

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

DISSERTATION

Durchflusszytometrischer Reifescorere als prognostischer Faktor bei der  
Akuten Myeloischen Leukämie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tanja Schneider

aus Brandenburg an der Havel

Datum der Promotion: 27.02.2015

**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abstrakt .....	IV
Abstract .....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Grundlagen und Epidemiologie der AML.....	1
1.2 Entstehung der AML.....	2
1.2.1 Ätiologie .....	2
1.2.2 Pathogenese .....	3
1.2.2.1 Hämatopoese .....	3
1.2.2.2 Molekulare Pathogenese.....	5
1.3 Klinische Symptomatik .....	6
1.4 Diagnostik.....	7
1.4.1 Morphologie und Zytochemie .....	7
1.4.2 Immunphänotypisierung / Durchflusszytometrie.....	8
1.4.3 Zytogenetik.....	11
1.4.4 Molekulargenetik .....	11
1.5 Klassifikation der AML .....	12
1.5.1 FAB-Klassifikation .....	12
1.5.2 WHO-Klassifikation .....	13
1.6 Therapie .....	15
2. Ziele der Arbeit.....	18
3. Patienten, Material und Methoden.....	19
3.1 Patienten und retrospektive Datenanalyse .....	19
3.2 HCT-CI Score.....	20
3.3 Immunphänotyp.....	22
3.3.1 Aufbereitung der Proben .....	22
3.3.2 Funktionsprinzipien des FACS .....	24
3.3.3 Auswertung .....	25
3.4 Durchflusszytometrischer „Reifescore“ und dessen Entwicklung .....	26
3.5 Risikogruppeneinteilung nach ELN.....	30
3.6 Datenerfassung, Datenauswertung und Einsatz statistischer Verfahren .....	31

4. Ergebnisse .....	33
4.1 Deskriptive Statistik .....	33
4.1.1 Patientencharakteristika .....	33
4.1.2 Klinische Ergebnisse (CR / CRi, RFS, OS) .....	37
4.2 Einfluss des Reifegrades .....	40
4.2.1 Klinische Ergebnisse (CR / CRi, RFS, OS) .....	40
4.2.2 Biologische Phänotypen in den Gruppen „reife AML“ / „unreife AML“ ....	47
4.3 Einfluss der Risikogruppen .....	48
4.3.1 ELN-Risikogruppen der AML .....	48
4.3.2 Klinische Ergebnisse (CR / CRi-Rate, RFS, OS) .....	49
4.4 Einfluss des Reifegrades innerhalb der ELN-Risikogruppen .....	58
4.4.1 Klinische Ergebnisse (CR / CRi, RFS, OS) .....	59
4.4.2 Biologischer Phänotyp in den Reife- und ELN-Risikogruppen .....	68
4.5 Zytogenetisch normale AML .....	68
5. Diskussion .....	70
6. Zusammenfassung .....	80
7. Literaturverzeichnis .....	VIII
Lebenslauf .....	XX
Erklärung an Eides Statt .....	XX
Danksagung .....	XXII

## Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute Myeloische Leukämie
- sAML	Sekundäre Akute Myeloische Leukämie
- tAML	Therapieassoziierte Akute Myeloische Leukämie
- CN-AML	Zytogenetisch normale Akute Myeloische Leukämie
- MN-AML	Molekulargenetisch normale Akute Myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozytenleukämie
CD	Cluster of differentiation
CLP	Lymphatische Progenitorzelle / common lymphoid progenitor
CMP	Myeloische Progenitorzelle / common myeloid progenitor
CR	Komplette Remission / complete remission
CRi	Inkomplette Remission / complete remission with incomplete recovery
ELN	European LeukemiaNet
FAB	French-American-British Co-operative Group
FACS	Durchflusszytometrie / fluorescence activated cell sorting
Ges.	Gesamt
HCT-CI	Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
KM	Knochenmark
LIZ	Leukämie-induzierende Zelle
LSZ	Leukämische Stammzelle
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MPO	Myeloperoxidase
mpP	Multipotente Progenitorzelle
OS	Gesamtüberleben / overall survival
pB	peripheres Blut
RFS	Rezidiv-freies Überleben / relapse-free survival
SF	Standardfehler
SZT	Stammzelltransplantation
TdT	Terminale Desoxyribonucleotidyltransferase
WHO	World Health Organization

## Abstrakt

**Hintergrund:** Bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) sind molekulargenetische und zytogenetische Aberrationen die wichtigsten AML-assoziierten prognostischen Faktoren. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass auch die biologische Reife der AML, welche immunzytologisch durch die Expression bestimmter Antigenmuster reflektiert wird, prognostische Relevanz haben kann. Bisher fehlen jedoch Untersuchungen zum Einfluss des AML-Reifegrades auf die Prognose innerhalb der einzelnen molekulargenetisch-zytogenetisch definierten AML-Risikogruppen nach European LeukemiaNet (ELN).

**Ziel:** Ziel der Arbeit war die Klärung der Frage, ob der immunzytologisch (durchflusszytometrisch) ermittelte Reifegrad einer AML nur bestimmte zytogenetische bzw. molekulargenetische Phänotypen reflektiert oder ob dieser auch innerhalb der verschiedenen AML-Risikogruppen nach ELN prognostische Relevanz hat.

**Material und Methoden:** 300 an der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, im Zeitraum 01/2003 – 04/2012 diagnostizierte AML-Patienten wurden hinsichtlich ihrer durchflusszytometrischen Zellreife und ihrer Risikogruppen-Zuordnung nach ELN analysiert. Dazu wurde ein durchflusszytometrischer „Reifescore“ entwickelt, welcher auf der quantitativen Expression weniger Progenitorzellmerkmale (CD34, CD117 und TdT) beruht. Mittels dieses immunphänotypischen „Reifescores“ wurden die Patienten in „reife AML“ (AML-R) oder „unreife AML“ (AML-U) unterteilt. Der Einfluss dieses „Reifescores“ auf die klinischen Parameter komplette Remission (CR / CRi), Rückfall-freies Überleben (RFS) und Gesamtüberleben (OS) wurde dann sowohl in der Gesamtkohorte als auch in den einzelnen Risikogruppen nach ELN untersucht.

**Ergebnisse:** Im Gesamtkollektiv zeigten AML-R im Vergleich zu AML-U ein signifikant längeres RFS und OS ( $p < 0,001$ ). In der Gruppe der AML-R zeigte sich eine Anhäufung von Niedrigrisiko-Aberrationen (NPM1, PML-RARA), während in der Gruppe der AML-U gehäuft Hochrisiko-Aberrationen (monosomaler und komplex-aberranter Karyotyp, -5, (del)5q, -7) beobachtet werden konnten.

Interessanterweise fand sich der Unterschied in RFS und OS aber auch innerhalb der einzelnen ELN-Risikogruppen, wobei hier – am ehesten fallzahlbedingt – in der intermediären Risikogruppe nach ELN statistische Signifikanz erreicht wurde (RFS: 7,0 Jahre (AML-R) vs. 3,3 Jahre (AML-U);  $p = 0,002$ ; OS: 5,1 Jahre (AML-R) vs. 3,0 Jahre (AML-U);  $p = 0,022$ ). Im Gegensatz dazu fand sich kein Zusammenhang zwischen dem Reifegrad der AML und der CR / CRi-Rate.

**Schlussfolgerung:** Die vorliegenden Daten geben einen ersten Hinweis darauf, dass der in dieser Arbeit entwickelte durchflusszytometrische „Reifescore“ für die AML eine weitere prognostische Stratifizierung innerhalb der einzelnen Risikogruppen nach ELN erlaubt. Die Ergebnisse sollten in einer größeren Patientengruppe prospektiv evaluiert werden. Der durchflusszytometrische „Reifescore“ könnte insbesondere in der intermediären Risikogruppe nach ELN ein zusätzliches Kriterium für die Wahl einer adäquaten Postremissionstherapie werden.

## Abstract

**Background:** In Acute Myeloid Leukemia (AML), molecular genetic and cytogenetic changes in leukemic blasts are the strongest AML-related prognostic factors and the basis for the European LeukemiaNet (ELN) risk classification. Additionally, it has been suggested that individual surface antigen patterns, which reflect maturity or immaturity may also have prognostic relevance. However, there are no prior studies analyzing the impact of blast maturity within the different ELN risk groups.

**Objective:** The aim of this study was to clarify whether AML blast maturity as measured by flow cytometry only reflects specific cytogenetic or molecular phenotypes or whether it also has a prognostic value within the different ELN risk groups.

**Materials and Methods:** 300 patients newly diagnosed with AML from 01/2003 through 04/2012 at Charité – University Medical Center Berlin, Campus Virchow Klinikum, were analyzed with regard to their flow cytometric cell maturity and their ELN risk group. For this purpose, a quantitative flow cytometric score based on CD34, CD117 and TdT antigen expression has been developed and patients were classified as “mature” (AML-R) or “immature” (AML-U). The influence of this maturity score on clinical parameters such as remission rate (CR / CRi rate), relapse-free survival (RFS), and overall survival (OS) was evaluated for both the total cohort and the different ELN risk groups.

**Results:** AML-R showed a significantly longer RFS and OS than AML-U ( $p < 0,001$ ). Significant accumulation of good-risk mutations (NPM1, PML-RARA) was observed in patients with AML-R; high-risk phenotypes (monosomal and complex aberrant karyotype, -5, (del)5q, -7) were frequently seen in AML-U.

However, the differences in RFS and OS in favor of AML-R were also confirmed within the different ELN risk groups, particularly within the group “intermediate risk”, in which this difference was statistically significant (RFS: 7.0 vs. 3.3 years;  $p = 0,002$ ; OS: 5.1 vs. 3.0 years;  $p = 0,022$ ). In contrast, no correlation was observed between CR / CRi rate and blast maturity ( $p > 0,050$ ).

**Conclusion:** The present data show that our flow cytometric score might allow further prognostic stratification within the different ELN risk groups. Our results should be confirmed in a prospective trial in a larger cohort of AML patients. In the future, the flow

cytometric score might become an additional criterion for the choice of the most appropriate post remission therapy in AML, particularly within the intermediate risk group according to ELN.



## 1. Einleitung

### 1.1 Grundlagen und Epidemiologie der AML

Nach der WHO-Klassifikation von 2008 zählt die AML zu den myeloischen Neoplasien. Sie gehört zu den häufigsten malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems im Erwachsenenalter, pathogenetisch liegt ihr eine Transformation und deregulierte Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen zugrunde [2, 3].

Die AML entsteht nach heutigem Verständnis durch Mutationen bzw. zytogenetische Aberrationen, die in Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zellen eingreifen und so zu einer klonalen Expansion unreifer Progenitorzellen, sogenannter Blasten, führen, welche meist auch in das periphere Blut ausgeschwemmt werden. Durch ein verdrängendes Wachstum dieser unreifen Zellpopulation wird die gesunde Blutbildung im Knochenmark zunehmend verdrängt. In der Folge entwickelt sich eine meist typische Befundkonstellation mit Zeichen der Granulozytopenie, Anämie und Thrombozytopenie. Auf zellbiologischer Ebene imponiert die AML vor allem durch eine Vielzahl von zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen in den leukämischen Blasten. Zusätzlich exprimieren die Blasten häufig aberrante Antigenmuster auf ihrer Oberfläche, welche in der physiologischen Granulozytopoese nicht vorkommen (s. Kap. 1.4.2).

Da sich ein flächendeckendes Krebsregister für Deutschland aktuell erst im Aufbau befindet, können epidemiologische Daten zur AML vorwiegend anhand der Krebsregister anderer Länder (z.B. des United States National Cancer Institutes / NCI) und mithilfe von Studiendaten hochgerechnet werden [4, 5]. So schätzt man, dass sich die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland insgesamt gegenwärtig auf 4 / 100.000 / Jahr bzw. auf ca. 3.500 / Jahr beläuft, die sich in ihrer Altersverteilung aber deutlich unterscheiden. Ist bei jüngeren Patienten noch eine Inzidenz von ca. 1 – 4 / 100.000 zu verzeichnen, steigt die Zahl bei > 65-Jährigen auf bis zu 20 / 100.000 an [4]. Das mediane Erkrankungsalter liegt z.B. in den USA bei 67 Jahren. Dabei sind Männer (58%) häufiger betroffen als Frauen (42%) [5]. Die durchschnittliche Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Patienten < 65 Jahren 40 – 45%, bei Älteren nur noch 10 – 15% [6].

## 1.2 Entstehung der AML

### 1.2.1 Ätiologie

Die Genese einer AML bleibt in den meisten Fällen ungeklärt, nur in ca. 10% der Fälle kann ein kausaler pathogenetischer Faktor ermittelt werden [7]. Im Wesentlichen werden bei der AML drei Entstehungsarten beschrieben:

Die "De novo-AML" entwickelt sich meist ohne Prodromi und hat Risikofaktoren wie z.B. die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und Benzol [2, 8, 9]. Eine positive Nikotinanamnese (> 10 Jahre: odds ratio = 1,2 – 1,3) und ein Raucherstatus bei Erstdiagnose (odds ratio = 1,4) erhöhen ebenfalls das AML-Risiko [10].

Eine sekundäre AML (sAML) entsteht aus einer anderen myeloischen Neoplasie, z.B. einem Myelodysplastischen Syndrom (MDS). Durch genetische Aberrationen kommt es zu einer Störung von Proliferation und Differenzierung und ggf. einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen. Daraus resultiert eine schwere Störung der physiologischen Hämatopoese [11].

Bei der sogenannten therapieassoziierten AML (tAML) werden zwei Typen unterschieden. Am häufigsten entsteht sie aufgrund einer fünf bis zehn Jahre zurückliegenden Zytostatika-Therapie mit Alkylantien (Wirkmechanismus: DNA-Schädigung durch Einbau von Alkylgruppen, z.B. Cyclophosphamid, Busulfan) oder einer Bestrahlung und ist charakterisiert durch teilweise oder vollständige Verluste an den Chromosomen 5 und 7 (-5-, (del)5q-, -7-, (del)7q-AML). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass 1 – 5 Jahre nach der Therapie mit Doxorubicin oder Etoposid (Wirkmechanismus: Topoisomerase II-Interaktionen) vermehrt genetische Veränderungen wie 11q23 und 21q22 und balancierte Translokationen wie t(15;17) und t(8;21) auftraten [2, 12].

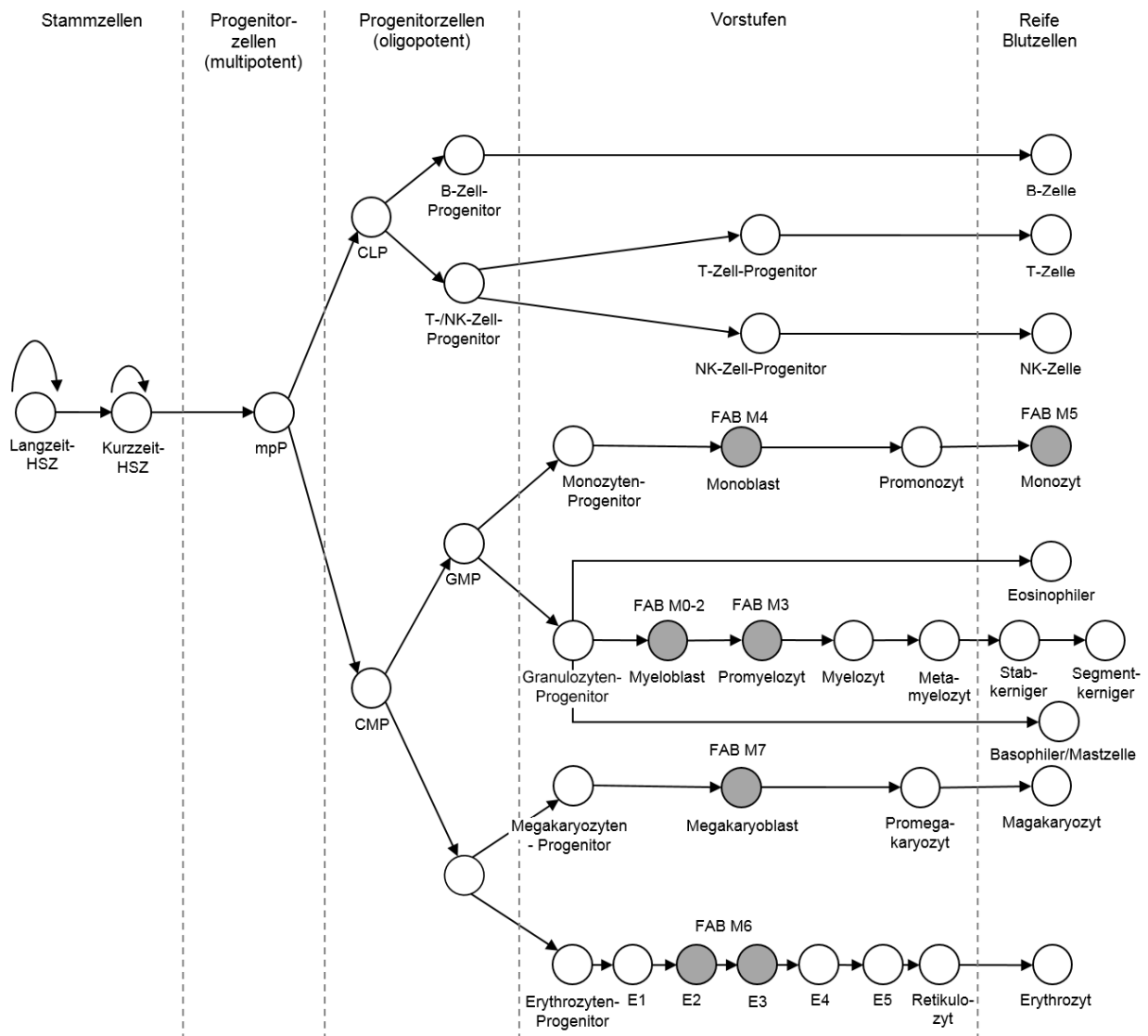
## 1.2.2 Pathogenese

### 1.2.2.1 Hämatopoese

Die Bildung der Blutzellen findet im Knochenmark, ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) statt. Der Pool von HSZ befindet sich bei Gesunden durch Apoptose-, Differenzierungs- oder Migrationsprozesse in einem Gleichgewicht („steady state“). Aus diesem lebenslangen Vorrat von Langzeit- HSZ wird eine Population von Kurzzeit-HSZ rekrutiert, deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung im Gegensatz zu den Langzeit-HSZ nur wenige Wochen anhält. Diese teilen sich zu ebenfalls multipotenten Progenitorzellen (mpP), die sich wiederum in oligopotente lymphatische (common lymphoid progenitor, CLP) oder myeloische Progenitorzellen (common myeloid progenitor, CMP) differenzieren. Von diesen geht dann in der Regel irreversibel die Reifung zur terminal differenzierten Blutzelle aus (s. Abb. 1.1) [13, 14].

Die linienspezifische Ausreifung wird von Zytokinen, Transkriptions- und Wachstumsfaktoren bestimmt. Im Maus-Experiment konnte erstmals gezeigt werden, dass durch die AML-Fusionsonkogene MLL-ENL, MLL-AF9 und MOZ-TIF2 nicht nur in den HSZ, sondern zusätzlich auch in mpP und CMP die maligne Transformation induziert werden kann. Hierdurch wurden Arbeitshypothesen zur Entstehung von leukämischen Stammzellen wesentlich beeinflusst [15-19]. Es ist davon auszugehen, dass auf der einen Seite sequenzielle Mutationen in der HSZ zur Entwicklung eines hierarchisch organisierten, aber funktionsuntüchtigen leukämischen Zellklons führen [18, 19]. Auf der anderen Seite nimmt man an, dass Leukämie-induzierende Zellen (LIZ) auch aus Progenitorzellen, welche die Fähigkeiten einer Stammzelle wiedererlangt haben, entstehen können [15-17]. Dass auch Zellen eines weiter fortgeschrittenen Reifestadiums eine Leukämie induzieren können, konnte bisher nur für die kindliche Akute Lymphatische Leukämie (ALL) gezeigt werden [20].

Die vom dominanten Leukämieklon produzierten leukämischen Blasten haben die Fähigkeit verloren, zu funktionsfähigen Erythrozyten, Neutrophilen, Monozyten und Thrombozyten zu reifen. Zusätzlich hemmen sie Chemokin-vermittelt die Reifung gesunder Blutzellvorstufen; dabei gibt es aber keine Korrelation zwischen dem Grad der Zytopenie und dem Blastengehalt im Knochenmark [2].



**Abbildung 1.1: Übersicht über die Hämatopoese (modifiziert nach [1]). FAB (French-American-British)-Einteilung s. Kap. 1.5.1.**

Unlängst konnten in der Aufklärung der Pathogenese der AML große Fortschritte erzielt werden. Die Arbeitsgruppe um T. Ley zeigte, dass gesunde hämatopoetische Zellen mit zunehmendem Alter des Menschen hunderte Mutationen anhäufen, die keine biologischen Konsequenzen haben („bystander“ Mutationen). Dabei weisen Stammzellen aus Nabelschnurblut die wenigsten und jene von 70-Jährigen die meisten Mutationen auf. Die Anzahl der akkumulierten Exomutationen gesunder Probanden entsprach dabei jener von AML-Patienten des gleichen Alters.

Die Transformation einer Zelle in eine Leukämiezelle findet aber erst statt, wenn eine AML-auslösende Mutation („driver“ Mutation) auftritt, welche häufig die Zelldifferenzierung betrifft und dann die Entwicklung eines einzelnen Leukämiekons

begründet. Zur klinisch apparenten AML kommt es nach diesen Daten aber erst, wenn zusätzlich eine „kooperierende Mutation“ hinzukommt, welche dem Leukämieklon einen Proliferationsvorteil verschafft. So scheint nur ein kleiner Teil der insgesamt vorhandenen molekulargenetischen Veränderungen in der Stammzelle wirklich zur Pathogenese einer AML beizutragen [21, 22].

### **1.2.2.2 Molekulare Pathogenese**

Genmutationen bei der AML lassen sich nach Kelly und Gilliland in zwei Gruppen einteilen: in Gruppe-I-Mutationen, bei welchen Signaltransduktionswege aktiviert werden, die den hämatopoetischen Progenitorzellen einen Proliferations- und Überlebensvorteil verschaffen, und Gruppe-II-Mutationen, welche den normalen Differenzierungsprozess der Zellen durch genetische Veränderungen von Transkriptionsfaktoren und -komplexen stören [31, 37].

#### **a) Gruppe-I-Mutationen**

Zu dieser Gruppe zählen die FLT3-ITD, FLT3-TKD- und RAS-Mutationen [37].

FLT3 (fms-related tyrosine kinase 3) ist eine an der Oberfläche von hämatopoetischen Progenitorzellen gelegene Rezeptortyrosinkinase, welche eine wesentliche Rolle bei deren Proliferation und Differenzierung spielt [38]. FLT3 besitzt zwei funktionelle Bereiche: die für die Autoinhibition verantwortliche juxtamembranäre Domäne, welche durch die internal tandem duplication (ITD)-Mutation von 3 – 400 Basenpaaren konstitutiv aktiviert wird (ligandenunabhängige Proliferation und aufgehobene Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen) und die „activation loop“ der Tyrosinkinasedomäne, deren TKD-Mutation durch einen Basenaustausch entsteht. Eine FLT3-ITD-Mutation tritt bei 20 – 25% aller AML-Patienten und bei 35 – 45% der Patienten mit unauffälliger Zytogenetik auf und wird nach ELN mit einer intermediären Prognose assoziiert [26, 36].

RAS Onkogene (z.B. NRAS, KRAS) sind eine Familie membranassoziierter Proteine, die vielfältige Funktion in der Signaltransduktion nach Ligandenbindung ausüben [39].

## **b) Gruppe-II-Mutationen**

Zu den Gruppe-II-Mutationen zählen NPM1-, CEBPA- und MLL-Mutationen [31]. Das Nukleophosmin Gen (NPM1) ist ein nukleo-zytoplasmatisches Transport-Phosphoprotein, welches u.a. für die Regulierung der Transkription verantwortlich ist. Bei einer Mutation im Exon 12 des Gens akkumuliert es im Zytoplasma und inhibiert so den ARF-p53-Tumorsuppressor-Signalweg [40]. Bei der AML des Erwachsenen stellt NPM1 die häufigste genetische Aberration dar (24 – 35% der gesamten und 43 – 62% der CN-AML-Patienten) und wird als Niedrigrisikomutation nach ELN betrachtet [31, 36, 41].

CEBPA (CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$ ) ist ein für die Differenzierung der neutrophilen Granulozyten verantwortlicher Transkriptionsfaktor. Mutationen können am N-Terminus (Proteinverkürzung) und / oder am C-Terminus (erhöhte DNA-Bindung, Dimerisierung) auftreten [42].

Das Mixed-lineage leukemia (MLL)-Gen auf Chromosom 11q23 kodiert für ein Protein mit Histonmethyltransferaseaktivität, welches die Transkription einer Gruppe von Hämatopoesegenen reguliert. Veränderungen des MLL-Gens (Fusionsproteine, partielle Tandemduplikationen, Amplifikationen) führen zu einer Hemmung der Zelldifferenzierung und erhöhen das Risiko des Patienten [26, 36, 43].

## **1.3 Klinische Symptomatik**

Klinisch auffällig werden AML-Patienten als Folge der fortschreitenden hämatopoetischen Insuffizienz durch körperliche Schwäche, Blässe (Anämie), protrahiertes Fieber, Infektionen (Granulozytopenie) und Blutungen (Thrombozytopenie). Die Laboruntersuchungen der Patienten zeigen meist eine Leukozytose, Anämie und Thrombozytopenie. Es werden aber auch gar nicht selten Leukopenien bemerkt, besonders bei sekundären AML, welche sich aus einem MDS entwickelt haben.

Selten werden extramedulläre Manifestationen der AML beobachtet, noch seltener sind rein extramedulläre Formen der AML (früher auch „Myelosarkom“ genannt) [23]. Insbesondere bei der Akuten Promyelozytenleukämie (APL) kann es zu einer Verbrauchskoagulopathie, Fibrinolyse und damit zu Symptomen einer gesteigerten Blutungsneigung kommen [24].

## 1.4 Diagnostik

### 1.4.1 Morphologie und Zytochemie

Für die endgültige Diagnosestellung "Akute Myeloische Leukämie" muss eine zytologische oder histologische Beurteilung des peripheren Blutaussstrichs und des Knochenmarks des Patienten erfolgen. Hierfür ist als Standard eine Knochenmark-Aspiration etabliert. Kann dabei kein verwertbares Aspirat gewonnen werden (Punctio Sicca), wird mit einer Jamshidi-Nadel ein Gewebepräparat aus dem Beckenkamm gewonnen. Die Proben werden nach May-Grünwald-Giemsa (Pappenheim) oder Wright-Giemsa gefärbt.

Für die Diagnosestellung einer AML muss der Blastenanteil im peripheren Blut oder Knochenmark wenigstens 20% betragen. Ausnahmen sind die APL mit t(15;17), die CBF-Leukämien mit t(8;21), inv(16) und t(16;16), bei denen allein der Nachweis der zytogenetischen Aberration die Diagnose „AML“ definiert.

