

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie
und Tumorimmunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Bedeutung der Immunphänotypisierung für die Diagnose und
Therapie - Stratifizierung hämatologischer Neoplasien**

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.),
vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Richard Schabath

aus Saarbrücken

Datum der Promotion: 09.09.2016

Inhaltsverzeichnis:

| | |
|--|-----------|
| 1. Publikationen: Titel und Journal | 3 |
| 1.1. The murine chemokine receptor CXCR4 is tightly regulated during T cell development and activation, J Leukoc Biol. 1999: | 3 |
| 1.2. Differential expression of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules panCD66, CD66a, CD66c and of sialyl-Lewis x (CD15s) on blast cells of acute leukemias. Int J Hematol. 2008:..... | 3 |
| 1.3. Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations. Br J Haematol. 2010: | 3 |
| 1.4. Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. Blood. 2011: | 3 |
| 1.5. Lineage classification of childhood acute lymphoblastic leukemia according to the EGIL recommendations: results of the ALL-BFM 2000 trial.Klin Padiatr. 2013: | 3 |
| 2. Zusammenfassung der Publikationen | 4 |
| 2.1. Abstract..... | 4 |
| 2.2. Einleitung..... | 7 |
| 2.3. Zielstellung..... | 10 |
| 2.4. Material und Methoden..... | 10 |
| 2.5. Ergebnisse und Diskussion..... | 13 |
| 2.6. Literatur..... | 16 |
| 3. Anteilserklärung, Selbstständigkeitserklärung und eidesstattliche Versicherung | 18 |
| 4. Fünf Publikationen als Publikationsleistung | 20 |
| 4.1. Publikation 1: | 22 |
| 4.2. Publikation 2: | 31 |
| 4.3. Publikation 3: | 38 |
| 4.4. Publikation 4: | 48 |
| 4.5. Publikation 5: | 57 |
| 5. Lebenslauf..... | 63 |
| 6. Publikationsliste | 66 |
| 7. Danksagung | 69 |

1. Publikationen: Titel und Journal

1.1. The murine chemokine receptor CXCR4 is tightly regulated during T cell development and activation, J Leukoc Biol. 1999:

Schabath R, Müller G, Schubel A, Kremmer E, Lipp M, Förster R. J Leukoc Biol. 1999 Dec;66(6):996-1004.

1.2. Differential expression of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules panCD66, CD66a, CD66c and of sialyl-Lewis x (CD15s) on blast cells of acute leukemias. Int J Hematol. 2008:

Ratei R, Karawajew L, Schabath R, Ehrfeldt A, Grunert F, Ludwig WD. Int J Hematol. 2008 Mar;87(2):137-43.

1.3. Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations. Br J Haematol. 2010:

Gerr H, Zimmermann M, Schrappe M, Dworzak M, Ludwig WD, Bradtke J, Moericke A, Schabath R, Creutzig U, Reinhardt D. Br J Haematol. 2010 Apr;149(1):84-92.

1.4. Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. Blood. 2011:

Matutes E, Pickl WF, Van't Veer M, Morilla R, Swansbury J, Strobl H, Attarbaschi A, Hopfinger G, Ashley S, Bene MC, Porwit A, Orfao A, Lemez P, Schabath R, Ludwig WD. Blood. 2011 Mar;117(11):3163-71.

1.5. Lineage classification of childhood acute lymphoblastic leukemia according to the EGIL recommendations: results of the ALL-BFM 2000 trial. Klin Padiatr. 2013:

Ratei R, Schabath R, Karawajew L, Zimmermann M, Möricke A, Schrappe M, Ludwig WD. Klin Padiatr. 2013 May;225 Suppl 1:S34-9.

2. Zusammenfassung der Publikation

2.1. Abstract

Deutsch:

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der allgemeinen Bedeutung der Durchflusszytometrie für die Charakterisierung der physiologischen Hämatopoese und dem Stellenwert der Immunphänotypisierung von Knochenmark und peripherem Blut für die Definition und Diagnose distinkter, prognoserelevanter Subtypen von akuten Leukämien im Kindesalter und Erwachsenenalter mit Schwerpunkt auf den akuten Leukämien mit gemischtem Immunphänotyp („mixed phenotype acute leukemias“ nach der WHO Klassifikation, vormals „akute biphänotypischen Leukämien“ („acute biphenotypic leucemia“, BAL) nach der EGIL Klassifikation).

English:

The present work discusses the general significance of flow cytometry in the characterization of the physiological hematopoiesis and the importance of immunophenotyping of bone marrow and peripheral blood in the definition and diagnosis of distinct relevant subtypes of acute leukemias in childhood and adulthood, focusing on "mixed phenotype acute leukemias" according to the WHO classification, formerly named as "acute biphenotypic leucemias" according to the EGIL classification.

2.2. Zusammenfassung der Publikationen

2.2.1. Publikation 1: Mit der Publikation **“The murine chemokine receptor CXCR4 is tightly regulated during T cell development and activation.”** (Schabath R, Müller G, Schubel A, Kremmer E, Lipp M, Förster R. **J Leukoc Biol.** 1999 Dec;66(6):996-1004.) wurde der Chemokinrezeptor (CR) CXCR4 (CD184) während der T-Zellentwicklung und –aktivierung charakterisiert. Unsere Daten zeigen, dass die CXCR4 Expression auf T-Zellen genau reguliert wird und darüber hinaus eine unterschiedliche Rezeptorexpression und –funktion zwischen Mensch und Maus besteht.

2.2.2. Publikation 2: In der Arbeit **“Differential expression of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules panCD66, CD66a, CD66c and of sialyl-Lewis x (CD15s) on blast cells of acute leukemias.”** (Ratei R, Karawajew L, Schabath R, Ehrfeldt A, Grunert F, Ludwig WD., **Int J Hematol.** 2008 Mar; 87(2):137-43.) untersuchten wir die Expression des Oberflächenmoleküls CD66 auf akuten

Leukämien. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Blasten von 28 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, 13 Patienten mit B-Vorläuferzelleukämie und sieben Patienten mit T-ALL untersucht. Die Expression von CD66 in akuten Leukämien, speziell in der AML, wies eine hohe Heterogenität auf.

2.2.3. Publikation 3: Akute Leukämien mit einem gemischten Immunphänotyp sind eine seltene Subgruppe akuter Leukämien, die sowohl lymphatische als auch myeloische Antigene exprimieren. In der Arbeit „**Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations.**“ (Gerr H, Zimmermann M, Schrappe M, Dworzak M, Ludwig WD, Bradtke J, Moericke A, Schabath R, Creutzig U, Reinhardt D. **Br J Haematol.** 2010 Apr;**149(1):84-92.**) wurden Daten zur Diagnose, Therapie und Verlauf von 92 Kindern retrospektiv analysiert, die innerhalb der AML BFM- (Berlin, Frankfurt und Münster) und ALL BFM-Studien behandelt wurden. Unsere Daten zeigten deutliche Unterschiede in Ansprechen und Remissionsdauer je nach gewählter Induktionstherapie. Darüber hinaus zeigte sich, dass eine intensive Therapie mit konsekutiver Stammzelltransplantation für Patienten mit bilinärer Leukämie oder „lineage switch“ vorteilhaft sein könnte, während Patienten mit ETV6/RUNX1-Fusion und einer lymphatischen Morphologie sowie Patienten mit Expression von cyCD22 und cyCD79a eher mit Therapieprotokollen für akute lymphatische Leukämien behandelt werden sollten.

