

Aus dem
Charité Centrum 14 für Tumormedizin, Campus Virchow-Klinikum
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Direktor: Prof. Dr. med. B. Dörken

Habilitationsschrift

Klinische Relevanz der Detektion minimaler Resterkrankung bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie mittels multiparametrischer Durchflußzytometrie

zur Erlangung der *Lehrbefähigung*
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Richard Ratei

Eingereicht: Oktober 2010
Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachterin: Frau Prof. Dr. Claudia Rössig
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Hubert Serve

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	3
1.0 EINLEITUNG	5
1.1 Prognostische Relevanz von MRD bei ALL	5
1.2 Ontogenese der B- und T-Zellen.....	8
1.3 Antigenmodulation und Genexpression leukämischer Blasten.....	9
1.4 LAIP und durchflußzytometrischer Nachweis von MRD	12
2.0 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELE.....	16
3.0 EIGENE ARBEITEN UND ERGEBNISSE.....	18
3.1 Qualitätskontrolle und Standardisierung.....	18
3.1.1 Instrumenteneinstellung und Kompensation	18
3.1.2 Datenanalyse und Interpretation	20
3.1.3 Internationaler Konsensus und Richtlinien	24
3.2 Sensitivität und Spezifität der FCM-MRD vs. PCR	25
3.2.1 Allgemeine Prinzipien und die Grenzen der Poisson-Verteilung	26
3.2.2 FCM- MRD versus PCR-MRD	26
3.2.3 FCM-Lyse versus FCM-Ficoll.....	28
3.3 Klinische Ergebnisse des MRD Nachweises mittels FCM	30
3.3.1 Beurteilung der Blastenreduktion in-vivo	30
3.3.2 Algorithmen der FCM-MRD Risikostratifizierung.....	32
3.3.3 FCM-MRD Risikostratifizierung im klinischen Kontext.....	33
3.4 Antigenmodulation leukämischer Blasten im Therapieverlauf	34
3.4.1 Vergleich leukämischer Blasten mit normalen B-Zellen	34
3.4.2 Differentielle Genexpression nach in-vivo Prednison Exposition	38
3.4.3 Identifizierung neuer Oberflächenmarker	39
4.0 DISKUSSION UND AUSBLICK.....	40
5.0 ZUSAMMENFASSUNG	49
6.0 LITERATURANGABEN	52
DANKSAGUNG	60
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	61

Abkürzungen

ABL	Abelson Murine Leukemia
AIEOP	L'Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ALL-BFM	Berlin-Frankfurt-Münster kooperative multizentrische ALL Studiengruppe
ALL-BFM 2000	Multizentrische Therapiestudie zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit Akuter Lymphoblastischer Leukämie. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00430118 http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00430118?term=ALL-BFM&rank=1
BCBM	Blast Count Bone Marrow, Blastenzahl im Knochenmark
BCPB	Blast Count Peripheral Blood, Blastenzahl im peripheren Blut
BCR	Break Point Cluster Region
BCR-ABL	Fusionsgen der Translokation t(9;22)(q34;q11)
BFM	Berlin – Frankfurt - Münster
BRR	Blast Reduction Rate, Blastensenkungsrate
CD	Cluster of Differentiation
DC	Dendritische Zellen
E2A-PBX	Fusionsgen der Translokation t(1;19)(q23;p13)
ETP	Early Thymus Progenitors
EWGCCA	European Working Group for Clinical Cell Analysis
FCM	Durchflußzytometrie
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FLT3	FMS-like Tyrosine Kinase 3
GC	Glukokortikosteroide
GEP	Genexpressionsprofil
Ig	Immunglobulin
INF	Interferon
KM	Knochenmark
LAIP	Leukämie - assoziierter Immunphänotyp
mAk	Monoklonaler Antikörper
MNC	Mononukleäre Zellen
MPO	Myeloperoxidase
MRD	Minimale Resterkrankung
NK	Natürliche Killer Zellen

OPAL	Outcome Predictor in Acute Leukemia
pB	Peripheres Blut
PBC	Precursor B-cell, Vorläufer B-Zelle
PCR	Polymerase – Ketten - Reaktion
PE	Phycoerythrin
RAG	Rekombinase aktivierende Gene
RQ-PCR	Realtime-quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SDF	Stem Cell Derived Factor
SOP	Gemeinsame Arbeitsanweisung, "Standard Operating Procedure"
SVM	Support Vector Machine
TdT	Terminale Desoxynucleotidyl Transferase
TEL-AML1	Fusionsgen der Translokation t(12;21)(p12;q22)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSP	Thymus Seeding Progenitors
TZR	T-Zell Rezeptor

**„Not everything that is countable counts and
not everything that counts is countable“.**

Albert Einstein

1.0 Einleitung

1.1 Prognostische Relevanz von MRD bei ALL

Akute Leukämien sind klonale Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle die durch eine unkontrollierte exponentielle Vermehrung der leukämischen Zellpopulation die normale Blutbildung verdrängen. Der daraus resultierende Mangel an normalen, funktionsfähigen Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten begünstigt Infektionen, Blutungen und Sauerstoffmangel, der ohne Therapie mit dem Leben nicht mehr vereinbar ist. Bei Diagnosestellung beträgt die im Körper zirkulierende Gesamtmasse an Leukämiezellen etwa 10^{10} - 10^{12} mit einem entsprechenden Gewicht von ca. 1-2 kg. Eine weitere Vermehrung der leukämischen Zellmasse auf 10^{13} führt unbehandelt rasch zum Tode¹.

Mit der Einleitung einer systemischen Chemotherapie wird bei den meisten Patienten eine deutliche Reduktion der Leukämiebelastung erreicht, so dass die Erkrankung nicht mehr, weder im peripheren Blut noch im Knochenmark, mit dem Lichtmikroskop erkannt und quantifiziert werden kann und die Kriterien einer kompletten Remission erfüllt sind, obwohl mit sensitiveren Nachweismethoden als der Lichtmikroskopie noch Leukämiezellen im Körper nachgewiesen werden können (Abb. 1)²⁻⁵. Für die ALL im Kindesalter bedeutet dies, dass etwa 20-25% aller Kinder in kompletter Remission trotz moderner risikostratifizierter Therapie ein Rezidiv der Erkrankung erleiden^{4,6}. Begründet wird dies zum Teil durch die Definition und Beurteilung der Remission, die bisher auf der morphologischen Begutachtung mittels Lichtmikroskopie beruht und einen arbiträren Schwellenwert von weniger als 5% residualen Blasten für das Erreichen einer kompletten Remission festlegt. Zudem beträgt die Sensitivität der Lichtmikroskopie für die Detektion residualer Blasten nur ca. 10^{-2} , so dass lediglich eine Leukämiezelle pro 100 gemusterte kernhaltige Zellen erkannt werden kann. Deshalb lassen sich kleine Mengen persistierender Leukämiezellen mit Hilfe der Lichtmikroskopie nur ungenügend oder gar nicht erkennen und eine Verbesserung der Therapieergebnisse ist durch eine, an der residualen Blastenzahl orientierte Therapie nur begrenzt möglich. Um eine an der tatsächlichen MRD-Last orientierte, risikoadaptierte Intensivierung, oder auch eine De-Eskalation der Therapie vornehmen zu können, müssen Methoden mit höherer Sensitivität als der Lichtmikroskopie, zur Detektion und Charakterisierung der residualen Leukämiezellen angewendet werden.

Hierzu stehen heute zwei Methoden zur Verfügung, die in der Lage sind das Therapieansprechen und die Remissionsbeurteilung mit einer hohen Sensitivität zu überprüfen. Zum einen sind dies molekularbiologische Verfahren, insbesondere die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), die den Nachweis individueller, Leukämieklon-spezifischer Umlagerungen der Immunglobulin-Schwerkettengene oder der T-Zellrezeptorgene ermöglicht, oder aber die RT-PCR mit der Transkripte von Fusionsgenen rekurrenter chromosomaler Translokationen, wie z.B. der t(9;22), auf einem Sensitivitätsniveau von ca. 10^{-5} - 10^{-6} detektiert werden können. Zum anderen steht mit der multiparametrischen Durchflußzytometrie (FCM) eine Methode zur Verfügung, die über den Nachweis der Expression eines Leukämie-assoziierten Immunphänotyps (LAIP) die Detektion leukämischer Blasten mit einer Sensitivität von 10^{-4} - 10^{-5} ermöglicht⁷⁻⁹. Dies bedeutet, dass beide Methoden in der Lage sind eine Leukämiezelle in 10.000 - 100.000 normalen Zellen zu detektieren, womit die Sensitivität gegenüber der Lichtmikroskopie um das 100 - 1000fache gesteigert wird¹⁰.

Sowohl für die molekularbiologischen als auch für die durchflußzytometrischen Untersuchungsmethoden konnte in unabhängig durchgeführten klinischen Studien gezeigt werden, dass der MRD-Nachweis in den frühen Behandlungsphasen ein unabhängiger prognostischer Parameter ist, der für die Planung zukünftiger risikoadaptierter Therapiestratifikationen einen wesentlichen Stellenwert hat^{7-9,11,12}. Grundlegend für die Bedeutung des durchflußzytometrischen MRD-Nachweises waren insbesondere die von Campana und Coustain-Smith am St. Jude Children's Research Hospital in Memphis (USA) durchgeführten Studien^{9,11}. Weltweit haben bereits zahlreiche Studiengruppen MRD-Untersuchungsprogramme, vorwiegend anhand molekularer Methoden, in die aktuellen Therapieprotokolle integriert. So wird z.B. in der I-BFM Studiengruppe gemäß dem gemeinsamen Protokoll (AIEOP-BFM ALL 2000) eine molekulare MRD-Bewertung mittels PCR-Technologie vorgenommen, anhand derer die Patienten in drei unterschiedliche Risikokategorien mit unterschiedlichen Postremissionstherapien stratifiziert werden. Da es zwischen den unterschiedlichen MRD-Nachweisverfahren (PCR oder FCM) und der Risikoeinschätzung bisher nur wenige vergleichende Studien mit sehr kleinen Patientenzahlen gibt¹³⁻¹⁵, werden bei der Auswahl des Nachweisverfahrens vor allem Faktoren wie individuelle Erfahrung mit den geeigneten Methoden, technischer und personeller Aufwand, sowie Zeit und Kosten der Methode berücksichtigt. Ein

wesentlicher Vorteil der FCM gegenüber der PCR besteht aber vor allem in ihrer raschen Durchführbarkeit, so dass MRD-basierte Therapieentscheidungen zeitnah erfolgen können. Außerdem lassen sich vitale residuale Leukämiezellen nicht nur identifizieren und quantifizieren, sondern auch durchflußzytometrisch sortieren und isolieren. Die anhand ihres LAIP definierten und isolierten Leukämiezellen können dann bezüglich ihrer Genexpression und spezifischer Kandidatengene charakterisiert werden, was die Möglichkeit eröffnet, Veränderungen bestimmter Zellpopulationen unter der Therapie mittels Genexpressionsanalysen zu verfolgen.

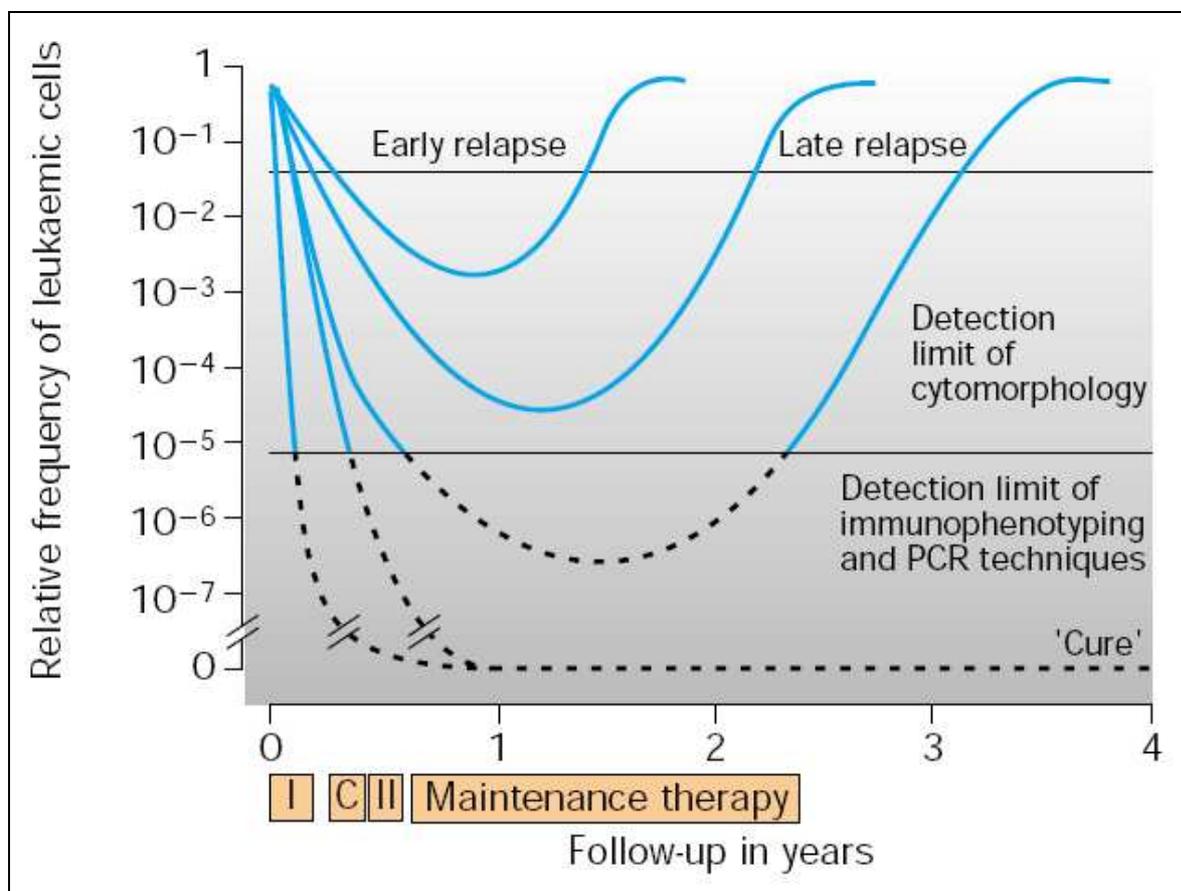


Abbildung 1

Nachweisgrenzen und Sensitivitätsniveau der unterschiedlichen Möglichkeiten zur Beurteilung der Remission, insbesondere der Zytomorphologie, der molekularbiologischen und der durchflußzytometrischen Methoden zur MRD - Detektion bei unterschiedlichen Krankheitsverläufen mit Früh- oder Spätrezidiv⁵.

1.2 Ontogenese der B- und T-Zellen

B-Zell Ontogenese

Die Ontogenese der B- und T-Lymphozyten beginnt mit der gemeinsamen lymphatischen Progenitorzelle im Knochenmark, die durch die Expression von CD34, CD10, CD38 und CD127 (IL-7 Rezeptor) auf der Zellmembran charakterisiert ist^{16,17}. Im Zellkern können Rekombinase aktivierende Gene (RAG) und die Terminale deoxynukleotidyl Transferase (TdT) mittels RT-PCR nachgewiesen werden¹⁸. Unter dem Einfluß von positiven Wachstumsregulatoren wie IL-7, FLT3-Ligand und SDF-1, sowie von Wachstumsinhibitoren wie z.B. TNF- α , TNF- β und IFN sind die ersten B-Linien spezifischen Moleküle des B-Zell Rezeptorkomplexes, Vpre β und λ 5, in dieser frühen B-Zelle noch vor der Expression von membranständigem CD19, intrazytoplasmatisch detektierbar¹⁹⁻²¹. Aber erst mit dem Nachweis von CD19, CD34 und CD10 an der Oberfläche läßt sich die Zelle erstmals als eine Vorläufer B-Zelle (pro-B-Zelle) erkennen. Die weitere Differenzierung der pro-B Zelle in die prä-B Zelle geht mit Verlust der CD34- und TdT-Expression, bei gleichzeitigem Auftreten der zytoplasmatischen IgM-Schwerketten (μ HC) einher. Mit dem Beginn der Leichtketten Genumlagerungen wird der B-Zell Rezeptor auf der Membran exprimiert und die Zelle als pre-B Zelle bezeichnet. Aufgrund von Zellzyklus-Analysen lassen sich in der Population der prä-B Zellen die großen proliferierenden prä-BI von den kleinen postmitotischen prä-BII Zellen, bei denen sich ein aktives Rearrangement der κ -Leichtketten vollzieht, unterscheiden²². Hiermit erfolgt die Expression des kompletten IgM-Moleküls, bestehend aus zwei Schwerketten und zwei Leichtketten und die Zelle verläßt als sogenannte unreife B-Zelle das Knochenmark und tritt in die Zirkulation über. Durch alternatives „splicing“ der Schwerketten – mRNA²³ exprimieren diese Antigen-naiven, zirkulierenden B-Zellen sowohl IgM als auch IgD an der Zelloberfläche und haben im Gegensatz zu ihren Vorgängern im Knochenmark die Fähigkeit, fremdes Antigen unspezifisch zu binden.

