

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie
der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Prognostische Relevanz der CD25 Expression bei Patienten mit
Akuter Myeloischer Leukämie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Yasmin Djirsarai-Eichhorn

aus Teheran (Iran)

Datum der Promotion: 08.12.2017

Gewidmet Emilia und Boris Eichhorn

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	5
Abstrakt.....	8
Abstract.....	10
1 Einleitung.....	12
1.1 Akute myeloische Leukämie	12
1.1.1 Epidemiologie	12
1.1.2 Ätiologie.....	13
1.1.3 Pathogenese	13
1.2 Klassifikation.....	15
1.2.1 Zytomorphologische FAB-Klassifikation der AML	15
1.2.2 WHO-Klassifikation der AML von 2008.....	16
1.2.3 Zwei Hauptgruppen der AML	18
1.3 Klinische Symptomatik.....	19
1.4 Diagnostik.....	20
1.4.1 Zytomorphologie	20
1.4.2 Durchflusszytometrie	21
1.4.3 Zytogenetik.....	22
1.4.4 Molekulargenetik	23
1.5 Therapie	23
1.6 Prognose	24
2 Ziel der Arbeit	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Patienten	26
3.2 Immunphänotypisierung.....	26
3.2.1 Probeentnahme und Probevorbereitung – Präanalytik.....	27
3.2.2 Prinzip der Durchflusszytometrie	28
3.2.3 Auswertung der Listmode-Daten.....	29
3.3 ELN-Risikoklassifikation: zytogenetisch und molekulargenetisch.....	30
3.4 Medical Research Council (MRC)-Kriterien: Zytogenetik	30
3.5 Statistische Auswertung.....	31

4	Ergebnisse.....	33
4.1	CD25 Antigenexpression	33
4.1.1	Patienten Charakteristika.....	33
4.1.2	Heatmap-Darstellungen.....	33
4.1.3	Analyse der quantitativen Antigenexpressionen.....	36
4.1.4	Lebensalter und quantitative Blutbildparameter bei Diagnose in Abhängigkeit von der CD25 Expression.....	40
4.1.5	Qualitative Analyse der Antigenexpression und ihre Assoziation mit der CD25 Expression.....	41
4.2	Kategorische Parameter und CD25 Antigenexpression	44
4.2.1	Geschlecht und CD25 Expression	44
4.2.2	Zytomorphologische-Klassifikation und CD25 Expression	44
4.2.3	Molekulargenetik und CD25 Expression	46
4.2.4	ELN-Risikoklassen und CD25 Expression	48
4.2.5	Zytogenetik, MRC-Risikogruppe und CD25 Expression.....	49
4.2.6	Induktionstherapie und CD25 Expression	53
4.2.7	Induktionsergebnis und CD25 Expression	55
4.3	Überlebenswahrscheinlichkeit	56
4.3.1	Überlebenswahrscheinlichkeit nach ELN-Risikoklassen	56
4.3.2	Überlebenswahrscheinlichkeit nach CD25 Expression	58
5	Diskussion	60
6	Zusammenfassung	66
7	Literatur	68
	Eidesstattliche Versicherung	79
	Lebenslauf	80
	Danksagung.....	82

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute Myeloische Leukämie
- sAML	Sekundäre Akute Myeloische Leukämie
- tAML	Therapie-assoziierte Akute Myeloische Leukämie
ANOVA	analysis of variance
APL	Akute Promyelozytenleukämie
ATRA	all-trans retinoic acid
BMI	Body-Mass-Index
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CA-AML	zytogenetisch abnormale AML
CN-AML	zytogenetisch normaler Karyotyp
CD	Cluster of Differentiation
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CR	Komplette Remission/ Complete Remission
CRi	Inkomplette Remission/ Complete Remission with incomplete recovery
DMSO	Dimethylsulfoxid-Lösung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGIL	der European Group for the Immunological Characterization of Leukemias
ELN	European Leukemia Net
FAB	French-American-British co-operative group

FACS	Durchflusszytometrie/ Fluorescence Activated Cell Sorting
FCM	Flow Cytometry
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
ggf.	Gegebenenfalls
Hb	Hämoglobin
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
i.v.	Intravenös
KM	Knochenmark
LSC	Leukämie Stammzellen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MPO	Myeloperoxidase
MPP	Multipotente Progenitorzelle
MRC	Medical Research Council
MRD	minimal residual disease
MTX	Methotrexat
NW	Normalwert
o.g.	oben genannt
OS	Gesamtüberleben/ Overall Survival
pB	Peripheres Blut
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PML	Promyelozytenleukämie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

RAR α	Retinolsäure-Rezeptor-Protein
s.	Siehe
SF	Standardfehler
sog.	sogenannt
SZT	Stammzelltransplantation
t	Translokation
TdT	Terminale Desoxyribonucleotidyltransferase
u.a.	Unter anderem
WHO	Weltgesundheitsorganisation/ World Health Organization

Abstrakt

Hintergrund: Es ist bereits bekannt, dass biologische, molekulargenetische und zytogenetische Merkmale eine wichtige Rolle für die Prognose der akuten myeloischen Leukämie (AML) spielen. Diese Merkmale wurden von verschiedenen Studiengruppen, unter anderem auch vom European Leukemia Net in prognostische Risikoklassen (ELN) unterteilt. Die prognostische Bedeutung wurde in der Vergangenheit insbesondere für Progenitorzellmerkmale, wie z.B. CD34 oder CD117 vielfach untersucht. Dennoch mangelt es an Untersuchungen von aberrant exprimierten Antigenen auf myeloischen Blasten, wie z.B. dem CD25 Antigen, die einen Einfluss auf die Prognose und den Erkrankungsverlauf haben können.

Ziel: Ziel dieser Arbeit ist es, die prognostische Relevanz und den Einfluss der Expression von CD25 auf Blasten von Patienten mit AML hinsichtlich des Erkrankungsverlaufs mithilfe der durchflusszytometrischen Immunphänotypisierung zu analysieren.

Material und Methoden: Aus dem peripheren Blut oder Knochenmark von 148 an AML-erkrankten Patienten wurde mithilfe der multiparametrischen Durchflusszytometrie die Expressionen von 25-30 Antigenen, einschließlich der Expression von CD25 untersucht. Der Einfluss der CD25 Antigenexpression wurde hinsichtlich der ELN-Risikoklassen, des Geschlechts, der FAB-Klassifikation, der Molekular- und der Zytogenetik, der Induktionstherapie, des Induktionsergebnisses, des Gesamtüberlebens (OS) sowie der Differenzierung der AML-Zellen untersucht.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass die CD25 Expression mit der Differenzierung der AML-Blasten korreliert. So wurde bei den CD25-positiven Patienten eine vermehrte Expression von CD34 ($p=0,032$) und CD117 ($p=0,001$) beobachtet. Dagegen fand sich lediglich eine geringe CD25 Expression bei Patienten mit granulozytär differenzierten Leukämien die eine verstärkte Expression von CD16 ($p=0,049$) und Lactoferrin ($p=0,042$) aufwiesen. Außerdem zeigte sich auch eine vermehrte Expression von CD4 ($p=0,048$) und MPO7 ($p=0,014$) bei CD25-negativen Patienten. Bemerkenswert war ebenfalls der signifikant höhere Anteil von Blasten im CD45 vs. SSC-Gate (Blastengate) bei CD25-positiven Patienten ($p=0,001$). Die Patienten mit positiver CD25 Antigenexpression waren im Vergleich zu den CD25-

negativen Patienten signifikant häufiger der prognostisch intermediären oder ungünstigen ELN-Risikoklassifizierung zuzuordnen ($p=0,047$). Patienten mit einer günstigen ELN-Risikoklassifikation wiesen in dem hier vorliegenden Patientenkollektiv eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu den intermediären oder ungünstigen ELN-Risikoklassen auf ($p=0,005$). Wobei kein signifikanter Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen CD25-positiven und CD25-negativen Patienten festgestellt werden konnte ($p=0,14$).

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die CD25 Antigenexpression mit der ELN-Risikoklassifikation und der granulo-monozytären Differenzierung der AML korreliert. Ob die Kombination der ELN-Risikostratifizierung mit der CD25 Expression in der intermediären Risikogruppe der ELN-Klassifikation eine zusätzliche prognostische Differenzierung ermöglicht, muss an einem größeren Patientenkollektiv untersucht werden.

Abstract

Background: It is already known that biological, molecular- and cytogenetic features play an important role in the prognosis of acute myeloid leukemia. These features have already been stratified into prognostic risk classes by different study groups, including the European Leukemia Net. The prognostic importance has been studied in the past, in particular for progenitor cell features, e.g. CD34 or CD117. However, studies of aberrantly expressed antigens on myeloid blasts, e.g. CD25 antigen, which can influence the prognosis and the course of the disease, are lacking.

Objective: The objective of this dissertation is to analyze the prognostic relevance and influence of the expression of CD25 on blasts of patients with AML in the course of the disease by means of flow cytometry immunphenotyping.

Materials and Methods: Peripheral blood or bone marrow samples from 148 patients with AML have been analyzed with multiparametric flow cytometry regarding the expression of 25-30 antigens, including the expression of CD25. The influence of the CD25 antigen expression was investigated with regard to ELN risk classes, gender, FAB-classification, molecular- and cytogenetic aberrations, outcome of induction therapy, overall survival as well as the differentiation of AML cells.

Results: It was shown that the CD25 expression correlates with the differentiation of AML blasts. Thus, CD25-positive patients showed an increased expression of CD34 ($p=0.032$) and CD117 ($p=0.001$). In CD25-positive patients more granulocytic differentiated leukemia cells according to CD16 ($p=0.049$) and lactoferrin ($p=0.042$) expression were observed. Furthermore, an increased expression of CD4 ($p=0.048$) and MPO7 ($p=0.014$) and a significantly higher proportion of blasts in the CD45 vs. SSC blast gate ($p=0.001$) were detected in CD25-positive patients. Compared to CD25-negative patients, patients with a positive CD25 antigen expression were assigned significantly more often ($p=0.047$) to the prognostically intermediate or the unfavorable ELN risk group. As expected, patients with a favorable ELN risk group had a better overall survival probability than patients within the intermediate or unfavorable ELN risk group ($p=0.005$). Although most of the CD25-negative patients were assigned to the intermediate or unfavorable ELN risk group, a significant difference in the overall

survival probability between CD25-positive and CD25-negative patients could not be determined ($p=0.14$).

Conclusion: CD25 antigen expression correlates with the ELN risk classification and with the granulo-monocytic differentiation of AML. The correlation of the ELN intermediate and unfavorable risk groups with a positive CD25 expression status suggests a prognostic implication which has to be proven in a larger patient collective.

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie ist eine maligne Neoplasie der myeloischen Zelllinien [1]. Mutationen auf zytogenetischer und molekulargenetischer Ebene in der Wachstums- und Differenzierungsphase der Zellen führen zur Produktion von unreifen und funktionsuntüchtigen leukämischen Blasten im Knochenmark (KM), die auch ins periphere Blut (pB) ausgeschüttet werden können. Chromosomenanomalien und exogene Schädigungen des KM spielen bei der Entstehung der AML eine wichtige Rolle.

Die Krankheit äußert sich u.a. durch Störungen in der Granulopoese, Erythropoese und Thrombopoese. Diese können zu einer klinischen Symptomatik, mit Infektneigung, Gerinnungsstörungen und Anämie führen. Leukämien verlaufen in der Regel leukämisch mit erhöhten Leukozytenzahlen, können aber auch subleukämisch mit normalen oder erniedrigten Leukozytenzahlen, oder sogar aleukämisch mit ausschließlichem Nachweis von Blasten im KM einhergehen. Ein Hiatus Leucaemicus, mit dem Vorkommen von Blasten und reifen Granulozyten bei Fehlen von mittelreifen Leukozyten im Blutausschlag, dient als diagnostischer Hinweis auf AML [2]. Die Heilungs- und Behandlungsmöglichkeiten sind Dank vielfältiger Forschungen in den letzten Jahren stark verbessert worden. Therapeutisch kommt im Allgemeinen eine myeloablative Chemotherapie in einer Kombination von Cytosinarabinosid und einem Anthrazyklin oder/ und eine allogene Stammzelltransplantation zum Einsatz [3].

1.1.1 Epidemiologie

Die AML ist mit 80% die häufigste maligne Erkrankung im Erwachsenenalter. Ein Fünftel der Fälle bei Kindern sind unter 15 Jahren. Die AML-Erkrankungsinzidenz steigt mit dem Alter. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung liegt bei 65 Jahren, weshalb die AML auch hauptsächlich zum Erkrankungsbild älterer Menschen gehört. Dabei sind Männer häufiger betroffen als Frauen (1,6 m:1 w). Die Gesamtinzidenz der AML-Erkrankung liegt bei 3-5/ 100.000 Einwohner im Jahr [4].

1.1.2 Ätiologie

Nach heutigem Wissensstand ist in den meisten Fällen die genaue Ursache für die AML Entstehung unbekannt, wobei Umweltfaktoren, genetische Faktoren und hämatopoetische Erkrankungen einen Einfluss bei der Entstehung der Krankheit haben.

Eine chronische Exposition mit ionisierender Bestrahlung und Benzol erhöht das AML-Risiko [2, 5, 6]. Ionisierende Strahlen verdoppeln das Leukämierisiko [7]. Benzol erhöht die Wahrscheinlichkeit einer AML-Erkrankung um das 4- bis 7-fache [2]. Nikotinabusus oder eine positive Raucheranamnese erhöht das Risiko ebenfalls [8].

Genetische Erkrankungen, wie z.B. Trisomie 21, Klinefelter-, Bloom- und Wiskott-Aldrich-Syndrom, Fanconi-Anämie oder andere Chromosomenanomalien können durch Störungen in der Proliferation- und Differenzierungsphase zu einem Funktionsverlust der Zellen führen und damit die Wahrscheinlichkeit an AML zu erkranken erhöhen [9].

Hämatopoetische Erkrankungen, wie Myelodysplastische Erkrankungen, Osteomyelofibrose und chronische myeloische Leukämien können durch eine Proliferations- und Differenzierungsstörung zu einer sekundären AML (sAML) führen [2, 10].

Findet sich in der Anamnese von AML-Patienten eine seit Jahren zurückliegende Zytostatika- (vor allem Alkylanzien wie Cyclophosphamid und Topoisomerase II-Inhibitoren wie Irinotecan) oder Bestrahlungstherapie so besteht eine sogenannte Therapie-assoziierte myeloische Neoplasie (tAML) [9]. Durch die Chemo- oder Bestrahlungstherapie kann es zu einem teilweisen oder vollständigen Verlust von Chromosomen oder/ und vermehrt zu genetischen Veränderungen mit balancierten Translokationen kommen, die erst Jahre später zur Ausbildung eines leukämischen Klons und zur Manifestation der Leukämie führen [1, 11].

1.1.3 Pathogenese

Blutzellen werden im KM durch hämatopoetische Stammzellen (HSZ) gebildet. HSZ differenzieren zu multipotenten Progenitorzellen (MPP), die sich in oligopotenten lymphatische- (Common Lymphoid Progenitor, CLP) oder myeloische Progenitorzellen (Common Myeloid Progenitor, CMP) weiterentwickeln. Durch Mutationen und genetische Veränderungen dieser Progenitorzellen entsteht eine leukämisch entartete

Stammzelle (LSC) mit Störungen in der Regulation von Genen, die die Differenzierung kontrollieren oder die Proliferation und Apoptose steuern und somit zur Ausbildung eines leukämischen Zellklons führen (s. Abbildung 1) [12–14]. Das führt zur Akkumulation von teilungs- und funktionsuntüchtigen Zellen, die die normalen hämatopoetischen Zellen aus dem KM verdrängen. Die Ausreifung einer Zelle ist von Zytokinen, Transkriptions- und Wachstumsfaktoren abhängig. Die leukämischen Blasten sind auf einer Seite nicht in der Lage einen funktionsfähigen Erythrozyten, Neutrophilen, Monozyten oder Thrombozyten zu produzieren und auf der anderen Seite verhindern Chemokine die Reifung gesunder Blutzellvorstufen [1]. Häufig findet die Umwandlung zu einer Leukämie Zelle erst durch eine AML-auslösende Mutation, eine sogenannte „driver“ Mutation, statt. Durch weitere Mutationen und molekulargenetische Veränderungen in den HSZ wird die Pathogenese der AML weiter verstärkt [15, 16].

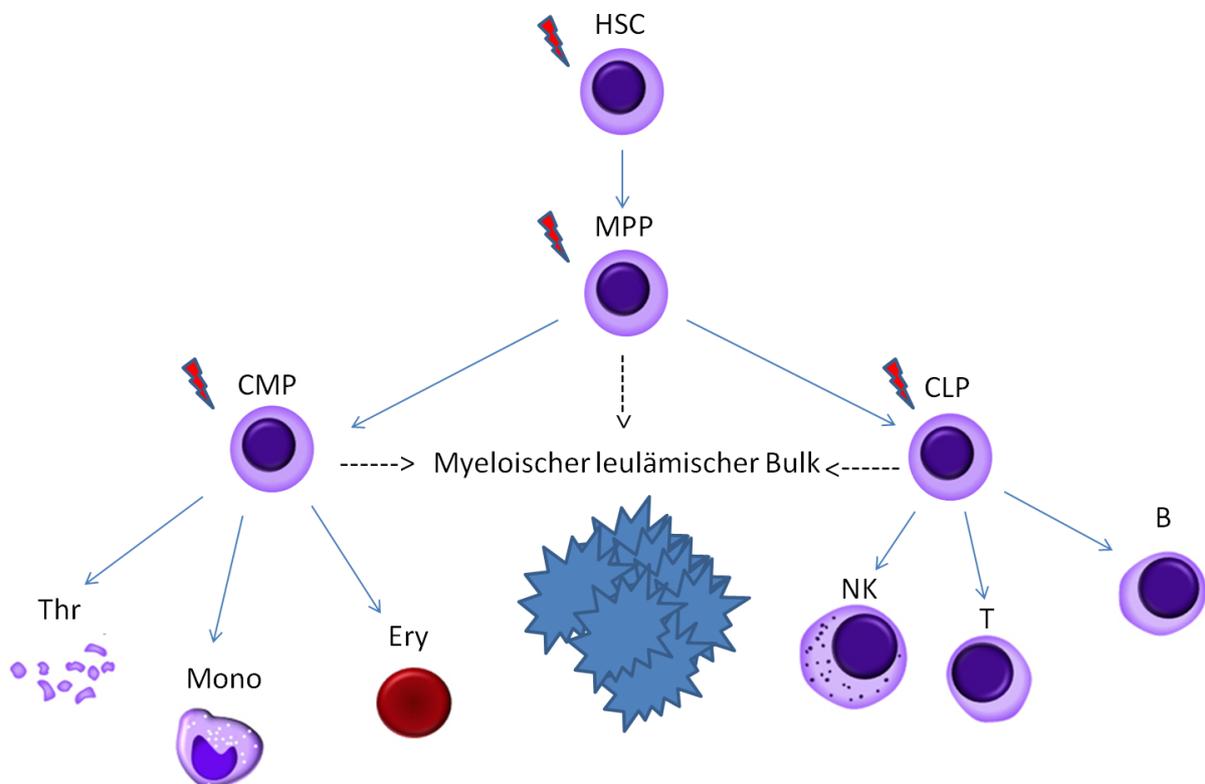


Abbildung 1. Pathogenese der myeloischen Stammzellen bei AML. HSC: Hämatopoetische Stammzellen, MPP: Multipotente Progenitorzellen, CMP: Common Myeloid Progenitor, CLP: Common Lymphoid Progenitor, Thr: Thrombozyten, Mono: Monozyten, Ery: Erythrozyten, NK: natürliche Killerzellen, T: T-Lymphozyten und B: B-Lymphozyten (Die Abbildung wurde inspiriert von [13, 14]).

