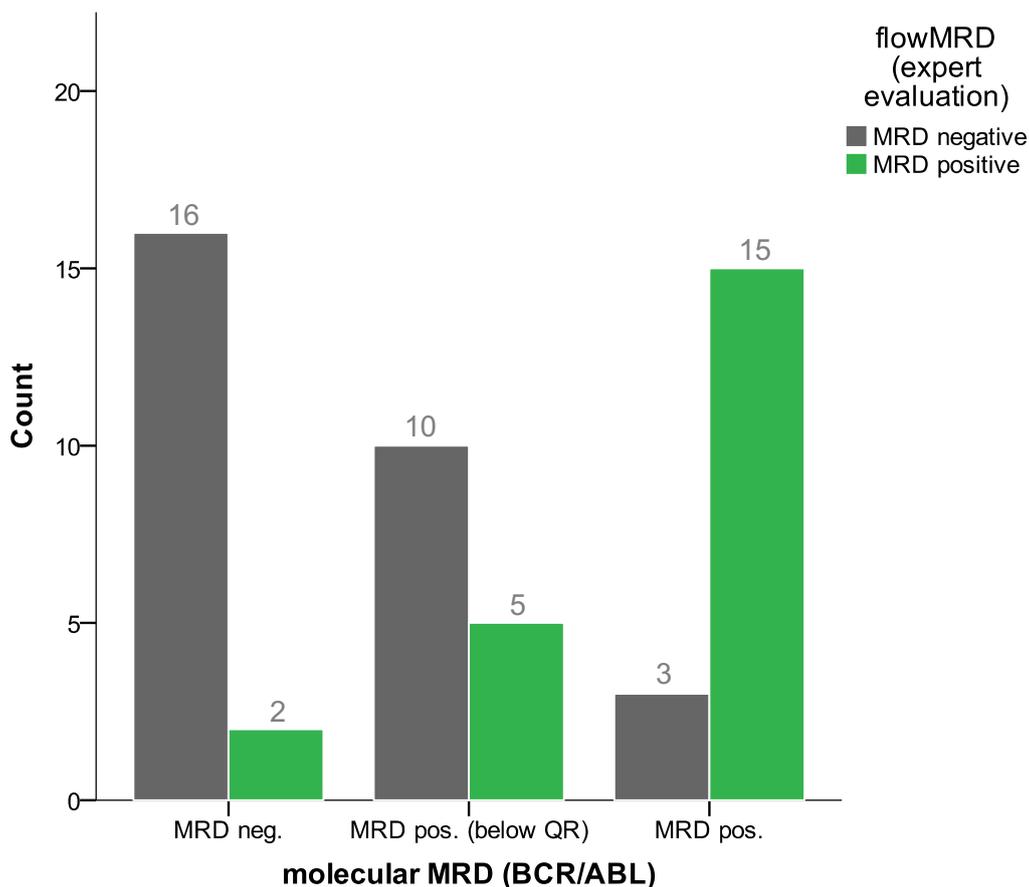


Abbildung 15: Übereinstimmung zwischen molekularer MRD Diagnostik im Vergleich zu der „different from normal“ flow MRD Evaluation bei BCR-ABL positiven Proben

Wie bereits in der BCR-ABL negativen Gruppe konnte auch hier in der BCR-ABL positiven Gruppe gezeigt werden, dass durch die Bewertung der mittels

Durchflusszytometrie gewonnenen Ergebnisse durch die „different from normal - Strategie“ MRD negative Proben mit einer hohen Sicherheit als korrekt negativ gewertet werden. In 5 von 18 Proben der BCR-ABL negativen Gruppe traten Unklarheiten in der Befundung durch hohe Autofluoreszenz oder einen hohen Anteil von physiologischen Vorläuferzellen auf. Diese Gruppe wird in Abbildung 16 dargestellt.