T-Zell Ontogenese

Das begrenzte Entwicklungspotential der thymischen Vorläuferzellen (sog. Thymus seeding progenitors = TSP) setzt eine kontinuierliche Quelle von lymphatischen Progenitoren aus dem Knochenmark voraus, die in den Thymus einwandern können. Im menschlichen Nabelschnurblut lassen sich CD34+, CD45RA+, CD7+ Zellen nachweisen, die sowohl T-, B-, als auch NK- und DC-Progenitorpotential

aufweisen^{24,25}. Die Analyse der TZR-Genumlagerungen dieser CD34+, CD38^{lo} exprimierenden Zellen bestätigt einerseits deren frühes T-Zellpotential und andererseits wird hiermit auch gezeigt, dass multipotente Präkursoren in den Thymus einwandern und auch den Ursprung thymischer B-Zellen bilden können. Die TSP und ETP (early thymus progenitors) sind noch multipotente Vorläuferzellen, die erst durch die Expression von cyCD3 und CD1a ihre definitive T-Zellprägung erhalten. Unter dem für die T-Zellentwicklung unabdingbaren Einfluß von IL-7 werden im Rahmen der als β -Selektion bezeichneten TZR-Genumlagerungen verschiedene, transiente Stadien der thymischen T-Zell Entwicklung durchlaufen, die sich vor allem in der CD4- und CD8-Expression unterscheiden²⁶⁻²⁸. Nach erfolgreicher β -Selektion wird der vollständige TZR membranständig exprimiert und der reife, CD4- oder CD8-positive T-Lymphozyt verläßt den Thymus und gelangt in das periphere Blut und das lymphatische System.

1.3 Antigenmodulation und Genexpression leukämischer Blasten

Die Modulation der Expression bestimmter Antigene im Krankheitsverlauf ist ein Phänomen, das in Abhängigkeit vom Therapieprotokoll und der darin eingesetzten Medikamente betrachtet werden muss. Umfangreiche Untersuchungen gibt es zum Einfluss der in fast allen Therapieprotokollen eingesetzten GC, wobei die meisten dieser Untersuchungen die Veränderungen auf Proteinebene analysiert haben, z.T. aber auch funktionelle Untersuchungen, insbesondere zur Beeinflussung der Apoptose und des Zellzyklus durch GC, durchgeführt wurden. Für die FCM-MRD Diagnostik ist die Kenntnis der Antigenmodulation in den einzelnen Therapiephasen von entscheidender Bedeutung, um die leukämische Restblastenpopulation sicher von reaktiv-regenerativen Veränderungen der normalen Hämatopoese und insbesondere der B-Zell Regeneration, abgrenzen zu können. Für eine umfassende und genaue Analyse ist ein Versuchsaufbau, der den Vergleich leukämischer Restblasten mit normalen reaktiv-regenerativen B-Zellen intra- und inter-individuell zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie nicht nur für ein Antigen, sondern für möglichst viele Antigene bezüglich der globalen Genaktivität erfasst, am aussagekräftigsten. Mit Hilfe der durchflußzytometrischen Zellsortierung und der globalen Genexpressionsanalyse lassen sich die beiden Zellpopulationen, normale regenerierende B - Zellen und leukämische Restblasten, bei einem Patienten an

unterschiedlichen Therapiezeitpunkten anhand der unterschiedlichen Expression von Oberflächenmolekülen differenzieren, sortieren, isolieren und für eine getrennte, globale Genexpressionsanalyse verwenden.

Die Methode der Genexpressionsanalyse mittels Mikroarraytechnik sei hier kurz dargestellt, da sie als eine bahnbrechende Entwicklung der Molekularbiologie auf dem Gebiet der biologischen Charakterisierung und klinischen Diagnostik von akuten Leukämien einen wesentlichen Beitrag leistet^{29,30}. Hiermit kann, im Gegensatz zu den klassischen Methoden wie Northern-Blot oder RT-PCR, die Expression von mehreren Tausend Genen parallel untersucht werden. Insbesondere nach der Aufklärung der Struktur des menschlichen Genoms bieten sich prinzipiell neue Möglichkeiten der Analyse der globalen (genomweiten) Genaktivität in der Zelle^{29,31-33}.

Zur Erstellung von Genexpressionsprofilen lassen sich zwei verschiedene Array-technologien anwenden: cDNA- und Oligonukleotid-Mikroarrays³⁴. Vor allem die letztgenannte Methode ist gut standardisierbar und reproduzierbar, wodurch die Voraussetzungen für Verlaufsuntersuchungen zur MRD-Beurteilung bei langjährigen Therapiestudien erfüllt werden. Die hauptsächlich verwendeten Oligonukleotid-Mikroarrays werden von der Firma Affymetrix (Großbritannien) hergestellt und als GeneChips® bezeichnet³³. Der derzeit neueste genomweite Affymetrix-Chip U133 Plus 2.0 (entspricht dem älteren Chip-Set U133A/B) und umfasst ca. 33.000 humane Gene. Die Gene selbst werden durch kurze, 25 Nukleotide lange Abschnitte ihrer Sequenz repräsentiert. Die mRNA aus den zu untersuchenden Zellen wird in die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte cRNA umgesetzt und mit den Genchip-gebundenen Oligonukleotiden hybridisiert. Die mit Hilfe eines Laser-Scanners ermittelten Fluoreszenzintensitäten können dann z. B. in Form einer Excel-Tabelle ausgegeben werden, wodurch erste einfache Analysen, wie der paarweise Vergleich von Genexpressionsprofilen, möglich sind. Die statistische Signifikanz von Genen, die sich beim paarweisen Vergleich zweier Gruppen als differentiell exprimiert zeigen, lässt sich mit dem für Genchip-Analysen entwickelten Programm SAM (significance analysis of microarrays) bestimmen³². Um jedoch die erzeugten großen Datenmengen genauer auswerten zu können, ist der generelle Einsatz bioinformatischer Methoden erforderlich, mit denen meist typische Fragestellungen bearbeitet werden³⁵. Mit Hilfe von so genannten Supervised Learning Algorithmen

kann z. B. nach spezifischen Genexpressionssignaturen gesucht werden, die es ermöglichen, bestimmte, bereits bekannte Klassen (genetische Subtypen, Krankheitsstadien etc.) zu diskriminieren. Hierzu wird ein Probenkollektiv in Lern- und Test-Set aufgeteilt. Das Lern-Set besteht aus der Gruppe der bereits bekannten Proben, mit deren Hilfe es Genexpressionssignaturen für die einzelnen Klassen erlernt, die dann an dem Test-Set, bestehend aus Gruppe der unbekanntem Proben, überprüft werden. Um anhand der Genexpressionsprofile neue Risikogruppen entdecken zu können, werden hingegen Clustering-Methoden eingesetzt, die als Unsupervised Learning Algorithmen bezeichnet werden. Die Ergebnisse der Cluster-Analysen werden durch Dendrogramme visualisiert, die die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Genen oder Proben wiedergeben³⁶.

Die Mikroarraytechnologie hat für die medizinische Diagnostik erhebliche Bedeutung erlangt, da hiermit die Klassifizierung akuter Leukämien auf molekularer Ebene erfolgen kann^{37,38}. Nachdem es Golub et al.³⁰ im Jahre 1999 erstmals gelungen war, die beiden Hauptgruppen, akute lymphatische und myeloische Leukämien, anhand der Genexpressionsprofile zu unterscheiden, folgten weitere Arbeiten, in denen an größeren Patientenkollektiven noch genauere Differenzierungen der Leukämien vorgenommen werden konnten. Die bislang veröffentlichten größten Genexpressionsstudien kindlicher ALLs stammen aus dem St. Jude Children's Research Hospital^{38,39}. In diesen Studien konnten Genexpressionsdaten von mehr als 360 Patienten erhoben werden, die nicht nur dazu genutzt wurden, Genexpressionssignaturen zur Klassifizierung bestimmter leukämischer Subtypen (BCR-ABL, E2A-PBX1, TEL-AML1, Rearrangements im MLL-Gen, Hyperdiploidie mit > 50 Chromosomen, T-ALL) zu identifizieren und verifizieren, sondern auch, um prognostische Aussagen zu ermöglichen.

Bei T-ALL konnten darüber hinaus Genexpressionsprofile identifiziert werden, die charakteristisch sind für bestimmte Entwicklungsstadien innerhalb der normalen T-Zell Ontogenese, übereinstimmend mit der Vorstellung, dass der leukämische Zellklon arretierte Entwicklungsstadien der normalen Hämatopoese widerspiegelt⁴⁰.

Die Genexpressionsanalysen können zudem zur Identifizierung neuer molekularer Marker mit prognostischem Wert beitragen. Das zeigt die Entdeckung von drei Genen, deren Expressionsstärke mit der Prognose von kindlichen ALL Patienten korreliert⁴¹. Das Gen, das dabei die größte prognostische Bedeutung zeigt, ist das in seiner Funktion bislang weitgehend unbekannte OPAL1 (Outcome Predictor in Acute

Leukemia 1). 87% der Patienten, die eine hohe Expression dieses Gens zeigten, erreichten eine anhaltende komplette Remission, wohingegen bei Patienten mit schwacher Expression von OPAL1 nur 32% eine längere Zeit in Remission blieben⁴¹. Diese Ergebnisse müssen jedoch zunächst in unabhängigen Studien validiert werden. Zudem war es bislang nur im begrenzten Maße möglich, neu definierte, Prognose-relevante Patientengruppen zu identifizieren oder prognostisch relevante molekularbiologische Marker zu finden.

Die meisten der bis heute publizierten Untersuchungen wurden an primären Materialien zum Zeitpunkt der initialen Diagnose bzw. eines Rezidives durchgeführt. Nur in einer Arbeit wurden die Genexpressionänderungen von ALL-Blasten aus dem peripheren Blut einen Tag nach Beginn der Therapie mit Methotrexat oder Mercaptopurin untersucht und eine Gruppe differenziell exprimierter Gene identifiziert⁴².

Eine intraindividuelle, sequentielle Analyse und chronologische Charakterisierung von phänotypischen und genotypischen Veränderungen der residualen leukämischen Blasten, an den unterschiedlichen Zeitpunkten während der Induktions- oder Postremissionstherapie wäre sowohl aus klinischer als auch aus biologischer Sicht von großem Interesse, wurde aber bisher in der Literatur nicht mitgeteilt.

1.4 LAIP und durchflußzytometrischer Nachweis von MRD

Die Herausforderung der MRD - Detektion besteht nicht nur darin die sprichwörtliche „Nadel im Heuhaufen“ zu finden, sondern zu beweisen, dass es auch wirklich eine Nadel ist und von welcher Art die gefundene Nadel ist. Hierzu ist nicht nur eine genaue Kenntnis der oben beschriebenen B- und T- Zellentwicklung notwendig, sondern auch das Wissen um die immunphänotypischen Veränderungen der normalen Lymphopoese unter dem Einfluß der Chemotherapie, d.h., zu den jeweiligen Kontrollzeitpunkten des ALL-BFM 2000 Therapieprotokolls. Da Patienten mit akuten lymphoblastischen T- und B-Zell Leukämien eine identische Induktionstherapie erhalten besteht die Möglichkeit, dass Muster der normalen B-Zell-expression bei lymphoblastischer T-ALL und umgekehrt, dass Muster der normalen T-Zell-expression bei lymphoblastischer B-ALL an den verschiedenen Zeitpunkten der Therapie zu untersuchen und mit dem Expressionsmuster der Leukämiezellen zu vergleichen (Abb. 2, 3 und 4).

Die Pathogenese der ALL führt zu einer klonalen Expansion leukämisch transformierter lymphatischer Progenitorzellen, die auf der Stufe der lymphatischen Stammzelle oder in einem sehr frühen Entwicklungsstadium der B- bzw. T-Zell Ontogenese arretiert sind. Hierbei bleiben stadienspezifische Antigenmuster der normalen B- bzw. T-Zell Ontogenese weitgehend erhalten. Dennoch weisen die meisten ALL aberrante oder asynchrone Expressionsmuster spezifischer Antigene auf, die sich in einer Überexpression (für die B-Zellreihe z.B. von CD19, CD10, CD20, CD34, CD44 oder CD58, für die T-Zellreihe z.B. für CD7), einer verminderten Expression (für die B-Zellreihe z.B. CD10, CD11a, CD38, CD44, CD45 oder TdT und für die T-Zellreihe z.B. von CD3), oder in einer Koexpression von myeloischen Antigenen (z.B. CD13, CD33, CD15, CD65 oder MPO) äußern und die Grundlage für die Auswahl diagnostischer Antikörperkombinationen für die MRD-Detektion darstellen⁴³⁻⁵¹. Die moderne multiparametrische Durchflußzytometrie kann simultan neben den Streulichteigenschaften, die die Größe und Granulation der Zelle wiedergeben, auch die Expression mehrerer intrazytoplasmatischer und membranständiger Antigene für tausende von einzelnen Leukämiezellen mit bis zu 10 spezifischen, aber mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörpern detektieren. Dadurch wird eine mehrdimensionale Analysematrix erzeugt, in der sich nicht nur das Expressionsmuster normaler hämatopoetischer Zellen von dem leukämischer Zellen differenziert darstellen lässt (Abb. 2, 3 und 4), sondern auch die phänotypische Heterogenität der leukämischen Blasten deutlich wird. Normale B- und T-Lymphozyten sind in jeder leukämischen Probe aus dem Knochenmark (KM) oder peripheren Blut (pB) enthalten und können als interne, vergleichende Orientierung bei der Bewertung des leukämischen Expressionsmusters behilflich sein. Da nicht nur eine, sondern mehrere Färbekombinationen von Antikörpern eingesetzt werden, lassen sich auch Patienten mit zunächst unsicherer Differenzierung normaler von leukämischen Zellen durch die Darstellung alternativer Leukämie-assoziiertes Immunphänotypen (LAIP) sicher beurteilen. In den meisten Fällen ist ein Panel von drei bis vier 4-Farbkombinationen ausreichend. Ein wesentlicher Vorteil der FCM-MRD Methode besteht darin, dass es im Gegensatz zur PCR-Technologie möglich ist, MRD-Verlaufsbeurteilungen an vitalen Zellen durchzuführen. Diese können dann auch anhand des LAIP sortiert und isoliert werden und mittels weiterer Methoden, wie z.B. der Genexpressionsanalysen, charakterisiert werden.

Bei der MRD-Beurteilung von lymphoblastischen T-ALL kommt für die FCM-MRD Methode begünstigend hinzu, dass die T-Zell Ontogenese mit ihren unreifen Vorstufen auf den Thymus beschränkt ist und sich anhand der Expression von CD1a, TdT und CD99 deutlich von normalen T-Zellen im pB oder KM unterscheiden lässt. Diese sog. ektopischen Expressionsmuster von T-ALL Blasten hat man sich schon früh bei der FCM-MRD Beurteilung von T-ALL zunutze gemacht^{43,47}.

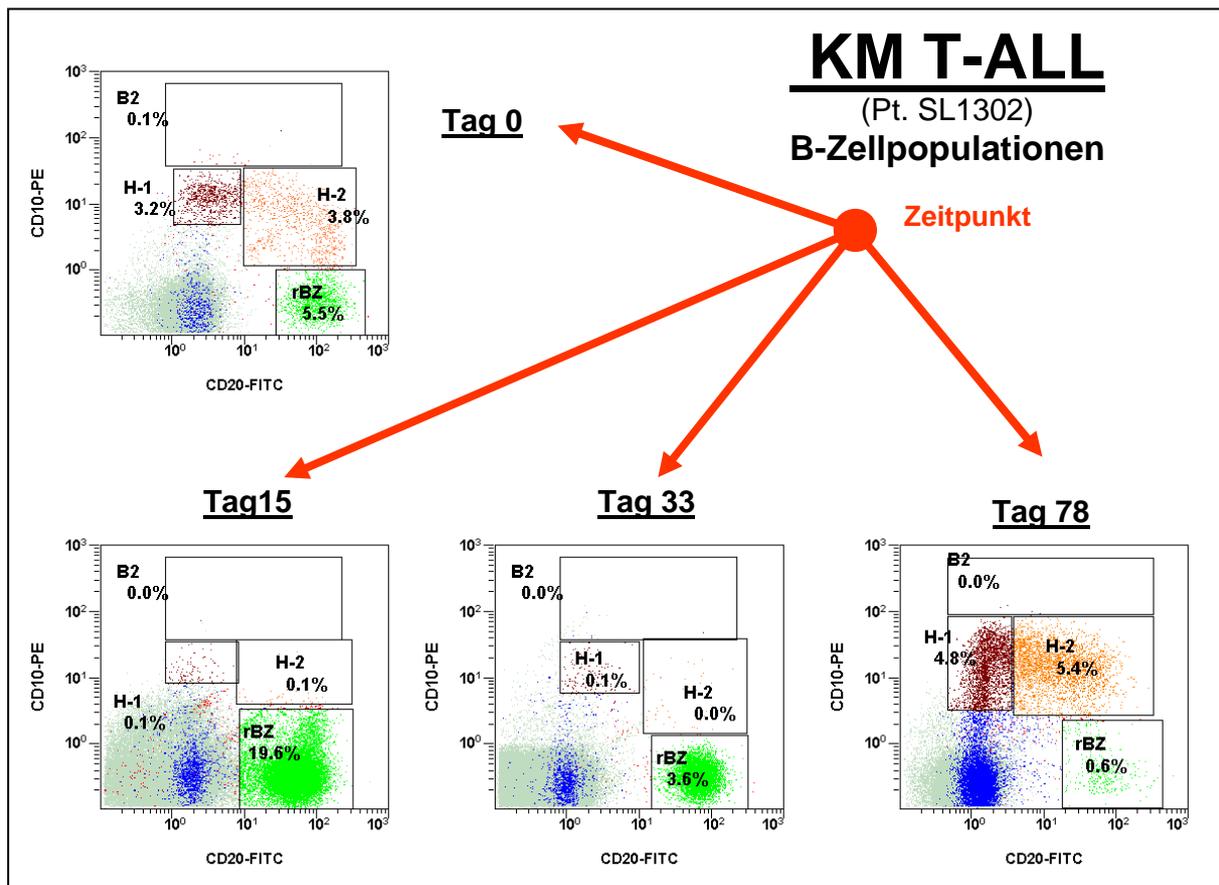


Abbildung 2

Darstellung der normalen B - lymphatischen Zellpopulationen bei Diagnose und im Therapieverlauf am Beispiel einer akuten T-lymphoblastischen Leukämie. Die Induktionsbehandlung erfolgt in Analogie zu den akuten B - lymphoblastischen Leukämien mit demselben Therapieprotokoll (ALL-BFM 2000), so dass die Veränderungen der normalen B - Zellpopulationen bei T - ALL mit den leukämischen B - lymphoblastischen Zellpopulationen bei Patienten mit B-lymphoblastischen Leukämien an den verschiedenen Therapiezeitpunkten verglichen werden können. CD19 positive Zellen sind in Braun, Orange und Hellgrün dargestellt. H1(braun) = normale B - Progenitoren (Hämatogonen, CD10+/CD20-); H2 (Orange)

= intermediäre B-Zellen (CD10+/CD20+); rBZ (hellgrün) = reife B – Lymphozyten (CD10-/CD20+). In der Region B2 finden sich leukämische Blasten bei z.B. common-ALL (s. Abb. 3).

