

Aus dem CC -14 Klinik für Hämatologie, Onkologie und
Tumorimmunologie des Campus Benjamin Franklin
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zytogenetische Veränderungen im Rezidiv akuter Leukämien
nach allogener Stammzelltransplantation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gregor Richter
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. I.-W. Blau
 2. Prof. Dr. med. M. Freund
 3. Prof. Dr. med. N. Kröger

Datum der Promotion: 22. 03. 2013

Vorveröffentlichungen der Dissertation:

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des CC 14 Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie, Campus Benjamin Franklin der Charite - Universitätsmedizin Berlin, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht.

Publikation:

Schmidt-Hieber M, Blau IW, Richter G, Türkmen S, Bommer C, Thiel G, Neitzel H, Stroux A, Uharek L, Thiel E, Blau O. Cytogenetic studies in acute leukemia patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2010; 198: 135-143

1. EINLEITUNG	7
1.1 Grundlagen.....	8
1.1.1 Die Hämatopoese.....	8
1.1.2 Akute Leukämien: Ätiologie, Diagnostik und Therapie	9
1.1.3 Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen.....	14
1.1.4 Monitoring der minimalen Resterkrankung (mrd)	17
1.1.4.1 Immunologisch / Immunphänotypisch / FACS	17
1.1.4.2 Zytogenetische Kulturmethoden / G-Bänderungstechnik / Konventionelle Zytogenetik / Chromosennomenklatur	17
1.1.4.3 Molekularzytogenetisches Monitoring der minimalen Resterkrankung	19
1.1.4.4 Erweiterte Chromosomenanalysen: Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) / Multicolor FISH (M- FISH) / Comparative genomische Hybridisierung (CGH)	19
1.1.4.5 Molekulargenetisch PCR/RT-PCR	21
1.1.5 Zytogenetik bei akuten Leukämien	21
1.1.6 Molekulargenetik bei akuten Leukämien	23
1.1.7 Ziele der Arbeit	27
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 Patienten	28
2.2 Statistik und Definitionen	30
3. ERGEBNISSE.....	31
3.1 Karyotyp, Überleben und Todesursachen bei Patienten mit einer Karyotypveränderung im Rezidiv nach allo-SZT.....	31
3.2 Karyotypen, Überleben und Todesursache bei Patienten, die den gleichen Karyotyp vor allo- SZT und im Rezidiv hatten	36
3.3 Charakterisierung der Karyotypveränderungen.....	37
3.4 Einfluss einer zusätzlichen strukturellen Chromosom 1 Aberration im Rezidiv nach allo-SZT auf Mortalitätsraten.....	38
3.5 Entdeckung einer neuen Entität	40

3.6 Unterschiede der Karyotypveränderungen im Rezidiv zwischen mit einer alkylierenden Substanz konditionierten Patienten und nicht mit einer alkylierenden Substanz konditionierten Patienten.....	42
3.7 Studienlage.....	43
4. DISKUSSION.....	44
5. ZUSAMMENFASSUNG	56
6. LITERATURVERZEICHNIS	58
7. ERKLÄRUNG AN EIDES STATT.....	72
8. DANKSAGUNG.....	73
9. CURRICULUM VITAE	74

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
BFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
TBI	Total Body Irradiation
KM	Knochenmark
PB	Peripheres Blut
SZT	Stammzelltransplantation
SN	Sekundäre Neoplasien
ST	Solide Tumoren
LK	Lymphknoten
AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
DNA	Desoxyribonucleicacid
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Allo-SZT	Allogene Stammzelltransplantation
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
mrd	Minimale Resterkrankung (Minimal Residual Disease)
MRD	Matched Related Donor
MUD	Matched Unrelated Donor
MMUD	Mismatched Unrelated Donor
s.c.	subcutan
RIC	Dosis reduzierte Konditionierung (reduced intensity conditioning)
a/c GvHD	Akute/chronische Graft versus Host Disease
CSA	Cyclosporin A
MTX	Methotrexat
MMF	Mycophenolatmofetil

1. Einleitung

Leukämien können akut oder chronisch verlaufen. Dank der zytostatischen und Strahlentherapie sowie der allogenen Stammzelltransplantation (allo-SZT) können 70-80% der Patienten unter 60 Jahren und ungefähr 50% über 60 Jahre im Gegensatz zu früher Remissionen erreichen (Löwenberg et al. 1999). Mehr als 80% der pädiatrischen ALL erreichen lebenslang komplette Remissionen (Gustafsson et al. 2000, Schrappe et al. 2000, Moghrabi et al. 2007). Allerdings erleidet bis zu 50% der erwachsenen Patienten ein Rezidiv (Schetelig et al. 2008). Dieses geht vermutlich von Klonen der maligne entarteten Zellen aus, welche zum Zeitpunkt der Therapie resistent gegen diese waren oder wurden. Die Therapie erfolgt in Zyklen, um möglichst alle malignen Zellen zu eliminieren. Die anschließende allo-SZT soll in dem Patienten wieder ein tumorfreies blutbildendes System herstellen. Kommt es zu einem Rezidiv so kann u.a. anhand der Zytogenetik ermittelt werden, ob dieses von verbliebenen Zellen des einen Klones ausgeht. Weicht der im Rezidiv ermittelte Karyotyp von dem bei Diagnosestellung ab, bezeichnet man dieses als klonale Evolution. Hierbei kann der Chromosomensatz zusätzliche Aberrationen erlangen (Evolution) oder verlieren (Devolution). Dieses ist durch die allgemein DNA zerstörende Chemo- und Strahlentherapie zur Remissionsinduktion bzw. Konditionierung vor allo-SZT und/oder durch zunehmende genetische Instabilität des Klones mit Bildung von Subklonen bedingt. Bekannt ist die Bedeutung der verschiedenen Aberrationen auf Therapieansprechen und klinischen Verlauf (Mrozek et al. 2001, Van den Neste et al. 2007, Pullarkat et al. 2008). Wenig untersucht sind die Zytogenetik im Verlauf, ihre klonale Evolution und deren Einfluss auf den klinischen Verlauf. Für die chronischen Leukämien gibt es einige Studien, wenige für die akuten Leukämien. Cortes et al. beschrieben die klonale Evolution der Philadelphia-Chromosom positiven CML als „einen Prozess mit dem Potential den Phänotyp maligner werden zu lassen.“ So wird der Klon weniger abhängig von seiner Schlüsselmutation t(9;22) und möglicherweise nicht mehr durch Imatinib (Tyrosin Kinase Inhibitor) therapierbar (Cortes J et al. 2004). Shah et al. beschrieben die Karyotypen im Rezidiv von 19 Patienten mit CML nach allo-SZT und fanden neben dem vorher bei den Patienten bekannten Philadelphia Chromosom zusätzliche Aberrationen, welche sich total von konventionell therapierten Patienten im Rezidiv unterschieden. Strukturelle Chromosom 1 Aberrationen wurden häufiger gefunden als bei einem zufälligen genetischen Mechanismus zu erwarten gewesen wäre. Sie machten keine Aussagen zu einem Einfluss auf den klinischen Verlauf (Shah et al. 1992). Karrmann et al. verglichen den Karyotyp von 131 CML Patienten im Rezidiv nach allo-SZT (122 allogene, 9 autologe) zwischen allogene und autologe transplantierten Patienten sowie mit zytotoxisch behandelten, nicht transplantierten AML Patienten. Sie fanden balanzierte Aberrationen signifikant häufiger ($p = 0.03$) nach allogener als nach autologer SZT. Die für AML nach Radiochemotherapie induzierten, typischen Veränderungen wurden sehr selten nach SZT gefunden. Dies könnte auf einem anderen Mechanismus der Schädigung bzw. genetischer Instabilität beruhen (Karrmann et al. 2007). Lawler et al. verglichen die Karyotypen initial/im Rezidiv bei 13 AML und 5 ALL Patienten nach allo-SZT. Sie fanden in 7 von 8 Patienten Aberrationen, die bei Diagnosestellung einen normalen Karyotyp aufwiesen und in 2 Patienten 2 unabhängige Klone und hielten die TBI für die wahrscheinlichste Ursache. Sie stellten aber keine Beziehung zwischen Art der Aberration und klinischem Verlauf her (Lawler et al. 1990). Frassoni et al. verglichen in einer Multi-Center-Studie 117 Patienten (41 AML; 76 ALL) nach

allo-SZT und fanden im Rezidiv bei 10 Patienten neue Karyotypen, stellten aber auch keine Beziehung zwischen Art der Aberration und Klinik her (Frassoni et al. 1988). Kern et al verglichen die Karyotypen von 117 AML Patienten bei Diagnosestellung und im Rezidiv, fanden bei 38% eine Karyotypevolution (bei 36% der initial normalen und bei 39% der initial aberranten) und konnten diese mit signifikant kürzerer Rezidiv-freier Zeit (relapse free survival; RFS) korrelieren. Sie fanden auch eine höhere Frequenz von Evolutionen bei Karyotypen der „ungünstig“- Gruppe (s.u. Zytogenetik bei Leukämien). Karyotyp-Aberrationen bei Diagnose hatten keinen Einfluss auf Therapieansprechen aber beeinflussten Überleben und „Ereignis freie Zeit“ signifikant. Die Patienten erhielten keine Stammzelltransplantation (Kern et al. 2002).

1.1 Grundlagen

1.1.1 Die Hämatopoese

Die normale Hämatopoese beginnt mit der Proliferation und Differenzierung von pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen (HSZ). Sehr frühe HSZ tragen charakteristischer Weise nicht die Glykoprotein-Oberflächenmarker CD 34 und nicht CD 38. Besonders CD 34 wird allerdings als Stammzellmarker benutzt, da dessen Expression während der Differenzierung in andere Zellen schnell herunter reguliert wird. Die CD 34 positiven Zellen differenzieren unter der Wirkung von Wachstumsfaktoren zu den verschiedensten Blutzellen, welche ein Spektrum an unterschiedlichen Funktionen übernehmen. Die Stammzellen befinden sich beim Adulten im Knochenmark der Wirbelkörper, der Rippen, des Sternum, des Schädels, des Kreuzbeines, dem Becken und dem proximalen Femur und Humerus. Ausnahmen sind die Fetalperiode, die Kindheit, sowie pathologische Anpassungsreaktionen unter speziellen Bedingungen. Beim Feten sind vom 0.-2. Monat der Dottersack, vom 2.-7. Monat Leber und Milz die Blutbildungsorte. Ab dem 5. Monat sowie während der Kindheit ist das Mark praktisch aller Knochen Ort der Blutbildung. Bei vielen pathologischen Prozessen breitet sich die Hämatopoese wieder in Milz, Leber und andere ehemalige Orte der Hämatopoese aus.

Die HSZ liegt eingebettet in der Stromamatrix des KM. Sie ist über extrazelluläre Glykoproteine mit Makrophagen, Fibroblasten, Adipozyten, Osteoblasten und Endothelzellen verbunden. Dieses Mikromillieu produziert für die Hämatopoese essentielle Zytokine und Wachstumsfaktoren wie z.B. dem Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor (GM-CSF). Makrophagen phagozytieren u.a. anfallenden Detritus und bauen ihn in den Lysosomen ab, speichern aber auch Eisen für die Erythropoese. Durch Extrazellularverbindungen werden die Stammzellen und ihre Endprodukte in einem extramikrozirkulatorischen Kompartiment zurückgehalten und erst bei entsprechendem Bedarf in die Mikro- und somit auch Makrozirkulation entlassen. So kann wie bei der Stammzelltransplantation praktiziert, durch rekombinantes G-CSF die Degranulation der Neutrophilen erhöht werden. Die so exozytierten Metalloproteasen zerstören die endothelialen CD34 Rezeptoren. Andererseits dienen das CD34 Rezeptor-Ligand System als „Homingadressierung“ der HSZ bei der Stammzelltransplantation. Aus der CD34 positiven Stammzelle wird unter Einfluss des Stammzellfaktors (SZF) jeweils eine neue Stammzelle und entweder eine lymphatische oder gemischt myeloische Vorläuferzelle (CFUgemm, CD33+). Diese Selbsterneuerungskapazität ist mit einer Telomeraseaktivität assoziiert (Calado et al. 2009). Die Telomerase ist ein oftmals auch von malignen Zellen exprimiertes Enzym und verleiht eine praktisch unbegrenzte Teilungsfähigkeit. Von der

myeloischen bzw. der lymphatischen Reihe differenzieren die Zellen unter Einfluss von Wachstumsfaktoren über mehrere Schritte zu Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, neutrophile-, eosinophile- und basophile Granulozyten, T- bzw. B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen. Monozyten wandern in verschiedene Gewebe aus und werden u.a. zu Alveolarmakrophagen, hepatischen Kupferzellen oder Osteoklasten. Die Verteilung der Gesamtkapazität der HP auf die einzelnen Zelllinien erfolgt fein reguliert auf einem Basisbedarf. Wird einer der Regelmechanismen aus seinem Equilibrium gestört, so wird selektiv die entsprechende Zelllinie bzw. Art mehr oder weniger produziert. Bei Hypoxämie wird von den peritubulären Nephrozyten mehr Erythropoetin (EPO) gebildet, welches die myeloische Vorläuferzelle von vier möglichen Differenzierungsschritten in die für die Erythropoese wichtigen BFUe lenkt. Bei Fehlen von EPO bei Nephropathien entwickelt sich eine Anämie. Bei Infektionen wird über IL-1, IL-6 und TNF-alpha ebenso eine temporäre Anämie induziert. Das hepatische Thrombopoetin (TPO) reguliert über eine konstant gebildete Menge die Thrombopoese auf allen Stufen von den Progenitorzellen bis zu den Megakaryozyten. Die Zellen der unspezifischen (Granulozyten) und spezifischen Immunität (Lymphozyten) werden über entsprechende Mechanismen je nach Bedarf selektiv mehr gebildet. So erhöht sich bei bakteriellen Infektionen die Anzahl der neutrophilen Granulozyten und bei parasitären Infektionen die der basophilen Granulozyten (M.F.Fey 2007). Einige Autoren vermuten auch eine immunmodulatorische, feinabstimmende Funktion des Knochenmarkes und sehen es als potentiell Target für Immuntherapien und anti-Tumor Vakzinationen (Zhao et al. 2011).

Das hämatopoetische System versorgt im physiologischen Zustand das Gesamtkörpersystem mit einer ausreichenden Anzahl von Zellen mit Funktionen. Ein Mangel an ihnen ist fast ebenso schädlich wie ein zu viel. So kann eine Polyglobulie trotz vermeintlich verbesserter Sauerstofftransportkapazität zu einem gegenteiligen Effekt durch Hämatokriterhöhung und somit Viskositätserhöhung führen. Um ein steady state zwischen Produktion und Entsorgung zu gewährleisten, muss auch der Abbau reguliert sein. So altern die schon als Retikulozyten kernlosen Erythrozyten nahezu passiv. Durch fehlenden Proteinexpressionsapparat können diese keine Struktur- und Funktionsproteine nachsynthetisieren und so wird sukzessive die Anzahl der funktionellen Proteine vermindert. Trotz einer Glutathionfunktion gegen Stress durch freie Radikale sterben sie hauptsächlich durch diese. Andere kernhaltige Blutzellen wie neutrophile Granulozyten sterben hingegen durch Apoptose. Gestörte Apoptosemechanismen tragen zur Entstehung vieler hämatologischer Neoplasien bei. Eine weitere Besonderheit des hämatopoetischen Systems ist die genetische Instabilität der T- und B-Zellen. Durch genetische Rekombination im Bereich der Antikörperbildung durch B-Zellen und der T-Zellrezeptor Diversität und der hohen Zellteilungsrate der an der Hämatopoese beteiligten Zellen allgemein erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, genetische Defekte zu erwerben und zu akkumulieren im Vergleich zu anderen Gewebearten des menschlichen Körpers.

1.1.2 Akute Leukämien: Ätiologie, Diagnostik und Therapie

„Akute Leukämien entstehen durch maligne Transformation myeloischer oder lymphatischer Vorläuferzellen im Knochenmark auf einer meist frühen, unreifen Stufe der Hämatopoese. Grundlage der Transformation sind genetische Veränderungen, entweder im Rahmen von bei diesen Erkrankungen häufig auftretenden balancierten chromosomalen Translokationen oder

durch andere Mutationsereignisse im Genom von hämatopoetischen Vorläuferzellen“ (Sargin et al. 2003). Die Mutationen betreffen meist Gene, welche Transkriptionsfaktoren oder Komponenten des Transkriptionskomplexes kodieren (Look et al. 1997). „Diese Veränderungen stören das physiologische Wechselspiel von Proliferation, Apoptose und Differenzierung, welches im außerordentlich schnell wachsenden Knochenmark normalerweise die Homöostase der Zellen des peripheren Blutes gewährleistet. Dies führt zur Akkumulation von klonalen, invasiven, reifungsgestörten und hoch proliferativen myeloischen oder lymphatischen Vorläuferzellen (den leukämischen Blasten) im Knochenmark und in anderen Organen“ (Sargin et al. 2003).

Akute myeloische Leukämie (AML)

Die Erkrankung ist Folge der Infiltration des Knochenmarks durch eine erhöhte Anzahl von myeloisch differenzierten, in ihrer Ausreifung auf einer frühen Stufe arretierten leukämischen Blasten. Oft entsteht durch eine Verdrängung der normalen Hämatopoese eine hämatopoetische Insuffizienz (Granulozytopenie, Thrombozytopenie, Anämie) mit oder ohne Leukozytose (Löwenberg et al. 1999). Die jährliche Inzidenz der AML in Europa liegt etwa bei 2-5 pro 100.000 (www.seer.cancer.gov), mit zunehmender Häufigkeit im Alter. Die kumulative Inzidenz aller Altersgruppen der AML in den USA von 1972 bis 1992 betrug 2,4 pro 100.000, bei den über 65-Jährigen 12,6 pro 100.000 (Kosary et al. 1995). Die Ätiologie der Erkrankung ist letztlich unklar und wahrscheinlich multifaktoriell, d.h. sie entwickelt sich bei entsprechender Prädisposition und unter Einfluß externer Faktoren. Die deutliche Häufung der AML bei bestimmten hereditären Erkrankungen (wie Trisomie 21; Down Syndrom) zeigt, dass eine genetische Prädisposition möglich ist. Umweltfaktoren, wie die Exposition bestimmter Chemikalien (u.a. Benzol und petrochemische Erzeugnisse), Rauchen oder ionisierende Strahlung wurden ebenfalls mit einer deutlichen Häufung der Erkrankung assoziiert. Die klinischen Symptome sind vielfältig und unspezifisch. Meistens präsentieren sich Patienten mit Zeichen der Erschöpfung, Blutungen, Infektionen, Fieber, Blässe und Belastungsdyspnoe wegen der Verdrängung der HP. Zusätzliche Symptomkomplexe auf Grund der Gewebsinfiltration sind u.a. Hepatomegalie, Splenomegalie, Hautveränderungen, Lymphadenopathie, Knochenschmerzen, Gingivitiden und neurologische ZNS/PNS-Symptome. Durch die Hyperleukozytose entstehen leukostatische Symptome (Gefahr der Leukostase bei Blasten $> 100.000/\mu\text{l}$) (Gökbuget et al. 2005)) mit okulärer und cerebrovaskulärer Dysfunktion, sowie Hyperurikämien durch erhöhten Zellumsatz und Tumorlyse (Löwenberg et al. 1999). Paraneoplastische Symptome sind bei hämatologischen Neoplasien mit bis zu 11% (vs. 8% bei soliden Neoplasien) beschrieben. Diese werden überwiegend durch Lymphome mit direkter osteolytischer Aktivität und resultierender, prognosemindernder Hyperkalzämie verursacht (Pelosof et al. 2010).

Abhängig von ihrem spontanen Auftreten, ihrer Entwicklung aus einem myelodysplastischen Syndrom oder ihrer Assoziation mit einer vorangegangenen Chemo- oder Strahlentherapie spricht man von „de novo“, „sekundärer“ oder „Therapie assoziierter“ AML. Die Therapie assoziierte AML kommt meist nach einer Behandlung mit einer alkylierenden Substanz oder Topoisomerase-II-Inhibitoren mit einer Häufung 2-10 Jahre nach Beginn der Therapie vor. Nach

Topoisomerase-II-Inhibitorgabe wurde meist eine Latenzzeit von 2-3 Jahren, nach Gabe einer alkylierenden Substanz eine Latenzzeit von 5-10 Jahren beobachtet. Beide Subtypen der Therapie assoziierten AML sind mit charakteristischen zytogenetischen Veränderungen assoziiert (11q23-Veränderungen nach Topoisomerase-II-Inhibitoren, Aberrationen an 5q oder 7q nach Therapie mit einer alkylierenden Substanz) (Löwenberg et al. 1999). Es mehren sich Hinweise, die AML organisieren sich in einer zellulären Hierarchie ähnlich anderen Gewebearten und kommuniziert u.a. mit lokalen Fibroblasten. So bilden Leukämische Stammzellen (LSZ) mit einer Selbsterneuerungsfähigkeit den Apex der Kaskade welche dann zu „Bulk leukemic blasts“ differenzieren. AML Infiltrationen induzieren häufig die Angiogenese durch VEGF und BFGF. VEGF und VEGF-Rezeptoren werden wahrscheinlich von den AML-Zellen selbst produziert/exprimiert (Löwenberg 2008). Das Unvermögen die LSZ zu eradizieren wird momentan als Schwachstelle der Therapie diskutiert (Grimwade et al. 2010). Dias und Kollegen zeigten, dass von Stromazellen produziertes VEGF-C die AML Zellen vor Chemotherapie-induzierter Apoptose schützten (S Dias et al. 2002). Prognostisch ungünstig sind ein Alter über 60 Jahre, eine Therapie assoziierte und sekundäre Genese, Leukozytose über 20.000/mm³ und erhöhte Serum Laktatdehydrogenase (LDH) bei Diagnosestellung (Löwenberg et al. 1999).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien (AML)

Kategorie	Leukämieformen
AML mit typischen zytogenetischen Veränderungen	AML mit t(8;21)(q22;q22); AML-1/ETO AML mit abnormen KM-Eosinophilen und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22);CBF-MYH11 Akute Promyelozytenleukämie –AML M3 mit t(15;17)(q22;q11-12)(PML-RAR α) und Varianten AML mit 11q23-(MLL) Anomalien
AML mit multilineärer Dysplasie (mindestens zwei Linien betroffen)	AML mit vorausgegangener Myelodysplasie/Myeloproliferativem Syndrom De novo AML ohne vorausgegangenem Syndrom
Therapie induzierte AML und Therapie assoziiertes Myelodysplastisches Syndrom (MDS)	AML/MDS nach Gabe einer alkylierenden Substanz AML/MDS nach Topoisomerase-II-Inhibitorgabe AML/MDS nach sonstiger Chemo-/Strahlentherapie
AML ohne andere Einordnungsmöglichkeit	AML, minimaldifferenziert (FAB M0) AML ohne Ausreifung (FAB M1) AML mit Ausreifung (FAB M2) Akute Myelomonozytäre Leukämie (FAB M4) Akute monozytäre Leukämie (FAB M5a,b) Akute Erythroleukämie (FAB M6) Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7) Akute Basophilenleukämie Akute Panmyelose mit Myelofibrose Myelosarkom/Chlorom

Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Die ALL des Erwachsenen ist mit einer Inzidenz von 1 pro 100.000 in Europa deutlich seltener als die AML (Bassan und Hoelzer 2011). Die Inzidenz der ALL in den USA beträgt zurzeit 1,5 pro 100.000 mit Häufungen der Altersgruppen 2 bis 5 Jahren und über 50 Jahren. Am häufigsten sind Kaukasier und in Städten lebende Menschen betroffen (A Jemal et al. 2006). Eine Metaanalyse von Fall-Kontroll Studien konnte eine Assoziation von niedrigeren magnetischen Feldern und pädiatrischen ALL Fällen nicht ausschließen (Pelissari et al. 2009). Die Remissionsraten liegen zwischen 74%-93%. Aber 2/3 der unter 60-Jährigen und über 90% der über 60-Jährigen versterben an der Erkrankung (Rowe et al. 2008). Ein positiver Trend ist bei 5 Jahres Überleben zu beobachten. Es stieg von 14% auf 20% beim Vergleich von 1980 bis 1984 mit 2000 bis 2004 (Pulte et al. 2009, Gökbüget et al. 2009). Es handelt sich auch hier um eine klonale Erkrankung, mit einer Infiltration des Knochenmarks von > 25% durch lymphatisch determinierte leukämische Blasten. Die Symptome sind ähnlich der AML mit Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, atraumatischen Petechien, Dyspnoe, Schwindel und Infektionen. Zum Teil treten aber auch „nur“ Schmerzen der Gelenke und Extremitäten auf (S Faderl et al. 2010). Häufiger als bei der AML kommt es zu extramedullären Manifestationen. Eine durch Liquorpunktion bestätigte ZNS Beteiligung bei Diagnosestellung findet sich bei 6% (1% bis 10%) der Patienten mit Lähmungen/Ausfall der Hirnnerven und anderen neurologischen Dysfunktionen. Es wird zusätzlich mit intrathekal instilliertem Methotrexat alleine oder in Kombination mit Cytarabin und Prednisolon mit/ohne Bestrahlung der Neuroachse behandelt (HM Lazarus et al. 2006). Zusätzlich kommt es bei der T-ALL häufiger als bei der B-ALL oder AML zu paraneoplastischen Hyperkalzämien. Braun und Kollegen berichteten über eine 41-jährige Patientin ohne medizinische Vorgeschichte, die sich mit einer akuten Pankreatitis durch schwere Hyperkalzämie als Erstmanifestation einer T-ALL vorstellte. Die T-ALL wurde durch KM-Stanzbiopsie und Immunphänotypisierung bei normalen Parathormon-related-Peptide (PTHrP) Serumwerten gesichert (C Braun et al. 2007). In den meisten Fällen zeigen ALL-Blasten Merkmale der Differenzierung von B-Vorläuferzellen, seltener von T-Zellen oder reiferen B-Zellen. Die wichtigsten ungünstigen Prognosefaktoren sind: Alter über 55 Jahre und Leukozytenzahlen, bei B-Zell-Vorläufer ALL $\geq 30 \times 10^9/L$, bei T-Zell-Vorläufer ALL $\geq 100 \times 10^9/L$ (Hölzer, Thiel und Löffler 1988), sowie schlechtes frühes Therapieansprechen und hohe mrd-Level (s.u.) nach Ende der Induktion (Smith et al. 1996, Verma et al. 2001, Silverman et al. 2003, Schultz et al. 2007, Borowitz et al. 2008).

