

Aus der Kinderklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer

Vergleichende Analyse von Antigenexpressionsmustern kindlicher cALL-Blasten und  
gesunden B-Zellvorstufen – Nutzen für die MRD Diagnostik

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Katharina Hempel  
aus  
Neustadt an der Weinstraße

Würzburg, Oktober 2017

**Referent:** Professor Dr. med. Matthias Karl Eugen Eyrich

**Koreferent:** Professor Dr. med. Stefan Knop

**Dekan:** Professor. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 03.04.2019

**Die Promovendin ist Ärztin.**

Für meine Mama

Zeit ist Leben.  
Und das Leben wohnt im Herzen.

Meister Hora  
Aus Momo von Michal Ende

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Hämatopoese .....	1
1.2	CD Nomenklatur und weitere Identifizierungsantigene .....	4
1.3	Leukämien .....	7
1.3.1	Definition und Ätiologie .....	7
1.3.2	Einteilung.....	8
1.3.3	Diagnostik.....	9
1.3.4	Therapie .....	9
1.3.5	Minimale Resterkrankung (MRD).....	10
1.3.6	Rezidive .....	11
1.4	Ziel der Studie.....	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Patienten .....	13
2.1.1	cALL Gruppe .....	13
2.1.2	Kontrollgruppe (KG) .....	13
2.2	Durchflusszytometrie .....	14
2.3	Panel.....	15
2.4	Gating Strategie.....	17
2.4.1	Leukämie-Patienten .....	18
2.4.2	Kontrollgruppe .....	23
2.5	Statistische Auswertung.....	27
3	Ergebnisse .....	29
3.1	Vergleich zwischen den Gruppen.....	29
3.2	Marker ohne Unterschied zu den Vorläufern .....	30
3.3	Marker mit signifikanten Unterschieden zu den Vorläuferzellen .....	31
3.4	Rezidive .....	40
4	Diskussion.....	42
4.1	Gating Strategie.....	42
4.2	Markerexpression .....	43
4.3	Rezidive .....	48

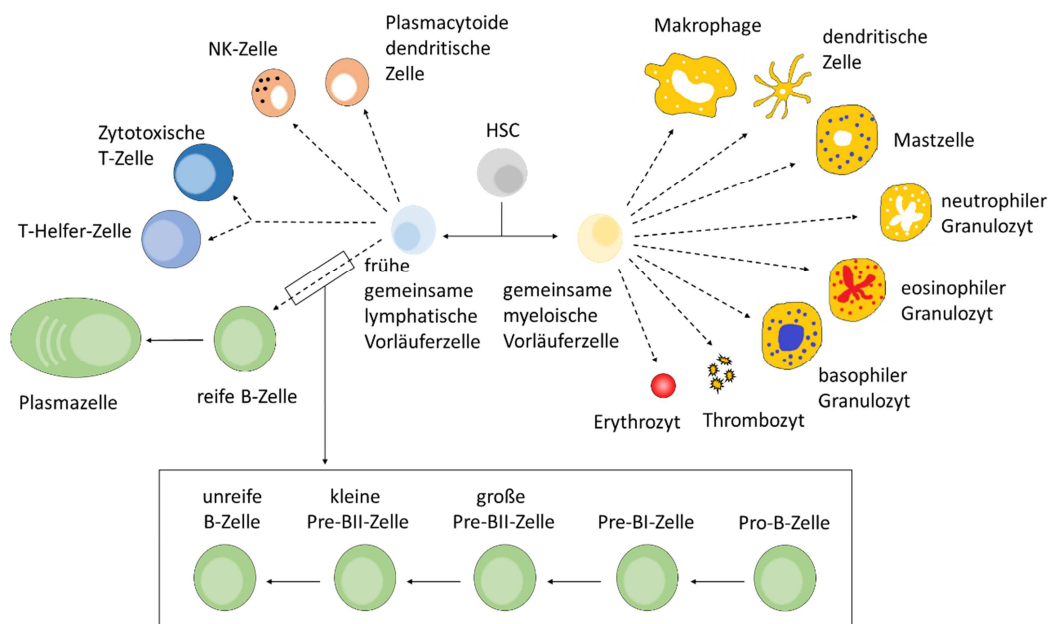
4.4	Fehlerquellen .....	49
4.5	Ausblick .....	51
5	Zusammenfassung.....	53
6	Anhang .....	55
7	Abkürzungsverzeichnis.....	66
8	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	68
9	Literatur.....	70
	Danksagung.....	74
	Lebenslauf .....	75

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämatopoese

Die Aufgaben des Blutes sind ungemein vielfältig und bedürfen einer Vielzahl spezialisierter Zellen. Deren Entstehung wird als Hämatopoese bezeichnet. Gesteuert über eine Vielzahl von Wachstums- und Differenzierungssignalen sind bis heute viele Details nicht verstanden.

Ausgangspunkt ist die zur Selbstregeneration befähigte, multipotente hämatologische Stammzelle (Hematopoietic Stem Cell – HSC), aus der zu Beginn die gemeinsamen Vorläuferzellen der myeloischen und der lymphatischen Reihen (common myeloid progenitor - CMP bzw. common lymphoid progenitor - CLP) entstehen. Über viele Zwischenstufen reifen letztlich alle erforderlichen Blutzellen heran (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Vereinfachte Darstellung der Hämatopoese gesunder Blutzellen. Modifiziert nach Kruse, A. <sup>[1]</sup>, Kraus et al. <sup>[2]</sup>

Morphologisch lassen sich nur die wenigsten dieser Stufen voneinander unterscheiden. Eine Differenzierung der Zellen ist durch auf der Oberfläche der Zellen befindliche Moleküle möglich, die zu einem bestimmten Zeitpunkt und in bestimmter Kombination, im Laufe der Entwicklung der Zelle exprimiert werden. Das Erkennen

dieser Antigene durch spezifische Antikörper (Antigen-Antikörper-Prinzip) erlaubt die Zuordnung einer Zelle zu einer definierten Zelllinie oder einem Zelltyp<sup>[1, 3]</sup>.

Insbesondere muss hier auf die gesunde Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark (KM) eingegangen werden, deren Darstellung in der Literatur uneinheitlich ist.

Ein Modell beschreibt die Differenzierung der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle zur Pro-B-Zelle als ersten B-Zelllinien-spezifischen Vorläufer. Aus dieser entwickelt sich über die Pre-BI und Pre-BII Zelle die unreife (nicht stimulierte) B-Zelle.

Grundlegend dabei ist die Umlagerung der Immunglobulin (Ig)-Loki der DNA, die zunächst intrazellulär erfolgt und letztlich in der klon-spezifischen Oberflächenexpression von Ig-G und Ig-M mündet. Diese bilden, zusammen mit assoziierten Signalmolekülen, den für die Antigenerkennung zuständigen B-Zellrezeptor (B-cell receptor – BCR). Tabelle 1 zeigt die Antigenexpression, oder auch den Immunophänotyp, der unterschiedlichen B-Zellvorläufer.

**Tabelle 1:** Antigenexpressionsmuster auf B-Zellvorläufern; nach Ghia et al. und Noordzij et al., aus dem Buch „Zelluläre Diagnostik“ Sack et al.<sup>[4-6]</sup>




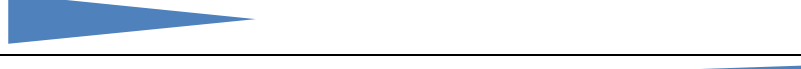


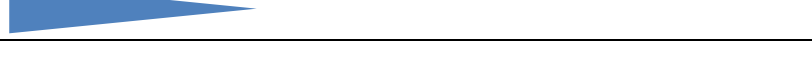
Marker	Pro-B	Pre-BI	Pre-BII		Unreife B-Zelle	Reife B-Zelle
			groß	klein		
Linien-spezifisch						
CD22	+	+	+	+	+	++
cyCD79α	-/+	+	+	+	+	+
CD19	-	+	+	+	+	+
Differenzierung						
CD20	-	-	-	(+)	+	+
CD10	-/(+)	+	+	+	+	-
CD34	+	+	-	-	-	-
CD24	-	++	++	++	++	+
CD38	++	++	++	++	++	+
cy-TdT	-/+	+	+/-	-	-	-
cy-VpreB(CD179α)	-	+	+	-	-	-
cy-μ	-	-	+	+	+	+
Sm-IgM	-	-	-	-	+	+
Sm-IgD	-	-	-	-	-/+	+
Rekombination						
RAG	-	+	-	+	-	-
Ig-Schwerkette	Keimbahn	DJ	VDJ	VDJ	VDJ	VDJ
Ig-Leichtkette	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn	VJ	VJ	VJ



Andere Autoren bezeichnen B-Zellvorläufer als Hämatogonen (H). Es werden drei Typen unterschieden (H1-H3). Die Einteilung wird anhand ihrer Größe und der Expressionshöhe von CD45 in der Durchflusszytometrie vorgenommen. Die weitere Charakterisierung der Stufen erfolgt anhand von Vorläufermarkern (CD34, terminale Desoxynukleotidyl-Transferase [TdT] und CD10) und B-Zelllinien spezifischen Markern (CD19, CD20 und CD22) <sup>[7]</sup>. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich sind die Übergänge fließend. Vorläufermarker gehen verloren, während die Expression von B-Zelllinien spezifischen Markern zunimmt. Eine Ausnahme ist CD22, welches von H1 zu H2 in der Expressionshöhe sinkt, um dann auf H3 wieder auf etwa das Ausgangsniveau anzusteigen.

Sedek et al. verbindet beide Einteilungen und bezeichnet H als die Summe aller CD19 positiven B-Zellvorläufern. Dabei entsprechen H1 den Pre-BI-Zellen, H2 den Pre-BII Zellen und H3 naiven (nicht stimulierten) B-Zellen <sup>[8]</sup>.

**Tabelle 2:** Antigenexpressionsmuster auf Hämatogonen nach Sedek et al. 2014

Marker	H1 (Pre-BI)	H2 (Pre-BII)	H3 (unreife B-Zelle)
CD20			
CD22			
CD10			
CD34			
CD38			
CD45			
cyTdT			

In vorliegender Arbeit wird die Einteilung nach Sedek et al. verwendet und nur noch die Bezeichnungen H1, H2 und H3 verwendet und gleichgesetzt mit den B-Zellvorstufen Pre-BI, Pre-BII bzw. unreife (nicht-stimulierte) B-Zellen.

## 1.2 CD Nomenklatur und weitere Identifizierungsantigene

Mittlerweile sind 371 CD (cluster of differentiation) Moleküle bekannt. Deren Einteilung und Beschreibung wird durch den Human Cell Differentiation Molecules (HCDM) Workshop vorgenommen <sup>[6, 10-17]</sup>. Tabellen 3 fasst die 23 in dieser Arbeit untersuchten CDs zusammen.

**Tabelle 3:** In dieser Arbeit berücksichtigte CDs

Antigen	Name	Positive Zellen	Funktion
CD10	Common Acute Lymphocytic Leukemia Antigen CALLA), Neutral Endopeptidase, Membrane-Associated (NEP)	B- und T-Vorläuferzellen, Knochenmarkszellen, Epithelzellen	Zink-Metalloprotease, reguliert wahrscheinlich Wachstum und Proliferation von B-Zellen
CD11b	Integrin alpha-M, Complement Receptor Type 3, alpha subunit (CR3A), Mac-1a	T-, B-, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen (CD11b, CD11c)	Intrazelluläre Adhäsion, co-stimulatorische Funktion, Bindung an ICAM-1 und Fibrinogen
CD13	Aminopeptidase N (APN), Leukocyte Surface Antigen Gp150	Myelomonozytische Zellen, Granulozyten, Endothel-, Epithelzellen	Zink-Metalloprotease, Rezeptor für Coronaviren
CD15	X-Hapten, Lewis X	Neutrophile, Eosinophile, Monozyten, Lymphozyten (CD15s, CD15u, CD15su) und Endothelzellen (CD15s, CD15u, CD15su)	Kohlenhydrat, wichtig für Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Interaktionen, Zelladhäsion, Phagozytose, Chemotaxis
CD19	B-Lymphocyte Antigen, B4	B-Zellen, folliculäre dendritische Zellen, frühestes B-Zelllinienantigen, auf B-Zelllinie restringiert	Corezeptor des BZR, Signaltransduktion, reguliert Entwicklung, Differenzierung und Aktivierung von B-Zellen

Einleitung

CD20	B-Lymphocyte surface antigen B1, Bp35	B-Zellen (Plasmazellen sind CD20 negativ)	Oligomere bilden Ca <sup>2+</sup> -Kanal, reguliert Aktivierung und Proliferation von B-Zellen
CD21	Complement Component Receptor 2 (CR2), Epstein-Barr-Virus- Receptor, Complement Component 3d Receptor (C3dR)	B-Zellen, folliculäre dendritische Zellen, Epithelzellen	Rezeptor für Komplementkomponenten C3bi, C3dg, C3d, Rezeptor für EBV, Signaltransduktionskomplex mit CD19, CD81 und CD225
CD22	B Lymphocyte cell adhesion molecule (BL-CAM), Sialic Acid-Binding Immunoglobulin-Like Lectin 2 (SIGLEC2)	B-Zellen, Basophile Granulozyten, Mastzellen, plasmazytoide Dendritische Zellen	Signalmolekül, Adhäsion von B-Zellen an T-Zellen und Monozyten, bindet an CD75
CD24	Heat Stable Antigen Homologue (HAS)	B-Zellen, Granulozyten, Epithelzellen	Vesikeltransport, Apoptose, Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen, Reguliert die Aktivität von Integrinen
CD25	Tac Antigen, Interleukin 2 Receptor $\alpha$ , IL-2R $\alpha$	Lymphozyten (Aktivierte B- und T-Zellen, regulatorische T-Zellen)	$\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors; Regulierung der T-Zell-Aktivität
CD33	P67	Myeloide Vorläuferzellen, Monozyten, Granulozyten	Unbekannt; möglicherweise ein Adhäsionsmolekül, Zell-Zell-Interaktion
CD34	gp 105-120	Hämatopoetische Vorläuferzellen, Endothelzellen	Ligand für L-Selektin, Zelladhäsion
CD35	CR1, C3b/ C4b-Rezeptor	T-, B-Zellen, Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen, Erythrozyten	Komplementrezeptor 1, bindet C3b und C4b, vermittelt Phagozytose