2.2.4. Publikation 4: Im Jahre 2008 wurde die aktuelle WHO-Klassifikation hämatologischer Neoplasien publiziert. Damit änderten sich auch die Definition und Diagnosekriterien der akuten biphenotypischen Leukämien. Erstmals wurden danach in der Arbeit „**Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification.**“ (Matutes E, Pickl WF, Van't Veer M, Morilla R, Swansbury J, Strobl H, Attarbaschi A, Hopfinger G, Ashley S, Bene MC, Porwit A, Orfao A, Lemez P, Schabath R, Ludwig WD. **Blood.** 2011 Mar;**117(11):3163-71.**) 100 Patienten mit akuten Leukämien mit gemischtem Immunphänotyp (mixed-phenotype acute leukemias (MPALs)), die die neuen Kriterien der WHO-Klassifikation erfüllten, analysiert. Eine Korrelation zwischen Alter, Morphologie, Immunphänotyp oder Zytogenetik bestand nicht. Eine Therapie mit einem ALL-Protokoll induzierte in 85% der Fälle ein Ansprechen, ein AML-Regime nur in 41% der Fälle. 3 von 5 Patienten sprachen auf eine kombinierte Therapie an. 40 (58%) Patienten verstarben, davon 33 an einer therapieresistenten Erkrankung. Das Gesamtüberleben lag bei 18 Monaten und 37% der Patienten waren nach 5 Jahren noch am Leben. Das Patientenalter, das Vorliegen einer t(9;22) und eine Behandlung mit einem AML-Regime waren negative Prädiktoren für das Gesamtüberleben der Patienten (P<0.001; P<0.002; P<0.003). Mit diesen Daten ist belegt, dass es sich bei der Gruppe der MPAL um eine Erkrankung mit schlechter Prognose und hohem Rezidivrisiko handelt. Es sollte erwogen werden, Patienten mit akuter Leukämie und einer t(9;22) in erster Remission einer allogenen Stammzelltransplantation zuzuführen.

2.2.5. Publikation 5: In der Publikation „**Lineage classification of childhood acute lymphoblastic leukemia according to the EGIL recommendations: results of the ALL-BFM 2000 trial.**“ (Ratei R,

Schabath R, Karawajew L, Zimmermann M, Mörcke A, Schrappe M, Ludwig WD. **Klin Padiatr. 2013 May;225 Suppl 1:S34-9** wurde die Korrelation von Immunphänotyp (nach der EGIL Klassifikation) mit klinisch relevanten Parametern wie Alter, Ansprechen auf die initiale Steroidtherapie sowie klinische Risikogruppen evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Durchflusszytometrie nicht nur eine eindeutige Linienzuordnung und Subtypisierung gewährleisten konnte sondern auch eine rasche Einschätzung der ALL Prognose ermöglichte.

2.2. Einleitung

Die vorliegende Arbeit demonstriert exemplarisch die Bedeutung der Durchflusszytometrie für die Charakterisierung der normalen Lymphopoese und für die Definition und Diagnose distinkter, prognoserelevanter Subtypen von akuten Leukämien im Kindesalter und Erwachsenenalter mit Schwerpunkt auf den biphänotypischen Leukämien.

Chemokine und ihre Rezeptoren sind erst in den letzten beiden Jahrzehnten in den Interessenfokus der Hämatophysiologie gelangt(1). In der vorliegenden Arbeit wurde der CXC-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4/CD184) untersucht(2). Chemokine sind proinflammatorisch und chemotaktisch wirkende Zytokine. Seit 1988 Interleukin-8 (CXCL8) als erstes Chemokin beschrieben wurde, sind zahlreiche weitere Vertreter dieser Molekülgruppe entdeckt und charakterisiert worden. Mittlerweile sind mehr als 50 Vertreter dieser Proteinfamilie bekannt. Nach der Sequenz hoch-konservierter Cysteinreste innerhalb des Chemokinmoleküls werden sie in vier Klassen eingeteilt, von denen die bedeutendsten die CXC- und die CC-Chemokine sind, die auch als α - und β -Chemokine bezeichnet werden. Diese weisen zwischen den ersten beiden von vier konservierten Cysteinresten eine bzw. keine weitere Aminosäure auf. Neben der chemotaktischen Funktion ist den Chemokinen die Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren gemeinsam. Dabei binden die Rezeptoren jedoch nur Liganden aus einer Klasse und werden nach dieser Eigenschaft in CXC- und CC-Chemokinrezeptoren eingeteilt (CXCR / CCR, R steht hierbei für Rezeptor). Nachdem die Rezeptoren zunächst auf Leukozyten nachgewiesen wurden und ihre Bedeutung dort bei Entzündungen erkannt wurde, sind sie inzwischen auf fast allen Zellen beschrieben worden. Der CXC-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4/CD184) bindet als wichtigsten Liganden SDF-1 (Stromal derived factor 1). In der Nomenklatur der Chemokine wird er als CXCL12 bezeichnet. SDF-1 erhielt seinen Namen, da es von Stromazellen des Knochenmarks sezerniert wird. Es liegt überwiegend in der Splicevariante SDF-1 α vor. Die ursprünglich beobachtete Rolle dieses Chemokins liegt in der Migration hämatopoetischer Stammzellen aus dem peripheren Blut in das Knochenmark, wo es außerdem proliferativ auf die Zellen wirkt(3).

Die Diagnose und Klassifikation der akuten Leukämien (AL) orientiert sich an der Klassifikation der World Health Organization (WHO(4)) von Tumoren hämatopoetischer und lymphatischer Gewebe. In dieser Klassifikation werden akute myeloische Leukämien (AML) und akute lymphatische Leukämien (ALL) der Vorläufer-B- bzw. Vorläufer-T-Zellen von reifen B-, T- und NK-Zell-Neoplasien abgegrenzt. Bei der differentialdiagnostischen Unterscheidung der verschiedenen Subtypen der AL werden morphologische bzw. histologische Merkmale, Immunphänotyp und Genotyp berücksichtigt. Die häufig parallel durchgeführte Analyse dieser zellbiologischen Merkmale von Tumorzellen hat die Erkennung neuer Subtypen bzw. Entitäten, deren klinisches Erscheinungsbild und therapeutische Beeinflussbarkeit differieren, wesentlich erleichtert. Darüber hinaus konnte anhand der Charakterisierung genetischer Veränderungen in Leukämiezellen das Verständnis der für die Leukämogenese relevanten Pathomechanismen wesentlich verbessert werden(5).

