

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Regensburg
Leitung Prof. Dr. med. Adreesen
Der Fakultät für Medizin
Der Universität Regensburg

Titel der Arbeit

Mikrosatelliteninstabilität bei der AML und deren prognostische Relevanz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von Gerlinde Götz

2011

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Regensburg
Leitung Prof. Dr. med. Adreesen
Der Fakultät für Medizin
Der Universität Regensburg

Titel der Arbeit
Mikrosatelliteninstabilität bei der AML und deren prognostische Relevanz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von Gerlinde Götz

2011

In Liebe an meine Eltern Katharina und Sebastian und an E. Fesl.

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Albrecht Reichle

2. Berichterstatter: PD. Dr. Wolfgang Dietmaier

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2011

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Epidemiologie der Leukämie	2
1.2.	Ätiologie der AML	2
1.3.	Pathogenese der AML	4
1.3.1.	Maligne Transformation	5
1.3.2.	Tumorsuppressorgene und Onkogene	6
1.3.3.	Chromosomale Abberationen	6
1.4.	Diagnostik der AML	7
1.4.1.	Blutbild- und Knochenmarksausstrich	7
1.4.2.	Zytogenetik und Molekulargenetik	9
1.4.3.	Klassifikation der AML nach FAB und WHO	10
1.5.	Therapie der AML	13
1.5.1.	Induktionstherapie	13
1.5.2.	Konsolidierungstherapie	14
1.5.3.	Erhaltungstherapie	15
1.5.4.	Hämatopoetische Stammzelltransplantation	15
1.6.	Prognostische Faktoren bei AML	18
1.7.	Molekularbiologie	20
1.7.1.	Mikrosatelliten und ihre Veränderungen	20
1.7.2.	Nachweis von molekularen Veränderungen	22
1.8.	MSI und LOH bei hämatologischen Erkrankungen	23
1.9.	Ziel der vorliegenden Arbeit	25
2.	Material und Methoden	27
2.1.	Probengewinnung humaner Zellen	27
2.1.1.	Herstellung von Objektträgern mit Blasten aus Knochenmarkspunkttaten von AML-Patienten	27
2.1.2.	Herstellung von Referenzzellen	28
2.1.3.	Patientenaufklärung, Ethikkommission	30
2.2.	Methoden	31
2.2.1.	Leukapherese	31
2.2.2.	Dichtegradientenzentrifugation der apheresierten Zellen mittels Ficoll Hypaque	32
2.2.3.	Zellaufreinigung der mononukleären Zellen	34
2.2.4.	Quantitative und qualitative Erfassung der CD34-Zellen	36
2.2.5.	DNA-Isolierung aus den CD34-negativen Zellen	38
2.2.6.	DNA-Isolierung aus Wangenschleimhautepithelzellen	40
2.2.7.	DNA-Isolierung aus Zellen von gefärbten Objektträgern	40
2.2.8.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
2.2.9.	Panel ausgesuchter Primer	43
2.2.10.	Detektion von Mikrosatelliteninstabilitäten (LOH, MSI) mittels ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer	45
2.3.	Eingesetzte Gerätschaften, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Chemikalien	52
2.4.	Statistische Methoden	55

3.	Ergebnisse	56
3.1.	Untersuchung des Referenzmaterials (Plattenepithelzellen der Wangenschleimhaut, Zellen der CD34-negativen Zellfraktion aus Leukapheresenprodukten, Zellen von Ausstrichen aus Knochenmarksbröckel) auf genetische Instabilität	56
3.2.	Untersuchungen bezüglich genetischer Instabilität in Blasten aus Knochenmarkausstrichen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer akuten myeloischen Leukämie	64
3.3.	Rezidivhäufigkeit eines AML in Abhängigkeit von Genabberationen (LOH oder MSI) an bestimmten Genlokalisierungen	74
3.3.1.	AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 7q31-1 (Primerpanel D7S486)	74
3.3.2.	AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 7q22-31.1 (Primerpanel D7S525)	75
3.3.3.	AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 8q22 (Primerpanel D8S559)	76
3.3.4.	AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 17p12-13.1 (Primerpanel TP53ALS)	77
3.3.5.	AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 11q23 (Primerpanel D11S1356)	78
3.3.6.	AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 2p16 (Primerpanel D2S123)	79
3.3.7.	AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 5q21-22 (Primerpanel APC)	80
3.3.8.	AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 17q11.2-12 (Primerpanel MDF15)	81
3.4.	Follow up-Untersuchung	82
3.4.1.	Klinische Parameter	82
3.4.2.	Genetische Instabilität in AML-Blasten bei Erstdiagnose in Relation zum Alter, LDH-Wert, Zytogenetik (Karyotyp) und sekundärer AML bei Follow up	84
3.4.3.	Analyse des rezidivfreien Überlebens bei 79 Patienten mit primärer und sekundärer AML	85
3.4.3.1.	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Patientenalter	85
3.4.3.2.	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom LDH-Wert	86
3.4.3.3.	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Karyotyp (Zytogenetik) ..	87
3.4.3.4.	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der genetischen Instabilität in AML-Blasten bei AML-Erstdiagnose	88
3.4.3.5.	Rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit vom AML-Typ	89
3.4.4.	Analyse des rezidivfreien Überlebens bei 65 Patienten mit primärer AML Regressionsanalysen	90
3.5.	Regressionsanalysen	91
4.	Diskussion	93
5.	Zusammenfassung	106

6.	Literaturverzeichnis	108
7.	Lebenslauf	120
8.	Danksagung	122
9.	Erklärung	123

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AML-CFU	AML Colony Forming Units
CD	Cluster of Differentiation
CR	complete remission (komplette Remission)
diff.	differenziert(es)
DN-AML	De Novo-AML
DLI	Donor Lymphozyten Infusion
FSC	Forward Angle Light Scatter
GIN	Genetische Instabilität
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen DR
HSC	hematopoetic stem cells (hämatopoetische Stammzellen)
IL-2	Interleukin-2
KG	Körpergewicht
KMT	Knochenmarktransplantation
LOH	Loss of Heterozygosity
MDS	Myelodysplasie
MNC	mononuclear cells (mononukleäre Zellen)
MRD	Minimal Residual Disease
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NHL	Non Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBSZT	peripheren Blutstammzelltransplantation
PCR	Polymerasekettenreaktion
sAML	sekundäre Akute Myeloische Leukämie
s.c.	subkutan
SSC	Side Scatter
tAML	therapy-related-AML

1. Einleitung

Leukämien werden unterteilt in akute und chronische Erkrankungen des blutbildenden Systems, wobei dies bereits eine Beschreibung über den Verlauf der Erkrankung ist. Morphologisch wird zwischen der „myeloischen“ und der „lymphatischen“ Leukämie differenziert. Geprägt wurde der griechische Begriff „Leukämie“ („weißes Blut“) von dem bekannten Pathologen Rudolf Virchow (1821-1902) bei der Beschreibung der chronischen myeloischen Leukämie in einer Publikation aus dem Jahre 1845 [Virchow 1845].

Die Hämatopoese, das heißt die Bildung neuer Blutzellen, findet beim gesunden erwachsenen Menschen im Knochenmark statt. Aus pluripotenten Stammzellen differenzieren sich die myeloischen und lymphozytischen Zellreihen, die roten Blutzellen und die plättchenbildenden Megakaryozyten. Bei der Leukämieentstehung ist die physiologische Wachstumsregulation bzw. die normale Kontrolle des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung in der entsprechenden hämatopoetischen Zellreihe gestört. Ursachen sind erworbene zytogenetische bzw. molekulargenetische Aberrationen. Auf Grundlage dieser erworbenen genetischen Veränderungen kommt es zur neoplastischen Transformation, verbunden mit veränderten Proliferationsverhalten und aberranter Differenzierung von Leukämiestammzellen.

Bei der akuten Leukämie, wie der akuten myeloischen Leukämie (AML), steht die oft rasche abnorme Proliferation im Vordergrund. Die leukämischen Blasten verdrängen im Knochenmark die normale Hämatopoese. Das rasche verdrängende Wachstum führt zu einer schweren Knochenmarksinsuffizienz mit Beteiligung aller Zellreihen. Klinische Zeichen sind Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie. Daraus folgt eine gesteigerte Infektanfälligkeit, eine Blutungsneigung und eine zunehmende körperliche Schwäche [Schütz et al. 2005].

Zusätzlich werden eventuell extramedulläre Organe infiltriert, z.B. das Zahnfleisch (Gingivahyperplasie), Haut oder Knochen (Schmerzsyndrome). In ca. 85% der AML werden Leukämiezellen ins Blut ausgeschwemmt.

1.1. Epidemiologie der Leukämie

Nach Angaben des Robert Koch Instituts [2008] erkranken jährlich etwa 9.100 Menschen in Deutschland an Leukämien (Männer: 4.800; Frauen 4.300). Das bedeutet für beide Geschlechter jeweils 2,1% aller Krebsneuerkrankungen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter für Leukämien liegt bei Männern bei 67 Jahren und bei Frauen bei 70 Jahren. Hierbei ist jedoch zwischen den verschiedenen Leukämieformen zu differenzieren. Während chronische Leukämieformen im Erwachsenenalter vorkommen, stellen akute lymphatische Leukämien (ALL) die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter dar. Unter den Krebsarten bei Kindern finden sich in 34,1% Leukämien. Unter diesen dominiert bei Kindern wiederum mit 80% die „akute lymphatische Leukämie“ (ALL), während bei den Leukämiefällen im Erwachsenenalter die akute myeloische Leukämie (AML) 80% der Erkrankungen repräsentiert. Insgesamt treten Leukämien in Deutschland jährlich beim männlichen Geschlecht mit einer Inzidenz von ca. 10/100.000 Einwohner und beim weiblichen Geschlecht bei etwa 6/100.000 Einwohnern auf. Die Inzidenz nimmt mit dem Lebensalter erheblich zu. Sie erreicht ihre höchsten Werte in beiden Geschlechtergruppen ab dem 70. Lebensjahr (60-65/100.000 für Männer; 28-60/100.000 bei Frauen) [Robert Koch Institut 2008].

1.2. Ätiologie der AML

Die Entstehung einer AML gilt als ein Stufenprozess. Eine Vielzahl genetischer Veränderungen in den Blutstammzellen gilt als ursächlich [Estey 2008]. Eine Reihe von Faktoren können dabei als prädisponierend erachtet werden, wobei die Ätiologie durch eine gestörte Zelldifferenzierung und Zellausreifung charakterisiert ist.

Für die AML gelten bestimmte Noxen als Risikofaktoren, welche die hämatologischen Progenitorzellen schädigen können. Eine Reihe von Chemikalien wie Benzol, Äthylenoxide, Pestizide, etc. werden bei dauerhafter Exposition mit einem erhöhten Leukämierisiko in Verbindung gebracht. Zytostatika, unter denen Alkylanzien und Topoisomerase-Hemmer II hervorzuheben sind, gelten ebenfalls als Ursachen für die AML. In

diesen Fällen wird die Erkrankung auch als „therapy-related-AML“ (tAML) bezeichnet [Christiansen 2001].

Seit dem Atombombenabwurf auf Hiroshima und Nagasaki liegt auch der Nachweis für einen Zusammenhang zwischen radioaktiver Strahlung und Leukämien vor. In Hiroshima war die Inzidenz der AML erheblich über die vor dem Abwurf vorhandene Inzidenz angestiegen [Preston et al. 1994]. Medizinisch indizierte Anwendung von Strahlen, z.B. bei der Tumorthерапie oder nach therapeutischen Gaben von Radionukliden (P^{32} bei Polyzythämia Vera), können ebenfalls zur Leukämientstehung beitragen [Najean et al. 1998].

Die AML wird entsprechend ihrer Ätiologie in die „de novo-AML“ (DN-AML) mit ungeklärter Ätiologie, kurzem schwerem Verlauf und ohne Prodromalstadium sowie in die „sekundäre akute myeloische Leukämie“ (sAML) unterteilt. Die sekundäre AML beschreibt jene AML-Fälle, die aus einer vorangegangenen Myelodysplasie (MDS) entstanden ist. Sie tritt zumeist im höheren Erwachsenenalter auf oder ist therapieassoziiert (tAML) und damit als Folge der zytotoxischen Behandlung einer vorausgegangenen malignen Erkrankung zu sehen.

Im Gegensatz zur DN-AML kann die sAML nur unzureichend mittels der Kriterien der French-American-British Cooperative Group (FAB-Kriterien) [Bennett et al. 1985] klassifiziert werden. Häufig liegt der sAML eine schlechtere Prognose zugrunde, zumal von ihr überwiegend ältere Patienten betroffen sind [Michels et al. 1985].

In seltenen Fällen, sind AML-Erkrankungen auf eine genetische Prädisposition zurückzuführen. Dabei führen eine Reihe angeborener genetischer Veränderungen und hämatologischer Erkrankungen zu einem erhöhten AML-Erkrankungsrisiko. Als Beispiele können eine autosomal rezessiv vererbte Monosomie 7 mit konsekutiver MDS-Entstehung und Übergang in eine AML angeführt werden [Shannon et al. 1992]. Auch Erkrankungen wie die Trisomie 21 [Kurkjian et al. 2006], die Fanconie-Anämie [Cioc et al. 2010], das Li-Fraumeni-, das Klinefelter-, das Pateau-, das Schwachman-, das Kostman-Syndrom [Deschler und Lübbert 2008] sind mit einem erhöhten AML-Risiko assoziiert.

1.3. Pathogenese der AML

Die Regulation der normalen Blutbildung geschieht durch ein Netzwerk von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, welche die Zelldifferenzierung aktivieren und steuern. Veränderungen von Genen, welche diese Wachstums- und Transkriptionsfaktoren kodieren, entstehen entweder durch mikroskopisch erkennbare chromosomale Veränderungen in den Zellen oder durch submikroskopische molekulargenetische Veränderungen in der DNA oder RNA.

Bei der Entstehung einer AML kommt es zu einer Anhäufung funktionell unreifer Blasten, die nicht mehr in der Lage sind normal zu differenzieren. Obwohl leukämische (LCS) und reguläre hämatopoetische Stammzellen (HSC) übereinstimmend bestimmte Oberflächenmarker zeigen (CD34, CD38, HLA-DR, CD71), werden die Marker CD90 bzw. Thy-1 [Blair et al. 1997] auf LCS nicht exprimiert. LCS sind zudem häufig CD34-positiv, jedoch CD71- und HLA-DR-negativ [Blair et al. 1998]. Auch weisen LCS kein c-kit (CD117) auf [Blair und Sutherland 2000]. Die IL-3-Rezeptor- α -Kette jedoch scheint ein typischer Marker für humane AML-LCS zu sein [Jordan et al. 2000].

Zwei Hypothesen bieten sich derzeit als Erklärung für die Heterogenität der AML-LCS an. Die ältere von beiden [Griffin und Lowenberg 1986] geht davon aus, dass während der Hämatopoiese verschiedene Vorläuferzellen anfällig für Transformationen sind. In Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium der transformierten Zelle resultierten dann verschiedene leukämische Stammzellen mit unterschiedlichen Charakteristika, die in der Lage sind, sich weiter zu differenzieren. Das aktuellere Modell [Bonnet und Dick 1997] nimmt hingegen an, dass für die Transformation und Progression hin zur Leukämie verantwortlichen Mutationen bzw. Translokationen ausschließlich auf der Ebene der humanen Stammzelle stattfinden. Demnach ist nur noch eine kleine Minderheit der proliferativen leukämischen Blasten in der Lage, sich zu kolonieformende Zellen (AML-CFU) fortzuentwickeln und der eigentlich wirksame leukämische Klon der AML entwickelt sich aus einer selten auftretenden leukämischen Stammzelle, die eine extensive Proliferationskapazität aufweist [Bonnet 2005].

1.3.1. Maligne Transformation

Die Tumorgenese wird mittlerweile als ein schrittweise ablaufender Prozess verstanden, in dessen Rahmen eine gesunde Körperzelle allmählich in eine maligne, autonom proliferierende Zelle umgewandelt wird. Die entstehenden genetischen Aberrationen werden an die Tochterzellen weitergegeben, so dass ein Klon genetisch veränderter Zellen entsteht. Es handelt sich bei dieser Entwicklung um eine Akkumulation molekulargenetischer Veränderungen, wobei der Aktivierung von dominant wirkenden Proto-Onkogenen bzw. der Inaktivierung von rezessiven Tumorsuppressorgenen besonderer Stellenwert zukommt. Dieses Modell wird nach Vogelstein und Kinzler [1993] als „multistep“-Theorie bezeichnet. Dieser Mehrstufenprozess, der eine mehrfache Mutation erfordert, zeigt sich auch bei der AML. So reicht das häufig nachgewiesene Fusionsgen PML-RAR alleine nicht zur Auslösung einer AML aus [Minucci et al. 2002], sondern es müssen zusätzliche genetische oder epigenetische Ereignisse eintreten. Zu diesen Aktivierungsmechanismen gehören Translokationen, Punktmutationen und Amplifikationen. Jedoch spielen auch solche Genveränderungen eine wichtige Rolle, die durch konventionelle Chromosomenanalyse nicht detektierbar sind.

Das initiale Ereignis der Leukämogenese ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, jedoch könnte das Auftreten einer genetischen Instabilität wie „Loss of Heterozygosity“ (LOH) oder „Mikrosatelliteninstabilität“ (MSI), die schon bei kolorektalen Karzinomen nachgewiesen wurden [Kambara et al. 2001, Thibodeau et al. 1993], verantwortlich sein. Die Übersichtsarbeit von Lengauer et al. [1998] zeigen beispielsweise die Gene ATM, ATR, BRCA1, BRCA2 und p53 eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Translokationen, die auf diese Weise zu einer chromosomalen Instabilität führen können.

Molekulargenetische Untersuchungen von Schoch et al. [2002a] an AML-Zellen konnten zeigen, dass diese Zellen ein verändertes Genexpressionsmuster aufweisen. Durch diese veränderten Expressionsmuster werden Proteine, welche den Zellzyklus beeinflussten, in veränderter Form exprimiert, wodurch die Regulation des Zellzyklus fehlerhaft abläuft. Daraus lässt sich ableiten, dass es durch diese Abweichungen zu Veränderungen der Zelldifferenzierung bzw. zur Entstehung von funktionslosen Zellen kommen kann, die sich sowohl durch ein gesteigertes Proliferationspotential als auch durch ein erhöhtes Überlebenspotential auszeichnen können.

1.3.2. Tumorsuppressorgene und Onkogene

Bei der Entstehung einer Leukämie kommt es zu spezifischen Veränderung der Gentranskription. Die betroffenen Gene werden unterteilt in Tumorsuppressorgene und Proto-Onkogene. Nach Knudson [1993] spielen chromosomale Translokationen, die wiederum zelluläre Proto-Onkogene aktivieren, eine besonders wichtige Rolle primär bei der Entstehung von Leukämien und einigen wenigen anderen Tumorarten (Ewing Sarkom, alveoläres Rhabdomyosarkom).

Tumorsuppressorgene kontrollieren die Zellproliferation, während die Proto-Onkogene als Wachstumsfaktoren wirken. Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen. Durch genetische Veränderungen kommt es zu einer Umwandlung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen und zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Folglich wird die normale Zellregulation gestört und es kommt zu einer unkontrollierten autonomen Expansion maligner Zellen. Da die genaue Lokalisation einiger dieser Gene bekannt ist, können einzelne Genveränderungen molekulargenetisch nachgewiesen werden. Beispiele für Tumorsuppressorgene sind das p53 Gen (17p13), das Rb-Gen (13q24), das APC-Gen (5q21) und das WT1-Gen (11p13). Als Proto-Onkogene fungieren das MYC-Gen (8q24), das ABL-Gen (9q34), das BCL6-Gen (3q27) und das BCL2-Gen (18q21).

1.3.3. Chromosomale Aberrationen

Numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen sind bei zwei Dritteln der AML-Blasten zu beobachten. Man differenziert balancierte (Translokation, Inversion) und unbalancierten Aberrationen (Gewinn oder Verlust von Genen). Durch die Translokationen entstehen Fusionsgene, welche meist für bestimmte Transkriptionsfaktoren kodieren oder welche die Signaltransduktion in der Zelle beeinflussen. Eine besondere Rolle bei der AML-Entstehung spielen das AML-1/ETO- und das PML-RARa-Gen [Yuan et al. 2001]. Diese entstehen durch balancierte Translokationen zwischen den Chromosomen 8 und 21 bzw. 15 und 17. PML-RARa stellt das typische

Fusionsgen bei der Promyelozyten-Leukämie dar. Das onkogen wirkende Fusionsgen CBF β /MYH11 entsteht durch eine Inversion des Chromosoms 16.

Charakteristisch für eine unbalanzierte Abberation ist der Gewinn oder der Verlust von chromosomal Material. Diese findet sich bei AML häufig. In Studien wurde gezeigt, dass insbesondere bei der AML Genverluste mit komplex aberrantem Karyotyp dominieren, wobei diese mit einer besonder schlechten Prognose verbunden sind [Schoch et al. 2001a].

1.4. Diagnostik der AML

Für die Diagnosestellung und die Einschätzung des therapieassoziierten Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko einer AML werden genaue zytogenetische, molekularbiologische und immunphänotypische Klassifizierungen benötigt (siehe Kap. 1.4.1. und 1.4.2.). Diese führt zu einer Klassifikation der AML nach FAB bzw. WHO (siehe Kap. 1.4.3.).

1.4.1. Blutbild- und Knochenmarksausstrich

Die Zytologie bzw. die Zytomorphologie stellt die Grundlage in der AML-Diagnostik dar. Die Zellidentifizierung erfolgt mittels panoptisch gefärbten Blut- und Knochenmarksausstrichen. Die Diagnose "Leukämie" wird bei einem Blastenanteil an allen kernhaltigen Zellen von 30% (FAB-Klassifikation) bzw. über 20% (WHO-Klassifikation) gestellt. Die Zuordnung zur myeloischen Reihe erfolgt durch den Nachweis von Auerstäbchen und azuropphiler Granula. Durch nachfolgende zytochemischen Untersuchungen wie der POX- (Myeloperoxidasereaktion), der Esterase- (α -Naphthylacetatesterase-Reaktion) sowie der PAS-Reaktion erfolgt die Zuordnung zu den jeweiligen Subtypen der FAB-Klassifikation (s. Tabelle 1).

Sub-typ	Morphologie	Peroxidase	Esterase	Häufigkeit
M0	blastär-undifferenziert	-	-	3%
M1	myeloblastär-undifferenziert	+/-	+/-	20%
M2	myeloblastär-differenziert	+++	+/-	25%
M3	promyelozytär-hypergranulär	+++	-	10%
M3 v	promyelozytär-mikrogranulär			
M4	Myelomonozytär	+	+++	20%
M4 Eo	myelomonozytär mit pathologischen Eosinophilen	+	+++	
M5 a	Monoblastär	-	+++	20%
M5 b	promonozytär-monozytär	-	+++	
M6	erythroblastär-myeloblastär	+/-	-	5%
M7	Megakaryoblastär	-	+/-	5%

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie mit morphologischer Differenzierung und korrespondierenden Enzymreaktionen [Sauer und Wilmanns 1985]; - = negativ; +/++ = positiv/stark positiv

Durch eine Immunphänotypisierung ist es möglich, eine atypische Antigenexpression auf einzelnen AML-Subtypen zu erfassen (s. Tabelle 2), was für das Bestimmen von minimaler Resterkrankung bedeutsam sein kann.

AML-Subgruppen	typische Proteinmarker
M0	CD34, CD33, CD13
M1	CD34, CD33, CD13
M2	CD34, CD33, CD15, CD13
M3	CD33, CD13, (HLA-DR-)
M4	CD34, CD33, CD15, CD14, CD13
M5	CD33, CD15, CD14, CD13
M6	CD33, Glykophorin
M7	CD33, CD41

Tabelle 2: Darstellung unterschiedlicher Oberflächen-/ Proteinmarker (CD = Cluster of Differentiation) in den FAB-Subgruppen der AML [Cheson et al. 1990]

Man verwendet bei diesem Analyseverfahren die Durchflusszytometrie. Durch ein Panel aus monoklonalen Antikörpern werden die CD-Antigene („cluster of differentiation“) auf der Leukozytenoberfläche detektiert. Dieses Verfahren ist von erheblicher Bedeutung in jenen Fällen, bei denen eine eindeutige Zuordnung der

Tumorlinie mittels konventioneller Zytologie schwierig ist (z.B. bei AML-Subtyp M0 oder M7). Die Einordnung erfolgt anhand der international gültigen CD-Nomenklatur nach Jones et al. [2002]. Immunologische Untersuchungen werden auch beim Minimal Residual Disease (MRD)-Monitoring verwendet. Mittels Durchflusszytometrie und Antikörperpanels lassen sich leukämieassoziierte abberante immunologische Phänotypen auch nach bereits durchgeföhrter Therapie detektieren [Kern et al. 2004]. Somit stellt die Immunphänotypisierung ein verlässliches Werkzeug für die Prognoseabschätzung der vorliegenden Erkrankung dar und erlaubt eine individuelle Modifikation der Therapie [Feller et al. 2004].

1.4.2. Zytogenetik und Molekulargenetik

Die konventionelle Zytogenetik dient der Darstellung der einzelnen Bandenmuster der Chromosomen mittels spezieller Bänderungs- und Färbetechniken. Für die Chromosomenänderungsanalyse werden sich teilende Zellen in der Metaphase durch ein Spindelgift arretiert, die Chromosomen angefärbt und nach Größe, Anfärbbarkeit und Lage des Zentromers in einem so genannten Karyogramm angeordnet. Obligatorisch erfolgt die Chromosomenanalyse der veränderten Zellen nach den seit 1991 bestehenden „Guidelines for Cancer Cytogenetics“ bezüglich der aufgetretenen Aberrationen (Translokationen, Inversionen, Deletionen, Trisomien, usw.). Die festgestellten, leukämieassoziierten Veränderungen der Blasten sind meist erworben und bei etwa 55% der neu diagnostizierten erwachsenen Patienten auffindbar [Mrozek et al. 2004]. Die Diagnosesicherung steht bei der Zytogenetik weniger im Vordergrund, sondern die Bestimmung des Karyotyps, da dieser eine Aussage über die Prognose des Patienten zulässt und somit einen wichtigen Verlaufsparameter darstellt [Grimwade et al. 1998, Byrd et al. 2002, Schoch et al. 2003].

Molekulargenetische Untersuchungen der Patienten sind deshalb erforderlich, weil ein beträchtlicher Teil der Chromosomen- und vor allem der Genaberrationen mit den klassischen Analysemethoden nicht darstellbar ist. Die Molekulargenetik kann zusätzlich für die Charakterisierung der AML eingesetzt werden. Dies ist besonders bei zytogenetisch unauffälligem Karyotyp bedeutsam. Mit Hilfe von wie der Polymerase-

Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, bestimmte Fusionstranskripte, die durch balancierte Veränderungen entstehen, nachzuweisen. Ebenso möglich ist es, durch die Untersuchungen von Mikrosatelliten genetische Instabilitäten (MSI und LOH) in den hämatologischen Zellen zu detektieren. Auf diese Weise können jene Gene entschlüsselt werden, die die physiologischen Vorgänge in der Zelle regulieren.

1.4.3. Klassifikation der AML nach FAB und WHO

Seit dem Jahre 1976 erfolgt die morphologische und zytologisch/zytochemische Einteilung der AML anhand der FAB-Klassifikation [Bennett et al. 1976]. Sie wurde von einer Gruppe von Hämatologen bzw. Hämatopathologen aus Frankreich, den USA und England entwickelt und eingeführt. Grundlage ist der panoptisch gefärbte Blutaussstrich. Die Diagnose Leukämie wird bei einem Blastenanteil von $\geq 30\%$ aller kernhaltigen Zellen gestellt. Die Zuordnung zur myeloischen Reihe erfolgt durch den Nachweis von Auerstäbchen und von azuropheilen Granula. Mit diesen Subtypen werden bestimmte klinische Erscheinungsformen und charakteristische Befunde verbunden (s. Tabelle 3a-b). Bezieht man sich ausschließlich auf die Befunde der Zytogenetik, können drei Hauptgruppen der AML differenziert werden:

1) AML mit balanzierten Translokationen:

Sie ist häufig bei jüngeren Patienten nachweisbar (z.B. AML1/ETO, CBF β /MYH11 oder PML/RAR- α). Meist handelt sich um Transkriptionsfaktoren der normalen Hämatopoiese [Haferlach et al. 2003].

2) AML mit unbalanzierten Veränderungen:

Verlust oder Zugewinn von genetischen Material (z.B. Monosomien, Deletionen oder komplexe Karyotypveränderungen), häufig bei älteren Patienten auffindbar. Diese Form ist der sekundären bzw. therapieassoziierten AML-Form pathogenetisch ähnlich.

3) AML ohne detektierbare zytogenetische Veränderung und ohne Altersprävalenz:

Bei dieser Gruppe ermöglicht die Molekulargenetik eine entsprechende Charakterisierung. Bei über 50% dieser Fälle konnten Genmutationen bei FLT3, MLL, (fms-like tyrosine kinase, mixed lineage leukemia) N-RAS und C-KIT festgestellt werden.

FAB-Subtyp	WHO-Nomenklatur	morphologische Definition des Subtyps (FAB \geq 30% Blasten; WHO \geq 20% Blasten)
M0	AML mit minimaler Differenzierung	<ul style="list-style-type: none"> - Anteil MPO-positiver Blasten von < 3% und - Nachweis myeloischer (CD13, CD33, CD117) bzw. monozytärer (CD14) Antigene mittels Durchflusszytometrie und/oder - immunologischer Nachweis von MPO und/oder - elektronenmikroskopischer Nachweis von MPO
M1	AML ohne Ausreifung	<ul style="list-style-type: none"> - 90% Blasten, davon \geq 3% MPO-positiv und - ausreifende Granulopoese (Promyelozyten bis Segmentkernige) mit oder ohne Monozytenanteil von \leq 10%
M2	AML mit Ausreifung bzw. mit t(8;21) (AML1/ETO)	<ul style="list-style-type: none"> - maximal 89% Blasten, davon \geq 3% MPO-positiv und - ausreifende Granulopoese (Promyelozyten bis Segmentkernige) mit oder ohne Monozytenanteil von \geq 10% (aber monozytäre Population von < 20%)
M3	akute Promyelozytenleukämie	<ul style="list-style-type: none"> leukämische Population aus Blasten und abnormen, hypergranulierten Promyelozyten, davon \geq 3% MPO-positiv
M3v	AML mit t(15;17) (PML/RAR α)	<ul style="list-style-type: none"> - wie M3, jedoch Promyelozyten mit feineren Granula bzw. agranulär - auffällige, lobulierte Kernformen
M4	akute myelomonzytäre Leukämie	<ul style="list-style-type: none"> - granulozytäre Komponente (Myeloblasten bis Segmentkernige) von \geq 20% der nicht erythrozytären positiven Zellen (NEZ) und - signifikante (\geq 20%ige) monozytäre Komponente (Monoblasten, Promonozyten bis Monozyten im Knochenmark/KM: \geq 20% der NEZ-positiven) Zellen; und Monozyten im peripheren Blut von $\geq 5 \times 10^9/l$ oder - Monoblasten, Promonozyten bis Monozyten im KM: \geq 20% der NEZ-positiven Zellen und α-Naphthylacetatesterase/ANAE-Positivität oder erhöhte Konzentration an Lysozym im Urin oder Serum oder - Markbefund wie bei M2 und $\geq 5 \times 10^9$ Monozyten/l im peripheren Blut und ANAE-Positivität oder erhöhte Konzentration an Lysozym in Urin oder Serum

Tabelle 3a: Einteilung und Definition der AML nach der FAB- und der WHO-Klassifikation [nach Bennett et al. 1976, Bennett et al. 1985, Bennet et al. 1991, Zipursky 1994, Zipursky 1999] - Teil I

FAB-Subtyp	WHO-Nomenklatur	morphologische Definition des Subtyps (FAB \geq 30% Blasten; WHO \geq 20% Blasten)
M4Eo	AML mit inv16 oder t(16;16) (CBF β /MYH11)	wie M4, jedoch zusätzlich Nachweis von > 5% atypischer Eosinophiler im Knochenmark
M5A	akute Monoblastenleukämie	monozytäre Komponente im Knochenmark von \geq 80% der NEZ-positiven Zellen, davon \geq 80% Monoblasten, < 20% MPO-positive Zellen und > 80% unspezifische esterasepositive Zellen
M5B	akute Monozytenleukämie	monozytäre Komponente im Knochenmark von \geq 80% der NEZ-positiven Zellen, davon < 80% Monoblasten
M6	akute Erythroleukämie	- Erythropoese von \geq 50% der nukleären Zellen im Knochenmark und - Blastenanteil von \geq 30% (bzw. \geq 20%) der NEZ-positiven Zellen (AML M6A) - Erythroblastenanteil \geq 80% (reine Erythroleukämie, AML M6B)
M7	akute Megakaryoblastenleukämie	- Megakaryoblasten MPO-negativ - immunologischer Nachweis von Plättchenglycoproteinen (CD41, CD61) - elektronenmikroskopische Untersuchung auf MPO bzw. der Ultrastruktur - WHO-Klassifikation: \geq 50% der leukämischen Blasten müssen der megakaryozytären Linie zuzuordnen sein

Tabelle 3b: Einteilung und Definition der AML nach der FAB- und der WHO-Klassifikation [nach Bennett et al. 1976, Bennett et al. 1985, Bennet et al. 1991, Zipursky 1994, Zipursky 1999] - Teil II

Die häufigste numerische Chromosomenabberation bei AML ist die Abberation "+8", während die häufigste strukturelle Chromosomenabberation bei AML "t(8;21)" ist. Die Abberation "t(15;17)" ist spezifisch für eine Promyelozytenleukämie.

1.5. Therapie der AML

Eine Polychemotherapie ist bisher das wirksamste Instrument zur Bekämpfung der Leukämie. Dabei wird zwischen einer Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie unterschieden. Bereits Mayer et al. [1987] konnten nachweisen, dass nach einer alleinigen Induktionstherapie mit Antrazyklinen und Cytosinarabinosid, die zu einer kompletten Remission führte, bereits nach 12 Monaten ein Rezidiv eintritt. Aus diesem Grund ist eine Postremissionstherapie zur Verbesserung des leukämiefreien Überlebens unverzichtbar.

Zum besseren Verständnis der nachfolgenden therapeutischen Verfahren soll noch ein kurzer Überblick über die Definition des Begriffes einer "kompletten Remission" (CR) erfolgen. Es werden vier Kriterien für die Beurteilung der CR herangezogen [Cheson et al. 1990]:

- 1) lichtmikroskopisch weniger als 5% Blasten ohne nachweisbare Auer-Stäbchen in einer Knochenmarksprobe mit über 20% Zellularität und Reifung aller hämatopoetischer Zelllinien.
- 2) kein Vorliegen einer extramedullären Leukämie
- 3) keine leukämische Blasten im peripheren Blut
- 4) Neutrophile $> 1,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ und Thrombozyten $> 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ im peripheren Blut

Anzumerken ist, dass sich bei einer morphologischen CR lichtmikroskopisch zwar keine leukämischen Blasten mehr nachweisen lassen, jedoch ist deren Zahl bei Diagnosestellung (10^{12} - 10^{13}) durch eine Induktionstherapie in der Regel nur auf Werte von 10^8 - 10^9 reduzierbar. Somit wäre ein Rezidiv ohne Postremissionstherapie unvermeidlich.

1.5.1. Induktionstherapie

Um so rasch wie möglich eine CR zu erreichen, werden ein bis zwei knochenmarksaplasieinduzierende Chemotherapien verabreicht. Aus der vorübergehenden Aplasie des Knochenmarks heraus soll es idealerweise zur Rekonstitution der normalen Häma-

topoese aus Stammzellen kommen. Die Induktionstherapie wird bei allen Formen der AML und in Abwandlung bei der AML M3/M3v wie folgt vorgenommen.

Eine Doppelinduktion erfolgt mit einem TAD (Thioguanin, ARA-C, Daunorubicin)/HAM-Regime hochdosiert (ARA-C, Mitoxantron), wodurch 60-75% der erwachsenen Patienten eine CR erreichen. Die 5-Jahresrezidivfreiheit beträgt 30-40% und hängt vom zytogenetisch/molekulargenetischen Typ der akuten Leukämie sowie dem Patientenalter ab. Als prognostisch ungünstig gilt ein frühes Rezidiv innerhalb des ersten Jahres nach Therapiebeginn [Herold et al. 2004].

Bei der Promyelozyten-Leukämie (AML M3), die durch eine Translokation zwischen Chromosom 15 und 17 (Fusionsgen PML-RAR α) charakterisiert ist, und die zu einer Hemmung der retininsäureinduzierte Gentranskription und Zelldifferenzierung führt, erfolgt die Induktionstherapie mit all-trans-Retinolsäure (ATRA). Dies dient dem Versuch, der gehemmten Zellausdifferenzierung entgegenzusteuern. In Kombination mit einer Chemotherapie führt die ATRA-Therapie zu einer Langzeitremission in über 80% der Fälle [Lengfelder et all 2000]. Erfolgreich zum Einsatz kommt bei der AML M3 auch die ATRA-Therapie kombiniert mit Arsentrioxid [Powell et al. 2010].

1.5.2. Konsolidierungstherapie

Um möglichst alle residuellen Leukämie-Blasten zu eliminieren, wird die Induktionstherapie und Postremissionstherapie in Abhängigkeit vom Karyotyp, dem Alter und der Klinik des Patienten stratifiziert. Auf die Induktionstherapie folgt eine konventionelle Chemotherapie mit TAD oder hochdosiertem Ara-C. Als Konsolidationstherapie in der Postremission kann eine Hochdosischemotherapie, gefolgt von autologer oder allogener Stammzelltransplantation angeschlossen werden. Die allogene Transplantation spielt vor allem bei zytogenetisch oder molekulargenetisch definierten Risikopatienten eine zentrale Rolle.

1.5.3. Erhaltungstherapie

Standardmäßig wird eine remissionserhaltende Weiterführung der Chemotherapie und eine intensive supportive Therapie vorgenommen. Diese besteht aus dem prophylaktischen Einsatz von Antibiotika oder dem Verabreichen von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF) im Rahmen von klinischen Studien, um die Frühmortalität der Patienten zu reduzieren [Büchner et al. 1995]. Als immunologische Erhaltungstherapie kann Interleukin-2 (IL-2) eingesetzt werden. Durch IL-2 wird der Graft-versus-Leukemia-Effekt nachgeahmt. Eventuell kann der Einsatz des Cyclosporinabkömlings PSC833 erfolgen, um den Effekt der MDR-1 (Multitrugresistance-1) Gen-Expression bei rezidivierten Patienten zu reduzieren [Kornblau et al. 1997]. Jedoch haben sich weder die IL-2 Therapie noch die Therapie zur Überwindung der Multidrugresistance bisher etablieren können.