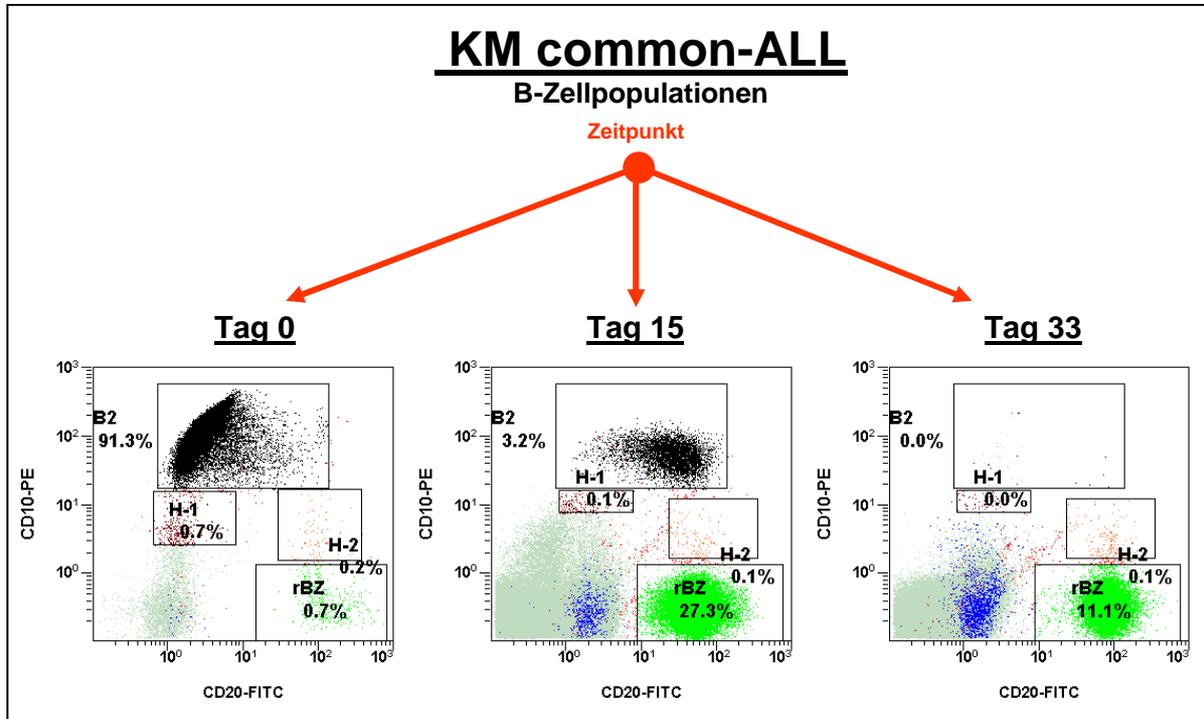


Abbildung 3

Beispiel eines aberranten Phänotyps einer lymphoblastischen B-ALL bei Diagnose (Tag 0) und für den MRD-Nachweis an Tag 15 und an Tag 33 der Induktionstherapie. Dargestellt ist das KM eines Patienten mit common-ALL. Im Vergleich zu den normalen B-Zellpopulationen (s. Abb. 2) findet sich bei den schwarz dargestellten Leukämiezellen in Region B2 eine verstärkte Expression von CD10 und nur eine partielle Expression von CD20. Am Tag 15 hat sich die Fluoreszenzintensität und die Expression von CD20 verstärkt. Am Tag 33 der Induktionsbehandlung finden sich keine Restblasten mehr in der Region B2.

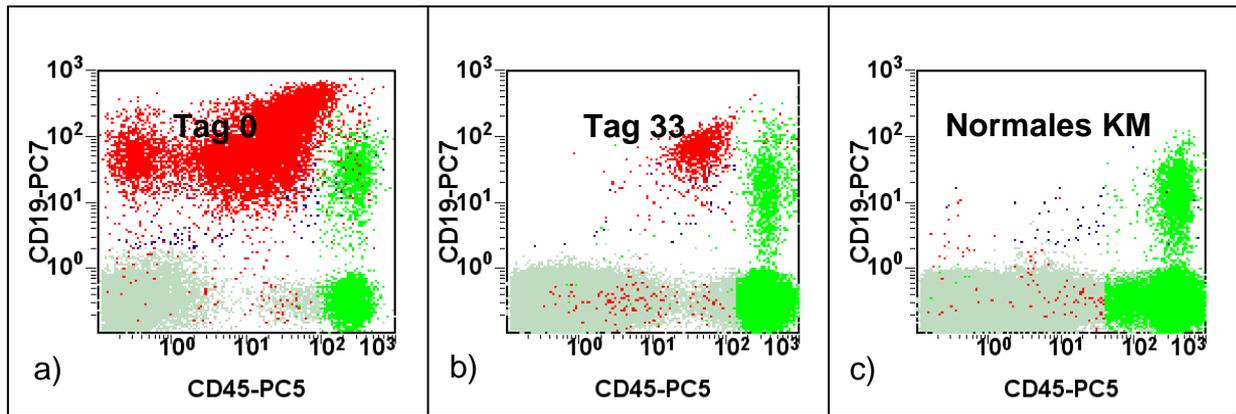


Abbildung 4

Aberrante, schwache Expression von CD45 bei einer lymphoblastischen B-ALL. Am Tag 0 (a), vor Therapiebeginn findet sich neben der roten Blastenpopulation eine kleine, CD19+/CD45+++ Population (grün), die den normalen B-Lymphozyten entspricht. Am Tag 33 der Therapie (b) besteht noch eine residuale Blastenpopulation (rot). Zum Vergleich hierzu zeigt das normale KM (c) keine CD45 negativen oder CD45 schwach exprimierenden CD19 positiven Zellen.

2.0 Problemstellung und Ziele

Für die Überwachung des Ansprechens auf die Therapie und die Remissionsbeurteilung von akuten Leukämien sind molekulargenetische und/oder durchflußzytometrische Nachweismethoden von residualen Leukämiezellen unverzichtbarer Bestandteil in der Risikobeurteilung und Therapiestratifikation moderner Therapieprotokolle. Die Wertigkeit und die Vergleichbarkeit beider Methoden kann dabei aber nur im spezifischen Kontext der jeweiligen Erkrankung und ihrer Therapie beurteilt werden. Dies bedeutet für die Integration der FCM-MRD Diagnostik in das AIEOP-ALL-BFM Therapieprotokoll die Interpretation und Bewertung der Ergebnisse im Vergleich zu der etablierten PCR-MRD basierten Risikobeurteilung.

Voraussetzung für die prospektive Evaluation der prognostischen Wertigkeit der FCM-MRD Quantifizierung im Rahmen des internationalen AIEOP-ALL-BFM 2000 Therapieprotokolls ist die Standardisierung der multizentrisch und international durchgeführten Methode der FCM-MRD Detektion. Hierzu wurden methodische Standards für alle Arbeitsschritte der Analytik, einschließlich der Interpretation und Befundübermittlung erarbeitet und in einer gemeinsamen Arbeitsanweisung (SOP)

festgelegt. Zudem sind interne und externe Kontrollen durchgeführt und Ringversuche für eine regelmäßige Qualitätskontrolle etabliert worden.

Die Vergleichbarkeit der durchflußzytometrischen MRD-Detektion mit der etablierten aber ungleich aufwändigeren molekularbiologischen MRD-Bestimmung ist für die Prognose und Stratifikation der Patienten von entscheidender Bedeutung. Erst durch die Berücksichtigung der spezifischen methodischen, biologischen und auch logistischen Unterschiede beider Methoden vor dem Hintergrund der Wahrscheinlichkeitsrechnung und der mathematischen Verteilungslehre ist eine Interpretation und Wertung der FCM-MRD Detektion im klinischen Kontext des AIEOP-ALL-BFM 2000 Protokolls möglich geworden.

Der FCM-MRD Nachweis wird zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung im KM und im pB durchgeführt. Die Untersuchungen von pB an den Therapietagen 0, 8, 15, 22, 33, 52, 78 und von KM an den Therapietagen 0, 15, 33, 52, 78 ermöglicht sowohl statische MRD-Beurteilungen zu einem bestimmten Therapiezeitpunkt als auch dynamische Beurteilungen, die eine Kinetik des Therapieansprechens über einen zeitlichen Verlauf „in-vivo“ wiedergeben. Mithilfe der Verlaufsbeobachtungen ist untersucht worden, ob die statische FCM-MRD Beurteilung eine Trennung in unterschiedliche Risikogruppen ermöglicht und zu welchem Zeitpunkt der Untersuchung eine maximale Trennschärfe in die Risikogruppen erreicht werden kann. Außerdem wurde geprüft, ob die kinetischen Aussagen über den MRD-Verlauf, wie z.B. die Differenz der Blastenreduktion von Tag 0 auf Tag 8 oder Tag 15 und von Tag 15 auf Tag 33 sich als prognostisch aussagekräftiger erweisen, als die statischen Beurteilungen an einem bestimmten Therapiezeitpunkt.

Die Expression, der für die FCM-MRD Detektion relevanten Antigene, CD10, CD20, CD34, CD45, TdT, CD19, unterliegt einer Therapie - abhängigen Modulation. Die Veränderungen der Antigenexpression von leukämischen Blasten im Verlauf der Behandlung unter dem Einfluss der verschiedensten Chemotherapeutika können Ausdruck einer Selektion von therapieresistenten leukämischen Subklonen sein, können aber auch einer durch die Zytostatika induzierten, zellbiologischen Überlebensstrategie des gesamten leukämischen Zellklons entsprechen. Die nach den

verschiedenen Therapiephasen durchgeführten durchflußzytometrischen Untersuchungen der Antigenexpression und die molekularbiologischen Analysen von isolierten, residualen Blasten mittels genomweiter Genexpressionsanalyse, dienten dazu die Antigenmodulation auf Protein- und RNA - Niveau zu charakterisieren und haben zur Definition eines MRD-assoziierten Antigen- und Genexpressionsprofils (GEP) beigetragen. Außerdem wurden diese Untersuchungen auch zur Klärung der Ursachen und der Mechanismen der Antigenmodulationen durchgeführt, die unter dem Einfluss einer, in einem klinischen Studienprotokoll standardisierten, zytostatischen Therapie, insbesondere aber unter dem Einfluss von Glukokortikosteroiden, auftreten. Letztlich wurden so auch neue MRD-spezifische Marker erkannt und definiert, die in Zukunft für eine Verbesserung der durchflußzytometrischen MRD-Detektion eingesetzt werden können.

3.0 Eigene Arbeiten und Ergebnisse

3.1 Qualitätskontrolle und Standardisierung

Die Qualitätskontrolle muss jeden prä-analytischen, analytischen und post-analytischen Schritte der diagnostischen Prozedur erfassen und evaluieren. Im Einzelnen bedeutet dies:

- 1) Die Überprüfung der Leistung des Durchflußzytometers
- 2) Die Überprüfung der Probenentnahme, des Transportes und der Lagerung
- 3) Die Überprüfung der Reagenzien, insbesondere der monoklonalen Antikörper
- 4) Die Messung der Probe, Datenaquisition, Datenauswertung und Interpretation.

In einem multizentrischen Vorhaben, müssen die einzelnen Arbeitsschritte in jedem Labor standardisiert durchgeführt und kontrolliert werden um die Ergebnisse vergleichen zu können. Hierfür lassen sich nach einer Standardisierung der einzelnen Arbeitsschritte, die in einer SOP festgelegt werden, interne und externe Kontrollverfahren anwenden.

3.1.1 Instrumenteneinstellung und Kompensation

Die Geräteeinstellung der von verschiedenen Herstellern eingesetzten Durchflußzytometer für die MRD – Diagnostik unterscheidet sich nicht wesentlich von der für die diagnostische Immunphänotypisierung von akuten Leukämien und weist auch

keine Besonderheiten gegenüber der üblichen Immunphänotypisierung von Lymphozyten auf. Die linearen Verstärkereinstellungen für die Streulichtparameter sollen so gewählt sein, dass alle vorkommenden Zellen auf dem Bildschirm in einem zweidimensionalen Punktediagramm (Dot plot) zu sehen sind, einschließlich kleiner Normoblasten, myeloischer Vorläuferzellen und eosinophiler Granulozyten mit starkem Seitwärtsstreulicht. Eine logarithmische Verstärkung des Seitwärtsstreulichtes ist ebenfalls möglich und kann den üblichen Bereich für die Blasten vergrößernd darstellen und somit eine Markierung mittels Software oder ein eventuelles Gating erleichtern. Die Einstellungen der Fluoreszenzverstärker erfolgen auf einer logarithmischen Skala derart, dass ungefärbte Lymphozyten in allen Fluoreszenzkanälen in der ersten Dekade positioniert werden. Hierbei ist zu beachten, dass alle Kompensationen auf null gestellt sind. Bei der anschließenden Kompensation dürfen die Verstärkereinstellungen für die einzelnen Fluoreszenzkanäle dann nicht mehr verändert werden. Durch die spektrale Überlappung der Fluorochrome ist eine Kompensation erforderlich, um die positive Reaktion mit dem Antikörper gegenüber dem Kontrollansatz abzugrenzen. Die einmal optimierten Geräteeinstellungen sind bei den modernen Routinegeräten relativ stabil und lassen sich üblicherweise abspeichern. Für die Überprüfung eignen sich fluorochromierte Latexkügelchen mit lymphozytenähnlichen Eigenschaften bezüglich Größe und Fluoreszenzintensität und/oder gefärbte Lymphozyten gesunder Kontrollspender. Die gefärbten Antigene müssen sich gegenseitig auf der Zelloberfläche der Lymphozyten ausschließen (z.B. CD4, CD8 und CD19), um eine überlappungsfreie Auftrennung in die verschiedenen Analysequadranten zu gewährleisten. Zu beachten ist, dass schlecht hergestellte oder verfallene Fluorochrom-Tandemkonjugate, wie z.B. PE-Cy5 aufgrund der unerwünschten Abstrahlung des PE besondere Probleme bereiten können, so dass ggf. bei Chargen- oder Herstellerwechsel erneut kompensiert werden muss. Außerdem weisen Tandemkonjugate oft eine erhöhte unspezifische Bindung an myeloische und insbesondere monozytäre Zellen auf.

Wie in der vorliegende Arbeit gezeigt, lässt sich die interne Qualitätskontrolle der Instrumenteneinstellung mit Hilfe normaler Lymphozyten, die auch in jeder leukämischen Probe vorhanden sind, in einer multizentrischen Studie durchführen und liefert wertvolle Informationen über die einzelnen analytischen Schritte im zeitlichen Verlauf.

Interne Qualitätskontrolle für die durchflußzytometrische Immunphänotypisierung mittels normaler Lymphozyten in leukämischen Zellproben.

Normal lymphocytes from leukemic samples as an internal quality control for fluorescence intensity in immunophenotyping of acute leukemias.

Cytometry B Clin Cytom 70:1-9, 2006

Ratei R., Karawajew L., Lacombe F., Jagoda K., Del Poeta G., Kraan J., De Santiago M., Kappelmayer J., Björklund E., Ludwig W.-D., Gratama J., Orfao A.