Die Immunphänotypisierung von Knochenmark (KM) und/oder peripheren Blut (PB) ist heute ein unverzichtbarer Bestandteil in der initialen Diagnostik und im Verlauf der AL. Sie basiert auf dem Nachweis verschiedener Antigene mittels fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper (moAk), die von Vorläufer- und/oder reifen Zellen der Myelo- bzw. Lymphopoese, häufig abhängig von deren Reifegrad, exprimiert werden(6). Die Bindung der moAk an membranständige bzw. intrazelluläre Antigene kann mit Hilfe verschiedener Methoden analysiert werden. Dabei gelten die Markierung von Zellsuspensionen mit Immunfluoreszenz-Techniken und deren Auswertung mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie sowie immunenzymatische Färbungen heute als Routinemethoden(7). Die Vorteile der durchflusszytometrischen Immunphänotypisierung sind im Einzelnen:

- Schnelle Analyse des Probenansatzes trotz hoher Zellzahlen ($> 10^6$ Zellen in einem Ansatz).
- Hohe Nachweisempfindlichkeit; simultane Auswertung verschiedener Parameter wie 2–10 Fluoreszenzfarbstoffe und Streulichteigenschaften der Zellen.
- Exakte Quantifizierung der Ergebnisse.
- Statistische und automatisierte Datenauswertung.

Wesentliche Ziele der Immunphänotypisierung der AL sind:

- Morphologisch und zytochemisch undifferenzierte Leukämien der B-lymphatischen, T-lymphatischen, NK bzw. myeloischen Zellreihen zuzuordnen sowie den Reifegrad der Leukämiezellen festzulegen; biologisch und/oder prognostisch relevante Subtypen zu erkennen und in standardisierter, studiengerechter Weise zu diagnostizieren.
- Expression von Proteinen nachzuweisen, die bei der Regulation zellbiologisch wichtiger Funktionen, z.B. der Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt sind.
- Detektion von Zielstrukturen für eine „zielgerichtete Therapie“ („Targeted Therapy“ z.B. mittels moAK gegen CD20, CD33 oder CD52).
- Die Behandlung nicht eliminerter residueller Leukämiezellen (Minimal residual disease, MRD) durch deren Identifikation und Quantifizierung zu ermöglichen(8).

Ausgehend von der morphologischen Diagnose AL, die immer auf der lichtmikroskopischen Auswertung panoptisch gefärbter Ausstrichpräparate beruht, erfolgt eine eindeutige Diagnose und Definition des Subtyps durch die Linienzuordnung und die Festlegung des immunologischen Subtyps und Reifegrads der AL.

Die Linienzuordnung der Leukämieblasten wird anhand des Nachweises von membranständigen (m) bzw. intrazytoplasmatischen (cy) Antigenen vorgenommen, die von unreifen lymphatischen oder myeloischen Vorläuferzellen exprimiert werden. Besonders bedeutsam für die Diagnostik der AL sind im Zytoplasma lokalisierte Antigene, die linienspezifisch bereits in sehr unreifen Zellen exprimiert werden, z.B:

- CD13, CD33, Myeloperoxidase (MPO) und Lysozym in myeloischen Zellen.
- CD19, cyCD22 und cyCD79a in B-lymphatischen Vorläuferzellen.
- cyCD3 in T-lymphatischen Vorläuferzellen.

Diese Antigene, deren Nachweis immunenzymatisch oder nach Fixierung und Permeabilisierung von Leukämiezell-Suspensionen auch mittels Durchflusszytometrie erfolgen kann, werden teilweise von reiferen Leukämie- bzw. Lymphomzellen auch membranständig exprimiert (CD3, CD22, CD79a)(9).

Die Festlegung des immunologischen Subtyps und Reifegrads der AL erfolgt mittels monoklonaler Ak gegen Antigene, deren Expression auf unreife lymphohämatopoetische Vorläuferzellen beschränkt oder mit unterschiedlichen Differenzierungsstufen der Lympho- oder Myelopoese assoziiert ist.

Anhand des Expressionsmusters werden die für die Immunphänotypisierung der AL wichtigen Antigene unterteilt in:

- Linienspezifische Merkmale, z.B. MPO für die myeloische Zellreihe; cy/m Immunglobuline, CD22, CD79a für die B-Zellreihe sowie T-Zell-Rezeptor alpha/beta bzw. gamma/delta und CD3 für die T-Zellreihe.
- Panmyeloische Antigene, z.B. CD13, CD33, CD65.
- Pan-B-Antigene, z.B. CD19, CD22, CD79a.
- Pan-T-Antigene, z. B. CD3, CD2, CD5, CD7.
- Linienassoziierte Antigene, z.B. CD14 für monozytäre, CD15 für granulozytäre, CD235a (Glykophorin A) für erythrozytäre und CD41 sowie CD61 für megakaryozytäre Zellen.
- Progenitorzell-assoziierte Antigene, z.B. CD10, CD34, CD117, HLA-DR, terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT).

Die Analyse dieser Antigene ermöglicht in fast allen Fällen der AL eine eindeutige Linienzuordnung und Definition des Subtyps(10).

Morphologisch bzw. zytochemisch akute undifferenzierte Leukämien (AUL), bei denen mittels der Immunphänotypisierung nicht mehr als ein Antigen der myeloischen bzw. B- oder T-lymphatischen Zellreihe nachweisbar ist, werden nur noch sehr selten (<1% aller AL) diagnostiziert. AUL, früher morphologisch auch als akute Stammzell-Leukämie bezeichnet, exprimieren ausschließlich Progenitorzell-assoziierte Antigene (CD34, CD38, CD117, HLA-DR, TdT)(11).

Die Identifizierung und Zuordnung der ALL zur B- oder T-Zellreihe ist anhand der in lymphatischen Vorläuferzellen zunächst intrazytoplasmatisch exprimierten Antigene cyCD3, cyCD22, cyCD79a sowie der membran-ständigen Antigene CD7 und CD19 leicht möglich. Diese Antigene können in unreifen B- oder T-Vorläuferzellen und in >99% der korrespondierenden immunologischen Subtypen der ALL nachgewiesen werden.

Wichtig für die Definition von Risikogruppen und Zuordnung zu den verschiedenen Therapieformen der deutschen multizentrischen ALL-Therapiestudien bei Kindern (ALL-BFM) bzw. Erwachsenen (GMALL) ist die Abgrenzung folgender Subtypen:

- Pro-B-ALL (Hochrisiko-Therapie in der GMALL-Studie).
- reife B-ALL (eigenes Protokoll in den GMALL- bzw. ALL-BFM-Studien).
- T-Vorläuferzell-ALL (Einzelne Subtypen werden unterschiedlich behandelt).

Im Rahmen der Klassifikationen der AML ist die Immunphänotypisierung erforderlich hauptsächlich für die Erkennung der:

- AML mit minimaler myeloischer Differenzierung, M0-Subtyp nach FAB-Klassifikation: MPO zytochemisch negativ, Expression panmyeloischer Antigene und/oder Nachweis von MPO mittels moAk bei Negativität von linienspezifischen B- oder T-Zell-Merkmalen.