In die Anzahl der Blasten fließen die Anzahl der Myeloblasten und der Blastenäquivalente mit ein. Der Myeloblast stammt von der multipotenten Progenitorzelle ab und ist die unreifste myeloische Zelle. Als Blastenäquivalente werden Monoblasten und Promonozyten bei Akuter Monoblastärer / Monozytärer / Myelomonozytärer Leukämie, Megakaryoblasten bei Akuter Megakaryoblastenleukämie und Promyelozyten bei APL gezählt. Erythroblasten werden nicht als Blasten gezählt, außer in den seltenen Fällen von Erythroleukämie [25, 26].

Zur Bestimmung der Zelllinienzugehörigkeit wird ergänzend die Zytochemie eingesetzt. Die Myeloperoxidase (MPO)-Färbung zeigt eine myeloische Differenzierung der Blasten an, allerdings schließt die Abwesenheit von MPO eine solche nicht aus, da frühe Myeloblasten und Monoblasten MPO-negativ sein können. Die Sudan-Schwarz B (SSB)-Färbung verhält sich ähnlich wie die MPO-Färbung, ist aber weniger spezifisch. Eine positive Anfärbbarkeit für die unspezifische Esterase (NSE) spricht meist für eine Akute Myelomonozytäre / Monozytäre Leukämie, eine Periodic Acid Schiff (PAS)-Färbung u.a. für eine Akute Erythroleukämie (bei PAS-positiver Erythropoese), insgesamt ist die PAS-Färbung aber als nicht sehr spezifisch zu werten [26].

### 1.4.2 Immunphänotypisierung / Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) können durch Zugabe und Kombination bestimmter Antikörper intrazytoplasmatische und oberflächliche CD (cluster of differentiation)-Antigene der Probe detektiert und ein leukämieassoziiertes Profil von Antigenen bzw. ein Leukämie-assoziiertes Phänotyp (LAIP) beschrieben werden.

Für den Leukämie-assoziierten Phänotyp werden verschiedene Gruppen unterschieden:

- 1) Ko-Expression von lymphatischen Antigenen auf AML-Blasten (s.u.),
- 2) asynchrone Antigenausprägung (gleichzeitige Expression von in der Granulozytopoese oder Monozytopoese auftretenden frühen und späten Markern),
- 3) quantitative Überexpression und
- 4) fehlende Expression von Markern [27].

Wenn leukämische Zellen zu 10% (intrazytoplasmatisch) bzw. 20% (oberflächlich) den Marker exprimieren, wird der Marker als positiv gewertet [26]. Beim Gesunden liegen im peripheren Blut keine Blasten und im Knochenmark < 5% Blasten (über alle kernhaltigen Zellen berechnet) vor.

Die nahezu bei jedem Patienten anwendbare Durchflusszytometrie ermöglicht es, bei Erstdiagnose sowie im Verlauf, die leukämischen Zellen hinsichtlich ihrer Zelllinienzugehörigkeit und ihres Differenzierungs- bzw. Reifungsgrades zu unterscheiden (s. Abb. 1.2).

Auch kann mithilfe des FACS im Krankheitsverlauf eine minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) nachgewiesen werden. Eine MRD liegt vor, wenn immunphänotypisch, molekular oder zytogenetisch Anhalt für das Vorhandensein leukämischer Zellen im Knochenmark besteht, diese aber nicht lichtmikroskopisch nachgewiesen werden können [30].



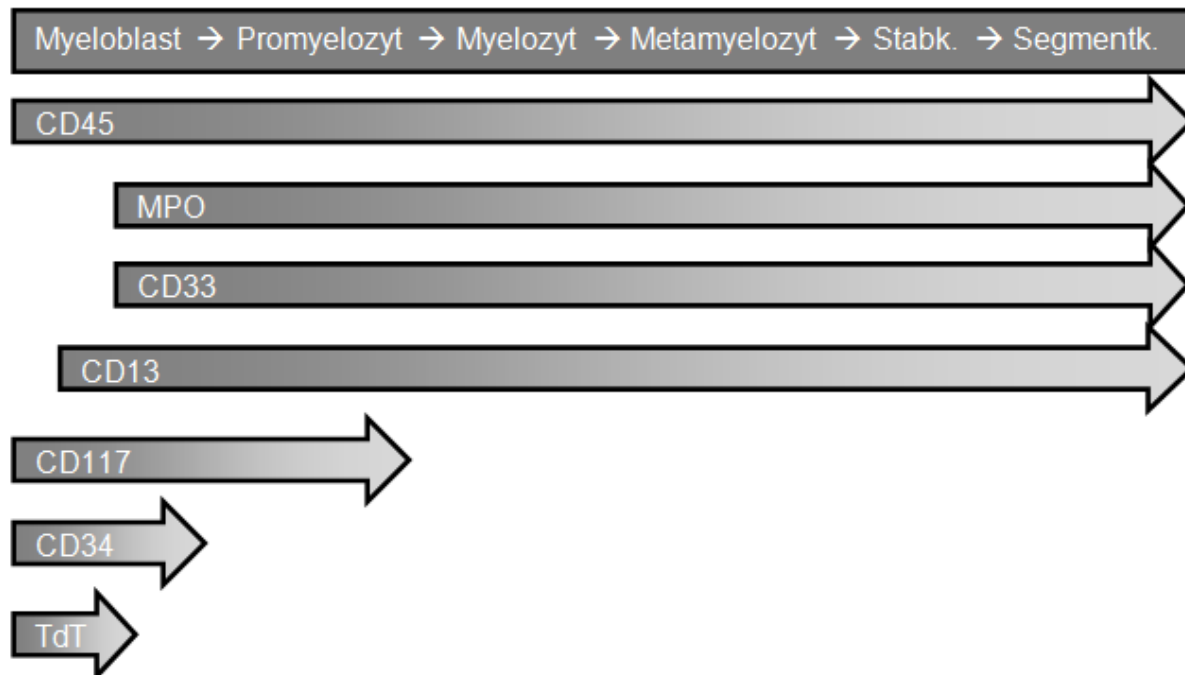
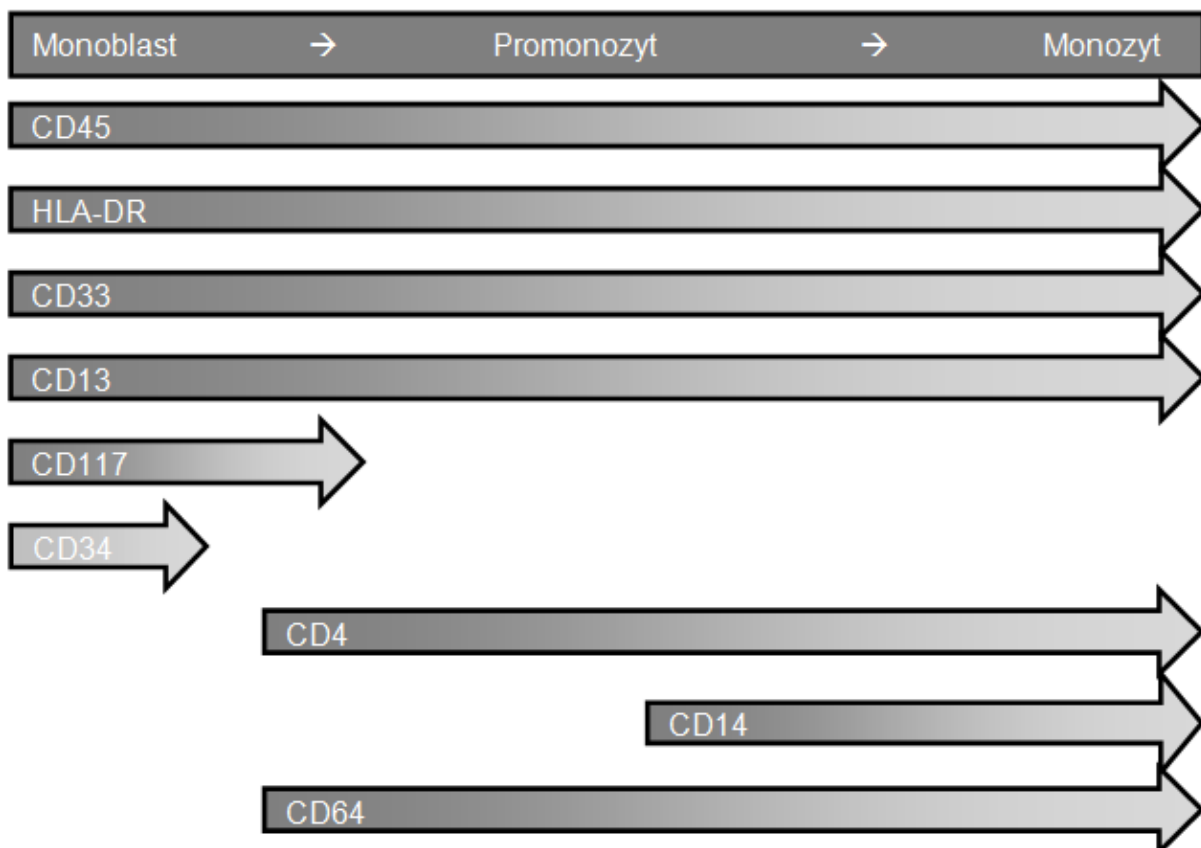
**Granulopoese (frühe Marker):****Monozytopoese (frühe Marker):**

Abbildung 1.2: Expression ausgewählter Antigene während der Granulopoese (A) und der Monozytopoese (B, HLA-DR: Humanes Leukozytenantigen DR, TdT: Terminale Desoxyribonucleotidyltransferase, Stabk.: Stabkerniger (neutrophiler) Granulozyt, Segmentk.: Segmentkerniger (neutrophiler) Granulozyt).

Selten werden mithilfe des FACS sog. Biphänotypische Akute Leukämien (BAL, Marker zweier Zelllinien auf einer Blastenpopulation) bzw. Bilineäre Leukämien (verschiedene Blastenpopulationen unterschiedlicher Zelllinienzugehörigkeit) diagnostiziert.

Diese werden klassischerweise nach Béné bzw. der European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) eingeteilt. Dabei werden für myeloische, B- und T-Zell-Marker je nach Linienspezifität 0,5 bis 2 Punkte vergeben, welche dann in ihrer Summe (je  $\geq 2$  Punkte für die myeloische sowie eine der lymphatischen Zellreihen) die Diagnose einer BAL erlauben (s. Tab. 1.1) [28, 29]:

**Tabelle 1.1: Klassifikation der Biphänotypischen Akuten Leukämie (BAL) nach Béné / EGIL (zyt.: zytoplasmatisch, oberfl.: oberflächlich)**

Punkte	Myeloische Linie	B-Zell-Linie	T-Zell-Linie
<b>2</b>	anti-MPO	zyt. CD79a zyt. IgM zyt. CD22	CD3 (zyt. / oberfl.) anti-TZR $\alpha/\beta$ anti-TZR $\gamma/\delta$
<b>1</b>	CD13 CD33 CDw65	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10
<b>0.5</b>	CD14 CD15 CD64 CD117	TdT CD24	TdT CD7 CD1a

Die aktuelle WHO-Klassifikation (s. Kap. 1.5.2) bezeichnet die nach EGIL Biphänotypischen Akuten Leukämien dagegen als MPAL (mixed phenotype acute leukemia, AL mit gemischtem Phänotyp) innerhalb der Gruppe „Akute Leukämien unklarer Linienzugehörigkeit“ und hat folgende Diagnosekriterien (s. Tab. 1.2) [3, 26].

**Tabelle 1.2: Diagnosekriterien einer Leukämie mit gemischtem Phänotyp nach der aktuellen WHO-Klassifikation**

Myeloische Zellreihe	B-Zell-Linie	T-Zell-Linie
MPO oder Nachweis einer monozytären Differenzierung (mind. 2 positive Marker aus NSE, CD11c, CD14, CD64, Lysozym)	Starke CD19-Expression plus 1 positiver Marker aus: CD79a, zyt. CD22, CD10 oder schwache CD19-Expression plus 2 positive Marker aus CD79a, zyt. CD22, CD10	Zytoplasmatisches CD3 oder CD3 auf der Zelloberfläche

### 1.4.3 Zytogenetik

Ein obligatorischer Bestandteil der initialen Diagnostik bei AML ist die Bestimmung des Karyotyps zum Nachweis von Chromosomenveränderungen. Die zytogenetische Analyse kann entweder durch mikroskopische Untersuchung der Chromosomenbanden in mindestens 20 Metaphasekernen des Knochenmarks, deren Kultivierung allerdings einige Tage dauert, oder mithilfe einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in Interphasekernen erfolgen [7].

Ca. 50 – 60% der AML-Patienten weisen einen aberranten Karyotyp auf, man spricht hierbei von einer zytogenetisch abnormalen AML (CA-AML) [31]. Sind keine Veränderungen des Karyotyps nachweisbar, wird die AML als zytogenetisch normal (CN-AML) beschrieben. Bei Nachweis von  $\geq 2$  Monosomien oder einer Monosomie plus 2 strukturellen Aberrationen spricht man von einem monosomalen Karyotyp [32]. Ein komplexer-aberranter Karyotyp ist definiert als  $\geq 3$  chromosomale Veränderungen.

Zytogenetischen Aberrationen kommt prognostische Bedeutung zu. Eine günstige prognostische Bedeutung wird hauptsächlich den Veränderungen t(15;17), t(8;21) und t(16;16) sowie inv(16) zugeschrieben, eine ungünstige vor allem einem monosomalen und komplex-aberranten Karyotyp, del(5q), -5, und -7 [33-35]. Die Prognose bei CN-AML wird im Kontext mit zusätzlich vorliegenden molekulargenetischen Veränderungen bestimmt.

### 1.4.4 Molekulargenetik

Für die molekulare Diagnostik sollten Proben aus dem Knochenmark (oder dem peripheren Blut) gewonnen werden. Das Erkennen von Genmutationen gelingt u.a.

mithilfe verschiedener PCR-Techniken, der DHPLC (Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie) und der Direktsequenzierung nach Sanger [36]. 85% der Patienten mit einer CN-AML haben mindestens eine Genmutation. Laut ELN-Leitlinien von 2009 wird empfohlen, diese Patienten auf NPM1, FLT3 und CEBPA zu untersuchen. Testungen auf RAS-, MLL-, KIT-, WT1-, RUNX1-, IDH1, TP53- und TET2-Mutationen erfolgen derzeit nur im Rahmen von Studien [26, 31, 36].

## 1.5 Klassifikation der AML

### 1.5.1 FAB-Klassifikation

Im Jahr 1976 nahm die „French-American-British (FAB) Co-operative Group“ erstmals eine systematische Einteilung der Akuten Myeloischen Leukämien vor. Mithilfe zytomorphologischer und zytochemischer Untersuchungsmethoden wurden je nach Zellliniendifferenzierung und Reifungsgrad der Blasten die AML-Untergruppen M1 bis M7 definiert [44]. In den darauffolgenden Jahren wurde die FAB-Klassifikation immer wieder ergänzt (s. Tab. 1.3) [45-49].

**Tabelle 1.3: Übersicht über die FAB-Klassifikation**

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

## 1.5.2 WHO-Klassifikation

2001 publizierte die World Health Organization (WHO) eine neue, vermehrt auf biologischen (= zytogenetischen und molekulargenetischen) Charakteristika basierende Systematik für die Einteilung der Akuten Myeloischen Leukämien [25, 50].

Im Jahr 2008 wurde die WHO-Klassifikation durch die Berücksichtigung neuer klinisch-wissenschaftlicher Erkenntnisse erneut überarbeitet und z.B. die NPM1- und CEBPA-Mutation als eigene provisorische Entitäten aufgenommen (s. Tab. 1.4) [3, 51].

**Tabelle 1.4: WHO-Klassifikation der Akuten Myeloischen Leukämien**

<p><b>AML mit typischen zytogenetischen Veränderungen</b></p> <p>AML mit t(8;21)(q22;q22) / RUNX1-RUNX1T1            AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22) / CBF<math>\beta</math>-MYH11            APL mit t(15;17)(q22;q11-21) / PML-RARA (FAB M3)            AML mit t(9;11)(p22;q23) / MLLT3-MLL            AML mit t(6;9)(p23;q34) / DEK-NUP214            AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2) / RPN1-EV11            AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1            vorläufig: AML mit NPM1<sup>mut</sup>            vorläufig: AML mit CEBPA<sup>mut</sup></p>
<p><b>AML verbunden mit myelodysplasieassoziierten Veränderungen</b></p> <p>Mehr als 20% Blasten im Knochenmark (KM) oder peripheren Blut (pB) <u>plus</u> Vorliegen eines der folgenden Faktoren:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) Vorhergehendes Myelodysplastisches Syndrom (MDS) oder myelodysplastische / myeloproliferative Neoplasie (MDS/MPN)</li> <li>(2) Vorhandensein von MDS-assoziierten zytogenetischen Veränderungen           <ul style="list-style-type: none"> <li>- komplex-aberranter Karyotyp (<math>\geq 3</math> chromosomale Veränderungen)</li> <li>- unbalancierte Veränderungen: -7 / del(7q), -5 / del(5q), i(17q) / t(17p), -13 / del(13q), del(11q), del(12p) / t(12p), del(9q), idic(X)(q13)</li> <li>- balancierte Veränderungen: t(11;16)(q23;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.1), t(2;11)(p21;q23), t(5;12)(q33;p12), t(5;7)(q33;q11.2), t(5;17)(q33;p13), t(5;10)(q33;q21), t(3;5)(q25;q34)</li> </ul> </li> <li>(3) Dysplasien in mindestens 50% der Zellen in 2 oder mehr Linien der Hämatopoese (Multiliniendysplasie) <u>plus</u> keine vorherige zytotoxische Therapie bei einer Erkrankung <u>plus</u> keine genetische Abweichung (s.o.)</li> </ol>
<p><b>Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien</b></p> <p>Alkylantien, ionisierende Radiatio, Topoisomerase-II-Inhibitoren, andere</p>

**AML, nicht weiter kategorisiert (NOS)**

- AML mit minimaler Differenzierung (FAB M0)
- AML ohne Ausreifung (FAB M1)
- AML mit Ausreifung (FAB M2)
- Akute Myelomonozytäre Leukämie (FAB M4)
- Akute Monoblastäre / Monozytäre Leukämie (FAB M5a/b)
- Akute Erythroleukämie (FAB M6)
  - Reine Erythroleukämie
  - Erythroleukämie, erythroid / myeloisch
- Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7)
- Akute Basophilenleukämie (ABL)
- Akute Panmyelose mit Myelofibrose (= Akute Myelofibrose, Akute Myelosklerose)

**Myeloisches Sarkom / Extramedullärer Myeloischer Tumor, Granulozytäres Sarkom, Chlorom****Myeloische Proliferationen verbunden mit Down-Syndrom**

- Transiente abnormale Myelopoese (= Transiente myeloproliferative Erkrankung)
- Myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom

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

- Akute Undifferenzierte Leukämie (AUL)
- Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1
- Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und t(v;11q23); MLL
- Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, B / myeloisch, nicht weiter kategorisiert
- Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, T / myeloisch, nicht weiter kategorisiert
- vorläufig: Natürliche Killer (NK)-Zell lymphoblastische Leukämie / Lymphom

## 1.6 Therapie

Die Prognose der AML wird im Wesentlichen von AML-assoziierten zellbiologischen Merkmalen wie der Zytogenetik und Molekulargenetik und patientenbezogenen Charakteristika wie Alter, Komorbiditäten und Allgemeinzustand (Karnofsky-Index / ECOG-Status) bestimmt [26]. Diese Faktoren beeinflussen einerseits das dauerhafte Ansprechen auf eine Chemotherapie und andererseits die Therapie-assoziierte Morbidität.

Oft wird im Rahmen von Studien eine risikostratifizierte Therapie durchgeführt. Die Therapie der AML gliedert sich in die Induktionstherapie, Konsolidierung und gegebenenfalls Erhaltungstherapie. Ziel der Induktionstherapie ist es, die Masse des AML-Zellklons zu verkleinern und eine hämatologische Remission (Blasten im KM < 5%, Neutrophile > 1,0 / nl und Thrombozyten > 100 / nl) zu erreichen. Der Standard in der Induktionstherapie bei Patienten von 18 – 60 Jahren (APL ausgenommen) besteht aus einem oder zwei Zyklen einer Chemotherapie mit dem Antimetaboliten Cytarabin (Ara-C, 100 - 200 mg/m<sup>2</sup> i.v. über 7 Tage) und einem Anthrazyklin (z.B. Daunorubicin 60mg/m<sup>2</sup>, Idarubicin 10-12mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche oder Mitoxantron 10-12mg/m<sup>2</sup> i.v. über 3 Tage = 7+3-Schema) [26, 52-54]. Mit diesem Regime werden CR-Raten von 60 – 80% erzielt [26]. Keine andere Therapie zeigte bisher eine eindeutige Überlegenheit [55-64]. Auch die alleinige Gabe von Hochdosis-Cytarabin oder die zusätzliche Gabe von Etoposid (Topoisomerase II-Hemmung) erzielte im Vergleich zum konventionellen 7+3-Schema keine besseren Ergebnisse [57, 65, 66].

Patienten im Alter von 60 – 74 Jahren wird, je nach gesundheitlichem Zustand, entweder die Standardinduktionstherapie (s.o.) oder diese mit einer reduzierten Dosis verabreicht (CR-Rate: 50%). Eine Studie konnte zeigen, dass in dieser Patientengruppe auch die Gabe einer höheren Daunorubicin-Dosis (90mg/m<sup>2</sup>) zu diskutieren ist [67]. Wird trotz gutem Zustand eine zytogenetische Hochrisikokonstellation erkannt, sollten Therapiekonzepte im Rahmen von Studien unter Einschluss der allogenen Stammzelltransplantation (SZT) erwogen werden, da die Remissionswahrscheinlichkeit in diesem Fall unter 30% sinkt [26]. Bei Patienten > 74 Jahre sollte die Therapieentscheidung individuell getroffen werden. Das mögliche Spektrum, abhängig von

Komorbiditäten und dem Willen des Patienten, reicht von der Standardinduktionstherapie bis hin zu palliativer Therapie mit Hydroxyurea oder „best supportive care“.

Mit einer Knochenmarks-Frühpunktion zwischen Woche zwei und vier wird das Therapieansprechen evaluiert. In der Regel (außer bei CBF-Leukämien) wird bei Patienten < 60 Jahre ein zweiter Induktionszyklus appliziert. Als primär therapierefraktär gelten Patienten, die auch auf diesen Zyklus nicht ansprechen.

Um das leukämische Zellkompartiment komplett zu eradizieren, wird anschließend eine Konsolidierung (Postremissionstherapie) durchgeführt. Diese besteht in der Niedrigrisikogruppe (s. Kap. 3.4) aus einer Hochdosis Ara-C-basierten Chemotherapie mit einer kumulativen Dosis von 54-72 g/m<sup>2</sup> über 3-4 Zyklen [26, 68, 69]. In der „intermediären“ Risikogruppe kann ebenfalls diese Therapie erfolgen [26, 70, 71]. Jedoch gibt es zunehmend Daten, welche im Falle eines geeigneten Spenders auf ein verbessertes Gesamtüberleben nach allogener SZT hinweisen [72]. Bei Hochrisikopatienten soll konsolidierend – wenn möglich in jedem Fall – eine allogene SZT durchgeführt werden [26]. Patienten 60 – 74 Jahre können in der Postremissionstherapie mit wiederholten Zyklen einer altersadaptierten Hochdosis Ara-C-Therapie behandelt werden.

Aktuell klinisch geprüft werden Genotyp-spezifische Therapiekonzepte für eine molekulare zielgerichtete Therapie, welche zusätzlich zur Standardtherapie verabreicht wird. Studienmedikationen umfassen neben Zytostatika (z.B. Clofarabin) auch weitere Substanzen wie Antikörper (z.B. Gemtuzumab-Ozogamicin) oder Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Dasatinib, Midostaurin und Quizartinib [73, 74].

Liegt eine APL (FAB M3) vor, wird diese mit einer ergänzenden „targeted therapy“ behandelt. Bei dem durch die t(15;17)-Mutation veränderten Retinsäurerezeptor wird zusätzlich zu einer Anthrazyklin-basierten Chemotherapie eine Therapie mit All-trans-Retinoidsäure (ATRA) durchgeführt. Neben der Gabe in Induktion und Konsolidierung wird hier auch eine Erhaltungstherapie mit ATRA und MTX durchgeführt [75-77]. Die Ergebnisse einer kürzlich publizierten Studie weckten Hoffnung, die APL künftig ohne Chemotherapie behandeln zu können: ATRA in Kombination mit Arsentrioxid (ATO) zeigte sich der eigentlichen APL-Standardtherapie (ATRA plus Chemotherapie)



hinsichtlich der CR / CRi-Rate, dem eventfreien Überleben und dem Gesamtüberleben ebenbürtig, wenn nicht sogar überlegen [78].

Wichtig für den Erfolg der zytostatischen Therapie ist die Durchführung adäquater Supportivmaßnahmen, wie sorgfältige Hygiene und die prophylaktische bzw. therapeutische Gabe von Antibiotika, ggf. Antimykotika und Virostatika [79, 80]. Daneben tragen die adäquate Transfusion von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten und Prophylaxe einer Tumorlyse (ausreichende Hydrierung, Gabe von Allopurinol oder gegebenenfalls Rasburicase) zu einer signifikanten Reduktion der Therapiemortalität bei [81, 82].

## 2. Ziele der Arbeit

Die Risikogruppenklassifikation nach ELN ist zur Prognoseabschätzung der AML gut etabliert. Weitestgehend ungeklärt hingegen ist die Frage, ob der biologische Reifegrad von Leukämiezellen einen eigenständigen Risikofaktor darstellt. Basierend auf der Hypothese, dass der biologische Reifegrad bei der AML ein Prognosefaktor ist, sollten in dieser Arbeit folgende Fragen untersucht werden:

- 1) Welchen Einfluss hat biologische Reife / Unreife auf die klinischen Parameter „komplette Remission“ (CR / CRi-Rate), „Rezidiv-freies Überleben“ (RFS) und „Gesamtüberleben“ (OS)?
- 2) Hat der biologische Reifegrad einer AML auch innerhalb der verschiedenen ELN-Risikogruppen noch eine prognostische Bedeutung?

### 3. Patienten, Material und Methoden

#### 3.1 Patienten und retrospektive Datenanalyse

Im Zeitraum vom 01. Januar 2003 bis 30. April 2012 wurden an der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, insgesamt 300 Patienten > 18 Jahre identifiziert, bei denen bei Erstdiagnose der AML ein kompletter durchflusszytometrischer Befund vorlag. Patienten mit einer auswärtigen AML-Erstdiagnose bzw. jene ohne FACS-Befund wurden nicht mit eingeschlossen.