For the European Working Group of Clinical Cell Analysis (EWGCCA)

Zusammenfassung: In acht europäischen Laboren wurden die Knochenmarkproben von insgesamt 151 Patienten mit akuten Leukämien durchflußzytometrisch untersucht. Im einzelnen: 29 Patienten mit B-ALL, 77 Patienten mit AML, 10 Patienten mit T-ALL und 35 Normalpersonen. Die Lymphozyten wurden entsprechend ihren Streulichteigenschaften und der CD45-Expression markiert und hinsichtlich ihrer qualitativen und quantitativen Expression von B- (CD19 und CD22) und T- (CD7 und CD3) lymphatischen Merkmalen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere die Fluoreszenzintensität von CD3 auf den normalen T-Lymphozyten in einer longitudinalen Verlaufsdarstellung als interner Qualitätskontrollparameter geeignet ist

3.1.2 Datenanalyse und Interpretation

Die technischen Entwicklungen auf dem Gebiet der Durchflußzytometrie und Immunphänotypisierung haben dazu geführt, dass die Anzahl der auf einer Zelle gleichzeitig darstellbaren und messbaren Parameter mithilfe von Fluoreszenz markierten Antikörpern und den Streulichteigenschaften von ehemals drei bis vier, heutzutage auf 10 - 12 Parameter angestiegen ist. Die Auswertung dieser komplexen, multiparametrischen Datenmatrix erfolgt aber zumeist noch über die Darstellung von zweidimensionalen Grafiken der Fluoreszenzintensitäten, bei denen die unterschiedlichen Fluoreszenzen der eingesetzten mAk gegeneinander aufgetragen werden. Für eine vierdimensionale Datenmatrix mit vier unterschiedlichen mAk benötigt man für eine komplette Darstellung aller möglichen Kombinationen sechs zweidimensionale Grafiken, entsprechend den sechs dunkelroten Quadraten

in Abbildung 5. Für eine zwölfdimensionale Datenmatrix, die neben den Streulichteigenschaften, Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht, auch noch die Fluoreszenzintensitäten von 10 unterschiedlichen Färbungen mit mAk beinhaltet, benötigt man aber schon 45 zweidimensionale Grafiken, entsprechend den sechs dunkelroten und 39 grauen Rechtecken, um jede der möglichen zweidimensionalen Kombinationen der Färbung mit 10 Antikörpern darzustellen.

Parameter B	10										
	9										
	8										
	7										
	6										
	5										
	4										
	3										
	2										
	1										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Parameter A									

Abbildung 5

Anzahl von zweidimensionalen Grafiken, die für die Darstellung aller Fluoreszenz-Parameter in einer vier-dimensionalen (nur die 6 dunkelroten Quadrate) und 10 -dimensionalen Datenmatrix (6 dunkelrote + 39 graue Quadrate) notwendig sind.

Um die Auswertungen und Beurteilungen dieser komplexen Datenstrukturen besser als mit 45 zwei-dimensionalen Grafiken erfassen zu können, wurden die beiden folgenden, prinzipiellen Arbeiten über die Analyse durchflußzytometrischer Daten bei Diagnose und im Krankheitsverlauf durchgeführt.

Diskriminanzanalyse als Entscheidungsunterstützungssystem für die Diagnose von akuten Leukämien mit einem minimalen Antikörper Panel und multiparametrischer Durchflußzytometrie.

Discriminant function analysis as decision support system for the diagnosis of acute leukemia with a minimal four color screening panel and multiparameter flow cytometry immunophenotyping.

Leukemia 21:1204-1211, 2007.

Ratei R., Karawajew L., Lacombe F., Jagoda K., Del Poeta G., Kraan J., De Santiago M., Kappelmayer J., Björklund E., Ludwig W.-D., Gratama J., Orfao A.
For the European Working Group of Clinical Cell Analysis (EWGCCA)

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Studie wurde die Anwendbarkeit und diagnostische Genauigkeit eines minimalen standardisierten Vierfarb-Panels von 13 monoklonalen Antikörpern in einem multizentrischen Vorgehen für die einheitliche Diagnose von klinisch relevanten Subgruppen akuter Leukämien untersucht. Knochenmarkproben von 155 Patienten mit AML (n=79), B-ALL (n=29), T-ALL (n=12) und normalen Knochenmarkspendern (n=35) wurden in acht verschiedenen, europäischen Laboren untersucht. Mit der auf zusätzliche klinische, zytologische, immunhistologische, immunologische und zytogenetische Untersuchungen gewonnenen Diagnose wurde mit Hilfe der Diskriminanzanalyse ein „Wissen-basierter“ Lern-Algorithmus generiert. Der Einsatz dieses Algorithmus an einer Lernprobe und einer Testprobe erbrachte eine diagnostische Genauigkeit des minimalen Vierfarb-Panels für die Differenzierung der o.g. Leukämie Entitäten von 97.2% (s. Abb. 6). Damit konnte gezeigt werden, dass eine multizentrische Standardisierung der multiparametrischen Durchflußzytometrie möglich ist und eine hohe diagnostische Genauigkeit für die akuten Leukämien mit nur sechs der 13 eingesetzten Antikörper aus dem minimalen Vierfarb-Panel möglich ist.

Eine weitere Möglichkeit die Auswertung und Interpretation durchflußzytometrischer Datensätze objektiver und unabhängiger vom Untersucher zu machen besteht im Einsatz von multivariaten Klassifikationssystemen. In der folgenden Arbeit wurde dies anhand einer SVM basierten In-Silico-Detektion von MRD Zellpopulationen gezeigt.

Anwendung der automatisierten In-Silico Detektion von Zellpopulationen in durchflußzytometrischen Datensätzen für die Diagnostik minimaler Rest-erkrankung bei akuten Leukämien

Automated in-silico detection of cell populations in flow cytometry readouts and its application to leukemia disease monitoring.

Toedling, J., P. Rhein, **R. Ratei**, L. Karawajew, and R. Spang.

BMC Bioinformatics 7:282, 2006.

Zusammenfassung:

Der Nachweis von sehr kleinen Zellpopulationen, wie z.B. leukämische Restblasten nach einer Chemotherapie, im Knochenmark oder im peripheren Blut hat zunehmend Bedeutung erlangt für die Beurteilung des Therapieansprechens und die weitere Therapiestratifikation. Mit den modernen Durchflußzytometern können verlässlich bis zu 10 -12 Variablen pro Zelle gemessen werden, die neben der Größe und Granularität der Zelle auch die Expression von membranständigen, aber auch zytoplasmatischen Antigenen beschreiben. Die Analyse dieser Daten beruhte bisher auf der visuellen Inspektion und dem manuellen Gating von ein- oder zweidimensionalen Darstellungen dieser Daten mit ggf. anschließenden statistischen Verfahren wie z.B. der Diskriminanzanalyse (s.o.). Diese Verfahren ist sehr arbeitsintensiv und kann bei multiparametrischen Datensätzen die hochdimensionalen Zusammenhänge nicht mehr sicher Erkennen und somit zu fehlerhaften Interpretationen führen. Die Anwendung multivariater Klassifikationssysteme, wie z.B. der „Support Vector Machines“ für die automatische Detektion von Zellpopulationen kann diese subjektiven, Untersucher abhängigen Einflüsse der Interpretation durchflußzytometrischer Daten umgehen und eine objektivere Beurteilung dieser komplexen Datensätze ermöglichen.

In dieser Arbeit wurden leukämische Zellproben von Patienten mit ALL bei Diagnose und im Therapieverlauf mit Vierfarb Durchflußzytometrie untersucht. Zur Analyse der Datensätze wurden multivariate Klassifikationstechniken mithilfe von „Support Vector Machines“ eingesetzt. Die Classifiers wurden anhand von konventionell diagnostizierten Daten gewonnen. Wir untersuchten die Nachweisgenauigkeit des SVM basierten multivariaten Klassifikationssystems an unabhängigen Testdatensätzen und die Markerexpression von inkongruent klassifizierten Zellen. Es zeigte sich, dass durch die SVM-Klassifikation die manuell klassifizierten Zellpopulationen mit einer Sensitivität von 99,78% und einer Spezifität von 98,87% diagnostiziert werden können. Somit sind automatische multivariate Klassifikationssysteme für den Nachweis von minimaler Resterkankung in durchflußzytometrischen, multiparametrischen Datensätzen potentiell geeignet.

3.1.3 Internationaler Konsensus und Richtlinien

Für die Erhebung von durchflußzytometrischen Daten und die Erstellung von Befunden in einem multizentrischen Studiensetting, ist es notwendig, dass die Analytik zwischen den einzelnen Laboren standardisiert und abgeglichen wird, um die Daten vergleichbar zu machen. Eine erfolgreiche, multizentrische Standardisierung der Geräteeinstellungen und der Kompensation für die multiparametrische Durchflußzytometrie konnte in Kooperation mit der European Working Group for Clinical Cell Analysis (EWGCCA) für die Diagnose und Klassifikation akuter Leukämien durchgeführt werden⁵². Für die Diagnostik und Bewertung von minimaler Resterkrankung bei ALL existierten aber bislang nur Erfahrungen aus einzelnen Laboren, die gezeigt haben, dass die Durchflußzytometrie prognostisch unabhängige Information liefern kann^{53,54}. Dass dies aber auch in einem multizentrischen Vorgehen zuverlässig möglich ist, konnte von der Studiengruppe für die durchflußzytometrische MRD-Diagnostik innerhalb der AIEOP-BFM 2000 in der folgenden Arbeit nachgewiesen werden.

Standardisierung der durchflußzytometrischen Diagnostik von minimaler Resterkrankung bei akuter lymphatischer Leukämie: Eine multizentrische Bewertung ist durchführbar.

Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible

Dworzak M.N., Gaipa G., ° **Ratei R.**, Veltroni M., Schumich A., Maglia O., Karawajew L., Benetello A., Potschger U., Husak Z., Gardner H., Biondi A., Ludwig W.D., and Basso G.

° *equally contributing*

Cytometry B Clin Cytom 74:331-340, 2008.

Zusammenfassung:

In den vier kollaborierenden durchflußzytometrischen Laboren für die MRD-Diagnostik im Rahmen der AIEOP-BFM-ALL 2000 Therapiestudie wurde ein extensives Standardisierungsprogramm eingerichtet, das neben der methodischen Zusammenführung auch eine Schulung der Mitarbeiter und kontinuierliche Qualitätskontrollen beinhaltete. Verblindete Tests zur Interpretation von 202 durchflußzytometrischen Datensätzen im Krankheitsverlauf von 31 Patienten zeigte eine hohe Übereinstimmung (Korrelationskoeffizient: 0.979) zwischen den vier

Laboren, obwohl es Unterschiede bei den eingesetzten Durchflußzyometern und der Software zur Darstellung der Datensätze gab. Die Konkordanz war allerdings abhängig von der MRD-Last und war etwas niedriger in Proben bzw. Datensätzen von Proben mit einer MRD von $< 0.1\%$. Der Austausch von insgesamt 42 Proben mit unterschiedlicher MRD zwischen den Laboren erbrachte eine Konkordanz von 0.98. Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die durchflußzytometrische MRD-Diagnostik für eine Bewertung im Einsatz von multizentrischen Studien, verlässlich standardisiert werden kann

Grundlage für die Integration der FCM-MRD in das aktuelle Studienprotokoll AIEOP-BFM-ALL 2009 war neben der verlässlichen Standardisierung auch die Aufstellung von standardisierten Arbeitsanweisungen (SOPs), die von allen Laboren der einzelnen Studiengruppen (Italien, Deutschland, Österreich, Schweiz, Tschechien und Israel) getragen werden

Standard Arbeitsanweisungen für die ≥ 6 Farb Durchflußzytometrie zum MRD-Nachweis bei ALL.

Standard Operating Procedure ≥ 6 -color FLOW-MRD detection in ALL

Dworzak M., Basso G., Gaipa G., Ratei R., Karawajew L., Hrusak O., Bourquin J.-P., Lurit D.

AIEOP – BFM-A/G/S – CPH - ISPHO

version "International" 1.4 of October 16, 2009

Hier werden insgesamt 14 Arbeitsschritte der durchflußzytometrischen, multiparametrischen MRD-Diagnostik aufgeführt, im einzelnen: Probenannahme und – Registrierung, Kalkulation des Zelleinsatzes, Bestimmung der eingesetzten mAk, Arbeiten mit mAk-Cocktails, Geräteeinstellung und Kompensation, Aquisition bei Diagnose und im Verlauf, Richtlinien zur Datensatzanalyse, Befundmitteilung, Intra- und Interlabor – Qualitätskontrollen sowie die Dokumentation und Bewertung.

3.2 Sensitivität und Spezifität der FCM-MRD vs. PCR

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Integration der FCM-MRD in den Algorithmus für die Therapiestratifikation in der neuen AIEOP-BFM-ALL 2009 Studie,

war die genaue Analyse des Vergleiches der beiden Methoden FCM-MRD und PCR-MRD bezüglich Sensitivität, Spezifität und Konkordanz.

3.2.1 Allgemeine Prinzipien und die Grenzen der Poisson-Verteilung

In der AIEOP-BFM ALL 2000 Studie für die ALL im Kindesalter, werden die Patienten hauptsächlich nach dem MRD-Level an Tag 33 (TP1) und Tag 78 (TP2) der Behandlung stratifiziert. Das MRD-Level wird durch Amplifikation klonotypischer Immunglobulin- und T-Zell Rezeptor Genumlagerungen, die für jeden Patienten individuell ermittelt werden, durch RQ-PCR quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass der PCR-basierte MRD-Nachweis ein unabhängiger prognostischer Indikator ist, der bedeutsamer ist, als die klassischen Risikofaktoren. In diesem Zusammenhang wurde die FCM-basierte MRD-Bestimmung an einem früheren Zeitpunkt im Therapieverlauf, nämlich schon nach zwei Wochen (Tag 15) als ein früher Prediktor des Rezidiv-freien-Überlebens (RFÜ) untersucht. Um zu verstehen, wie beide Methoden in einem MRD-basierten klinischen Protokoll für eine Risikostratifikation sinnvoll eingesetzt werden können, wurde die Korrelation beider Methoden in Patientendatensätzen überprüft bei denen beide Methoden simultan angewandt wurden.

3.2.2 FCM- MRD versus PCR-MRD

Zeitpunkt abhängige Konkordanz der FCM-MRD und RQ-PCR beim Nachweis von MRD bei der ALL im Kindesalter: Erfahrungen der AIEOP-BFM-ALL Studiengruppe

Time Point-Dependent Concordance of Flow Cytometry and RQ-PCR in the MRD Detection in Childhood ALL: The Experience of the AIEOP-BFM- ALL MRD Study Group.

Gaipa G., Cazzaniga G., Panzer-Grümayer R.E., Veltroni M., Karawajew L., Silvestri D., Buldini B., **Ratei R.**, Schrauder A., Schrappe M., Ludwig W.-D., Valsecchi M.G., Biondi A., Dworzak M.N., and Basso G.

Blood (ASH Annual Meeting, Oral Presentation, Abstracts), Nov 2008; 112: 700.

Zusammenfassung:

Insgesamt wurden zwischen September 2000 und Juni 2006 3618 Knochenmarkproben von 1570 Patienten aus Italien, Deutschland und Österreich (= 32.5% aller Studienpatienten) an den Therapiezeitpunkten Tag15 (478 Proben), Tag 33 (1570 Proben) und Tag 78 (1570 Proben) der Induktionstherapie des AIEOP-BFM ALL 2000 Studienprotokolls untersucht. Die Selektion der Patienten erfolgte lediglich nach dem Kriterium der Verfügbarkeit von MRD-Bestimmungen mit beiden Methoden. Die RQ-PCR wurde an mononukleären Zellen, die nach Ficollseparation gewonnen wurden durchgeführt, während die FCM-MRD Bestimmung nach Vollblutlyse mittels Vierfarb-Durchflußzytometrie mit Aufnahme und Analyse von 300.000 kernhaltigen Zellen erfolgte. MRD-Werte $\geq 10^{-4}$ wurden als „positiv“, MRD-Werte unterhalb dieses Schwellenwertes bei noch vorhandenem Signal als nicht mehr quantifizierbar, bei nicht mehr nachweisbarem Signal als „negativ“ bezeichnet. Insgesamt ergab sich eine qualitative Konkordanz über alle drei Zeitpunkte bei 2704/3618 Proben (74.7%). Die Konkordanzen zu den einzelnen Therapiezeitpunkten sind in Abbildung 6 dargestellt.

		PCR								
		day 15			day 33			day 78		
		pos	neg	total	pos	neg	total	pos	neg	total
FCM	pos	399	2	401	343	85	428	69	17	86
	neg	67	10	77	474	668	1142	269	1215	1484
	total	466	12	478	817	753	1570	338	1232	1570
Concordance		85.6%			64.4%			81.8%		

Abbildung 6

Kreuztabellen für die Konkordanzbestimmung zwischen FCM-MRD und PCR-MRD an den verschiedenen Kontrollzeitpunkten, Tag 15, 33 und 78 im KM. Konkordanz = FCM- und PCR-MRD positive + FCM- und PCR-MRD negative/ Total (z.B.: Tag 15 Konkordanz: $399 + 10/478 \times 100 = 85.6\%$)

Etwa 70% aller diskordanten Proben an allen Zeitpunkten waren Fälle mit niedriger PCR-Positivität (Log-Stufe 10^{-4}) und negativer FCM-MRD, oder umgekehrt. Außerdem wurde die Konkordanz nach den PCR-basierten MRD-Risikogruppen untersucht. Von den 571 PCR-MRD Standardrisiko-Patienten (MRD-SR = PCR an Tag 33 mit zwei Markern mit einer Sensitivität von $\geq 10^{-4}$ negativ) waren 515 (90.9%) auch mit FCM-MRD an Tag 33 negativ, wohingegen an Tag 78 von 121 PCR-MRD

positiven Hochrisiko Patienten (MRD-Werte $\geq 10^{-3}$) 59 Patienten und somit fast die Hälfte (48%) mit FCM-MRD negativ waren.

Um die Korrelation der beiden Methoden genauer zu untersuchen, wurde bei 266 Patienten die Probe an den Therapiezeitpunkten Tag 15, 33, 52 und 78 nach Ficoll-Separation der MNCs für die Analyse mit beiden Methoden aliquotiert und für die FCM-MRD Bestimmung wurden nicht mehr nur 300.000, sondern 500.000 MNCs aquiriert. Außerdem wurde statt eines Vierfarb-Panels ein Siebenfarb-Panel eingesetzt. Hierdurch konnte die Gesamtkonkordanz für alle Zeitpunkte von 74.7% auf 87.0% gesteigert werden.