Nach Kelly und Gilliland werden die mit der AML-assoziiierenden molekulargenetischen Mutationen in zwei Klassen eingeteilt [17, 18]:

a) Klasse -1- Mutationen (u.a. FLT3-ITD-, FLT3-TKD- und RAS Mutationen) [18]:

FLT3 (fms-related tyrosine kinase 3) ist ein Zytokinrezeptor, der zur Rezeptor-tyrosinkinase III gehört. Mutationen an FLT3 können zu AML führen. FLT3 liegt auf der Oberfläche vieler HSZ und spielt bei der Proliferation und Differenzierung von HSZ und Progenitorzellen eine wichtige Rolle [19]. FLT3 hat zwei Funktionsdomänen: eine für die Autoinhibition verantwortliche juxtamembranäre Domäne, die durch *ITD-Mutationen* (internal tandem duplication) aktiviert wird und eine Tyrosinkinasedomäne, die erst durch *TKD-Mutationen* entsteht. FLT3-ITD-Mutationen stellen die häufigsten Mutationen bei AML-Patienten dar [19]. *RAS Protoonkogene*, wie NRAS, kodieren membranassoziierte Proteine, die bei der zellulären und der molekularen Signalübertragung sowie der Ligandenbindung von Bedeutung sind [20].

b) Klasse -2- Mutationen (u.a. NPM1-, CEBPA- und MLL-Mutationen):

NPM1 (Nukleophosmin Gen) ist ein nukleozytoplasmatisches Transportphosphoprotein, das durch Chromosomenaberrationen und Mutationen den p53-Tumorsuppressor-Signalweg inhibiert [21]. NPM1-Mutationen sind auch bei anderen hämatologischen Neoplasien, wie z. B. bei Non-Hodgkin Lymphom, Akuter Promyelozytenleukämie (APL), AML- und MDS-Patienten beschrieben [22]. *CEBPA* (CCAAT enhancer binding protein α) ist für die neurophile Granulozyten Differenzierung zuständig [23]. Das MLL-Gen (Mixed lineage leukemia) liegt auf dem Chromosom 11q23 und ist für die Kodierung der Proteine mit Histonmethyltransferaseaktivität zuständig. Dieses Gen reguliert die Zelldifferenzierung bei HSZ [24].

1.2 Klassifikation

1.2.1 Zytomorphologische FAB-Klassifikation der AML

Akute Leukämien (AML, ALL und MDS) werden durch FAB-Klassifikation (French-American-British) klassifiziert [25–29]. Akute myeloische Leukämien werden anhand der Zytomorphologie nach der FAB-Klassifikation in acht Subtypen eingeteilt (M0-M7) (s. Tabelle 1) [26, 27].

Tabelle 1. FAB-Klassifikation der Akuten Myeloischen Leukämien [27].

FAB-Subtyp	Beschreibung
M0	Akute Myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung
M1	Akute Myeloische Leukämie ohne Ausreifung
M2	Akute Myeloische Leukämie mit Ausreifung
M3	Akute Promyelozytenleukämie
M3v	Akute mikrogranuläre Promyelozytenleukämie
M4	Akute Myelomonozytäre Leukämie
M4eo	Akute Myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilen
M5a	Akute unreife Monozytenleukämie
M5b	Akute reife Monozytenleukämie
M6	Akute Erythroblastenleukämie
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie

1.2.2 WHO-Klassifikation der AML von 2008

Die FAB-Klassifikation [26] wird heute durch die erst kürzlich revidierte WHO-Klassifikation ersetzt [30]. In der WHO-Klassifikation werden AML-Blasten nicht nur anhand der Zytomorphologie sondern auch nach zytogenetischen und molekulargenetischen Kriterien beurteilt [2, 31]. Seit 2008 werden in der WHO-Klassifikation auch neue molekulargenetische Veränderung wie die NPM1- und die CEBPA- Mutationen berücksichtigt [32].

Tabelle 2. WHO-Klassifikation der Akuten Myeloischen Leukämien [27].

<p>AML mit wiederkehrenden genetischen Veränderungen</p> <p>AML mit t(8;21)(q22;q22)/ RUNX1-RUNX1T1</p> <p>AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22)/ CBFβ-MYH11</p> <p>APL mit t(15;17)(q22;q11-21)/ PML-RARA (FAB M3)</p> <p>AML mit t(9;11)(p22;q23)/ MLLT3-MLL</p> <p>AML mit t(6;9)(p23;q34)/ DEK-NUP214</p> <p>AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2)/ RPN1-EVI1</p> <p>AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1</p> <p>vorläufige Einheit: AML mit NPM1-Mutation</p> <p>vorläufige Einheit: AML mit CEBPA-Mutation</p>
<p>AML verbunden mit myelodysplasieassoziierten Veränderungen</p> <p>definiert durch: Zytogenetik, MDS-Vorphase und Zytomorphologie</p>
<p>Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien</p> <p>definiert durch Radio und Chemotherapie (u.a. ionisierende Bestrahlung, Alkylanzien, Topoisomerase II)</p>
<p>AML, nicht weiter kategorisiert (NOS)</p> <p>AML mit minimaler Differenzierung</p> <p>AML ohne Ausreifung</p> <p>AML mit Ausreifung</p> <p>Akute Myelomonozytäre Leukämie</p> <p>Akute Monoblastäre/ Monozytäre Leukämie</p> <p>Akute Erythroleukämie</p> <p>Reine Erythroleukämie Erythroleukämie, erythroid/ myeloisch Akute Megakaryoblastenleukämie</p> <p>Akute Basophilenleukämie (ABL)</p> <p>Akute Panmyelose mit Myelofibrose (Synonym: Akute Myelofibrose, Akute Myelosklerose)</p>
<p>Myeloisches Sarkom (Synonym: Extramodullärer Myeloischer Tumor, Granulozytäres Sarkom, Chlorom)</p>

Myeloische Proliferationen verbunden mit Down-Syndrom

Transiente abnormale Myelopoese (Synonym: Transiente myeloproliferative Erkrankung)

Myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom

Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien**Akute Leukämien mit unklarer Linienzugehörigkeit**

Akute Undifferenzierte Leukämie

Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp mit t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1

Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp mit t(v;11q23); MLL neu anordnen

Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, B/ myeloisch, nicht weiter kategorisiert (NOS)

Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, T/ myeloisch, nicht weiter kategorisiert (NOS)

vorläufige Einheit: Natürliche Killer (NK)-Zell lymphoblastische Leukämie / Lymphom

1.2.3 Zwei Hauptgruppen der AML

Je nach Zytogenetik und molekularen Mutationen werden die AML-Patienten in zwei Prognosegruppen eingeteilt [7]:

1) AML ohne zytogenetisch nachweisbare chromosomale Aberrationen (Cytogenetic normal, CN): Zu dieser Gruppe gehören 48% der AML-Patienten. Die Heilungsrate beträgt etwa 30%.

2) AML mit chromosomalen Aberrationen: 52% der Patienten befinden sich in dieser Gruppe. Diese Gruppe teilt sich wiederum in zwei Untergruppen auf:

2.1) AML mit balancierten Chromosomenveränderungen (ohne DNA-Verlust): Hier kommen meistens Translokationen in Betracht. Die Heilungsrate in dieser Gruppe liegt bei >60%.

2.2) AML mit unbalancierten Chromosomenveränderungen (in Form von Verlust oder Gewinn von Chromosomenmaterial): Die Heilungschance bei diesen Patienten liegt bei knapp 15% [7].

Tabelle 3. Einteilung der AML Prognosegruppen nach zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen [7, 33].

Prognosegruppe	Genetische Subgruppe
Günstige Prognosegruppe (Niedrigrisiko)	<ul style="list-style-type: none"> • t(15;17)/APL- RARα • t(8;21)/AML-ETO (Core-binding-factor-AML) • inv(16)/t(16;16) CBFβ-MYH11 • Isolierte NPM1-Mutationen mit normaler Karyotyp • Isolierte CEBPA-Mutationen mit normalem Karyotyp
Mittlere Prognosegruppe (Intermediäres Risiko)	<ul style="list-style-type: none"> • Normaler Karyotyp • Trisomie 8
Ungünstige Prognosegruppe (Hochrisiko)	<ul style="list-style-type: none"> • Komplexe Aberrationen (≥ 3 chromosomale Anomalien) • Monosomie 7 • Anomalien an Chromosom 3 • FLT3-Längenmutationen (FLT3-LM/FLT3-ITD) • MLL-PTD

1.3 Klinische Symptomatik

Prinzipiell haben alle AML-Patienten eine ausgeprägte B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust von bis zu 10% des gesamten Körpergewichts innerhalb eines halben Jahres). Klinisch treten vermehrt Anämie (Schwäche, chronische Müdigkeit, Blässe), erhöhte Blutungsneigung mit petechialen Spontanblutungen, Hämatome und Epistaxis sowie erhöhte Infektanfälligkeit gegenüber bakteriellen oder mykotischen Infekten (z.B. *Candida albicans*) auf. Neben der Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark mit den Symptomen einer ausgeprägten Knochenmarkinsuffizienz können die leukämischen Blasten auch Organe infiltrieren und Lymphknotenschwellungen, Splenomegalie, Hepatomegalie und Kapselspannung der inneren Organe mit viszeralen Schmerzen verursachen. Bei einer Leukozytose von $>100.000/\mu\text{l}$ (Hyperleukozytose) kann ein Leukostasesyndrom mit Dyspnoe, Schwindel, Sehstörung, Akrozyanose und Priapismus auftreten, welches einen absoluten Notfall darstellt. Einige Krankheitssymptome sind AML-Subtypen

spezifisch. Eine hypertrophische Gingivitis kann bei M3- und M4-, eine disseminierte intravasale Gerinnung bei M3- und eine leukämische Hautinfiltration bei monozytär differenzierten Leukämien auftreten [9]. Ganz selten kommt es zu rein extramedullären Manifestationen [34]. Diese sind wiederum bei APL-Patienten besonders ausgeprägt und können zu einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) führen [2, 35].

1.4 Diagnostik

In der modernen AML-Diagnostik sind die Zytomorphologie, die Durchflusszytometrie, die Zytogenetik und die Molekulargenetik integrative Bestandteile, die nicht nur der Diagnose der Erkrankung, sondern auch der Klassifikation, der biologischen Zuordnung, der Risikostratifizierung sowie der Prognose dienen und so eine differenzierte Therapiestratifizierung ermöglichen [36].

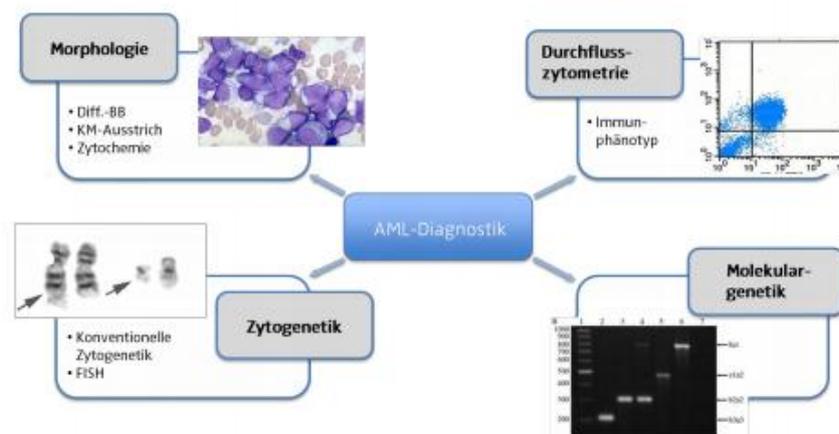


Abbildung 2. Die vier Säulen der moderne AML-Diagnostik: Zytomorphologie, Durchflusszytometrie, Zytogenetik und Molekulargenetik [36].

1.4.1 Zytomorphologie

Das Knochenmark wird aus dem Beckenknochen (z.B. der Spina iliaca posterior superior) mit Hilfe einer Jamshidi-Nadel aspiriert und auf einen Objektträger ausgestrichen [25]. Entscheidend für die Diagnose einer AML ist der Nachweis von unreifen Blasten im KM und im Blutausstrich mit einem zytomorphologisch quantifizierten Blastenanteil im Knochenmarkausstrich von >20% bezogen auf alle kernhaltigen Zellen [32, 37].

Die zytochemische Beurteilung der Blasten mit Nachweis der Myeloperoxidase (MPO) oder der unspezifischen Esterase (NSE) zur Beurteilung der granulo-monozytären Differenzierung ist heute weitgehend durch die Immunphänotypisierung ersetzt und verdrängt worden [38].

1.4.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (engl. FCM: Flow Cytometry) ermöglicht es Antigene mit Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern zu detektieren, die sich gegen bestimmte Merkmale (Antigene) auf der Zelloberfläche oder im Zytoplasma der Zelle richten [39].

Neben der Bestimmung der Zelllinienzugehörigkeit ermöglicht die Durchflusszytometrie auch eine Zuordnung des Differenzierungsgrades bzw. Reifegrades der AML-Zellen. Außerdem kann mit dieser Technik eine sehr geringe Anzahl von Leukämie Zellen im KM detektiert und quantifiziert werden, was in der Diagnostik einer minimalen Resterkrankung (MRD) zur Beurteilung des Therapieverlaufes nützlich sein kann [40]. Anhand des Expressionsmusters der Antigene kann der sogenannte Leukämie-assoziierte Immunphänotyp (LAIP) definiert werden, der sich von dem normalen, physiologischen Differenzierungsmuster der Antigenexpression unterscheidet. Der LAIP ist ein leukämietypischer Immunphänotyp, der in der normalen physiologischen Hämatopoese nicht vorkommt. Zum Zeitpunkt der AML Erstdiagnose lassen sich die LAIPs z.B. durch eine aberrante Koexpression von lymphatischen Antigenen oder eine Über- oder Unterexpression von Antigenen auf AML-Blasten definieren [41].

Des Weiteren kann durch die FCM die AML von anderen akuten Leukämie Arten, wie z.B. der akuten lymphatischen Leukämie, der akuten biphänotypischen Leukämie sowie der akuten Leukämie mit unklarer Linienzugehörigkeit abgegrenzt werden. Die Grundlage für diese Abgrenzung und Klassifizierung ist durch die European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL) mittels eines Scoring-Systems vorgegeben und definiert worden [42, 43].

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der initialen, diagnostischen Immunphänotypisierung mit einem 25-30 Antigene umfassenden Antikörper-Panel auch die CD25 Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) auf den blastären Zellen

analysiert. CD25 ist ein essentieller Bestandteil des IL-2 Rezeptors, ohne den die IL-2 induzierte Signalkaskade mit Übertragung von Proliferationssignalen nicht ausgelöst werden kann, wodurch CD25 bei der AML eine pathogenetisch bedeutsame Rolle zukommt. Physiologischerweise wird CD25 auf T-Lymphozyten exprimiert. Ein Anstieg der CD25 Expression auf T-Lymphozyten zeigt sich bei Infektionen mit Viren oder intrazellulären Erregern und Parasiten, bei einem akuten Schub einer Autoimmunerkrankung, bei Organabstoßungen transplantierte Patienten sowie bei T-Zell-Lymphomen und einer Vielzahl anderer maligner Erkrankungen [44].

1.4.3 Zytogenetik

Die zytogenetische Charakterisierung der Leukämie Blasten ist für die Diagnostik der AML erforderlich. Sie liefert neben der Morphologie und der Immunphänotypisierung wichtige diagnostische Hinweise, die zur Klassifikation und auch zur Prognose der Erkrankung beitragen [45–48]. Die Charakterisierung kann z.B. durch eine lichtmikroskopische Darstellung der angefärbten Chromosomenbanden erfolgen (chromosomale Bandenanalyse). Um auch submikroskopische Aberrationen nachzuweisen, kann die zumeist verminderte Probenvitalität mit Hilfe einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an Interphasenkernen vervollständigt werden [5]. Etwa 55% der AML-Patienten werden aufgrund eines aberranten Karyotyps bzw. einer Chromosomenveränderung als sogenannte zytogenetisch abnormale AML (CA-AML) klassifiziert [17], im Gegensatz zu Erkrankungen mit zytogenetisch normalem Karyotyp, die als CN-AML bezeichnet werden. Bei mehr als zwei Monosomien oder Monosomien mit zwei Aberrationen spricht man von einem monosomalen Karyotyp [49]. Mehr als drei strukturelle Veränderungen werden als komplex-aberranter Karyotyp bezeichnet. Zytogenetische Veränderungen haben eine prognostische Relevanz. So wird den AML mit t(15;17), t(8;21) und mit inv(16) in allen prognostischen Erhebungen eine günstige Prognose zugewiesen, wohingegen den AML mit t(16;16), t(6;9), 11q23/MLL und den Leukämien mit komplex-aberrantem Karyotyp eine ungünstige Prognose zugeschrieben wird [50–52].

1.4.4 Molekulargenetik

Bei etwa der Hälfte der AML-Patienten können rein zytogenetisch keine Aberrationen beobachtet werden. Hier kommt die molekulargenetische Untersuchung zum Einsatz. Mit Hilfe von PCR-Techniken und der Direktsequenzierung nach Sanger können Proben aus dem KM oder dem pB auf bestimmte molekulargenetische Veränderungen hin untersucht werden [25, 53].

Gemäß den aktuellen ELN-Leitlinien sollen CN-AML-Patienten u.a. auf NPM1, FLT3 und CEBPA (biallelisch) untersucht werden, da diese Marker sowohl eine prognostische als auch eine therapeutische Relevanz besitzen. Alle anderen Mutationen wie RAS, MLL, KIT, WT1, RUNX1, IDH1, TP53 und TET2 befinden sich derzeit noch in der abschließenden Bewertung durch Studien [17, 33, 53].

1.5 Therapie

Ziel der Therapie ist es eine vollständige bzw. komplette Remission (CR) zu erreichen. Dafür werden AML-Patienten je nach Alter, Allgemeinzustand, zytogenetischen Veränderungen und klinischen Befunden (Karnofsky-Index / ECOG-Status) in drei Risikogruppen (niedriges, mittleres und hohes Risiko) eingeteilt („Risikostratifizierung“) [38]. Je nach Risiko-Gruppe und in Abhängigkeit vom Alter, Begleiterkrankungen und Allgemeinzustand des Patienten wird über die Dauer und Intensität der Chemotherapie und/ oder eine evtl. durchzuführende allogene Stammzelltransplantation entschieden.