Die Beschaffung der Krankenakten gelang bei drei Patienten nicht. Aus den Akten bzw. der internen SAP-Datenbank der gesamten Krankheitsverläufe wurden, soweit möglich, folgende Daten entnommen (Definition CR / CRi, RFS und OS: s. Kap. 3.6):

- bei Erstdiagnose
  - Datum, Personalien, Alter, Ethnizität, Größe, Gewicht,
  - Raucherstatus mit Anzahl der „pack years“, Vorerkrankungen (bekanntes Malignom, kardiovaskuläre und pulmonale Vorerkrankungen, Diabetes), Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index (HCT-CI Score; s. Kap. 3.2)
  - Einschluss in eine Studie, ELN-Risikogruppe (s.u.), Anzahl der Blasten im peripheren Blut und Knochenmark, FACS-Befund, Befund der Molekulargenetik (erhoben wurden: FLT3-ITD, FLT3-TKD-, NPM1-, CBF-, MLL-, CEBPA-, PML-RARA-Status) und Zytogenetik mit anschließender Einteilung nach WHO, FAB-Subtyp (in Zusammenschau der Befunde der Zytomorphologie, Zytochemie, Durchflusszytometrie und ggf. Pathologie)
  - Laborparameter (Hämoglobin in g / dl, Leukozyten / nl, Thrombozyten / nl, Lactatdehydrogenase (LDH) in U / l, Gesamtbilirubin in mg / dl, Serumkreatinin in mg / dl, Serumalbumin in g / dl), Splenomegalie
  - Einschluss in eine Studie
  - Art der verabreichten (Chemo-)Therapie, Gabe von Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF)

- während Frühpunktion und Konsolidierung
  - Datum, Art der verabreichten Chemotherapie, Gabe von G-CSF, Anzahl der Blasten im pB und KM, Laborparameter (s.o.)
- bei kompletter Remission (CR) bzw. inkompletter Remission (CRi; s. Kap. 3.6)
  - Datum, Laborparameter (s.o.)
- im Fall eines primären Therapieversagens, Rezidiv und Transplantation
  - Datum, Anzahl der Blasten im pB und KM, Laborparameter (s.o.)
- bei Tod
  - Datum, Laborparameter (s.o.)
  - Dauer eines eventuellen Intensivaufenthaltes im Verlauf

Die ausführlichen durchflusszytometrischen Befunde waren nicht in den Patientenakten, sondern nur im Archiv des Labors für Durchflusszytometrie der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie am Campus Virchow Klinikum zugänglich.

Die Einwilligungen der Patienten zur Durchführung der Diagnostik (Knochenmarkpunktion, Bildgebung) und stationären Behandlung mit Chemotherapie, ggf. nach Einschluss in eine Studie, lagen vor. Die Durchführung der Sammlung der Daten im Rahmen der Studien erfolgte unter schriftlicher Einwilligung der Patienten, sowie in Einklang mit den europäischen Richtlinien zur guten klinischen Praxis (good clinical practice, GCP).

Konnte der weitere klinische Verlauf der Patienten nicht anhand der Krankenakten ermittelt werden, so wurde dieser mithilfe der betreuenden Hausärzten und Hämatologen erhoben.

### **3.2 HCT-CI Score**

Der Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index (HCT-CI Score) wurde entwickelt, um Nebenerkrankungen des Patienten zu erfassen und Mortalität und Überleben noch genauer einschätzen zu können (s. Tab. 3.1). Vorerkrankungen werden je nach Schwere mit einem bis drei Punkten bewertet und addiert.

**Tabelle 3.1: HCT-CI Score (nach: Deutsch-Österreichische Studiengruppe Akute Myeloische Leukämie (AML SG) [83], <sup>a</sup>Stenose einer oder mehrerer Koronararterien und benötigte medikamentöse Therapie, Stent oder Bypass, EF: Ejektionsfraktion, TIA: Transiente Ischämische Attacke, NW: Normwert, BMI: Body-Mass-Index, AST: Aspartat-Aminotransferase, ALT: Alanin-Aminotransferase, SLE: Systemischer Lupus Erythematoses, RA: Rheumatoide Arthritis, DLCO: Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid, FEV1: Einsekundenkapazität)**

Komorbidity	Definition	Punkte HCT-CI Score
Arrhythmie	Vorhofflimmern, Sinusknotensyndrom oder Ventrikuläre Arrhythmien	1
Kardiale Vorerkrankung	Koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz <sup>a</sup> , Myokardinfarkt oder EF < 50%	1
Chronisch-Entzündliche Darmerkrankung	Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa	1
Diabetes	Insulinabhängig oder Therapie mit oralen Antidiabetika	1
Zerebrovaskuläre Erkrankung	TIA oder Schlaganfall	1
Psychiatrische Störung	Psychiatrische Konsultation oder psychiatrische Behandlung bei Depression oder Angsterkrankung	1
Hepatische Vorerkrankung (leicht)	Chronische Hepatitis, Bilirubin > NW bis 1,5facher NW oder AST/ALT > NW bis 2,5facher NW	1
Adipositas	BMI > 35 kg/m <sup>2</sup>	1
Infektion	Fortsetzung der Antibiotischen Therapie nach Tag 0	1
Rheumatologische Vorerkrankung	SLE, RA, Polymyositis, Sharp-Syndrom oder Polymyalgia Rheumatica	2
Magenulcus	Therapiebedürftiges Magenulcus	2
Renale Vorerkrankung	Serumkreatinin > 2 mg/dl, Patient dialyseabhängig oder vorherige Nierentransplantation	2
Pulmonale Vorerkrankung (mäßig)	D <sub>LCO</sub> und/oder FEV <sub>1</sub> 66 – 80% oder Dyspnoe bei leichter Anstrengung	2
Vorheriger solider Tumor	Krankenvorgeschichte beinhaltet Behandlung des Patienten, außer Basaliom und Spinaliom	3
Herzklappenerkrankung	Außer Mitralklappenprolaps	3
Pulmonale Vorerkrankung (schwer)	D <sub>LCO</sub> und/oder FEV <sub>1</sub> ≤ 65% oder Ruhedyspnoe oder Sauerstofftherapie	3
Hepatische Vorerkrankung (schwer)	Leberzirrhose, Bilirubin > 1,5facher NW oder AST/ALT > 2,5facher NW	3

Es konnte nachgewiesen werden, dass ein höherer Summenscore mit vermindertem Therapieansprechen, erhöhter Toxizität und verkürztem Overall Survival (OS) einhergeht [83]. Der HCT-CI Score wurde vor allem für Patienten entwickelt, welche vor einer allogenen SZT standen. Darüber hinaus konnte ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen der Höhe des HCT-CI Scores und des steigenden Therapierisikos für AML-Patienten ohne Transplantation gezeigt werden [84].

### **3.3 Immunphänotyp**

Ein durchflusszytometrischer Befund wurde bei 284 Patienten anhand der Entnahme von Knochenmark und bei 16 Patienten durch eine periphere Blutprobe erstellt. Bei Letzteren konnte u.a. aufgrund einer „Punctio Sicca“ kein Knochenmark gewonnen werden. Die Durchflusszytometrie wurde zusätzlich zur Sicherung der Erstdiagnose auch zur Verlaufskontrolle während der Induktion (Frühpunktion an d12 – d16), vor Beginn der Konsolidierung und zu weiteren Verlaufskontrollen benutzt.

Die Messungen im Durchflusszytometer erfolgten mit dem FACSCalibur- und dem FACSCanto™ -System der Firma Becton & Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA).

#### **3.3.1 Aufbereitung der Proben**

Als Untersuchungsmaterial wurden mit EDTA zur Antikoagulation versetzte und bei Raumtemperatur gelagerte Knochenmark- oder Blutproben verwendet. Überstieg der Leukozytengehalt des zusätzlich angefertigten Blutbildes 10 / nl, wurde die Probe mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt.

Die Messung der CD-Oberflächenmoleküle (CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD7.1 / NG2, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD36, CD38, CD56, CD64, CD65, CD117, CD133, CD235a, HLA-DR) begann dabei mit der 20-minütigen Inkubation des Gemisches aus 200 µl Probenmaterial und dem jeweiligen fluoreszierenden Antikörper bei Raumtemperatur im Dunkeln. In der folgenden Tabelle abgebildet sind die verschiedenen Ansätze mit den eingesetzten Antikörper- und Fluorochromkombinationen (s. Tab. 3.2 und Kap. 3.3.2):

**Tabelle 3.2: Oberflächenfärbungen (FITC: Fluorescein Isothiocyanat, PE: Phycoerythrin, PC5.5: Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanin 5.5, APC: Allophycocyanin)**

Ansatz	FITC-Antikörper	PE-Antikörper	PC5.5-Antikörper	APC-Antikörper
1	IgG1	IgG1	CD45	IgG1
2	CD33	CD13	CD45	CD34
3	CD10	CD13	CD45	CD19
4	CD2	CD1a	CD45	CD3
5	CD33	CD7	CD45	HLA-DR
6	CD34	CD7.1	CD45	CD117
7	CD65	CD56	CD45	CD34
8	CD36	CD235a	CD45	CD13
9	CD61	CD33	CD45	CD4
10	CD15	CD33	CD45	CD20
11	CD64	CD33	CD45	CD14
12	sIgM	CD19	CD45	CD34
13	CD38	CD33 CD13	CD45	CD34

Anschließend wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 3 ml Lysepuffer zersetzt und wiederum 10 Minuten inkubiert. Das durch zweimalige Zentrifugation und Waschung mit 3 ml bzw. 300 µl PBS gewonnene Zellpellet war danach messfertig.

Die Probenherstellung für die Bestimmung der intrazytoplasmatischen Marker (MPO, TdT, LF, cyCD3, cyCD22, cyCD79a) startete mit der Dunkelinkubation von 50 µl Probenmaterial und 100 µl des Formaldehyd-enthaltenen Fixierungsmediums (Fix&Perm®) über 15 Minuten bei Raumtemperatur; anschließend wurden 3 ml PBS zugesetzt und zentrifugiert (s. Tab. 3.3). Die Zellmasse wurde dann mit 100 µl Permeabilisierungslösung (Fix&Perm®) und Fluoreszenzantikörpern wiederum 15 Minuten inkubiert.

Tabelle 3.3: Zytoplasmatische Färbungen

Ansatz	FITC-Antikörper	PE-Antikörper	PC5.5-Antikörper	APC-Antikörper
14	IgG1	IgG1	CD45	IgG1
15	MPO	CD22	CD45	CD34
16	TdT	CD79a	CD45	CD3

Nach Zugabe von 3 ml PBS wurde die Probe einer erneuten Zentrifugation zugeführt und das entstehende Zellpellet konnte durchflusszytometrisch analysiert werden [85].

### 3.3.2 Funktionsprinzipien des FACS

Mithilfe des FACS lassen sich die den Laserstrahl passierenden Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität und damit der Zelllinienzugehörigkeit und des Reifegrades unterscheiden.

Das Durchflusszytometer besteht aus drei Bestandteilen: dem Flüssigkeitssystem, welches für den Transport des zu untersuchenden Materials sorgt; den Lasern, Filtern sowie Detektoren des optischen Systems und der Verarbeitungselektronik.

Durch Druck auf die Probenflüssigkeit wird diese in die Messzelle (Durchflusszelle) geleitet, wo sie von Mantelflüssigkeit bzw. Hüllflüssigkeit umspült wird. Damit wird gewährleistet, dass die Zellen beschleunigt werden und sich mittig im Probenfluss befinden (hydrodynamische Fokussierung). Das Ziel ist es, dass die Partikel möglichst einzeln den durch die Anregungsoptik geformten einfallenden Laserstrahl passieren und mit dieser optimalen Projizierung die bestmögliche Auflösung erreicht wird. Messverfälschungen entstehen einerseits durch in den Fluss geratene Luftbläschen und Zelltrümmer und andererseits durch einen zu hohen Probendruck. Dieser führt zu einer gesteigerten Flussrate und einer verkürzten Messzeit, kann die Anstrahlung der Zellen in einer geordneten Reihenfolge aber zunehmend nicht mehr gewährleisten.

In der Anregungsoptik werden blaues Argonlaserlicht (488 nm) und rotes Helium-Neon-Laserlicht (633 nm) über Glasfaserkabel geleitet und mittels fokussierender Prismen und Linsen als sich nicht kreuzende Laserstrahle in die Durchflusszelle gelenkt. Trifft



nun das einfallende Laserlicht auf Kolloide, wird es gestreut (Tyndall-Effekt). Das von jedem Partikel weitergegebene Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) hängt von der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) von der zellinternen Granularität ab. Anhand der FSC- und SSC-Charakteristika dieser Streuung können die Zelltypen der Probe differenziert werden.

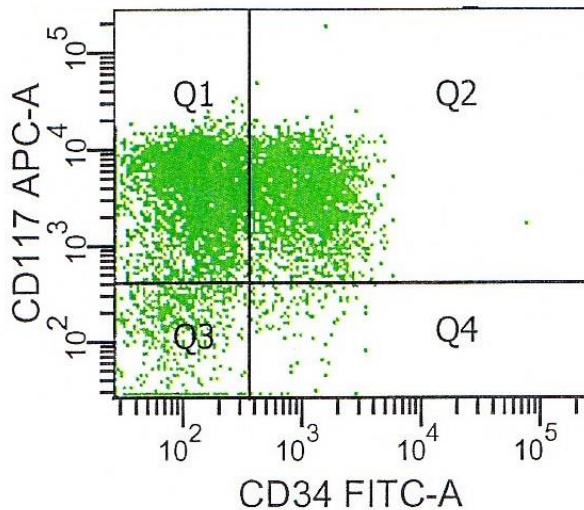
Das Laserlicht wirkt nicht nur zur Erfassung der totalen Lichtstreuung, sondern auch zur Anregung der mit dem Antikörper gebundenen Fluorochrome auf den Zellen. Durch die im Absorptionsspektrum aufgenommene Lichtenergie werden Elektronen des Moleküls angeregt und gehen nach Aussendung von Lichtquanten bzw. Photonen (Emissionsspektrum) wieder in den Grundzustand über. Die Intensität dieser sog. Fluoreszenz steigt, umso mehr Fluorochrome gebunden wurden. Durch die Wellenlänge eines Lasers können verschiedene Fluorochrome angeregt werden, deren Absorptionsspektren diese Wellenlänge beinhalten. Die Absorptionsmaxima der Fluorochrome sind jedoch kurzwelliger als die jeweiligen Emissionsmaxima, sodass bei Anregung des Fluorochroms in dessen Absorptionspeak nicht Licht mit der höchsten Intensität emittiert wird. Dadurch können unterschiedliche Fluorochrome, z.B. FITC (Fluorescein Isothiocyanat), APC (Allophycocyanin), PerCP-Cy 5.5 (Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanin 5.5) und PE (Phycoerythrin) auch in Kombination verwendet werden.

Das von den Zellen gestreute und emittierte Licht erreicht über Sammellinsen, Glasfaserkabel, Spiegel und diverse optische Filter die Photodioden (Verarbeitung des FSC-Signals) und Photomultiplier (Registrierung des SSC- und Fluoreszenzsignals). Diese Detektoren wandeln durch Erzeugung eines Spannungspulses Licht- in elektronische Signale und schließlich mithilfe von analogen bzw. digitalen Signalprozessoren in einen digitalen Wert um [85, 86].

#### **3.3.3 Auswertung**

Als Mess- und Auswertungssoftware standen CellQuest und FACSDIVA™ zur Verfügung. Die Blastenregion wurde über CD45 und Streulichteigenschaften definiert („immunologisches Gate“), wobei 30.000 Zellen aufgenommen wurden (s. Abb. 3.1).

Die in dieser Blastenregion (Teilmenge) liegenden Zellen wurden auf ihre Positivität bzw. Negativität bezüglich der o.g. Antigene untersucht. Im Falle von Oberflächenantigenen wurde die Population als positiv gewertet, wenn  $\geq 20\%$  der Zellen das Antigen exprimierten, bei intrazytoplasmatischen Antigenen galten  $\geq 10\%$  als positiv.



**Abbildung 3.1:** Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse im Blastengate (CD45 vs. SSC). In Quadrant 1 (Q1, UL = upper left) liegen Zellen, welche nur CD117 gebunden haben, sich in Quadrant 2 (Q2, UR = upper right) befindende Zellen haben CD117 und CD34 gebunden (doppelt positiv). Quadrant 4 (Q4, LR = lower right) ist nur positiv für CD34 und Quadrant 3 (Q3, LL = lower left) für CD117 und CD34 doppelt negativ.

### 3.4 Durchflusszytometrischer „Reifescore“ und dessen Entwicklung

Um den biologischen Reifegrad einer AML aufgrund ihres durchflusszytometrisch gemessenen Immunphänotyps quantifizieren zu können, wurde ein „Reifescore“ entwickelt, dessen Erhebung mithilfe des durchflusszytometrischen Befundes einfach durchführbar war. Dabei wurde bewusst auf Parameter verzichtet, welche nicht über den gesamten Untersuchungszeitraum bestimmt wurden oder welche üblicherweise schwer zu quantifizieren sind.

Wie bereits erwähnt, exprimieren Blutzellen im Laufe ihrer Entwicklung verschiedene Oberflächen- und intrazytoplasmatische Marker; dabei kann je nach Antigenmuster

festgestellt werden, um welche Zellart es sich handelt und in welchem Reifestadium sich diese befindet (s. Kap. 1.4.2). Unreife myeloische Zellen zeigen dabei eine quantitativ sehr unterschiedliche starke Expression der Antigene CD34, CD117, CD13, CD33, TdT, HLA-DR und MPO. CD38 wurde erst im Jahr 2011 in die durchflusszytometrische AML-Erstuntersuchung eingeführt und konnte aufgrund zahlreicher fehlender Werte deshalb nicht in den Score einfließen.

Unter dem Gesichtspunkt eines einfachen und gut quantifizierbaren Score-Systems eigneten sich für den „Reifescore“ die Marker CD34, CD117 und TdT besonders gut. CD34 ist ein transmembranäres monomeres Oberflächenglykoprotein und spielt eine große Rolle als Stammzellmarker [88]. Bis hin zum Promyelozyten bzw. Monoblasten findet sich CD117, ein Tyrosinkinaserzeptor (c-Kit), dessen Dimerisierung durch Bindung des Stammzell-Faktors (SCF) zur Zellmobilisierung führt, auf der Oberfläche [89]. TdT (Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase) ist eine intranukleäre DNA-Polymerase, welche Nukleotide an das freie 3'-Ende der DNA anhängen kann [90]. TdT wird üblicherweise bei der Akuten Lymphatischen Leukämie exprimiert, jedoch können auch sehr unreife AML eine TdT-Expression aufweisen.

Der „Reifescore“ wertet die Menge blastärer Zellen, welche die Marker CD34, CD117 und TdT exprimieren. Dieser Anteil wird im Blastengate in Prozent angegeben. Je nach Stärke der Expression bzw. des Prozentsatzes Marker-positiver Zellen wurden entsprechend Punkte zugeordnet. Gewichtet wurde der Score zugunsten von CD34 und TdT, welche bei Positivität ( $\geq 20\%$  für CD34 bzw.  $\geq 10\%$  für TdT) einen Punkt erhielten und bei  $\geq 50\%$ iger Expression je zwei Punkte. Für CD117 wurde ein halber bzw. ein Punkt vergeben, da dieser Marker noch etwas länger als die beiden anderen Marker, bis hin zum Promyelozyten, exprimiert wird und deshalb etwas weniger spezifisch für Unreife ist. Ein Wert von 5 Punkten zeigt hier somit die „maximale Unreife“ an und ein kleinerer Wert zunehmende Reifung (s. Tab. 3.4.):

Tabelle 3.4: Punkteverteilung für den „Reifescore“

Marker	Prozent (%)	Punkte
CD34	0-19	0
	20-49	1
	≥ 50	2
CD117	0-19	0
	20-49	0,5
	≥ 50	1
TdT	0-9	0
	10-49	1
	≥ 50	2

Ein „Reifescore“ mit vollständigen Angaben zu CD34, CD117 und TdT konnte von 276 / 300 (92%) Patienten erhoben werden (s. Tab. 3.5):

Tabelle 3.5: Verteilung der Werte des „Reifescorers“. Dabei gilt ein Wert von „0“ als sehr reif, ein Wert von „5“ als sehr unreif

Punkte „Reifescore“	Anzahl (n)	Prozent (%)
0	35	11,7
0,5	20	6,7
1	54	18,0
1,5	36	12,0
2	24	8,0
2,5	11	3,7
3	73	24,3
3,5	3	1,0
4	12	4,0
4,5	2	0,7
5	6	2,0
Fehlend	24	8,0
Gesamt	300	

Für die statistische Auswertung sollten innerhalb des Punktekontinuums zwei möglichst gleich große Gruppen gebildet werden. Die größtmögliche Trennschärfe zwischen zwei

potentiellen Gruppen wurde durch Korrelation der Cut-Values < 1,0; < 1,5; < 2,0; < 2,5 und < 3,0 mit dem OS und RFS berechnet.

Die höchste Trennschärfe, sowohl für das RFS als auch für das OS, zeigten sich bei einem Wert von < 1,5 Punkten (s. Tab. 3.6):

**Tabelle 3.6: Signifikanzen und Gruppenverteilungen potentieller Cut-Values**

Cut-Value in Punkten	Gruppenverteilung Pat. mit „Reifescoré“ (n = 276)	RFS (Monate)	OS (Monate)
< 1 (0-0,5 und 1-5)	55 / 221	$p = 0,012$	$p = 0,084$
<b>&lt; 1,5 (0-1 und 1,5-5)</b>	<b>109 / 167</b>	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
< 2 (0-1,5 und 2-5)	145 / 131	$p = 0,126$	$p = 0,007$
< 2,5 (0-2 und 2,5-5)	169 / 107	$p = 0,008$	$p = 0,006$
< 3 (0-2,5 und 3-5)	180 / 96	$p = 0,031$	$p = 0,036$

Auch im Hinblick auf die entstehenden Gruppengrößen wurde ein Cut-Value von < 1,5 festgelegt. Es bildete sich nun einerseits eine Gruppe von 0 – 1 Punkten (109 Patienten, 39,5%), die aufgrund ihrer sehr geringen bis fehlenden Expression der unreifen Marker CD34, CD117 und TdT nachfolgend AML-R („reif“) genannt wird. Dagegen spiegelte die Gruppe von 1,5 – 5 Punkten (167 Patienten, 60,5%) Unreife wider und wird im Folgenden AML-U („unreif“) genannt. Bei der Betrachtung beider Gruppen des „Reifescorés“ zeigte sich ein vermehrtes Vorkommen der AML-U in den auch nach FAB unreifen Leukämien (FAB M0, M1). AML-R traten dagegen vermehrt in den reifen FAB-Gruppen auf (s. Abb. 3.2):

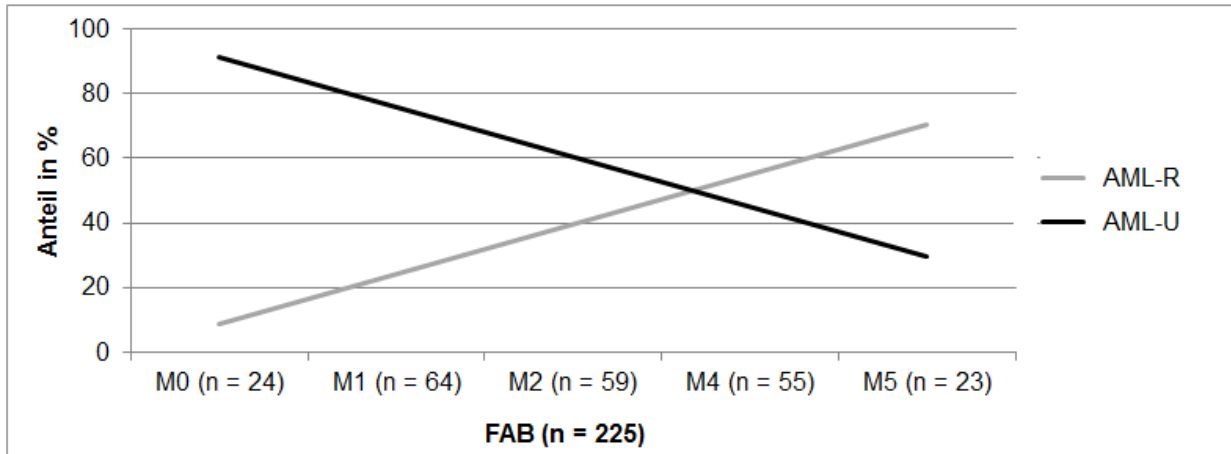


Abbildung 3.2: „Reifescore“ innerhalb der „AML, NOS“-Subgruppen (analog FAB).

### 3.5 Risikogruppeneinteilung nach ELN

Die Prognose der Patienten wird beeinflusst durch eine Vielzahl von biologischen und klinischen Parametern. Die bisherigen Prognosesysteme basieren vor allem auf genetischen Veränderungen, da diese, neben dem Alter, den größten Einfluss auf das Überleben haben [31, 87]. Um Studiendaten dabei besser vergleichbar zu machen, wurde vom European LeukemiaNet 2009 anhand von zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen im Hinblick auf das Therapieansprechen nach Induktion und die Überlebenswahrscheinlichkeit eine Risikogruppeneinteilung veröffentlicht (s. Tab. 3.6). Aufgrund der nicht unumstrittenen Einteilung der heterogenen „intermediären“ Gruppen (s. Kap. 5) und zur Förderung einer adäquaten Gruppengröße wurden diese in unserer Arbeit zu einer einzigen „intermediären“ Gruppe zusammengefasst [26].

Keiner ELN-Risikogruppe zugeordnet wurden Patienten, die:

- eine Biphänotypische oder Bilineäre Leukämie hatten (n = 13),
- einen positiven molekulargenetischen Befund für NPM1, FLT3-ITD oder CEBPA aufwiesen, aber der zytogenetische Befund ausstand (n = 23, insgesamt aber fehlte der zytogenetische Befund bei n = 27 Patienten) und
- jene, die sich trotz vorhandenem molekulargenetischen und zytogenetischen Befund nicht eindeutig einer ELN-Risikogruppe zuordnen ließen (n = 17).

Tabelle 3.6: Risikogruppeneinteilung nach ELN [26]

„Günstig“	<ul style="list-style-type: none"> <li>- t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1</li> <li>- inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11</li> <li>- normaler Karyotyp mit NPM1<sup>mut</sup> / FLT3-ITD<sup>neg</sup></li> <li>- normaler Karyotyp mit CEBPA<sup>mut</sup> (biallelisch)</li> </ul>
„Intermediär I“	<ul style="list-style-type: none"> <li>- normaler Karyotyp mit NPM1<sup>mut</sup> / FLT3-ITD<sup>pos</sup></li> <li>- normaler Karyotyp mit NPM1<sup>WT</sup> / FLT3-ITD<sup>pos</sup></li> <li>- normaler Karyotyp mit NPM1<sup>WT</sup> / FLT3-ITD<sup>neg</sup></li> </ul>
„Intermediär II“	<ul style="list-style-type: none"> <li>- t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL</li> <li>- zytogenetische Veränderungen, die nicht zur „günstigen“ oder „ungünstigen“ Risikogruppe gehören</li> </ul>
„Ungünstig“	<ul style="list-style-type: none"> <li>- inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1</li> <li>- t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214</li> <li>- t(v;11)(v;q23); MLL-Rearrangements</li> <li>- del(5) oder del(5q); del(7); abn(17p); komplex-aberranter Karyotyp</li> </ul>

### 3.6 Datenerfassung, Datenauswertung und Einsatz statistischer Verfahren

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie der Charité Universitätsmedizin Berlin und dem Statistik-Service Dr. Gladitz in Berlin.

Die Erfassung der Merkmale erfolgte zunächst mithilfe des Programmes MS Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA); der entstandene Datensatz wurde zur statistischen Auswertung in IBM SPSS Statistics®, Version 20 (IBM® 2011, Armonk, NY, USA) konvertiert.

Die Testung auf signifikante Unterschiede der CR / CRi-Raten der jeweiligen Gruppen, welche zeitunabhängig waren, wurde mit dem Fisher's-Exact-Test (2x2-Kontingenztafel) bzw. dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson (komplexere Stichproben) durchgeführt.