Die Einteilung der ALL erfolgt nach dem Entwicklungsstadium des malignen Klons (Bene et al. 1995) und nach der T- oder B-Zelllinie.

Diagnostik

Die Patienten werden meist wegen der oben genannten Symptome vorstellig. Der Großteil der chronischen Leukämien wird erst bei Erstellen eines Routineblutbildes entdeckt. Dieser unspezifischen Leukozytose folgt zur Diagnosesicherung eine Beckenkammstanzbiopsie und/oder eine Aspirationszytologie unter lokal- oder Allgemeinanästhesie (bei Kindern). Die Beckenkammstanzbiopsie muss zeitaufwendig entkalkt werden, liefert aber auch Aussagen über die KM-Histologie. Die Aspirationszytologie ist nach Färbung sofort beurteilbar, zeigt aber nur einzelne Zellen und keine Histologie. Die Zellen werden zuerst lichtmikroskopisch

morphologisch beurteilt. Es wird versucht, die Zugehörigkeit der Zelle zu einer Zelllinie und den Grad der Infiltration bzw. den prozentualen Anteil der Blasten im KM zu bestimmen. Definitionsgemäß müssen für die AML $\geq 20\%$ Blasten und für die ALL $\geq 25\%$ Blasten nachgewiesen werden. Sind weniger als 20% Blasten im KM und die Zytogenetik ist aberrant wird die Diagnose „Myelodysplasie mit zytogenetischen Anomalitäten“ gestellt. Blasten werden als Prozentzahl aller kernhaltigen Zellen bestimmt und im peripheren Blut aus 200 Zellen und im Knochenmark aus 500 Zellen gezählt. Der Grad der Dysplasie in den verschiedenen Zelllinien wird bestimmt um evtl. die Diagnose der multilineären Dysplasie zu stellen. Anschließend wird mit der Fluoreszenz Aktivierten Zell Sortierung (Fluorescent activated cell sorting; FACS) eine Immunphänotypisierung erstellt, um die malignen Klone einer Zelllinie (myeloid, B-Zell, T-Zell) zuzuordnen (Betz et al. 2010).

Therapie

Ziel der Therapie ist das Erreichen einer kompletten Remission, also die Normalisierung des Blutbildes und Reduktion der blastären Zellen im KM $< 5\%$. Dafür stehen momentan die Radio-Chemotherapie zum Abladieren des gesamten blutbildenden Systems einschließlich der malignen Zellen gefolgt von der peripheren Blutstammzelltransplantation in erster Remission zum Installieren eines neuen, tumorfreien blutbildenden Systems mit eventuell adjuvanten Maßnahmen zur Verfügung. Dabei zeigt sich allerdings ein Vorteil der allogenen-MRD-SZT in 1. CR nur bei Hochrisikopatienten (A Thiebaut et al. 2000). Bei Rezidivpatienten ist die Indikation für eine SZT unstrittig. Die Chemotherapie wird unterteilt in:

- 1) Remissionsinduktion: Verminderung der Zahl maligner Zellen durch Chemotherapie. Hier meist Anthrazykline (Daunorubicin) und Cytarabin, mit denen eine CR durchschnittlich in 70-80% bei unter 60-Jährigen und ungefähr 50% bei über 60-Jährigen erreicht werden kann (Löwenberg 2008).
- 2) Konsolidierung und Erhaltung: mit hochdosiertem Cytarabin (Mayer et al. 1994).
- 3) Reinduktion: Vernichtung weiterer Leukämiezellen welche zum Therapiezeitpunkt entweder in der G0 Phase, in schlecht perfundierten Kompartimenten oder aus anderem Grund resistent waren.
- 4) Postinduktionstherapie: Verhinderung eines Rezidives mit drei Therapieoptionen für jüngere Patienten. Allogene Stammzelltransplantation, autologe Stammzelltransplantation oder weitere Chemotherapie.

1.1.3 Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen

Die Stammzelltransplantation wurde 1957 das erste Mal von Thomas et al einem Tiermodell folgend durchgeführt (Thomas et al. 1957). Erste Langzeitüberlebende der Transplantation waren Patienten mit Schwerer kombinierter Immundefizienz (Severe Combined Immunodeficiency-SCID; Adenosindesaminase-/Nucleosidphosphorylasemangel). Heutzutage werden weltweit > 20.000 Knochenmarkstammzelltransplantationen pro Jahr durchgeführt. Das Indikationsspektrum hat sich von AML, ALL und CML zu Hoch-Risiko-CML, MDS und Myelofibrose ausgeweitet. Heute wird die Indikation sogar für nicht maligne Erkrankungen wie aplastische Anämie, Hämoglobinopathien und angeborene Enzymdefekte der hämatologischen Zellen wie SCID oder Glukose-6-Phosphatdehydrogenasemangel gestellt. Ein HIV-Patient mit AIDS wurde unter Verwendung eines Transplantates mit mutiertem CCR5 Δ 32-Rezeptor geheilt (Hütter et al. 2009, Allers et al. 2011). Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen bei Leukämien hat zwei Hauptziele:

- 1) Der Empfänger erhält ein neues, von malignen Zellen befreites Blutbildungssystem.
- 2) Die Ausnutzung des „Graft vs. Leukemia“ Effektes (s.u.).

Da wie oben beschrieben es bisher allgemein nicht gelingt spezifisch nur die leukämischen Zellen zu zerstören, tut man dies mittels Strahlen- und/oder Chemotherapie mit allen Zellen der Hämatopoese. Der Empfänger wird einer Konditionierungstherapie unterzogen, um die malignen Zellen und sein Immunsystem zu zerstören. Dafür erhält er z.B.: Cyclophosphamid 60 mg/kg KG (Alkylierende Substanz) und 12 Gy TBI direkt vor der SZT. Dosis reduzierte Intensitätskonditionierungen (RIC) sind nicht-myeloablativ, verträglicher aber mit höheren Rezidiv-Raten assoziiert (Blau et al. 2006). Durch die Konditionierung wird eine Neutropenie induziert, die im Durchschnitt 14 Tage dauert. Während dieser Zeit sind die Patienten hoch Infektionsgefährdet und sollten isoliert untergebracht werden. Anschließend wird durch die SZT ein neues blutbildendes System installiert. Für die SZT kann autologes oder allogenes Material verwendet werden. Beste Spender-Empfänger Paare sind immunologisch gesehen eineiige Zwillinge. Bei dieser syngenen SZT ist allerdings das Rezidivrisiko – wahrscheinlich wegen des fehlenden GvL Effektes (s.u.) - erhöht. Es kommen zwei mögliche Transplantatentnahmetechniken in Frage. Beiden geht eine hochdosierte myeloablativ Radiochemotherapie des Patienten voraus. Es werden folgende drei Abkürzungen für die Stammzellspender-Empfänger Kombinationen benutzt:

- 1) Matched Related Donor (MRD); HLA-kompatibler, verwandter Spender,
- 2) Matched Unrelated Donor (MUD); HLA-kompatibler, unverwandter Spender
- 3) Mismatched Unrelated Donor (MMUD); HLA-inkompatibler, unverwandter Spender

Transplantation von Stammzellen aus dem Knochenmark (Knochenmarkstransplantation - KMT)

Bei der KM-Transplantation werden in Allgemeinanästhesie KM-Zellen gewonnen und dem Empfänger reinfundiert. Diese Methode war die erste, sie ist allerdings komplikationsträchtiger und für potentielle Spender abschreckend. Für Patienten mit Indikation zur allo-SZT wegen nicht maligner Erkrankungen wird Knochenmark wegen der geringeren Inzidenz chronischer GvHD (s.u.) bevorzugt. Diese Patienten würden weniger von dem gleichzeitigen GvL Effekt profitieren (Bornhäuser et al. 2000).

Transplantation von Stammzellen aus dem peripheren Blut (Periphere Blutstammzelltransplantation - PBSZT)

Bei der heutzutage häufiger durchgeführten allogenen PBSZT wird zuerst dem Empfänger peripheres venöses Blut entnommen und sein HLA-Typ bestimmt. Ist ein geeigneter Spender gefunden, wird ihm der rekombinant hergestellte Wachstumsfaktor G-CSF s.c. injiziert. Dieser wirkt auf verschiedene Stufen der Hämatopoese und besonders der Stammzellen proliferativ und mobilisiert diese aus dem KM. Bei der folgenden Leukapherese werden dem Spenderblut nun mononukleäre Zellen (diese Fraktion enthält u.a. hämatopoetische Stammzellen) entzogen und übrige Blutbestandteile reinfundiert. Vorteil der PBSZT ist die Eleganz des Verfahrens für den Spender sowie ein besseres und schnelleres Anwachsen des Transplantates, hier insbesondere von Neutrophilen und Thrombozyten.

Graft versus Host Disease/Graft versus Leukemia Effekt

Die Graft versus Host Disease (GvHD) kann als Nebeneffekt der SZT akut oder chronisch verlaufen und ist formalpathologisch eine Abstoßungsentzündung vorwiegend an Schleimhäuten und deren Übergängen zur Haut.

Die akute GvHD tritt in bis zu 85% (Ferrara et al. 2005) aller Transplantierten bis zu drei Monate post-SZT auf. Die ursprüngliche Einteilung war: bis Tag + 100 akut, nach Tag + 100 chronisch. Aktuell gibt es vier Gruppen: klassisch akut, Überlappung, spät-akut und klassisch chronisch (Arora et al. 2009). Alloreaktive T-Lymphozyten des Spenders (Ferrara et al. 2005) führen zu Schädigung der Haut (makulopapulöses Exanthem, Erythrodermie), des Darmes (Enteritis) und der Leber (Hepatitis). Zur Einteilung werden den drei hauptbetroffenen Organen Schweregrade zugeteilt (Haut- Stadium des Exanthemes (1-4), Leber- Bilirubinwert (1-4), Darm-Diarrösvolumen (1-4)). Die drei Werte gehen in ein Graduierungssystem von 0- fehlend bis 4- lebensbedrohlich ein. Als Risikofaktoren gelten Grad der Histoinkompatibilität zwischen Spender-Empfänger, Alter des Patienten bei allo-SZT, Art der Konditionierung, Alter des Spenders und eine Geschlechtsdifferenz zwischen Spender-Empfänger (Glucksberg et al. 2005). Prophylaktisch kann Cyclosporin A und Methotrexat gegeben werden, zur Therapie Prednisolon, Antithymozytenglobulin oder monoklonale T-Zellantikörper (Ferrara et al. 2005).

Die chronische GvHD tritt in 30-70% aller Transplantierten mit einem mittleren Beginn 4-6 Monate nach der SZT auf (S Lee 2010). Klinisch präsentieren sich die Patienten mit inflammatorischen und fibrosierenden Symptomen, wie papulösem Exanthem, Konjunktivitis (Sicca Syndrom), Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie (BOOP) mit Leber (Autoimmunhepatitis oder biliärer Zirrhose) und Darmbeteiligung (chronische Diarrhöe, Malabsorptionssyndrom). Bei ungefähr 50% der Patienten betrifft die cGvHD 3 oder mehr Organe. Es gibt zwei in randomisierten Studien bestätigte cGvHD Strategien zur Prophylaxe. Diese sind die Gabe von anti-Thymozyten-Globulin (ATG) und die Verwendung von G-CSF stimuliertem KM als HSZ-Quelle (Bacigalupo et al. 2006, Finke et al. 2009, J Morton et al. 2001). „Die beste Prophylaxe der chronischen GvHD ist die Verhinderung der akuten GvHD. Die chronische GvHD bleibt Hauptursache der hohen Morbidität und Therapie assoziierten Mortalität nach allo-SZT“ (Blau 2007). Therapeutischer Standard ist aktuell: Prednison 0,5-1,0 mg/kg KG pro Tag mit/ohne Calcineurininhibitor (SJ Lee 2010).

Der gleiche Effekt wird vorteilhaft für den Patienten als „Graft vs. Leukemia/Disease“-Effekt (GvL/GvD) bezeichnet. So bekämpft das vom Spender transplantierte Immunsystem restlich verbliebene Blasten. Der GvL Effekt kann solange ausgenutzt werden, bis die gleichzeitig auftretende GvHD für den Patienten nicht mehr tolerierbar ist und mittels pharmakologischer Immunsuppression werden beide gestoppt. Ein zukünftiger Ansatz zur Therapie bzw. Prävention des Auftretens der GvHD kann die ex-vivo Manipulation und Retransfusion von regulatorischen T-Zellen darstellen (Wang et al. 2011, Sagoo et al. 2011).

Die allogene PBSZ/KM-Transplantation verringert das Rezidivrisiko durch den GvL-Effekt. Dies wird durch die höhere Rezidivrate und geringere akute und chronische GvHD Inzidenz bei Spender-T-Zell-depletierten Transplantaten deutlich. Zusätzlich können bei einem Rezidiv Spender-Lymphozyten-Infusionen („Donor-Lymphocyte-Infusion; DLI“) als Rezidivtherapie mit Erfolg auch mehrfach verabreicht werden (Kolb et al. 1990, Deol et al. 2010). Dies führt bei der AML in 15-42% zu einer Remission (Kolb et al. 1995, Collins et al. 1997, Porter et al. 2000, Choi et al. 2004, Schmid et al. 2007).

Die Vorteile der allo-SZT als Post-Induktionstherapie für jeden individuellen Patienten müssen gegen die Risiken durch Tod und Morbidität abgewogen werden, da die Mortalität durch SZT-assoziierte Komplikationen wie akuter/chronischer GvHD und Infektionen zwischen 10-40% liegen (Cornelissen et al. 2007). Ein weiteres Problem ist die iatrogene Induktion von Sekundärneoplasien durch die Radio-/Chemotherapie. In einer Metaanalyse für nach Morbus Hodgkin-Therapie auftretenden sekundären Neoplasien (SN) ist eine Inzidenz von 2% frühestens nach 2-4 Jahren beschrieben. Die SN wurden in drei Klassen eingeteilt: Non-Hodkin-Lymphome (NHL), Therapie-assoziierte-Akute Leukämien (t-AL) (dann mit typischer Zytogenetik s.o. (Löwenberg et al. 1999)) und solide Tumoren (ST). Von den soliden Tumoren (494 von 9312 analysierten Patienten mit SN) waren am häufigsten (histologisch nicht spezifiziert) Lunge (97/494), Haut (87/494), Mamma (65/494), Dünndarm/Colon/Rektum (33/494) und Magen (20/494) betroffen. Die ST hatten die längsten medianen Gesamtüberlebenszeiten (ST 36 Monate, NHL 34 Monate, t-AL 7 Monate) (Franklin 2006). Es treten nach Bestrahlung der Hals und Mediastinalen LK Regionen Schilddrüsenkarzinome auf, insbesondere nach früher verwendeten Mono-Feld Techniken (Monnier et al. 1997).

1.1.4 Monitoring der minimalen Resterkrankung (mrd)

Als das Monitoring der "Minimal residual disease" bezeichnet man molekularbiologische und immunologische Methoden, um restliche maligne Zellen zu detektieren, welche die konventionelle Lichtmikroskopie des Knochenmarkaspirates nicht mehr erfasst. Ein z.B. bei der ALL definierter Anteil der malignen Blasten < 5% aller KM-Zellen zeigt eine zytologische komplette Remission an. Erstaunlicherweise ist es nicht unbedingt notwendig, alle leukämischen Zellen zu eliminieren und die aktuellen Therapien leisten dies überwiegend noch nicht. Vielmehr geht man heute davon aus, dass eine Reduzierung der Tumormasse unter ein kritisches Volumen ausreicht. Bei verringertem Volumen ist der Organismus u.a. durch immunologische Mechanismen imstande, die Menge der restlichen malignen Zellen zu eradizieren oder zumindest auf einem CR-Level zu halten. Allerdings korreliert besonders die mrd-Positivität während der frühen Therapiephasen mit einer hohen Rezidiv rate und schlechterem Gesamtüberleben bei der kindlichen ALL (Campana 2008). Bis jetzt gibt es keine Studie, die über Langzeitüberlebende mit persistierend positivem mrd Level berichtet hat (Kern et al. 2008). Bruggemann et al berichteten, dass sie gar keine Rezidive in den ersten drei Jahren bei ALL-Patienten beobachten konnten, deren mrd Level innerhalb des ersten Monats der Therapie schnell sanken (Bruggemann et al. 2006).

Das mrd Monitoring hilft, die Prognose, das Rezidiv-Risiko vorherzusagen und die Therapie zu individualisieren.

Die im Folgenden genannten Methoden werden Routinemäßig zum Monitoring der mrd genutzt. Im Einzelnen gibt es Überschneidungen der Methoden zum mrd Monitoring und anderen Anwendungsbereichen derselben Methoden zum Detektieren genetischer Aberrationen.

1.1.4.1 Immunologisch / Immunphänotypisch / FACS

Die zur Gruppe der Durchflusszytometrie zählende Methode MFC benutzt gegen die „Cluster of Differentiation“ Glykoprotein Moleküle (CD) gerichtete monoklonale Antikörper (m-AK), welche mit verschiedenfarbigen Fluorochromen markiert sind und Zellen in vorher definierte Subpopulationen aufteilt. Diese auch zur **Immunphänotypisierung** - also Zuteilung zu einer Zelllinie aufgrund der phänotypischen Oberflächenmarker - verwendeten Methode ist sensitiv genug zum mrd-Monitoring. Hauptunterschied zur Immunphänotypisierung von Zelllinien ist die Detektion von aberranten Immunphänotypen (IP). Baer et al führten eine Immunphänotypisierung an AML-Zellen von 136 Patienten bei initialer Diagnosestellung und im Rezidiv mit neun Feldern a drei m-AKs durch und fanden bei 124/136 Patienten (91%) Veränderungen des Immunphänotyps (IP) im Rezidiv. Mit nur drei AK konnte ein AML-Rezidiv nur in 68-91% vorhergesagt werden. Mit acht mal jeweils drei AK konnten 100% der AML-Rezidive identifiziert werden (Baer et al. 2001).

1.1.4.2 Zytogenetische Kulturmethoden / G-Bänderungstechnik / Konventionelle Zytogenetik / Chromosomenomenklatur

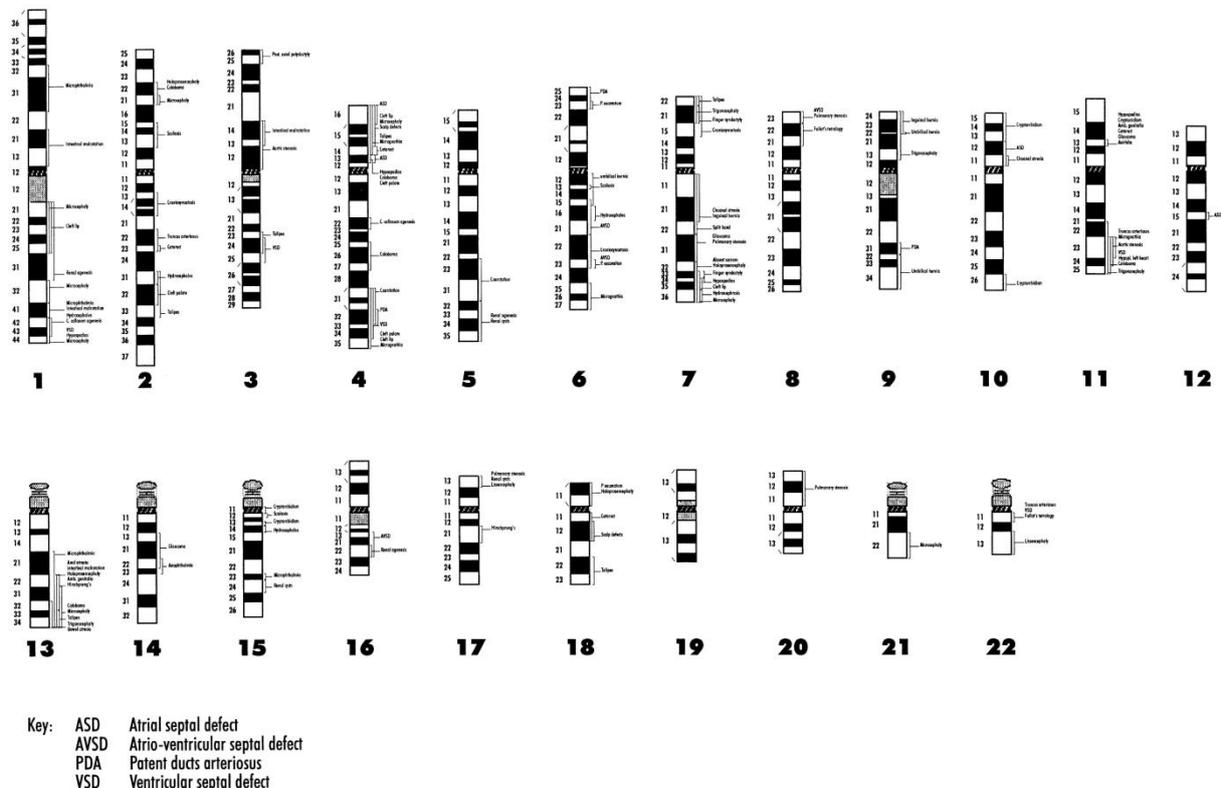
Die Untersuchung der konventionellen Zytogenetik („Conventional Cytogenetics; CC“) kann an allen zur Mitose fähigen Zellen vorgenommen werden. Es ist kein Vorwissen über zu erwartende Aberrationen erforderlich. „Die Zytogenetik liefert einen ersten Überblick über alle mikroskopisch erkennbaren Aberrationen“ (C Haferlach). Wegen einfacher Entnahme und hoher

mitotischer Ausbeute nach Stimulierung mit Phytohämagglutinin (PHA) in vitro haben sich Lymphozyten aus mit Natrium-Heparin antikoaguliertem, peripherem Blut durchgesetzt. Bei akuten Leukämien sollte sowohl eine Lymphozytenkultur aus peripherem Blut als auch eine weitere aus Knochenmarkspirat erstellt werden. Metaphasen von Kulturen aus peripherem Blut sind hier oft qualitativ und quantitativ besser geeignet. Die Lymphozyten sind als 20-30%iger Anteil im sogenannten „buffy coat“, der nach Zentrifugieren übrigen mittleren Schicht zwischen Erythrozyten (unten) und Plasma (oben) enthalten. Davon wiederum sind 55-75% T-Zellen und 15-30% B-Zellen. Nach Stimulierung mit PHA sind bei 36,5-37°C nach 24 Stunden erste, nach 60-70 Stunden maximale mitotische Aktivitäten zu beobachten. Standardisiert werden pro Patient je zweimal 0,4-0,5 ml Blut für 72-96 Stunden kultiviert. Wahlweise werden Synchronisatoren zugefügt. Zur Analyse des Karyotyps leukämischer Blasten erfolgt die Anreicherung mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark durch die Isolierung bei einem Ficoll Gradienten. Die gewonnenen mononukleären Zellen werden in einer Konzentration von 1×10^6 /ml kultiviert (Kulturmedium RPMI und fetales Kälberserum) ohne spezifischen Zelltypstimulator für 24 – 48 h. Zugabe von hypotoner 0,075 M KCL Lösung lysiert die Erythrozyten, ein Methanol-Essigsäuregemisch in einem 3:1 Verhältnis dient zur Fixierung. Zur Befundung werden 20 Metaphasen pro Patient ausgezählt. Anschließend können an dem übrigen Material Spezialuntersuchungen wie die FISH vorgenommen werden (Barch et al. 1997).