Bei 100 Proben konnte mit keiner der beiden Methoden MRD nachgewiesen werden, 56 der Proben waren FCM-MRD negativ, aber PCR-MRD positiv ($<10^{-4}$) und nur 13 Proben waren PCR-MRD positiv ($\geq 10^{-4}$) und negativ mit FCM-MRD. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mehrere methodische Faktoren die Konkordanz beider Methoden beeinflussen, insbesondere Probenunterschiede (erste oder zweite Knochenmarkaspiration Aspiration), Aufarbeitung des Materials (Ficoll-Separation mit Anreicherung von MNCs im Vergleich zu Vollblutlyse) und die Anzahl der analysierten Zellen.

Die neueren technischen Entwicklungen in der Durchflußzytometrie erlauben durch die Färbung von bis zu 10 Antigenen in einem Ansatz das meist nur geringe Probenvolumen in einer Färbung einzusetzen und nicht auf mehrere Ansätze verteilen zu müssen. Das kann zu einer Steigerung der Sensitivität und Spezifität der FCM-MRD Methode beitragen. Wenn beide Methoden entsprechend Ihrer Vor- und Nachteile, komplementär eingesetzt werden, kann die Auswahl der MRD Bestimmungsmethode je nach Therapieprotokoll und Therapiephase und nach den verfügbaren Ressourcen, zur Therapieplanung und Stratifikation zum Vorteil der Patienten eingesetzt werden.

3.2.3 FCM-Lyse versus FCM-Ficoll

Dichtegradientenzentrifugation und Erythrozytenlyse bzw. Vollblutlyse sind Zellaufbereitungsverfahren, die in der Durchflußzytometrie zur Isolierung von mononukleären Zellen und zur Entfernung von Erythrozyten und Debris aus der Knochenmark- oder der Blutprobe dienen, um deren störenden Einfluss bei der Färbung und der durchflußzytometrischen Analyse zu minimieren.

Historisch wurde zuerst die Dichtegradientenisolierung mit anschließender Färbung eingesetzt. Vorteile dieses Vorgehens sind die Anreicherung der Blastenpopulation und eine Abreicherung avitaler Zellen; Nachteile sind der Zellverlust und die Abreicherung granulocytyärer oder erythropoetischer Zellen im Vergleich zur Vollblutmethode. Bei geringen Probenmengen (z.B. bei Kindern) hat die Vollblutmethode aufgrund ihres geringen Zellverlustes einen wesentlichen Vorteil.

Die meisten Laboratorien, die auf dem Gebiet der Immunphänotypisierung und FCM-MRD Diagnostik von hämatologischen Neoplasien arbeiten, setzen für die Oberflächenmarkierung die Vollblutlyse Methode ein. Neben dem geringeren Volumenbedarf ist der geringere Zeitaufwand von Vorteil. Nachteil bei der Verarbeitung von größeren Probenvolumina, insbesondere bei Knochenmark-aspiraten, kann die unvollständige Lyse von erythropoetischen Vorläuferzellen sein.

Die verschiedenen Lyseverfahren können zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, was z.B. den prozentualen Anteil von Blasten oder die Expressionsdichte bestimmter Antigene betrifft. Außerdem variieren die kommerziell erhältlichen Lysereagenzien in ihrer Zusammensetzung je nach Hersteller erheblich und können somit auch zu unterschiedlichen Ergebnissen beitragen. Daneben werden die hypotone Lyse oder die auf Ammoniumchlorid basierende Lyse verwendet, die mit dem Nachteil schlechter Streulichtergebnisse bzw. Probenstabilität behaftet sind. Die Proben, für die FCM-MRD Untersuchungen im Rahmen der AIEOP-BFM ALL 2000 Studie wurden in allen Laboren mittels eines einheitlichen Lyse-Verfahren aufgearbeitet. In dem Vergleich zwischen beiden Verfahren zeigt sich in drei unabhängigen Verdünnungsversuchen von Leukämiezellen in „buffy-coats“ eine hohe Konkordanz mit einem mittleren Korrelationskoeffizienten von 0.97 (s. Abb. 6).

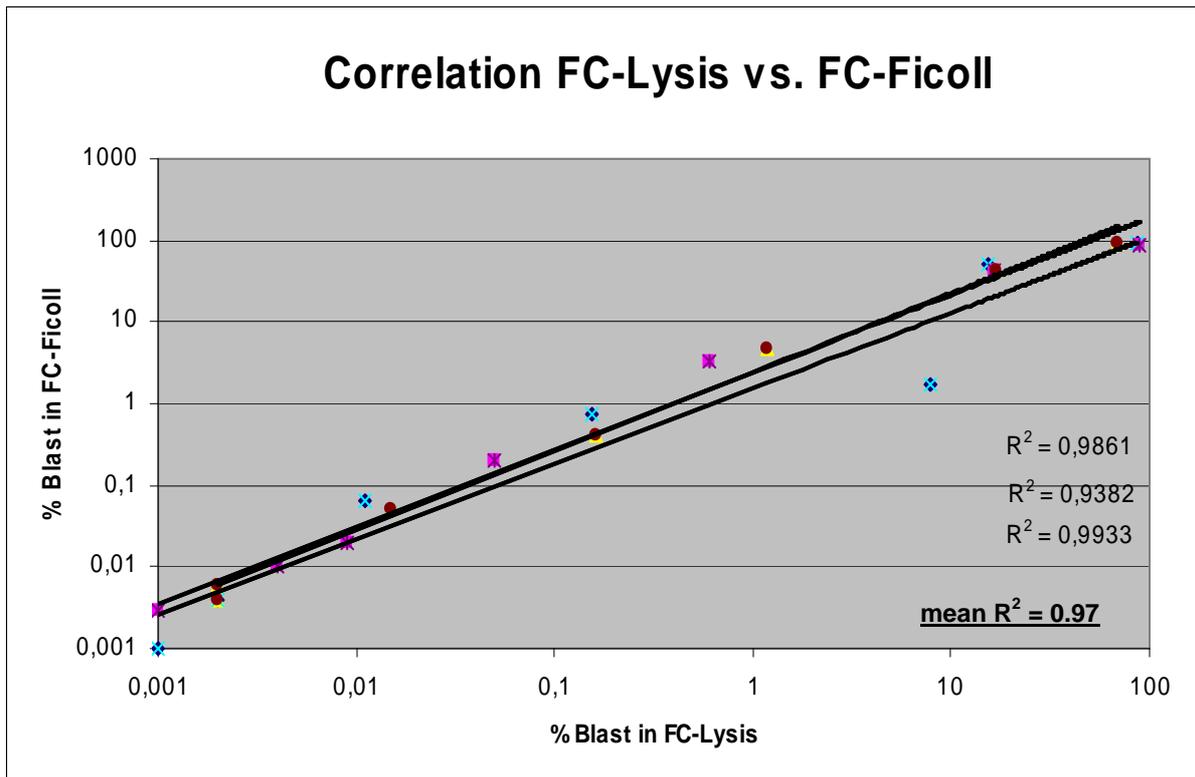


Abbildung 6

Korrelation des quantitativen Nachweises von leukämischen Blasten nach Aufbereitung der Proben mittel Dichtegradientenzentrifugation oder Vollblutlyse – Verfahren. Dargestellt sind die Korrelationen der Verdünnungsreihen 0.001 – 100% von leukämischen Blasten in „buffy-coats“ von normalen Blutspendern. Der mittlere Korrelationskoeffizient aller drei Verdünnungsversuche beträgt 0.97.

3.3 Klinische Ergebnisse des MRD Nachweises mittels FCM

3.3.1 Beurteilung der Blastenreduktion in-vivo

Überwachung der Therapieantwort mit FCM-MRD bei Kindern mit akuter Vorläufer B-Zell Leukämie, die im Rahmen des AIEOP-BFM-ALL 2000 Protokolls behandelt werden: Prädiktiver Einfluß der frühen Blastenreduktion auf den Remissionsstatus nach Induktion.

Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction.

Ratei, R., G. Basso, M. Dworzak, G. Gaipa, M. Veltroni, P. Rhein, A. Biondi, M. Schrappe, W.D. Ludwig, and L. Karawajew.

Leukemia 23:528-534, 2009.

Zusammenfassung:

Das Ansprechen auf die Therapie ist eines der wichtigsten Kriterien für die Prognose der Erkrankung. In dieser Arbeit wurde der prädiktive Einfluß der durchflußzytometrischen Quantifizierung von Blasten als absoluter Wert und als Reduktionsrate an den frühen Therapiezeitpunkten im Blut und Knochenmark (Tag 0, Tag 8 und Tag 15) auf den Remissionsstatus nach Induktion am Tag 33 des AIEOP-BFM-ALL 2000 Protokolls untersucht. Den stärksten prädiktiven Effekt für das Erreichen einer nach FCM-MRD Kriterien (negativ/positiv) kompletten Remission nach der Induktion hatte der absolute Blastengehalt am Tag 15 im Knochenmark. Bei weniger als 17 Blasten/ μ l am Tag 15 im KM erreichten 50% der Patienten eine FCM-MRD negative Remission an Tag 33, während es bei mehr als 17 Blasten/ μ l nur 15% waren (Odds ratio 5.6, 95% Konfidenzintervall: 4.1-7.6, $p < 0.001$). Für die Blastenreduktionsrate an Tag 15 und die absolute Blastenzahl an Tag 8 lag die Odds ratio bei 3.8 und 2.6. In der multiplen Regressionsanalyse von 440 Patienten, waren die absoluten Blastenzahlen im peripheren Blut an Tag 0 und 8 und an Tag 15 im Knochenmark, sowie die Blastenreduktionsrate an Tag im pB die Variablen die mit einer Gesamt Prediktionsrate von 74.8% signifikant zur Vorhersage des Remissionsstatus and Tag 33 im Knochenmark beitragen. Insgesamt zeigen diese multizentrischen Untersuchungen, dass die frühe durchflußzytometrische quantitative Beurteilung der Blastenreduktion im pB und KM einen Einfluß auf die Vorhersage des Remissionsstatus nach der Induktionstherapie haben.

3.2 Algorithmen der FCM-MRD Risikostratifizierung

Die prognostische Relevanz der MRD-Detektion bei der ALL ist unbestritten und mehrfach für die molekularbiologischen und durchflußzytometrischen Nachweismethoden bei Kindern und erwachsenen in verschiedenen klinischen Therapieprotokollen gezeigt worden⁵³⁻⁵⁸. Für die molekularbiologische MRD-Risikostratifizierung in die drei Risikogruppen, Hoch-, Intermediär und Niedrigrisiko, haben sich im AIEOP-BFM ALL 1995 und 2000 Protokoll die Zeitpunkte nach Beendigung der Induktionsphase 1 (Tag 33) und Induktionsphase 2 (Tag 78) als entscheidend erwiesen.

Die FCM-MRD Untersuchungen wurden im AIEOP-BFM ALL 2000 Protokoll auch an diesen Tagen, zusätzlich aber noch an früheren Zeitpunkten, wie z.B. Tag 15 und Tag 8 durchgeführt. Um zu überprüfen, welche Therapiezeitpunkte und welche MRD-Level von größter klinischer und prognostischer Bedeutung sind, wurden drei Risiko-Algorithmen hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz untersucht.

1) Im Risikoalgorithmus 1 wurde die *absolute* Anzahl residualer Blasten im KM bewertet. Nach dem Risiko-Algorithmus 1 sind Patienten die ≤ 10 Blasten/ μ l an Tag 15 im KM haben und die im weiteren Therapieverlauf MRD negativ bleiben, als Niedrigrisiko Patienten zu betrachten. Patienten die am Tag 78 einen positiven MRD Nachweis haben sind als Hochrisiko Patienten einzustufen und alle anderen Patienten werden der intermediären Risikostufe zugeordnet.

2) Im Risiko-Algorithmus 2 wurde nur der *Prozentsatz an residualen Blasten* zum Therapiezeitpunkt Tag 15 im KM betrachtet und die folgenden Risikogruppen gebildet. Niedrigrisiko: $\leq 0.1\%$ Blasten. Intermediäres Risiko: $\leq 1\% > 0.1\%$ Blasten. Hochrisiko: $\leq 10\% > 1.0\%$ und sehr Hochrisiko: $> 10\%$ Blasten.

3) Bei dem dritten Risikoalgorithmus wurde wie beim 1. Risikoalgorithmus Tag 15 und Tag 78 einbezogen, aber diesmal nicht die *absolute* Blastenzahl/ μ l, sondern die *relative* Blastenzahl, gemessen an den kernhaltigen Zellen, bewertet. Niedrigrisiko: $\leq 0.1\%$, danach negativ. Hochrisiko: Jede MRD-Positivität an Tag 78. Intermediäres Risiko: Alle Patienten die nicht Niedrig- oder Hochrisiko sind.

Es zeigte sich, dass die Durchflußzytometrie an den Tagen 33 und 78 gegenüber der Molekularbiologie Nachteile hinsichtlich Sensitivität und Spezifität aufweist, die auch mit der technischen Weiterentwicklung und Verbesserung der Durchflußzytometrie nicht mit den Ergebnissen der PCR als gleichwertig zu betrachten sind. Der Tag 15 hingegen stellt für die durchflußzytometrische Quantifizierung der Restblasten einen

optimalen Zeitpunkt dar (s. Risiko-Algorithmus 2), der für die Risiko- und Therapiestratifizierung zusätzlich, oder bei nicht Verfügbarkeit der molekularbiologischen MRD-Detektion auch als alleiniges Stratifizierungskriterium eingesetzt werden kann.

3.3.3 FCM-MRD Risikostratifizierung im klinischen Kontext

Prädiktion des Rezidiv-Risikos bei der ALL im Kindesalter durch die durchflußzytometrische Messung residueller Blasten an Tag 15 im Knochenmark.

Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow.

Basso, G., M. Veltroni, M.G. Valsecchi, M.N. Dworzak, **R. Ratei**, D. Silvestri, A. Benetello, B. Buldini, O. Maglia, G. Maserà, V. Conter, M. Arico, A. Biondi, and G. Gaipa.

J Clin Oncol 27:5168-5174, 2009

Zusammenfassung:

Die Dynamik der Blastenreduktion ist ein Indikator für das Ergebnis der Therapie bei der kindlichen ALL und die Verfügbarkeit einer kostengünstigen Bestimmungsmethode von MRD ist von klinischer Bedeutung. Im AIEOP-BFM-ALL 2000 Protokoll wurden die Patienten mittels PCR-MRD an den Tagen 33 und 78 anhand des PCR-MRD Levels stratifiziert. Außerdem wurde der prognostische Einfluss von FCM-MRD an Tag 15 im Knochenmark untersucht. Bei 830 Patienten wurde am Tag 15 der Therapie, nach 14 Tagen Steroidbehandlung, einer Gabe von intrathekalem MTX, sowie Gabe von Vincristin, Daunorubicin und Asparaginase intravenös, mittels Vierfarb-Durchflußzytometrie die MRD-Last im KM quantifiziert.

Drei Patientengruppen mit unterschiedlichen Rezidiv-Risiken konnten identifiziert werden. Die Standardgruppe mit einer relativen Blastenzahl von $< 0.1\%$ machte 42% aller Patienten aus. Eine MRD-Last von 0.1 bis $< 10\%$ fand sich bei 47% der Patienten mit intermediären Risiko und 11% der Patienten, die eine sehr hohe residuale Blastenzahl mit $> 10\%$ aufwiesen zeigten das höchste Rezidivrisiko. Die kumulative Inzidenz für das Rezidivrisiko (CIR) nach fünf Jahren betrug 7.5% für die Standardgruppe (SE, 1.5), für die Intermediäre Gruppe 17.5% (SE, 2.1) und die Hochrisikogruppe 47.2% (SE, 5.9). In der multivariaten Analyse für die an Tag 15 zur

Verfügung stehenden weiteren Risikofaktoren zeigte, dass die durchfluß-zytometrische Quantifizierung der Restblasten im KM der wichtigste prognostische Faktor für die Vorhersage eines Rezidivs ist, mit einem zweifach, bzw. fünffach erhöhten Risiko für Intermediär und Hochrisiko-Patienten im Vergleich zu Patienten mit <0.1% Blasten (Niedrigrisiko-Gruppe) .

Diese Arbeit zeigt, dass die Messung der FCM-MRD Last an Tag 15 im Knochenmark der wichtigste frühe Parameter für die Vorhersage eines Rezidivs ist, der bei nahezu allen Patienten bestimmt werden kann und PCR-MRD basierte Untersuchungen an späteren Therapiezeitpunkten komplementieren kann, um so eine zusätzliche Optimierung der Therapie zu ermöglichen.