Als in kompletter Remission gilt ein Patient, welcher nach der Induktionstherapie Blasten im KM < 5 % (diese auch ohne Auerstäbchen), keine Blasten im peripheren Blut, Neutrophile > 1,0 / nl und Thrombozyten > 100 / nl aufwies und keine Transfusion von Erythrozytenkonzentraten benötigt.

In inkompletter Remission (CRi) war ein Patient wenn er alle CR-Kriterien erfüllte, aber sich noch in Neutropenie (Neutrophile  $< 1,0$  / nl) und/oder Thrombopenie (Thrombozyten  $< 100$  / nl) befand. Aufgrund der oft erst nach der Entlassung eintretenden und so nur unvollständig dokumentierten CR wurden CR und CRi zusammengefasst.

Überlebenszeitanalysen wurden mit der Kaplan-Meier-Methode durchgeführt, bei welcher die Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines Ereignisses innerhalb eines bestimmten Zeitrahmens berechnet wird. Zum Vergleich von Überlebenszeiten zweier oder mehrerer Gruppen wurde der Logrank (Mantel-Cox)-Test angewandt. Das Rezidivfreie Überleben (RFS) wurde definiert als der Zeitraum gemessen vom Tag der CR / CRi bis zum Tag des Rückfalls, welcher durch einen Anstieg der Blastenpopulation  $> 5\%$  im Knochenmark definiert ist. Das OS wurde berechnet vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Tod aus jeglichem Grund.

Mithilfe der Kaplan-Meier-Methode wurden ebenfalls die Signifikanzen bzw. Trennschärfen verschiedener Cut-Values für den „Reifescoré“ bestimmt. Die Bestimmung der Phänotypen in den gebildeten Gruppen des „Reifescorés“ und innerhalb der ELN-Risikogruppen erfolgte anhand des exakten Testes nach Fisher. Die durchgeführten Messungen entsprachen univariaten Analysen.

Das Signifikanzniveau wurde stets auf  $p < 0,05$  festgelegt. Sofern in der Auswertung nicht anders gekennzeichnet, ist mit dem Begriff „durchschnittlich“ der „Mean“ bzw. Mittelwert gemeint. Die Literaturverwaltung fand mit Hilfe des Programms EndNote X5 (Thomson Reuters 2011, NYC, NY, USA) statt.



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Deskriptive Statistik

#### 4.1.1 Patientencharakteristika

Das Gesamtkollektiv umfasste 300 Patienten im Alter von 18 – 89 Jahren, welche von Januar 2003 – April 2012 mit einer AML erstdiagnostiziert wurden (s. Tab. 4.1). Das mediane Erkrankungsalter lag in dieser Studie bei 61 Jahren (Frauen: 59 Jahre, Männer: 61 Jahre). Das Verhältnis Männer zu Frauen betrug 1,16 : 1.

Bei der durchflusszytometrischen Diagnostik in einem immunologischen Gate betrug die mediane Zahl der Blasten im Knochenmark 66% und im periphereren Blut 44%.

Insgesamt wurden bei 62,3% der Patienten (n = 170 / 273) zytogenetische und bei 30,7% der Patienten (n = 92 / 300) molekulargenetische Aberrationen nachgewiesen.

N = 66 / 273 Patienten (24,2%) waren zytogenetisch und molekulargenetisch (erhobene Aberrationen s. Kap. 3.1) unauffällig. Die häufigsten zytogenetischen Aberrationen waren ein komplex-aberranter Karyotyp (n = 46 / 273, 16,8%), ein monosomaler Karyotyp (12,8%), Trisomie 8 (11,4%), Deletion 7 (11,0%), Deletion 5q (8,8%) und Deletion 7q (5,5%). Molekulargenetisch traten am häufigsten FLT3-ITD- (n = 32 / 300, 10,7%), NPM1- (9,3%), PML-RARA- (6,3%), CBF- (5,3%), MLL- (4,0%) und FLT3-TKD-Mutationen (1,0%) auf.

Entsprechend der WHO-Klassifikation (s. Kap. 1.5.2) ließen sich die Patienten folgendermaßen einteilen: n = 65 / 300 in die Gruppe „AML mit typischen zytogenetischen Veränderungen“, n = 73 in „AML verbunden mit myelodysplastischen Veränderungen“, n = 5 in „Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien“, n = 144 in die heterogene Gruppe „AML, nicht weiter subspezifiziert (AML, NOS)“ und n = 13 Patienten fielen in die Kategorie „Akute Leukämie unklarer Linienzugehörigkeit“.

Innerhalb der Gruppe AML-NOS war die Verteilung der Patienten wie folgt:

- AML mit minimaler Differenzierung (FAB M0) 8,7% (n = 26),
- AML ohne Ausreifung (FAB M1) 23,3% (n = 70),
- AML mit Ausreifung (FAB M2) 21,7% (n = 65),

- Akute Promyelozytenleukämie (FAB M3) 6,3% (n = 19),
- Akute Myelomonozytäre Leukämie (FAB M4) 16,7% (n = 50),
- Akute Monozytenleukämie (FAB M5) 8,0% (n = 24) und
- Akute Erythrozytenleukämie (FAB M6) 1,7% (n = 5).

Insgesamt 35 Patienten (11,7%) konnten aufgrund fehlenden Probenmaterials bzw. widersprüchlicher Angaben der Zytologie, Pathologie und Durchflusszytometrie nicht klar zugeordnet werden. 59,0% (n = 177 / 300) bzw. 81% (n = 235 / 300) der Patienten bei AML-Erstdiagnose waren positiv für CD34 bzw. CD117. Eine Positivität für TdT wiesen 10,0% der Patienten auf (n = 30 / 300). Für jeweils 10 (CD34 und CD117) bzw. 21 Patienten (TdT) waren entsprechende durchfluss-zytometrische Werte nicht zu erheben. Diesen Patienten wurde kein „Reifescoré“-Wert zugeordnet und sie wurden von allen diesbezüglichen Analysen ausgeschlossen.

Bei der Erstdiagnose betragen die Laborwerte für Hämoglobin 3,2 – 15,1 g / dl (Median 9,3 g / dl), die Leukozytenzahl 0,3 – 402,3 / nl (Median 8,8 / nl) und die Thrombozytenzahl 6 – 412 / nl (Median 55 / nl).

132 der 300 Patienten (44,0%) wurden in Therapiestudien eingeschlossen. Therapiert wurden die Patienten in der ersten Induktion überwiegend mit Daunorubicin / Ara-C-basierten Schemata (n = 137), 61 Patienten erhielten Hochdosis Ara-C-basierte Schemata (n = 61). 153 Patienten wurde eine zweite Induktionstherapie verabreicht, davon erhielten 13 Patienten einen zweiten Zyklus mit einem Daunorubicin / Ara-C-basierten Schema, 125 Patienten erhielten ein HD-AraC-basiertes Schema.

Patienten mit einer Akuten Promyelozytenleukämie (FAB M3, n = 19) wurden nach einem entsprechenden Protokoll behandelt und erhielten zusätzlich ATRA. 49 Patienten (16,3%) wurden palliativ mit Litalir, low-dose Ara-C und / oder Studienmedikationen (z.B. Volasertib) behandelt. Weiterhin wurden 77 Patienten (25,7%), davon 62 in erster CR, mit einer SZT behandelt.

Da Antibiotika-Therapien, welche einerseits zur Prophylaxe und andererseits zur Behandlung von Infektionen verabreicht wurden, zusammengefasst wurden, betrug der kleinste Wert des HCT-CI Scores bei Diagnosestellung mindestens einen Punkt und der Median vier Punkte bei einer Höchstpunktzahl im Score von 29 Punkten. Patienten, die bei Diagnosestellung < 60 Jahre waren, wiesen einen medianen HCT-CI Score von 3,5; ältere Patienten einen von 5,0 auf.

Tabelle 4.1: Patientencharakteristika

Eigenschaft	Patienten gesamt (n = 300)	In Prozent (%)
<b>Geschlecht</b>		
• Weiblich	139	46,3
• Männlich	161	53,7
<b>Alter bei Erstdiagnose / Tod (Jahre)</b>		
• Mittelwert	57,8 / 62,4	
• Spanne	18 – 89 / 19 – 90	
• Standardabweichung	15,4 / 13,6	
• Median	61,0 / 65,0	
Weiblich	59,0 / 65,5	
Männlich	61,0 / 64,0	
<b>Altersgruppen (Jahre)</b>		
• 18 – 29	26	8,7
• 30 – 39	14	4,7
• 40 – 49	33	11,0
• 50 – 59	68	22,7
• 60 – 69	88	29,3
• 70 – 79	58	19,3
• 80 – 89	13	4,3
<b>Blasten im KM (%) bei ED</b>		
• Mittelwert	63,7	
• Median	66,0	
• Fehlend	18	6,0
<b>Blasten im peripheren Blut (%) bei ED</b>		
• Mittelwert	44,5	
• Median	45,0	
• Fehlend	79,0	26,3
<b>Zytogenetik (n / 273)</b>		
• CN-AML	103	37,7
• Komplex-aberranter Karyotyp	46	16,8
• Monosomaler Karyotyp	35	12,8
• Trisomie 8	31	11,4

Eigenschaft	Patienten gesamt (n = 300)	In Prozent (%)
• Deletion 7	30	11,0
• Deletion 5q	24	8,8
• Deletion 7q	15	5,5
• Trisomie 21	10	3,7
• Deletion 5	8	2,9
• Trisomie 13	7	2,6
• Deletion 9q	6	2,2
• Trisomie 11	5	1,8
• Deletion 20q	3	1,1
<b>Molekulargenetik (n / 300)</b>		
• FLT3-ITD <sup>mut</sup>	32	10,7
• NPM1 <sup>mut</sup>	28	9,3
• MLL <sup>mut</sup>	12	4,0
• NPM1 <sup>mut</sup> + FLT3-ITD <sup>mut</sup>	11	3,7
• CBF mit inv(16)	9	3,0
• CBF mit t(8;21)	7	2,3
• FLT3-TKD <sup>mut</sup>	3	1,0
<b>WHO-Klassifikation 2008</b>		
• AML mit typischen zytogenetischen Veränderungen	65	21,7
• AML mit myelodysplastischen Veränderungen	73	24,3
• Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien	5	1,7
• AML, NOS	144	48,0
• AL unklarer Linienzugehörigkeit	13	4,3
<b>Hämoglobin (g / dl) bei ED</b>		
• Mittelwert	9,4	
• Spanne	3,2 – 15,1	
• Standardabweichung	1,8	
• Median	9,3	
• Fehlend	4	1,3

<b>Leukozyten ( / nl) bei ED</b>		
• Mittelwert	33,8	
• Spanne	0,3 – 402,3	
• Standardabweichung	57,2	
• Median	8,8	
• Fehlend	4	1,3
<b>Thrombozyten ( / nl) bei ED</b>		
• Mittelwert	76	
• Spanne	6 – 412	
• Standardabweichung	70	
• Median	55	
• Fehlend	4	1,3
<b>HCT-CI Score</b>		
• Mittelwert	4,4	
• Spanne	1 – 13	
• Standardabweichung	2,6	
• Median	4,0	
< 60 J.	3,5	
≥ 60 J.	5,0	
• Fehlend	14	4,7

#### 4.1.2 Klinische Ergebnisse (CR / CRi, RFS, OS)

Als klinische Endpunkte wurden die CR-Rate, das RFS und das OS der gesamten Patientengruppe, sowie zum Vergleich in den Altersgruppen < 60 und ≥ 60 Jahre, festgelegt. Bei 150 / 300 Patienten wurde der gesamte Verlauf der Krankenakte entnommen.

Die fehlenden Daten konnten bei 124/150 Patienten mit Hilfe der weiterbehandelnden Ärzte erhoben werden, 26 Verläufe blieben unbekannt. Die mittlere Nachbeobachtungszeit aller 300 Patienten betrug 29,4 Monate (0 – 116,5 Monate).

**a) CR / CRi-Rate**

Insgesamt erreichten 206 der 300 Patienten (68,7%) eine komplette Remission (CR) oder inkomplette Remission (CRi) nach der Induktionstherapie (s. Tab. 4.2). In der Patientengruppe < 60 Jahre war die CR / CRi-Rate 81,6%, in der Patientengruppe  $\geq$  60 Jahre betrug sie 57,2% ( $p < 0,001$ , s. Tab. 4.2).

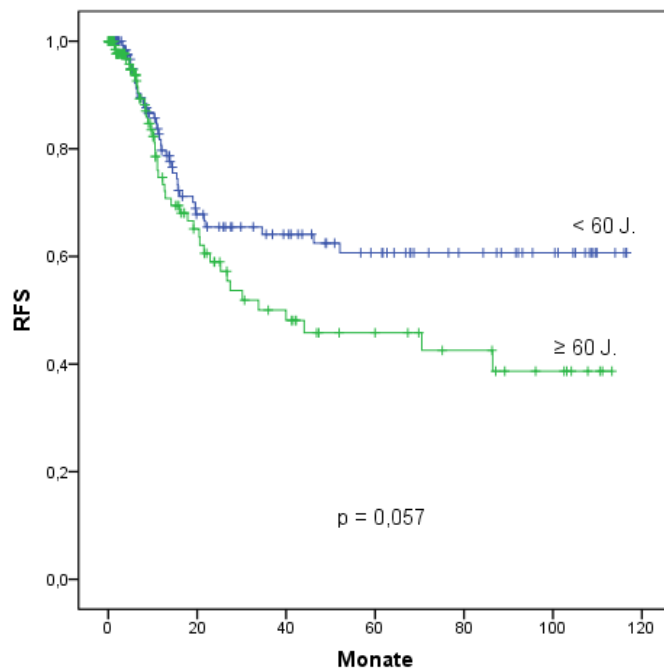
**Tabelle 4.2: CR / CRi-Raten aller Patienten. Patienten < 60 Jahre zeigen eine signifikant höhere CR / CRi-Rate als ältere Patienten ( $p < 0,001$ )**

	Patienten mit CR / CRi	Patienten gesamt	Signifikanz (Fisher's Exact Test )
<b>Alle (n = 300)</b>			
• Gesamt	206 (68,7%)	300	$p < 0,001$
• < 60 J.	115 (81,6%)	141	
• $\geq$ 60 J.	91 (57,2%)	159	

**b) Rezidiv-freies Überleben (RFS)**

27,0% der Patienten erlitten in der Gesamtgruppe (n = 81 / 300) ein Rezidiv (s. Abb. 4.1). In der Altersgruppe < 60 Jahre (n = 38 / 141) rezidierten 27,0% der Patienten nach 5 Jahren, 25,8% der Patienten  $\geq$  60 Jahre hatten nach 5 Jahren (n = 43 / 159) ein Rezidiv. Das mittlere RFS betrug 5,8 Jahre (69,5 Monate), mit einem klaren Trend zu einem längeren RFS der Jüngeren (6,4 Jahre bzw. 76,9 Monate) gegenüber den Älteren (4,9 Jahre bzw. 58,5 Monate). Das Signifikanzniveau lag dabei bei  $p = 0,057$ .

Diese Tendenz zeigte sich ebenfalls bei allen nicht transplantierten AML-Patienten. Das mittlere RFS lag hier insgesamt bei 6,2 Jahren (74,1 Monate). Die < 60-Jährigen wiesen ein RFS von durchschnittlich 7,0 Jahren (84,5 Monate) und die  $\geq$  60-Jährigen in mittleres RFS von 5,1 Jahren (61,6 Monate) auf.



**Abbildung 4.1:** RFS aller Patienten ( $n = 300$ ), getrennt nach Altersgruppe. Die Patienten  $< 60$  Jahre zeigen ein längeres RFS als Patienten  $\geq 60$  Jahre ( $p = 0,057$ ).

### c) Gesamtüberleben

Die Fünf-Jahres-Überlebensrate aller Patienten ( $n = 300$ ) betrug 38,3% (s. Abb. 4.2). Das mittlere OS betrug 3,9 Jahre (46,7 Monate). Patienten  $< 60$  Jahre überlebten durchschnittlich 5,1 Jahre (61,0 Monate) nach Diagnosestellung, Patienten  $\geq 60$  Jahre 2,8 Jahre (33,7 Monate).

Bei den Patienten, die keine allogene SZT erhielten, betrug die Fünf-Jahres-Überlebensrate 33,6% und das mittlere OS 3,5 Jahre (42,0 Monate). Blickt man auf Patienten  $< 60$  Jahre und  $\geq 60$  Jahre, so zeigte sich ein mittleres OS von 4,9 Jahren (59,0 Monate) bzw. 2,5 Jahren (30,4 Monate).

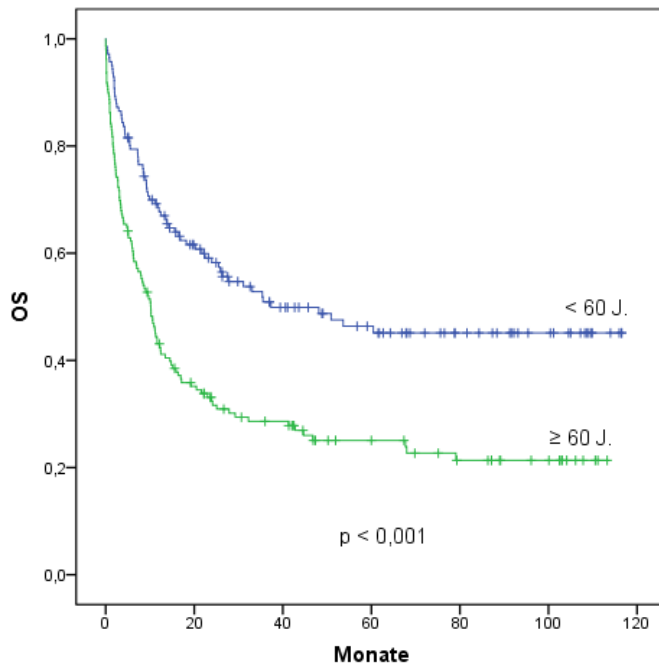


Abbildung 4.2: OS aller Patienten (n = 300), getrennt nach Altersgruppe. Die Patienten < 60 Jahre zeigen ein signifikant längeres OS als Patienten  $\geq 60$  Jahre ( $p < 0,001$ ).

## 4.2 Einfluss des Reifegrades

### 4.2.1 Klinische Ergebnisse (CR / CRi, RFS, OS)

#### a) CR / CRi-Rate

Von den 276 Patienten, bei denen ein vollständiger „Reifescore“ erhoben werden konnte, erreichten n = 187 (67,8%) eine CR / CRi (s. Tab. 4.3). Dabei übertraf die CR / CRi-Rate der Patienten mit reifer AML (AML-R, 73,4%) die der Patienten mit unreifer AML (AML-U, 64,1%), ( $p = 0,115$ ). Auch innerhalb der beiden Altersgruppen < 60 Jahre und  $\geq 60$  Jahre zeigten die AML-R gegenüber den AML-U hinsichtlich des Erreichens einer CR / CRi einen Vorteil, welcher aber jeweils nicht signifikant war.



**Tabelle 4.3: CR / CRi-Raten aller Patienten in den Subgruppen AML-R und AML-U. Der  $p$ -Wert bezieht sich jeweils auf den Unterschied in der CR / CRi-Rate der AML-R / AML-U in der Gesamtgruppe ( $p = 0,115$ ), in der Altersgruppe  $< 60$  Jahre ( $p = 0,508$ ), sowie  $\geq 60$  Jahre ( $p = 0,228$ )**

	Patienten mit CR / CRi	Patienten gesamt	Signifikanz (Fisher's Exact Test )
<b>Alle (n = 276)</b>			
• Gesamt	187 (67,8%)	276	$p = 0,115$
AML-R	80 (73,4%)	109	
AML-U	107 (64,1%)	167	
• $< 60$ J.	108 (80,6%)	134	$p = 0,508$
AML-R	47 (83,9%)	56	
AML-U	61 (78,2%)	78	
• $\geq 60$ J.	79 (55,6%)	142	$p = 0,228$
AML-R	33 (62,3%)	53	
AML-U	46 (51,7%)	89	

#### **b) Rezidiv-freies Überleben (RFS)**

Die Rezidivrate aller Patienten betrug 70 / 276 (25,4%) bei einem durchschnittlichen RFS von 5,9 Jahren (71,3 Monate). Die AML-R zeigten dabei ein signifikant längeres RFS (im Mittel 89,4 Monate) verglichen zu den AML-U (51,5 Monate), ( $p < 0,001$ ). Auch in beiden Altersgruppen trat ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den AML-R und AML-U hinsichtlich des Rezidiv-freien Überlebens auf (s. Abb. 4.3 und Tab. 4.4).

Bei einem mittleren RFS von 7,7 Jahren (92,1 Monate) zeigte sich das RFS der AML-R dem der AML-U (4,9 Jahre bzw. 58,4 Monate) auch in der Altersgruppe  $< 60$  Jahre überlegen ( $p = 0,005$ ). Das Gleiche galt für die  $\geq 60$ -Jährigen (AML-R: 82,7 vs. AML-U: 42,2 Monate,  $p = 0,010$ ).

Vor allem durch unterschiedliche Risikokonstellationen begründet, lag die Rezidivrate der nicht allogenen transplantierten Patienten insgesamt etwas niedriger (40 / 207 = 19,3%) und das RFS etwas höher (6,5 Jahre bzw. 78,3 Monate). Dabei bestand ein hochsignifikanter Unterschied hinsichtlich des RFS in der Gruppe AML-R (8,1 Jahre bzw. 97,3 Monate) und AML-U (4,4 Jahre bzw. 53,1 Monate), ( $p < 0,001$ ).

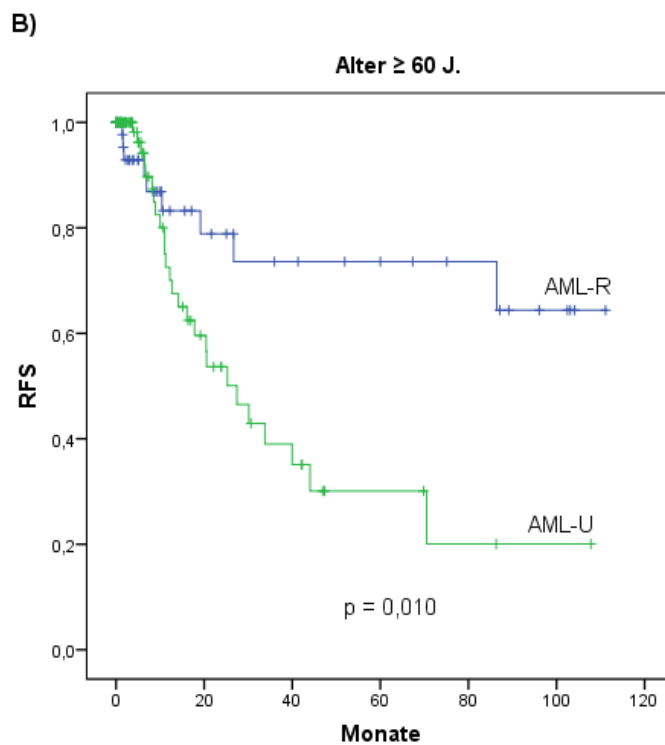
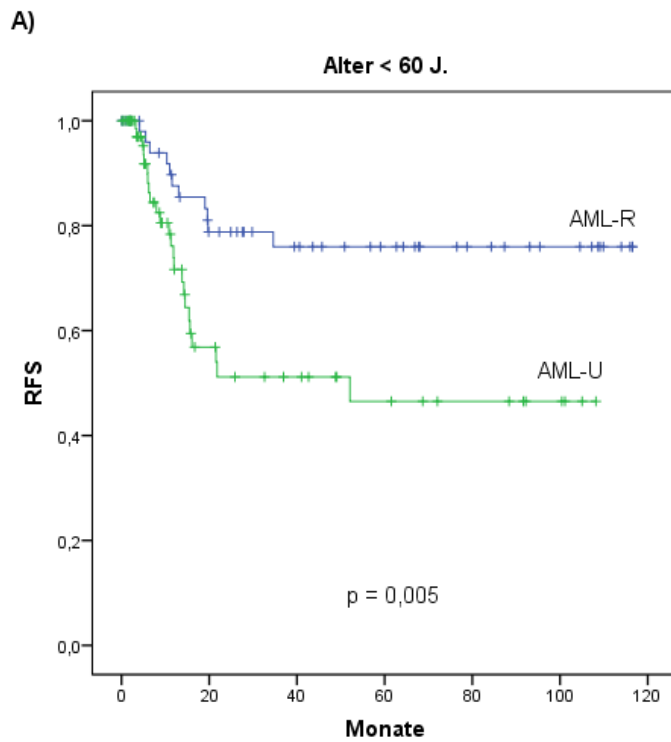


Abbildung 4.3: RFS aller Patienten mit Berechnung des „Reifescorés“ (n = 276). AML-R zeigen dabei sowohl in der Altersgruppe < 60 Jahre (A) ein signifikant längeres RFS als AML-U ( $p = 0,005$ ), als auch in der Gruppe  $\geq 60$  Jahre (B), ( $p = 0,010$ ).

Tabelle 4.4: Rezidivraten und RFS aller Patienten mit Berechnung des „Reifescorers“ und aller nicht allogenen transplantierten Patienten in den Subgruppen AML-R und AML-U. Der  $p$ -Wert bezieht sich jeweils auf die Unterschiede zwischen AML-R und AML-U in den jeweiligen Gruppen (SF: Standardfehler)

	Patienten ohne Rezidiv	Patienten gesamt	Signifikanz (Logrank)	RFS in Monaten (Spanne)	SF
<b>Alle (n = 276)</b>					
• Gesamt	206 (74,6%)	276	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>	71,3 (63,2 – 79,5)	4,1
AML-R	89 (81,7%)	109		89,4 (79,0 – 99,7)	5,3
AML-U	117 (70,1%)	167		51,5 (41,2 – 61,9)	5,3
• < 60 J.	99 (73,9%)	134	<b><math>p = 0,005</math></b>	77,5 (67,2 – 87,9)	5,3
AML-R	45 (80,4%)	56		92,1 (79,5 – 104,8)	6,5
AML-U	54 (69,2%)	78		58,4 (43,9 – 72,8)	7,4
• $\geq 60$ J.	107 (75,4%)	142	<b><math>p = 0,010</math></b>	59,9 (48,0 – 71,9)	6,1
AML-R	44 (83,0%)	53		82,7 (66,4 – 98,9)	8,3
AML-U	63 (70,8%)	89		42,2 (28,3 – 56,0)	7,1
<b>Ohne SZT (n = 207)</b>					
• Gesamt	167 (80,7%)	207	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>	78,3 (68,7 – 87,9)	4,9
AML-R	76 (87,4%)	87		97,3 (86,9 – 107,6)	5,3
AML-U	91 (75,8%)	120		53,1 (39,5 – 66,6)	6,9
• < 60 J.	67 (81,7%)	82	<b><math>p = 0,006</math></b>	86,9 (74,0 – 99,7)	6,6
AML-R	33 (89,2%)	37		102,6 (89,9 – 115,4)	6,5
AML-U	34 (75,6%)	45		61,4 (40,8 – 81,9)	10,5

	Patienten ohne Rezidiv	Patienten gesamt	Signifikanz (Logrank)	RFS in Monaten (Spanne)	SF
• $\geq 60$ J.	100 (80,0%)	125	$p = 0,010$	66,2 (52,9 – 79,6)	6,8
AML-R	43 (86,0%)	50		87,9 (72,5 – 103,4)	7,9
AML-U	57 (76,0%)	75		45,4 (28,1 – 62,7)	8,8

### c) Gesamtüberleben (OS)

Die Fünf-Jahres-Überlebensrate aller 276 Patienten betrug 38,4% bei einem mittleren OS von 46,4 Monaten (s. Abb. 4.4 und Tab. 4.5). AML-R-Patienten überlebten im Mittel 5,3 Jahre (63,8 Monate) nach Diagnosestellung, wohingegen Patienten der Gruppe AML-U 2,7 Jahre (32,9 Monate) überlebten ( $p < 0,001$ ). Die gleiche Entwicklung war sowohl bei den  $< 60$ -jährigen Patienten, als auch bei den  $\geq 60$ -jährigen Patienten festzustellen ( $< 60$  Jahre:  $p < 0,001$ ;  $\geq 60$  Jahre:  $p = 0,033$ ).