1.5.4. Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die Grundlagen der heutigen Stammzelltransplantation (SZT) setzte Dr. E. Donnall Thomas, Medizinnobelpreisträger des Jahres 1990. Bereits im Jahre 1957 transplantierte er Knochenmark bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen nach bereits erfolgter Chemo- und Radiotherapie [Thomas et al. 1957]. Heute wird die Indikation für die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) in großen Umfang gestellt. Im hämatologischen Bereich betreffen sie Myelome, Non-Hodgkin-Lymphome, akute Leukämien oder aplastische Anämien [Rodewald und Friedrich 2002]. Die Stammzelltransplantation erfolgt nach einer intensivierten Konsolidierung und Zytoreduktion mittels einer myeloablativen Hochdosischemotherapie und/oder einer Ganzkörperbestrahlung. Dadurch kann die Rezidivhäufigkeit bei malignen hämatologischen Erkrankungen reduziert werden [Zhong et al. 2002].

Bedeutsam für die Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen ist der Umstand, dass sich hämatologische Vorläuferzellen von den reifen Blutzellen nicht nur durch ihre Multipotenz, Klonalität und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung unterscheiden lassen: Durchflußzytometrisch können sie auch anhand des charakteristischen Oberflächen-

antigens CD34 identifiziert werden. Dieses ist typisch für hämatologischen Progenitorzellen [Krause et al. 1996] und es nimmt während der Zelldifferenzierung beständig ab [Strauss et al. 1986].

Durch Verabreichung von Zytokinen und insbesondere von myelopoesestimmulierenden Wachstumsfaktoren (z.B. GM-CSF, G-CSF) lassen sich CD34-positive Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisieren [Richmann et al. 1976]. Die Blutstammzellen können dann anschließend durch die „Leukapherese“ abgeschöpft und mittels der Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt werden. Das Leukaphereseprodukt wird mit Gefrierschutzmittel (DMSO) versetzt und dann bei -196°C in flüssigen Stickstoff kryokonserviert, um später dem Patienten intravenös refundiert („transplantiert“) zu werden. Es gibt verschiedene Verfahren der Stammzelltransplantation, die nachfolgend kurz erläutert werden.

Die Gewinnung der Stammzellen mittels Leukapherese belastet den Patienten in der Regel wenig. Bei der autologen peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSZT) regeneriert sich die Hämatopoese innerhalb von etwa 10 Tagen [Breems und Löwenberg 2005]. Bei dem älteren Verfahren der Knochenmarkstransplantation (KMT) hingegen benötigt dieser Prozess zwei bis drei Wochen. Der Vorteil der verkürzten Aplasiezeit bei der PBSZT hat dazu geführt, dass die KMT von diesem Verfahren bereits weitestgehend verdrängt wurde, da die Behandlungskosten gesenkt werden konnten [Harmann et al. 1997] und das Kontaminationsrisiko mit residualen Leukämiezellen geringer ist [Shimoni und Korbing 2002]. Die peripheren Blutstammzell-Apharesate haben zusätzlich im allogenen Setting den Vorteil eines geringeren Abstoßungsrisikos im Vergleich zur allogenen KMT [Bensinger et al. 2000].

Allogene Transplantationsverfahren sind heute ein wichtiger Bestandteil der AML-Therapie. Dabei erfolgt ein vollständiger Ersatz der blutzellbildenden Zellen des Leukämiepatienten durch die Stammzellen eines gesunden und gewebekompatiblen Spenders. Die hochdosierte, manchmal in Kombination mit einer Radiotherapie vorgenommene „Konditionierungstherapie“ soll dabei den Leukämiezellklon zerstören und den Empfänger maximal immunsupprimieren, damit die neuen gesunden Spenderzellen anwachsen können. Voraussetzung dafür ist, dass sich der Patient im Stadium der kompletten Remission befindet, infektfrei ist und eine bestimmte Altersgrenze nicht überschritten hat. Allerdings wurde die starre Altersgrenze (50-55 Jahre) seit der

Einführung der toxitätsreduzierten Konditionierung vor einer allogenen PBSCT gelockert [De Lima und Giralt 2006]. Darüber hinaus verbessert die ständig wachsende Zahl potentieller Stammzellspender die Chance, einen nichtverwandten kompatiblen Spender auch für ältere Patienten zu finden. Bei der Variante der toxitätsreduzierten Konditionierung mit allogener PBSZT kommt es zu einem allmählichen vollständigen Ersatz der hämatopoetischen Empfängerstammzellen durch die Spenderstammzellen (kompletter Chimärismus). Die Vorteile der nicht myeloablativer Konditionierung, die sich auf den Graft-versus Leukämie-Effekt stützt, liegen sowohl in einer verringerten therapieassoziierten Mortalität als auch in einer geringer ausgeprägten Graf-versus-Host-Disease. Als Nachteil ist eine erhöhte Rezidivrate zu nennen [Aoudjhane et al. 2005, Kassim et al. 2005]. Rezidive können mittels der adoptiven Immuntherapie bzw. durch eine Infusion von Spenderlymphozyten (Donor Lymphozyten Infusion/DLI) behandelt werden, um den Graft-versus-Leukämie-Effekt doch noch zu erzielen [Au et al. 1999, Kolb 1990, Porter et al. 2006].

Die autologe Stammzelltransplantation, also der Retransfusion von im Stadium der kompletten Remission apheresierten Stammzellen, wird das Verfahren weder durch eine mangelnde Spenderverfügbarkeit noch eine Altersgrenze limitiert. Auch therapie-induzierte Todesfälle sind wesentlich seltener im Vergleich zur allogenen Transplantation [Anak et al. 2005]. Im Vergleich zur allogenen Transplantation weist die autologe Stammzelltransplantation jedoch eine höhere Rezidivwahrscheinlichkeit auf, die durch die eventuelle Apheresesatkontamination mit residuellen leukämischen Blasten und der residuellen Erkrankung im Patienten entsteht. Residuelle Blasten entziehen sich der morphologischen Detektierbarkeit und sind nur molekulargenetisch nachweisbar. Ein Graft-versus-Leukämie-Effekt tritt bei der autologen PBSZT nicht auf [Shimoni und Korbing 2002]. Da das Rezidivrisiko von AML-Patienten vom zytogenetischen Befund bei Erstdiagnose beeinflusst wird und Risikopatienten im höheren Erwachsenenalter deutlich überwiegen, wird im Stadium der ersten kompletten Remission in der Regel allogen transplantiert. Da die allogene Transplantation trotz erheblich verbesserter supportiver Maßnahmen mit einer hohen therapieassoziierten Mortalität verbunden ist; werden AML-Patienten streng risikoadaptiert transplantiert. Das heißt, trotz ihrer beträchtlichen Verbesserung der Überlebensraten ist mit einer therapieassoziierten Mortalitätszahl (TRD) von ca. 15% zu rechnen [Frassoni et al. 1996, Hashmi et al.

2005]. Bei einer autologen Transplantation liegt diese wesentlich niedriger [Lazarus et al. 2006]. Deren Vorteil wird wiederum durch eine erhöhte Rezidivrate belastet.

1.6. Prognostische Faktoren bei AML

Die Bewertung prognostischer Faktoren hat zum Ziel, den individuellen Krankheitsverlauf mit ausreichender Sicherheit vorherzusagen und risikoadaptierte Therapiepläne zu erstellen. Bei der notwendigen Bewertung sind prätherapeutische und zytogenetische Prognoseparameter von Bedeutung.

Unter den prätherapeutischen Prognoseparametern spielen die Faktoren Allgemeinzustand des Patienten bei Diagnosestellung, Alter des Patienten bei Erstdiagnose, hohe Leukozytenzahlen, erhöhte LDH-Werte, sowie Begleiterkrankungen (kardiovaskuläre oder pulmonale Erkrankungen, Infektionen) eine Rolle [Ferrara und Mirto 1996, Wald et al. 1982]. Inwieweit das Alter den Krankheitsverlauf beeinflusst, wird intensiv diskutiert. Schoch et al. [2004] zeigten, dass sich die Prognose bei über 50jährigen Patienten mit zunehmenden Alter deutlich verschlechtert. Bei 60jährigen Patienten finden sich gehäuft ungünstige Karyotypen, eine MDR1-Expression bzw. sekundäre AML-Formen mit schlechterem Outcome [Büchner et al. 1995]. Darüber hinaus treten therapieassoziierte Todesfälle bei der älteren Population signifikant häufiger auf als bei den jüngeren Patienten [Hiddemann et al. 1999]. In einer Studie von Löwenberg et al. [1999] konnte gezeigt werden, dass ein erheblicher Unterschied im Verlauf der Erkrankung in Bezug auf das Erkrankungsalter vorhanden ist. Erkrankte unter 60 Jahren erreichten in 75% der Fälle eine komplette Remission, die entsprechende Rate bei über 60jährigen Patienten betrug hingegen nur 45-55%. Jüngere Patienten wiesen eine 5-Jahres-Überlebensrate von 35-40% auf, ältere Patienten hingegen nur eine solche von 10%. In einer Studie von Fröhling et al. [2006] fand sich bei über 70jährigen Patienten mit hohem zytogenetischen Risikoprofil ein sehr schlechtes Therapieergebnis trotz intensiver Chemotherapie. Dies illustriert, dass neben dem Alter auch die Zytogenetik ein wichtiges Outcome-Kriterium darstellt.

Zytogenetik und Zytomorphologie lassen prognostische Aussagen bei Patienten mit AML zu [Bloomfield 2002]. Eine positive Myeloperoxidasereaktion und der Nachweis

von Auerstäbchen in den AML-Blasten gehen mit einer günstigen Prognose einher. Prognostisch ungünstig wirkt sich eine Mehrliniendysplasie aus, bei der neben Leukozyten und Erythrozyten auch die Thrombozyten von dysplastischen Veränderungen betroffen sind [Haferlach et al. 2003]. In Abhängigkeit vom Karyotyp lassen sich bei der AML folgende drei Gruppen mit unterschiedlicher Prognose bzw. unterschiedlicher Remissionsrate und Remissionsdauer ableiten [Mrozek et al. 2004]:

1) prognostisch günstiger Karyotyp

$t(15;17)(q22;a12)$; $inv(16)(p13q22)$ / $t(16;16)(p13;q22)$; $t(8;21)(q22;q22)$

2) prognostisch ungünstiger Karyotyp

komplex aberranter Karyotyp; -5/5q-, -7/7q- und 17p-Abberationen; 11q23/MLL-Rearrangements; $inv(3)(q21q26)$; $t(6;9)(p23;q34)$

3) prognostisch intermediärer Karyotyp

normaler Karyotyp und alle weiteren unter 1) und 2) nicht genannten Karyotypen.

Unter den genannten ungünstigen Karyotypen ist der komplexe aberrante Karyotyp, der bei etwa 10-20% aller AML-Erkrankungen zu finden ist, mit einer besonders schlechten Prognose verbunden. Trotz intensiver Behandlung einschließlich allogener Transplantation beträgt in diesem Fall das mediane Überleben nur sechs Monate und nur 10% der Betroffenen überleben langfristig [Schoch et al. 2001a]. Bei dieser AML-Karyotyp-Variante handelt es sich nach Schoch et al. [2005] um eine eigenständige biologische Entität, die durch eine erhebliche Zunahme der Inzidenz ab dem 50. Lebensjahr charakterisiert ist. Des Weiteren finden sich Anzeichen chromosomal Zuwinnens, aber vor allem von chromosomal Verlusten von 5q14q33, 7q32q35 und 17p13 mit einer reduzierten Genexpression in den entsprechenden Regionen. Es findet sich zudem eine erhöhte Genexpression einschließlich einer Up-Regulation von DNA-Reparaturgenen, eine hohe Inzidenz von tp53-Deletionen oder -Mutationen.

1.7. Molekularbiologie

Der Hypothese von Knudson [1993] folgend bedarf es mehrerer Schritte bis zur Entstehung einer Neoplasie. Mutationen auf molekularer Ebene können deshalb bereits frühe krankheitsspezifische Ereignisse darstellen bzw. prädisponierend für eine Erkrankung sein und damit entscheidend zur späteren Tumorentstehung und Tumorprogression beitragen. Durch Punktmutationen können Protein-Leseraster verändert werden oder es können durch Genverschmelzung Fusionsgene entstehen, die zu einer unphysiologischen Proteinexpression bzw. zur Entstehung einer Leukämie beitragen. Als weitere Mechanismen in der Leukämogenese spielen Veränderung von Tumor-Suppressor-Genen und DNA-Reparaturgenen (Mismatch Repair Gene), Aktivierung von Onkogenen und Drug-Resistance-Genen eine entscheidende Rolle. Nachfolgend wird erläutert, welche DNA-Marker sich besonders für die Analyse des Genoms und damit für eine mögliche frühzeitige Diagnostik von Leukämievorstufen eignen könnten.

1.7.1. Mikrosatelliten und ihre Veränderungen

Im Genom des Menschen liegen kodierende Gene oft weit auseinander. Zwischen den Genen befinden sich repetitive DNA-Elemente. Diese kurzen, hintereinanderliegenden DNA-Abschnitte bezeichnet man als Satelliten-DNA. Mikrosatelliten-DNA setzt sich aus der 10-50fachen Kopie einer Abfolge von 1-6 Basenpaaren zusammen. Mikrosatelliten kommen als Di-, Tri- und Tretranukleotid-Folgen vor (z.B. als AC-, GAG-, AAAG- Sequenzen). Die Anzahl dieser Repeats kann sich bei der Zellteilung durch Verrutschen der gepaarten DNA verändern. Dadurch sind sie in der Population hoch polymorph. Ein Längenpolymorphismus der Mikrosatelliten bedeutet, dass sowohl jedes Individuum als auch die mütterlichen und väterlichen Allele unterschiedlich lange Sequenzen besitzen. Durch diese Heterogenität der Mikrosatelliten eignen sie sich hervorragend, als DNA-Marker für Analysen des Genoms. Veränderungen von Mikrosatelliten-DNA sind bekannte Ereignisse sowohl in der Karzinogenese solider Tumoren und Leukämien [Nomdedeu et al. 2005]. Sie beinhalten zwei Gruppen von Genmutationen. Bei der „Mikrosatelliteninsabilität“

(MSI) erfolgt eine Instabilität auf genomischer Ebene, während die „Loss of Heterozygosity“ (LOH) einen Verlust des gesamten Mikrosatellitenareals bzw. einer Instabilität auf chromosomaler Ebene beschreibt. Zu einer MSI führen Mutationen der Satelliten-DNA (z.B. Insertionen, Duplikationen oder Deletionen von Basenpaaren), welche durch Defekte in den Reperaturmechanismen der Zelle (MMR-Deficiency) nicht mehr kompensiert werden können.

Molekulare Untersuchungen konnten zeigen, dass trotz zytogenetisch normal erscheinenden Tumorzellen molekulargenetische Veränderungen von Tumorzellen vorliegen können. Im Normalfall liegen zwei Kopien eines Chromosoms (väterlicher- und mütterlicherseits) im Genom vor. Krebszellen zeigen zwar häufig ebenfalls zwei Chromosomen, jedoch stammt diese meist nur von einem Elternteil (acquired uniparental dysomy). Durch diesen Verlust der Heterozygotität (LOH) können Gene (z.B. Tumorsuppressorgene) verloren gehen oder inaktiviert werden. Ein LOH entsteht also durch den Verlust des gesamten Chromosoms oder als Folge einer fehlerhaften Rekombination während der Zellteilung. Der Verlust eines Chromosoms wird meist zytogenetisch durch die Duplikation des verbleibenden Chromosoms verdeckt, so dass dieser Verlust erst durch molekulargenetische Untersuchung entdeckt wird, die Längenpolymorphismen der DNA untersuchen [Vogelstein und Kinzler 1998].

Beim hereditären non-polypösen Kolonkarzinom zeigten sich bei Untersuchungen der Mikrosatellitensequenzen des Tumormaterials genetische Aberrationen, die sich in Form eines veränderten Bandenmusters äußerten. Diese Veränderungen wurden als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bzw. als Replication Error Phenotype (RER+) bezeichnet und aufgeklärt [Ionov et al. 1993, Thibodeau et al. 1993].

In einer Reihe weiterer Analysen konnte gezeigt werden, dass sehr viele Tumore genetisch instabil sind. Die Mehrzahl von diesen weist chromosomale Verluste (z.B. LOH) auf. Bei manchen Neoplasien liegt die Instabilität auf molekularer Ebene (z.B. MSI) [Lengauer et al. 1998].

1.7.2. Nachweis von molekularen Veränderungen

MSI und LOH können mittels PCR-Technik amplifiziert und untersucht werden. Für die Detektion ist jedoch eine Vergleichs-DNA aus einer Zellpopulation des Patienten nötig. Diese kann aus gesunden Lymphozyten oder Epithelzellen der Wangenschleimhaut gewonnen werden [Sweester et al. 2001]. Darüber hinaus muss eine Heterogenität des Allels bestehen, um ein LOH nachweisen zu können. Bei homozygoter Ausprägung von MSI oder LOH kann mittels der Elektrophorese keine Auf trennung beider Allele nach ihrer Länge erfolgen. Es stellt sich nur eine Bande dar, wodurch ein Allelverlust nicht mehr erkennbar ist. Zu betonen ist, dass es sich bei den untersuchten Zellen um eine möglichst reine Population handeln muss. Ist dies nicht gewährleistet kann es zu einer Kontamination der Tumorzellpopulation mit gesunder Vergleichs-DNA und in der Folge zu einer Verdeckung der genetischen Veränderungen kommen [Mori et al. 2000].

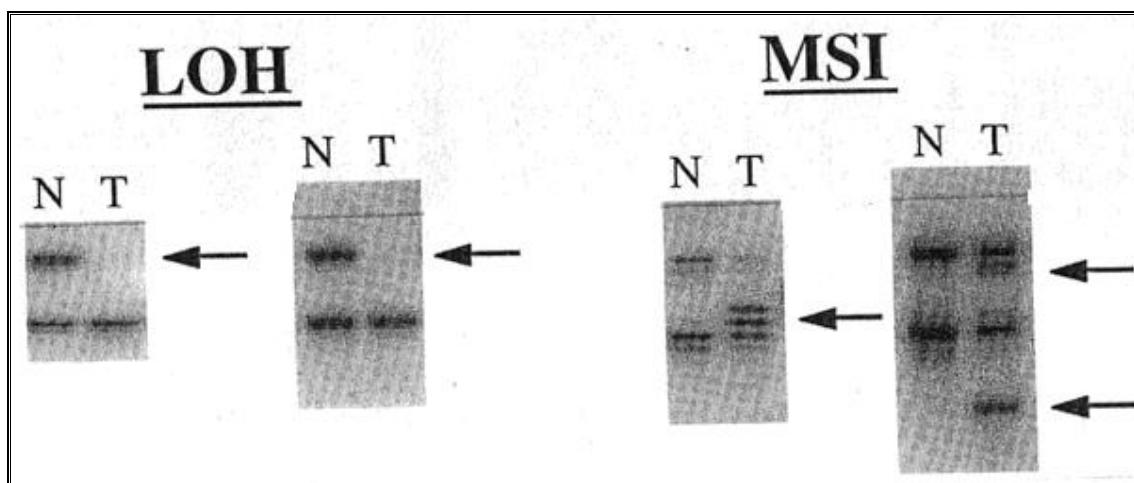


Abbildung 1: Darstellung einer LOH (links) und einer MSI (rechts). "N" bezeichnet die normale Zelle mit zwei Amplifikationen, "T" steht für die Tumorzelle. Bei der LOH (links) ist der Verlust der Amplifikation zu erkennen. Bei der MSI (rechts) hingegen ist eine Längenveränderung der Amplifikate deutlich, die durch ein Hinzutreten neuer Banden auffällt [Vogelstein und Kinzler 1998].

Bei der AML-Diagnostik ist die Mikrosatellitenuntersuchung insofern von Vorteil, da manche genetische Aberrationen in der konventionellen Zytogenetik unentdeckt bleiben und somit genetische Instabilitäten wie LOH und MSI auf Genen aufgespürt werden können, die ansonsten keine zytogenetischen Veränderungen zeigen [Sweester et al. 2001]. Somit stellt die Mikrosatellitenuntersuchung eine Screeningmethode für das Aufspüren von eventuell veränderten Tumorsuppressorgenen und Onkogenen dar [Mori et al. 2000]. Nach der Hypothese von Knudsen [1993] bedingt erst der funktionelle Ausfall beider Allele eines Tumorsuppressorgens negative Auswirkungen auf die Regulation der Zellteilung. Funktionsschwächende oder inaktivierende Mutationen eines Tumorsuppressorgens und insbesondere Deletionen bzw. LOH's sind die führenden Merkmale der genetischen Veränderung dieser Gruppe. Dabei kodieren die meisten Protoonko- und Tumorsuppressorgene Proteine, die wichtig für die Zellzyklusregulation, Zelldifferenzierung und Signaltransduktion sind. Somit kann die veränderte Genexpression zu einem unkontrollierten Wachstum der Zelle führen. Ob sich daraus tatsächlich eine maligne Transformation entwickelt, hängt entscheidend von der individuellen Empfindlichkeit, der genetischen Disposition bzw. der Effektivität von DNA-Reparatur- und apoptoseinduzierenden Genen ab.

1.8. MSI und LOH bei hämatologischen Erkrankungen

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass genetische Instabilitäten während der Leukämogenese zwischen den verschiedenen AML-Typen variieren. Während die meisten Untersuchungen bei "de novo-AML" kaum Mikrosatellitenveränderungen aufzeigten, ergab sich eine Zunahme von MSI in Kollektiven älterer Patienten [Das-Gupta et al. 2001]. Hervorzuheben ist hierbei das Auftreten der Veränderungen bei über 50% der sekundären AML-Formen [Ohyashiki et al. 1996]. Veränderungen von Chromosom 7 sind häufig in tAML/tMDS zu finden. Vor allem konnten durch den Nachweis von LOH's kritische Genloci entdeckt werden, welche entscheidend zur AML/MDS-Entstehung beitragen [Liang et al. 1998]. Bereits bekannt ist, dass defekte DNA-Reparatur-Gene wie MSH2 (plaziert auf Chromosome 2p22-2p21 und nachgewiesenermaßen an der MSI-Entstehung beim hereditären non-poly-

pösen Kolonkarzinom und anderen soliden Tumoren beteiligt) und das von MSI betroffene Tumorsuppressorgen *tp53* auf Chromosom 17 bzw. deren verändertes Proteinexpressionsmuster eine Schlüsselrolle in der Leukämieentstehung bei tAML sowie beim AML des älteren Menschen einnimmt [Zhu et al. 1999]. Olipitz et al. [2002] machten ebenfalls defekte DNA-Reparaturmechanismen für die MSI bzw. die Entstehung der t-Leukämie/t-MDS verantwortlich, da sie signifikante Assoziationen zwischen MSI-Mustern primärer Tumoren und der darauf folgenden Leukämie/MDS nachweisen konnten.

Darüber hinaus werden LOH's und MSI's regelmäßig im Genom von AML-Patienten gefunden, die zuvor schädlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt oder einer Chemotherapie unterzogen worden waren. Ungefähr 42% der tAML/tMDS und 10% der de-novo-AML-Fälle zeigen genetische Instabilitäten auf dem langen Arm des Chromosom 5 [Le Beau et al. 1993, Xie et al. 2000]. Mori et al. [2000] demonstrierten die wichtige biologische Rolle von MSI und LOH beim Übergang eines MDS in eine AML. Xie et al. [2000] wiesen einen hohen Prozentsatz an LOH's an den Chromosomen 5q, 7q, 17p (mit *Tp53* Mutation), 20q, 1p, 1q und 18q nach und vermuteten, dass dort Tumorsuppressorgene angesiedelt seien, die eine entscheidende Bedeutung für die Entwicklung der MDS und AML haben.

1.9. Ziel der vorliegenden Arbeit

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist weltweit Gegenstand vieler laufender Therapiestudien. Ihre zyto- und molekulargenetische Charakteristika wurden umfänglich untersucht und auf dieser Grundlage konnten die therapeutischen Ergebnisse in den letzten 40 Jahren erheblich verbessert werden. Das Hauptproblem der AML-Therapie bleibt jedoch eine ausgeprägte therapieassoziierte Morbidität und Mortalität, so dass die Notwendigkeit der Entwicklung von zielgerichteten Therapien weiterhin besteht. Ein besonderes Problem der AML-Therapie ist, dass nach erfolgreicher Kontrolle der AML die Hämatopoiese mit einer Myelodysplasie regenerieren kann. Deshalb muss nicht nur die minimale leukämische Resterkrankung, sondern auch diese Myelodysplasie behandelt werden. Es wäre wünschenswert, diagnostische Verfahren zu besitzen, die die Überwachung therapeutischer Verläufe u.a. im Rahmen der Follow-Up-Untersuchungen verbessern könnten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, genetische Instabilität mit einem selektionierten Primer-Panel bei AML-Blasten schon bei der Erstdiagnose zu detektieren und auf ihre prognostische Relevanz mit einem statistischen uni- und multivariaten Auswertungsansatz zu untersuchen.

Bei der Untersuchung von den Blasten der an AML erkrankter Patienten auf genetische Instabilität, also in Bezug auf LOH und/oder MSI, ist es erforderlich, eine physiologische, nicht betroffene, autologe Referenzprobe zu besitzen, um etwaige genetische Veränderungen der Blasten-DNA detektieren zu können. Im ersten Teil dieser Arbeit sollen deshalb folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Welche Referenzzellen sind für die vergleichende Analyse auf genetische Instabilität gut geeignet und einfach zu gewinnen. Was muss bei der Verwendung beachtet werden bzw. gibt es Verwendungseinschränkungen?
- 2) Kann eine intensive Chemotherapie genetische Instabilität in den Referenzzellproben, d.h. in den Plattenepithelien der Mundschleimhaut, bei den CD34-negativen Zellen aus der Leukapherese und bei den Zellen von Knochenmarksausstrichen zum Zeitpunkt der 1. kompletten hämatologischen Remission, hervorrufen?

- 3) Unterscheiden sich die Referenzzellproben (CD34-negative Zellen, Wangenschleimhautzellen) bei hämatologischen Stammzellerkrankungen (AML, MDS) von den Referenzzellproben einer nicht-hämatologischen Stammzellerkrankung (z.B. Non-Hodgkin-Lymphome, M. Hodgkin, Plasmozytom, Ewing-Sarkom).

Um beantworten zu können, ob eine genetische Instabilität in den untersuchten Referenzzellproben (CD34-negativ Zellen, Plattenepithelzellen der Wangenschleimhaut, Knochenmarksausstriche) durch intensive Chemotherapie der AML (Induktions- bzw. Konsolidierungstherapie) induziert werden können, sollen CD34-negative Zellproben von intensiv vortherapierten Patienten ohne AML aber mit nicht-hämatopoetischen Neoplasien auf genetische Instabilität untersucht werden. Im Anschluss soll eine Aussage darüber getroffen werden, ob sich die qualitative und quantitative Detektierbarkeit von genetischer Instabilität in CD34-negativen Stammzellen von AML-Patienten von jener von Patienten ohne hämatologische Stammzellerkrankung unterscheidet.

Im zweiten Teil der Arbeit werden folgende Fragen zur Detektion von genetischer Instabilität bei AML-Blasten im Rahmen der Erstdiagnose und für die prognostische Einschätzung der AML gestellt. Durch die Verwendung von acht Mikrosatellitenmarkern soll eine genetische Instabilität in den AML-Blasten gefunden werden. Nach Definition des Kriteriums der genetischen Instabilität/GIN (diese liegt vor, wenn mindestens zwei Primer ein LOH oder ein MSI detektieren), soll dessen Wert als Prognoseparameter beurteilt werden. Es stellen sich folgende Fragen:

- 1) Kann mit einem selektierten Primer-Panel genetische Instabilität in den Blasten der AML bei Erstdiagnose detektiert werden?
- 2) Wie wirkt sich das Vorhandensein einer genetischen Instabilität in den Blasten der AML auf die Rezidivwahrscheinlichkeit der Erkrankung und das rezidivfreie Überleben des Patienten aus?

2. Material und Methoden

2.1. Probengewinnung humaner Zellen

2.1.1. Herstellung von Objektträgern mit Blasten aus Knochenmarkspunktaten von AML-Patienten bei Erstdiagnose

Es wurden prospektive Knochenmarksaspirate von Patienten mit der Diagnose einer „akute myeloische Leukämie“ (AML) untersucht. Für die Sicherung der AML-Diagnose wurden bei jedem Patienten aus Knochenmarkspunktat beschickte Objektträgerausstriche mit Knochenmarkszellen bzw. Blasten angefertigt, um den zytologischen Befund zu erheben. Die Knochenmarksausstriche (Erstdiagnose, Remissionsdiagnostik) wurden konsekutiv von stationär aufgenommenen, neu erkrankten AML-Patienten gewonnen. Zusätzlich wurden retrospektiv Ausstriche von AML-Patienten verwendet, bei denen Ausstriche für weitere Untersuchungen im Rahmen der Diagnostik bereits gewonnen und aufbewahrt worden waren. Um genetische Instabilitäten in Leukämieblasten zu detektieren, wurde konstitutionelle DNA als Referenz entweder aus den Epithelzellen der Wangenschleimhaut, aus CD34-negativ Zellen von Leukaphereseprodukten oder aus Zellen von Objektträgerausstrichen von Knochenmarkspunktionen verwendet, die zum Zeitpunkt der kompletten hämatologischen Remission des Patienten erstellt worden waren. Für die Analyse wurde die DNA aus den AML-Blasten mittels QIAamp DNA Micro Kit (Fa. Qiagen, Hilgen) isoliert.

Zytologie

Die Grundlage der zytomorphologischen Diagnostik sind die Kriterien der FAB-Klassifikation [Bennett et al. 1976]. Die in der Universitätsklinik Regensburg untersuchten Blutausstriche werden nach folgendem Schema behandelt:

- Pappenheim-Färbung bzw. May-Grünwald-Giemsa-Lösungen (MGG) mit dem Ziel der Erfassung des Anteils von Blasten und des Blastentyps (Typ I bis III) sowie der Ermittlung myeloischer oder lymphatischer Differenzierungsmerkmale.
- POX-Färbung

- Esterase-Färbung
- Eisen-Färbung
- PAS-Färbung mit dem Ziel der linienspezifischen Differenzierung der akuten Leukämien (myeloisch, monozytär, erythroblastär, megakaryozytär)
- Durchflusszytometrie mit dem Ziel der Detektion einer abnormen Antigenexpression auf den Blasten

Zytogenetik

Die Chromosomenanalyse erfolgte nach Standardprotokollen der jeweiligen Referenzlaboratorien der AML-CG-Studien durch das zytogenetische Labor der Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof. Haferlach). Für die Bewertung der prognostischen Bedeutung der zytogenetischen Befunde wurden folgende Subgruppen definiert:

1. prognostisch günstige Gruppe: t(8;21)(q22;q22), inv16(p13q22), t(15;17)(q22;q12),
2. prognostisch intermittierende Gruppe: normaler Karyotyp
3. prognostisch ungünstige Gruppe: primär unbalanzierte Karyotyp-Veränderungen, Trisomien 8, 11, 13, 14, 21; Deletionen von 5q, 7q, 17p; t(11)(q23)/MLL, inv(3), t(3;-3) und komplex aberranter Karyotyp

2.1.2 Herstellung von Referenzzellen

Um die Verwendbarkeit von den Epithelzellen der Wangenschleimhaut als Referenz-DNA bei Untersuchungen auf Mikrosatellitenveränderungen zu analysieren, wurden Wangenscheimhautabstriche mit CD34-negativen Zellen und mit Remissionszellen von Knochenmarksausstrichen bzw. aus diesen Zellfraktionen extrahierte DNA molekulargenetisch miteinander verglichen.

Zur Durchführung der Analyse wurden konsekutiv CD34-negative Zellen aus Leukapheresen (in 1. Remission) sowohl von mit G-CSF (Neupogen®) Stammzellmobilisierten AML-Patienten (n=18) als auch von intensiv chemotherapeutisch vorbehandelten Nicht-AML-Patienten (n=12) verwendet. Die AML-Patienten erhielten vor der Leukapherese eine Chemotherapie nach dem

AMLCG-92 Protokoll (siehe Tabelle 4). Nicht-AML-Patienten erhielten ihrer Diagnose entsprechend Chemotherapien (Tabelle 5).

Doppelte Induktionstherapie	
1. Zyklus: TAD (9 Tage)	
a) Ara-C (Cytarabin; Pyrimidinanalogen)	1 x tägl. 100 mg/m ² an den Tagen 1-2
b) Daunorubicin (Antrazyklin)	60 mg/m ² an den Tagen 1-3
c) Thioguanin (Purinanalogen)	2 x tägl. 100 mg/m ² an den Tagen 3-9
1. Zyklus: HAM (5 Tage)	
a) Ara-C hochdosiert	2 x tägl. 3 mg/m ² an den Tagen 1-3
b) Mitoxantron (Antrazyklin)	20 mg/m ² an den Tagen 3-5
Konsolidierungstherapie	
2. Zyklus: TAD (9 Tage)	
a) Ara-C	1 x tägl. 100 mg/m ² an den Tagen 1-2
b) Daunorubicin	60 mg/m ² an den Tagen 1-3 und 2 x tägl. 100 mg/m ² an den Tagen 3-8
c) Thioguanin	2 x tägl. 100 mg/m ² an den Tagen 3-9
Konditionierung (vor autologer peripherer Stammzelltransplantation)	
1. Zyklus Busulfan/Cyclophosphamid über 8 Tage	
a) hochdosiertes Busulfan (Alkylanz)	4 mg/kg KG an den Tagen -9 bis -6
c) Cyclophosphamid	60 mg/kg KG an den Tagen -5 bis -2
Zur Verbesserung der Stammzellmobilisierung wurde G-CSF (Neupogen [®]) nach der HAM/TAD-Konsolidierungstherapie gegeben. Die Neupogen [®] -Gabe startete am Tag 6 nach Chemotherapie mit einer Dosis von 5 mg/kg KG s.c.	

Tabelle 4: Therapieschemata der nach dem AMLCG-92-Protokoll [Buchner et al. 2000] behandelten AML-Patienten in der vorliegenden Studie

Patient	Diagnose	Chemotherapie(n) vor Stammzellapherese
2	diff. Ewing-Sarkom	4 x VIDE
6	M. Hodgkin	8 x CHOP, 6 x ABVD, 1 x CEP, 1 x VIPE
8	M. Hodgkin	4 x BEACOPP, 1 x VIPE
10	IgA-kappa Plasmozytom	10 x Darubizin, Dexamethason, 1 x IEV
11	großzelliges NHL	6 x CHOEP, 1 x Mabthera/VIPE
14	plasmoblastäres NHL	6 x CHOP, 1 x VIPE
16	Mantelzell-Lymphom	8 x CHOP, 1 x VIPE+Rituximab
21	B-NHL	6 x CHOP, 1 x VIPE
25	B-NHL	4 x CHOP14/Rituximab, 1 x CHOEP/Rituximab
29	B-NHL	4 x CHOP/Mabthera, 1 x CHOEP
30	NHL	6 x CHOP21, 1 x VIPE/Mabthera
34	NK-Zell-Lymphom	4 x CHOP, 1 x CHOEP

Tabelle 5: Therapieschemata derjenigen Chemotherapien, die bei Nicht-AML-Patienten in der vorliegenden Studie angewendet wurden

Die für die vorliegende Untersuchung gewonnenen Zellen stammten aus bei -80°C kryokonservierten Rücklagen (sog. Back-up's), die nicht mehr benutzt wurden, da die Patienten adäquat nach autologer Transplantation regeneriert hatten. Bei diesen Patienten war zusätzlich die Entnahme von Epithelzellen der Wangenschleimhaut nach Chemotherapie möglich gewesen.

Um die Epithelzellen der Wangenschleimhaut und die Stammzellen von den Patienten zu erhalten, wurden die Patienten brieflich oder telefonisch über Ziel und Umfang der Untersuchung aufgeklärt und gebeten, sich bei ihrem nächsten Termin in der Universitätsklinik Regensburg einen Abstrich von der Wangenschleimhaut abnehmen zu lassen.

Das Gewinnen von Wangenschleimhautepithelzellen erfolgte nach einem standardisierten methodischen Ablauf, so dass Fehler in der Entnahmeprozedur ausgeschlossen werden konnten. Der Ablauf war wie folgt: die Patienten wurden angewiesen, den Mund gründlich mit Wasser zu spülen. Anschließend wurde versucht, durch kräftiges Reiben eines Watteträgers an der buccalen Schleimhaut Epithelzellen zu gewinnen. Die Watteträger wurden unverzüglich ins Labor gebracht, um dort die DNA der Epithelzellen zu extrahieren.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit, wurden die CD34-negativ Zellen als Referenzzellpopulation für den Nachweis von genetischer Instabilität in AML-Blasten verwendet. (Separationsverfahren siehe 2.2.3)

2.1.3. Patientenaufklärung, Ethikkommission

Alle Patienten gaben nach ausführlicher Aufklärung über Ziel und Methoden der Untersuchung ihre schriftliche Einverständniserklärung vor der jeweiligen Untersuchung bzw. Probennahme ab. Der Untersuchungsplan war vorher durch die zuständige lokale Ethikkommission genehmigt worden.

2.2. Methoden

2.2.1. Leukapherese

Die Leukapherese erfolgte im Stadium der kompletten hämatologischen Remission, also nach erfolgter Doppelinduktion- bzw. Konsolidationstherapie und bei Erreichen einer CD34-Zellzahl von mehr als $3 \times 10^3/\text{ml}$ Blut. Bei diesem Verfahren werden aus dem Vollblut des Patienten unter Verwendung eines diskontinuierlich arbeitenden Cobe Spectra Zellseparators mononukleare Zellen gewonnen. Das Verfahren beruht darauf, dass mit Citratlösung versetztes venöses Blut bei 2040 rpm zentrifugiert wird, um die Zellen entsprechend ihres Dichtekoeffizienten maschinell aufzutrennen. Das abzusammelnde Zellmaterial wird anschließend in einer Gefrierschutzlösung aus 90% FCS und 10% DMSO eingefroren. Das Cobe Spectra Apheresesystem ist in zwei Komponenten aufgeteilt. Ein Einwegset, bestehend aus einem Trennkanal für die Auf trennung der Blutbestandteile und aus Schläuchen, für die Leitung von Blut und Ersatzflüssigkeiten. Den zweiten Teil bildet das eigentliche Apheresesystem, welches als ein automatischer Blutkörperchenseparator auf Zentrifugenbasis verstanden werden muss. Das Gerät übernimmt zusätzlich die Steuerung und Überwachung des extrakorporalen Kreislaufs während der Apherese (siehe Abbildung 2).