– Akuten Megakaryoblastenleukämie, M7-Subtyp nach FAB-Klassifikation: Membranständige, selten ausschließlich intrazytoplasmatische Expression von CD41 und/oder CD61.

Bei etwa 75–90% aller Patienten mit AML exprimieren Leukämiezellen die Antigene CD13, CD33 und CD65, wobei alle drei panmyeloischen Marker nur in etwa 55%, zumindest eines dieser Antigene jedoch in > 98% der Fälle nachweisbar sind. MPO kann mittels moAk in knapp 90% der AML nachgewiesen werden.

AL mit gemischtem Immunphänotyp (Mixed phenotype acute Leukemia, MPAL), bei denen die pathologische Blastenpopulation gleichzeitig myeloische und lymphatische Antigene exprimiert (aberrante Antigenexpression), werden zunehmend häufiger diagnostiziert (bis 5% aller AL) und wurden erstmalig in der EGIL-Klassifikation von 1995(10) zunächst als biphenotypische akute Leukämien (BAL) klassifiziert.

Eine international akzeptierte Nomenklatur für diese heterogene Untergruppe der AL existiert seit der WHO Klassifikation von 2008(4). Der in **Tabelle 1** dargestellte Score für die immunologische Klassifikation der MPAL basiert auf dieser Klassifikation und löste die Empfehlungen der EGIL ab. Für die Prognose und Therapie der MPAL ist jedoch nicht allein der Immunphänotyp sondern vor allem die zugrunde liegende zytogenetische oder molekularbiologische Aberration mitentscheidend. Die vorliegende Arbeit konnte anhand der bisher größten publizierten Fallserien zur MPAL des Kindes- und Erwachsenenalters erstmals Aussagen zu Prognose und Therapie dieser seltenen AL-Form machen.

2.3. Zielstellung

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war zum einen die Charakterisierung der physiologischen Lymphopoese und Lymphozytenaktivierung am Beispiel des Chemokinrezeptors CXCR4 und zum anderen die nähere Charakterisierung und Subtypisierung akuter Leukämien mit einem Fokus auf die seltene Subgruppe akuter Leukämien mit gemischtem Immunphänotyp („Mixed phenotype acute leucemia“, MPAL).

2.4. Material und Methoden

2.4.1. Mäuse

NMRI und BALB/c Mäuse wurden im Tierhaus des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin gehalten. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Versuche zwischen 6 und 10 Wochen alt.

2.4.2. Klonierung des murinen Chemokinrezeptors CXCR4

Eine reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wurde durchgeführt mit einer Gesamt-RNA-Präparation aus dem murinen Thymus. 5 µg RNA dienten als Vorlage für die reverse Transkriptase (GIBCO-BRL, Eggenstein, Germany) Reaktion in Gegenwart von 50 fmol „backward“ Primer GSP-RT-CXCR4 (5'-ACG ATG CCG GGC AGG ATG AG-3'; 80°C, 5 min auf Eis, 37°C über 60 min). Im ersten Schritt der „nested“ PCR wurden die folgenden Primer benutzt: GSP-1-CXCR4 (5'-CAC AGA TGT ACC TGT CAT CC-3'); QT (5'- CAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTT

TTTTTTTTTT-3'); Q0 (5'-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3'); 1 Zyklus bei 98°C, 300 s; 75°C, 120 s; 50°C, 120 s; 72°C, 40 min; 30 Zyklen bei 94°C, 60 s; 56°C, 60 s; 72°C, 180 s; 1 Zyklus bei 72°C, 600 s. Ein zweiter Amplifikationsschritt wurde mit folgenden Primern durchgeführt: GSP-2-CXCR4 (5'-CCT TGG CCT TTG ACT GTT GG-3') and Q1 (5'-GAGGACTCG AGCTCAAGC-3'): 30 Zyklen bei 98°C, 120 s; 94°C, 60 s; 60°C, 60 s; 72°C, 180 s. Nach Trennung der Fragmente erfolgte die Klonierung in KpnI-HindIII des p-Bluescript KS(-) Vektors und anschließend in das Rc-CMV Plasmid(12).

2.4.3. Antikörper

Im Rahmen der Charaktisierung von CXCR4 wurden folgende Antikörper benutzt: Fluorescein isothiocyanate-(FITC), Phycoerythrin-(PE) oder Biotin-markierte Antikörper anti-CD4 (L3/T4, Klon YTS 191.1), anti-CD8 (CT-CD8a) und anti-Thy 1.2 (Klon 5a-8) von Caltag (Medac, Hamburg); anti-CD62L und anti-CD44 von Pharmingen (Hamburg); anti-CD3 von Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Der anti-CXCR4 Antikörper (Klon 2B11) wurde im Labor selbst hergestellt und konjugiert. Im Rahmen der Charaktisierung akuter humaner Leukämien kam eine Fülle weiterer Antikörper zum Einsatz (siehe Publikationen)(12).

2.4.4. Western Blot

Thymozytenmembran wurde mittels 0.025% Digitonin (Sigma) gelöst und so einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) and "Western blotting" zugänglich gemacht(13).

2.4.5. Immunhistochemie

Die murinen Thymi von 6-10 Wochen alten Tieren wurden entnommen und schockgefroren. 10 µm dicke Kryoschnitte wurden mit biotiniertem anti-CXCR4 mAk und anderen additiven Antikörpern gefärbt (TSA-Direct, DuPont-NEN; Bad Homburg). Die Schnitte wurden mittels konfokalem Lasermikroskop untersucht (Leica, Bensheim).

2.4.6. Durchflusszytometrie

Mittels NH₄Cl-Lyse wurden Erythrozyten aus den Zellsuspensionen (gewonnen aus peripherem Blut, Lymphknoten und Milz) entfernt. Die Zellen wurden zweifach in PBS gewaschen (phosphate-buffered saline, 2% fetales Kälberserum (FCS), 0.1% NaN₃, 10 mM HEPES, pH 7.3) und in einem FACS-Puffer resuspendiert (FACS-Puffer: PBS+5% Rattenserum). Die Zellen wurden mit variierenden Antikörperkombinationen und -konjugationen inkubiert (30 min bei 4°C). Nach zweimaligem Waschen wurden biotinierte Antikörper mit Streptavidin-PE-Konjugaten oder Streptavidin-CyChrom (Jackson, 1:100) gekoppelt. Die immunphänotypische Analyse wurde an einem FACScan- oder FACSCalibur Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg; Germany) durchgeführt.

2.4.7. Zellkultur

Lymphozyten wurden aus dem peripheren Blut mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die murinen Milzen wurden durch ein 70 µm Nylonnetz püriert. Die Erythrozyten wurden mittels NH₄Cl lysiert und Makrophagen mittels Plastikadhärens entfernt. Die Lymphozyten wurden in RPMI-1640 ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum bei 37°C und 5% CO₂ über bis zu 6 Tage kultiviert. Das Medium wurde alle 3 Tage erneuert.