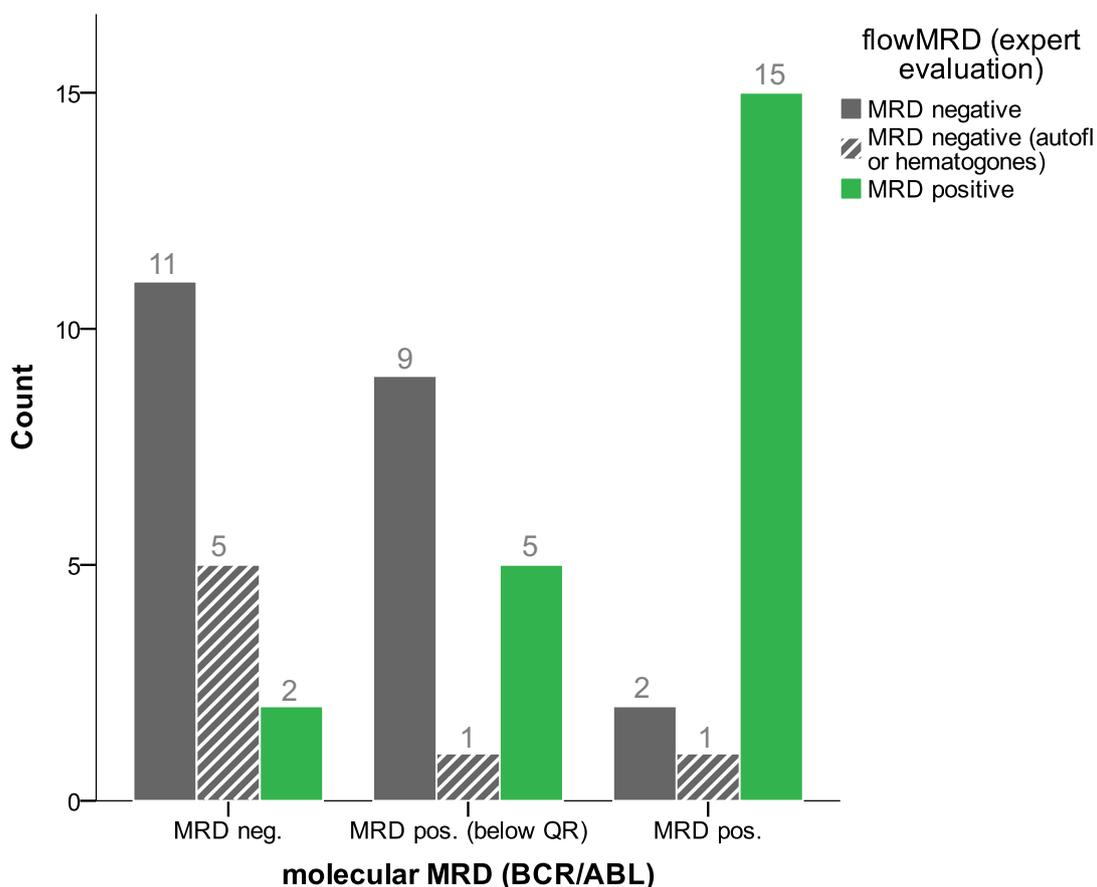


Abbildung 16: Übereinstimmung zwischen molekularer MRD Diagnostik im Vergleich zu der „different from normal“ flow MRD Evaluation bei BCR-ABL positiven Proben unterhalb des quantifizierbaren Bereiches

4.7 BCR - ABL positive ALL mittels „LAIP - Strategie“

Es erfolgt zudem ein Vergleich zwischen der in Frankfurt durchgeführten MRD Diagnostik für die BCR-ABL positive Kohorte im Vergleich zur „LAIP - Strategie“ in Abbildung 17.

Mittels „LAIP – Gating“ wurden 46,2% der Proben als MRD positiv klassifiziert (24 von 52 Proben). Im Vergleich zu den als Referenzdiagnostik angenommenen molekularen

MRD Diagnostik mittels PCR in Frankfurt, konnte mit dieser Methode nur eine niedrige Spezifität von 50,0% und ein positiver prädiktiver Wert von 62,5% erreicht werden. Die Sensitivität (45,5%) und der negativ prädiktive Wert (33,3%) waren sehr niedrig. Dies ist in Tabelle 13 dargestellt.