Bei der ersten **Bänderungstechnik** wurden die sogenannten Q-Banden mit einem Fluoreszenzfarbstoff Quinacrin-Mustard angefärbt. Diese wurden in der Routinediagnostik von der heute in der konventionellen Chromosomenanalyse benutzten G-Bandenfärbung mit Giemsa Farbstoff abgelöst. Mit Giemsa gefärbte Chromosomen lassen sich Lichtmikroskopisch leichter darstellen. Die G-Banden entsprechen den fluoreszierenden Banden bei der Q-Bänderung. Für die Bandenmuster wurde eine **Internationale Standard-Chromosomen-Nomenklatur** festgelegt und teils aktualisiert (Schaffer et Tommerupp 2005, Schaffer et al. 2009). Die 22 Autosomenpaare werden fortlaufend nummeriert. Jedes Chromosom wird durch das Zentromer in den kurzen Arm p („petit“) und den langen Arm q (der auf p folgende Buchstabe) eingeteilt. Die Chromosomenarme sind weiterhin durch die bei der Färbung entstehenden, charakteristischen Banden in Regionen unterteilt. Diese werden vom Zentromer ausgehend in p oder q Richtung nach distal fortlaufend nummeriert. Innerhalb dieser Regionen werden die hellen und die dunklen Banden nummeriert. In der Routinepräparation sind etwa 350 Banden zu unterscheiden. Das vom Zentromer aus gesehene Ende eines jeden p/q Armes ist jeweils von der Telomerregion begrenzt. Es existieren mehrere Theorien zur Erklärung der durch Giemsa-Färbung entstehenden Banden. So sollen manche Regionen mehr Giemsa-affine Basen enthalten oder sich in verschiedenen Kondensierungs/DNA-Packungsgraden befinden. Letztendlich bleibt die molekulare Grundlage der verschiedenen Färbungsaffinitäten unklar. Es gibt numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen. Numerische bedeuten Zugewinn oder Verlust eines ganzen Chromosoms. Sie entstehen durch Non-Disjunction in der Meiose (gametische Mutation, wird falls Individuum noch Fortpflanzungsfähig ist an die Nachkommen weitergegeben) oder Mitose (somatische Mutation, wird nicht vererbt). Strukturelle werden unterteilt in Translokationen (balanziert = Gesamtzahl erhalten, unbalanziert = Gesamtzahl nicht erhalten), Deletionen, Inversionen und Insertionen. Bei den strukturellen Chromosomenaberrationen wird

weiter in intrachromosomal (Umbauten innerhalb eines Chromosoms) und interchromosomal (Umbauten zwischen verschiedenen Chromosomen) unterschieden (Murken et al. 1996).

Abbildung 1: G-Bänderung eines autosomalen Karyotyps nach ISCN-Schema (C Brewer et al. 1998) zur Demonstration Malformations-assoziiierter Banden von 47 verschiedenen angeborenen Malformationen. Hier als Beispiel für ISCN-Schema gezeigt. Geschlechtschromosomen XX/XY nicht abgebildet.



1.1.4.3 Molekularzytogenetisches Monitoring der minimalen Resterkrankung

Die Zytogenetik kann nicht zum mrd Monitoring benutzt werden, da ihre Nachweisgrenze zu hoch ist. Es kann aber beobachtet werden, ob die aberranten Chromosomen „nachweisbar“ oder „nicht mehr nachweisbar“ sind. Dabei bedeutet „nicht nachweisbar“ aber keinesfalls mrd-Negativität.

1.1.4.4 Erweiterte Chromosomenanalysen: Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) / Multicolor FISH (M-FISH) / Comparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die traditionelle G-Bänderungstechnik der Chromosomenuntersuchung ist für die Interpretation von komplex aberranten Karyotypen sowie die Detektion von sehr kleinen, nur wenige Basenpaare umfassende Aberrationen nicht ausreichend. Die durch Färbung entstehenden charakteristischen Bandenmuster für die Chromosomenzuteilung sind bei den komplex

aberranten Chromosomen gestört und lassen sich nicht aus dem Kontext interpretieren (MacKinnon et. Chudoba 2011). Sehr kleine Aberrationen würden mit den konventionellen Bänderungstechniken übersehen und zu falsch normalen Karyotypisierungen führen (L Kearney 2006). Mit der **FISH**-Methode (Sensitivität: 1 leukämische/500 Zellen; 0,2%) können bekannte numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen mit patientenspezifischen Fluoreszierend-markierten komplementären DNA-Sonden hybridisiert werden, ohne Metaphasenpräparationen herzustellen. Die zu suchenden Gensequenzen müssen vorher zur effektiven und ökonomischen Anwendung bekannt sein. Nach hyperthermischer Denaturierung des DNA-Doppelstranges in zwei Einzelstränge wird die Patientenprobe mit der für die zu suchende Aberration spezifischen, komplementären Sonde hybridisiert. Ist die gesuchte Aberration vorhanden, so bindet die fluoreszierend markierte komplementäre Sonde jeweils über zwei (Adenin und Thymin) oder drei (Cytosin und Guanin) Wasserstoffbrückenbindungen pro Basenpaar an diese Region. Ist nach Hybridisierung und Auswaschen das Fluoreszierende Signal vorhanden, ist die vermutete Aberration bestätigt.

Die Weiterentwicklung der FISH Methode führte zur **Multicolor-FISH (M-FISH)** Technik. Im Jahr 1996 berichteten zwei Forschungsgruppen unabhängig voneinander über die Entwicklung von M-FISH (Speicher et al. 1996) und spectral Karyotyping (SKY) (Schröck et al. 1997). Beide Methoden unterscheiden sich nur in den Diskriminierungstechniken der verschiedenen markierten Proben. Durch Kombination der Farben können alle 24 humanen Chromosomen (22+XX/XY) in einem Hybridisierungsschritt identifiziert werden. Die Verwendung von n verschiedenen Fluorochromen ergibt N erreichbare Farbzusammensetzungen nach der Formel: $N = 2^n - 1$ (Kearney 2006). Auf Grund der pro Chromosom charakteristischen Zusammensetzung der einzelnen Farben (n) zu einem neuen Farbton (Pseudofarbe) kann auch bei komplex aberranten Karyotypen eine Zuteilung einzelner Bruchstücke zu den einzelnen Chromosomen erfolgen. Die Proben werden durch Schmalband-Fluoreszenzfilter und digitale Bildverarbeitung ausgewertet. Ein Nachteil bei allen Techniken die ganze Chromosomen färben ist die Unfähigkeit, intrachromosomale Umlagerungen wie Duplikationen, Deletionen oder Inversionen zu detektieren (Uhrig et al. 1999). Mehrere Faktoren bestimmen die Auflösung von m-FISH. Die Qualität der Metaphasenpräparation, der Grad der Chromosomenkondensation, die Qualität der Hybridisation und der Probenmarkierung, die Größe des umgelagerten Segmentes und die in die jeweiligen interchromosomalen Umlagerungen involvierten Fluorochrome (Kearney 2006).

Um Genom weite Unterschiede der DNA Kopienzahl durch Zugewinn und/oder Verlust von Chromosomenregionen oder ganzer Chromosomen zu erkennen, wurde die **Comparative genomische Hybridisierung (CGH)** entwickelt (Pinkel et al. 1998). Veränderungen von 100 bis mehreren Millionen Basenpaaren können so detektiert werden. Die konventionell-Lichtmikroskopische G-Bänderungs-Chromosomenanalyse erfasst nur Aberrationen mit mehr oder gleich 5-10 Millionen Basenpaaren. Eine Referenz-DNA (gesunder Gewebe) und Tumor-DNA werden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen hybridisiert. Hätten beide die gleiche „Menge“ an genetischem Material, so wären die entstehenden Fluoreszenzsignale identisch. Durch Zugewinn (meist Onkogene) oder Verlust (meist Tumorsuppressorgene) der Tumor-DNA verschiebt sich das Fluoreszenzfarbspektrum im Vergleich zur gesunden Referenz-DNA und kann automatisch erfasst werden (Solinas-Toldo et al. 1997). Eine Weiterentwicklung der array-

CGH bestand in der Verwendung von Oligonukleotiden (**oligonucleotide-CGH**). Die für die array-CGH benutzten bakteriellen artifiziiellen Chromosomen (BAC) sind in der Herstellung Zeit und Geld aufwendig und die Grenze der Auflösung wurde erreicht (Van den Ijssel et al. 2005). Oligonukleotide haben eine praktisch unbegrenzte Auflösung, sind flexibel anwendbar und kosteneffektiv (Carvalho et al. 2004). Eine von Yasar et al erstellte, retrospektive oligoarray-CGH Arbeit an AML und ALL Patienten bei Erstdiagnose und im Rezidiv konnte zusätzlich zu zytogenetisch detektierten Aberrationen in 95% der ALL und 90,5% der AML kryptische Aberrationen finden (Yasar et al. 2010). Dies zeigt die Vorteile dieser Methode, „für die Routineanwendung gibt es allerdings einige Restriktionen“, wie „die Detektion niedrigprozentiger Mosaiken“ und die „Ineffizienz in der Detektion von balanzierten Translokationen“ (Yasar et al. 2010).

1.1.4.5 Molekulargenetisch PCR/RT-PCR

Die RT-PCR ist die sensitivste aller mrd-Monitoring Methoden (Sensitivität: 0,01-0,1%). Bei der „Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction“ wird die schon durch splicing Intron-freie mRNA mit dem Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre cDNA transkribiert und diese anschließend mit der PCR ein-, oder mehr schrittig (dann „nested-PCR“-Sensitivität: 1×10^6) amplifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese nach Größe/Ladung aufgetrennt, mit einem UV-Transluminator visualisiert und mit bekannten Banden verglichen. Durch die Amplifikation ist die Methode sehr sensitiv aber auch kontaminationsanfällig. Es kann eine leukämische Zelle in bis zu 1 Million normaler Zellen detektiert werden. Als RNA-Marker dienen dabei fast ausschließlich chimäre Fusionsgene. Die molekularen Bruchpunkte der DNA sind bei den Patienten hochindividuell und oftmals tief in den Introns lokalisiert. Um dennoch die breite Masse von Patienten untersuchen zu können wird ein Paar von Primern benutzt, welche die Gen-Fusion - falls vorhanden - durch gemeinsame unspezifische Fusionspunkte in der mRNA in allen betroffenen Patienten nachweist (Mason et Griffiths 2011).

1.1.5 Zytogenetik bei akuten Leukämien

Die Zytogenetik wurde 2008 in die neue WHO-Klassifikation der hämatologischen Neoplasien aufgenommen (siehe Abb.). Zytogenetische Befunde vor der Therapie sind die wichtigsten, unabhängigen prognostischen Faktoren, um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Induktionsremission und das Rezidiv-Risiko vorherzusagen (W Xu et al. 2010).

Zytogenetik der AML

54,9% aller Erwachsenen AML zeigen zytogenetische Veränderungen, folglich zeigen 45,1% keine (Mrozek et al. 2004). Laut Betz et al. haben 45% aller akuter Leukämien aberrante Karyotypen, 15% haben einen komplex aberranten Karyotyp (mehr als drei Aberrationen) (Betz et Hess 2010). Bei der Therapie assoziierten AML haben 80-90% chromosomale Aberrationen (Fenaux 2001). Bis zu 50% der Therapie assoziierten AML und MDS haben einen komplex aberranten Karyotyp (Speicher et al. 1996, Schoch et al. 2001). Tallman et al verglichen die Therapie-assoziierte-Mortalität, Rezidivrate, krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben abhängig von drei zytogenetischen Risikogruppen der SWOG/ECOG (Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group) in 261 AML-Patienten nach MUD-allo-SZT in

erster kompletter Remission (CR) und 299 AML-Patienten in zweiter CR. Die zytogenetischen Risikogruppen hatten wenig Einfluss auf das Gesamtüberleben in 1.CR. Ein nicht-signifikant moderat positiver Einfluss konnte bei Patienten die Aberrationen der günstig-Gruppe in 2.CR festgestellt werden. Zu den „**günstigen**“ zählen: **t(8;21), t(15;17), inv(16), t(16;16), del(16q)** mit oder ohne zusätzliche Aberrationen. Zu den „**intermediären**“ zählen: **+8, -Y, +6, del(12p) und normale Karyotypen**. Die „**schlechte**“ Gruppe besteht aus: **-5, del(5q), -7, del(7q), inv(3q), t(3,3), abnormale 11q, 20q oder 21q, del(9q), t(6;9), t(9;22), abnormale 17p und komplex aberrante** (mit mehr als drei Aberrationen). Unbekannt ist das Risiko bei allen anderen mit weniger als drei Aberrationen (Tallman et al. 2007). Mrozek et al. verglichen die Zuteilung der Erwachsenen AML zu Zytogenetik abhängigen-Risikogruppen der drei größten Studiengruppen Cancer and Leukemia Group B (CALGB), United Kingdom Medical Research Council (MRC) und der SWOG/ECOG. Diese teilt die Patienten nach den 35 häufigsten Aberrationen (darunter auch „keine Aberrationen“) in die drei Risikoklassen „günstig“, „intermediär“ und „schlecht“ ein. Diese stimmen überwiegend überein mit Abweichungen in den angrenzenden Bereichen günstig/intermediär und intermediär/schlecht. Übereinstimmend sind die folgenden Gruppen. Günstig: t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22), t(16;16)(p13;q22). Intermediär: Keine Aberrationen, -Y. Schlecht: Inv(3), t(3;3), komplex (>3 Aberrationen) und komplex (>5 Aberrationen). Kriterien für die Einteilung sind: Erreichen einer kompletten Remission (complete remission; CR), Zeitdauer der CR (complete remission duration; CRD) und Gesamtlebensdauer nach Diagnosestellung (overall survival; OS). Einstimmig teilen alle drei „keine zytogenetischen Aberrationen“ in die „intermediäre“ Gruppe. Aberrationen zu haben kann - daran gemessen - also besser oder schlechter für den klinischen Verlauf sein als keine zu haben. Baer et al. fanden beim Vergleich des Immunphänotypes bei Diagnosestellung/im Rezidiv heraus, dass der Immunphänotyp bei normalem Karyotyp instabiler ist als bei aberranten. AML mit spezifischen chromosomalen Aberrationen bildet demnach immunphänotypisch stabilere Zellpopulationen als die normal-Karyotyp AML (Baer et al. 2001). Bis heute konnten bei der AML über 200 verschiedene, wiederkehrende strukturelle und numerische Aberrationen wie reziproke Translokationen, Inversionen, Insertionen, Deletionen, unbalancierte Translokationen, Isochromosomen, isodizentrische Chromosomen, isolierte Monosomien und Trisomien identifiziert werden. Erwachsenen AML hatten seltener abnormale Karyotypen als pädiatrische (55% von 4257 vs. 76% von 1184) (Mrozek et al. 2004).

Zytogenetik bei ALL

Zusammengefasst in Molekulargenetik bei ALL

1.1.6 Molekulargenetik bei akuten Leukämien

Molekulargenetik der AML

Beinahe die Hälfte (45%) der AML Patienten haben bei Diagnosestellung keine zytogenetischen Aberrationen. Bei diesen **normal-Karyotyp-AML** Patienten kann heute in 85% eine molekulare Aberration festgestellt werden (Marcucci et al. 2005, Haferlach 2007). Diese sind nach häufigster Frequenz geordnet: *NPM1* (45-55%), *FLT3-ITD* (35-45%), *IDH 1* (8-9%), *MLL-PTD* (5-10%), *CEBPA* (10%), *NRAS* (5-10%), *WT1* (8%), *RUNX1* (14-34%) und *FLT3-TKD* (5-8%) (Bacher et al. 2010). Nachfolgend werden die molekularbiologische Funktion falls bekannt und der klinische Einfluss der einzelnen Mutationen aufgelistet. Bei der *NPM1*-Mutation ist Nucleophosmin, ein Shuttleprotein zwischen Zellkern und Zytosol defekt und so dauerhaft im Zytoplasma lokalisiert. Dieses stört den ARF-p53 Tumorsuppressor Signalweg (Falini et al. 2007). Die Patienten haben eine moderate Prognose und profitieren möglicherweise nicht von einer allo-SZT in 1.CR (Marcucci et al. 2011). Die Mutation des Tyrosin-Kinase-Rezeptors *FLT3* führt zu einer Autophosphorylierung, Aktivierung der nachfolgenden Signalwege und dadurch erhöhter Proliferationsrate (Gilliland et al. 2002). Die Prognose dieser Patienten ist schlecht, besonders wenn hohe Mutationsraten verglichen mit dem Wildtyp vorliegen. Auch bei diesen Patienten ist eine allo-SZT indiziert (Marcucci et al. 2011). Mutationen von *IDH1/2* führen zu neomorpher Enzymaktivität der bei *IDH1* cytosolischen und bei *IDH2* mitochondrialen NADP⁺ abhängigen Isocitrat Dehydrogenase mit falscher Bildung des onkogenen Metaboliten R(2)-2-Hydroxyglutarat. *IDH1/2* sind auch bei neurochirurgischen Gliomen bekannt. *IDH1/2* Mutationen sind mit einer hohen Rezidivrate, verkürztem Gesamtüberleben und Krankheits-freiem Überleben assoziiert (Marcucci et al. 2001). Eine *MLL* Mutation tritt häufig bei Therapie-assoziierten Leukämien nach Gabe von Topoisomerase-II-Inhibitoren auf und kodiert einen DNA bindenden Transkriptionsfaktor (Schoch et al. 2003, Armstrong et al. 2002). Eine *MLL* Mutation führt zu kürzerer CRD, RFS, EFS aber nicht OS (gleich) (Marcucci et al. 2011). Das *CEBPA* Genprodukt ist in die Regulation und Differenzierung der Granulopoese involviert (Pabst et al. 2001). Patienten mit *CEBPA* haben oft CR, lange RFS und OS Zeiten (Marcucci et al. 2011). Das membranständige Protein *N-RAS* reguliert Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Eine Mutation von *N-RAS* kann die leukämischen Klone sensitiv für Cytarabin machen (Marcucci et al. 2011). Auch das *WT-1* (*Wilms-Tumor*) Genprodukt ist ein in die Regulation der Apoptose, Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen involvierter Transkriptionsfaktor. Die Studienlage ist Kontrovers, meist impliziert eine *WT-1* Mutation eine schlechte Prognose (Marcucci et al. 2011). Eine Mutation des *RUNX-1* Genes führt zu einer defekten Synthese des „Core binding factors“ (CBF), einem Transkriptionsfaktor. Diese Mutation ist mit den Trisomien 13 und 21 assoziiert und bildet eine eigene Entität. Erste Ergebnisse deuten auf reduzierte CR-Raten und kürzeren RFS und OS hin (Marcucci et al. 2011). Ähnlich der *FLT-ITD*, bewirkt eine Mutation des *FLT-3-TKD* Genes eine dauerhafte Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne, allerdings tritt diese *TKD*-Mutation viel seltener auf als die *ITD* und bedarf wahrscheinlich zusätzlicher, synergistischer Mutationen (Whitman et al. 2008, Bacher et al. 2008). Die

prognostische Signifikanz ist kontrovers. Klinische Studien in Phase II und III evaluieren zurzeit gegen TKD gerichtete Tyrosinkinaseinhibitoren (Marcucci et al. 2011).

Von den genannten Mutationen haben bis jetzt NPM1, CEBPA und FLT3-ITD klinische Bedeutung für Diagnose, Risiko-Stratifizierung und Therapieentscheidung (Döhner et al. 2010). AML mit NPM1 und AML mit CEBPA wurden in die WHO-Klassifikation von 2008 als eigenständige Entitäten aufgenommen (Swerdlow et al. 2008). So können Patienten mit einer isolierten NPM1 Mutation durch alleinige Chemotherapie Remissionen erreichen, eine allo-SZT kommt bei diesem Patientenkollektiv mit guter Prognose nur bei einem Rezidiv in Frage (Bacher et al. 2010). Eine Mutation t(15;17) des **PML-RAR α** Genes ist Therapie entscheidend. Wird durch den FISH Nachweis und die typische Zytomorphologie die damit verbundene Diagnose der Promyelozytenleukämie FAB M3 verifiziert, so muss umgehend die Therapie mit All-Trans-Retinsäure eingeleitet werden, um die charakteristischen, lebensbedrohlichen Koagulopathien zu verhindern (Bacher et al. 2010, Kanamaru et al. 1995). So können bei etwa 80% der Patienten die Promyelozyten zur Ausreifung in granulopoetische Zellen gebracht werden (Tallmann et al. 2002).

Molekulargenetik der AML bei aberranter Zytogenetik

Es sind momentan drei wichtige, molekulargenetisch charakterisierte defekte Gene bei der AML bekannt, welchen spezifische zytogenetische Aberrationen zugeordnet werden konnten. Diese sind: t(8;21)(q22;q22) bei AML1/ETO, inv (16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22) bei CBF-Beta/MYH11 und die akute Promyelozytenleukämie t(15;17)(q22;q11-12) bei PML/RAR α . In sehr seltenen Fällen können Patienten die durch mit FISH bestätigte Aberrationen CBF beta/MYH 11 und Runx1-CBFA2T1 ohne die typische Zytogenetik haben (Mrozek et al. 2001, Rowe et al. 2000). Weitere charakteristische Translokationen bei AML und die beteiligten Gene siehe Tabelle 2.

Tabelle 2: French-American British (FAB) Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien (AML), assoziierte Translokationen und beteiligte Gene.