2.4.8. Endozytose Assay

Um zu überprüfen, ob SDF-1 α eine Herabregulierung des Rezeptors CXCR4 von der Zelloberfläche bewirkt, wurden Thymozyten und andere Zellen (isoliert von mesenterialen Lymphknoten und der Milz) mit rekombinantem SDF-1 α (Peprotech, London oder R & D Systems, Wiesbaden) bei 37°C inkubiert. Nach 45 min wurden die Zellen gewaschen und mit anti-CXCR4 mAb (30 min auf Eis) gefärbt. Die Stärke der CXCR4-Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen.

2.4.9. Apoptose Assay

Thymozyten (5x10⁶/ml in RPMI, 10% FBS) wurden mit 2 µM Dexamethason in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von SDF-1 α bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 5 h wurde die Anzahl apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie unter Nutzung einer Annexin V-FITC- (Boehringer Mannheim) und Propidiumiod-Färbung (Sigma) quantifiziert(14).

2.4.10. Chemotaxis Assay

Die durch SDF-1 α bedingte in vitro Migration von Zellen wurde in einer modifizierten 96-Lochplatte (Neuro Probe Inc.) detektiert. 30 µl SDF-1 α Verdünnungen in RPMI/0.5% BSA wurden in das untere Kompartiment installiert und 75000 Thymozyten in 50 µl RPMI wurden in das obere Kompartiment gegeben. Die beiden Kompartimente wurden durch einen Polyvinylpyrrolidon-freien Polycarbonatfilter mit 5 µm großen Poren und einer Beschichtung mit 20 µg/ml Kollagen IV (Maus) verbunden. Die Kammern wurden über 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Filter wurden fixiert und gefärbt (Methanol mit 5% Glutardialdehyd und 1% Krystalviolett). Migrierende Zellen wurden in 5–15 zufällig ausgewählten "High-Power Fields" ausgezählt.

2.4.11. Datenbank und Statistik

Alle Datenerfassungen und -aufbereitungen erfolgten mittels Exceldatenbank. Zeitabhängige Variablen (Überleben, Symptombdauer) wurden in Kaplan-Meier Kurven dargestellt und mittels Log-Rank-Test miteinander verglichen. Kategoriale und kontinuierliche Variablen wurden mittels Fisher-Exact und Mann-Whitney-U-Test verglichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei einem P-Wert $\leq 0,05$ angenommen. Alle statistischen Berechnungen wurden mit der Statistiksoftware SPSS (Versionen 11-13) vorgenommen.

2.5. Ergebnisse und Diskussion

Mit der Publikation "The murine chemokine receptor CXCR4 is tightly regulated during T cell development and activation." (Schabath R, Müller G, Schubel A, Kremmer E, Lipp M, Förster R. *J Leukoc Biol.* 1999 Dec;66(6):996-1004.) wurde der Chemokinrezeptor (CR) CXCR4 während der T-Zellentwicklung und -aktivierung charakterisiert. Unsere Daten zeigen, dass dieser CR in Maus und Mensch unterschiedlich exprimiert und reguliert wird. Die Aktivierung resultiert im Mausmodell in einer gesteigerten Oberflächenaktivierung von CXCR4 innerhalb von zwei Tagen, während der Rezeptor in derselben Situation im Menschen herunterreguliert wird. Die intraperitoneale Vakzinierung von Mäusen führt zu seiner starken Expression von CXCR4 auf zytotoxischen T-Zellen in Milz und mesenterialen Lymphknoten. Im Thymus ist die Expression von CXCR4 auf CD4⁺CD8⁺ doppelt positive T-Zellen limitiert. Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF) ist der natürliche Ligand von CXCR4 und induziert Chemotaxis bei Thymozyten und kann bei ihnen die Dexamethason-induzierte Apoptose verhindern. Unsere Daten zeigen, dass die CXCR4-Expression auf T-Zellen genau reguliert wird und dass darüber hinaus eine unterschiedliche Rezeptorexpression und -funktion zwischen Mensch und Maus besteht.

In der Arbeit "Differential expression of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules panCD66, CD66a, CD66c and of sialyl-Lewis x (CD15s) on blast cells of acute leukemias." (Ratei R, Karawajew L, Schabath R, Ehrfeldt A, Grunert F, Ludwig WD., *Int J Hematol.* 2008 Mar;87(2):137-43.) untersuchten wir die Expression des Oberflächenmoleküls CD66(15; 16) auf akuten Leukämien. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Blasten von 28 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, 13 Patienten mit B-Vorläuferzellleukämie und sieben Patienten mit T-ALL untersucht. Dabei wurden monoklonale Antikörper gegen panCD66 (Klon D14HD11), CD66a (Klon 4.3.17), CD66c (Klon 9A6) und CD15s verwendet. Eine Expression von panCD66 fanden wir bei 13 von 28 Patienten mit AML (46%) und 6 von 13 Patienten mit B-lymphoblastischer akuter Leukämie (46%). Alle sieben Patienten mit T-ALL zeigten keine Expression der untersuchten Antigene. Bei der AML wurden panCD66, CD66a und CD66c häufiger mit CD65, CD15 und CD64 koexprimiert als mit CD13, CD33 und den beiden Progenitormarkern CD34 and CD117. Im Gegensatz zu CD15 war die Expression von sialylated Lewis X (CD15s) bei der Mehrheit der AML Fälle mit CD117-Positivität assoziiert (64 vs. 85%, $P = 0.043$). Diese Ergebnisse sollten bei etwaigen therapeutischen Strategien, die das CD66 Antigen als "Target" vorsehen, in Erwägung gezogen werden, da die Expression von CD66 in akuten Leukämien, speziell in der AML, eine hohe Heterogenität aufweist. Gerade bei der AML ist die Expression mit dem Vorhandensein reiferer granulomonozytärer Zellen verbunden und CD34 und CD117 positive Progenitorzellen weisen keine Antigenexpression auf.

Akute Leukämien mit einem gemischten Immunphänotyp sind eine rare Subgruppe akuter Leukämien, die sowohl lymphatische als auch myeloische Antigene exprimieren(17; 18). In der Arbeit „Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations.“ (Gerr H,