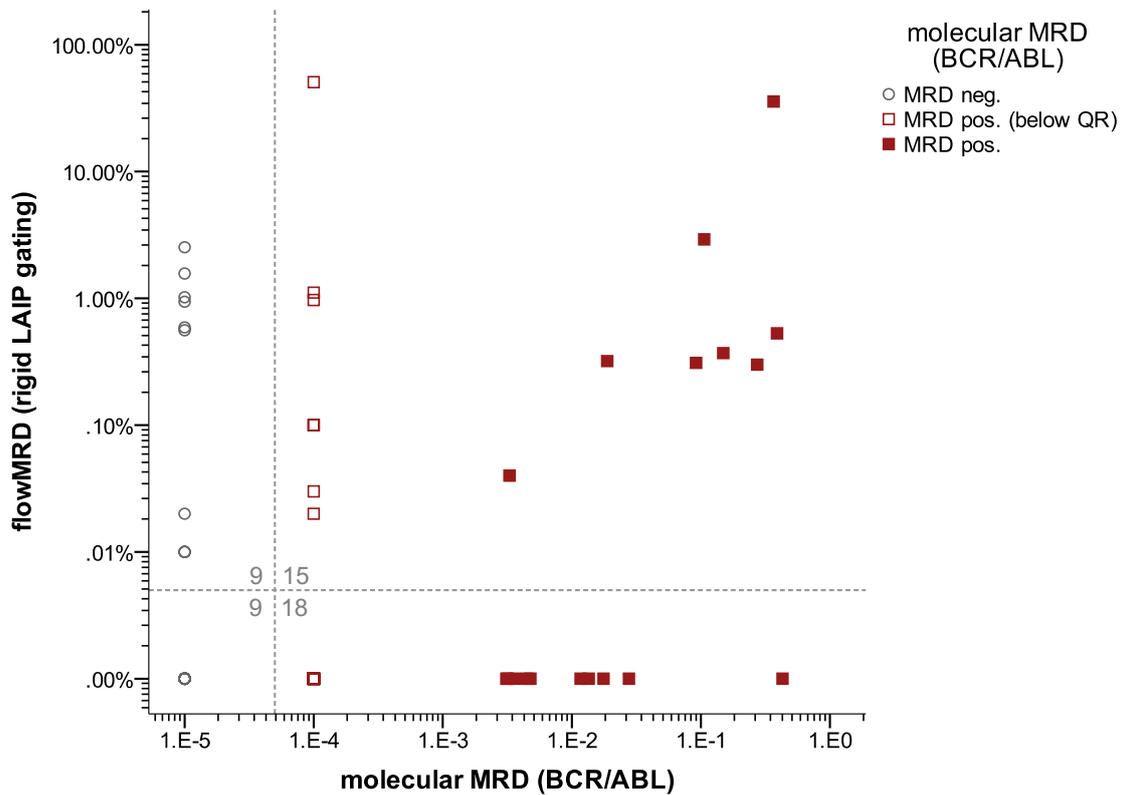


Abbildung 17: molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zur „LAIP - Strategie“ bei BCR-ABL positiven Proben

Statistic	Formula	Value	95% CI
Sensitivity	$\frac{a}{a + b}$	45.45%	28.11% to 63.65%
Specificity	$\frac{d}{c + d}$	50.00 %	26.02% to 73.98%
Positive Likelihood Ratio	$\frac{\textit{Sensitivity}}{100 - \textit{Specificity}}$	0.91	0.50 to 1.65
Negative Likelihood Ratio	$\frac{100 - \textit{Sensitivity}}{\textit{Specificity}}$	1.09	0.62 to 1.90
Disease prevalence	$\frac{a + b}{a + b + c + d}$	64.71% (*)	50.07% to 77.57%
Positive Predictive Value	$\frac{a}{a + c}$	62.50% (*)	47.92% to 75.12%
Negative Predictive Value	$\frac{d}{b + d}$	33.33 % (*)	22.26% to 46.61%

Tabelle 13: Übersichtstafel, molekulare MRD Diagnostik im Vergleich zu MRD Evaluation mittels „LAIP - Strategie“ bei BCR-ABL positiven Proben

5 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit haben wir diagnostische Methoden zur Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) bei akuter lymphatischer Leukämie (ALL) verglichen. Schon frühzeitig wurde der morphologischen Diagnostik bei akuter lymphatischer Leukämie ein hoher prognostischer Stellenwert für die Überlebensrate beigemessen (Miller, Leikin et al. 1981). Die morphologische Diagnostik wird typischerweise durch Beurteilung des Knochenmarks durch einen erfahrenen Befunder durchgeführt. Jedoch ist die Sensitivität der Methode begrenzt, da auch im physiologischen Knochenmark unreife Vorläuferzellen/Blasten nachweisbar sind und insbesondere im Rahmen einer zytostatischen Chemotherapie reaktive Veränderungen im Knochenmark die Regel sind. Dies kann zur Folge haben, dass die morphologischen Merkmale leukämischer Zellen nicht als diese erkannt werden und fälschlicherweise als physiologische und nicht maligne Zellpopulationen klassifiziert werden (Campana 2011). Außerdem werden Proben, in denen unter 5% Blasten identifiziert werden, als in klinischer Remission klassifiziert, obwohl gleichzeitig noch leukämische Zellen vorhanden sein können (Coustan-Smith, Behm et al. 1998).

Als wichtigster Parameter zur Evaluation des Therapieansprechens konnte der Nachweis der submikroskopischen minimalen Resterkrankung (minimal residual disease - MRD) identifiziert werden, von der ein zentraler Stellenwert in der ALL-Therapie ausgeht. Es wird der Validierung der zur MRD-detektion verwendeten Methoden eine zunehmende Bedeutung beigemessen. Als Minimale Resterkrankung wird der Anzahl der noch detektierbaren leukämischen Zellen zum jeweiligen Messzeitpunkt bezeichnet.

Es wurden jeweils Vergleiche zwischen morphologischer Diagnostik, MRD Bestimmung mittels Durchflusszytometrie und Referenzdiagnostik der MRD mittels PCR betrachtet. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die Interpretation der durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnisse (flow MRD) durch einen erfahrenen Befunder mittels „different from normal - Strategie“ der morphologischen Diagnostik überlegen ist. Außerdem zeigten wir erstmals, dass ein neuer Ansatz, welchen wir als „LAIP - Strategie“ bezeichnen, diagnostisch schlechtere Werte auswies als die „different from normal - Strategie“ im Vergleich zur Referenzdiagnostik (PCR). Unsere Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass für eine sichere MRD Diagnostik die „LAIP - Strategie“ bei schlechter Sensitivität und Spezifität keine Alternative darstellt.