FAB	Bezeichnung	Assoziierte Translokation	Beteiligte Gene
M 0	Akute myeloische Leukämie	Inv (3q26), t(3;3)	EVI-1
M 1	Akute Myeloblastenleukämie	-	-
M 2	Akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung	t(8;21)oder t(6;9)	AML-1/ETO oder DEK/CAN
M 3	Akute Promyelozytenleukämie	t(15;17) t(11;17) t(3;17)	PML/RAR α PLZF/RAR α NPM/RAR α
M 4	Akute myelomonozytäre Leukämie	11q23 Inv(3q26), t(3;3) t(6;9)	MLL EVI-1 DEK/CAN
M4a	Akute myelomonozytäre	Inv(16), t(16;16)	CBF β /MYH11
M 5	Akute Monozytenleukämie	11q23 t(8;16)	MLL MOZ/CBP
M 6	Erythroleukämie	-	-
M 7	Akute Megakaryozytenleukämie	t(1;22)	unbekannt

Molekulargenetik bei akuten lymphatischen Leukämien

Wie oben erwähnt unterscheiden sich die späteren B- und T- Zellen der lymphatischen Reihe von denen der myeloischen u.a. durch Ausbildung und Expression eines spezifischen Antigenrezeptors. Diese immunologische Diversität erfordert spezielle genetische Mechanismen wie die Umlagerung und Rekombination von Genen. Dafür weichen Zellen der lymphatischen Reihe von dem biologischen Dogma ab, dass alle somatischen Zellen den gleichen Bestand an Genen wie die aus Spermien-Eizellenfusion entstandene Zygote haben. Die Umlagerung und Rekombination von Genen zur Differenzierung von B-, T-, und Plasmazellen geht regelmäßig mit Deletionen und Translokationen einher (Murken et al. 1996). Ungefähr 80-85% der ALL sind B-Zell Vorläufer ALL und 15-20% T-Zell Vorläufer ALL. Die häufigste Mutation der T-Zell Vorläufer ALL ist in mehr als 50% eine aktivierende „Gain of Function“ Mutation des transmembranösen NOTCH1 Genproduktes und führt zu abnormaler Selbsterneuerung (Weng et al. 2004). Sehr häufig ist eine ständige Aktivierung der dem TCR nachfolgenden Kinasen der Signaltransduktion ohne Antigenkontakt. Bei den B-Zell Vorläufer ALL ist in 3-5% eine durch Translokation bedingte Mutation der Immunglobulinrezeptoren zu beobachten (Graux 2011). Die bekannteste ist die t(9;22) mit Bildung des Fusionsgenes Bcr-Abl.

Tabelle 3: bekannte chromosomale Aberrationen der ALL, defekte Gene und deren Einfluss auf die Prognose falls bekannt. Zur besseren Übersicht tabellarisch zusammengefasst nach C. Graux (Graux 2011).

Entität/Subentität	Zytogenetik	Korreliertes Gen	Prognose
<u>B-Zell Vorläufer ALL</u>			
Ig-Rezeptor Gen Translokationen	t(8;14)(q34;32)	MYC;IGH	schlecht
	t(8;14)(q11;q32)	CEBPD;IGH	nicht genannt
	t(14;19)(q32;p13)	IGH;EPOR	nicht genannt
	t(X,14)(p22;q32)	CRLF2;IGH	nicht genannt
	t(6;14)(p21;q32)	ID4;IGH	nicht genannt
Fusionsgene	t(12;21)(p13;q22)	ETV6-RUNX1	gemäßigt
	t(9;22)(q34;q21)	BCR-ABL1	schlecht
	t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1	nicht genannt
	t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	sehr schlecht
	t(9;11)(p22;q23)	MLL-AF9	nicht genannt
	t(11;19)(q23;p13)	MLL-ENL	nicht genannt
	del(X)/del(Y)	P2RY8-CRLF2	nicht genannt
Deletionen	del(9)(p21)	CDKN2A	nicht genannt
Veränderungen der Ploidität	Hohe Hyperdiploidität	(>50 Chromosomen)	gemäßigt
	Hypodiploid	(<45 Chromosomen)	sehr schlecht
<u>T-Zell Vorläufer ALL</u>			
T-Zell Rezeptor Gen Translokationen	t(10;14)(q24;q11)	TLX1;TCRA/D	günstig
	t(11;14)(p15;q11)	LMO1;TCR	nicht genannt
	t(11;14)(p13;q11)	LMO2;TCR	nicht genannt
	t(1;14)(p32;q11)	TAL1;TCR	nicht genannt
Inversion	inv(7)(p15q32)	HOXA;TCRB	nicht genannt
	t(7;19)(q34;p13)	LYL1;TCRB	nicht genannt
	(5;14)(q35;q32)	TLX3;BCL11B	schlecht
Fusionsgene	del1(p32) interstitiell	SIL-TAL 1	nicht genannt
	9(q34) episom	NUP214-ABL1	nicht genannt
	t(10;11)(p13;q14)	CALM-AF 10	nicht genannt
	t(11;19)(q23;p13)	MLL-ENL	nicht genannt
Deletionen/Amplifikationen	del(9)(p21)	CDKN2A	nicht genannt
	del(6q)	unbekannt	nicht genannt
	dup(6)(q23)	MYB	nicht genannt
Genmutationen		NOTCH1/FBW7, JAK1, PTEN, RAS, FLT3, PHF6	alle nicht genannt

Zusammenfassend, profitieren Patienten mit folgenden genetischen Aberrationen nicht von einer allo-SZT in 1. kompletter Remission: AML mit t(8;21), AML mit inv(16)t(16;16), AML mit NPM1mut/FLT3-ITDneg und AML mit CEBPAmut (Cornelissen et al. 2007, Schlenk et al. 2008).

1.1.7 Ziele der Arbeit

Da bis jetzt von wenigen Autoren die chromosomale Stabilität im Rezidiv von Leukämien, insbesondere akuten Leukämien untersucht wurde, wurden in vorliegender Arbeit chromosomale Veränderungen im Rezidiv bzw. Progression nach allo-SZT erfasst und mit diesen zum Diagnosezeitpunkt verglichen. Im Einzelnen sollen folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Welche chromosomalen Veränderungen treten im Rezidiv bzw. Progression nach allo-SZT im Vergleich zum Diagnosezeitpunkt auf (z.B.: gleicher Karyotyp, Evolution, Devolution)?
2. Beeinflusst eine Änderung des Karyotypes per se im Rezidiv oder bei Progression im Vergleich zum Diagnosezeitpunkt die Zeit in Remission und die Gesamtüberlebenszeit?
3. Haben Patientencharakteristika und Konditionierungsregime einen Einfluss auf die Zeit in Remission und die Gesamtüberlebenszeit?
4. Sind bestimmte Chromosomen bei zytogenetischer Aberration im Rezidiv/bei Progression im Verhältnis zur Chromosomenlänge über- oder unterrepräsentiert?
5. Haben Patienten mit einem initial aberranten Karyotyp vor allo-SZT häufiger zusätzliche Aberrationen im Rezidiv nach allo-SZT im Vergleich zu initial normalen Karyotypen? Sind diese also instabiler?

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

Ausgewertet wurden die Daten der Patienten mit AML und ALL, welche am Campus Benjamin Franklin der Charite Berlin zwischen 1996 und 2007 eine allogene Transplantation von Stammzellen aus dem peripheren Blut oder Stammzellen aus dem Knochenmark erhielten und bei denen zusätzlich ein Rezidiv oder eine Progression nachgewiesen werden konnte. Es musste mindestens jeweils ein aberranter zytogenetischer Befund als Karyotyp bei Diagnosestellung und im Rezidiv oder der Progression vorliegen.

Es konnten auf Grund der oben genannten Einschlusskriterien 22 Patienten in die Analyse einbezogen werden. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Es waren 16 Patienten (73%) männlich, 6 (27%) weiblich. Das mittlere Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation lag bei 49 Jahren (19-67 Jahre). Der überwiegende Anteil der Patienten (82%) wurde wegen einer AML transplantiert. Auf Grund einer B-Zell Vorläufer ALL wurden 4 von 22 (18%) transplantiert. Bei 16 (73%) wurde eine komplette Remission im Therapieverlauf erreicht. Bei 6 Patienten (27 %) konnte zu keinem Zeitpunkt nach allo-SZT eine komplette Remission erreicht werden. Eine Konditionierung mit Dosis reduzierter Konditionierung („Reduced Intensity Conditioning“ (RIC)) erhielten 11 (50%) Patienten. Die anderen Patienten, 11 (50%) erhielten eine konventionelle Konditionierung. Die Quelle der KM/PBSZT Spende war bei 5 Patienten (23%) ein HLA-passender, verwandter Spender (MRD), bei 15 Patienten (68%) ein nicht verwandter, HLA-passender Spender (MUD) und bei 2 Patienten (9%) ein unverwandter, HLA-nicht identischer Spender (MMUD). Die Spender-Empfänger Geschlechtskombination war bei 14 Patienten (64%) Frau zu Frau, bei 8 (36%) Frau zu Mann, Mann zu Frau oder Mann zu Mann. Stammzellen aus dem Knochenmark erhielt 1 Patient (5%), 21 Patienten (95%) erhielten Stammzellen aus dem peripheren Blut. Die GvHD-Prophylaxe war meist CSA basiert (siehe Tabelle 4).

Table 4. Patientencharakteristika

	n= 22
Mittleres Alter bei allo-SZT, Jahre (Spanne)	49 (19-67)
Männer, n (%)	16 (73)
Grunderkrankung, n (%)	
AML	18 (82)
B-Zell Vorläufer ALL	4 (18)
Krankheitsstadium vor allo-SZT, n (%)	
Komplette Remission	16 (73)
Nicht komplette Remission	6 (27)
Konditionierung, n (%)	
Intensitätsreduziert	
Fludarabin + Treosulfan	8 (36)
FLAMSA-Protokoll ^a	3 (14)
Konventionell	
12 Gy TBI + 120mg/kg KG Cyclophosphamid	7 (32)
Busulfan + Cyclophosphamid	1 (4)
Nicht myeloablativ (2 Gy TBI)	3 (14)
Spendertyp, n (%)	
MRD	5 (23)
MUD	15 (68)
MisMUD ^b	2 (9)
Spender/Empfänger Geschlechtskomb. n^c (%)	
Weiblich zu männlich	8 (36)
Andere Kombination	14 (64)
Stammzell Quelle, n^c (%)	
Knochenmark	1 (5)
Peripheres Blut	21 (95)
GvHD Prophylaxe, n^d (%)	
CSA + MTX	17 (77)
CSA + MMF	3 (14)
CSA + MMF + MTX	1 (4,5)
CSA	1 (4,5)

^a inklusive Fludarabin, Cytarabin und Amsakrin gefolgt von 4 Gy TBI, Antithymozytenglobulin und Cyclophosphamid. ^b Ein Patient mit einem Major HLA-Antigen mismatch und ein Patient mit einem HLA-B und DRB-1 mismatch. ^c nicht bekannt bei einem Patient. ^d Ohne Berücksichtigung von In vivo T-Zell Depletionen (z.B.: mit Anti-Thymozyten Globulin).

2.2 Statistik und Definitionen

Die Daten der 22 Patienten wurden aus den Krankenblättern und Arztbriefen entnommen. Alle zytogenetischen Befunde lagen im Original vor und wurden tabellarisch erfaßt. Die statistischen Tests wurden mit dem SPSS Programm-Version 16.0 für Windows XP durchgeführt, wobei ein Signifikanzniveau von 0,05 (zweiseitig) festgelegt wurde und sich die Konfidenzintervalle auf 95% Grenzen beziehen. Mit dem Chi-Quadrat-Test wurde überprüft, ob die Alters oder Geschlechtsgruppen signifikant bezüglich eines Karyotypwechsels im Rezidiv differierten. Für den Fishers-exakt Test mit Yates Kontinuitätskorrektur bezüglich des Unterschiedes von mit alkylierenden Substanzen behandelten und nicht mit alkylierenden Substanzen behandelten Patienten wurde die freie Statistiksoftware R Version 2.14.0 verwendet. Das Überleben wurde mit der Kaplan-Meier Methode geschätzt und mit dem log-Rank Test zwischen den Patientengruppen mit einem Karyotypwechsel im Rezidiv und ohne einen Karyotypwechsel im Rezidiv verglichen. Der Einfluss eines Karyotypwechsels oder zusätzlicher Chromosom 1 Aberrationen im Rezidiv auf das Gesamtüberleben wurde zusätzlich durch Einfügen dieser Variablen als Zeit abhängige Co-Variable in einem Cox-Modell bestätigt. Kategorische Daten wurden mit dem Fishers-exakt Test verglichen, wobei der Mann-Whitney-U Test zum Vergleich kontinuierlicher Variablen verwendet wurde. Die Berechnungen für das Gesamtüberleben (Overall survival, OS) bezogen sich auf die Zeit in Tagen von der allo-SZT bis zum Tod oder letzten datierten Kontakt. Die Überlebenszeit nach dem Rezidiv bezog sich auf die Zeit vom Rezidiv, definiert durch das Datum der zytogenetischen Analyse im Rezidiv bis zum Tod oder den letzten datierten Kontakt.

Tabelle 5: Internationale Abkürzungen für vergleichende Studien in der Onkologie

Abkürzung	Bedeutung
OS (Overall Survival)	Zeit von Diagnosestellung bis letzt datiertem Kontakt/Tod
RFS (Relapse free survival)	Zeit von allo-SZT bis Rezidiv
CR-Rate (Complete Remission)	Komplette Remission ja/nein
SAR (Survival after Relapse)	Zeit von Rezidiv bis Tod/ letzter Kontakt

3. Ergebnisse

Es konnten die Daten von 22 Patienten analysiert werden. Alle erkrankten an akuten Leukämien (18 AML, 4 ALL), erhielten eine Transplantation allogener HSZ und erlitten ein Rezidiv. Bei 15 von 22 (68%) Patienten wurde eine Karyotypveränderung (Evolution oder Devolution) im Rezidiv festgestellt. Bei 7 von 22 (32%) Patienten fand keine Karyotypveränderung statt. Patienten mit einer Karyotypveränderung waren signifikant jünger als die ohne (33 und 57 Jahre ($p = 0,017$)). In der Konditionierung vor der allo-SZT erhielten die Patienten 12 Gy GKB (5 Patienten (33%)) mit einer Karyotypveränderung und in 2 (29%, nicht signifikant) ohne Karyotypveränderung. Tabelle 2 zeigt die Karyotypen bei Diagnose, allo-SZT und im Rezidiv nach allo-SZT sowie die Zeit von allo-SZT bis zum Rezidiv und die Überlebenszeit nach dem Rezidiv bei den 15 von 22 Patienten, welche einen Karyotypwechsel im Rezidiv hatten.

3.1 Karyotyp, Überleben und Todesursachen bei Patienten mit einer Karyotypveränderung im Rezidiv nach allo-SZT

Tabelle 6a-d. Karyotypen, Überleben und Todesursachen bei Patienten mit einer Karyotypveränderung im Rezidiv nach allo-SZT.

Patientennummer	Malignität [Art der Karyotypveränderung]	Karyotyp bei Diagnose	Karyotyp bei Diagnose und allo-SZT	Karyotyp im Rezidiv nach allo-SZT	Zeit von allo-SZT bis Rezidiv (Tage)	Überlebenszeit nach Rezidiv (Tage); [Todesursache]
1	AML (de novo) [Devolution]	46,XX,t(10;11)(p15;q23)[2]/ 54-58,XX,t(10;11)(p15;q23),inc[6]/46,XX[11]	46,XX[25]	46,XX,t(10;11)(p15;q23)[2]/ 1]/ 46,XX[2]	86	115- [Rezidiv (ZNS)]
2	AML (sekundäre) [Evolution]	46,XY,t(3;21)(q26;q22)[20]	46,XXY,t(3;21)(q26;q22)[25]	46,XXY,t(3;21)(q26;22)[12]/ 46,XY,t(3;21)(q26;q22), t(2;22)(p14;q11)[11]	279	120- [Rezidiv]
3	AML (sekundäre) [Devolution und Evolution]	47,XY,del(13)(q12;q21),+21[22]/ 46,XY[8]	46,XXY,add(1)(p36),del(9)(q22)add(12)(p13),del(13)(q12q21),-17,+21[18]/ 46,X,-Y,t(1;21)(p22;p11.2)t(7;7)(p15;q36),del(13)(q12;q21),+21[7]	47,XXY,add(1)(p36), t(4;15)(q22;q26),del(9)(q22),del(13)(q12q21),-17,+21[8]/ 46,X,-Y,t(7;7)(p15;q36),del(13)(q12q21),+21[13]/ 46,XX[4]	54	56- [Sepsis ^a , aGVHD]
4	AML (de novo) [Devolution]	41,XXY,add(3)(q25),-5,-7, t(12;17)(p10;q10),-17,-18, der(18)t(5;18)(q11;q31),-22[25]	41,XXY, add(3)(p25),-5,-7, t(12;17)(p10;q10),-17,- 18,der(18)t(5;18)(q11;q31),-22[22]/ 41,XXY,-5,-7, der(12;17)(p10;q10),-13,-16,- 17,der(18)t(5;18)(q11;q31),-22[3]	41,XXY,-5,-7, t(12;17)(p10;q10),-13,-16,- 17,der(18)t(5;18)(q11;q31),-22[15]/ 46,XY[15]	334	576- [Sepsis]

Patientennummer	Malignität [Art der Karyotypveränderung]	Karyotyp bei Diagnose	Karyotyp bei Diagnose und allo-SZT	Karyotyp im Rezidiv nach allo-SZT	Zeit von allo-SZT bis Rezidiv (Tage)	Überlebenszeit nach Rezidiv (Tage); [Todesursache]
5	AML (de novo) [Evolution]	46,XY,t(3;6)(q26;q25)[25]	46,XY[25]	46,XY,t(3;6)(q26;q25)[3/46,XY,t(3;6)(q26;q25),der(7) t(1;7)(q21;q22)[19]/ 46,XY,t(3;6)(q26;q25),del(7)(q22)[3]	105	42- [Leber,- und Nierenversagen]
6	AML (sekundär) [Evolution]	47,XXY,+21[6]/ 46,XXY[16]	47,XXY+21[7]/ 46,XXY[8]	47,XXY,t(1;4)(p22;q31),+21[5]/ 46,XXY,t(11;12)(p15;q13)[3]/ 46,XXY[17]	61	64- [Rezidiv]
7	AML (de novo) [Devolution + Evolution]	45,XXY,-7, t(9;11)(p21;q23) [22]/ 50,XXY,- 7,+8,t(9;11)(q21;q23),+13,+19,+21 [3]	46,XXY[25]	45,XXY,t(3;4)(p10;p10),-7,t(9;11)(p21;q23)[25]	195	283- [HF]
8	AML (de novo) ^e [Devolution + Evolution]	56,XXY,+1,+3, del(5)(q13;q33),+6,+8,+9,+11,i(14)(q10),+15,+19,+21 [25]	46,XXY[25]	42-45,XXY, del(5)(q13;q33),-7[8]/ 49,XXY, +1,del(5)(q13;q33),+6,-7[1]/ 46,XXY[1]	177	1503- [HF]

Patienten nummer	Malignität [Art der Karyotypveränderung]	Karyotyp bei Diagnose	Karyotyp bei Diagnose und allo-SZT	Karyotyp im Rezidiv nach allo-SZT	Zeit von allo-SZT bis Rezidiv (Tage)	Überlebenszeit nach Rezidiv (Tage); [Todesursache]
9	AML (de novo) [Evolution]	46,XY,t(7;11)(p15;p15)[10]/ 46,XY[15]	46,XY[25]	46,XY,t(7;11)(p15;p15), t(15;17)q15~22;q21~25) [17]/ 46,XY[3]	2458	350+
10	AML (sekundär) [Evolution]	43,XY,t(1;6)(q21;q22),-4,-5,del(6)(q14),-7,t(7;10)(q31;p12),add(17)(p13),add(22)(p12)[18]	46,XY[25]	43,XY,t(1;6)(q21;q22),-4,-5,del(6)(q14),-7,t(7;10)(q31;p12),add(17)(p13),add(22)(p12)[11]/43,idem,del(3)(p21)[8]/46,XX ^b [6]	176	720+
11	AML (de novo) [Devolution + Evolution]	47,XY,+8[2]/ 46,XY[5]	46,XY[25]	Komplex aberranter Karyotyp mit 3,6,13 ohne +8 [25] ^d	399	665+
12	AML (de novo) [Evolution]	46,XX[25]	47,XX,+11[10]/ 46,XX[5]	47,XX,+11[19]/ 47,XX,+del(11)(q22)[7]/ 46,XX[6]/ 46,XY ^b [1]	213	1660- [Rezidiv]

Patientennummer	Malignität [Art der Karyotypveränderung]	Karyotyp bei Diagnose	Karyotyp bei Diagnose und allo-SZT	Karyotyp im Rezidiv nach allo-SZT	Zeit von allo-SZT bis Rezidiv (Tage)	Überlebenszeit nach Rezidiv (Tage); [Todesursache]
13	B-Zell Vorläufer-ALL [Devolution]	94-96, XXXYY, t(9;22) (q34;q11) x2[17]/ 46,XY[13]	46,XY[25]	45-46,XY,der(1)t(1;1)(p36;q21),t(3;5;10)(p13;q34;p13),(6;21)(q21;q22),der(8)t(8;8)(p21;q23),t(9;22)(q34;q11),-9,-17[12]/ 45-46,XY,dup(1) (qter->q21::p36>qter, t(3;16)(p13;q22),der(4) add(4)(q22), t(5;14)(q35;q11.2),der(8) t(8;8)(p21;q23),t(9;22)q34;q11),9, add(10)(q24),add(11)(p11.2)-17, +der(22)t(9;22)(q34;q11)x2[13]	255	37- [Rezidiv]
14	B-Zell Vorläufer ALL [Evolution]	46,XY,del(9)(p13)[15]/ 46,XY[10]	46,XY[25]	46,XY,del(9)(p13)[7]/ 46,XY,t(5;8)(q35;q12),del(9)(p13)[4]/ 46,XY,add(3)(q29),del(9)(p13)[5]/46,XY,t(1;5)(q21;q13),del(9)(p13),der(17)t(3;17)(p21;p12),ad d(17)(p12)[5]/46,XY[4]	77	22- [Rezidiv]
15	B-Zell Vorläufer ALL [Evolution]	46,XY,del(9)(p13),del(13)(q13q22)[10]/ 46,XY[2]	n.d.	46,XY,del(9)(p13),del(13)(q13q22)[14]/ 46,XY,del(9)(p13),-10, del(13)(q13q22)+mar[2]/ 46,XY[5]	259	22- [Sepsis ^a ,JFI]

Karyotypveränderungen sind Fettgedruckt markiert (im Rezidiv/Krankheitsprogression nach allo-SZT im Vergleich zu den initialen bei Diagnose für Patienten die in kompletter Remission transplantiert wurden im Vergleich mit den Karyotypen zwischen Diagnose und allo-SZT für Patienten die nicht in kompletter Remission transplantiert wurden). ^aSepsis oder wahrscheinlich bakterieller Ursprung. ^bSpenderzellen. ^cDieser Patient wurde dreimal allogentransplantiert und zeigte weitere klonale Evolutionen (54,XY,del(1)(q21),+3,del(5)(q13q33)+6,-7,+8,+9,+11,+der(14),+19,+21[15]/46,XX[10]) im Rezidiv nach der zweiten allo-SZT. ^dNicht weiter spezifiziert.

Abkürzungen: ZNS (Zentrales Nervensystem), IFI (invasive, fungale Infektion), n.g. (nicht gemacht), +: Patient ist noch am Leben. -: Patient verstorben.

In Tabelle 7 sind die Karyotypen, Zeit von allo-SZT bis Rezidiv und Zeit von Rezidiv bis Tod/Last-follow-up der 7 von 22 Patienten zusammengefasst, die bei Diagnosestellung, vor allo-SZT und im Rezidiv nach allo-SZT den selben Karyotyp aufwiesen.

3.2 Karyotypen, Überleben und Todesursache bei Patienten, die den gleichen Karyotyp vor allo-SZT und im Rezidiv hatten

Tabelle 7. Karyotypen, Überleben und Todesursache bei Patienten die den gleichen Karyotyp vor allo-SZT und im Rezidiv hatten.

Nr.	Malignität	Karyotypen vor allo-SZT und im Rezidiv	Zeit von allo-SZT bis zum Rezidiv (Tage)	Überleben nach dem Rezidiv (Tage) [Todesursache]
1	AML (sekundär)	45,XX,-7[25]	82	370 - [Sepsis ^a]
2	AML (de novo)	46,XY[25]	138	16 +
3	AML (de novo)	46,XY [25]	63	24 - [bakterielle Pneumonie]
4	AML (sekundär)	41, XY komplex aberrant, hypodiploid) [25] ^b	152	213 - [cGvHD]
5	AML (de novo)	45,X,-X,der(1)(2pter-p12::3q21-3q25::1p36-pter),der(2)t(2;3)(p23;q25),der(4)t(3;4)(q27;p15),del(5)(q22;q34),-7,t(16;21)(p11;q22)[25]	437	150 +
6	AML (de novo)	46,XX,der(19)t(11;19)[21]/46,XX[2]	82	300 +
7	B Zell Vorläufer ALL	49,XY,t(2;5)(q13;q35),t(8;15)(p23;q15),der(9)t(2;9)(?;q34),del(9)(p13),+15,+mar[20]	110	12 +

^aSepsis mit wahrscheinlich bakteriellem Ursprung. ^bNicht weiter spezifiziert. **Abkürzungen:** +: Patient noch am Leben. -: Patient verstorben.