Die Sequenz der Chemotherapie folgt idealerweise bei allen Patienten nach dem Schema einer Induktions-, Konsolidierungs-, ggf. Re-Konsolidierungs-, und Erhaltungstherapie.

In allen Risikogruppen beginnt die Therapie zunächst mit der Induktion einer Remission, die mit den meisten Therapieprotokollen bei etwa 70-80% der Patienten erreicht werden kann. Induktionstherapien dauern ca. vier bis sechs Wochen, sind sehr effektiv aber auch sehr nebenwirkungsreich. Das Ziel der Therapie ist es eine massive Reduktion der Leukämieast und letztlich eine komplette Remission (CR) zu erreichen [2].

Die Beurteilung der Remission bei AML-Patienten erfolgt anhand der Nachweisbarkeit von Blasten im Anschluss an die Induktionstherapie. Eine CR bei AML-Patienten nach

der Induktionstherapie wird erst dann erreicht, wenn die folgenden CR-Kriterien erfüllt sind [38]:

- Keine Blasten im pB oder weniger als 5% im KM
- Neutrophile $>1,0/ \text{nl}$
- Thrombozyten $>100/ \text{nl}$
- Es wird keine Transfusion von Erythrozytenkonzentraten benötigt

Die Patienten, die zwar alle CR-Kriterien erfüllen aber immer noch an einer Neutropenie und Thrombopenie leiden, haben lediglich eine inkomplette Remission (CRi) erreicht.

Es kommen heutzutage auch gezielte Genotyp- und molekular-basierte Medikamente zum Einsatz. Hier werden neben Zytostatika wie Clofarabin auch monoklonale Antikörper wie Gemtuzumab-Ozogamicin [54] oder Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Dasatinib und Midostaurin verwendet [55]. Bei genetisch definierten Erkrankungen der AML, wie z.B. der seltenen Philadelphia-Chromosom-positiven AML oder der Eosinophilenleukämie, kann auch der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib eingesetzt werden [9].

1.6 Prognose

Die 5-Jahres Überlebensrate der AML-Patienten liegt bei ca. 30%. Negative Faktoren wie ein Alter von über 60 Jahren, Leukozytenzahlen von $>100.000/\mu\text{l}$, komplex aberranter Karyotyp sowie Therapierefraktärität beeinflussen dabei die Überlebenswahrscheinlichkeit. Vor allem Dank der modernen supportiven Therapiemöglichkeiten, insbesondere der antimykotischen und antibiotischen Therapien und den zunehmend gezielten Therapieoptionen sind heutzutage die Lebensqualität sowie die Lebensdauer der AML-Patienten deutlich verbessert bzw. verlängert [2].

2 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, die Bedeutung der CD25 Expression auf Blasten von Patienten mit AML mittels Durchflusszytomterie und einer retrospektiven unizentrischen klinischen Datenerhebung zu analysieren. Hierbei soll in erster Linie untersucht werden, ob der CD25 Expression bei AML eine prognostische Relevanz beigemessen werden kann. Des Weiteren soll untersucht werden, ob sich zwischen der CD25-positiven und der CD25-negativen Patientengruppe signifikante Unterschiede hinsichtlich Alter, Geschlecht, AML-Klassifikation, ELN-Risikogruppe, Induktionstherapie und Induktionsergebnis, Zytogenetik sowie Molekulargenetik ergeben. Außerdem sollen die Unterschiede im Immunphänotyp beider Patientengruppen charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten gehen auf 148 AML-erkrankte Patienten zurück, die im HELIOS Klinikum Berlin-Buch in den Jahren von 2001 bis 2015 diagnostiziert und behandelt wurden.

Mithilfe des EDV basierten klinischen Informationssystems SAP und den Patientenakten wurde der vollständige Krankheitsverlauf der Patienten retrospektiv ermittelt. Dabei wurden folgende Daten erfasst:

Bei Erstdiagnose:

- Geburtsdatum, Alter und Geschlecht der Patienten
- Laborparameter: Hämoglobin (Hb), Thrombozyten, Leukozyten
- Anzahl der Blasten im pB und im KM
- Durchflusszytometrie Befunde (ACCESS-Datenbank des Immunologischen Zellmarkerlabors des HELIOS Klinikum Berlin-Buch)
- Zytogenetik (Karyotyp) und Molekulargenetik mit anschließender FAB-Klassifikation und den ELN-Risikoklassen (günstig, intermediär und ungünstig. s. Abschnitt 3.3 ELN-Klassifikation)
- Art der Chemotherapie bzw. Induktionstherapie

Remissionsbeurteilung nach Induktionstherapie:

- KM-Punktion und Induktionsergebnis (CR/ CRi bzw. Regression)

3.2 Immunphänotypisierung

Die immunphänotypischen Befunde wurden aus dem pB oder dem KM von 148 Patienten mit AML mittels Durchflusszytomtrie im Immunologischen Zellmarkerlabor des HELIOS Klinikums Berlin-Buch erhoben.

Die Messungen am Durchflusszytometer wurden mithilfe des FACSCalibur- und des FACSCantoTM -Systems der Firma Becton & Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA) durchgeführt.

3.2.1 Probeentnahme und Probevorbereitung – Präanalytik

Vor der Probenentnahme muss auf folgende Punkte geachtet werden:

- Entnahmezeitpunkt planen
- Röhrchen und Objektträger vorbereiten
- Ungefärbte Ausstriche mitschicken
- Anforderungsscheine ausfüllen
- Versandmaterial vorbereiten
- Aus Gewebe sofort Zellsuspension herstellen
- Empfängerlabor informieren
- Transport vollständig organisieren

Die aus venösem pB und KM gewonnen Proben der Patienten müssen sorgfältig beschriftet sein und rechtzeitig zum Labor für die Auswertung geschickt werden. Vor dem Probentransport sollte das Labor benachrichtigt werden. Die Untersuchungen sind sehr aufwendig. Daher sollten die Proben am besten schon früh am Tag entnommen werden. Hierbei handelt es sich um ein aseptisches Verfahren aus dem pB und KM. Bei der KM Entnahme wird mit der Hilfe einer Jamshidi-Nadel zunächst ein Knochenstanzzyylinder für die immunhistologische Aufarbeitung gewonnen und dann KM aspiriert. Dieser Vorgang sollte nicht mehrfach wiederholt werden, da durch wiederholte Aspiration die Möglichkeit einer Verdünnung des KM Materials mit venösem Blut besteht. Für die zytologische Diagnostik wird eine Reihe von Bröckelausstrichen angefertigt sein (ca. 10 Stück). Die gewonnen Proben sollten vorsichtig gemischt werden, ohne dass sich Schaum bildet. Bei fehlendem Bröckelausstrich kann versucht werden mit Hilfe eines Siebaufsatzes Markbröckel zu gewinnen. Dieser sollte dann ebenfalls ins Labor mitgeschickt werden. Um die aus dem pB oder dem KM entnommenen Zellen zu immunphänotypisieren, müssen die Proben mit Antikoagulantien, z.B. EDTA oder Heparin bei Raumtemperatur versetzt werden, um eine Koagelbildung zu vermeiden. Bei der Anwendung von Heparin besteht allerdings die Gefahr von Artefakt- und Schleierbildung in den Proben, welche in der Folge eine eindeutige morphologische Beurteilung erschweren können. Im Labor werden die Proben für die notwendigen Analysen und die Diagnostik aufgetrennt. Vollblut kann mit

Hilfe von 10%igem DMSO-Zusatz eingefroren werden. Die Proben können auch in speziellen Behältern bei -70°C für mehrere Monate gelagert werden [25].

Für den Nachweis der Antigene: CD2, CD3, cyCD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, cyCD22, CD25, CD33, CD34, CD45, CD56, CD57, CD61, CD64, CD65, CD79a, CD117, GlyA, HLA-DR, Kappa, MoAb7-1, MPO, Lambda, Lactoferrin, TdT, TZRab und TZRgd wurden 200µl Probenmaterial mit den jeweiligen Detektionsantikörpern für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Antikörper wurden in Drei- oder Vierfarb-Panels in Konjugation mit den Fluorochromen Fluorescein Isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cyan5 (PE-Cy5) oder Allophycocyanin (APC) eingesetzt. Durch Zugabe von 3ml Lysepuffer werden die Erythrozyten lysiert und für weitere zehn Minuten inkubiert. Anschließend werden die Zellsuspensionen zweimal zentrifugiert und mit 3ml PBS gewaschen und zur Messung vorbereitet [25].

3.2.2 Prinzip der Durchflusszytometrie

Für die Immunphänotypisierung einer Vielzahl von Zellen in möglichst kurzer Zeit ist die FCM die Methode der Wahl. Mit Hilfe der FCM können die Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität charakterisiert und zugeordnet werden.

Durch eine sogenannte hydrodynamische Fokussierung werden die Antikörperbeladenen Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln, wie an einer Perlenkette hintereinander aufgereiht, an einem Laserstrahl vorbeigeführt und analysiert [56].

Durch die Beugung und Streuung des Laserlichts können Größe und Granularität der Zellen gemessen werden. Wenn das Laserlicht vorwärts streut (FSC = Forward Scatter) hängt dies von der Zellgröße ab und wenn es seitwärts streut (SSC = Side Scatter) von der zellinternen Granularität [57].

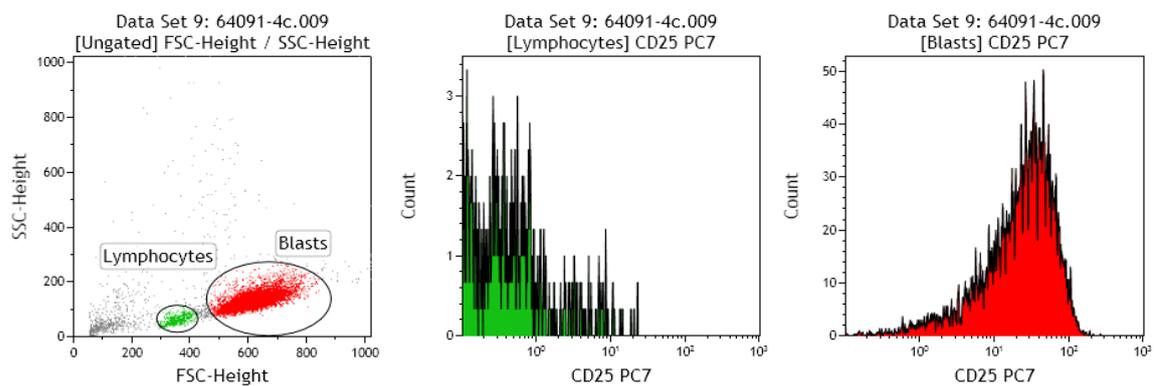
Gleichzeitig werden die mit Fluorochromen (wie APC-Cy7, Fluoreszeinisothiozyanat, PE-Cy5, PerCP, Phycoerythrin und Propidiumjodid) markierten Antikörper auf den Oberflächen der Zellen durch die Wellenlänge des Lichts angeregt. Dabei werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau gehoben, um dann anhand von Photonenemission auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück zu fallen. Die emittierten Photonen können daraufhin durch einen

Photodetektor registriert und die gemessenen Daten in einem sog. Listmode Datensatz digital archiviert werden [56].

3.2.3 Auswertung der Listmode-Daten

Als Auswertungssoftware standen CellQuest und FACSDIVA™ zur Verfügung. Mit diesen Programmen wurde der Immunphänotyp ermittelt und die Blasten hinsichtlich der Expression von CD25 untersucht. Die Zellen wurden als positiv gewertet, wenn $\geq 20\%$ von ihnen das Antigen CD25 exprimierten.

CD25 positive AML-Zellen



CD25 negative AML-Zellen

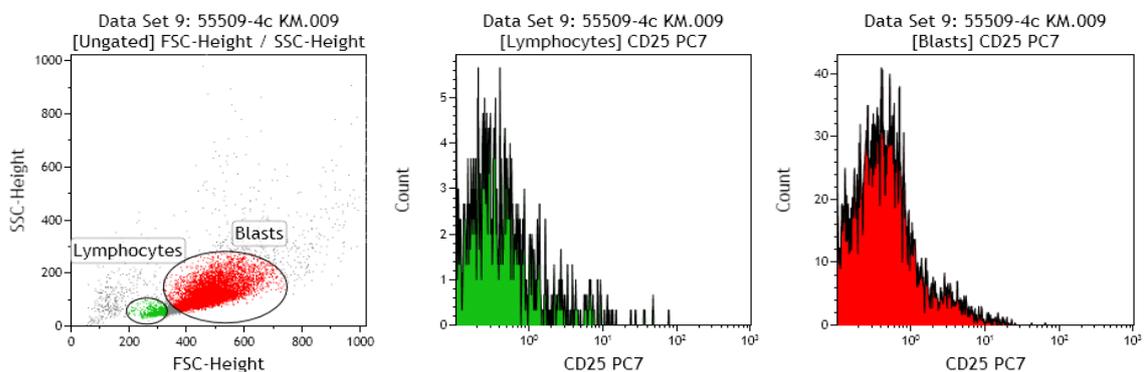


Abbildung 3. Gatingstrategie und Analyse der CD25 Expression. Die Zellen wurden als CD25-positiv bewertet, wenn sie eine Antigenexpression von $\geq 20\%$ im Vergleich zur Negativkontrolle aufwiesen.

3.3 ELN-Risikoklassifikation: zytogenetisch und molekulargenetisch

Wie bereits oben beschrieben, beeinflussen unterschiedliche Faktoren die Prognose und Überlebenswahrscheinlichkeit von AML-Patienten. Explizit kann festgehalten werden, dass molekulargenetische und zytogenetische Veränderungen die wichtigste Rolle bei der Einschätzung der Prognose und der Therapiestratifizierung spielen [17].

Die Risikoklassifikation des European Leukemia Net ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit klinischer Studiendaten und bietet die Möglichkeit anhand zytogenetischer und molekulargenetischer Veränderungen die Prognose der Patienten schon vor Beginn einer Therapie abzuschätzen und eine Therapiestratifizierung vorzunehmen (s. Tabelle 4) [27, 38]. In dieser Arbeit wurden die beiden Intermediärgruppen I und II in nur einer Gruppe zusammengefasst [38].

Tabelle 4. Risikoklassen nach ELN [27, 38].

Genetische Gruppe	Untergruppe
Günstig	<ul style="list-style-type: none"> • t(8;21)(q22;22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> • inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> • <i>NPM1</i> Mutation ohne <i>FLT3</i>-ITD mit normaler Karyotyp • <i>CEBPA</i> Mutation mit normaler Karyotyp
Intermediär I	<ul style="list-style-type: none"> • <i>NPM1</i> Mutation und <i>FLT3</i>-ITD mit normaler Karyotyp • <i>NPM1</i> Wildtyp und <i>FLT3</i>-ITD mit normaler Karyotyp • <i>NPM1</i> Wildtyp ohne <i>FLT3</i>-ITD mit normaler Karyotyp
Intermediär II	<ul style="list-style-type: none"> • t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i> • Zytogenetische Veränderungen, die nicht als günstig oder ungünstig eingeteilt werden
Ungünstig	<ul style="list-style-type: none"> • inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> • t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> • t(v;11)(v;q23); <i>MLL-Rearrangements</i> • -5 or del(5q); -7; abn(17p); komplexer Karyotyp

3.4 Medical Research Council (MRC)-Kriterien: Zytogenetik

Etwa 40 bis 45% der an einer AML-erkrankten Patienten haben einen normalen Karyotyp. Ca. 50% der Patienten zeigen eine balancierte oder unbalancierte zytogenetische Anomalie. Nach den Kriterien des Medical Research Councils (MRC)

können diese Patienten in drei prognostische Gruppen eingeteilt werden [58, 59] (Häufigkeit [60]).

Tabelle 5. MRC-Kriterien [58].

Prognose	Chromosomenanomalien	Fusionsgen	Häufigkeit
Günstig	<ul style="list-style-type: none"> • t(15;17)(q22;q21) • t(8;21)(q22;q22) • inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) 	<ul style="list-style-type: none"> • PML-RARA • RUNX1-RUNX1T1 • CFBF-MYH11 	<ul style="list-style-type: none"> • 5-10 % • 10-15 % • 3-8 %
Intermediär	<ul style="list-style-type: none"> • Entitäten, die weder günstig noch ungünstig sind 		
Ungünstig	<ul style="list-style-type: none"> • abn(3q) [ausgeschlossen t(3;5)(q21~25;q31~35)] • inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) • add(5q), del(5q), -5 • -7, add(7q)/del(7q) • t(6;11)(q27;q23) • t(10;11)(p11~13;q23) • t(11q23) [ausgeschlossen t(9;11)(p21~22;q23) und t(11;19)(q23;p13)] • t(9;22)(q34;q11) • -17/abn(17p) • Komplex (≥ 4 nicht verwandte zytogenetische Veränderungen) 	<ul style="list-style-type: none"> • MLL-MLLT4 • MLL-MLLT10 • BCR-ABL 	<ul style="list-style-type: none"> • 5-9% (bei MLL Fusion)

3.5 Statistische Auswertung

Die klinischen Daten der AML-Patienten wurden anhand der Aktenlage retrospektiv erhoben und mit den durchflusszytometrischen Datensätzen zusammengeführt. Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung von IBM SPSS Statistics®, Version 20 (IBM® 2011, Armonk, NY, USA).

Die signifikanten Unterschiede der jeweils untersuchten Gruppen wurden mit dem Fisher's-Exact-Test (2x2-Kontingenztafel) bzw. dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson (komplexere Stichproben) getestet.

Mit Hilfe einer Heatmap wurden die Antigenexpressionen aller untersuchten Antigene im FSC/SSC-Blastengate in Prozent dargestellt. Dies ermöglicht die gleichzeitige Darstellung der CD25 Antigenexpression mit anderen Antigenen sowie den ELN-Risikoklassen.

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten der Patienten innerhalb der Beobachtungszeit wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier Analyse berechnet und dargestellt.

Die statistische Analyse bzgl. der ELN-Risikoklassen wurde nach Fisher durchgeführt. Das Signifikanzniveau der durchgeführten Analysen wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Mit dem Begriff „Mean“ ist der statistische Mittelwert gemeint. Die Literaturverwaltung wurde mit Hilfe des Programms Citavi 5 (Swiss Academic Software, Zürich 27. Februar 2015) strukturiert [61].