## Einleitung

CD36	GpIIb, GPIV	Dendritische Zellen, Monozyten, Endothelzellen, Erythrozyten	Adhäsion von Thrombozyten, beteiligt an Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen
CD38	T10, ADP- Ribosylcyclase	Lymphozyten, Monozyten, Plasmazellen	NAD-Glykohydrolase, Zellaktivierung, Zellproliferation
CD45	Leukocyte- common antigen (LCA)	Alle hämatopoetischen Zellen, außer Erythrozyten, deren direkte Vorläufer und Thrombozyten. Die Zellen exprimieren unterschiedliche Isoformen (RA, RO, RB, RC)	Tyrosinphosphatase; reguliert die Signaltransduktion am TCR bzw. BCR
CD56	NKH-1, NCAM, Leu-19	NK-, T-Zellen	Zelladhäsionsmolekül
CD58	LFA-3	Alle Zellen	Vermittelt Zell-Zell-Adhäsion, bindet CD2
cyCD79 $\alpha$ CD79 $\beta$	Ig $\alpha$ , MB1 Ig $\beta$ , BCR	B-Zellen, wahrscheinlich ab pro-B	Teil des BCR; vermittelt die intrazelluläre Signaltransduktion nach Aktivierung des BCR
CD99	MIC2, E2	Lympho-, Mono-, Erythro-, Thrombozyten, Endothel-, Epithelzellen	Beeinflusst T-Zell-Adhäsion, induziert Apoptose bei doppelt-positiven Thymozyten
CD117	c-KIT, stem cell factor receptor	Hämatopoetische Vorläuferzellen	SCF-Rezeptor, Tyrosin-Kinase
CD123	IL-3-Rezeptor $\alpha$	Knochenmarkstammzellen, Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen, Endothelzellen	$\alpha$ -Kette des IL-3-Rezeptors
CD133	AC133	Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen, Endothel-, Epithelzellen	An der Organisation der Plasmamembran beteiligt

HLA-Moleküle der Klasse II und einige Enzyme haben sich weiterhin für die Identifizierung von Zellen bewährt. In dieser Arbeit berücksichtigt wurden in Tabelle 4 zusammengefasste Antigene:

**Tabelle 4:** Sonstige in dieser Arbeit verwendete Antigene <sup>[13-15]</sup>

Antigen	Name	Positive Zellen	Funktion
HLA-DR	Human leukocyte antigen	Antigen-präsentierenden Zellen	MHC-II-Molekül, Genlocus DR; Antigenpräsentation
zytoplasmatisches (cy)MPO	Myeloperoxidase	Myeloide Zellen	In den Phagosomen lokalisiertes Enzym; Beteiligt an der Bildung von Peroxiden
cyTdT	Zytoplasmatische terminale Desoxynukleotidyl-Transferase	B- und T-Vorläuferzellen	Enzym; katalysiert das Anknüpfen von Nukleotide an das 3'-Enden der DNA

### 1.3 Leukämien

#### 1.3.1 Definition und Ätiologie

Die in Abschnitt 1.1 beschriebene geordnete Hämatopoese wird durch eine Vielzahl von im Zellzyklus eingebauten Kontrollpunkte geleitet. Hier werden Fehler in der Desoxyribonukleinsäure erkannt, ggf. korrigiert oder falls notwendig eine Apoptose der Zelle eingeleitet. Das Vorhandensein mehrerer Mutationen in den zuständigen Kontroll- und Reparaturgenen führt zu einem Ausfall der Regelmechanismen wodurch eine defekte Zelle sich weiter unkontrolliert vermehren kann. Eine Reifung findet nicht mehr statt, es kommt zu einer unkontrollierten Expansion des entarteten Zellklons <sup>[13, 16]</sup>. Das vermehrte Auftreten dieser als Blasten bezeichneten, malignen Zellen mit konsekutiver Erhöhung des zellulären Anteils im KM bzw. peripherem Blut wird als Leukämie (griechisch „Weißes Blut“) bezeichnet.

Die Mutationen sind meist spontane somatische Mutationen, sehr selten Keimbahnmutationen. Dabei sind bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) v. a. Translokationen, also Austausch von Genmaterial zwischen den Chromosomen, zu beobachten. Ein Beispiel ist die BCR/ABL-Translokation, die mit einer schlechten Prognose der kindlichen ALL einhergeht. Die Einflussfaktoren sind vielseitig, aber in ihrer Bedeutung unklar: seltene endogene Faktoren wie das Bestehen einer Trisomie

21 oder eine Fanconi-Anämie können eine Rolle spielen, fraglichen Einfluss haben exogene Faktoren wie Strahlung oder Chemikalien, z. B. Topoisomerase II Inhibitoren. Von einer Leukämie spricht man, wenn mehr als 25% der kernhaltigen Zellen im KM Blasten sind<sup>[17, 20, 21]</sup>.

### 1.3.2 Einteilung

So vielfältig wie die Vorläuferzellen sind auch die aus ihnen entstehenden Leukämieformen. Abhängig vom gesetzten Schwerpunkt gibt es unterschiedliche Möglichkeiten der Einteilung.

Grundsätzlich lassen sich Leukämien nach dem klinischen Verlauf in akute und chronische Leukämien einteilen, des Weiteren nach dem entarteten Zelltyp in myeloische und lymphatische Leukämien, es gibt aber auch Mischformen (mixed-phenotype acute leukemia). Die bei Kindern häufigste Form ist die ALL.

Diese lässt sich morphologische nach der French-American-British Klassifikation in die Typen L1, L2 und L3 unterscheiden<sup>[22]</sup>.

Die Möglichkeit den Immunophänotyp der Blasten detaillierter zu beschreiben, erlaubt uns eine genauere Klassifizierung, die nach der European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL) vollzogen wird (Tab. 5)<sup>[23]</sup>.

**Tabelle 5:** Einteilung der B-ALL nach EGIL

Zuordnung zur B- Linien ALL (2 von 3 positiven Marker): CD19, CD79a, CD22 meist auch TdT und HLA-DR + (Ausnahme Mature B-ALL, häufig TdT-)	
Pro-B-ALL	Keine Expression weiterer Differenzierungsantigene der B-Zelllinien
common-ALL (cALL)	CD10+
Pre-B-ALL	Zytoplasmatisches IgM +
Mature B-ALL	Ig + (Zytoplasmatisch oder membranständig) Leichtketten - κ oder λ + (membranständig)

### 1.3.3 Diagnostik

Nach Anamnese und körperlicher Untersuchung folgen die Blutabnahme, eine Knochenmarkpunktion und Lumbalpunktion. Das gewonnene Material wird für verschiedene Untersuchungen verwendet:

- Zytologie: Erfassung von Morphologie und zytochemischen Eigenschaften
- Immunphänotypisierung:

Die Immunphänotypisierung, mittels Durchflusszytometrie, erlaubt uns einen individuellen Phänotyp der blastären Zellen zu erstellen, der leukemia associated immunophenotype (LAIP). Dabei sind die Marker häufig asynchron exprimiert (zum falschen Zeitpunkt und anderem Ausmaß der Entwicklungsstufe) oder sogar aberrant (Marker wird sonst überhaupt nicht von dieser Zelllinie exprimiert). Der LAIP ermöglicht nicht nur die Subklassifizierung der Leukämie, sowie die Unterscheidung zu gesunden Zellen<sup>[16]</sup> sondern auch die Nachverfolgung der Erkrankung im Verlauf der Therapie.

Dies hat nicht nur akademische Bedeutung, sondern bestimmt die Prognose der Erkrankung, damit auch die Einteilung in Risikogruppen und letztlich die Intensität der Therapie<sup>[17]</sup>.

- Karyotypisierung und Molekulargendiagnostik: Identifizierung von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen

### 1.3.4 Therapie

Die risikoadaptierte Polychemotherapie trug entscheidend dazu bei die Heilungsraten der Kinder von 20% auf über 80% zu steigern <sup>[24, 26]</sup>.

Die Therapie der ALL im Kindesalter erfolgt im Rahmen von Studien. Deutschland ist Studienzentrale der internationalen AIEOP-ALL BFM 2009 Studie (Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica-acute lymphocytic leucemia-Berlin Frankfurt Muenster). Die Patienten werden, anhand des Immunphänotyps und initialen Risikoprofils, in Risikogruppen eingeteilt. Das Therapieprotokoll beinhaltet eine in Blöcken durchgeführte Polychemotherapie mit anschließender Erhaltungstherapie. Im

Therapieprotokoll sind definierte Zeitpunkte zur Kontrolle der Risikofaktoren, wie der minimalen Resterkrankung, vorgesehen. Deren Wert ist unter anderem mitentscheidend für den weiteren Verlauf der Therapie.

### **1.3.5 Minimale Resterkrankung (MRD)**

Im Verlauf der Therapie sinkt die Anzahl leukämischer Zellen normalerweise sehr schnell unter die morphologische Nachweisgrenze ab. Einige wenige Tumorzellen allerdings können dennoch vorhanden sein, sie bilden die minimale Resterkrankung (minimal residual disease – MRD) und können Ursache eines Rezidivs sein <sup>[27]</sup>.

Zur Erfassung der MRD stehen die Durchflusszytometrie und die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction - PCR) zur Verfügung, die beide einen gleichwertigen Ansatz bieten <sup>[28]</sup>.

Das Erkennen der MRD ist deshalb so wichtig, weil sie ein entscheidender Prognosefaktor für das Outcome einer kindlichen ALL, sowohl nach Erstdiagnose (ED) <sup>[29]</sup>, als auch nach einem Rezidiv ist <sup>[30, 31]</sup>. Daher findet die Einteilung der Risikogruppen auch anhand des MRD Verlaufs statt <sup>[32]</sup>.

Die Durchflusszytometrie ist in der Lage eine Leukämiezelle in  $10^3$ - $10^4$  gesunden Zellen zu erkennen <sup>[7]</sup>. Im Rahmen der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie z. B. ist ein Standardrisiko unter anderem dadurch definiert, dass das MRD Ergebnis an Tag 15 des Therapieprotokolls unter diesem Wert bis  $< 0,1\%$  bleibt. MRD Werte an Tag 15 über  $10\%$  zeigen einen Hochrisiko Verlauf an, was eine Intensivierung der Therapie zur Folge hat <sup>[33, 34]</sup>.

Eine Veränderung des blastären Phänotyps unter Therapie kann die Diagnostik der Leukämien erheblich erschweren. Dieses Phänomen wird als phänotypischer Shift bezeichnet und wird durch zwei mögliche Mechanismen verursacht. Zum einen ist die Selektion eines therapieresistenten Subklons möglich, andererseits aber auch eine durch die Therapie induzierte Veränderung der Genexpression <sup>[35-38]</sup>.



### 1.3.6 Rezidive

Zwar können aufgrund der risikoadaptierten Therapieprotokolle über 80% der Kinder geheilt werden, 20% allerdings erleiden einen Rückfall, der die Prognose auf nur 40-50% erheblich verschlechtert <sup>[26]</sup>.

Auch Rezidive werden nach Studienprotokollen therapiert. Die aktuelle IntReALL 2010 Studie (International Study of Treatment of Childhood Relapsed ALL) vergleicht dabei das ALL-REZ BFM 2002 Protokoll mit dem UK-ALL-R3 Protokoll und in einem zweiten Schritt den Nutzen des CD22 Antikörpers Epratuzumab.

Ein Rezidiv ist nach ALL-REZ BFM 2002 definiert bei >25% Blasten im KM (isoliertes KM Rezidiv). Kommt es darüber hinaus zu einer extramedullären Beteiligung ist schon bei >5% Blasten im KM von einem kombinierten Knochenmarksrezidiv auszugehen. Weiterhin werden Rezidive eingeteilt nach Zeitpunkt in sehr frühe (< 18 Monate nach ED und < 6 Monate nach Ende der Ersttherapie), frühe ( $\geq$  18 Monate nach ED und < 6 Monate nach Ende der Ersttherapie) und späte ( $\geq$  6 Monate nach Ende der Ersttherapie) Rezidive. Neben den beiden genannten Charakteristika Ort und Zeitpunkt des Rezidivs wird auch der Immunphänotyp bestimmt. Diese drei Parameter dienen zur Definition der Risikogruppen S1 bis S4 und letztlich zur Wahl des Therapieprotokolls <sup>[32]</sup>.

Wird im Verlauf der Therapie eine MRD von mehr als 0,001 Zellen festgestellt, ist eine allogene Stammzelltransplantation (SZT) als weitere intensive, aber kurative, Therapie indiziert.

#### 1.4 Ziel der Studie

Leukämische Blasten lassen sich häufig nicht zweifelsfrei von gesunden B-Zellvorstufen unterscheiden, insbesondere wenn die Blastenlast, z. B. im Rahmen einer MRD sehr niedrig und die gesunden Vorstufen im Rahmen der Regeneration erhöht sind. Letzteres kann insgesamt verschiedene Ursachen haben: eine vorangegangene SZT oder Chemotherapie, Blutverlust oder Erkrankungen des Immunsystems wie autoimmune Störungen oder HIV/AIDS<sup>[8]</sup>. Auch im Verlauf der Therapie der kindlichen cALL kann eine sehr hohe Anzahl an normalen hämatopoetischen Zellen im Knochenmark beobachtet werden, vor allem in der Regenerationsphase nach Erreichen einer kompletten Remission. Diese sind im Gegensatz zu Blasten in ihrem Phänotyp sehr stabil, unabhängig von der Art der Leukämie oder der Therapie<sup>[7]</sup>. Um aber eine MRD während der Chemotherapie bzw. ein Rezidiv auch bei geringer Blastenzahl und wechselndem Phänotyp frühzeitig zu erkennen, braucht man zuverlässige Unterscheidungsmerkmale zu gesunden Zellen.

