

Aus der
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Haas

**Untersuchungen zur Pathogenese, Diagnostik und Behandlung von
myeloischen Blutstammzellerkrankungen**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia legendi für das Fach
Innere Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. med. Thomas Michael Schroeder
aus Essen

2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Zusammenfassung	4
Einleitung	6
1. Neue Erkenntnisse zur Pathogenese myeloischer Neoplasien	12
- Risikofaktoren für myelodysplastische Syndrome (MDS) und akute myeloische Leukämien (AML)	12
- Molekulare und funktionelle Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen von Patienten mit MDS, AML und Multiplem Myelom	19
2. Fortschritte in Diagnostik und Prognose myeloischer Neoplasien	28
- Differenzierung zwischen MDS und idiopathischen Zytopenien unklarer Signifikanz mittels Klonalitätsanalysen	28
- Molekulare Analysen von prognoserelevanten Genexpressionsunterschieden und Mutationen	32
- Molekulares Monitoring minimaler Resterkrankung anhand von Mutationen	37
3. Verbesserung bei der allogenen Blutstammzelltransplantation	42
- Neue Substanzen zur Remissionsinduktion vor allogener Blutstammzelltransplantation ..	42
- Verbesserung der Konditionierungstherapie für MDS-Patienten	46
- Neue Behandlungsformen der Graft-versus-Host Disease	49
- Ergebnisse einer Kombinationstherapie mit Azacitidine und Spenderlymphozyteninfusionen zur Rezidivbehandlung nach allogener Blutstammzelltransplantation	52
- Wirkprinzipien einer Therapie mit Azacitidine und Spenderlymphozyten	60
- Zielgerichtete Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Behandlung des AML-Rezidivs nach allogener Blutstammzelltransplantation	65
Schlussfolgerung und Ausblick	67
Abkürzungsverzeichnis	71

Zusammengefasste Publikationen.....	74
Literatur.....	79
Danksagung.....	90
Anhang: Sonderdrucke der zusammengefassten Publikationen.....	91

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit fasst eine Auswahl meiner wissenschaftlichen Arbeiten zur Verbesserung des pathophysiologischen Verständnisses, der Diagnostik und Behandlung von Patienten mit myelodysplastischen Syndromen (MDS) und akuten myeloischen Leukämien (AML) zusammen. Ursachen für die Entstehung einer AML oder MDS lassen sich nur bei wenigen Patienten, bei denen eine Exposition gegenüber Lösungsmitteln oder eine externe Strahlen- oder Chemotherapie stattgefunden hat, finden. Wir konnten zeigen, dass bei Patienten mit Glykogenspeicherkrankheit infolge dauerhafter Therapie mit ‚Granuloocyte-Colony stimulating factor‘ (G-CSF), infolge einer systemischen Radiojodtherapie wegen Schilddrüsenerkrankungen und aufgrund von immunmodulatorischen Substanzen, den sog. ‚Imids‘ myeloische Neoplasien entstehen können. Dabei spielen bei der MDS-Pathogenese nicht nur Veränderungen der Blutstammzellen eine Rolle, sondern auch mesenchymale Stromazellen als Bestandteil des Knochenmarkmilieus (‚Microenvironment‘), die strukturell und molekular verändert sind und so durch eine mangelhafte Unterstützung der Hämatopoiese die insuffiziente Blutbildung mitbedingen. Molekulargenetische Analysen mittels X-chromosomalen Inaktivierungsmustern, ‚reverse transcription polymerase chain reaction‘ (RT-PCR) sowie DNA-Sequenzierung führten zum Nachweis von Veränderungen in den Blutstammzellen, die uns einen vertieften Einblick in die Pathomechanismen erlaubten. Damit ist es möglich, eine genauere Diagnose zu stellen, eine bessere Prognoseabschätzung zu treffen sowie ein Monitoring minimaler Resterkrankung (MRD) durchzuführen. Um die Therapieergebnisse nach einer allogenen Blutstammzelltransplantation zu verbessern, verabreichten wir den Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib und behandelten Patienten mit MDS mit einer sequenziellen Hochdosistherapie nach dem FLAMSA-Schema. Letztere erwies sich als wirksam und auch tolerabel für Patienten mit einem Alter von bis zu 70 Jahren. Die Gabe von Tacrolimus und Mycophenolat Mofetil (MMF) als Graft-versus-Host Disease (GvHD)-Prophylaxe nach nicht-myeloablativer Konditionierung führte zu einem Rückgang der durch toxische Nebenwirkungen bedingten Mortalität, ohne das Risiko für ein Rezidiv zu verändern. Auf der Suche nach neuen Therapieformen fanden wir, dass der DNA-Methyltransferaseinhibitor Azacitidine in Kombination mit

Spenderlymphozyten bei einem Rezidiv nach allogener Blutstammzelltransplantation wirksam und gut verträglich ist.

Einleitung

Myelodysplastische Syndrome (MDS) und akute myeloischen Leukämie (AML) sind Blutstammzellerkrankungen, die im Jahre 1900 von Olivier von Leube bzw. im Jahre 1870 Neumann erstmals beschrieben wurden (1, 2). Beide Erkrankungsformen werden in der aktuellen WHO-Klassifikation von 2008 als eigenständige Entitäten unter das gemeinsame Dach der myeloischen Neoplasien gestellt (3), weil es einige Gemeinsamkeiten hinsichtlich Pathogenese und Symptomen gibt. So geht abhängig vom Subtyp ein Teil von 14%-65% der Patienten mit MDS innerhalb von 5 Jahren in eine sekundäre AML (sAML) über (4). Sowohl MDS als auch AML stellen angesichts eines mittleren Erkrankungsalters der Patienten von 73 bzw. 71 Jahren Erkrankungen des höheren Lebensalters dar. Die Prävalenz dieser Erkrankungen wird in Zukunft aufgrund der steigenden Lebenserwartung in der Bevölkerung zunehmen (5-7). Gemeinsam ist MDS und AML eine insuffiziente Blutbildung, die bis zu einer Panzytopenie führen und mit Anämiesymptomen, einer gesteigerten Infektanfälligkeit und erhöhten Blutungsneigung einhergehen kann (8, 9). Ungeachtet dieser Gemeinsamkeiten möchte ich die beiden Entitäten im Folgenden voneinander getrennt betrachten:

Myelodysplastische Syndrome (MDS) – Klinische Aspekte

Die WHO-Klassifikation unterteilt die MDS auf der Basis der betroffenen Zellreihen, der Blastenzahl im Knochenmark und peripheren Blut sowie zytogenetischer Veränderungen in sieben Subtypen. Dabei bleiben die zyto- und histomorphologische Beurteilung von Knochenmark und Blut die Grundlage der Diagnostik (10, 11). Durch zytogenetische Untersuchungen lassen sich bei etwa der Hälfte der MDS-Patienten chromosomale Veränderungen nachweisen (12, 13), wobei es sich um unbalancierte Chromosomenanomalien wie zum Beispiel einer Deletion des kurzen Armes von Chromosom 5 (del5q) oder eines Teilstücks des Chromosom 7 (del7q/-7) handeln kann (13). Neben dem Nachweis einer klonalen Zellpopulation dient die Zytogenetik auch der Prognoseabschätzung, was im 'International Prognostic Scoring System' (IPSS) zum Ausdruck kommt (14). In der aktuellen Version des IPSS wird der zytogenetische Befund zum entscheidenden Parameter für die Risikostratifizierung und bestimmt ganz maßgeblich die Auswahl

der Therapie (15). In diese Entscheidung spielen außerdem als weitere krankheitsassoziierte Faktoren der Schweregrad der Zytopenien und die hiermit verbundene Transfusionsbedürftigkeit sowie spezifische Karyotypveränderungen wie zum Beispiel eine isolierte Deletion 5q mit hinein. Daneben beeinflussen das Lebensalter sowie Komorbiditäten die Therapieentscheidung (5, 16).

Zumeist erhalten alle Patienten mit MDS im Sinne supportiver Maßnahmen Transfusionen von Thrombozyten- oder Erythrozytenkonzentraten sowie Antiinfektiva (17). Mit dem Ziel, die insuffiziente Hämatopoiese zu stimulieren, wird Erythropoietin bei MDS-Patienten mit einem inadäquat niedrigen endogenen Erythropoietin-Spiegel verabreicht (18). Zur Zeit wird die Wirksamkeit der Thrombopoietin-Analoga Romiplostin und Eltrombopag in klinischen Studien untersucht (19). Für die Subgruppe der MDS-Patienten mit isolierter Deletion 5q ist Lenalidomid zugelassen, welches bei 56% bis 67% dieser Patienten zu einer Transfusionsunabhängigkeit führt (20-22). Bei einer anderen Subgruppe von MDS-Patienten mit hypoplastischem Knochenmark spielt ein fehlgesteuertes Immunsystem eine wesentliche pathogenetische Rolle, weshalb diese Patienten auf eine immunsuppressive Therapie mit Antithymozytenglobulin, dem monoklonalen anti-CD52-Antikörper Alemtuzumab und Cyclosporin A ein Ansprechen zeigen (23-25). Als weitere MDS-spezifische Therapie wurde im Jahre 2008 die Substanz Azacitidine zur Behandlung von älteren, nicht transplantationsfähigen MDS-Patienten mit IPSS-Risikoprofil intermediate-2 und high sowie CMML-Patienten zugelassen. Im Gegensatz zu den in den 60iger Jahren verwendeten hohen Dosierungen induzieren niedrigere, besser verträgliche Dosierungen von Azacitidine eine Hemmung von DNA-Methyltransferasen. Diese Enzyme übertragen Methylgruppen auf die DNA, so dass deren Hemmung vor dem Hintergrund einer beim MDS vorliegenden Hypermethylierung aus pathophysiologischer Sicht sinnvoll erschien. In der Tat konnten zahlreiche Studien einen therapeutischen Nutzen zeigen. In der größten Phase-III-Studie konnte beim Vergleich mit konventionellen Behandlungsformen ein Überlebensvorteil von 9,5 Monaten für die mit Azacitidine behandelten Patienten gezeigt werden (26). Auch bei Patienten mit sAML mit bis zu 30% Blasten führt Azacitidine im Vergleich zu konventionellen Behandlungsformen zu einem Überlebensvorteil von 8,5 Monaten (27).

Für einige Patienten mit einem proliferativ verlaufenden MDS, also mit einem pathologisch erhöhten Blastenanteil im Knochenmark oder Blut, sowie für Patienten

mit einer AML aus MDS kann eine Induktionschemotherapie infrage kommen. Hierdurch lässt sich bei 56% bis 62% der Patienten eine komplette Remission erzielen, wobei vor allem Patienten mit einem normalen Karyotyp auf eine Chemotherapie ansprechen (28-30). Ein Gesamtüberleben zwischen 12% und 27% nach 5 Jahren belegt jedoch, dass eine intensive Chemotherapie allein nur bei einer kleinen Patientengruppe zur Heilung führen kann (28, 29). Neben der Toxizität einer intensiven Chemotherapie stellt das hohe Rückfallrisiko den Prognose-limitierenden Faktor dar (28-30).

Im Lichte dessen ist die allogene Blutstammzelltransplantation für Patienten mit MDS der aktuell einzig verfügbare kurative Therapieansatz. Bis vor ca. 10 Jahren war die allogene Blutstammzelltransplantation allerdings aufgrund der hohen transplantationsassoziierten Morbidität und Mortalität nur MDS-Patienten bis zu einem maximalen Lebensalter von 60 Jahren zugänglich. Durch die Einführung dosis-reduzierter und nicht-myeloablativer Konditionierungsprotokolle sowie Verbesserungen der Immunsuppression und Supportivtherapie konnte die Toxizität der allogenen Blutstammzelltransplantation maßgeblich verringert werden (31-33). Daher können heutzutage auch Patienten bis zu einem Alter von 75 Jahren transplantiert werden (34). Limitiert wird der Therapieerfolg der allogenen Blutstammzelltransplantation allerdings durch eine unverändert hohe Rückfallrate von bis zu 40% (35). Gegenwärtig unklar ist, ob eine vorangegangene Behandlung mit einer Chemotherapie, Azacitidine oder die direkte Transplantation zu einer Verbesserung dieser Ergebnisse führen kann. (36-40). Aktuelle Ansätze zielen daher darauf ab, einen Krankheitsrückfall frühzeitig mit Hilfe des sogenannten ‚Minimal Residual Disease‘-Monitoring zu detektieren und zu behandeln, um die aktuelle 5-Jahres-Überlebensrate von 40% bis 50% nach einer allogenen Blutstammzelltransplantation zu steigern (41).

Akute myeloische Leukämien (AML) – Klinische Aspekte

Im Gegensatz zu den MDS ist die aktuelle WHO-Klassifikation der AML einen Schritt weiter, da sie bereits zytogenetische und molekulargenetische Befunde berücksichtigt. Darüber hinaus führt sie die aus den MDS hervorgegangenen sAML als eigene Entität und berücksichtigt auch anamnestische Angaben wie eine vorangegangene Chemo- oder Radiotherapie (3).

Ähnlich wie bei den MDS werden chromosomale Veränderungen bei ca. 50%-60% der AML-Patienten gefunden (12, 13). Allerdings handelt es sich hierbei vor allem um strukturelle chromosomale Veränderungen wie z. B. Translokationen, die durch eine Fusion von Genen einem gesteigerten Proliferationssignal führen. Im weiteren Verlauf treten zusätzliche genetische Veränderungen auf, so dass es zum Differenzierungsarrest kommt (sog. ‚Double-hit-Theorie‘) (42). Auch bei der AML stellt der zytogenetische Befund den wichtigsten Prädiktor für das Ansprechen auf eine Induktionstherapie sowie den wichtigsten Prognosefaktor für das Gesamtüberleben dar. Dabei werden die zytogenetischen Befunde in 3 Kategorien (günstig, intermediär und ungünstig) eingeteilt (10). In diese Kategorisierung des genetischen Risikoprofils werden bei der AML auch prognostisch relevante molekulargenetische Veränderungen integriert (10). Diese Risikoabschätzung auf der Basis der Zytogenetik/Molekulargenetik bildet zusammen mit dem Alter und dem Allgemeinzustand des Patienten die Grundlage für die Therapieauswahl.

Für jüngere AML-Patienten ohne relevante Komorbiditäten (bis ca. 70 Jahre) stellt die Induktionstherapie gefolgt von einer Konsolidation den allseits akzeptierten Therapiestandard dar (10). Dabei kann durch ein oder zwei Zyklen einer Kombination aus Anthrazyklin und Cytarabin (sog. ‚3+7-Schema‘) bei ca. 75% der Patienten eine Remission erzielt werden (43). In Abhängigkeit vom genetischen Risikoprofil, vom Ansprechen auf die Induktionstherapie, sowie der Spenderverfügbarkeit erfolgt anschließend eine Konsolidationstherapie. Diese besteht entweder aus 1 bis 3 Zyklen einer hochdosierten Cytarabin-Chemotherapie oder einer allogenen Blutstammzelltransplantation (43). Letztgenannte erfolgt wenn immer möglich zur Konsolidation einer bereits durch konventionelle Chemotherapie erreichten Remission. Sie verfolgt das Ziel, das Rezidivrisiko durch Ausnutzen des sog. ‚Graft-versus-Leukemia‘ Effektes im Vergleich zu einer rein Zytostatika-basierten Therapie weiter zu senken (43).

Für Patienten, die aufgrund ihres Alters (ca. >70 Jahre) bzw. Komorbiditäten nicht für eine intensive Chemotherapie geeignet sind, stehen neben denselben Supportivmaßnahmen wie beim MDS eine niedrig-dosierte Chemotherapie oder eine Behandlung mit dem für diese Indikation zugelassenen DNA-Methyltransferaseinhibitor Decitabine als Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Aktuelle Studien legen zudem nahe, dass auch AML-Patienten von einer Therapie mit Azacitidine als alternativen DNA-Methyltransferaseinhibitor profitieren können.

Dennoch beträgt die 5-Jahresüberlebensrate für jüngere AML-Patienten ca. 40%-45% und für ältere Patienten ca. 20% und bietet somit Anlass für Verbesserungen (44).

Pathogenese der MDS und AML

Um die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten zu verbessern, bedarf es eines besseren Verständnisses von Entstehung und Pathophysiologie der MDS und AML. Grundsätzlich handelt es sich bei MDS und AML um klonale Erkrankungen der CD34+ Blutstamm- und –progenitorzellen, wie Xenograft-Transplantationen sowie der Nachweis MDS- und AML-spezifischer Chromosomenveränderungen und Mutationen in den CD34+ Blutstammzellen belegen (45-49). Anders als bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) mit dem bcr-abl Fusionsprotein als auslösenden Mechanismus lässt sich bei MDS und AML allerdings kein singulärer bzw. monogenetischer Pathomechanismus identifizieren. Vielmehr spiegelt sich die phänotypische und klinische Heterogenität der MDS und AML auch in einer Vielzahl von pathophysiologisch relevanten Mechanismen wider. Dabei legen die zytogenetischen Befunde nahe, dass es neben überlappenden auch MDS- und AML-spezifische Pathomechanismen vorliegen dürften.

Mit Hilfe von sog. Hochdurchsatzsequenzierungstechniken ließen sich hierüber hinaus zahlreiche Genmutationen entdecken, die für die DNA-Methylierung, für die Histon-Modifikation und für das RNA-Splicing eine Rolle spielen (50-52). Bei AML finden sich gehäuft Mutationen in Genen für myeloische Transkriptionsfaktoren, Cohesine sowie in Signaltransduktionskaskaden (53). Deren pathophysiologische Relevanz wird aktuell in funktionellen Untersuchungen geprüft, wobei sich bereits zum gegenwärtigen Zeitpunkt abzeichnet, dass nur die Kombination von mehreren Mutationen zur Entwicklung eines MDS- bzw. AML-Phänotyps führt. Einige Mutationen wie zum Beispiel die TET2-Mutationen treten im Alter auch bei gesunden Menschen auf und stehen so am Anfang einer Reihe von Mutationen, die am Ende in eine MDS- oder AML-Stammzelle münden (54, 55). Diese dynamische klonale Evolution einer Blutstammzelle durch Gewinn sowie Verlust von genetischen Ereignissen spielt auch bei der Entstehung von Rezidiven sowie beim Übergang vom MDS in die sAML eine Rolle (56-58).

Auch das Knochenmarkmikromilieu, in welchem die Blutstammzellen eingebettet

sind, ist an der Entstehung und Aufrechterhaltung von MDS und AML beteiligt ist (59, 60).

Die Untersuchungen im ersten Teil meiner Arbeit betreffen Aspekte der Pathogenese von MDS und AML wie die Suche nach Risikofaktoren für die Entstehung myeloischer Blutstammzellerkrankungen. Anknüpfend hieran untersuchten wir mesenchymalen Stromazellen (MSC) von MDS- und sAML-Patienten und fanden, dass diese als integraler Bestandteil der Stammzellnische im Knochenmark molekular und funktionell verändert sind und wesentlich zur hämatopoietischen Insuffizienz beitragen.

Der zweite Teil meiner Habilitationsschrift enthält die Resultate molekularbiologischer Analysen, die zur Diagnostik, Prognosebestimmung sowie zum Nachweis der minimalen Resterkrankung („minimal residual disease“, MRD) nach einer allogenen Blutstammzellerkrankung bei myeloischen Neoplasien verwendet werden können. Der dritte Teil dieser Arbeit widmet sich den Möglichkeiten zur Verbesserung der allogenen Blutstammzelltransplantation als potentiell kurative Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit myeloischen Neoplasien.

1. Neue Erkenntnisse zur Pathogenese myeloischer Neoplasien

Risikofaktoren für myelodysplastische Syndrome (MDS) und akute myeloische Leukämien (AML)

Mit Ausnahme einzelner Patienten mit beruflicher oder umweltbedingter Lösungsmittel- oder Strahlenexposition kann bei der Mehrheit der Patienten mit AML und MDS kein auslösendes Agens identifiziert werden (61). Circa 5% bis 10% der AML- und MDS-Patienten weisen in ihrer Anamnese eine Chemotherapie und/oder eine Radiotherapie zur Behandlung einer malignen oder nicht-malignen Primärerkrankung auf (62). Diese werden in der aktuellen WHO-Klassifikation gemeinsam mit den myelodysplastisch/myeloproliferativen Neoplasien nach einer Chemo- oder Strahlentherapie in einer eigenständigen Gruppe der ‚Therapie-assoziierten myeloischen Neoplasien‘ zusammengefasst (3). Diese Sonderform der MDS und AML kann nicht nur nach einer Chemo- und/oder externen Radiotherapie auftreten, sondern auch infolge einer dauerhaften Immunsuppression wegen einer Autoimmunerkrankung oder nach einer Organtransplantation (63). Neben diesen eher klassischen toxischen Auslösern besteht seit langer Zeit eine kontroverse Debatte über das Leukämie-induzierende Potential des hämatopoietischen Wachstumsfaktors G-CSF. Dieser wird bei Tumorpatienten regelmäßig eingesetzt, um die Dauer und Schwere der Chemo- und Radiotherapie-induzierten Neutropenie zu verringern. Auch wenn große Metaanalysen ein marginal erhöhtes Leukämie-Risiko von 0,41% nachweisen konnten, so war das Gesamtrisiko zu sterben bei G-CSF-behandelten Patienten vermindert, da die Patienten durch die G-CSF-Gabe intensiver therapiert werden konnten (64). Anders stellt sich dies bei Patienten mit angeboren Knochenmarkinsuffizienz-Syndromen wie dem Shwachman-Diamond-Syndrom oder der schweren kongenitalen Neutropenie dar. Bei diesen Erkrankungen liegt bereits eine Prädisposition durch einen intrinsischen Stammzelldefekt vor. Durch die kontinuierliche Gabe von G-CSF zur Überwindung der krankheitsbedingten Neutropenie wird das Risiko für die Entstehung eines MDS oder einer AML relevant gesteigert (65-67).

Auch Patienten mit einer Glykogenspeicherkrankheit Typ Ib, einer autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung des Glykogenmetabolismus, leiden an einer

Neutropenie und erhalten daher oftmals eine dauerhafte G-CSF-Therapie (68). Hier ist der kausale Zusammenhang aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und nur zwei in der Literatur erwähnten Fällen nicht geklärt. Daher war es auch aus wissenschaftlicher Sicht relevant, als sich im Jahre 2008 ein 28-jähriger Mann aufgrund von Anämie- und B-Symptomen, Blutungszeichen und Knochenschmerzen in unserer Klinik vorstellte (**Referenz A**). Dieser Patient litt seit Geburt an einer Glykogenspeicherkrankheit Typ Ib und hatte kumulativ über einen Zeitraum von 12,84 Jahren eine durchschnittliche G-CSF-Tagesdosis von 2,83 µg/kg und eine G-CSF-Gesamtdosis von 13.729 µg/kg zur Behandlung der krankheitsbedingten Neutropenie erhalten. Wir diagnostizierten nun eine AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen nach WHO-Klassifikation mit einer Monosomie 7 und einer Translokation t(3;8)(q26;q24). Der kausale Zusammenhang zwischen G-CSF-Verabreichung und Entstehung einer myeloischen Neoplasie war bis dato für Patienten mit Glykogenspeicherkrankheit nicht gezeigt worden. In der größten retrospektiven Studie über 15 Kinder mit G-CSF entwickelte kein Kind ein MDS oder eine AML (66). Es existierten lediglich zwei Fallberichte über die Entstehung einer AML, wobei eines der Kinder nie G-CSF erhalten hatte (69, 70). Der Verlauf unseres Patienten, insbesondere seiner zytogenetischen Befunde spricht für einen relevanten leukämogenen Effekt des G-CSF (Abbildung 1).

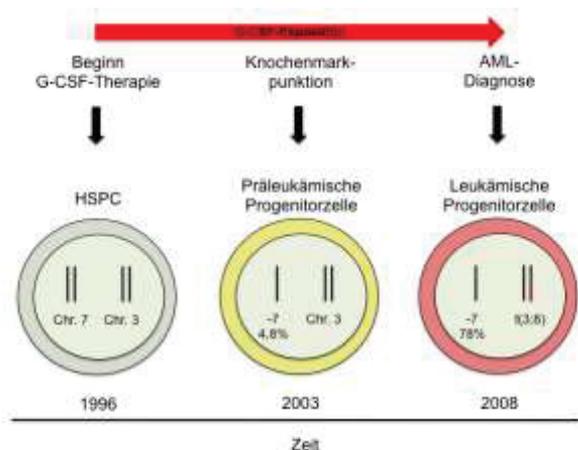


Abbildung 1: Potentielles Modell der Leukämogenese

Bereits 5 Jahre zuvor war bei unserem Patienten eine Monosomie 7 in 4,8% der untersuchten Interphasen von Knochenmarkszellen nachgewiesen worden. Dies wurde zum damaligen Zeitpunkt als unterhalb des relevanten Cut-off-Levels gewertet

und die G-CSF Therapie fortgesetzt. Zum Zeitpunkt der AML-Diagnose lag nun eine Monosomie 7 in 78% der Metaphasen vor. Bei Patienten mit aplastischer Anämie, die im Verlauf einer G-CSF-Dauertherapie ein MDS entwickeln, weisen 58% der Patienten eine Monosomie 7 auf. Außerdem konnte in-vitro nachgewiesen werden, dass G-CSF präferentiell das Wachstum von Monosomie 7-tragenden Knochenmarkzellen fördert (71). Gleichzeitig ist bei unserem Patienten mit der Translokation t(3;8)(q26;q24) zum Zeitpunkt der aktuellen Vorstellung eine weitere genetische Aberration hinzugekommen, die zuvor nicht nachweisbar war. Diese Translokation führt zu einer Überexpression des Protoonkogens EVI1, welches zur AML-Entstehung wesentlich beiträgt (72). Anhand des zytogenetischen Verlaufes und der Evidenz aus der Literatur folgerten wir, dass es bei unserem Patienten infolge der dauerhaften G-CSF-Therapie zu einer Expansion des Monosomie 7-tragenden Klons gekommen war. Infolge der zweiten genetischen Veränderung dürfte es dann zur Manifestation der AML gekommen sein. Dieser Verlauf legt nahe, dass auch bei Patienten mit einer Glykogenspeicherkrankheit Typ Ib ähnlich wie bei Patienten mit einem angeborenem Knochenmarkdefektsyndrom während einer dauerhaften G-CSF-Therapie regelmäßige Knochenmarkuntersuchungen inklusive zytogenetischer Untersuchungen durchgeführt werden sollten.

Die potentiell leukämogene Wirkung einer externen Radiotherapie zur Behandlung von soliden Tumoren ist bekannt (62), während ein kausaler Zusammenhang zwischen einer internen Bestrahlung mit dem β -Strahler ^{131}Jod und der Entstehung einer Therapie-assoziierten myeloischen Neoplasie lange Zeit kontrovers diskutiert worden war. Diese Therapieform wird zur Behandlung von malignen und nicht-malignen Schilddrüsenerkrankungen verwendet. In einer Metanalyse der Literatur, welche 16.502 Patienten umfasste, konnte ein 2,5-fach erhöhtes Risiko für die Entstehung einer AML nach einer Radiojodtherapie belegt werden (73). Die Literatur, welche Patienten mit einer myeloischen Neoplasie nach dieser spezifischen Bestrahlungsform beschrieb, basierte bisher hauptsächlich auf Fallberichten (74, 75). Mit dem Ziel, diese myeloischen Neoplasien näher zu charakterisieren und erstmals Erkenntnisse hinsichtlich Therapieansprechen und Prognose zu gewinnen, führten wir innerhalb der Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen MDS-Studiengruppe (D-A-CH) eine retrospektive Studie durch (**Referenz B**). Hierbei konnten wir Daten von 39 Patienten analysieren, welche mit einer medianen Latenzzeit von 79 Monaten nach einer Radiojodtherapie ein MDS (n=21) oder eine AML (n=18) entwickelten.