3.3 Charakterisierung der Karyotypveränderungen

Bei den Patienten mit einer Karyotypveränderung war die Anzahl der Chromosomen initial und im Rezidiv pseudodiploid in 6 von 6 Fällen (43/43%), hypodiploid in 2 von 4 (14/29%), hyperdiploid in 5 von 3 (36/21%) und enthielt sowohl hypodiploide als auch hyperdiploide Klone in 1 von 1 (7/7%) Fällen. Die durchschnittliche Anzahl verschiedener Klone war 2,71 im Rezidiv nach allo-SZT (Standardabweichung 0,51) aber 1,57 (Weite 1-2, Standardabweichung 0,99) bei initialer Diagnose ($p = 0,001$). Eine Karyotypveränderung konnte in 14 von 19 Patienten (74%) mit einem abnormalen Karyotyp bei Diagnose und in 1 von 3 Patienten mit einem normalen Karyotyp bei Diagnose (nicht signifikant) festgestellt werden.

Karyotypveränderungen bestanden aus klonalen Evolutionen in 53,3% (8 Patienten), klonalen Devolutionen in 13,3% (2 Patienten) und beiden klonalen Evolutionen und Devolutionen in 33,3% (5 Patienten). Hier bestand die Mehrheit der Karyotypveränderungen aus Zugewinn oder Verlust von strukturellen chromosomalen Aberrationen (7 Patienten, 50%) und zu einem kleineren Anteil aus numerischen chromosomalen Veränderungen (2 Patienten, 14%) oder beides: numerischen und strukturellen chromosomalen Veränderungen (5 Patienten, 36%). Zusätzliche strukturelle Aberrationen, die im nach-allo-SZT Rezidiv auftraten, betrafen Chromosom 1, 3 und 4 öfter als theoretisch auf Grund ihrer relativen Länge erwartet. Dagegen waren Chromosom 2 und 9 unterrepräsentiert.

Den Tabellen 6 und 7 sind die „Zeit von allo-SZT bis zum Rezidiv“ und das „Überleben nach Rezidiv“ für jeden Patienten zu entnehmen. Patienten mit und ohne Karyotypveränderung hatten ein medianes „Überleben nach Rezidiv“ von 120 Tagen (CI 0-396 Tagen) und 370 Tagen (CI nicht anwendbar), respektive ($p = 0,923$). Das mediane Gesamtüberleben war 399 Tage (CI 150-648 Tage) bei Patienten mit Karyotypveränderung und 452 Tage (CI 319-585 Tage) bei den Patienten ohne Karyotypveränderung ($p = 0,889$; bestätigt durch Cox proportionales Gefahren Modell). Es wurde des Weiteren der prognostische Einfluss von zusätzlichen strukturellen Aberrationen untersucht, welche zu denen im Rezidiv überrepräsentierten Chromosomen 1, 3 oder 4 gehörten. Nur der Zugewinn struktureller Chromosom 1 Aberrationen hatte einen signifikanten Einfluss auf „Überleben nach Rezidiv“ (37 und 370 Tage, $p = 0,002$; Tabelle 8 und Abbildung 4). Zusätzliche strukturelle Aberrationen an Chromosom 3 und 4 hatten keinen signifikanten Einfluss auf das mediane „Überleben nach Rezidiv“ (37 und 56 Tage gegen 213 und 370 Tage in Patienten ohne Zugewinn von strukturellen Aberrationen des jeweiligen Chromosoms, $p = 0,714$ und $0,085$).

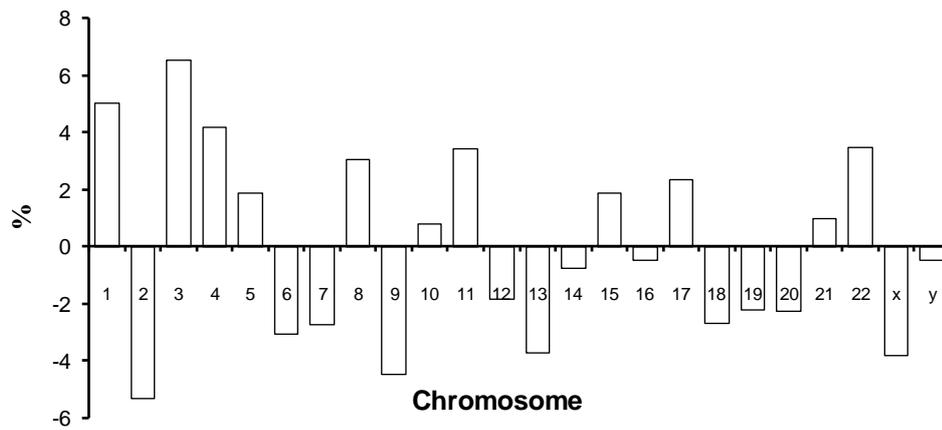
3.4 Einfluss einer zusätzlichen strukturellen Chromosom 1 Aberration im Rezidiv nach allo-SZT auf Mortalitätsraten

Tabelle 8. Einfluss einer im Rezidiv erstmals aufgetretenen strukturellen Chromosom 1 Aberration nach allo-SZT auf Mortalitätsraten in Patienten mit AML (n = 17)¹ oder B Zell Vorläufer ALL (n = 4). Die Tabelle zeigt median und CI Intervalle in Tagen (Kaplan-Meier Methode).

	Patienten die zusätzliche strukturelle Chromosom 1 Aberrationen im Rezidiv nach allo-SZT erlangten (n = 4)	Patienten die keine zusätzlichen strukturellen Chromosom 1 Aberrationen im Rezidiv nach allo-SZT erlangten (n = 17)	p-Wert
Gesamtüberleben²	125 (CI 78-172)	478 (CI 0-983)	0,008
Zeit von allo-SZT bis Rezidiv assoziiertem Tod²	37 (CI 10-64)	1660 (CI n.a.)	0,008
Überleben nach Rezidiv	37 (CI 17-57)	370 (CI 126-614)	0,002
Zeit von Rezidiv bis Rezidiv assoziiertem Tod	37 (CI 10-64)	1660 (CI n.a.)	< 0,001

¹Patient Nr. 11 (Tabelle 6) mit einem komplex aberranten Karyotyp (nicht im Detail spezifiziert) wurde nicht integriert. ²Diese Vergleiche wurden mit einem Cox Proportionalem Gefahrenmodell bestätigt (Hazard-ratio 6.9 und 23.0, CI Intervalle 1.7-28.5 und 2.2-233.9); Das mittlere Überleben wurde mit der Kaplan-Meier Methode und dem p-Wert von dem Cox proportionalem Gefahren Modell berechnet. Abkürzungen: CI (Confidenz Intervall), n.a. (nicht anwendbar).

Abbildung 2. Verteilung der zusätzlich im Rezidiv nach allo-SZT erlangten, strukturellen chromosomalen Aberrationen von Patienten mit AML (n = 17)* oder B Zell Vorläufer ALL (n = 4). Die Abbildung zeigt die Unterschiede zwischen den zusätzlich erlangten Bruchpunkten eines jeweiligen Chromosoms im Verhältnis zu der Gesamtzahl an Bruchpunkten und der theoretisch erwarteten Frequenz an Bruchpunkten im Verhältnis zu der relativen Länge des Chromosoms. Positive Werte zeigen, dass zusätzliche Bruchpunkte eines jeweiligen Chromosoms im Rezidiv nach allo-SZT häufiger als erwartet gefunden wurden. Negative Werte zeigen, dass zusätzliche Bruchpunkte seltener als theoretisch erwartet gefunden wurden. Angenommen wurde eine zufällige Verteilung.



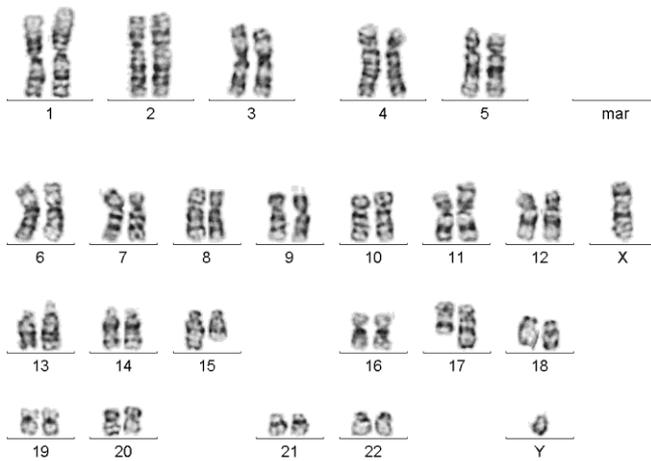
3.5 Entdeckung einer neuen Entität

Klinische, zytogenetische und immunphänotypische Charakteristiken

Ein 28-jähriger Mann mit AML, FAB M2 (No.9, Tabelle 6) und $t(7;11)(p15;p15)$ bei Diagnose zeigte 7 Jahre nach allo-SZT eine klonale Evolution $t(15;17)(q15\sim22;q21\sim25)$. Nach Standard-Induktionstherapie (Thioguanin, Cytarabin und Daunorubicin) resultierte eine komplette Remission. Dem Patienten wurden nach Konditionierung mit Cyclophosphamid und 12 Gy TBI allogene Stammzellen von seinem HLA identischem Bruder transplantiert (MRD). Im Rezidiv zeigten sich im Knochenmarkspirat ungefähr 50% Blasten mit einer Morphologie ähnlich der bei initialer Diagnosestellung. Immunphänotypisierung und zytogenetische Analyse bestätigten das Rezidiv. Der Patient erhielt einen chemotherapeutischen Zyklus nach dem Mito-FLAG Protokoll (Mitoxantron, Fludarabin, Cytarabin und G-CSF) gefolgt von einer weiteren allo-SZT von seiner HLA-identischen Schwester (MRD) nach Konditionierung mit Fludarabin, Cytarabin und Amsakrin gefolgt von 4 Gy TBI, Antithymozytenglobulin und Cyclophosphamid (FLAMSA-RIC-Protokoll). Der Patient war bei der letzten Präsentation seit 17 Monaten ohne größere Komplikation in kompletter Remission (CR). Die Ergebnisse der FISH Untersuchung und Immunphänotypisierung sind exemplarisch für den Patienten mit der vorher nicht beschriebenen klonalen Evolution $t(15;17)$ im Rezidiv dargestellt. Die FISH Untersuchung zeigte ein Signal für den PML Locus auf Chromosom 17 (siehe Abbildung 3). Dieses war aber distal des Signales für den RARalpha Locus ohne Anzeichen für eine PML-RARalpha Fusion oder anderer RARalpha rearrangements. Die Abwesenheit des PML-RAR alpha Fusionsgenes wurde zusätzlich mit PCR bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die AML Blasten zeigten in der Immunphänotypisierung bei Diagnose eine Expression von CD13, CD15, CD33, CD64, CD117 und keine Expression von CD3, CD7, CD10, CD19, CD34 und HLA-DR. Der später im Rezidiv nach allo-SZT bestimmte Immunphänotyp war identisch bis auf ein Fehlen der Expression von CD117.

Abbildung 3. Klonale Evolution t(15;17) bei einem AML (FAB M2) Patient im Rezidiv 7 Jahre nach allo-SZT. Zum Zeitpunkt der Diagnose hatte der Patient nur die zytogenetische Aberration t(7;11)(p15;p15). Die Ergebnisse von (A) Standard GTG-Färbung und (B) Dual Color Dual Fusion Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH; RARalpha: grün, PML: rot) demonstrieren das Vorhandensein der chromosomalen Aberrationen und Abwesenheit des PML-RARalpha Fusionsgenes (gefärbte Genabschnitte liegen nicht zusammen).

A)



B)

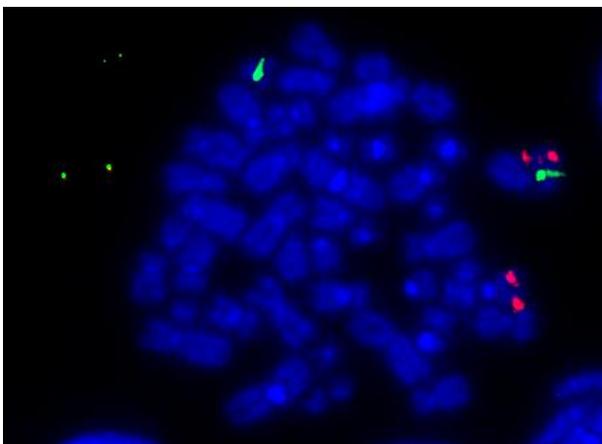
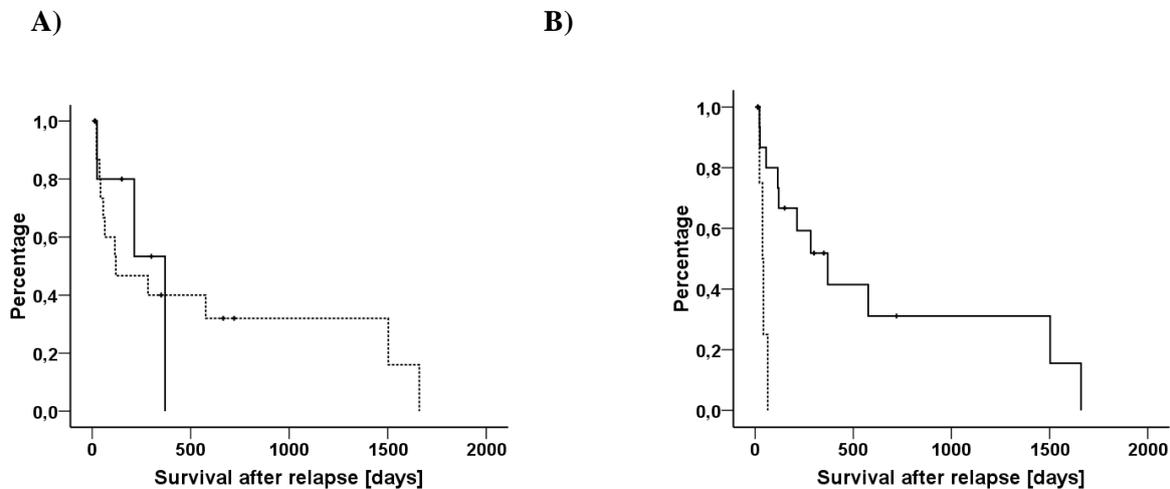


Abbildung 4. A: “Überleben nach Rezidiv” von Patienten mit AML (n = 18) oder B-Zell-Vorläufer ALL (n = 4) die einen Karyotypwechsel im Rezidiv nach allo-SZT hatten (n = 15; gepunktete Linie) im Vergleich mit der Gruppe der Patienten die einen identischen Karyotyp zu beiden Zeitpunkten hatten (n = 7; kontinuierliche Linie). **B:** “Überleben nach Rezidiv” bei akuten Leukämie Patienten die eine zusätzliche, strukturelle Chromosom 1 Aberration im Rezidiv nach allo-SZT erlangten (n = 4; gepunktete Linie) im Vergleich mit den Patienten, die keine strukturelle Chromosom 1 Aberration erlangten (n = 17; durchgezogene Linie).



Bemerkung

Patient Nr. 11 (Tabelle 6) mit einem komplex aberranten Karyotyp (nicht im Detail spezifiziert) wurde nicht in diese Analyse eingeschlossen

3.6 Unterschiede der Karyotypveränderungen im Rezidiv zwischen mit einer alkylierenden Substanz konditionierten Patienten und nicht mit einer alkylierenden Substanz konditionierten Patienten

Tabelle 9: Patienten die nicht mit einer alkylierenden Substanz konditioniert wurden. Keiner der Patienten (0 von 3 (0%)) hatte zusätzliche chromosomale Aberrationen im Rezidiv nach allo-SZT. Zwei von diesen 3 Patienten hatten einen normalen Karyotyp im Rezidiv nach allo-SZT.

Patient (initialien) ^d	Geschlecht	Spender-Geschlecht	Konditionierung	Karyotyp initial/im Rezidiv nach allo-SZT
K,B	Frau	Mann	TBI (2 Gy)	45, XX -7 ¹
K,H	Mann	Frau	TBI (2 Gy) + Fludarabin	46, XY ²
P,H-J	Mann	Mann	TBI (2 Gy)	46, XY ³

Bemerkung: ^{1,2} Da bei diesen beiden Patienten Spender-Empfänger Geschlecht differieren, und ¹ bei weiblichem Geschlecht einen weiblichen Karyotyp im Rezidiv und ² bei männlichem Geschlecht einen männlichen Karyotyp aufweist, kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich um ihre eigenen, rezidierten Klone handelt. Bei ³ besteht die Möglichkeit der „Fehldiagnose“. Der eigene maligne Klon könnte einen anderen Karyotyp im Rezidiv haben. d: Initialien statt Nummern verwendet, KB entspricht Patient 1 aus Tabelle 7, Patient KH entspricht Patient 2 aus Tabelle 7, PH-J entspricht Patient 3 aus Tabelle 7.

Tabelle 10: Kreuztabelle für den Fishers exakt Test mit Yates Korrektur bezüglich des Einflusses einer vorherigen Konditionierung mit einer alkylierenden Substanz auf eine Änderung des Karyotypes im Rezidiv akuter Leukämien

	Karyotypveränderung im Rezidiv (ja)	Karyotypveränderung im Rezidiv (nein)	
Alkylierende Substanz (nein)	0	3	3
Alkylierende Substanz (ja)	14	5	19
	14	8	n = 22
p-Wert nach Fishers exakt Test mit Yates Korrektur für Stichproben (n = 20- 60)			P = 0,03636 Konfidenzintervall = 95% Alpha = 5%

3.7 Studienlage

Tabelle 11: Vergleich der bei Medline über Pubmed gefundenen Studien über eine „überzufällige Beteiligung von bestimmten Chromosomen im Rezidiv nach allogener-SZT bei Leukämien“. Übereinstimmend berichten alle Autoren über eine überzufällige Beteiligung von Chromosom 1 im Rezidiv bei Leukämien nach allogener Stammzelltransplantation.

Studie (Jahr)	Erkrankung (n =)	Chromosomen die häufiger als zufällig erwartet zusätzliche Aberrationen nach allo-SZT aufwiesen (spezieller Lokus; n =)	Chromosomen die seltener als zufällig erwartet zusätzliche Aberrationen nach allo- SZT aufwiesen (spezieller Lokus; n =)
Vorliegende Arbeit	AML + SZT (n = 18) ALL + SZT (n = 4)	1,3,4 (1q21; n = 3) (1p36; n = 1)	2,9
Yoshihara et al. (2005)	ALL + SZT (n = 1)	1,7,13,X	n.a.
Shah et al. (1992)	CML + SZT (n = 19)	1	n.a.
Chase et al. (2000)	CML + SZT (n = 47)	1,7,13	n.a.
Alimena et al. (1990)	CML + SZT (n = 36)	1,4,7,12	n.a.

n.a.: nicht angegeben; allo-SZT: allogene Stammzelltransplantation

4. Diskussion

Chromosomale Aberrationen bei Diagnosestellung gehören neben dem Alter des Patienten zu den wichtigsten, unabhängigen prognostischen Faktoren bei akuten Leukämien. Nach Einteilung in Karyotyp-abhängige Patientengruppen (günstig/intermediär/ungünstig), bleiben sie der einzige signifikante Prognosefaktor hinsichtlich Gesamtüberleben und Rezidiv freiem Überleben bei akuten Leukämien (Pullakart et al. 2008). Die vorliegende Arbeit diente dazu folgende, bisher unzureichend geklärte Fragestellungen bezüglich der Veränderungen des Karyotypen im Rezidiv akuter Leukämien zu untersuchen (siehe Ziele der Arbeit).

In der hier vorgelegten Untersuchung an 22 akuten Leukämie Patienten wurde eine Karyotypveränderung im Rezidiv nach allo-SZT bei 68% der Patienten festgestellt. Die häufigste Veränderung war eine alleinige klonale Evolution oder kombiniert klonale Evolution und Devolution (87% von 68% mit Karyotypveränderung im Rezidiv nach allo-SZT). Diese Beobachtung lässt annehmen, dass eine Karyotypveränderung im Rezidiv akuter Leukämien nach allo-SZT mit derselben Häufigkeit auftritt, wie bei Patienten mit AML (38-62%) und ALL (66-90%) im Rezidiv nach konventionellen Therapiemodalitäten (Shikano et al. 1990, Chucrallah et al. 1995, Estey et al. 1995, Kern et al. 2002, Hur et al. 2001). Tritt eine Karyotypveränderung im Rezidiv akuter Leukämien vergleichbar häufig bei nach allo-SZT behandelten Patienten wie bei ohne allo-SZT behandelten Patienten auf, so könnte die allo-SZT oder ein eventueller Einfluss der neuen KM-Umgebung auf die Spenderzellen als ein die klonale Evolution/Devolution auslösender bzw. begünstigender Faktor wie von anderen Autoren beschrieben (Karrman et al. 2007, Yoshihara et al. 2005) ausgeschlossen werden. Als Ursache der klonalen Evolution käme am ehesten die bei allogenen Stammzelltransplantiert und bei konventionell Behandelten angewandte Remissions Induktionstherapie und weitere chemotherapeutische Zyklen, bzw. die natürlich zunehmende genetische Instabilität der leukämischen Blasten in Betracht.

Bisher war unklar, ob ein Karyotypwechsel an sich bei akuten Leukämie Patienten im Rezidiv nach konventioneller Therapie (ohne allo-SZT) mit einer negativen Prognose assoziiert ist (Chucrallah et al. 1995, Estey et al. 1995, Kern et al. 2002).

In dieser Arbeit hatte eine Karyotypveränderung im Rezidiv nach allo-SZT an sich keinen negativen Einfluss auf das mediane Gesamtüberleben oder das Überleben nach Rezidiv.

Der Zugewinn struktureller Chromosom 1 Aberrationen im Rezidiv nach allo-SZT war in vorliegender Untersuchung assoziiert mit einer signifikant kürzeren Gesamtüberlebenszeit ($p = 0,002$) und kürzerer Zeit von Rezidiv bis Rezidiv-assoziiertem Tod. Zusätzliche strukturelle Chromosom 1 Aberrationen waren gehäuft in der 1q21 Region bei 3 Patienten und die 1p36 Region bei 1 Patient.

In dieser Arbeit waren Patienten mit einer Karyotypveränderung im Rezidiv signifikant jünger als die Patienten ohne eine Karyotypveränderung im Rezidiv. Diese Beobachtung wurde bei konventionell behandelten ALL Patienten gemacht (Hur et al. 2001). Eine altersabhängige Anfälligkeit der leukämischen Zellen für klonale Evolutionen könnte durch einer in höherem Alter insgesamt verminderten Zellteilungsrate erklärt werden. Es ist anzunehmen, dass eine sich schnell teilende Population von malignen Zellen bei jüngeren Patienten statistisch mehr Fehler akkumuliert.

Drei von vier B-ALL Patienten (75%) und 12 von 18 AML (67%) zeigten eine Karyotypevolution im Rezidiv. Aufgrund der geringen Anzahl von B-ALL Fällen ($n = 4$) (vs. AML ($n = 18$)) in dieser Arbeit ist keine signifikante Aussage über eine unterschiedliche Anfälligkeit für Karyotypveränderungen und deren klinische Auswirkung im Rezidiv nach SZT zwischen ALL und AML zu machen ($p = 1$). Das Verhältnis der Karyotypveränderungen im Rezidiv liegt bei AML und ALL im selben Prozentbereich (ALL 75%, AML 67%). Hur et al fanden zytogenetische Veränderungen nach konventioneller Therapie im Rezidiv signifikant häufiger bei B-ALL (90%) als bei AML (47,8%) ($p = 0,05$) (Hur et al. 2001).