In dieser Studie wurden deswegen folgende Fragen adressiert:

- **Wie unterscheiden sich die Antigenexpressionsmuster von normalen B-Zellprogenitoren von denen auf leukämischen Blasten?**
- **Ist die Intensität der Antigenexpression verändert?**
- **Verändert sich der Immunphänotyp der Blasten im Rezidiv im Vergleich zur Erstmanifestation?**

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Alle Knochenmarksproben wurden im Zeitraum von 2006 bis 2014 zu diagnostischen Zwecken in der Universitätskinderklinik Würzburg entnommen und im Stammzelllabor gefärbt. In jedem Fall bestand ein Verdacht auf eine maligne Knochenmarkserkrankung, die es auszuschließen bzw. zu diagnostizieren galt. Bei der hier durchgeführten Untersuchung handelt es sich um eine rein retrospektive Analyse von Daten, die im Rahmen der klinischen Routinediagnostik erhoben worden waren. Die Datensätze wurden vom Betreuer der Arbeit ausgewählt und anonymisiert zur Auswertung weitergegeben.

#### **2.1.1 cALL Gruppe**

In die Studie aufgenommen wurden 33 Kinder, denen die Diagnose einer cALL gestellt werden musste. Eine Referenzbeurteilung zur Diagnosebestätigung erfolgte durch das Helios Klinikum Berlin Buch.

Die 19 Jungen und 14 Mädchen waren durchschnittlich 7 Jahre alt (1,2 – 16,8 Jahre). Alle Kinder wurden nach AIEOP-BFM-2000 oder -2009 Studienprotokoll therapiert.

Von den 33 Patienten erlitten 4 Patienten ein Rezidiv, ein Patient drei Rezidive (Rezidivrate: 15,15%). Die Rezidivtherapie erfolgte anhand der InReALL 2010 oder ALL-REZ-BFM 2012 Studienprotokolle.

Ausgeschlossen wurden sowohl alle anderen Leukämieformen, als auch Proben, die aufgrund technischer Gegebenheiten einer differenzierten Analyse nicht zugänglich waren.

#### **2.1.2 Kontrollgruppe (KG)**

Die knochenmarksgesunde Vergleichsgruppe bestand aus 24 Patienten, bei denen eine maligne Knochenmarkserkrankung ausgeschlossen werden musste. Eine Knochenmarkentnahme bei völlig gesunden Kindern ist ethisch nicht vertretbar. Hauptdiagnosen dieser Patienten waren Ewing-Sarkome, Erkrankungen des

rheumatischen Formkreises oder Neuroblastome. Das Alter der Kinder lag im Mittel ebenfalls bei 7 Jahren (0,25 bis 15,6 Jahre), davon waren 15 männlich und 9 weiblich. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Hinweis auf eine hämatologische Grunderkrankung, die Einfluss auf Zellreifung und –differenzierung hämatopoetischer Zellen haben könnte, z. B. myelodysplastische Syndrome, Fanconi-Anämien oder Lymphome oder aber auch solche mit einem Knochenmarksbefall durch die Grunderkrankung (Sarkom).

**Tabelle 6:** Übersicht Patientenkollektiv

Gruppe	Panel 1	Panel 2	Gesamt
cALL	17	16	<b>33</b>
KG	7	17	<b>24</b>

## 2.2 Durchflusszytometrie

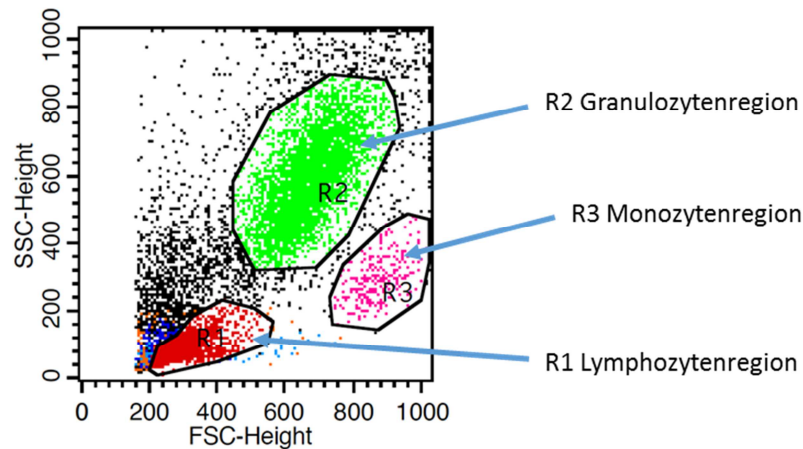
Die Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence-activated cell sorting) ist eine Methode zur quantitativen Analyse von Zellen <sup>[39, 40]</sup>.

Grundlage dabei ist die Ablenkung von Licht durch eine Zelle bzw. die Fluoreszenzemission von an die Zelle mittels Antikörpern gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen.

Das abgelenkte Licht wird von Detektoren gemessen: Bei einem FACS Gerät mit vier Fluoreszenzdetektoren sind dies der forward scatter Detektor (FSC), der die Größe der Zelle misst, der side scatter Detektor (SSC), der der Granulierung einer Zelle entspricht und die vier Detektoren für die Farbstoffe Fluorescein (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex (PerCP) und Allophycocyanine (APC). Je mehr Antikörper eine Zelle gebunden hat, desto höher ist die Fluoreszenz. Diese ist also ein Maß für die Expressionsdichte des entsprechenden Antigens.

Die Darstellung der Informationen findet in sogenannten Plots statt. Hier können Regionen (R) gesetzt werden und diese zu Gates (G) verknüpft werden, so dass die näher zu analysierenden Zellpopulationen ausgewählt und von den restlichen vorhandenen events isoliert betrachtet werden können <sup>[40]</sup>.

So kann jeder Zelle, jedem event, eine Kombination von Eigenschaften zugeordnet und meist eine Identifizierung der Zellpopulation vorgenommen werden (Abb. 2)<sup>[40, 41]</sup>.



**Abbildung 2:** SSC vs. FSC-Plot: KG 0.5.2; Tube 10.ALL, no Gate

Die Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe überlappen sich zum Teil. Hinzu kommt eine gewisse Eigenfluoreszenz der Zellen. Um dennoch die Trennschärfe zu erhalten, wird eine Kompensation mit Isotypen (ISO) durchgeführt. ISO sind Antikörper mit entsprechendem Fluoreszenzfarbstoff, aber ohne spezifischer Bindungsstelle auf humanen Zellen, entsprechen also einer Negativkontrolle<sup>[42]</sup>.

Alle Messungen der vorliegenden Arbeit wurden an einem FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company, BD, Heidelberg) durchgeführt und mittels BD CellQuest Pro Software Version 5.2.1 ausgewertet.

### 2.3 Panel

Die verwendeten Färbungen waren Teil der Routinediagnostik bei Verdacht auf maligne Erkrankung des KMs an der Universitätskinderklinik Würzburg. Ausgewertet wurden 29 Antikörper bzw. 26 Antigene.

In den Jahren 2006 bis 2008 war eine Antikörperkombination (Markerkombination) gebräuchlich, die im Folgenden als Panel 1 bezeichnet wird (Tab. 7).

**Tabelle 7:** Panel 1; grau hinterlegte Marker wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.  
Tube Nummerierung: acute myeloid leukemia (AML); Isotypenkontrolle (ISO)

Tube	FITC	PE	PerCP	APC
1. ALL	ISO ALL			
2. ALL	CD 19	CD 10	CD 20	CD 22
3. ALL	Lambda	Kappa	HLA-DR	CD 19
4. ALL	CD 19	CD 10	CD 34	CD 45
5. ALL	CD 58	CD10	CD 19	CD 38
6. ALL	CD 19	CD 21	CD 34	CD 33
7. ALL	CD8	CD 4	CD 3	CD 45
8. ALL	CD 7	CD 1a	CD 3	CD 5
9. ALL	TCR gamma/delta	TCR alpha/beta	CD 3	CD 2
10. ALL	CD 19	CD 10	CD 45	CD 11b
10. AML	ISO AML			
11. AML	CD15	CD13	CD34	CD33
12. AML	CD 15	CD 87	HLA-DR	CD33
13. AML	CD10	CD 133/1+2	CD34	CD45
14. AML	CD 61	GlyA	CD42a	CD45
15. AML	CD65w	CD64	CD34	CD14
16. AML	CD24	CD117	CD34	CD33
24. F+P	ISO F+P			
25. F+P	cyMPO	CD56	CD34	CD33
26. F+P	cyTdT	CD99	CD3	CD19
27. F+P	cyCD3	CD19	CD3	CD79a

Im Jahr 2008 wurde das Panel aufgrund neuer Erkenntnisse modifiziert, so dass ab 2008 für alle Patienten eine veränderte Markerkombination angewendet wurde. Diese wird im Folgenden als Panel 2 bezeichnet (Tab. 8).

**Tabelle 8:** Panel 2; grau unterlegte Marker wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.  
Tube Nummerierung: Myeloisch dysplastisches Syndrom (MDS); Fix and Perm (F+P)

Tube Nr.	FITC	PE	PerCP	APC
1. ISO ALL	ISO ALL			
2. ALL	CD 19	CD 10	CD 20	CD 22
3. ALL	CD 19	CD 10	CD 45	CD 34
4. ALL	CD 19	CD 21	CD 45	CD 34
5. ALL	Lambda	Kappa	CD 45	CD 34
6. ALL	CD 24	CD 19	CD 45	CD 38
7. ALL	CD 7	CD 1a	CD 3	CD 34
8. ALL	CD 8	CD 4	CD 3	CD 45
9. ALL	cdTCR	abTCR	CD 3	CD 5
10. ALL	CD 25	CD 56	CD 45	CD 34
ISO MDS 1	ISO MDS 2			
11. MDS 1	HLA-DR	CD 117	CD 45	CD 34
13. MDS 1	HLA-DR	CD 123	CD 45	CD 34
15. MDS 1	CD 65	CD 87	CD 45	CD 34
16. MDS 1	CD 61	CD 33	CD 45	CD 34
17. MDS 1	CD 36	CD 64	CD 45	CD 34
ISO MDS 2	ISO MDS 2			
12. MDS 2	CD 11b	CD 13	CD 45	CD 34
14. MDS 2	IREM2	CD 14	CD 45	CD 34
ISO. F+P	ISO F+P			
19. F+P	CD 19	cyCD 79a	CD 45	CD 34
20. F+P	cyTdT	CD 19	CD 45	CD 34
21. F+P	cyMPO	CD 35	CD 45	CD 34
22. F+P	cyCD 3	CD 99	CD 3	CD 19
23. F+P	CD 3	CD 16/56	CD 8	CD 4

## 2.4 Gating Strategie

Zu Beginn stand die Identifizierung der Lymphozyten-/Blastenregion (Abb. 3A).

Hierzu wurde die Region R1 großzügig gesetzt, um auch große Blasten zu erfassen. In der KG wurde R1 restriktiver gewählt um, falls möglich, Monozyten dadurch klar abzugrenzen. Als Negativkontrolle dienten ungefärbten Zellen der gleichen Probe<sup>[43]</sup>,

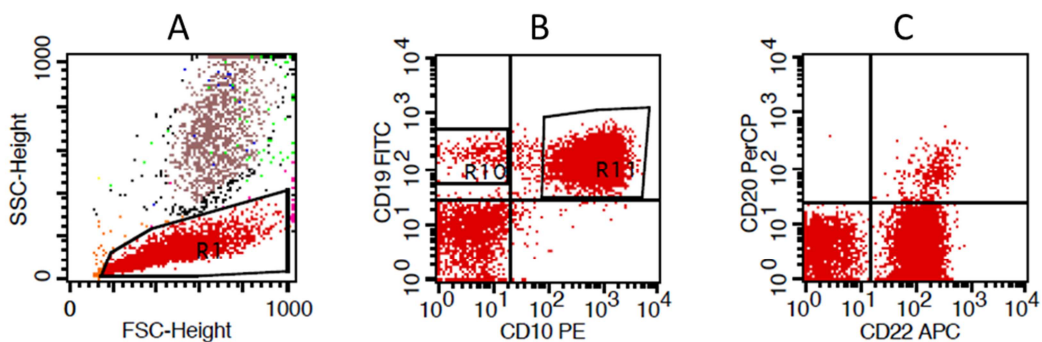
während zur Positivkontrolle positiv zu erwartende residuelle Zellen herangezogen wurden (siehe Tabelle 9 und 10).

Im Folgenden wird die Gatingstrategie abhängig vom gefärbten Panel, in den verschiedenen Gruppen beschrieben.

### 2.4.1 Leukämie-Patienten

Beispielhaft wird das Vorgehen am Pat. 25.1, im Panel 1, Tube 2: 19-10-20-22 gezeigt.

Nach Setzen eines Blasteneingangsgates (R1 in Abb. 3A) wurde die Antigenexpressionen isoliert für R1 betrachtet (Abb. 3B und C).