Dabei zeigte unsere Untersuchung, dass der Großteil der Patienten entweder bereits an einer AML litt, oder aber an einem Hochrisiko-MDS, was sich im Blastenanteil, im Karyotyp, in der IPSS-Risikoklassifizierung oder einem raschen Krankheitsprogress widerspiegelte. Somit waren die Krankheitscharakteristika dieser Patienten vergleichbar mit denen von 165 weiteren Patienten, die nach einer Chemotherapie, einer externen Bestrahlung oder einer kombinierten Radiochemotherapie ein MDS oder eine AML entwickelten und deren Daten wir vergleichend betrachtet hatten. Dies traf auch auf den Anteil der Patienten mit einem veränderten Karyotyp, die betroffenen Chromosomen 3, 5, 7 und 8 sowie die mediane Latenz von 6,58 Jahren bis zur Entstehung der myeloischen Neoplasie zu.

	Radiojod	Radiatio	Chemotherapie	Radiochemotherapie	p-Wert
No	29	29	85	43	
Geschlecht[%]					
männlich	49	42	49	50	n.s.
weiblich	51	58	51	50	
Medianes Alter, Jahre	63	71	62	58	< 0,001
Spanne	19-80	39-99	21-84	24-90	
Mediane Zeit bis tMDS/AML, Monate	78	108	70	61	§
Spanne	6-440	1-408	1-341	4-237	
WHO, Patienten (%)*					
RA	1 (2,5)	1 (3)	9 (11)	1 (3)	
RARS	1 (2,5)	1 (3)	3 (3,5)	0 (0)	
RCMD	8 (18)	10 (35)	31 (36,5)	22 (50)	
MDS Sq.	3 (8)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	n.s.
RAEB I	2 (5)	4 (15)	14 (16)	8 (13)	
RAEB II	6 (15)	6 (21)	12 (14)	7 (17)	
MDS/MPN	2 (5)	3 (10)	6 (7)	2 (5)	
AML	18 (46)	4 (13)	8 (11)	5 (12)	
AML Transformation, Patienten (%)**					
ja	7 (33)	6 (22)	22 (29)	8 (21)	n.s.
nein	14 (67)	19 (78)	54 (71)	30 (79)	
IPSS, Patienten (%)***					
low	4 (23)	5 (17)	7 (8)	1 (3)	n.s.
intermediate-1	5 (29)	11 (38)	26 (31)	18 (41)	
intermediate-2	6 (35)	8 (28)	28 (33)	17 (40)	
high	2 (13)	5 (17)	24 (28)	7 (16)	
Zytopenetisches Risiko, Patienten (%)***					
niedrig	9 (52)	15 (52)	29 (34)	17 (41)	n.s.
intermediär	4 (24)	8 (28)	14 (17)	7 (16)	
hoch	4 (24)	6 (20)	42 (49)	19 (43)	

Tabelle 1: Krankheitscharakteristika der Patienten mit myeloischen Neoplasien nach Radiojodtherapie sowie nach anderen Behandlungsmodalitäten

*Bezüglich der AML-Frequenz bei den anderen Therapiemodalitäten sind nur die Patienten aufgeführt, welche als RAEB-T nach FAB-Klassifikation im MDS-Register gespeichert wurden.

**es wurden nur die Patienten berücksichtigt, welche ein tMDS hatten.

***für die Angaben bezüglich des IPSS und des zytopenetischen Risikos wurden nur Patienten herangezogen, die ein tMDS aufwiesen.

n. s. = nicht signifikant; § p=0,026 für den Vergleich zwischen Radiojod und Chemotherapie und p=0,006 für den Vergleich zwischen Radiojod und Radiochemotherapie

Die Häufung von Charakteristika, welche mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, spiegelte sich auch im Therapieansprechen und in der Prognose unserer

Patientengruppe wider. Insgesamt 17 Patienten erhielten eine intensive Induktionstherapie, aber nur fünf (29%) hiervon erreichten eine komplette Remission. Dies ist verglichen mit Patienten mit einer de novo Erkrankung erheblich geringer (43). In Einklang hiermit lag das mediane Gesamtüberleben unserer Patientengruppe bei 21,7 Monate und unterschied sich somit nicht von der Prognose der Patienten mit therapieassoziierten Neoplasien nach anderen Therapieformen (Abbildung 2).

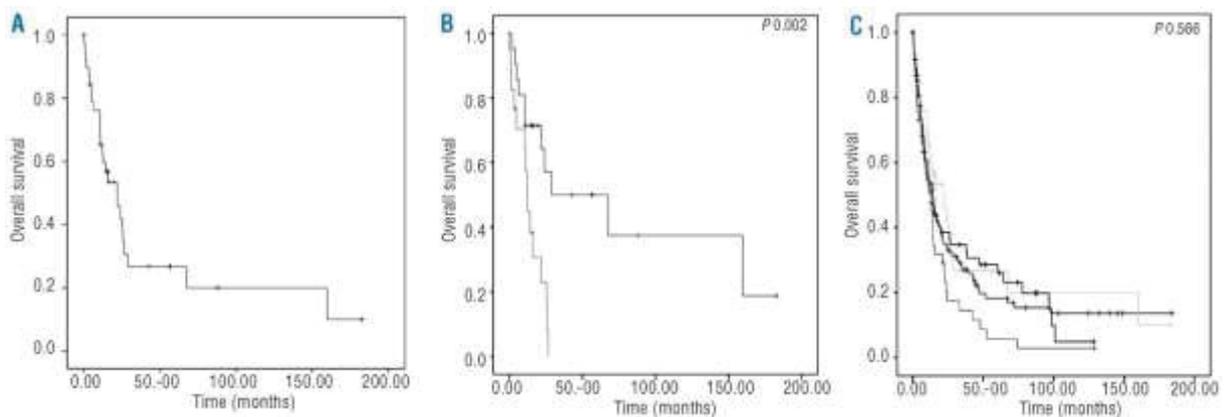


Abbildung 2: Gesamtüberleben aller 39 Patienten (A) sowie aufgeteilt (B) nach MDS ($n=21$, schwarze Kurve) und AML ($n=18$, graue Kurve) nach Radiojodtherapie; (C) Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit myeloischer Neoplasie nach Radiojodtherapie (hellgraue Kurve), Strahlentherapie (dunkelgraue Kurve), Chemotherapie (untere schwarze Kurve) sowie nach Radiochemotherapie (obere schwarze Kurve)

Genau diese Vergleichbarkeit der Krankheitseigenschaften sowie der Prognose zwischen den verschiedenen Gruppen unterstützen die Hypothese von einem kausalen Zusammenhang zwischen der Radiojodtherapie und der Entwicklung myeloischer Neoplasien. Dies wird auch gestützt durch einen Artikel von Gilabert et al., in welchem als direkte Antwort auf unseren Artikel von weiteren 10 Fällen einer Radiojod-induzierten akuten Leukämie berichtet wurde (76). Aufgrund dessen sollte man Patienten, die eine Radiojodtherapie erhalten sollen, bezüglich dieser Folgen einer allgemein als gut verträglich angesehenen Therapie aufklären und während der Nachsorge daraufhin untersuchen.

Während die Gabe von G-CSF und die Radiojodtherapie etablierte Therapieformen sind, werden Therapieformen verfügbar, mit denen sich die Prognose von Patienten

mit soliden und hämatologischen Tumoren stetig bessert. Dazu zählen auch die Gruppe der sog. ‚Imids‘, welcher neben Thalidomid auch die Zweitgenerationsmedikamente Lenalidomid und Pomalidomid angehören. Diese Substanzklasse wird insbesondere zur Therapie von Patienten mit Plasmazellerkrankungen wie dem multiplen Myelom verwendet. Angesichts einer relativen Häufung von Sekundärmalignomen in Studien zur Lenalidomid-Erhaltungstherapie beim multiplen Myelom befürchtete man, dass die Substanzklasse der ‚Imids‘ zu einer gesteigerten Inzidenz von Sekundärmalignomen führen könnte (77-80). Deshalb untersuchten wir in einer weiteren Analyse 313 Patienten mit multiplen Myelom hinsichtlich des Auftretens von Sekundärneoplasien (**Referenz C**). Alle Patienten hatten zwischen 1994 und 2009 eine Melphalan-basierte Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer Blutstammzelltransplantation erhalten, an die sich bei 72% eine Interferon- oder Thalidomid-Erhaltungstherapie anschloss. In Einklang mit vorangegangenen Registerdaten und den Resultaten einer anderen deutschen Gruppe zeigte sich in der Gesamtgruppe eine Sekundärmalignom-Frequenz von 5,8%. Den größten Anteil machten MDS bzw. AML (8 von 18 Patienten) aus. Im Gegensatz zu den ersten Studien zur Lenalidomid-Erhaltungstherapie war die Häufigkeit der Sekundärmalignome in unserer Gruppe jedoch weder bei den Patienten mit Thalidomid-Salvage-therapie (n=206) noch mit einer Lenalidomid-Salvage-therapie (n=71) erhöht. Auch die 96 Patienten mit einer Thalidomid-Erhaltungstherapie nach autologer Transplantation wiesen kein erhöhtes Risiko für Sekundärmalignomen auf (Abbildung 3). Einziger signifikanter Risikofaktor für die Entstehung eines Zweitmalignoms war eine Überlebenszeit von ≥ 5 Jahren ab Diagnose (HR 4,7 [95% CI 1,1 – 19,8], p=0.04).

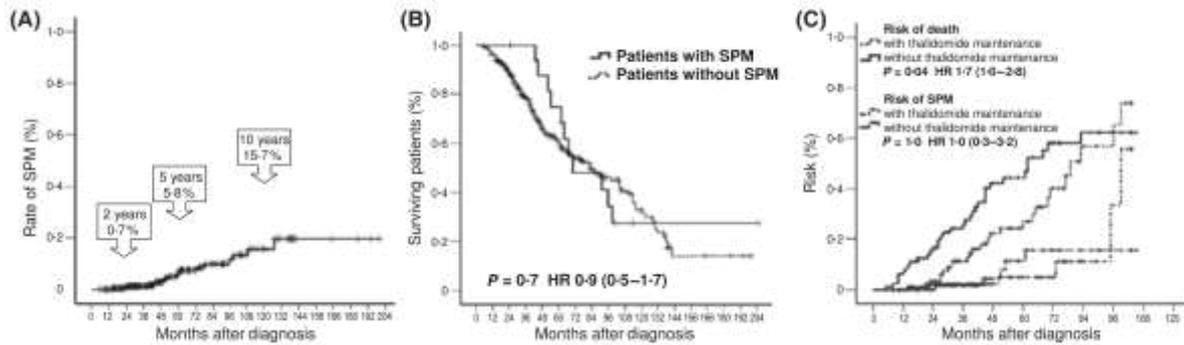


Abbildung 3: (A) Kumulative Inzidenz der Sekundärneoplasien (SPM) vom Zeitpunkt der Myelom-Diagnose bei Patienten, die eine Hochdosischemotherapie und autologe Blutstammzelltransplantation erhielten. (B) Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Auftreten einer Sekundärneoplasie. (C) Risiko für Tod und für die Entwicklung einer Sekundärneoplasie für Patienten mit und ohne Thalidomid-Erhaltungstherapie.

Eine Metaanalyse von 7 randomisierten Studien mit insgesamt 3218 Patienten, die Lenalidomid im Rahmen einer Erstlinientherapie erhielten, zeigte, dass eine Lenalidomid-Behandlung mit einer höheren Rate von hämatologischen Sekundärneoplasien einhergeht. Dabei traten die sekundären Neoplasien vor allem bei Patienten auf, die Lenalidomid zusammen mit oralem Melphalan für mehr als 24 Monate erhielten. Im Gegensatz hierzu war die Inzidenz analog zu unseren Ergebnissen im Rahmen einer Erhaltungstherapie nach intravenösem Hochdosis-Melphalan nicht erhöht. Die Metaanalyse zeigte auch, dass die Patienten vor allem am Progress des Myeloms oder an Komplikationen wie Infektionen verstarben und nicht an Sekundärmalignomen (81). Wir zogen hieraus den Schluss, dass sowohl die ‚Imids‘ wie auch die kontinuierlich neu hinzu kommenden antineoplastischen Substanzen regelmäßig mit Blick auf ihr Risiko für Sekundärmalignome zu evaluieren sind.

Molekulare und funktionelle Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen von Patienten mit MDS, AML und Multiplem Myelom

Den zuvor genannten Risikofaktoren wird ein toxischer Einfluss auf die hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) zugeschrieben bei der Entstehung der MDS und AML. Daher stehen auch in den meisten wissenschaftlichen Untersuchungen auf dem Gebiet von MDS und AML Analysen der leukämischen Stammzelle im Mittelpunkt (48, 82-84). Aber auch das sog. Knochenmarkmikromilieu spielt eine wesentliche Rolle für die gesunde Hämatopoiese wie auch unter pathologischen Bedingungen (85, 86). Dabei besteht das Knochenmarkmikromilieu zum einen aus zellulären Bestandteilen wie mesenchymalen Stromazellen (MSC), Osteoblasten, Endothel-, Fett- und Immunzellen sowie sympathischen Nervenfasern, zum anderen aus Matrixkomponenten wie Kollagen und Hyaluronsäure. Insbesondere die MSC sind in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den HSPZ und formen sog. Stammzellnischen (85, 86). Hierdurch können MSC direkt oder parakrin mit den HSPZ in Wechselwirkung treten und deren fein abgestimmtes Wechselspiel zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung beeinflussen (Abbildung 4).

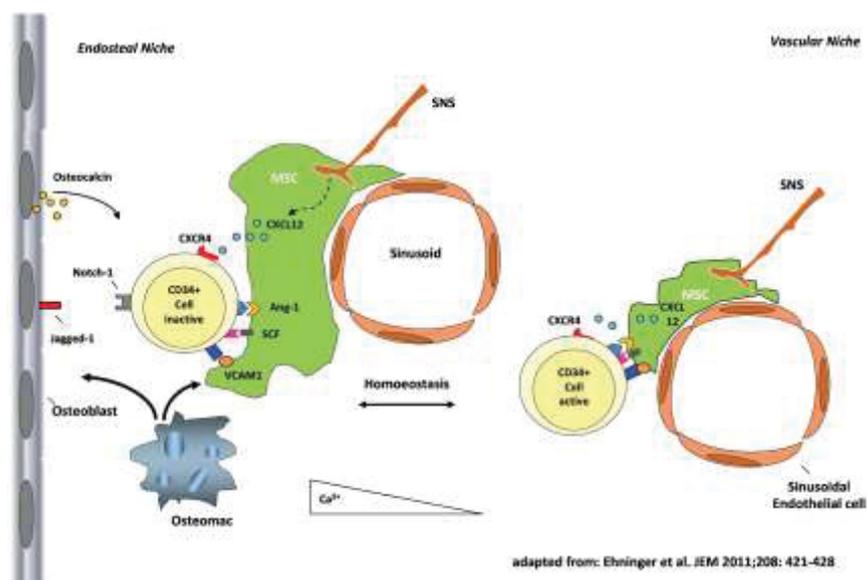


Abbildung 4: Schematische Darstellung der sog. Blutstammzellnischen innerhalb des Knochenmarkes [adaptiert nach (87)]

Wir untersuchten MSC aus dem Knochenmark von 121 unbehandelten MDS-Patienten, wobei alle MDS-Subtypen gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation sowie

alle Risikostadien entsprechend dem IPSS in ausreichender Zahl vorhanden waren (**Referenz D**). Als Kontrollgruppe dienten 67 hämatologisch gesunde Personen, die sich einer Hüftoperation unterzogen, so dass die MSC aus dem Knochenmark der entfernten Hüftköpfen gewonnen werden konnten. Dies war erforderlich, um zu gewährleisten, dass beide Gruppen hinsichtlich des Alters (gesunde Kontrollen: Median 63 Jahren, 31-85 Jahre; MDS: Median 66 Jahre, Spanne 26-91 Jahre; $p=0.3324$) und Geschlechts vergleichbar waren.

Dabei zeigten durchflusszytometrische Untersuchungen, dass sich die MSC der MDS-Patienten hinsichtlich des Oberflächenmarkerprofils nicht von gesunden MSC unterscheiden. Sowohl die MSC der Patienten wie auch die der Kontrollgruppe exprimieren die MSC Marker CD73, CD90 und CD105 (>95% der Zellen), wohingegen die hämatopoietischen Marker CD34 und CD45 nicht exprimiert werden (<2% der Zellen, Abbildung 5a). Die parallel durchgeführten mikroskopischen Analysen jedoch zeigten, dass die MSC von MDS-Patienten im Gegensatz zu gesunden MSC in vitro nicht die typische Fibroblasten-ähnliche Morphologie aufweisen und auch nicht den typischen ‚Feederlayer‘ ausbildeten. Die MDS-MSC waren vielmehr aufgetrieben und die Architektur der Kolonien erschien disorganisiert (Abbildung 5b). In Einklang hiermit war das Proliferationspotential der MDS-MSC gemessen anhand der ‚Colony-forming unit fibroblast (CFU-F)-Aktivität‘, der kumulativen Populationsverdopplung (CPD) sowie der maximalen Anzahl an möglichen Passagierungen signifikant niedriger (Abbildung 5c-e). Als mögliche Erklärung für dieses Wachstumsdefizit fanden wir mit Hilfe der β -Galaktosidase-Färbung eine gesteigerte zelluläre Seneszenz der MDS-MSC (Abbildung 5f).

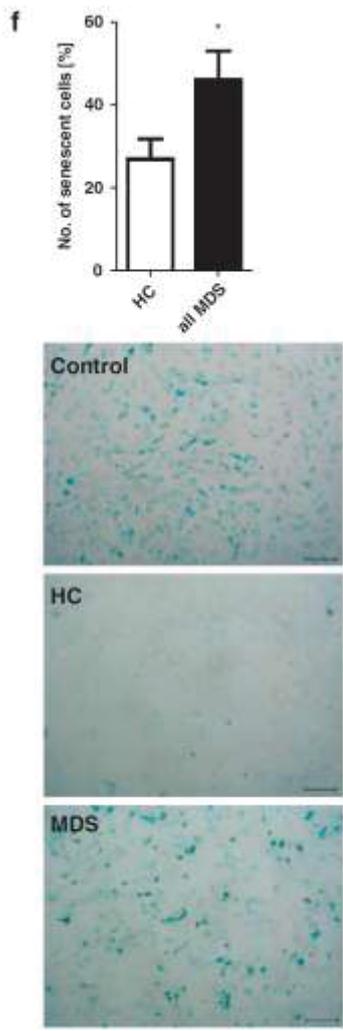
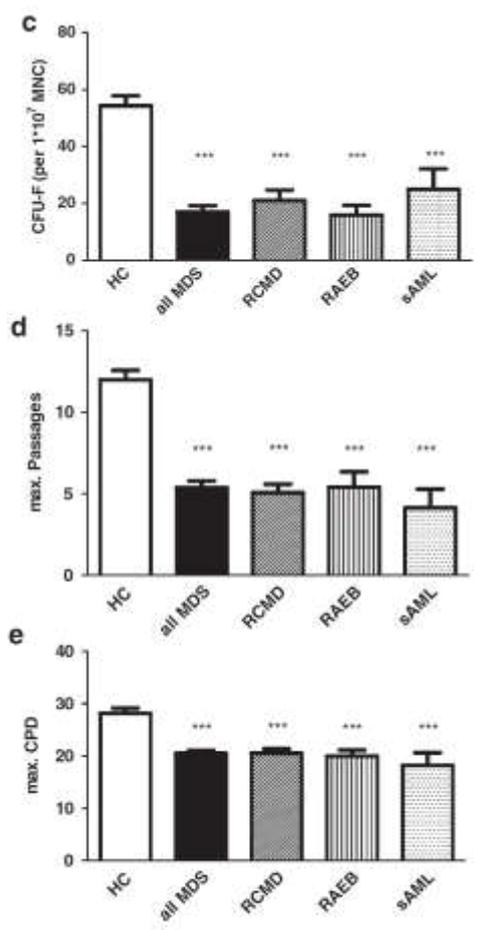
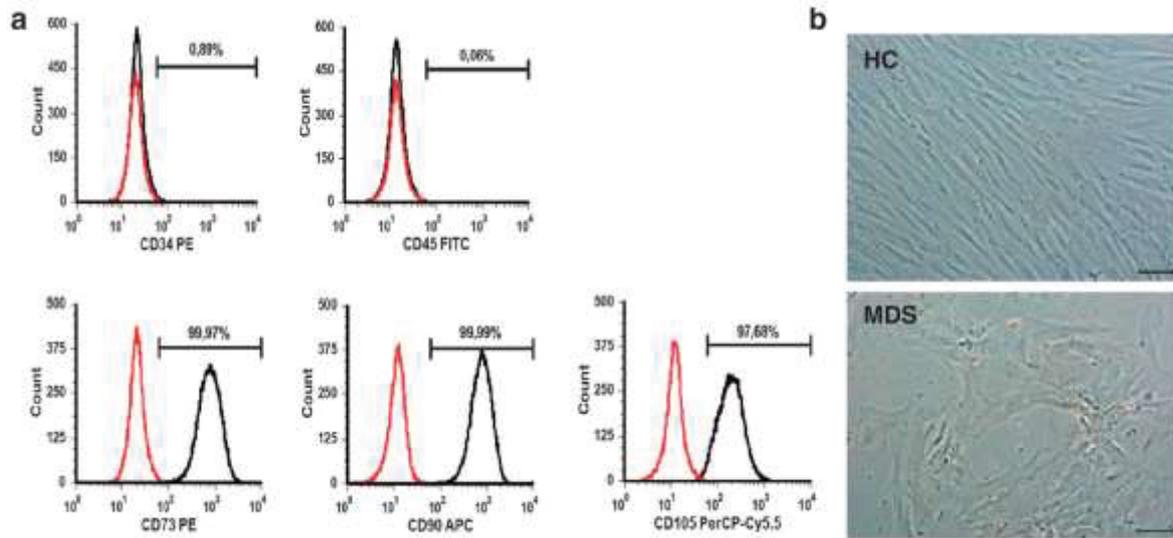


Abbildung 5: Phänotypische und funktionelle Eigenschaften von MSC von MDS-Patienten

Eine weiterführende Charakterisierung der MSC der MDS-Patienten wurde uns durch eine Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Frank Lyko vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg durch die Betrachtung des Methyloms der MSC möglich. Mit Hilfe von Infinium 450 K Arrays untersuchten wir das Methylierungsprofil von 450.000 CpG Islands bei insgesamt 8 MDS-Patienten (4 RCMD, 4 RAEB) und verglichen es mit dem Methylierungsprofil von MSC gesunder Kontrollen. Hierbei fanden wir 252 differentiell methylierte CpG Islands, welche sich auf 65 Gene verteilten. Interessanterweise ermöglichten diese differentiell 252 methylierten CpG Islands in sog. ‚Cluster- und Principal Component Analysen‘ eine klare Unterscheidung zwischen gesunden und MDS-MSC (Abb. 6a). Die Pathway-Analysen zeigten, dass insbesondere Gene differentiell methyliert waren, welche eine Rolle für den Zellphänotyp und die Regulation der Transkription spielten und die beschriebenen phänotypischen Unterschiede der MDS-MSC erklären könnten. Drei Kandidatengene, das HOXB-Cluster, TBX 15 sowie PITX2, wiesen gehäuft Methylierungsunterschiede auf (Abb. 6b). Nach Bestätigung der Hypermethylierung dieser Gene mittels 454 Bisulfitsequenzierung zeigte sich, dass die unterschiedlichen Lokalisationen der Methylierung innerhalb der Gene zu einer gesteigerten mRNA-Expression von PITX2 und zu einer verminderten Expression von HOXB und TBX15 führt. Für letztgenanntes Gen ist in der Maus gezeigt worden, dass es eine wesentliche Rolle für Proliferation und osteogene Differenzierung spielt (88). Ob dies auch relevant für die von uns beschriebenen phänotypischen Veränderungen der MDS-MSC ist, wird von uns zurzeit untersucht.

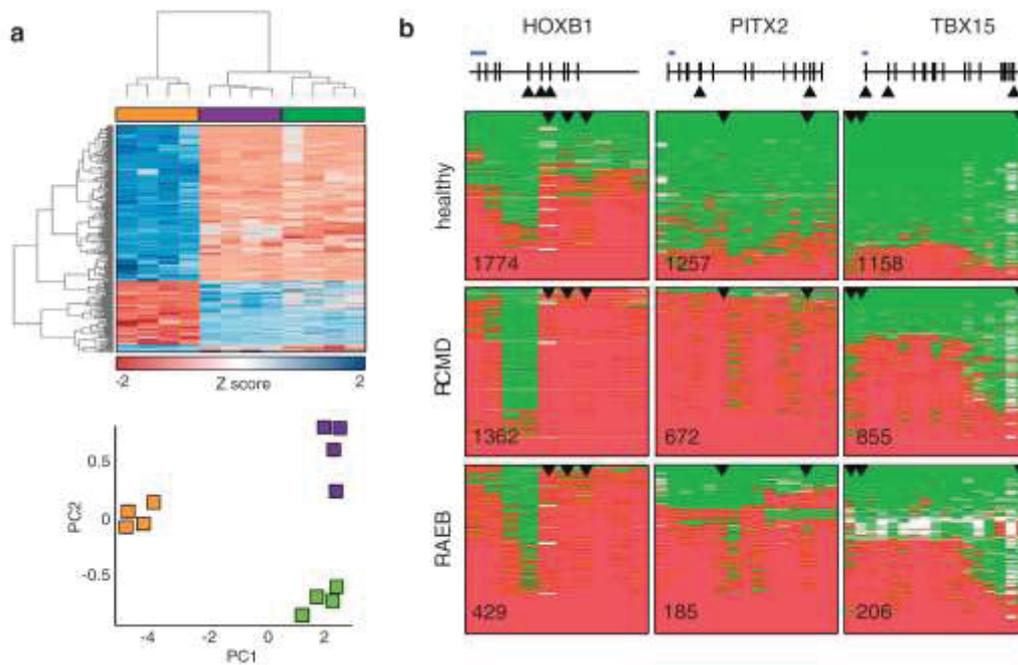


Abbildung 6: Methylierungsanalyse der MSC von MDS-Patienten mittels Clusteranalyse (a) und Bisulfitssequenzierung der Kandidatengene (b)

Neben der Plastikadhärenz und den Oberflächenmarkern ist ein definierendes Merkmal der MSC ihre trilineäre Differenzierbarkeit in andere mesenchymale Gewebe (89). Unsere in-vitro Untersuchungen der Differenzierungsfähigkeit demonstrierten, dass MDS-MSK zwar vergleichbar in Knorpel- und Fettgewebe differenzieren können. Es zeigte sich aber anhand verschiedener Färbemethoden und der Expression der Osteogenesemarker Osterix und Osteocalcin auf mRNA- und Proteinniveau, dass die osteogene Differenzierungskapazität der MDS-MSK signifikant herabgesetzt ist.

In weiteren Analysen mittels quantitativer real-time RT-PCR, FACS-Analysen sowie ELISA fanden wir eine differenzielle Expression zahlreicher Chemo- und Zytokine sowie Hämatopoiese-regulierender Mediatoren wie unter anderem Angiopoietin, Kit-Ligand und Jagged-1 in den MDS-MSK.