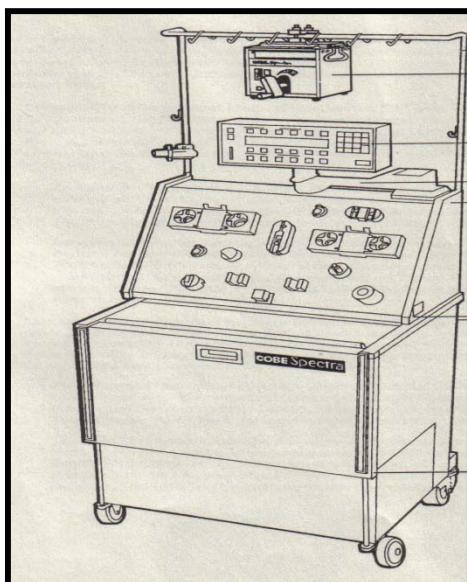


Abbildung 2: Cobe Spectra Apheresegerät (modifiziert nach Benutzerhandbuch)

2.2.2. Dichtegradientenzentrifugation der apheresierten Zellen mittels Ficoll Hypaque

Im Arbeitsablauf der Untersuchung befassten sich die nächsten Analyseschritte mit der Auftrennung der Leukaphareseprodukte in einzelne Blutbestandteile.

Zur Gewinnung eines mononukleären Zellpellet müssen Verunreinigungen bzw. erythrozytäre und thrombozytäre Blutbestandteile entfernt werden. Hierbei werden die Leukaphareseprodukte einer manuellen Dichtegradientenzentrifugation (sog. Hand-Ficoll) unterzogen, um die Zellfraktionen aufzutrennen (= Aufschichtung).

Das Hand-Ficoll-Verfahren nützt den Umstand aus, dass sich Blutbestandteile wie Monozyten, Erythrozyten und Thrombozyten in ihrer Dichte unterscheiden. Dadurch ist es möglich, unter Verwendung einer Ficoll-Hypaque-Lösung, die eine definierte Dichte von 1,077 aufweist, eine Trennung der Zellfraktionen zu erreichen (siehe Abbildung 3).

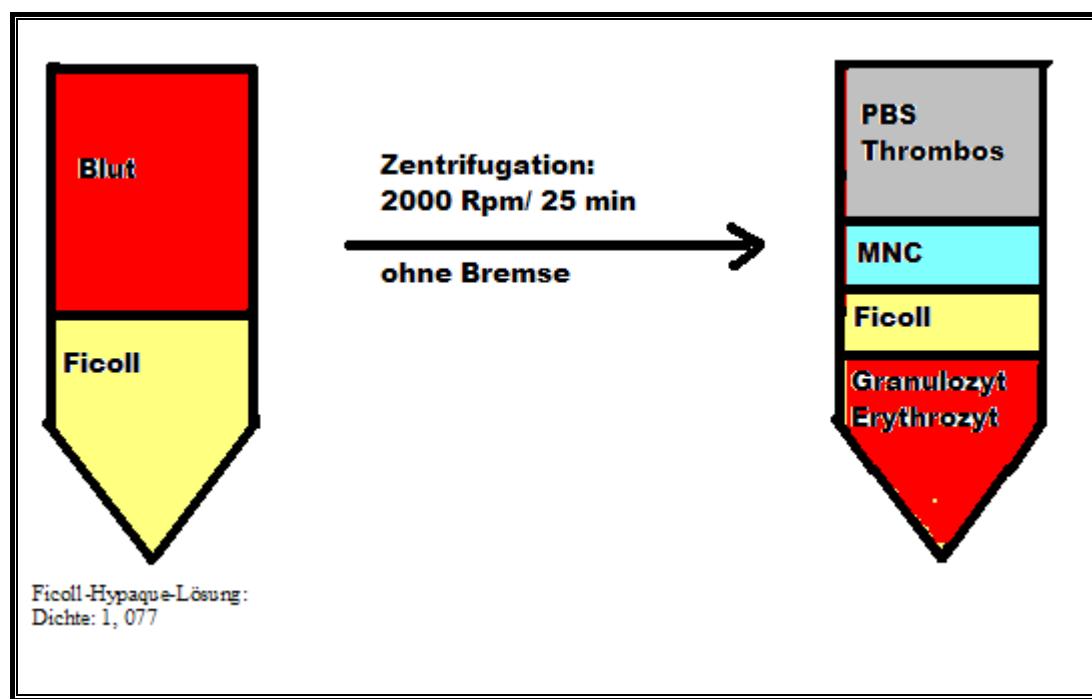


Abbildung 3: Graphische Darstellung des Ficoll-Hypaque Schichtungsprinzips. Durch Aufbringen von Blut auf eine Ficoll-Hypaque-Lösung mit definierter Dichte und anschließender Zentrifugation erfolgt eine Auftrennung der Zellen (Granulo-/Erythrozyten unterhalb und mononukleäre Zellen/MNC oberhalb der Ficoll-Hypaque-Lösung, PBS-Mittel und Thrombozyten positionieren sich oberhalb der MNC-Schicht)

Zur Durchführung des Hand-Ficoll-Verfahrens sind folgende Arbeitsschritte notwendig:

- 1) Auftauen der Beutel im Wasserbad bei 37°C
- 2) Überführen des Beutelinhalts in 2070-Falcon Röhrchen und Heparinzugabe
- 3) Zentrifugation bei 1300 U/min für sieben Minuten
- 4) Waschen der Zellen mit 50ml PBS und 2%FCS und erneute Zentrifugation wie in Schritt 3
- 5) DNase-Zugabe (1ml) und 10ml PBS/2% FCS; für zehn Minuten in den Brutschrank geben, anschließende Zentrifugation
- 6) Waschen (siehe Schritt 4)
- 7) Zellen Filtern (70 µm Porenfilter), Zugabe von 50 ml PBS/2% FCS, erneute Zentrifugation (siehe Schritt 3)
- 8) Ficoll-Dichtezentrifugation
- 8.1) resuspendierte Zellen mit 40ml PBS auffüllen, neue Ficoll-Röhrchen mit je 10ml Biocoll-Lösung befüllen, Zellsuspension langsam auf die Ficoll-Lösung schichten, anschließend ungebremste Zentrifugation bei 2000 U/min für 25 Minuten, Abpipettierung der entstandenen Trennschicht bzw. der entsprechend des Dichtegradienten aufgeschichteten mononuklearen Zellen
- 8.2) mononukleäre Zellen mit 50 ml PBS auffüllen und anschließend Zentrifugation (1800 U/min über sieben Minuten)
- 8.3) zweimalige Wiederholung des Waschvorgangs (siehe Schritt 8.2)
- 8.4) Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer. Die Zellen werden dabei mit 20µl Trypanblau (reichert sich nur in Zellen mit defekter Zellmembran an) versetzt. Nach Beschicken der Zählkammer werden die ungefärbten, d.h. lebenden Zellen gezählt und dann unter Berücksichtigung von Kammervolumen und Verdünnungsfaktor die Anzahl vitaler Zellen berechnet.
- 9) Auffüllen der resuspendierten Zellen mit 15 ml PBS/2% FCS; Aufbewahrung im Kühlschrank

2.2.3. Zellaufreinigung der mononukleären Zellen

Da der molekulargenetische Vergleich von Zellfraktionen ein sehr störungsempfindliches Verfahren ist, ist eine optimale Reinheit der Zellpopulationen erforderlich. Aus diesem Grund, werden die durch die Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen mononukleären Zellen getrennt, um CD34-positive hämatologische Vorläuferzellen sowie CD34-negativ Zellen (überwiegend Lymphozyten) zu erhalten. Die Weiterverarbeitung der durch die Hand-Ficoll-Dichtezentrifugation gewonnenen und bereits gezählten sowie in PBS/2% FCS-Lösung aufbewahrten Zellen wurde folgendermaßen vorgenommen:

Unter Verwendung von MACS[®]-Separation Columns erfolgte die Aufreinigung nach CD34-positiven und CD34-negativen Vorläuferzellen. Die aus den Aphereseprodukten stammenden mononukleären und mittlerweile angereicherten Zellpopulationen wurden mit magnetisierten und gegen ihr Oberflächenantigen CD34 gerichteten Antikörpern (MACS CD34 MicroBeads) besetzt. Während des Füllens dieser besetzten Zellen in eine von einem Magneten umschlossene Säule können durch Anlegen eines Magnetfeldes die CD34-positiven, magnetisierten myeloischen Vorläuferzellen zurückgehalten werden, während die nicht markierten CD34-negativen Zellen ungehindert passieren und in einem separaten Röhrchen gesammelt werden können. Um die CD34-positiven Stammzellen zu gewinnen, wird die Säule aus dem Magneten genommen und mit einem Säulenstempel die Zellfraktion vorsichtig herausgedrückt, um sie in ein separates Röhrchen zu überführen (siehe Abbildung 5).

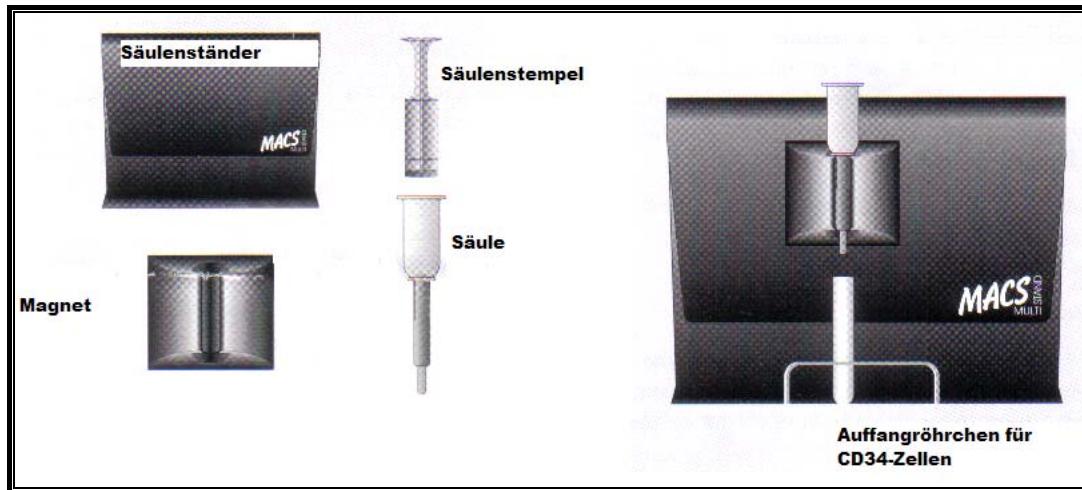


Abbildung 5: Schematische Darstellung der MACS Separation Columns System. In einem Magneten wird die Separation der magnetisierten CD34-positiven myeloischen Vorläuferzellen vorgenommen, die am Ende der Separation mittels eines Säulenstempels vom inneren der Säule in ein vorbereitetes Gefäß überführt werden (modifiziert nach MACS-Handbuch)

Die Durchführung der MACS-Separation erfolgt in den nachfolgenden Arbeitsschritten:

- 1) Zentrifugation bei 1300 U/min für sieben Minuten
- 2) verbliebenes Zellpellet vortexen und mit FcR Blocking Reagent versetzen (100 µl Reagenz für 1×10^8 Zellen), Inkubation für 1 Minute
- 3) Zugabe von 100 µl MicroBeads pro 1×10^8 Zellen, vortexen und Inkubation im Kühlschrank für 30 Minuten
- 4) Waschen der Zellen mit 50 ml PBS/2% FCS und Zentrifugation (1300 U/min für sieben Minuten)
- 5) Zellen resuspendieren ($> 1 \times 10^8$ Zellen in 500 µl PBS/2% FCS)
- 6) MACS®-Separation Columns mit 3 ml PBS/2% FCS vorspülen
- 7) resuspendierte Zellen in 500 µl -Portionen auf die Säule geben
- 8) Spülen der Säule 3 ml PBS/2% FCS zur Gewinnung der nicht adhärierten CD34-negativen Zellpopulation zur Erfassung der Zellzahl dieser Population
- 9) MACS Separation Säule aus dem Magneten entfernen und über steriles Röhrchen halten

- 10) 5 ml PBS/2% FCS auf die Säule geben und mit beigefügten Säulenstempel die adhärierten CD34⁺ Zellen aus der Säule pressen; Wiederholung des Vorgangs, um Zellzahl zu erhöhen
- 11) CD34-positive Zellen zentrifugieren bei 1300 U/min für sieben Minuten zur Erfassung der Zellzahl
- 12) Aufbewahren der Zellen in 90% FCS/10% DMSO-Lösung

2.2.4. Quantitative und qualitative Erfassung der CD34-Zellen

Zur Beurteilung des Reinheitsgrades, der mittels MACS Separation Columns System aufgetrennten CD34-positiven und CD34-negativen Zellfraktion wurde durchflusszytometrisch (Coulter® EPICS® XL-MCL Flow Cytometer) der jeweilige Gehalt an CD34-positiven und CD34-negativen Zellen untersucht. Die Messung wurde nach der von der International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) empfohlenen Vorgehensweise ausgeführt. Dabei wurden die Zellen mit monoklonalen fluoreszierenden CD45⁺- und CD34⁺-Antikörpern versetzt.

Die Messung beruht darauf, dass Streulicht- und Fluoreszenzsignale jeder einzelnen Zelle gemessen werden. Die Messung des Vorwärtsstreulichts (Forward Angle Light Scatter/FSC) dient zur Bestimmung der Zellgröße. Form der Zelle, Granularität und Membranfaltung können mittels des Seitwärtsstreulichts (Side Scatter/SSC) detektiert werden. Dadurch ist es möglich, mittels der Streulichtsignale FSC und SSC eine Unterteilung in Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten durchzuführen.

Da im Gegensatz zu den CD34-positiv Stammzellen die Leukozyten das Oberflächenantigen CD45 sehr stark exprimieren, während CD34 von ausgereiften Leukozyten nicht mehr oder nur noch in Spuren exprimiert wird, können durch das apparative Vorgehen primär CD34-positive myeloische Stammzellen von den Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten) unterschieden werden.

Das Vorgehen des apparativen Vorgehens bei der flowzytometrischen Messung (FACS) enthält die nachfolgenden Arbeitsschritte:

- 1) Erfassung des Leukozytengehalts der Probe (ADVIA-120) und ggf. Verdünnung des Ausgangsmaterials mit DPBS/FCS auf eine Zellzahl von $2 \times 10^7/\text{ml}$
- 2) Beschriftung von zwei Cups für jede Probe (Doppelbestimmung)
- 3) Probendurchmischung und Verteilung von $100 \mu\text{l}$ Probenmaterial auf die Cups
- 4) Zugabe von $10 \mu\text{l}$ CD45-PECy5 mAB und $20 \mu\text{l}$ CD34-mAB auf die Cups; nachfolgend Mischen
- 5) lichtgeschützte Inkubation auf Eis über 20 Minuten
- 6) Zugabe von 2 ml NH_4Cl Lyselösung, vortexen
- 7) lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur über 15 Minuten
- 8) unmittelbar vor dem Messvorgang erfolgt Zugabe von $100 \mu\text{l}$ Flow-Count Bead-Suspension
- 9) Datenerhebung mittel Coulter®EPICS®XL-MCL Durchflusscytometer
- 10) Instrumentenadjustierung nach Gratama et al. [1999] und Keeney et al. [1998]
- 11) Datenanalyse: Determination der gezählten Ereignisse (CD45⁺-Events für Leukozyten bzw. CD34⁺-Events für Stammzellen oder CD34⁺-Events für Blasten)
- 12) Berechnung der Gesamtzellzahl nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen} \times \text{Flow-Count Beads}}{\text{Gezählte Beads} \times \text{Konzentration}}$$
- 13) Bildung des Mittelwertes aus beiden Messreihen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors
- 14) Bestimmung des Reinheitsgrades (Effizienz der CD34-Auf trennung) nach folgender Formel:

$$\text{Gezählte CD45}^+ \text{-Leukozyten: } 100\%$$

$$\text{Gezählte CD 34}^+ \text{-Zellen: \%-Anteil an den gezählten CD45}^+ \text{-Leukozyten}$$

2.2.5. DNA-Isolierung aus den CD34-negativen Zellen

Es bedarf einer Extraktion der Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus den CD34-Stammzellen, um nachfolgend molekulargenetische Untersuchungen vornehmen zu können. Für die Extraktion bzw. Isolierung der DNA wurde der QIAamp Micro Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Als Lösungen für die DNA-Isolierung dienten Buffer AL (Lysepuffer), Buffer AW1 (Waschpuffer), Buffer AW2 (Waschpuffer), Buffer AE (Elutionspuffer) sowie Qiagen Proteinase K. Das Isolationsprinzip zeigt die Abbildung 6.

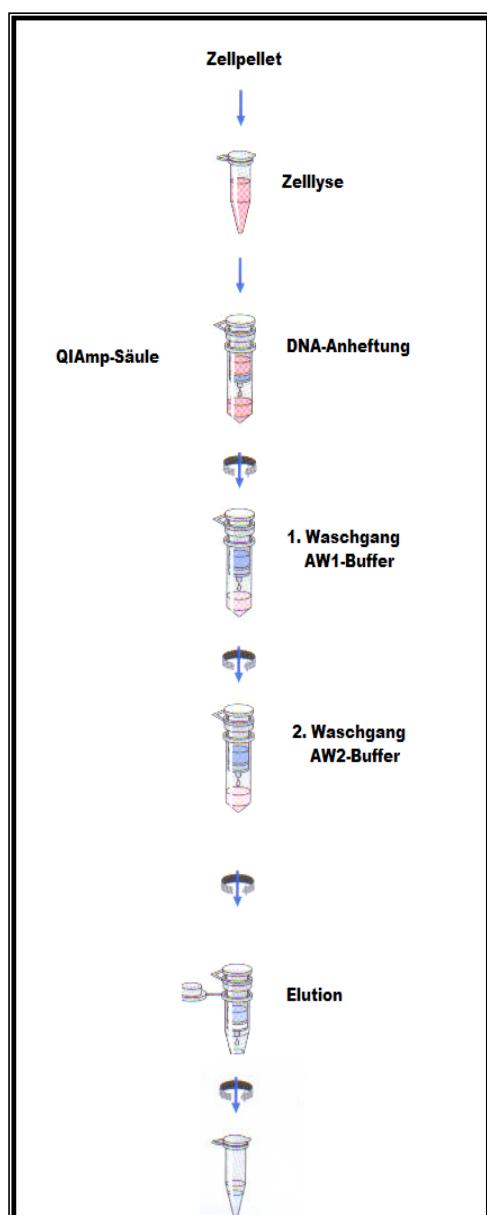


Abbildung 6:
Graphische Darstellung der Arbeitsschritte der DNA-Isolation mittels (QIAamp. Micro Kit®). Die DNA-Isolierung erfolgt aus der aufgereinigten CD34-negativ Zellfraktion mittels Säulensystem (QIAamp. Micro Kit®) in folgenden Schritten:

Durch Zugabe von AL-Puffer, Ethanol und der Proteinase K auf das Zellpellet erfolgt die Lyse der Zellen. Anschließend wird das Probenmaterial in ein Säulensystem geladen, wobei sich die aus den Zellen herausgelöste DNA auf eine spezifische Silika-Gel-Membran anheftet. Die nachfolgenden Waschschritte mit zwei verschiedenen Waschpuffern erhöhen die Reinheit des DNA-Materials, welches schließlich durch die Zugabe eines Elutionspuffers eluiert werden kann.

Das Vorgehen erfordert die nachfolgend geschilderten Arbeitsschritte:

- 1) Versetzen mit 20 µl Proteinkinase K pro Filter-Cup
- 2) Zugabe von 200 µl Buffer AL (Lysepuffer)
- 3) Vortexen für 15 Sekunden, anschließend Inkubation bei 56 °C für zehn Minuten
- 4) Zugabe von 200 µl Ethanol
- 5) Vortexen für 15 Sekunden, anschließend Inkubation bei Raumtemperatur für drei Minuten
- 6) Zentrifugation der Säule für eine Minute
- 7) Aufsetzen der Säule auf ein neues Cup
- 8) Zugabe von 500 µl Waschpuffer (AW 1) und anschließend Zentrifugation für eine Minute
- 9) Wiederum Aufsetzen der Säule auf ein neues Cup
- 10) Zugabe von 500 µl Waschpuffer (AW2) und anschließend Zentrifugation für eine Minute
- 11) Säule in ein verschließbares Eppendorf Cup stecken, 100 µl Elutionspuffer (AE) aufschichten und für fünf Minuten bei Raumluft inkubieren, anschließend eine Minute zentrifugieren, um das DNA- Eluat zu erhalten

2.2.6. DNA-Isolierung aus Wangenschleimhautepithelzellen

Hierfür wurde der DNA-High template preparation Kit (Fa. Roche, Mannheim) verwendet. Das Vorgehen entspricht der Isolierung von DNA aus CD34-Zellen in Kap. 2.2.5.

2.2.7. DNA-Isolierung aus Zellen von gefärbten Objektträgern

In diesem Teil der Arbeit wurden Knochenmarksausstriche von Patienten im Stadium der Erstdiagnose und im Stadium der kompletten hämatologischen Remission molekulargenetisch untersucht. Hierfür wurde der „QIAmp Mini Kit“ der Firma QIAGEN verwendet. Das Arbeitsprinzip entspricht jenem der DNA-Isolierung von CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen in Kapitel 2.2.5.

Folgende Lösungen wurden für die DNA-Isolierung verwendet: Buffer ATL (Gewebslysepuffer), Buffer AL (Lysepuffer), Buffer AW1 (Waschpuffer), Buffer AW2 (Waschpuffer), Buffer AE (Elutionspuffer) und QIAGEN Proteinkinase K.

Es waren folgende Arbeitsschritte erforderlich:

- 1) Materialbereitstellung; ATL-Puffer und Proteinkinase K im Verhältnis 10:1 mischen; Beschriftung der Eppendorf-Cups, Vorheizen des Thermomixers
- 2) Auftragen von 220 µl der 10:1-Mischung auf den Objektträger, kurz andauen und anschließend Material mit Pipette aufsaugen und in Eppendorf-Cup geben
- 3) Cups für 15 Sekunden vortexen und in den Thermomixier bei 56 °C und 9000 U/min für 15 Minuten geben
- 4) Zugabe von 200 µl AL-Puffer, vortexen und in den Thermomixier bei 56°C und Zentrifugation bei 9000 U/min für 15 Minuten
- 5) Zentrifugation über eine Minute
- 6) Komplette Lösung in beschriftete QIAamp-Säule geben und Zentrifugation bei 8000 U/min für zwei Minuten durchführen
- 7) Säulen auf neue Cup stecken und 500 µl AW1-Waschpuffer geben und Zentrifugation bei 8000 U/min für zwei Minuten

- 8) Säulen auf neue Cup stecken und 500 µl AW2-Waschpuffer geben und Zentrifugation bei 8000 U/min für zwei Minuten durchführen
- 9) Säulen auf neue Cup stecken und für fünf Minuten bei 11.000 U/min zentrifugieren, um die Säulenmembran zu trocknen
- 10) Säulen auf neue Cup stecken, 70 µl AE-Puffer auftragen und wiederum für fünf Minuten bei 11.000 U/min zentrifugieren, um das DNA-Eluat zu erhalten

2.2.8. Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Durch die PCR erfolgt eine *in vitro*-Amplifikation ausgewählter genomischer DNA-Abschnitten mittels definierter Primer [Mullis et al. 1986]. Die PCR-Reaktion läuft in vier Phasen ab.

Während der *DNA-Denaturierung* wird die doppelsträngige Ursprungs-DNA durch Hitzeeinwirkung (Melting bei 94°C über 1 Minute) in Einzelstränge aufgetrennt. Diese Einzelstränge dienen im weiteren Verlauf als Matrize für die Synthese neuer DNA-Abschnitte.

Während der *Primeranheftung* kann sich ein vorher definiertes Primerpaar (up- and down-Primer, entsprechend einem Startermolekül) an die DNA-Einzelstränge anlagern (Annealing), wobei eine für den Primer spezifische Temperatur einzuhalten ist.

In der *Elongationsphase* verlängert eine thermostabile DNA-Polymerase mit zugefügten DNA-Bausteinen (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) den neuen DNA-Strang bei 72 °C für eine Minute. Um die Automatisierung des Verfahrens zu ermöglichen, gilt die Taq-Polymerase, gewonnen aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, als Prototyp. Als Verknüpfungsstartpunkt der komplementären Basen entlang der Matrize, dient der gewählte Primer. Durch die Wiederholung der Zyklen gezeugt man eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle. Dies bedeutet, dass man mit lediglich etwa 20 Reaktionen bereits 220 Kopien erhält, was einer 106-fachen Vermehrung der Ausgangs-DNA entspricht. Dadurch ist es möglich, dass ursprünglich nur in Spuren vorhandenes genetisches Material vervielfältigt und somit einer molekulärbiologischen Untersuchung zugänglich gemacht werden kann.

Im vierten PCR-Schritt (*Abkühlung*) wird die Temperatur des Ansatzes auf 4 °C gesenkt, um unspezifische Primerreaktionen zu vermeiden.

Die PCR ist ein hochsensibles DNA-Vervielfältigungsverfahren, bei dem hochspezifische und hochempfindliche Enzyme verwendet werden. Auf äußerste Sauberkeit und Genauigkeit ist zu achten, um mögliche Verunreinigungen des Probenansatzes zu vermeiden [Kwok et al. 1989]. Für die Durchführung der PCR sind deshalb besonders ausgestattete Arbeitsplätze erforderlich. Der Arbeitsablauf umfasst folgende Teilschritte:

- 1) Wischdesinfektion des Arbeitsplatzes
- 2) Tragen von Einmalhandschuhen
- 3) Verwendung von frischen Milliporewasser und Reagenzien

Nach der Arbeitsplatzvorbereitung und Bereitstellung der benötigten Reagenzien bzw. Template-DNA auf Eis wurde der Reaktionsansatz nach folgender Vorschrift pipettiert (siehe Tabelle 6):

Komponente	Komposition im Master-Mix		Komposition der Stammlösung
	µl	Endkonzentration	Ausgangskonzentration
H ₂ O	21,1		
DMSO	1,5	5 %	100 %
MgCl ₂	1,8	1,5 µM	25 mM
10 x Rx-Buffer	3,0	1 x	10 x
DNTPs	0,6	0,2 mM	10 mM
Primer 1	0,4	0,3 µM	10 µM
Taq-Pol	0,1	0,02 U/µl	5 U/µl
GESAMT	28,5		
add 28,5 µl Master-Mix zu 1,5 µl template-DANN			

Tabelle 6: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der PCR (Master-Mix) pro einzelner DNA-Probe

Das Endvolumen des DNA-Probe/Reaktionsansatzes betrug 30 µl. Dieser bestand aus 28,5 µl Reaktionsmix und 1,5 µl DNA-templet.

Die in sterilen und gekennzeichneten Reaktionsgefäß angesetzten Proben wurden bis zur DNA-Denaturierung auf Eis gelagert. Der Thermocycler unterzog die Proben dem programmierten und auf den jeweiligen Primer (Temperaturvorgabe) abgestimmten PCR-Zyklus. Insgesamt wurden 30 PCR-Zyklen durchlaufen (siehe Tabelle 7).

PCR-Schritt	Temperatur	Zeitdauer	Kommentar
1.	94°C	2 min.	
2.	94°C	1 min.	
3.	65-50°C	1 min.	Touchdown
4.	72 °C	1 min.	
5.	92 °C	1 min.	
6.	50 °C	1 min.	30 x
7.	72 °C	1 min.	
8.	72 °C	8 min.	

Tabelle 7: Programmierung der einzelnen PCR-Schritte im Thermocycler

Um die Sauberkeit der PCR zu kontrollieren, lief bei jedem PCR-Ansatz eine Negativ-Kontrolle (Wasser plus Mastermix) mit. Bei eingetretenen Verunreinigungen wurden die PCR-Produkte als auch die Reagenzienansätze verworfen.

2.2.9. Panel ausgesuchter Primer

Der Annahme folgend, dass LOH und MSI sowohl in nicht-leukämischen CD34-negativen Zellen der Remissionshämatopoese als auch in AML-Blasten vorkommen können, wurden in beiden Zellfraktionen verschiedene Genloci untersucht.

Die Primer D2S123, APC und Mfd15 wurden ausgewählt, da sie nach Erfahrungen aus Studien beim hereditären non-polypösen Kolonkarzinom hoch spezifisch für den Nachweis von MSI bzw. genetischer Instabilität sind.

Im Weiteren wurden durch die Wahl der Primer D7S486 und D7S525 Genregionen auf dem Chromosom 7q untersucht, welche bei akuter myeloischer Leukämie und myelodysplastischem Syndrom häufig Deletionen zeigen.

Der Primer D11S1356 wurde in das Untersuchungsspektrum wegen der bekannten Tandem-Duplikation im MLL-Gen bei AML-Patienten mit normalen Karyotyp aufgenommen. Diese Tandem-Duplikation gilt als spezifisch ungünstiger Prognosefaktor.

Die Genregion von ETO wurde auf Grund seiner Beteilung an der bei AML häufig zu findenden Translokation t(8; 21)(q22; q22) mit dem Fusionsprodukt AML1-ETO untersucht.

Mutationen des Tumor-Suppressorgens p53, die auf dem Chromosomenabschnitt 17p13 lokalisiert sind, wurden mit dem Primer TP53ASL geprüft, da entsprechende Mutationen eine wichtige Rolle in der „multistep process“-Theorie der Krebsentstehung haben. Erworbene somatische Mutationen des p53-Gens können bei soliden Tumoren in über 50% nachgewiesen werden. Das p53-Protein gehört in die Gruppe der „Mismatch-Repair-Proteine“ (MMR), d.h. durch dieses postreplikative DNA-Reparatursystem können DNA-Replikationsfehler behoben werden. Ein Verlust der p53 Funktion führt zu einer Anhäufung von zytogenetischen und molekulargenetischen Mutationen. Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass die Regionen um 5q, 7q und 17p, häufig bei Patienten mit komplex aberranten Karyotyp, Verluste von genetischem Material zeigen und somit aufschlussreich für die vorliegende Untersuchung sein können. Die nachfolgenden Tabellen 8 und 9 zeigen den Aufbau des Primer-Panels sowie die einzelnen Primersequenzen.

Primer	Chromosom	Genregion
D2S123	2p16	Human MSH2
APC	5q21-22	APC
D7S486	7q31-1	Unbekannt
D7S525	7q22-31.1	c-met
D8S559	8q22	ETO
D11S1356	11q23	MLL
Mfd 15	17q11.2-12	BRCA 1
TP53ASL	17p12-13.1	p53

Tabelle 8: Struktur des Primer-Panels

Bezeichnung	Primersequenz
D7S486-U-Fam	5'-(6-Fam)AAAGGCCAATGGTATATGCC-3'
D7S486-D	5'-GCCCAAGGTGATTGATAGTGC-3'
D7S525-U-Fam	5'-(6-Fam)GTTAGCCGAGATTGCC-3'
D7S525-D	5'CTTGCTGTTAACGTACCAAGTTC3'
D8S559-U-Hex	5'-(Hex)AATTGAAGTGAGGTAGGAGGTTG-3'
D8S559-D	5'-AGCTATTGCTCTTACAGGAGGG-3'
D11S1356-U-Hex	5'-(Hex)GTTGCTCATCTGTTGCTCA-3'
D11S1356-D	5'-ACCTGCCCTGACTTGC3-'
TP53ALS-U-FAM	5'-(6-Fam)TCGAGGGAGGTTGCAGTAAGCGGA-3'
TP53ALS-D	5'-AACAGCTCCTTAATGGCAG-3'
D2S123-U-Fam	5'-(6-Fam)AACACGGATGCCTGCCTTA-3'
D2S123-D	5'-GGACTTTCCACCTATGGGAC-3'
APC-U	5'-ÁCTCACTCTAGTGATAAATCG-3'
APC-D-HEX	5'-(Hex)AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3'
MFD15-UNed	5'-NED-GGAAGAATCAAATAGACAAT-3'
MFD15-D	5'-GCTGGCCATATATATTTAAACC-3'

Tabelle 9: Darstellung der Struktur der eingesetzten Primersequenzen des Panels

2.2.10. Detektion von Mikrosatelliteninstabilitäten (LOH, MSI) mittels ABI PRISM®

3100 Genetic Analyzer

Der Genetische Analysator ABI Prism®3100-Avant ist ein Fluoreszenz-Elektrophoresegerät mit vier Kapillaren für die automatisierte DNA-Analyse.

Das Nachweissprinzip beruht darauf, dass eine große Anzahl von Mikrosatelliten hochpolymorph ist. Dies bedeutet, dass das maternale und paternale Allel unterschiedlich lange Sequenzen von Mikrosatelliten besitzt. In der Analyse werden die speziellen Sequenzen mit fluoreszierenden Primern amplifiziert (PCR-Verfahren), um anschließend elektrophoretisch im ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer ihrer Länge nach aufgetrennt und graphisch dargestellt werden zu können. Um Verunreinigungen der PCR-Produkte zu detektieren, wurden jeweils Negativkontrollen mit untersucht.

Anschließend können die Graphen der Blasten-DNA mit jenen der Referenz-DNA (z.B. CD34-negative Zellen, Epithelzellen der Wangenschleimhaut) desselben Patienten, anhand ihrer Mikrosatelliten-Mustern verglichen werden.

Vorgehensweise:

Das Probenaliquot (1 µl des PCR-Produkts) wird mit 12 µl Hidi-Formamid und 0,7 µl Genescan Rox 400 (systemspezifischer roter Längenstandard), vermischt und auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Anschließend wird die Platte in den Analyzer geladen.

Im Gerät befindet sich zwischen der Kathode und der Anode eine mit gelartigem Polymer befüllte Kapillare. Nach Anlage eines elektrischen Feldes wandern die fluoreszierenden Mikrosatelliten entsprechend ihrer Länge durch diese Kapillare. Die Fragmente fluoreszieren nach Anregung durch einen Laserstrahl und werden dann von einer Digitalkamera detektiert. Die Fluoreszenzsignale werden in digitale Messwerte umgewandelt, mit dem Systemstandard verglichen und graphisch sowie zahlenmäßig dargestellt. Dies erlaubt sowohl eine visuelle als auch statistische Analyse der Daten.

Die Probenanalyse der CD34-positiven Stammzellen im Vergleich zu konstitutionelle DNA enthaltenen Vergleichszellen bzw. zu CD34-negativen Zellen (Epithelzellen der Wangenschleimhaut, Zellen von Knochenmarksausstrichen desselben Patienten) lassen sich vier unterschiedliche Ergebnisse ermitteln.

- 1) Mikrosatellitenstabilität (MSS): beide Allele sind sowohl in der Proben-DNA als auch in der Referenz-DNA identisch.
- 2) Nicht informativer Fall (ni): in der Probe als auch in der Referenz-DNA ist nur ein Allel dargestellt bzw. die Länge der Allele ist identisch und somit nicht auftrennbar
- 3) Loss of Heterozygosity (LOH)
- 4) Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Als LOH wurden Auffälligkeiten angenommen, bei denen Allele um 50% reduziert oder ganz verloren gegangen sind. Zur Vermeidung von Auswertungsfehlern wurde eine rechnerische Auswertung der ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer-Daten durchgeführt. Der Cut-off Level für die LOH-Berechnung betrug < 0,7 bzw. > 1,43. Die Berechnung erfolgte anhand der Formel

$$AR = (L1/L2) / (N1/N2).$$

wobei L für die Peak-Höhe der beiden Allele von den Blasten und N für die Allele der Referenz-DNA steht (siehe Abbildung 7).

Bei reinen Zellpopulationen wird in der Literatur ein Cut-off Level für das Vorliegen eines LOH im Bereich > 2 bzw. $< 0,5$ genannt. Da es sich bei den CD34-negativen Zellen, den Wangenschleimhautepithelzellen und den AML-Blasten jeweils um eine polyklonale Zellpopulation handelt, wurde für die vorliegende Arbeit ein schwächerer und sensiblerer Cut-Off-Level von $> 1,43$ bzw. $< 0,7$ verwendet.

Ein „MSI“ lag vor, wenn eine zusätzliche Bande bzw. Banden im Bereich der spezifischen Allele auftraten oder wenn ein Verschieben eines Allelsignals nachweisbar war. Diese Analyse wurde von drei unabhängigen Untersuchern vorgenommen.

Wichtig bei LOH-Untersuchungen ist die Heterogenität. Es müssen hierbei zwei Allele vorhanden sein, damit es sich um einen informativen Fall handelt bzw. damit ein Verlust eines Allels nachgewiesen werden kann. Bei einer homozygoten Ausprägung bzw. dem Vorliegen eines nicht informativen Falles ist der Nachweis eines LOH nicht möglich. Begründbar durch die Tatsache, dass bei homozygoten Erbanlagen zwei gleich lange DNA-Banden vorliegen, welche durch den „Genetic Analyzer“ nicht aufgetrennt werden können. Derartige Fälle werden in der vorliegenden Arbeit als „ni“ bzw. nicht informativ betrachtet.

Als Genetische Instabilität (GIN+) wurde Ergebnisse betrachtet, in denen bei zwei oder mehr Primern bzw. Genloci ein LOH und/oder ein MSI detektiert wurde. Als Mikrosatellitenstabilität (MSS) wurden Fälle bezeichnet, in denen weder MSI noch LOH aufgefunden werden konnte. Es mussten mindestens 50% bzw. 70% der Zellen klonalen Ursprungs sein, um mit der dargelegten Methode ein MSI bzw. ein LOH detektieren zu können.

Die nachfolgenden Abbildungen 7 bis 10 illustrieren die Interpretation der vier Befundkonstellationen anhand ausgewählter Beispiele.