Bisherige zytogenetische Untersuchungen nach allogener SZT wurden hauptsächlich bei CML Patienten durchgeführt. Diese deuteten an, dass sich klonale Evolutionsmuster im Rezidiv nach allo-SZT grundsätzlich von Evolutionsmustern nach konventionellen Therapiemodalitäten unterschieden. Die Autoren nannten als mögliche Ursachen die (wie oben bereits erwähnt) klastogenen Effekte der Konditionierung (alkylierende Substanzen und TBI verursachen Quervernetzungen der Basenpaare), die Immunsuppression oder ein verändertes Knochenmark Milieu (Karrman et al. 2007, Yoshihara et al. 2005). Die von Karrman et al festgestellten Unterschiede der Evolutionsmuster der Karyotypen im Rezidiv von allogentstammzelltransplantierten im Vergleich mit konventionell therapierten Patienten bei CML konnten in dieser Arbeit wegen fehlender Vergleichsgruppe (Karyotypen nicht allogentransplantierte Patienten mit akuten Leukämien im Rezidiv) nicht überprüft werden (Karrmann et al. 2007).

Den genannten spezifischen Aberrationen die von Karrmann et al in CML Patienten nach allo-SZT gefunden wurden (wie +8, +Ph, i(17q), +19, +21, +17 und -7) konnten teilweise auch spezifische Behandlungsmodalitäten zugeordnet werden, so wie etwa +8 nach Busulphan Therapie (Karrmann et al. 2007). Da keine dieser bei CML Patienten im Rezidiv nach allo-SZT typischen Muster bei Patienten im Rezidiv nach allogener SZT bei AML/ALL Patienten gefunden wurden, könnten die Aberrationen auch durch Selektion entstanden sein und so die nötigen Mutationen sein, die eine CML im Rezidiv entwickelt bzw. zur Therapieresistenz führt. Aber eben nicht charakteristisch durch die allogene Transplantation per se. Karrmann et al konnten auch keinen signifikanten Unterschied aber einen Trend für das häufigere Vorhandensein der genannten Aberrationen nach autologer als nach allogener Transplantation feststellen (Karrmann et al. 2007).

In der vorliegenden Untersuchung waren Karyotypen im Rezidiv tendenziell hypodiploid und signifikant öfter polyklonal als bei initialer Diagnosestellung (durchschnittliche Anzahl der Klone initial 1,57 vs. Rezidiv 2,71; $p = 0,001$). Karrman et al fanden nach allo-SZT häufiger

pseudodiploide Klone. Obwohl diese Charakteristiken schon vorher der allo-SZT zugeschrieben wurden, konnte man sie auch bei AML Patienten im Rezidiv nach konventioneller Therapie beobachten (Kern et al. 2002).

Um mehr Einblick in spezifische klonale Evolutionsmuster bei Patienten mit akuten Leukämien im Rezidiv nach allo-SZT zu erlangen, wurde in dieser Arbeit die Verteilung von zusätzlich im Rezidiv nach allo-SZT erlangter struktureller chromosomaler Aberrationen mit der theoretisch erwarteten Beteiligung eines jeden Chromosoms verglichen. Es wurde für die theoretisch zu erwartende Beteiligung eines jeden Chromosoms eine zufällige Verteilung angenommen. Zusätzlich erlangte strukturelle chromosomale Aberrationen im Rezidiv nach allo-SZT wurden bei Chromosom 1, 3 und 4 häufiger, bei Chromosomen 2 und 9 seltener gefunden, als aufgrund der jeweiligen Chromosomenlänge zu erwarten gewesen wäre wenn es sich um zufällig verteilte genetische Ereignisse gehandelt hätte.

Yoshihara et al berichteten von einer jungen weiblichen ALL-Patientin, die nach MRD-SZT zusätzliche Aberrationen der Chromosomen 1, 7, 13 und X hatte. Shah et al fanden auch häufiger als bei einem zufälligen genetischen Ereigniss Aberrationen an Chromosom 1 bei allo-SZT therapierten als bei konventionell therapierten CML-Patienten (Shah et al. 1992). Chase et al fanden bei CML Patienten im Rezidiv nach allo-SZT eine häufigere Beteiligung von Chromosom 1, 7 und 13, als wenn es sich um zufällige genetische Ereignisse gehandelt hätte (Chase et al. 2000). Die Autoren zogen daraus den Schluss, dass die 13q12-14 Regionen ein oder mehrere Tumorsuppressorgene kodieren könnten (Chase et al. 2000). Zwei weitere Studien die auch CML Patienten im Rezidiv nach allo-SZT untersuchten, konnten eine häufiger als durch zufällige genetische Ereignisse erklärbare Beteiligung von Chromosom 13 nicht bestätigen (Offit et al. 1990, Alimena et al. 1990). In der vorliegenden Arbeit mit 22 akuten Leukämiepatienten waren Aberrationen an Chromosom 13 tendenziell unter- und nicht überrepräsentiert.

Alle über die Zytogenetik im Rezidiv nach allo-SZT akuter und chronischer Leukämien schreibenden Autoren fanden übereinstimmend eine mehr als zufällige Beteiligung des Chromosom 1 mit variablen Loci (Yoshihara et al. (ALL), Shah et al. (CML), Chase et al. (CML), Offit et al. (CML), Alimena et al. (CML). Häufiger als zufällig erwartete Aberrationen an Chromosom 1 wurden auch in vorliegender Arbeit gefunden (vergleiche Tabelle 10).

Aberrationen an Chromosom 1 wurden auch bei anderen, meist soliden Neoplasien sowohl bei initialer Diagnosestellung schon vorhanden (also sicher nicht durch Radio-/Chemotherapie induziert) als auch nach Chemotherapie (fraglich durch diese induziert) als Indikator einer schlechten Prognose wie im Folgenden beschrieben. Aberrationen von 1q21 bei 37 von 91 Patienten mit Multiplem Myelom nach Hoch-dosis-Chemotherapie waren mit signifikant kürzerem Progressionsfreiem Überleben ($p = 0,044$) und kürzerem 4-Jahres-Gesamtüberleben ($p = 0,001$) korreliert, verglichen mit den 54 von 91 Patienten, die keine zusätzliche 1q21 Aberration nach Hoch-Dosis-Chemotherapie aufwiesen (Nemec et al. 2010).

Bei Nephroblastomen (Wilms Tumor) wurde ein Zugewinn einer 1q Aberration bei 59% der rezidierten (vs. 24% der nicht rezidierten ($p = 0,019$)) signifikant häufiger gefunden (Hing et al. 2001).

Korshunov et al fanden in 8 von 8 Fällen leptomeningeal-disseminierter, supratentorieller Glioblastome ein Zugewinn einer 1p36 Aberration ohne vorherige Radio-, oder Chemotherapie (Korshunov et al. 2007).

So kann „der Zugewinn der 1q31-1q32 Aberration bei Retinoblastomen in mehr als 50% der Fälle und in vielen anderen Tumoren gefunden werden“ (Corson et al. 2005).

Der Zugewinn von zusätzlichen strukturellen Aberrationen der neben Chromosom 1 auch im Rezidiv nach allo-SZT häufiger als bei einem zufälligen genetischen Ereigniss repräsentierten Chromosomen 3 oder 4 hatte einen geringeren Einfluss auf das Überleben nach Rezidiv. Dieser Wert erreichte keine statistische Signifikanz. Nur ein Autor konnte eine mehr als zufällige Häufigkeit an Aberrationen von Chromosom 4 bei CML-Rezidiv nach allo-SZT bestätigen (Alimena et al. 1990). Drei Autoren beschrieben Chromosom 7 Aberrationen als überrepräsentiert (Yoshihara et al. 2005, Chase et al. 2000, Alimena et al. 1990). Dies konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Es bleibt unklar, ob die Radiochemotherapie zu zusätzlichen Aberrationen an Chromosom 1 durch einen spezifischen Mechanismus führt oder die durch Zufall bzw. durch genetische Instabilität entstehenden Aberrationen an Chromosom 1 zu einem Rezidiv führen. Am wahrscheinlichsten sind leukämische Zellen mit zusätzlichen Aberrationen an Chromosom 1 im Rezidiv überlebensfähiger als leukämische Zellen ohne eine zusätzliche Chromosom 1 bzw. anderen Aberrationen und werden so selektiert.

Zusätzliche strukturelle Chromosom 1 Aberrationen waren gehäuft in der 1q21 Region bei 3 Patienten und die 1p36 Region bei 1 Patienten.

Aberrationen – speziell in diesen beiden Regionen von Chromosom 1 konnten mit der Pathogenese von verschiedenen hämatologischen und onkologischen Malignitäten assoziiert werden (z.B.: durch Verlust eines Tumorsuppressionsgenes wie KIF1Bbeta) und könnten einen negativen prognostischen Einfluss auf maligne Erkrankungen haben (Bagchi et al. 2008, Maru et al. 2009, Fonseca et al. 2006). Dem Zugewinn der 1q31-32 Region bei Retinoblastomen konnte von Corson et al durch mRNA-Kopien Anzahlanalyse das Gen KIF-14 zugeordnet werden. Dieses Gen wird von den Autoren als möglicher Faktor der Onkogenese diskutiert (Corson et al. 2005). Maru et al. berichteten, dass der Verlust von Chromosom 1q ein häufiger Befund bei Ösophaguskarzinomen ist und der Verlust der 1q21.3 Region mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit assoziiert ist (Maru et al. 2009). Fonseca et al beschrieben in einer Kohortenstudie von 159 Multiplen Myelompatienten, dass der Zugewinn von 1q21 Kopien mit einer erhöhten Expression von CKS1B und mit signifikant reduziertem Überleben assoziiert ist (Fonseca et al. 2006).

Yoshihara et al stellten bei ALL Patienten im Rezidiv nach allo-SZT 1p22.2 als die häufigste Aberration von Chromosom 1 fest (Yoshihara et al. 2005).

Neben et al stellten in einer Multivarianzanalyse an 354 Patienten mit Multiplem Myelom (MM) fest, dass die Aberration +1q21 abhängig von ihrer Kopienanzahl (mehr als drei Kopien) als unabhängiger Prediktor für ein schlechtes Progressionsfreies Überleben (PFS) und

Gesamtüberleben (OS) dient. Bis zu drei Kopien hatten nur einen marginalen Effekt auf PFS und OS, mehr als drei verkürzten die PFS und OS. Die Autoren machten einen möglicherweise Dosisabhängigen Effekt der Chromosomenregion 1q21 dafür verantwortlich (Neben et al. 2012).

Shaughnessy et al untersuchten das Genexpressionsprofil von 532 MM Patienten und fanden 70 Gene die mit einem Tod in frühem Krankheitsstadium korreliert werden konnten. 30% dieser Gene waren auf Chromosom 1 lokalisiert. Die meisten herunterregulierten Gene waren auf dem 1p Arm, die meisten hochregulierten Gene auf dem 1q Arm (Shaughnessy et al. 2007).

Eine SNP Array Analyse von Nowak et al an 93 akuten Promyelozyten Leukämie Patienten fanden als häufigste Kopienanzahl Alteration (CNA; copy number alteration) Deletionen der Subbande 1q31.3 in 14% der Patienten. Diese kodierende Region umfasst die Gene der mircoRNAs mir 181a1/b1. Deletionen der 1q31.3 Subbande war mit einer signifikant höheren Anzahl von CNA ($p = 0,0001$) verbunden und war ein starker, unabhängiger prognostischer Faktor eines Rezidives ($p = 0,0031$) (Nowak et al. 2012). Micro RNA (miRNA) sind an der Regulation der Genexpression beteiligt, etwa 22 Nukleotide kurze nicht kodierende RNA Moleküle. Sie können im menschlichen Körper in exozytierten Vesikeln zirkulieren. MiRNA könnten als Biomarker für maligne Erkrankungen dienen, da die Dysregulation der miRNA Expression früh in der Karzinogenese stattfindet. MiRNA werden auch als zirkulierende, Hormon ähnliche Moleküle diskutiert, welche die Genexpression endokrin regulieren könnten (Cortez et al. 2011).

Von Löwenberg et al wurden spezifische Karyotypveränderungen für therapieassoziierte AML nach vorheriger Therapie mit alkylierenden Substanzen beschrieben. Da 19 der insgesamt in dieser Arbeit untersuchten 22 Patienten mit einer alkylierenden Substanz konditioniert wurden und die vorherige Induktionstherapie ohne eine alkylierende Substanz sondern mit Antimetaboliten und DNA-interkalierenden Anthracyclinen erfolgte, wäre es interessant, ob diese Patienten die für therapieinduzierte AML bekannten und beschriebenen „typischen zytogenetischen Veränderungen der therapieassoziierten AML, wie Deletionen von 5q oder 7q nach Behandlung mit einer alkylierenden Substanz“ (Löwenberg et al. 1999) zusätzlich im Rezidiv aufweisen würden. Dies könnte hypothetisch auf eine Assoziation der zur Konditionierung benutzten alkylierenden Substanz als Induktor typischer Aberrationen bei Leukämien im Rezidiv nach allo-SZT hinweisen.

Von 19 mit einer alkylierenden Substanz konditionierten Patienten konnte bei 14 (73,7%) zusätzlich eine Karyotypveränderung im Rezidiv und bei 6 von diesen 14 (43%) mit einer Karyotypveränderung im Rezidiv neue Veränderungen an 5q oder 7q gefunden werden.

Bei 4 von 14 (28,6%) mit einer alkylierenden Substanz konditionierten Patienten konnten die für Therapie induzierte akute Leukämien geforderten del 5 oder del 7 neu im Rezidiv nach allo-SZT gefunden werden (1 Patient -5 und -7, 2 Patienten -7, 1 Patient -5). Dies liegt etwas über den „3-10% die nach Behandlung mit alkylierenden Substanzen nicht-assoziiertes Neoplasien eine sekundäre AML (mit typischer Zytogenetik del 5/del 7) entwickeln“ (Löwenberg et al. 1999). Die alkylierende Substanz könnte als zusätzlicher Faktor der Evolution mit weiteren, charakteristischen Aberrationen in Betracht kommen. Die bisher von Löwenberg (s.o.) beschriebenen charakteristischen chromosomalen Aberrationen der Therapie induzierten AML

gelten für primär nicht an Leukämien Erkrankten, aus anderen Gründen (meist andere Neoplasien als Leukämien) zytostatisch mit alkylierenden Substanzen behandelte Patienten. Da alkylierende Substanzen aber völlig unspezifisch durch Alkylgruppen (X-CH_{3(n)}) Moleküle quervernetzen, könnte es sein, dass sie zufällig über andere Mechanismen auch zu Deletion 5 oder 7 führen und diese als Nebenprodukt gefunden werden, die alkylierenden Substanzen aber nicht durch den gleichen molekularen Mechanismus der del 5q oder del 7q wie bei den t-AML beschrieben die Evolution der Klone auslösen.

Die 19 von 22 (86%) mit einer alkylierenden Substanz konditionierten Patienten wiesen in 14 von 19 (74% von 86%) Fällen eine Änderung des Karyotypes und in 5 von 19 Fällen (26,3%) keine Änderung auf. Es besteht ein signifikanter Unterschied ($p = 0,03636$) bezüglich einer Karyotypveränderung im Rezidiv zwischen Patienten die mit einer alkylierenden Substanz konditioniert wurden und Patienten die nicht mit einer alkylierenden Substanz konditioniert wurden. Die 3 nicht mit einer alkylierenden Substanz konditionierten Patienten erhielten entweder 2 Gy TBI ($n = 2$) oder 2 Gy TBI + Fludarabin ($n = 1$). Von diesen Patienten hatten alle 3 von 3 (100%) keine Karyotypveränderung im Rezidiv (Siehe Tabelle 9). Es kann also davon ausgegangen werden, dass eine Konditionierung mit einer alkylierenden Substanz eine Karyotypveränderung im Rezidiv begünstigt bzw. mit verursacht.

Eine von M'Kacher et al an Hodgkin Lymphom und anderen Neoplasie-Patienten und einer gesunden Vergleichsgruppe durchgeführte Studie untersuchte chromosomale Aberrationen (CA) und komplexe chromosomale Aberrationen (CCA) an peripheren Lymphozyten während verschiedener Therapiephasen exemplarisch für Chromosom 1, 3 und 4. Die Autoren beobachteten signifikant häufiger CA und CCA nach der Chemotherapie und beobachteten eine Abhängigkeit vom Therapieregime. Die häufigste CA verursachende Kombination war BEACOPP (M'Kacher et al. 2003).

Genau wie in der vorliegenden Arbeit konnten die Autoren eine signifikant erhöhte Anzahl an CA nach alkylierende Substanzen enthaltenden Therapieregimen im Vergleich zu nicht-alkylierenden Substanzen finden ($p = 0,05$). CCR waren kontroverser Weise nicht signifikant häufiger nach Behandlung mit alkylierenden Substanzen. Sehr vorsichtig postuliert könnten sie ein Resultat der Bestrahlung und nicht der Chemotherapie mit alkylierenden Substanzen sein.

Von den 10 von 22 mit 12 Gy TBI konditionierten Patienten, hatten 6 von diesen 10 Patienten (60%) klonale Evolutionen, von den 12 nicht mit 12 Gy (gar keine oder 2 Gy Radiatio) bestrahlt wurden, hatten 9 von 12 (75%) eine klonale Evolution im Rezidiv. Dieser Wert war nicht signifikant ($p = 0,6517$). Wurde noch die intensitätsreduzierte Konditionierung mit 2 Gy abgezogen, blieben 7 von 22 Patienten ohne Konditionierungs-Bestrahlung übrig. Diese 7 von 7 Patienten wiesen alle (100%) klonale Evolutionen im Rezidiv nach allo-SZT auf.

Es könnte vermutet werden, dass die 12 Gy TBI am effektivsten alle malignen Zellen eradiziert. Wenn allerdings intensitätsreduziert (2 Gy) oder gar nicht bestrahlt wird, fördert dies durch ineffektive Vernichtung die klonale Evolution bei den dann überlebenden, durch die milde Bestrahlung selektierten Klonen. Die Werte erreichten keine statistische Signifikanz. Auf Grund der relativ geringen Spanne zwischen Bestrahlungsintensität und Prozentzahl der

evolutionierten Karyotypen (60% bei 12 Gy; 100% bei 0 Gy) kann die Bestrahlung höchstens als Ko-Faktor der Karyotypveränderung betrachtet werden.

Die bereits erwähnte, von M Kacher et al an Hodgkin Lymphom und anderen Neoplasie-Patienten und einer gesunden Vergleichsgruppe durchgeführte Studie untersuchte chromosomale Aberrationen (CA) und komplexe chromosomale Aberrationen (CCA) an peripheren Lymphozyten. Sie fanden signifikant häufiger CCA nach Bestrahlung und keine CCA vor Therapie bei gesunden Spendern und nur bei einem Neoplasie-Patienten und machten dafür eine spezielle Funktion oder eine Unfähigkeit der Hodgkin Lymphom-Zellen verantwortlich, wie z.B. defekte DNA Reparaturmechanismen. Auch hier ist der direkte Vergleich zu Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da hier eine andere hämatologische Neoplasie verglichen wurde und keine allo-SZT erfolgte.

Komplexe chromosomale Aberrationen (CCA) wurden auch bei einer Untersuchung an mesenchymalen Knochenmarkszellen von drei Patienten (1 Leukämiepatient, 2 gesunde Kontrollpatienten) nach in vitro Exposition mit anti-leukämischen Therapie äquivalenten TBI Dosen und vergleichbarer Fraktionierung gefunden (Yeh et al. 2012). Des Weiteren wurde in derselben Studie der Einfluß drei verschiedener Konditionierungsregime auf hämatopoetische sowie mesenchymale Knochenmarkszellen untersucht. Während die vorher in allen drei Fällen nachzuweisenden chromosomalen Aberrationen der hämatopoetischen Knochenmarkszellen nach 12 Gy TBI Konditionierung und PBSZT nicht mehr nachweisbar waren, konnten bei den mesenchymalen Knochenmarkszellen zusätzlich zu den vor Therapie vorhandenen CAs in allen drei Fällen komplexe chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden. Dies belegt den schon bekannten, komplexe chromosomale Aberrationen induzierenden Effekt der TBI, da bei den anderen Konditionierungsregimen (2 Fälle Busulfan/Cyclophosphamid, 1 Fall Hoch-Dosis Ara-C, 1 Fall Hoch-Dosis Ara-C/ATRA) keine chromosomalen Aberrationen nachweisbar waren (Yeh et al. 2012). Hier muss der lokale Effekt der TBI auf die mesenchymalen Knochenmarkszellen betont werden, da die Strahlendosis auf das KM zentriert sicher stärker mutagen auf die KM Zellen wirkt als die anderen systemisch verabreichten genotoxischen Konditionierungsregime. Es konnte bei den drei Fällen kein spezifisches der TBI zuzuschreibendes klonales Evolutionsmuster festgestellt werden, welches mit den in der vorliegenden Arbeit vergleichbar und so isoliert der TBI zuzuschreiben wäre. Auch hier wurde die Zytogenetik nicht im Rezidiv und bei mesenchymalen Knochenmarkszellen untersucht.

Die von Hur et al bei 99 akuten Leukämiepatienten gemachte Beobachtung, dass initial aberrante Klone signifikant häufiger (78,3%) zusätzliche Aberrationen im Rezidiv nach allo-SZT als initial normale (43,5%) ($p = 0,016$) aufweisen, konnte in dieser Arbeit fast identisch bestätigt werden (Hur et al. 2001). Von 14 Patienten mit Karyotypveränderungen im Rezidiv wiesen 11 schon initial Aberrationen auf (11 von 14) (78%) und von 6 initial normalen wiesen nur 3 (3 von 6) (50%) eine Karyotypveränderung im Rezidiv auf. Dies bestätigt, dass aberrante Klone anfälliger für den Zugewinn weiterer Aberrationen sind und könnte durch die immer komplexer werdende Anordnung der Spindelfasern und z.B. dezentrierten Centromeren oder Verlust von DNA Reparaturgenen erklärt werden.

Patienten ohne Karyotypveränderung im Rezidiv hatten in 4 von 7 (57%) Fällen denselben komplex aberranten Karyotyp vor allo-SZT wie im Rezidiv. Patienten mit einer Karyotypveränderung im Rezidiv hatten in 8 von 15 (53%) Fällen initial einen nicht komplex aberranten Karyotyp. Dieses bedeutet nicht unbedingt, dass ein komplex aberranter Karyotyp instabiler ist als ein einfach aberranter. Eventuell spielen hier andere, bisher unbekanntere Faktoren eine Rolle.

In dieser Arbeit hatten nur 2 von 22 (9%) sowohl initial als auch im Rezidiv nach allo-SZT einen normalen Karyotyp, also 20 von 22 (91%) hatten chromosomale Aberrationen im Rezidiv, 19 von 22 (86%) auch schon initial. Dies bestätigt, dass ein aberranter Karyotyp im Rezidiv nach allo-SZT sehr häufig ist und in derselben Spanne liegt, wie bei Therapie assoziierten AML (t-AML) und Myelodysplastischen Syndromen (t-MDS) (80-90%) (Fenaux et al. 2001).

Bis zu 50% der Therapie assoziierten AML und MDS haben einen komplex aberranten Karyotyp (Speicher et al. 1996, Schoch et al. 2001). In dieser Arbeit hatten 2 von 22 (9%) einen initial einfach aberranten und später einen komplex aberranten Karyotyp im Rezidiv nach allo-SZT. Dies würde gegen eine reine Therapie assoziierte Evolution sprechen.