4 Ergebnisse

4.1 CD25 Antigenexpression

4.1.1 Patienten Charakteristika

In dieser Arbeit wurde die Expression des CD25 Antigens bei 148 Patienten mit AML im Alter von 5 bis 97 Jahren aus dem HELIOS Klinikum Berlin-Buch in den Jahren von 2001 bis 2015 mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Von 148 an einer AML-erkrankten Patienten zeigten 15,5% (23/148) eine positive CD25 Expression. Als positive Expression wird der Nachweis des CD25 Antigens auf $\geq 20\%$ der leukämischen Blasten bezeichnet. 84,5% (125/148) der Patienten waren demnach CD25-negativ (CD25 Expression $< 20\%$). Bei den CD25-positiven Patienten bestand ein Verhältnis zwischen Frauen und Männern von 1,9:1. Bei den CD25-negativen Patienten war das Verhältnis zwischen Frauen und Männern mit 1:1,2 fast gleich.

4.1.2 Heatmap-Darstellungen

Die Heatmap Darstellung ermöglicht eine zweidimensionale farbkodierte Visualisierung der einzelnen an AML-erkrankten Patienten mit den jeweiligen Antigenexpressionen des gesamten Antikörperpanels bestehend aus CD2, CD3, cyCD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, cyCD22, CD25, CD33, CD34, CD45, CD56, CD57, CD61, CD64, CD65, CD79a, CD117, GlyA, HLA-DR, kappa, MoAb7-1, MPO, Lambda, Lactoferrin, TdT, TZRab und TZRgd die mittels Durchflusszytometrie detektiert wurden.

Dadurch kann das Verhältnis der CD25 Expression zu den anderen Antigenexpressionen dargestellt werden (s. Abbildung 4). Die Abbildung zeigt, dass bei den CD25-positiven Patienten mit undifferenzierter AML CD16 und Lactoferrin geringer exprimiert werden, wohingegen bei den CD25-negativen Patienten mit granulomonozytär differenzierter AML, CD16 und Lactoferrin verstärkt exprimiert sind. Gleichzeitig lässt sich erkennen, dass eine positive Korrelation zwischen der Positivität der CD25 Expression und dem Nachweis der Progenitormerkmale CD34 und CD117 besteht. Beide Antigene sind Merkmale unreifer AML-Zellen, was wiederum nahelegt,

dass die CD25 Expression nicht mit granulo-monozytär differenzierten AML, sondern eher mit undifferenzierten Leukämien assoziiert ist.

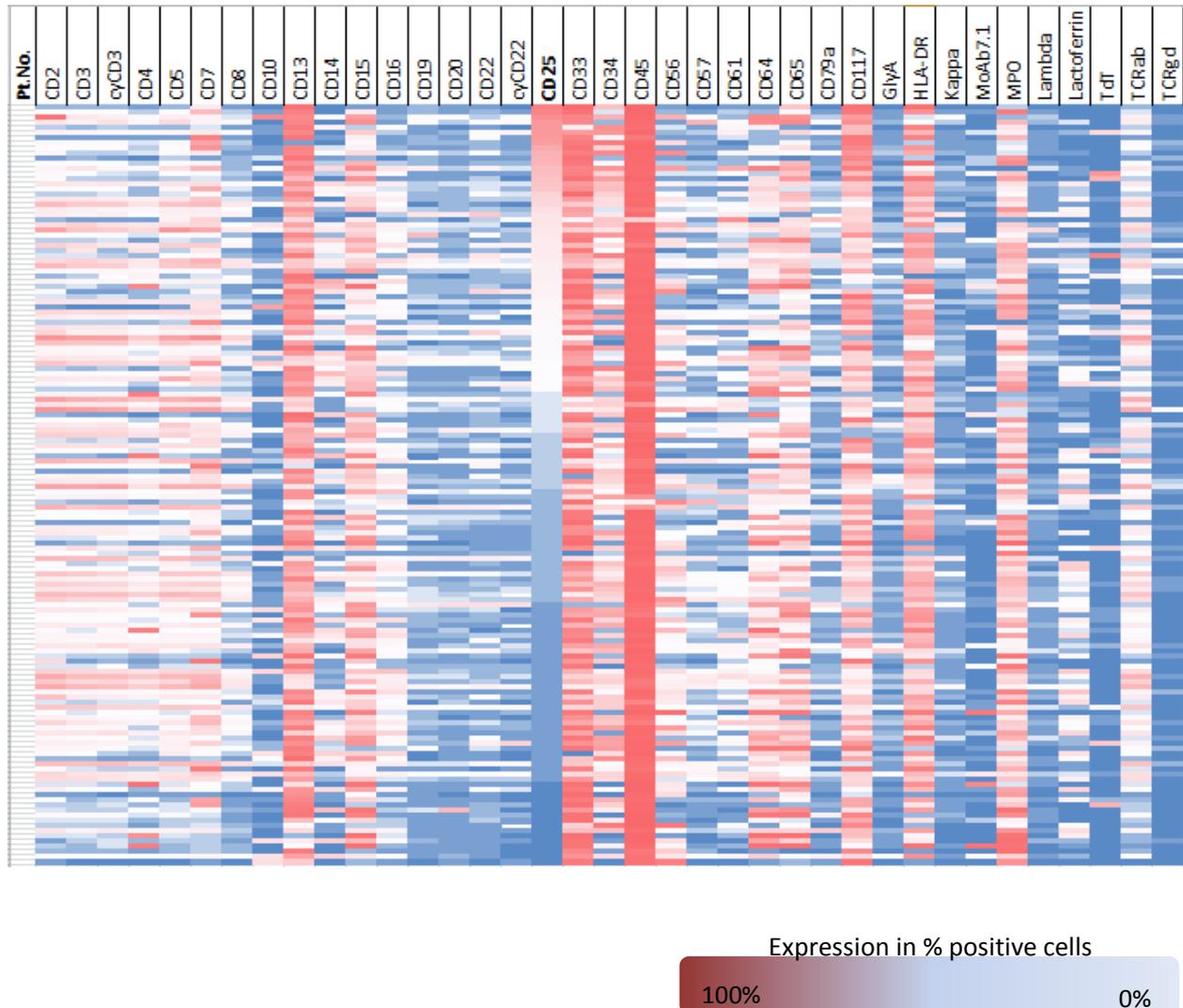


Abbildung 4. AML-Immunphänotyp Expressions-Heatmap: In der Heatmap wurde die Expression der untersuchten Antigene in Prozent der positiven Zellen dargestellt. (Rot: Expression auf 100% der Zellen und Blau: 0%ige Expression). Anzahl von AML-erkrankten Patienten aus dem Berlin Buch Klinikum n=148.

Wie bereits beschrieben, haben die ELN-Risikoklassen eine prognostische und therapeutische Relevanz bei AML-erkrankten Patienten. Die im HELIOS Klinikum Berlin-Buch untersuchten CD25-positiven AML Patienten ließen sich zu der intermediären oder der ungünstigen ELN-Risikoklasse zuordnen. Patienten mit einer günstigen ELN-Risikoklasse wurden bei den CD25-positiven Patienten nicht

beobachtet. Das wiederum weist darauf hin, dass die Expression von CD25 auf Leukämie Zellen bei AML Patienten eher mit einer intermediären oder einer ungünstigen, als mit einer günstigen Prognose einhergeht.

Eine eindeutige, signifikante Korrelation zwischen der positiven Expression von CD25 mit anderen Antigen Clustern oder den ELN-Risikoklassen ließ sich jedoch nicht nachweisen (s. Abbildung 5). Vielmehr stellt sich eher eine heterogene Verteilung der ELN-Risikoklassen in Bezug auf das Antigenexpressionsmuster dar (s. Abbildung 5).

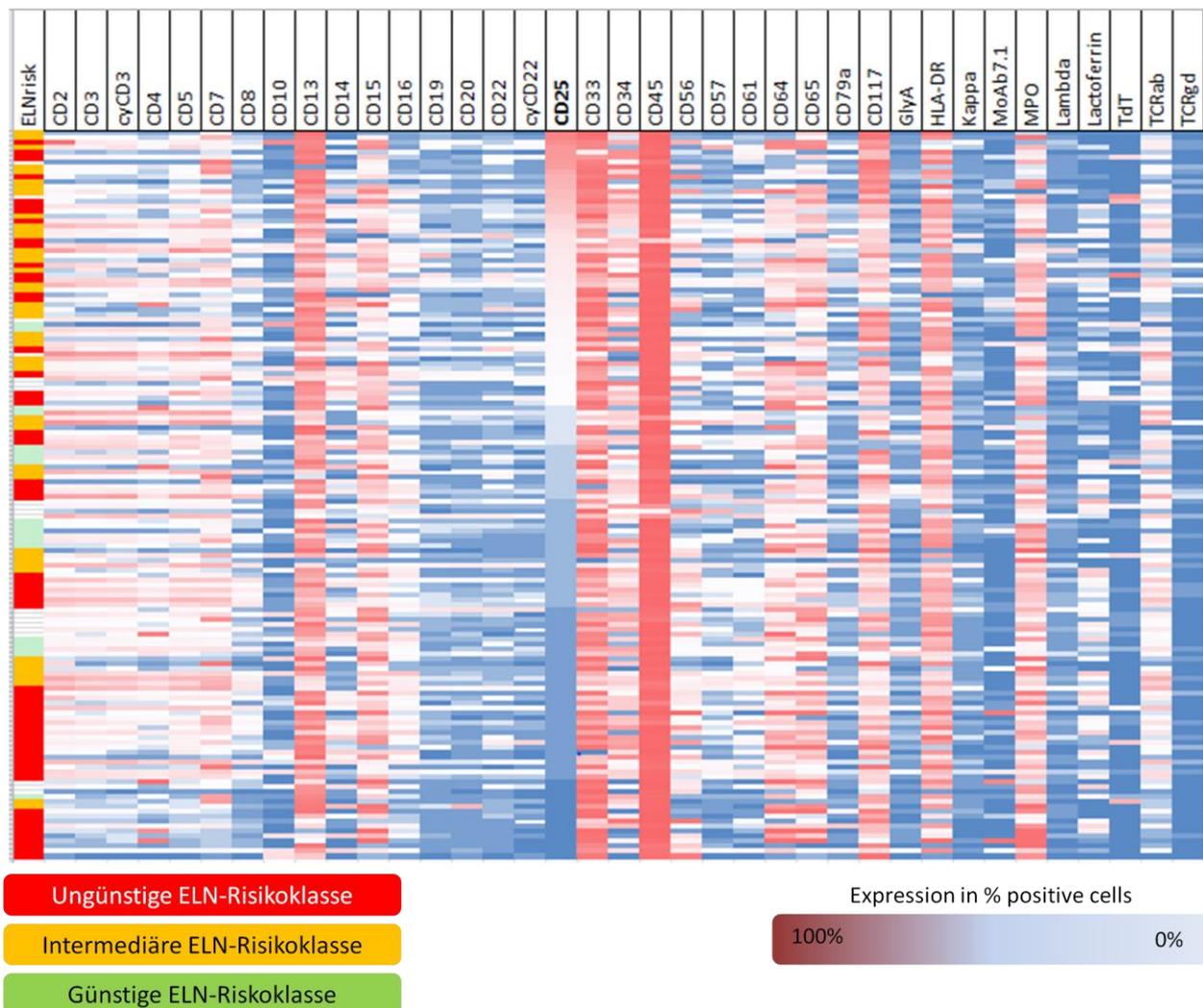


Abbildung 5. Heatmap für den AML–Immunphänotyp und die ELN-Risikoklassen: In der Heatmap wurde die Antigenexpression aller untersuchten Antigene in Prozent im Bezug zu den drei ELN-Risikoklassen dargestellt. (Rot: 100%ige Zell Expression und Blau: 0%ige Zell Expression). Anzahl von AML-erkrankten Patienten aus dem HELIOS Klinikum Berlin-Buch (n=148).

4.1.3 Analyse der quantitativen Antigenexpressionen

Mit der quantitativen Analyse der Antigenexpression wird der prozentuale Anteil der Antigen exprimierenden Zellen im Blastengate erfasst. In Tabelle 6 ist die Anzahl der untersuchten Patienten (N), der Mittelwert (M) und die Standardabweichung (SD) des prozentualen Anteils der Antigen exprimierenden Zellen im Blastengate der CD25-negativen und der CD25-positiven Patienten vergleichend dargestellt. Die Auswertungen zeigen, dass die CD25 Expression mit der Expression von CD4, CD16, CD34, CD117 und Lactoferrin korreliert ist. CD4, CD16 und Lactoferrin werden bei CD25-negativen Patienten zu einem signifikant höheren Prozentsatz exprimiert als bei CD25-positiven Patienten (CD4 $p=0,027$, CD16 $p=0,049$ und Lactoferrin $p=0,042$). Der Prozentsatz der CD34 und CD117 exprimierenden Zellen war hingegen bei CD25-positiven Patienten signifikant höher als bei CD25-negativen Patienten (CD34 $p=0,032$ und CD117 $p=0,001$).

Tabelle 6. Vergleich des Prozentsatzes an Antigen exprimierenden Zellen im Blastengate bei CD25-positiven und CD25-negativen AML-Patienten. N: Anzahl der Patienten, M: Mittelwert, SD: Standard Deviation (Standardabweichung), n.s.: nicht signifikant und s.: signifikant ($p<0,05$).

Antigene	CD25-negativ			CD25-positiv			P-Wert
	N	M	SD	N	M	SD	
CD2	125	17,6	17,6	23	14,0	20,2	$p=0,382$ (n.s.)
CD3	125	15,1	15,3	23	9,4	9,1	$p=0,083$ (n.s.)
cyCD3	124	14,7	14,7	23	8,8	8,9	$p=0,068$ (n.s.)
CD4	125	14,7	19,7	23	5,4	5,2	$p=0,027$ (s.)
CD5	125	16,4	16,3	23	11,4	9,9	$p=0,160$ (n.s.)
CD7	125	24,0	22,2	23	28,6	24,3	$p=0,380$ (n.s.)
CD8	124	6,9	7,6	23	4,1	4,2	$p=0,094$ (n.s.)

CD10	125	4,6	9,4	23	4,7	16,0	p=0,966 (n.s.)
CD13	125	58,8	25,3	23	69,3	23,1	p=0,066 (n.s.)
CD14	125	10,1	12,6	23	5,5	8,1	p=0,095 (n.s.)
CD15	125	37,6	26,4	23	30,0	25,3	p=0,201 (n.s.)
CD16	124	8,6	8,2	23	5,1	5,6	p=0,049 (s.)
CD19	124	3,4	5,4	23	3,6	4,6	p=0,885 (n.s.)
CD20	125	3,0	5,2	23	2,4	3,2	p=0,604 (n.s.)
CD22	125	4,2	5,3	23	4,8	7,6	p=0,615 (n.s.)
cyCD22	121	3,1	4,6	23	2,6	2,7	p=0,658 (n.s.)
CD33	125	65,9	26,8	23	74,8	24,2	p=0,137 (n.s.)
CD34	125	26,5	22,8	23	38,1	27,4	p=0,032 (s.)
CD45	125	95,8	9,2	23	94,8	13,7	p=0,657 (n.s.)
CD56	125	17,8	21,5	23	13,9	22,0	p=0,427 (n.s.)
CD57	124	4,9	7,2	23,0	4,5	10,5	p=0,822 (n.s.)
CD61	124	6,7	8,0	23	10,9	18,2	p=0,074 (n.s.)
CD64	125	31,0	27,9	23	19,5	25,8	p=0,068 (n.s.)
CD65	125	32,8	27,5	23	30,2	24,7	p=0,672 (n.s.)
CD79a	124	3,2	4,9	22	4,6	9,4	p=0,318 (n.s.)

CD117	125	39,8	25,5	23	59,2	26,1	p=0,001 (s.)
Glya	124	2,1	3,5	23	1,0	0,9	p=0,150 (n.s.)
HLA-DR	125	47,1	25,2	23	50,9	31,3	p=0,531 (n.s.)
Kappa	125	1,8	2,6	23	2,1	3,7	p=0,660 (n.s.)
Moab7.1	125	3,6	13,7	23	1,2	1,7	p=0,410 (n.s.)
MPO	125	41,7	26,7	23	30,8	28,3	p=0,076 (n.s.)
Lambda	125	1,5	2,8	23	1,3	1,9	p=0,759 (n.s.)
Lactoferrin	125	7,2	9,8	23	2,8	4,7	p=0,042 (s.)
TdT	125	3,1	10,8	23	6,5	18,4	p=0,226 (n.s.)
TZRa/b	124	14,1	14,5	23	9,1	8,3	p=0,113 (n.s.)
TZRg/d	124	0,5	1,2	23	0,4	0,7	p=0,570 (n.s.)

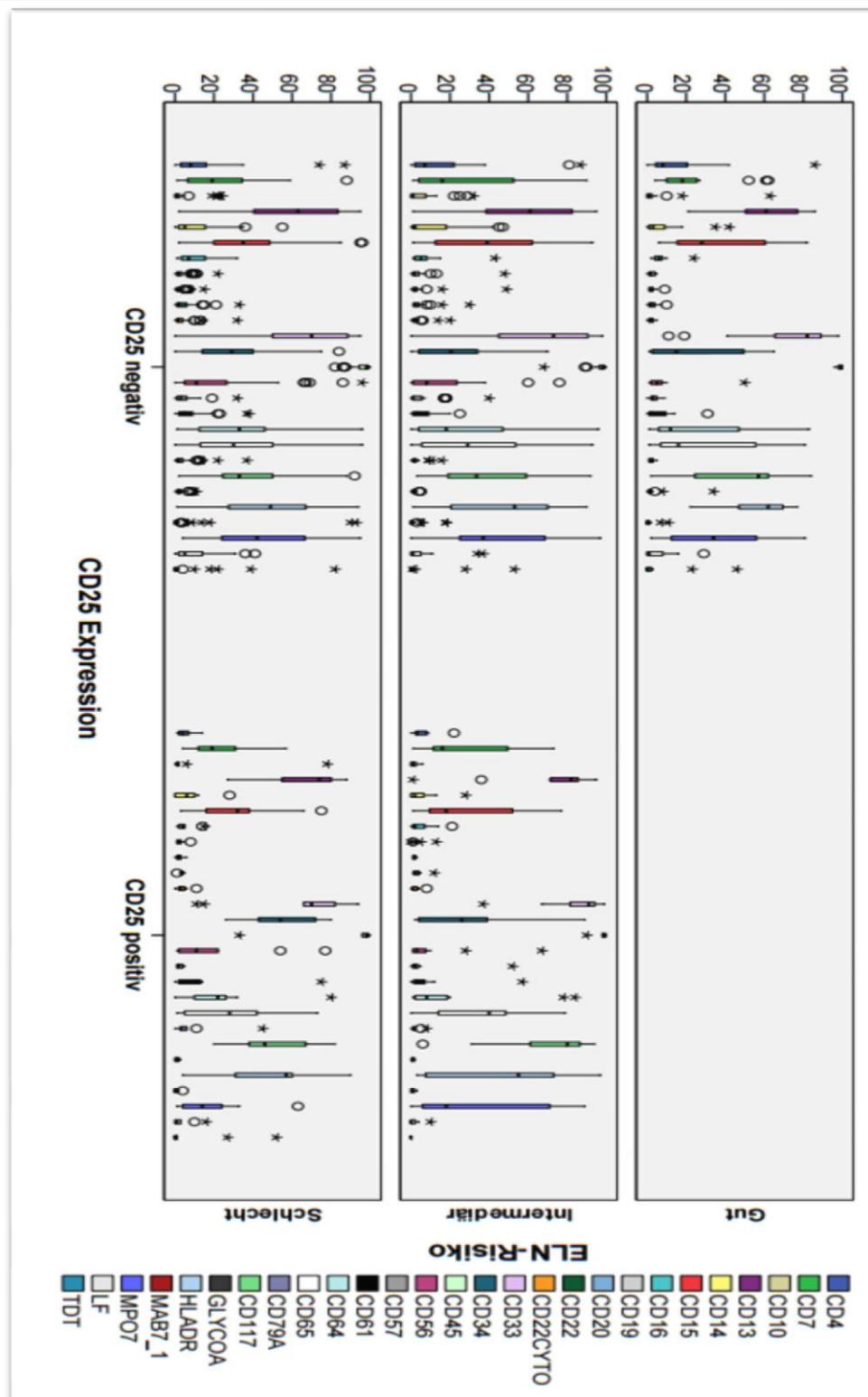


Abbildung 6. Boxplot Darstellungen des Prozentsatzes an Antigen exprimierenden Zellen und ihre Assoziation mit der CD25 Expression sowie der ELN-Klassifikation. Nach diesen Beobachtungen sind die CD25-positiven Patienten eher der intermediären oder der ungünstigen ELN-Risikogruppe zuzuordnen, denn es gab keine CD25-positiven Patienten in der günstigen ELN-Risikogruppe. Nach ELN-Kriterien haben die CD25-negativen Patienten eine gute Prognose. Dabei besteht eine signifikante Assoziation der Expression von CD25 Antigen mit den Antigenen CD4, CD16, CD34, CD117 und Lactoferrin.