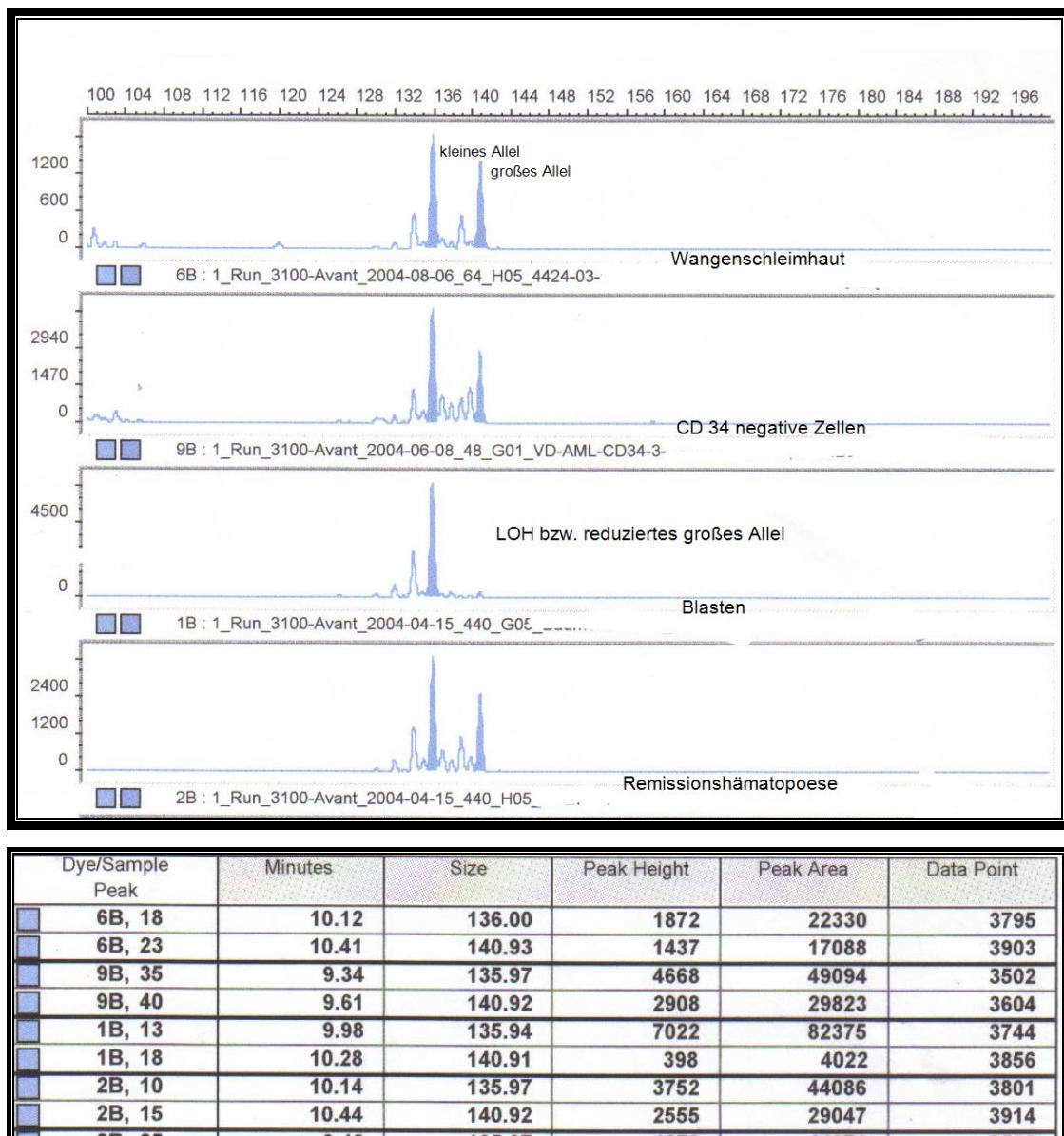


Abbildung 7: Bildbeispiel für ein LOH; Blasen eines Patienten mit AML-Erstdiagnose, Remissionshämatopoese aus Knochenmarksabstrichen, CD34-negativen Zellen und Epithelzellen der Wangenschleimhaut.

Rechenbeispiel: $AR = (L1/L2)/(N1/N2) = (398/7022) / (2908/4668) = 0,09$

Daraus folgt ein LOH, da $AR < 0,7$.

L1 = Peak-Höhe des großen Allels der Blasen bei Erstdiagnose

L2 = Peak-Höhe des kleinen Allels der Blasen bei Erstdiagnose

N1 = Peak-Höhe des großen Allels der Referenz-DNA

N2 = Peak-Höhe des kleinen Allels der Referenz-DNA

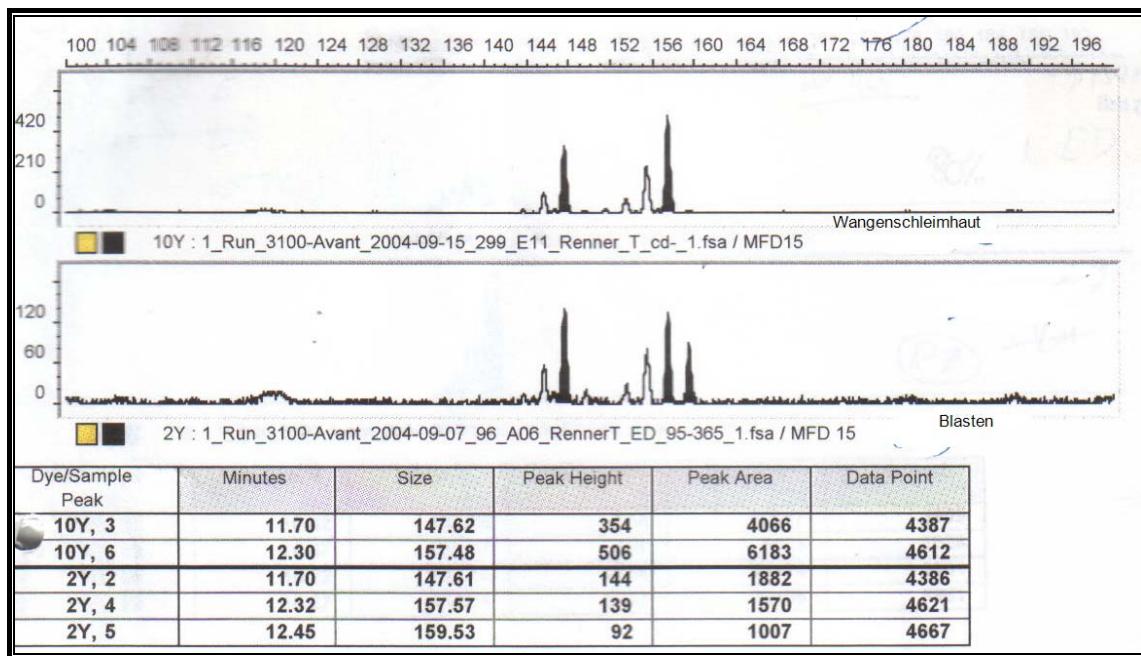
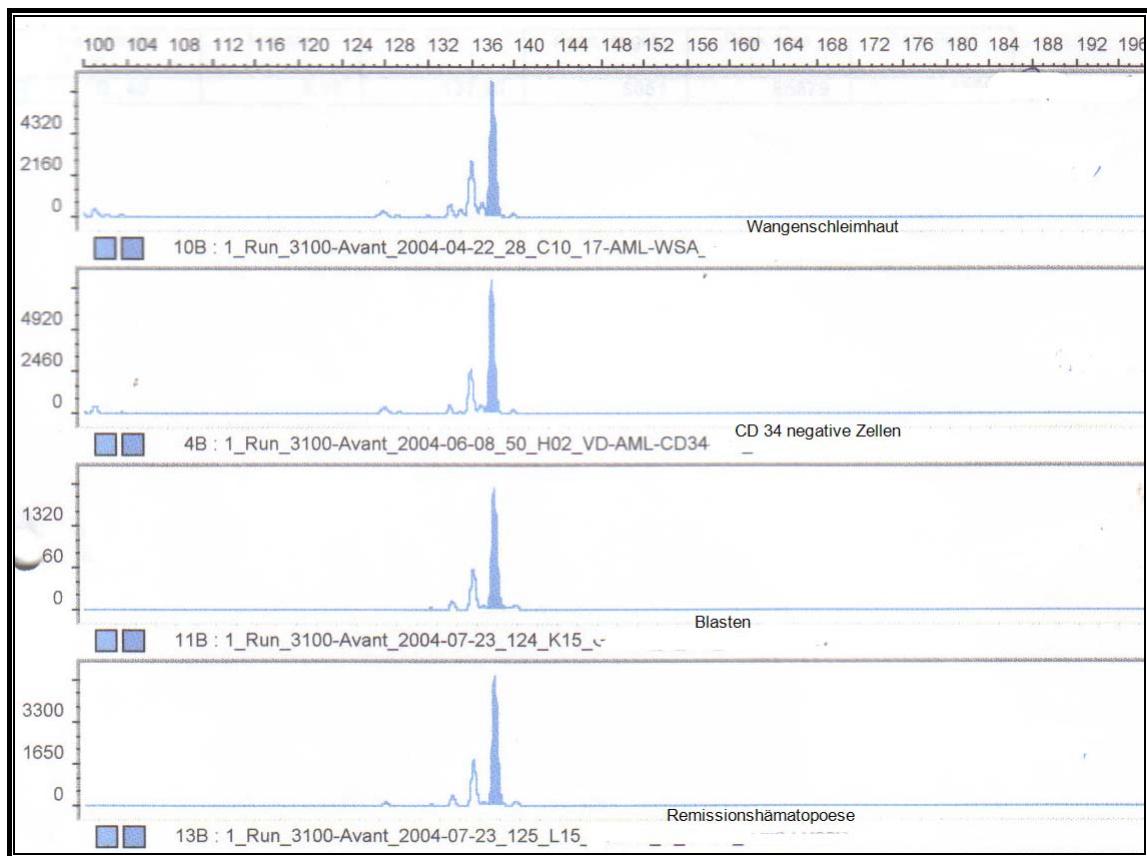
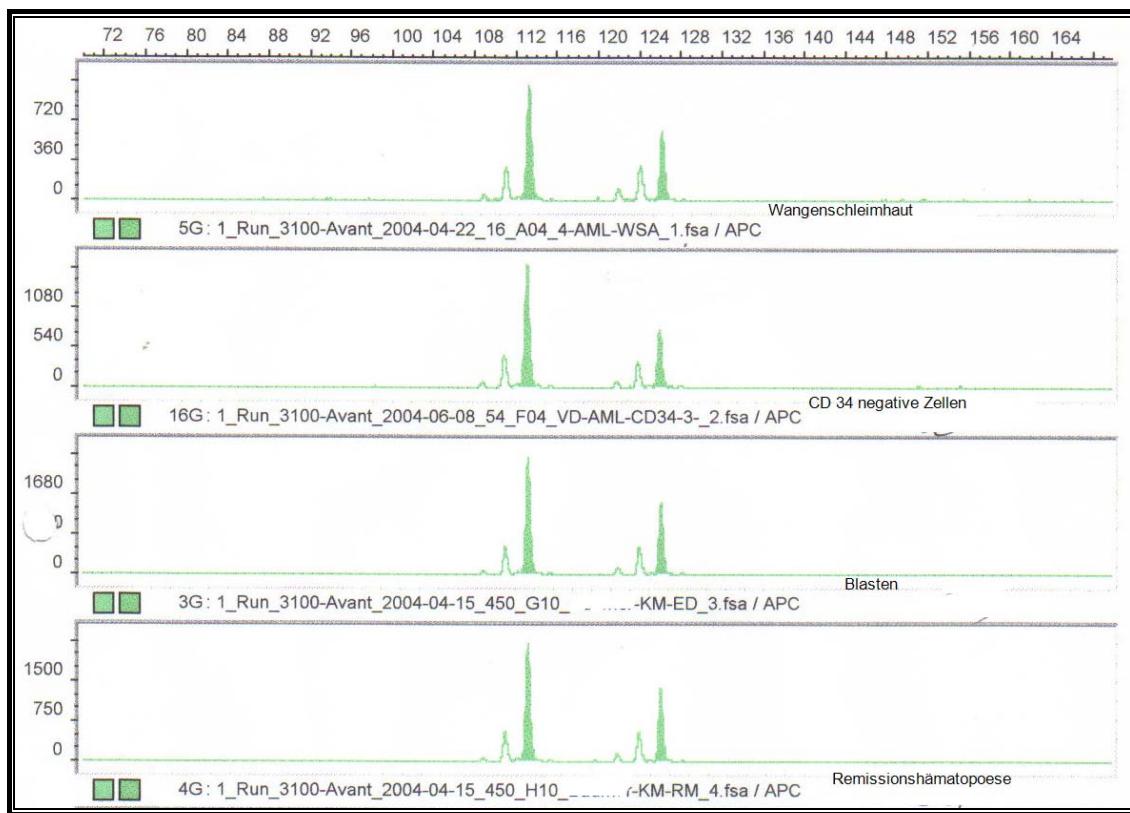


Abbildung 8: Bildbeispiel für ein MSI in den AML-Blasten aus Knochenmarksabstrichen



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
10B, 41	11.70	138.00	7072	103603	4389
4B, 31	9.15	137.87	7946	84036	3432
11B, 5	11.19	138.04	1935	25396	4197
13B, 10	11.27	138.05	5169	67344	4225

Abbildung 9: Bildbeispiel für einen nicht informativen Fall (ni), Homozygote Allele



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
5G, 6	9.78	113.35	1066	14130	3667
5G, 9	10.60	126.31	645	8404	3974
16G, 9	8.54	113.22	1689	18903	3203
16G, 14	9.25	126.09	789	9044	3470
3G, 4	9.21	113.31	2512	29605	3454
3G, 10	9.99	126.20	1542	18818	3746
4G, 4	9.38	113.28	2227	27319	3516
4G, 10	10.17	126.20	1414	17283	3815

Abbildung 10: Bildbeispiel für eine Mikrosatellitenstabilität (MSS) in Epithelzellen der Wangenschleimhaut, CD34-negativer Zellen, AML-Blasten und Remissionszellen aus Knochenmarksausstrichen

2.3. Eingesetzte Gerätschaften, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Chemikalien

Folgende Gerätschaften wurden im Rahmen der notwendigen Untersuchungen eingesetzt:

Apharesegerät	Cobe Spectra Zellseparator, München, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, BBD 6220, Hanau, Deutschland
FACS	Coulter® EPICS® XL-MCL flow cytometer (Beckman Coulter)
	ADVIA-120® clinical haematology analyzer (Bayer)
PCR-Cycler	MJ Research, PTC 200
	Peltier Thermo-Cycler Biozym (Hess Oldendorf)
ABI PRISM® 3100	Applied Biosystem Darmstadt Genetic Analyzer
Mikroskope	Leica, Wild MPS 52, Wetzlar, Deutschland
Sterilbank	Clean Air, Modell Ca/REVS 4
	Clean Air Deutschland GmbH
	Hilden, Deutschland
Vortexer	Genie 2, Scientific Ind., Bohemia, N.Y., USA
Zentrifuge	Megafuge 1.0, Heraeus Depa Tech, Hanau, Deutschland
Zählkammer	Neubauer improved, Tiefe 0,100 mm, Marienfeld, BRD
Pipettierhilfen	Eppendorf Reference, 10/100/1000 µl, Eppendorf 300
	Mehrfachpipette, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Pipetboy acu, IBS Integra Biosciences, Walliselle, Schweiz
Multipipetten	Finnpipette (Neolap)

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden im Rahmen der notwendigen Untersuchungen verwendet:

MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Pre Separation Filter 30µm	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
QIAamp DNA Micro Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
DNA High templet preparation Kit	Roche, Mannheim preparation Kit
Pipetten: Falcon	Becton Dickinson Labware, USA
Röhrchen: Falcon	Becton Dickinson Labware, USA
Filter: Falcon	Becton Dickinson Labware, USA
Pipettenspitzen:	
gestopft:	Biozym, Oldendorf
ungestopft:	Sarstedt, Nümbrecht
ungestopft 20-300 µl	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Cryo Tube 1,8 ml	Nunc A/S, Dänemark
Stripps 8er	Biozym
96er Well-Platte	Applied Biosystem Darmstadt

Folgende Reagenzien und Chemikalien wurden im Rahmen der notwendigen Untersuchungen benutzt:

Biocoll	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid, Sigma, Deisenhofen
DNase	Roche
FCS	Fetal Calf Serum, GIBCO
Heparin	Heparin-Natrium-7500-ratiopharm Ratiopharm GmbH, Deutschland
MgCl	Roche, Mannheim
dNTP	Roche, Mannheim
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Sigma, Deisenhofen
TAG-Polymerase	Roche, Mannheim
PCR Puffer	Roche, Mannheim
Primer	Metabion (Martinsried)
Wasser für HPLC	Applied Biosystem Darmstadt und Genset SA Paris
Hidi Formamid	Neolap, Heidelberg
Genescan Rox 400	Applied Biosystem Darmstadt
Trypanblau	trypan blue solution (0,4%), Sigma Deisenhofen
CD ³⁴ Micro Beads	Miltenyi Biotec GmbH (monoklonale Maus CD 34 AK Klone: QBEND10)
FCR-Blocking Reagent	Miltenyi Biotec GmbH (Human IgG)
PE-anti-CD34 mAB	BD Biosciences (Klone: 8G12)
PE-Cy5- anti CD 45mAB	IOTest (Klone J33)

2.4. Statistische Methoden

Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden zunächst in eine Excel-Matrix überführt und auf Konsistenz bzw. Validität kontrolliert. Danach wurden die Daten zum Zweck der Auswertung in das Statistikprogramm SAS überführt.

An beschreibenden Parametern wurden die absolute (n) und relative (%) Häufigkeit sowie Mittelwert bzw. Median, Minimum und Maximum (Range) berechnet. An statistischen Methoden wurden bei nominalskalierten Variablen wie Geschlecht oder bei dichotomisierten Variablen wie LDH-Wert (≤ 700 U/L oder in > 700 U/L) zum statistischen Vergleich der χ^2 -Test oder (bei zu geringen Gruppengrößen) der Fisher-Exact-Test verwendet.

Für die Berechnung des rezidivfreien Überlebens und der Analyse darauf einwirkender dichotomisierter Einflussfaktoren (Alter: ≤ 50 Jahre vs. > 50 Jahre; zytogenetisches Risikoprofil: gutes Risikoprofil vs. mäßiges bis schlechtes Risikoprofil; LDH-Wert: ≤ 700 U/l vs. > 700 U/l; genetische Instabilität: keine GIN vs. GIN) wurde der Kaplan-Meier-Log-Rank-Test benutzt. Als Endpunkt der Berechnung wurden der Zeitpunkt des Auftretens eines gesicherten Rezidivs oder myelodysplastischen Syndroms bzw. bei Fehlen dieses Ereignisses die Zeit bis zum Ende des Beobachtungszeitraums verwendet. In den Fällen, in denen keine komplette Remission erreicht wurde, wurde als rezidivfreies Überlebensintervall ein fixer Wert von einem Monat angenommen. Patienten, die als primäre Konsolidationstherapie die allogene Stammzelltransplantation erhielten, wurden nicht in die Überlebenszeitanalyse eingeschlossen.

Für die Bestimmung der prognostischen Relevanz einer genetischen Instabilität und weiteren dichotomisierten klinischen Parametern (Alter, LDH, Karyotyp, AML-Typ) wurde eine multivariate Cox-Regressions verwendet. Zuerst wurde dieses Modell nur für bekannte Prognosekriterien verwendet (Alter, LDH, Karyotyp) danach wurde die genetische Instabilität mit einbezogen. Schließlich wurde eine rückläufige, schrittweise erfolgende Selektion (limitiert durch p-Werte = 0,2) durchgeführt. Als Kriterium für den Einschluss eines Faktors in das Modell wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ gewählt.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung des Referenzmaterials (Plattenepithelzellen der Wangenschleimhaut, Zellen der CD34-negativen Zellfraktion aus Leukapheresenprodukten, Zellen von Ausstrichen aus Knochenmarksbröckel in 1. Remission) auf genetische Instabilität

In die vergleichende Untersuchung der autologen Referenzzellen wurden Zellfraktionen (CD34-negative Zellfraktion, Wangenschleimhautzellen, Knochenmarkausstriche) von 18 AML-Patienten eingeschlossen. Ebenso wurden CD34-negative Zellfraktion und Wangenschleimhautzellen von 12 "Nicht-AML"-Patienten verwendet, die intensiv chemotherapeutisch vorbehandelt worden waren, jedoch nicht an einer hämatologischen Stammzellenerkrankung litten. Deshalb wurden von diesen 12 Patienten auch keine Knochenmarksausstriche gewonnen. Die Nicht-AML-Patienten wurden einbezogen, um zu klären, ob eventuell eine MIS oder eine LOH in der CD34-negativen Zellfraktion durch eine vorausgegangene intensive Chemotherapie induziert werden kann.

Die CD34-negative Zellfraktion bei den Patientengruppen war ursprünglich als "Backup" für eine periphere Blutstammzelltransplantation vorgesehen. Die Abstrichproben der Wangenschleimhäute waren während der ambulanten bzw. stationären Aufenthalte der Patienten gewonnen worden. Bei den AML-Patienten waren die Knochenmarksausstriche aus Knochenmarksbröckeln gewonnen worden.

Die CD34-negative Zellfraktion wurde zum Zeitpunkt der ersten hämatologischen Remission des Patienten aus den Aphereseprodukten gewonnen. Abstriche der Wangenschleimhaut wurden nach der Applikation der Chemotherapie (Induktions- und Konsolidationstherapie) oder nach einer durchgeführten allogenen Blutstammzelltransplantation gewonnen. Die Knochenmarksausstriche wurden zum Zeitpunkt der ersten hämatologischen Remission der AML-Patienten und zum Teil auch nach allogener Blutstammzelltransplantation angefertigt.

Von den insgesamt betrachteten 30 Patienten beider Subgruppen erhielten zehn Patienten eine allogene Stammzelltransplantation. Zwei dieser Patienten wurden in 1. Remission transplantiert (s. Tabelle 10 und 11).

Pat-ID	Alter (J)	Diagnose	Z.n. allogener PBSZT bei WSA-Entnahme	Entnahmzeitpunkt	Entnahmzeitraum nach letzter Chemo-therapie
AML-Patientengruppe (n=18)					
1	48	AML-M2	nein	nCHT	10 Jahre
2	44	AML-M2	nein	nCHT	9 Jahre
3	52	AML-M3	nein	nCHT	4 Jahre
4	44	AML-M2	nein	nCHT	7 Jahre
5	42	AML-M0	ja, prim. aPBSZT	nCHT/aPBSZT	5 Jahre
6	47	AML-M2	nein	nCHT	2 Jahre
7	62	AML-M0	nein	nCHT	2 Jahre
8	48	AML	ja, im Rezidiv	nCHT/aPBSZT	6 Jahre
9	68	AML-M4eo	nein	nCHT	7 Jahre
10	53	AML-M5	ja, im Rezidiv	nCHT/aPBSZT	5 Jahre
11	24	AML-M4eo	ja, im Rezidiv	nCHT/aPBSZT	1 Jahr
12	49	AML-M1	ja, im Rezidiv	nCHT/aPBSZT	3 Jahre
13	50	AML-M2	ja, prim. aPBSZT	nCHT/aPBSZT	1 Jahr
14	37	sAML-M5	nein	nCHT	3 Jahre
15	34	AML-M2	ja, im Rezidiv	nCHT/aPBSZT	4 Monate
16	40	AML-M1	ja, im Rezidiv	nCHT/aPBSZT	4 Monate
17	19	AML-M2	nein	nCHT	2 Monate
18	53	AML-M5a	nein	nCHT	4 Monate

Tabelle 10: AML-Patientenpopulation (n=18) für den Vergleich der genetischen Instabilität in den Plattenepithelien der Wangenschleimhaut (WSA) versus der CD34-negativen Zellfraktion aus Leukaphereseprodukten in der ersten hämatologischen Remission. Zusätzlich Angabe, ob eine allogene periphere Blutstammzelltransplantation (PBSZT) erfolgte und wann in Bezug auf das Therapiestadium die WSA gewonnen wurde; nCHT = nach Chemotherapie; aPBSZT = allogene periphere Blutstammzelltransplantation

Pat-ID	Alter (J)	Diagnose	Z.n. allogener PBSZT bei WSA-Entnahm	durchgeführte intensive Chemotherapie vor Probennahme	Entnahmzeitraum nach Chemotherapie
Nicht-AML-Patientengruppe (n=12)					
19	22	Ewing-Sarkom	nein	10xIdarubizin, Dexamethason, 1xIEV	2 Mo.
20	62	Mantelzell-L.	nein	4xBEACOPP, 1xVIPE	1 Jahr
21	50	M. Hodgkin	nein	6xCHOP21, 1xVIPE/Mabthera	2 Jahre
22	35	M. Hodgkin	nein	4xCHOP, 1xCHOEP	2 Jahre
23	58	Plasmozytom	nein	4xCHOP/Mabthera, 1CHOEP	2 Jahre
24	47	B-NHL	nein	6xCHOEP, 1xMabthera/VIPE	1 Monat
25	44	B-NHL	ja, im Rezidiv	4xVIDE	1 Jahr
26	52	B-Zell-L.	nein	2xRibomustin/Fludarabin, 6xFludarabin/Endoxan, 1xEndoxan-Etoposid	3 Jahre
27	57	B-NHL	nein	4xCHOP14/Rituximab, 1xCHOEP/Rituximab	2 Jahre
28	32	B-NHL	nein	6xCHOP, 1xVIPE	6 Monate
29	60	B-NHL	nein	8xCHOP, 6xABVD, 1xCEP, 1xVIPE	2 Monate
30	42	NK-Zell-L.	ja, im Rezidiv	6xCHOP, 1xVIPE	2 Jahre

Tabelle 11: Nicht-AML-Patientenpopulation (n=12) für den Vergleich der genetischen Instabilität in den Plattenepithelien der Wangenschleimhaut (WSA) versus der CD34-negativen Zellfraktion aus Leukaphereseprodukten in der ersten hämatologischen Remission. Zusätzlich Angabe, nach welcher Chemotherapie die WSA entnommen wurde und wann in Bezug auf das Therapiestadium die WSA gewonnen wurde; NHL = Non-Hodgkin-Lymphom; L. = Lymphom

Die CD34-negative Zellfraktion beinhaltete Lymphozyten und Monozyten und wurde nach Gewinnung aus den Leukaphereseprodukten auf ihre Reinheit überprüft. Hierbei wurde die Kontaminationsrate mit hämatologischen Remissionszellen bzw. mit CD34-positiven Zellen festgestellt. Gemessen wurde mittels FACS (Coulter® EPICS® XL-MCL flow cytometer) eine Reinheit der CD34-negativem Zellfraktion von im Median 95% (Range: 89-98%). Dieses Ergebnis stellte sicher, dass das Zellpellet im Median aus 95% Zellen der CD34-negativen Fraktion bestand. Diese Reinheitswerte wurden nach zweimaliger Passage der MACS Separation Columns (Verfahrensoptimierung nach Herstellerangaben siehe 2.2.3) erzielt. Dadurch gelang es, das Risiko einer Verunreinigung der Zellproben mit eventuell durch die Chemotherapie geschädigten Zellen mit genetisch instabiler Remissionshämatopoiese bzw. mit CD34-positiven Stammzellen zu minimieren.

Mit dem ausgewählten Primerpanel wurde die genetische Instabilität in den Referenzzellproben untersucht. Diese Untersuchung erstreckte sich bei den 30 Patienten auf insgesamt 194 Genorte.

In der 18 Patienten umfassenden Patientengruppe traten bei dreizehn Genorten (6,7%) bzw. bei vier Patienten (ID 1, 10, 11, 13) eine genetische Instabilität respektive unterschiedliche Kurvenverläufe in den Kapillarelektrophoresen (LOH/MSI) zwischen den Plattenepithelzellen der Mundschleimhaut und der CD34-negativen Zellfraktion auf. Hierbei waren die Primerpanele D7S486 (Chromosom 7q31-1), D7S525 (Chromosom 7q22-31.1), D8S559 (Chromosom 8q22), TP53 (Chromosom 17p12-13.1), D2S123 (Chromosom 2p16), APC (Chromosom 5q21-22) und MFD (Chromosom 17q11.2-12) positiv. In der Gruppe der 12 Nicht-AML-Patienten wurden keinerlei genetische Instabilitäten gefunden - siehe Tabelle 12.

Pat-ID	Primerpanel (Genlocus)								aPBSZT
	D7S486	D7S525	D8S559	TP53	D11S1356	D2S123	APC	MFD	
AML-Patienten (n=18)									
1	nein	GI	nein	nein	-	nein	nein	nein	-
2	nein	nein	nein	nein	-	nein	nein	nein	-
3	nein	nein	nein	nein	-	nein	nein	nein	-
4	nein	nein	nein	nein	-	nein	nein	nein	-
5	nein	nein	nein	nein	-	nein	nein	nein	ja
6	nein	nein	nein	nein	-	nein	nein	nein	-
7	nein	nein	nein	nein	-	nein	nein	nein	-
8	nein	nein	nein	nein	-	nein	nein	nein	ja
9	nein	nein	nein	-	-	nein	nein	nein	-
10	nein	GI	nein	GI	-	nein	nein	GI	ja
11	GI	nein	GI	GI	-	GI	GI	GI	ja
12	nein	nein	nein	nein	-	nein	nein	nein	ja
13	nein	nein	GI	nein	-	GI	nein	GI	ja
14	nein	nein	nein	nein	-	nein	nein	nein	-
15	nein	nein	nein	nein	-	nein	nein	nein	ja
16	nein	nein	nein	nein	-	-	-	-	ja
17	nein	nein	nein	nein	-	nein	nein	nein	-
18	nein	nein	nein	nein	-	nein	nein	nein	-
Nicht-AML-Patienten (n=12)									
19	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	-
20	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	-
21	-	-	-	-	nein	-	nein	nein	-
22	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	-
23	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	-
24	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	-
25	-	-	-	-	-	-	nein	nein	ja
26	-	-	-	nein	nein	-	nein	nein	-
27	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	-
28	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	-
29	nein	-	-	nein	nein	nein	-	nein	-
30	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja

Tabelle 12: Auftreten einer genetischen Instabilität (MSI und/oder LOH) bei Epithelzellen der Wangenschleimhaut und der CD34-negativen Zellfraktion bei AML-Patienten und nicht-AML-Patienten. nein = keine genetische Instabilität, GI = genetische Instabilität; - = Untersuchung nicht durchgeführt aPBSZT = allogene periphere Blutstammzelltransplantation

Ein auffälliges Ergebnis war, dass im Kollektiv der AML-Patienten nur bei bereits im Vorfeld der Untersuchung allogen transplantierten Patienten eine genetische Instabilität (LOH und/oder MSI) in den Plattenepithelzellen der Wangenschleimhaut gefunden werden konnte. War die Knochenmarksuntersuchung vor der allgogenen Blutstammzelltransplantation erfolgt, fand sich in keinem Fall eine LOH/MSI (siehe Tabelle 13).

Pat-ID	Therapie	Primer		KM-Untersuchung	
		CD34	WSA	nach aPBSZT	vor aPBSZT
1	I/K	MSS	MSI/LOH	nicht durchgeführt	MSS
2	I/K	MSS	MSS	nicht durchgeführt	MSS
3	I/K	MSS	MSS	nicht durchgeführt	MSS
4	I/K	MSS	MSS	nicht durchgeführt	MSS
5	aPBSZT	MSS	MSS	MSS	nicht durchgeführt
6	I/K	MSS	MSS	nicht durchgeführt	MSS
7	I/K	MSS	MSS	nicht durchgeführt	MSS
8	aPBSZT	MSS	MSS	MSS	MSS
9	I/K	MSS	MSS	nicht durchgeführt	MSS
10	aPBSZT	MSS	MSI/LOH	MSI/LOH	MSS
11	aPBSZT	MSS	MSI/LOH	MSI/LOH	MSS
12	aPBSZT	MSS	MSS	MSS	nicht durchgeführt
13	aPBSZT	MSS	MSI/LOH	MSI/LOH	nicht durchgeführt
14	I/K	MSS	MSS	nicht durchgeführt	MSS
15	aPBSZT	MSS	MSS	MSS	MSS
16	aPBSZT	MSS	MSS	MSS	MSS
17	I/K	MSS	MSS	nicht durchgeführt	MSS
18	I/K	MSS	MSS	nicht durchgeführt	MSS

Tabelle 13: Häufigkeit einer MSI und/oder LOH beim eingesetzten Primerpanel CD34 und WSA bei den 18 AML-Patienten unter Berücksichtigung des Zeitpunktes der Knochenmarkanalyse (KM) vor oder nach einer allogenen Blutstammzelltransplantation (aPBSZT) und der durchgeführten Chemotherapie (I/K = Induktions-/Konsolidationstherapie); MSS = Mikrosatellitenstabilität, MSI /LOH = MSI + Loss of Heterozygosity

Aus diesem Grund wurde versucht, die Ausstriche von Knochenmarksbröckel mit der Remissionshämatopoese bei den AML Patienten im Stadium der kompletten hämatologischen Remission vor (n=18) und (sofern vorhanden) auch nach allogener Stammzelltransplantation (n=8), zu untersuchen. Als Referenzzellen zu den Zellen der Knochenmarksausstriche von der Remissionshämatopoese wurden sowohl die CD34-negative

Zellfraktion der Leukapherese als auch die Plattenepithelzellen der Wangenschleimhaut verwendet.

In einem Fall (Pat.-ID 13), wo eine periphere allogene Stammzelltransplantation erfolgte, wurde die Knochenmarkspunktion und die WSA Entnahme nach der Transplantation durchgeführt und der Knochenmarksausstrich mit der hämatologischen Remission untersucht. Die genetische Instabilität (MSI), welche in den Plattenepithelzellen der Wangenschleimhaut im Vergleich mit der CD34-negativen Zellfraktion nachgewiesen wurde, konnte ebenfalls in den Remissionszellen des Knochenmarksausstrichs nach allogener PBSZT detektiert werden (s. Abbildung 11).

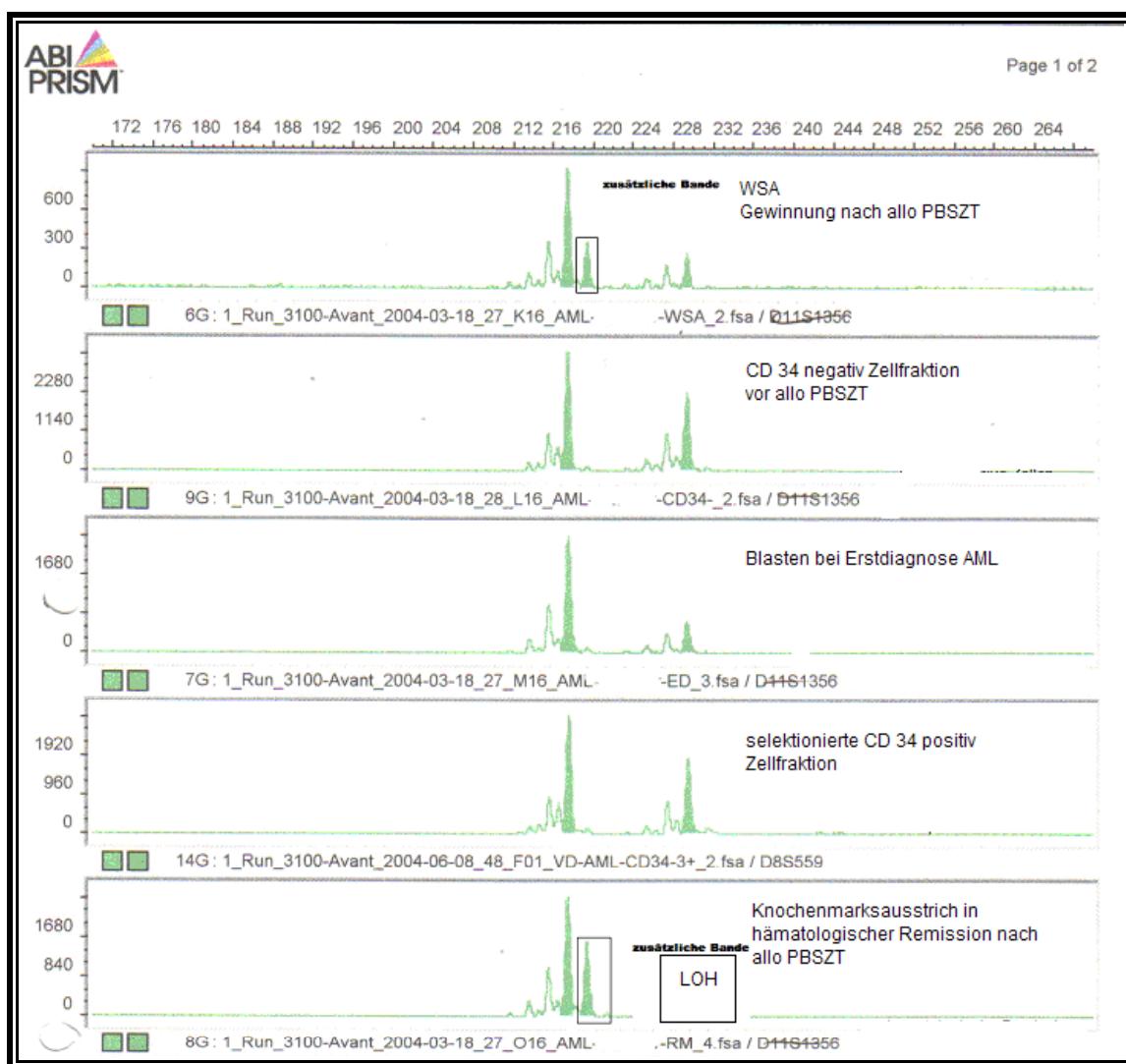


Abbildung 11: Patient ID 13: genetische Instabilität bzw. unterschiedliche Allelverläufe zwischen den Wangenschleimhautepithelzellen und der CD34- negativen Zellfraktion, Knochenmarksausstrich und Wangenabstrichentnahme nach erfolgter allogener peripherer Blutstammzelltransplantation

Eine weitere Patientin (siehe Abbildung 12) zeigte in den Zellen des Knochenmarkausstriches zum Zeitpunkt der ersten kompletten Remission vor der Blutstammzelltransplantation keine genetische Identität mit den Zellen des Wangenschleimhautabstriches auf. Die Zellen des Knochenmarksausstrichs der zweiten kompletten Remission, die nach erfolgter allogener Transplantation gewonnen worden waren, zeigten die gleichen genetischen Muster wie die Wangenschleimhauptepithelzellen auf, welche ebenfalls nach allogener PBSZT gewonnen worden waren.