Wie erwartet fanden sich bei Proben, bei denen morphologisch ein erhöhter Blastenanteil nachweisbar war, ein signifikanter Anteil von MRD positiven Proben. Dies entspricht den Befunden vorangegangener Studien (Vidriales, Perez et al. 2003), (Chou, Tang et al. 2007).

In der Diagnostik der minimal residuellen Resterkrankung werden in Deutschland die qRT-PCR und die Durchflusszytometrie verwendet. In unserer Studie war die Evaluation der MRD durch die „different from normal - Strategie“ im Vergleich zur Referenzdiagnostik hoch sensitiv. So konnte gezeigt werden, dass beide Methoden grundsätzlich übereinstimmende Ergebnisse zeigen, wie auch durch bereits bestehende Studien bestätigt wird (Neale, Coustan-Smith et al. 2004). Darüber hinaus konnte bei nahezu allen Proben, welche in der immunologischen Diagnostik eine Persistenz der Erkrankung aufzeigten, ein übereinstimmendes Ergebnis auch molekulargenetisch mittels PCR gewonnen werden.

In unserer Studie zeigte sich jedoch im direkten Vergleich eine geringe Sensitivität für die durchflusszytometrische MRD-Bestimmung.

Ein wesentlicher Nachteil der Durchflusszytometrie ist jedoch, dass es im Erkrankungsverlauf zu phänotypischen Veränderungen kommen kann, was dazu führt, dass der LAIP sich verändert und ein Rezidiv nur durch ausreichende Expertise diagnostiziert werden kann (Bruggemann, Schrauder et al. 2010).

Die vorliegende Arbeit verfolgte erstmals den Ansatz mithilfe der „LAIP - Strategie“ den leukämie-assoziierten Phänotyp (LAIP) bei Erstdiagnose festzulegen und exakt nach dem gleichen System auf die Verlaufsmessungen desselben Patienten zu übertragen. Es sollte somit ermöglicht werden, ein Rezidiv der Erkrankung auch mit wenig klinischer Erfahrung bezüglich der Muster von B- und T-Zellreifung bei Wiederauftreten derselben Oberflächenmerkmale frühzeitig zu erkennen.

Deshalb sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Evaluation mittels der sogenannten „LAIP - Strategie“ die Bewertung durch einen erfahrenen Befunder ersetzen konnte. Es zeigte sich, dass die diagnostische Bewertung der MRD flow Ergebnisse durch die „different from normal Strategie“, welche durch einen erfahrenen Befunder durchgeführt wurde, nicht durch ein die „LAIP - Strategie“ ersetzt werden kann und die klinische Expertise weiterhin von großer Bedeutung ist. Die Anwendung der sogenannten

„LAIP - Strategie“ führte zu einem Anstieg der falsch positiven Bewertung, am ehesten da Messartefakte und physiologische Vorläuferzellen nicht als solche erkannt wurden. Hier konnte insgesamt eine schlechte Korrelation im Vergleich zu immunphänotypischer MRD Diagnostik mittels „LAIP – Strategie“ und molekulargenetischer PCR Diagnostik erzielt werden.

Relevanz der Diagnostik der minimalen Resterkrankung

Der Diagnostik der minimalen Resterkrankung (MRD) kann insgesamt ein hoher Stellenwert zugeschrieben (Vidriales, San-Miguel et al. 2003) werden. So konnte in einer Reihe von Studien gezeigt werden, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der durchflusszytometrischen MRD Diagnostik und dem klinischen Krankheitsverlauf besteht (Mortuza, Papaioannou et al. 2002); (Borowitz, Wood et al. 2015); (Coustan-Smith, Ribeiro et al. 2006). Die Höhe der MRD ist darüber hinaus direkt proportional zu dem Risiko der Entstehung eines Rezidivs (Campana 2009). Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine früh im Therapieverlauf eingesetzte MRD Diagnostik sinnvoll ist, um zum Beispiel Patienten zu detektieren, welche in besonderem Maße von einer Stammzelltransplantation profitieren (Dhédin, Huynh et al. 2015).

Insgesamt bezeichnet man mittels MRD ein Vorliegen leukämischer und somit maligner Zellen unterhalb der morphologischen Nachweisgrenze. Für den Nachweis von leukämischen Blasten mittels Morphologie liegt die Nachweisgrenze bei 5%. Insgesamt betrachtet sollte die Sensitivität bei der MRD Diagnostik mindestens 10^{-4} erreichen, es könnte dann somit eine leukämische Zelle in 10.000 Zellen nachgewiesen werden.

Bereits in 1997 konnte dies bezüglich gezeigt werden, dass in der Kohorte mit einer MRD $\leq 10^3$ zum Vergleichszeitpunkt mit den anderen Gruppen keine Rezidive aufgetreten waren. Hier wurden ab einer MRD von $>10^3$ ebenfalls alternative therapeutische Strategien empfohlen (Jacquy, Delepaut et al. 1997). in der Literatur ist es umstritten welcher unterer Schwellenwert als positiv gewertet werden soll und die klinische Relevanz von positiven Ergebnissen unter bestimmten Werten nicht ausreichend gezeigt ist.