3.4 Antigenmodulation leukämischer Blasten im Therapieverlauf

Die Veränderung der Antigen-Expression des leukämischen Zellklons kann Ausdruck einer klonalen Selektion eines schon bei Erstdiagnose bestehenden Subklons der Leukämie sein, oder als Modulation der Antigenexpression von leukämischen Zellen unter dem Selektionsdruck der Chemotherapie verstanden werden. Klinische Bedeutung erlangt die Antigenmodulation, weil diese phänotypisch nachweisbaren Veränderungen mit einer Resistenzentwicklung gegenüber der eingesetzten Chemotherapie einhergehen können, oder der leukämische Klon sich somit einem Nachweis mittels FCM-MRD entziehen kann. Wir haben deshalb das Verhalten mehrerer, zur MRD-Detektion benutzten Antigene, wie z.B., CD58, CD10, CD20, CD34, aber auch CD11b bezüglich ihres Verhaltens während der Therapie im Rahmen des AIEOP-BFM ALL 2000 Protokolls untersucht. Die folgenden Publikationen fassen diese Arbeiten zusammen und liefern eine Grundlage für die sichere Beurteilung der Veränderung von MRD-relevanten Antigenen im Therapieverlauf. Darüber hinaus ergeben sich aus diesen Untersuchungen auch Spekulationen über die biologischen Reaktionen von Leukämien unter dem Selektionsdruck einer Chemotherapie.

3.4.1 Vergleich leukämischer Blasten mit normalen B-Zellen

Expression von CD58 bei normalen, regenerierenden und leukämischen B-Zellen des Knochenmarks: Implikationen für den Nachweis von MRD bei ALL

Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia.

Veltroni, M., L. De Zen, M.C. Sanzari, O. Maglia, M.N. Dworzak, **R. Ratei**, A. Biondi, G. Basso, and G. Gaipa.

Haematologica 88:1245-1252, 2003.

Zusammenfassung:

CD58 ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und wird von hämatopoetischen und nicht - hämatopoetischen Zellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass CD58 bei Vorläufer B - Zell Leukämien im Vergleich zu normalen B-Zellen verstärkt exprimiert ist und deshalb potentiell für die MRD-Detektion residueller Blasten bei B-ALL einzusetzen ist. In der vorliegenden Studie wurde die Anwendbarkeit und Verlässlichkeit von CD58 für die MRD-Detektion mittels FCM untersucht. Es wurden 180 Knochenmarkproben von Patienten mit B-ALL bei Erstdiagnose (8 pro - B, 164 frühe B- und 8 reife - B ALL) und 123 Verlaufsproben, 54 an Tag 15 und 69 an Tag 78, sowie 51 normale Knochenmarkproben und 7 regenerierende Knochenmarkproben von Patienten mit T-ALL an Tag 78 bzw. Woche 12 des AIEOP-BFM-ALL 2000 Protokolls bezüglich der CD58 Expression mittels Vierfarb - FCM untersucht.

Es zeigte sich, dass die CD58 Expression bei ALL Blasten deutlich höher war als bei normalen B-Lymphozyten und zwischen regenerierenden B-Zellen und normalen B-Lymphozyten kein Unterschied bestand. Bei 99.4% aller Vorläufer B - Zell Leukämien fand sich eine CD58-Expression, die bei 93.5% aller Fälle im Vergleich zu normalen oder regenerierenden B-Zellen deutlich verstärkt war. Eine signifikante Modulation der CD58 Expression während der Induktions - Chemotherapie wurde nicht beobachtet. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass CD58 ein stabiler Marker für die FCM-MRD Detektion an klinisch relevanten Therapiezeitpunkten ist und keiner wesentlichen Modulation unterliegt.

Therapie-induzierte Modulation des Immunphänotyps bei kindlicher ALL: Implikationen für den Nachweis von MRD

Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection

Gaipa, G., G. Basso, O. Maglia, V. Leoni, A. Faini, G. Cazzaniga, C. Bugarin, M. Veltroni, B. Michelotto, **R. Ratei**, T. Coliva, M.G. Valsecchi, A. Biondi, and M.N. Dworzak.

Leukemia 19:49-56, 2005

Zusammenfassung:

Die Beurteilung von FCM-MRD beruht auf dem Nachweis des LAIP bei Erstdiagnose und im Krankheitsverlauf. Obwohl der LAIP bei der ALL relativ stabil nachweisbar ist, kann es während der Behandlung doch zu Veränderungen der Antigenexpression kommen. In dieser Arbeit wurden 30 Kinder mit akuter Vorläufer B-Zell Leukämie hinsichtlich der quantitativen Expression von sieben Antigenen bei Diagnose und zu verschiedenen Zeitpunkten der Induktionsbehandlung untersucht, die für die FCM-MRD Diagnostik eingesetzt werden. Eine Abnahme der Antigenexpression fand sich für CD10 und CD34 im Therapieverlauf, während CD19, CD20, CD45RA und CD11a verstärkt exprimiert wurden. Die Expression von CD58 wurde im Therapieverlauf nicht moduliert. Trotz dieser Veränderungen der Antigenexpression konnten die residualen leukämischen Zellen während der Behandlung anhand ihres LAIP eindeutig von normalen B-Zellen unterschieden und getrennt werden. Diese Ergebnisse beweisen, dass es während der Induktionstherapie im Rahmen des AIEOP-BFM-ALL 2000 Protokolls zu einer immunphänotypischen Antigenmodulation kommt. Der FCM-MRD Nachweis wird aber dadurch nicht beeinträchtigt, solange adäquate Analyseprotokolle eingesetzt werden und dem Untersucher dieses Phänomen bekannt ist.

Prednisolon induziert eine immunphänotypische Modulation von CD10 und CD34 bei non-apoptotischen Zellen von B-Vorläuferzell ALL

Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in nonapoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells.

Gaipa, G., G. Basso, S. Aliprandi, M. Migliavacca, C. Vallinoto, O. Maglia, A. Faini, M. Veltroni, D. Husak, A. Schumich, **R. Ratei**, A. Biondi, and M.N. Dworzak..
Cytometry B Clin Cytom 74:150-155, 2008

Zusammenfassung:

Durch die Überwachung der Therapie mittels FCM-MRD ist bekannt, dass die Modulation der Antigenexpression bei der kindlichen akuten Vorläufer B-Zell Leukämie durch die Gabe von Steroiden während der Induktionstherapie beeinflusst wird. Um dies auch in - vitro zu zeigen, wurden die bei Diagnose entnommenen KM-Proben auf mesenchymalen Knochenmark – Stroma - Zellen kultiviert. Die Zellen die in - vitro weiter mit Prednisolon behandelt wurden zeigten eine signifikante Reduktion der CD10 und CD34 Expression gegenüber Kontroll-Zellen, die ohne Prednisolon kultiviert wurden. Die in - vitro Abnahme der CD10 und CD34 Expression unter Steroid - Einfluss war bei den identischen Patienten mit der in - vivo Abnahme der CD34 und CD10 Expression im KM an Tag 15 der Behandlung, vergleichbar. Die Streulichteigenschaften und die Viabilität der Zellen veränderte sich unter dem Einfluss von Steroiden nicht. Insgesamt ließ sich somit zeigen, dass die in - vivo beobachtete Steroid - induzierte Antigenmodulation auch in - vitro reproduziert werden kann und mit einem Ansprechen auf die Chemotherapie einhergeht.

3.4.2 Differentielle Genexpression nach in-vivo Prednison Exposition

Nach Induktionstherapie persistierende Blasten bei kindlicher ALL zeigen eine Genexpression wie normale B-Zellen, verminderte Proliferation und eine bestimmte Expression von Oberflächenmarkern.

Gene expression shift towards normal B cells, decreased proliferative capacity and distinct surface receptors characterize leukemic blasts persisting during induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia.

Rhein, P., S. Scheid, **R. Ratei**, C. Hagemeier, K. Seeger, R. Kirschner-Schwabe, A. Moericke, M. Schrappe, R. Spang, W.D. Ludwig, and L. Karawajew.

Leukemia 21:897-905, 2007

Zusammenfassung:

Die Persistenz von leukämischen Blasten während der Behandlung ist bei der kindlichen akuten Vorläufer B - Zell Leukämie von entscheidender prognostischer Bedeutung. Da über die molekularen und zellbiologischen Veränderungen von nach einer Therapiewoche noch persistierenden Blasten wenig bekannt ist, haben wir das Genexpressionsprofil dieser Zellen bei Diagnose an Tag 0 und nach einer Woche Therapie an Tag8, bei 18 Patienten untersucht und ein Set von Genen identifiziert, dass differentiell exprimiert wird. Die Veränderungen an Tag 8 zeigen, dass die Genexpression sich der von reifen B-Zellen annähert, dass der Zellzyklus inhibiert wird und die Expression von Adhäsionsmolekülen, insbesondere von CD11b und von Zytokinen, wie z.B. CD119 verstärkt wird. Mit einem direkten Vergleich mit normalen B-Lymphozyten, die weitgehend Therapie resistent sind, bestätigte sich der Wechsel der Genexpression an Tag in Richtung der normalen B - Lymphozyten. Die durchflußzytometrischen Analysen an Tag 8 an einer unabhängigen Kohorte von Patienten zeigte ebenfalls eine Hochregulation von CD11b und CD119 auf persistierenden Blasten an Tag 8 der Therapie. Diese Verlagerung der Differenzierung und die Veränderung der Proliferation von residualen Blasten an Tag 8 der Therapie kann für die Persistenz der Leukämiezellen und ihre Empfindlichkeit gegenüber der weiteren Chemotherapie von Bedeutung sein. Außerdem kommen die Marker CD11b und CD119 für die Detektion von FCM-MRD in Frage und sollten diesbezüglich weiter untersucht werden.

3.4.3 Identifizierung neuer Oberflächenmarker

CD11b ist ein Marker für Therapie Resistenz und MRD bei akuten B - Vorläuferzell Leukämien

CD11b is a therapy resistance- and minimal residual disease-specific marker in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia

Rhein, P., R. Mitlohner, G. Basso, G. Gaipa, M.N. Dworzak, R. Kirschner-Schwabe, C. Hagemeyer, M. Stanulla, M. Schrappe, W.D. Ludwig, L. Karawajew, and **R. Ratei**. *Blood* 115:3763-3771, 2010

Zusammenfassung:

Ein wesentliches Merkmal der GEP - Veränderungen in persistierenden leukämischen Blasten bei akuten B-Vorläufer Zell Leukämien nach einer Woche Therapie, ist die konsistent erhöhte mRNA Expression des Adhäsionsrezeptors CD11b. Um die klinische Relevanz dieser Veränderung zu untersuchen, haben wir bei 159 Patienten bei Diagnose und bei 53 Patienten im Therapieverlauf die CD11b Protein-Expression mittels FCM analysiert und mit den Zytoreduktionsraten an klinisch bedeutenden Therapiezeitpunkten des AIEOP-BFM-ALL 2000 Protokolls korreliert. Bei Patienten mit CD11b Expression ist das Risiko am Tag 33 der Induktion noch mittels FCM-MRD nachweisbare residuale Leukämiezellen im KM zu haben gegenüber CD11b negativen Patienten fünffach erhöht. In der multivariaten Analyse zeigte sich CD11b als unabhängiger prognostischer Faktor im Vergleich zu anderen, klinisch relevanten Parametern bei Erstdiagnose. Unter Therapie steigt die Expression von CD11b bei den meisten Patienten meist in der frühen Behandlungsphase an und bleibt während der Induktions- und Konsolidierungstherapie konstant erhöht. Bei mehr als 30% der MRD-positiven Patienten ist die CD11b Expression auf den leukämischen Blasten deutlich stärker als auf normalen, reifen B-Zellen und kann somit dazu beitragen diese Zellen in der FCM-MRD Diagnostik besser voneinander zu unterscheiden. Somit hat die CD11b Expression erhebliche Bedeutung für die Prognose, das Therapieansprechen und den MRD-Nachweis mittels Durchflußzytometrie bei der kindlichen Vorläufer B - Zell Leukämie.

4.0 Diskussion und Ausblick

Bei der Behandlung von akuten Leukämien wird der Therapieerfolg nach der Induktionstherapie durch das Erreichen einer kompletten Remission und nach Vollendung der Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie durch das Ereignis-freie-Überleben (EFÜ) bestimmt. Die Remissionsbeurteilung und Quantifizierung der Restleukämiebelastung nach der Induktion ist bei der Einschätzung des Therapieerfolges und der Prognose von entscheidender Bedeutung und erfolgt heutzutage mit den folgenden Methoden, die sich hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität im qualitativen und quantitativen Nachweis von Restleukämie unterscheiden:

1. Die Zytomorphologie hat mit der Nachweismöglichkeit von einer Leukämiezelle in 100 normalen Zellen (10^{-2}) eine ähnliche Sensitivität wie die
2. zytogenetische Analyse von Metaphasen-Chromosomen oder die Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) von Interphase - und Metaphasekernen.
3. Die molekularbiologischen Analyseverfahren wie z.B. die Polymerase-Ketten-Reaktion, die qualitativ und quantitativ auf RNA- und DNA-Basis durchgeführt werden können, haben sich mit dem Nachweis von einer Leukämiezelle in 10^5 – 10^6 normalen Zellen als etwas sensitiver wie die
4. Durchflußzytometrie (ca. 10^{-4} - 10^{-5}) erwiesen.

Zytomorphologie und Durchflußzytometrie sind bei nahezu allen Leukämien zu jedem Zeitpunkt der Remissionskontrolle anzuwenden, wohingegen zytogenetische und molekulare Nachweismethoden bestimmte Zielstrukturen, wie z.B. chromosomale Aberrationen, oder Leukämie-spezifische Genumlagerungen von T-Zell- oder B-Zell-Rezeptorgenen voraussetzen. Die Remissionsbeurteilung und die daraus folgende prognostische Einschätzung und Therapiestratifizierung muss daher immer die Nachweismethode, und deren Sensitivität, aber auch die biologischen Voraussetzungen der Leukämie-Erkrankung, wie z.B. das Vorhandensein einer rekurrenten chromosomalen Aberration, berücksichtigen.

Die bei der ALL im Kindesalter eingesetzten Methoden zur Remissionsbeurteilung variieren je nach Therapieprotokoll und Studiengruppe. In den von der AIEOP-BFM-ALL Studiengruppe durchgeführten Therapieprotokollen wird neben der klassischen Morphologie, vor allem die Molekularbiologie mit der Amplifizierung und dem

quantitativen Nachweis von individuellen, Leukämie spezifischen IgH-Genumlagerungen angewandt⁵⁸, wohingegen in den US-amerikanischen pädiatrischen Studienprotokollen der POG und in St. Jude Hospital in Memphis vornehmliche die FCM-MRD Methode zur Anwendung kommt^{55,59}. Erst durch die vorliegenden Arbeiten unserer Studiengruppe wurde die FCM-MRD Methode neben der PCR-MRD integrativer Bestandteil des neuen AIEOP-BFM ALL 2009 Protokolls⁶⁰.

Die modernen Therapieprotokolle für die Behandlung von akuten Leukämien führen bei einem hohen Prozentsatz von Patienten zu einer klinischen und morphologischen kompletten Remission. Trotzdem erleiden aber viele dieser Patienten ein Rezidiv der Erkrankung, weil nicht alle Leukämiezellen durch die Chemotherapie eliminiert werden, sondern in geringer Menge als MRD persistieren. Die klinische und morphologische Analyse der Remission ist daher für die Beurteilung der Wirksamkeit der Therapie nur von begrenzter Aussagekraft, da nur die Patienten sicher erkannt werden können, die mehr als 10^{-2} Restblasten aufweisen und damit keine komplette Remission erreicht haben. Die hohen Remissions- und Überlebensraten bei der kindlichen ALL im Rahmen der ALL-BFM Studien konnten in den letzten Jahren vor allem durch eine, an einer verbesserten und sensitiveren Remissionsbeurteilung als der Zytomorphologie adaptierten Therapiestratifizierung, erreicht werden^{57,61}. Die Risikostratifizierung beruht dabei nicht mehr nur auf der morphologischen Remissionsbeurteilung, wie z.B. der Prednison-Antwort am Tag 8 im peripheren Blut, sondern auch auf zytogenetischen und molekularen Parametern, die bereits bei Diagnose und im Erkrankungsverlauf erhoben werden können. Darüber hinaus stellt das Ansprechen der Erkrankung auf die initiale Chemotherapie bereits in den ersten Behandlungswochen die Basis für die Stratifizierung der Patienten in Risikogruppen dar^{53,57,61,62}. Die morphologische Quantifizierung der Blastenzahl im peripheren Blut an Tag 8 oder an Tag 15 im Knochenmark stellen seit Jahren die wichtigsten frühen Parameter für den die Kontrolle des Therapieerfolges dar.

Erst in den letzten 10-15 Jahren wurde die Bedeutung der submikroskopischen Bestimmung und Quantifizierung von Restleukämie in der frühen Therapiephase im Blut und im KM untersucht. So hat sich gezeigt, dass die MRD-Level an Tag 33 und Tag 78 der Therapie im Rahmen des AIEOP-BFM ALL 2000 Protokolls eine, von den bisher etablierten Risikofaktoren wie z.B. Alter und Leukozytenzahl, unabhängige prognostische Bedeutung haben⁵⁸. Aber auch bei der ALL des Erwachsenen konnte

gezeigt werden, dass durch Beurteilung der Therapieantwort mittels molekularer Methoden prognostisch relevante Subgruppen stratifiziert werden können⁶³. Seitdem ist die molekulare Detektion von MRD bei der ALL sehr gut standardisiert und als fester Bestandteil in der Therapieüberwachung und Remissionsbeurteilung im AIEOP-BFM-ALL 2000 Protokoll integriert⁶⁴. Im Gegensatz dazu, ist der durchflußzytometrische Nachweis von MRD weniger standardisiert und bislang nur unizentrisch eingesetzt worden^{59,65}, obwohl er methodisch einfacher, schneller, kostengünstiger und bei nahezu allen Patienten einsetzbar ist.