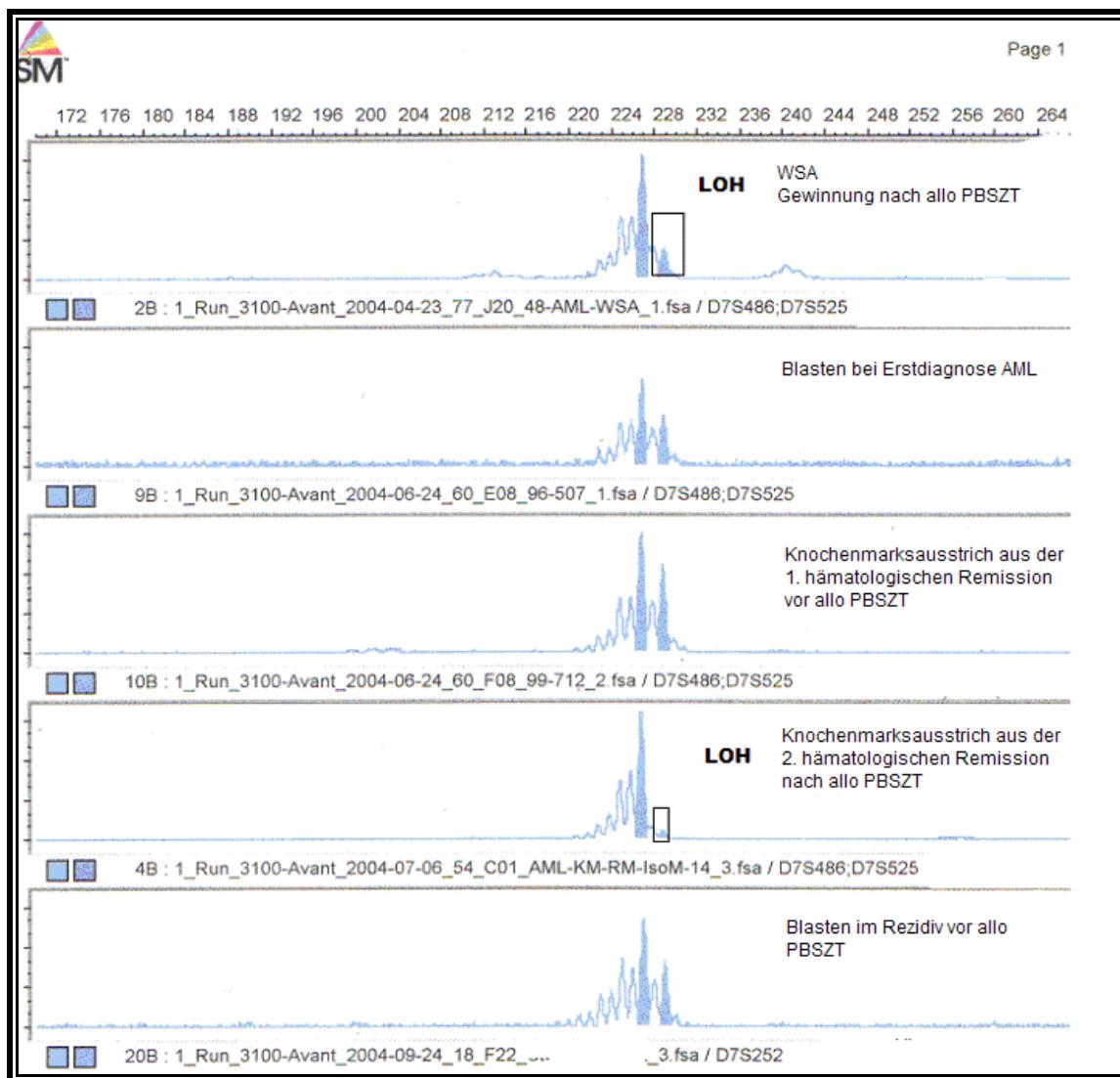


Abbildung 12: Patient ID 10: Darstellung der genetischen Instabilität (LOH) von den Zellen der Knochenmarksausstriche mit der hämatologischen Remission vor bzw. nach allogener peripherer Blutstammzeltransplantation; Blasen bei Erstdiagnose und im Rezidiv im Vergleich mit Wangenabstrich

Allerdings wiesen jedoch auch sieben Patienten (26,3% der untersuchten Genorte) keinerlei molekulargenetische Abweichungen bzw. unterschiedliche Allelverläufe zwischen den Plattenepithelzellen der Wangenschleimhaut und der CD34-negativen Zellfraktion auf, obwohl eine allogene periphere Blutstammzelltransplantation erfolgt war.

Eine Patientin (Pat-ID 1), die im Vorfeld keine allogene periphere Blutstammzelltransplantation erhalten hatte, wies an einem Genort (c-met) Veränderungen in den Wangenschleimhautepithelzellen auf, welche weder in den Blasten im Rahmen der AML-Erstdiagnose, in der CD34-negativen Rerreferenzzellfraktion noch in den Knochenmarkausstrichen zum Zeitpunkt der ersten Remission gefunden werden konnten.

3.2. Untersuchungen bezüglich genetischer Instabilität in Blasten aus Knochenmarkausstrichen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer akuten myeloischen Leukämie

Die DNA wurde aus den Blasten isoliert und auf genetische Instabilität hin untersucht. Als Referenzzellprobe wurde die CD34-negative Zellfraktion der Leukapherese, verwendet, die bei 58 Patienten während der kompletten hämatologischen Remission gewonnen worden war. Von den insgesamt 91 Patienten konnte bei 33 Patienten keine CD34-negative Zellfraktionen als Referenz benutzt werden. Dies erklärt sich dadurch, dass nur 65 Patienten eine komplette hämatologische Remission erreichten, wobei wiederum nur bei 58 Patienten ein „Back up“ der Leukapherese asserviert worden war. Bei 33 Patienten CD34-negativen Blasten wurden die Epithelzellen der Wangenschleimhaut als Referenzzellprobe verwendet.

Um eine Verfälschung der Untersuchungsergebnisse durch ein Überwiegen von „Nicht-Leukämiezellen“ auf den Knochenmarkausstrichen zu vermeiden, wurde der Blastenanteil in den Zellen der Knochenmarkausstriche berücksichtigt. Der Blastenanteil in den Knochenmarkausstrichen zum Zeitpunkt der AML-Erstdiagnose betrug mindestens 68% in allen Ausstrichen (Median 86%; Range 68-98%). Die Reinheit der CD34-negativen Zellfraktion (Anteil der B- und T-Lymphozyten) betrug im Median 95% (Range 89-98%). Somit war die Kontaminationsrate durch eine genetisch instabile Remissionshämatopoese gering.

Für die Gewinnung von DNA aus den Blasten von „de novo AML“ (n=75) und „sekundärer AML“ (n=16) wurden Knochenmarksausstriche verwendet, welche bei Erstdiagnose der AML (n=91) angefertigt wurden. Das Kollektiv bestand überwiegend aus männlichen Patienten (59%). Das mediane Alter betrug 49 Jahre.

Von den analysierten 91 AML-Erstdiagnosen gruppierten sich zytogenetisch 7 (8%) Patienten in die Gruppe mit guten Prognosekriterien (z.B. t(8; 21), inv 16, t(15; 17)) sowie in 58 Patienten (64%) in die Gruppe mit intermediären Prognosekriterien (z.B. normaler Karyotyp, t(1;17), Trisomie 13 und 21) sowie in 26 Patienten (27%) in die Gruppe mit schlechten Prognosekriterien (z.B. komplexer Karyotyp, -7, 7q-, t(9; 11)). In der zytomorphologischen Klassifikation nach den „FAB“-Kriterien zeigten sich 10 Patienten mit M0 (10%), 12 Patienten mit M1 (13%), 36 mit M2 (38%), 4 mit M3

(4%), 13 mit M4 (14%), 12 mit M5(13%), 4 mit M6 (4%) und 4 Patienten waren nicht nach der „FAB“Klassifikation eingeteilt.

Bezüglich des LDH-Wertes, der im Median 494 U/L betrug, wurde eine Aufteilung des Kollektivs in Patienten mit einem LDH von unter bzw. über 700 U/l vorgenommen. Insgesamt 76 Patienten (84%) wiesen ein LDH < 700 U/L auf, während 15 Patienten (16%) einen LDH über 700 U/l zeigten (siehe Tabelle 14).

AML-Typ	de novo AML sekundäre AML	n=75 (82,4%) n=16 (17,6%)
Alter	- Median: - Range: > 50 Jahre:	49 Jahre 16 - 78 Jahre 45 (47%)
Geschlecht	männlich weiblich	54 (59%) 37 (41%)
FAB- Klassifikation	unklassifiziert - M0 - M1 - M2 - M3 - M4 - M5 - M6	4 (4%) 10 (10%) 12 (13%) 36 (38%) 4 (4%) 13 (14%) 12 (13%) 4 (4%)
LDH (U/l)	- Median: - Range	494 U/l 118 - 1884 U/l
Leukozyten (*10⁹/l)	- Median - Range	5,9 * 10 ⁹ /l 0,8 - 488 * 10 ⁹ /l
Zytogenetik	- gute Prognosekriterien - intermediäre Prognosekriterien - schlechte Prognosekriterien	7 (8%) 58 (64%) 26 (28%)

Tabelle 14: Patientencharakteristika (Alter, Geschlecht, FAB-Klassifikation, LDH, Leukozyten und Zytogenetik) der untersuchten Patienten- gruppe mit de novo- und sekundärer AML (91 Patienten)

Von den untersuchten 91 Patienten erreichten 65 Patienten durch die Doppelinduktions- therapie nach dem TAD-HAM-Regime eine komplette hämatologische Remission. Bei zehn Patienten wurde eine allogene periphere Stammzelltransplantation in der ersten hämagologischen Remission durchgeführt. Von diesen 10 Patienten erreichte kein Patient eine komplette Remission und sechs der 10 Patienten starben therapieassoziiert.

Die Verteilung des zytogenetisch bestimmten Risikos war in den gebildeten beiden Altersgruppen (unter bzw. über 50 Jahre) geringgradig unterschiedlich. In der Patientengruppe im Alter unter 50 Jahren fanden sich anteilmäßig weniger Patienten mit intermediärer (27,4% vs. 36,3%), dafür mehr Patienten mit schlechten Prognosekriterien (17,6% vs. 10,1%) - siehe Tabelle 15.

Risikoprofil laut Zytogenetik	Patienten unter 50 Jahren		Patienten über 50 Jahren	
	n	%	n	%
gute Prognosekriterien	4	4,4	3	3,3
intermediäre Prognosekriterien	25	27,4	33	36,3
schlechte Prognosekriterien	16	17,6	10	10,1

Tabelle 15: Einteilung in die zytogenetisch bestimmten Risikogruppen in Abhängigkeit des Alters der 91 untersuchten Patienten

Von den insgesamt 91 untersuchten Patienten zeigten sich bei 26 (29%) genetische Abberationen auf molekularer Ebene in den untersuchten Blasten bei Erstdiagnose der AML. Von den 75 Patienten mit de novo-AML wiesen 28% und von den 16 Patienten mit sAML zeigten 31% genetische Abberationen.

Bei sAML-Patienten lag bei den Referenzzellen aus Wangenschleimhautepithel der Anteil von Abberationen mit 25% deutlich höher als bei de novo-AML-Patienten. Legt man die CD34-negativ Zellfraktion als Referenz zu Grunde war das Verhältnis umgekehrt (sAML: 6,3% vs. de novo-AML: 18,7%). Der Unterschied im Auftreten von genetischen Abberationen zwischen de novo AML und sekundärer AML war aber nicht signifikant ($p=0,442$) - siehe Tabelle 16

Blasten bei Diagnose	genetische Abberation insgesamt		genet. Abberation in Referenzzellen aus Wangenschleimhautepithelzellen		genet. Abberation Referenzzellen: CD34-negative Zellfraktion	
de novo AML (n=75)	21	28%	7	9,3%	14	18,7%
sAML (n=16)	5	31%	4	25%	1	6,3%
alle Patienten (n=91)	26	29%	11	33,3%	15	25,9%

Tabelle 16: Anzahl (%-Anteil) genetischer Abberationen bei de novo-AML und sekundärer AML (sAML) im Gesamtkollektiv sowie bei den Referenzzellen aus Wangenschleimhautepithel und der CD34-negativen Zellfraktion

Insgesamt wurden 728 Genorte mit acht verschiedenen Primern untersucht. Hierbei waren die Primerpanele D7S486 (Chromosom 7q31-1), D7S525 (Chromosom 7q22-31.1), D8S559 (Chromosom 8q22), TP53ALS (Chromosom 17p12-13.1), D11S1356 (Chromosom 11q23), D2S123 (Chromosom 2p16), APC (Chromosom 5q21-22) und MFD (Chromosom 17q11.2-12) im Einsatz. Es wurden insgesamt 38 LOH (verteilt auf 22 Patienten) und 15 MSI (verteilt auf acht Patienten) detektiert. Bei vier Patienten trug eine Kombination aus LOH und MSI auf. 45 Genoarte waren nicht informativ, da die Analysen keine Aussagekraft bezüglich einer genetischen Instabilität zeigten bzw. homozytoge Allele vorlagen - siehe Abbildung 13.

LOH/MSI bei Erstdiagnose AML - Verteilung zwischen LOH und MSI (patientenbezogen)

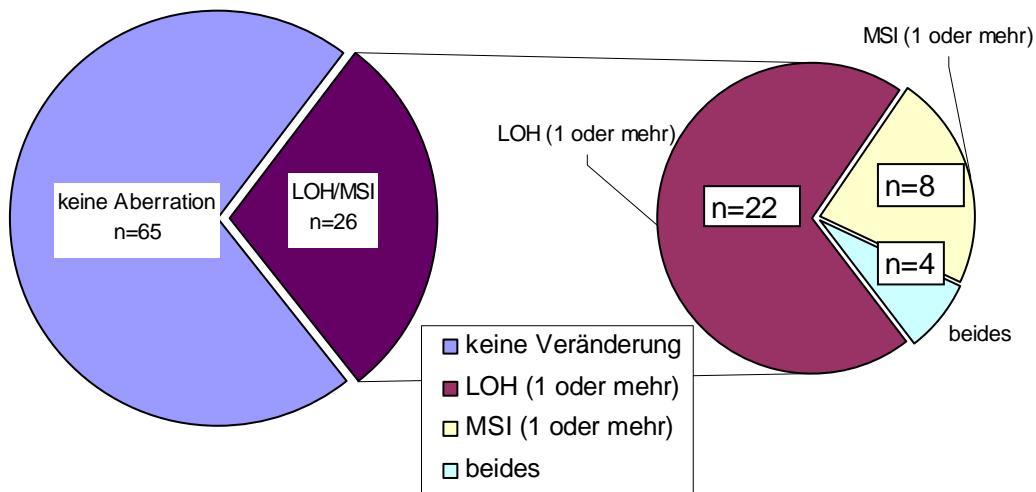


Abbildung 13: Häufigkeit von genetischer Instabilität (LOH und/oder MSI) im Gesamtkollektiv von 91 Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer AML (links) sowie der Anteil der genetischen Instabilitäten (rechts)
 MSI = Mikrosatelliteninstabilität, LOH = Loss of Heterozygosity

Eine Loss of Heterozygosity (LOH) wurde bei 22 (24,2%) der 91 Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer AML festgestellt. Bei 10 der 22 Patienten mit LOH wurde durch die eingesetzten Primerpanele mehr als 1 LOH diagnostiziert (siehe Abbildung 13). Am häufigsten wurden LOH mit den Primerpanels D7S486 (n=11) auf Chromosom 7q31-1, mit TP53ALS (n=6) auf Chromosom 17p12-13.1 und mit APC (n=6) auf Chromosom 5q21-22 nachgewiesen (siehe Abbildung 14).

Anzahl der Patienten mit LOH in Blasten bei Erstdiagnose AML/ Verteilung zwischen Primern

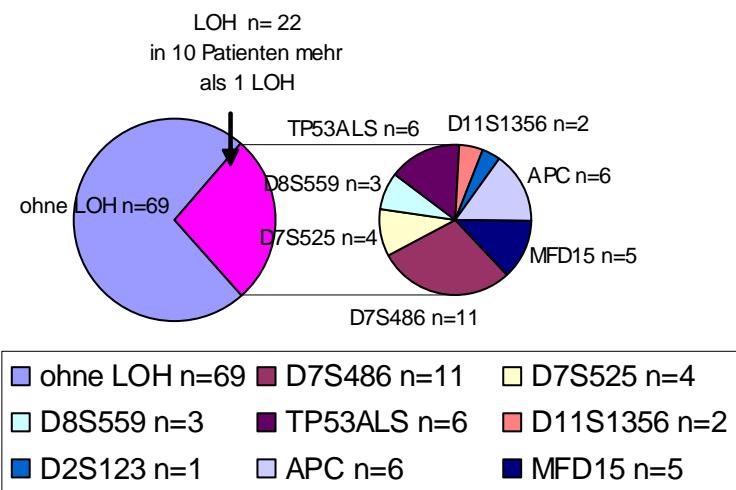


Abbildung 14: Häufigkeit von Loss of Heterozygosity (LOH) im Gesamtkollektiv von 91 Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer AML (links) sowie die LOH-Häufigkeit in Abhängigkeit vom eingesetzten Primerpanel (rechts). Bei 10 Patienten wurde mehr als eine LOH festgestellt

Eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wurde bei acht (8,8%) der 91 Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer AML festgestellt. Bei vier der acht Patienten mit MSI wurde durch die eingesetzten Primerpanele mehr als ein MSI festgestellt (siehe Abbildung 15). Mit dem Primerpanel D7S525 (Chromosom 7q22-31.1) konnte eine MSI diagnostiziert werden, mit den anderen Primerpanels hingegen waren jeweils zwei MSI feststellbar.

Anzahl der Patienten mit MSI bei Erstdiagnose AML / Verteilung zwischen Primern

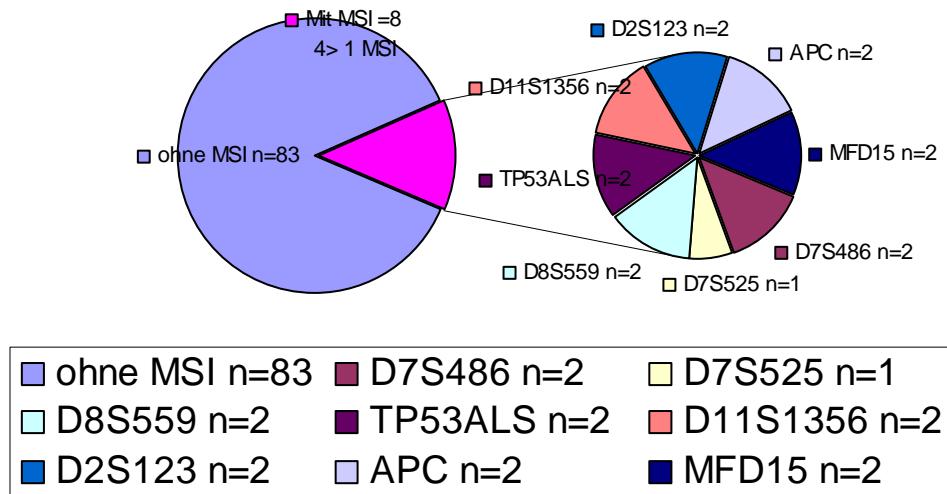


Abbildung 15: Häufigkeit einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) im Gesamtkollektiv von 91 Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer AML (links) sowie die MSI-Häufigkeit in Abhängigkeit vom eingesetzten Primerpanel (rechts). Bei vier Patienten wurde mehr als eine MSI festgestellt

Die nachfolgende Abbildung 16 gibt die einzelnen Befunde der Patienten mit LOH- und/oder MSI-Nachweis wieder.

ID	D7S468	D7S525	D8S559	TP53ALS	D11S1356	D2S123	APC	MFD15	Geb.-Datum	Alter	AML-Typ	Karyogramm	Karyo-Risk	CR	MDS
1					ED				12.03.1953	46	M3	t(15;17), i(17q) ,+8	3	1	0
5	■								15.02.1937	66	M2 nach MDS	normaler Karyotyp	2	1	1
7		■	■						05.03.1954	49	M2	Trisomie 8, del (7) q	3	0	1
8	■								17.06.1954	44	M2	-7	3	0	1
13					ED	■			02.05.1937	62	M4	normaler Karyotyp	2	1	0
19	■	■	■						16.02.1944	54 ?		komplexer Kary	3	0	1
22				ED					28.08.1960	34	M2	normaler Karyotyp	2	1	0
28	■				ED				28.11.1938	64 ?	nach MDS	45,XY,-7	3	1	1
34									22.04.1952	46	M0	45 XY,der (3), komplex	3	1	0
35		ED				ED			03.07.1927	76	M2 nach MDS	46 XX, del (5), komplex	3	1	1
41									28.06.1941	59	M2	del (5), komplex	3	0	1
46	■	ED	ED		ED				24.07.1937	66	M2	46XX, 5q-1p, +8	3	0	1
47	ED	ED	ED		ED				06.01.1959	34	M2	normaler Karyotyp	2	1	0
61									28.09.1965	38	M2 nach MDS	-7, -12, del(q22), deri 8 3	0	1	
70	■								18.03.1959	44	M2	45XY -7 Keiltyp	3	0	0
71	■	■	ED						28.06.1943	52	M2	normaler Karyotyp	2	1	0
72	■								10.02.1937	66	M6 nach MDS	kompl. del(5)(q31)	3	0	1
74									18.10.1939	59	M4	normaler Karyotyp	2	1	0
76	■	ED				ED	ED		27.08.1961	33	M4	normaler Karyotyp	2	1	0
79									15.01.1932	71	M2	komplexer män. Kary	3	1	1
80	■	ED							17.10.1936	58	M4 eo	inv(16)	1	1	0
81									30.01.1938	63	M2	47 XX, +6	2	1	0
83				ED	ED				24.12.1939	65	biphänotyp	47 XY,+8	2	0	0
90					ED				05.06.1964	39	M2	46XX, del(5)(q31);(7)(q; 3	1	0	
93									07.04.1967	36	M2	46XY,der(2) ,komplex	3	0	1
96									03.01.1955	44	M1	normaler Karyotyp	2	1	0

Abbildung 16: Darstellung der 26 Patienten mit LOH und/oder MSI in Abhängigkeit Alter, AML-Typ, Karyotyp, dem zytogenetischen Risikoprofil, dem Auftreten einer kompletten Remission (CR) und einer Myelodysplasie (MDS);

Loss of Heterozygosity (LOH) ist **grün** markiert,

Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist **rot** markiert,

ED = keine Datenerhebung

graues Feld = nicht informativ (d.h. homozygote Allele)

unauffällige Befunde sind weiß (leer) markiert

Bezieht man die mit den acht Primern festgestellten Genabberationen auf das Gesamtkollektiv aller Patienten und berücksichtigt man, dass nicht bei allen Patienten alle Primerpanele angewendet wurde, zeigen sich folgende Resultate.

Anteilmäßig am häufigsten fanden sich Genabberationen beim Einsatz des Primerpanels D7S486 (Chromosom 7q31-1) mit 15,4%. In jedem zehnten untersuchten Fall wurde mittels des Primerpanels TP53ALS (10,1%) und APC (9,4%) eine Genabberation festgestellt. Bei den Primerpanels MFD15, D7S525, D8S559, D11S1356 und D2S123 lag die Auffinderate von Genabberationen jedoch niedriger und schwankten zwischen 8,6% bis 4,8%. Die Detektionsrate an LOH war beim Primerpanel D7S486 mit 13,1% am höchsten, in deutlichem Abstand gefolgt vom Primerpanel TP53ALS (7,6%) und APC (7,1%). Die Auffinderate von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) war bei allen Primerpanels in etwa ähnlich hoch. Am höchsten lag sie beim Panel D11S1356 (3,4%) und am niedrigsten beim Primerpanel D7S535 (1,4%) - siehe Tabelle 17.

Primer (Genlocus)	Anzahl untersuchter Proben	Abberationsraten					
		gesamt		davon LOH		davon MSI	
	n	%	n	%	n	%	
D7S486 (7q31-1)	n=84	13	15,4	11	13,1	2	2,4
TP53ALS (17p12-13.1)	n=79	8	10,1	6	7,6	2	2,5
APC (5q21-22)	n=85	8	9,4	6	7,1	2	2,4
MFD15 (17q11.2-12)	n=81	7	8,6	5	6,2	2	2,5
D7S525 (7q22-31.1)	n=74	5	6,8	4	5,4	1	1,4
D8S559 (8q22)	n=84	5	6,0	3	3,6	2	2,4
D11S1356 (11q23)	n=58	3	5,2	1	1,7	2	3,4
D2S123 (2p16)	n=84	4	4,8	2	2,4	2	2,4

Tabelle 17: Häufigkeit von mittels der acht Primerpanels aufgefundenen Genabberationen (Loss of Heterozygosity/LOH; Mikrosatelliteninstabilität/MSI) im Gesamtkollektiv aller Patienten; geordnet nach der Auffindenshäufigkeit

Die Häufigkeit einer genetischen Instabilität im Sinne eines Loss of Heterozygosity (LOH) war zwischen Patienten mit und ohne AML-Rezidiv nicht signifikant unterschiedlich. Von den 37 Patienten mit einem AML-Rezidiv zeigten zwar fast doppelt soviele Patienten ein LOH im Vergleich zu den 54 Patienten ohne AML-Rezidiv (32,4% vs. 18,5%), aber der Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens erreichte noch keine statistische Signifikanz - siehe Tabelle 18.

AML-Rezidiv	Patienten mit LOH ¹⁾ (n=22)		Patienten ohne LOH (n=69)		alle Patienten (n=91)		p-Wert
	n	%	n	%	n	%	
- ja	12	32,4	25	67,6	37	40,6	p = 0,21 ²⁾
- nein	10	18,5	44	81,5	54	59,4	

Tabelle 18: Häufigkeit von Loss of Heterozygosity (ein oder mehrere LOH) in Abhängigkeit eines AML-Rezidivs bei AML-Erstdiagnose; ¹⁾ ein oder mehrere LOHs, ²⁾ χ^2 -Test

Die Häufigkeit des Auftretens einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) war bei Patienten mit AML-Rezidiv mehr als doppelt so häufig wie bei Patienten ohne AML-Rezidiv (13,5% vs. 5,5%), aber der Unterschied erreichte keine statistische Signifikanz - siehe Tabelle 19.

AML-Rezidiv	Patienten mit MSI ¹⁾ (n=8)		Patienten ohne MSI (n=83)		alle Patienten (n=91)		p-Wert
	n	%	n	%	n	%	
- ja	5	13,5	32	86,5	37	40,6	p = 0,36 ²⁾
- nein	3	5,5	51	94,5	54	59,4	

Tabelle 19: Häufigkeit von Mikrosatelliteninstabilität (ein oder mehrere MSI) in Abhängigkeit eines AML-Rezidivs bei AML-Erstdiagnose; ¹⁾ ein oder mehrere MSI, ²⁾ Fisher-Exact-Test

Von den vier Patienten, die sowohl ein LOH als auch ein MSI bei AML-Erstdiagnose aufwiesen, hatten drei Patienten (75%) ein AML-Rezidiv.

Wurden nur jene Patienten betrachtet, die ein LOH an mindestens zwei Genorten aufwiesen, und wurden diese Patienten mit den Patienten ohne LOH unter Berücksich-

tigung eines AML-Rezidivs verglichen, zeigte sich folgendes. Patienten mit AML-Rezidiv wiesen fast fünfmal häufiger eine LOH an mindestens zwei Genloci auf im Vergleich zu Patienten ohne AML-Rezidiv (24,2% vs. 4,3%). Der Unterschied erreichte statistische Signifikanz ($p = 0,014$) - siehe Tabelle 19.

AML-Rezidiv	Patienten mit LOH an mind. 2 Genorten (n=10)		Patienten ohne LOH (n=69)		alle Patienten (n=79)		p-Wert
	n	%	n	%	n	%	
- ja	8	24,2	25	75,8	33	41,7	$p = 0,014^1)$
- nein	2	4,3	44	95,7	46	58,3	

Tabelle 19: Häufigkeit von Loss of Heterozygosity (ein oder mehrere LOH) an mindestens zwei Genorten gleichzeitig in Abhängigkeit eines AML-Rezidivs bei AML-Erstdiagnose; ¹⁾ χ^2 -Test

Wurde die Auftretenshäufigkeit aller genetischen Abberationen (LOH und/oder MSI) gemeinsam betrachtet und in Relation zum Auftreten eines AML-Rezidivs bei AML-Erstdiagnose gesetzt, so ergab sich, dass eine derartige genetische Abberation doppelt so häufig bei AML-Rezidiv-Patienten im Vergleich zu Patienten ohne AML-Rezidiv anzutreffen war (40,5% vs. 20,3%). Der Unterschied erreichte aber noch keine statistische Signifikanz (siehe Tabelle 20).

AML-Rezidiv	Patienten mit LOH/MSI ¹⁾ (n=26)		Patienten ohne MSI (n=65)		alle Patienten (n=91)		p-Wert
	n	%	n	%	n	%	
- ja	15	40,5	22	59,5	37	40,6	$p = 0,13^2)$
- nein	11	20,3	43	79,7	54	59,4	

Tabelle 20: Häufigkeit von genetischer Abberation (LOH und/oder MSI) in Abhängigkeit eines AML-Rezidivs bei AML-Erstdiagnose; ¹⁾ χ^2 -Test

3.3. Rezidivhäufigkeit eines AML in Abhängigkeit von Genabberationen (LOH oder MSI) an bestimmten Genlokalisierungen

3.3.1. AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 7q31-1 (Primerpanel D7S486)

Lag ein Loss of Heterozygosity (LOH) auf dem Chromosom 7q31-1 vor, betrug die Rezidivrate 63%. War eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) auf dem gleichen Chromosom mittels des Primerpanels D7S486 nachgewiesen worden, betrug die AML-Rezidivrate hingegen 50%. Am niedrigsten war die Rezidivrate bei Patienten, die weder ein LOH noch ein MSI aufwiesen (32%) - siehe Abbildung 17.

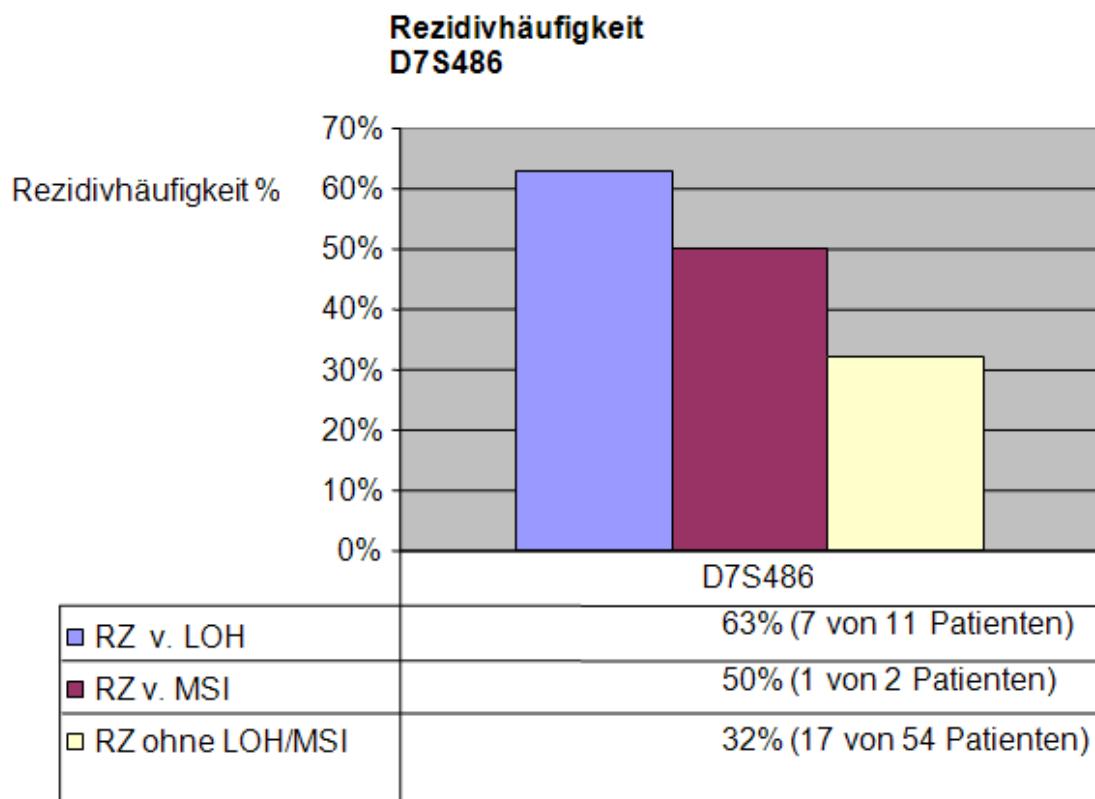


Abbildung 17: Häufigkeit des Auftretens eines AML-Rezidivs bei Genabberationen (Loss of Heterozygosity/LOH; Mikrosatelliteninstabilität/MSI) auf dem Chromosom 7q31-1 bei Einsatz des Primerpanels D7S486

3.3.2. AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 7q22-31.1 (Primer-panel D7S525)

Bei Vorhandensein eines LOH's auf dem Chromosom 7q22-31.1 betrug die AML-Rezidivrate 75%. Konnte mittels des Primerpanels D7S5254 eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden, betrug die Rezidivrate sogar 100%. Bei Patienten ohne LOH oder MSI belief sich die AML-Rezidivrate nur auf 39% - siehe Abbildung 18.

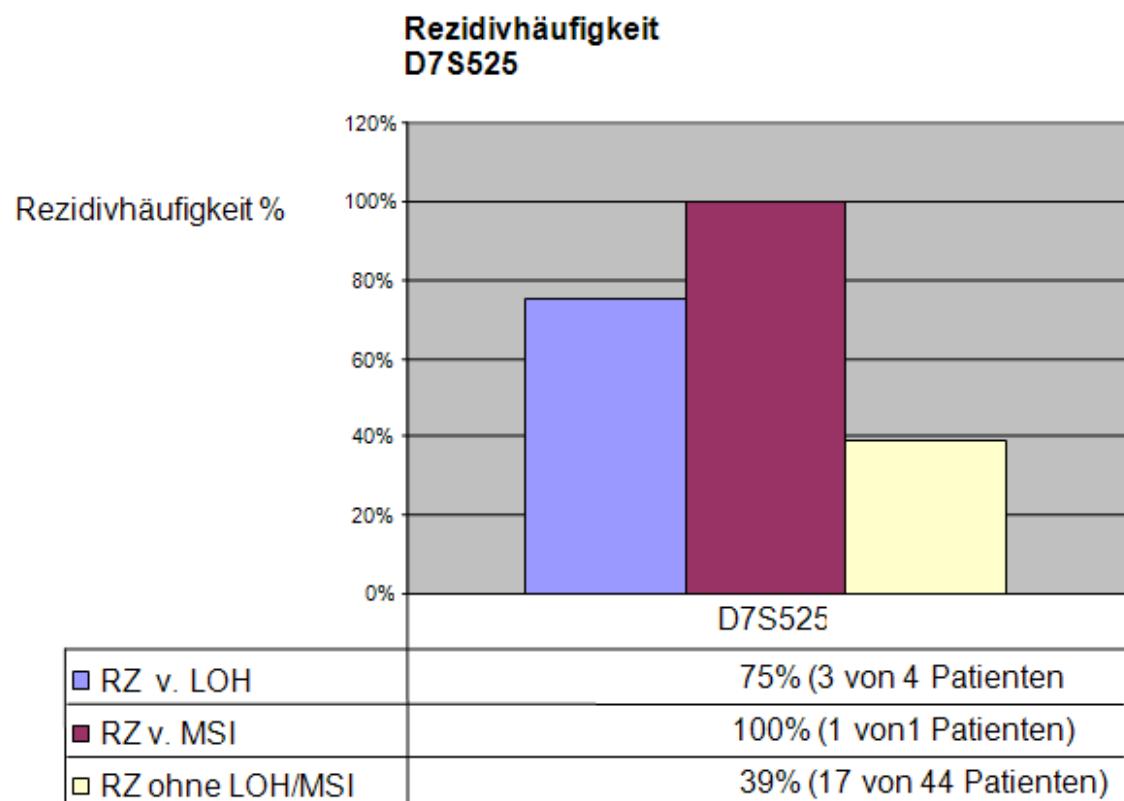


Abbildung 18: Häufigkeit des Auftretens eines AML-Rezidivs bei Genabberationen (Loss of Heterozygosity/LOH; Mikrosatelliteninstabilität/MSI) auf dem Chromosom 7q22-31.1 bei Einsatz des Primerpanels D7S525

3.3.3. AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 8q22 (Primerpanel D8S559)

Konnte nach dem Einsatz des Primerpanels D8S559 ein Loss of Heterozygosity (LOH) auf dem Chromosom 8q22 nachgewiesen werden, betrug die AML-Rezidivrate 67%. Eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) war mit einer 50%igen Rezidivrate verbunden. Bei Fehlen eines LOH oder MSI betrug die AML-Rezidivrate nur 38% - siehe Abbildung 19.

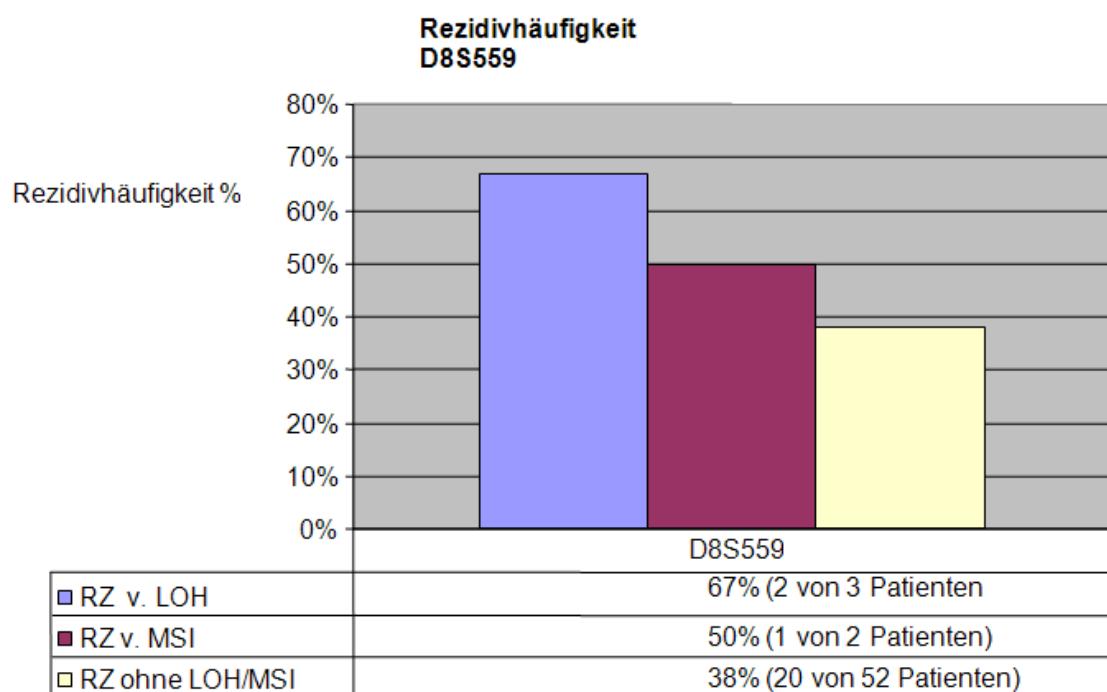


Abbildung 19: Häufigkeit des Auftretens eines AML-Rezidivs bei Genabberationen (Loss of Heterozygosity/LOH; Mikrosatelliteninstabilität/MSI) auf dem Chromosom 8q22 bei Einsatz des Primerpanels D8S559

3.3.4. AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 17p12-13.1 (Primerpanel TP53ALS)

Wenn das Primerpanels TP53ALS einen Loss of Heterozygosity (LOH) auf dem Chromosom 17p12-13.1 zeigen konnte, war dies mit einer AML-Rezidivrate von 50% verbunden. Eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ergab ebenfalls eine 50%ige Rezidivrate. Bei Fehlen eines LOH oder MSI war die AML-Rezidivrate mit lediglich 37% deutlich niedriger - siehe Abbildung 20.