Insgesamt geht von der MRD Diagnostik eine wesentliche Bedeutung in der Therapieplanung und Prognose der ALL aus, außerdem kann ein entstehendes Rezidiv frühzeitig detektiert werden (Schrappe 2014). Da sowohl die immunphänotypische als auch die molekulargenetische Diagnostik mit Vor- und Nachteilen einhergehen gilt stets,

dass die korrekte Interpretation von der technischer Ausstattung und der klinischen Expertise abhängt (Coustan-Smith and Campana 2010).

Vor- und Nachteile der PCR und flow MRD mit Evaluation durch einen erfahrenen Befunder

Insgesamt betrachtet gibt es sowohl für die molekulargenetische qRT-PCR als auch für die immunphänotypische Durchflusszytometrie Vor- und Nachteile.

Bei der qRT-PCR handelt es sich um ein hoch standardisiertes Verfahren und es kann eine hohe Sensitivität erreicht werden. Diese liegt bei 10^4 bis 10^5 . Durch die standardisierte molekulargenetische Diagnostik kann die MRD evaluiert werden und ein fehlendes Ansprechen auf die Therapie frühzeitig detektiert werden (Gökbuget, Kneba et al. 2012).

Ein bedeutender Nachteil dieser Methode sind die hohen Kosten, die bei der Diagnostik entstehen, und ein hoher Zeitaufwand (Kotrova, Muzikova et al. 2015). Zugrunde liegend ist die Durchführung in verschiedenen Zyklen, in denen jeweils die Fluoreszenzsignale gemessen werden.

Im Vergleich zeigt die Durchflusszytometrie niedrigere Kosten in der Durchführung und ist schneller durchführbar und verfügbar (Campana and Coustan-Smith 2004). Insgesamt betrachtet ist davon auszugehen, dass in über 95% der B-Zelllinien-ALL im Erwachsenenalter bei Erstdiagnosestellung ein abnormaler Phänotyp detektiert werden kann (Krampera, Perbellini et al. 2006). Dieser kann durch die Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie erfasst werden. Von dieser Methodik geht ein hoher prognostischer Wert aus (Dworzak, Gaipa et al. 2008).

Stärken und Limitationen der Arbeit

Eine Stärke der Arbeit ist die standardisierte und verblindete Diagnostik mittels der „LAIP - Strategie“. Darüber hinaus werden in der vorliegenden Arbeit zwei Gruppen bezüglich des BCR-ABL-Genrearrangements separat untersucht, eine BCR-ABL negative und eine BCR-ABL positive Gruppe. Dies ist besonders relevant, da davon eine prognostische Relevanz für den Verlauf der Erkrankung einhergeht (Gleißner, Gökbuget et al. 2002), (Heisterkamp, Jenster et al. 1990).

In dieser Arbeit ist von einigen Fällen zu berichten, bei denen mittels PCR ein positiver Nachweis erfolgte, dieser aber unterhalb des quantifizierbaren Messbereiches lag. Diese Untergruppe geht mit einer anspruchsvollen und schwierigen Diagnostik einher, wie auch andere Studien berichten (van der Velden, Wijkhuijs et al. 2008). Eine Vielzahl dieser

Proben wurden mittels durchflusszytometrischen MRD-Diagnostik als MRD negativ gewertet. Eine mögliche Ursache könnte daher sein, dass die Anzahl der leukämischen Zellen des Patienten zu niedrig ist, um mittels flow MRD detektiert werden zu können. Ein weiterer Grund für eine falsch positive PCR könnte eine hohe Anzahl vieler unspezifischer PCR Amplifikationen sein. Es ist somit nicht klar, ob eine spezifische Amplifikation der PRC vorliegt oder viele unspezifische Amplifikationen.

Es gilt stets, dass sowohl die molekularbiologische Diagnostik als auch die Diagnostik mittels Immunphänotypisierung ein Risiko für falsch negative Ergebnisse aufweist. Als mögliche Lösung kommt künftig der kombinierte Einsatz beider Verfahren in Frage (Munoz, Lopez et al. 2000).

Eine aktuelle Studie schlägt zudem eine automatisierte, computerbasierte Methodik vor. Mittels eines bestimmten Algorithmus kann somit eine Standardisierung der immunphänotypischen MRD Diagnostik erreicht werden (DiGiuseppe, Tadmor et al. 2015). Dieses Verfahren wurde in unserer Studie nicht untersucht und sollte in künftigen Studien berücksichtigt werden.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Detektion der minimalen Resterkrankung (MRD) bei erwachsenen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie. Ziel der Arbeit ist der Vergleich der zur MRD-Bestimmung eingesetzten Methoden. Zunächst wurde untersucht, ob die durchflusszytometrische und die molekulargenetische MRD-Detektion eine verbesserte Sensitivität und Spezifität im Vergleich zur klassischen zytomorphologischen Remissionsbeurteilung ermöglichen. Anschließend wurden die beiden genannten Methoden miteinander verglichen und schließlich untersucht, ob eine sogenannte „LAIP - Strategie“ zur MRD-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie mit der aktuell gängigen Praxis der „different from normal - Strategie“ durch einen erfahrenen Befunder gleichzusetzen ist. Eingeschlossen wurden 318 Knochenmarksproben von 83 Patienten im Zeitraum von März 2012 bis Oktober 2016.