Patienten, die nicht allogene Stammzelltransplantiert wurden ( $n = 207$ ), zeigten eine durchschnittliche Fünf-Jahres-Überlebensrate von 34,3%. Das mittlere OS betrug 42,5 Monate, wobei auch hier die AML-R (5,1 Jahre bzw. 61,6 Monate) ein deutlich besseres Ergebnis als die AML-U (2,2 Jahre bzw. 26,7 Monate) aufwies. Ebenfalls zeigten die AML-R gegenüber den AML-U hier sowohl unter den jüngeren als auch unter den älteren Patienten ein signifikant längeres Gesamtüberleben ( $p = 0,001$  und  $p = 0,008$ ).

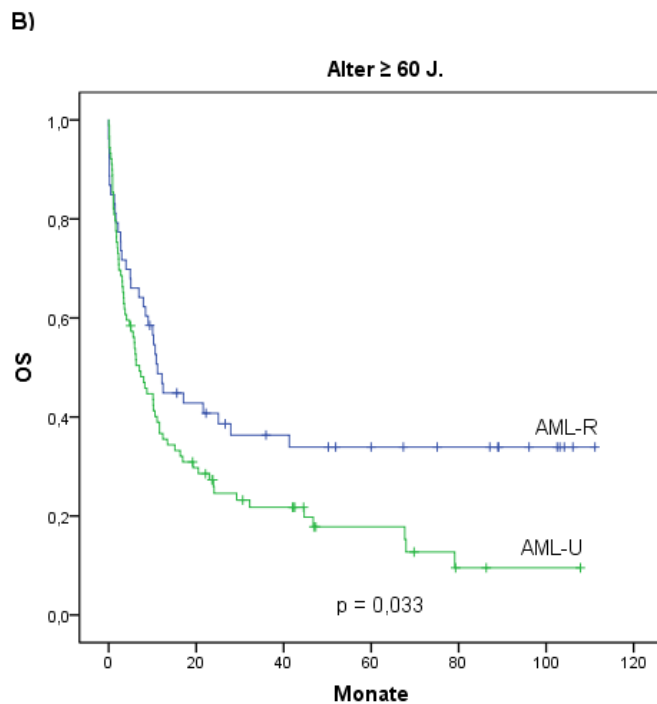
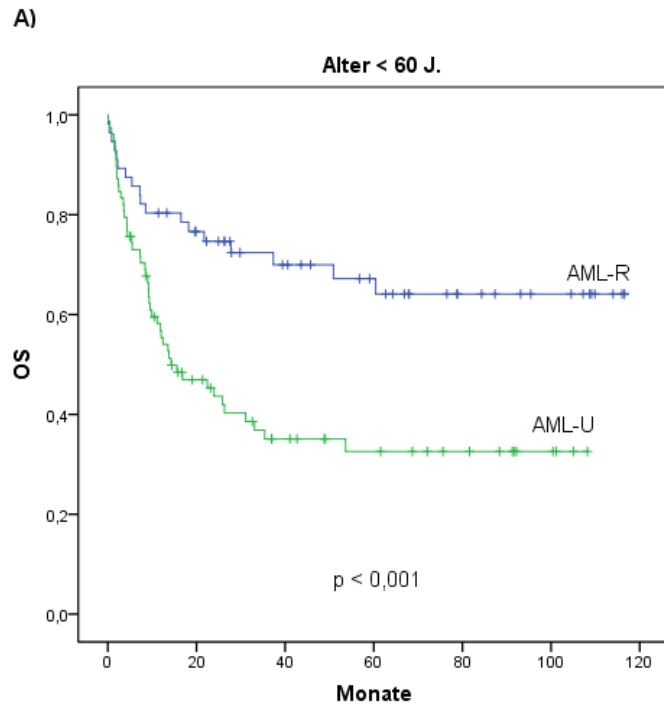


Abbildung 4.4: OS aller Patienten mit erhobenem „Reifescore“ (n = 276). In den Altersgruppen < 60 Jahre (A) und  $\geq$  60 Jahre (B) zeigen AML-R ein signifikant längeres OS als AML-U.

Tabelle 4.5: Überleben aller Patienten und aller nicht allogenen transplantierten Patienten mit erhobenem „Reifescore“. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf den Unterschied zwischen AML-R und AML-U in der Gesamtgruppe und der jeweiligen Altersgruppe (< 60 und ≥ 60 Jahre, SF: Standardfehler)

	Überlebende Patienten	Patienten gesamt	Signifikanz (Logrank)	OS in Monaten (Spanne)	SF
<b>Alle (n = 276)</b>					
• Gesamt	103 (37,3%)	276	<b>p &lt; 0,001</b>	46,4 (40,2 – 52,7)	3,2
AML-R	57 (52,3%)	109		63,8 (53,5 – 74,1)	5,3
AML-U	46 (27,5%)	167		32,9 (26,2 – 39,7)	3,4
• < 60 J.	68 (50,7%)	134	<b>p &lt; 0,001</b>	61,3 (51,9 – 70,6)	4,8
AML-R	38 (67,9%)	56		81,3 (68,0 – 94,6)	6,8
AML-U	30 (38,5%)	78		43,5 (32,6 – 54,5)	5,6
• ≥ 60 J.	35 (24,6%)	142	<b>p = 0,033</b>	31,8 (24,5 – 39,1)	3,7
AML-R	19 (35,8%)	53		43,4 (29,8 – 56,9)	6,9
AML-U	16 (18,0%)	89		23,7 (16,1 – 31,3)	3,8
<b>Ohne SZT (n = 207)</b>					
• Gesamt	70 (33,8%)	207	<b>p &lt; 0,001</b>	42,5 (35,3 – 49,6)	3,7
AML-R	44 (50,6%)	87		61,6 (49,9 – 73,3)	6,0
AML-U	26 (21,7%)	120		26,7 (19,2 – 34,2)	3,8
• < 60 J.	29 (23,2%)	125	<b>p = 0,001</b>	60,6 (48,5 – 72,7)	6,2
AML-R	18 (36,0%)	50		83,7 (67,4 – 100,00)	8,3
AML-U	11 (14,7%)	75		38,8 (24,6 – 53,0)	7,3

	Überlebende Patienten	Patienten gesamt	Signifikanz (Logrank)	OS in Monaten (Spanne)	SF
• $\geq 60$ J.	41 (50,0%)	82	<b><math>p = 0,008</math></b>	29,5 (21,8 – 37,3)	3,9
AML-R	26 (70,3%)	37		43,3 (29,2 – 57,3)	7,2
AML-U	15 (33,3%)	45		19,3 (11,5 – 27,0)	4,0

#### 4.2.2 Biologische Phänotypen in den Gruppen „reife AML“ / „unreife AML“

Es stellte sich nun die Frage, ob sich die beiden AML-Subgruppen (reif vs. unreif) bezüglich bestimmter zytogenetischer oder molekulargenetischer Aberrationen unterscheiden – oder vielmehr, ob die beiden nach Reifegrad eingeteilten AML-Subgruppen bestimmte zytogenetische oder molekulare Phänotypen „akkumulieren“ (s. Tab. 4.6). In der Gruppe der AML-R (Patienten mit einem „Reifescore“ von 0 – 1 Punkt, s. Kap. 3.4) sammelten sich NPM1 und PML-RARA, welche per se schon als Niedrigrisiko eingestuft werden. Außerdem fand sich jedoch eine signifikante Häufung von FLT3-ITD und der CN-AML (mittleres Risiko nach ELN). 8 Patienten waren in der Gruppe gleichzeitig FLT3-ITD und NPM1-positiv (7,3%). In der Gruppe AML-U (Punkte im „Reifescore“: 1,5 – 5) fand sich eine signifikante Häufung von monosomalem und komplex-aberrantem Karyotyp, Trisomie 13, Monosomie 5, Deletion 5q und Monosomie 7, aber auch von allen t(8;21)-Fällen (n = 7). Bis auf die Translokation t(8;21) sind diese zytogenetischen Veränderungen als „Hochrisiko“ klassifiziert.

Tabelle 4.6: Signifikante Unterschiede zytogenetischer und molekulargenetischer Aberrationen in den Gruppen AML-R und AML-U

Zytogenetischer / Molekularer Phänotyp	Gesamt (n / 276)	AML-R (n / 109)	AML-U (n / 167)	Signifikanz (Fisher's Exact Test)
FLT3-ITD	31 (11,2%)	<b>18 (16,5%)</b>	13 (7,8%)	<b>p = 0,031</b>
NPM1	26 (9,4%)	<b>23 (21,1%)</b>	3 (1,8%)	<b>p &lt; 0,001</b>
PML-RARA	18 (6,5%)	<b>17 (15,6%)</b>	1 (0,6%)	<b>p &lt; 0,001</b>
CN-AML	94 (34,1%)	<b>52 (47,7%)</b>	42 (25,1%)	<b>p &lt; 0,001</b>
CBF t(8;21)	7 (2,5%)	0 (0,0%)	<b>7 (4,2%)</b>	<b>p = 0,045</b>
Monosomaler Karyotyp	33 (12,0%)	1 (0,9%)	<b>32 (19,2%)</b>	<b>p &lt; 0,001</b>
Komplex-aberranter Karyotyp	44 (15,9%)	4 (3,7%)	<b>40 (23,4%)</b>	<b>p &lt; 0,001</b>
Trisomie 13	7 (2,5%)	0 (0,0%)	<b>7 (4,2%)</b>	<b>p = 0,045</b>
Monosomie 5	8 (2,9%)	0 (0,0%)	<b>8 (4,8%)</b>	<b>p = 0,024</b>
Deletion 5q	23 (8,3%)	2 (1,8%)	<b>21 (12,6%)</b>	<b>p = 0,001</b>
Monosomie 7	28 (10,1%)	2 (1,8%)	<b>26 (15,6%)</b>	<b>p &lt; 0,001</b>

### 4.3 Einfluss der Risikogruppen

#### 4.3.1 ELN-Risikogruppen der AML

Da die ELN-Risikogruppen (s. Kap. 3.4) als anerkanntes Instrument zur Prognoseabschätzung dienen, wurden die Patienten zunächst nach diesen Kriterien gruppiert. Dann wurde innerhalb dieser Subgruppen der Einfluss des „Reifescorés“ auf die klinischen Parameter CR / CRi, RFS und OS untersucht. Dieses Vorgehen diente zur Klärung, ob der durchflusszytometrische „Reifescorés“ auch innerhalb dieser etablierten Risikogruppen Relevanz hat. Zunächst ergaben sich folgende Subgruppen (s. Tab. 4.7):



Tabelle 4.7: Risikogruppen nach ELN

ELN-Risikogruppe	Anzahl (n / 300)	Prozent (%)
„Günstig“	45	15,0
„Intermediär I“	83	27,7
„Intermediär II“	49	16,3
„Ungünstig“	70	23,3
Biphänotypische AML	12	4,0
Bilineäre AML	1	0,3
Fehlend	40	13,3
Gesamt	300	

Bei 40 Patienten konnte die Risikogruppeneinteilung nach ELN aufgrund einer fehlenden Zytogenetik nicht stattfinden (keine kultivierbaren Metaphasen). Die 13 Biphänotypischen und Bilineären Leukämien wurden als gesonderte Gruppe betrachtet und nicht in die Analysen einbezogen. In dieser Arbeit wurden somit folgende Risikogruppen nach ELN untersucht: 1) „günstiges“-Risiko (n = 45), 2) „intermediäres“-Risiko (n = 132) und 3) „ungünstiges“-Risiko (n = 70) Gruppe.

#### 4.3.2 Klinische Ergebnisse (CR / CRi-Rate, RFS, OS)

##### a) CR / CRi-Rate

Die Analyse der CR / CRi-Raten nach Induktion innerhalb der verschiedenen ELN-Risikogruppen bestätigte die durch die zytogenetischen und molekularen Merkmale definierte unterschiedliche Prognose (s. Tab. 4.8). Die drei ELN-Risikogruppen „günstig“, „intermediär“ und „ungünstig“ unterschieden sich signifikant in ihrer CR / CRi-Rate (86,7% vs. 78,0% vs. 55,7%), ( $p < 0,001$ ). Bei isolierter Analyse innerhalb der Gruppe jüngerer Patienten (< 60 Jahre, n = 119) zeigte sich die gleiche Tendenz wie in der Gesamtgruppe (91,7% vs. 86,4% vs. 77,8%), jedoch verloren die Unterschiede bei dieser Subgruppenanalyse ihre Signifikanz. In der Gruppe der älteren Patienten ( $\geq 60$  Jahre, n = 128) waren diese Unterschiede allerdings weiterhin hochsignifikant (81,0% vs. 71,2% vs. 32,4%;  $p < 0,001$ ).

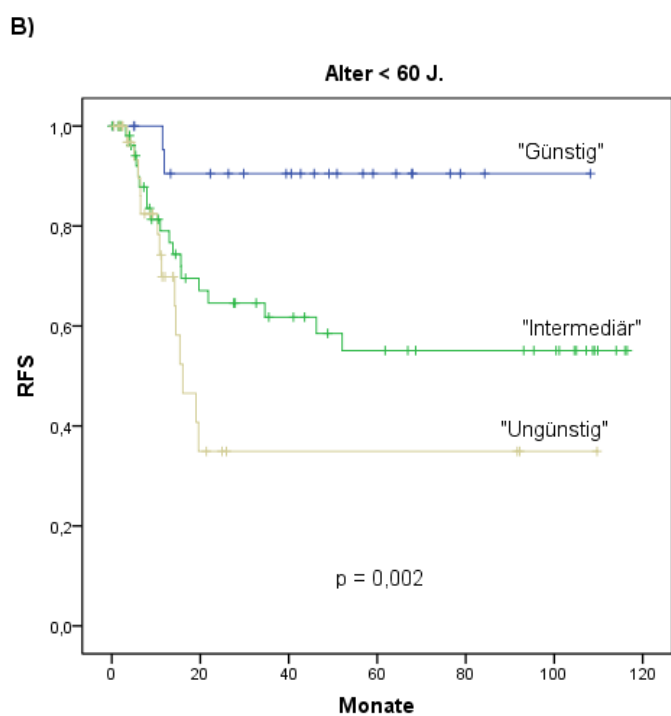
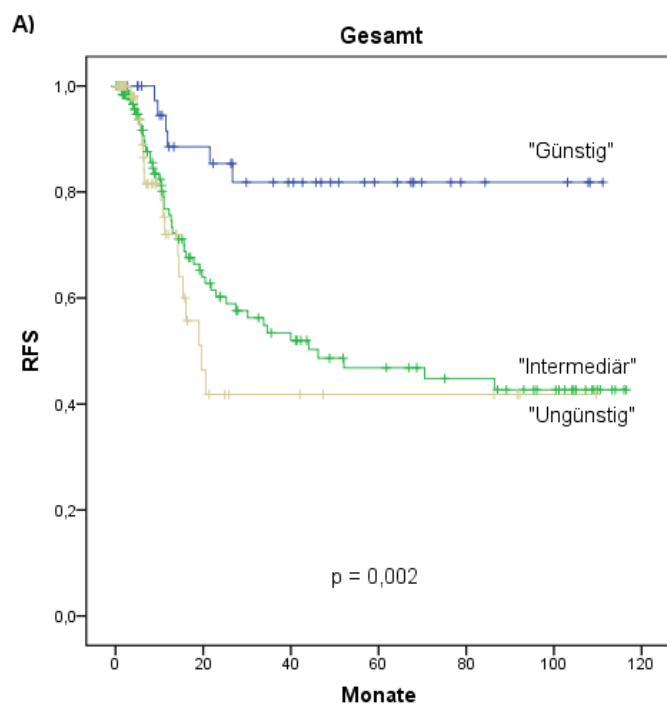
Tabelle 4.8: CR / CRi-Raten aller Patienten getrennt nach ELN-Risikogruppen, sowie nach Altersgruppen. Die  $p$ -Werte beziehen sich auf den Unterschied der CR / CRi-Raten der ELN-Risikogruppen in der Gesamtgruppe ( $p < 0,001$ ), sowie in den Altersgruppen  $< 60$  Jahre ( $p = 0,303$ ) und  $\geq 60$  Jahre ( $p < 0,001$ )

	Patienten mit CR / CRi	Patienten gesamt	Signifikanz (Pearson Chi <sup>2</sup> )
<b>Alle (n = 247)</b>			
• Gesamt	181 (73,3%)	247	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
„Günstig“	39 (86,7%)	45	
„Intermediär“	103 (78,0%)	132	
„Ungünstig“	39 (55,7%)	70	
• $< 60$ J.	101 (84,9%)	119	$p = 0,303$
„Günstig“	22 (91,7%)	24	
„Intermediär“	51 (86,4%)	59	
„Ungünstig“	28 (77,8%)	36	
• $\geq 60$ J.	80 (62,5%)	128	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
„Günstig“	17 (81,0%)	21	
„Intermediär“	52 (71,2%)	73	
„Ungünstig“	11 (32,4%)	34	

**b) Rezidiv-freies Überleben (RFS)**

Nach 5 Jahren wiesen die Patienten mit zugeordneter ELN-Risikogruppe ( $n = 247$ ) eine Rezidivrate von 28,3% auf. Die ELN-Risikogruppen hatten – wie zu erwarten war – insgesamt einen signifikanten Einfluss auf Rezidivrate und RFS ( $p = 0,002$ ). Die Gruppen „günstig“ (RFS: 7,8 Jahre bzw. 93,8 Monate), „intermediär“ (RFS: 5,2 Jahre bzw. 62,5 Monate) und „ungünstig“ (RFS: 4,4 Jahre bzw. 53,1 Monate) grenzten sich deutlich voneinander ab. Für alle 247 Patienten betrug das mittlere RFS 5,7 Jahre (68,5 Monate). Deutliche Unterschiede in den ELN-Risikogruppen zeigen sich auch bei den Patienten  $< 60$  Jahren, welche ein RFS von 8,3 Jahren bzw. 99,0 Monaten („günstig“), 6,0 Jahren bzw. 72,2 Monaten („intermediär“) und 3,9 Jahren bzw. 46,4 Monaten („ungünstig“) aufwiesen ( $p = 0,002$ ). Betrachtet man die älteren Patienten, war der Unterschied zwischen der „intermediären“ und „ungünstigen“ Gruppe nicht mehr signifikant (s. Abb. 4.5 und Tab. 4.9).

Nicht transplantierte Patienten ( $n = 181$ ) hatten mit einer Wahrscheinlichkeit von 23,8 % nach 5 Jahren ein Rezidiv und wiesen ein mittleres RFS von 72,9 Monaten auf. Dabei zeigte sich in der Gruppe „günstig“ (8,4 Jahre bzw. 100,9 Monate) ein längeres RFS als in der Gruppe „intermediär“ (5,5 Jahre bzw. 66,1 Monate) sowie „ungünstig“ (2,8 Jahre bzw. 33,2 Monate), ( $p < 0,001$ ). Unter den jüngeren Patienten ( $< 60$  Jahre) hatte in der „günstigen“ Risikogruppe kein Patient ein Rezidiv, die „ungünstige“ Risikogruppe zeigte die höchste Rezidivrate, ( $p < 0,001$ ). Nicht signifikant dagegen waren die Unterschiede im RFS in den einzelnen Risikogruppen der älteren Patienten ( $p = 0,199$ ).



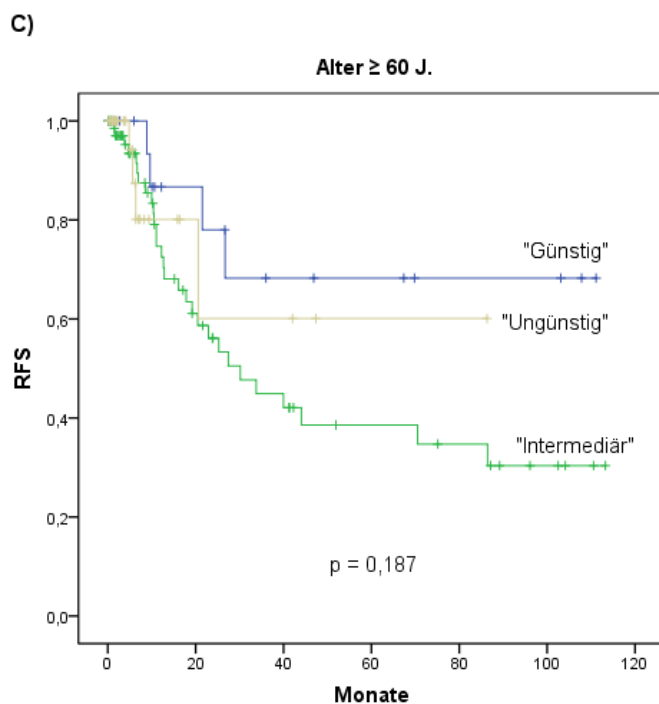


Abbildung 4.5: RFS aller Patienten mit erhobener ELN-Risikogruppe, Verlauf in der Gesamtgruppe (A,  $n = 247$ ), sowie getrennt nach Altersgruppen:  $< 60$  Jahre (B) und  $\geq 60$  Jahre (C).

Tabelle 4.9: Rezidivraten und RFS aller Patienten und aller nicht transplantierten Patienten in den ELN-Risikogruppen in der Gesamtgruppe sowie in den Altersgruppen  $< 60$  Jahre und  $\geq 60$  Jahre. Die angegebenen Signifikanzen bezeichnen den Unterschied im RFS zwischen den ELN-Risikogruppen in der jeweiligen Gruppe (SF: Standardfehler)

	Patienten ohne Rezidiv	Patienten gesamt	Signifikanz (Logrank)	RFS in Monaten (Spanne)	SF
<b>Alle (<math>n = 247</math>)</b>					
• Gesamt	175 (70,9%)	247	<b><math>p = 0,002</math></b>	68,5 (60,2 – 76,7)	4,2
„Günstig“	39 (86,7%)	45		93,8 (81,1 – 106,4)	6,4
„Intermediär“	84 (63,6%)	132		62,5 (51,9 – 73,1)	5,4
„Ungünstig“	52 (74,3%)	70		53,1 (34,8 – 71,4)	9,4
• $< 60$ J.	84 (70,6%)	119	<b><math>p = 0,002</math></b>	74,5 (63,6 – 85,5)	5,6
„Günstig“	22 (91,7%)	24		99,0 (86,9 – 111,1)	6,2

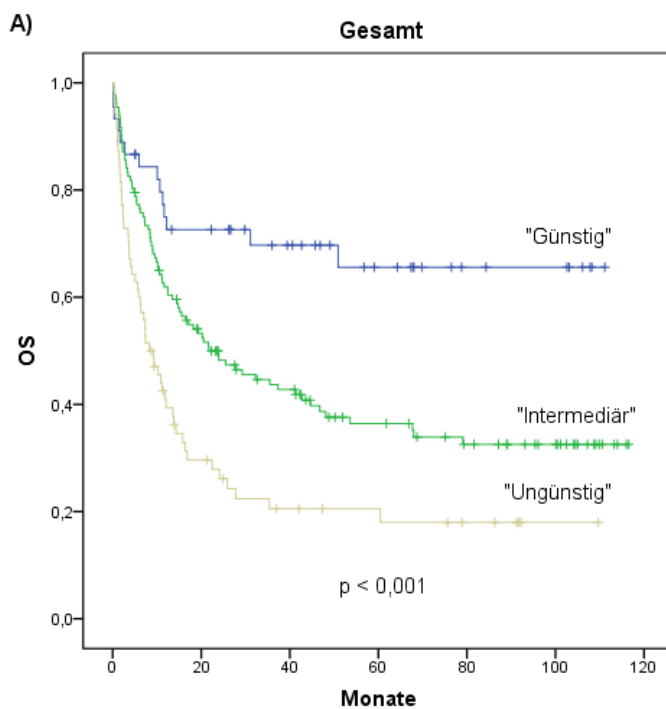
	Patienten ohne Rezidiv	Patienten gesamt	Signifikanz (Logrank)	RFS in Monaten (Spanne)	SF
„Intermediär“	40 (67,8%)	59		72,2 (57,1 – 87,4)	7,8
„Ungünstig“	22 (61,1%)	36		46,4 (25,5 – 67,2)	10,6
• ≥ 60 J.	91 (71,1%)	128	$p = 0,187$	59,3 (47,4 – 71,3)	6,1
„Günstig“	17 (81,0%)	21		81,6 (57,1 – 106,0)	12,5
„Intermediär“	44 (60,3%)	73		51,9 (38,1 – 65,7)	7,0
„Ungünstig“	30 (88,2%)	34		57,1 (31,2 – 83,0)	13,2
<b>Ohne SZT (n = 181)</b>					
• Gesamt	137 (75,7%)	181	$p < 0,001$	72,9 (62,9 – 82,9)	5,1
„Günstig“	34 (91,9%)	37		100,9 (89,8 – 111,9)	5,6
„Intermediär“	67 (68,4%)	98		66,1 (53,2 – 79,0)	6,6
„Ungünstig“	36 (78,3%)	46		33,2 (11,0 – 55,5)	11,4
• < 60 J.	54 (76,1%)	71	$p < 0,001$		
„Günstig“	18 (100,0%)	18			
„Intermediär“	27 (71,1%)	38			
„Ungünstig“	9 (60,0%)	15			
• ≥ 60 J.	83 (75,5%)	110	$p = 0,199$		
„Günstig“	16 (84,2%)	19			
„Intermediär“	40 (66,7%)	60			
„Ungünstig“	28 (90,3%)	31			

### c) Gesamtüberleben (OS)

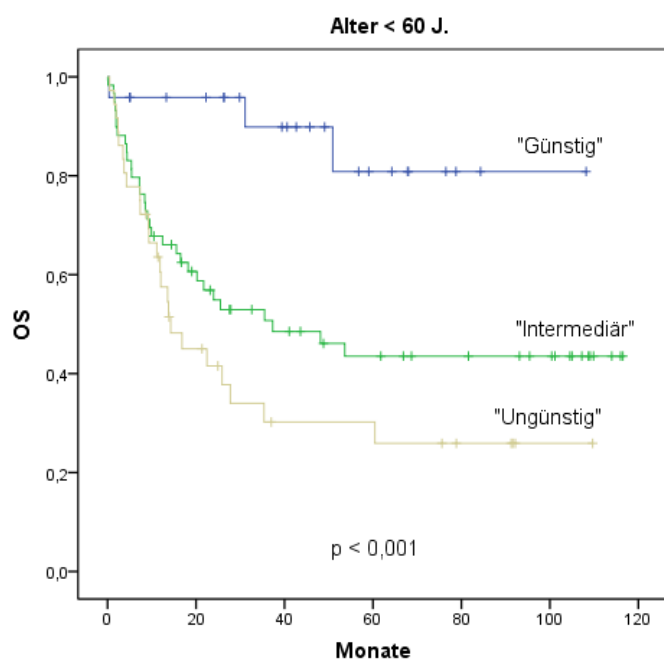
Das Fünf-Jahres-Überleben aller Patienten mit Risikogruppe betrug 40,5% bei einem durchschnittlichen OS von 49,4 Monaten. Bei der Analyse des OS zeigte sich erwartungsgemäß, dass sowohl die Unterschiede der ELN-Risikogruppen innerhalb der

gesamten und der nicht transplantierten Patienten, als auch getrennt nach Alter  $< 60$  Jahre und  $\geq 60$  Jahre hochsignifikant waren ( $p < 0,001$ ). In sämtlichen Untergruppen zeigten sich in der Reihenfolge „günstig“, „intermediär“ und „ungünstig“ ein abnehmendes OS (s. Abb. 4.6. und Tab. 4.10).