Zimmermann M, Schrappe M, Dworzak M, Ludwig WD, Bradtke J, Moericke A, Schabath R, Creutzig U, Reinhardt D. Br J Haematol. 2010 Apr;149(1):84-92.) wurden Daten zur Diagnose, Therapie und klinischem Verlauf von 92 Kindern retrospektiv analysiert, die innerhalb der AML BFM- (Berlin, Frankfurt und Münster) und ALL BFM-Studien behandelt wurden(19; 20). Es wurden nach der WHO Klassifikation von 2002(18) 78 Patienten mit biphänotypischer akuter Leukämie, sechs Patienten mit bilinärer Leukämie und acht Patienten mit einer Leukämie mit „lineage switch“ (Übergang einer myeloischen in eine lymphatische Leukämie oder vice versa) eingeschlossen, die im Zeitraum 1998 bis 2006 behandelt wurden (2,4% aller Fälle mit kindlichen Leukämien in der BFM Studiengruppe). Die Kohorte war charakterisiert durch ein hohes medianes Lebensalter (8,9 LJ), eine hohe Leukozytenzahl im peripheren Blut ($14,9 \times 10^9/l$), eine hohe Frequenz von Hyperleukozytosen im peripheren Blut (18,5%) und einen hohen Anteil von Patienten mit Beteiligung des zentralen Nervensystems (24,1%). Die häufigste zytogenetische Aberration war eine ETV6/RUNX1-Fusion $t(12;21)(p13;q22)$ (16%) gefolgt von der Trisomie des Chromosoms 8 (14,6%). Komplette Remissionen waren seltener als bei anderen Patienten des ALL-BFM Protokolls (91,8% vs. 99,1%, $P < 0,001$) aber vergleichbar mit den Ergebnissen des AML-BFM Protokolls (87,9%). Das „Event-Free Survival“ (EFS) und das „Overall Survival“ (OS) waren niedrig und das EFS war schlechter als für ALL-Patienten mit einem 5-Jahres EFS von $62 \pm 5\%$. (ALL: $80 \pm 1\%$, $P < 0,001$), aber besser als für AML Patienten ($49 \pm 2\%$, $P = 0,027$). Unsere Daten geben Hinweise darauf, dass ein intensives Therapieregime mit konsekutiver Stammzelltransplantation für Patienten mit bilinärer Leukämie oder „lineage switch“ vorteilhaft sein könnten, während Patienten mit ETV6/RUNX1-Fusion und einer lymphatischen Morphologie sowie Patienten mit Expression von cyCD22 und cyCD79a mit Therapieprotokollen für akute lymphatische Leukämien behandelt werden sollten.

Im Jahre 2008 wurde die aktuelle WHO-Klassifikation(4) hämatologischer Neoplasien publiziert. Damit änderten sich auch die Definition und die Diagnosekriterien der akuten biphänotypischen Leukämien. Erstmals wurden danach in der Arbeit „Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification.“ (Matutes E, Pickl WF, Van't Veer M, Morilla R, Swansbury J, Strobl H, Attarbaschi A, Hopfinger G, Ashley S, Bene MC, Porwit A, Orfao A, Lemez P, Schabath R, Ludwig WD. Blood. 2011 Mar;117(11):3163-71.) 100 Patienten mit akuten Leukämien mit gemischtem Immunphänotyp (mixed-phenotype acute leukemias (MPALs)), die die neuen Kriterien der WHO-Klassifikation erfüllten, analysiert. Hierzu wurden der myeloische Marker Myeloperoxidase (MPO) und der T-lymphatische Marker CD3 intrazytoplasmatisch untersucht sowie der B-lymphatische Marker CD19 neben weiteren pan-B Markern. In die Studie wurden 62 Männer und 38 Frauen eingeschlossen, 68% der Patienten waren Erwachsene. Morphologisch wurde bei diesen Patienten in 43% der Fälle eine ALL und in 42% der Fälle eine AML diagnostiziert, bei der übrigen 15% ließ die Morphologie alleine keine klare Zuordnung zu. Immunologisch konnten bei 59% der Patienten eine myeloische und B-lymphatische Differenzierung gezeigt werden, bei 35% eine myeloische und T-lymphatische, bei 4% eine B- und T-lymphatische und bei 2% eine trilineäre. Zytogenetisch fand sich eine Translokation $t(9;22)$ (20% der Fälle), ein 11q23/MLL Rearrangement (8%), ein komplex aberranter Karyotyp (32%), eine andere

Aberration (27%) oder ein normaler Karyotyp (13%). Eine Korrelation zwischen Alter, Morphologie, Immunphänotyp oder Zytogenetik bestand nicht. Daten zu Therapieansprechen und weiterem klinischen Verlauf lagen für 70 Patienten vor. Eine Therapie mit einem ALL-Protokoll induzierte in 85% der Fälle ein Ansprechen, ein AML-Regime nur in 41% der Fälle. 3 von 5 Patienten sprachen auf eine kombinierte Therapie an. 40 (58%) Patienten verstarben, davon 33 an einer therapieresistenten Erkrankung. Das Gesamtüberleben lag im Median bei 18 Monaten und 37% der Patienten waren nach 5 Jahren noch am Leben. Das Patientenalter, das Vorliegen einer t(9;22) und eine Behandlung mit einem AML-Regime waren negative Prädiktoren für das Gesamtüberleben der Patienten ($P < 0.001$; $P < 0.002$; $P < 0.003$ s.o.). Mit diesen Daten ist belegt, dass es sich bei der Gruppe der MPAL um eine Erkrankung mit schlechter Prognose und hohem Rezidivrisiko handelt. Es sollte erwogen werden, Erwachsene und Patienten mit t(9;22) in erster Remission einer allogenen Stammzelltransplantation zuzuführen.

In der Publikation "Lineage classification of childhood acute lymphoblastic leukemia according to the EGIL recommendations: results of the ALL-BFM 2000 trial." (Ratei R, Schabath R, Karawajew L, Zimmermann M, Mörcke A, Schrappe M, Ludwig WD. *Klin Padiatr.* 2013 May;225 Suppl 1:S34-9) wurde die Korrelation von Immunphänotyp (nach der EGIL Klassifikation(10)) mit klinisch relevanten Parametern wie Alter, Ansprechen auf die initiale Steroidtherapie sowie klinische Risikogruppen evaluiert. Eine zentralisierte Immunphänotypisierung wurde für 2775 Patienten mit B-Vorläufer ALL (82,6%), 493 Patienten mit T-Vorläufer ALL (14,7%) und 90 Patienten (2,7%) mit biphänotypischer akuter Leukämie. Mit B-Vorläufer ALL hatten Patienten ein leicht besseres EFS nach 10 Jahren im Vergleich zu T-Vorläufer ALL oder BAL (10 y pEFS B-ALL $78 \pm 1.0\%$, T-ALL 10 y pEFS of $74 \pm 1.8\%$, BAL 10 yEFS $69 \pm 9.0\%$ ($p < 0.009$)). Es konnte gezeigt werden, dass die Durchflusszytometrie nicht nur eine eindeutige Linienzuordnung und Subtypisierung gewährleisten konnte sondern auch eine rasche Einschätzung der ALL Prognose ermöglicht.