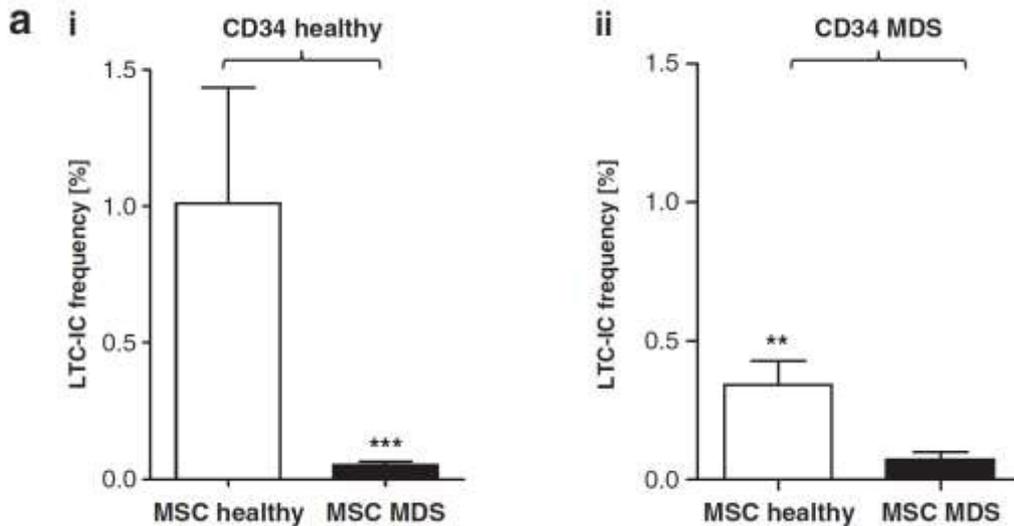


Abbildung 7: Stromaler Hämatopoiese-Support von MDS-MSC und Kontrollen im LTC-IC-Versuchsansatz

Diese Moleküle sind essentiell für die Interaktion und Kommunikation zwischen MSC und HSPZ. Aufgrund dessen und den anderen strukturellen und molekularen Veränderungen der MDS-MSC vermuteten wir, dass die MDS-MSC einen verminderten Stromasupport für die Hämatopoiese liefern könnten. Daher führten wir Kokulturrexperimente mit MSC und HSPZ durch, um die Situation der räumlichen und funktionellen Nähe zwischen diesen Zellen, wie sie im Knochenmark vorliegt, zu simulieren. Hierbei zeigte sich in sog. ‚Long-term Culture Initiating Cell-Assays‘ (LTC-IC), dass MDS-MSC signifikant weniger die Bildung von Sekundärkolonien und somit die Selbsterneuerungskapazität früher gesunder HSPZ unterstützen.

In Übereinstimmung hiermit zeigte sich, dass eine dreitägige Exposition gegenüber MDS-MSC zu einem signifikanten Shift im Zellzyklusverhalten gesunder HSPZ gemessen mittels Ki67 und Hoechst 33342-Färbung führt. Während in der Gegenwart gesunder MSC der Großteil der HSPZ sich in der G1 und G2/S/M-Phase befindet, so finden sich die meisten HSPZ in Anwesenheit von MDS-MSC in der G0-Phase.

Zusammenfassend konnten wir anhand der bis dato größten untersuchten Patientengruppe feststellen, dass MDS-MSC strukturelle und funktionelle Defizite im Vergleich zu gesunden MSC aufweisen. Diese Ergebnisse, die durch eine parallel veröffentlichte Arbeit einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt wurden (90), legen somit nahe, dass die defizienten MSC wesentlich zu der Entstehung der hämatopoietischen Insuffizienz bei den MDS beitragen.

In diesem Kontext drängt sich die Frage auf, ob es sich hierbei um primäre Defekte der MDS-MSK handelt, oder ob es sich hierbei um reaktive Veränderungen ausgelöst durch die Expansion des MDS-HSPZ-Klons handelt. Wir können anhand der hier geschilderten Daten diese Frage nicht beantworten. Doch auch wenn insbesondere Resultate von Mausmodellen darauf hindeuten, dass es sich um primäre Veränderungen handeln könnte (91, 92), sprechen folgende Überlegungen und Daten für die zweite Hypothese der reaktiven Veränderungen:

1. Es ist unwahrscheinlich, dass, wie in den Mausmodellen gezeigt, eine spezifische genetische Veränderung der MSC in der Lage ist, ein so heterogenes Krankheitsbild wie die MDS hervorzurufen.
2. Wenn es sich um eine primäre Erkrankung des Stromas handeln würde, so würde das beim MDS erfolgreich eingesetzte Therapiekonzept der allogenen Blutstammzelltransplantation nicht funktionieren, da die MSC nach der Transplantation weiterhin vom Empfänger stammen (93).
3. Klinischerseits korreliert die hämatopoietische Funktion des Knochenmarks invers mit der Krankheitsaktivität, d. h. wenn klonale MDS-Zellen im Knochenmark vorliegen, kommt es zu einer Verschlechterung der Blutbildung, während die Eradikation des MDS-Klons durch Chemotherapie oder demethylierende Substanzen zu einer Erholung der Hämatopoiese führt.

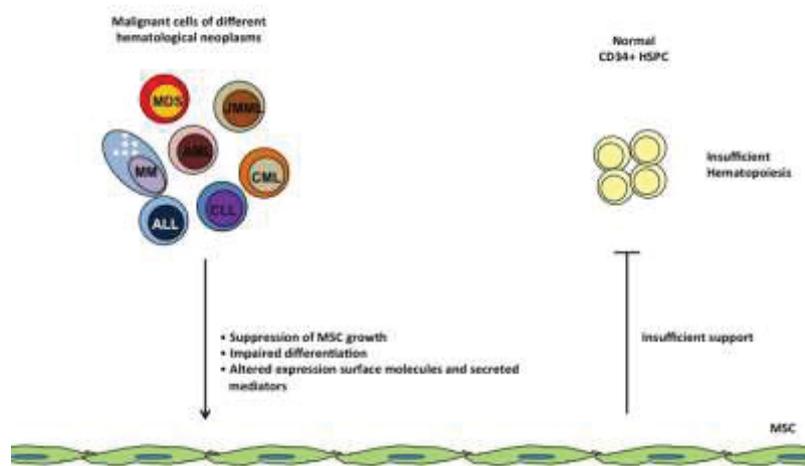


Abbildung 8: Hypothetisches Modell der Verdrängungsmyelopathie

Diese Hypothese, dass die malignen, das Knochenmark infiltrierenden Zellen zu einer funktionellen Suppression der Hämatopoiese führen, wird auch dadurch

unterstützt, dass dieses Phänomen nicht allein bei den MDS, sondern generell bei sowohl bei lymphatischen wie auch myeloischen Neoplasien vorliegen dürfte. So konnten wir zeigen, dass auch beim multiplen Myelom, einer malignen Plasmazellerkrankung eine funktionelle Hemmung der MSC vergleichbarer derer beim MDS vorliegt (**Referenz E**). Dies spiegelte sich nicht nur in einer verminderten Proliferations- und Differenzierungskapazität wider, sondern führte vor allem zu einem verminderten stromalen Support der Hämatopoiese in den LTC-IC Assays. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen und Immunblotting der ebenfalls funktionell supprimierten CD34+ HSPZ sowie mittels ELISA von Knochenmarküberständen von Myelom-Patienten konnten wir nachweisen, dass Transforming Growth Factor (TGF) β vermehrt von Plasmazellen ins Knochenmarkmikromilieu beim Myelom freigesetzt wird. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten fanden wir, dass TGF β sowohl zu einer Suppression der CD34+ HSPZ als auch der MSC beim Myelom führt (94). Eine Blockade des TGF β -Signals durch die Hinzugabe von SD-208, einem Inhibitor der TGF β Rezeptor 1 Kinase, induzierte wiederum auf Seiten der CD34+ HSPZ eine Steigerung der Proliferation, der Selbsterneuerungskapazität und der Bildung erythroider Kolonien. Auf Seiten der MSC führte die TGF β -Blockade zu einer Wiederherstellung der hämatopoietischen Support-Funktion im LTC-IC-Assay.

Während diese Ergebnisse die von uns favorisierte Hypothese der funktionellen Inhibition der MSC durch maligne Zellen weiter untermauern, so legen sie auch nahe, dass es bei verschiedenen hämatologischen Neoplasien gemeinsame Mechanismen der hämatopoietischen Suppression geben könnte. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass auch bei den MDS ein gesteigertes TGF β -Signaling im Knochenmark vorliegt, welches unter anderem für die insuffiziente Hämatopoiese verantwortlich zu sein scheint. Aufgrund dessen werden aktuell die Substanzen Luspatercept und Sotacerccept als sog. ‚TGF β -Ligand-Traps‘ in klinischen Studien untersucht, ob es durch die Blockade des TGF β -Signals zu einer Verbesserung der Erythropoiese bei Niedrigrisiko-MDS-Patienten kommt (95-97). Aufgrund dieser möglicherweise überlappenden Mechanismen der Myelosuppression bei verschiedenen Entitäten zielen unsere aktuellen Untersuchungen auf einen Vergleich der MSC bei verschiedenen hämatologischen Neoplasien ab. Dabei legen unsere Analysen von MSC von Patienten mit AML nahe, dass auch hier eine funktionelle Hemmung der MSC ausgehend von den leukämischen Progenitorzellen vorliegt (98). Insbesondere durch eine vergleichende Analyse des Methyloms und

der Genexpression von MSC von verschiedenen hämatologischen Neoplasien erwarten wir neue Einblicke in die Rolle des Knochenmarkmikromilieus für deren Pathogenese.

2. Fortschritte in Diagnostik und Prognose myeloischer Neoplasien

Differenzierung zwischen MDS und idiopathischen Zytopenien unklarer Signifikanz mittels Klonalitätsanalysen

Grundvoraussetzung, um die Diagnose eines MDS stellen zu können, ist das Vorliegen einer Zytopenie einer oder mehrerer hämatopoietischer Zelllinien, welche nicht auf eine andere Ursache zurückgeführt werden kann (11). Darüber hinaus bedarf es mindestens eines weiteren Diagnosekriteriums. Hierzu zählen Dysplasiezeichen in mindestens 10% der Zellen, ein erhöhter Blastenanteil von 5-19% im Knochenmark und der Nachweis einer charakteristischen chromosomalen Veränderung. Angesichts dessen stellt die zytomorphologische Untersuchung des Knochenmarks die tragende Säule der MDS-Diagnostik dar, welche ergänzt wird durch eine zytogenetische Analyse mittels Bänderungszytogenetik oder FISH. Auch wenn sich hiermit in der Mehrzahl der Fälle die Diagnose MDS eindeutig stellen lässt, so gibt es auch Patienten, welche nur milde Zytopenien und geringe Dysplasiezeichen sowie einen normalen Karyotyp aufweisen. Da diese formal die Diagnosekriterien nicht erfüllen, erschwert dies die Diagnosestellung. Für solche Patienten wurde der Begriff ‚idiopathische Zytopenie unklarer Signifikanz‘ (ICUS, ‚idiopathic cytopenia of cytopenia‘) definiert (99). Mit dem Ziel, diese Patientengruppe näher zu charakterisieren und ihre Prognose sowie den Krankheitsverlauf besser abschätzen zu können, analysierten wir diejenigen Patienten, die per definitionem an einem ICUS litten und deren Daten im Düsseldorfer MDS-Register hinterlegt waren (**Referenz F**). Wir konnten 67 Patienten (49 Frauen, 18 Männer) mit einem medianen Alter von 69 Jahren (19-88 Jahre) identifizieren. Diese litten führend an einer unilineären Zytopenie (66%), während eine Bizytopenie bei 18% und eine Panzytopenie bei 12% vorlagen (Abbildung 9). Des Weiteren zeigte sich in unserer Untersuchung, dass zwei Drittel der Patienten (67%) eine Anämie aufwiesen, während eine Neutropenie und/oder eine Thrombopenie bei 39% und 36% nachweisbar war. Die übrigen von uns betrachteten hämatologischen Laborparameter wie LDH oder auch Ferritinspiegel lagen im Normbereich oder waren allenfalls marginal verändert (Tabelle 2).

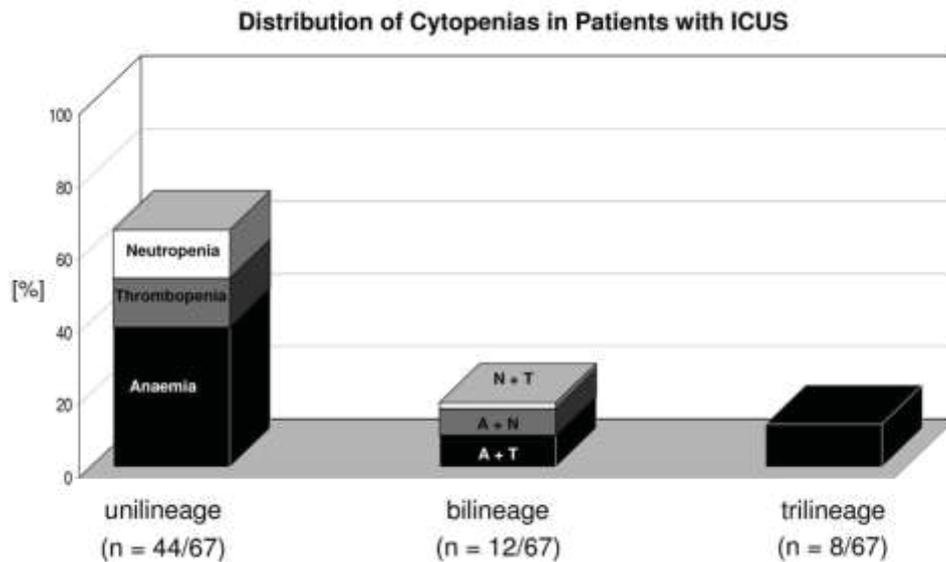


Abbildung 9: Verteilung der Zytopenien bei ICUS-Patienten

	ICUS (all patients)	ICUS (analysed by HUMARA)
Patients, n (%)	67 (100)	23 (34)
Age, years (median and range)	69 (19–88)	73 (47–84)
Leukocytes (/ μ l) [4000–11 000/ μ l]	3800 (353–13 300)	5000 (1900–11 600)
Granulocytes (/ μ l) [2000–8250/ μ l]	2100 (360–9280)	3549 (1548–9280)
Haemoglobin (g/dl) [female: 12–16 g/dl; male: 14–18 g/dl]	10.1 (4.6–14)	10.3 (6.3–13.4)
MCV (fl) [84–98 fl]	96.8 (78–128)	93 (83–112)
Reticulocytes (%) [0.5–2%]	1.6 (0.1–6.1)	2 (0.2–3.4)
EPO (mU/ml) [3.7– 31.5 mU/ml]	103 (47–1207)	103 (52–1207)
Ferritin (μ g/l) [20–290 μ g/l]	260 (21–3480)	295 (92–617)
Platelets (/ μ l) [150–400/ μ l]	139 (2–840)	185 (9–541)
Medullary blasts (%)	2 (0–4)	2 (1–4)
LDH (U/l) [<247 U/l]	206 (129–1551)	206 (138–384)
Creatinine (mg/dl) [<1.0 mg/dl]	0.9 (0.4–1.6)	0.9 (0.6–1.4)
TSH (μ IU/ml) [0.27–4.2 μ IU/ml]	0.99 (0.33–3.24)	0.99 (0.4–3.24)

Tabelle 2: Charakteristika der ICUS-Patienten

Infolge der Zytopenien waren 32% der Patienten bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung transfusionsbedürftig. Im Anschluss an diese phänotypische

Charakterisierung betrachteten wir den klinischen Verlauf und die Prognose der ICUS-Patienten. Interessanterweise entwickelten 12% der Patienten im weiteren Verlauf eine AML. Das mediane Gesamtüberleben betrug 44 Monate (1-199) Monate und lag damit zwischen dem medianen Überleben von Patienten mit einer refraktären Anämie (RA, 58 Monate) und dem von Patienten mit Refraktärer Zytopenie und multilineärer Dysplasie (RCMD, 38 Monate). In der Literatur waren bisher nur 2 Fallserien über jeweils 10 Patienten mit ICUS veröffentlicht worden (100, 101). In beiden Berichten entwickelte ein relevanter Anteil der Patienten im Verlauf ein MDS. In Einklang mit unseren Daten legt dies nahe, dass unter den vermeintlichen ICUS-Patienten eine Subgruppe existiert, welche bereits an einem klinisch inapparenten MDS bzw. an einer Art ‚MDS-Vorstufe‘ leidet.

Angesichts der hiermit einhergehenden verkürzten Lebenserwartung und dem relevanten Risiko für die Entstehung einer AML stellten wir uns als nächstes die Frage, ob diese Patienten bereits zu diesem frühen Zeitpunkt eine klonale Hämatopoese aufweisen und hierüber diagnostisch identifiziert werden können. Hierfür wählten wir den sogenannten HUMARA Klonalitätsassay, der auf dem Nachweis von Inaktivierungsmustern des X-chromosomalen Gens des ‚human androgen receptor gene‘ (HUMARA) beruht und dem folgende Grundprinzipien zugrunde liegen (102, 103):

1. In jeder weiblichen Zelle ist nur eines der beiden X-Chromosomen (maternal oder paternal) aktiv. Die Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms findet in der Embryonalentwicklung statt und wird stabil an alle Tochterzellen weitergegeben (Lyon-Hypothese) (103).
2. Die Inaktivierung des jeweils zweiten X-Chromosoms erfolgt über eine Methylierung der Gene (103).
3. Einzelne X-chromosomale Gene wie das HUMARA-Gen sind hochpolymorph, d. h. sie unterscheiden sich durch zahlreiche variable CAG-Short-Tandem-Repeats zwischen paternalen und maternalen Genen (102).

Durch den Einsatz von methylierungsspezifischen Endonukleasen (in unserem Fall HpaII, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) werden nur diejenigen Gene, die methyliert sind, für eine PCR zugänglich. Im Anschluss an diesen enzymatischen Restriktionsenzymverdau erfolgt eine PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern und die Visualisierung der Genprodukte mittels einer Kapillarelektrophorese.

In unseren Analysen gingen wir also davon aus, dass physiologischerseits das Knochenmark ein Gemisch von Zellen darstellt, welche jeweils zur Hälfte das paternale und das maternale Gen tragen. Diese 50:50-Verteilung der Gene definierten wir als polyklonal, wohingegen wir in Einklang mit der Literatur ab einer Verteilung von >75% des Anteils des paternalen oder maternalen Gens von einer monoklonalen Population ausgingen (104, 105). Basierend auf der biologischen Grundlage der Methode konnten wir diese Analyse nur bei den weiblichen Patientinnen durchführen. Dabei war es uns möglich die Klonalität bei 23 der 49 weiblichen Patienten retrospektiv zu analysieren, wohingegen aufgrund zu geringer DNA-Mengen 26 Patientinnen nicht untersucht werden konnten. Wir fanden bei 17 Patientinnen ein nicht-klonales Inaktivierungsmuster, während die anderen 6 Patientinnen ein monoklonales Muster aufwiesen. Während sich die beiden Patientengruppen hinsichtlich des Alters, Ausmaß der hämatopoietischen Insuffizienz und Transfusionsbedarf nicht unterschieden, entwickelten 2 der 6 Patientinnen (33%) mit klonalem Inaktivierungsmuster im Verlauf eine AML. Demgegenüber entwickelte keine der 17 Frauen (0%, $p=0.013$) mit polyklonalem Muster eine AML. Bei Patienten mit aplastischer Anämie ist der Nachweis der Klonalität ein Indikator für den Übergang in ein MDS. Auch für Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom, die eine autologe Transplantation erhalten hatten, ist der Nachweis von Klonalität assoziiert mit dem erhöhten Risiko für die Entstehung einer therapie-assoziierten myeloischen Neoplasie (106).

Aufgrund dessen folgerten wir aus diesen Ergebnissen, dass ein Teil der Patienten mit ICUS bereits ein beginnendes MDS oder eine MDS-Vorstufe aufweist. Als Surrogatparameter bietet sich bei weiblichen Patienten eine Klonalitätsanalyse mittels HUMARA-Assay an. Für Männer, aber auch Frauen kann die Klonalität jedoch heutzutage auch durch den Nachweis von Single-Nucleotide-Polymorphysmen oder den Nachweis von MDS-spezifischen molekularen Veränderungen erfolgen. Diese Methoden weisen eine höhere Spezifität und Sensitivität als die Klonalitätsanalyse mittels X-chromosomalen Inaktivierungspattern auf, da letzteres auch physiologischerseits als oligo- oder monoklonales Muster bei gesunden älteren Frauen auftreten kann („Age-related Skewing“). Genau dieses Phänomen, dass mit zunehmenden Alter bei bis dahin hämatologisch gesunden Menschen gehäuft Mutationen auftreten und eine klonale Hämatopoiese anzeigen, konnte durch 2 Arbeitsgruppen mittels Next Generation Sequencing (NGS) vor

kurzem gezeigt werden (54, 55). Insbesondere fanden sich gehäuft Mutationen in den Genen für DNMT3A, TET2 und ASXL1, die charakteristischerweise bei Patienten mit myeloischen Neoplasien auftreten. Patienten, die Mutationen und somit eine klonale Hämatopoiese aufwiesen, entwickelten im Verlauf signifikant häufiger eine myeloische Neoplasie. Dies legt nahe, dass bereits Jahre vor der Manifestation eine klonale Hämatopoiese besteht, die dann durch Hinzukommen weiterer Mutationen zu einer hämatologischen Neoplasie evolutioniert. Angesichts dieses erhöhten Risikos sollten die Patienten mit ICUS bzw. mit einem positiven Klonalitätsnachweis jedoch unabhängig von der jeweiligen Methode regelmäßig untersucht werden und im Falle eines Übergangs in ein MDS dementsprechend behandelt werden.

Molekulare Analysen von prognoserelevanten Genexpressionsunterschieden und Mutationen

Molekularbiologische Untersuchungen bieten sich neben der differentialdiagnostischen Abgrenzung der MDS auch für die prognostische Eingrenzung der MDS an. Dabei kann prinzipiell entweder der Nachweis der Überexpression eines spezifischen Genes oder einer spezifischen Mutation genutzt werden.

So gingen wir in einer weiteren Untersuchung der Frage nach, ob die mRNA Expression des Meningioma 1 (MN1) Gens bei Patienten mit MDS generell erhöht ist und mit dem Risiko für einen AML-Übergang korreliert (**Referenz G**). Bei Patienten mit de novo AML fungiert dieser Transkriptionsfaktor nicht nur als Partner in verschiedenen onkogenen Fusionsproteinen. Die Überexpression von MN1 induziert darüber hinaus in Mäusen die Entstehung einer AML und ist beim Menschen mit de novo AML mit einem geringen Therapieansprechen und einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (107-110). Wir analysierten deshalb die mRNA-Expression von MN1 in immunmagnetisch angereicherten CD34+ Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark von 60 MDS-Patienten (Tabelle 3) mittels quantitativer real-time RT-PCR und verglichen diese mit der Expression von 8 gesunden Kontrollen.

Die Untersuchungen wurden auf einem Light Cycler System (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt und das Housekeepinggen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) diente als externe Kontrolle

zur relativen Quantifizierung. Dabei verwendeten wir zur relativen Quantifizierung die ΔC_t -Methode, bei welcher die relative Genexpression als Differenz der sog. ‚Cycles of threshold‘-Werte des MN1-Gens und des Housekeepinggens angegeben wird (111). Ein hoher C_t -Wert korreliert dabei invers mit dem MN1-Expressionsniveau.

Table I. Patients' demography according to the WHO classification of MDS.

Characteristic	RA	RCMD	RAEB	sAML
Patients, n (%)	9 (15)	20 (33.33)	20 (33)	11 (18.33)
Sex, n (%)				
Male	4 (44.44)	14 (70)	13 (65)	6 (54.55)
Female	5 (55.56)	6 (30)	7 (35)	5 (45.45)
Age (years)				
Median	62	65	70	71
Range	33–75	44–74	38–79	50–86
Hemoglobin level (g/dL)				
Mean	9.4	10	9.1	9.1
Range	7–11	6.8–14.4	6.4–12.6	7.4–11.5
WBC count (μ /L)				
Mean	5 650	3 800	5 062	18 038
Range	1.700–14.200	1.500–8.000	1.000–21.500	71 100
Platelets (μ /L)				
Mean	112 050	150 933	82 443	49 125
Range	40.000–221.000	8.000–404.000	11.000–295.000	12.000–95.000
Medullary blasts (%)				
Mean	3	2	10	38
Range	1–4	1–4	7–18	22–80
LDH (U/L)				
Mean	212	184	229	920
Range	170–250	140–246	177–345	125–5.400

RA, refractory anemia; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RAEB, refractory anemia with excess of blasts; sAML, secondary acute myeloid leukemia; WBC, white blood cells; LDH, lactate dehydrogenase.

Tabelle 3: Charakteristika der Patienten in der MN1-Untersuchungsgruppe

In unseren Analysen zeigte sich, dass sich das MN1-Expressionslevel nicht signifikant unterschied, wenn man die gesamte MDS-Patientengruppe mit den gesunden Kontrollen verglich (MDS medianer C_t -Wert 5,99 Zyklen, Standardabweichung 1,76 Zyklen; gesunde Kontrollen medianer C_t -Wert 6,19 Zyklen, Standardabweichung 0,71 Zyklen). Dies stand in Einklang mit den Daten, welche bei der AML beschrieben worden waren. Heuser et al. hatten gezeigt, dass eine relevante MN1-Expression in CD34+ wie auch mononukleären Zellen von gesunden Menschen detektierbar ist (110). In einer weiteren Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass nur etwa die Hälfte der pädiatrischen Patienten mit AML eine MN1-Überexpression aufweist (107). Auffällig bei unseren Untersuchungen war jedoch die große interindividuelle Schwankung der MN1-Expression bei den einzelnen Patienten mit MDS im Vergleich im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Während bei den gesunden Kontrollen die C_t -Werte maximal um den Faktor 4,11 variierten, so bestand zwischen dem niedrigsten und höchsten MN1-Levels ein 128-

facher Unterschied. Des weiteren fand sich eine signifikante Korrelation sowohl mit dem WHO-Subtyp als auch mit der IPSS-Risikoklassifizierung. Patienten mit einem fortgeschrittenen MDS gemessen an der Anzahl der Blasten im Knochenmark, also RAEB oder sAML, oder gemessen an der IPSS-Risikokategorie, also intermediate-II oder high-risk, hatten eine signifikant höhere MN1-Expression im Vergleich zu den Niedrigrisiko-MDS-Patienten ohne Blastenvermehrung.

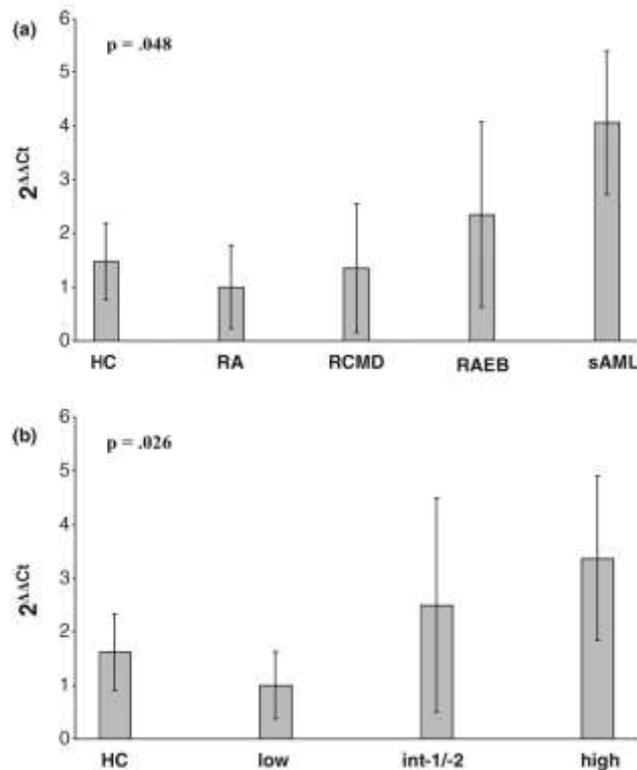


Abbildung 10: MN1-Expression in CD34+ Zellen von Patienten mit MDS aufgetrennt nach WHO-Subtyp und IPSS-Stadium

Am ehesten aufgrund des retrospektiven Charakters zeigte sich in unserer Analyse kein Einfluss der MN1-Expressionshöhe auf das Gesamtüberleben der Patienten. Interessanterweise konnten jedoch in den vergangenen Jahren unabhängig von einander zwei Arbeitsgruppen zeigen, dass die Überexpression von MN1 als Bestandteil von Genexpressionssignaturen mit einem kürzeren Gesamtüberleben sowie einem erhöhten Risiko für einen AML-Übergang vergesellschaftet ist (112, 113). Zusammengefasst legen diese und unsere Daten nahe, dass die Expression von MN1 pathogenetisch eine Rolle beim Übergang der MDS in eine sAML spielen könnte.