4.1.4 Lebensalter und quantitative Blutbildparameter bei Diagnose in Abhängigkeit von der CD25 Expression

Neben dem Alter der Patienten wurden auch einige klinische Laborparameter, wie die Leukozyten- und Thrombozytenzahl, der Hb-Wert und die Zellzahl im CD45/SSC-Blastengate im Zusammenhang mit der CD25 Expression untersucht (s. Tabelle 7).

Bis auf die Anzahl der Blasten im CD45/SSC-Gate, ließ sich zwischen den CD25-negativen und CD25-positiven Patienten kein signifikanter Unterschied im Bezug auf die o.g. Parameter zeigen.

Die mittlere Anzahl der Blasten im CD45 vs. SSC-Gate bei den CD25-positiven Patienten (n=22) lag bei 63,0% wohingegen bei den CD25-negativen Patienten (n=121) mit 43,2% die Anzahl der Blasten signifikant geringer war. Der Prozentsatz an Blasten im CD45-SSC Blastengate war demnach bei CD25-positiven Patienten signifikant höher als bei CD25-negativen Patienten ($p=0,001$).

Tabelle 7. Vergleich von Hb, Alter, Leukozyten, Thrombozyten und Prozentsatz an Blasten im CD45/ side scatter (SSC) Blastengate bei CD25-positiven und CD25-negativen AML-Patienten. N: Anzahl der untersuchten Patienten, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, n.s.: Nicht signifikant und s.: Signifikant ($p<0,05$).

Parameter	CD25+/-	N	M	SD	SF	RSS	p-Wert
Alter	CD25 +	23	60,3	20,31	4,2	49257,0	p=0,151
	CD25 -	124	66,3	18,07	1,6	708,4	(n.s.)
	Gesamt	147	65,4	18,5	1,5		
Hb (g/dl)	CD25 +	23	9,1	2,3	0,5	536,9	p=0,896
	CD25 -	121	9,0	1,9	0,2	0,07	(n.s.)
	Gesamt	144	9,0	1,9	0,2	537,0	
Leukozyten (Gpt/l)	CD25 +	23	51,0	58,0	12,1	534726,0	p=0,441
	CD25 -	121	40,3	61,9	5,6	2246,1	(n.s.)
	Gesamt	144	42,0	61,2	5,1	536972,1	
Thrombozyten Gpt/l	CD25 +	23	72,4	64,1	13,4	926465,9	p=0,842

	CD25 -	121	76,1	83,4	7,6	261,0	(n.s.)
	Gesamt	144	47,5	80,5	6,7	926726,9	
% Zellen im CD45/SCC- Blastengate	CD25 +	22	63,0	21,3	4,5	96377,3	p=0,001
	CD25 -	121	43,2	26,9	2,4	7335,8	(s.)
	Gesamt	143	46,2	27,0	2,3	103713,1	

4.1.5 Qualitative Analyse der Antigenexpression und ihre Assoziation mit der CD25 Expression

Bei der qualitativen Analyse der Antigenexpression wird anhand des Grenzwertes von $\geq 20\%$ zwischen einer positiven ($\geq 20\%$) und einer negativen Expression des jeweiligen Antigens unterschieden [27, 32]. Für die membranständigen Antigene ist der Grenzwert von $\geq 20\%$, für die intrazytoplasmatischen Antigene (MPO und Lactoferrin) der Grenzwert von $\geq 10\%$ festgelegt [42, 43]. Die vorliegende Tabelle (s. Tabelle 8) vergleicht die qualitative Expression (positiv/negativ) aller untersuchten Antigene zwischen den CD25-positiven und den CD25-negativen Patienten.

Von insgesamt 148 Patienten zeigten 125 Patienten (84,5%) keine Expression von CD25. Bei 23 Patienten (15,5%) ließen sich CD25-positive Zellen nachweisen. 119 der 148 Patienten (80,4%) waren CD4-negativ ($< 20\%$) und nur 29/148 Patienten (19,6%) waren CD4-positiv. 28/125 (22,4%) der CD25-negativen Patienten waren CD4-positiv und nur 1/23 (4,3%) der CD25-positiven Patienten zeigten gleichzeitig eine CD4 Expression. Damit kann festgehalten werden, dass eine CD4 Expression signifikant häufiger bei CD25-negativen als bei CD25-positiven Patienten vorkommt ($p=0,048$).

124/148 (83,8%) Patienten wiesen eine Expression von MPO7 auf. 109 der insgesamt 125 CD25-negativen Patienten (87,2%) und 15 von 23 der CD25-positiven Patienten (65,2%) zeigten eine MPO7-Expression. Diese Zahlen zeigen erneut, dass die MPO7 Antigenexpression signifikant häufiger bei CD25-negativen Patienten als bei CD25-positiven Patienten vorkommt ($p=0,014$).

Zwischen anderen Antigenexpressionen, wie CD7 ($p=0,82$), CD10 ($p=0,69$), CD13 ($p=0,7$), CD14 ($p=0,53$), CD15 ($p=0,24$), CD16 ($p=0,69$), CD33 ($p=1$), CD34 ($p=0,25$), CD45 ($p=1$), CD57 ($p=1$), CD61 ($p=0,65$), CD64 ($p=0,07$), CD65 ($p=0,82$), CD117

($p=0,1$), glya ($p=1$), MAB7.1 ($p=1$), Lactoferrin ($p=0,2$) und HLA-DR ($p=0,54$) konnte kein vergleichbar signifikantes Ergebnis und damit auch keine vergleichbare Assoziation mit der CD25 Expression beobachtet werden.

Tabelle 8. Vergleich der Antigenexpression bei CD25-positiven und CD25-negativen Patienten mit einer dichotomen 2 x 2 Kontingenztabelle. Die Werte in der Tabelle zeigen, dass eine signifikante Assoziation zwischen CD25 Expression mit CD4 und MPO7 besteht. So wurden CD4 ($p=0,048$) und MPO7 ($p=0,014$) vermehrt auf CD25-negativen Zellen exprimiert. Bei anderen Antigenen konnte in den Untersuchungen keine Assoziation bzw. kein signifikantes Ergebnis festgestellt werden ($p<0,05$).

Antigen-Expression (cut-off $\geq 20\%$)	CD25 Expression		p-Wert
	CD25-negativ n=125	CD25-positiv n=23	
CD4+	28	1	$p=0,048$
CD4-	97	22	
CD7+	58	10	$p=0,82$ (n.s.)
CD7-	67	13	
CD10+	12	1	$p=0,69$ (n.s.)
CD10-	113	22	
CD13+	112	22	$p=0,7$ (n.s.)
CD13-	13	1	
CD14+	21	2	$p=0,53$ (n.s.)
CD14-	104	21	
CD15+	82	12	$p=0,24$ (n.s.)
CD15-	43	11	
CD16+	11	1	$p=0,69$ (n.s.)
CD16-	113	22	
CD33+	114	21	$p=1$ (n.s.)
CD33-	11	2	
CD34+	69	16	$p=0,25$ (n.s.)
CD34-	56	7	

CD45+	124	23	p=1 (n.s.)
CD45-	1	0	
CD57+	5	1	p=1 (n.s.)
CD57-	119	22	
CD61+	8	2	p=0,65 (n.s.)
CD61-	116	21	
CD64+	64	7	p=0,07 (n.s.)
CD64-	61	16	
CD65+	72	14	p=0,82 (n.s.)
CD65-	53	9	
CD117+	94	21	p=0,1 (n.s.)
CD117-	31	2	
Glya+	1	0	p=1 (n.s.)
Glya-	123	23	
MAB7.1+	3	0	p=1 (n.s.)
MAB7.1-	122	23	
MPO7+	109	15	p=0,014 (s.)
MPO7-	16	8	
Lactoferrin+	13	0	p=0,2 (n.s.)
Lactoferrin-	112	23	
HLA-DR+	105	18	p=0,54 (n.s.)
HLA-DR-	20	5	

4.2 Kategorische Parameter und CD25 Antigenexpression

Des Weiteren wurden die Parameter Geschlecht, FAB-Klassifikation, Molekulargenetik, Zytogenetik, ELN-Risikoklasse und Induktionstherapie bzw. Induktionsergebnis im Hinblick auf deren Verhältnis zur CD25 Expression untersucht.

4.2.1 Geschlecht und CD25 Expression

Von 75 männlichen Patienten zeigten acht (10,7%) eine CD25 Expression und 89,3% (n=67) keine CD25 Expression. Insgesamt waren von den CD25-positiven Patienten 34,8% (n=8) männlich.

Von den 73 weiblichen Patienten waren 58 (79,5%) CD25-negativ und 15 (20,5%) CD25-positiv. Damit war der relative Anteil von CD25-positiven Patienten bei den Frauen zwar fast doppelt so hoch, blieb aber ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Geschlechtern ($p=0,24$).

Tabelle 9. Geschlecht und CD25 Expression. Alle 148 Patienten wurden nach Geschlecht und CD25 Expression unterteilt ($p=0,24$). M: Männlich (n=75), W: Weiblich (n=73).

Geschlecht	CD25 Expression	
	CD25-negativ n=125	CD25-positiv n=23
M	67	8
W	58	15

4.2.2 Zytomorphologische-Klassifikation und CD25 Expression

In Tabelle 1 wurde die FAB-Klassifikation dargestellt (s. Abschnitt 1.2.1). Die zytomorphologische Beurteilung gemäß FAB-Klassifikation in Abhängigkeit von der CD25 Expression ist in Tabelle 10 zusammengefasst. Hier wurden auch die Patienten mit Übergang von AML/MDS, MDS, Übergang von MDS/MPN und CML erfasst. Von den 148 untersuchten Patienten konnten allerdings neun Patienten wegen fehlender

Information nicht zytomorphologisch klassifiziert werden. Von den verbliebenen 139 nach FAB (M0-M7) klassifizierten Patienten waren: (10/139) 7,2% M0, (1/139) 0,7% Übergang MDS/M1, (20/139) 14,4% M1, (1/139) 0,7% Übergang M1/M2, (29/139) 20,9% M2, (1/139) 0,7% Übergang M2/CML, (7/139) 5% M3, (15/139) 10,8% M4, (6/139) 4,3% M5, (7/139) 5% M5a, (3/139) 2,1% M5b, (3/139) 2,1% M6 und (3/139) 2,1% M7.

Bei 20% der M0-, 30% der M1-, 10,3% der M2-, 42,9% der M3-, 6,7% der M4-, 33,3% der M5- und 33,3% der M7-Patienten konnte eine CD25 Expression im Blastengate nachgewiesen werden. Hingegen waren alle Patienten mit MDS/M1, M1/M2, MDS/M2, M2/CML, M5a, M5b und M6 CD25 negativ (siehe Tab.10). Ein signifikanter Unterschied im Bezug auf die CD25 Expression konnte aber zwischen den zytomorphologischen Gruppen nicht nachgewiesen werden ($p=0,69$).

Tabelle 10. Zytomorphologische-Klassifikation und CD25 Expression. Von 148 Patienten konnten 139 nach FAB-Klassifikation und CD25 Expression unterteilt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den CD25-positiven und CD25-negativen Patienten hinsichtlich der zytomorphologischen Klassifikation bestand nicht ($p=0,69$). Bei neun von 148 Patienten gab es zwar eine durchflusszytometrische Bestätigung der AML, aber es lag keine Information zur zytomorphologischen Klassifikation vor.

Zytomorphologische-Klassifikation	CD25 Expression	
	CD25-negativ n=118	CD25-positiv n=21
AML (ohne FAB)	8	0
AML/MDS	7	1
MDS	10	2
MDS/MPN	2	0
CML	1	0
M0	8	2
M1	14	6
MDS/M1	1	0

M1/M2	1	0
M2	26	3
MDS/M2	2	0
M2/CML	1	0
M3	4	3
M4	14	1
M5	4	2
M5a	7	0
M5b	3	0
M6	3	0
M7	2	1

4.2.3 Molekulargenetik und CD25 Expression

Die in verschiedenen zytogenetischen und molekulargenetischen Laboren erhobenen Befunde zu Aberrationen, Deletionen und Mutationen wurden zusammengestellt und in Bezug zu den beiden Patientengruppen entsprechend der CD25 Expression deskriptiv dargestellt (s. Tabelle 11). 69 von 148 und damit 46,6% der Patienten konnten hierbei wegen fehlender Information nicht in diese Auswertung einbezogen werden. Bei der Aufstellung muss berücksichtigt werden, dass es über den retrospektiven Beobachtungszeitraum von mehr als 10 Jahren kein standardisiertes molekulargenetisches Untersuchungspanel gab und die Befunde auch nicht nur in einem, sondern in mehreren Laboren erhoben wurden.

Insgesamt stellt sich daher ein sehr heterogenes Bild dar, dass keine Korrelation zum CD25 Expressionsstatus zulässt, aber trotz alledem eine Zuordnung zu der ELN Risikoklassifikation ermöglicht.

Tabelle 11. Molekulargenetik und CD25 Expression. 148 an AML-erkrankte Patienten wurden nach Molekulargenetik und CD25 Expression unterteilt ($p=0,134$). 69 von diesen Patienten konnten wegen fehlender Information nicht berechnet werden ($n=79$). +: Mutation, -: Keine Mutation.

Molekulargenetik	CD25 Expression	
	CD25-negativ n=63	CD25-positiv n=16
BCR-ABL+	0	1
BCR-ABL-/JAK2-	1	0
C-MYC+	1	0
CBFM-MYH11+/FLT3-/NPM1-	1	0
CEBPA+	1	0
FLT3-/NPM1-/CEBPA-/RUNX1-	0	1
FLT3-/NPM1-/CEBPA+ (biallelisch)	1	0
FLT3-	2	0
FLT3+	1	0
FLT3+/NPM1+/MLL-	7	2
FLT3-ITD+ (Ratio 3,023)/CEBPA+/NPM1-/P53+	1	0
FLT3-LM/RUNX1+/NPM1-/CEBPA- /MLL-PTD-	0	1
FLT3-/MLL-PTD-	1	0
RUNX1-	1	0
BCR-ABL-/JAK-2 (V617F+)	1	0
MLL-	3	1

MLL-/NPM1-/FLT3-	8	1
NPM1+	4	0
NPM1+/FLT3-	7	1
NPM1+/FLT3+	5	1
NPM1+/FLT3-/MLL-/JAK2-	1	0
NPM1+/FLT3+/MLL-PTD-	0	1
NPM1-/FLTLM-/FLT-ITD-/MLL-/ CEBPA-	1	0
NPM1-/FLT3-	4	1
NPM1+/FLT3+/FLT-ITD-/MLL-	1	0
NPM1-/FLT3+	1	1
NPM1-/MLL-	1	0
PML-RAR α	2	3
RUNX1+	2	0
RUNX1+/NPM1-/FLT3-/BCR-ABL- /JAK2 (V617F-)/MPL-W515- /Calreticulin-/CSF3R-	1	0
RUNX1+/NPM1+	1	0
JAK-2 (V617F+)	2	0
WT1+/FLT3-ITD+/MLL-	0	1

4.2.4 ELN-Risikoklassen und CD25 Expression

Die vorliegenden molekulargenetischen und zytogenetischen Daten ermöglichten bei 128 Patienten eine Zuordnung zu den ELN-Risikoklassen.

Von den 19 Patienten (14,8%) mit einer günstigen ELN-Prognose ließ sich bei keinem eine CD25 Expression nachweisen ($p=0,047$). Wohingegen von den 46 Patienten (36%) mit intermediärer ELN-Prognose 73,9% ($n=34$) CD25-negativ und 26,1% ($n=12$) CD25-positiv waren. Die 63 Patienten mit ungünstiger ELN-Prognose (49,2%) wiesen zu 85,7% ($n=54$) keine CD25 Expression auf und waren zu 14,3% ($n=9$) CD25 positiv. Damit war der relative Anteil CD25-positiver Patienten in der intermediären ELN-Risikogruppe mit 26,1% fast doppelt so hoch wie in der ungünstigen ELN Risikogruppe mit 14,3%. In der günstigen Risikogruppe gab es keinen Patienten mit Expression von CD25.

Tabelle 12. ELN-Risikoklassen und CD25 Expression. 128 an AML-erkrankte Patienten wurden nach ELN-Risikoklassen und CD25 Expression unterteilt ($p=0,047$). 20 von 148 der Patienten konnten wegen fehlender Information nach ELN nicht eingestuft werden.

ELN-Risikogruppe	CD25 Expression	
	CD25-negativ $n=107$	CD25-positiv $n=21$
Günstig	19	0
Intermediär	34	12
Ungünstig	54	9

4.2.5 Zytogenetik, MRC-Risikogruppe und CD25 Expression

In Tabelle 13 wurde die CD25 Expression der untersuchten Patienten im Zusammenhang mit der Zytogenetik und der daraus abgeleiteten MRC Risikogruppe (s. Tabelle 5) dargestellt. Allerdings konnten 51/148 (34,4%) der Patienten wegen fehlender Informationen zur Zytogenetik, oder wegen nicht durchgeführter zytogenetischer Untersuchung nicht berücksichtigt werden. Bei den verbleibenden 97 Patienten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen zytogenetischen Veränderungen und der CD25 Expression nachgewiesen.