Die Fünf-Jahres-Überlebensrate betrug in der „günstigen“ Risikogruppe nach ELN 68,9% ( $n = 45 / 247$  Patienten), in der „intermediären“ Risikogruppe nach ELN 40,2% ( $n = 132 / 247$ ) und in der „ungünstigen“ Risikogruppe nach ELN 22,9% ( $n = 70 / 247$ ), ( $p < 0,001$ ).



B)



C)

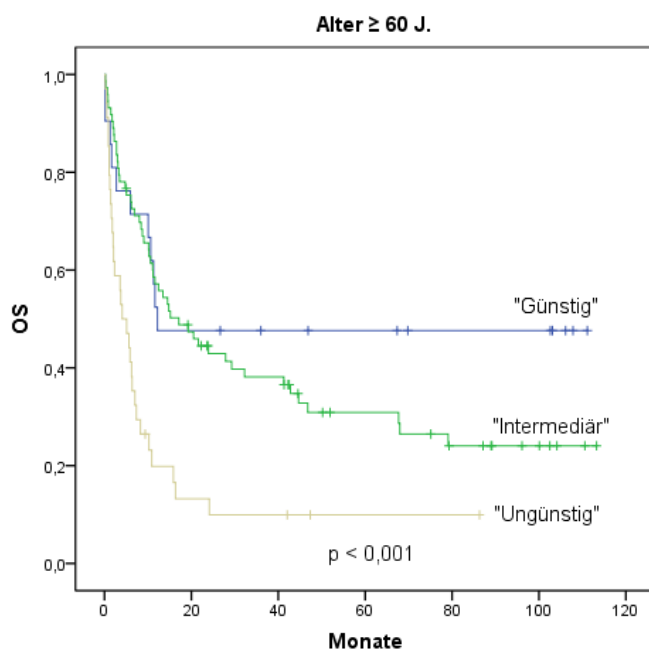


Abbildung 4.6: OS aller Patienten mit erhobener ELN-Risikogruppe, Verlauf aller Patienten (A, n = 247), sowie < 60-Jährigen (B) und älteren Patienten  $\geq$  60 Jahre (C) getrennt nach Risikogruppe.



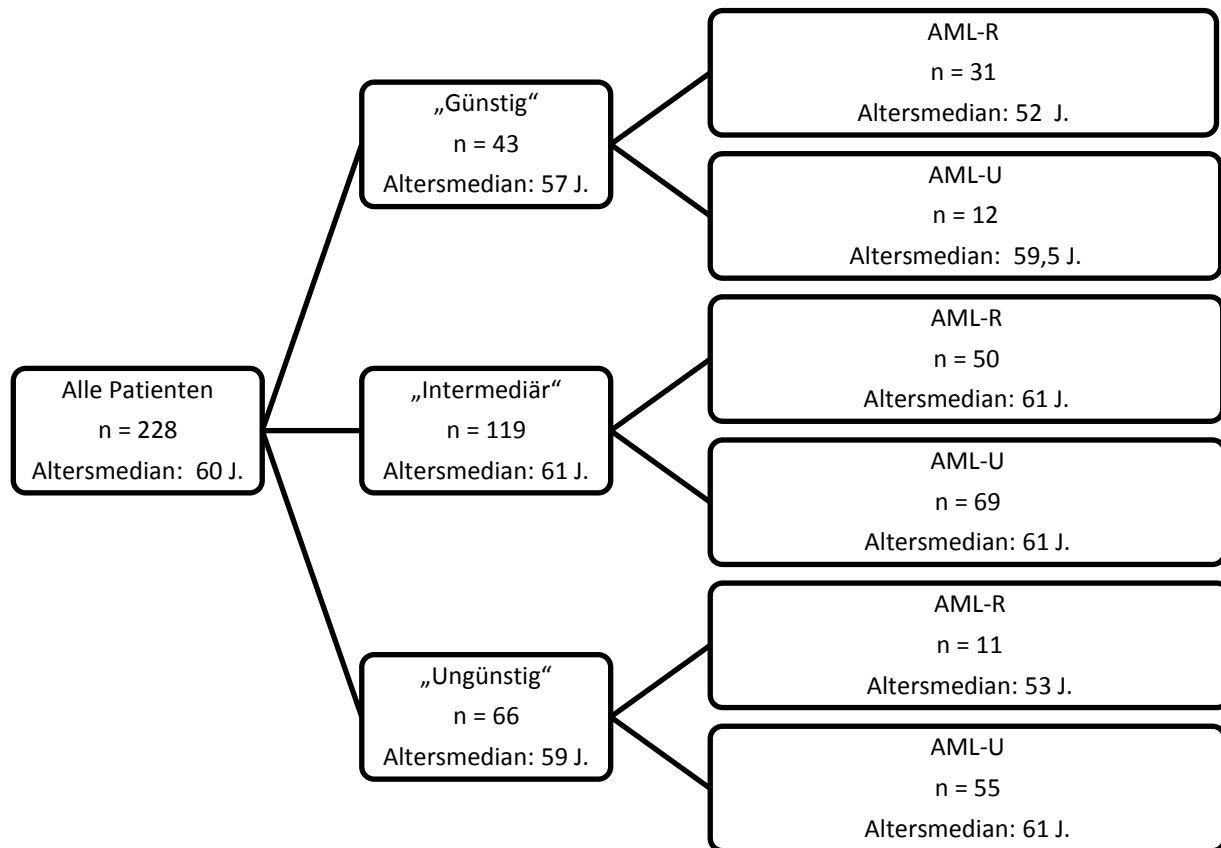
Tabelle 4.10: Überleben aller Patienten und aller nicht transplantierten Patienten mit erhobener ELN-Risikogruppe (n = 247), jeweils in der Gesamtgruppe sowie getrennt nach Altersgruppen (< 60 Jahre, ≥ 60 Jahre). Die p-Werte bezeichnen den Unterschied hinsichtlich des OS zwischen den ELN-Risikogruppen der jeweiligen Gesamt- oder Altersgruppe (SF: Standardfehler)

	Überlebende Patienten	Patienten gesamt	Signifikanz (Logrank)	OS in Monaten (Spanne)	SF
<b>Alle (n = 247)</b>					
• Gesamt	97 (39,3%)	247	<b>p &lt; 0,001</b>	49,4 (42,8 – 56,0)	3,4
„Günstig“	31 (78,9%)	45		77,5 (63,0 – 92,0)	7,4
„Intermediär“	50 (37,9%)	132		49,7 (41,0 – 58,5)	4,5
„Ungünstig“	16 (22,9%)	70		28,0 (18,1 – 37,9)	5,1
• < 60 J.	61 (51,3%)	119	<b>p &lt; 0,001</b>	62,1 (52,3 – 71,9)	5,0
„Günstig“	21 (87,5%)	24		93,9 (79,1 – 108,7)	7,5
„Intermediär“	28 (47,6%)	59		59,4 (45,7 – 73,1)	7,0
„Ungünstig“	12 (33,3%)	36		39,5 (24,3 – 54,8)	7,8
• ≥ 60 J.	36 (28,1%)	128	<b>p &lt; 0,001</b>	37,3 (29,2 – 45,5)	4,2
„Günstig“	10 (47,6%)	21		56,2 (33,7 – 78,6)	11,5
„Intermediär“	22 (30,1%)	73		41,5 (30,8 – 52,1)	5,4
„Ungünstig“	4 (11,8%)	34		13,5 (4,9 – 22,1)	4,4
<b>Ohne SZT (n = 181)</b>					
• Gesamt	63 (34,8%)	181	<b>p &lt; 0,001</b>	44,4 (36,8 – 52,0)	3,9
„Günstig“	25 (67,6%)	37		76,3 (60,2 – 92,5)	8,2
„Intermediär“	32 (32,7%)	98		44,1 (34,2 – 54,1)	5,1

	Überlebende Patienten	Patienten gesamt	Signifikanz (Logrank)	OS in Monaten (Spanne)	SF
„Ungünstig“	6 (13,0%)	46		15,2 (6,8 – 23,5)	4,3
• < 60 J.	34 (47,9%)	71	<b>p &lt; 0,001</b>	59,1 (46,3 – 71,8)	6,5
„Günstig“	16 (88,9%)	18		95,4 (79,1 – 111,8)	8,3
„Intermediär“	15 (39,5%)	38		52,2 (35,5 – 68,8)	8,5
„Ungünstig“	3 (20,0%)	15		22,4 (5,0 – 39,9)	8,9
• ≥ 60 J.	29 (26,4%)	110	<b>p &lt; 0,001</b>	33,8 (25,2 – 42,3)	4,4
„Günstig“	9 (47,4%)	19		55,9 (32,3 – 79,5)	12,1
„Intermediär“	17 (28,3%)	60		37,3 (25,9 – 48,7)	5,8
„Ungünstig“	3 (9,7%)	31		11,0 (2,8 – 19,3)	4,2

#### 4.4 Einfluss des Reifegrades innerhalb der ELN-Risikogruppen

Um die eigentliche Frage zu klären, ob die nach Reifegrad gruppierten AML-Subgruppen (AML-R vs. AML-U) lediglich bestimmte ELN-Risikogruppen reflektieren oder ob der Reifegrad auch einen eigenständigen Prognosefaktor darstellt, wurde der Einfluss des Reifegrades innerhalb der einzelnen ELN-Risikogruppen untersucht. Dadurch ergaben sich die folgenden Untergruppen (s. Abb. 4.7):



**Abbildung 4.7: Aufteilung der Patienten je nach Reifegrad (AML-R vs. AML-U) in die ELN-Risikogruppen.**

Die „intermediäre“ Risikogruppe nach ELN als größte Gruppe (n = 119) fiel wegen ihrer Homogenität im Hinblick auf die Aufteilung des „Reifescorers“ (n = 50 bzw. 69) und die Altersmediane (konstant 61 Jahre) auf. In der ELN-Risikogruppe „günstig“ gliederte sich der Großteil der Patienten innerhalb der reifen AML ein (n = 31 / 43), in der ELN-Risikogruppe „ungünstig“ überwog der Anteil derer mit unreifer AML (n = 55 / 66), sodass die Verteilung der Subgruppen hier recht ungleichmäßig war. Zudem waren die Patienten in letztgenannter Untergruppe mit medianen 61 Jahren auch älter als in der Gruppe mit Niedrigrisiko-AML nach ELN und höherem Reifegrad (median 52 Jahre).

#### 4.4.1 Klinische Ergebnisse (CR / CRi, RFS, OS)

##### a) CR / CRi-Rate

Beim Vergleich der CR / CRi-Raten innerhalb der ELN-Risikogruppen in Abhängigkeit vom Reifegrad (AML-R vs. AML-U) zeigten sich höhere Remissionsraten in der Gruppe mit reifer AML (AML-R) als in der Gruppe mit unreifer AML (AML-U), sowohl in der

Gesamtbeachtung als auch in allen Risikogruppen nach ELN. Jedoch erreichten diese Unterschiede keine statistische Signifikanz (s. Tab. 4.11).

**Tabelle 4.11: Einfluss des Reifegrades (AML-R vs. AML-U) in den drei ELN-Risikogruppen auf die CR / CRi-Rate aller Patienten mit erhobenem „Reifescore“ und ELN-Risikogruppe (n = 228). Die abgebildeten Signifikanzen beziehen sich auf den Unterschied in der CR / CRi-Rate der Gesamtgruppe ( $p = 0,051$ ), der „günstigen“ ( $p = 1,000$ ), der „intermediären“ ( $p = 0,828$ ) und der „ungünstigen“ Risikogruppe ( $p = 0,742$ )**

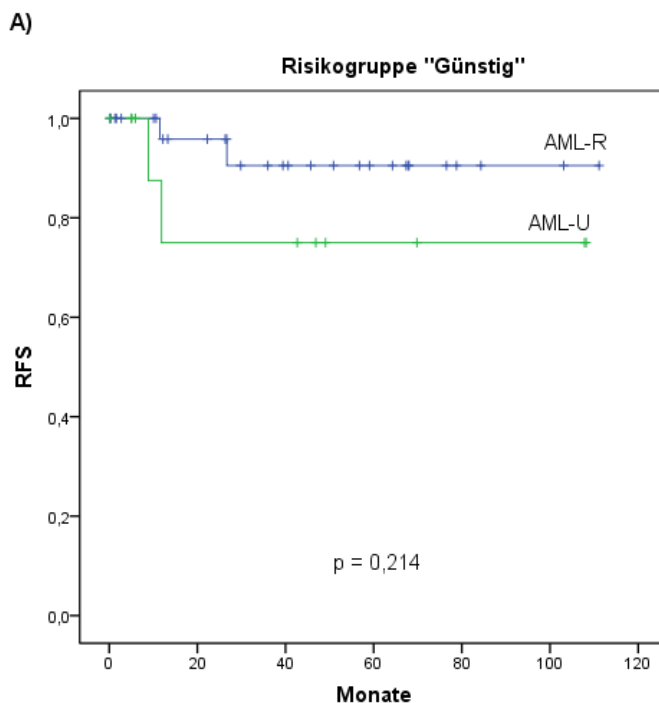
	Patienten mit CR / CRi	Patienten gesamt	Signifikanz (Fisher's Exact Test)
<b>Alle (n = 228)</b>			
• Gesamt	164 (71,9%)	228	$p = 0,051$
AML-R	73 (79,3%)	92	
AML-U	91 (66,9%)	136	
• „Günstig“	37 (86,0%)	43	$p = 1,000$
AML-R	27 (87,1%)	31	
AML-U	10 (83,3%)	12	
• „Intermediär“	91 (76,5%)	119	$p = 0,828$
AML-R	39 (78,0%)	50	
AML-U	52 (75,4%)	69	
• „Ungünstig“	36 (54,5%)	66	$p = 0,742$
AML-R	7 (63,6%)	11	
AML-U	29 (52,7%)	55	

#### **b) Rezidiv-freies Überleben (RFS)**

Nach 5 Jahren betrug die Rezidivwahrscheinlichkeit der Patienten mit erhobener ELN-Risikogruppe und „Reifescore“ (n = 228) 26,8% bei einem mittleren RFS von 69,7 Monaten. Es bestand insgesamt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen AML-R und AML-U, wobei die reiferen AML ein längeres RFS (7,3 Jahre bzw. 87,5 Monate) aufwiesen als die unreifen AML (4,1 Jahre bzw. 49,3 Monate), ( $p = 0,009$ ). Auf Ebene der ELN-Risikogruppen war dieser Unterschied im RFS nur in der „intermediären“ Risikogruppe nach ELN statistisch signifikant (RFS AML-R: 7,0 Jahre bzw. 84,5 Monate vs. RFS AML-U: 3,3 Jahre bzw. 39,7 Monate), ( $p = 0,002$ ). Im Gegensatz zu den Patienten der Hochrisikogruppe nach ELN zeigte sich in der

Niedrigrisikogruppe nach ELN zwar die erwartete Tendenz zugunsten der reifen AML, jedoch ebenfalls keine Signifikanz ( $p = 0,214$ , s. Abb. 4.8 und Tab. 4.12).

Nach Zensur der Patienten mit allogener SZT blieben die o.g. signifikanten Unterschiede der nicht allogenen transplantierten Patienten ( $n = 169$ ) für das RFS und die Rezidivrate sowohl in der Gesamtgruppe als auch für die „intermediäre“ Risikogruppe nach ELN bestehen ( $p = 0,021$  bzw.  $p = 0,013$ ). Erwähnenswert ist, dass es kein Rezidiv ( $n = 0 / 27$ ) unter den Patienten der „günstigen“ Risikogruppe nach ELN mit einem reifen Phänotyp (AML-R) gab (s. Abb. 4.8 und Tab. 4.12).



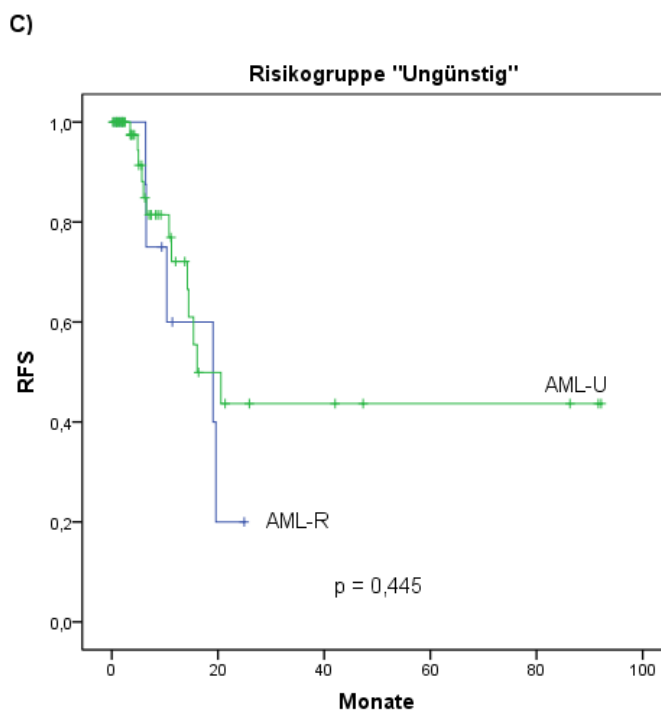
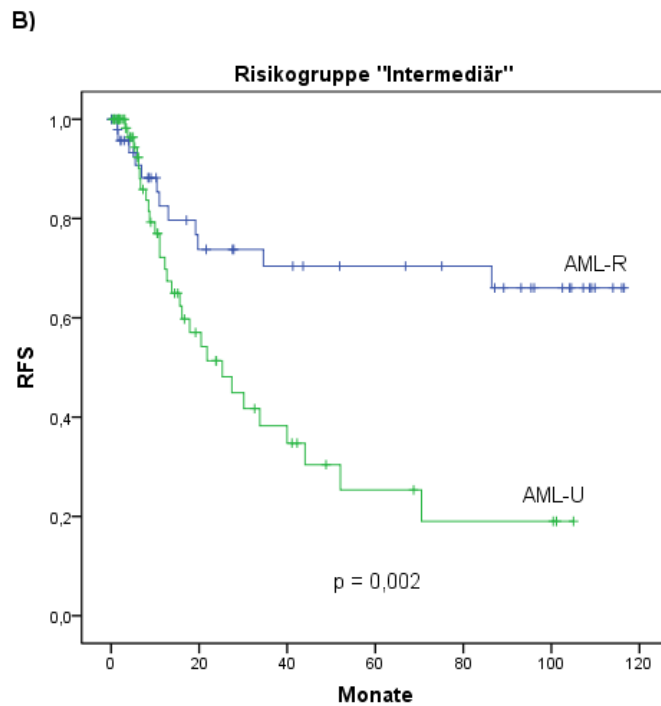


Abbildung 4.8: RFS aller Patienten mit erhobenem „Reifescore“ und ELN-Risikogruppe (n = 228) und Einfluss des Reifegrades (AML-R / AML-U) innerhalb der 3 Risikogruppen „Günstig“ (A), „Intermediär“ (B) und „Ungünstig“ (C).

Tabelle 4.12: Einfluss des Reifegrades (AML-R vs. AML-U) auf Rezidivraten und RFS aller Patienten (n = 228) und aller nicht transplantierten Patienten (n = 169) in den drei ELN-Risikogruppen. Der *p*-Wert bezeichnet den Unterschied der AML-R / AML-U innerhalb der jeweiligen Gruppe (Gesamt, „günstiges“, „intermediäres“ und „ungünstiges“ Risiko, SF: Standardfehler)

	Patienten mit Rezidiv	Patienten gesamt	Signifikanz (Logrank)	RFS in Monaten (Spanne)	SF
<b>Alle (n = 228)</b>					
• Gesamt	165 (72,4%)	228	<b><i>p</i> = 0,009</b>	69,7 (60,9 – 78,4)	4,5
AML-R	73 (79,3%)	92		87,5 (76,3 – 98,6)	5,7
AML-U	92 (67,6%)	136		49,3 (38,2 – 60,3)	5,7
• „Günstig“	39 (90,7%)	43	<i>p</i> = 0,214	98,7 (87,3 – 110,1)	5,8
AML-R	29 (93,5%)	31		102,5 (91,1 – 113,9)	5,8
AML-U	10 (83,3%)	12		83,7 (54,4 – 113,1)	15,0
• „Intermediär“	78 (65,5%)	119	<b><i>p</i> = 0,002</b>	63,5 (52,1 – 74,9)	5,8
AML-R	38 (76,0%)	50		84,5 (69,1 – 99,8)	7,8
AML-U	40 (58,0%)	69		39,7 (27,4 – 52,1)	6,3
• „Ungünstig“	48 (72,7%)	66	<i>p</i> = 0,445	42,5 (27,3 – 57,7)	7,7
AML-R	6 (54,5%)	11		15,9 (10,8 – 20,9)	2,6
AML-U	42 (76,4%)	55		46,9 (29,4 – 64,4)	8,9
<b>Ohne SZT (n = 169)</b>					
• Gesamt	132 (88,1%)	169	<b><i>p</i> = 0,021</b>	76,2 (65,9 – 86,6)	5,3
AML-R	62 (84,9%)	73		95,0 (83,6 – 106,4)	5,8
AML-U	70 (72,9%)	96		49,5 (34,9 – 64,1)	7,4
• „Günstig“	34 (97,1%)	35	<i>p</i> = 0,056		
AML-R	27 (100,0%)	27			

	Patienten mit Rezidiv	Patienten gesamt	Signifikanz (Logrank)	RFS in Monaten (Spanne)	SF
AML-U	7 (87,5%)	8			
• „Intermediär“	63 (70,8%)	89	$p = 0,013$		
AML-R	31 (77,5%)	40			
AML-U	32 (65,3%)	49			
• „Ungünstig“	35 (87,8%)	45	$p = 0,563$		
AML-R	4 (66,7%)	6			
AML-U	31 (79,5%)	39			

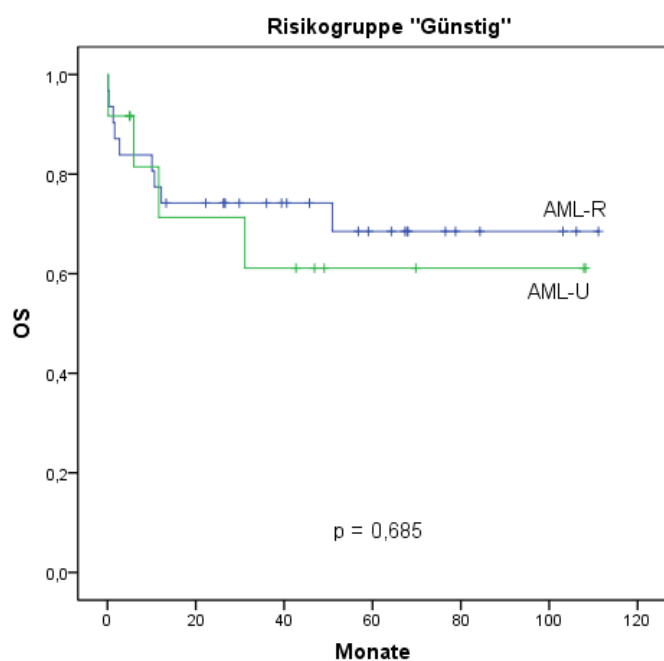
### c) Gesamtüberleben (OS)

Bei einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 40,4% betrug das Gesamtüberleben aller 228 Patienten durchschnittlich 48,8 Monate (s. Abb. 4.9 und Tab. 4.13). Ohne Berücksichtigung der Risikogruppen nach ELN fand sich auch hier ein signifikant besseres Überleben der AML-R (Fünf-Jahres-Überlebensrate: 45,7%, OS 5,6 Jahre bzw. 66,7 Monate) im Vergleich zu den AML-U (Fünf-Jahres-Überlebensrate: 30,1%, OS 2,9 Jahre bzw. 34,3 Monate,  $p = 0,013$ ). In allen ELN-Risikogruppen zeigten die AML-R-Patienten ein längeres OS als die AML-U-Patienten. Dieser Unterschied erreichte aber wiederum nur in der „intermediären“ Risikogruppe nach ELN statistische Signifikanz (AML-R: OS 5,1 Jahre bzw. 61,4 Monate, AML-U: OS 3,0 Jahre bzw. 35,6 Monate), ( $p = 0,022$ ).

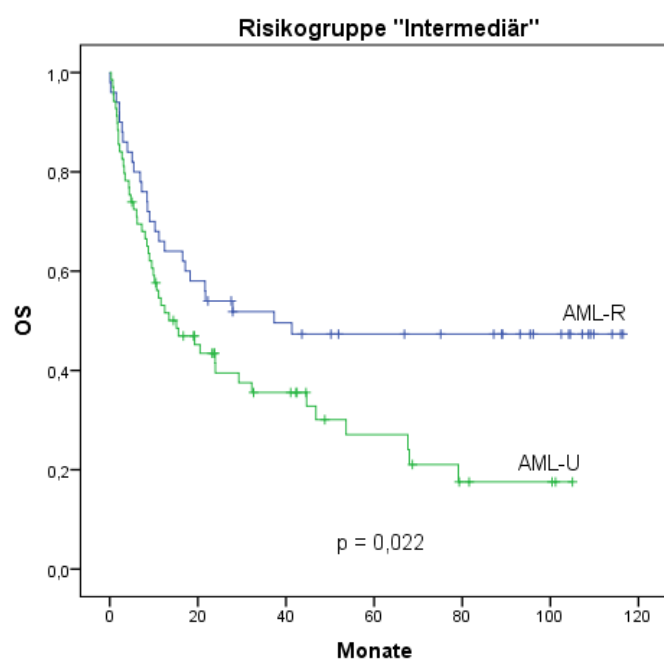
Bei Betrachtung der nicht allogenen transplantierten Patienten gab es ebenfalls einen signifikanten Unterschied in der Gesamtgruppe ( $n = 169$ ), als auch in der „intermediären“ Risikogruppe nach ELN, jeweils zugunsten der reifen AML. Innerhalb der „günstigen“ und der „ungünstigen“ Risikogruppe nach ELN waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant.