Neben der Überexpression von Kandidatengen konnten mit Hilfe stetig optimierter Sequenzierungstechniken in den vergangenen Jahren zahlreiche Mutationen beim MDS nachgewiesen werden. Zu diesen gehörten Mutationen in Genen des Splicosomes, des epigenetischen Regulationsapparates, der Chromatinmodifizierung sowie verschiedener Signaltransduktionsmolekülen (50-52). Dabei erweitert sich die Liste der möglichen relevanten Gene kontinuierlich, ohne dass für die Vielzahl der Gene die prognostische Aussagekraft bis dato abschließend geklärt ist.

Mit der Frage nach der Prävalenz und dem prognostischen Stellenwert von etwaigen Mutationen untersuchten wir daher als erstes das SET binding protein 1 (SETBP1) Gen in einer Gruppe von 944 Patienten mit MDS und AML (**Referenz H**). Mutationen dieses Gens waren zuvor bei Patienten mit atypischer chronisch-myeloischer Leukämie nachgewiesen worden und waren dort mit einer höheren Leukozytenzahl und einer schlechteren Prognose assoziiert (114). Mittels Sanger-Sequencing konnten wir eine Mutation dieses Gens jeweils in der SKI homologous domain bei 10 Patienten nachweisen, wobei 6 Patienten (Frequenz 1,7%) ein MDS und 4 Patienten (Frequenz 2,4%) eine sekundäre AML nach MDS (sAML) aufwiesen (Tabelle 4). Bei Patienten mit de novo AML hingegen fand sich die Mutation bei keinem Patienten. Mit Blick auf andere Mutationen traten die SETBP1 Mutationen signifikant gehäuft bei Patienten auf, welche auch eine Mutation im SRSF2-Splicosome-Gen trugen. Während die mittels quantitativer real-time RT-PCR gemessene Expressionsstärke des SETBP1 Gens keine prognostische Relevanz besaß, so war das Vorliegen einer Mutation dieses Gens mit einem erhöhten Rezidivrisiko nach einer allogenen Transplantation vergesellschaftet.

Im Zentrum zweier weiteren Untersuchungen stand das Calreticulin (CALR) Gen (**Referenz I und J**). Somatische ‚frameshift‘ Mutationen dieses Gens waren zuvor bei Patienten mit Essentieller Thrombozythämie (ET) sowie bei Patienten mit Primärer Myelofibrose (PMF) beschrieben worden (115, 116). Neben dem wesentlichen Nutzen als diagnostischer Marker bei diesen myeloproliferativen Erkrankungen deuteten erste Arbeiten auch auf bestimmte klinische Korrelate sowie eine prognostische Relevanz hin (117). So wiesen die PMF-Patienten mit mutiertem CALR Gen in einer Arbeit niedrigere Leukozyten- und höhere Thrombozytenzahlen auf und lebten länger als Patienten mit Wildtyp CALR Gen (115). In einer anderen Arbeit ging das Vorliegen einer solchen Mutation mit einem niedrigen Risikostadium gemessen am sog. DIPSS und einem längeren Überleben einher (118). Da der

prognostische Stellenwert der CALR Mutationen im Kontext der allogenen Blutstammzelltransplantation zum damaligen Zeitpunkt bisher nicht untersucht war, analysierten wir 133 Patienten mit primärer oder sekundärer Myelofibrose, die eine allogene Transplantation in kurativer Absicht erhielten, hinsichtlich Prävalenz und prognostischer Wertigkeit dieser Mutation. Dabei fanden wir bei 28 der Patienten (21%) eine CALR Mutation, wobei sich anhand des Mutationsstatus keine relevanten Unterschiede hinsichtlich Patienten- und Krankheitscharakteristika ergaben. Jedoch zeigte sich in der univariaten Analyse ein signifikant besseres Gesamtüberleben für Patienten mit dem mutiertem CALR Gen verglichen zu Patienten mit Wildtyp CALR Gen und auch gegenüber Patienten mit JAK2- und MPL-Mutation.

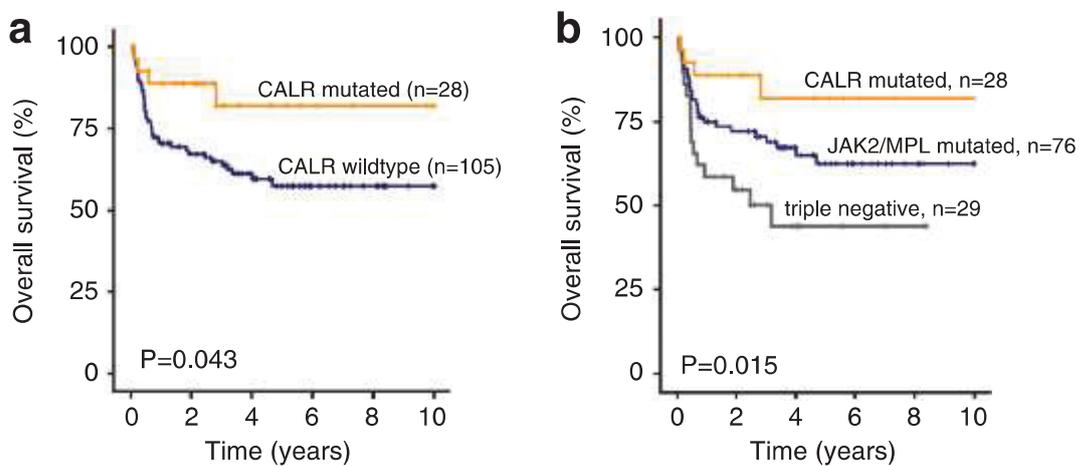


Abbildung 11: Gesamtüberleben entsprechend des Calreticulin-Mutationsstatus (a) sowie im Vergleich zum JAK2/MPL-Mutationsstatus (b)

In der Multivariate-Analyse bestätigte sich diese Erkenntnis trendweise (Hazard Ratio 0,41; 95% Konfidenzintervall 0.15-1.16, $p= 0.094$). In weiteren univariaten und multivariaten Analysen zeigte sich dann, dass Patienten mit einer CALR Mutation ein signifikant niedriges Risiko für die Nicht-Rezidiv-bedingte Sterblichkeit besitzen im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-Gen (4-Jahres NRM CALR Mutation 7% vs. CALR Wildtyp 31%, $p= 0.024$). Im Gegensatz hierzu hatte der CALR Mutationsstatus keinen Einfluss auf die Rezidiv-Inzidenz. Die Schlussfolgerung aus dieser Analyse war, dass CALR Mutationen neben einem diagnostischen auch einen prognostisch relevanten Marker für Patienten mit Myelofibrose, bei denen eine allogene Blutstammzelltransplantation durchgeführt wird, darstellen.

Angesichts dieses Stellenwertes bei der Myelofibrose betrachteten wir in einer weiteren Analyse die Prävalenz und eine etwaige prognostische Bedeutung der CALR-Mutationen bei 527 Patienten mit MDS oder sAML (**Referenz J**). Es zeigte sich in Einklang mit einer nahezu zeitgleich erschienenen Publikation eine sehr niedrige Frequenz (0,38%) von CALR-Mutationen bei diesen Patienten (119). Insgesamt nur 2 Patienten mit sAML wiesen eine CALR Mutationen auf. Dies belegt die hohe Spezifität der CALR-Mutationen bei Patienten mit ET und PMF und unterstreicht den Nutzen dieser Mutationen als diagnostisches Instrument für diese myeloischen Blutstammzellerkrankungen.

Autor	Gen	Patientenzahl	Mutationsfrequenz
Thol e al. (Referenz H)	SETBP1	de novo AML n= 425	0%
		sAML n=170	2,4%
		MDS n=349	1,7%
Panagiota et al. (Referenz I)	CALR	PMF n=133	21%
Heuser et al. (Referenz J)	CALR	MDS n=328	0,4%
		sAML n=199	

***Tabelle 4:** Mutationsfrequenz der Gene für SETBP1 und CALRETICULIN bei Patienten mit myeloischen Neoplasien*

Molekulares Monitoring minimaler Resterkrankung anhand von Mutationen

Über den differentialdiagnostischen Nutzen und die prognostische Relevanz hinaus ist der Nachweis spezifischer Mutationen auch für die Detektion der sogenannten minimalen Resterkrankung („minimal residual disease“, MRD) nach therapeutischen Interventionen wie einer allogenen Blutstammzelltransplantation von Bedeutung. Das Grundprinzip des MRD-Monitorings beruht dabei auf dem Vorliegen einer chromosomalen Veränderung, einem überexprimierten Genprodukt, einer Genmutation oder einem aberrant exprimierten Oberflächenantigen in den malignen Blutzellen. Dies ermöglicht im Anschluss an eine Therapie mittels molekularbiologischer Untersuchung wie FISH, RT-PCR, Sequenzierungsanalysen oder mittels Durchflusszytometrie die Detektion verbliebener maligner Zellen unterhalb der lichtmikroskopischen Nachweisgrenze und somit eine genauere

Beurteilung der Remissionstiefe. Darüber hinaus erlaubt ein sequenzielles MRD-Monitoring oftmals eine frühzeitigere Erkennung eines möglichen Rezidives bereits auf der submikroskopischen Ebene (120). Dies ist insbesondere daher von wesentlicher Bedeutung, da ein Ansprechen auf eine Salvagetherapie mit dem Level der Krankheitslast invers korreliert.

Angesichts fehlender Kenntnis spezifischer Mutationen beruhte das MRD-Monitoring bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen und myelodysplastisch/myeloproliferativen Neoplasien lange Zeit auf dem Nachweis chromosomaler Aberrationen. Durch die Einführung neuer Sequenzierungstechniken wie dem Sanger-Sequencing und dem Next Generation Sequencing konnten zahlreiche Mutationen von Genen verschiedener funktioneller Pathways in den vergangenen Jahren identifiziert werden (50-52). Diese haben nicht nur zu einem besseren Verständnis der Pathogenese der MDS und MPN beigetragen, sondern bieten sich auch für ein sensitiveres MRD-Monitoring an.

Mit dem Ziel, den Stellenwert der neu entdeckten Mutationen für das MRD-Monitoring nach einer allogenen Transplantation zu evaluieren, haben wir 45 Patienten mit myelodysplastisch/myeloproliferativen Neoplasien (32 CMML, 5 MDS/MPN Overlap-Syndrome, 1 atypische CML, 7 transformierte AML) mittels Sanger-Sequenzierung und 454 Next Generation Sequencing auf das Vorliegen von Mutationen in insgesamt 5 Genen untersucht (**Referenz K**). Hierdurch konnten wir bei 89% der Patienten mit einer mittleren Detektionssensitivität von 2% vor der Transplantation mindestens eine Mutation im peripheren Blut nachweisen. Dabei fand sich am häufigsten eine Mutation im ASXL1-Gen (50%), in absteigender Reihenfolge gefolgt vom TET2- (42%), NRAS- (33%), KRAS- (21%) und CBL-Gen (19%). Dreizehn Patienten wiesen Mutationen in 2 Genen auf, 5 Patienten sogar in 3 Genen.

Unsere Analyse zeigte, dass keine der gefundenen Genmutationen einen prädiktiven Wert für das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben noch für die therapieassoziierte Mortalität oder die GvHD-Inzidenz besaßen. Bei 21 Patienten mit nachgewiesener Mutation konnten wir im Median 6 Monate (Spanne: 3-9 Monate) nach der Transplantation erneut eine molekulare Analyse durchführen. Dabei war die entsprechende Mutation bei 7 Patienten (33%) erneut nachweisbar und zeigte somit das Vorhandensein von klonalen myeloischen Zellen an. Einhergehend hiermit war die Rezidiv-Inzidenz bei den Patienten mit positivem MRD-Nachweis signifikant

höher (50%) als bei Patienten (15%, $p=0.04$), bei denen die vorbekannte Mutation nicht mehr detektierbar war. Interessanterweise fanden wir keine klare Korrelation zwischen den Ergebnissen der Mutationsanalysen und denen der Chimärismusanalysen. Bei den Patienten mit nachweisbarer Mutation wiesen 44% dennoch einen kompletten, die anderen 56% hingegen einen gemischten Spenderchimärismus auf.

Insgesamt zeigen diese Resultate, dass neue Sequenzierungstechniken als Screeninguntersuchungen zur Identifikation von Genmutationen, die für das MRD-Monitoring verwendet werden können, sehr gut geeignet sind. Für das sequenzielle MRD-Monitoring können die neuen Methoden wie das NGS ebenso verwendet werden, wobei der Nachweis der entsprechenden Mutation in der Posttransplantationsphase prädiktiv für einen Krankheitsrückfall ist. Nichts desto trotz haben die neuen Methoden einige Nachteile. Im Mittel liegt das Detektionslimit dieser Methoden bei ca. 1% und ist damit vergleichbar mit den bisher verfügbaren Methoden. Eine Steigerung der Sensitivität ist prinzipiell möglich, würde aber eine längere Untersuchungsdauer und hiermit indirekt höhere Kosten hervorrufen. Eine andere Möglichkeit wäre, anstatt des peripheren Bluts Knochenmark zu verwenden. Dies würde zwar zu einer Steigerung der Sensitivität führen, ist aber für den Patienten belastend, da ein sequenzielles MRD-Monitoring in diesem Fall regelmäßige Knochenmarkpunktionen erfordern würde. Denkbar wäre ebenso die Durchführung von patientenspezifischen PCRs, indem man für die individuell vorliegende Mutation jeweils Primer designt. Auch dies ist jedoch mit hohem zeitlichen und finanziellen Aufwand verbunden. Daher haben diese Nachteile den routinemäßigen Einsatz des NGS als MRD-Testmethode bisher verhindert. Bis dies geschehen ist, sollten Methoden für das MRD-Monitoring Patienten mit MDS folgende Ansprüche erfüllen:

1. eine sensitive und spezifische Methode sollte für möglichst viele MDS-Patienten parallel anwendbar sein
2. möglichst sollte eine quantitative real-time RT-PCR verwendet werden, um eine hohe Sensitivität zu erzielen
3. der Marker sollte im zeitlichen Verlauf während unterschiedlicher Krankheitsphasen stabil nachweisbar sein
4. wünschenswert aus Patientensicht wäre eine Methode, welche peripheres Blut als Untersuchungsmaterial verwendet

Ein molekularer Marker, welcher dieses Anforderungsprofil möglicherweise erfüllen könnte, ist das Wilms' Tumor 1 (WT1) Gen. Das Gen, welches für den Transkriptionsfaktor WT1 codiert, liegt auf dem Chromosom 11 und wird in ca. 90% aller AMLs auf transkriptioneller Ebene überexprimiert (121). Daher ist sein Stellenwert als MRD-Marker bei der AML etabliert und es existiert ein standardisierter RT-PCR Assay mit festgelegten Grenzwerten für eine pathologische Überexpression (122). Bei den MDS ist die Rolle des WT1 aufgrund der limitierten Zahl bisher untersuchter Patienten, unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien (Knochenmark bzw. peripheres Blut) sowie aufgrund der Verwendung von nicht-standardisierten in-house-Methode bisher nicht vollständig klärt (123-129). Vor diesem Hintergrund haben wir bei 106 unbehandelten MDS-Patienten mittels dem Ipsogen® WT1 ProfileQuant® Kit (Qiagen, Germany) die WT1-Expression im peripheren Blut bestimmt. Es zeigte sich eine eindeutige Korrelation mit dem Blastengehalt, dem Risikostadium nach IPSS und IPSS-R sowie mit dem WHO Subtyp. Je höher der Blastengehalt bzw. je fortgeschrittener das Risikostadium, desdo höher ist das WT1-Expressionslevel und die Frequenz der Patienten mit pathologischer WT1-Expression.

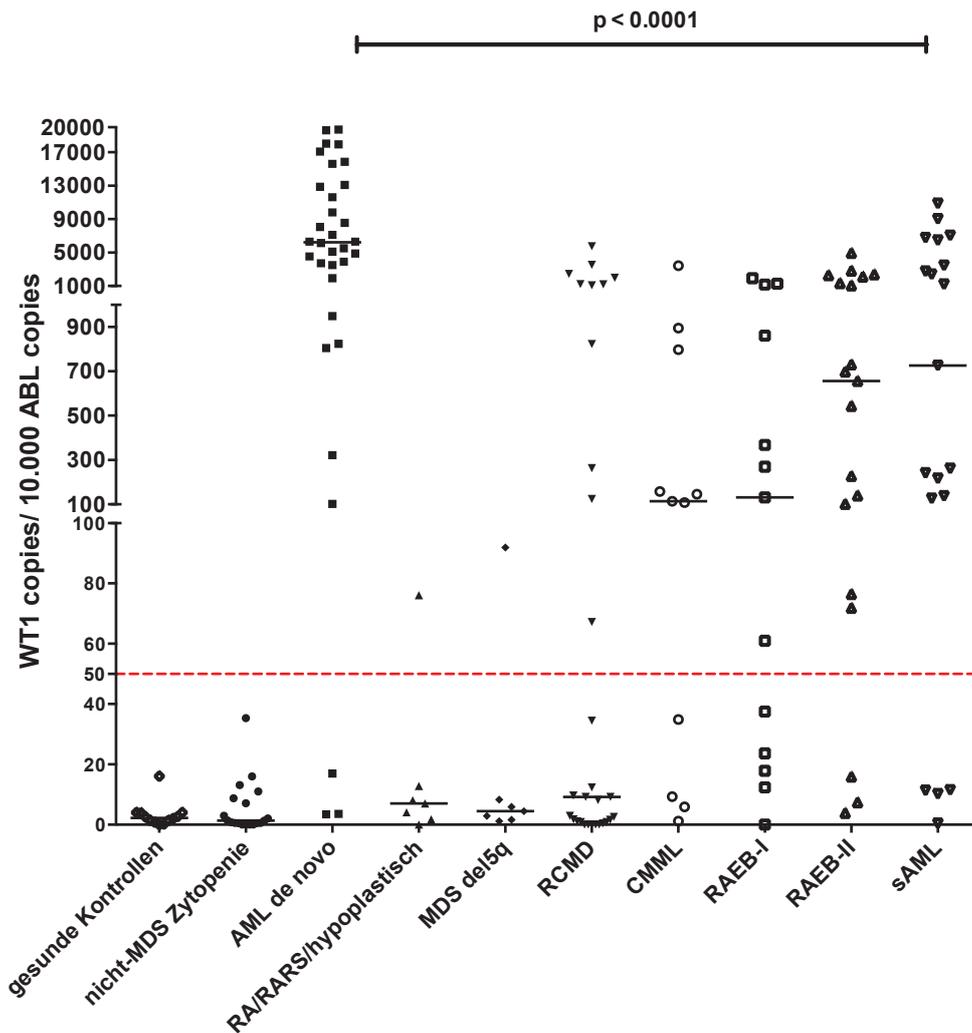


Abbildung 13: WT1 mRNA-Expressionslevel im peripheren Blut von MDS-Patienten entsprechend dem WHO-Subtyp

Darüber hinaus konnten wir mittels uni- und multivariater Analyse zeigen, dass die WT1-Überexpression bei Patienten mit IPSS low oder intermediate-1 bzw. IPSS-R low oder intermediate Risikostadium ein unabhängiger, negativer Prädiktor für das progressionsfreie Überleben ist. Bei den bisher 21 Patienten, die wir nach der allogenen Transplantation sequenziell nachverfolgen konnten, zeigt sich eine 100%ige, stabile Korrelation zwischen dem Remissionsstand und dem WT1-Expressionslevel (130).

3. Verbesserung bei der allogenen Blutstammzelltransplantation

Für AML- und MDS-Patienten bis 70 Jahre, die aufgrund ihrer allgemeinen körperlichen Verfassung als geeignet erachtet werden, stellt die allogene Blutstammzelltransplantation eine kurative Therapieoption dar (131, 132). Hierbei besteht für Patienten mit MDS generell eine Indikation, wenn ein Hochrisikoprofil (d. h. IPSS intermediate-2 oder high), ausgeprägte Zytopenien oder prognostisch ungünstige genetische Veränderungen vorliegen (34). Bei Patienten mit AML basiert die Indikationsstellung für eine allogene Transplantation auf einer Nutzen-Risiko-Abwägung zwischen dem Rezidivrisiko und der therapieassoziierten Mortalität von konventioneller Chemotherapie im Vergleich zur allogenen Transplantation. Dabei beruht die Abschätzung des Rezidivrisikos zum einen auf zytogenetischen und molekularen Krankheitscharakteristika, zum anderen auf dem Ansprechen der Erkrankung auf die konventionelle Chemotherapie (43).

Neue Substanzen zur Remissionsinduktion vor allogener Blutstammzelltransplantation

Durch eine konventionelle Induktionstherapie bestehend aus einem Anthrazyklin und Cytarabin (3+7'-Schema) lässt sich bei jüngeren AML-Patienten (<60 Jahre) in 65% bis 75% und bei älteren Patienten (>60 Jahre) in 40% bis 60% eine komplette Remission erzielen (43). Da der Remissionszustand vor einer allogenen Transplantation ein Prädiktor für das Outcome ist, zielen aktuelle Studien unter anderem darauf ab die Ansprechrate auf die Induktionstherapie zu erhöhen. Hierbei versucht man, das bessere molekulare Verständnis der AML zu nutzen, indem man zielgerichtete Medikamente wie z. B. Tyrosinkinaseinhibitoren entweder in Kombination mit der Induktionstherapie oder als Monotherapie einsetzt. Am meisten wird hierbei der Einsatz von sog. FLT3-Inhibitoren untersucht, die darauf abzielen, die sog. Fms-like tyrosine-3 kinase (FLT3) zu inhibieren. Eine Mutation dieses Gens liegt in 25% bis 40% der AML-Patienten mit normalem Karyotyp vor und führt über eine konstitutive Aktivierung dieser Rezeptorkinase zu einer gesteigerten Proliferation der leukämischen Zellen (133, 134).

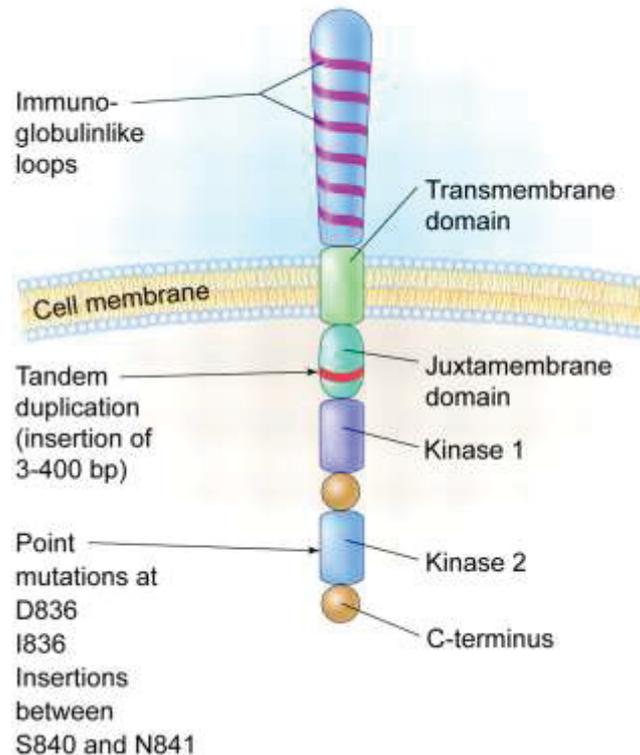


Abbildung 14: Struktur der FLT3-Tyrosinkinase und Lokalisation der häufigsten Mutationen (135)

Mit derselben Intention haben wir bei 5 AML-Patienten den Multikinaseinhibitor Sorafenib (Dosisbereich: 400 bis 800 mg pro Tag per os, mediane Behandlungsdauer 34 Tage, Spannweite: 5-50 Tage) vor einer allogenen Transplantation eingesetzt. Sorafenib hemmt neben Raf, dem VEGF-Rezeptor, dem ‚Platelet-derived Growth Factor‘ auch die FLT3-Rezeptortyrosinkinase und ist für die Therapie des metastasierten hepatozellulären und Nierenzellkarzinom zugelassen (**Referenz L**). Dabei wiesen 4 der Patienten eine sog. Internal Tandem Duplication (ITD) in der juxtamembranösen Domäne auf, während eine Patientin eine Mutation in der Tyrosinkinasedomäne (TKD) hatte.

Vier Patienten waren entweder refraktär auf die initiale Induktionstherapie oder waren im Intervall zwischen der Induktion und der allogenen Transplantation rezidiert. Die beiden primär refraktären Patienten erhielten daher Sorafenib in Kombination mit hochdosiertem Cytarabin und Mitoxantron (HAM-S) und erreichten hierdurch eine komplette molekulare Remission. Dabei zeigt sich der potentiell additive Effekt des Sorafenibs zur Chemotherapie insbesondere in dem klinischen Verlauf sowie dem MRD-Verlauf (Abbildung 15). Die beiden rezidierten Patienten

erhielten Sorafenib allein bzw. in Kombination mit einer Einzeldosis Cytarabin. Dies führte zu einem hämatologischen Ansprechen bei diesen beiden Patienten.

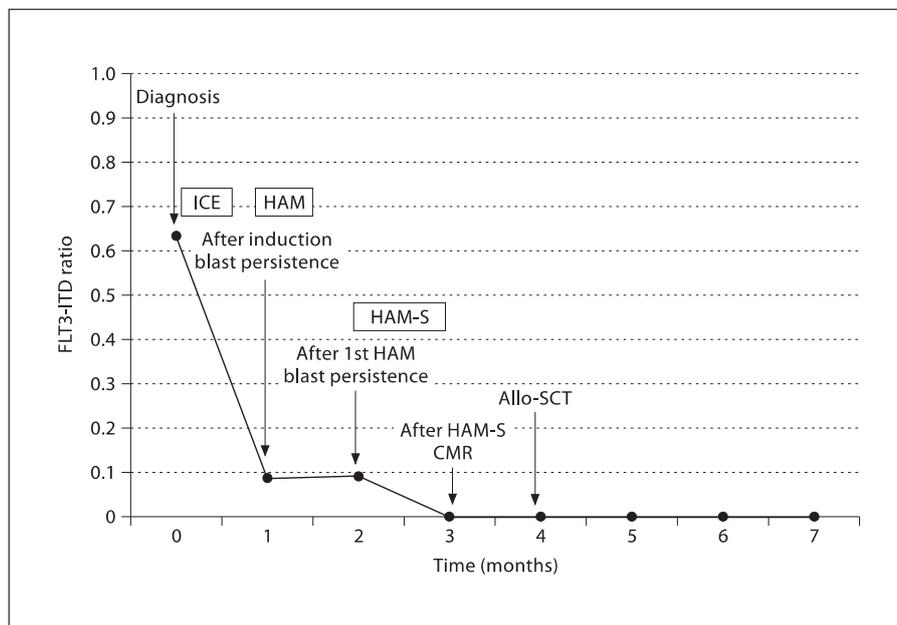


Abbildung 15: Molekularer und klinischer Verlauf einer Patientin mit FLT3-ITD nach Hinzunahme von Sorafenib zur Induktionstherapie

Die fünfte Patientin hatte zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine Hyperleukozytose mit 377.000/ μ l und litt bereits an einem pulmonalen Leukostase-Syndrom. Nachdem Therapieversuche mit Hydroxyurea, Cytarabin und eine therapeutische Leukapherese nicht zu einer relevanten Reduktion der Leukozyten geführt hatten, verabreichten wir der Patientin Sorafenib. Hierdurch kam es innerhalb von 5 Tagen zu einer Reduktion der Leukozyten von 119.700/ μ l (98% Blasten) auf 5.300/ μ l (28% Blasten). Dies ermöglichte den Beginn einer konventionellen Induktionstherapie unter Fortführung der Sorafenib-Therapie, wodurch eine komplette Remission erreicht werden konnte.