Lediglich eine Patientin hatte einen normalen Karyotyp bei Erstdiagnose und einen komplex aberranten im Rezidiv sowie vor allo-SZT. Sie hatte bei weitem die längste Überlebenszeit nach Rezidiv mit 1660 Tagen (vs. Durchschnittlich 415 Tagen der Patienten mit Karyotypveränderungen im Rezidiv). Dies ist das einzige Beispiel, bei dem die Zytogenetik vor (aber eben nicht durch) die allo-SZT aberrant wurde. Sehr wahrscheinlicher ist, dass durch Zufall keine aberranten Klone entnommen wurden, da alle anderen Patienten mit einer Karyotypveränderung im Rezidiv schon bei Diagnose Aberrationen aufwiesen. Dies lässt im Vergleich mit den Therapie assoziierten AML/MDS wieder am ehesten die Schlussfolgerung zu, dass die Klone in dieser Arbeit „natürlich“ zunehmend instabiler werden, die komplexeren dann selektioniert (immunologisch und oder Therapie-resistenten Klone haben dann möglicherweise Wachstumsvorteil) und die Therapie nicht dazu beiträgt. Therapie assoziierte Veränderungen treten in gleicher Häufigkeit (80-90%) aber später (2-10 Jahre) auf.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine bisher nicht in der Literatur beschriebene klonale Evolution t(15;17) mit PML-RAR- α Rearrangement im Rezidiv 7 Jahre nach allo-SZT bei einem AML Patienten (FAB M2) gefunden werden. Normalerweise ist eine t(15;17)(q22,q21) mit Bildung eines PML-RAR- α Fusionsgenes typischerweise strikt auf die eigenständige Entität der FAB M3 Akute Promyelozytenleukämie beschränkt (Grignani et al. 1994). Trotzdem beschreiben wenige Fallberichte die Translokation t(15;17) mit oder ohne Bildung des PML-RAR- α Fusionsgenes bei AML Patienten mit anderen FAB-Typen als den typischen M3. Es gibt keine weiteren Berichte in der Literatur über die klonale Evolution dieser Translokation (Di Bona et al. 1996, Allford et al. 1999, S Li et al. 2000, Cotter et al. 2003). Die Immunphänotypisierung hat eine 100% Sensitivität und 99% Spezifität in der Vorhersage der PML-RAR- α Neubildung durch das hochgradig charakteristische, immunphänotypische Expressionsmuster von CD13, CD15 und CD34 (Orfao et al. 1999). Der Immunphänotyp dieses Patienten mit klonaler Evolution t(15;17) im Rezidiv nach allo-SZT war CD13 und CD15 positiv

sowie CD34 negativ und unterschied sich so von dem Immunphänotyp, welcher typischerweise bei t(15;17) mit PML-RAR- α erwartet wird.

Pathophysiologisches Modell

Obwohl die Daten zeigen, dass eine Chromosom 1 Aberration im Rezidiv nach allo-SZT mit einer Krankheitsprogression assoziiert ist, bleibt es unklar, welche Gene zusätzlich im Rezidiv betroffen sind. Die Daten von anderen Autoren sind kontrovers. Bei verschiedensten Tumoren konnte sowohl ein Zugewinn von Aberrationen an Chromosom 1 als auch ein Verlust vorher nachgewiesener Aberrationen (Devolution) von Chromosom 1 mit der Onkogenese an sich und der prognostischen Bedeutung assoziiert werden. Eine Evolution und/oder Devolution von Aberrationen an Chromosom 1 können ohne als auch mit negativen klinischen Effekten einhergehen. Die miteinander verglichenen Neoplasien sind genetisch verschieden, zytogenetisch kann keine Aussage über die molekularpathophysiologische, funktionelle Änderung der vielen Gene der Chromosomenbanden gemacht werden. Theoretisch könnte eine häufigere als bei einem zufälligen genetischen Ereigniss zu erwartende Beteiligung eines bestimmten Chromosoms in zytogenetischen Evolutionsmustern im Rezidiv oder der Progression mit der unterschiedlichen Empfindlichkeit für Schäden von chromosomalen Regionen bei verschiedenen Kondensationsgraden erklärt werden. Die Chromosomen sind innerhalb des Nukleus nicht zufällig angeordnet. In lymphoblastoiden Zellen sind Gen reiche Chromosomen im Zentrum und Gen arme Chromosomen mehr in der Peripherie des Nukleus angeordnet (Croft et al. 1999, Boyle et al. 2001). Ebenso denkbar wäre die Erlangung von zusätzlichen Tumorpromotorgenen oder Verlust von Tumorsuppressorgenen im Rezidiv und/oder bei der Progression die eben zu einem Rezidiv und/oder der Progression führen und sich auf der Makroebene der Chromosomen in einem veränderten Karyotyp darstellen würden. Diese Vermutung könnte durch molekularbiologisches Sequenzieren des Tumorgenoms vor Rezidiv/ im Rezidiv und Vergleich mit den Karyotypen vor Rezidiv/im Rezidiv bestätigt oder ausgeschlossen werden.

Von Ding et al wurde die klonale Evolution im ersten Rezidiv ohne allo-SZT bei acht an akuter myeloischer Leukämie erkrankten Patienten mit Ganz-Genom-Sequenzierung untersucht (Ding et al. 2012). Die Autoren fanden viele im Rezidiv neu mutierte Gene. Bei dem Vergleich zwischen Primärtumorgenom und Rezidivgenom konnten die Autoren zwei besondere klonale Evolutionsmuster beobachten.

Einmal erlangte der Urklon zusätzliche Aberrationen und evolutionierte in den Rezidivklon. Ein anderer Subklon des Urklones überlebte die initiale Therapie, erlangte zusätzliche Mutationen und expandierte.

In keinem Fall wurde der Urklon durch die Chemotherapie eliminiert und in allen Fällen wurden zusätzliche Transversionen im Rezidiv festgestellt. Die Autoren gehen auch von einem (Cytarabin und Anthrazykline als Induktion und Konsolidation) Chemotherapie induzierten Selektionsdruck aus (Ding et al. 2012). Die Arbeit von Ding et al bestätigt die im Rahmen der vorliegenden Arbeit formulierte Vermutung, dass die mit einem normalen Karyotyp rezidivierten

Klone zusätzliche molekulare Aberrationen im Rezidiv erlangen und dies auch ohne vorherige allo-SZT.

Eine Studie an Knock-out Mäusen bei denen der MYC Transkriptionsfaktor mittels Transfektion durch einen viralen Vektor genetisch verändert wurde und dadurch Multiple Myelome resultierten, zeigte drei mögliche Entwicklungen der Tumorzellen: stabil mutierte Klone, Klone mit einer linearen Evolution und Klone mit einem heterogenen Mix sich in ihrer Dominanz abwechselnder Klone. Die Autoren postulierten eine für alle Tumorzellen anzunehmende Symbiose. Aggressivere Klone können andere, weniger aggressive Klone unterstützen oder auch zurückdrängen und entstehen wahrscheinlich partiell durch den therapeutischen Selektionsdruck (Keats et al. 2012).

In einer in vivo Studie zur Zytogenetik von Doherty et al an somatischen Zellen wurde beobachtet, „dass die Zellen nach Induktion eines chromosomalen Schadens, zellbiologische Folgeschäden entwickeln, von denen die meisten letal für die Zelle auf Grund defekter Zellteilung sind. Die Anwesenheit der Schäden birgt aber ein Potential, feinere und daher übertragbare chromosomale Aberrationen, die die Zellteilung überleben und dann weitervererbt werden, zu erzeugen. Meistens sind induzierte zytogenetische Schäden begleitet von Genmutationen“ (AT Doherty et al. 2012).

Ob die Akkumulation einzelner spezifischer Gendefekte mit den jeweiligen additiven Folgen alleine zur autonomen Proliferation führt, wird gegenwärtig diskutiert. Nach Duesberg et al stören chromosomale Umlagerungen das Gleichgewicht vieler Gene in einem höheren Ausmaß als durch die Akkumulation der jeweils durch einzelne Umlagerungen veränderten Gene an den spezifischen Bruchpunkten alleine erklärbar wäre (Duesberg et al. 2011).

Die Rolle der Immunsuppression als ein die klonale Evolution begünstigender Faktor verdeutlicht sich bei den t-AML, die bei Patienten unter Immunsuppression nach Organtransplantation ohne vorherige gentoxische Chemo- oder Strahlentherapie beobachtet wurden (Offman et al. 2004).

Von B-Zell Lymphomen und CML Fällen ist bekannt, dass die Endothelzellen der LK und des KM Lymphom bzw. CML spezifische chromosomale Aberrationen aufwiesen (Gunsillius et al. 2000, Streubel et al. 2004).

Auch sind Fälle von akuten Leukämien nach Nabelschnur-Blutstammzelltransplantation bei dem Empfänger mit eindeutig zytogenetisch und molekular nachgewiesenem Spenderursprung aber ohne Leukämie zu irgendeinem Zeitpunkt bei dem Spender bekannt (Fraser et al. 2005). Die postulierten Mechanismen für diese Formen von Leukämie, wie Therapie induzierte oder hereditäre Abnormitäten der stromalen KM-Zellen, Transformation der Spenderzellen durch Antigenstimulation des Empfängergewebes oder Fusion der Spenderzellen mit verbliebenen Empfänger Leukämiezellen (Cooley et al. 2000) geben einen weiteren Hinweis auf die Komplexität der Leukämogenese und ihrer Einflußfaktoren.

Zusammenfassend ist es am wahrscheinlichsten, dass die bei den jeweiligen Patienten malignen Klone natürlich zunehmend genetisch instabiler werden und bei jüngerem Alter mit schnelleren

Proliferationsraten die malignen Klone statistisch eher zusätzliche Aberrationen akkumulieren, die dann bei einigen Patienten in mehreren Subklonen resultieren. Eine vorherige Konditionierung mit alkylierenden Substanzen scheint synergistisch mit dieser multifaktoriellen Genese zu wirken. Schon aberrante Klone scheinen anfälliger für die Akkumulation weiterer Aberrationen zu sein. Bisher nicht identifizierte Gene auf Chromosom 1 sind im Rezidiv häufiger betroffen und haben eine negative klinische Auswirkung. Warum Chromosom 1 häufiger betroffen ist, bleibt unklar. Wahrscheinlich führen Aberrationen an Chromosom 1 alleine oder additiv mit anderen Aberrationen zu einem Rezidiv und/oder Therapieresistenz, werden durch die Therapie selektioniert und sind so vermehrt in dieser Untersuchung repräsentiert. Zusätzliche Aberrationen von Chromosom 1 im Rezidiv machen die Klone - in Form der signifikant kürzeren Überlebenszeiten- aggressiver. Unklar bleibt ob dies durch noch nicht identifizierte Genmutationen oder durch einen mechanisch entstehenden, sich auf viele zellbiologische Funktionen auswirkenden Replikationsdefekt der malignen leukämischen Zellen basiert. Eine Erklärung könnte die defekte Regulation der Spindelfasern für die Zellteilungen bedingt durch vorherige Mutationen sein. Auf Grund der Vergleiche mit konventionell (nicht allo-SZT) behandelten akuten Leukämiepatienten scheint die allo-SZT nicht der die klonale Evolution allein auslösende Faktor zu sein. Jedoch scheinen die Faktoren, die mit der allo-SZT in Zusammenhang stehen (Konditionierung und Immunsuppression) sowie eventuelle Selektionsmechanismen des Spenderimmunsystems auf die restlich verbliebenen leukämischen Klone und Subklone des Empfängers jeweils zusätzlich zur „natürlichen Evolution“ beizutragen. So konnten in vielen Studien die spezifischen Aberrationen für die benutzten Therapiemodalitäten beschrieben werden (TBI und CCA, alkylierende Substanzen und CA/-5q/-7q, Busulphan und +8 usw.). Es wurde aber auch über einen, nach Hoch-Dosis Chemotherapie (HDCT) und allogener SZT, die zur kompletten zytologischen und zytogenetischen Remission führte und zum Auftreten eines neuen, hoch aberranten und völlig unspezifischem Klon viereinhalb Monate später bei einem AML Patienten berichtet, den die Autoren der vorherigen Therapie, der Immunsuppression und - auf Grund der schnellen Genese - dem klonalen Selektionsdruck zuschrieben (Kadam et al. 2007). Bei Betrachtung aller Studien und den isolierten Effekten der einzelnen Faktoren erscheinen die Aberrationen insgesamt sehr zufällig. Am wahrscheinlichsten ist, dass die durch alle Faktoren beeinflusst zufällig entstehenden, stabilen Aberrationen selektioniert werden.

Die Devolution einzelner Klone könnte ein Ausdruck der Darwinschen Nicht-Überlebensfähigkeit (Erreichbar durch die Therapie, immunologisch eradizierbar) bzw. kompetitiv eingreifender DNA-Reparaturmechanismen sein.

Perspektiven

Insgesamt haben die Daten in dieser spezifischen Hochrisikopopulation eine hohe Aussagekraft. Für die spezifischen Anforderungen (rezidierte akute Leukämie nach SZT mit Karyotyp initial/im Rezidiv vorhanden sowie rezidierte akute Leukämie ohne SZT mit Karyotyp initial/im Rezidiv vorhanden) könnten die Fragen zufriedenstellend nur in einer Multicenter-Metaanalyse beantwortet werden. Eine doppelblinde, randomisiert-kontrollierte prospektive

Studie kommt allein aus ethischen Gründen nicht in Frage. Die zunehmend entschlüsselte molekulargenetische Diversität der einzelnen Subentitäten der akuten Leukämien lässt erkennen, dass die Ursache bzw. der Mechanismus der Evolution mit Karyotypen alleine nicht zu beantworten ist. Sehr interessant wäre, die Entwicklung der Klone auf MRD-Ebene aus vielen Entnahmeorten (LK, PB, KM) zu verfolgen. So könnte man mehr über die Ursache der Evolution erfahren. Umino et al konnten durch oligo-array-CGH zeigen, dass die klonale Evolution der HTLV-1 induzierten T-ALL sehr wahrscheinlich in den peripheren Lymphknoten stattfindet (A Umino et al. 2011). Eine frühere Untersuchung an Atombombenüberlebenden fand, dass mehr aberrante Klone im KM als in PB gefunden wurden (Kamada et al. 1983, Ishihara et al. 1983). Diese werden möglicherweise in den peripheren Lymphknoten immunologisch eradiziert und einem chemotherapeutischem Selektionsdruck ausgesetzt. So wird zuerst die Anzahl der aberranten Klone vermindert, die stabil-evolutionierten werden dann selektiert.

Perspektivisch sollte die in 50% heilende Radiochemotherapie, die bekannterweise Sekundärneoplasien und auch malignere Rezidiv-Klone erzeugt durch spezifischere molekular ansetzende Therapien oder eventuell ex-vivo manipulierte Immunzellen (T/NK-Zellen) ersetzt werden und mit immuntherapeutischen Methoden – wie die Antikörpergabe gegen Immuntoleranz erzeugende Signale - sowie spezifisch in den Metabolismus maligner Zellen eingreifender Pharmaka kombiniert werden (Pardoll et al. 2012, Vander Heiden 2011).

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit sollten Wissenslücken über Karyotypveränderungen, deren Muster und klinische Auswirkungen im Rezidiv nach allogener SZT bei Patienten mit akuten Leukämien geschlossen werden. Damit wurde ein Beitrag zur Etablierung einer klinisch routinemäßig anzuwendenden Genomdiagnostik der leukämischen Zellen geleistet und deren Notwendigkeit begründet.

5. Zusammenfassung

Bis zu 50% der akuten Leukämien rezidivieren nach allogener peripherer Blutstammzelltransplantation (Schetelig et al. 2008). Die Prä-Transplantationszytogenetik hat einen festen Stellenwert in der Risikogruppeneinteilung (Mrozek et al.). Wenig untersucht wurden hingegen die Zytogenetik im Verlauf und der Einfluss einer Karyotypveränderung auf den weiteren Therapieverlauf. In dieser Arbeit wurde von 22 Patienten mit akuten Leukämien (AML (n = 18); ALL (n = 4)) der Karyotyp bei Diagnosestellung und der Karyotyp im Rezidiv nach allogener Blutstammzelltransplantation verglichen und mit Patientencharakteristika sowie Konditionierungsregimen korreliert. Folgende Ergebnisse werden zusammengefasst:

Eine Karyotypveränderung (Evolution und/oder Devolution) im Rezidiv nach allo-SZT konnte in 68% der Patienten festgestellt werden. Dies liegt im selben Prozentbereich wie bei konventionell nicht-allogen-transplantierten Patienten im Rezidiv.

Eine Karyotypveränderung an sich hatte keinen negativen Einfluss auf das mediane Gesamtüberleben (OS) oder Überleben nach Rezidiv (SAR).

Patienten mit einer Karyotypveränderung im Rezidiv waren signifikant jünger.

Chromosom 1, 3 und 4 waren im Verhältnis zu ihren Längen häufiger, Chromosom 2 und 9 seltener betroffen als erwartet, hätte es sich um zufällige genetische Ereignisse gehandelt. Besonders die überzufällige Beteiligung von Chromosom 1 im Rezidiv nach allo-SZT konnte von vier weiteren Studien bestätigt werden.

Der Zugewinn struktureller Chromosom 1 Aberrationen im Rezidiv nach allo-SZT war assoziiert mit einer signifikant kürzeren Gesamtüberlebenszeit (OS) und kürzerer Zeit von Rezidiv bis Rezidiv- assoziiertem Tod (SAR). Dies ist von klinischer Relevanz.

Es konnte keine Assoziation zwischen Konditionierungsart und fraglich spezifischen Karyotypveränderungen im Rezidiv hergestellt werden. Bei 28,6% der mit einer alkylierenden Substanz konditionierten Patienten und bei denen zusätzlich eine Änderung des Karyotypes im Rezidiv festgestellt wurden, konnten die vorher beschriebenen typischen Deletion 5 und/oder 7 zusätzlich gefunden werden.

In der Gruppe der mit einer alkylierenden Substanz konditionierten Patienten hatte kein Patient (0/14 (0%)) einen normalen Karyotyp im Rezidiv nach allo-SZT.

In der Gruppe der nicht mit einer alkylierenden Substanz konditionierten Patienten hatten alle Patienten (3/3 (100%)) keine zusätzlichen Aberrationen (keine Änderung des Karyotypes) im Rezidiv. Davon hatten 2 Patienten einen normalen Karyotyp (siehe Tabelle 9 und 10). Es besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0,04$) bezüglich einer Karyotypveränderung per se im Rezidiv zwischen Patienten, die mit einer alkylierenden Substanz konditioniert wurden und Patienten, die ohne eine alkylierende Substanz konditioniert wurden. Eine vorherige Konditionierung mit einer

alkylierenden Substanz scheint eine Karyotypveränderung im Rezidiv nach allo-SZT zu begünstigen.

Initial aberrante Klone haben häufiger zusätzliche Aberrationen im Rezidiv nach allo-SZT als initial normale (78% vs. 50%). Aberrante Klone sind anfälliger für den Zugewinn weiterer Aberrationen im Rezidiv nach allo-SZT.

Ein komplex aberranter Karyotyp (mehr als drei Aberrationen) ist nicht instabiler im Rezidiv nach allo-SZT als ein einfach aberranter (57% vs. 53%). Eventuell spielen hier andere, bisher unbekannte Faktoren eine Rolle.

Ein aberranter Karyotyp im Rezidiv nach allo-SZT ist sehr häufig (91% vs. 9%) und liegt in derselben Spanne wie bei den Therapie assoziierten AML (t-AML) und den Myelodysplastischen Syndromen (t-MDS) (80-90%).

Es konnte eine bisher nicht in der Literatur beschriebene klonale Evolution t(15;17) mit PML-RAR- α Rearrangement im Rezidiv 7 Jahre nach allo-SZT bei einem AML Patienten (FAB M2) gefunden werden. Normalerweise ist eine t(15;17)(q22,q21) mit Bildung eines PML-RARalpha Fusionsgenes typischerweise strikt auf die eigenständige Entität der FAB M3 akute Promyelozytenleukämie beschränkt.

Es bleibt unklar, warum einige Leukämien mit einem normalen Karyotyp rezidivieren und andere im Rezidiv evolutionieren. Auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit ist es am ehesten der zunehmenden genetischen Instabilität, einer Chemotherapie induzierten Mutationsgenese sowie einer immunologischen/Darwinschen Selektion überlebensfähigerer Klone zuzuschreiben. Sehr wahrscheinlich erlangen die Klone mit einem normalen Karyotyp im Rezidiv mit der konventionellen Zytogenetik nicht erfassbare, zusätzliche molekulare Aberrationen.

6. Literaturverzeichnis

- Alimena G, De Cuia MR, Mecucci C, Arcese W, Mauro F et al. Cytogenetic follow-up after allogeneic bone-marrow transplantation for Ph1-positive chronic myelogenous leukemia. *Bone marrow transplant* 1990; 2: 119-27
- Allers K, Hütter G, Hofmann J, Loddenkemper C, Rieger K, Thiel E, Schneider T. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation. *Blood* 2011; 117: 2791-2799
- Allford S, Grimwade D, Langabeer S, Duprez E, Saurin A. Identification of the t(15;17) in AML FAB types other than M3: evaluation of the role of molecular screening for the PML/RAR α rearrangement in newly diagnosed AML. *British Journal of Haematology* 1999; 105: 198-207
- Anderson K, Lutz C, Van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, Kempinski H, Moorman AV, Titley I, Swansbury J, Kearney L, Enver T, Greaves M. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 2011; 469: 356-362
- Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature Genetics* 2002; 1: 41-7
- Arora M, Nagaraj S, Witte J, DeFort TE, MacMillan M et al. New classification of chronic GVHD: added clarity from the consensus diagnoses. *Bone marrow Transplantation* 2009; 43: 149-153
- Aschan J. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: current status and future outlook. *British Medical Bulletin* 2006; 77: 23-36
- Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sule N et al. High frequencies of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection. *Blood* 2001; 97: 3574-3580
- Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters- an analysis of 3082 patients. *Blood* 2008; 111: 2527-2537
- Bacher U, Schnittger S, Haferlach T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Oncology* 2010; 22: 646-655
- Bacigalupo A, Lamparelli T, Gualandi F, Occhini D, Bregante S et al. Allogeneic hemopoietic stem cell transplants for patients with relapsed acute leukemia: long-term outcome. *Bone Marrow Transplantation* 2007; 39: 341-346
- Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H et al. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 5: 487-95

- Bagchi A, Mills AA. The quest for the 1p36 tumor suppressor. *Cancer Res* 2008; 68(8): 2551-6
- Baird K, Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Current Opinion in Hematology* 2006; 13: 426-435
- Barch MJ, Knudsen T, Spurbeck JL. *AGT Cytogenetics Laboratory Manual*; 3rd Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia 1997
- Bassan R, Hoelzer D. Modern Therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29: 532-543
- Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European Leukemia Net Work Package 10. *Leukemia* 2011; 25: 567-574
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the immunological characterization of leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 10: 1783-6.
- Betz BL, Hess JL. Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 1427-1433
- Blau IW, Schmidt-Hieber M, Leschinger N, Göldner H, Knauf W, Hopfenmüller W et al. Engraftment kinetics and hematopoietic chimerism after reduced-toxicity conditioning with fludarabine and treosulfan prior to allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol.* 2007; 86(8): 583-9
- Blau IW. Untersuchung des hämatopoetischen Chimärismus nach der allogenen Stammzelltransplantation und Konditionierung mit reduzierter Intensität. Habilitationsschrift für das Fach Innere Medizin. Charite Berlin, Campus Benjamin Franklin 2007
- Bornhäuser M, Theuser C, Soucek S, Hölig K, Klingenberg T et al. Allogeneic transplantation of G-CSF mobilized peripheral blood stem cells from unrelated donors: a retrospective analysis. *Haematologica* 2000; 85: 839-847
- Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Childrens oncology group study. *Blood* 2008; 111: 5477-5485
- Braun C, Duffau P, Mahon FX, Rosier E, Leguay T, Etienne G, Michaud M. Acute pancreatitis due to hypercalcemia revealing adult t-cell leukemia. *Rev Med Interne* 2007; 28: 116-9
- Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D. A chromosomal deletion map of human malformations. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 63: 1153-1159
- Bruggemann M, Raff T, Flohr T et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 107: 1116-1123

Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29: 487-494

Calado RT, Regal JA, Hills M. Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106: 1187-92

Campana D. Molecular determinants of treatment response in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 2008; 366-373

Campana D. Status of minimal disease testing in childhood haematologic malignancies. *British Journal of Haematology* 2008; 143: 481-489

Carvalho B, Ouwerkerk E, Meijer GA, Ylstra B. High resolution microarray comparative genomic hybridization analysis using spotted oligonucleotides. *Journal of Clinical Pathology* 2004; 57: 644-646