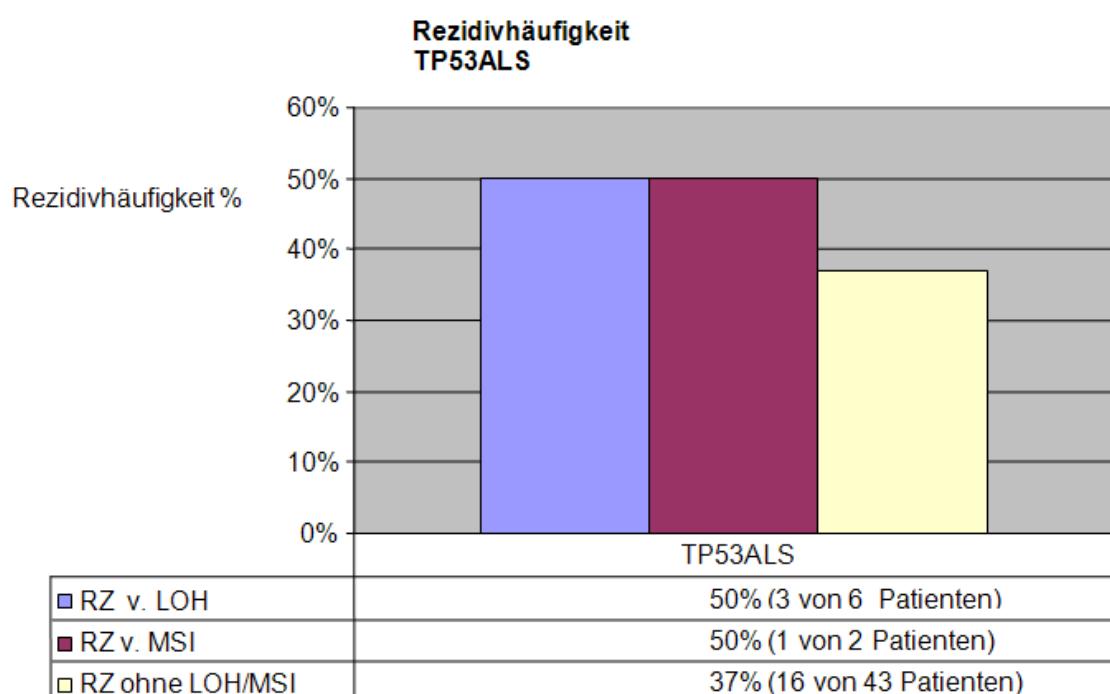


Abbildung 20: Häufigkeit des Auftretens eines AML-Rezidivs bei Genabberationen (Loss of Heterozygosity/LOH; Mikrosatelliteninstabilität/MSI) auf dem Chromosom 17p12-13.1 bei Einsatz des Primerpanels TP53ALS

3.3.5. AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 11q23 (Primerpanel D11S1356)

Unter Verwendung des Primerpanels D11S1356 konnte gezeigt werden, dass bei einem Loss of Heterozygosity (LOH) auf dem Chromosom 11q23 in jedem Fall ein AML-Rezidiv auftrat. Lag eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) vor, erlitten 50% dieser Patienten ein AML-Rezidiv. Bei Fehlen eines LOH oder MSI war die AML-Rezidivrate mit lediglich 45% allerdings nur wenig geringer - siehe Abbildung 21.

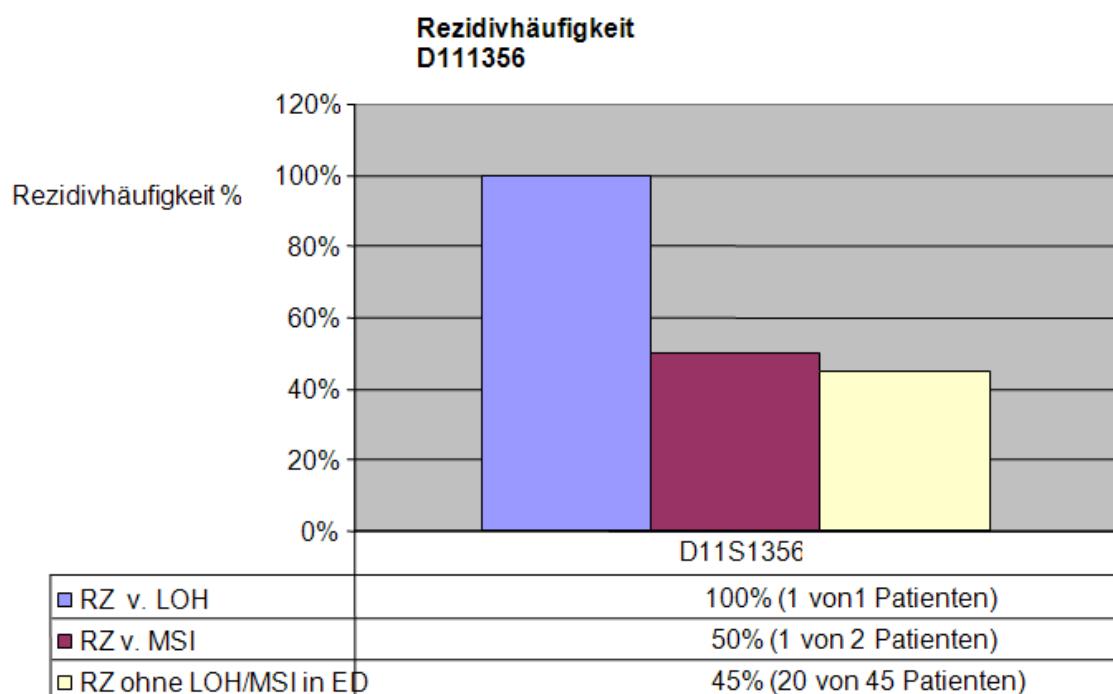


Abbildung 21: Häufigkeit des Auftretens eines AML-Rezidivs bei Genabberationen (Loss of Heterozygosity/LOH; Mikrosatelliteninstabilität/MSI) auf dem Chromosom 11q23 bei Einsatz des Primerpanels D11S1356

3.3.6. AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 2p16 (Primerpanel D2S123)

Bei Vorhandensein eines LOH auf dem Chromosom 2p16 betrug die AML-Rezidivrate 50%. Konnte durch das Primerpanel D2S123 eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden, betrug die Rezidivrate ebenfalls 50%. Bei Patienten ohne LOH oder MSI lag die AML-Rezidivrate mit 40% etwas niedriger - siehe Abbildung 22.

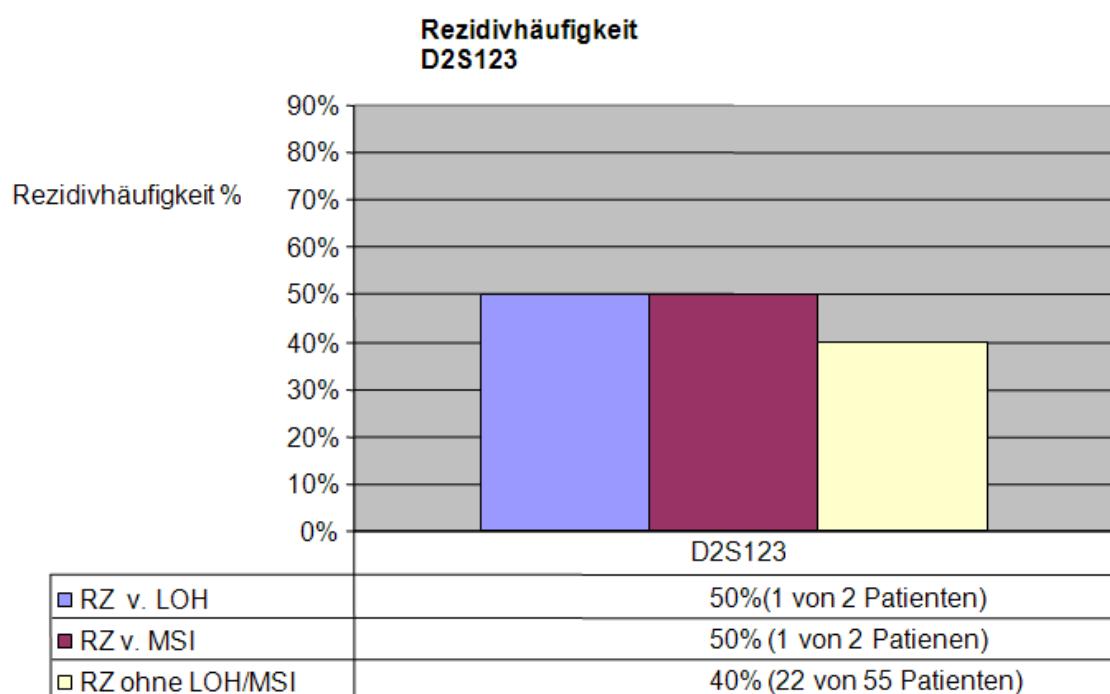


Abbildung 22: Häufigkeit des Auftretens eines AML-Rezidivs bei Genabberationen (Loss of Heterozygosity/LOH; Mikrosatelliteninstabilität/MSI) auf dem Chromosom 2p16 bei Einsatz des Primerpanels D2S123

3.3.7. AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 5q21-22 (Primerpanel APC)

Bei Vorhandensein eines mittels des Primerpanels APC nachgewiesenen Loss of Heterozygosity auf dem Chromosom 5q21-22 betrug die AML-Rezidivrate 67%. Konnte 4 eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden, sank die Rezidivrate auf 50%. Bei Patienten ohne LOH oder MSI reduzierte sich die AML-Rezidivrate auf lediglich 34% - siehe Abbildung 23.

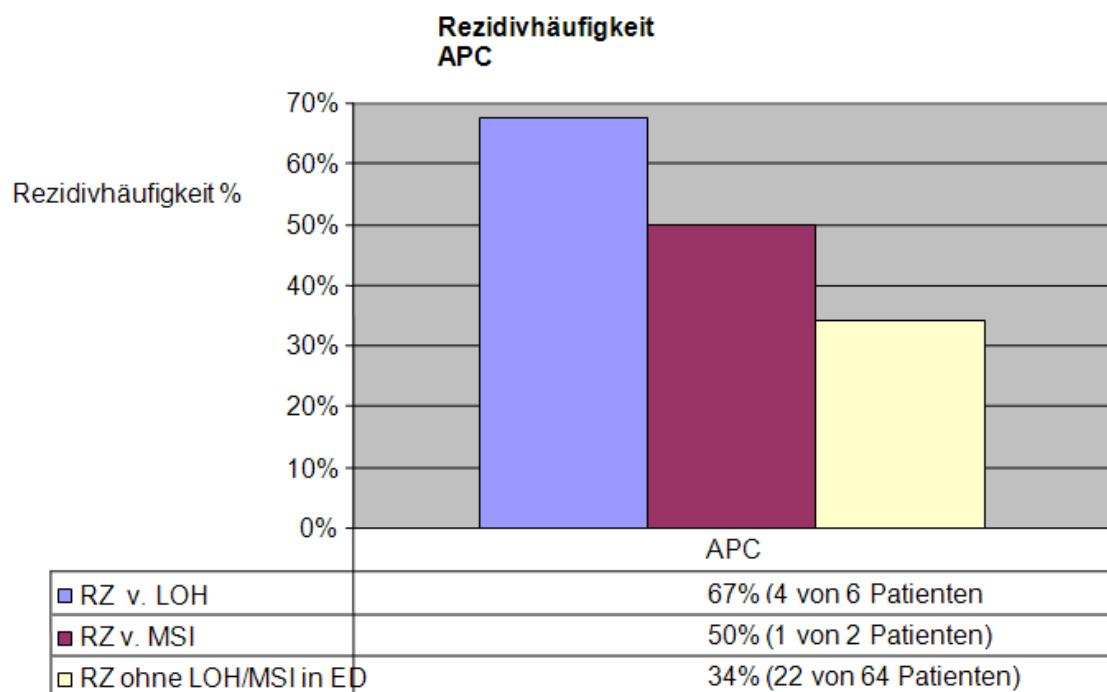


Abbildung 23: Häufigkeit des Auftretens eines AML-Rezidivs bei Genabberationen (Loss of Heterozygosity/LOH; Mikrosatelliteninstabilität/MSI) auf dem Chromosom 5q21-22 bei Einsatz des Primerpanels APC

3.3.8. AML-Rezidiv bei Abberationen auf Chromosom 17q11.2-12 (Primerpanel MDF15)

Konnte mittels des Primerpanels MDF15 ein Loss of Heterozygosity auf dem Chromosom 17q11.2-12 demonstriert werden, lag die AML-Rezidivrate bei 40%. Bei einem MSI-Nachweis hingegen stieg die Rezidivrate auf 100%. Bei Patienten ohne LOH oder MSI sank die AML-Rezidivrate auf 35% - siehe Abbildung 24.

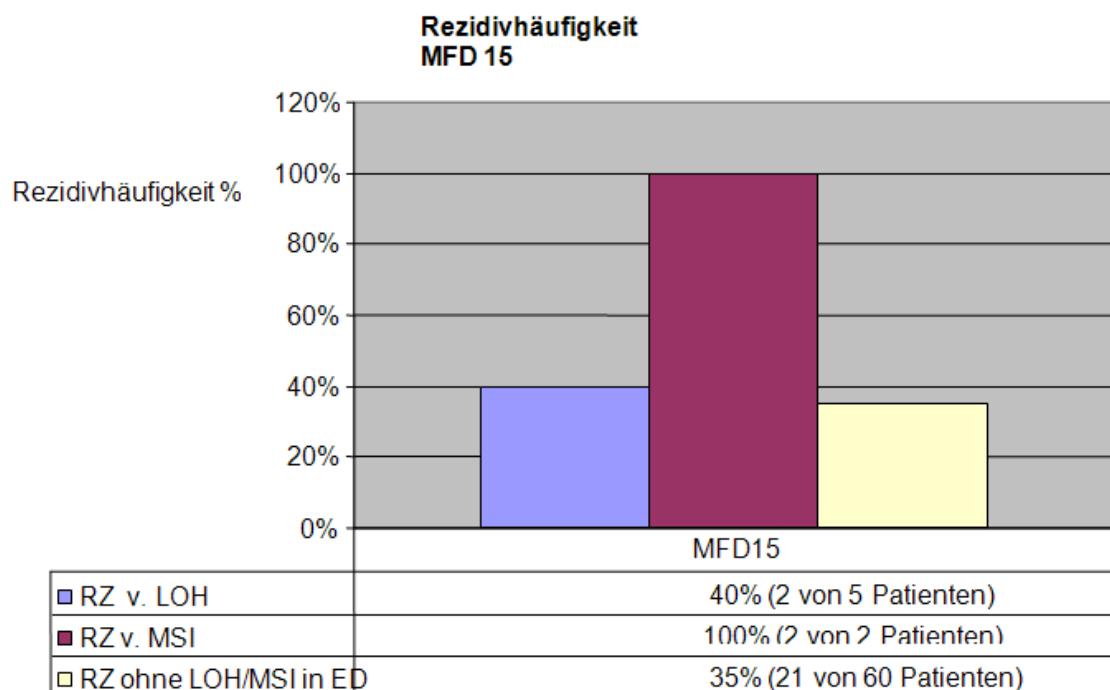


Abbildung 24: Häufigkeit des Auftretens eines AML-Rezidivs bei Genabberationen (Loss of Heterozygosity/LOH; Mikrosatelliteninstabilität/MSI) auf dem Chromosom 17q11.2-12 bei Einsatz des Primerpanels MDF15

3.4. Follow up-Untersuchung

3.4.1. Klinische Parameter

Zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung standen noch 79 Patienten (66% männlich, 44% weiblich) zur Verfügung, unter denen sich 18% mit sekundärer AML (myelodysplastisches Syndrom oder chronisch myeloproliferative Erkrankung im Vorfeld) befanden. Das Alter der Patienten betrug durchschnittlich 49,1 Jahre und schwankte zwischen 16 bis 78 Jahren, wobei 45,6% der Patienten über 50 Jahre alt waren. In der FAB-Klassifikation war die M2-Klassifikation mit 36% am häufigsten. Die LDH betrug im Mittel 547,7 U/l und betrug bei 25% der Patienten mehr als 700 U/l. Die Zytogenetik ergab bei nur 7% der Patienten gute Prognosekriterien (t(8; 21), inv16, t(15; 17)), bei zwei Dritteln (66,7%) der Patienten lagen intermediäre Prognosekriterien (normaler Karyotyp: t(1; 7), Trisomie 13 und 21) vor und bei etwas mehr als einem Viertel (27%) zeigten sich schlechte Prognosekriterien (-7, -7q, t(9; 11), komplexer Karyotyp). Das rezidivfreie Überleben betrug bei den Patienten im Durchschnitt 26,2 Monate - siehe Tabelle 21.

AML-Typ (n=79)	primäre AML sekundäre AML (AML ex MDS)	65 (82%) 14 (18%)
Alter (n=79)	- Mean \pm SD - Median: - Range: - > 50 Jahre: - 36 (45,6%)	49,1 \pm 13,8 Jahre 49 Jahre 16 - 78 Jahre 36 (45,6%)
Geschlecht (n=79)	männlich weiblich	44 (66%) 35 (44%)
FAB- Klassifikation (n=79)	- M0 - M1 - M2 - M3 - M4 - M5 - M6	10 (13%) 11 (14%) 29 (36%) 4 (5%) 11 (14%) 11 (14%) 3 (4%)
LDH (U/l); n=72	- Mean \pm SD - Median: - Range - LDH > 700 U/l	547,7 \pm 391,6 U/l 436,5 U/l 118 - 1884 U/l 18 (25%)
Zytogenetik; n=76	- gute Prognosekriterien - intermediäre Prognosekriterien - schlechte Prognosekriterien	5 (7%) 50 (66%) 21 (27%)
Rezidivfreies Überleben (Mo.); n=79	- Mean \pm SD - Median - Range	26,2 \pm 33,3 Mo. 13,6 Mo. 1-139,9 Mo.

Tabelle 21: Patientencharakteristika (Alter, Geschlecht, FAB-Klassifikation, LDH, Leukozyten und Zytogenetik) der untersuchten Patientengruppe mit de novo- und sekundärer AML (79 Patienten)

3.4.2. Genetische Instabilität in AML-Blasten bei Erstdiagnose in Relation zum Alter, LDH-Wert, Zytogenetik (Karyotyp) und sekundärer AML bei Follow up

Zur Beantwortung der Frage, ob Beziehungen zwischen den klinischen Prognoseparametern bei der Erstdiagnose der AML und dem Auftreten von genetischen Instabilitäten (GIN) bestehen, wurde die Häufigkeit des Auftretens einer GIN in Abhängigkeit vom Alter, dem LDH-Wert, dem Karotyp und dem AML-Typ (primär, sekundär) ermittelt.

Bei Patienten im Alter bis zu 50 Jahren trat eine GIN bei AML-Erstdiagnose weniger als halb so häufig auf wie bei über 50jährigen Patienten (9,8% vs. 22,2%), aber der Unterschied erreichte noch keine statistische Signifikanz.

Patienten mit einem LDH-Wert von unter 700 U/l zeigten etwa ebenso häufig wie Patienten mit einem LDH-Wert oberhalb 700 U/l eine GIN bei den AML-Blasten zum Zeitpunkt der AML-Erstdiagnose (16,7% vs. 13,5%).

Patienten mit intermediärem bis schlechten Prognosekriterien gemäß der Zytogenetik zeigten nur etwas häufiger eine GIN im Vergleich zu Patienten mit guten Prognosekriterien (20% vs. 15,9%).

Patienten mit sekundärer AML wiesen ebenfalls etwas häufiger eine GIN bei den AML-Blasten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose auf als Patienten mit primärer AML (21,4% vs. 14,3%), aber die Diskrepanz war nicht signifikant - siehe Tabelle 22.

Parameter	Gruppenbildung	GIN bei AML-Blasten bei Erstdiagnose der AML		p-Wert ¹⁾
		GIN	keine GIN	
Alter	≤ 50 Jahre	4 (9,8%)	37 (90,2%)	p = 0,132
	> 50 Jahre	8 (22,2%)	28 (79,8%)	
LDH-Wert	> 700 U/l	3 (16,7%)	15 (83,3%)	p = 0,509
	< 700 U/l	7 (13,5%)	45 (86,5%)	
Prognose laut Zytogenetik (Karyotyp)	gute Prognose	1 (20,0%)	4 (80,0%)	p = 0,598
	int. - schlecht ²⁾	11 (15,9%)	58 (84,1%)	
AML-Typ	primäre AML	9 (14,3%)	54 (85,7%)	p = 0,376
	sekundäre AML	3 (21,4%)	11 (78,6%)	

Tabelle 22: Häufigkeit einer genetischen Instabilität (GIN) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der AML in Abhängigkeit vom Alter, dem LDH-Wert, dem zytogenetischen Risiko und dem AML-Typ; ¹⁾ χ^2 - bzw. Fisher-Exact-Test
²⁾ intermediäre bis schlechte Prognose laut Zytogenetik

3.4.3. Analyse des rezidivfreien Überlebens bei 79 Patienten mit primärer und sekundärer AML

3.4.3.1. Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Patientenalter

Patienten im Alter bis zu 50 Jahren wiesen mit einer mittleren rezidivfreien Überlebenszeit von $62,5 \pm 10,0$ Monaten (^{95%}KI: 42,9-82,1 Monate) eine signifikant längere (log-rank-Test: $p = 0,02$) Zeitspanne auf als über 50jährige Patienten ($17,7 \pm 3,7$ Monaten; ^{95%}KI: 10,5-14,9 Monate) - siehe Abbildung 25.

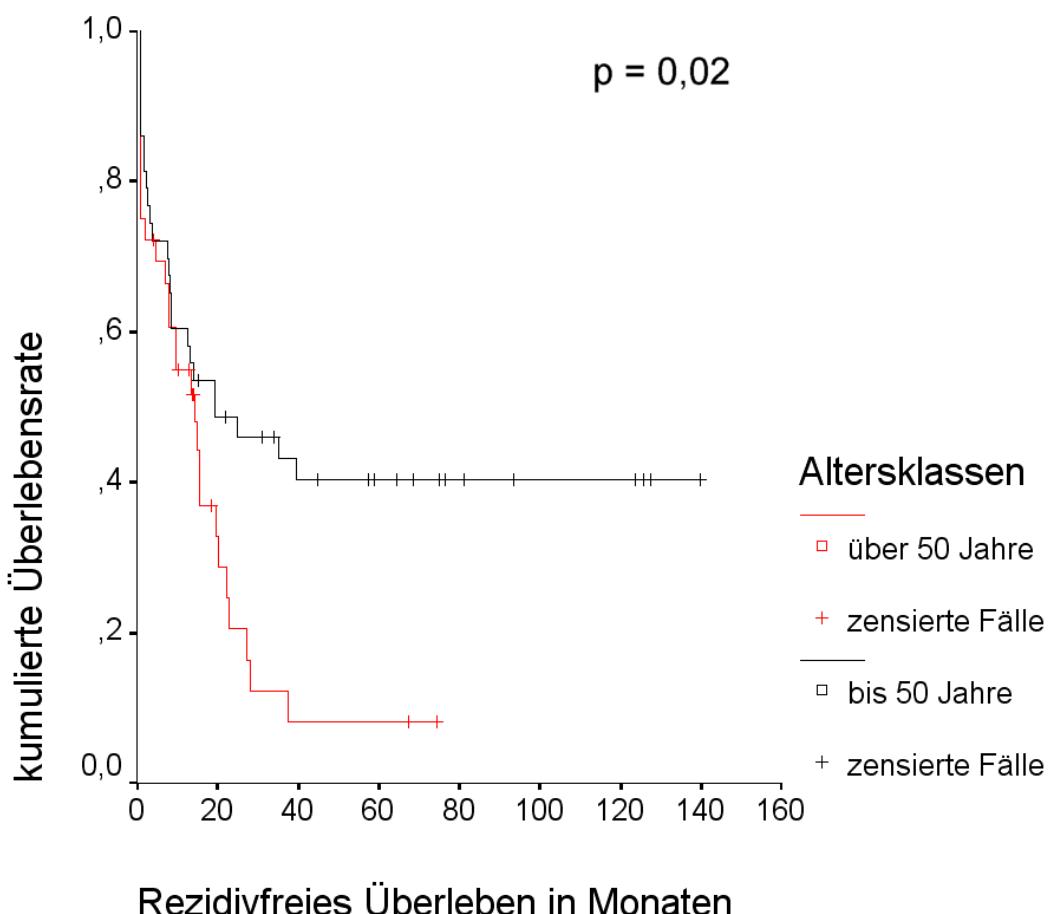


Abbildung 25: Rezidivfreie Überlebensrate (Kaplan-Meier) bei 79 AML-Patienten mit primärer oder sekundärer AML zum Zeitpunkt des Follow up in Abhängigkeit von der Altersgruppe (bis 50 Jahre, unter 50 Jahre); die Überlebensraten unterscheiden sich statistisch signifikant (log-rank-Test: $p = 0,02$). Rezidivrate bei bis 50jährigen Pat. 58,1% (25/43) und bei über 50jährigen Patienten 77,8% (28/36)

3.4.3.2. Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom LDH-Wert

Patienten, die eine LDH unterhalb von 700 U/l aufwiesen, zeigten ein mittleres rezidivfreies Überleben von $36,2 \pm 7,0$ Monaten ($^{95\%}\text{KI}: 22,5\text{-}49,9$ Monate), welches signifikant kürzer (log-rank-Test: $p = 0,05$) ausfiel als die entsprechende Zeitspanne von Patienten mit einem LDH oberhalb 700 U/l ($79,5 \pm 15,8$ Monaten; $^{95\%}\text{KI}: 48,6\text{-}110,4$ Monate) - siehe Abbildung 26.

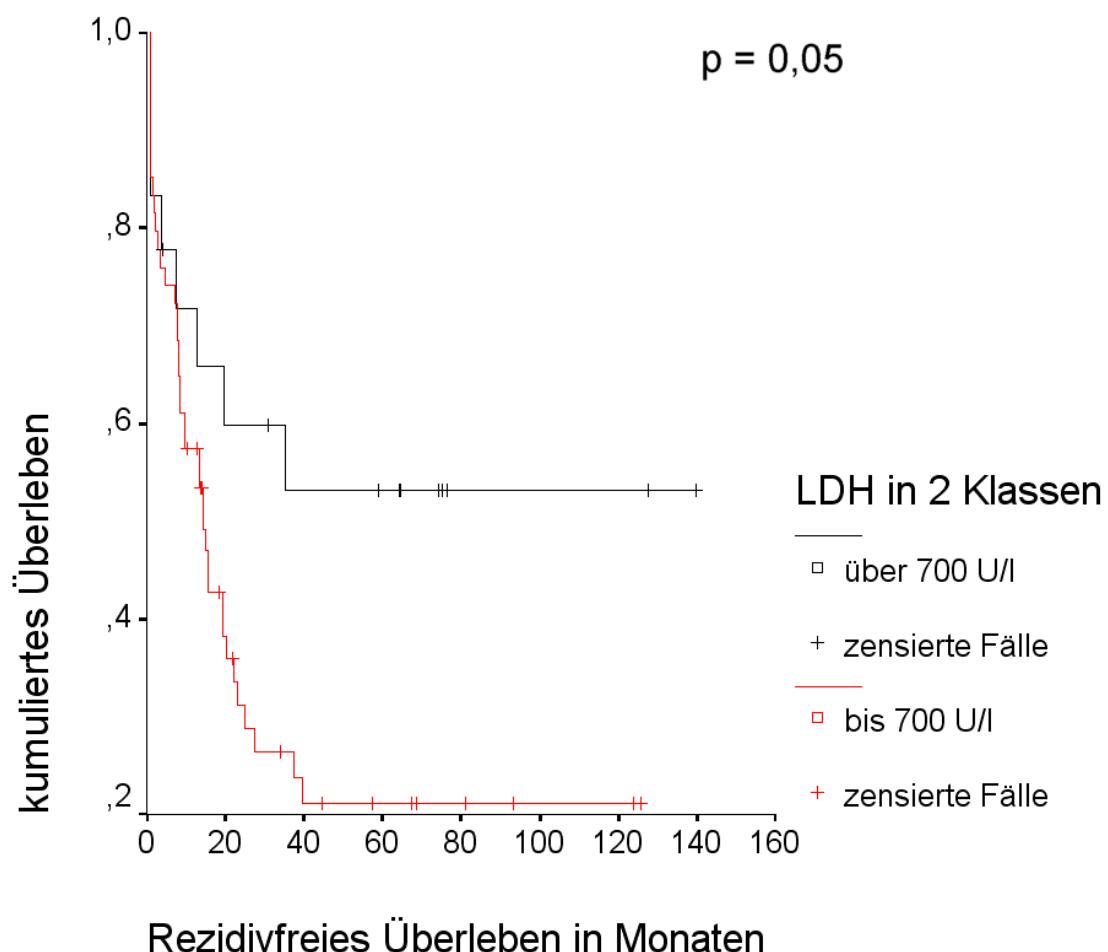


Abbildung 26: Rezidivfreie Überlebensrate (Kaplan-Meier) bei 72 AML-Patienten mit primärer oder sekundärer AML zum Zeitpunkt des Follow up in Abhängigkeit von der Höhe des LDH-Wertes (unter 700 U/l, über 700 U/l); die Überlebensraten unterscheiden sich statistisch signifikant (log-rank-Test: $p = 0,05$). Rezidivraten bei Pat. mit LDH bis 700 U/l 72,2% (39/54) und bei Pat. mit LDH > 700 U/l 44,4% (8/18)

3.4.3.3. Rezidivfreies Überlebens in Abhängigkeit vom Karyotyp (Zytogenetik)

Die aus der zytogenetischen Befundung abgeleitete Prognoseeinschätzung hatte einen signifikanten Einfluss auf die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit der Patienten. Patienten mit schlechter Prognose wiesen die kürzeste Zeitspanne auf ($16,4 \pm 5,9$ Monate; $^{95\%}\text{KI}: 4,9\text{-}28$ Monate). Patienten mit intermediären Prognosekriterien zeigten eine deutlich längere Überlebensspanne ($46,0 \pm 8,5$ Monaten; $^{95\%}\text{KI}: 29,3\text{-}62,7$ Monate) und Patienten mit guter Prognose wiesen mit $59,3 \pm 14,1$ Monaten ($^{95\%}\text{KI}: 31,7\text{-}86,9$ Monate) die längste mittlere Überlebenszeitspanne auf. Die Unterschiede dieser Zeitspannen waren statistisch signifikant (log-rank-Test: $p = 0,01$) - siehe Abbildung 27.

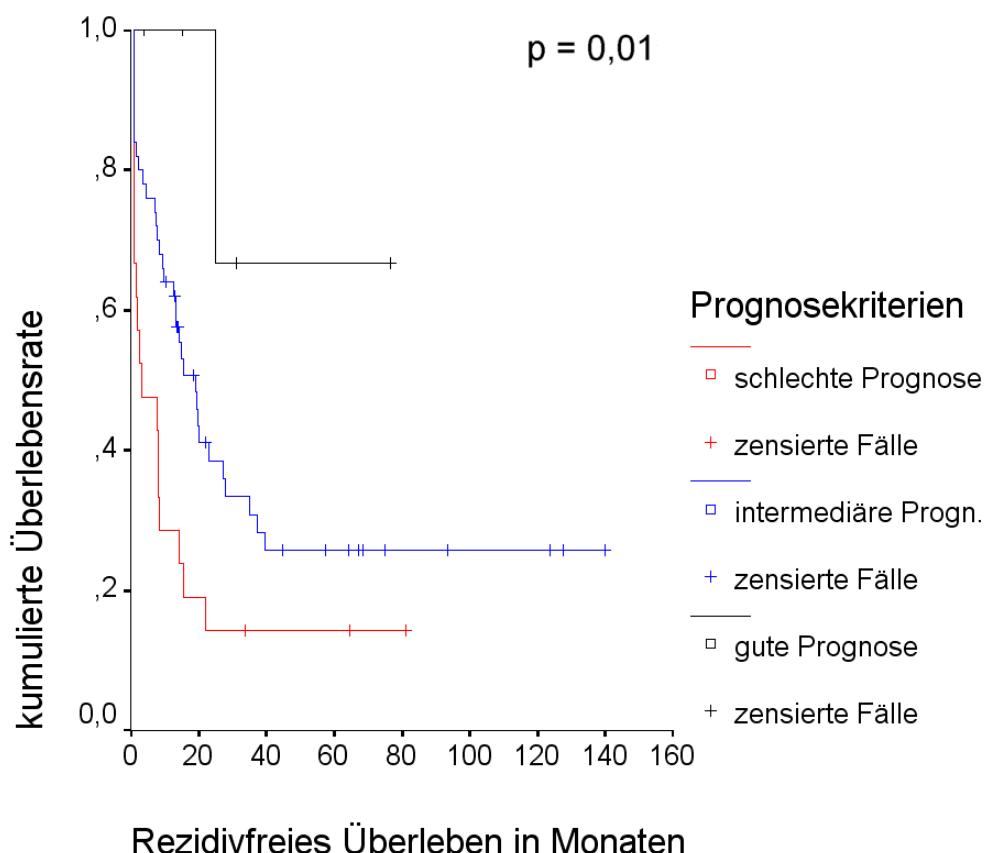


Abbildung 27: Rezidivfreie Überlebensrate (Kaplan-Meier) bei 76 AML-Patienten mit primärer oder sekundärer AML zum Zeitpunkt des Follow up in Abhängigkeit von Prognosekriterien lt. Zytogenetik (schlechte, intermediäre, gute Prognose); die Überlebensraten unterscheiden sich statistisch signifikant (log-rank-Test: $p = 0,01$). Rezidivrate bei guter Prognose 20% (1/5), intermediärer Prognose 68% (34/50) und schlechter Prognose 85,7% (18/21)

3.4.3.4. Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der genetischen Instabilität in AML-Blasten bei AML-Erstdiagnose

Patienten, die zum Zeitpunkt ihrer AML-Erstdiagnose eine genetische Instabilität (GIN) aufwiesen, zeigten mit einer durchschnittlichen rezidivfreien Überlebenszeit von $6,9 \pm 2,8$ Monaten (^{95%}KI: 1,5-12,3 Monate) eine signifikant kürzere (log-rank-Test: $p = 0,01$) Zeitspanne als Patienten ohne GIN ($53,0 \pm 7,9$ Monaten; ^{95%}KI: 37,5-68,6 Monate) - siehe Abbildung 28.

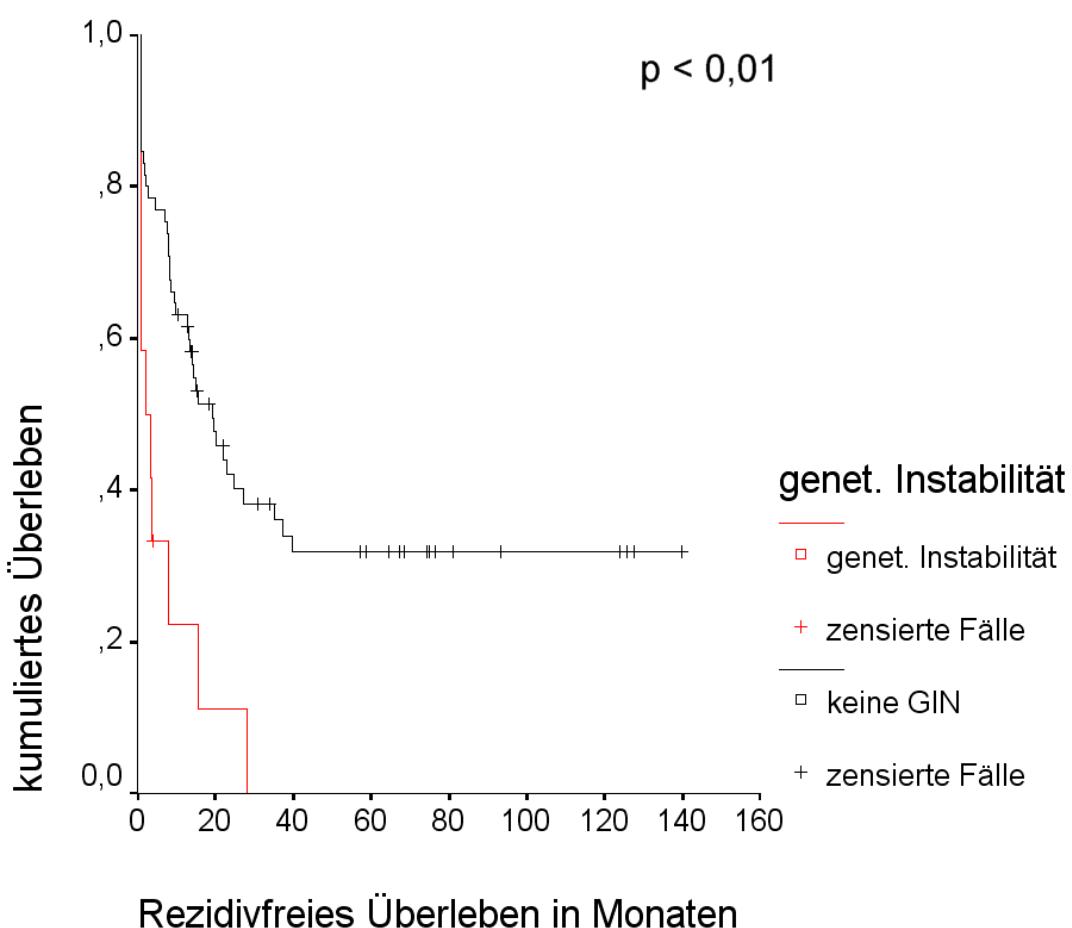


Abbildung 28: Rezidivfreie Überlebensrate (Kaplan-Meier) bei 79 AML-Patienten mit primärer oder sekundärer AML zum Zeitpunkt des Follow up in Abhängigkeit vom Auftreten einer genetischen Instabilität zum Zeitpunkt der AML-Erstdiagnose; die Überlebensraten unterscheiden sich statistisch signifikant (log-rank-Test: $p = 0,01$). Rezidivrate bei Pat. mit GIN 91,6% (11/12) und bei Pat. ohne GIN 63% (41/65)

3.4.3.5. Rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit vom AML-Typ

Patienten mit einer primären AML hatten eine durchschnittliche rezidivfreie Überlebenszeitspanne von $52,8 \pm 7,8$ Monaten ($^{95\%}\text{KI}: 37,6-68$ Monate). Diese war signifikant länger (log-rank-Test: $p = 0,01$) als jene von Patienten mit sekundärer AML ($8,0 \pm 2,5$ Monaten; $^{95\%}\text{KI}: 3,1-12,9$ Monate) - siehe Abbildung 29.