Bei allen fünf Patienten war es möglich im Anschluss an die Sorafenib-Therapie eine allogene Blutstammzelltransplantation durchzuführen. Betrachtet man unsere Erfahrungen bei den Patienten, die Sorafenib in Kombination mit Chemotherapie erhielten, im Lichte der einzigen prospektiven Studie, in welcher Sorafenib ebenfalls parallel zur Chemotherapie gegeben wurde, so zeigt sich in beiden Arbeiten, dass durch die Hinzunahme von Sorafenib das Ansprechen auf eine Chemotherapie gesteigert werden kann (136). Auch wenn dies die antileukämische Wirkung des Sorafenibs darlegt, scheint dies leider keinen Einfluss auf die

Rückfallwahrscheinlichkeit zu haben. Wie auch in der prospektiven Studie, sind drei unserer Patienten sind mittlerweile infolge eines Rezidivs verstorben.

Die beiden Patienten mit der Sorafenib-Monotherapie vor einer allogenen Transplantation erhielten Sorafenib nur über einen sehr kurzen Zeitraum. Hierdurch kann keine abschließende Aussage über die Wirksamkeit einer Sorafenib-Monotherapie getroffen werden. Daher untersuchten wir im Verbund mit Kollegen aus Marburg sowie 28 weiteren Zentren 36 Patienten, die ebenfalls Sorafenib als Monotherapie nach Versagen einer konventionellen Chemotherapie erhielten (**Referenz M**). Bei 11 (30%) der Patienten konnte eine komplette Remission erreicht werden, davon bei 3 Patienten sogar eine komplette molekulare Remission. Leider verlor nahezu die Hälfte der Patienten (47%) ihr Ansprechen wieder im Median nach 136 Tagen, ein Phänomen, welches bereits zuvor beschrieben worden war. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse beider Arbeiten, dass die Hinzunahme von Sorafenib zur konventionellen Therapie oder als Monotherapie bei individuellen Patienten hilfreich sein kann. Die aktuelle Studienlage erlaubt jedoch bisher kein abschließendes Urteil: Während bei älteren Patienten (>60 Jahre) kein Vorteil durch die additive Gabe des Sorafenib gezeigt werden konnte (137), so zeigt eine aktuelle placebo-kontrollierte Studie bei jüngeren Patienten (<60 Jahre) möglicherweise ein verlängertes Ereignis-freies Überleben (138). Hier gilt aber zu berücksichtigen, dass bei beiden Studien nur 14% bzw. 17% der Patienten eine FLT3-ITD-Mutation aufwiesen. Daher gilt es, die Ergebnisse weiterer Studien mit anderen, teils potenteren FLT3-Inhibitoren wie Midostaurin oder Quizartinib abzuwarten.

Verbesserung der Konditionierungstherapie für MDS-Patienten

Ziel einer Induktionstherapie bei der AML ist das Erreichen einer kompletten Remission vor einer allogenen Transplantation, um durch Reduktion der leukämischen Zellen zumindest auf ein submikroskopisches Niveau die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit zu senken. Bei Patienten mit MDS oder sekundärer AML aus MDS ist die Rolle einer vorgeschalteten Induktionsbehandlung vor der allogenen Transplantation bisher ungeklärt. Bislang existieren nur retrospektive Vergleiche zwischen Patienten, die vor der allogenen Transplantation eine Induktionschemotherapie erhielten und solchen, die ohne Vorbehandlung direkt transplantiert wurden (36-38, 40). In diesen Analysen hatte sich kein Vorteil für eine Induktionschemotherapie gezeigt. Ferner gilt zu berücksichtigen, dass auf Seiten der Patienten, die eine Induktion erhielten, ein möglicher positiver Selektionsbias besteht. Denn die MDS-Patienten sprechen verglichen mit de-novo AML-Patienten seltener auf eine Induktionschemotherapie an und erleiden infolge von Alter und Komorbiditäten häufiger Komplikationen in der Aplasiephase nach der Induktion. Aufgrund dessen kann ein relevanter Anteil der Patienten gar nicht mehr transplantiert werden.

Das sog. FLAMSA-RIC-Protokoll ist ein intensiviertes, sequentielles Konditionierungsregimen, welches von der Arbeitsgruppe um Hans-Jochem Kolb entwickelt und bei Patienten mit Hochrisiko-AML eingesetzt wurde. Dieses Protokoll basiert auf einer sequenziellen Gabe zunächst von einer Kombinationschemotherapie bestehend aus Fludarabin, Amsacrin und AraC gefolgt von der eigentlichen Konditionierungstherapie, welche in der Originalversion aus Cyclophosphamid und einer niedrig-dosierten Ganzkörperbestrahlung von 4 Gray bestand. Hierdurch lassen sich selbst bei Patienten mit refraktärer AML Überlebensraten von 32% nach 4 Jahren erreichen (139), was die effektive antileukämischen Wirkung belegt. Ein weiterer Vorteil ist, dass es im Gegensatz zum Ansatz der Induktionschemotherapie nur zu einer Aplasiephase kommt, da die eigentliche Konditionierung in der Aplasie verabreicht wird.

Mit dem Ziel, durch Einsatz eines effektiven zytoreduktiven Konditionierungsregimen die Rückfallwahrscheinlichkeit zu senken und gleichzeitig durch nur eine Aplasiephase das Risiko für therapieassoziierte Komplikationen zu minimieren, haben wir 30 Patienten mit fortgeschrittenem MDS (n=20) oder sekundärer AML aus MDS (n=10) mit einem modifizierten FLAMSA-Protokoll behandelt (**Referenz N**).

Dabei verzichteten wir aufgrund der länger zu erwartenden Immunsuppression auf Cyclophosphamid und die Ganzkörperbestrahlung und setzten stattdessen Melphalan in altersadaptierter Dosis mit oder ohne Thiotepa als eigentliche Konditionierung ein (s. Abbildung 16). Zusätzlich erhielten 22 Patienten Antithymozytenglobulin (ATG-Fresenius). Ein unverwandter Spender wurde bei 17 Patienten eingesetzt, bei 13 Patienten ein verwandter Spender.

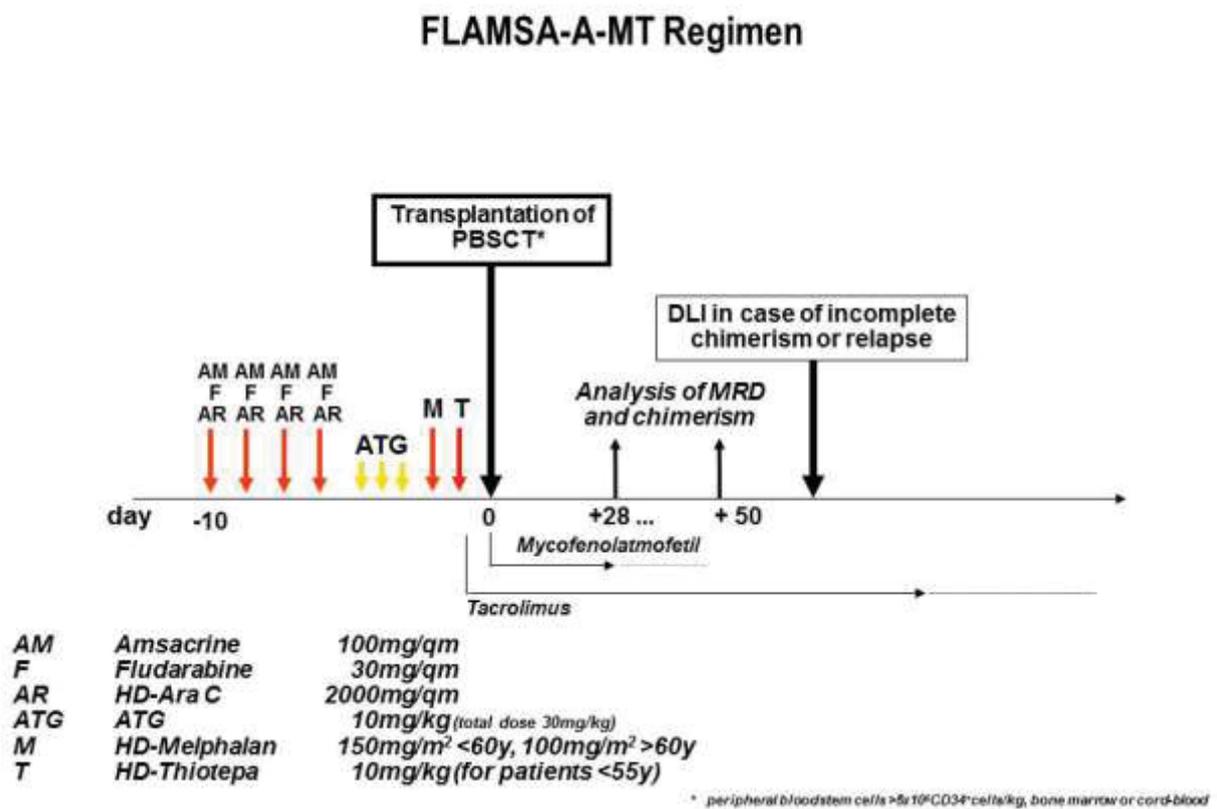


Abbildung 16: Schematische Darstellung des FLAMSA-MT-Konditionierungsprotokolls

Das Ziel, eine möglichst wirksame Therapie einzusetzen, wurde erreicht. Bis auf einen Patienten (97%) erreichten alle Patienten eine komplette Remission an Tag 28. Das Ereignis-freie Überleben betrug nach 2 Jahren 63%, das Gesamtüberleben 70%. Von den 10 Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation eine AML aufwiesen, lebten nach 2 Jahren sogar noch 80%.

Auch das Ziel, durch das sequenzielle Vorgehen nur eine möglichst kurze

Aplasiaphase zu induzieren, wurde erreicht. Die Phase, in der eine Grad IV Neutropenie vorlag, betrug im Median 18 Tage (Spannbreite 11 bis 39 Tage) und war somit kürzer im Vergleich zu historischen Kollektiven nach einer Induktionschemotherapie (140). Zwar traten dennoch insgesamt 17 Grad III/IV Infektionen auf, diese waren jedoch meist mit einer GvHD assoziiert und nicht Folge der Neutropenie. Trotz einer intensiven Konditionierung in dieser älteren Patientengruppe (medianes Alter 49 Jahre) mit mehr als Hälfte der Patienten mit mind. einer Komorbidität war die Rate an therapieassoziierten Todesfällen mit 30% vergleichbar mit anderen klinischen Studien (141, 142). Es zeigte sich jedoch bereits früh, dass vor allem Patienten verstarben, die zusätzlich zum Melphalan auch Thiotepa erhielten. Hier lag die therapieassoziierte Mortalität bei 67% im Vergleich zu 21% mit der alleinigen Melphalan-Gabe. Aufgrund dessen haben wir bereits frühzeitig auf Thiotepa innerhalb des Konditionierungsprotokolles verzichtet.

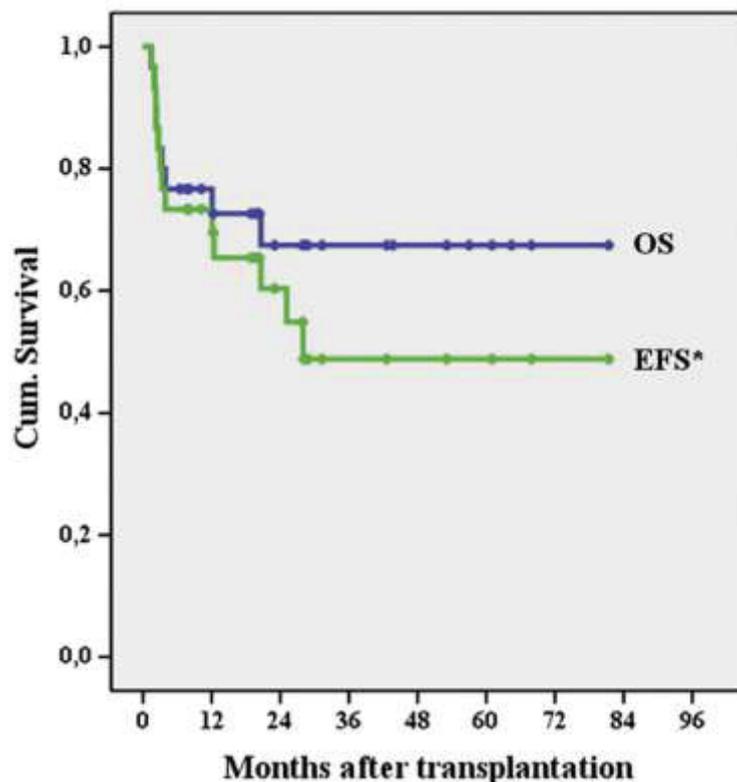


Abbildung 17: Gesamtüberleben (OS) und Ereignis-freies Überleben der 30 Patienten nach FLAMSA-basierter Konditionierung

Insgesamt zeigen die Daten, dass auch in dieser älteren Patientengruppe ein sequenzielles FLAMSA-Konditionierungsregimen durchführbar ist. Die vergleichende Analyse von 138 Patienten, die an unserer Klinik zwischen und transplantiert wurden, legt wiederum nahe, dass mit dieser Upfront-Transplantation Resultate hinsichtlich Gesamt- und Rezidiv-freiem Überleben sowie therapieassoziierter Mortalität erreicht werden können, die mindestens vergleichbar mit den Ergebnissen nach vorheriger Induktionschemotherapie sind (Thomas Schroeder/Guido Kobbe nicht publizierte Daten). Dennoch unterliegt auch unsere Betrachtung dem methodischen Fehler, dass nur die Patienten in der Induktionsgruppe in die Auswertung eingehen, welche auch letztendlich transplantiert und nicht auf dem Weg zur Transplantation infolge von Komplikationen verloren gingen.

Verhältnismäßig hoch war bei der Gruppe der Patienten, die myeloablativ mit FLAMSA-Melphalan konditioniert worden waren, die Inzidenz der akuten GvHD (73%) und der chronischen GvHD (76%). Die Schwere der aGvHD und der cGvHD war jedoch meist eher gering ausgeprägt mit 53% Grad I/II-GvHD sowie 56% limited cGvHD. Von den 6 Patienten, die eine Grad III/IV aGvHD erlitten, hatten 3 einen Mismatch-Spender. Insgesamt 5 starben an Komplikationen der GvHD. Dies zeigt, dass neben einer optimalen Spenderauswahl ein engmaschiges Monitoring der Patienten und Modulation der Immunsuppression erforderlich ist.

Neue Behandlungsformen der Graft-versus-Host Disease

Auch bei Patienten, die eine nicht-myeloablative Konditionierung erhalten, stellt die GvHD ein relevantes Problem und die Hauptursache für die therapieassoziierte Mortalität und Morbidität dar. Bei diesem Therapieverfahren, das ursprünglich von Rainer Storb und Kollegen in Seattle entwickelt wurde, werden nur Fludarabin und 2 Gray Ganzkörperbestrahlung als Konditionierung verwendet. Vorteil ist eine höchst mögliche Minimierung der Toxizität der Konditionierung, so dass dieses Regime auch bei älteren meist komorbiden Patienten wie den MDS-Patienten eingesetzt werden kann. Nachteil ist, dass der antileukämische Effekt nahezu allein auf der Alloimmunreaktion beruht (143). Eine Verstärkung der Immunsuppression zur Vermeidung einer GvHD hat daher beinahe unvermeidbar zur Folge, dass der Graft-versus-Leukemia (GvL)-Effekt abgeschwächt wird. Traditionell wurde bei diesem Konditionierungsverfahren Ciclosporin und Mycophenolat Mofetil (MMF) als GvHD-

Prophylaxe verwendet.

In einer prospektiven Studie untersuchten wir nun bei 50 Patienten mit fortgeschrittenen hämatologischen Neoplasien die Kombination aus Tacrolimus als alternativen Calcineurininhibitor und MMF als GvHD-Prophylaxe nach nicht-myeloablativer Konditionierung und anschließender Transplantation von Blutstammzellen unverwandter Spender (**Referenz O**). Etwa die Hälfte der Patienten litt an einer meist rezidierten oder refraktären myeloischen Blutstammzellerkrankung (13 AML, 6 MDS, 4 CML). Alle Patienten waren aufgrund von Alter >55 Jahre (n=23), Komorbiditäten (n=20) oder vorangegangenen Hochdosischemotherapien (n=29) nicht geeignet für eine myeloablative Konditionierung.

Die Studie zeigte, dass mit dieser GvHD-Prophylaxe bei 96% der Patienten ein stabiles Engraftment korrelierend mit einem vollständigen Donorchimärismus bei 41 von 50 Patienten (85%) erreicht werden konnte. Es zeigte sich ferner, dass die Kombination aus Tacrolimus und MMF gut verträglich war. Hauptnebenwirkung, welche jedoch reversibel war, war die Nephrotoxizität. Auch hinsichtlich des primären Studienendpunktes, nämlich einer effektiven GvHD-Prophylaxe, zeigte die Kombination aus Tacrolimus und MMF vergleichbare Ergebnisse wie mit der Standardprophylaxe bestehend aus CSA und MMF (144). So betrug die Rate der aGvHD 56%, wobei nur 16% aller Patienten eine aGvHD vom Schweregrad III oder IV entwickelten. In Einklang mit Daten von Nieto et al. bei der Familienspendertransplantation, trat die aGvHD verhältnismäßig spät erst nach im Median 66 Tagen auf (145). Die Gesamtrate der cGvHD betrug 61%, wobei lediglich 21% eine ‚extensive disease‘ entwickelten. Insgesamt zeigten die Resultate, dass die Kombination aus Tacrolimus und MMF möglicherweise effektiver ist als die Standardkombination aus CSA und MMF und sich insbesondere die ‚early-onset‘ aGvHD hierdurch vermeiden lässt. Trat jedoch eine akute oder chronische GvHD auf, so bedurfte es einer Intensivierung der Immunsuppression. Hierbei stellen Steroide die Erstlinientherapie dar, wobei nur ca. 50% der Patienten ansprechen. Bei den steroid-refraktären Patienten kommen auch monoklonale Antikörper als Zweitlinientherapie zum Einsatz (**Referenz P**). Diese richten sich zwar meist recht zielgerecht gegen zelluläre oder lösliche Mediatoren innerhalb des ‚Circulus vitiosus‘ der GvHD-Pathogenese. Allerdings unterdrücken sie dadurch auch oftmals wichtige Effektormechanismen der antimikrobiellen Abwehr, so dass, wie auch bei

unseren Patienten mit GvHD beobachtet, vor allem lebensbedrohliche Infektionen auftreten können.

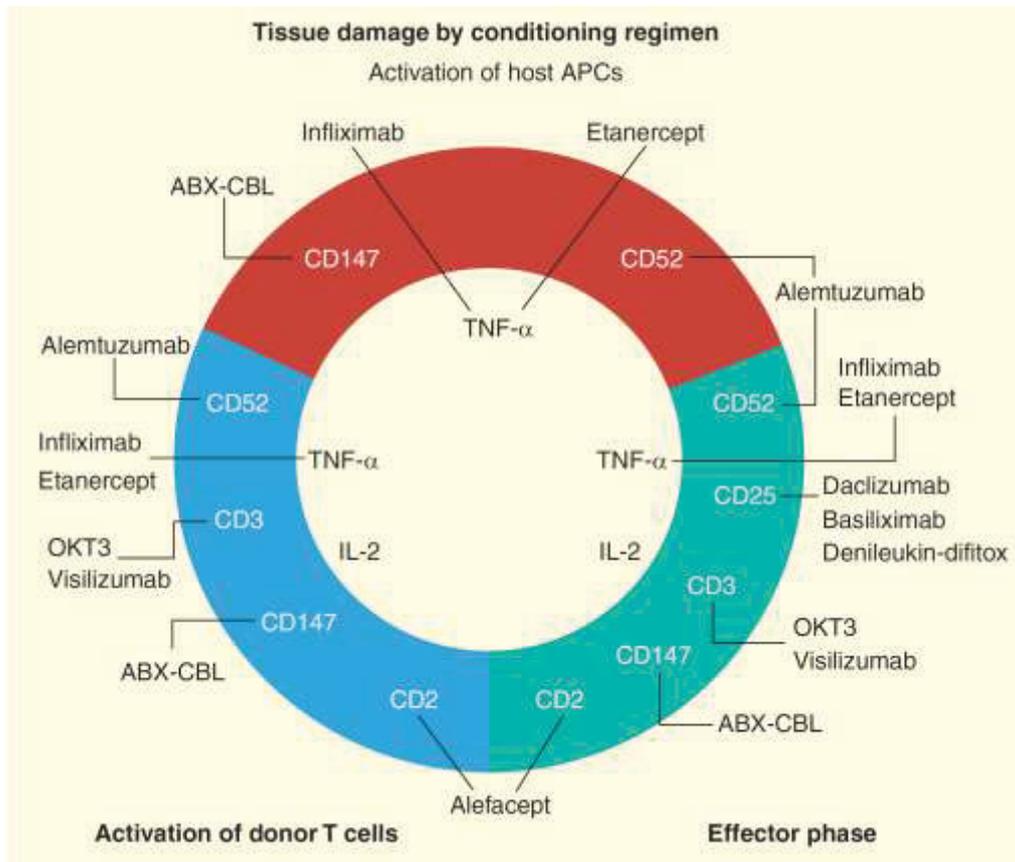


Abbildung 18: Schematische Darstellung der GvHD-Pathogenese und Angriffspunkte für die Antikörper-basierte GvHD-Therapie

Es zeigte sich auch in unserer Arbeit, dass die Patienten, welche zum Zeitpunkt der Transplantation keine Remission erreicht hatten, ein signifikant schlechteres Überleben mit 20% nach 3 Jahren hatten. Da eine Intensivierung der Vorbehandlung, also eine erneute Salvagechemotherapie oder eine myeloablative Konditionierung nicht möglich war, bedarf es vor allem post-transplantationem neuer Ansätze um ein sich ankündigendes oder manifest gewordenes Rezidiv möglichst schonend aber dennoch effektiv zu behandeln.

Ergebnisse einer Kombinationstherapie mit Azacitidine und Spenderlymphozyten zur Rezidivbehandlung nach allogener Blutstammzelltransplantation

Im Gegensatz zu den Fortschritten bei der therapieassoziierten Mortalität konnte mit Blick auf das Rezidiv-freie Überleben keine durchgreifenden Fortschritte erzielt werden. Weiterhin erleiden zwischen 20% und 65% der Patienten mit AML und MDS nach der allogenen Transplantation einen Krankheitsrückfall, so dass das Rezidiv die häufigste Ursache für ein Therapieversagen darstellt (35). In einer solchen Situation ist die Prognose mit den gegenwärtig verfügbaren therapeutischen Optionen äußerst schlecht und weniger als 20% der Patienten überleben langfristig (146, 147). Die bisher eingesetzten Therapien bestanden bisher aus der Gabe einer erneuten konventionellen Chemotherapie sowie zellbasierten Ansätzen wie der Infusion von Spenderlymphozyten oder einer zweiten Blutstammzelltransplantation (147-149). Dabei lässt sich nur bei einer geringen Zahl von Patienten mit der Chemotherapie erneute eine Remission erzielen (147). Mit Blick auf die zellbasierten Verfahren profitieren in der Regel jedoch nur diejenigen Patienten, die zuvor eine Remission erreicht haben (147, 149). Außerdem können aufgrund der vorangegangenen Nebenwirkungen der ersten Transplantation nur wenige Patienten eine intensive Chemotherapie tolerieren, und auch die Gabe von Spenderlymphozyten oder eine zweite Transplantation ist mit zahlreichen Risiken, insbesondere dem Risiko für schwere Formen der GvHD assoziiert.

Daher bedarf es neuer Therapieansätze, die auf der einen Seite möglichst eigenständig eine Remission erzielen können und gleichzeitig möglichst gut verträglich sind. Wünschenswert im Kontext der allogenen Blutstammzelltransplantation wäre ferner, dass die Therapie einen immunologischen Effekt gegen die malignen Zellen (sog. Graft-versus-Leukemia Effekt) induziert, parallel hierzu aber möglichst keine schwere GvH-Reaktionen hervorruft.

Auf der Suche nach einer solchen Therapieoption wurde in unserer Klinik im Jahre 2006 weltweit erstmalig den DNA-Methyltransferaseinhibitor Azacitidine als Rezidivtherapie nach allogener Blutstammzelltransplantation in Kombinationen mit Spenderlymphozyteninfusionen eingesetzt (150). Die Substanz war bis dato nur für Hochrisiko-MDS-Patienten und AML-Patienten mit bis zu 30% Blasten im Knochenmark zugelassen, die nicht für eine allogene Blutstammzelltransplantation in Frage kamen (26, 27). Im Rahmen dieses individuellen Heilversuches erreichte die

64-jährige Patientin, welche an einem Frührezidiv eines Hochrisiko-MDS litt und für die eine intensive Chemotherapie angesichts ihres Allgemeinzustandes nicht zugänglich war, bereits nach 2 Behandlungszyklen Azacitidine und einer Gabe von Spenderlymphozyten eine komplette Remission, die über 7 Monate anhielt. Dieser Verlauf legte nahe, dass die Substanz Azacitidine neben einer direkten antileukämischen Wirkung nach einer allogenen Blutstammzelltransplantation auch immunologische Effekte haben könnte, welche die erwünschte Wirkung der Spenderlymphozyten noch verstärken könnten.