Tabelle 13. Zytogenetische MRC-Kriterien und CD25 Expression [59]. 97 AML-erkrankte Patienten wurden nach Zytogenetik und CD25 Expression unterteilt (p=0,067). Für diese Patienten wurde anhand von Tabelle 5 die jeweilige MRC Risikogruppe bestimmt. 51 von 148 der Patienten konnten wegen fehlender Information nicht eingestuft werden. t: Translokation, del: Deletion, inv: Inversion, r: Ring Chromosom, der: Derivat und i: Isochromosom.

Zytogenetik	CD25 Expression		MRC-Risikogruppe
	CD25-negativ n=78	CD25-positiv n=19	
47,XX,+8/46,XX,t(2;10;14)(p23;q23;q11), t(10;12)(q24;q24),del(14),t(14;17) (q32;q22),r(18)(p11q12)[13]/46,XX,[7]	1	0	Intermediär
45,XX,-7,t(3;3)(q21;26)[11]	1	0	Ungünstig
45,XY,-7	1	0	Ungünstig
45,X,-X	1	0	Intermediär
45,XY,-7,del(20)(q11q13)/46,XY,+X,-7,del(20) (q11q13)/46,XY	1	0	Ungünstig
45,XX,inv(3)(q21q26),-7(23)	0	1	Ungünstig
46,XX	14	4	Intermediär
46,XY	22	3	Intermediär
46,XX,del(12p)	0	1	Intermediär
46,XY,[15]	1	0	Intermediär
46,XX,t(3;7)(q21;q34)[19]/ 46,XX,t(3;7)(q21;q34),+9[2]	0	1	Intermediär
46,XY,t(11;19)(q23;p13)/ 46,XY,del(6)(p22~23),t(11;19)(q23;p13)	1	0	Intermediär

46,XX,[20]	1	1	Intermediär
46,XX,[3]/45,XX,t(3;11)(q21;p14),-7[17]	1	0	Ungünstig
46,XX,del(1)(5)	0	1	Ungünstig
46,XX,t(3;12)	1	0	Intermediär
46,XX,der(19),t(17; 19)(p13;q21)[4]/ 46,XX,[16]	1	0	Intermediär
46,XY/46,XY,+8	1	0	Intermediär
46,XX,der(3),del(3)(q2?), del(7)(p1?),del(20)(?)[7]	1	0	Ungünstig
46,XX,inv(16)(p13;q22)	1	0	Intermediär
46,XX,t(15;17)(q22;q12)	1	0	Günstig
46,XY,i(14)(q10)	1	1	Intermediär
46,XX,t(15;17)	1	0	Günstig
46,XX,r(8)(p11q12),der(10),t(8;10)(q12;p13)(17)/ 46,XX,(3)	1	0	Intermediär
46,XX,[21]	1	0	Intermediär
46,XY,t(15;17)(q24; q21)(7)/46,XY,(13)	1	0	Intermediär
47,XY,+14/46,XY,+14,-7	1	0	Ungünstig
47,XX,+8	1	0	Intermediär
47,XY,+8	1	1	Intermediär
47,XY,+19/46,XY	0	1	Intermediär
Komplex aberranter Karyotyp	17	2	Ungünstig
del(5)(7)	0	1	Ungünstig

t(15;19),t(16;18),t(20;21)	1	0	Intermediär
t(2;11),-7	0	1	Ungünstig
46,XY,t(6;11)(q27;q23)	1	0	Ungünstig

Den zytogenetischen Risikogruppen wurden gemäß der MRC-Kriterien [59] nur 97/148 Patienten (65,5%) zugeordnet, da die restlichen 51 Patienten wegen fehlender Informationen zur Zytogenetik in dieser Erhebung nicht berücksichtigt werden konnten.

In dem Tortendiagramm in Abbildung 7 wurden die Risikogruppen zusammengefasst. 49% der untersuchten Patienten zeigten einen normalen Karyotyp. Die restlichen Patienten wurden anhand der MRC-Kriterien in drei zytogenetische Risikogruppen eingeteilt. 31% der Patienten wiesen eine ungünstige-, 14% der Patienten eine Intermediäre- und 5% eine günstige Prognose auf:

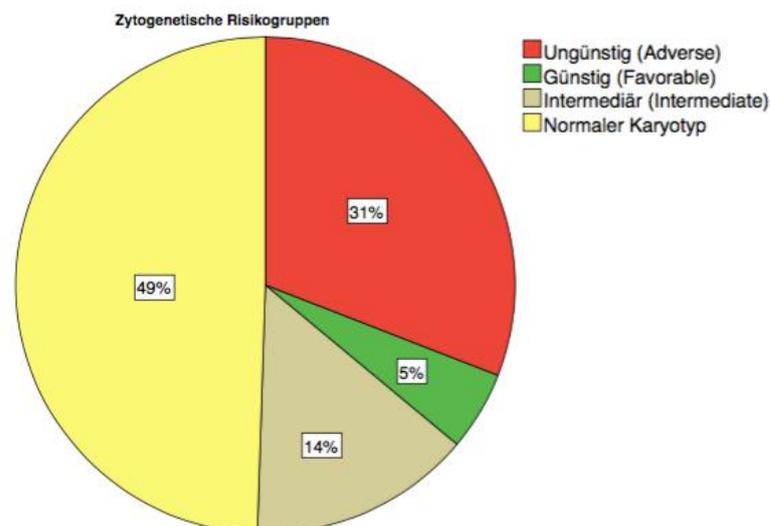


Abbildung 7. Häufigkeit der MRC-Risikogruppen der Patienten bei denen ein zytogenetischer Befund erhoben werden konnte (n=97): Normaler Karyotyp 49%, Karyotyp mit günstiger Prognose 5%, Karyotyp mit intermediärer Prognose 14% und Karyotyp mit ungünstiger Prognose 31%.

Mit Hilfe von Kaplan-Meier Analysen wurde die nach MRC-Kriterien stratifizierte Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten berechnet. Dabei wurden die Patienten mit normalem Karyotyp mit den drei weiteren prognostischen Risikogruppen nach MRC-

Kriterien verglichen. Die Patienten in der günstigen Risikogruppe zeigten dabei erwartungsgemäß eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit und wiesen eine bessere Prognose auf als die Patienten in der intermediären und der ungünstigen Risikogruppe.

Nach vier Jahren wiesen die Patienten mit einem normalen Karyotyp eine kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit von ca. 50% auf. Diese Patienten hatten damit eine bessere Prognose und eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als die Patienten in der intermediären und der ungünstigen Risikogruppe, aber eine deutlich schlechtere Prognose und eine niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zur günstigen Risikogruppe nach etwas mehr als eineinhalb Jahren. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand jedoch nicht (n.s.).

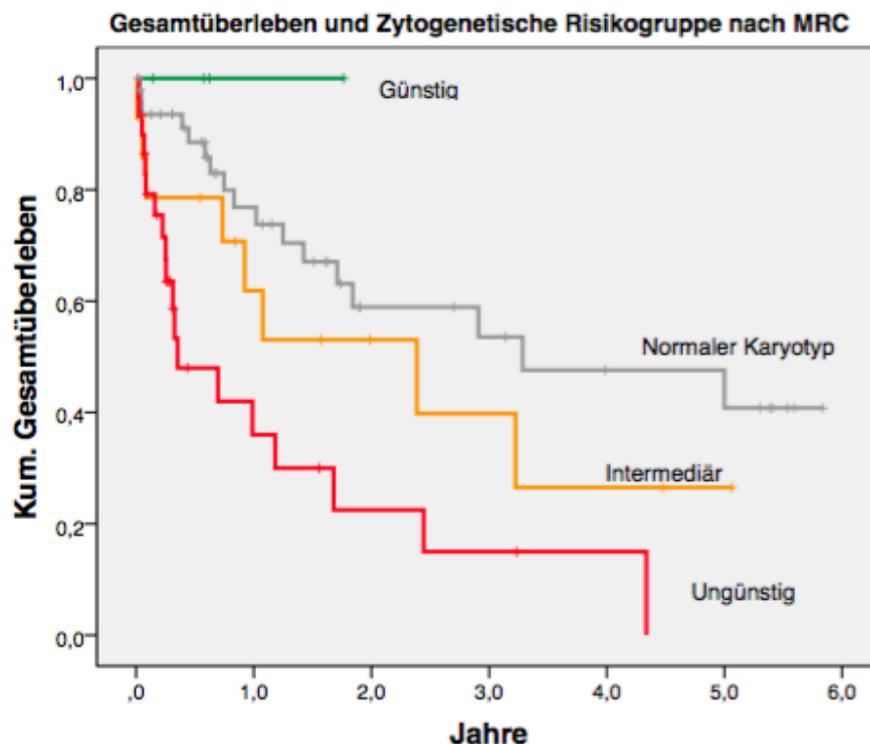


Abbildung 8. Gesamtüberleben und zytogenetische Risikogruppen nach MRC-Klassifikation (n=97).

4.2.6 Induktionstherapie und CD25 Expression

Viele unterschiedliche Induktionsregime kamen in Abhängigkeit von Alter, Begleiterkrankung, Krankheitsentität und Allgemeinzustand des Patienten zum Einsatz.

Eine definitive Zuordnung, bzw. Korrelation zur CD25 Expression ließ sich aber nicht erkennen, so dass lediglich eine deskriptive Darstellung erfolgen konnte.

Die Patienten, die mit den folgenden Therapieregimen behandelt wurden, exprimierten kein CD25 auf ihren Leukämie Zellen: AIDA, AraC + MTX, ATRA + Idarubicin, Cytarabin + Daunorubicin, Cytarabin + Mitoxantron, Daunorubicin, Decitabin, FLAG-IDA und Home-care. Nur die zwei Patienten, die nach dem „7+3“-Schema behandelt wurden, waren CD25-positiv.

Bei den mit den Induktionstherapien 5-Azacitidin, AraC, HAM, S-HAM, TAD-9 und TAD-HAM behandelten Patienten gab es sowohl CD25-positive, als auch CD25-negative. Obwohl durch die genannten Therapien mehr CD25-negative Patienten behandelt wurden (s. Tabelle 14) ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied nicht nachweisen ($p=0,417$).

Tabelle 14. Induktionstherapie und CD25 Expression. 148 AML Patienten wurden nach Induktionstherapie und CD25 Expression unterteilt ($p=0,417$). 30% (44/148) der untersuchten Patienten konnten wegen fehlender Information zur durchgeführten Therapie nicht bewertet werden ($n=104$).

Induktionstherapie	CD25 Expression	
	CD25-negativ n=86	CD25-positiv n=18
7+3-Schema	0	2
5-Azacitidin	13	2
AIDA	3	0
AraC	8	1
AraC+ MTX	1	0
ATRA+Idarubicin	1	0
Cytarabin+Daunorubicin	1	0
Cytarabin+Mitoxantron	1	0
Daunorubicin	2	0

Decitabin	4	0
FLAG-IDA	1	0
HAM	20	6
Home-care	1	0
S-HAM	18	4
TAD-9	8	2
TAD-HAM	3	1

4.2.7 Induktionsergebnis und CD25 Expression

Hier konnte bei der retrospektiven Datenerhebung nur bei etwa der Hälfte der Patienten ein Remissionsergebnis erhoben werden. Von den 84 Patienten bei denen ein Remissionsergebnis erhoben werden konnte, waren 78,6% (n=66) CD25-negativ und 21,4% (n=18) CD25-positiv. Unter der Induktionstherapie zeigten 23 (34,8%) der CD25-negativen Patienten zunächst eine blastenfreie Aplasie. Nach Abschluss der Induktion bestand bei 15 (22,7%) der CD25-negativen Patienten eine CR und bei 4 (6%) eine inkomplette Remission (CRi). Ein Rezidiv bzw. eine Blastenpersistenz fand sich bei 4 (6%), respektive bei 15 (22,7%) der CD25-negativen Patienten. Bei den CD25-positiven Patienten war im Vergleich zu den CD25-negativen Patienten der relative Anteil blastenfreier Aplasien nach Induktionstherapie mit 22,2% (n=4) versus 34,8% (n=23) deutlich niedriger und mehr als doppelt so viele Patienten 61,1% (n=11) versus 22,7% (n=15) hatten eine Blastenpersistenz ($p=0,021$).

Tabelle 15. Induktionsergebnis und CD25 Expression. 84 Patienten wurden nach Induktionsergebnis und CD25 Expression unterteilt (p=0,021). Wegen fehlender Informationen konnten 43,2% der untersuchten Patienten nicht nach dem Induktionsergebnis bewertet werden.

Induktionsergebnis	CD25 Expression	
	CD25-negativ n=66	CD25-positiv n=18
Blastenfreie Aplasie	23	4
CR	15	1
CRi	4	0
Blastenpersistenz	15	11
Punctio sicca	2	0
Reaktive Veränderungen	1	0
Rezidiv	4	1
Subtotale-Infiltration	1	0
Therapie-Unterbrechung	0	1
Totale-Infiltration	1	0

4.3 Überlebenswahrscheinlichkeit

4.3.1 Überlebenswahrscheinlichkeit nach ELN-Risikoklassen

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der nach den ELN-Risikoklassen stratifizierten Patienten wurde mithilfe der Kaplan-Meier Analysen berechnet. 14,2% (21/148) der Patienten konnten aufgrund fehlender Zytogenetik nicht nach ELN-Risikoklassen stratifiziert werden. Die verbleibenden Patienten (n=127, 85,8%) wurden den drei Risikogruppen günstig, intermediär und ungünstig zugeordnet. 19/127 (15,0%) der Patienten befanden sich in der günstigen, 45/127 (35,4%) der Patienten in der intermediären und 63/127 (49,6%) der Patienten in der ungünstigen ELN- Risikoklasse. Die Mehrheit der Patienten befand sich somit also in der ungünstigen Risikoklasse.

Insgesamt waren 63/127 (49,6%) der Patienten zum Zeitpunkt der retrospektiven Datenerhebung verstorben.

Das mediane Gesamtüberleben der 19 Patienten in der günstigen ELN-Risikoklasse, der 45 Patienten in der intermediären Risikogruppe und der 63 Patienten mit dem ungünstigen Risiko betrug $3,8 \pm 1,3$ Jahre, $2,6 \pm 0,85$ und $2,4 \pm 1,4$ Jahre.

Nach fünf Jahren wiesen die Patienten mit der günstigen ELN Prognose eine kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit von 45%, die der intermediären Gruppe von 37% und die der ungünstigen Gruppe von 13,5% auf. Mit einer deutlichen Signifikanz von $p=0,005$ konnte auch an dieser Patientenkohorte bestätigt werden, dass die Patienten in der günstigen ELN-Risikogruppe eine längere Überlebenswahrscheinlichkeit und eine bessere Prognose aufwiesen als die Patienten in einer intermediären ELN-Risikoklasse und letztere wiederum eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit bzw. Prognose im Vergleich zu Patienten in der ungünstigen ELN-Risikoklasse hatten.

Tabelle 16. Gesamtüberleben und Kumulativüberleben aller Patienten, die nach ELN-Risikoklassen eingeteilt wurden (n=127). Die Gesamtgruppe wurde in eine günstige, eine intermediäre und eine ungünstige ELN-Risikoklasse eingeteilt. Der Mittelwert und der Medianwert zum Gesamtüberleben der Patienten wurden in Jahren berechnet. (SF: Standardfehler).

ELN-Risiko	Anzahl der Patienten	Mittelwert von Gesamtüberleben in Jahren (Zeitspanne)	SF	Medianwert von Gesamtüberleben in Jahren (Zeitspanne)	SF	p-Wert
Gesamt	127	3,8 (2,7 – 4,9)	0,67	1,25 (0,6 – 1,8)	0,32	$p=0,005$
Günstig	19	3,8 (2,5 – 5,1)	0,42	5		
Intermediär	45	2,6 (1,8 – 3,5)	0,71	1,7 (0,8 – 2,5)	0,44	
Ungünstig	63	2,4 (1 – 3,8)	0,67	0,36 (0 – 1)	0,35	

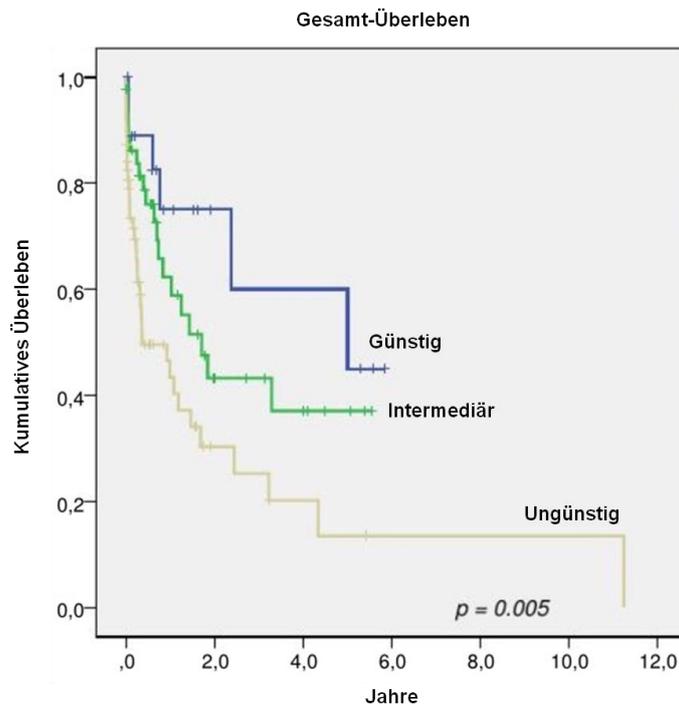


Abbildung 9. Kaplan-Meier Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeiten in den drei ELN-Risikoklassen. Die Patienten wurden der günstigen, der intermediären oder der ungünstigen ELN-Risikoklasse zugeordnet. Von den insgesamt 127 klassifizierbaren Patienten gehörten 19 (15%) zur günstigen Risikoklasse, 45 (35,4%) zur intermediären Risikoklasse und 63 (49,6%) zur ungünstigen Risikoklasse.

4.3.2 Überlebenswahrscheinlichkeit nach CD25 Expression

In Tabelle 17 und Abbildung 10 wurde die Gesamt-Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten nach der CD25 Expression stratifiziert und mithilfe von Kaplan-Meier Analysen dargestellt. Die Patienten mit mehr als 20% CD25-positiven Zellen im Blastengate wurden als positiv und die Patienten, die weniger als 20% CD25-positive Zellen aufwiesen, wurden als CD25-negativ bezeichnet.

Von den insgesamt 147 Patienten zeigten nur 22 (15%) eine positive CD25 Expression und 125 Patienten (85%) keine CD25 Expression im Blastengate. Ein Patient konnte wegen fehlender Informationen nicht in die Auswertung mit einbezogen werden.

Die CD25-positiven Patienten zeigten beim Gesamtüberleben einen Mittelwert von 1,46 Jahren (Zeitspanne von 0,7 – 2,2) und die CD25-negativen Patienten einen Mittelwert von 4,2 Jahren (Zeitspanne von 3 – 5,4).

Die kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit von CD25-positiven Patienten betrug 26% und die von CD25-negativen Patienten 30%. Ein signifikanter Unterschied zwischen den CD25-positiven und CD25-negativen Patienten ergab sich nicht ($p=0,140$).