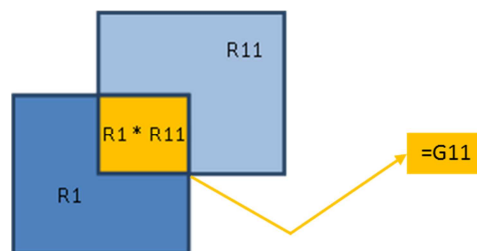
**Abbildung 3:** Pat. 25.1 Tube 2 (19-10-20-22)

**A** FSC/SSC Plot: Alle events werden angezeigt; R1: Blastenregion

**B** Gate G1 = R1; CD19 FITC vs. CD10 PE Plot; R10 Residuelle B-Zellen, R11: Blasten

**C** Gate G1 = R1; CD20 PerCP vs. CD22 APC Plot

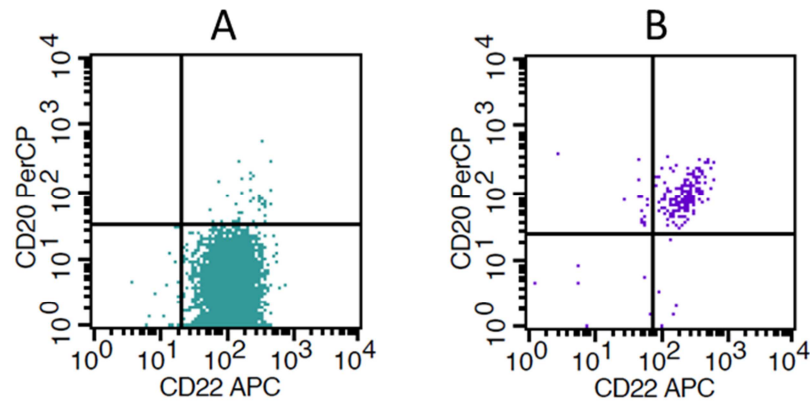
Naive residuelle B-Zellen wurden hier als  $CD10^{\text{negativ}} CD19^{\text{positiv}}$  (R10 in Abb. 3B) und leukämische Blasten als  $CD10^{\text{hochpositiv}} CD19^{\text{positiv}}$  (R11 in Abb. 3B) definiert. Anschließend muss die Anweisung zur Erstellung der Gates an das Programm gegeben werden: G10 ist definiert durch R1 and R10 ( $R1 * R10$ ) bzw. G11 durch R1 and R11 ( $R1 * R11$ ). Dies führt dazu, dass nur solche Zellen betrachtet werden, die sowohl in R1 als auch in R10 bzw. R11 liegen (Abb. 4).



**Abbildung 4:** Logische Verknüpfung von Regionen (R) zu Gates (G)



Die nachfolgenden Plots zeigen die Antigenexpression für das Gate G10, welches isoliert die residuellen normalen B-Zellen darstellt (Abb. 5B) und G11 für die Blasten (Abb. 5A). So wird die richtige Auswahl des Gates bzw. der Verknüpfung überprüft (Backgating).

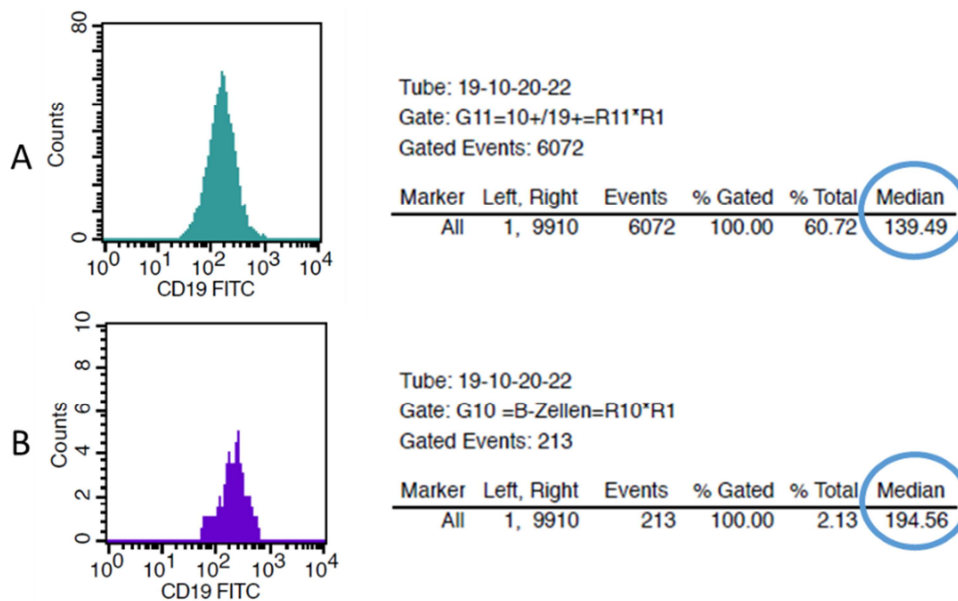


**Abbildung 5:** Pat. 25.1 Tube 2 19-10-20-22

**A** Expression von CD20 und CD22 auf Blasten G11 = R1 und R11

**B** Expression von CD20 und CD22 auf gesunden naiven B-Zellen G10 = R1 und R10

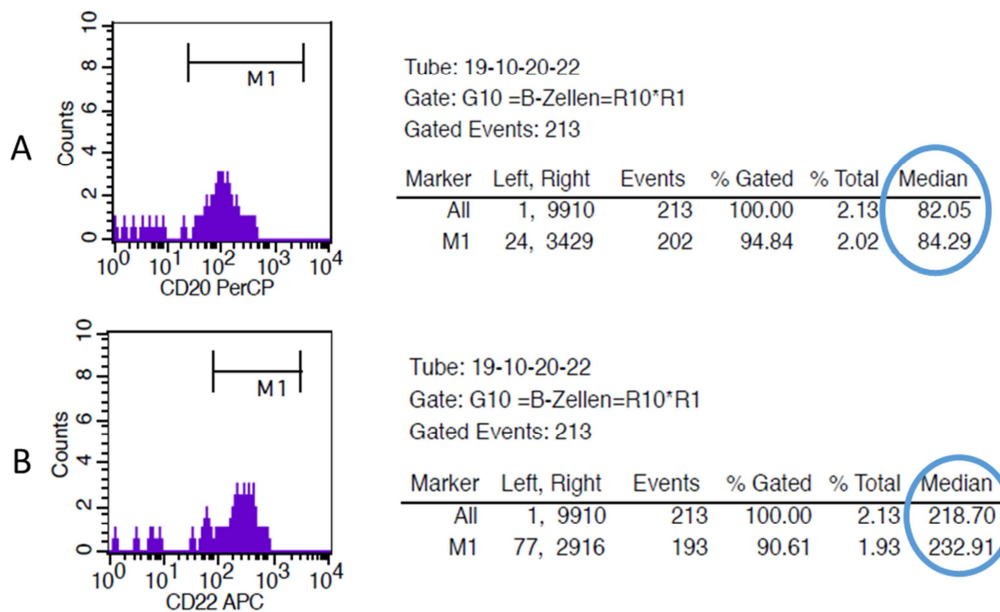
Jeder Marker wurde dann, jeweils für gesunde und maligne Zellen, in einem separaten Histogramm dargestellt und die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der jeweiligen Zellpopulation abgelesen (Kreis in Abb. 6).



**Abbildung 6:** Pat. 25.1: Histogramme und Statistik für CD19 FITC auf **A** Blasten G11; **B** residuelle normalen B-Zellen G10

Nicht immer konnte rein nach diesem Schema verfahren werden.

So liegt in Abb. 5B die Hauptpopulation der B-Zellen im rechten oberen Quadranten während in den übrigen Quadranten nur wenige events zu finden sind. Ist die Hauptpopulation klein (<100 Ereignisse), führen diese Artefakte zu einer erheblichen Verschiebung des Medians. Um dem entgegenzuwirken, wurden Artefakte durch das Setzen von sogenannten marker bounds (M) in den Histogrammen ausgeschlossen (Abb.7).



**Abbildung 7:** Pat. 25.1; residuelle normale B-Zellen (G10) Histogramm mit M1

**A:** CD20 PerCP

**B:** CD22 APC

Die Grenzen der Marker bounds wurden entweder anhand von Isotypenkontrollen, oder durch nicht gefärbte Zellen der gleichen Probe gewählt.

Die Definition der zu analysierenden Zellen wurde in Abhängigkeit der Markerkombination im jeweiligen Tube vorgenommen.

Die nachfolgenden Tabellen 9 und 10 zeigen die standardmäßig verwendeten Definitionen von Blasten und Vergleichspopulation (z. B. residuelle normale B-Zellen, Granulozyten etc.).

**Tabelle 9:** Panel 1; Definition der Gates in der cALL Gruppe

- bezeichnet negative Zellen; + bezeichnet low positive Zellen; ++ bezeichnet high positive Zellen

wenn nicht anders gekennzeichnet liegen die ausgewählten Zellen in R1

Tube Nr.	Definition Blasten	Definition residuelle normale Zellen
2.	CD19+/CD10+	CD19+/CD10-
4.	CD19+/CD10+	CD19+/CD10-
5.	CD19+/CD10+	CD19+/CD10-
6.	CD19+/CD34+ od. -	CD19+/CD34- Granulozyten über SSC/FSC für CD33- Koexpression
11.	G1 oder CD34+	Granulozyten über SSC/FSC für CD33- Koexpression
13.	CD10+/CD45low/- oder CD34+/CD45low/-	CD34-/CD45+ oder CD10-/CD45+
16.	CD24+/CD34+	Granulozyten über SSC/FSC für CD117- Koexpression
25.	CD34+ oder cyMPO-/CD56-	Granulozyten über SSC/FSC für cyMPO- Koexpression
26.	CD19+/cyTdT+ oder CD19+/CD99++	CD19+/cyTdT- oder CD19+/CD99+

**Tabelle 10:** Panel 2 Definition der Gates in der cALL Gruppe

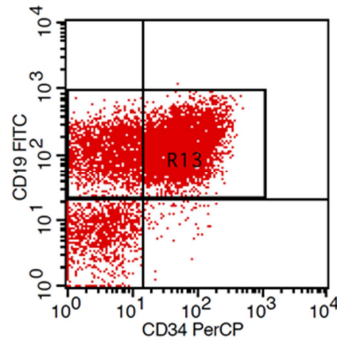
- bezeichnet negative Zellen; + bezeichnet low positive Zellen; ++ bezeichnet high positive Zellen

wenn nicht anders gekennzeichnet liegen die ausgewählten Zellen in R1

Tube Nr.	Definition Blasten	Definition residuelle normale Zellen
2.	CD19+/CD10+	CD19+/CD10-
3.	CD19+/CD10+	CD19+/CD10-
4.	CD19+/CD45low/ CD34+/CD45+ bis -	CD19+/CD45++ oder CD34-/CD45++
6.	CD19+/CD45+ bis -	CD19+/CD45++
10.	CD34+/CD45+ bis -	CD34-/CD45++
11.	CD34+/CD45+ bis -	SSC/CD45++ Monozyten
12.	CD34+/CD45+ bis -	SSC/CD45++ Granulozyten
13.	CD34+/CD45+ bis -	SSC/CD45++ Monozyten
16.	CD34+/CD45+ bis -	SSC/CD45++ Granulozyten
17.	CD34+/CD45+ bis -	SSC/CD45++ Monozyten
19.	CD34+/CD45+ bis – ev. zusätzlich CD19+/cyCD79a+	CD34-/CD45++ oder CD19+/cyCD79a+/ CD34-/CD45++
20.	CD34+/CD45+ bis – ev. zusätzlich CD19+	CD34-/CD45++ oder CD19+/ CD34-/CD45++
21.	CD34+/CD45+ bis –	SSC/CD45++ Granulozyten
22.	CD19+/CD99++	CD19+/CD99+

Eine Anpassung der Gates an individuelle Besonderheiten musste im Einzelfall erfolgen.

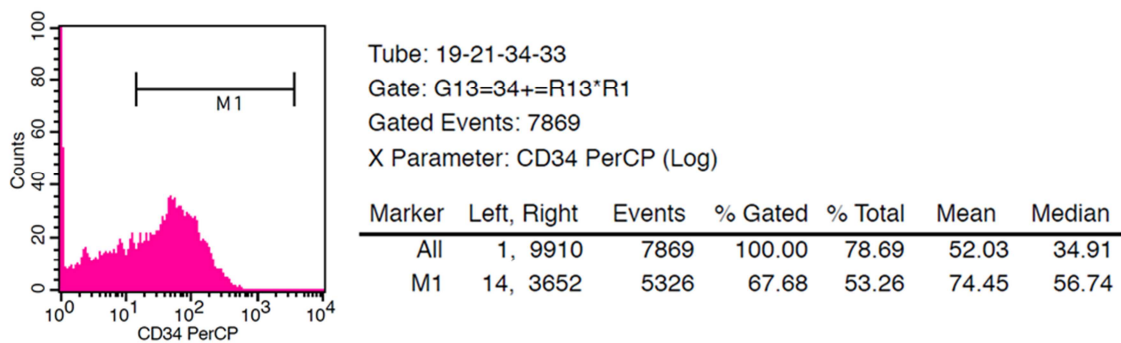
Z. B. hat eine sehr hohe Blastenlast die Konsequenz, dass residuelle normale Zellen insbesondere gesunde B-Zellen nicht abgegrenzt werden konnten. Der entsprechende Wert wurde als fehlend gekennzeichnet, und alle im Gate vorhandenen Zellen als Blasten gewertet (Abb. 8). So kommt es zwar zu Mischpopulationen, durch die hohe Blastenlast mit teilweise >90% ist der entstehende Fehler jedoch als gering einzuschätzen (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Pat. 19.1; Tube 6 19-21-34-33; G1 = R1

In R13 liegen sowohl gesunde B-Zellen (CD19+/CD34-), als auch maligne Blasten

Hier zeigt sich auch eine weitere Besonderheit, nämlich die heterogene Expression von Antigenen auf Blasten. So ist ein Teil der Blasten CD34 positiv, ein anderer CD34 negativ. Für die statistische Auswertung des CD34 Antigens wurde in solchen Fällen nur die CD34 positive Blastenpopulation berücksichtigt (M1 in Abb. 9).



**Abbildung 9:** Pat. 19.1: Tube 6: 19-21-34-33; Blasten im Histoplot; setzen von M1

Die Auswertung für CD34 PerCP und CD34 APC wurde auf diese Weise durchgeführt bei den Patienten 14.2, 17.2, 19.1, 26.1, 29.1, 30.1 und 34.1.

Die MFI Werte für die Rezidive wurden in gleichartiger Weise generiert.