Daher behandelten wir im Anschluss insgesamt 19 AML- und MDS-Patienten, die nach allogener Transplantation ein Rezidiv erlitten hatten, mit der Kombination aus Azacitidine und Spenderlymphozyten. Die Daten dieser Patienten wurden gemeinsam mit Daten von drei weiteren Patienten, die in den Unikliniken von Dresden und Hamburg ebenfalls mit dieser Kombination behandelt worden waren, retrospektiv ausgewertet (**Referenz Q**). Im Median erhielten die Patienten 2 Zyklen (Spanne: 1-8 Zyklen) Azacitidine (100 mg/m² pro Tag für 5 Tage) und 18 Patienten (82%) erhielten mindestens eine Spenderlymphozyteninfusion (Median: 2, Spanne: 1-5). Insgesamt sprachen 16 Patienten (72%) auf diese Therapie an. Fünf Patienten erreichten eine komplette Remission, 4 Patienten eine partielle Remission und 6 weitere Patienten zeigten eine Stabilisierung ihres Krankheitsverlaufes. Bei den 5 Patienten, die eine komplette Remission erreichten, hielt diese im Median für 433 Tage (Spanne: 114-769 Tage) an. Neben diesen vielversprechenden Ansprechraten war die Therapie gut verträglich und konnte diesen meist intensiv vorbehandelten Patienten in der Regel ambulant verabreicht werden. Die beobachteten Toxizitäten beschränkten sich auf Zytopenien infolge einer myelosuppressiven Wirkung von Azacitidine und die bereits vorbeschriebenen lokalen Reizungen an der Injektionsstelle. Auch die Rate an akuten und chronischen GvH-Reaktionen war mit 33% bzw. 18% verglichen mit historischen Kollektiven, die Spenderlymphozyten ohne Azacitidine erhalten hatten (149), gering. Ebenso war die Dauer bis zum Auftreten einer GvH-Reaktion (im Median 138 Tage nach der ersten Spenderlymphozyteninfusion) und die Anzahl der verabreichten Spenderlymphozyteninfusionen (Median: 3, Spanne 2-5) relativ lang bzw. hoch. Diese eher milden Verläufe der Abstoßungsreaktionen legten bereits zum damaligen Zeitpunkt den Schluss nahe, dass Azacitidine möglicherweise eine immunmodulierende Wirkung haben könnte. Als Resultat aus der beobachteten

Wirksamkeit bei einem erheblichen Anteil der Patienten und der gleichzeitig moderaten Toxizität dieser Kombination aus einem pharmakologischen und zellbasierten Therapieansatz war auch die Zwei-Jahresüberlebensrate von 23% (Abbildung 19) vielversprechend und zumindest vergleichbar mit den sonstigen in dieser Situation eingesetzten, oftmals deutlich nebenwirkungsreicheren Behandlungsformen wie Chemotherapie oder einer Zweittransplantation (147, 148).

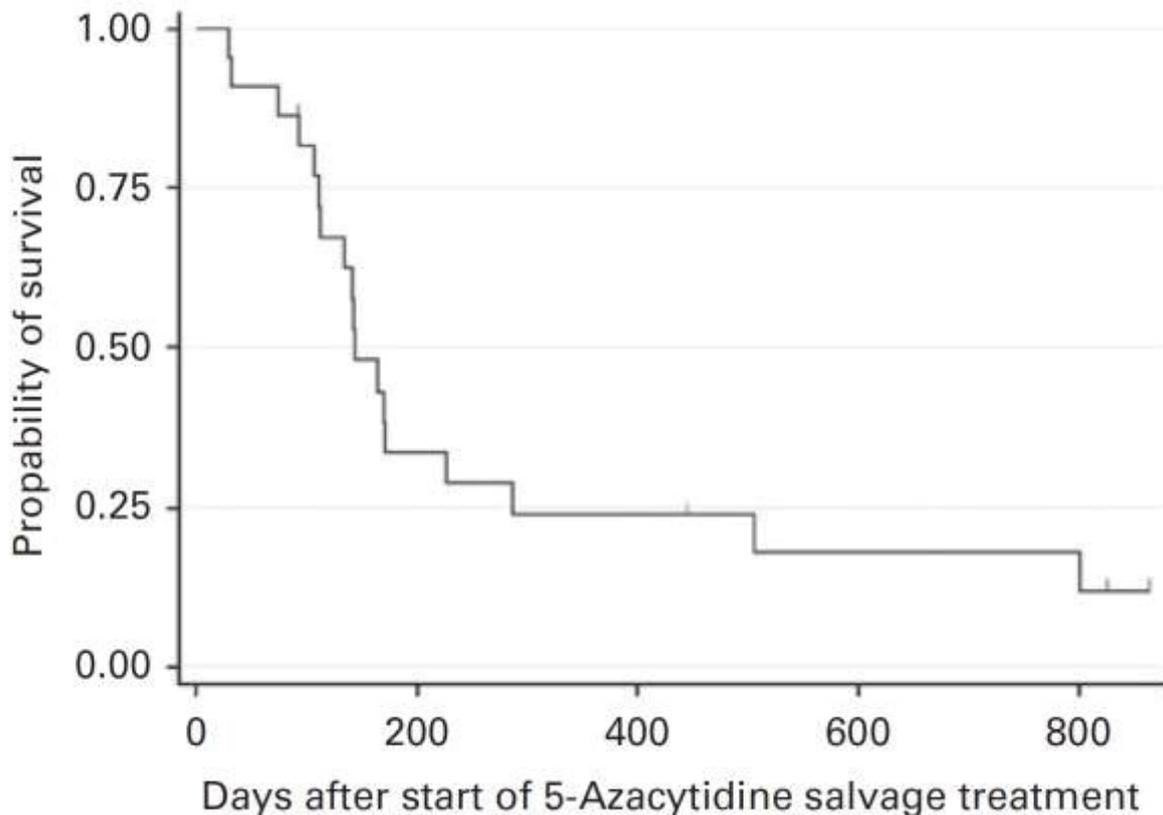


Abbildung 19: Retrospektive Auswertung der mit Azacitidine und DLI behandelten Patienten - Gesamtüberleben

Als Bestätigung für unsere Ergebnisse veröffentlichen parallel und in der Folgezeit anderer Gruppen größtenteils retrospektive Analysen und Fallberichte mit einer jeweiligen Rate an kompletten Remissionen zwischen 15% und 60% (111, 151-157).

Aufgrund dieser Daten initiierten wir eine einarmige, offene, multizentrische Phase-2-Studie (AZARELA-Studie, NCT-00795548), um die Effektivität und Sicherheit der Kombination aus Azacitidine und Spenderlymphozyten prospektiv zu evaluieren. Die Studie wurde unter unserer Federführung gemeinsam mit 5 weiteren deutschen Transplantationszentren (Hamburg, Frankfurt, Dresden, Berlin und Heidelberg)

zwischen 2009 und 2011 durchgeführt (**Referenz R**). Insgesamt wurden 30 Patienten, davon 28 mit einer AML und 2 mit einem MDS, die im Median 175 Tage (Spanne: 19-1688 Tage) nach einer allogenen Blutstammzelltransplantation ein hämatologisches Rezidiv erlitten hatten, mit der Kombination aus Azacitidine und Spenderlymphozyten behandelt. Für alle Patienten stellte diese Therapie die erste Salvagetherapie für das Rezidiv dar, was sich einem medianen Intervall von 9 Tagen (Spanne: 0-60 Tage) zwischen der Diagnose des Krankheitsrückfalls und dem Start der Therapie widerspiegelte.

Geplant war für jeden Patienten jeweils die Gabe von bis zu 6 Zyklen Azacitidine (100 mg/m² pro Tag für 5 Tage, alle 28 Tage) sowie drei Spenderlymphozytengaben mit aufsteigender Dosis CD3+ T-Zellen:

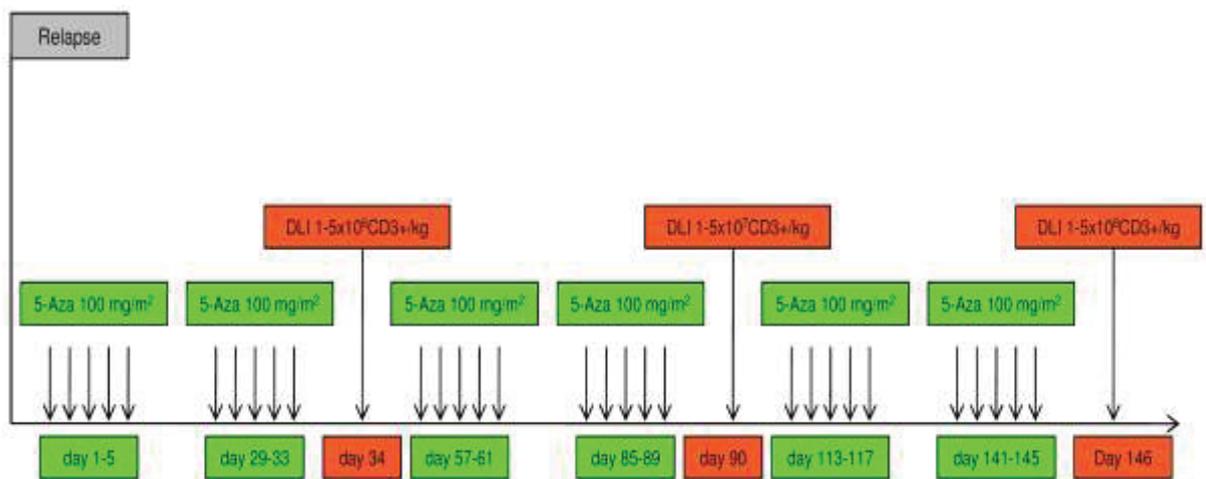


Abbildung 20: Therapieplan der AZARELA-Studie

Die Patienten erhielten im Median 3 Zyklen Azacitidine (Spanne: 1-8 Zyklen) und 73% der Patienten erhielten Spenderlymphozyten-Infusionen, wobei 12 Patienten eine Infusion, 3 Patienten 2 Infusionen, 5 Patienten 3 Infusionen und 2 Patienten sogar 4 Infusionen erhielten. Hierdurch ergab sich eine mediane Dosis CD3+ T-Zellen von 5x10⁶/kg KG pro Patient.

Mit dieser Therapie gelang es bei 7 Patienten (23%) eine komplette Remission inklusive Wiedererlangen eines 100%igen Donorchimärismus zu erzielen. Weitere 2 Patienten (7%) erreichten eine partielle Remission, so dass die Gesamtansprechrates 30% betrug. Bei 5 von 7 Patienten hielt die erreichte komplette Remission für im Median 777 Tage an (Spanne 461-888 Tage). Ein Patient verlor seine Remission nach 396 Tagen wieder, während der siebte Patient in Remission an den Folgen einer GvHD verstarb. Abgesehen von diesem Patienten war die Inzidenz und

Schwere an akuten und chronischen GvHD jedoch gering. Insgesamt entwickelten 37% eine akute GvHD, die in über der Hälfte der Patienten vom Schweregrad I oder II war und im Median nach 97 Tagen nach der ersten DLI auftrat. Eine chronische GvHD wiederum erlitten 5 Patienten (4 Fälle limited disease, 1 Fall extensive disease). Auch die anderen Nebenwirkungen waren für die Therapiesituation und das Patientenkollektiv erwartbar: Etwa bei zwei Drittel der Therapiezyklen entwickelten sich eine Grad III/IV Neutro- oder Thrombopenie, wobei bereits 50% der Patienten zum Studieneinschluss eine Grad III/IV Neutro- oder Thrombopenie infolge der Grunderkrankung aufwiesen. Daher waren auch neben meist leichten Hautirritationen und gastrointestinalen Beschwerden zytopeniebedingte Komplikationen wie Blutungen und Infektion die häufigsten schwerwiegenderen Nebenwirkungen. Als Folge dieser eher günstigen Nutzen-Risiko-Balance zeigte sich ein medianes Gesamtüberleben von 117 Tagen, wobei das mediane Gesamtüberleben für Patienten, die eine CR erreichten, bisher nicht erreicht wurde.

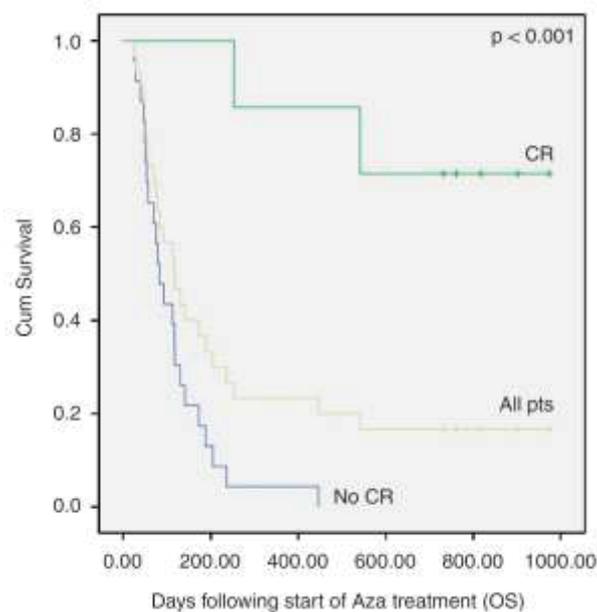


Abbildung 21: Gesamtüberleben der Patienten in der AZARELA-Studie gemäß dem Therapieansprechen

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die Kombination bei etwa einem Viertel der Patienten zu einer dauerhaften Remission führen kann. Gleichzeitig erscheint die Kombination aus einer pharmakologischen und zellbasierten Therapieform gut verträglich zu sein, da die Inzidenz und Schwere von Nebenwirkungen und der GvHD im Vergleich zu den sonst üblichen Therapien wie

Zweittransplantation oder konventioneller Chemotherapie und Spenderlymphozyten gering waren (148, 149).

Als Folge der eher limitierten Patientenzahl war es in dieser prospektive Studie nicht möglich, Prädiktoren für Ansprechen und das Gesamtüberleben zu identifizieren. Für diesen Zweck führten wir daher eine retrospektive Analyse innerhalb der Deutschen Kooperativen Transplantationsstudiengruppe durch (**Referenz S**).

Hierfür kombinierten wir die Daten der 61 in unserer Klinik behandelten Patienten mit denen der 30 Patienten in der prospektiven Studie sowie von 63 Patienten, die in 11 weiteren deutschen Transplantationszentren mit der Kombination aus Azacitidine und Spenderlymphozyten behandelt worden waren. Die Daten der letztgenannten Gruppe wurden mittels des EBMT-Med-A-Bogens sowie einem speziell von uns für diese Studie entworfenen Fragebogen erhoben. Der Großteil der Patienten (81%) litt an einem Rückfall einer AML, während die anderen Patienten (19%) an einem Rückfall eines MDS oder MPS litt. Meist handelte es sich um ein hämatologisches Rezidiv (88%) inklusive 6 Patienten mit extramedullärem Rezidiv, während bei 19 Patienten der Krankheitsrückfall nach der allogenen Transplantation frühzeitig auf molekularem Niveau entdeckt wurde. Für 93% der Patienten stellte die Kombination aus Azacitidine und Spenderlymphozyten die erste Therapie des Rezidives dar. Im Gegensatz hierzu hatten 7% der Patienten bereits eine andere Therapie wie Chemotherapie oder auch Spenderlymphozyten erhalten.

Ähnlich wie in der prospektiven Studie erhielten die Patienten in der retrospektiven Studie im Median 4 Zyklen Azacitidine (Spannbreite: 1 bis 14 Zyklen). Circa zwei Drittel der Patienten (68%) erhielten Spenderlymphozyten, wobei die mediane Anzahl an Infusionen pro Patient 2 (Spannbreite 1 bis 7 Gaben) betrug. Die Gesamtansprechrates von 33% mit 27% kompletter und 6% partieller Remission war vergleichbar mit den Resultaten der prospektiven Studie. Dies traf auch auf die Inzidenz und Schweregrade der akuten und chronischen GvHD (akute GvHD: 23%; chronische GvHD: 27%) zu.

Als Folge dessen betrug die 2-Jahresüberlebensrate aller in der Studie inkludierten Patienten 29% \pm 4%. In uni- und multivariaten Analysen gelang es uns, das Vorliegen eines molekularen Rezidivs sowie die Diagnose eines MDS als signifikante Prädiktoren für das Erreichen einer kompletten Remission herauszuarbeiten (Tabelle 5). Für das Gesamtüberleben wiederum identifizierten wir neben den bereits genannten beiden auch einen Blastengehalt von weniger als 13% (Median der

Gesamtgruppe) als signifikanten Prädiktor. Dies demonstriert eine klare Korrelation zwischen Krankheitslast zu Beginn der Therapie und Ansprechen, wobei unter Umständen sich hinter diesen Daten auch eine langsamere Krankheitsdynamik verbirgt.

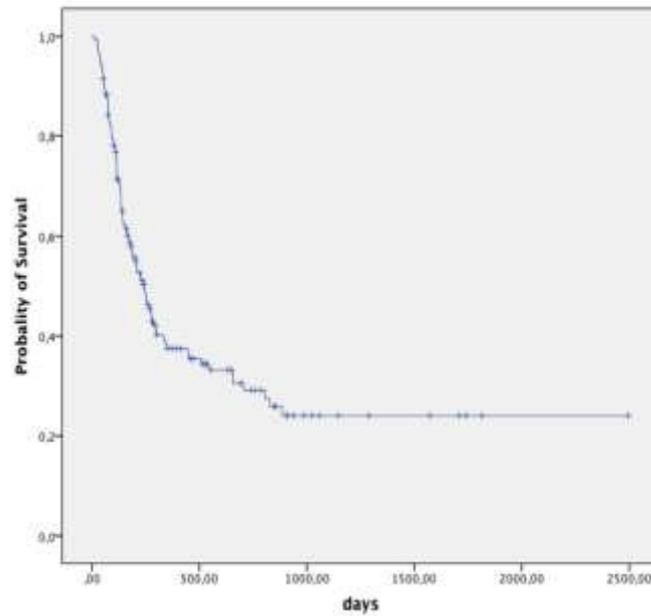


Abbildung 22: Gesamtüberleben der 154 mit Azacitidine und DLI behandelten Patienten in der retrospektiven Analyse

Predictive Factors for CR in Patients Treated with Aza and DLI

Variable	First-Line Aza (n = 143)		All Patients (n = 154)		
	CR Rate %	P Univariate	CR Rate %	P Univariate	P Multivariate
Time from first transplantation to relapse					
<185 d (median)	22	.2604	22	.2739	ND
>185 d	31		31		
Type of relapse					
Hematological	21	<.0001	21	<.0001	.004
Molecular	72		68		
Diagnosis					
MDS	42	.0894	41	.0702	.011
AML or MPS	23		23		
Karyotype					
Normal	26	.8498	25	.7189	ND
Abnormal	29		28		
Karyotype					
Noncomplex	24	.6728	24	.8371	ND
Complex	29		28		
Karyotype					
Nonmonosomal	27	.2615	26	.4589	ND
Monosomal	44		40		
Molecular/genetic risk [†]					
Low/intermediate	30	.5569	29	.5700	ND
High	24		24		
BM blasts at relapse					
<13% (median)	44	.0004	45	.0002	.099
>13%	15		15		
PB blasts at relapse					
Present	17	.0074	16	.0049	.380
Absent	42		41		
WBC at relapse					
<1 × 10 ⁹ /L	29	.7279	31	1.000	ND
>1 × 10 ⁹ /L	18		28		
WBC at relapse					
<3.5 × 10 ⁹ /L (median)	25	.4429	26	.7090	ND
>3.5 × 10 ⁹ /L	32		30		

ND indicates not done.

Complex karyotype was defined as ≥3 abnormalities. Monosomal karyotype was defined as ≥2 autosomal monosomies or 1 single autosomal monosomy in combination with at least 1 structural abnormality. Results from univariate analyses are shown for all patients (n = 154) as well as for those patients treated with Aza as first-line therapy (n = 143). Factors influencing response in univariate analysis with a P value <.10 were included into multivariate analysis. For variables associated with achievement of CR, a multinomial logistic regression analysis was performed. Based on the availability of requested parameters, 131 patients (72%) could be included into the calculation.

[†] Defined by [22].

[†] Defined by [18,20].

Risk Factor Analysis for Outcome in Patients Treated with Aza and DLI

Variable	First-Line Aza (n = 143)		All Patients (n = 154)		
	OS at 2 Years after Treatment Start %	P Univariate	OS at 2 Years after Treatment Start %	P Univariate	P Multivariate
Time from first transplantation to relapse					
<185 d (median)	20.4 ± 5	.005	19.4 ± 5	.001	.237
>185 d	36.8 ± 7		38.6 ± 7		
Type of relapse					
Hematological	23.9 ± 4	.001	24.8 ± 4	.003	.007
Molecular	65.4 ± 15		61.7 ± 15		
Diagnosis					
MDS	66.3 ± 10	.001	66.0 ± 16	.004	.002
AML or MPS	24.7 ± 5		23.5 ± 5		
Karyotype					
Normal	33.7 ± 7	.325	34.6 ± 7	.197	ND
Abnormal	25.9 ± 6		25.9 ± 6		
Karyotype					
Noncomplex	33.7 ± 6	.072	33.7 ± 6	.010	.09
Complex	14.7 ± 6		15.9 ± 7		
Karyotype					
Nonmonosomal	28.3 ± 5	.811	28.9 ± 5	.871	ND
Monosomal	40 ± 17		36 ± 16		
Molecular/genetic risk [†]					
Low/intermediate	35.2 ± 6	.033	35.2 ± 6	.030	.801
High	18.9 ± 6		19.9 ± 7		
BM blasts at relapse					
<13% (median)	46.3 ± 8	<.0001	46.6 ± 8	<.0001	.021
>13%	20.9 ± 6		22.6 ± 6		
PB blasts at relapse					
Present	23.3 ± 7	.028	21.9 ± 7	.018	.788
Absent	37.5 ± 7		37.3 ± 7		
WBC at relapse					
<10 × 10 ⁹ /L	30.4 ± 5	.054	28.8 ± 5	.259	ND
>10 × 10 ⁹ /L	10 ± 10		15.6 ± 13		
WBC at relapse					
<3.5 × 10 ⁹ /L (median)	29.9 ± 6	.215	28.3 ± 6	.406	ND
>3.5 × 10 ⁹ /L	27.3 ± 6		29.1 ± 6		

Complex karyotype was defined as ≥3 abnormalities. Monosomal karyotype was defined as ≥2 autosomal monosomies or 1 single autosomal monosomy in combination with at least 1 structural abnormality. Results from univariate analyses are shown for all patients (n = 154) as well as for those patients treated with Aza as first-line therapy (n = 143). Factors influencing outcome in univariate analysis with a P value <.10 were included into multivariate analysis. For overall survival, a Cox regression model was used with a stepwise backward procedure deleting factors in the final model above the cut-off significance level of .05. Based on the availability of requested parameters 109 patients (71%) could be included into the calculation.

[†] Defined by [22].

[†] Defined by [18,20].

Tabelle 5: Prädiktoren für Ansprechen und Gesamtüberleben nach einer Therapie mit Azacitidine und DLI

Insgesamt etablieren diese Daten die Kombination aus Azacitidine und Spenderlymphozyten als relevante Therapiealternative für Patienten mit Rezidiv nach allogener Blutstammzelltransplantation. Dabei sprechen vor allem MDS-Patienten und diejenigen Patienten an, die frühzeitig möglichst noch im molekularen Rezidiv behandelt werden. Diese Ergebnisse haben zu einer Änderung unseres Therapiealgorithmus geführt: Neben der Etablierung von Azacitidine als erste Therapielinie für die meisten Patienten mit hämatologischem Rezidiv versuchen wir durch ein engmaschiges MRD-Monitoring mittels WT1 oder anderer krankheitsspezifischer Marker das Rezidiv bereits auf molekularem Niveau zu detektieren und dann präemptiv zu behandeln.

Wirkprinzipien einer Therapie mit Azacitidine und Spenderlymphozyten

Nachdem wir in den prospektiven und retrospektiven Analysen den klinischen Benefit der Kombinationstherapie aus Azacitidine und Spenderlymphozyten zeigen konnten, stellte sich die Frage nach den Mechanismen der antileukämischen Wirkung. Zum einen vermuteten wir neben einem direkten zytotoxischen Effekt des Azacitidine auf AML- und MDS-Progenitoren einen immunogenen Effekt. Dabei fokussierten wir unsere Untersuchungen aus folgenden Gründen auf sog. Cancer testis Antigene (CTA):

1. CTA sind eine Gruppe von Proteinen, die eine hohe natürliche Immunogenität aufweisen und physiologischerseits nur in wenigen menschlichen Geweben wie dem Namen entsprechend im Hodengewebe exprimiert werden (158).
2. Darüber hinaus werden sie auf zahlreichen soliden und hämatologischen Neoplasien exprimiert. Bei der AML war dies bisher jedoch nicht umfassend untersucht worden (159).
3. Die Expression der CTA ist epigenetisch über DNA-Methylierung reguliert und kann möglicherweise durch DNA-Methyltransferaseninhibitoren wie Azacitidine oder Decitabine therapeutisch moduliert werden (160-162).

Aus diesem Grunde haben wir zunächst die steady-state Expression von insgesamt 20 CTA, die physiologischerweise auf keinem anderem Gewebe außer dem Hodengewebe exprimiert werden, in 10 verschiedenen AML-Zelllinien aller FAB-Subkategorien (GF-D8, HL-60, KASUMI-1, MUTZ-2, MUTZ-3, ML-2, MONO-MAC-1,

MV4-11, SKM-1, OCI-M1) mittels RT-PCR untersucht (**Referenz T**). Es zeigte sich, dass unter 6 CTA, die in mindestens einer Zelllinie exprimiert wurden, lediglich das CTA PRAME eine weitverteilte Expression (>2 Zelllinien) nämlich 9 von 10 der untersuchten Zelllinien aufwies. Anschließend haben wir diese 6 in den Zelllinien exprimierten CTA auch in Blut- oder Knochenmarkproben von 64 AML-Patienten untersucht. Korrelierend mit den Daten der Zelllinien zeigte sich, dass PRAME bei 34 Patienten (53%) exprimiert wird, wohingegen die anderen CTA (MAGE-A3, SPO11, ROPN1, SCP-1 und SLLP1) gar nicht oder nur bei wenigen Patienten exprimiert werden. Bei Hinzunahme der klinischen Parameter zeigte sich, dass die Expression von PRAME positiv mit dem Vorliegen einer prognostisch günstigen Zytogenetik korreliert. Aufgrund der epigenetischen Regulation der CTA-Expression über DNA-Methylierung untersuchten wir als nächstes in vitro die Expression der CTA in den Zelllinien nach Kultivierung mit dem DNA-Methyltransferaseinhibitor Decitabine (DAC, 1 μ M) und/oder dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (5 μ M). Hierbei zeigte sich, dass es durch die Therapie mit DAC, nicht aber mit dem HDAC-Inhibitor zu einer gesteigerten Expression von bereits partiell exprimierten CTA und darüber hinaus auch zur erstmaligen Expression bisher nicht exprimierter CTA kommt. Unter den letztgenannten fiel besonders SSX-2 auf, welches vor der DAC-Kultivierung in keiner Zelllinie, nach DAC-Gabe aber in 8 von 10 Zelllinien exprimiert wurde. Dieser Effekt der Demethylierung bestätigte sich auch in vivo, als wir die Expression von SSX-2 in 8 Patienten untersuchten, die im Rahmen der Azarela-Studie mit Azacitidine behandelt wurden (Abbildung 23).

Es zeigte sich 5 bis 8 Tage nach Beginn der Azacitidine-Behandlung eine relevante de novo Induktion der SSX-2 Expression bei der Mehrzahl der Patienten sowie eine Steigerung der Expression des bereits bei 7 von 8 Patienten exprimierten PRAME.

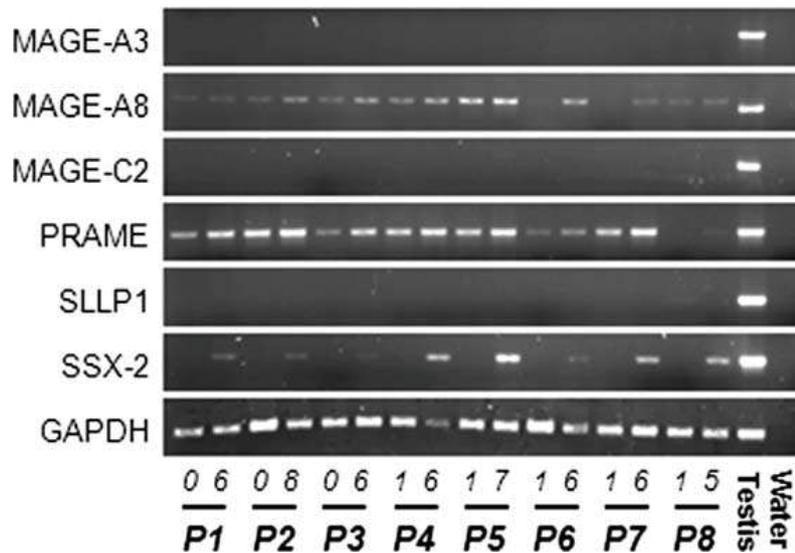


Abbildung 23: mRNA-Expression von 6 Cancer Testis Antigenen bei 8 AML-Patienten (P1-8) während einer Therapie mit Azacitidine. Die Zahlen geben jeweils den Tag nach Beginn der Azacitidine-Therapie an. GAPDH wurde als Housekeeping-Gen eingesetzt.