Tabelle 1 WHO Definition der „Mixed phenotype acute leukemia“ (MPAL)

| |
|--|
| Myeloische Zellreihe |
| MPO <i>oder</i> Zwei Marker monozytärer Differenzierung wie CD11c, CD14, CD64, Lysozym, NSE |
| T-Zellreihe |
| cyCD3 <i>oder</i> mCD3 (nur wenige Fälle bekannt) |
| B-Zellreihe |
| CD19 (starke Expression) begleitet von einem weiteren Marker wie CD79a, cyCD22, CD10 |
| <i>Oder</i> CD19 (schwache Expression) begleitet von zwei weiteren Marker wie CD79a, cyCD22, CD10 |

Um eine MPAL zu diagnostizieren müssen die Expressionskriterien für mindestens zwei Zellreihen (myeloisch, B oder T) gegeben sein. Abkürzungen: CD, Cluster of differentiation; cy/m, intrazytoplasmatische bzw. membranständige Expression; MPO, Myeloperoxidase; NSE, Neuronenspezifische Enolase

2.6. Literatur

1. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997. 90(3):909-928.
2. Förster R, Emrich T, Kremmer E, and Lipp M. Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood*. 1994. 84(3):830-40.
3. Lataillade J-J, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P, and Le Bousse-Kerdilès M-C. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34+ cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood*. 2000. 95(3):756-768.
4. Swerdlow SH, Campo E, and Harris NL. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. France: IARC Press, 2008; 2008.
5. Cline MJ. The molecular basis of leukemia. *N Engl J Med*. 1994, Feb 3;330(5):328-36.
6. Mason D, Andre P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al. Leukocyte typing VII: white cell differentiation antigens. *Leukocyte typing VII: white cell differentiation antigens*. 2002
7. Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R, et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clinical Chemistry*. 1999. 45(10):1708-17.
8. Campana D, and Coustan-Smith E. Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia. *Acta haematologica*. 2004. 112(1-2):8-15.
9. Paredes-Aguilera R, Romero-Guzman L, Lopez-Santiago N, Burbano-Ceron L, Monte C-D, and Nieto-Martinez S. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in the diagnosis of acute leukemia. *American Journal of Hematology*. 2001. 68(2):69-74.
10. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, and Van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995. 9(10):1783-1786.
11. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, and Sultan C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *British Journal of Haematology*. 1991. 78(3):325-329.
12. Förster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerl C, et al. Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *Journal of Immunology* 1998. 160(3):1522-31.

13. Emrich T, Förster R, and Lipp M. Topological characterization of the lymphoid-specific seven transmembrane receptor BLR1 by epitope-tagging and high level expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993. 197(1):214-20.
14. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, and van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994. 84(5):1415-20.
15. Stocks SC, Ruchaud-Sparagano MH, Kerr MA, Grunert F, Haslett C, and Dransfield I. CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. *European Journal of Immunology*. 1996. 12:2924-32.
16. Beauchemin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray-Owen S, Grunert F, et al. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Experimental Cell Research*. 1999. 252(2):243-9.
17. Sobol RE, Mick R, Royston I, Davey FR, Ellison RR, Newman R, et al. Clinical importance of myeloid antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1987. 316(18):1111-1117.
18. Béné MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Doekharan D, van der Holt B, Knapp W, Lemez P, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Schoch C, Sperling C, van't Veer MB, et al. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. *British Journal of Haematology*. 2001. 113(3):737-45.
19. Möricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dördelmann M, et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood*. 2008. 111(9):4477-89.
20. Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, Reinhardt D, Hermann J, Henze G, et al. Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia*. 2005. 19(12):2030-42.

3. Selbstständigkeitserklärung, Anteilserklärung und eidesstattliche Versicherung

„Ich, Richard Schabath, geboren am XX.XX.19XX in Saarbrücken, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Bedeutung der Immunphänotypisierung für die Diagnose und Therapie - Stratifizierung hämatologischer Neoplasien“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind.

Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Dieser Promotion, die im Rahmen einer Publikationspromotion durchgeführt wurde, liegen fünf Publikationen zugrunde. Der Promovierende hatte daran folgenden Anteil:

Publikation 1:

The murine chemokine receptor CXCR4 is tightly regulated during T cell development and activation.

Schabath R, Müller G, Schubel A, Kremmer E, Lipp M, Förster R.

J Leukoc Biol. 1999 Dec;66(6):996-1004.

Beitrag des Promovenden:

Immunphänotypisierung inklusive Antikörper Aufreinigung und Konjugation, Western-Blotting, Zellkultur, Immunhistochemie, alle Tier-experimentellen Schritte inklusive Sektion, Chemotaxis- und Apoptose Assays, statistische Analyse, Manuskripterstellung.

Publikation 2:

Differential expression of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules panCD66, CD66a, CD66c and of sialyl-Lewis x (CD15s) on blast cells of acute leukemias.

Ratei R, Karawajew L, Schabath R, Ehrfeldt A, Grunert F, Ludwig WD.

Int J Hematol. 2008 Mar;87(2):137-43.

Beitrag des Promovenden:

Immunphänotypisierung und Befundung, statistische Analyse, Manuskripterstellung.

Publikation 3:

Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations.

Gerr H, Zimmermann M, Schrappe M, Dworzak M, Ludwig WD, Bradtke J, Moericke A, Schabath R, Creutzig U, Reinhardt D.

Br J Haematol. 2010 Apr;149(1):84-92.

Beitrag des Promovenden:

Immunphänotypisierung und Befundung, Fallauswahl, Manuskripterstellung.

Publikation 4:

Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification.

Matutes E, Pickl WF, Van't Veer M, Morilla R, Swansbury J, Strobl H, Attarbaschi A, Hopfinger G, Ashley S, Bene MC, Porwit A, Orfao A, Lemez P, Schabath R, Ludwig WD.

Blood. 2011 Mar;117(11):3163-71.

Beitrag des Promovenden: Immunphänotypisierung und Befundung, Entwicklung und Erstellung der Fall-Klassifikation, Fallauswahl, statistische Analyse, Manuskripterstellung.

Publikation 5:

Lineage classification of childhood acute lymphoblastic leukemia according to the EGIL recommendations: results of the ALL-BFM 2000 trial.

Ratei R, Schabath R, Karawajew L, Zimmermann M, Möricke A, Schrappe M, Ludwig WD.

Klin Padiatr. 2013 May;225 Suppl 1:S34-9

Beitrag des Promovenden:

Durchführung der Immunphänotypisierung und Befundung, Datenerfassung, statistische Analyse, Manuskripterstellung

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

PD Dr. med. R. Ratei

Unterschrift des Promovenden

R. Schabath

4. Fünf Publikationen als Publikationsleistung

4.1. Publikation 1:

The murine chemokine receptor CXCR4 is tightly regulated during T cell development and activation.

Schabath R, Müller G, Schubel A, Kremmer E, Lipp M, Förster R.

J Leukoc Biol. 1999 Dec;66(6):996-1004.

PMID: 10614783 – DOI Verlinkung nicht verfügbar

ImpactFactor 2012: 4,568

4.2. Publikation 2:

Differential expression of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules panCD66, CD66a, CD66c and of sialyl-Lewis x (CD15s) on blast cells of acute leukemias.

Ratei R, Karawajew L, Schabath R, Ehrfeldt A, Grunert F, Ludwig WD.

Int J Hematol. 2008 Mar;87(2):137-43.

PMID: 18299959 - <http://dx.doi.org/10.1007/s12185-008-0044-0>

ImpactFactor 2012: 1,681

4.3. Publikation 3:

Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations.

Gerr H, Zimmermann M, Schrappe M, Dworzak M, Ludwig WD, Bradtke J, Moericke A, Schabath R, Creutzig U, Reinhardt D.

Br J Haematol. 2010 Apr;149(1):84-92.