Zunächst konnten wir bestätigen, dass sowohl die durchflusszytometrische als auch die molekulargenetische MRD-Diagnostik der morphologischen Remissionsbeurteilung überlegen ist. In der BCR-ABL negativen ALL-Kohorte ergaben sich 19 von 174 falsch positive Ergebnisse durch die morphologische Untersuchung. In der BCR-ABL positiven Kohorte ergaben sich 3 von 51 falsch positive Ergebnisse durch die morphologische Untersuchung.

Ferner konnten wir zeigen, dass die durchflusszytometrische und die molekulargenetische MRD-Diagnostik eine gute Korrelation miteinander aufwies. Es zeigte sich ein $r^2 = 0,816$ und positives Signifikanzniveau für die Korrelation „different from normal - Strategie“ im Vergleich zur TCR/Ig-PCR Diagnostik mit Probenzahl von 264. Für die Korrelation „different from normal - Strategie“ vs. BCR/ABL-PCR mit Probenzahl von 51 ergab sich ein $r^2 = 0,665$ bei ebenfalls ein positives Signifikanzniveau.

Es zeigte sich zudem für die durchflusszytometrische MRD-Diagnostik im Vergleich zur molekulargenetischen MRD-Bestimmung eine hohe Spezifität von 99,2% (BCR-ABL neg.) bzw. 88,9% (BCR-ABL pos.). Jedoch konnten mehr Proben mittels molekulargenetischer als mittels durchflusszytometrischer MRD-Bestimmung als MRD-positiv identifiziert werden, was zu einer nur mäßigen Spezifität der durchflusszytometrischen MRD-Bestimmung im Vergleich zu molekulargenetischen MRD-Bestimmung führte (57,7% für BCR-ABL negative Proben und 60,6% für BCR-

ABL positive Proben im Vergleich zwischen molekularer MRD Diagnostik zu der „different from normal“ flow MRD Evaluation).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich für beide Methoden ein hohes Maß an Korrelation miteinander nachweisen lässt, und die molekulargenetische MRD-Bestimmung ggf. mit einer besseren Sensitivität vergesellschaftet ist.

Schließlich haben wir evaluiert, ob mit Hilfe der sogenannten „LAIP - Strategie“ in der Auswertung und Befundung der durchflusszytometrischen MRD-Bestimmung die klinische Expertise eines erfahrenen Befunders mittels „different from normal - Strategie“ ersetzt werden kann. Hier zeigte sich für die BCR-ABL positive Kohorte lediglich eine moderate Spezifität von 66,7% und ein positiv prädiktiver Wert von 58,2%. In der BCR-ABL negativen Kohorte lag die Spezifität bei 50%, der positiv prädiktive Wert bei 62,5%. Die Korrelation „different from normal - Strategie“ im Vergleich zur „LAIP - Strategie“ mit Probenzahl von 315 ergab sich ein $r^2 = 0,439$ bei positivem Signifikanzniveau. In der Korrelation zwischen „LAIP - Strategie“ und „TCR/Ig-PCR“ ergab sich bei einer Probenzahl von 267 ebenfalls ein $r^2 = 0,439$ bei positivem Signifikanzniveau, bei der Korrelation zwischen „LAIP - Strategie“ und „BCR/ABL-PCR“ ergab sich bei einer Probenzahl von 51 ein $r^2 = 0,141$ mit negativem Signifikanzniveau.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die klinische Expertise des erfahrenen Befunders dringend notwendig ist, da es beim strikten Gating zu einer falsch positiven Interpretation von Artefakten oder benignen physiologischen Vorläuferzellen kommen kann.

Durch weitreichende Forschung auf dem Gebiet der akuten lymphatischen Leukämie konnten im Verlauf der letzten Jahrzehnte sowohl die diagnostischen als auch die therapeutischen Möglichkeiten im Krankheitsverlauf deutlich verbessert werden. Weitere Studien sollten aber folgen, welche vor allem sich vor allem mit den positiven PCR Proben befassen, welche unterhalb des quantifizierbaren Bereiches liegen. Die Anzahl der leukämischen Zellen kann in diesem Fall nämlich so niedrig sein, dass sich im Fall einer Diagnostik mittels Durchflusszytometrie ein negativer MRD Status ergibt.

Ein wahrscheinlicher Grund für eine falsch positive PCR könnte zudem eine hohe Anzahl vieler unspezifischer PCR Amplifikationen sein.