Diese Ergebnisse lassen folgende Rückschlüsse zu: Erstens legen sie nahe, dass die durch demethylierende Substanzen induzierte Expression von CTA möglicherweise zu einer besseren Erkennbarkeit der Leukämiezellen durch das Immunsystem führt. Diese Theorie wird unterstützt durch Publikationen, in welchen ein Anstieg der zytotoxischen T-Zell-Aktivität (160) sowie ein Anstieg der CTA-spezifischen T-Zellen in Patienten nach Therapie mit demethylierenden Substanzen beschrieben wurden (163). Zweitens lassen sie vermuten, dass das konstitutiv exprimierte PRAME ein präferenziell geeignetes Ziel für Immuntherapien bei der AML ist, und dass demethylierende Substanzen möglicherweise, wie hier anhand SSX-2 gezeigt, die Expression weiterer Angriffspunkte für das Immunsystem induzieren.

Neben der antileukämischen Wirkung war in der prospektiven Studie wie auch in den retrospektiven Analysen besonders auffällig, dass trotz des regelmäßigen Einsatzes von Spenderlymphozyten im Vergleich zu historischen Kollektiven nur eine geringe Inzidenz und Schwere von akuten und chronischen GvHD auftrat (149). Da bereits im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass Azacitidine über eine gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 zu einer Expansion CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺

Foxp3+ regulatorischer T-Zellen führt (164, 165), untersuchten wir diese Zellen sowie weitere Lymphozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie während einer Therapie mit Azacitidine (**Referenz U**). Hierzu haben wir peripheres Blut von 13 Patienten mit einem Rezidiv nach allogener Blutstammzelltransplantation (8 AML, 5 MDS) vor Beginn der Azacitidine-Therapie (Tag 0) sowie an Tag 6 (Zyklus 1), Tag 34 (Zyklus 2), Tag 90 (Zyklus 4) und Tag 146 (Zyklus 6) untersucht. Es zeigte sich, wenn man die Patienten anhand des medianen Intervalls von Transplantation bis zum Rezidiv (446 Tage) dichotomisiert, dass Azacitidine bei Patienten mit frühem Rezidiv zu einem 3,2-fachen Anstieg ($p=0.0479$) der absoluten Zahl und zu einem 1,9-fachen Anstieg ($p=0.06$) der Frequenz regulatorischer T-Zellen führt. Bei Patienten mit späterem Rezidiv (>446 Tage) fand sich hingegen kein Effekt von Azacitidine auf die Zahl und Frequenz der regulatorischen T-Zellen. Auch auf andere Lymphozytensubpopulationen fand sich in der gesamten Untersuchungsgruppe kein Effekt.

Der zeitabhängige Effekt auf die regulatorischen T-Zellen früh nach der Transplantation ist in Einklang mit Daten einer anderen Studie, die bei Patienten während einer Azacitidine-Erhaltungstherapie zeigen konnte, dass es insbesondere in den ersten 3 Monaten nach Beginn der Therapie zu einem Anstieg der T-Zellen kommt (166). Korrelierend mit dem Effekt auf die regulatorischen T-Zellen zeigte sich bei den von uns untersuchten Patienten nur eine meist milde Ausprägung der akuten GvHD (Inzidenz 38%) und chronischen GvHD (Inzidenz 46%). Dabei entwickelten die Patienten, die früh rezidierten und daher einen Anstieg der regulatorischen T-Zellen hatten, nur in 8% der Fälle eine GvHD, wohingegen 30% Patienten mit spätem Rezidiv und fehlendem Anstieg der regulatorischen T-Zellen eine GvHD entwickelten.

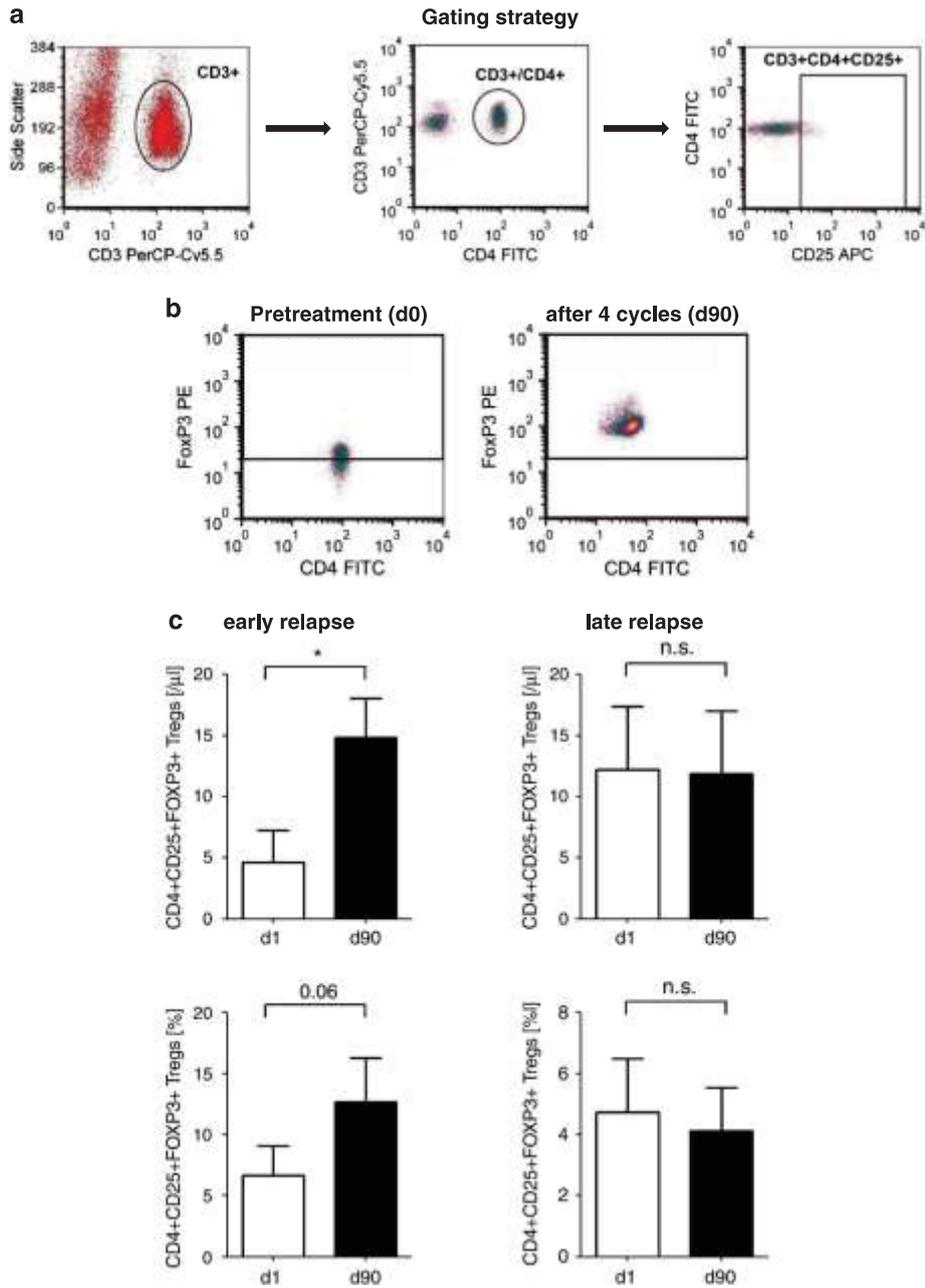


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Messung der regulatorischen T-Zellen (CD3+/CD4+/CD25+/FoxP3+) bei Patienten mit MDS- oder AML-Rezidiv nach allogener Transplantation während einer Therapie mit Azacitidine

Diese Resultate legen nahe, dass eine Azacitidine-vermittelte Expansion regulatorischer T-Zellen im Menschen für die geringe Rate und Schwere der GvHD nach der Spenderlymphozytengabe verantwortlich sein könnte. Da innerhalb der regulatorischen T-Zellen funktionelle Subgruppen existieren und Azacitidine neben der Zahl auch die Funktionalität der regulatorischen T-Zellen beeinflussen kann

(167), wird es weiterer Studien bedürfen, um die immunologischen Wirkmechanismen des Azacitidine vollständig zu verstehen.

Zielgerichtete Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Behandlung des AML-Rezidivs nach allogener Blutstammzelltransplantation

In unseren Analysen erreichten Patienten mit AML-Rezidiv nach einer Therapie mit Azacitidine und Spenderlymphozyten nur in einem Viertel der Fälle eine erneute Remission. Aufgrund dessen war die 2-Jahresüberlebensrate mit 26% auch deutlich geringer als bei Patienten mit MDS (168, 169). Daher bestand die Hoffnung, durch ein besseres Verständnis der molekularen Pathogenese der AML infolge der Hochdurchsatzsequenzierungstechnik auch nach der allogenen Transplantation eine möglichst zielgerichtete Rezidiv- und Erhaltungstherapie einzusetzen.

Wie schon bei den Patienten mit FLT3-Mutationen vor einer allogenen Transplantation, setzten wir daher Sorafenib bei insgesamt 8 Patienten mit FLT3-Mutation (7 ITD-, 1-TKD-Mutation) zur Behandlung des Rezidives nach allogener Blutstammzelltransplantation ein (**Referenz M**). Alle Patienten erhielten Sorafenib als Monotherapie und bereits zuvor war die Immunsuppression, soweit noch bestehend, abgesetzt worden. Drei Patienten hatten vor Sorafenib zur Zytoreduktion AraC erhalten, 3 weitere Patienten hatten kein Ansprechen auf die Kombination von Azacitidine und Spenderlymphozyten gezeigt. Trotz dieses eher ungünstigen Risikoprofils, das sich auch in dem kurzen Intervall von im Median 77 Tagen zwischen Transplantation und Rezidiv widerspiegelte, erreichten 3 der Patienten eine komplette Remission. Zwei verstarben infolge eines erneuten Progresses nach 164 bzw. 594 Tagen, während die andere Patientin über 4 Jahre nach Beginn der Sorafenib-Therapie ohne antileukämische Therapie krankheitsfrei ist. Vier weitere Patienten erreichten ein passageres hämatologisches Ansprechen, verstarben jedoch ebenso infolge der AML wie auch 2 weitere Patienten, die kein Ansprechen auf die Sorafenib-Therapie zeigten.

Insbesondere die drei Patienten, die eine komplette Remission erreichten, deuteten an, dass eine Sorafenib-Monotherapie zumindest passager effektiv sein kann. Die geringe Fallzahl und die Heterogenität der Patienten ließen jedoch keine finalen Schlussfolgerungen zu. Aufgrund dessen haben wir analog zu der Betrachtung der

Sorafenib-Therapie vor allogener Transplantation an einer multizentrischen retrospektiven Analyse teilgenommen (**Referenz N**). Insgesamt konnten 29 Patienten identifiziert werden, die aufgrund eines Rezidives nach der allogenen Blutstammzelltransplantation mit Sorafenib als Monotherapie (mediane Tagesdosis 600 mg) für im Median 76 Tage (Spanne: 14 bis 904 Tage) behandelt wurden. Mit dieser Behandlung konnte bei 14 der 29 Patienten (48%) eine komplette Remission erreicht werden, wobei bei der Hälfte der Patienten sogar die FLT3-Mutation molekular nicht mehr nachweisbar war. Etwas mehr als ein Drittel der Patienten (38%) verlor das Ansprechen jedoch wieder im Median 197 Tagen (Spannbreite: 38 bis 225 Tage) nach Therapiebeginn. Verglichen mit den Patienten, die Sorafenib vor einer allogenen Transplantation erhielten, waren die Inzidenz und das Intervall bis zur sekundären Resistenz signifikant geringer bzw. länger. Daher suggerieren diese Daten, dass Sorafenib gerade in der Phase nach einer allogenen Transplantation synergistisch mit immunologischen Effekten wirken könnte, ohne dass wir eine gesteigerte Inzidenz einer GvHD beobachteten. Basierend auf diesen retrospektiven Daten haben die Kollegen der Uniklinik in Marburg eine prospektive Studie (SORMAIN, Eudra-CT: 2010-018539-16) initiiert, in welcher Sorafenib als Erhaltungstherapie nach allogener Blutstammzelltransplantation bei AML-Patienten mit FLT3-Mutation placebo-kontrolliert untersucht wird.

Darüber hinaus wecken diese Daten die Hoffnung, dass basierend auf dem besseren molekularen Verständnis für molekulare Subgruppen der AML-Patienten in Zukunft neue zielgerichtete Medikamente wie zum Beispiel auch die IDH-Inhibitoren (170) zur Verfügung stehen könnten.

Schlussfolgerung und Ausblick

Unsere zusammengefassten Arbeiten haben in den vergangenen Jahren zu einem besseren Verständnis der Pathogenese sowie zu neuen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten bei den MDS und AML beigetragen.

In Einklang mit Arbeiten anderer Forschungsgruppen erbrachten unsere Resultate die Erkenntnis, dass MSC wesentlich an der Entstehung der hämatopoietischen Insuffizienz bei MDS, AML aber auch beim Myelom beteiligt sind. Die Tatsache, dass bei verschiedenen Entitäten ähnliche Veränderungen der MSC vorliegen, lässt den Schluss zu, dass der hämatopoietischen Insuffizienz möglicherweise krankheitsüberlappend gemeinsame Mechanismen zugrunde liegen. Dieser Hypothese folgen wir aktuell in einem Anschlussprojekt, in welchem wir in Kooperation mit Herrn Prof. Frank Lyko vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg vergleichend das Methylom und Transcriptom von MSC bei verschiedenen Entitäten betrachten. Ungeklärt ist bisher auch die Frage, ob es sich bei den aufgedeckten Veränderungen um intrinsische Defekte der MSC oder eher eine Reaktion auf den expandierenden malignen Zellklon handelt. Während Mausexperimente einen primären Defekt der MSC als Ursache denkbar erscheinen ließen (91, 92), legen unsere Ergebnisse und die anderer Arbeitsgruppen nahe, dass es sich um ein sekundär-reaktives Geschehen handelt (171). Letztgenannter Hypothese werden wir nun in einem von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projekt (Projekt-Nr. SCHR 1470/1-1) nachgehen, in welchem wir den Einfluss von MDS-Zellen auf die Stromafunktion untersuchen. Ziel solcher Untersuchungen bezüglich der Interaktionen zwischen malignem Zellklon und Stroma ist es, kurz- oder mittelfristig neue Therapieansätze zu finden, die einerseits zur Eradikation des malignen Zellklons, andererseits zur Verbesserung der Hämatopoiese beitragen können. Als ein erstes vielversprechendes Beispiel seien in diesem Zusammenhang die klinischen Studien mit den ‚TGF-beta-Ligand traps‘ genannt. (95-97).

Bereits im klinischen Alltag genutzt wird die mit Hilfe neuer Sequenzierungstechniken immer genauer werdende molekulare Charakterisierung der MDS und AML. Ähnlich wie in unseren Arbeiten bezüglich MN1, Calreticulin und SETBP1 gezeigt, erlauben z. B. molekulare Marker wie TP53, EZH2 oder ASXL1 bei den MDS (172) sowie FLT3-ITD- und NPM1-Mutationen bei den AML (133) eine

Risikostratifikation vorzunehmen und auf dieser Basis individuelle Therapieentscheidungen für den jeweiligen Patienten zu fällen. Auch der Verlauf der minimalen Resterkrankung (MRD) wird sich in Zukunft mittels der individuellen molekularen Marker, wie von uns am Beispiel des WT1 gezeigt, auf submikroskopischem Niveau besser überwachen lassen. Dies wiederum bietet die Chance für frühzeitigere therapeutische Interventionen, um verbliebene Leukämie- oder MDS-Zellen zu eliminieren und ein hämatologisches Rezidiv zu vermeiden. Um diese diagnostischen Möglichkeiten in Kenntnis des sich stetig im Wandel befindlichen Wissens und ökonomisch darstellbar möglichst vielen Patienten mit myeloischen Neoplasien anbieten zu können, etablieren wir aktuell im Verbund mit anderen Universitätskliniken eine NGS-basierte Genpanel-Plattform. Um darüber hinaus das wünschenswerte Ziel einer personalisierten Therapie für jeden AML- und MDS-Patienten zu erreichen, wird es aber neben diesen diagnostischen Fortschritten auch der Entwicklung von neuen zielgerichteten Medikamenten bedürfen. Als eines der ersten solcher Medikamente werden aktuell Isocitratdehydrogenase-Inhibitoren bei AML- und MDS-Patienten mit IDH-Mutation getestet (170).

Bis zur Verfügbarkeit solcher zielgerichteter Medikamente verbleibt die allogene Blutstammzelltransplantation die Therapieform mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für langfristige Krankheitsfreiheit (34, 43). Dabei konnte die therapie-assoziierte Mortalität kontinuierlich gesenkt werden (32), so dass hier nur noch begrenzt Spielraum für Optimierungen sein dürfte. Wahrscheinlich können die weitreichendsten Verbesserungen in der Phase nach der Transplantation durch genaueres MRD-Monitoring und neue Therapien zur Vermeidung oder Behandlung eines Rezidives erreicht werden. So konnten wir mit dem WT1 einen Marker in unserem Nachsorge-Algorithmus etablieren, der im peripheren Blut messbar ist und bei den meisten AML-Patienten und vielen MDS-Patienten mit einer hohen Sensitivität und Spezifität eingesetzt werden kann. Hierdurch werden wir in Zukunft Rezidive früher erkennen und behandeln können. Dabei konnten wir durch unseren Arbeiten federführend mitwirken, dass Azacitidine in Kombination mit Spenderlymphozyten aufgrund seiner Wirksamkeit und guten Verträglichkeit eine relevante Therapiealternative darstellt und regelmäßig im unserem klinischen Alltag eingesetzt wird. Mit dem Ziel, die Ansprechraten und Überlebenschancen unserer Patienten weiter zu verbessern, haben wir nun an unserer Klinik sowie an 5 weiteren deutschen Kliniken die AZALENA-Studie initiiert, in welcher wir durch die

zusätzliche Gabe von Lenalidomid die Alloimmunreaktion noch weiter verstärken wollen (Abbildung 25).

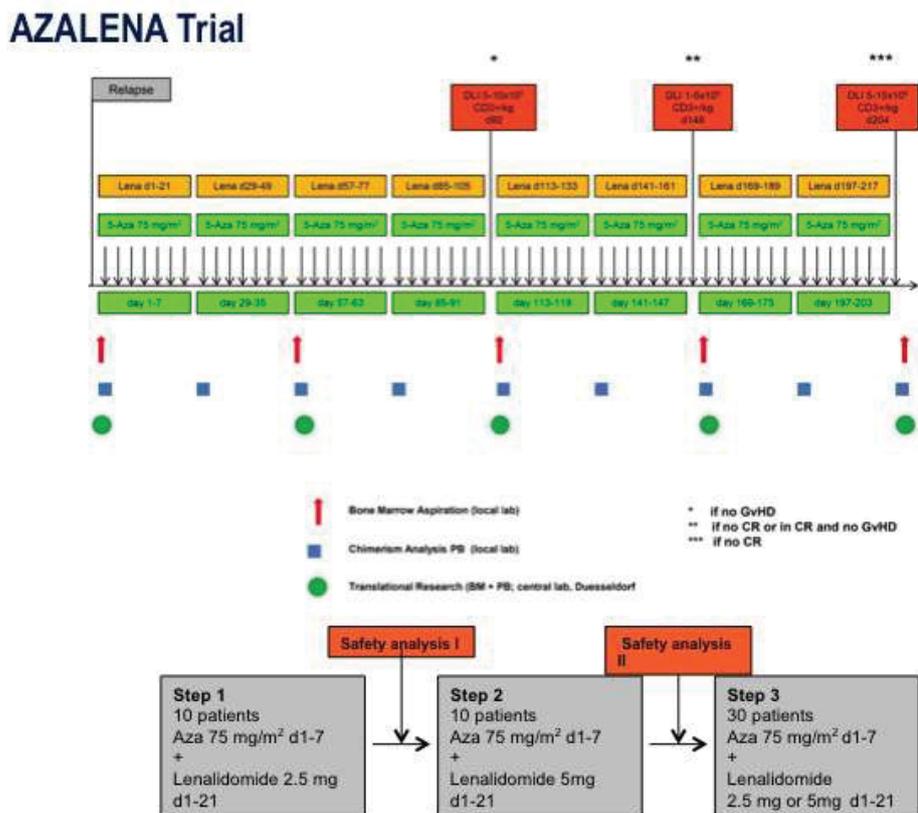


Abbildung 25: Studienkonzept der Düsseldorfer AZALENA-Studie

Eine weitere Option, das Rückfallrisiko nach einer allogenen Transplantation zu verringern und so die Überlebenswahrscheinlichkeit zu steigern, ist eine Konsolidations- oder Erhaltungstherapie. In diesem Kontext werden aktuell vor allem die hypomethylierenden Substanzen Azacitidine und Decitabine sowie der Histondeacetylase-Inhibitor Panobinostat in klinischen Studien untersucht. Darüber hinaus sind als vielversprechendste Ansätze für unsere Patienten die CAR-T-Zell-Technologie sowie die Immuncheckpoint-Blockade zu nennen. Ziel dieser Therapieformen ist eine aktive Manipulation der körpereigenen Immunabwehr, um diese zum immunologischen Angriff auf das Malignom zu bringen. Trotz all dieser jüngsten Fortschritte bleibt es jedoch noch ein langer, arbeitsamer Weg, um den

meisten Patienten mit myeloischen Neoplasien durch eine möglichst personalisierte Therapie langfristig helfen zu können.

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozytenleukämie
ATG	Antithymozytenglobulin
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CFU-F	Colony Forming Unit-Fibroblast
CpG	Cytosine pre Guanine
CPD	Cumulative Population Doubling
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CR	Complete Remission
CTA	Cancer Testis Antigen
DAC	Decitabine
DACH	Deutsch-Österreichisch-Schweizerisch
DLI	Donor Lymphocyte Infusion
DNA	Desxoyribonukleinsäure
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ET	Essenzielle Thrombozythämie
FACS	Fluorescence-associated Cell Sorting
FISH	Fluorescence in-situ Hybridization
FLAMSA	Fludarabin, Amsacrin und AraC
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor
GvL	Graft versus Leukemia
GvHD	Graft versus Host Disease
HSPZ	Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen
HUMARA	Human Androgen Receptor
ICUS	Idiopathic Cytopenia of Unkown Significance
IDH	Isocitrat Dehydrogenase
IPSS	International Prognostic Scoring System
IPSS-R	International Prognostic Scoring System - revised
ITD	Internal Tandem Duplication
LDH	Lactatdehydrogenase
LTC-IC	Long-term culture initiating cell
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MMF	Mycophenolat Mofetil
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MRD	Minimal Residual Disease
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stromazellen
NGS	Next Generation Sequencing
NRM	Non-relapse Mortality
PMF	Primäre Myelofibrose
RA	Refractory Anemia

RAEB	Refractory Anemia with Excess Blasts
RCMD	Refractor Anemia with Multilineage Dysplasia
RIC	reduced intensity conditioning
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase Chain Reaction
TGF	Transforming Growth Factor
TKD	Tyrosine Kinase Domain
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
WT1	Wilms' Tumor 1 Gen

Zusammengefasste Publikationen

- A **Schroeder T**, Hildebrandt B, Mayatepek E, Germing U, Haas R. A patient with glycogen storage disease type Ib presenting with acute myeloid leukemia (33) bearing monosomy 7 and translocation t(3;8)(q26;q24) after 14 years of treatment with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): a case report. *J Med Case Rep*. 2008 Sep 30;2:319.
- B **Schroeder T**, Kuendgen A, Kayser S, Kröger N, Bräulke F, Platzbecker U, Klärner V, Zohren F, Haase D, Stadler M, Schlenk R, Czibere AG, Bruns I, Fenk R, Gattermann N, Haas R, Kobbe G, Germing U. Therapy-related myeloid neoplasms following treatment with radioiodine. *Haematologica*. 2012 Feb;97(2):206-12.
- C Fenk R, Neubauer F, Bruns I, **Schroeder T**, Germing U, Haas R, Kobbe G. Secondary primary malignancies in patients with multiple myeloma treated with high-dose chemotherapy and autologous blood stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2012 Mar;156(5):683-6.
- D Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. Geyh S, Oz S, Cadeddu RP, Fröbel J, Brückner B, Kündgen A, Fenk R, Bruns I, Zilkens C, Hermsen D, Gattermann N, Kobbe G, Germing U, Lyko F, Haas R, **Schroeder T**. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1841-51.

- E Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells. Bruns I, Cadeddu RP, Brueckmann I, Fröbel J, Geyh S, Büst S, Fischer JC, Roels F, Wilk CM, Schildberg FA, Hünerlitürkoglu AN, Zilkens C, Jäger M, Steidl U, Zohren F, Fenk R, Kobbe G, Brors B, Czibere A, **Schroeder T**, Trumpp A, Haas R. *Blood*. 2012 Sep 27;120(13):2620-30.
- F Distinguishing myelodysplastic syndromes (MDS) from idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS): HUMARA unravels clonality in a subgroup of patients. **Schroeder T**, Ruf L, Bernhardt A, Hildebrandt B, Aivado M, Aul C, Gattermann N, Haas R, Germing U. *Ann Oncol*. 2010 Nov;21(11):2267-71.
- G Meningioma 1 gene is differentially expressed in CD34 positive cells from bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes with the highest expression in refractory anemia with excess of blasts and secondary acute myeloid leukemia. **Schroeder T**, Czibere A, Zohren F, Aivado M, Gattermann N, Germing U, Haas R. *Leuk Lymphoma*. 2009 Jun;50(6):1043-6.
- H SETBP1 mutation analysis in 944 patients with MDS and AML. Thol F, Suchanek KJ, Koenecke C, Stadler M, Platzbecker U, Thiede C, **Schroeder T**, Kobbe G, Kade S, Löffeld P, Banihosseini S, Bug G, Ottmann O, Hofmann WK, Krauter J, Kröger N, Ganser A, Heuser M. *Leukemia*. 2013 Oct;27(10):2072-5.