Aufgrund dieser Eigenschaften wäre die durchflußzytometrische Quantifizierung von Restleukämie bei entsprechender Standardisierung und Qualitätssicherung die am besten geeignete Methode das Therapieansprechen in den frühen Phasen der Induktionsbehandlung zu überwachen und könnte so als Grundlage für eine Intensivierung oder De-Eskalation der Therapie dienen. Voraussetzung ist aber nicht nur die Standardisierung und die Qualitätskontrolle der Methode, sondern auch ein Vergleich mit der bestehenden molekularen MRD-Bestimmung. Die meisten Studien zur Durchführbarkeit der FCM-MRD Methode wurden unizentrisch durchgeführt und mussten nicht den Herausforderungen einer multizentrischen Standardisierung, wie sie in der AIEOP-BFM-ALL Studiengruppe vorliegen, gerecht werden. Die Schwierigkeiten einer multizentrischen Standardisierung aller Analyseschritte zeigt sich schon bei der Probenentnahme, Probentransport und der Lagerung. Die exakte Quantifizierung von MRD im Knochenmarkaspirat kann z.B. davon abhängen ob die erste, noch nicht durch pB verdünnte Probe zur FCM-MRD Analyse gelangt, oder erst die zweite, dritte oder vierte, durch pB verdünnte Aspiration. Bei der Aufarbeitung der Probe im Labor kommt es bei der Dichtegradientenzentrifugation im Vergleich zur Vollblutlyse eher zu einer Anreicherung von mononukleären Zellen, so dass der Anteil von MRD-Blasten hier höher ausfallen kann als bei der Vollblutlyse. Diese Unterschiede konnten anhand der vergleichenden Analyse von Verdünnungsreihen nach Aufbereitung mit beiden Methoden aufgezeigt werden, sind aber bei der logarithmischen Bewertungsskala der MRD-Last nicht von entscheidender Bedeutung.

Eine Standardisierung des eigentlichen Analyseverfahrens würde bedeuten, dass einheitliche Durchflußzytometer, Antikörper-Klone und Fluorochrom-Konjugate von allen beteiligten Laboren verwendet werden müssten, was aufgrund der bestehenden

Diversifizierung der Geräte, monoklonalen Antikörper, Fluorochrome, den ökonomischen Zwängen und den rasanten technischen und biologischen Entwicklungen bei der Herstellung von Geräten und Antikörpern nicht möglich ist. Außerdem haben vergleichende Untersuchungen mit Messungen von einheitlich präparierten und gefärbten Proben an baugleichen Geräten gezeigt, das es auch bei größtmöglicher Übereinstimmung der Analysemethoden zu Messunterschieden kommen kann. Eine weitgehende Übereinstimmung konnte aber für die zu untersuchenden Antigene und die hierfür einzusetzenden mAk und Fluorochrom-Konjugate erreicht werden. Somit konnte in Ringversuchen von Patientenproben, aber auch mit präparierten Verdünnungen von Leukämiezellen in normalem KM eine hohe Übereinstimmung zwischen den Laboren erreicht werden, obwohl unterschiedliche Durchflußzytometer, z.T. auch unterschiedliche Fluorochrom-Konjugate und auch unterschiedliche Analyse-Software, zur Anwendung kamen. Möglich ist dies, weil trotz der unterschiedlichen Geräte verschiedener Hersteller bei entsprechender Instrumenteneinstellung und Kompensation ein gemeinsames Analysefenster in der durchflußzytometrischen Datenmatrix definiert und auf jedem Gerät entsprechend eingerichtet werden kann. Zur Einrichtung und Kontrolle dieses Analysefensters können die auch in jeder leukämischen Probe noch vorhandenen normalen Lymphozyten oder auch in ihrer Größe und Fluoreszenz standardisierte Latexpartikel als Referenzpopulation dienen. Die zu erwartende MRD-Population kann so in Bezug zu den bekannten Lymphozyten oder Kontrollpartikeln gebracht werden und sicher und zuverlässig nachgewiesen werden.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Integration der FCM-MRD Untersuchungen in das neue AIEOP-BFM-ALL 2009 Studienprotokoll war neben der Standardisierung und Kontrolle des Verfahrens die Vergleichbarkeit der durchflußzytometrischen mit der molekularbiologischen MRD-Bestimmung. In den publizierten Arbeiten zur Vergleichbarkeit beider Methoden aus den unizentrischen Arbeitsgruppen, waren hohe Übereinstimmungen mit Konkordanzraten von 95% erreicht worden^{66,67}. Diese hohen Konkordanzen ließen sich in dem multizentrischen Vorgehen im Rahmen der AIEOP-BFM ALL 2000 Studie nicht erzielen und führten nach anfänglicher Verunsicherung zu einem genauen Vergleich der beiden Methoden.

Neben den methodisch bedingten Differenzen zwischen durchflußzytometrischem und molekularbiologischem MRD-Nachweis, müssen auch logistische und

mathematische Determinanten berücksichtigt werden. Bei der molekularen MRD-Detektion werden die auf DNA – Ebene bestehenden Leukämie-spezifischen, individuellen Genumlagerungen der Immunglobulin-Schwerketten Gene (IgH-Gene) des B - Zell Rezeptorkomplexes sequenziert^{58,64}. Die entsprechend dieser Sequenzen erstellten Primer werden in einer quantitativen PCR für die Amplifikation von ggf. vorhandener Restleukämie – DNA eingesetzt. Die bei Diagnose erstellten Primer werden in einer Verdünnungsreihe der Leukämiezellen auf ihre Sensitivität getestet, die oftmals bei 10^{-5} - 10^{-6} liegt und somit eine Leukämiezelle in 100.000 bis 1.000 000 normalen Zellen nachweisen kann. Die im Krankheitsverlauf gewonnenen Proben werden mit den bei Diagnose hergestellten Primern mittels quantitativer PCR untersucht und die entstandenen Signale (Bande in der Gel - Elektrophorese oder die Amplifikationskurve) mit der initialen Verdünnungskurve verglichen und die MRD-Last entsprechend der initialen Verdünnungsreihe bewertet.

Bei der durchflußzytometrischen MRD-Bestimmung wird bei Erstdiagnose der Erkrankung der LAIP definiert und dient im weiteren Verlauf als Orientierung für die Bewertung der MRD Untersuchungen. Eine initiale Verdünnungsreihe der Leukämiezellen zur Untersuchung der Sensitivität des LAIP wird nicht durchgeführt und das MRD-Niveau wird auch nicht anhand des Vergleiches mit einer initialen Verdünnungsreihe, sondern als Prozentsatz der Leukämiezellen an allen kernhaltigen Zellen in der Probe, zum jeweiligen Zeitpunkt der Therapiekontrolle, angegeben. Ein weiterer Methoden-inhärenter Unterschied besteht darin, dass bei der molekularen MRD-Bestimmung auch Leukämie-spezifische IgH-Gensequenzen aus apoptotischen Zellen oder aus in der Probe befindlichen Debris amplifiziert werden kann und ein positives MRD-Signal zeigen können, obwohl gar keine vitalen Leukämiezellen mehr in der Probe existieren. Bei der FCM-MRD Methode hingegen werden apoptotische Zellen und Zelldebris mittels DNA-Färbungen von der Auswertung ausgeschlossen.

Ein nicht zu vernachlässigender logistischer, prä-analytischer Unterschied zwischen unizentrischer und multizentrischer Untersuchung von MRD mittels PCR und FCM besteht darin, dass in der multizentrischen Struktur der AIEOP-BFM-ALL 2000 Studie die Proben für das FCM- und PCR-Labor bereits am Patienten aliquotiert werden und oftmals Unterschiede in der Zellularität und der Zusammensetzung der Aliquots bestehen. Beim Versand von nur einer Probe in ein unizentrisches Labor, in dem diese Probe zwischen FCM und PCR aufgeteilt wird, entstehen weniger

Inhomogenitäten und die Wahrscheinlichkeit einer guten Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden ist wahrscheinlicher. In Versuchen mit Verdünnungsreihen von Leukämiezellen in normalem KM oder peripherem Blut wurden homogene Aliquots der einzelnen Verdünnungsstufen mittels PCR und FCM untersucht. In den einzelnen Laboren der AIEOP-BFM-ALL 2000 Studie konnten so ebenfalls hohe Konkordanzen zwischen beiden Methoden erzielt werden.

Unabhängig von den Methoden-inhärenten Unterschieden beider Nachweisverfahren, müssen grundsätzliche Modelle der mathematischen Verteilungslehre, insbesondere der Gaußschen Normalverteilung und der Poisson Verteilung, bedacht werden. Im Gegensatz zur Gaußschen Normalverteilung, die eine Wahrscheinlichkeitsdichte für häufig auftretende Ereignisse beschreibt, liefert die Poisson Verteilung Voraussagen über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von seltenen Ereignissen. Betrachtet man die Mengenverhältnisse von Restleukämiezellen zu allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen im Gesamtkörper, so entspricht dies durchaus der „Nadel im Heuhaufen“ und dem Auftreten seltener Ereignisse. Bei einer Restleukämiekonzentration von einer Leukämiezelle in 10^6 normalen kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes in einem durchschnittlich 70kg schweren Menschen mit einer Blutmenge von etwa vier bis fünf Litern Blut und einer Leukozytenzahl von 10 Gpt/l entspricht dies etwa einer Restleukämiezellmasse von 40 - 50.000 Leukämiezellen im Gesamtblutvolumen. Unter der nicht sehr wahrscheinlichen Annahme einer idealen homogenen Verteilung der Leukämiezellen im KM und im pB müssten sich in einer 10ml Blut- oder Knochenmarkprobe ca. 100 Leukämiezellen befinden. Aufgrund der mathematischen Gesetzmäßigkeiten, die eine ideale normale Verteilung seltener Ereignisse ausschließt und den biologischen Gegebenheiten, die die Verteilung von Zellen in den unterschiedlichen Kompartimenten Blut und Knochenmark bestimmen, ist es möglich, dass in einer Blut- oder KM - Probe, trotz der hohen Sensitivität der Methode und trotz des Vorhandenseins von Restleukämie im Gesamtorganismus, keine Leukämiezellen enthalten sind. Diesem Entnahme- und Verteilungsfehler muss bei der Beurteilung der MRD-Nachweismethoden im Einzelnen, aber auch beim Vergleich beider Methoden, Rechnung getragen werden. Erst wenn der gesamte „Heuhaufen“ dem MRD Nachweisverfahren unterzogen wird, kann man mit letzter Sicherheit die Nadel finden oder das Vorhandensein der Nadel ausschließen.

Dass diese Betrachtungen durchaus eine klinische Relevanz besitzen, zeigen Untersuchungen bei Kindern mit ALL, die ein Spätrezidiv der Erkrankung erlitten haben. Bei diesen Rezidiven, z.T. bis zu 10 Jahren nach Ersterkrankung, war die Leukämie molekular identisch mit der Ersterkrankung, obwohl die Patienten nach der ersten Erkrankung auch mit hochsensitiven Nachweismethoden keinerlei MRD-Nachweis hatten⁶⁸.

Angesichts dieser, durch die Nachweismethoden bedingten Unterschiede und den grundsätzlichen biologischen und mathematischen Begrenzungen der Detektion von seltenen Ereignissen in biologischen Systemen, lässt sich konstatieren, dass zwar mit beiden Methoden des MRD-Nachweises ähnliche Risikostratifikationen vorgenommen werden können, dass die Patientenpopulationen aber nicht vollständig identisch sind. In Kenntnis dieser Unterschiede lassen sich, unter Abwägung der jeweiligen Vor- und Nachteile beide Methoden, beide Verfahren in unterschiedlichen Therapiephasen vorteilhaft für die Therapieplanung und den Patienten einbringen. Trotz der unterschiedlichen MRD-Nachweismethoden, der verschiedenen Therapieprotokolle bei Kindern und Erwachsenen und den nationalen Unterschieden, hat man für die europäischen Therapieprotokolle bei der ALL eine gemeinsame Terminologie bei der MRD-Beurteilung definiert: „Complete MRD response“, „MRD persistence“ und „MRD reappearance“ sind einheitlich definierte Begriffe, die eine standardisierte Bewertung des Therapieansprechens bei Kindern und Erwachsenen unabhängig vom jeweiligen Therapieprotokoll ermöglichen⁶⁹

Mit der Durchflußzytometrie lässt sich die Blastenreduktion in der frühen Induktionsphase viel sensitiver und spezifischer als mit der mikroskopischen Zytomorphologie und viel schneller und einfacher als mit der PCR-MRD erfassen, so dass schon in der Frühphase der Behandlung Therapieänderungen vorgenommen werden können. Die Untersuchungen der frühen Parameter zur Erkennung der Blastenreduktion und des Remissionsstatus nach der ersten Induktionsphase (Tag 33) haben gezeigt, dass der Blastengehalt im KM am Tag 15 der Therapie am besten mit dem Therapieerfolg an Tag 33 korreliert. Der prognostische Einfluss des Blastengehaltes im KM am Tag 15 besteht aber nicht nur für den Therapieerfolg an Tag 33, sondern auch als unabhängiger prognostischer Faktor für das Ereignis-freie-Überleben. So lassen sich anhand des Blastengehaltes im KM an Tag 15 bezüglich des Ereignis - freien Überlebens drei Risikogruppen unterscheiden: 1) Die Niedrig-Risiko Gruppe mit einer Blastenkonzentration von <0.1% aller kernhaltigen Zellen und einem EFÜ nach 5

Jahren von 89.8%, 2) die Gruppe mit intermediärem Risiko, die einen Blastengehalt von $\geq 0.1 - 10\%$ aller kernhaltigen Zellen und ein 5-Jahres EFÜ von 79.3% zeigt und die 3) Hochrisiko-Gruppe mit einem Blastengehalt von $\geq 10\%$ und einem 5-Jahres EFÜ von nur 46.1%⁷⁰. Die FCM-MRD Untersuchungen von Coustan-Smith et al. aus dem St. Jude Kinderkrankenhaus in Memphis haben gezeigt, dass von 248 untersuchten Kindern an Tag 19 der Therapie 46% FCM-MRD negativ waren ($< 0.01\%$) und sich zwei Risikogruppen ähnlicher Größe anhand der FCM-MRD Quantifizierung der Restblasten unterschieden ließen⁵⁹. Erst kürzlich konnte auch die Children's Oncology Group in einer umfangreichen Studie an mehr als 2000 Kindern mit ALL zeigen, dass die Quantifizierung von Restleukämie mittels FCM-MRD zu frühen Therapiezeitpunkten eine gute Risikostratifizierung ermöglicht und insbesondere Patienten mit MRD-Negativität an frühen Zeitpunkten eine besonders gute Prognose aufwiesen⁵⁵.

Die Risikostratifizierung anhand der Quantifizierung des Blastengehaltes an einem entscheidenden Therapiezeitpunkt, der je nach Therapieprotokoll variieren kann, hat sich gegenüber den anfänglichen Risiko-Algorithmen mit Berechnung verschiedener Schwellenwerte an verschiedenen Therapiezeitpunkten als klinisch aussagekräftiger erwiesen. Ähnlich wie bei der molekularen MRD-basierten Risikostratifizierung, bei der die MRD-Level an Tag 33 und Tag 78 berücksichtigt werden, hat man versucht diese beiden Zeitpunkte auch bei der FCM-MRD Risikostratifizierung einzusetzen. Da die FCM-MRD Methode aber an beiden Zeitpunkten gegenüber der PCR-Methode Sensitivitäts- und Spezifitätsnachteile hat, erwiesen sich diese, auf zwei Zeitpunkten beruhenden Algorithmen als klinisch nicht ausreichend zuverlässig.

Der Blastengehalt im KM am Tag 15 hingegen hat sich als optimaler Zeitpunkt für die FCM-MRD Quantifizierung im Rahmen des AIEOP-BFM-ALL 2000 Protokolls erwiesen und kann zudem eine klinisch relevante und prognostische Aussage hinsichtlich des Überlebens liefern. Dies hat dazu geführt, dass dieser Risikoparameter in die Algorithmen zur Risikostratifizierung im neuen AIEOP-BFM ALL 2009 Protokoll integriert wurde⁶⁰.

Die Identifizierung leukämischer Blasten mittels FCM vor dem Hintergrund einer normalen oder reaktiv-regenerierenden Hämatopoese nach Chemotherapie ist nur möglich durch die Expression des LAIP auf den leukämischen Restblasten. Im Gegensatz zur normalen oder regenerierenden Hämatopoese zeigen leukämische Blasten eine Über- oder Unterexpression von linienspezifischen Antigenen, eine

Koexpression von myeloischen, oder eine asynchrone Expression von Merkmalen unreifer und reifere Entwicklungsstufen der jeweiligen B- oder T-Zell Ontogenese. Die Identifizierung und Charakterisierung der LAIP-Merkmale bei Diagnose und im Therapieverlauf ist entscheidend für die Identifizierung und Quantifizierung von FCM-MRD, aber auch für den Einsatz zielgerichteter Therapien, wie z.B. des anti-CD20 Antikörpers Rituximab⁷¹.