Insgesamt kann aber sowohl die molekularbiologische Diagnostik als auch die Diagnostik mittels Immunphänotypisierung ein Risiko für falsch negative Ergebnisse aufweist. Als mögliche Lösung kommt künftig sowohl der kombinierte Einsatz beider Verfahren (Munoz, Lopez et al. 2000), als auch die weitere Forschung in ergänzenden Studien in Frage.

7 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Doktormutter Prof Dr. med. Marion Subklewe für die Überlassung dieses Themas und die jederzeit gewährte Betreuung und Supervision der Arbeit. Dank ihr erhielt ich einen sehr engagierten Betreuer an meiner Seite, Dr. Thomas Köhnke. Ich danke Dir für die Begleitung der Arbeit, Korrekturen, Ratschläge und aufbauenden Worte. Ohne Dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

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

8 Literaturverzeichnis

- Arber, D. A., et al. (2016). "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia." Blood **127**(20): 2391-2405.
- Bassan, R. and D. Hoelzer (2011). "Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia." Journal of Clinical Oncology **29**(5): 532-543.
- Bene, M., et al. (1995). "Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)." Leukemia **9**(10): 1783-1786.
- Borowitz, M., et al. (2015). "Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232." Blood **126**(8): 964-971.
- Brüggemann, M., et al. (2006). "Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia." Blood **107**(3): 116-123.
- Brüggemann, M., et al. (2012). "Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL?" Blood **120**(23): 4470-4481.
- Bruggemann, M., et al. (2010). "Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008." Leukemia **24**(3): 521-535.
- Bruggemann, M., et al. (2004). "Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia." Leukemia **18**(4): 709-719.
- Campana, D. (2009). "Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia." Semin Hematol **46**(1): 100-106.
- Campana, D. (2011). "Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia." Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology(6).
- Campana, D. and E. Coustan-Smith (1999). "Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry." Cytometry **38**(4): 139-152.
- Campana, D. and E. Coustan-Smith (1999). "Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry." Cytometry **38**(4): 139-152.
- Campana, D. and E. Coustan-Smith (2004). "Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia." Acta Haematol **112**(1-2): 8-15.
- Campana, D. and C. Pui (1995). "Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance." Blood **85**(6): 1416-1434.
- Cavé, H., et al. (1998). "Clinical Significance of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia." The New England Journal of Medicine **339**: 591-598.

- Chou, W. C., et al. (2007). "Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (NPM1) mutations." Leukemia **21**: 998.
- Cilloni, D., et al. (2002). "Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients." Leukemia **16**(10): 2115-2121.
- Ciudad, J., et al. (1998). "Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia." Journal of Clinical Oncology **16**(12): 3774-3781.
- Coustan-Smith, E., et al. (1998). "Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia." Lancet **351**(9102): 550-554.
- Coustan-Smith, E. and D. Campana (2010). "Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: a comparative approach to molecular testing." Best Pract Res Clin Haematol **23**(3): 347-358.
- Coustan-Smith, E., et al. (2006). "A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome." Blood **108**(1): 97-102.
- Dhédin, N., et al. (2015). "Role of allogeneic stem cell transplantation in adult patients with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia." Blood **125**(16): 1486-2496.
- DiGiuseppe, J. A., et al. (2015). "Detection of minimal residual disease in B lymphoblastic leukemia using viSNE." Cytometry B Clin Cytom **88**(5): 294-304.
- Dores, G. M., et al. (2012). "Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007." Blood **119**(1): 34-43.
- Dworzak, M. N., et al. (2008). "Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible." Cytometry B Clin Cytom **74**(6): 331-340.
- Gaipa, G., et al. (2013). "Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia." Cytometry B Clin Cytom **84**(6): 359-369.
- Garand, R., et al. (2012). "Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL." Leukemia **27**: 370.
- Garcia Vela, J. A., et al. (2000). "Aberrant immunophenotypes detected by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia." Leuk Lymphoma **36**(3-4): 275-284.
- Gleißner, B., et al. (2002). "Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis." Blood **99**(5): 1536-1543.

Gökbuget, N., et al. (2005). "Akute Leukämien." Retrieved 07.03.2017, from http://www.uksh.de/uksh_media/Dateien_Kliniken_Institute+/Kiel+Campuszentrum/Med2_KI/Dokumente/Dokumente+WissLab/DGHO+Leitlinie+ALL.PDF.

Gökbuget, N. and D. Hoelzer (2012). Konsensus-Empfehlung der German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL) für die Therapie von Akuter lymphatischer Leukämie bei jüngeren Patienten (18 - 55 Jahre). G. M. S. G. f. A. A. (GMALL).

Gökbuget, N., et al. (2012). "Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies." Blood **120**(9): 1868-1876.

Greaves, M. F. (1997). "Aetiology of acute leukaemia." The Lancet **349**(9048): 344-349.

Griesinger, F., et al. (1999). "Leukaemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: detection in remission marrow predicts outcome." British Journal of Haematology **105**(1): 241-255.