- I Prognostic effect of calreticulin mutations in patients with myelofibrosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Panagiota V, Thol F, Markus B, Fehse B, Alchalby H, Badbaran A, Lehmann U, Koenecke C, Shahswar R, Chaturvedi A, Stadler M, Eder M, Göhring G, Koenigsmann M, Kloos A, Trummer A, **Schroeder T**, Kobbe G, Thiede C, Platzbecker U, Schlegelberger B, Kreipe HH, Ganser A, Kröger N, Heuser M. *Leukemia*. 2014 Jul;28(7):1552-5.
- J Low frequency of calreticulin mutations in MDS patients. Heuser M, Panagiota V, Koenecke C, Fehse B, Alchalby H, Badbaran A, Shahswar R, Stadler M, Eder M, Göhring G, Trummer A, **Schroeder T**, Kobbe G, Thiede C, Platzbecker U, Schlegelberger B, Kroeger N, Ganser A, Thol F. *Leukemia*. 2014 Sep;28(9):1933-4.
- K Postallogeneic monitoring with molecular markers detected by pretransplant next-generation or Sanger sequencing predicts clinical relapse in patients with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. Fu Y, **Schroeder T**, Zabelina T, Badbaran A, Bacher U, Kobbe G, Ayuk F, Wolschke C, Schnittger S, Kohlmann A, Haferlach T, Kröger N. *Eur J Haematol*. 2014 Mar;92(3):189-94.
- L Sorafenib treatment in 13 patients with acute myeloid leukemia and activating FLT3 mutations in combination with chemotherapy or as monotherapy. **Schroeder T**, Zohren F, Saure C, Bruns I, Czibere A, Safaian NN, Fenk R, Haas R, Kobbe G. *Acta Haematol*. 2010;124(3):153-9.
- M High activity of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia synergizes with allo-immune effects to induce sustained responses. Metzelder SK, **Schroeder T**, Finck A, Scholl S, Fey M, Götze K, Linn YC, Kröger M, Reiter A, Salih HR, Heinicke T, Stuhlmann R, Müller L, Giagounidis A, Meyer RG, Brugger W, Vöhringer M, Dreger P, Mori M, Basara N, Schäfer-Eckart K, Schultheis B, Baldus C, Neubauer A, Burchert A. *Leukemia*. 2012 Nov;26(11):2353-9.

- N Upfront allogeneic blood stem cell transplantation for patients with high-risk myelodysplastic syndrome or secondary acute myeloid leukemia using a FLAMSA-based high-dose sequential conditioning regimen. Saure C, **Schroeder T**, Zohren F, Groten A, Bruns I, Czibere A, Galonska L, Kondakci M, Weigelt C, Fenk R, Germing U, Haas R, Kobbe G. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Mar;18(3):466-72.
- O Tacrolimus and mycophenolate mofetil as GvHD prophylaxis following nonmyeloablative conditioning and unrelated hematopoietic SCT for adult patients with advanced hematologic diseases. Zohren F, **Schroeder T**, Czibere A, Fenk R, Bruns I, Kondakci M, Saure C, Haas R, Kobbe G. *Bone Marrow Transplant.* 2011 May;46(5):747-55.
- P Treatment of graft-versus-host disease with monoclonal antibodies and related fusion proteins. **Schroeder T**, Haas R, Kobbe G. *Expert Rev Hematol.* 2010 Oct;3(5):633-51.
- Q 5-Azacytidine for the treatment of patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome who relapse after allo-SCT: a retrospective analysis. Czibere A, Bruns I, Kröger N, Platzbecker U, Lind J, Zohren F, Fenk R, Germing U, **Schroeder T**, Gräf T, Haas R, Kobbe G. *Bone Marrow Transplant.* 2010 May;45(5):872-6.
- R Azacitidine and donor lymphocyte infusions as first salvage therapy for relapse of AML or MDS after allogeneic stem cell transplantation. **Schroeder T**, Czibere A, Platzbecker U, Bug G, Uharek L, Luft T, Giagounidis A, Zohren F, Bruns I, Wolschke C, Rieger K, Fenk R, Germing U, Haas R, Kröger N, Kobbe G. *Leukemia.* 2013 Jun;27(6):1229-35.

- S Treatment of Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndrome Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation with Azacitidine and Donor Lymphocyte Infusions-A Retrospective Multicenter Analysis from the German Cooperative Transplant Study Group. **Schroeder T**, Rachlis E, Bug G, Stelljes M, Klein S, Steckel NK, Wolf D, Ringhoffer M, Czibere A, Nachtkamp K, Dienst A, Kondakci M, Stadler M, Platzbecker U, Uharek L, Luft T, Fenk R, Germing U, Bornhäuser M, Kröger N, Beelen DW, Haas R, Kobbe G. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Dec 23. pii: S1083-8791(14)01416-5.
- T Cancer-testis antigen expression and its epigenetic modulation in acute myeloid leukemia. Atanackovic D, Luetkens T, Kloth B, Fuchs G, Cao Y, Hildebrandt Y, Meyer S, Bartels K, Reinhard H, Lajmi N, Hegewisch-Becker S, Schilling G, Platzbecker U, Kobbe G, **Schroeder T**, Bokemeyer C, Kröger N. *Am J Hematol.* 2011 Nov;86(11):918-22.
- U Salvage therapy with azacitidine increases regulatory T cells in peripheral blood of patients with AML or MDS and early relapse after allogeneic blood stem cell transplantation. **Schroeder T**, Fröbel J, Cadeddu RP, Czibere A, Dienst A, Platzbecker U, Bug G, Uharek L, Fenk R, Germing U, Kröger N, Haas R, Kobbe G. *Leukemia.* 2013 Sep;27(9):1910-3.

Literatur

1. Naegeli O. Ueber rothes Knochenmark und Myeloblasten. Dtsch med Wochenschr. 1900;26(18):287-90.
2. Steensma DP. Historical perspectives on myelodysplastic syndromes. Leukemia Research. 2012;36(12):1441-52.
3. Vardiman JW, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009;114(5):937-51.
4. Germing U, et al. Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. Annals of hematology. 2008;87(9):691-9.
5. Juliusson G, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. Blood. 2009;113(18):4179-87.
6. Neukirchen J, et al. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry. Leuk Res. 2011;35(12):1591-6.
7. Dores GM, et al. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. Blood. 2012;119(1):34-43.
8. Neukirchen J, et al. Platelet counts and haemorrhagic diathesis in patients with myelodysplastic syndromes. European journal of haematology. 2009;83(5):477-82.
9. Schemenau J, et al. Cellularity, characteristics of hematopoietic parameters and prognosis in myelodysplastic syndromes. European journal of haematology. 2015.
10. Dohner H, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2010;115(3):453-74.
11. Valent P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. Leuk Res. 2007;31(6):727-36.
12. Grimwade D, et al. Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. Hematology/oncology clinics of North America. 2011;25(6):1135-61, vii.
13. Haase D, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. Blood. 2007;110(13):4385-95.
14. Greenberg P, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood. 1997;89(6):2079-88.
15. Greenberg PL, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. Blood. 2012;120(12):2454-65.
16. Della Porta MG, et al. Predictive factors for the outcome of allogeneic transplantation in patients with MDS stratified according to the revised IPSS-R. Blood. 2014;123(15):2333-42.
17. Malcovati L, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. Blood. 2013;122(17):2943-64.

18. Jadersten M, et al. Long-term outcome of treatment of anemia in MDS with erythropoietin and G-CSF. *Blood*. 2005;106(3):803-11.
19. Brierley CK, et al. Thrombopoiesis-stimulating agents and myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*. 2015.
20. Fenaux P, et al. A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood*. 2011;118(14):3765-76.
21. List A, et al. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *The New England journal of medicine*. 2006;355(14):1456-65.
22. Fink EC, et al. Lenalidomide Induces Ubiquitination and Degradation of CSNK1A1 in MDS with Del(5q). *Blood*. 2014;124(21):4-.
23. Olnes MJ, et al. Targeting immune dysregulation in myelodysplastic syndromes. *Jama*. 2011;305(8):814-9.
24. Passweg JR, et al. Immunosuppressive therapy for patients with myelodysplastic syndrome: a prospective randomized multicenter phase III trial comparing antithymocyte globulin plus cyclosporine with best supportive care--SAKK 33/99. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(3):303-9.
25. Sloan EM, et al. Alemtuzumab treatment of intermediate-1 myelodysplasia patients is associated with sustained improvement in blood counts and cytogenetic remissions. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(35):5166-73.
26. Fenaux P, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology*. 2009;10(3):223-32.
27. Fenaux P, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(4):562-9.
28. de Witte T, et al. Value of allogeneic versus autologous stem cell transplantation and chemotherapy in patients with myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia. Final results of a prospective randomized European Intergroup Trial. *Haematologica*. 2010;95(10):1754-61.
29. Hofmann WK, et al. Intensive chemotherapy with idarubicin, cytarabine, etoposide, and G-CSF priming in patients with advanced myelodysplastic syndrome and high-risk acute myeloid leukemia. *Annals of hematology*. 2004;83(8):498-503.
30. Knipp S, et al. Intensive chemotherapy is not recommended for patients aged >60 years who have myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia with high-risk karyotypes. *Cancer*. 2007;110(2):345-52.
31. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *The New England journal of medicine*. 2007;357(15):1472-5.
32. Gooley TA, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *The New England journal of medicine*. 2010;363(22):2091-101.

33. Martino R, et al. Comparison of conditioning regimens of various intensities for allogeneic hematopoietic SCT using HLA-identical sibling donors in AML and MDS with <10% BM blasts: a report from EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(6):761-70.
34. Kroger N. Allogeneic stem cell transplantation for elderly patients with myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2012;119(24):5632-9.
35. Pavletic SZ, et al. NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: report from the Committee on the Epidemiology and Natural History of Relapse following Allogeneic Cell Transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2010;16(7):871-90.
36. Damaj G, et al. Impact of azacitidine before allogeneic stem-cell transplantation for myelodysplastic syndromes: a study by the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie-Cellulaire and the Groupe-Francophone des Myelodysplasies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2012;30(36):4533-40.
37. Nakai K, et al. Value of chemotherapy before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor for myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 2005;19(3):396-401.
38. Oran B, et al. Cytogenetics, donor type, and use of hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome with allogeneic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2014;20(10):1618-25.
39. Saure C, et al. Upfront allogeneic blood stem cell transplantation for patients with high-risk myelodysplastic syndrome or secondary acute myeloid leukemia using a FLAMSA-based high-dose sequential conditioning regimen. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2012;18(3):466-72.
40. Scott BL, et al. Pretransplantation induction chemotherapy and posttransplantation relapse in patients with advanced myelodysplastic syndrome. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2005;11(1):65-73.
41. Cutler C. Timing of allogeneic stem cell transplantation for myelodysplastic syndromes and aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2014;2014(1):77-81.
42. Bernasconi P. Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationships and distinctions-a review. *British journal of haematology.* 2008;142(5):695-708.
43. Schlenk RF. Post-remission therapy for acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2014;99(11):1663-70.
44. Burnett AK. Treatment of acute myeloid leukemia: are we making progress? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:1-6.
45. Bonnet D, et al. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine.* 1997;3(7):730-7.
46. Li X, et al. Effect of intravenous coadministration of human stroma cell lines on engraftment of long-term repopulating clonal myelodysplastic syndrome cells in immunodeficient mice. *Blood cancer journal.* 2013;3:e113.

47. Medyouf H, et al. Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell stem cell*. 2014;14(6):824-37.
48. Will B, et al. Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood*. 2012;120(10):2076-86.
49. Woll PS, et al. Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer cell*. 2014;25(6):794-808.
50. Haferlach T, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28(2):241-7.
51. Papaemmanuil E, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616-27; quiz 99.
52. Walter MJ, et al. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013;27(6):1275-82.
53. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2013;368(22):2059-74.
54. Genovese G, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England journal of medicine*. 2014;371(26):2477-87.
55. Jaiswal S, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *The New England journal of medicine*. 2014;371(26):2488-98.
56. Ding L, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506-10.
57. Walter MJ, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2012;366(12):1090-8.
58. Wong TN, et al. Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2015;518(7540):552-5.
59. Raaijmakers MH. Myelodysplastic syndromes: revisiting the role of the bone marrow microenvironment in disease pathogenesis. *International journal of hematology*. 2012;95(1):17-25.
60. Schepers K, et al. Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell stem cell*. 2015;16(3):254-67.
61. Beelte S, et al. [Paradigm change in the assessment of myeloid and lymphoid neoplasms associated with occupational benzene exposure]. *Medizinische Klinik*. 2009;104(3):197-203.
62. Sill H, et al. Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics. *British journal of pharmacology*. 2011;162(4):792-805.
63. Knipp S, et al. Secondary myelodysplastic syndromes following treatment with azathioprine are associated with aberrations of chromosome 7. *Haematologica*. 2005;90(5):691-3.
64. Lyman GH, et al. Acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome in randomized controlled clinical trials of cancer chemotherapy with granulocyte colony-stimulating factor: a systematic review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(17):2914-24.
65. Alter B. Diagnosis, genetics and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:29 - 39.

66. Donadieu J, et al. Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. *Haematologica*. 2005;90(1):45 - 53.
67. Rosenberg P, et al. The incidence of leukaemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy. *Blood*. 2006;107(12):4628 - 35.
68. Ozen H. Glycogen storage diseases: new perspectives. *World J Gastroenterol*. 2007;13(18):2541 - 53.
69. Pinsk M, et al. Acute myelogenous leukemia and glycogen storage disease 1b. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002;24(9):756 - 8.
70. Simmons P, et al. Acute myelogenous leukaemia and malignant hyperthermia in a patient with type 1b glycogen storage disease. *J Pediatr*. 1984;105(3):428 - 31.
71. Sloand E, et al. Granulocyte-colony stimulating factor preferentially stimulates proliferation of monosomy 7 cells bearing the isoform IV receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(39):14483 - 8.
72. Lennon P, et al. Aberrant EVI1 expression in acute myeloid leukemias associated with the t(3;8)(q26;q24). *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;177(1):37 - 42.
73. Sawka AM, et al. Second primary malignancy risk after radioactive iodine treatment for thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2009;19(5):451-7.
74. Focosi D, et al. Acute myeloid leukemia and follicular lymphoma after very low dose radioiodine therapy for thyroid diseases. *Haematologica*. 2007;92(9):e96-7.
75. Grudeva-Popova J, et al. Therapy-related acute promyelocytic leukemia after treatment with radioiodine for thyroid cancer: case report with literature review. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2007;12(1):129-32.
76. Gilibert M, et al. Acute leukemia arising after radioiodine treatment for thyroid cancer. *Haematologica*. 2012;97(8):e28-9; author reply e30.
77. Attal M, et al. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(19):1782-91.
78. Krishnan AY, et al. Second Primary Malignancies after Autologous Hematopoietic Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2013;19(2):260-5.
79. McCarthy PL, et al. Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(19):1770-81.
80. Palumbo A, et al. Continuous lenalidomide treatment for newly diagnosed multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(19):1759-69.
81. Palumbo A, et al. Second primary malignancies with lenalidomide therapy for newly diagnosed myeloma: a meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology*. 2014;15(3):333-42.
82. Nilsson L, et al. Involvement and functional impairment of the CD34(+)CD38(-)Thy-1(+) hematopoietic stem cell pool in myelodysplastic syndromes with trisomy 8. *Blood*. 2002;100(1):259-67.
83. Nilsson L, et al. The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of 5q myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2007;110(8):3005-14.

84. Pang WW, et al. Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(8):3011-6.
85. Bianco P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood*. 2011;117(20):5281-8.
86. Mendez-Ferrer S, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-34.
87. Ehninger A, et al. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(3):421-8.
88. Singh MK, et al. The T-box transcription factor Tbx15 is required for skeletal development. *Mechanisms of development*. 2005;122(2):131-44.
89. Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
90. Ferrer RA, et al. Mesenchymal stromal cells from patients with myelodysplastic syndrome display distinct functional alterations that are modulated by lenalidomide. *Haematologica*. 2013;98(11):1677-85.
91. Raaijmakers MH, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 2010;464(7290):852-7.
92. Kode A, et al. Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts. *Nature*. 2014;506(7487):240-4.
93. Bartsch K, et al. Mesenchymal stem cells remain host-derived independent of the source of the stem-cell graft and conditioning regimen used. *Transplantation*. 2009;87(2):217-21.
94. Fortunel NO, et al. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*. 2000;96(6):2022-36.
95. Suragani RN, et al. Transforming growth factor-beta superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. *Nature medicine*. 2014;20(4):408-14.
96. Platzbecker U, et al. ACE-536 Increases Hemoglobin and Reduces Transfusion Burden in Patients with Low or Intermediate-1 Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS): Preliminary Results from a Phase 2 Study. *Blood*. 2014;124(21):411-.
97. Komrokji RS, et al. An Open-Label, Phase 2, Dose-Finding Study of Sotatercept (ACE-011) in Patients with Low or Intermediate-1 (Int-1)-Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) or Non-Proliferative Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) and Anemia Requiring Transfusion. *Blood*. 2014;124(21):3251-.
98. Geyh S, et al. Functional Inhibition of Mesenchymal Stem and Progenitor Cells (MSPC) Significantly Contributes to Hematopoietic Insufficiency with Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*. 2014;124(21):3492-.
99. Valent P. Low blood counts: immune mediated, idiopathic, or myelodysplasia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:485-91.
100. Hanson C, et al. P089 Is idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) a valid clinical concept? A longitudinal clinicopathological study. *Leukemia Research*. 2009;33:S109-S11.

101. Wimazal F, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) versus low risk MDS: the diagnostic interface. *Leuk Res.* 2007;31(11):1461-8.
102. Allen RC, et al. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *American journal of human genetics.* 1992;51(6):1229-39.
103. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961;190:372-3.
104. Delforge M, et al. Patients with high-risk myelodysplastic syndrome can have polyclonal or clonal haemopoiesis in complete haematological remission. *British journal of haematology.* 1998;102(2):486-94.
105. Gale RE, et al. Interpretation of X-chromosome inactivation patterns. *Blood.* 1994;84(7):2376-8.
106. Mach-Pascual S, et al. Predictive value of clonality assays in patients with non-Hodgkin's lymphoma undergoing autologous bone marrow transplant: a single institution study. *Blood.* 1998;91(12):4496-503.
107. Carella C, et al. MN1 overexpression is an important step in the development of inv(16) AML. *Leukemia.* 2007;21(8):1679-90.
108. Grosveld GC. MN1, a novel player in human AML. *Blood cells, molecules & diseases.* 2007;39(3):336-9.
109. Heuser M, et al. MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in patients with AML. *Blood.* 2007;110(5):1639-47.
110. Heuser M, et al. High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood.* 2006;108(12):3898-905.
111. Antar A, et al. Azacitidine in the treatment of extramedullary relapse of AML after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(7):994-5.
112. Pellagatti A, et al. Identification of gene expression-based prognostic markers in the hematopoietic stem cells of patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2013;31(28):3557-64.
113. Thol F, et al. Prognostic significance of combined MN1, ERG, BAALC, and EVI1 (MEBE) expression in patients with myelodysplastic syndromes. *Annals of hematology.* 2012;91(8):1221-33.
114. Piazza R, et al. Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nature genetics.* 2013;45(1):18-24.
115. Klampfl T, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *The New England journal of medicine.* 2013;369(25):2379-90.
116. Nangalia J, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *The New England journal of medicine.* 2013;369(25):2391-405.
117. Rumi E, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood.* 2014;124(7):1062-9.
118. Tefferi A, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia.* 2014;28(7):1472-7.

119. Hou HA, et al. Calreticulin mutation was rarely detected in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2014;28(7):1555-7.
120. Hourigan CS, et al. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nature reviews Clinical oncology*. 2013;10(8):460-71.
121. Yang L, et al. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*. 2007;21(5):868-76.
122. Cilloni D, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(31):5195-201.
123. Cilloni D, et al. Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(10):1988-95.
124. Israyelyan A, et al. Real-time assessment of relapse risk based on the WT1 marker in acute leukemia and myelodysplastic syndrome patients after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(1):26-33.
125. Lange T, et al. Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(+) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia*. 2011;25(3):498-505.
126. Qin YZ, et al. PRAME and WT1 transcripts constitute a good molecular marker combination for monitoring minimal residual disease in myelodysplastic syndromes. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(7):1442-9.
127. Tamura H, et al. Prognostic significance of WT1 mRNA and anti-WT1 antibody levels in peripheral blood in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2010;34(8):986-90.
128. Ueda Y, et al. Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(7):1450-8.
129. Yoon JH, et al. Wilms tumor gene 1 expression as a predictive marker for relapse and survival after hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndromes. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(3):460-7.
130. Schroeder T, et al. Monitoring of Wilms' Tumor 1 (WT1) Expression in Peripheral Blood (PB) of Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS) By a Standardized European Leukemia Net (ELN)-Certified Assay to Detect Minimal Residual Disease (MRD) and Guide Therapeutic Intervent.... *Blood*. 2014;124(21):4661-.
131. Vyas P, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(1):8-15.
132. Platzbecker U. Who benefits from allogeneic transplantation for myelodysplastic syndromes?: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:522-8.
133. Schlenk RF, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2008;358(18):1909-18.

134. Kindler T, et al. FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. *Blood*. 2010;116(24):5089-102.
135. Litzow MR. More flitting about FLT32005 2005-11-15 00:00:00. 3331-2 p.
136. Ravandi F, et al. Final report of phase II study of sorafenib, cytarabine and idarubicin for initial therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014;28(7):1543-5.
137. Serve H, et al. Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(25):3110-8.
138. Röllig C, et al. Sorafenib Versus Placebo in Addition to Standard Therapy in Younger Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: Results from 267 Patients Treated in the Randomized Placebo-Controlled SAL-Soramyl Trial. *Blood*. 2014;124(21):6-.
139. Schmid C, et al. Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2006;108(3):1092-9.
140. Ossenkoppele GJ, et al. A randomized study of granulocyte colony-stimulating factor applied during and after chemotherapy in patients with poor risk myelodysplastic syndromes: a report from the HOVON Cooperative Group. Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group. *Leukemia*. 1999;13(8):1207-13.
141. Deeg HJ, et al. Conditioning with targeted busulfan and cyclophosphamide for hemopoietic stem cell transplantation from related and unrelated donors in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2002;100(4):1201-7.
142. Jurado M, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for advanced myelodysplastic syndrome after conditioning with busulfan and fractionated total body irradiation is associated with low relapse rate but considerable nonrelapse mortality. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2002;8(3):161-9.
143. Storb R, et al. Graft-versus-host disease and graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(12):1530-8.
144. Mielcarek M, et al. Comparable outcomes after nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation with unrelated and related donors. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2007;13(12):1499-507.
145. Nieto Y, et al. Tacrolimus and mycophenolate mofetil after nonmyeloablative matched-sibling donor allogeneic stem-cell transplantations conditioned with fludarabine and low-dose total body irradiation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2006;12(2):217-25.
146. Savani BN, et al. Management of relapse after allo-SCT for AML and the role of second transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44(12):769-77.
147. Schmid C, et al. Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2012;119(6):1599-606.
148. Christopheit M, et al. Second allograft for hematologic relapse of acute leukemia after first allogeneic stem-cell transplantation from related and unrelated donors: the role of donor change.

Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2013;31(26):3259-71.

149. Schmid C, et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(31):4938-45.
150. Graef T, et al. Successful treatment of relapsed AML after allogeneic stem cell transplantation with azacitidine. *Leuk Res*. 2007;31(2):257-9.
151. Bolanos-Meade J, et al. 5-azacytidine as salvage treatment in relapsed myeloid tumors after allogeneic bone marrow transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2011;17(5):754-8.
152. Jabbour E, et al. Low-dose azacitidine after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Cancer*. 2009;115(9):1899-905.
153. Kim SY, et al. Azacitidine treatment after discontinuation of immunosuppressants in patients with myelodysplastic syndrome and relapse after allo-SCT at a single center. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(8):1375-6.
154. Lubbert M, et al. Efficacy of a 3-day, low-dose treatment with 5-azacytidine followed by donor lymphocyte infusions in older patients with acute myeloid leukemia or chronic myelomonocytic leukemia relapsed after allografting. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(4):627-32.
155. Platzbecker U, et al. Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial. *Leukemia*. 2012;26(3):381-9.
156. Tessoulin B, et al. Azacitidine salvage therapy for relapse of myeloid malignancies following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(4):567-71.
157. Yamamoto W, et al. Successful azacitidine treatment with increase of regulatory T cells for relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplant. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(9):2079-80.
158. Old LJ. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer immunity*. 2001;1:1.
159. Greiner J, et al. Cancer vaccines for patients with acute myeloid leukemia--definition of leukemia-associated antigens and current clinical protocols targeting these antigens. *Haematologica*. 2006;91(12):1653-61.
160. Almstedt M, et al. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine induces expression of NY-ESO-1 and other cancer/testis antigens in myeloid leukemia cells. *Leuk Res*. 2010;34(7):899-905.
161. Claus R, et al. Decitabine induces very early in vivo DNA methylation changes in blasts from patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2013;37(2):190-6.
162. Flotho C, et al. The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2009;23(6):1019-28.
163. Goodyear O, et al. Induction of a CD8+ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Blood*. 2010;116(11):1908-18.

164. Choi J, et al. In vivo administration of hypomethylating agents mitigate graft-versus-host disease without sacrificing graft-versus-leukemia. *Blood*. 2010;116(1):129-39.
165. Sanchez-Abarca LI, et al. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood*. 2010;115(1):107-21.
166. Goodyear OC, et al. Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2012;119(14):3361-9.
167. Costantini B, et al. The effects of 5-azacytidine on the function and number of regulatory T cells and T-effectors in myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2013;98(8):1196-205.
168. Schroeder T, et al. Azacitidine and donor lymphocyte infusions as first salvage therapy for relapse of AML or MDS after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2013;27(6):1229-35.
169. Schroeder T, et al. Treatment of Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndrome Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation with Azacitidine and Donor Lymphocyte Infusions- A Retrospective Multicenter Analysis from the German Cooperative Transplant Study Group. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2014.
170. Stein EM, et al. AG-221, an Oral, Selective, First-in-Class, Potent Inhibitor of the IDH2 Mutant Metabolic Enzyme, Induces Durable Remissions in a Phase I Study in Patients with IDH2 Mutation Positive Advanced Hematologic Malignancies. *Blood*. 2014;124(21):115-.
171. Schepers K, et al. Normal and Leukemic Stem Cell Niches: Insights and Therapeutic Opportunities. *Cell stem cell*. 2015;16(3):254-67.
172. Bejar R, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine*. 2011;364(26):2496-506.

Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle meinen klinischen und wissenschaftlichen Lehrern, an erster Stelle Herrn Professor Dr. Rainer Haas, Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie. Herr Professor Haas hat mich 2001 als Medizin-Doktorand an seiner Klinik aufgenommen und seitdem kontinuierlich gefördert. Seine Anregungen, stetige Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik haben meine wissenschaftlichen Arbeiten nicht nur möglich gemacht, sondern haben maßgeblich zu ihrem Gelingen beigetragen.

Als zweites möchte ich Herrn Professor Dr. Guido Kobbe danken. Er hat meine klinische Laufbahn wesentlich geprägt und sein innovatives Denken war oftmals Grundstein für meine wissenschaftlichen Projekte. Darüber hinaus war er mir ein ständiger Ansprechpartner bei Fragen und Problemen. Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Ulrich Germing, der mich kontinuierlich in meiner klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit unterstützt hat und als Leiter der Düsseldorfer MDS-Gruppe mir den Einstieg in dieses Forschungsgebiet ermöglicht hat.

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktorandin Stefanie Geyh, die mit ihrem unermüdlichen Einsatz und ihrem Verständnis zum Gelingen der gemeinsamen Projekte entscheidend beigetragen hat. Darüber hinaus danken möchte ich meinen ärztlichen Kollegen Professor Dr. Roland Fenk, Professor Dr. Ulrich Steidl, PD Dr. med. Ralf Kronenwett und Dr. Fabian Zohren sowie meinen wissenschaftlichen Kooperationspartnern, insbesondere Professor Dr. Frank Lyko. Für ihre technische, vor allem aber auch moralische Unterstützung bedanke ich mich bei Anke Böckmann und Sabrina Pechtel. Außerdem gilt mein Dank den Doktoranden und ärztlichen Kollegen und Mitarbeitern der Klinik für Hämatologie und Onkologie für ihre vielfältige Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und Geschwistern, aber vor allem meiner Frau Doro und meinem Sohn Benedikt, die mich bedingungslos unterstützt haben und mit Geduld und Verständnis ihre Interessen oftmals in den Hintergrund gestellt haben.

Anhang: Sonderdrucke der zusammengefassten Publikationen