Tabelle 17. Gesamtüberleben und Kumulativüberleben aller Patienten, die nach CD25 Expression auf der Zelloberfläche eingeteilt wurden (n=147). Die Patienten wurden in CD25-positive und CD25-negative Patientengruppen eingeteilt. Der Mittelwert und der Median zum Gesamtüberleben der Patienten wurde in Jahren berechnet. (SF: Standardfehler).

CD25 Expression	Anzahl der Patienten	Mittelwert von Gesamtüberleben in Jahren (Zeitspanne)	SF	Medianwert von Gesamtüberleben in Jahren (Zeitspanne)	SF	p-Wert
Gesamt	147	4 (2,9 – 5)	0,56	1,4 (0,7 – 2,1)	0,34	$p=0,140$
CD25 positiv	22	1,46 (0,7 – 2,2)	0,38	0,83 (0,14 – 1,5)	0,35	
CD25 negativ	125	4,2 (3 – 5,4)	0,61	1,6 (0,6 – 2,7)	0,55	

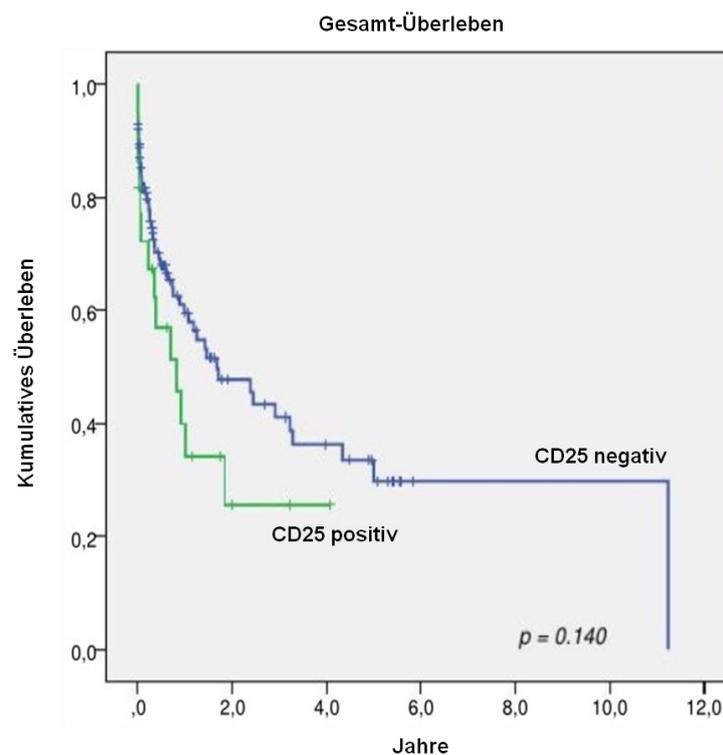


Abbildung 10. Kaplan-Meier Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit von CD25-negativen (n=125) und CD25-positiven (n=22) Patienten mit AML ($p=0,140$).

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat in einer retrospektiven Datenerhebung von klinischen, zytogenetischen, molekulargenetischen und durchflusszytometrischen Befunden die Bedeutung der CD25 Expression bei Patienten mit AML analysiert. Dabei wurde untersucht, ob die CD25 Expression mit der Expression weiterer, durchflusszytometrisch bestimmter Antigene, der zytomorphologischen FAB-Klassifikation, der ELN-Risikoklasse, der Molekulargenetik, der Zytogenetik, weiterer Laborparameter der klinischen Chemie sowie dem Geschlecht korreliert und/ oder assoziiert ist und ob sich hierdurch eine prognostische Relevanz der CD25 Expression bei AML Patienten ableiten lässt.

Die Bedeutung der CD25 Expression bei AML Patienten und seine prognostische Relevanz wurde bisher nur wenig untersucht [62]. In Genexpressionsanalysen konnte aber ein Zusammenhang der CD25 Antigen-Expression (IL-2-Rezeptor- α) mit der AML-Erkrankung bestätigt werden [62–64]. Um den Einfluss der CD25 Expression auf den Krankheitsverlauf von AML Patienten, sowie die Prognose der AML-Erkrankung zu untersuchen und zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit pB und/ oder KM von 148 Patienten des HELIOS Klinikums Berlin-Buch mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Von den 148 untersuchten AML Patienten wiesen 23/148 Patienten (15,5%) eine CD25 Antigenexpression auf. Diese Patienten wurden als CD25-positive Patientengruppe bezeichnet. 125/148 Patienten (84,5%) wiesen keine CD25 Expression auf. Sie wurden als CD25-negative Patientengruppe bezeichnet.

Die folgenden weiteren Antigene wurden ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert: CD2, CD3, cyCD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, cyCD22, CD25, CD33, CD34, CD45, CD56, CD57, CD61, CD64, CD65, CD79a, CD117, CD235a, HLA-DR, Kappa, Moab7-1, MPO7, Lambda, Lactoferrin, TdT, TZRab, TZRgd und hinsichtlich ihrer Assoziation zur CD25 Expression untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass eine positive CD4 ($p=0,048$) und MPO7 ($p=0,014$) Expression bei CD25-negativen Patienten häufiger vorkommt als bei CD25-positiven Patienten und somit eine signifikante Korrelation in der Expression dieser Antigene besteht. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in der CD25-positiven

Patientengruppe eine signifikant höhere Anzahl von Blasten im CD45/SSC-Gate nachweisbar ist ($p=0,001$). Weitere Laborparameter, wie z.B. der Hb-Wert und die Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten wurden ebenfalls im Zusammenhang mit der CD25 Expression gemessen und miteinander verglichen. Bei der CD25-positiven Patientengruppe wurde ein höherer Hb-Wert und mehr Leukozyten, dafür aber weniger Thrombozyten gegenüber der CD25-negativen Patientengruppe gemessen. Es konnte jedoch kein eindeutig signifikanter Unterschied zwischen beiden Patientengruppen im Hinblick auf die genannten Parameter nachgewiesen werden.

Es bestand ebenfalls eine signifikante Assoziation zwischen der CD25 Expression und der Expression von CD16, CD34, CD117 und Lactoferrin. Die Heatmap Abbildungen (s. Abbildungen 4 und 5) und die ANOVA Statistik konnten diese Ergebnisse bestätigen. So wurden CD16 ($p=0,049$) und Lactoferrin ($p=0,042$) verstärkt bei den CD25-negativen Patienten exprimiert, wohingegen eine positive CD34 ($p=0,032$) und CD117 ($p=0,001$) Expression vermehrt bei den CD25-positiven Patienten auftrat. CD34 und CD117 wurden vermehrt auf den unreifen Zellen und CD16 sowie Lactoferrin vermehrt auf den Zelloberflächen von reifen Leukämie Zellen exprimiert. Es ist bereits bekannt, dass eine verstärkte Expression von CD34 und CD117 insbesondere bei unreifen AML vorkommt [65]. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD34 bei unreifen NPM1^{mut} Leukämie Zellen zu einer schlechteren Prognose der AML Patienten beiträgt [66]. Weitere Studien haben gezeigt, dass der Nachweis der intrazytoplasmatischen Expression von Lactoferrin bei der Klassifikation und Differenzierung von akuten myeloischen Leukämien behilflich sein kann. So kann z.B. bei AML-FAB M2 eine erhöhte Expression von Lactoferrin beobachtet werden, bei AML-FAB M4 liegt eher eine heterogene Expression vor, wohingegen sich bei AML FAB M1, M3 und M5 keine Expression findet [67]. Insgesamt lassen diese Befunde darauf schließen, dass eine Expression von CD25 vor allem bei Patienten mit unreifen, nicht granulozytär differenzierten AML Subtypen vorkommt.

Heutzutage ist bekannt, dass die unreifen AML der FAB Gruppe M0 einen Zusammenhang mit Hochrisikofaktoren, wie z.B. komplexen Aberrationen, aufweist [68, 69]. Zudem konnten frühere Studien zeigen, dass die FAB-Gruppe M0 im Vergleich zu anderen FAB-Untergruppen eine schlechtere Prognose hat [68]. Wobei erwähnt werden muss, dass keine der damaligen Studien molekulargenetische oder zytogenetische

Parameter berücksichtigt hat. Bezüglich der CD25 Expression wurden für die FAB-Klassifikation im Rahmen dieser Arbeit heterogene Ergebnisse beobachtet, die aber zumindest darauf hindeuten, dass die Expression von CD25 doch eher mit undifferenzierten AML Subtypen einhergeht. So waren 20% der M0 Patienten CD25-positiv. MDS/M1-, M1/M2-, MDS/M2-, M2/CML-, M5a-, M5b- und M6-Patienten wiesen hingegen keine CD25 Expression auf, was allerdings keinen Einfluss auf die Prognose hatte ($p=0,69$).

Die Anzahl der Männer und Frauen war im untersuchten Patientenkollektiv dieser Arbeit annähernd gleich. Allerdings fand sich bei den weiblichen Patienten auf den Leukämie Zellen mit 65,2% deutlich häufiger eine Expression von CD25 als bei den männlichen Patienten mit 34,8%, obgleich dieses Ergebnis nicht signifikant war ($p=0,24$).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Menschen aufgrund zunehmender genetischer Veränderungen und deren Begleiterkrankungen im Alter anfälliger für eine AML-Erkrankung sind [16]. So wurde beobachtet, dass jüngere Patienten im Vergleich zu älteren Patienten eine bessere Prognose im Hinblick auf den Krankheitsverlauf aufweisen. In jeder ELN-Risikoklasse hatten ältere Patienten eine schlechtere Prognose als jüngere Patienten. Jüngere Patienten wiesen zu 41% eine günstige, zu 19% eine intermediär-II und zu 22% eine ungünstige ELN-Risikoklassifikation auf. Dagegen wiesen ältere Patienten zu 20% eine günstige, zu 30% eine intermediär-II und zu 31% eine ungünstige ELN-Risikoklassifikation auf ($p=0,001$). Außerdem hatten die jüngeren Patienten im Vergleich zu älteren Patienten eine bessere CR-Rate und ein besseres OS. Eine günstige ELN-Risikoklasse ging ebenfalls einher mit einer besseren CR und OS im Vergleich zu einer intermediären ELN-Risikoklasse und diese wiederum wies eine bessere CR und OS gegenüber einer ungünstigen ELN-Risikoklasse auf [70]. Der Mittelwert des Alters von CD25-negativen Patienten lag bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten bei 66,3 Jahren und damit höher als bei CD25-positiven Patienten (60,3 Jahren). Hieraus kann allerdings nicht signifikant geschlossen werden, dass CD25-negative Patienten generell eine höhere Lebenserwartung aufweisen als CD25-positive Patienten ($p=0,151$).

Anhand der ELN-Risikoklassifikation ist es möglich die Prognose der Patienten nicht nur durch zytogenetische Merkmale, sondern auch durch molekulargenetische Veränderungen oder Mutationen einzuschätzen [17, 53]. In dem hier untersuchten

Patientenkollektiv gehörten die CD25-positiven Patienten entweder zur intermediären oder zur ungünstigen ELN-Risikoklasse, allerdings überwiegend (57,1% der Patienten) zur intermediären Risikoklasse ($p=0,047$), was wiederum zeigt, dass eine Korrelation zwischen der Expression von CD25 und den ELN-Risikoklassen existiert. Die CD25 Expression findet sich nur bei Patienten mit intermediärer oder ungünstiger Prognose. Es konnte kein CD25-positiver Patient mit einer günstigen ELN-Risikoklasse beobachtet werden. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer positiven CD25 Expression nur selten eine günstige zytogenetische bzw. molekulargenetische Konstellation aufweisen [71]. So hat die CD25 Expression bei der Mehrzahl der Patienten eine unabhängige, negative prognostische Relevanz in den genetisch definierten intermediären und ungünstigen Risikoklassen. Dementsprechend könnte dieser relativ einfach durchflusszytometrisch zu bestimmende Parameter als Stratifikationsmerkmal für die Behandlung berücksichtigt werden, oder zumindest in ein integriertes durchflusszytometrisches, molekulargenetisches und zytogenetisches Prognosemodell aufgenommen werden [72].

Im Hinblick auf die Überlebenswahrscheinlichkeit konnte auch in dem hier untersuchten Patientenkollektiv bestätigt werden, dass die Patienten in einer günstigen ELN-Risikoklasse ein signifikant besseres Gesamtüberleben ($3,8\pm 1,3$ Jahre) aufwiesen und die kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu den intermediären und ungünstigen ELN-Risikoklassen ebenfalls höher war. Patienten der intermediären ELN-Risikoklassen wiesen ein Gesamtüberleben von $2,6\pm 0,85$ Jahren und eine kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit von 37% auf, wohingegen diese Werte in der ungünstigen ELN-Risikoklasse nur $2,4\pm 1,4$ Jahre für das Gesamtüberleben und 13,5% für die kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit betragen ($p=0,005$). In der ECOG-Studie E1900 von Gönen et al. hatten die CD25-positiven Patienten eine deutlich schlechtere CR-Rate ($p=0,0005$) und ein schlechteres OS ($p<0,0001$) gegenüber den CD25-negativen Patienten [71]. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten betrug der Mittelwert des Gesamtüberlebens der CD25-positiven Patienten 1,46 Jahre (Zeitspanne von 0,7 bis 2,2), wohingegen CD25-negative Patienten eine mittlere Überlebensdauer von 4,2 Jahren (Zeitspanne von 3 bis 5,4) aufwiesen. Die kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit von CD25-positiven Patienten betrug 26% und die von

CD25-negativen Patienten 30%. Allerdings war der Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen nicht statistisch signifikant ($p=0,140$).

Prognostisch relevante Merkmale, wie z.B. die Molekulargenetik und die Zytogenetik, sind bereits durch unterschiedliche Arbeitsgruppen untersucht und bestätigt worden [17, 38, 48, 50, 51]. Zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen unterstützen Forscher und Ärzte die Prognose von Patienten mit AML besser einschätzen zu können (s. Tabelle 3). Es konnte bereits eine Korrelation von CD25 Antigenexpression mit anderen negativen Einflussfaktoren bei der Entstehung von AML nachgewiesen werden, u.a. mit CD123, CEBPA Mutation, MLL Translokation, mit internen Tandemverdopplungen in FLT3 (FLT3-ITD) sowie mit NPM1-Mutationen [71]. So wurde auch eine signifikante Assoziation der CD25 Expression bei Patienten mit BCR/ABL-positiven Leukämien beobachtet [73].

Es konnte gezeigt werden, dass prognostische Faktoren, u.a. der Karyotyp und die Zytogenetik, einen Einfluss auf die Krankheitsentwicklung der AML und das Gesamtüberleben haben [74–77]. Eine zytogenetische Variation bei AML Patienten hilft bei der Subklassifizierung der AML. Die besonderen zytogenetischen Anomalien haben darüber hinaus auch in diagnostischer, prognostischer sowie therapeutischer Hinsicht eine wichtige Bedeutung bei AML Patienten [48, 77, 78]. Patienten mit normalem Karyotyp können unterschiedliche Gen-Mutationen aufweisen [79]. So ist bekannt, dass 40 bis 45% der AML Patienten einen normalen Karyotyp haben. 50% der Patienten zeigen eine balancierte oder unbalancierte zytogenetische Anomalie [58, 59]. In der vorliegenden Arbeit lag nur bei 97 der 148 Patienten ein zytogenetischer Befund vor, so dass nur diese 97 Patienten den zytogenetischen MRC-Kriterien zugeordnet werden konnten: 49% dieser Patienten wiesen einen normalen Karyotyp auf. Diese Patienten hatten nach den Kaplan-Meier Analysen eine höhere Überlebenschancen und eine bessere Krankheitsprognose als die Patienten, die einer intermediären oder ungünstigen zytogenetischen Risikogruppe nach MRC-Kriterien zugeordnet wurden. Nur bei den Patienten mit der günstigen zytogenetischen Risikogruppe war die Überlebenschancen höher als bei den Patienten mit normalem Karyotyp. In diesen Untersuchungen konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen CD25 Expression und molekulargenetischer Variabilität ($p=0,134$) sowie zytogenetischer Risikogruppe ($p=0,067$) festgestellt werden.

Die Heterogenität des Behandlungserfolgs bei der AML ist bedingt durch die klinischen Parameter, wie z.B. das unterschiedliche Alter und die unterschiedlichen Begleiterkrankungen der Patienten, aber vor allem durch die Zytogenetik und Molekulargenetik und lässt sich durch verschiedene Risikoscores auch online berechnen [80, 81]. So konnte nachgewiesen werden, dass sich unreife Leukämie Zellen zum großen Teil im Ruhestadium G0 des Zyklus befinden und deshalb Chemotherapie resistent sind [69, 82–84]. Obwohl durchflusszytometrische Parameter bislang keine Berücksichtigung in diesen Prognosescores gefunden haben, wird vermutet, dass eine CD25 Expression die chemotherapeutische Resistenz von leukämischen Stammzellen (LSC) im Knochenmark begünstigt [85]. Insbesondere ist die CD25 Expression mit einem verminderten Ansprechen auf daunorubicinhaltige Chemotherapien verbunden, wobei dieses Phänomen von der Dosis unabhängig ist. Diese Hypothese wurde von Saito et. al. formuliert [85]. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen verabreichter Chemotherapie und CD25 Expression zeigen ($p=0,417$). Allerdings waren die Patienten, die nach der Induktionstherapie in CR waren und eine blastenfreie Aplasie erreichten, häufiger CD25-negativ. Allerdings waren die Patienten mit nicht blastenfreier Aplasie, Rezidiv oder Sub-/ totaler-Infiltration ebenfalls häufiger CD25-negativ ($p= 0,021$).

Abschließend sei angemerkt, dass bereits 2012 in einer Phase 3–Studie der ECOG (Gönen et al.) die CD25 Expression bei AML Patienten als ein unabhängiger prognostischer Parameter bestätigt werden konnte [71]. Um die Rolle und den Einfluss von CD25 Expression in der AML-Pathogenese beurteilen zu können, sind weitere Untersuchungen und Studien notwendig. Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse liefern ebenfalls Anhalt für eine prognostische Bedeutung der CD25 Expression bei AML, können dies aber aufgrund der geringen Fallzahl und der retrospektiven Datenerhebung nicht eindeutig bestätigen, liefern aber durchaus eine Begründung für weitere Untersuchungen der CD25 Expression bei AML Patienten.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, in einer retrospektiven Datenerhebung bei Patienten mit AML, die im HELIOS Klinikums Berlin-Buch behandelt wurden, den Einfluss und die prognostische Relevanz der CD25 Expression zu untersuchen. Hierbei wurden die Patienten nach der durchflusszytometrisch analysierten Expression des CD25 Antigens in eine CD25-positive und eine CD25-negative Patientengruppe eingeteilt. Dabei wurden sowohl die Korrelation, als auch die Unterschiede beider Gruppen hinsichtlich Alter, Geschlecht, AML-Klassifikation, ELN-Risikogruppe, Induktionstherapie, Induktionsergebnis, Zytogenetik und Molekulargenetik analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang der CD25 Expression mit der Differenzierung der AML besteht. So trat eine CD25 Expression vermehrt bei Patienten mit undifferenzierten Leukämien auf, was sich durch den Nachweis einer gesteigerten Antigenexpression von Progenitor markern, wie CD34 ($p=0,032$) und CD117 ($p=0,001$), bei CD25-positiven Patienten zeigte. Darüber hinaus konnte durch die durchflusszytometrische Untersuchung der reifen granulozytären Markern, wie z. B. CD16 ($p=0,049$) und Lactoferrin ($p=0,042$), dargestellt werden, dass CD25 bei Patienten mit granulozytär differenzierten Leukämien in deutlich geringerem Maße exprimiert wird.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD4 und MPO7 signifikant häufiger bei Patienten mit CD25-negativer AML exprimiert wird, als bei Patienten mit CD25-positiver AML (CD4 $p=0,048$ und MPO7 $p=0,014$). Zusätzlich ergaben die Untersuchungen, dass der Anteil von Blasten im CD45 vs. SSC-Gate (Blastengate) bei CD25-positiven Patienten signifikant höher ist, als bei CD25-negativen Patienten ($p=0,001$).