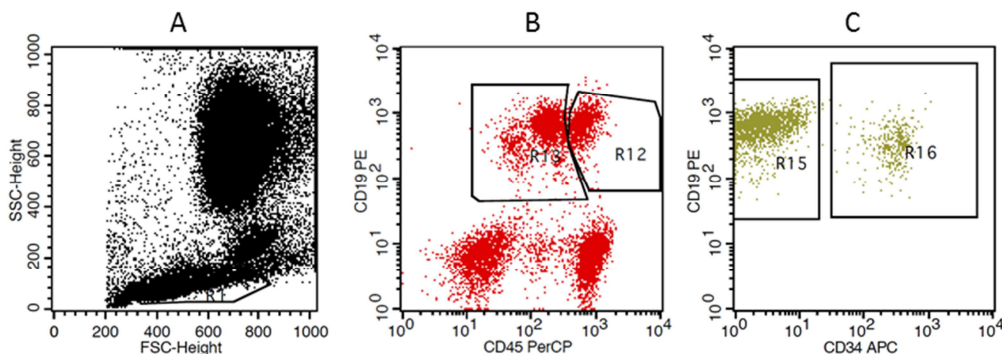
## 2.4.2 Kontrollgruppe

Wie in der Einleitung gezeigt lässt sich die Hämatopoese der B-Zelle unterschiedlich einteilen. In vorliegender Arbeit wurden, ähnlich wie bei Sedek et al., die beiden vorherrschenden Einteilungssysteme kombiniert und folgende Definitionen gewählt (Tab. 11):

**Tabelle 11:** Definition der B-Zellvorläufer

Marker	Pre-BI = H1	Pre-BII = H2	Unreife B-Zelle = H3	Reife B-Zelle
Linienpezifisch				
CD22	+	+	+	++
cyCD79 $\alpha$	+	+	+	+
CD19	+	+	+	+
Differenzierung				
CD45	+	++	+++	+++
CD20	-	-	+	+
CD10	+++	++	+	-
CD34	+	-	-	-
CD24	++	++	++	+
CD38	++	++	++	+
cy-TdT	+	+/-	-	-

Gezeigt wird das Vorgehen beispielhaft an KG 0.3.2, Panel 2, Tube 20 cyTdT-19-45-34. Im ersten Schritt wurde das Lymphozyteneingangsgate (R1), möglichst unter Ausschluss der Monozyten, gesetzt (Abb. 10A). Anschließend wurde isoliert R1 bezüglich der Markerexpression auf den Zellen betrachtet (Abb 10B). Es erfolgte eine weitere Verknüpfung der Region R1 mit R13 zu G13 für die B-Zellvorläufer und R1 mit R12 zu G12 für die reiferen B-Zellen. In G13 liegen demnach Zellen, die schon CD19 exprimieren aber CD45 noch nicht vollständig hoch reguliert haben. Abb. 10C untersucht diese Zellen auf ihre CD34 Expression. Hier lassen sich die CD34<sup>+</sup> Pre-BI Zellen (H1) in R16 von den CD34<sup>-</sup> Pre-BII Zellen (H2) in R15 unterscheiden [2, 4, 8]. Für CD34 wurden nur H1 Zellen ausgewertet.



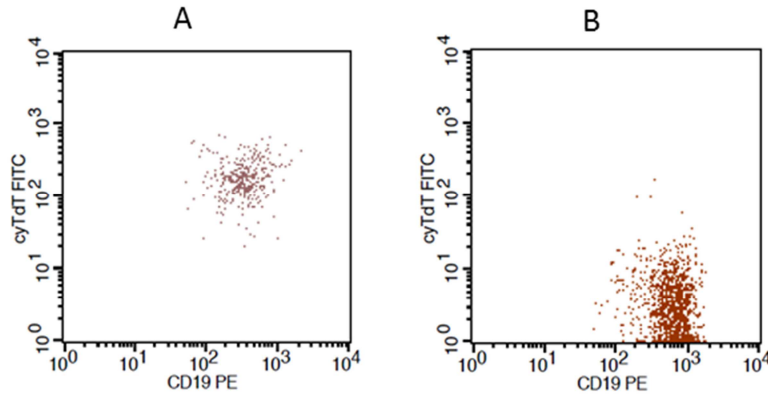
**Abbildung 10:** KG 0.3.2 Tube 20: cyTdT-19-45-34;

**A** SSC/FSC Plot; R1: Lymphozytenregion

**B** G1; R12: CD45<sup>high+</sup>/CD19<sup>+</sup> unreife und reife B-Zellen; R13: CD45<sup>low+</sup>/CD19<sup>+</sup> B-Zellvorläufer

**C** G13 = CD19<sup>+</sup>/CD45<sup>low+</sup>; R15: Pre-BII Zellen (H2); R16: Pre-BI Zellen (H1)

Die nachfolgenden Plots (Abb. 11) dienen der Kontrolle (backgating) und zeigen die vorhandene Expression von cyTdT auf Pre-BI Zellen (H1) bzw. den Verlust der cyTdT Expression auf Pre-BII Zellen (H2).

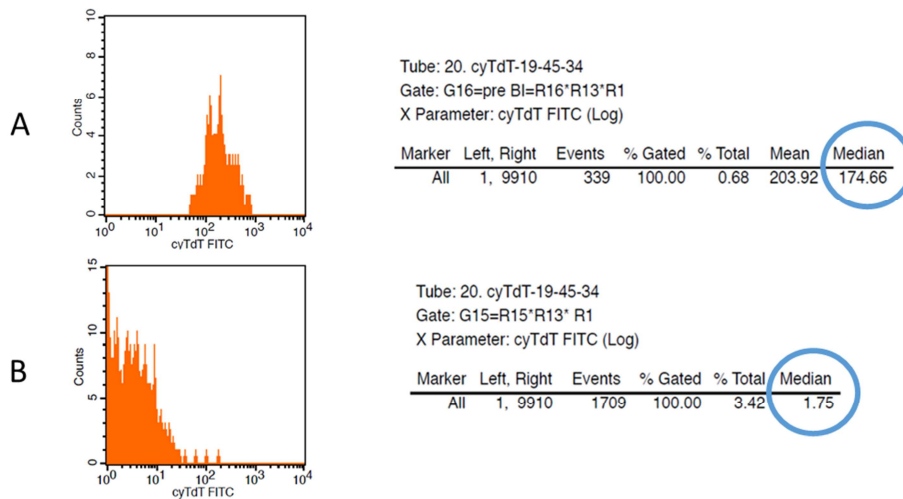


**Abbildung 11:** KG 0.3.2 Tube 20

**A** G16 (R1\*R13\*R16) = Pre-BI (H1) = CD19<sup>+</sup>/CD45<sup>low+</sup>/CD34<sup>+</sup>/cyTdT<sup>+</sup>

**B** G15 (R1\*R13\*R15) = Pre-BII (H2) = CD19<sup>+</sup>/CD45<sup>low+</sup>/CD34<sup>-</sup>/cyTdT<sup>-</sup>

Den Histograms mit zugehörigen Statistiken wurden die Mediane entnommen (Abb. 12).



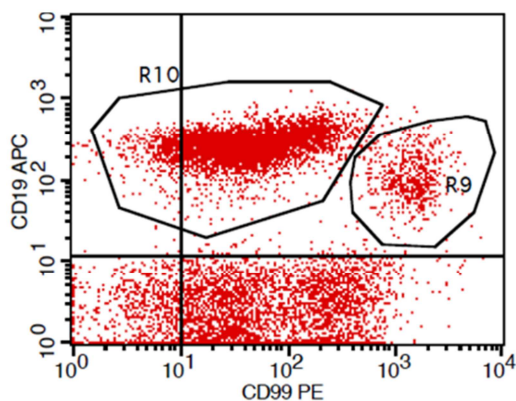
**Abbildung 12:** KG 0.3.2 Histograms für cyTdT FITC

**A:** G16 = Pre-BI (H1)

**B:** G15 = Pre-BII (H2)

Nicht immer war ein derart differenziertes Vorgehen möglich. Abhängig von der Markerkombination im Tube wurden die Gates entsprechend verschieden gewählt.

So wurde in Panel 2 Tube 22 bzw. die Antikörper CD19 APC und CD99 PE wie folgt ausgewertet. In der KG zeigten sich bei den CD19+ Zellen in jedem Fall zwei Populationen: die CD99<sup>++</sup>/CD19<sup>+</sup> Population (G9 = R1\*R9) wurden als unreifer gegenüber der CD99<sup>+</sup>/CD19<sup>++</sup> Population (G10 = R1\*R9) definiert (Abb. 13).



**Abbildung 13:** CD99 PE vs. CD19 APC Plot; KG 0.1.2 Tube 22; der Plot beinhaltet Zellen in G1; R9 = CD19<sup>+</sup> Vorstufen, R10 = reifere Zellen

Die Tab. 12 und 13 zeigt die verwendete Definition in den ausgewerteten Tubes.

**Tabelle 12:** Panel 1; Definition der Gates in der Kontrollgruppe

- bezeichnet negative Zellen; + bezeichnet low positive Zellen; ++ bezeichnet high positive Zellen; Wenn nicht anders gekennzeichnet liegen die ausgewählten Zellen in R1<sup>[2, 4, 7, 8]</sup>

Tube Nr.	Definition Vorläufer	Definition ausgereifter Zellen
2.	Pre-BI (H1): CD10 <sup>++</sup> / CD20 <sup>-</sup> Pre-BII (H2): CD10 <sup>+</sup> / CD20 <sup>-</sup> bis + unreife B-Zelle (H3): CD10 <sup>+</sup> / CD20 <sup>++</sup>	CD19 <sup>+</sup> /CD10 <sup>-</sup>
4.	Pre-BI (H1): CD19 <sup>+</sup> /CD10 <sup>+</sup> /CD34 <sup>+</sup> Pre-BII (H2): CD19 <sup>+</sup> /CD10 <sup>+</sup> /CD34 <sup>-</sup>	CD19 <sup>+</sup> /CD10 <sup>-</sup>
5.	Pre-BI H1: CD19 <sup>+</sup> /CD10 <sup>++</sup>	CD19 <sup>+</sup> /CD10 <sup>-</sup>
6.	Pre-BI (H1): CD19 <sup>+</sup> /CD34 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup> /CD34 <sup>-</sup> SSC/FSC Granulozyten
11.	CD34 <sup>+</sup> Vorläufer = HSC bis Pre-BI (H1)	SSC/FSC Granulozyten
13.	Pre-BI (H1): CD10 <sup>+</sup> /CD34 <sup>+</sup>	CD34 <sup>-</sup> /CD45 <sup>++</sup>
16.	CD117 <sup>+</sup> /CD34 <sup>+</sup>	SSC/FSC Granulozyten
25.	CD34 <sup>+</sup> Vorläufer = HSC bis Pre-BI	SSC/FSC Granulozyten
26.	CD19 <sup>+</sup> /CD99 <sup>++</sup>	CD19 <sup>+</sup> /CD99 <sup>+</sup>



**Tabelle 13:** Panel 2; Definition der Gates in der Kontrollgruppe

- bezeichnet negative Zellen; + bezeichnet low positive Zellen; ++ bezeichnet high positive Zellen; wenn nicht anders gekennzeichnet liegen die ausgewählten Zellen in R1<sup>[2, 4, 7, 8]</sup>

Tube Nr.	Definition Vorläufer	Definition reifer Zellen
2.	Pre-BI (H1): CD10 <sup>++</sup> /CD20 <sup>-</sup> Pre-BII (H2): CD10 <sup>+</sup> /CD20 <sup>-</sup> bis + unreife B-Zelle (H3): CD10 <sup>+</sup> /CD20 <sup>++</sup>	CD19 <sup>+</sup> /CD10 <sup>-</sup>
3.	Pre-BI (H1): CD19 <sup>+</sup> /CD10 <sup>+</sup> /CD34 <sup>+</sup> Pre-BII (H2): CD19 <sup>+</sup> /CD10 <sup>+</sup> /CD34 <sup>-</sup>	CD19 <sup>+</sup> /CD10 <sup>-</sup>
4.	Pre-BI (H1): CD19 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> /CD34 <sup>+</sup> Pre-BII (H2): CD19 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> /CD34 <sup>-</sup>	CD19 <sup>+</sup> /CD45 <sup>++</sup>
6.	Pre-BI (H1): CD19 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> Pre-BII (H2): CD19 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup> /CD45 <sup>++</sup>
10.	CD34 <sup>+</sup> Vorläufer = HSC bis Pre-B (H1)	CD34 <sup>-</sup> /CD45 <sup>++</sup>
11.	CD34 <sup>+</sup> Vorläufer = HSC bis Pre-BI (H1)	SSC/CD45 <sup>++</sup> Monozyten
12.	CD34 <sup>+</sup> Vorläufer = HSC bis Pre-BI (H1)	SSC/CD45 <sup>++</sup> Granulozyten
13.	CD34 <sup>+</sup> Vorläufer = HSC bis Pre-BI (H1)	SSC/CD45 <sup>++</sup> Monozyten
16.	CD34 <sup>+</sup> Vorläufer = HSC bis Pre-BI (H1)	SSC/CD45 <sup>++</sup> Granulozyten
17.	CD34 <sup>+</sup> Vorläufer = HSC bis Pre-BI (H1)	SSC/CD45 <sup>++</sup> Monozyten
19.	Pre-BI (H1): CD19 <sup>+</sup> /CD10 <sup>+</sup> /CD34 <sup>+</sup> Pre-BII (H2): CD19 <sup>+</sup> /CD10 <sup>+</sup> /CD34 <sup>-</sup>	CD45 <sup>++</sup> /CD34 <sup>-</sup> oder CD19 <sup>+</sup> /cyCD79a <sup>+</sup> /CD45 <sup>++</sup> /CD34 <sup>-</sup>
20.	Pre-BI (H1): CD19 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> /CD34 <sup>+</sup> Pre-BII (H2): CD19 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> /CD34 <sup>-</sup>	CD34 <sup>-</sup> /CD45 <sup>++</sup> oder CD19 <sup>+</sup> /CD34 <sup>-</sup> /CD45 <sup>++</sup>
21.	CD34 <sup>+</sup> Vorläufer = HSC bis Pre-BI (H1)	SSC/CD45 <sup>++</sup> Granulozyten
22.	CD19 <sup>+</sup> /CD99 <sup>++</sup>	CD19 <sup>+</sup> /CD99 <sup>+</sup>

## 2.5 Statistische Auswertung

Zum Vergleich der Marker wurde die MFI der Histogramm-Statistik verwendet. Die meisten Marker kamen nur in einem Tube vor, so dass ein Wert pro Fallnummer vorhanden war. Manche Marker waren im Panel mehrfach vorhanden. Die Werte aus den verschiedenen Tubes wurden addiert und ein Mittelwert gebildet. Dies betraf sechs Marker: CD10 PE, CD19 FITC, CD19 PE, CD34 APC, CD45 PerCP und HLA-DR FITC. Für die Marker CD34 und CD45 sind zwei Besonderheiten zu erwähnen: zum einen waren die Antikörper mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen beladen. Es wurde eine zusammenfassende Auswertung vorgenommen. Zum anderen wurde das

Patientenkollektiv jeweils in positive und negative Blastenpopulationen aufgeteilt. Der MFI Grenzwert wurde nach explorativer Datenanalyse mit SPSS festgelegt (Tab. 14).