A)



B)



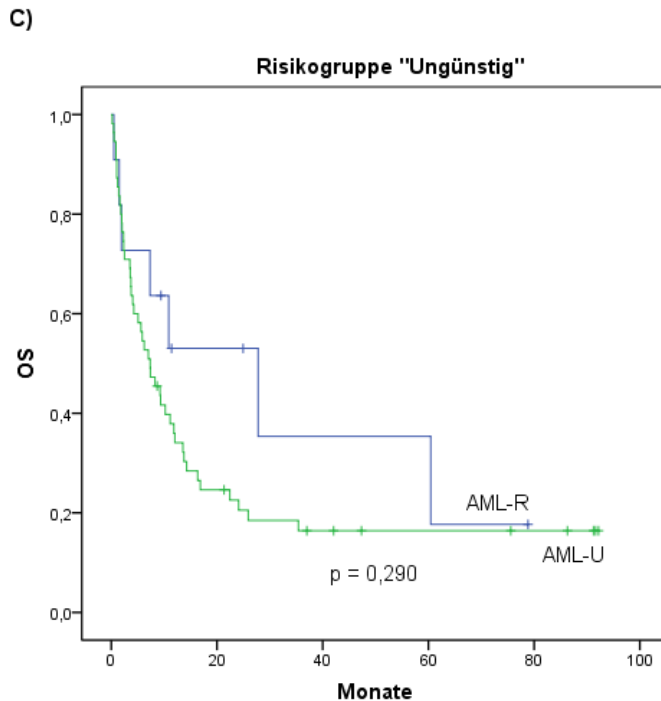


Abbildung 4.9: OS aller Patienten mit erhobenem „Reifescore“ und ELN-Risikogruppe (n = 228), OS-Kurven der als „reif“ und „unreif“ klassifizierten AML (AML-R und AML-U) innerhalb der drei ELN-Risikogruppen „Günstig“ (A), „Intermediär“ (B) und „Ungünstig“ (C).

Tabelle 4.13: Einfluss des Reifegrades (AML-R vs. AML-U) auf das Überleben aller Patienten und aller nicht transplantierten Patienten mit erhobenem „Reifescore“ und ELN-Risikogruppe. Vergleich des OS der AML-R und AML-U innerhalb der drei ELN-Risikogruppen mit Angabe der jeweiligen  $p$ -Werte (SF: Standardfehler)

	Überlebende Patienten	Patienten gesamt	Signifikanz (Logrank)	OS in Monaten (Spanne)	SF
<b>Alle (n = 228)</b>					
• Gesamt	89 (39,0%)	228	<b><math>p = 0,013</math></b>	48,8 (41,9 – 55,7)	3,5
AML-R	50 (54,3%)	92		66,7 (55,6 – 77,7)	5,7
AML-U	39 (28,7%)	136		34,3 (26,8 – 41,8)	3,8
• „Günstig“	30 (69,8%)	43	$p = 0,685$	78,2 (63,4 – 93,1)	7,6
AML-R	22 (71,0%)	31		80,3 (63,3 – 97,2)	8,7
AML-U	8 (66,7%)	12		71,1 (42,2 – 100,00)	14,7
• „Intermediär“	45 (37,8%)	119	<b><math>p = 0,022</math></b>	49,0	4,8

	Überlebende Patienten	Patienten gesamt	Signifikanz (Logrank)	OS in Monaten (Spanne)	SF
				(39,7 – 58,3)	
AML-R	24 (48,0%)	50		61,4 (46,7 – 76,2)	7,5
AML-U	21 (30,4%)	69		35,6 (25,6 – 45,5)	5,1
• „Ungünstig“	14 (31,2%)	66	$p = 0,290$	23,6 (15,4 – 31,9)	4,2
AML-R	4 (36,4%)	11		31,7 (11,7 – 51,7)	10,2
AML-U	10 (18,2%)	55		21,8 (13,1 – 30,4)	4,4
<b>Ohne SZT (n = 169)</b>					
• Gesamt	60 (35,5%)	169	$p = 0,013$	44,8 (36,8 – 52,7)	4,1
AML-R	39 (53,4%)	73		65,3 (52,7 – 77,8)	6,4
AML-U	21 (21,9%)	96		27,2 (18,9 – 35,5)	4,3
• „Günstig“	24 (68,6%)	35	$p = 0,746$	77,1 (60,6 – 93,7)	8,5
AML-R	18 (66,7%)	27		75,4 (56,4 – 94,4)	9,7
AML-U	6 (75,0%)	8		80,6 (47,8 – 113,4)	16,8
• „Intermediär“	30 (33,7%)	89	$p = 0,002$	44,5 (33,9 – 55,1)	5,4
AML-R	20 (50,0%)	40		63,1 (46,5 – 79,8)	8,5
AML-U	10 (20,4%)	49		25,3 (14,9 – 35,7)	5,3
• „Ungünstig“	6 (13,3%)	45	$p = 0,926$	15,4 (6,8 – 23,9)	4,4
AML-R	1 (16,7%)	6		5,5 (1,6 – 9,4)	2,0
AML-U	5 (12,8%)	39		15,8 (6,8 – 23,9)	4,4

#### 4.4.2 Biologischer Phänotyp in den Reife- und ELN-Risikogruppen

Da die ELN-Risikogruppen mithilfe zytogenetischer und molekulargenetischer Aberrationen definiert sind, ergibt sich die Frage, ob die Gruppe der AML-R bzw. AML-U eine Häufung bestimmter zytogenetischer oder molekularer Phänotypen aufweist. In der Gruppe der reifen AML zeigte sich eine signifikante Akkumulation von PML-RARA und NPM1 (beide „günstiges“ Risiko nach ELN) und der CN-AML („intermediäre“ Risikogruppe nach ELN). Die CBF-AML („günstiges“ Risiko nach ELN) und AML mit einem monosomalen Karyotyp („ungünstiges“ Risiko nach ELN) fanden sich dagegen vermehrt in der Gruppe AML-U (s. Tab. 4.14):

**Tabelle 4.14: Statistisch signifikante Unterschiede zytogenetischer und molekulargenetischer Phänotypen innerhalb der Gruppen des „Reifecores“ (aufgeschlüsselt nach ELN-Risikogruppen)**

ELN-Risikogruppe	Zytogenetischer / Molekularer Phänotyp	Patienten gesamt (n / 228)	AML-R (n / 92)	AML-U (n / 136)	Signifikanz (Fisher's Exact Test)
„Günstig“	CBF t(8;21)	5 (2,2%)	0 (0,0%)	<b>5 (3,7%)</b>	<b>p = 0,001</b>
	CBF inv(16) / t(16;16)	5 (2,2%)	1 (1,1%)	<b>4 (2,9%)</b>	<b>p = 0,017</b>
	PML-RARA	18 (7,9%)	<b>17 (18,5%)</b>	1 (0,7%)	<b>p = 0,006</b>
	NPM1	9 (3,9%)	<b>7 (7,6%)</b>	2 (1,5%)	<b>p = 0,034</b>
„Intermediär“	CN-AML	74 (32,5%)	<b>38 (41,3%)</b>	36 (26,5%)	<b>p = 0,012</b>
„Ungünstig“	Monosomaler Karyotyp	31 (13,6%)	1 (1,1%)	<b>30 (22,1%)</b>	<b>p = 0,007</b>
	MLL	10 (4,4%)	<b>7 (7,6%)</b>	3 (2,2%)	<b>p &lt; 0,001</b>

#### 4.5 Zytogenetisch normale AML

Von 228 Patienten hatten 89 eine zytogenetisch normale AML (CN-AML). Wie bereits erwähnt, waren diese der „intermediären“ Risikogruppe nach ELN zuzuordnen (n = 74), solange sie keine alleinige NPM1- oder CEBPA-Mutation trugen und damit in die „günstige“ Risikogruppe nach ELN kamen (n = 15). In dieser Gruppe ohne weitere molekulargenetische Merkmale wie PML-RARA und NPM1, welche beide mit einem reifen Phänotyp assoziiert sind, war es eine besonders interessante Frage, ob der Reifegrad der AML auch hier die Prognose bestimmte. Auch in dieser Subgruppe wurde der Einfluss der Reife auf Remissionsrate, RFS und OS untersucht:

Von 89 CN-AML-Patienten erreichten 72 eine CR / CRi (80,9%), davon hatten 43 Patienten eine AML-R und 29 Patienten eine AML-U gemäß „Reifescore“. 17 AML-Patienten erreichten keine CR / CRi (AML-R: 8; AML-U: 9). Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ( $p = 0,417$ ). Der Reifegrad hatte somit in dieser Subgruppe keinen Einfluss auf das Erreichen einer CR / CRi.

Hinsichtlich des RFS ergab sich für die Gruppe der reifen AML (AML-R) mit 11 Rezidiven unter 51 Patienten (21,6%) und einem mittleren RFS von 7,3 Jahren (88,1 Monate) jedoch ein signifikanter Unterschied zu den unreifen AML (AML-U). Letztere zeigten eine Rezidivrate von 14 / 38 Patienten (36,8%) und ein mittleres RFS von 4,2 Jahren (50,0 Monate), ( $p = 0,020$ ).

Auf das Gesamtüberleben bezogen, bestätigte sich eine Tendenz zu einem besseren OS in der Gruppe der AML-R, jedoch war dieser Unterschied in der hier untersuchten Gruppe der CN-AML nicht signifikant. Bei einem durchschnittlichen OS von 5,8 Jahren bzw. 70,0 Monaten verstarben 43,1% (22 / 51) der Patienten mit AML-R. Im Vergleich wiesen AML-U ein OS von 3,7 Jahren bzw. 44,6 Monaten bei einer Mortalität von 60,5% (23 / 38 Patienten) auf ( $p = 0,071$ ). Die fehlende Signifikanz ist hier sicherlich einerseits der Gruppengröße, andererseits dem Einfluss der Rezidivtherapie auf das OS geschuldet.

Wenn man innerhalb der Gruppe der CN-AML nur die Patienten ohne gleichzeitig nachgewiesene molekulargenetische Aberrationen betrachtete (MN-AML), blieb nur eine geringe Fallzahl von 53 Patienten übrig. 40 / 53 Patienten (75,5%) erreichten eine CR / CRi, wovon  $n = 21$  Patienten in die Gruppe AML-R und  $n = 19$  in die Gruppe AML-U fielen ( $p = 0,526$ ). Das RFS betreffend, hatten 17 Patienten ein Rezidiv (32,1%). Davon gehörten  $n = 6$  Patienten in AML-R (mittleres RFS: 7,2 Jahre bzw. 86,2 Monate) und  $n = 11$  Patienten in die Gruppe AML-U (mittleres RFS: 3,9 Jahre bzw. 46,2 Monate), ( $p = 0,079$ ).  $N = 28 / 53$  Patienten (52,8%) mit unauffälliger Zytogenetik und Molekulargenetik verstarben. Davon waren 12 Patienten der Gruppe AML-R zuzuordnen und 16 Patienten der Gruppe AML-U. Das durchschnittliche OS der AML-R betrug 5,8 Jahre bzw. 69,1 Monate und das der AML-U 3,8 Jahre bzw. 46,0 Monate ( $p = 0,219$ ).

## 5. Diskussion

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist der Einfluss der biologischen Reife einer AML auf deren Prognose. Speziell sollte untersucht werden, ob der Reifegrad leukämischer Blasten innerhalb der verschiedenen Risikogruppen nach ELN klinische Parameter wie Remissionsrate, RFS und OS beeinflusst [26].

Der Einfluss zytogenetischer und molekulargenetischer Merkmale auf die Prognose der AML ist bereits hinreichend charakterisiert worden und stellt die Grundlage der AML-Risikogruppen nach ELN dar [26, 31, 33, 35, 87, 91, 92]. Dagegen wurde der Einfluss einzelner immunologischer Marker wie z.B. CD34 und CD56 mit teils kontroversen Ergebnissen untersucht, wobei Unterschiede bei Untersuchungsmethoden, Auswertungsverfahren, Patientencharakteristika und Therapiekonzepten die Vergleichbarkeit dieser Studien erschweren [93-99].

Es fehlen bislang jedoch Untersuchungen zur Bedeutung der biologischen Reife innerhalb der einzelnen AML-Risikogruppen nach ELN. Die Tatsache, dass die aktuelle WHO-Klassifikation primär auf biologischen Merkmalen (Zytogenetik und Molekulargenetik) beruht, spiegelt die Erkenntnis wider, dass solche biologischen Charakteristika bei alleiniger Verwendung einer rein morphologisch-deskriptiven Einteilung (z.B. nach FAB) hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz klar überlegen sind.

Um die Reife der AML zu bestimmen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein durchflusszytometrischer Score entwickelt, welcher erstmals in quantitativer Weise die Expression der frühen Oberflächenmarker CD34 und CD117, sowie die des intrazytoplasmatischen Markers TdT berücksichtigt. Die Korrelation zwischen diesem immunzytologischen „Reifescore“ und morphologischer Reife nach FAB (s. Abb. 3.2) zeigt, dass der hier entwickelte Score den Reifegrad der AML gut abbildet.

Die mittels dieses neu entwickelten „Reifescores“ definierten Gruppen der reifen und unreifen AML (AML-R und AML-U) zeigen signifikante Unterschiede hinsichtlich der klinischen Parameter RFS und OS, dies sowohl in der Gesamtgruppe als auch in einer Subgruppenanalyse bei jungen (< 60 Jahre) und älteren AML-Patienten (≥ 60 Jahre).

In der Gruppe mit mittlerem Risiko nach ELN zeigten sich interessanterweise signifikante Unterschiede zwischen den AML-R (längeres RFS und OS) und den AML-U (kürzeres RFS und OS), wobei dieser Unterschied - wahrscheinlich fallzahlbedingt - in einer Subgruppenanalyse für die Altersgruppen  $< 60$  und  $\geq 60$  Jahre seine Signifikanz verlor. Für das RFS (Niedrigrisikogruppe) und OS (Niedrig- und Hochrisikogruppe) zeigte sich dieselbe Tendenz, jedoch waren diese Unterschiede - wahrscheinlich aufgrund der deutlich geringeren Fallzahlen in diesen Subgruppen - nicht signifikant.

Auch bei isolierter Betrachtung der Patienten mit CN-AML ( $n = 89$ ) zeigten sich die oben genannten Unterschiede: AML-R zeigten dabei ein signifikant längeres Rezidiv-freies Überleben als AML-U. Beschränkte sich die Analyse auf zytogenetisch und molekulargenetisch normale AML ( $n = 53$ ), zeigte sich wiederum dieselbe Tendenz hinsichtlich eines längeren RFS bei den reiferen AML, jedoch war dieser Unterschied dann (bei deutlich geringeren Fallzahlen) nicht mehr signifikant ( $p = 0,079$ ).

Ganz im Gegensatz zu den (die längerfristige Prognose widerspiegelnden) Überlebensraten (RFS und OS) hatte der Reifegrad der AML keinen Einfluss auf die Remissionsrate, mögliche Gründe hierfür sollen noch diskutiert werden.

Mit der Datensammlung für die vorliegende Studie wurde nach der Veröffentlichung und klinischen Einführung eines modifizierten FACS-Konsensuspanels des „Kompetenznetzes Leukämie“ im Jahr 2003 begonnen [100]. Die hier betrachtete Patientengruppe bestand aus 300 Patienten mit der Diagnose „Akute Myeloische Leukämie“.

Die aufgezeigten Signifikanzen basieren auf Berechnungen mit dieser Patientengruppe ( $n = 300$ ). Bei größeren Fallzahlen, wie sie z. B. in nationalen multizentrischen Studien erreicht werden, ist durchaus anzunehmen, dass die hier gefundenen Unterschiede für AML unterschiedlichen Reifungsgrades auch in weiteren Subgruppen statistische Signifikanz erreicht hätten.

Die primären Analysen zum klinischen Ansprechen schlossen alle zur Verfügung stehenden Patienten ein, unter ihnen auch die AML-Patienten, die eine allogene SZT erhielten. Diese Patienten galten als potentielle „Confounder“, da das RFS (wenn in 1.

CR transplantiert) und OS beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurden alle Berechnungen zur CR / CRi-Rate, RFS und OS sowohl im Gesamtkollektiv als auch nach Ausschluss der allogenen transplantierten Patienten durchgeführt. Trotz abnehmender Fallzahl blieben die Unterschiede zwischen AML-R und AML-U dabei signifikant.

Auf Grundlage der vorhandenen molekulargenetischen und zytogenetischen Befunde wurde die Risikogruppeneinteilung nach ELN durchgeführt. Dabei übersteigt der Umfang von routinemäßig durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen gegenwärtig jenen zu Beginn der Erhebungsperiode. Durch so möglicherweise entstandene „falsch negative“ molekulargenetische Befunde könnte die Zuordnung zur ELN-Risikogruppe im Einzelfall beeinflusst worden sein. Dieser Einflussfaktor betrifft jedoch in erster Linie nur die Subgruppe von CN-AML, da in den allermeisten anderen Fällen allein der zytogenetische Befund zu einer klaren Risikostratifizierung nach ELN führt. Beispiele für eine solche „fehlerhafte“ Zuordnung zur ELN-Risikogruppe sind z.B. ein „falsch negativer“ NPM1-Status, welcher im Falle einer CN-AML zur Einordnung in die „intermediäre“ anstelle der „günstigen“ Risikogruppe führt. Dieser Fall erscheint für unsere Betrachtung jedoch weniger problematisch, da es sich nur um wenige Fälle handeln dürfte: unter Berücksichtigung der in der Gruppe CN-AML tatsächlich beobachteten NPM1-positiven AML und unter der Annahme, dass ca. 45% der Patienten mit CN-AML auch NPM1-positiv sind und von diesen wiederum ca. 60% negativ für FLT3-ITD sind, ergeben sich maximal 8-10 Fälle, welche möglicherweise als „falsch negativ“ in die „intermediäre“ Risikogruppe eingeordnet wurden [26, 36]. Allerdings konnte gerade für diese Gruppe der NPM1<sup>POS</sup>-AML bereits gezeigt werden, dass Reife (fehlende CD34-Expression) ein günstiger prognostischer Faktor ist, was ebenfalls zeigt, dass durch den durchflusszytometrischen „Reifescore“ zusätzliche prognostische Information zu gewinnen ist [101, 102].

Ein weiteres Beispiel wäre ein „falsch negativer“ FLT3-ITD-Status in einer CN-AML, welcher in unserer Einteilung aber keinen Einfluss hat, da aus oben genannten Gründen keine Unterteilung in „intermediär-I“ und „intermediär-II“ vorgenommen wurde. Auch ein „falsch negativer“ c-kit-Status bei einer CBF-AML zählt zu den möglichen Einflussfaktoren, wovon jedoch höchstens 14,5% aller CBF-AML betroffen sind [103].



Auch heute zählt der c-kit-Status noch nicht zu den Routineparametern bei der Erstdiagnose einer AML. Der Einfluss auf die hier vorliegenden Ergebnisse ist nicht höher einzuschätzen als der von vielen (noch) unbekanntem oder in ihrer prognostischen Bedeutung ungewissen molekulargenetischen Aberrationen, welche ebenfalls keinen Eingang in die hier beschriebene Analyse gefunden haben [26].

In der Summe solcher Ereignisse ist davon auszugehen, dass sie in der Gesamtgruppe der von uns untersuchten AML-Kohorte nicht zu einem systematischen Bias hin zu einem günstigeren oder ungünstigen Risikoprofil geführt haben.

Das mediane Erkrankungsalter lag in dieser Arbeit bei 61 Jahren und damit etwas unter dem Durchschnitt der publizierten Daten (67 Jahre) [5]. Die aus der Literatur bekannte geringe Überzahl männlicher im Vergleich zu weiblichen AML-Patienten zeigte sich mit 54% vs. 46% auch in unserem Patientenkollektiv.

Die Fünf-Jahres-Überlebensrate betrug laut Daten des Krebsregisters der USA 24,9% (2003 – 2009), in unserer Studie 38,3% [5]. Die Niedrigrisiko-Gruppe wies eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 68,9% auf, die Gruppe mit mittlerem Risiko eines von 40,2% und die Hochrisiko-Patienten zeigten eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 22,9% ( $p < 0,001$ ).

Ein möglicher Grund für diese geringfügigen Unterschiede im Vergleich zur Literatur könnte darin liegen, dass in unserer Analyse nur Patienten bei AML-Erstdiagnose erfasst wurden, für welche vollständige durchflusszytometrische Untersuchungsergebnisse vorlagen. Durch somit bedingten Ausschluss von sehr alten und/oder stark komorbiden Patienten, für die eine (intensive) Therapie nicht in Betracht kam und bei denen deshalb möglicherweise keine vollständige Diagnostik durchgeführt wurde, könnte in unserer Studie ein Bias hin zu besseren Überlebensdaten entstanden sein. Auch könnte das geringere mittlere Alter unserer Kohorte, welches möglicherweise auch im Zusammenhang mit einer gewissen Selektionierung von Patienten in großen universitären Zentren steht, dazu beigetragen haben (s.o.).

Die Rate an detektierten zytogenetischen Veränderungen in dieser Arbeit entspricht etwa den Zahlen in früheren Publikationen (37,7% vs. 40 – 50% CN-AML; 16,8% vs.

11,2% komplex-aberranter Karyotyp; 12,8% vs. 13 – 25% monosomaler Karyotyp; 11,0% vs. 3,9% Deletion 7; 8,8% vs. 3,5% Deletion 5q; 5,5% vs. 1,6% Deletion 7q und 2,9% vs. 2,1% Deletion 5) [31, 34, 35, 104, 105].

Möglicherweise aufgrund der vorgenannten Einschränkungen bei der molekulargenetischen Diagnostik zu Beginn der Erhebungsperiode liegt die Gesamtzahl der Patienten mit molekulargenetischen Aberrationen niedriger als der in der Literatur publizierte Anteil (bezogen auf CN-AML: 23,3% (n = 24 / 103) vs. 45 – 55% NPM1<sup>mut</sup>; 20,4% (n = 21 / 103) vs. 35 – 45% FLT3-ITD<sup>mut</sup> und 1% (n = 1 / 103) vs. 5 – 10% MLL<sup>mut</sup>) [41, 36].

In dieser Arbeit wurde erstmals eine quantitative Bewertung von drei frühen Progenitorzellmarkern durchgeführt. Ein unreifer Phänotyp (AML-U) war dabei einerseits mit einer schlechteren Prognose und andererseits mit dem vermehrten Vorkommen von komplex-aberranten und monosomalen Karyotypen, einem Zugewinn des Chromosoms 13 und einem Verlust von Chromosom 5, 5q und 7 assoziiert. Dagegen häuften sich unter den reifen AML (AML-R) FLT3-ITD, die CN-AML und die nach ELN als „günstiges“ Risiko eingestuftes NPM1- und PML-RARA-Mutationen. 80% (n = 8/10) der FLT3-ITD<sup>pos</sup> / NPM1<sup>pos</sup>-Patienten fielen ebenfalls in die Gruppe AML-R.

Gestützt werden die vorliegenden Ergebnisse durch frühere Studien, welche zeigten, dass Patienten der FAB-Gruppe M0 im Gegensatz zu jenen reiferer FAB-Subtypen eine ungünstigere Prognose haben und sich in der Gruppe FAB M0 zusätzlich Hochrisiko-Aberrationen, u.a. ein komplex-aberranter Karyotyp, -5 / (del)5q, -7 / (del)7q, sowie ein höheres Durchschnittsalter der Patienten, häufen [106-108]. Die beteiligten Autoren schlussfolgerten ebenfalls, dass die FAB-Gruppe M0 per se mit einem ungünstigerem Risiko assoziiert ist [106].

Da diese Studien aber bereits vor längerer Zeit durchgeführt wurden, ist der Einfluss molekulargenetischer Marker darin noch nicht ausreichend berücksichtigt. Walter et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen FAB-Gruppe und NPM1/CEBPA-Status und bestätigten zum einen, dass die Gruppe FAB M0 ein schlechteres klinisches Ansprechen zeigt als andere FAB-Subgruppen, und zum anderen zeigten sie, dass

innerhalb der AML FAB M0 Niedrigrisiko-Mutationen erheblich seltener vorkommen. Betrachtet man nur die NPM1<sup>neg</sup> und NPM1<sup>neg</sup>/CEBPA<sup>neg</sup>-Patienten, verliert sich der Unterschied hinsichtlich CR, RFS und OS zwischen den FAB-Gruppen [109]. Darüber hinaus dokumentieren zwei kürzlich veröffentlichte Studien einen negativen Einfluss des Stammzellmarkers CD34 in NPM1<sup>mut</sup>-AML - ein Befund, der ebenfalls auf eine ungünstige prognostische Bedeutung von biologischer Unreife hinweist [101, 102].

Der zytogenetisch und molekulargenetisch definierten Einteilung der Risikogruppen nach ELN liegen zahlreiche Studien zugrunde [26, 31, 33, 35, 87, 91, 110, 111]. Dabei sind die zytogenetischen und molekulargenetischen Befunde maßgebend für die Zuordnung zur Risikogruppe. Die intermediäre Risikogruppe nach ELN bildet jedoch weiterhin eine sehr heterogene Gruppe. Auf dem ELN-Treffen 2009 wurde deshalb beschlossen, erstmals eine Differenzierung in „intermediär I“ und „intermediär II“ vorzunehmen.

Diese Einteilung (s. Kap. 3.4) wurde in der Folge jedoch von mehreren Arbeitsgruppen in Frage gestellt [112-114]. Vor allem für die beiden „intermediären“ Gruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied erkennen, teilweise wiesen die „intermediär II“-Patienten ein besseres klinisches Ansprechen auf als die „intermediär I“-Patienten. Aufgrund der Tatsache, dass in dieser Arbeit eine vergleichsweise kleinere Patientenkohorte zur Verfügung stand und die Unterteilung der „intermediären“ Risikogruppe nach ELN nicht unumstritten ist, erfolgte in dieser Arbeit keine Differenzierung in „intermediär I“ und „II“. In unserer Studie fiel auf, dass die „ungünstige“ Risikogruppe der  $\geq 60$ -jährigen Patienten (n = 34) bei Betrachtung des RFS (ausschließlich in den ELN-Gruppen) ein besseres Ergebnis zeigt als die Patienten der „intermediären“ Risikogruppe (n = 73). Aufgrund einer Subgruppenanalyse könne die Unterschiede zwischen „günstiger“ und „intermediärer“ Risikogruppe nicht durch eine unterschiedliche Anzahl allogener transplantierte Patienten in den beiden Risikogruppen erklärt werden. Ähnliche erwartete Unterschiede im RFS und OS wurden jedoch, wie oben beschrieben, auch von anderen Gruppen berichtet [112-114].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Akute Myeloische Leukämien mit einem unreifen Immunphänotyp ein schlechteres klinisches Outcome (RFS, OS) zeigen als jene mit einem reiferen Phänotyp. Innerhalb der ELN-Risikogruppen traf dies besonders für die Patienten mit mittlerem Risiko zu.

Im Folgenden soll versucht werden, eine biologische Hypothese für die beobachteten Unterschiede zwischen reifen und unreifen AML zu generieren. Eine mögliche Erklärung kann aus der biologischen Tatsache abgeleitet werden, dass unreife Zellpopulationen im Allgemeinen eine höhere Proliferationsrate und damit – aufgrund einer erhöhten Frequenz von Zellteilungen - eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten neuer (zusätzlicher) genetischer Aberrationen aufweisen. Dieser Zustand ist somit durch eine höhere „genetische Instabilität“ gekennzeichnet. Dies resultiert in einer höheren Wahrscheinlichkeit, dass weitere Veränderungen auftreten, welche der Zelle einen Proliferationsvorteil verschaffen und somit (möglicherweise auch unter einem Therapie-assoziierten Selektionsdruck) zu „klonaler Evolution“ führen. Für die Chronische Myeloische Leukämie (CML), bei welcher die „genetische Instabilität“ zu einer Hemmung der Apoptose, einem Differenzierungsblock und letztendlich zur Blastenkrise führt, ist dieses Konzept weitestgehend akzeptiert [115].