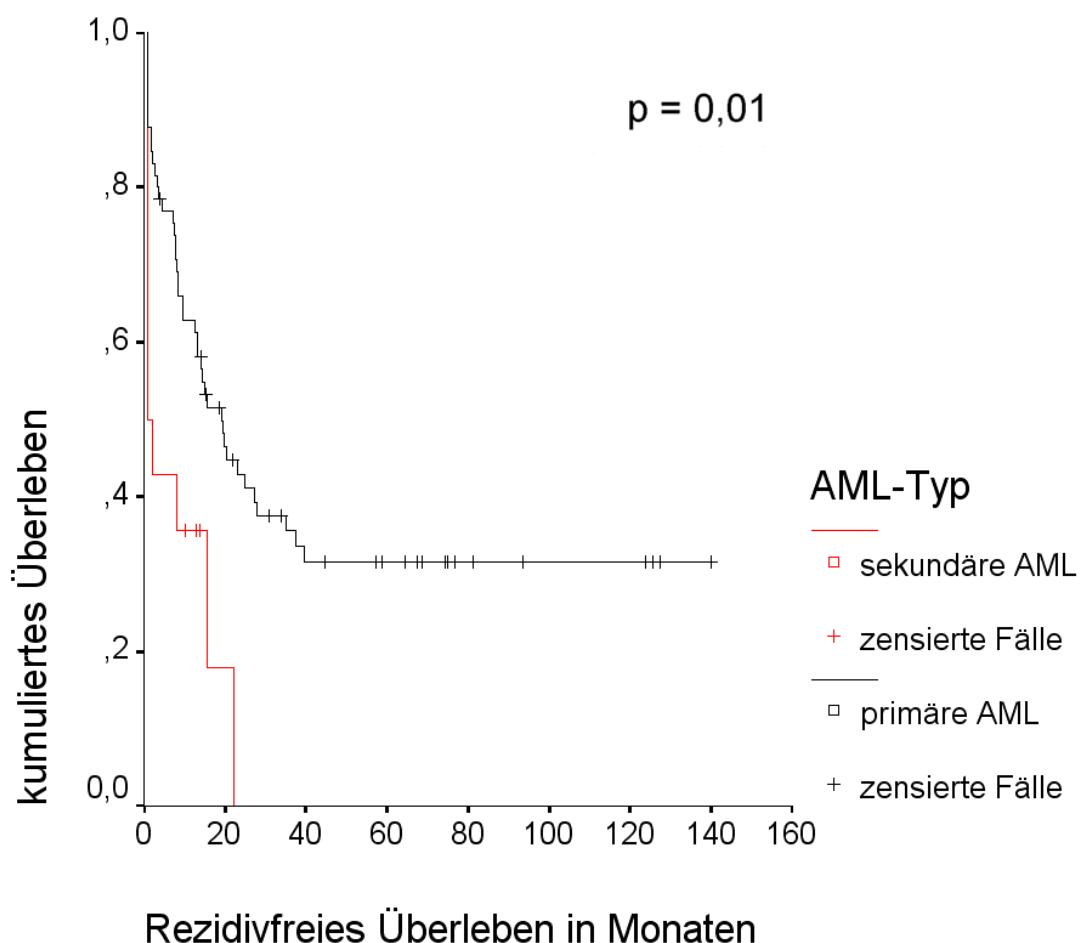


Abbildung 25: Rezidivfreie Überlebensrate (Kaplan-Meier) bei 79 AML-Patienten in Abhängigkeit von ihrem AML-Typ (primäre oder sekundäre AML); die Überlebensraten unterscheiden sich statistisch signifikant (log-rank-Test: $p = 0,01$). Rezidivrate bei sekundärer AML 64,6% (42/65) und bei sekundärer AML 78,5% (11/14)

3.4.4. Analyse des rezidivfreien Überlebens bei 65 Patienten mit primärer AML

Wurden ausschließlich jene 65 Patienten mit primärer AML ohne vorausgegangenes myelodysplastisches Syndrom untersucht, so zeigte sich bei drei der vier Einflussfaktoren ein signifikanter Einfluss auf die Rezidivrate bzw. das rezidivfreie Überleben. Patienten in einem Alter über 50 Jahren hatten eine signifikant höhere Rezidivrate und kürzere mittlere rezidivfreie Überlebensdauer (80% bzw. 20,3 Monate) als jüngere Patienten (55% bzw. 66,9 Monate). Lag laut Zytogenetik eine gute Prognose vor, war die Rezidivrate niedrig und die rezidivfreie mittlere Überlebensspanne länger (20% bzw. 59,3 Monate) im Vergleich zu Patienten mit intermediärer Prognose (69% bzw. 49,4 Monate) oder schlechter Prognose (80% bzw. 19,7 Monate). Patienten mit einer genetischen Instabilität zum Zeitpunkt der AML-Erstdiagnose zeigten eine deutlich höhere Rezidivrate und kürzere mittlere rezidivfreie Überlebenszeit (88,8% bzw. 8,7 Monate) gegenüber Patienten ohne genetische Instabilität (61,1% bzw. 58,5 Monate). Der LDH-Wert zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Rezidivrate, aber es zeigte sich bei einem LDH-Wert ≤ 700 U/l eine höhere Rezidivrate und eine kürzere rezidivfreie Überlebensspanne (75,6% bzw. 40,3 Monate) als bei Patienten mit einem LDH-Wert > 700 U/l (44,4% bzw. 79,5 Monate) - siehe auch Tabelle 23.

Variable	Gruppe	Rezidiv-rate	rezidivfreies Überleben (Monate)	95% KI	p-Wert ¹⁾
			mean \pm SD		
Altersgruppe	≤ 50 Jahre	55,0% (22/40)	$66,9 \pm 10,4$	46,5 - 87,3	p = 0,04
	> 50 Jahre	80,0% (20/25)	$20,3 \pm 4,4$	11,6 - 29,0	
LDH-Wert	≤ 700 U/l	75,6% (31/43)	$40,3 \pm 7,8$	24,9 - 55,7	p = 0,09
	> 700 U/l	44,4% (8/18)	$79,5 \pm 15,8$	48,6 - 110,4	
Zytogenetik	gut	20,0% (1/5)	$59,3 \pm 14,1$	31,7 - 86,9	p = 0,03
	intermediär	69,0% (29/42)	$49,4 \pm 9,1$	31,7 - 67,2	
	schlecht	80,0% (12/15)	$19,7 \pm 6,0$	4,0 - 35,3	
genetische Instabilität	keine GIN	61,1% (33/54)	$58,5 \pm 8,7$	41,5 - 75,5	p = 0,003
	GIN	88,8% (8/9)	$8,7 \pm 3,5$	1,8 - 15,7	

Tabelle 23: Kaplan-Meier-Analyse bei 65 AML-Patienten zum Follow up-Zeitpunkt.

Darstellung der Rezidivrate (Event-Rate) in Abhängigkeit vom Alter, dem LDH-Wert, der zytogenetischen Risikobewertung (Karyotyp) und der genetischen Instabilität der AML-Blasten bei AML-Erstdiagnose;

¹⁾ Kaplan-Meier-Log-Rank-Test

3.5. Regressionsanalysen

Für die multivariate Analyse im Rahmen der Cox-Regression wurden die dichotomisierten Parameter Alter, LDH-Wert, Karyotyp, AML-Typ und genetische Instabilität verwendet. Diese wurden in einem Cox-Regressions Modell verwendet. Es wurden nur die Daten derjenigen 67 Patienten verwendet, bei denen sowohl Angaben zu diesen Risikofaktoren als auch zur rezidivfreien Überlebenszeit (Rezidiv aufgetreten = 1, kein Rezidiv aufgetreten = 0) vorhanden waren.

Im Kollektiv aller 67 Patienten mit de novo- und sekundärer AML zeigte sich in der Untergruppe der Patienten, die bei AML-Erstdiagnose keine genetische Instabilität aufgewiesen hatten, dass das Risiko für ein Rezidiv vom Karyotyp beeinflusst wurde, nicht jedoch vom Alter, dem LDH-Wert oder dem AML-Typ. Bei Vorhandensein schlechter Prognosekriterien lag das Rezidivrisiko signifikant ($p = 0,038$) um das 2,017fache höher als beim Vorhandensein einer guten bis intermediären Prognose. Wurde die Analyse auf alle Patienten (mit und ohne GIN) ausgeweitet, so zeigte sich eine signifikante Risikoerhöhung für ein AML-Rezidiv ($p = 0,002$) auf das 3,691fache, wenn die Patienten eine genetische Instabilität aufwiesen im Vergleich zu Patienten ohne eine genetische Instabilität - siehe Tabelle 24.

Variable	Gruppe	Cox-Regr. p-Wert	Cox Regression ohne GIN bei AML-Erst- diagnose				Cox Regression mit und ohne GIN bei AML- Erstdiagnose		
			p	HR	95%KI	p	HR	95%KI	
Alter	0: ≤ 50 J. 1: > 50 J.	0,062	0,156	1,629	0,830-3,197	0,309	1,429	0,719-2,839	
LDH	0: > 700 U/l 1: ≤ 700 U/l	0,097	0,374	1,425	0,638-3,304	0,306	1,530	0,677-3,458	
Karyotyp	0: gut/interm. 1: schlecht	0,02	0,038	2,017	1,309-3,915	0,178	1,627	0,801-3,304	
sAML	0: keine 1: sAML	0,101	0,867	1,078	0,445-2,610	0,591	1,285	0,515-3,205	
genetische Instabilität	0: keine GIN 1: GIN	< 0,001				0,002	3,691	1,593-8,554	

Tabelle 24: Cox-Regressionstabelle für das Risiko des Auftretens eines AML-Rezidivs in Abhängigkeit von den Risikofaktoren Alter, LDH-Wert, Karyotyp (zytogenetisches Risikoprofil), AML-Typ (de novo-AML, sekundäre AML) und genetische Instabilität im Gesamtkollektiv aller 67 Patienten.

Modell 1: Berechnung für Patienten ohne GIN bei AML-Erstdiagnose

Modell 2: Berechnung für Patienten mit GIN bei AML-Erstdiagnose

HR = Auftretensrisiko für Rezidiv bei Vorliegen des Risikofaktors (=1)

95%KI = 95%-Konfidenzintervall

Im nächsten Schritt wurde die Regressionsanalyse auf das Kollektiv der 56 Patienten mit de novo-AML beschränkt.

Fokussierte man sich hierbei wiederum auf die de novo-AML-Patienten ohne genetische Instabilität bei AML-Erstdiagnose, zeigte sich wiederum der Karyotyp als entscheidender Risikofaktor für das Auftreten eines AML-Rezidivs. Patienten mit schlechtem Risikoprofil wiesen ein 2,334fach höheres Risiko für ein AML-Rezidiv auf im Vergleich zu Patienten mit gutem bis intermediärem Risikoprofil ($p = 0,023$).

Wurde die Regression auf de novo-AML-Patienten mit und ohne genetische Instabilität ausgeweitet, so zeigte sich, dass der Karyotyp keine signifikante Bedeutung mehr für ein AML-Rezidiv erreichte (obwohl weiterhin ein um das 2,02fach erhöhtes Risiko auftrat), sondern dass nunmehr der Umstand des Auftretens einer genetischen Instabilität für die Rezidiventwicklung eine signifikante Bedeutung erlangte. Patienten mit de novo-AML und genetischer Instabilität in den AML-Blasten zum Zeitpunkt der AML-Erstdiagnose hatten ein 3,457fach höheres AML-Rezidivrisiko im Vergleich zu entsprechenden Patienten ohne genetische Instabilität ($p = 0,007$) - siehe Tabelle 25.

Variable	Gruppe	Cox-Regr. p-Wert	Cox Regression ohne GIN bei AML-Erstdiagnose			Cox Regression mit und ohne GIN bei AML-Erstdiagnose		
			p	HR	95% KI	p	HR	95% KI
Alter	0: ≤ 50 J. 1: > 50 J.	0,073	0,070	1,926	0,947-3,915	0,121	1,762	0,861-3,605
LDH	0: > 700 U/l 1: ≤ 700 U/l	0,167	0,509	1,324	0,576-3,045	0,450	1,374	0,603-3,133
Karyotyp	0: gut/interm. 1: schlecht	0,044	0,023	2,334	1,121-4,860	0,074	2,020	0,935-4,364
genetische Instabilität	0: keine GIN 1: GIN	0,001				0,007	3,457	1,397-8,565

Tabelle 25: Cox-Regressionstabelle für das Risiko des Auftretens eines AML-Rezidivs in Abhängigkeit von den Risikofaktoren Alter, LDH-Wert, Karyotyp (zytogenetisches Risikoprofil) und genetische Instabilität im Kollektiv der Patienten mit de novo-AML bei Erstdiagnose

Modell 1: Berechnung für Patienten ohne GIN bei AML-Erstdiagnose

Modell 2: Berechnung für Patienten mit GIN bei AML-Erstdiagnose

HR = Auftretensrisiko für Rezidiv bei Vorliegen des Risikofaktors (=1)

95% KI = 95%-Konfidenzintervall

4. Diskussion

Die charakteristische Eigenschaft von hämatopoetischen Stammzellen ist ihre Fähigkeit, ein Gleichgewicht zwischen ihrer eigenen Reproduktion und der Differenzierung ihrer Tochterzellen herzustellen, die wiederum den Pfad der Hämatopoese beschreiten und sich auf diesem Wege beständig spezialisieren. Durch den Prozess der asymmetrischen Zellteilung entstehen auf der einen Seite identische Stammzellen und auf der anderen Seite ausgereiftere Zellen [Ho 2002]. Um einen persistierenden Pool von sich regenerierenden Stammzellen zu gewährleisten, ist eine strikte Regulation der Zellteilung hämatopoetischer Stammzellen erforderlich. Eine unkontrolliertes Zellwachstum kann zu einer malignen Zellvermehrung bis hin zur Ausbildung einer akuten oder chronischen myeloischen Leukämie führen [Passegue et al. 2003]. Aufgrund dieser ursprünglichen Probleme ist es verständlich, dass es sich bei der akuten myeloischen Leukämie um eine hinsichtlich ihrer Entstehung äußerst vielgestaltige Erkrankung handelt. Es handelt sich bei dieser Erkrankung um eine gestörte Produktion von Zellklonen im Rahmen einer fehlgesteuerten Hämatopoese, die durch eine Anhäufung funktionell inaktiver Blasten gekennzeichnet ist. Diese sind nicht in der Lage, normal auszudifferenzieren. Allerdings gibt es nur eine vergleichsweise niedrige Anzahl von proliferativen koloniebildenden leukämischen Blasten (AML-CFU), die letztlich die Ausgangsbasis für die AML-Entwicklung sind. Diese wenigen leukämischen Klone füllen beständig den Zellpool leukämischer Blasten auf [Bonnet 2005].

Obwohl es nur wenige phänotypische Unterschiede zwischen normalen hämatopoetischen Stammzellen und leukämischen Stammzellen gibt, konnten verschiedene Studien [Guenechea et al. 2001, Hope et al. 2004] zeigen, dass die Kapazität zur Selbsterneuerung und die proliferative Kapazität in beiden Zellpopulationen ähnlich ist. Beide Zellpopulationen beinhalten zwar Stammzellklassen, die sich hinsichtlich der Repopulationskapazität wie auch der Selbsterneuerungsrate unterscheiden, jedoch ist Fähigkeit zur Zelldifferenzierung hämatopoetischen Stammzellen nicht vollständig ausgeschaltet. Vielmehr hängen die resultierenden Effekte von genetischen Mutationen ab, die die leukämischen hämatopoetischen Stammzellen zugrundeliegenden, normalen hämatopoetischen Stammzellen betreffen. Balanzierte und unbalanzierte Chromosomenabberationen werden bei 20-40% der an AML leidenden Patienten vorgefunden [Johanns-

son et al. 1996, Grimwade et al. 1998 Pedersen-Bjergaard und Rowley 1994, Schoch et al. 2001b]. Werden diese zytogenetischen Veränderungen bei der Therapieplanung berücksichtigt, kann dies die Prognose deutlich verbessern.

Die Diagnosestellung der AML beinhaltet in der Regel die Risikostratifizierung, welche wiederum nur mit Hilfe häufig anzutreffender chromosomal Abberationen erfolgt. An diese Befunde wird dann die entsprechende Therapie angepasst. Bei 40-45% der AML-Patienten liegt jedoch keine Abberation, sondern ein normaler Karyotyp vor [Schoch et al. 2002b]. In diesem Fall werden die Patienten bei den bisher üblichen Stratifikationssystemen der niedrigen Risikokategorie zugeordnet [Germing et al. 2001]. Dabei umfassen auch Patienten mit normalem Karyotyp sowohl Fälle mit günstigem, intermediärem als auch ungünstigem klinischen Verlauf [Byrd et al. 2002, Grimwade et al. 1998].

Weil sich AML-Patienten ohne zytogenetische Veränderungen auf molekularer Ebene als sehr heterogenes Patientenclientel zeigen, ist es von großem Interesse, bei diesen mittels molekulargenetischer Analysen molekulare Marker zu finden, die eine Differenzierung zwischen prognostisch unterschiedlichen Untergruppen ermöglichen. Hierdurch könnte möglicherweise eine Optimierung der Therapie und damit vielleicht auch eine Verbesserung der Prognose erzielt werden [Agueli et al. 2007]. Als Beispiele für solche molekulargenetischen Veränderungen könnten die Wilms-Tumor-1 (WT1)-Genmutation oder die fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3)-Genmutation angeführt werden, welche trotz Vorhandenseins eines normalen Karyotyps mit einer schlechteren Prognose für AML-Patienten verbunden ist [Paschka et al. 2008]. Anti-FLT3-Antikörper könnten jedoch bei akuter lymphatischer und akuter myeloischer Leukämie sowohl als Signalinhibitoren als auch wegen ihrer antikörperbedingten Zellzytotoxizität im Rahmen der Targettherapie eingesetzt werden, um in der Zukunft die Prognose zu verbessern [Small 2008]. Tyrosinkinsaseinhibitoren werden derzeit bei FLT3 positiver AML in Kombination mit Chemotherapie getestet. Als ein positives Beispiel könnte die NPM1-Mutation angeführt werden, welche bei Blasten mit normalem Karyotyp mit einer guten Prognose für den AML-Patienten assoziiert ist. Gerade in diesem Fall konnte man ein gutes Ansprechen auf die Induktionschemotherapie in Verbindung mit einer schnellen Remission und einer hohen Remissionsrate ermitteln [Schneider et al. 2009].

Molekularbiologische Analysen, wie sie in der vorliegenden Studie den Bereich von Mikrosatelliteninstabilitäten und genetischen Instabilitäten in AML-Blasten betrafen, könnten insbesondere in der umfangreichen Patientengruppe mit zytogenetisch unauffälliger AML von prognostischer Relevanz sein. Mikrosatelliteninstabilitäten wurden bereits bei einer ganzen Reihe anderer Tumorentitäten wie Endometrium-, Zervix-, Ovarial- und Mammakarzinom in einer Häufigkeit von 6-30% nachgewiesen [Riesinger et al. 1993]. Auch Tumore des Gastrointestinaltraktes (Ösophagus, Magen) weisen in bis zu 33% der Fälle Mikrosatelliteninstabilitäten auf [Gleeson et al. 1996]. Es liegt also nahe, nach derartigen Abberationen bei AML-Blasten zu berücksichtigen. Mikrosatelliteninstabilitäten innerhalb von kodierenden Genabschnitten verursachen Frame-Shift-Mutationen sowie Verluste der Proteintranskription, wodurch es zu Beeinträchtigungen der Proteinfunktion kommt. Die Mikrosatelliteninstabilitäten können analog wie ein Loss of Heterozygosity (LOH) entscheidend zur Entstehung der AML beitragen. Bei einer AML des Kindesalters finden sich in 32% der Fälle ein LOH [Sweetser et al. 2001], bei Erwachsenen sogar in 78% der Fälle [Pabst et al. 1996]. Selbst bei AML-Patienten mit normalem Karyotyp kommt es in 20% zu einem LOH [Gorletta et al. 2005]. Akagi et al. [2009] gehen bei AML-Patienten mit normalem Karyotyp von einer Rate an Mikrosatelliteninstabilität von 50% aus. Sowohl Mikrosatelliteninstabilität als auch Loss of Heterozygosity sind demnach häufig bei AML-Blasten anzutreffen und stellen damit einen möglichen prognostischen Faktor dar.

Unterschiede der Häufigkeit von Mikrosatelliteninstabilität oder Loss of Heterozygosity bei AML-Blasten könnten in den verschiedenartigen Untersuchungstechniken und den unterschiedlichen Referenzgeweben begründet liegen, aber auch durch die Wahl des geprüften Patientenkollektivs (de novo-AML, sekundäre AML, t-AML) und der Wahl der eingesetzten Primer bedingt sein. Die Sensitivität der Detektion von Mikrosatelliteninstabilität und Loss of Heterozygosity in einer überwiegend klonalen Zellpopulationen, die sich in einer polyklonalen zellulären Umgebung befindet, ist niedrig. Dies röhrt unter anderem aus einer Kontamination des Probenmaterials durch polyklonale Nicht-Leukämiezellen her. LOH-Untersuchungen erfordern deshalb einen Mindestanteil an Leukämietumorzellen von 70%, während diese Rate für einen erfolgreichen Mikrosatelliteninstabilitätsnachweis nur 50% betragen muss. Mao et al. [1994] setzten zur Bewertung der Sensitivität bei der von ihnen verwendeten Nachweis-

methode Verdünnungsreihen ein. Eine in der Tumor-DNA nachweisbare neue Allelbande konnte bei einer Verdünnung der entsprechenden Lymphozyten-DNA noch in einer Konzentration von 1:200 bis 1:1000 nachgewiesen werden. Dies bedeutet, neoplastische Zellen können dann noch detektiert werden, wenn sie sich in einem Umfeld aus 200 bis 1000 normalen Zellen befinden. Um die Auffindechance von neoplastischen Zellen zu verbessern, besteht jedoch die Möglichkeit, den Reinheitsgrad der zu untersuchenden Zellproben mittels FACS-Analyse (Blastenquantifizierung) zu prüfen und die Kontamination durch Tumorzellen mittels der Zellmorphologie zu verifizieren. Gegebenenfalls können Zellfraktionen an von Oberflächenmarkern (CD34-positive Zellen) positiv bzw. negativ vorselektiert werden. Eine wesentliche Voraussetzung für die Diagnostik der Mikrosatelliteninstabilität bei AML ist das Vorhandensein einer aufgereinigten Referenzzellpopulation, damit eine Nicht-Leukämie-Zell-DNA für den Vergleich mit der genetisch abberanten Blasten-DNA vorhanden ist. Werden für die Referenzpopulation Leukozyten aus peripherem Blut des Patienten extrahiert, die in der Phase der kompletten hämatologischen Remission gewonnen wurden, kann dies jedoch zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, weil genau diese Leukozyten überproportional häufig aus einer ausgereiften Leukämiezellpopulation stammen können [Pabst et al. 1996]. Alternativ ist es möglich, Lymphozyten bzw. CD34-negative Stammzellen aus Leukapheresen und Zellen von Knochenmarkausstrichen, die zum Zeitpunkt der hämatologischen Remission gewonnen werden, oder auch Epithelzellen der Wangenschleimhaut zu verwenden [Webb et al. 1999].

Die vorliegende Studie gliedert sich in verschiedene Sektionen. Im ersten Bereich der Arbeit zielte die Fragestellung darauf ab, die Verwendungs- bzw. Eignungsfähigkeit von Wangenschleimhautgewebe als Quelle für eine konstitutionelle Referenz-DNA zu untersuchen und eventuelle Einschränkungen zu analysieren. Insgesamt wurden für diesen Zweck 30 Patienten untersucht, von denen 18 Patienten eine akute myeloische Leukämie und 12 Patienten eine Nicht-Stammzellerkrankung (Lymphome, multiples Myelom, Ewing-Sarkom) aufwiesen. Die 12 Nicht-AML-Patienten wurden aus zwei Gründen in die Untersuchung einbezogen. Zum einen war es durch sie möglich, zwischen einer Stammzellerkrankung (AML) und einer nicht-Stammzellerkrankung zu unterscheiden, denn bei einer AML können nicht nur die myeloischen Stammzellen,

sondern eventuell auch andere Stammzellen wie jene der lymphatischen Zellreihe von genetischen Veränderungen betroffen sein. Zum zweiten war es möglich, etwaige genetische Instabilitäten innerhalb von CD34-negativen Stammzellen und auch in Epithelzellen der Wangenschleimhaut zu beurteilen, welche durch eine hochdosierte Chemotherapie, die regelmäßig bei AML-Patienten während der Induktions- und Konsolidierungsphase angewendet wird, erzeugt werden könnten.

Um eine hohe Verlässlichkeit der gewonnenen Ergebnisse gewährleisten zu können, wurde eine systematisierte Art der Probengewinnung durchgeführt. Die Abstriche der Wangenschleimhaut wurden nach einem genau festgelegten, standardisierten Vorgehen angefertigt. Zusätzlich wurden alle auffälligen Ergebnisse in einem zusätzlichen Untersuchungsschritt überprüft. Die Kapillarelektrophorese wurde eingesetzt, um eine möglichst genaue Analyse der Mikroinstabilitäten zu ermöglichen. Eine Kontamination des PCR-Produktes konnte durch eine parallele Untersuchung von Negativ-Kontrollen in der Elektrophorese ausgeschlossen werden.

Bei den 12 Patienten aus der Nicht-AML-Gruppe wurden die Wangenschleimhautabstriche im zeitlichen Abstand von 2-24 Monaten nach einer Hochdosischemotherapie gewonnen. Zwei Patienten hatten im Vorfeld (1-2 Jahre zurückliegend) eine allogene Stammzelltransplantation erhalten. Bei keinem der Genorte, die bei den Nicht-AML-Patienten untersucht wurden, fand sich ein Unterschied im Allelmuster zwischen den Referenzzellen bzw. den CD34-negativen Zellen und den Epithelzellen der Wangenschleimhaut. Dadurch kann sowohl eine durch eine vorherige Chemotherapie induzierte genetische Instabilität von Epithelzellen als auch eine solche von hämatologischen Stammzellen weitgehend ausgeschlossen werden. Unser eigenes Resultat bestätigt die Ergebnisse von Faber et al. [2006], die sieben AML-Patienten nach durchgeführter Hochdosischemotherapie in Bezug auf das Vorhandensein einer Mikrosatelliteninstabilität in Epithelzellen von Wangenschleimhaut untersuchten. Auch diese Autoren konnten keine chemotherapieinduzierte MSI nachweisen. Auch Minicucci et al. [2008] konnten nach einer durchgeführten Chemotherapie keinen signifikanten Anstieg genetischer Veränderungen in Epithelzellen der Wangenschleimhaut auffinden.

Bei den 18 AML-Patienten der vorliegenden Arbeit, bei denen Wangenschleimhautabstriche angefertigt wurden, lag die Chemotherapie zwischen 2-120 Monaten zurück.

Acht dieser Patienten hatten eine allogene periphere Blutstammzelltransplantation (PBSZT) erhalten. Die 13 aufgefundenen Unterschiede bzw. veränderten Allelbanden in den Referenzzellen dieser Patienten verteilten sich auf drei Patienten mit PBSZT und eine Patientin ohne PBSZT. Sieben Patienten wiesen trotz durchgeföhrter allogener PBSZT keinerlei unterschiedliche Allelbanden zwischen den untersuchten Referenzzellen auf. Allerdings kann man nach Faber et al. [2006] in derartigen Fällen trotzdem von einer genetischen Instabilität der Wangenschleimhautzellen ausgehen, die durch eine Graft-versus-Host-Reaktion in den Epithelzellen der Wangenschleimhaut hervorgerufen wird. Dabei werden die Zellen einem inflammatorischen, oxidativen Stress ausgesetzt und die entstandenen genetischen Veränderungen können durch körpereigene DNA-Reparatursysteme nicht mehr vollständig eliminiert werden [Chang et al. 2002]. Es wäre aber ebenso möglich, dass sich die fehlende genetische Instabilität bei diesen Patienten dadurch erklärt, dass aufgrund der zurückliegenden PBSZT bereits ausreichend vorhandene Zellen der neuen Spenderhämatopoese untersucht wurden, die keine solchen Unterschiede mehr aufweisen. Dieser Effekt wird zumindest in der Literatur beschrieben. Endler et al. [1999] konnten in ihrer Untersuchung von Epithelzellen der Mundhöhle zeigen, dass bei Patienten nach allogener PBSZT bereits ein Anteil von 25% neuer Blutzellen ausreicht, um den ursprünglichen Empfängerogenotyp zu überdecken. Dabei zeigten die Epithelzellen der Wangenschleimhaut identische genetische Allelmuster wie Zellen aus Knochenmarkausstrichen zum Zeitpunkt der hämatologischen Remission, die nach der allogenen PBSZT eingetreten war.

Wenn demnach Verfälschungen durch bereits im Vorfeld stattgeföndene Stammzelltransplantationen vermieden werden, könnten sich Epithelzellen der Wangenschleimhaut als Referenz-DNA durchaus eignen. Die eigene Studie konnte bestätigen, dass bei der Auswahl des Referenzmaterials zumindest keine Differenzierung zwischen AML- und nicht-AML-Erkrankung notwendig ist. Somit besteht bei der Untersuchung der genetischen Instabilität nicht die Notwendigkeit, Wangenschleimhautepithelzellen oder CD34-negative Stammzellen als Referenzmaterial auszuschließen.

Diesen Vorteil beachtend könnte sich bei genetischen Analysen künftig die Diagnostik bzw. die Verlaufsbeobachtung auf diese neuen Referenzmaterialien stützen, die leicht zu gewinnen sind. In Anbetracht des Aufwandes im Rahmen der Leukapherese oder der

Belastung des Patienten während einer Knochenmarkspunktion wären die neuen Routinemethoden zur Gewinnung der Referenz-DNA als sehr wünschenswert anzusehen. Auf der anderen Seite ist auch die Gewinnung von genetisch abberanten Blasten mit leukämiespezifischer DNA aus peripher zirkulierendem Blut für die Untersuchung auf genetische Instabilität eine alternative gegenüber der Gewinnung derartiger Zellen durch eine Knochenmarkspunktion. Rogers et al. [2004] zeigten bereits, dass derartige Zellen bei AML-Patienten im peripheren Blut in erhöhtem Maße vorkommen und dass sich bei 70% der Patienten ein Loss of Heterozygosity nachweisen lässt. Der Umstand, warum sich peripher mehr genetisch abberante Leukämiezellen als im Knochenmarkaspirat nachweisen lassen, dürfte darin begründet sein, dass es durch den erhöhten Turnover von Zellen im Knochenmark zu einer schnelleren Ausschwemmung von Leukämiezellen in die Blutbahn kommt, während die normale Apoptoserate gesunder Zellen im zirkulierenden Blutsystem zu einer relativen Verringerung dieser gesunden Zellen im Vergleich zu den genetisch abberanten Zellen führt. Yeh et al. [2009] bestätigen diese Ansicht insofern, als dass sie bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen eine Anreicherung tumorspezifischer DNA und Proteine im Blutplasma nachweisen konnten.

Insgesamt lässt sich also aus den eigenen Daten der Schluss ziehen, dass sowohl die Verwendung von Wangenschleimhautepithelzellen als konstitutionelle Referenz-DNA zur Analyse auf genetische Instabilität und Mikrosatelliteninstabilität geeignet ist als auch die Entnahme von peripheren Blutzellen für die Diagnostik und die Verlaufs kontrolle der Therapie hämatologischer Erkrankungen als sinnvoll erscheint.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit steht die Bewertung der genetischen Instabilität von AML-Blasten in Bezug auf deren prognostische Relevanz im Vordergrund. Das Auftreten einer Loss of Heterozygosity oder einer Mikrosatelliteninstabilität könnte in Verbindung mit der während der Tumorprogression zunehmenden genetischen Instabilität der Krankheit und mit ihrer zunehmend schlechteren Prognose stehen. Um dies bewerten zu können, sollte zunächst die Häufigkeit von LOH und MSI in der eigenen Studie mit Daten aus der Literatur betrachtet werden.

Sheikhha et al. (2002) fanden eine Rate von Mikrosatelliteninstabilitäten bei 29,4% der von ihnen untersuchten AML-Patienten, während Horiike et al. [1999] bei Patienten mit

t-AML eine entsprechende genetische Abweichung bei 20% feststellten. Diese Daten entsprechen in etwa den eigenen Ergebnissen von 31% genetischer Instabilität (LOH/MSI) bei sekundärer AML bzw. 28% bei de novo-AML. Die eigene Rate ist allerdings niedriger als die von Agueli et al. [2007], die unter Anwendung von 35 Mikrosatellitenmarkern, die auf acht Chromosomen verteilt waren, eine Rate von 57% genetischer Instabilität bei AML demonstrierte. Dabei konnten diese Autoren zeigen, dass 99% ihrer Fälle bei Patienten eruierbar waren, die in der konventionellen Chromosomenanalyse keine Abweichungen gezeigt hatten. Legt man dem gegenüber die Ergebnisse der acht Mikrosatellitenmarker auf sechs Chromosomen zugrunde, die in der eigenen Studie zur Anwendung gelangten, zeigt sich eine genetische Instabilität bei 28,5% der untersuchten Blasten. Dies illustriert in Übereinstimmung mit Agueli et al. [2007] den Umstand, dass mit zunehmender Zahl untersuchter Genloci bzw. mit steigendem Umfang des Primerpanels vermutlich auch die Zahl von AML-Patienten mit genetischer Instabilität zunimmt.

Auch wenn die Zusammenstellung der in der eigenen Arbeit verwendeten Primer zunächst empirisch erfolgte, zeigt die Häufigkeit von LOH und MSI bei den einzelnen Primern, dass die ermittelten Daten keine Zufallsergebnisse sein können. Vielmehr scheint es sich bei den durch die eingesetzten Primer identifizierten Genorten um aussagefähige Lokalisationen hinsichtlich der genetischen Instabilität bei AML zu handeln. Dies wird durch eine erhöhte Rezidivrate bei den durch die verwendeten Primerpanels detektierten LOH und MSI im Vergleich zu Patienten ohne LOH/MSI illustriert (vgl. Kapitel 3.3.1. bis 3.3.8). Bedacht werden muss in diesem Zusammenhang aber die jeweils niedrige Fallzahl von Patienten, auf denen die jeweiligen Rezidivraten bei Vorliegen eines LOH oder einer MSI beruhen. Für künftige Studien ist es deshalb unumgänglich, die beobachteten Gruppenstärken deutlich zu erhöhen, um beobachtete Unterschiede statistisch signifikant belegen zu können. Die sich aus den Ergebnissen aufdrängende Frage, ob ein LOH bzw. eine MSI das initiale Ereignis der Leukämogenese darstellt, oder ob es vielmehr die Folge des Erkrankungsprozesses ist, kann die vorliegende Arbeit leider nicht beantworten.

Klinische und laborchemische Parameter wie Patientenalter und LDH-Wert bei Erstdiagnose einer AML hatte bei den eigenen Patienten keinen signifikanten Einfluss auf die Häufigkeit einer genetischen Instabilität. Trotzdem waren die Raten an genetischer

Instabilität bei über 50jährigen Patienten deutlich höher (22,2% vs. 9,8%) im Vergleich zu jüngeren Patienten. Ein LDH-Wert > 700 U/l hingegen führte nur zu einer äußerst geringgradigen Erhöhung der Rate an genetischer Instabilität im Vergleich zu Patienten mit niedrigeren Werten (16,7% vs. 13,5%), so dass in diesem Fall der LDH-Wert als relevanter Einflussfaktor auf die genetische Instabilität ausgeschlossen werden kann. Der Versuch nachzuweisen, ob die zytogenetisch eruierte Prognoseeinschätzung des Patienten mit einer erhöhten Rate an genetischer Instabilität in Zusammenhang steht, ergab keinen relevanten Unterschied. Die Resultate waren sogar etwas widersprüchlich. Patienten mit intermediärer oder schlechter Prognose wiesen geringgradig weniger häufig eine genetische Instabilität auf als Patienten mit guter Prognose (15,9% vs. 20%), obwohl eher das Gegenteil hätte erwartet werden müssen. Dass der Unterschied keine statistische Signifikanz erlangte, bedeutet einerseits, dass dieser Faktor nicht von Relevanz sein dürfte. Auf der anderen Seite ist aber zu bedenken, dass aufgrund der geringen Patientenzahl eine gemeinsame Gruppe aus Patienten mit intermediärer und schlechter Prognose gebildet werden müßte. Möglicherweise hätten sich in einem deutlich umfangreicheren Patientenkollektiv mit mehr Patienten mit intermediärer oder schlechter Prognose andere Häufigkeiten ergeben. Der AML-Typ scheint hinsichtlich der Häufigkeit einer genetischen Instabilität eine untergeordnete Rolle zu spielen. Schließlich war die Rate an genetischer Instabilität bei Patienten mit primärer AML mit 14,3% nicht signifikant niedriger als jene von Patienten mit sekundärer AML (21,4%). Trotzdem sind gewisse Unterschiede zugunsten einer primären AML erkennbar und möglicherweise hätte sich bei einer deutlich umfangreicheren Patientenkollektiv dieses Ergebnis als signifikant ergeben.

Auch wenn die vier geprüften Faktoren keine signifikanten Einfluss auf die Häufigkeit einer genetischen Instabilität zeigten, so ergaben sich sowohl bei dem gemischten Kollektiv aus Patienten mit primärer und sekundärer AML als auch im Kollektiv der ausschließlich an primärer AML leidenden Patienten signifikante Einflüsse auf das rezidivfreie Überleben. Für beide Subgruppen galt, dass jüngere Patienten (< 50 Jahre) länger rezidivfrei überleben als ältere Patienten, dass ein LDH-Wert über 700 U/l ebenfalls zu einem längeren rezidivfreien Überleben führt, dass Patienten mit einer guten Prognoseeinschätzung erheblich länger rezidivfrei überleben als Patienten mit einer intermediären oder schlechten Prognoseeinschätzung, dass eine genetische Instabilität

(LOH/MSI) mit einer erheblich verkürzten rezidivfreien Überlebenszeit verbunden ist im Vergleich zu Patienten ohne genetische Instabilität und dass schließlich eine sekundäre AML ebenfalls zu einer signifikant kürzeren rezidivfreien Überlebenszeit führt als eine primäre AML. In der Regressionsanalyse sind die jeweiligen Einflussfaktoren (Alter, LDH-Wert, Karyotyp, AML-Typ, genetische Instabilität) zwar häufig nicht mehr statistisch signifikant. Dies ist aber eher auf die relativ niedrige Fallzahl der Patienten zurückzuführen. Zumindest konnte für Patienten ohne genetische Instabilität statistisch signifikant gezeigt werden, dass ein prognostisch schlecht zu bewertender Karyotyp mit einem etwa zweifach höheren Rezidivrisiko verbunden war als ein Karyotyp mit intermediärer/guter Prognose.

Dies deckt sich mit Ergebnissen aus größeren Studien wie jener von Haferlach et al. [2003]. Diese konnten bei 614 Patienten mit de novo-AML im Rahmen einer multivariaten Analyse den negativen Einfluss eines prognostisch schlechten zytogenetischen Befundes, eines höheren Patientenalters und eines hohen LDH-Wertes auf die Prognose der Patienten nachweisen. Auch in anderen Studien [Fröhling et al., 2006; Shao et al., 2006] finden sich eindeutig höhere Rezidivraten für AML bei älteren Patienten im Alter über 70 Jahren (etwa 2-2,5fach) und bei Patienten mit prognostisch ungünstigem Karyotyp (ca. 2-2,5fach). Appelbaum et al. [2006] stellten zusätzlich fest, dass sich die Zahl der Patienten mit ungünstiger Zytogenetik mit steigendem Alter erhöht. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Büchner et al. [2009], die eine signifikant niedrigeres 4-Jahres-Überlebensrate bei Patienten im Alter über 60 Jahren im Vergleich zu jüngeren Patienten feststellten (16% vs. 37%) ist nicht nur offensichtlich, dass eine engmaschige Überwachung genetischer Instabilitäten bei älteren AML-Patienten erforderlich ist. Vielmehr ist es notwendig, in künftigen Studien zu eruieren, welche potentiellen Genloci möglicherweise sowohl mit zunehmendem Alter häufiger alteriert sind und welche derartigen Genloci mit einer besonders schlechten bzw. guten Prognose verbunden sind. Dadurch könnte eventuell herausgefunden werden, bei welchen Alterationen der jeweiligen Genloci eine entsprechende chemotherapeutische Therapie oder „Targedtherapie“ einen besonders positiven Einfluss auf die verbleibende Überlebenszeit oder das rezidivfreie Überleben hat.