Hansen-Hagge, T. E., et al. (1989). "Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by in vitro amplification of rearranged T-cell receptor delta chain sequences." Blood **74**(5): 1762-1767.

Heisterkamp, N., et al. (1990). "Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice." Nature **344**: 251.

Herold, G. and Mitarbeiter (2015). Innere Medizin.

Hoelzer, D., et al. (2016). "Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Annals of Oncology **27**(5): 69-82.

Hoelzer, D. and N. Gökbuget (2003). Multizentrische Therapieoptimierungsstudie der akuten lymphatischen Leukämie bei Erwachsenen und Adoleszenten ab 18 Jahren - Therapieoptimierung durch Evaluation der minimalen Resterkrankung. Frankfurt.

Hoelzer, D., et al. (2002). "Acute lymphoblastic leukemia." Hematology ASH Education Book **1**: 162-192.

Inoue, K., et al. (1994). "WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia." Blood **84**(3071-3079).

Jacqy, C., et al. (1997). "A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse." Br J Haematol **98**(1): 140-146.

Kaatsch, P., et al. (2018). "Jahresbericht 2017 des Deutschen Kinderkrebsregisters." from http://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure_downloads/22605/0/bd894cced68c7950a69875dc2588a29281fd6fbc/jb2017_s.pdf.

Kompetenznetz Leukämie (2018). "Häufigkeiten von Leukämien in Deutschland." from <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/epidemiologie/>.

Kotrova, M., et al. (2015). "The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL." *Blood* **126**(8): 1045-1047.

Krampera, M., et al. (2006). "Methodological approach to minimal residual disease detection by flow cytometry in adult B-lineage acute lymphoblastic leukemia." *Haematologica* **91**: 1109-1112.

Marks, D. and C. Rowntree (2017). "Management of adults with T-cell lymphoblastic leukemia." *Blood* **129**(9): 1134-1142.

Miller, D. R., et al. (1981). "Prognostic importance of morphology (FAB classification) in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL)." *Br J Haematol* **48**(2): 199-206.

Mortuza, F. Y., et al. (2002). "Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia." *J Clin Oncol* **20**(4): 1094-1104.

Munoz, L., et al. (2000). "Combined use of reverse transcriptase polymerase chain reaction and flow cytometry to study minimal residual disease in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia." *Haematologica* **85**(7): 704-710.

Neale, G. A., et al. (2004). "Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia." *Leukemia* **18**(5): 934-938.

Papaemmanuil, E., et al. (2009). "Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia." *Nat Genet* **41**(9): 1006-1010.

Pongers-Willemse, M. J., et al. (1998). "Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes." *Leukemia* **12**(12): 2006-2014.

Preston, D. L., et al. (1994). "Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987." *Radiat Res* **137**(2 Suppl): S68-97.

Roy, A., et al. (2013). "The impact of trisomy 21 on early human hematopoiesis." *Cell Cycle* **14**(4): 533.

Rudent, J., et al. (2015). "ARID5B, IKZF1 and Non-Genetic Factors in the Etiology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The ESCALE Study." *PLoS One* **10**(3).

Šálek, C., et al. (2016). "Early MRD response as a prognostic factor in adult patients with acute lymphoblastic leukemia." *European Journal of Haematology* **96**(3): 276-284.

Schrapppe, M. "ALL-BFM-Studie zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit akuter lymphoblastischer Leukämie." from http://www.uni-kiel.de/all-studie/All_stu_main.html

Schrappé, M. (2012). "Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2012**: 137-142.

Schrappé, M. (2014). "Detection and management of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia." Hematology **1**: 244-249.

Sherborne, A. L., et al. (2010). "Variation in CDKN2A at 9p21. 3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk." Nat Genet **42**(6): 492.

Short, N. and E. Jabbour (2017). "Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: How to Recognize and Treat It." Current Oncology Reports **19**(1).

Trevino, L. R., et al. (2009). "Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia." Nat Genet **41**(9): 1001-1005.

van der Velden, V. H., et al. (2008). "Non-specific amplification of patient-specific Ig/TCR gene rearrangements depends on the time point during therapy: implications for minimal residual disease monitoring." Leukemia **22**(3): 641-644.

van der Velden, V. H. J., et al. (2007). "Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data." Leukemia **21**: 604.

van Dongen, J., et al. (1992). "Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction." Leukemia **6**(1): 47-59.

van Dongen, J. J., et al. (1999). "Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia." Leukemia **13**(12): 1901-1928.

Veltroni, M., et al. (2003). "Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia." Haematologica **88**(11): 1245-1252.

Verhagen, O. J., et al. (2000). "Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia." Leukemia **14**(8): 1426-1435.

Vidriales, M. B., et al. (2003). "Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value." Blood **101**(12): 4695-4700.

Vidriales, M. B., et al. (2003). "Minimal residual disease monitoring by flow cytometry." Best Pract Res Clin Haematol **16**(4): 599-612.

Weir, E. G., et al. (1999). "A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for residual disease detection." Leukemia **13**(4): 558-567.