So konnte gezeigt werden, dass es Antigene wie z.B. CD58^{72,73} und CD11b⁷⁴ gibt, die bei der Erstdiagnose im Vergleich zu normalen B-Zellen auf den leukämischen Blasten der Vorläufer B - Zell Leukämien verstärkt exprimiert sind und im Therapieverlauf nicht moduliert werden, wohingegen andere Merkmale, wie z.B. CD19, CD20, CD45RA und CD11a , aber auch CD10, TdT und CD34 sowohl vermindert als auch verstärkt exprimiert werden können^{75,76}. Die Modulationen der Antigenexpression lassen sich auch ex - vivo bei primären, auf mesenchymalen Stroma-Zellen kultivierten Leukämiezellen nachvollziehen und bestimmten Therapie-Elementen, wie z.B. der Verabreichung von Glukokortikosteroiden, zuordnen⁷⁶. Insbesondere die Expression von CD10 und CD34, aber auch von TdT wird durch den Einfluss der Glukokortikosteroide reduziert⁷⁷. Dies kann klinische Relevanz haben, da bei Unkenntnis dieser Modulation, eine Fehleinschätzung des Gehaltes an leukämischen Restblasten und eine falsche Zuordnung in eine Risikogruppe erfolgen kann. Die prognostische Bedeutung der Quantifizierung der Blastenreduktion nach einer acht-tägigen Vorphase mit Glukokortikosteroiden wurde von Riehm et al. bereits in den 80iger Jahren erkannt und beschrieben⁷⁸, aber die molekularen Mechanismen der GC-induzierten zellulären Veränderungen im klinischen Kontext der 8-tägigen GC-Vorphase sind bislang weitgehend unbekannt geblieben und erst in letzter Zeit untersucht worden^{79,80}. So haben die in-vitro Untersuchungen von Tissing W.J.E. et al. an kurzzeitig kultivierten und Steroid exponierten leukämischen Blasten von 13 Patienten mit ALL gezeigt, dass nach drei-stündiger Inkubation keine signifikante Änderung der transkriptionell regulierten Gene, die mit dem Affymetrix Genchip U133A analysiert werden, eingetreten war⁸⁰. Wohl aber fanden sich 51 differentiell exprimierte Gene nach acht-stündiger Inkubation und GC-Exposition⁸⁰. Funktionell konnten diese Gene drei Hauptgruppen zugeordnet werden:

- 1) Dem MAP-Kinase Signalweg,
- 2) dem NF- κ B Signalweg und
- 3) dem Kohlenhydrat Metabolismus.

In den von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen wurden die leukämischen Blasten von 18 Patienten bei Erstdiagnose und nach in-vivo Exposition mit der acht-tägigen Prednison-Vorphase des AIEOP-BFM ALL 2000 Protokolls intra- und inter-individuell mittels GEP, ebenfalls mit dem Affymetrix Genchip HG U133A, analysiert und verglichen⁷⁹. Hier zeigte sich, dass die am Tag 8 persistierenden Blasten einen Genexpressionswechsel vollziehen, der dem von reifen B - Lymphozyten entspricht und der mit einer Hemmung des Zellzyklus und einer deutlich verminderten Proliferation einhergeht. Außerdem konnte eine verstärkte Expression des zur α -Untereinheit der Integrin - Rezeptorfamilie gehörenden Adhäsionsmoleküls CD11b und dem Zytokinrezeptor IFN-GR1 (CD119) auf den persistierenden Blasten nachgewiesen werden. Diese mit einer verminderten Proliferationsaktivität einhergehenden Veränderungen der Genexpression sind funktionell mit einer verminderten Sensitivität der Zellen für die weitere Chemotherapie durchaus vereinbar und könnten die Selektion eines therapieresistenten Klons mit einer im weiteren Verlauf der Erkrankung persistierenden MRD erklären.

5.0 Zusammenfassung

Die prognostische Bedeutung des Nachweises von minimaler Resterkrankung im Krankheitsverlauf bei akuten lymphoblastischen Leukämien im Kindesalter und beim Erwachsenen ist in den letzten Jahren durch mehrere Studien belegt worden. Die Kinetik der Blastenreduktion in der Induktionstherapie hat sich als prognostisch relevant erwiesen und wird in vielen Therapieoptimierungsstudien als ein wesentlicher Parameter für eine risikoadaptierte Therapiestratifikation herangezogen. Derzeit stehen drei hochsensitive und spezifische Methoden für die Detektion von MRD zur Verfügung: Die multiparametrische Durchflußzytometrie (FCM), die Polymerase-Ketten-Reaktion von Fusionsgen Transkripten (RT-PCR) und die RQ-PCR von Leukämie spezifischen klonalen Immunglobulin- oder T-Zell Rezeptor Genumlagerungen.

In dieser Arbeit wird die Dynamik der Reduktion der Leukämiezellmasse und die Detektion von MRD mittels FCM bei der ALL im Kindesalter im Rahmen einer prospektiven Begleituntersuchung des ALL-BFM 2000 Therapieprotokolls untersucht. Erstmals konnte für die MRD-Detektion mittels FCM gezeigt werden, dass durch Standardisierungs- und Qualitätskontrollmaßnahmen in einer internationalen,

multizentrischen Studie, ein sehr hohes Maß an Übereinstimmung erreicht werden kann. Durch die kritische Analyse und den Vergleich der Sensitivität und Spezifität der FCM-MRD Detektion mit den molekularbiologischen MRD-Verfahren mittels RQ-PCR wurden die Grundlagen für die klinische Korrelation der FCM-MRD Ergebnisse geschaffen. So haben sich verschiedene Algorithmen der FCM-MRD Risikostratifizierung hinsichtlich Remissionsinduktion, Ereignis freiem Überleben (EFS) und Gesamtüberleben (OS) als klinisch relevant erwiesen. Darüber hinaus ließ sich mittels vergleichender Genexpressionsanalysen bei persistierenden Leukämiezellen eine verminderte Proliferationsaktivität und die Hochregulation bestimmter Oberflächenmerkmale feststellen. Diese Phänomene werden zum einen als mögliche Ursachen für eine Therapieresistenz diskutiert werden und ermöglichen zum anderen eine noch sensitivere und spezifischere Detektion von Leukämiezellen..

Damit zeigt diese Arbeit nicht nur die klinische Relevanz der FCM MRD-Detektion für die ALL im Kindesalter, sondern auch erstmals deren multizentrische Durchführbarkeit. Ausserdem ließen sich zellbiologische Ursachen für eine Therapieresistenz charakterisieren, die für eine weitere Identifikation persistierender leukämischer Zellen genutzt werden könnte.

Schlagwörter:

Durchflußzytometrie, Resterkrankung, akute lymphoblastische Leukämie, Risikostratifizierung, Therapieansprechen

Abstract

Recent studies have indicated a significant role for the detection of minimal residual disease in adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia. Blast reduction kinetics during induction therapy have proved to be of significant prognostic importance and are used for risk adapted therapy stratification in many studies. Today, three highly specific and sensitive methods are available for MRD detection: Multiparametric flow cytometry immunophenotyping (FCM), real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR)-based detection of fusion gene transcripts or breakpoints, and RQ-PCR-based detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements.

In this study FCM was applied to analyze blast reduction kinetics and MRD within the ALL-BFM 2000 study protocol for childhood ALL. It is shown for the first time, that a multicentric assessment of FCM-MRD is feasible due to stringent standardization and quality control measures. Furthermore, critical analysis and comparison of RQ-PCR techniques with FCM were performed to build the basis for the clinical correlation of FCM-MRD data. Several FCM-MRD based algorithms for risk stratification were tested and proved to have a significant impact on remission induction and overall survival. Besides, DNA microarray techniques were applied to evaluate genome-wide gene expression patterns in persisting blast cells of individual patients yielding results which point to a decreased proliferative capacity and increased expression of adhesion receptors. These features may account for their persistence during therapy and affect their sensitivity to further treatment.

Keywords

Multiparametric flow cytometry immunophenotyping, minimal residual disease, acute lymphoblastic leukemia, risk stratification

6.0 Literaturangaben

1. Morley A: Quantifying leukemia. *N Engl J Med* 339:627-9, 1998
2. Campana D, Coustan Smith E: Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 15:1-19, 2002
3. Pui CH, Relling MV, Campana D, et al: Childhood acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 6:161-80, 2002
4. Pui CH, Campana D, Evans WE: Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. *Lancet Oncol* 2:597-607, 2001
5. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VH, et al: Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2:409-17, 2001
6. Schrappe M: Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Indian J Pediatr* 70:817-24, 2003
7. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer Grumayer ER, et al: Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 352:1731-8, 1998
8. Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, et al: Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia* 14:1939-43, 2000
9. Coustan Smith E, Behm FG, Sanchez J, et al: Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 351:550-4, 1998
10. Borowitz MJ, Pullen DJ, Shuster JJ, et al: Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: relation to other risk factors. A Children's Oncology Group study. *Leukemia* 17:1566-72, 2003
11. Campana D, Coustan Smith E: Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 38:139-52, 1999
12. Dworzak MN: Immunological detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Onkologie* 24:442-8, 2001
13. Neale GA, Coustan Smith E, Pan Q, et al: Tandem application of flow cytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal

residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 13:1221-6, 1999

14. Neale GA, Coustan Smith E, Stow P, et al: Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18:934-8, 2004

15. Malec M, Bjorklund E, Soderhall S, et al: Flow cytometry and allele-specific oligonucleotide PCR are equally effective in detection of minimal residual disease in ALL. *Leukemia* 15:716-27, 2001

16. LeBien TW: Fates of human B-cell precursors. *Blood* 96:9-23, 2000

17. LeBien TW, Tedder TF: B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112:1570-80, 2008

18. Welner RS, Pelayo R, Kincade PW: Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat Rev Immunol* 8:95-106, 2008

19. Parker MJ, Licence S, Erlandsson L, et al: The pre-B-cell receptor induces silencing of VpreB and lambda5 transcription. *Embo J* 24:3895-905, 2005

20. Miller JP, Izon D, DeMuth W, et al: The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7. *J Exp Med* 196:705-11, 2002

21. Karasuyama H, Rolink A, Shinkai Y, et al: The expression of Vpre-B/lambda 5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice. *Cell* 77:133-43, 1994

22. Blom B, Spits H: Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 24:287-320, 2006

23. Caldwell J, McElhone P, Brokaw J, et al: Co-expression of full-length and truncated Ig mu-chains in human B lymphocytes results from alternative splicing of a single primary RNA transcript. *J Immunol* 146:4344-51, 1991

24. Haddad R, Guardiola P, Izac B, et al: Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood* 104:3918-26, 2004

25. Hao QL, Zhu J, Price MA, et al: Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood* 97:3683-90, 2001

26. Spits H: Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol* 2:760-72, 2002

27. Carrasco YR, Trigueros C, Ramiro AR, et al: Beta-selection is associated with the onset of CD8beta chain expression on CD4(+)CD8alphaalpha(+) pre-T cells during human intrathymic development. *Blood* 94:3491-8, 1999
28. Seddon B, Tomlinson P, Zamoyska R: Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* 4:680-6, 2003
29. Balmain A: Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer* 1:77-82, 2001
30. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531-7, 1999
31. Guo QM: DNA microarray and cancer. *Curr Opin Oncol* 15:36-43, 2003
32. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5116-21, 2001
33. Zhu T: Global analysis of gene expression using GeneChip microarrays. *Curr Opin Plant Biol* 6:418-25, 2003
34. Watson A, Mazumder A, Stewart M, et al: Technology for microarray analysis of gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 9:609-14, 1998
35. Leung YF, Cavalieri D: Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet* 19:649-59, 2003
36. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, et al: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14863-8, 1998
37. Li Z, Zhang W, Wu M, et al: Gene expression-based classification and regulatory networks of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 114:4486-93, 2009
38. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al: Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1:133-43, 2002
39. Ross ME, Zhou X, Song G, et al: Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 102:2951-9, 2003
40. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, et al: Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 1:75-87, 2002

41. Mosquera-Caro M, Helman P, Veroff R, et al: Identification, validation and cloning of a novel gene (OPAL1) and associated genes highly predictive of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia using gene expression profiling, ASH. San Diego, Blood Journal of the American Society of Hematology, 2003
42. Cheok MH, Yang W, Pui CH, et al: Treatment-specific changes in gene expression discriminate in vivo drug response in human leukemia cells. *Nat Genet* 34:85-90, 2003
43. Porwit MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P, et al: BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 14:816-25, 2000
44. Ratei R, Sperling C, Karawajew L, et al: Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 77:107-14, 1998
45. Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, et al: BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. *Leukemia* 15:1185-92, 2001
46. Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, et al: Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 13:419-27, 1999
47. Ginaldi L, Matutes E, Farahat N, et al: Differential expression of CD3 and CD7 in T-cell malignancies: a quantitative study by flow cytometry. *Br J Haematol* 93:921-7, 1996
48. Farahat N, Lens D, Zomas A, et al: Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukaemic B-cell precursors. *Br J Haematol* 91:640-6, 1995
49. Chen JS, Coustan Smith E, Suzuki T, et al: Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 97:2115-20, 2001
50. Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, et al: Comparative phenotype mapping of normal vs. malignant pediatric B-lymphopoiesis unveils leukemia-associated aberrations. *Exp Hematol* 26:305-13, 1998

51. Dworzak MN, Fritsch G, Panzer Grumayer ER, et al: Detection of residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia by comparative phenotype mapping: method and significance. *Leuk Lymphoma* 38:295-308, 2000
52. Ratei R, Karawajew L, Lacombe F, et al: Normal lymphocytes from leukemic samples as an internal quality control for fluorescence intensity in immunophenotyping of acute leukemias. *Cytometry B Clin Cytom* 70:1-9, 2006
53. Campana D, Neale GA, Coustan-Smith E, et al: Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: the St Jude experience. *Leukemia* 15:278-9, 2001
54. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, et al: Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99:1952-8, 2002
55. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 111:5477-85, 2008
56. Coustan-Smith E, Gajjar A, Hijiya N, et al: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse. *Leukemia* 18:499-504, 2004
57. Moricke A, Reiter A, Zimmermann 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* 111:4477-89, 2008
58. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al: Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 352:1731-8, 1998
59. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, et al: Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100:52-8, 2002
60. Schrappe M: International Collaborative Treatment Protocol For Children And Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia. *ClinicalTrials.gov* identifier: NCT01117441, in <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01117441> (ed), 2009

61. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, et al: Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia* 14:2205-22, 2000
62. Pui CH, Evans WE: Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354:166-78, 2006
63. 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* 107:1116-23, 2006
64. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, et al: Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 22:771-82, 2008
65. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al: Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96:2691-6, 2000
66. Malec M, van der Velden VH, Bjorklund E, et al: Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia* 18:1630-6, 2004
67. Neale GA, Coustan-Smith E, Stow P, et al: Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18:934-8, 2004
68. Vora A, Frost L, Goodeve A, et al: Late relapsing childhood lymphoblastic leukemia. *Blood* 92:2334-7, 1998
69. Bruggemann M, Schrauder A, Raff T, et al: Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia* 24:521-35, 2010
70. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, et al: Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 27:5168-74, 2009

71. Dworzak MN, Schumich A, Printz D, et al: CD20 up-regulation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction treatment: setting the stage for anti-CD20 directed immunotherapy. *Blood* 112:3982-8, 2008
72. Lee RV, Braylan RC, Rimsza LM: CD58 expression decreases as nonmalignant B cells mature in bone marrow and is frequently overexpressed in adult and pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 123:119-24, 2005
73. Veltroni M, De Zen L, Sanzari MC, et al: Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 88:1245-52, 2003
74. Rhein P, Mitlohner R, Basso G, et al: CD11b is a therapy resistance- and minimal residual disease-specific marker in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115:3763-71, 2010
75. Gaipa G, Basso G, Aliprandi S, et al: Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in nonapoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Cytometry B Clin Cytom* 74:150-5, 2008
76. Gaipa G, Basso G, Maglia O, et al: Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 19:49-56, 2005
77. Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A, et al: Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. *Cytometry B Clin Cytom* 78:147-53, 2010
78. Riehm H, Reiter A, Schrappe M, et al: [Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83)]. *Klin Padiatr* 199:151-60, 1987
79. Rhein P, Scheid S, Ratei R, et al: Gene expression shift towards normal B cells, decreased proliferative capacity and distinct surface receptors characterize leukemic blasts persisting during induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 21:897-905, 2007

80. Tissing WJ, den Boer ML, Meijerink JP, et al: Genomewide identification of prednisolone-responsive genes in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 109:3929-35, 2007

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Univ. - Prof. Dr. med. B. Dörken, Direktor der Klinik für Innere Medizin der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum für die Ermöglichung der Forschungsaktivitäten.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. W.-D. Ludwig, Chefarzt der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie am HELIOS Klinikum Berlin Buch für die klinische Ausbildung und die Ermöglichung der Forschungsaktivitäten.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Martin Schrappe dem Direktor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel und Leiter der ALL-BFM Studie bedanke ich mich für die langjährige personelle und finanzielle Unterstützung

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. rer. nat. Leonid Karawajew für die vielen konstruktiven Gespräche und Diskussionen.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Immunologischen Zellmarkerlabors danke ich für ihren Einsatz, die Entwicklung des MRD - Forschungslabors voranzubringen.

Ich bedanke mich bei den verschiedenen nationalen und internationalen Kooperationspartnern, insbesondere aber bei Michael Dworzak, Giuseppe Basso und Giuseppe Gaipa, die meine Arbeit durch anregende Diskussionen, das Bereitstellen von klinischen Materialien, Reagenzien und Ihrem Fachwissen, über viele Jahre begleitet haben.

Der Wilhelm Sander Stiftung und der Gutermuth Stiftung danke ich für die großzügige Unterstützung verschiedener Forschungsprojekte sowie Drittmittelfinanzierung von Personalstellen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Frau und meiner Familie, die zu jeder Zeit viel Geduld mit mir hatten und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht mal in Angriff genommen worden wäre.

Erklärung

§ 4 Abs. 3(k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

.....

Datum

.....

Unterschrift