Die eigenen Resultate illustrieren deutlich, dass das Rezidivrisiko um etwa das 3,5fache erhöht war, wenn eine genetische Instabilität nachgewiesen werden konnte. Um eine

entsprechend umfangreiche Analyse des Rezidivrisikos für das alleinige Auftreten eines LOH oder eines MSI anzufertigen, waren jedoch die auswertbaren Fallzahlen in der vorliegenden Arbeit zu gering (vgl. Tabelle 17). Dies muss künftigen Studien mit umfangreicheren Kohorten überlassen bleiben. Trotz dieser kleineren Einschränkung ist ein Vergleich der eigenen Resultate mit der Literatur möglich, denn trotz der teilweise geringen Fallzahlen, die die Basis der prozentualen Rezidivrate darstellen, kann zumindest die Rezidivrate in Abhängigkeit vom Genlocis bewertet werden.

Koike et al. [1999] vermuteten bereits ein Tumorsuppressorgen auf dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Locus D7S486 des Chromosoms 7q31-1 und beschrieben ein LOH an dieser Stelle als ein wichtiges Ereignis in der Pathogenese einer de novo AML. Dies scheint sich auch in der eigenen Arbeit zu bestätigen, denn die Abberationsrate einer LOH waren mit 13,1% an diesem Locus am höchsten im Vergleich zu allen anderen Genloci, obgleich die MSI-Rate mit 2,4% nicht wesentlich unterschiedlich zu allen anderen von uns betrachteten Genloci war. Eine LOH führte an dieser Stelle mit 63% und eine MSI mit 50% erheblich häufiger zu einem Rezidiv im Vergleich zu Patienten ohne entsprechende genetische Instabilitäten (32%). Die Region um 7q gilt als ein "Hotspot" für genetische Abberationen im Rahmen der Genese der akuten Leukämie [Basirico et al. 2003]. So gilt die Genregion c-met/D7S525, die in der vorliegenden Arbeit in 6,8% der Fälle durch eine genetische Instabilität (LOH/MSI) charakterisiert war, als wichtige Region, die einen Einfluss auf die Proliferation und das Überleben hämatologischer Vorläuferzellen hat. Veränderungen in diesem Bereich führen zu einer gestörten Zelldifferenzierung [Borset et al. 1999] sowie zu einem Verlust von AML-assoziierten Tumor-Suppressor-Genen [Wilding et al. 2002]. Zudem zeigen sich Verbindungen zwischen LOH's auf Chromosom 7q und anderen chromosomalen Abberationen, die darauf hindeuten, dass die Region um 7q besonders anfällig für Chromosomenbrüche ist [Basirico et al. 2003]. Allerdings sind bei Patienten mit de novo-AML auch andere Chromosomen von MSI und LOH betroffen. Dies zeigten Nomdedéu et al. [2005] unter Anwendung eines Panels mit sieben Primern, die u.a. auch die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primer D2S123 (Chromosom 2p16) und MFD15 (Chromosom 17q11.2-12) beinhalteten. Sie fanden in 19,6% ihrer Patienten ein MSI und in 4,9% ein LOH. Schoch et al. [2003] konnten bei 2,8% (54 von 1897 Patienten) MLL-Genveränderungen nachweisen, wobei diese signifikant häufiger bei

sekundärer als bei primärer AML auftraten. Allerdings waren diese Genveränderungen in Übereinstimmung mit den eigenen Resultaten deutlich häufiger mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit sAML (9,4%) im Vergleich zu Patienten mit de novo-AML (2,6%) verbunden. Christiansen et al. [2001] fanden bei 27% ihrer untersuchten Patienten ein LOH auf dem Genort Tp53, der als Tumorsuppressoren fungiert. Diese Rate ist deutlich höher als die LOH-Rate bei TP53ALS in der eigenen Studie (7,6%). Mutationen von TP53 sind nach Ansicht von Christiansen et al. [2001] mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden. Dies kann durch die Daten der eigenen Studie belegt werden, denn die Rezidivrate bei LOH in diesem Bereich war mit 50% erheblich höher im Vergleich zu 37% bei Patienten ohne LOH/MSI bei TP53ALS. Zusätzlich wiesen alle der sechs Patienten eine 5q-Deletion und/oder einen komplexen bzw. prognostisch ungünstigen Karyotyp auf. Nach Le Beau et al. [2004] und Xie et al. [2000] finden sich in etwa 42% der Patienten mit sAML und bei 10% der Patienten mit de novo-AML eine genetische Instabilität auf dem langen Arm des Chromosoms 5q. Dies ist deutlich höher als die entsprechenden Raten von LOH (7,1%) und MSI (2,4%) bei Anwendung des Primers APC für den Genlocus auf Chromosom 5q21-22. Obwohl diese Raten in der eigenen Arbeit viel niedriger sind, zeigt sich trotzdem eine erheblich höhere Rezidivrate bei derartigen Abberationen für LOH (67%) und MSI (50%) gegenüber Patienten ohne genetische Instabilität auf 5q21-22. Dies illustriert die Notwendigkeit, das Rezidivrisiko für mit verschiedenen Primern identifizierte genetische Abberation in weiteren Studien zu untersuchen, um die prognostische Bewertung der jeweiligen Abberationen genauer bestimmen zu können.

Die in der eigenen Arbeit ermittelten Ergebnisse für LOH und MSI bei Patienten, auf deren Chromosomen im Rahmen der zytogenetischen Untersuchung keine Veränderungen zu identifizieren waren, zeigt deutlich, dass die Analyse von Mikrosatelliteninstabilitäten, die DNA-Sequestierung, das Array-CGH und das Gene Expression Profiling sensitive Methoden sind, um in dieser bezüglich der Zytogenetik scheinbar unauffälligen Patientengruppe jene Patienten herauszufinden, bei denen eine schlechte Prognose vorliegt. Durch dieses Vorgehen könnte in künftigen Studien der Versuch unternommen werden, mehr Erkenntnisse über den pathogenetischen Ursprung der Leukämie und durch Optimierung der Therapien eine Verbesserung ihrer Prognose zu bewirken. Gorletta et al. [2005] konnten nachweisen, dass mindestens 20% der AML-

Patienten mit einem zyto-genetischen Normalbefund ein LOH auf Allelen mit Tumor-Suppressor-Genen zeigen und dass die von Bedeutung in der Entstehung der AML sein könnte. Nach Pinheiro et al. [2008] sind sogar der Auffassung, dass Primer wie D7S486 auf Chromosom 7 Hinweise dafür liefern, dass entsprechende Abberationen vor dem Auftreten einer Leukämie vorhanden sind und somit ursächlich für und nicht die Folge der Erkrankung sind. Ist diese Annahme korrekt, so wären wesentliche Fortschritte in der frühen Diagnostik der AML möglich.

Obwohl die in der eigenen Arbeit gewählten Definitionskriterien für eine genetische Instabilität (zweimaliges LOH und/oder MSI) willkürlich gewählt erscheinen, belegt die Analyse der Rezidivrate und jene des rezidivfreien Überlebens die Realibilität dieser Vorgehensweise. Diese Kriterienwahl bedarf jedoch ohne Zweifel noch der Überprüfung in weiteren prospektiven Untersuchungen unter Hinzufügung weiterer Mikrosatellitenprimer.

5. Zusammenfassung

Veränderungen der DNA im Sinne einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) oder eines Loss of Heterozygosity (LOH) sind u.a. bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) bekannt. Da die AML-Therapie durch eine ausgeprägte therapieassoziierte Morbidität und Mortalität gekennzeichnet ist, ist es erforderlich, diagnostische Verfahren zu entwickeln, die die Überwachung des Verlaufs des behandelten Patienten in der Nachbeobachtungsphase verbessert. Ziel dieser Arbeit war es, genetische Instabilitäten (LOH, MSI) mittels acht selektionierter Primer-Panels bei AML-Blasten bereits bei Erstdiagnose der Erkrankung zu diagnostizieren und ihre prognostische Relevanz zu untersuchen.

Die erste Fragestellung der Arbeit zielte darauf ab, die Eignung von Wangenschleimhautabstrichen als konstitutionelle Referenz-DNA bei 30 Patienten (18 mit AML, 12 mit Nicht-Stammzellerkrankungen wie Lymphom, multiples Myelom, Ewing-Sarkom) zu analysieren. Es wurden insgesamt 30 Patienten untersucht, davon 18 mit AML und zwölf mit einer „Nicht-Stammzellerkrankung“ (zehn Lymphome, ein multiples Myelom und einem Ewing-Sarkom). Die Ergebnisse zeigten, dass, sofern Verfälschungen der Resultate durch im Vorfeld stattgefundene Stammzelltransplantationen vermieden werden, sich Epithelzellen der Wangenschleimhaut sowie CD34-negative Stammzellen als Referenz-DNA eignen. Es ist hierbei zudem keine Abgrenzung zwischen Patienten mit AML- bzw. mit nicht-AML-Erkrankung erforderlich.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit steht die Bewertung der genetischen Instabilität von AML-Blasten in Bezug auf deren prognostische Relevanz im Vordergrund. In Abhängigkeit des jeweiligen Primerpanels und des dadurch abgedeckten Chromosoms fanden sich folgende Raten an genetischer Instabilität (definiert als Vorhandensein von 2 LOH's und/oder einem MSI): Primerpanels D7S486/Chromosom 7q31-1 mit 15,4%, TP53ALS/Chromosom 17p12-13.1 mit 10,1%, APC/Chromosom 5q21-22 mit 9,4% s MFD15/Chromosom 17q11.2-12 mit 8,6%, D7S525/Chromosom 7q22-31.1 mit 6,8%, D8S559/Chromosom 8q22 mit 6%, D11S1356/Chromosom 11q23 mit 5,2% und D2S123/Chromosom 2p16 mit 4,8%. Die Rate genetischer Instabilität war bei älteren

Patienten im Alter über 50 Jahre höher als bei jüngeren Patienten (22,2 vs. 9,8%), während der LDH-Wert und die zytogenetische Prognoseeinschätzung keine Rolle spielten. Bei dem gemischten Patientenkollektiv mit primärer und sekundärer AML und auch bei der Untergruppe von Patienten mit primärer AML zeigte sich, dass jüngere Patienten (< 50 Jahre) länger rezidivfrei überlebten als ältere Patienten, dass ein LDH-Wert über 700 U/l ebenfalls zu einem längeren rezidivfreien Überleben führt, dass Patienten mit einer guten Prognoseeinschätzung erheblich länger rezidivfrei überleben als Patienten mit einer intermediären oder schlechten Prognoseeinschätzung und dass eine genetische Instabilität (LOH/MSI) mit einer erheblich verkürzten rezidivfreien Überlebenszeit verbunden ist im Vergleich zu Patienten ohne genetische Instabilität. Patienten mit sekundärer AML wiesen ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben auf als Patienten mit primärer AML. Das Rezidivrisiko war bei Patienten mit genetischer Instabilität 3,5fach höher als bei Patienten ohne eine solche Instabilität.

Die in der eigenen Arbeit ermittelten Ergebnisse für LOH und MSI bei Patienten, auf deren Chromosomen im Rahmen der zytogenetischen Untersuchung keine Veränderungen zu identifizieren waren, zeigt deutlich, dass die Analyse von Mikrosatelliteninstabilitäten, die DNA-Sequestierung, das Array-CGH und das Gene Expression Profiling sensitive Methoden sind, um in dieser scheinbar unauffälligen Patientengruppe jene Patienten herauszufinden, bei denen eine schlechte Prognose vorliegt. Die in der Arbeit vorgenommene Kriterienwahl für eine genetische Instabilität bedarf jedoch noch der Überprüfung in weiteren prospektiven Untersuchungen, ggf. unter Hinzufügung weiterer Mikrosatellitenprimerpanels.

6. Literaturverzeichnis

1. Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Yung A, Schnittger S, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP (2009) Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica* 94: 213-223
2. Agueli C, Basirico R, Fabbiano F, Rizzo V, Cascio F, Cammarata G, Marfia A, La Rosa M, Mirto S, Santoro A (2007) Loss of heterozygosity in acute leukaemia: evidence of frequent submicroscopic deletions. *Haematologica* 92: 678-681
3. Anak S, Saribeyoglu ET, Bilgen H, Unuvar A, Karakas Z, Devecioglu O, Agaoglu L, Gedikoglu G (2005) Allogeneic versus autologous versus peripheral stem cell transplantation in CR1 pediatric AML patients: a single center experience. *Pediatr Blood Cancer* 44: 654-659
4. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, Anderson JE, Petersdorf SH (2006) Age and acute myeloid leukemia. *Blood* 107: 3481-3485
5. Aoudjhane M, Labopin M, Gorin NC, Shimoni A, Ruutu T, Kolb HJ, Frassoni F, Boiron JM, Yin JL, Finke J, Shouten H, Blaise D, Falda M, Fauser AA, Esteve J, Polge E, Slavin S, Niederwieser D, Nagler A, Rocha V (1999) Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia* 19: 2304-2312
6. Au WY, Lie AK, Lee CK, Liang R, Kwong YL (1999) Donor Lymphocyte Infusion induced molecular remission in relapse of acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: *Bone Marrow Transplant* 23: 1201-1203
7. Basirico R, Pirrotta R, Fabbiano F, Mirto S, Cascio L, Pagano M, Cammarata G, Magrin S, Santoro A (2003) Submicroscopic deletions in the 7q region are associated with recurrent chromosome abnormalities in acute leukemia. *Haematologica* 88: 429-437
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976) Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 3: 451-458
9. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103: 620-625

10. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. (1991) Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). *Br J Haematol* 78: 458-459
11. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, Kashyap A, Flowers ME, Lilleby K, Chauncey TR, Storb R, Appelbaum FR (2000) Transplantation of bone marrow as compared with peripheral blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl. J Med* 344: 175-181
12. Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ (1997) Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* 89: 3104-3112
13. Blair A, Hogge DE, Sutherland HJ (1998) Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR(-). *Blood* 92: 4325-4335
14. Blair A, Sutherland HJ (2000) Primitive acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo lack surface expression of c-kit (CD117). *Exp Hematol* 28: 660-671
15. Bloomfield CD (2002) Clinical importance of genetic findings in adult AML. *Int J Hematol* 76 (Suppl. 2): 176-177
16. Bonnet D (2005) Leukemic stem cells show the way. *Folia Histochem Cytobiol* 43: 183-186
17. Bonnet D, Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-737
18. Borset M., Seidel C., Hjorth-Hansen H., Waage A., Sundan A (1999) The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in multiple myeloma and other blood malignancies. *Leukemia Lymphoma* 32: 249-256
19. Breems DA, Löwenberg B (2005) Autologous stem cell transplantation in the treatment of adults with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 130: 825-833
20. Büchner T, Hiddemann W, Löffler H (1995) Treatment of AML in elderly: full dose versus reduced dose induction treatment. *Blood* 86 (Suppl 1): 434a
21. Büchner T, Hiddemann W, Wörmann B, Löffler H, Ludwig WD, Schoch C, Maschmeyer G, Staib P, Aul C, Heyll GA, Grüneisen A, Rasche H, Eimermacher JH, Balleisen L, Pielken, HJ, Reis HE, Griesinger F, Reichle A, Sauerland MC, Heinecke G (2000) Acute myeloid leukemia in adults: is postconsolidation maintenance therapy necessary? *Int J Hematol* 117: 359-365

22. Byrd JC, Mrozek K, Dodge KR, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati J, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru RPK, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD (2002) 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* 100: 4325-4336
23. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD (2002) 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* 100: 4325-4336
24. Chang CL, Marra G, Chauhan DP (2002) Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C148-C154
25. Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, Schiffer CA, Bennett JM, Bloomfield CD, Brunning R, Gale RP, Grever MR, Keating MJ (1990) Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 8: 813-819
26. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J (2001) Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related-myelodysplasie and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 19: 1405-1413
27. Cioc AM, Wagner JE, MacMillian ML, DeFor T, Hirsch B (2010) Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with fanconi anemia: morphologic and cytogenetic characteristics. *Am J Clin Pathol* 133: 92-100
28. Das-Gupta EP, Seedhouse CH, Russell NH (2001) Microsatellite instability occurs in defined subsets of patients with acute myeloblastic leukaemia. *Br J Haematol* 14: 1044-1051
29. De Lima M, Giralt S (2006) Allogeneic transplantation for the elderly patient with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Semin Hematol* 43: 107-117
30. Deschler B, Lübbert M (2008) Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. In: Estey EH, Faderl SH, Kantarjian HM. *Hematologic malignancies: acute leukemias*. Springer Verlag, Berlin, New York, 47-56

31. Estey EH (2008) Therapy of AML. Cytogenetics as the principal predictor of resistance in AML. In: Estey EH, Faderl SH, Kantarjian HM. Hematologic malignancies: acute leukemias. Springer Verlag, Berlin, New York, 3-4
32. Faber P, Fisch P, Waterhouse M, Schmitt-Gräff A, Bertz H, Finke J, Spyridonidis A (2006): Frequent genomic alterations in epithelium measured by microsatellite instability following allogeneic cell transplantation in humans. *Blood* 107: 3389-3396
33. Feller N, van der Pol MA, van Stijn A, Weijers GWD, Westra AH, Evertse BW, Ossenkopele GJ, Schuurhuis GJ (2004) MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 18: 1380-1390
34. Ferrara F, Mirto S (1996) Serum LDH value as a predictor of clinical outcome in acute myelogenous leukaemia of the elderly. *Br J Haematol* 92: 627-631
35. Frassoni F, Labopin M, Gluckman E, Prentice HG, Vernant JP, Zwaan F, Granena A, Gahrton G, De Witte T, Gratwohl A, Reiffers J, Gorin NC (1996) Results of allogeneic bone marrow transplantation for acute leukaemia have improved over time in Europe. *Bone Marrow Transplant* 17: 13-18
36. Fröhling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Döhner K, Döhner H (2006) Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AMLHD98-B. *Blood* 108: 3280-3288
37. Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Hossfeld DK, Haas R, Aul C (2001) Myelodysplastic Syndrome. Neue WHO-Klassifikation und Aspekte zur Pathogenese, Prognose und Therapie. *Dt Ärztebl* 98: 2272-2278
38. Gleeson CM, Sloan M, McGuigan JA, Ritchie AJ, Weber JL, Russell SEH (1996) Ubiquitous somatic alterations at microsatellite alleles occur infrequently in barrett's-associated esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 56: 259-263
39. Gorletta TA, Gasparini P, D'Elios MM, Turbia M, Pelicci PG, Di Fiore PP (2005) Frequent loss of heterozygosity without loss of genetic material in acute myeloid leukaemia with a normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 44: 334-337
40. Gratama JW, Keeney M, Sutherland DR (1999) Enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Current Protocol Cytometry Suppl.* 8: 6.4.1-6.4.22
41. Griffin JD, Lowenberg D (1986) Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 68: 1185-1195

42. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheathley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 92: 2322-2333
43. Guenechea G, Gan OI, Dorrell C, Dick JE (2001) Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol* 1: 75-82
44. Haferlach T, Schoch C, Löffler H, Gassmann W, Kern W, Schnittger S, Fonatsch C, Ludwig W, Wuchter C, Schlegelberger B, Staib P, Reichle A, Kubica U, Eimermacher H, Balleisen L, Grüneisen A, Haase D, Aul C, Karow J, Lengfelder E, Wörmann B, Heinecke A, Sauerland M, Büchner T, Hiddemann W (2003) Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: Results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group Studies. *J Clin Oncol* 21: 256-265
45. Harmann O, Le Coroller AG, Blaise D, Michon J, Philip I, Norol F, Janvier M, Pico JL, Baranzelli MC, Rubie H, Coze C, Pinna A, Meresse V, Benhamou E (1997) Peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation for solid tumours and lymphomas: hematologic recovery and costs. *Ann Intern Med* 126: 600-607
46. Hashmi K, Khan B, Ahmed P, Hussain I, Altaf C, Raza S, Iqbal H, Khan MA, Malik HS, Naeem M, Kamal K, Anwar M (2005) Graft versus host disease in allogeneic stem cell transplantation – 3 ½ years experience. *J Pak Med Assoc* 55: 423-427
47. Herold G. (2004) Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Schattauer Verlag, München
48. Hiddemann W, Kern W, Schoch C, Fonatsch C, Heinecke A, Wörmann B, Büchner T (1999) Management of acute myeloid leukemia in elderly patients. *J Clin Oncol* 17: 3569-3576
49. Ho (2005) Kinetics and symmetry division of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 33: 1-8
50. Hope KJ, Jin L, Dick JE (2004) Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 7: 738-743
51. Horiike S, Misawa S, Kaenko H, Sasai Y, Kobayashi M, Fujii H, Tanaka S, Yagita M, Abe T, Kashima K, Taniwaki M (1999) Distinct genetic involvement of the TP53 gene in therapy-related leukemia and myelodysplasia with chromosomal losses of Nos 5 and/or 7 and its possible relationship to replication error phenotype. *Leukemia* 13: 1235-1242

52. Ionov Y, Peinado MA, Makhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363: 558-561
53. Johansson B, Mertens F, Mitelman F (1996) Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities: balanced rearrangements vs. genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 16: 155-163
54. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, Meyerrose T, Rossi R, Grimes B, Rizzieri DA, Luger SM, Phillips GL (2000) The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 10: 1777-1784
55. Kambara T, Matsubara N, Nakagawa H, Notohara K, Nagasaka T, Yoshino T, Isozaki H, Sharp GB, Shimizu K, Jass J, Tanaka N (2001) High frequency of low-level microsatellite instability in early colorectal cancer. *Cancer Res* 61: 7743-7746
56. Kassim AA, Chinratanalab W, Ferrara JL, Mineishi S (2005) Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemias: „what is the best recipe?“: *Bone Marrow Transplant* 36: 565-574
57. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR (1998) Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Cytometry* 34: 61-70
58. Kern W, Voskova D, Schoch C, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. (2004) Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 104: 3078-3085
59. Knudson AG (1993) Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10914-10921
60. Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose g, Brehm G, Heim M, Wilmanns W (2006) Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76: 2462-2465
61. Kornblau SM, Estey E, Madden T, Tran HT, Zhao S, Consoli U, Snell V, Sanchez-Williams G, Kantarjian H, Keating M, Newman RA, Andreeff M (1997) Phase I study of mitoxantrone plus etoposide with multidrug blockade by SDZ PSC-833 in relapsed or refractory acute myelogenous leukaemia. *J Clin Oncol* 15: 1796-1802
62. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996) CD34: structure, biology and clinical utility. *Blood* 87: 1-13

63. Kurkjian C, Patel S, Kamble R, Dunn ST, Kern W, Kharfan-Dabaja MA. (2006) Acute promyelocytic leukemia and constitutional trisomy 21. *Cancer Genet Cytogenet* 165: 176-179
64. Kwok S, Higuchi R (1989) Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237-238
65. Lazarus HM, Peres WS, Klein JP, Kollman C, Bate-Boyle B, Bredeson CN, Gale RP, Geller RB, Keating A, Litzow MR, Marks DI, Miller CB, Douglas Rizzo J, Spitzer TR, Weisdorf DJ, Zhang MJ, Horowitz MM (2006) Autotransplantation versus HLA-matched unrelated donor transplantation for acute myeloid leukaemia: a retrospective analysis from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Br J Haematol* 132: 755-769
66. Le Beau MM, Espinosa R, Neuman WL, Stock W, Roulston D, Larson RA, Keinanen M, Westbrook CA (1993) Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5484-5488
67. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649
68. Lengfelder E, Reichert A, Schoch C, Haase D, Haferlach T, Löffler H, Staib P, Heyll A, Seifarth W, Saussele S, Fonatsch C, Gassmann W, Ludwig WD, Hochhaus A, Beelen D, Aul C, Sauerland MC, Heinecke A, Hehlmann R, Wormann B, Hiddemann W, Buchner T (2000) Double induction strategy including high dose cytarabine in combination with all-trans retinoic acid: effects in patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. German AML Cooperative Group. *Leukemia* 14: 1362-1370
69. Liang H, Fairman J, Claxton DF, Nowell PC, Green ED, Nagarajan L (1998) Molecular anatomy of chromosome 7q deletions in myeloid neoplasms: evidence for multiple critical loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3781-3785
70. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A (1999) Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341: 1051-1062
71. Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D (1994) Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Sci USA* 91: 9871-9875
72. Mayer RJ (1987) Current chemotherapeutic treatment approaches to the management of previously untreated adults with de novo acute myelogenous leukemia. *Semin Oncol* 14: 384-396
73. Michels SD, McKenna RW, Arthur DC, Brunning RD (1985) Therapy-related

- acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a clinical and morphologic study of 65 cases. *Blood* 65: 1364-1372
74. Minicucci EM, Ribeiro DA, de Camargo B, Costa MC, Ribeiro LR, Favero-Salvadori DM (2008). DNA damage in lymphocytes and buccal mucosa cells of children with malignant tumours undergoing chemotherapy. *Clin Exp Med* 8: 79-85
75. Minucci S, Monestiroli S, Giavara S, Ronzoni S, Marchesi F, Insigna A, Diverio D, Gasparini P, Capillo M, Colombo E, Matteucci C, Contegno F, Lo-Coco F, Scanziani E, Gobbi A, Pelicci PG (2002) PML-RAR induces promyelocytic leukemias with high efficiency following retroviral gene transfer into purified murine hematopoietic progenitors. *Blood* 100: 2989-2995
76. Mori, N, Morosetti R, Hoflehner E, Lübbert M, Mizoguchi H, Koeffler P (2000) Allelic Loss in the Progression of Myelodysplastic Syndrom. *Cancer Res* 60: 3039-3042
77. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD (2004) Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 18: 115-136
78. Mullis KB, Faloona FA, Scharf S, Salki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reacion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273
79. Najean Y, Rain JD, Goguel A, Grange MJ, Vigneron N, Dupuy E, Mougeot-Martin M. (1998) Treatment of polycythemia. I. Using radiosphorus with or without treatment in 483 patients over 65 years of age. *Ann Med Interne (Paris)* 149: 87-93
80. Nomdedeu JF, Perea G, Estivill C, Lasa A, Carnicer MJ, Brunet S, Aventin A, Sierra J (2005) Mikrosatelliten instability is not an uncommon finding in adult de novo acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 84: 368-375
81. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Aizawa S, Kawakubo K, Shimamoto T, Iwama H, Hayashi S, Toyama K (1996) Replication errors in haematological neoplasias: genomic instability in progression of disease is different among different types of leukaemia. *Clin Cancer Res* 2: 1583-1589
82. Olipitz W, Hopfinger G, Aguiar R, Gunsiliu E, Girschikofsky M, Bodner C, Hiden K, Linkesch W, Hoefler G, Sill H (2002) Defective DNA-mismatch repair: a potential mediator of leukemogenic susceptibility in therapy-related myelodysplasia and leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 34: 243-248
83. Pabst T, Schwaller J, Bellomo MJ, Oestreicher M, Muhlematter D, Tichelli A (1996) Frequent clonal loss of heterozygosity but scarcity of microsatellite instability at chromosomal breakpoint clutster regions in adult leukaemias. *Blood* 88: 1026-1034
84. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrozek K, Maharry K, Langer

- C, Baldus CD, Zhao W, Powell BL, Baer MR, Carroll AJ, Caligiuri MA, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD (2008). Wilms Tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukaemia group B study. *J Clin Oncol.* 26: 4595-4602
85. Passegue E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weisman IL (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11842-11849
86. Pedersen-Bjergaard J, Rowley JD (1994) The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood* 83: 2780-2786
87. Pinheiro RF, Serio FM, Silva MR, Briones MR, Chauffaille ML (2008) Association of loss of heterozygosity with cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Braz J Med Biol Res* 41: 610-614
88. Porter DL, Levine BL, Bunin N, Stadtmauer EA, Luger SM, Goldstein S, Loren A, Phillips J, Nasta S, Perl A, Schuser S, Tsai D, Sohal A, Veloso E, Emerson S, June C (2006) A kphase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex vivo via CD3/CD28 costimulation. *Blood* 107: 1325-1331
- 89 Powell BL, Moser B, Stock W, Gallagher RE, Willman CL, Stone RM, Rowe JM, Coutre S, Feusner JH, Gregory J, Couban S, Appelbaum FR, Tallman MS, Larson Arsenic trioxide improves event-free and overall survival for adults with acute promyelocytic leukemia: North American Leukemia Intergroup Study C9710 *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3751-7
90. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, Kamada N, Dohy H, Matsui T (1994) Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res* 137 (Suppl. 2): 68-97
91. Richmann CM, Weiner RS, Yankee RA (1976) Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 47: 1031-1039
92. Riesinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J (1993) Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinomas. *Cancer Res* 53: 5100-5103
93. Robert Koch Institut. (2008) Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 3.20. Leukämien, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert Koch Institut Berlin, 6. Aufl., 98-101
94. Rodewald HR, Friedrich W (2002) Blutstammzelltransplantation. *Bundesgesundheitsblatt* 45: 85-91
95. Rogers A, Youngson J, Taghi M, Dey A, Jilani I, Giles F, Estey E, Freireich E,

- Keating M, Kantarjian H, Albitar M (2004) Relative increase in leukemia-specific DNA in peripheral blood plasma from patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Blood* 103: 2799-2801
96. Sauer H, Wilmanns W (1985) Internistische Therapie maligner Erkrankungen. *TNM-Klassifizierung maligner Erkrankungen*. 2. Aufl., Urban & Vogel, München
97. Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, Schneider S, Dufour A, Benthäus T, Mellert G, Zellmeier E, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C, Braess J, Fritsch S, Heinecke A, Sauerland MC, Berdel WE, Buechner T, Woermann BJ, Hiddemann W, Spiekermann K (2009) NPM1, but not FLT3-ITD mutations predict early blast cell clearance und CR rate in patients with normal karyotyp AML (NK-AML) or high risk myelodysplastik syndrom (MDS). *Blood* 113, 5250-5253
98. Schoch C, Haferlach T, Haase D, Fonatsch C, Löffler H, Schlegelberger B, Staib P, Sauerland MC, Heinecke A, Büchner T, Hiddemann W (2001a) Patients with *de novo* acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. *Br J Haematol* 112: 118-126
99. Schoch C, Haferlach T, Schnittger S, Kern W, Dugas M, Hiddemann W (2001b) AML with recurring chromosome abnormalities as defined in the new WHO classification: incidence of subgroups, additional genetic abnormalities, FAB subtype and age distribution in an unselected series of 1897 cytogenetically and moleculargenetically analysed AML. *Blood* 98: 457a
100. Schoch C, Kohlmann A, Schnittger S, Brors B, Dugas M, Mergenthaler S, Kern W, Hiddemann W, Eils R, Haferlach T (2002a) Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10008-10013
101. Schoch C, Haferlach T, Brusch S, Gerstner D, Schnittger S, Dugas M, Kern W, Löffler H, Hiddemann W (2002b) Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: a detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence *in situ* hybridization including 24-color FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 35: 20-29
102. Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T (2003) AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 102: 2395-2402
103. Schoch C, Kern W, Schnittger S, Büchner T, Hiddemann W, Haferlach T (2004) The influence of age on prognosis of *de novo* acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. *Haematologica* 89: 1082-1090

104. Schoch C, Kern W, Kohlmann A, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T (2005) Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Gene Chromosom Cancer* 43: 227-238
105. Schütz J, Blettner M, Michaelis J, Kaatsch P (2005) Ursachen von Leukämien im Kindesalter. Resümee einer Fallkontrollstudie des Deutschen Kinderkrebs-registers. *Dt Ärztebl* 102: 2557-2564
106. Shannon KM, Turhan AG, Rogers, PC, Kan YW (1992) Evidence implicating heterozygous deletion of chromosome 7 in the pathogenesis of familial leukemia associated with monosomy 7. *Genomics* 14: 121-125
107. Shao B, Gao YR, Wang C, Yan SK, Cai Q, Jiang JL, Yang J, Bai HT, Zhao M, Zhao CX (2006) Prognostic factor analysis of 77 old patients with acute myelogenous leukaemia. *Ai Zheng* 25: 1007-1012
108. Sheikhha MH, Tobal K, Liu-Yin JA (2002) High level of microsatellite instability but not hypermethylation of mismatch repair genes in therapy-related and secondary acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 117: 359-365
109. Shimoni A, Korbing M (2002) Tumour cell contamination in re-infused stem cell autografts: does it have clinical significance? *Crit Rev Oncol Hematol* 41: 241-250
110. Small D (2008) Targeting FLT3 for the treatment of leukemia. *Semin Hematol* 45 (3 Suppl2): 17-21
111. Sweester D, Chien-Shing Chen, Blomberg A, Flowers D, Galipeau P, Barrett M, Heerema N, Buckley J, Woods W, Bernstein I, Reid B (2001) Loss of heterozygosity in childhood de novo acute myelogenous leukaemia. *Blood* 98: 1188-1194
112. Strauss L, Rowley S, La Russa S, Stuart R, Civin C (1986) Antigenic analysis of hematopoiesis: Characterization of My-10 antigen expression by normal lympho-hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 14: 878-886
113. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816-819
114. Thomas ED, Lochete HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW (1957) Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 257: 491-496
115. Virchow R (1845) Weisses Blut. *Frorieps Notizen* 36: 151-156
116. Vogelstein B, Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer.

Trends Genetics 9: 138-141

117. Vogelstein B, Kinzler KW (1998) The genetic basis of human cancer. McGraw-Hill, New York, 2. Aufl., 3-8
118. Wald BR, Heisel MA, Ortega JA (1982) Frequency of early death in children with acute leukaemia presenting with hyperleukocytosis. *Cancer* 50: 150-153
119. Webb JC, Golovleva I, Simpkins AH, Kempki H, Reeves B, Sturt N, Chessells JM, Brickell PM (1999) Loss of heterozygosity and microsatellite instability at the MLL locus are common in childhood acute leukemia, but not in infant acute leukemia. *Blood* 94: 283-290
120. Wilding J, Meijne E, Haines J, Moody J., Edward A, Newbild R, Parris C, Cox R, Silver A (2002) Functional Evidence from microcell-mediated chromosome transfer of myeloid leukaemia suppressor genes on human chromosomes 7 and 11. *Genes Chromosomes Cancer* 34: 390-397
121. Yeh Ch, Tseng R, Albitar M (2009) Plasma-based detection of clonality in lymphoid malignancies. *Eur J Haematol* 82: 450-453
122. Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T, Iwasaki H, Harakawa N, Hetherington CJ, Burel SA, Lagasse E, Weissman IL, Akashi K, Zhang DE (2001) AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10398-10403
123. Zhong MZ, Chen FP, Shu YG (2002) Hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 27: 242-244
124. Zhu YM, Gupta EP, Russell NH (1999) Microsatellite instability and p53 mutation are associated with abnormal expression of the MSH 2 gene in adult acute leukemia. *Blood* 94: 733-740
125. Zipursky A, Thorner P, de Harven E, Christensen H, Doyle J (1994) Myelodysplasia and acute megakaryoblastic leukemia in Down's syndrome. *Leuk Res* 18: 163-171
126. Zipursky A, Brown EJ, Christensen H, Doyle J (1999) Transient myeloproliferative disorder (transient leukemia) and hematologic manifestations of Down syndrome. *Clin Lab Med* 19: 157-167
127. Xie D, Hofmann WK, Mori N, Miller CW, Hoelzer D, Koeffler HP (2000) Allelotyping analysis of the myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 14: 805-810

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Götz
Vorname	Gerlinde
Geburtsdatum	12.06.1976
Geburtsort	Breitenbrunn
Familienstand	ledig
Anschrift	Leiterzhofen 6 92363 Breitenbrunn

Beruflicher Werdegang

seit 02/2010	Assistenzärztin der Frauenklinik Klinikum Rosenheim Chefarzt Prof. Dr. Beck
7/2009 - 02/2010	Assistenzärztin Dr. Geisenhofer München
07/2008 - 06/2009	Assistenzärztin der Frauenheilkunde Klinikum Garmisch – Partenkirchen Chefarzt Dr. Wahl
12/2006 - 06/2008	Assistenzärztin der Frauenheilkunde Klinikum Neumarkt Chefarzt Prof. Dr. Egger
04/1996 - 06/1997	Arzthelferin / Erstkraft Dr. med. Nirnheim / FA für Allgemeinmedizin
10/1994 - 03/1996	Arzthelferin Dr. med. Bärtl / Kellner Orthopädische Gemeinschaftspraxis
09/1991 - 09/1994	Ausbildung zur Arzthelferin Dipl. med. Bork / FA für Allgemeinmedizin

Studium

10/2000 - 10/2006	Studium der Humanmedizin Universität Regensburg Abschlußnote: 1,83
10/2006	3. Staatsexamen
10/2005 - 09/2006	Praktisches Jahr - Chirurgische Klinik der Universität Regensburg - Krankenhaus St. Hedwig / Gynäkologie und Geburtshilfe, Regensburg - Zürcher Höhenklinik / Innere Medizin, Davos
08/2005	2. Staatsexamen
08/2003	1. Staatsexamen
08/2002	Ärztliche Vorprüfung

Berufsausbildung

01/1995 - 05/1996	Bayerische Landesärztekammer München Arztfachhelferin (Stipendium, berufsbegleitend)
09/1991 - 07/1994	Staatliche Berufsschule Neumarkt Arzthelferin

Schulbildung

09/82 - 07/91	Volksschule Breitenbrunn (Quali)
09/1998 - 07/2000	Berufsoberschule Regensburg Allgemeine Hochschulreife

Leiterzhofen, 03.12.2011

Gerlinde Götz

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Albrecht Reichle für die Bereitstellung des Themas und die unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Herrn PD Dr. Wolfgang Dietmaier danke ich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu erstellen.

Zusätzlich möchte ich allen Mitarbeitern der Hämatologie/ Onkologie und der Pathologie des Universitätsklinikum Regensburg für die tatkräftige Unterstützung und für die aufmunternden Worte, während des praktischen Teils dieser Arbeit, meinen Dank aussprechen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Elke, die mir die Kraft und die Ausdauer gegeben hat, damit diese Arbeit letztendlich fertig wurde.

Widmen möchte ich meine Arbeit meinen lieben Eltern, Katharina und Sebastian, die mich auf meinem Weg ohne Druck begleiten und bedingungslos immer für mich da sind.

9. Erklärung

„Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt“.

Leiterzhofen, 3.12.2011