**Tabelle 14:** Marker, mit Aufteilung des Patientenkollektivs.

	n Gesamt	MFI Grenze	n +	% Anteil +	n -	% Anteil -
<b>CD34</b>	33	10	23	69,70	10	30,30
<b>CD34 PerCP</b>	17	10	11	64,71	6	35,29
<b>CD34 APC</b>	16	10	12	75,00	4	25,00
<b>CD45</b>	33	30	13	39,39	20	60,61
<b>CD45 PerCP</b>	16	30	6	37,50	10	62,50
<b>CD45 APC</b>	17	30	7	41,18	10	58,82

Die in Excel 2013 erstellte Tabelle wurde zur weiteren Analyse in SPSS 21 importiert. Einzelne Werte wurden aus der Erhebung ausgeschlossen. Die Entscheidungsfindung scheint subjektiv, wurde aber anhand von Q-Q-Plots, Verteilungskurven und mündlicher Rücksprachen getroffen und in jedem Fall sorgfältig abgewogen.

Für die Tests wurde der nicht parametrische Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben, bzw. der Wilcoxon-Test für verbundenen Stichproben gewählt.

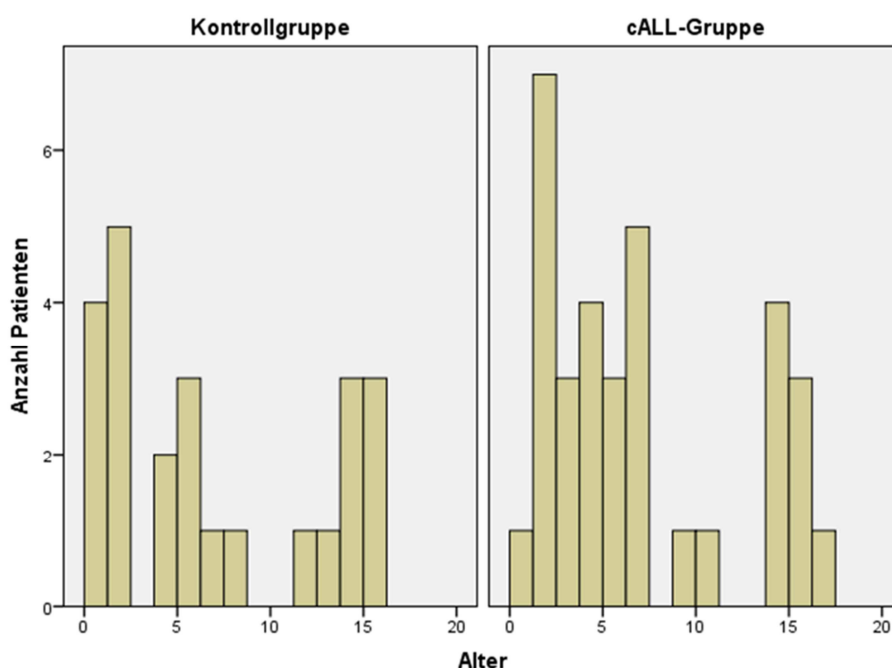
Als signifikant wurden p-Werte  $<0,05$  gewertet, bzw. nach Bonferroni-Korrektur korrigierte Werte ( $p\text{-Wert} = <0,05/k$ ;  $k = \text{Anzahl der Tests}$ )<sup>[44]</sup>.

Wann immer möglich wurde die exakte Signifikanz angegeben. Diese ist für Bindungen (Fälle gleichen Ranges) nicht korrigiert, was die Power des Tests erniedrigt, da aber der MFI stetig verteilt ist, waren nicht viele Bindungen zu erwarten. Ausnahmen sind Marker mit eindeutig negativer bzw. positiver Verteilung der Population. Die Ergebnisse verändernde Unterschiede zwischen asymptotischer und exakter Signifikanz waren nicht vorhanden. Weiterhin wurde untersucht, um wieviel Prozent der jeweilige MFI-Wert auf Blasten unter bzw. über dem kleinste, bzw. größten Wert auf B-Zellvorläufern lag und somit eindeutig von diesen zu unterscheiden war. Diese Werte wurden dann als die eigentliche Über- bzw. Unterexpression gewertet (Tab. 16). Für die Auswertung der Rezidive wurde das Vorgehen von Borowitz et al.<sup>[45]</sup> übernommen. Ein Shift wurde dabei als eine Veränderung des MFI Wertes ab einer halben Logarithmuspotenz festgelegt, ohne oder mit nur minimalen Überschneidungen zwischen ED und Rezidiv.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vergleich zwischen den Gruppen

Geschlecht und Alter zum Zeitpunkt der Diagnostik waren in beiden Gruppen gleich verteilt. Es waren in beiden Gruppen etwas mehr Jungen als Mädchen und bezüglich des Alters zeigten sich zwei Häufigkeitsgipfel. Der erste lag im Vorschulalter, der zweite im jugendlichen Alter (Abb. 14, Tab. 15).



**Abbildung 14:** Altersverteilung im Kollektiv

**Tabelle 15:** Geschlechtsverteilung im Kollektiv

Geschlecht		Gruppe		Gesamt
		KG	cALL	
männlich	Anzahl	15	19	34
	% innerhalb von Gruppe	62,50%	57,60%	59,60%
weiblich	Anzahl	9	14	23
	% innerhalb von Gruppe	37,50%	42,40%	40,40%
Gesamt	Anzahl	24	33	57

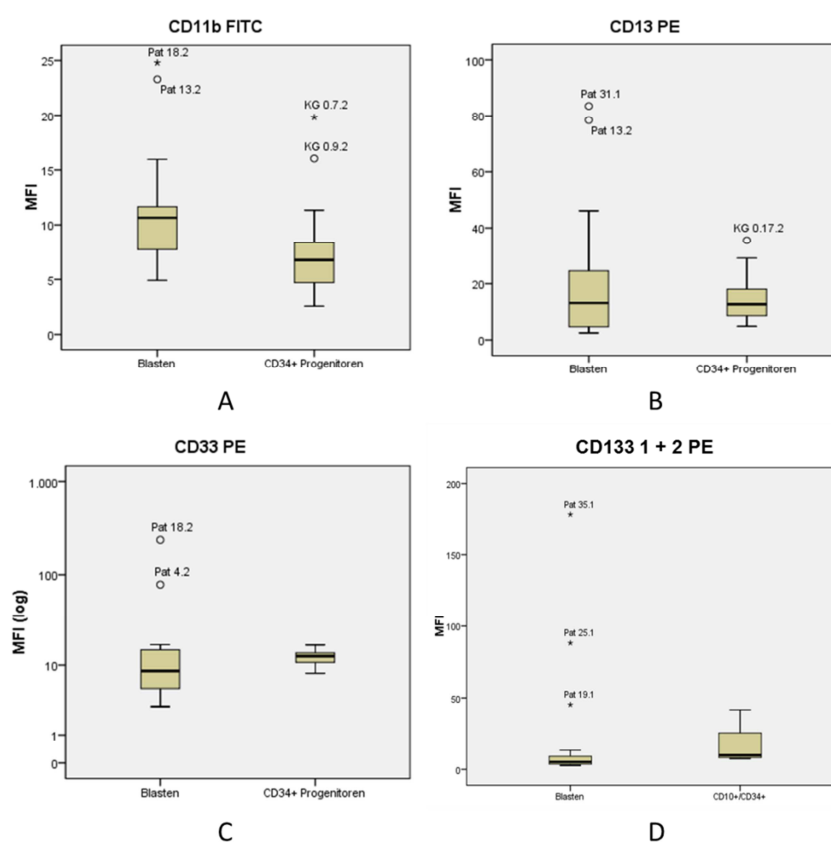
### 3.2 Marker ohne Unterschied zu den Vorläufern

Für einige Marker konnte kein signifikanter Unterschied zu den getesteten Vorstufen festgestellt werden. Solche Marker waren: CD11b, CD13, CD15, CD21, CD25, CD33, CD35, CD36, CD56, CD99, CD133 1+2, cyMPO und HLA-DR.

In Einzelfällen konnte aber eine blastäre Koexpression festgestellt werden, welche dann zur Diskriminierung gesunder von kranker Zellen beitragen konnte.

So wurde CD11b in 13% der Fälle (2 von 15 Fällen) coexprimiert, CD13 in 15,63% (5 von 32 Fällen), CD33 in 12,50% (2 von 16 Fällen) und CD133 1+2 in 17,65% (3 von 17 Fällen) (Abb. 15). Ein Patient exprimiert sowohl CD33 als auch CD11b, ein anderer CD13 und CD11b.

Bei den übrigen Markern gab es zwar einige Fälle mit höheren MFI Werten auf Blasten als auf Vorstufen, diese Unterschiede gingen allerdings entweder mit einer starken Unschärfe einher (CD21, CD35, CD99, HLA-DR, cyMPO), oder waren so diskret (CD25, CD56), dass eine sichere Unterscheidung nicht vorgenommen werden konnte.



**Abbildung 15:** Boxplot zur Expression von **A** CD11b, **B** CD13, **C** CD33 und **D** CD133 1+2

### 3.3 Marker mit signifikanten Unterschieden zu den Vorläuferzellen

**Tabelle 16:** Liste der Oberflächenmarker mit signifikantem Unterschied zwischen Blasten und normalen Zellen; k = Anzahl der Tests zwischen Blasten- und Normalkollektiv; nach Bonferroni korrigiertes neues Signifikanzniveau sind für jeden Marker im grünen Feld eingetragen. Unterstrichene p-Werte sind nach Korrektur nicht mehr signifikant. Unter den p-Werten ist die Richtung des Unterschiedes eingetragen und bezieht sich immer auf Blasten im Vergleich zur entsprechenden Spalte. Eine Tabelle der absoluten MFI Werte ist im Anhang zu finden. % Über-, Unterexpression: Eingetragen ist hier wie viel Prozent der MFI Werte auf Blasten über dem größten bzw. unter dem kleinsten MFI-Wert der Vergleichsgruppe liegen. Farbkodierung:

Blasten	Vorläufer (KG)	Reife Zellen (cALL)	Reife Zellen (KG)	Signifikante Werte	
<b>CD10 PE</b>	k	Bonferroni- Korrektur			
	5	< 0,01			
	H1	H2	H3	Lymphozyten	Lymphozyten
Blasten	0,582	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	gleich	höher	höher	höher	höher
% Überexpression	27,27	72,73	93,94	96,79	100
% Unterexpression	18,18	3,03	0,00	0,00	0,00
<b>CD11b FTIC</b>	3	< 0,017			
	CD34+			Granulozyten	Granulozyten
Blasten	0,021			0,001	< 0,001
	gleich			niedriger	niedriger
% Überexpression	13,33			0,00	0,00
% Unterexpression	0,00			100	100
<b>CD13 PE</b>	3	< 0,017			
	CD34+			Granulozyten	Granulozyten
Blasten	0,585			< 0,001	< 0,001
	gleich			niedriger	niedriger
% Überexpression	15,63			0,00	0,00
% Unterexpression	25,00			62,50	71,88€
<b>CD19 FITC</b>	5	< 0,01			
	H1	H2	H3	B-Zellen	B-Zellen
Blasten	< 0,001	< 0,001	0,129	0,768	0,747
	Höher	höher	gleich	gleich	gleich
% Überexpression	87,88	36,36	9,09	15,15	12,12
% Unterexpression	0,00	0,00	0,00	3,03	0,00
<b>CD19 APC</b>	3	< 0,017			
	19+/99++			19+/99+	19+/99+
Blasten	< 0,001			0,058	0,187
	höher			gleich	gleich
% Überexpression	93,75			12,50	12,50
% Unterexpression	0,00			0,00	0,00