Chase A, Pickard J, Szydlo R, Coulthard S, Goldman JM, Cross CP. Non-random involvement of chromosome 13 in patients with persistent or relapsed disease after bone-marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2000; 27: 278-284

Choi S-J, Lee JH, Lee JH, Kim S, Seol M. Treatment of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation with chemotherapy followed by G-CSF primed donor leukocyte infusion: a high incidence of isolated extramedullary relapse. *Leukemia* 2004; 18: 1789-1797

Chucrallah AE, Stass SA, Huh YO, Albitar M, Kantarjian HM. Adult acute lymphoblastic leukemia at relapse. Cytogenetic, immunophenotypic and molecular changes. *Cancer* 1995(6) 985-91

Collins RH, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralt S et al. Donor leukocyte infusions in patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Oncology* 1997; 15: 433-444

Cooley LD, Sears DA, Udden MM et al. Donor cell leukemia: report of a case occurring 11 years after allogeneic bone marrow transplantation and review of the literature. *Am J Hematol.* 2000; 63: 46-53

Cornelissen JJ, Van Putten WLJ, Verdonck LF et al. Results of a HOVON-SAKK donor versus donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first complete remission acute myeloid leukemia in young and middle aged adults: benefits for whom? *Blood* 2007; 109: 3658-3666

Corson TW, Huang A, Tsao MS, Gallie BL. KIF14 is a candidate oncogene in the 1q minimal region of genomic gain in multiple cancers. *Oncogene* 2005; 30: 4741-53

Cortes J, O'Dwyer ME. Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004; 18: 671-684

Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Berestein L, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids – the mix of hormones and biomarkers. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2011; 8: 467-477

Cotter M, Enright H. A novel t(15;17) translocation in acute myeloid leukaemia not associated with PML/RAR α rearrangement. *Clin. Lab. Haem.* 2003; 25: 255-257

Duesberg P, Mandrioli D, McCormack A, Nicholson JM. Is carcinogenesis a form of speciation? *Cell Cycle* 2011; 13: 2100-14

Dias S, Choy M, Alitalo K, Rafii S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - C signaling through FLT-4 mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* 2002; 99: 2179-2184

Di Bona E, Montaldi A, Guercini N, Rossi V, Luciano A, Biondi A, Rodeghiero F. A (15;17) translocation not associated with acute promyelocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 1996; 95: 706-9

Ding Li, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole genome sequencing. *Nature* 2012; 481: 506-510

Doherty AT, Baumgartner A, Anderson D. Cytogenetic in vivo assays in somatic cells. *Methods in Molecular Biology* 2012; 817: 271-304

Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K et al. Genomic Aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2000; 343: 1910-6

Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2010; 115: 453-474

Estey E, Keating MJ, Pierce S, Stass S. Change in karyotype between diagnosis and first relapse in acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 1995; 6: 972-6

Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D, Kantarjian HM. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2010; 116: 1165-76

Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc + AML): biologic and clinical features. *Blood* 2007; 109: 874-885

Fenaux P, Chromienne C, Degos L. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol.* 2001; 38: 13-25

Ferrara F, Palmieri S, Leoni F. Clinically useful prognostic factors in acute myeloid leukemia 2005; 66: 181-193

Fey MF. Normal and malignant hematopoiesis. *Annals of Oncology* 2007; 18: i9-i13

Fey MF. New insights into molecular mechanisms of haematological malignancies. *Annals of Oncology* 2008; 19: v59-v62

Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M et al. Standard graft versus host disease prophylaxis with or without anti t cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomized, open label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncology* 2009; 10: 855-64

Fonseca R, Van Wier SA, Chang WJ, Ketterling R. Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia* 2006; 20: 2034-2040

Franklin J, Pluetschow A, Paus M, Specht L, Anselmo AP, Aviles A, Biti G, Bogatyreva T, Bonadonna G, Brillant C, Cavalieri E, Diehl V, Eghbali H, Ferme C, Henry Amar M, Hoppe R, Howard S, Meyer R, Niedzwiecki D, Pavlovsky S, Radford J, Raemaekers J, Ryder D, Schiller P, Shakhtarina S, Valagussa P, Wilimas J, Yahalom J. Second malignancy risk associated with treatment of Hodgkin`s lymphoma: meta analysis of the randomized trials. *Annals of Oncology* 2006; 17: 1749-1760

Fraser CJ, Hirsch BA, Dayton V, Creer MH, Neglia JP et al. First report of donor cell-derived acute leukemia as a complication of umbilical cord blood transplantation. *Blood* 2005; 106: 4377-4380

Frasconi F, Barrett AJ, Granena A, Ernst P, Garthon G, Kolb HJ, Prentice HG, Vernant JP, Zwaan FE, Gratwohl A. Relapse after allogeneic bone marrow transplantation for acute leukaemia: a survey by the E.B.M.T. of 117 cases. *British Journal of Hematology* 1988; 3: 317-20

Gilliland DG, Griffin JD. Role of FLT3 in leukemia. *Current Opinion in Hematology* 2002; 9: 274-281

Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100: 1532-1542

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE et al. Clinical manifestation of graft versus host disease in human recipients of marrow from HL-A matched sibling donors. *Transplantation* 1974; 18(4): 295-304

Gökbuget N, Ganser A, Schlenck RF. Akute Leukämien: Leitlinie der DGHO 2005

Gökbuget N, Hoelzer D. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2009; 46(1): 64-75

Goldman J. Monitoring minimal residual disease in BCR-ABL positive chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Current Opinion in Hematology* 2005; 12: 33-39

Graux C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. *Transfusion and Apheresis Science* 2001; 44: 183-189

- Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481: 306-313
- Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 1994; 83: 10-25
- Grimwade D, Vyas P, Freeman S. Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr Op Oncol* 2010; 22: 656-663
- Gunsillius E, Duba HC, Petzer AI. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet* 2000; 355: 1688-1691
- Gustafsson G, Schmiegelow K, Forestier E, Clausen N, Glomstein A et al. Improving outcome through two decades in childhood ALL in the Nordic countries: the impact of high dose methotrexate in the reduction of CNS irradiation. Nordic society of pediatric haematology and oncology (NOPHO). *Leukemia* 2000; 12: 2267-75
- Gujral S, Badrinath Y, Kumar A, Subramanian PG et al. Immunophenotypic profile of acute leukemia: critical analysis and insights gained at a tertiary care center in india. *Cytometry Part B* 2009; 76B: 199-205
- Haferlach C, Alpermann T, Schnittger S, Kern W, Chromik J. Prognostic value of monosomal karyotype in comparison to complex aberrant karyotype in acute myeloid leukemia: study on 824 cases with aberrant karyotype. *Blood* 2012; 119: 2122-2125
- Harewood L, Chaignat E, Reymond A. Structural variation and its effect on expression. *Methods in Molecular Biology*; 838: 173-186
- Hart DP, Peggs KS. Current status of allogeneic stem cell transplantation for treatment of hematologic malignancies. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2007; 82: 325-329
- Hölzer D, Thiel E, Löffler H, Buchner T, Ganser A. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 1988; 71: 123-131
- Hing S, Lu YJ, Summersgill B, King-Underwood L, Nicholson J. Gain of 1q is associated with adverse outcome in favorable histology wilms tumors. *Am J Pathol* 2001; 158: 393-398
- Hur M, Chang YH, Lee DS, Park MH, Cho HI. Immunophenotypic and cytogenetic changes in acute leukaemia at relapse. *Clin. Lab. Haem.* 2001; 23: 173-179
- Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müßig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine* 2009; 360: 692-8
- ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, Basel 2005.
- International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ eds. *ISCN 2009: an International system for human cytogenetic nomenclature.* Basel;Unionville,CT: Karger 2009

- Ishihara T, Sasaki M, Oshimura M, Kamada N, Yamada K. A summary of cytogenetic studies on 534 cases of chronic myelocytic leukemia in Japan. *Cancer Genet Cytogenet.* 1983; 1: 81-91
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J et al. Cancer statistics 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 2: 106-30
- Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* 2002; 107: 76-94
- Kadam PS, Jain HV, Parikh PM, Saikia TK, Agarw S et al. Emergence of an unrelated highly aberrant clone in an AML patient at relapse four months after peripheral blood stem cell transplantation. *Indian J Hum Genet.* 2007; 13(3): 114-118.
- Kamada N, Tanaka K, Dohy H, Takimoto Y, Oguma N, Kuramoto A. Cytogenetic studies on patients with leukemia and RAEB found in atomic bomb survivors. *Rinsho Ketsueki* 1984; 2: 156-63
- Kanamaru A, Takemoto Y, Tanimoto M, Murakami H, Asou N et al. All-trans retinoic acid for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1995; 85: 1202-1206
- Karrmann K, Sallerfors B, Lenhoff S, Fioretos T, Johansson B. Cytogenetic evolution patterns in CML post SCT. *Bone Marrow Transplantation* 2007; 39: 165-171
- Kearny L. Multiplex-FISH (M-FISH): technique, developments and applications. *Cytogenetic Genome Research* 2006; 114: 189-198
- Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, Van Wier S et al. Clonal Competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* 2012-01-405985
- Kern W, Haferlach T, Schnittger S, Ludwig WD, Hiddemann W. Karyotype instability between diagnosis and relapse in 117 patients with acute myeloid leukemia: implications for resistance against therapy. *Leukemia* 2002; 16: 2084-2091
- Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008; 112: 4-16
- Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N. Graft versus leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995; 86: 2041-2050
- Korshunov A, Sycheva R, Golanov A, Pronin I. Gains at the 1p36 chromosomal region are associated with symptomatic leptomeningeal dissemination of supratentorial glioblastomas. *American Journal of Clinical Pathology* 2007; 127: 585-590
- Langlois RG, Yu LC, Gray JW, Carrano AV. Quantitative karyotyping of human chromosomes by dual beam flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 7876-7880
- Lawler SD, Khokhar MT, Davies H, Williams GJ, Powles R. Cytogenetic studies of leukemic recurrence in recipients of bone marrow allografts. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 47: 249-263

- Lazarus HM, Richards SM, Chopra R, Litzow MR, Burnett AK. Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: results from the international ALL trial MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood* 2006; 108: 465-472
- Lee SJ. Have we made progress in the management of chronic graft-vs-host disease? *Best Practice & Research clinical haematology* 2010; 23: 529-535
- Li P, Burke S, Wang J, Chen X, Ortiz M et al. Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science* 2010; 329(5987): 85-89
- Li S, Zhang L, Kern WF, Andrade D, Forsberg JE et al. Identification of t(15;17) and a segmental duplication of chromosome 11q23 in a patient with acute myeloblastic leukemia M2. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2000; 138: 149-152
- Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278: 1059-64
- Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 1999; 341: 1051-1062
- Löwenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008: 1-11
- M Kacher R, Girinsky T, Koscielny S, Dossou J, Violot D et al. Baseline and treatment-induced chromosomal abnormalities in peripheral blood lymphocytes of Hodgkin`s lymphoma patients. *Int. J.Radiation Oncology Biol.Phys* 2003; 57(2): 321-326
- Macgregor S, Montgomery GW, Liu JZ, Zhao ZZ, Henders AK et al. Genome- wide association study identifies a new melanoma susceptibility locus at 1q21.3. *Nat Genet* 2011; 43(11): 1114-8
- MacKinnon RN, Chudoba I. The Use of M-FISH and M-Band to define chromosome abnormalities. *Cancer Cytogenetics, Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 2011; 730: 203-218
- Marcucci G, Mrozek K, Bloomfield CD. Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. *Current Opinion in Hematology* 2005; 12: 68-75
- Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. Molecular Genetics of Adult Acute Myeloid Leukemia: Prognostic and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29: 475-486
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD et al. Recurring Mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *New England Journal of Medicine* 2009; 361: 1058-66
- Maru DM, Luthra R, Correa AM, White-Cross J, Anandasabapathy S et al. Frequent loss of heterozygosity of chromosome 1q in esophageal adenocarcinoma. *Cancer* 2009; 115: 1576-85

- Mason J, Griffiths M. Detection of minimal residual disease in leukemia by rt-pcr. *Methods in Molecular Biology* 2011; 688: 269-280
- Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powel BL et al. Intensive post-remission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 1994; 331: 896-903
- Medeiros BC, Chun K, Kamel-Reid S, Lipton J. Inv (11)(p14q21) in donor-derived Ph-negative cells in a patient with chronic myeloid leukemia in relapse successfully treated with imatinib mesylate post allogeneic stem cell transplantation. *American Journal of Hematology* 2007; 82: 758-760
- Mitelman F. *ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, Switzerland: Karger Publications; 1995.
- Moghrabi A, Levy DE, Asselin B, Barr R, Clavell L. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007; 109: 896-904
- Morton J, Hutchins C, Durrant S. Granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) – primed allogeneic bone marrow: significantly less graft versus host disease and comparable engraftment to G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells. *Blood* 2001; 98: 3186-3191
- Monnier A. Effets Tardifs de la radiotherapie externe sur la glande thyroide. *Cancer Radiotherapy* 1997; 1: 717-31
- Mrozek K, Prior TW, Edwards C, Marcucci G, Carroll AJ et al. Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv (16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group b study. *Journal of Clinical Oncology* 2001; 19: 2482-2492
- Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews* 2004; 18: 115-136
- Mrozek K, Döhner H, Bloomfield CD. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Current Opinion in Hematology* 2007; 14: 106-114
- Murken J, Cleve H. *Humangenetik, 6.Auflage* Enke, Stuttgart 1996
- Neben K, Lokhorst HM, Jauch A, Bertsch U, Hielscher T, van der Holt B, Salwender H, Blau IW et al. Administration of bortezomib before and after autologous stem cell transplantation improves outcome in multiple myeloma patients with deletion 17p. *Blood* 2010; 119: 940-948
- Nemec P, Zemanova Z, Greslikova H, Michalova K, Filkova H. Gain of 1q21 is an unfavorable genetic prognostic factor for multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16: 548-554

Nowak D, Klaumuenzer M, Hanfstein B, Mossner M, Nolte F et al. SNP array analysis of acute promyelocytic Leukemia may be of prognostic relevance and identifies a potential high risk group with recurrent deletions on chromosomal subband 1q31.3. *Genes, Chromosomes & Cancer* 00: 000-000 (2012)

Offit K, Burns JP, Cunningham I, Jhanwar SC, Black P, Kernan NA, O'Reilly RJ, Chaganti RS. *Blood* 1990; 75: 1346-1355

Offmann J, Opelz G, Doehler B et al. Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation. *Blood* 2004; 104: 822-8

Orfao A, Chillon MC, Bortoluci AM, Lopez-Berges MC, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Taberero MD, Garcia-Marcos MA, Rasillo AI, Hernandez-Rivas J, San Miguel JF. The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RAR α gene rearrangements. *Hematologica* 1999; 84: 405-412

Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/ enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nature Genetics* 2001; 3: 263-70

Pardoll DM. The Blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12: 252-264

Pelissari DM, Barbieri FE, Wunsch Filho V. Magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children: a systematic review of case-control studies 2009; 25: 441-52

Peloso LC, Gerber DE. Paraneoplastic syndromes: An approach to diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2010; 85(9): 838-854

Peters JM, Ansari Q. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 44-51

Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genetics* 1998; 20: 207-11

Porter DL, Collins RH, Hardy C, Kernan NA, Drobyski WR. Treatment of relapsed leukemia after unrelated donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions. *Blood* 2000; 95: 1214-1221

Pullarkat V, Slovak ML, Kopecky KJ, Forman SJ, Appelbaum FR. Impact of cytogenetics on the outcome of adult acute lymphoblastic leukemia: results of southwest oncology group 9400 study. *Blood* 2008; 111: 2563-2572

Pulte D, Gondos A, Brenner H. Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century. *Blood* 2009; 113: 1408-1411

- Rowe D, Cotterill SJ, Ross FM, Bunyan DJ, Vickers SJ et al. Cytogenetically cryptic AML1-ETO and CBF beta- MYH11 gene rearrangements: incidence in 412 cases of acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* 2000; 4: 1051-6
- Rowe JM. Optimal management of adults with ALL. *Br J Hematol.* 2009; 144(4): 468-483
- Rowe JM. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2010; 150(4): 389-405
- Sagoo P, Ali N, Garg G, Nestle FO, Lechler RI, Lombardi G. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 2011; 3(83): 83ra42
- Sargin B. AML und ALL des Erwachsenen – Neues aus Pathogenese, Diagnostik und Therapie. *Journal Onkologie Online.* (www.journalonko.de)
- Schetelig J, Bornhäuser M, Schmid C, Hertenstein B, Schwerdtfeger R, Martin H, Stelljes M, Hegenbart U, Schäfer-Eckart K, Füssel M, Wiedemann B, Thiede C, Kienast J, Baurmann H, Ganser A, Kolb HJ, Ehninger G. Matched unrelated or matched sibling donors result in comparable survival after allogeneic stem-cell transplantation in elderly patients with acute myeloid leukemia: a report from the cooperative german transplant study group. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26: 5183-5191
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J et al. Mutations and outcome of treatment in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 2008; 358: 1909-1919.
- Schmid C, Labopin M, Nagler A, Bornhäuser M, Finke J et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J Clin Oncol.* 2007; 25(31): 4938-45
- Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Alpermann T et al. Clinical impact of FLT3 mutation load in acute promyelocytic leukemia with t(15;17)/PML-RARA. *Haematologica* 2011; 96(12): 1799-807.
- Schoch R, Pitako J, Schafhausen P, Jenisch S, Haferlach T et al. Semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis for detection of bcr/abl rearrangement using RNA extracts from bone marrow aspirates compared with glass slide smears after 0, 2 and 4 d of storage. *Br J Haematol* 2001; 115(3): 583-7
- Schoch C, Kern W, Krawitz P, Dugas M, Schnittger S et al. Dependence of age-specific incidence of acute myeloid leukemia on karyotype. *Blood* 2001; 98:
- Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W et al. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 2003; 102(7): 2395-402

Schrapppe M, Camitta B, Pui CH, Eden T, Gaynon P et al. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; 12: 2193-4

Schröck E, Veldman T, Padilla-Nash H, Ning Y, Spurbeck J et al. Spectral Karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet.* 1997; 101(3): 255-62

Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children`s Cancer Group (CCG). *Blood* 2007; 109(3): 926-35

Shah NK, Wagner J, Santos G, Griffin C. Karyotype at relapse following allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genetics & Cytogenetics* 1992; 61: 183-192

Shannon K, Armstrong SA. Genetics, Epigenetics and Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2010; 363: 2460-2461

Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE et al. A validated gene expression model of high risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* 2007; 109: 2276-2284

Shikano T, Ishikawa Y, Ohkawa M, Hatayama Y, Nakadate H, Hatae Y, Takeda T. Karyotypic changes from initial diagnosis to relapse in childhood acute leukemia. *Leukemia* 1990; 6: 419-22

Silvermann LB, Sallan SE. Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment. *Curr Opin Hematol.* 2003; 10(4): 290-6

Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996; 14(1): 18-24

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20(4): 399-407

Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet.* 1996; 12(4): 368-75

Streubel B, Chott A, Huber D, Exner M, Jager U et al. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *New Eng J Med* 2004; 351: 250-259

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008

Tallmann MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH et al. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. *Blood* 2002; 100(13): 4298-302

Tallmann MS, Dewald GW, Gandham S, Logan BR, Keating A, Lazarus HM, Litzow MR, Jayesh M, Pedersen T, Perez WS, Rowe JM, Wetzler M, Weisdorf DJ. Impact of cytogenetics on outcome of matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first or second complete remission. *Blood* 2007; 110: 409-417

Thiebaut A, Vernant JP, Degos L, Huguet FR, Reiffers J et al. Adult acute lymphocytic leukemia study testing chemotherapy and autologous and allogeneic transplantation. A follow-up report of the French protocol LALA 87. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000; 14(6): 1353-66

Thomas ED, Lochte HL, Lu WC. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *New England Journal of Medicine* 1957; 257: 491-6

Tommerupp. *ISCN* 2009

Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C et al. Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet.* 1999; 65(2): 448-62

Umino A, Nakagawa M, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Taira N, Katayama N, Seto M. Clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma takes place in the lymph nodes. *Blood* 2011; 117: 5473-5478

Usvasalo A, Elonen E, Saarinen-Pihkala UM, Riikka R, Harila-Saari A, Koistinen P, Savolainen ER, Knuutila S, Hollmen J. Prognostic classification of patients with acute lymphoblastic leukemia by using gene copy number profiles identified from array-based comparative genomic hybridization data. *Leukemia research* 2010; 34: 1476-1482

Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery* 2011; 10: 671-684

Van den Ijssel P, Tijssen M, Chin SF, Eijk P, Carvalho B, Hopmans E, Holstege H, Bangarusamy DK, Jonkers J, Meijer GA, Caldas C, Ylstra B. Human and mouse oligonucleotide-based array CGH. *Nucleic Acid Research* 2005; 22: e192

Van den Neste E, Robin V, Francart J, Hagemeyer A, Stul M et al. Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in b-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia* 2007; 21: 1715-1722

Verma A, Stock W. Management of adult acute lymphoblastic leukemia: moving towards a risk-adapted approach. *Curr Opin Oncol* 2001; 13(1): 14-20

www.seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html (Stand 10. November 2011)

Wang X, Lu L, Jiang S. Regulatory T cells: customizing for the clinic. *Sci Transl Med.* 2011; 3(83): 83ps19

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB et al. *Science* 2004; 306(5694): 269-71

- Wessendorf S, Fritz B, Wrobel G, Nessling M, Lampel S et al. Automated screening for genomic imbalances using matrix-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest.* 2002; 82: 47-60
- Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrozek K, Paschka P et al. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood* 2008; 111(3): 1552-9
- Xu W, Li JY, Liu Q, Zhu Y, Pan JL, Qiu HR, Xue YQ. Multiplex fluorescence in situ hybridization in identifying chromosome involvement of complex karyotypes in de novo myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *International Journal of Laboratory Hematology* 2010; 32: e86-e95
- Yasar D, Karadogan I, Alanoglu G, Akkaya B, Luleci G, Salim O, Timuragaoglu, Toruner GA, Berker-Karauzum S. Array comparative genomic hybridization analysis of acute leukemia patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2010; 197: 122-129
- Yeh SP, Lo WJ, Lin CL, Liao YM, Lin CY et al. Anti-leukemic therapies induce cytogenetic changes of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Ann Hematol* (2012) 91: 163-172
- Yoshihara T, Hibi S, Yamane Y, Morimoto A, Hashida T et al. Numerous nonclonal chromosomal aberrations arising in residual recipient hematopoietic cells following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2005; 35: 587-589
- Zhou GN, Chen BA. M-FISH technique in diagnosis and prognostic analysis for acute leukemia with complex chromosomal aberrations. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2010; 18: 246-9

7. Erklärung an Eides Statt

Erklärung

„Ich, Gregor Richter, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Zytogenetische Veränderungen akuter Leukämien im Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Igor-Wolfgang Blau für die Vergabe meines Dissertationsthemas, die gute, motivierende fachliche und menschliche Betreuung, stete Beantwortung anfallender Fragen und Korrekturen.

Zu vielem Dank verpflichtet bin ich auch seinem damaligen Assistenzarzt PD Dr. med. Martin Schmidt-Hieber für die Unterstützung bei der Auswertung, Ausarbeitung der vorab veröffentlichten Publikation und Korrekturlesungen.

Vielen Dank auch an Frau Dr. med. habil (ru) Olga Blau für die Hilfe bei der Datenerfassung, Frau Prof. Dr. med. Gundula Thiel für die Bereitstellung der Daten aus ihrer humangenetischen Praxis, Frau Dr. med. Türkmen und Frau Dr. rer. nat. Bommer für die Hilfe bei der Datenerhebung im Institut für Humangenetik der Charite.

Ganz besonders herzlichen Dank an meine Eltern (Ruth Martius, Dr. med. Thomas Richter), meinen Stiefvater (Dr. rer. pol. Götz Martius) und meine Schwester (Ass. iur. Elena Richter) für die liebevolle und oftmals auch aufopferungsvolle Unterstützung auf allen bisherigen Lebenswegen von der Schule, dem Studium bis zu dieser Arbeit. Ihnen sei sie gewidmet.

9. Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.