PMID: 20085575 - <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.08058.x>

ImpactFactor 2012: 4,942

4.4. Publikation 4:

Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification.

Matutes E, Pickl WF, Van't Veer M, Morilla R, Swansbury J, Strobl H, Attarbaschi A, Hopfinger G, Ashley S, Bene MC, Porwit A, Orfao A, Lemez P, Schabath R, Ludwig WD.

Blood. 2011 Mar;117(11):3163-71.

PMID: 21228332 - <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-10-314682>

ImpactFactor 2012: 9,060

4.5. Publikation 5:

Lineage classification of childhood acute lymphoblastic leukemia according to the EGIL recommendations: results of the ALL-BFM 2000 trial

Ratei R, Schabath R, Karawajew L, Zimmermann M, Möricke A, Schrappe M, Ludwig WD.

Klin Padiatr. 2013 May;225 Suppl 1:S34-9

PMID: 23700065 - <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1337961>

ImpactFactor 2012: 1,904

5. Lebenslauf

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

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

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

6. Publikationsliste

Originalarbeiten

Peripheral blood sCD3- CD4+ T cells: a useful diagnostic tool in angioimmunoblastic T cell lymphoma.

Singh A, Schabath R, Ratei R, Stroux A, Klemke CD, Nebe T, Flörcken A, van Lessen A, Anagnostopoulos I, Dörken B, Ludwig WD, Pezzutto A, Westermann J.

Hematol Oncol. 2013 Jun 24.

ImpactFactor 2012: 2,036

Lineage classification of childhood acute lymphoblastic leukemia according to the EGIL recommendations: results of the ALL-BFM 2000 trial.

Ratei R, Schabath R, Karawajew L, Zimmermann M, Möricke A, Schrappe M, Ludwig WD.

Klin Padiatr. 2013 May;225 Suppl 1:S34-9

ImpactFactor 2012: 1,904

Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification.

Matutes E, Pickl WF, Van't Veer M, Morilla R, Swansbury J, Strobl H, Attarbaschi A, Hopfinger G, Ashley S, Bene MC, Porwit A, Orfao A, Lemez P, Schabath R, Ludwig WD.

Blood. 2011 Mar;117(11):3163-71.

PMID: 21228332

ImpactFactor2009: 10,555

Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10.

Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, Lacombe F, Lemez P, Marinov I, Matutes E, Maynadié M, Oelschlagel U, Orfao A, Schabath R, Solenthaler M, Tschurtschenthaler G, Vladareanu AM, Zini G, Faure GC, Porwit A.

Leukemia. 2011 Jan

PMID: 21252983

ImpactFactor2009: 8,296

Childhood near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia: an EGIL study on 36 cases.

Lemez P, Attarbaschi A, Béné MC, Bertrand Y, Castoldi G, Forestier E, Garand R, Haas OA, Kagialis-Girard S, Ludwig WD, Matutes E, Mejstříková E, Pages MP, Pickl W, Porwit A, Orfao A, Schabath R, Starý J, Strobl H, Talmant P, van't Veer MB, Zemanová Z; European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL).

Eur J Haematol. 2010 Oct;85(4):300-8.

PMID: 20561032

ImpactFactor2009: 2,345

Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations.

Gerr H, Zimmermann M, Schrappe M, Dworzak M, Ludwig WD, Bradtke J, Moericke A, Schabath R, Creutzig U, Reinhardt D.

Br J Haematol. 2010 Apr;149(1):84-92.

PMID: 20085575

ImpactFactor2009: 4,597

Differential expression of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules panCD66, CD66a, CD66c and of sialyl-Lewis x (CD15s) on blast cells of acute leukemias.

Ratei R, Karawajew L, Schabath R, Ehrfeldt A, Grunert F, Ludwig WD.

Int J Hematol. 2008 Mar;87(2):137-43.

PMID: 18299959

ImpactFactor2009: 1,168

SDF-1 (CXCL12) in haematopoiesis and leukaemia: impact of DPP IV/CD26.

Hildebrandt M, Schabath R.

Front Biosci. 2008 Jan;13:1774-9.

PMID: 17981666

ImpactFactor2009: 3,736

The prognostic significance of antigen expression in leukaemia.

Schabath R, Ratei R, Ludwig WD.

Best Pract Res Clin Haematol. 2003 Dec;16(4):613-28.

PMID: 14592646

ImpactFactor2009: 3,134

The murine chemokine receptor CXCR4 is tightly regulated during T cell development and activation.

Schabath R, Müller G, Schubel A, Kremmer E, Lipp M, Förster R.

J Leukoc Biol. 1999 Dec;66(6):996-1004.

PMID: 10614783

ImpactFactor2009: 4,403

Immunphänotypisierung. Ergebnisse der Konsensusbestrebungen zur Standardisierung und Qualitätssicherung innerhalb des Kompetenznetzes Leukämien.

Schabath R, Schuler M, Ludwig WD.

Med Welt. 2004 Sep;55:7-16

Fortschritte in der Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämien: Von FAB über MIC zu REAL und WHO.

Schabath R, Ratei R, Ludwig WD.

J Lab Med. 2003;27(7/8):261-4

Daneben zahlreiche Kongressbeiträge (Poster, freie Vorträge), exemplarisch:

Buchbeiträge

L. Thomas (Herausgeber), Labor und Diagnose. Erschienen bei TH-Books: R. Schabath, W.-D. Ludwig: Immunphänotypisierung von Hämatologischen Neoplasien und Non-Hodgkin Lymphomen; 2012.

U. Sack, A. Tarnok, G Rothe (Herausgeber), Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Erschienen bei Karger: R. Ratei, T. Nebe, R. Schabath, H.-D. Kleine, L. Karawajew, W.-D. Ludwig: Akute Leukämien; 2007.

Poster und Vorträge

ASH 2013, „Use Of Flow Cytometry To Identify Myelodysplasia In Peripheral Blood“, W. Kern, R. Schabath, T. Alpermann, C. Haferlach, S. Schnittger and T. Haferlach; 2013; Abstract 2774

DGHO 2013, „Diagnostische Bedeutung der durchflusszytometrischen Messung der CD200 Expression für die Differentialdiagnose CLL, CLL/PL und Mantelzelllymphom“, R. Schabath, C. Haferlach, F. Bellos, S. Schnittger, T. Haferlach und W. Kern; 2013;Abstract P497

7. Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Richard Ratei sowie meinem langjährigen Chefarzt Prof. Dr. med. Wolf-Dieter Ludwig für die Überlassung des überaus interessanten Themas, für die uneingeschränkte freundliche und intensive Betreuung sowie die fortwährende wissenschaftliche Unterstützung und Durchsicht der Arbeit. Darüber hinaus danke ich beiden für meine klinische Ausbildung. Mein Dank gilt weiterhin den Mitgliedern der Arbeitsgruppe des Labors für hämatologische Spezialdiagnostik des HELIOS Klinikums Berlin Buch. Besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mein Studium und somit die Verfassung dieser Arbeit ermöglicht haben. Ich danke Ihnen für die bedingungslose Unterstützung.