Ergebnisse

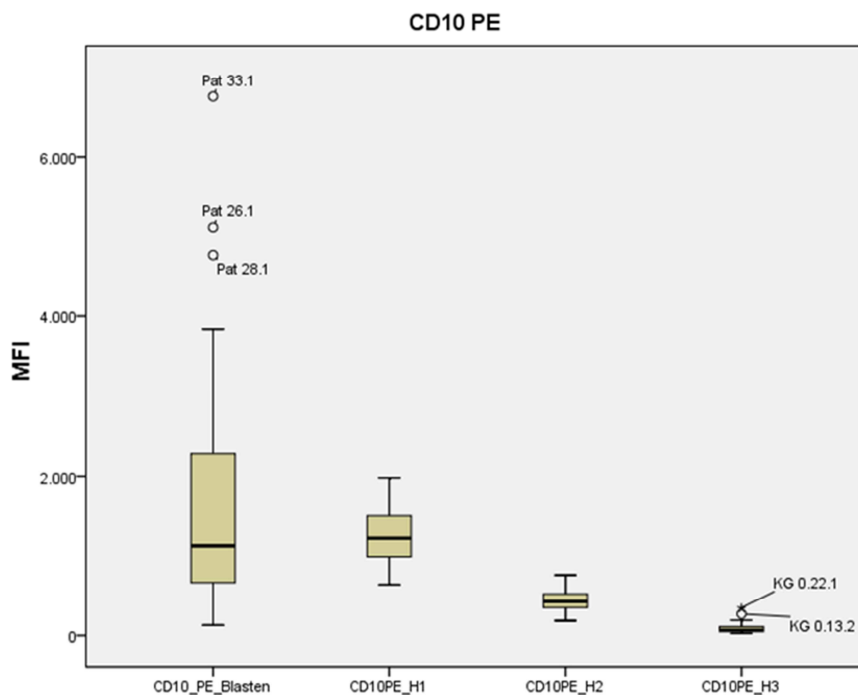
<b>CD20 PerCP</b>	5	< 0,01			
	H1	H2	H3	B-Zellen 20+	B-Zellen 20+
Blasten	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	<b>höher</b>	<b>niedriger</b>	<b>niedriger</b>	<b>niedriger</b>	<b>niedriger</b>
% Überexpression	24,24	9,09	0,00	0,00	0,00
% Unterexpression	0,00	27,27	100	93,94	96,97
<b>CD22 APC</b>	5	< 0,01			
	H1	H2	H3	B-Zellen 22+	B-Zellen 22+
Blasten	<b>0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	0,260	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	<b>höher</b>	<b>höher</b>	gleich	<b>niedriger</b>	<b>niedriger</b>
% Überexpression	57,58	57,58	0,00	0,00	0,00
% Unterexpression	0,00	0,00	6,06	9,09	57,58
<b>CD24 FITC</b>	4	< 0,013			
	H1	H2		B-Zellen	B-Zellen
Blasten	<u>0,043</u>	<b>0,004</b>		<b>0,003</b>	<u>0,027</u>
	gleich	<b>niedriger</b>		<b>höher</b>	gleich
% Überexpression	0,00	0,00		60,61	24,24
% Unterexpression	21,21	9,09		0,00	6,06
<b>CD34</b>	6	< 0,008			
	H1			Lymphozyten	Lymphozyten
Blasten MFI > 10	0,766			<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	gleich			<b>höher</b>	<b>höher</b>
Blasten MFI < 10	<b>&lt; 0,001</b>			0,878	0,305
	<b>niedriger</b>			gleich	gleich
% Überexpression	3,03			69,70	69,70
% Unterexpression	33,33			0,00	0,00
<b>CD38 APC</b>	4	< 0,013			
	H1	H2		Lymphozyten	Lymphozyten
Blasten	<b>0,002</b>	<u>0,030</u>		<b>&lt; 0,001</b>	0,071
	<b>niedriger</b>	gleich		<b>höher</b>	gleich
% Überexpression	3,70	3,70		29,63	14,81
% Unterexpression	44,44	3,70		0,00	0,00
<b>CD45</b>	8	< 0,006			
	H1	H2		Lymphozyten	Lymphozyten
Blasten MFI > 30	0,479	<b>&lt; 0,001</b>		<b>0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	gleich	<b>niedriger</b>		<b>niedriger</b>	<b>niedriger</b>
Blasten MFI < 30	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>		<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	<b>niedriger</b>	<b>niedriger</b>		<b>niedriger</b>	<b>niedriger</b>
% Überexpression	12,12	0,00		0,00	0,00
% Unterexpression	60,61	75,76		78,79	96,97
<b>CD58 FITC</b>	4	< 0,013			
	H1			B-Zellen	B-Zellen
Blasten	<u>0,027</u>			<b>0,004</b>	<b>0,005</b>

Ergebnisse

	gleich			<b>höher</b>	<b>höher</b>
Blasten MFI > 10	<b>0,005</b>				
	<b>höher</b>				
% Überexpression	36,36			90,91	90,91
% Unterexpression	9,09			9,09	9,09
<b>CD79α PE</b>	4	< 0,013			
	H1	H2		B-Zellen	B-Zellen
Blasten	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>		<u>0,013</u>	<u>0,013</u>
	<b>höher</b>	<b>höher</b>		gleich	gleich
% Überexpression	93,33	53,33		53,33	20,00
% Unterexpression	0,00	0,00		0,00	0,00
<b>CD99 PE</b>	3	< 0,017			
	19+/99++			19+/99+	19+/99+
Blasten	0,284			<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	gleich			<b>höher</b>	<b>höher</b>
% Überexpression	12,50			71,88	81,25
% Unterexpression	25,00			0,00	3,13
<b>CD117 PE</b>	3	< 0,017			
	CD34+/117+			Granulozyten	Granulozyten
Blasten	<b>&lt; 0,001</b>			<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	<b>niedriger</b>			<b>niedriger</b>	<b>niedriger</b>
% Überexpression	0,00			6,06	6,06
% Unterexpression	100,00			66,67	84,85
<b>CD123 PE</b>	3	< 0,017			
	CD34+			Monozyten	Monozyten
Blasten	<b>0,001</b>			0,501	<u>0,031</u>
	<b>höher</b>			gleich	gleich
% Überexpression	68,75			0,00	62,5
% Unterexpression	0,00			18,75	18,75
<b>CD133 1+2 PE</b>	3	< 0,017			
	H1			Lymphozyten	Lymphozyten
Blasten	0,055			0,570	0,383
	gleich			gleich	gleich
% Überexpression	17,65			5,88	41,18
% Unterexpression	64,71			23,53	23,53
<b>cyTdT FITC</b>	4	< 0,013			
	H1	H2		B-Zellen	B-Zellen
Blasten	<b>0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>		<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	<b>niedriger</b>	<b>höher</b>		<b>höher</b>	<b>höher</b>
% Überexpression	3,13	81,25		90,63	81,25
% Unterexpression	37,50	0,00		0,00	0,00

Insgesamt streuten die MFI Werte auf B-Zellvorstufen in einem geringen Umfang. Die Expressionsmuster erschienen stabil und nachvollziehbar. Dagegen war die Streuung auf Blasten größer und undurchsichtiger. Gelegentlich ließen sich dennoch Rückschlüsse auf die Stufe des Reifungsstopps der Blasten schließen.

Die größte Ähnlichkeit zeigten Blasten zu Zellen der Stufe H1. So war für CD10 kein signifikanter Unterschied zwischen H1 und Blasten zu erheben, erwähnenswert ist aber eine erhebliche Überexpression in etwa 27% der Fälle. Da die CD10 Expression über die Reifung der B-Zellen abnimmt, ließen sich höher differenzierte Zellen signifikant von Blasten trennen. Es lagen etwa 73% der MFI Werte in der Blastenpopulation über den von H2, bzw. etwa 94% über den von H3 (Abb. 16).



**Abbildung 16:** Boxplot CD10 PE Expression; Die Box beinhaltet die Werte zwischen der 75% und der 25% Perzentile, der Strich in der Mitte stellt den Median dar (50% Perzentile). Darüber und darunter ist der größte bzw. der kleinste nicht extreme Wert durch die Balken angezeigt. Ausreißer sind in SPSS21 durch einen Kreis gekennzeichnet und sind definiert durch einen mehr als 1,5-fachen Abstand als die Höhe der Box. Extremwerte werden durch einen Stern gekennzeichnet und haben mehr als den 3-fachen Abstand zur Box<sup>[46]</sup>. Entsprechendes gilt für alle folgenden Boxplots.



Für CD34 und CD45 musste differenzierter betrachtet werden.

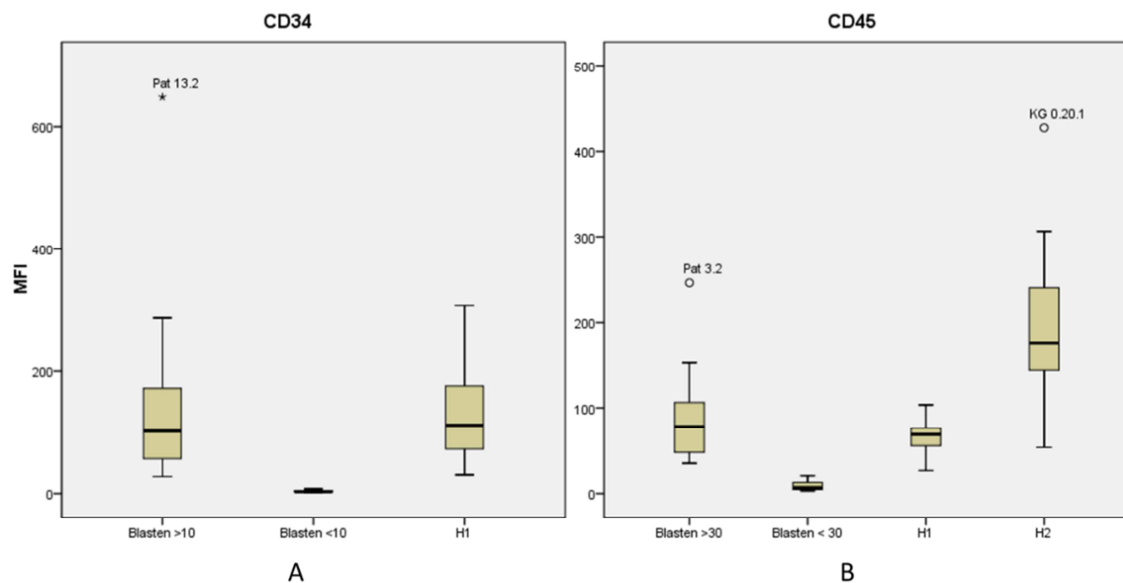
Zeigten die Blasten einen CD34-negativen Status konnten sie eindeutig von H1 Zellen unterschieden werden (10 von 33 Fälle; 30,30%).

In den übrigen Fällen (21,21% der Fälle zeigten Mischpopulationen, 48,49% waren CD34 positiv) konnte eine Diskriminierung zu H1 bezüglich CD34 nicht durchgeführt werden (Abb.17 A; Tab. 17).

Für CD45 galt ähnliches wie für CD34.

CD45-negative Blastenpopulationen (20 von 33 Fällen; 60,61%) ließen sich durch ihre niedrigere Expressionshöhe gut von H1 und H2 abgrenzen.

Dagegen ließen sich CD45-niedrigpositive Blastenpopulationen, bzw. heterogene Populationen (13 von 33 Fällen; 39,39%) allein durch CD45 nicht von H1 unterscheiden. Im Vergleich zu H2 zeigte sich eine signifikant niedrigere Expressionshöhe auf Blasten bei Auswertung über beide Farbstoffe (Abb.17 B; Tab. 17).



**Abbildung 17:** CD34 oder CD45 als Diskriminatoren **A** Boxplot CD34; die erste Box zeigt die Blasten mit MFI Werten > 10, die zweite Box mit MFI Werten < 10 **B** CD45 Expression; erste Box zeigt die Blasten mit MFI Werten > 30, die zweite Box mit MFI Werten < 30;

**Tabelle 17:** CD34 und CD45 Status der c-ALL Gruppe

	CD34+	CD34+/-	CD34-	Gesamt
Anz. der Pat.	16	7	10	33
%	48,49	21,21	30,30	100
	CD45+	CD45+/-	CD45-	Gesamt
Anz. der Pat.	11	2	20	33
%	33,33	6,06	60,61	100

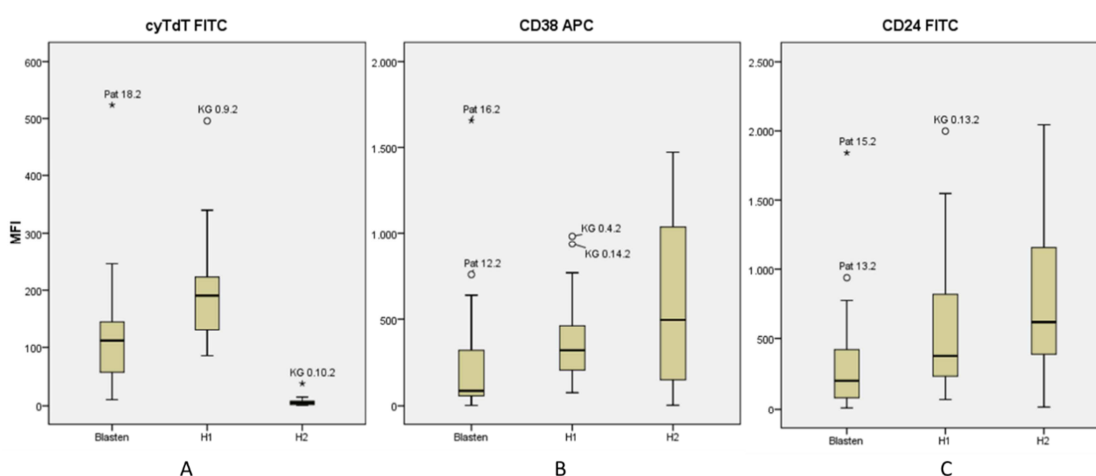
CyTdT FITC, CD38 APC und CD24 FITC waren auf Blasten im Vergleich zu H1 unterexprimiert.

Von 32 cALL Fällen war einer als cyTdT negativ zu werten (MFI-Wert: 10,65). Alle übrigen exprimierten das Antigen im mittleren bis hohen MFI Bereich. Blasten zeigten signifikant niedrigere MFI Werte als H1. 37,50% der MFI Werte auf Blasten lagen unter dem kleinsten MFI Werten der H1 Gruppe. Auf H2 ist cyTdT bereits negativ, so dass 81,25% der MFI Werte auf Blasten über den Werten der H2 Gruppe lagen (Abb.18 A).

CD38 APC und CD24 FITC zeigten in allen Gruppen stärkeren Schwankungen.

Für CD38 konnte ein signifikanter Unterschied zu H1 festgestellt werden. So lagen 44,44% der Blasten MFIs unterhalb des kleinsten Wertes der H1 Gruppe. Die Unterschiede zu H2 waren nicht signifikant (Abb.18 B).