Im Bezug auf die ELN-Risikoklassifikation ließ sich zeigen, dass die Patienten mit CD25-positiver AML vollständig der prognostisch ungünstigen oder der intermediären ELN-Risikogruppe zuzuordnen waren. Kein Patient mit CD25-positiver AML wies eine günstige ELN-Prognose auf, wohingegen bei den CD25-negativen Patienten 18% der günstigen ELN-Risikoklasse zuzuordnen waren ($p=0,047$).

Auch in dem hier untersuchten Patientenkollektiv bestätigte sich die ELN-Risikostratifikation insofern, als das bei den Patienten mit einer günstigen ELN-Risikoklasse eine höhere Überlebenschance bestand, als bei Patienten mit

intermediärer Prognose und bei letzteren lag die Überlebenswahrscheinlichkeit wiederum höher als bei Patienten mit einer ungünstigen ELN-Risikoklasse ($p=0,005$). Allerdings konnte nicht gezeigt werden, dass CD25-negative Patienten eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als CD25-positive Patienten haben ($p=0,140$).

Bei den Parametern Alter, Geschlecht, Molekulargenetik, zytologische Risikogruppe nach MRC-Kriterien sowie Induktionstherapie konnten keine signifikanten Unterschiede im Zusammenhang mit der CD25 Expression beobachtet werden.

7 Literatur

1. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006; 368(9550):1894-907.
2. https://amboss.miamed.de/wissen/Akute_Leuk%C3%A4mien, (Letzter Zugriff: 13.11.2015, 11:02).
3. <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e53188/e53189/#e53200>, 8.1. Chemotherapie der akuten myeloischen Leukämie. 8.1.3. Zytostatika, (Letzter Zugriff: 31.12.2016, 16:16).
4. <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/aml/epidemiologie/>, (Letzter Zugriff: 9.11.2015, 22:40).
5. Gundestrup M, Storm HH. Radiation-induced acute myeloid leukaemia and other cancers in commercial jet cockpit crew: a population-based cohort study. *Lancet* 1999; 354(9195):2029-31.
6. Cardis E, Gilbert ES, Carpenter L, Howe G, Kato I, Armstrong BK, Beral V, Cowper G, Douglas A, Fix J, et al. Effects of low dose and low dose rates of external ionizing radiation: Cancer mortality among nuclear industry workers in three countries. *Radiat Res* 1995. 354(9195):117-32.
7. Gerd Herold und Mitarbeiter. Innere Medizin "Akute Leukämien", Eigenverlag, Köln 2012: 86-92.
8. Kane EV, Roman E, Cartwright R, Parker J, Morgan G. Tobacco and the risk of acute leukaemia in adults. *Br J Cancer* 1999; 81(7):1228-33.
9. Ackermann H, Aden K, Aurich M, et al. Hämatologische Neoplasien - Akute myeloische Leukämie (AML). ALLEX Band A Innere Medizin. Stuttgart: Georg Thieme 2012: 586-9.
10. Tanaka Y, Tanaka A, Hashimoto A, Hayashi K, Shinzato I. Acute myeloid leukemia with basophilic differentiation transformed from myelodysplastic syndrome. *Case Rep Hematol* 2017;2017:4695491.

11. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MT, Andersen MK. Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hermatol Educ Program* 2007:392-7.
12. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:759-806.
13. Christ O, Feuring-Buske M, Hiddenmann W, Buske C. Pathogenese und Biologie der akuten myeloischen Leukämie. Urban & Vogel; München. *Med Klin* 2007; 102: 290-5 (Nr. 4).
14. https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/blut_und_blutbildung/, (letzter Zugriff 07.05.2017, 12:58).
15. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, Ritchey JK, Young MA, Lamprecht T, McLellan MD, McMichael JF, Wallis JW, Lu C, Shen D, Harris CC, Dooling DJ, Fulton RS, Fulton LL, Chen K, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Wendl MC, Heath S, Watson MA, Link DC, Tomasson MH, Shannon WD, Payton JE, Kulkarni S, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, Mardis ER, Wilson RK, DiPersio JF. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012; 481(7382):506-10.
16. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, Wartman LD, Lamprecht TL, Liu F, Xia J, Kandoth C, Fulton RS, McLellan MD, Dooling DJ, Wallis JW, Chen K, Harris CC, Schmidt HK, Kalicki-Veizer JM, Lu C, Zhang Q, Lin L, O'Laughlin MD, McMichael JF, Delehaunty KD, Fulton LA, Magrini VJ, McGrath SD, Demeter RT, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie TN, Walker JR, Watson MA, Heath SE, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Payton JE, Baty JD, Kulkarni S, Klco JM, Tomasson MH, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Ding L, Mardis ER, Wilson RK. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 2012; 150(2): 264-78.

17. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H; German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358(18):1909-18.
18. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3:179-98.
19. Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(9):650-65.
20. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 2006; 107(10):3847-53.
21. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(7):493-505.
22. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, Mandelli F, Mecucci C, Martelli MF. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 2007; 92(4):519-32.
23. Papst T, Müller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2001; 27(3):263-70.
24. Hess JL. MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med* 2004; 10(10):500-7.
25. Ratei R, Nebe T, Schabath R, Kleine HD, Karawajew L, Ludwig WD. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. *Akute Leukämien*. Basel, Karger; 2006, 1–55.
26. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33(4):451–8.

27. <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/aml/klassifikation/>, (Letzter Zugriff: 02.05.2017, 18:02).
28. Catovsky D, Matutes E, Buccheri V, Shetty V, Hanslip J, Yoshida N, Morilla R. A classification of acute leukaemia for the 1990s. *Ann Hematol* 1991; 62(1):16-21.
29. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnack HR, Sultan, C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol* 1991; 78(3):325-9.
30. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127:2391-405.
31. Vardiman JW, Harris N L, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100(7):2292-302.
32. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114(5):937-51.
33. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* Jan 26, January 2017; 129(4):424-47.
34. Tsimberidou AM, Kantarjian HM, Wen S, Keating MJ, O'Brien S, Brandt M, Pierce S, Freireich EJ, Medeiros LJ, Estey E. Myeloid sarcoma is associated with superior event-free survival and overall survival compared with acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008; 113(6):1370-8.
35. Kwaan HC, Wang J, Boggio LN. Abnormalities in hemostasis in acute promyelocytic leukemia. *Hematol Oncol* 2002; 20(1):33-41.

-
36. http://www.laborberlin.com/fileadmin/user_upload/aktuelles/diagnostik_bulletins/12_09_14_LB__Diagnostik_Bulletin_02.pdf, (Letzter Zugriff: 05.01.2017, 15:00).
37. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127(20):2375-90.
38. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD; European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115(3):453-74.
39. Will B, Steidl U. Multi-parameter fluorescence-activated cell sorting and analysis of stem and progenitor cells in myeloid malignancies. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2010; 23(3):391-401.
40. Al-Mavali A, Gills D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009; 131(1):16-26.
41. Del Principe MI, Buccisano F, Maurillo L, Sconocchia G, Cefalo M, Consalvo MI, Sarlo C, Conti C, De Santis G, De Bellis E, Di Veroli A, Palomba P, Attrotto C, Zizzari A, Paterno G, Voso MT, Del Poeta G, Francesco Lo-Coco F, Arcese W, Amadori S, Venditti A. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia of adults: Determination, Prognostic Impact and Clinical Applications. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2016; 8(1):e2016052.
42. <http://www.kompetenznetzleukaemie.de/content/aerzte/all/klassifikation/>, (Letzter Zugriff: 05.01.2017, 19:36).
43. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9(10):1783-6.

44. http://www.imdberlin.de/fileadmin/user_upload/Diag_Info/240_zellulaere_Immunstatus.pdf, (Letzter Zugriff: 04.01.2017, 15:04).
45. Patel AS, Hawkins AL, Griffin CA. Cytogenetics and cancer. *Curr Opin Oncol* 2000;12:62–67.
46. Rowley JD. The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Semin Hematol* 1999;36(4 suppl 7):59–72.
47. Haferlach T, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Schoch C: Genetic classification of acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol* 2004;83(suppl 1):S97–100.
48. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood* 2004;18(2):115-36.
49. Medeiros BC, Othus M, Fang M, Roulston D, Appelbaum FR. Prognostic impact of monosomal karyotype in young adult and elderly acute myeloid leukemia: the Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Blood* 2010; 116(13):2224-8.
50. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002; 100(13):4325-36.
51. Grimwade D, Walker H, Olivber F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92(7):2322-33.
52. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, Appelbaum FR. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000; 96(13):4075-83.

-
53. Bacher U, Schnittger S, Haferlach T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2010; 22(6):646-55.
54. Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, Roy S, Sridhara R, Rahman A, Williams G, Pazdur R. Gemtuzumab Ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2001; 7(6):1490-6.
55. Studien zur Primärtherapie Uni Ulm. AMLSG 16-10 und AMLSG 21-13. Study AML Group Studien <https://www.uni-ulm.de/onkologie/AMLSG/studien.html>, (Letzter Zugriff: 02.05.2017, 21:00).
56. <http://www.unimedizin-mainz.de/facs/durchflusszytometrie/prinzip-der-durchflusszytometrie.html> (Letzter Zugriff: 04.05.2017, 15:00).
57. <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/durchflusszytometrie-facs-messprinzip-aufbau/> (Letzter Zugriff: 05.05.2017, 17:17).
58. <http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/aml/marker/>, (Letzter Zugriff: 18.10.2016, 23:55).
59. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK. National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 young adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116(3):354-65.
60. Naoe T, Kiyoi H. Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. *Int J Hematol* 2013; 97(2):165-74.
61. Citavi Handbuch
http://www.citavi.com/sub/manual5/de/index.html?change_language.html, (Letzter Zugriff: 27.02.2015, 10:00).
62. Cerny J, Woods L, Yu H, Ramanathan M, Raffel GD, Walsh WV, Petrillo-Deluca LJ, Tarrasky NM, O'Rourke E, Bednarik JL, Woda B, Hutchinson L, Kroll A, Barton B, Rosmarin AG, Nath R. Expression of CD25 on acute myeloid leukemia (AML) blasts is an independent risk factor associated with refractory disease, which may

- be overcome by stem cell transplantation (SCT). *Blood* 2011; 118(21):1519. Abstract 3560.
63. Nakase K, Kita K, Otsuji A, Anazawa H, Hoshino K, Sekine T, Shirakawa S, Tanaka I, Nasu K, Tsutani H, Dohy H, Tsudo M. Diagnostic and clinical importance of interleukin-2 receptor alpha expression on non-T-cell acute leukemia cells. *Br J Haematol* 1992; 80(3):3317-26.
64. Terwijn M, Feller N, van Rhenen A, Kelder A, Westra G, Zweegman S, Ossenkoppele G, Schuurhuis GJ. Interleukin-2 receptor alpha-chain (CD25) expression on leukaemic blasts is predictive for outcome and level of residual disease in AML. *Eur J Cancer* 2009; 45(9):1692-9.
65. Eren R, Aslan C, Yokus O, Doqu MH, Suyani E. T-cell acute lymphoblastic leukemia with co-expression of CD56, CD34, CD117 and CD33: A case with poor prognosis. *Mol Clin Oncol* 2016; 5(2):331-2.
66. Dang H, Chen Y, Kamel-Reid S, Brandwein J, Chang H. CD34 expression predicts an adverse outcome in patients with NPM1-positive acute myeloid leukemia. *Hum Pathol* 2013; 44(10):2038-46.
67. Al Safadi L, Köhler G, Schaefer HE. Classification of acute myeloid leukaemia in trephine biopsies with special reference to lactoferrin. *Anticancer Res* 1998; 18(5B):3677-84.
68. Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Doekharan D, van der Holt B, Knapp W, Lemez P, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Schoch C, Sperling C, van't Veer MB. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. *Br J Haematol* 2001; 113(3):737-45.
69. Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox MC, Stasi R, Bruno A, Aronica G, Maffei L, Suppo G, Simone MD, Forte L, Cordero V, Postorino M, Tufilli V, Isacchi G, Masi M, Papa G, Amadori S. Minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): comparison of 25 cases with other French-American-British subtypes. *Blood* 1997; 89(2):621-9.

-
70. Mrozek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, Metzeler KH, Schwind S, Wu YZ, Kohlschmidt J, Pettenati MJ, Heerema NA, Block AW, Patil SR, Baer MR, Kolitz JE, Moore JO, Carroll AJ, Stone RM, Larson RA, Bloomfield CD. Prognostic Significance of the European LeukemiaNet Standardized System for Reporting Cytogenetic and Molecular Alterations in Adults With Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2012; 30(36):4515–23.
71. Gönen M, Sun Z, Figueroa ME, Patel JP, Abdel-Wahab O, Racevskis J, Ketterling RP, Fernandez H, Rowe JM, Tallman MS, Melnick A, Levine RL, Paietta E. CD25 expression status improves prognostic risk classification in AML independent of established biomarkers: ECOG phase 3 trial, E1900. *Blood* 2012; 120(11):2297–306.
72. Patel J, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci ND, Heguy A, Cherry A, Vance G, Higgins RR, Ketterling RP, Gallagher RE, Litzow M, van den Brink MR, Lazarus HM, Rowe JM, Luger S, Ferrando A, Paietta E, Tallman MS, Melnick A, Abdel-Wahab O, Levine RL. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366(12):1079-89.
73. Paietta E, Racevskis J, Neuberg D, Rowe JM, Goldstone AH, Wiernik PH. Expression of CD25 (interleukin-2 receptor alpha chain) in adult acute lymphoblastic leukemia predicts for the presence of BCR/ABL fusion transcripts: results of a preliminary laboratory analysis of ECOG/MRC Intergroup Study E2993. Eastern Cooperative Oncology Group/Medical Research Council. *Leukemia* 1997; 11(11):1887-90.
74. Stölzel F, Mohr B, Kramer M, Oelschlägel U, Bochtler T, Berdel WE, Kaufmann M, Baldus CD, Schäfer-Eckart K, Stuhlmann R, Einsele H, Krause SW, Serve H, Hänel M, Herbst R, Neubauer A, Sohlbach K, Mayer J, Middeke JM, Platzbecker U, Schaich M, Krämer A, Röllig C, Schetelig J, Bornhäuser M, Ehninger G. Karyotype complexity and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2016; 6:e386.
75. Sekeres MA, Peterson B, Dodge RK, Mayer RJ, Moore, Lee EJ, Kolitz J, Baer MR, Schiffer CA, Carroll AJ, Vardiman JW, Davey FR, Bloomfield CD, Larson RA, Stone

- RM, Cancer and Leukemia Group B (CALGB). Differences in prognostic factors and outcomes in African Americans and whites with acute myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103(11):4036-42.
76. Olesen LH, Aggerholm A, Andersen BL, Guldborg Nyvold C, Guldborg P, Nørgaard JM, Hokland P. Molecular typing of adult acute myeloid leukaemia: significance of translocations, tandem duplications, methylation, and selective gene expression profiling. *Br J Haematol* 2005; 131(4):457-67.
77. Estey EH. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer* 2001; 92(5):1059-73.
78. Marcucci G, Mrózek K, Bloomfield CD. Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. *Curr Opin Hematol* 2005; 12(1):68-75.
79. Mrozek K, Döhner H, Bloomfield CD. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr Opin Hematol* 2007; 14(2):106-14.
80. Krug U, Röllig C, Koschmieder A, Heinecke A, Sauerland MC, Schaich M, Thiede C, Kramer M, Braess J, Spiekermann K, Haferlach T, Haferlach C, Koschmieder S, Rohde C, Serve H, Wörmann B, Hiddemann W, Ehninger G, Berdel WE, Büchner T, Müller-Tidow C. German Acute Myeloid Leukaemia Cooperative Group; Study Alliance Leukemia Investigators. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: A Web-Based Application for Prediction of Outcomes. *Lancet* 2010; 376(9757):2000-8.
81. Büchner T, Berdel WE, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S, Müller-Tidow C, Braess J, Spiekermann K, Kienast J, Staib P, Grüneisen A, Kern W, Reichle A, Maschmeyer G, Aul C, Lengfelder E, Sauerland MC, Heinecke A, Wörmann B, Hiddemann W. Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2009; 27(1):61-9.

82. Stasi R, Del Poeta G, Venditti A, Masi M, Stipa E, Dentamaro T, Cox C, Dallapiccola B, Papa G. Analysis of treatment failure in patients with minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). *Blood* 1994; 83(6):1619-25.
83. Gentles AJ, Plevritis SK, Majeti R, Alizadeh AA. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA* 2010; 304(24):2706-15.
84. van Rhenen A, Feller N, Kelder A, Westra AH, Rombouts E, Zweegman S, van der Pol MA, Waisfisz Q, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res* 2005; 11(18):6520-7.
85. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, Tomizawa-Murasawa M, Tanaka S, Takagi S, Uchida N, Suzuki N, Sone A, Najima Y, Ozawa H, Wake A, Taniguchi S, Shultz LD, Ohara O, Ishikawa F. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci Transl Med* 2010; 2(17):17ra9.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Yasmin Djirsarai-Eichhorn, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Prognostische Relevanz der CD25 Expression bei Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

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

Berlin,

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD. Dr. Richard Ratei für die Übergabe dieses interessanten Themas, die Betreuung dieser Doktorarbeit, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, für seine große Hilfsbereitschaft sowie die wertvollen Anregungen und die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen. Gleichzeitig gilt mein Dank an Herrn Prof. Dr. Dirk Peetz vom Institut Labormedizin des HELIOS Klinikums Berlin-Buch für die Übernahme meiner Doktorarbeit als zweiter Gutachter und seiner hilfreichen Unterstützung, ohne welche die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie für ihre großartige Unterstützung und dafür, dass sie mich daran erinnern haben an mich zu glauben und meine Wünsche zu verwirklichen.