Das Modell der „klonalen Evolution“ besagt hierbei, dass die Leukämie bei hoher genetischer Instabilität eine große Wahrscheinlichkeit aufweist, dass Subklone mit noch aggressiverem biologischen Verhalten (u.a. auch mit Therapieresistenz) entstehen [22, 116, 117]. Ley et al. (s. Kap. 1.2.2.1) zeigten vor Kurzem, dass die Anzahl der Mutationen in einer Zelle im Laufe des Lebens ansteigt, wobei die meisten Mutationen wahrscheinlich bedeutungslos sind („bystander“ Mutationen). Für die Entstehung einer AML sind dann zwei Faktoren entscheidend: auf der einen Seite das Auftreten der AML-initiiierenden Mutation („driver“ Mutation) sowie auf der anderen Seite deren Zusammentreffen mit der kooperierenden Mutation, welche den transformierten Zellen einen Proliferationsvorteil verschafft. Im dominanten leukämischen Zellklon findet sich außerdem das Muster von Mutationen, das bereits in der ursprünglichen Zelle vor deren Transformation vorhanden war [22]. Dieses Modell, welches die Wechselwirkung zwischen vermehrter Proliferationsaktivität, „genetischer Instabilität“ und der folgenden Entstehung eines leukämischen Zellklones beschreibt, könnte erklären, warum Unreife (mit erhöhter Zellteilungsrate und somit erhöhter genetischer Instabilität) ein ungünstiger prognostischer Faktor ist.

Auch aus dem „Cancer Stem Cell“-Modell ergibt sich bei der AML ein möglicher Erklärungsansatz: insbesondere im unreifen  $CD34^{pos}/CD38^{neg}$ -Stammzellkompartiment befinden sich die meist ruhenden leukämischen Stammzellen (LSZ), definitionsgemäß mit der Fähigkeit, im Mausmodell eine Leukämie mit dem gleichen Phänotyp der Ursprungserkrankung zu induzieren, zu erhalten und durch Vermehrung auch auszudehnen [18, 19]. Dagegen steht auf der anderen Seite der von den LSZ abstammende große Blastenklon, welcher die Symptome der Krankheit auslöst [118]. Mit der führenden LSZ ist der leukämische Zellverband – wie auch die gesunde Hämatopoese – morphologisch, phänotypisch und funktionell hierarchisch organisiert [119].

Zu Beginn der Stammzellforschung konnte man zunächst zeigen, dass sich hämatopoetische Stammzellen in dem unreifen, linienunspezifischen  $CD34^{pos}/CD38^{neg}/Lin^{neg}$ -Kompartiment anreichern [120-122]. Experimente zum Ursprung der Leukämie-induzierenden Zelle zeigten dann, dass diese den gleichen Phänotyp wie die HSZ exprimieren, weshalb man annahm, dass sich eine AML aus HSZ entwickelt [16, 18, 19, 123]. Weitere Argumente, die für die HSZ als Ausgangsort der LSZ sprechen, sind deren bereits aktivierte Programme zur Selbsterneuerung und die Tatsache, dass die HSZ aufgrund ihrer längeren Lebensdauer mehr Mutationen ansammeln kann als eine Progenitorzelle [124].

Zahlreiche neuere Forschungsergebnisse konnten nun zeigen, dass auch differenziertere Progenitorzellen ( $CD34^{pos/neg}/CD38^{pos}/Lin^{neg/low}$ ) Ausgangspunkt der malignen Transformation sein können. Voraussetzung dafür ist aber, dass sie Stammzelleigenschaften wiedererlangen und anschließend weitere primäre Mutationen (Gruppe-I- und Gruppe-II-Mutationen, s. Kap. 1.2.2.2) anhäufen, welche sie zur Transformation in eine LSZ befähigen [15-17, 125-127]. Da CD38 erst vor Kurzem in das Standardpanel unseres FACS-Labors aufgenommen wurde, konnte dieser Marker in unserer Analyse leider nicht berücksichtigt werden.

Es besteht jedoch weitestgehend Konsens, dass sich der Großteil der HSZ im  $CD34^{pos}$ -Kompartiment befindet. Da die CD34-Expression einen zentralen Stellenwert in dem hier von uns beschriebenen durchflusszytometrischen „Reifescore“ hat, könnte die

schlechtere Prognose der unreifen AML dadurch erklärt werden, dass sich in dem unreifen CD34<sup>pos</sup>-Kompartiment verhältnismäßig mehr leukämische Stammzellen befinden. Diese LSZ sind möglicherweise zum Teil im Ruhestadium G0 des Zellzyklus und somit weniger Chemotherapie-sensitiv [107, 128-132].

Interessant ist in diesem Kontext auch das folgende Ergebnis unserer Studie: im Gegensatz zu Unterschieden für RFS und OS bei den reifen und unreifen AML fand sich kein signifikanter Unterschied für die CR / CRi-Raten. Es erscheint durchaus möglich, dass die Induktionschemotherapie die leukämische Zellmasse zunächst so weit reduziert, dass die meisten Patienten eine CR / CRi erreichen, aber später bevorzugt jene Patienten mit einem höheren Anteil an LSZ (im unreifen CD34<sup>pos</sup>-Zellkompartiment) einen Rückfall erleiden und dadurch RFS- sowie OS-Raten ungünstig beeinflusst werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass bei der biologisch unreifen AML eine hohe proliferative Aktivität im Zusammenhang mit einer hohen genetischen Instabilität (möglicherweise innerhalb eines LSZ-Kompartiments) für die ungünstige Prognose verantwortlich sind. Der hier analysierte und einfach berechenbare durchflusszytometrische „Reifescore“ erlaubt die Abgrenzung einer unreifen von einer reiferen AML und lässt damit eine weitere biologische Differenzierung auch innerhalb der ELN-Risikogruppen zu.

Im Gegensatz zu den Niedrig- (Chemotherapie) und Hochrisikopatienten (allogene SZT) sind die Entscheidungsmöglichkeiten für eine Postinduktionstherapie bei AML-Patienten mit mittlerem Risiko nach ELN häufig schwieriger (Chemotherapie vs. allogene SZT, s. Kap. 1.6). Es ist vorstellbar, dass in dieser Patientengruppe neben der individuellen Einschätzung des Transplantationsrisikos (ECOG-Status, Alter, Vorerkrankungen, EBMT-Risikoscore etc.) der hier entwickelte durchflusszytometrische Reifescore zusätzlich dazu beiträgt, eine Subgruppe mit günstiger oder ungünstiger Prognose zu identifizieren. Bei Patienten mit geringem Transplantationsrisiko und einem unreifen Immunphänotyp (AML-U) könnte die Entscheidung zur Durchführung einer SZT dadurch bestärkt werden. Um die klinische Relevanz des „Reifescore“ endgültig

klinisch beurteilen zu können, ist jedoch eine prospektive Evaluation an einem größeren Patientenkollektiv erforderlich.

## 6. Zusammenfassung

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine komplexe Erkrankung des hämatopoetischen Systems, deren Pathogenese bis heute nur ansatzweise verstanden ist. Bei der AML führen zytogenetische und molekulargenetische Aberrationen zur Transformation einer blutbildenden Zelle in eine leukämische Stammzelle, welche Ausgangspunkt für einen im weiteren Verlauf zunehmend heterogenen und verdrängend wachsenden leukämischen Zellklon ist.

Die Unterteilung der AML in verschiedene Risikogruppen nach ELN ist international etabliert und beruht im Wesentlichen auf zytogenetischen und molekulargenetischen Merkmalen. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die biologische Reife einer AML Einfluss auf die Prognose haben kann, jedoch ist bislang völlig unklar, ob dies auch innerhalb der bekannten ELN-Risikogruppen gilt. In dieser Arbeit wurde ein durchflusszytometrischer „Reifescore“ für die AML entwickelt, welcher auf der quantitativen Expression weniger Progenitormerkmale beruht (CD34, CD117 und TdT) und welcher sehr gut mit morphologischer Reife (nach FAB) korreliert.

Die sich dadurch ergebenden Patientengruppen „unreife AML“ (AML-U) und „reife AML“ (AML-R) zeigten signifikante Unterschiede hinsichtlich RFS und OS zugunsten der reiferen AML. Dabei fand sich in der Gruppe der unreifen AML eine Akkumulation ungünstiger zytogenetischer Merkmale wie der komplex-aberrante Karyotyp, der monosomale Karyotyp oder die Monosomien 5 und 7. Die reifen AML exprimierten hingegen häufig Niedrigrisiko-Aberrationen wie NPM1 und PML-RARA.

Interessanterweise zeigte sich die günstigere Prognose der reifen AML im Hinblick auf RFS und OS aber nicht nur in der Gesamtgruppe, sondern auch innerhalb der einzelnen ELN-Risikogruppen, wobei der Unterschied – wahrscheinlich fallzahlbedingt – nur innerhalb der intermediären Risikogruppe statistisch signifikant war.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen somit, dass der Reifegrad einer AML nicht nur bestimmte zytogenetische oder molekulargenetische Phänotypen reflektiert, sondern darüber hinaus einen eigenständigen Einfluss auf die Prognose der Erkrankung haben kann.



Mögliche hypothetische Erklärungen für die beobachteten Unterschiede sind eine höhere genetische Instabilität sowie eine mutmaßlich höhere Frequenz von leukämischen Stammzellen in der Gruppe der unreifen AML.

Der in dieser Arbeit entwickelte durchflusszytometrische „Reifescore“ muss an einem größeren Patientenkollektiv validiert werden und könnte in Zukunft eine weitere Entscheidungshilfe bei der Wahl der Postremissionstherapie der AML (Chemotherapie vs. allogene SZT) werden, insbesondere in der intermediären Risikogruppe nach ELN.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Fauci AS, K.D., Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, Harrison's Principles of Internal Medicine. Vol. 17th Edition. 2008, New York: The McGraw-Hill Company.
2. Estey, E. and H. Dohner, Acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 2006. 368(9550): p. 1894-907.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
4. Kompetenznetz Leukämie, [http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/epidemiologie/aml/index\\_ger.html](http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/epidemiologie/aml/index_ger.html), abgerufen am 28.07.2013 um 11.30 Uhr.
5. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2010/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/), based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2013.
6. Ferrara, F. and C.A. Schiffer, Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*, 2013. 381(9865): p. 484-95.
7. Bornhauser, M. and G. Ehninger, [Diagnostics and therapy of acute myeloid leukemia]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2009. 134(39): p. 1935-41.
8. Gundestrup, M. and H.H. Storm, Radiation-induced acute myeloid leukaemia and other cancers in commercial jet cockpit crew: a population-based cohort study. *Lancet*, 1999. 354(9195): p. 2029-31.
9. Cardis, E., et al., Effects of low doses and low dose rates of external ionizing radiation: cancer mortality among nuclear industry workers in three countries. *Radiat Res*, 1995. 142(2): p. 117-32.
10. Kane, E.V., et al., Tobacco and the risk of acute leukaemia in adults. *Br J Cancer*, 1999. 81(7): p. 1228-33.
11. Cilloni, D., et al., Myelodysplastic syndromes. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1028: p. 400-8.
12. Pedersen-Bjergaard, J., M.T. Andersen, and M.K. Andersen, Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2007: p. 392-7.

13. Kondo, M., et al., Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*, 2003. 21: p. 759-806.
14. Passegue, E., et al., Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100 Suppl 1: p. 11842-9.
15. Krivtsov, A.V., et al., Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*, 2006. 442(7104): p. 818-22.
16. Cozzio, A., et al., Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev*, 2003. 17(24): p. 3029-35.
17. Huntly, B.J., et al., MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell*, 2004. 6(6): p. 587-96.
18. Bonnet, D. and J.E. Dick, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 1997. 3(7): p. 730-7.
19. Lapidot, T., et al., A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 1994. 367(6464): p. 645-8.
20. le Viseur, C., et al., In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer Cell*, 2008. 14(1): p. 47-58.
21. Ding, L., et al., Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 481(7382): p. 506-10.
22. Welch, J.S., et al., The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*, 2012. 150(2): p. 264-78.
23. Tsimberidou, A.M., et al., Myeloid sarcoma is associated with superior event-free survival and overall survival compared with acute myeloid leukemia. *Cancer*, 2008. 113(6): p. 1370-8.
24. Kwaan, H.C., J. Wang, and L.N. Boggio, Abnormalities in hemostasis in acute promyelocytic leukemia. *Hematol Oncol*, 2002. 20(1): p. 33-41.
25. Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 2002. 100(7): p. 2292-302.

26. Dohner, H., et al., 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): p. 453-74.
27. Kern, W. and S. Schnittger, Monitoring of acute myeloid leukemia by flow cytometry. *Curr Oncol Rep*, 2003. 5(5): p. 405-12.
28. Bene, M.C., et al., Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 1995. 9(10): p. 1783-6.
29. Bene, M.C., et al., The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood*, 1998. 92(2): p. 596-9.
30. Al-Mawali, A., D. Gillis, and I. Lewis, The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol*, 2009. 131(1): p. 16-26.
31. Schlenk, R.F., et al., Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2008. 358(18): p. 1909-18.
32. Medeiros, B.C., et al., Prognostic impact of monosomal karyotype in young adult and elderly acute myeloid leukemia: the Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Blood*, 2010. 116(13): p. 2224-8.
33. Grimwade, D., et al., 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): p. 2322-33.
34. Slovak, M.L., et al., 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): p. 4075-83.
35. Byrd, J.C., et al., 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): p. 4325-36.
36. Bacher, U., S. Schnittger, and T. Haferlach, Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*, 2010. 22(6): p. 646-55.

37. Kelly, L.M. and D.G. Gilliland, Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2002. 3: p. 179-98.
38. Stirewalt, D.L. and J.P. Radich, The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(9): p. 650-65.
39. Bacher, U., et al., Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*, 2006. 107(10): p. 3847-53.
40. Grisendi, S., et al., Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(7): p. 493-505.
41. Schlenk, R.F. and K. Dohner, Impact of new prognostic markers in treatment decisions in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*, 2009. 16(2): p. 98-104.
42. Pabst, T., et al., Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet*, 2001. 27(3): p. 263-70.
43. Hess, J.L., MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med*, 2004. 10(10): p. 500-7.
44. Bennett, J.M., et al., Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 1976. 33(4): p. 451-8.
45. Bennett, J.M., et al., A variant form of hypergranular promyelocytic leukemia (M3). *Ann Intern Med*, 1980. 92(2 Pt 1): p. 261.
46. Bennett, J.M., et al., Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*, 1985. 103(3): p. 460-2.
47. Catovsky, D., et al., A classification of acute leukaemia for the 1990s. *Ann Hematol*, 1991. 62(1): p. 16-21.
48. Bennett, J.M., et al., Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*, 1985. 103(4): p. 620-5.
49. Bennett, J.M., et al., Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol*, 1991. 78(3): p. 325-9.
50. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of

- Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001, p75-107.
51. Vardiman, J.W., et al., The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 2009. 114(5): p. 937-51.
  52. Tallman, M.S., D.G. Gilliland, and J.M. Rowe, Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*, 2005. 106(4): p. 1154-63.
  53. Rai, K.R., et al., Treatment of acute myelocytic leukemia: a study by cancer and leukemia group B. *Blood*, 1981. 58(6): p. 1203-12.
  54. Yates, J., et al., Cytosine arabinoside with daunorubicin or adriamycin for therapy of acute myelocytic leukemia: a CALGB study. *Blood*, 1982. 60(2): p. 454-62.
  55. Arlin, Z., et al., Randomized multicenter trial of cytosine arabinoside with mitoxantrone or daunorubicin in previously untreated adult patients with acute nonlymphocytic leukemia (ANLL). Lederle Cooperative Group. *Leukemia*, 1990. 4(3): p. 177-83.
  56. Preisler, H., et al., Comparison of three remission induction regimens and two postinduction strategies for the treatment of acute nonlymphocytic leukemia: a cancer and leukemia group B study. *Blood*, 1987. 69(5): p. 1441-9.
  57. Buchner, T., et al., Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood*, 1999. 93(12): p. 4116-24.
  58. Buchner, T., et al., 6-Thioguanine, cytarabine, and daunorubicin (TAD) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (HAM) for induction, TAD for consolidation, and either prolonged maintenance by reduced monthly TAD or TAD-HAM-TAD and one course of intensive consolidation by sequential HAM in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia (AML): a randomized trial of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 2003. 21(24): p. 4496-504.
  59. Lowenberg, B., et al., Mitoxantrone versus daunorubicin in induction-consolidation chemotherapy--the value of low-dose cytarabine for maintenance of remission, and an assessment of prognostic factors in acute myeloid leukemia in the elderly: final report. European Organization for the Research and

- Treatment of Cancer and the Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Hovon Group. *J Clin Oncol*, 1998. 16(3): p. 872-81.
60. Tefferi, A. and L. Letendre, Going beyond 7 + 3 regimens in the treatment of adult acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 2012. 30(20): p. 2425-8.
  61. Berman, E., et al., Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood*, 1991. 77(8): p. 1666-74.
  62. Vogler, W.R., et al., A phase III trial comparing idarubicin and daunorubicin in combination with cytarabine in acute myelogenous leukemia: a Southeastern Cancer Study Group Study. *J Clin Oncol*, 1992. 10(7): p. 1103-11.
  63. Wiernik, P.H., et al., Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 1992. 79(2): p. 313-9.
  64. Mandelli, F., et al., A randomised clinical trial comparing idarubicin and cytarabine to daunorubicin and cytarabine in the treatment of acute non-lymphoid leukaemia. A multicentric study from the Italian Co-operative Group GIMEMA. *Eur J Cancer*, 1991. 27(6): p. 750-5.
  65. Weick, J.K., et al., A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*, 1996. 88(8): p. 2841-51.
  66. Bishop, J.F., et al., Etoposide in acute nonlymphocytic leukemia. Australian Leukemia Study Group. *Blood*, 1990. 75(1): p. 27-32.
  67. Lowenberg, B., et al., High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2009. 361(13): p. 1235-48.
  68. Mayer, R.J., et al., Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med*, 1994. 331(14): p. 896-903.
  69. Bloomfield, C.D., et al., Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res*, 1998. 58(18): p. 4173-9.

70. Cassileth, P.A., et al., Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med*, 1998. 339(23): p. 1649-56.
71. Harousseau, J.L., et al., Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. The Groupe Ouest Est Leucemies Aigues Myeloblastiques (GOELAM). *Blood*, 1997. 90(8): p. 2978-86.
72. Koreth, J., et al., Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA*, 2009. 301(22): p. 2349-61.
73. AMLSG 17-10-Studie der AMLSG Ulm, Kurzprotokoll: [http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/trial/pdf/knl\\_de/kurzprotokoll\\_LN\\_AMLSGU\\_2012\\_484.pdf?id=484](http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/trial/pdf/knl_de/kurzprotokoll_LN_AMLSGU_2012_484.pdf?id=484) abgerufen am 30.07.2013 um 20 Uhr.
74. AMLSG 09-09-Studie der AMLSG Ulm, Kurzprotokoll: [http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/trial/pdf/knl\\_de/kurzprotokoll\\_LN\\_AMLSGU\\_2009\\_316.pdf?id=316](http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/trial/pdf/knl_de/kurzprotokoll_LN_AMLSGU_2009_316.pdf?id=316) abgerufen am 30.07.2013 um 20 Uhr.
75. Tallman, M.S., et al., All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*, 1997. 337(15): p. 1021-8.
76. Fenaux, P., et al., Effect of all transretinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of a multicenter randomized trial. European APL 91 Group. *Blood*, 1993. 82(11): p. 3241-9.
77. Sanz, M.A., et al., Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood*, 2004. 103(4): p. 1237-43.
78. Lo-Coco, F., et al., Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2013. 369(2): p. 111-21.
79. Gafter-Gvili, A., et al., Meta-analysis: antibiotic prophylaxis reduces mortality in neutropenic patients. *Ann Intern Med*, 2005. 142(12 Pt 1): p. 979-95.
80. Robenshtok, E., et al., Antifungal prophylaxis in cancer patients after chemotherapy or hematopoietic stem-cell transplantation: systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*, 2007. 25(34): p. 5471-89.



81. Freireich, E.J., Supportive care for patients with blood disorders. *Br J Haematol*, 2000. 111(1): p. 68-77.
82. Montesinos, P., et al., Tumor lysis syndrome in patients with acute myeloid leukemia: identification of risk factors and development of a predictive model. *Haematologica*, 2008. 93(1): p. 67-74.
83. Sorrow, M.L., et al., Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*, 2005. 106(8): p. 2912-9.
84. Djunic, I., et al., Pretreatment risk factors and importance of comorbidity for overall survival, complete remission, and early death in patients with acute myeloid leukemia. *Hematology*, 2012. 17(2): p. 53-8.
85. Van Lessen, A., SOP AML Durchflusszytometrie Labor Berlin - Charité Vivantes GmbH. 2013: Berlin.
86. Becton Dickinson GmbH Flow Training & Support Center; Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung. Heidelberg; Germany: Becton, D.a.C., 2005.
87. Mrozek, K., N.A. Heerema, and C.D. Bloomfield, Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*, 2004. 18(2): p. 115-36.
88. Satterthwaite, A.B., et al., Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics*, 1992. 12(4): p. 788-94.
89. Sperling, C., et al., Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias. *Haematologica*, 1997. 82(5): p. 617-21.
90. Kurec, A.S. and F.R. Davey, Terminal deoxynucleotidyl transferase. *Hum Pathol*, 1981. 12(10): p. 867-9.
91. Grimwade, D., The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2001. 14(3): p. 497-529.
92. Mrozek, K., Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol*, 2008. 35(4): p. 365-77.
93. Ciolli, S., et al., CD34 expression fails to predict the outcome in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 1993. 78(3): p. 151-5.
94. Chang, H., et al., Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, 2004. 28(1): p. 43-8.

95. Plesa, C., et al., Prognostic value of immunophenotyping in elderly patients with acute myeloid leukemia: a single-institution experience. *Cancer*, 2008. 112(3): p. 572-80.
96. Dang, H., et al., Prognostic value of immunophenotyping and gene mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Hum Pathol*, 2013. 44(1): p. 55-61.
97. Djunic, I., et al., Prognostic significance of CD56 antigen expression in patients with acute myeloid leukemia. *Med Oncol*, 2012. 29(3): p. 2077-82.
98. Raspadori, D., et al., Incidence and prognostic relevance of CD34 expression in acute myeloblastic leukemia: analysis of 141 cases. *Leuk Res*, 1997. 21(7): p. 603-7.
99. Myint, H. and N.P. Lucie, The prognostic significance of the CD34 antigen in acute myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma*, 1992. 7(5-6): p. 425-9.
100. Schabath R et al. Akute und Chronische Leukämien. *Med Welt* 2004; 55: 261–264.
101. Zhu, H.H., et al., CD34 expression on bone marrow blasts is a novel predictor of poor prognosis independent of FLT3-ITD in acute myeloid leukemia with the NPM1-mutation. *Leuk Res*, 2013. 37(6): p. 624-30.
102. Dang, H., et al., CD34 expression predicts an adverse outcome in patients with NPM1-positive acute myeloid leukemia. *Hum Pathol*, 2013. 44(10): p. 2038-46.
103. Care, R.S., et al., Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol*, 2003. 121(5): p. 775-7.
104. Breems, D.A., et al., Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol*, 2008. 26(29): p. 4791-7.
105. Shen, Y., et al., Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2011. 118(20): p. 5593-603.
106. Bene, M.C., et al., Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. *Br J Haematol*, 2001. 113(3): p. 737-45.

107. Venditti, A., et al., Minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): comparison of 25 cases with other French-American-British subtypes. *Blood*, 1997. 89(2): p. 621-9.
108. Cuneo, A., et al., Cytogenetic profile of minimally differentiated (FAB M0) acute myeloid leukemia: correlation with clinicobiologic findings. *Blood*, 1995. 85(12): p. 3688-94.
109. Walter, R.B., et al., Significance of FAB subclassification of "acute myeloid leukemia, NOS" in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood*, 2013. 121(13): p. 2424-31.
110. Dohner, K. and H. Dohner, Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 2008. 93(7): p. 976-82.
111. Mrozek, K., H. Dohner, and C.D. Bloomfield, Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr Opin Hematol*, 2007. 14(2): p. 106-14.
112. Mrozek, K., et al., 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): p. 4515-23.
113. Rollig, C., et al., Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *J Clin Oncol*, 2011. 29(20): p. 2758-65.
114. Alpermann, T., et al., Evaluation of the proposed reporting system of the European LeukemiaNet and recommendations for prognosis of acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, 2013. 37(2): p. 197-200.
115. Radich, J.P., The Biology of CML blast crisis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2007: p. 384-91.
116. Paulsson, K., Genomic heterogeneity in acute leukemia. *Cytogenet Genome Res*, 2013. 139(3): p. 174-80.
117. Ding, L., et al., Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 2012. 481(7382): p. 506-10.
118. Somervaille, T.C., et al., Hierarchical maintenance of MLL myeloid leukemia stem cells employs a transcriptional program shared with embryonic rather than adult stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009. 4(2): p. 129-40.

119. Somervaille, T.C. and M.L. Cleary, Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2006. 10(4): p. 257-68.
120. Berenson, R.J., et al., Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest*, 1988. 81(3): p. 951-5.
121. Terstappen, L.W., et al., Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood*, 1991. 77(6): p. 1218-27.
122. Bhatia, M., et al., Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(10): p. 5320-5.
123. Haase, D., et al., Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations. *Blood*, 1995. 86(8): p. 2906-12.
124. Wang, J.C., Good cells gone bad: the cellular origins of cancer. *Trends Mol Med*, 2010. 16(3): p. 145-51.
125. Sarry, J.E., et al., Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rgammac-deficient mice. *J Clin Invest*. 121(1): p. 384-95.
126. Goardon, N., et al., Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 19(1): p. 138-52.
127. Taussig, D.C., et al., Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood*. 115(10): p. 1976-84.
128. van Rhenen, A., et al., High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(18): p. 6520-7.
129. Guan, Y., B. Gerhard, and D.E. Hogge, Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 2003. 101(8): p. 3142-9.
130. Gentles, A.J., et al., Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA*, 2010. 304(24): p. 2706-15.

131. Stasi, R., et al., Analysis of treatment failure in patients with minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). *Blood*, 1994. 83(6): p. 1619-25.
132. Venditti, A., et al., Minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0): cytochemical, immunophenotypic and cytogenetic analysis of 19 cases. *Br J Haematol*, 1994. 88(4): p. 784-93.

## **Lebenslauf**

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

## **Erklärung an Eides Statt**

„Ich, Tanja Schneider, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Durchflusszytometrischer Reifescore als prognostischer Faktor bei der Akuten Myeloischen 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](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an 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, 12.05.2014

Unterschrift

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. med. Jörg Westermann für die fundierten und eifrigen Diskussionen, seiner Sorgfalt und seiner stetigen Unterstützung, ohne welche die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Dr. med. Anne Flörcken danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft. Ihr unermüdlicher Enthusiasmus wird mir immer ein Vorbild sein.

Ein weiterer herzlicher Dank gilt Herrn Dipl.-Math. Traugott Wierer für seine kompetente Hilfe bei der statistischen Analyse.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des durchflusszytometrischen Labors und der Studienzentrale für die freundliche Zusammenarbeit und Kooperation, doch besonders bei Frau Irene Panzer, Anna Takvorian, Antje van Lessen und Margrit Stodder, welche mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ohne die Unterstützung und den unentwegten Zuspruch meiner Familie und Freunde wäre weder das Studium, noch die Anfertigung dieser Arbeit möglich gewesen.