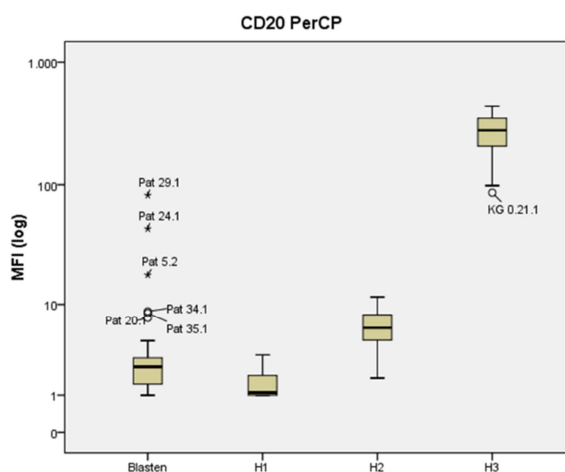
CD24 wird auf Blasten signifikant niedriger exprimiert als auf H2 (Abb. 18C). Zu H1 waren die Ergebnisse nach Bonferroni-Korrektur nicht mehr signifikant. Aufgrund der erwähnten starken Streuung sind die Unterschiede allerdings unscharf.



**Abbildung 18:** Boxplot der **A** cyTdT FITC, **B** CD38 APC und **C** CD24 FITC Expression

Dagegen war CD20 PerCP auf Blasten im Vergleich zu H1 signifikant höher exprimiert, im Vergleich zu H2 und H3 jedoch bereits unterexprimiert. Die absoluten Unterschiede waren allerdings klein, so dass eine eindeutige Diskriminierung schwierig blieb. 24,24% der MFI-Werte auf Blasten lagen über dem höchsten Wert der H1 Gruppe, während 27,27% der Fälle unter dem kleinsten Wert der H2 Gruppe lagen. CD20 war auf H3 hoch positiv, so dass hier die Diskriminierung zu den Blasten 100% betrug.

3 von 33 Fällen (9,1%) waren hoch positiv für CD20 und sehr gut von Hämatogonen zu trennen. Die oben genannten Ergebnisse veränderten sich auch nicht nach Ausschluss der positiven Fälle (Abb.19).



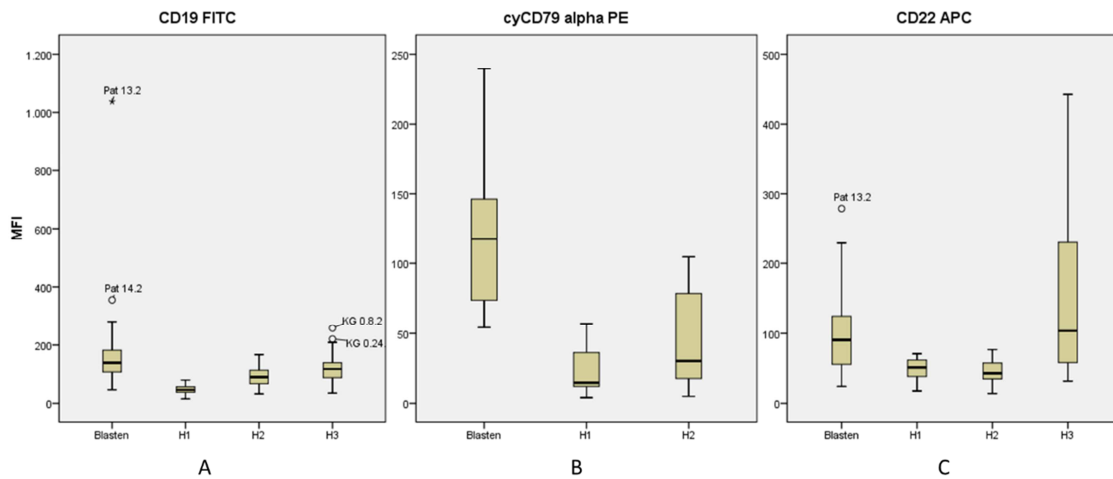
**Abbildung 19:** Boxplot der CD20 PerCP Expression; zur besseren Darstellung wurde die Skala logarithmiert

Während das Muster der Vorläufer- und Differenzierungsmarker auf Blasten eher denen von H1 ähnelten, waren die lymphatischen Marker auf Blasten deutlich höher exprimiert als auf frühen Vorläufern und ließen sich mit denen von reiferen Stufen der B-Zellentwicklung vergleichen.

So nahmen die B-Zellmarker CD19 FITC, cyCD79α PE und CD22 APC in ihrer Expression über die B-Zellreifung an Intensität zu. Blasten zeigten bereits eine hohe Expression dieser Marker, die auf dem Niveau von H3 oder sogar von ausgereiften B-Zellen lagen. Signifikante Unterschiede für diese drei Marker konnte zu H1 und H2 gesehen werden, wobei die Differenzierung unterschiedlich gut möglich war (Abb. 20):

Bei CD19 FITC lagen etwa 88% bzw. 36% der MFI Werte auf Blasten über dem höchsten Wert der H1 Zellen bzw. H2 Zellen (Abb. 20A). Bei cyCD79α PE waren sogar 93% der

MFI Werte der Blasten höher als der H1 Zellen (Abb. 20B) und für CD22 lagen 58% der Werte über denen von H1 und H2 Zellen. Zusätzlich konnte für CD22 eine Unterexpression auf Blasten im Vergleich zu reifen B-Zellen gesehen werden, letztere waren immer doppelt positiv für CD20 und CD22 und exprimierten beide Marker deutlich höher als Blasten (Abb.20C).



**Abbildung 20:** Boxplot zur **A** CD19 FITC, **B** cyCD79 α PE und **C** CD22 APC Expression

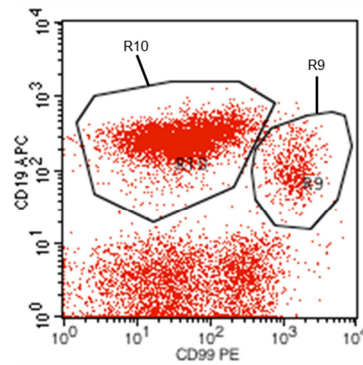
CD58, CD99, CD117 und CD123 waren weniger gut zu beschreiben.

Auf eine CD58 Expression wurden Blasten von 11 cALL-Patienten untersucht, wobei ein Fall als CD58 negativ anzusehen war (MFI Wert: 4,66). Alle anderen Patienten zeigten deutlich höhere Werte über 50. Nach Ausschluss des negativen Falls konnte eine signifikant höhere CD58 Expression auf Blasten im Vergleich zu H1 Zellen gezeigt werden, wobei eine Überexpression von 36,36% festgestellt werden konnte. Auch die Vergleiche zu den ausgereiften Kontrollen zeigten signifikant höhere Werte auf Blasten (Abb.22A).

Für CD99 war einer von 32 untersuchten Fällen CD99 negativ. Sonst war CD99 zwar homogen aber breit exprimiert, so dass sich für diesen Marker die größte Spannweite aller untersuchten Marker ergab (Spannweite Blasten: 8573,04). Die Vorläuferzellen konnten in diesem Tube weniger gut beschrieben werden. Es konnte lediglich CD19 APC als orientierender Marker der Reifungsstufe verwendet werden, so wurden aufgrund der niedrigeren CD19 APC Expression CD19+/CD99++ als unreifere

Vorläuferzellen deklariert (R9 in Abb. 21) und CD19<sup>++</sup>/CD99<sup>+</sup> Zellen, als reifere Stufen der B-Zellentwicklung betrachtet (R10 in Abb. 21)

Es exprimierten also Blasten CD19 APC auf Höhe der reiferen Stufen, mit deutlicher Überexpression (93,75% der Fälle) im Vergleich zu den Vorläufern, während kein signifikanter Unterschied für die Höhe der CD99 Expression zwischen Blasten und Vorläufern gesehen werden kann (Abb. 22B).



KG 0.1.2 Tube22

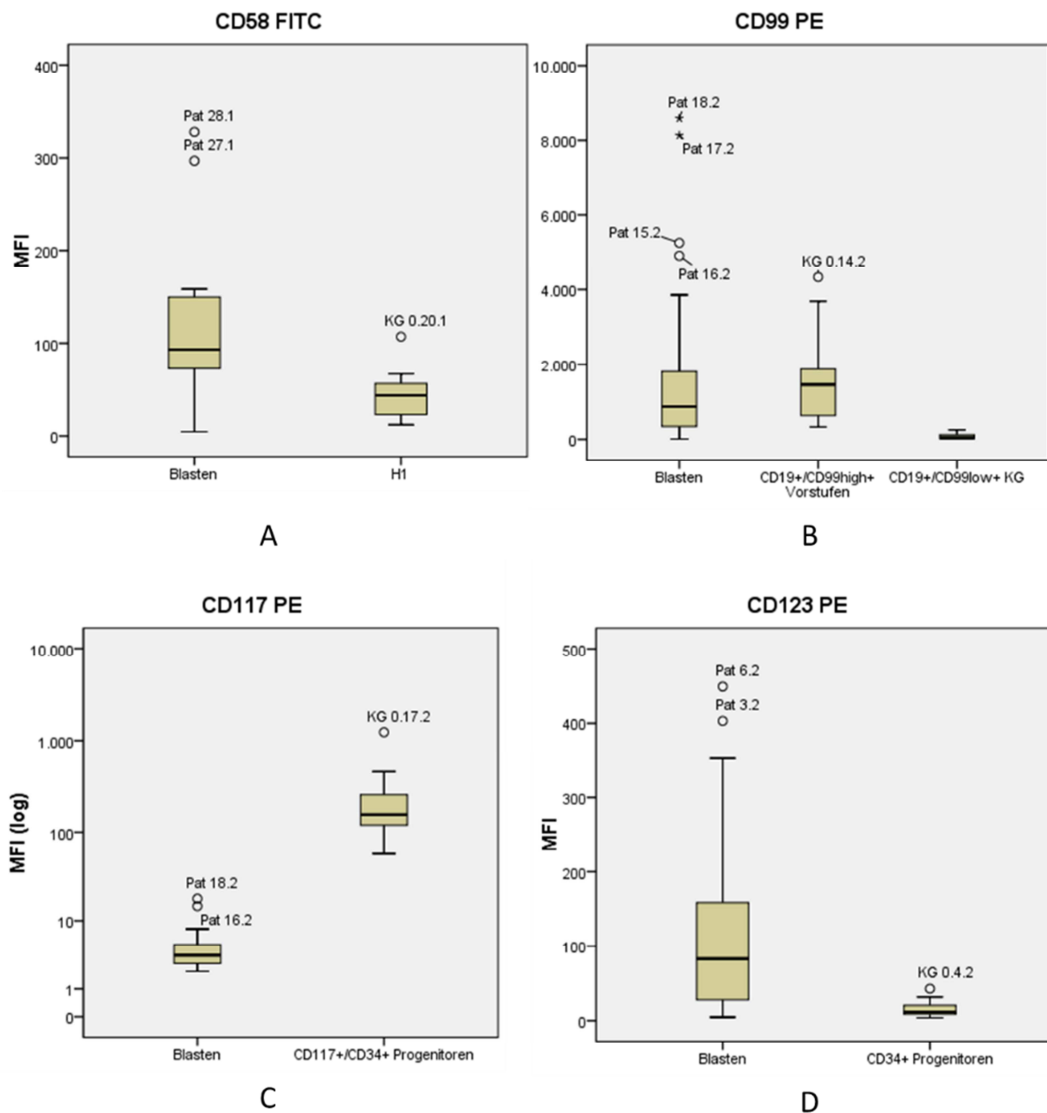
**Abbildung 21:** KG 0.1.2 Tube22

R9 = B-Vorläuferzellen mit hoher CD99 Expression und mittlerer CD19 Expression

R10 = Reifere B-Zellen mit niedriger CD99 Expression bei höherer CD19 Expression

Eine Koexpression von CD117 war in keiner ED festzustellen. Die MFI Werte der CD117<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> Vorläufer zeigten deutliche höhere MFI Werte bei großer Spannweite mit Werten zwischen 57,51 und 1235,37 (Spannweite: 1177,86; Abb.22C).

Dagegen war CD123 auf Blasten deutlich höher exprimiert als auf CD34<sup>+</sup> Vorläufern, die insgesamt CD123 PE negativ waren. Etwa 68% der Werte auf Blasten lagen über dem höchsten Wert der Kontrollgruppe (Abb.22D).



**Abbildung 22:** Boxplot zur **A** CD58 FITC, **B** CD99 PE, **C** CD117 und **C** CD123 PE Expression

### 3.4 Rezidive

Von 33 Patienten erlitten 5 Patienten mindestens ein Rezidiv (Rückfallrate 15,15 %). Ein Patient erlitt ein frühes isoliertes KM Rezidiv (31 Monate nach ED; 1 Monate nach Beenden der First-Line Therapie), zwei Patienten ein spätes isolierte KM Rezidiv (54 und 45 Monate nach ED), ein Patient ein isolierte KM Rezidiv 30 Monate nach SZT. Einen Patienten betrafen insgesamt drei Rezidive (2, 45, 68 Monate nach ED).

Eine statistische Analyse wurde aufgrund der geringen Fallzahl und teilweise unvollständigen Rezidivpanels, nicht durchgeführt, so dass hier lediglich beschreibende Angaben gemacht werden.

Ausgewertet wurden 21 Antigene. Bei jedem Patienten war mindestens ein Marker verändert, wobei Gesetzmäßigkeiten nicht aufgestellt werden konnten. CD22 fiel als einziger Marker im besonderen Maße als stabil auf.

Unter 72 durchgeführten Messungen waren 23 Shifts. Davon 6 negative und 17 positive. Positive Shifts waren also insgesamt häufiger (Tab. 18).

MFI Werte und Log Daten befinden sich im Anhang (Tab. 20).

**Tabelle 18:** Antigenshifts zwischen Erstdiagnose und Rezidiv

	Pat. 12.2	Pat. 13.2	Pat. 19.1	Pat. 20.1	Pat. 34.1
CD10-PE	negativ Shift	stabil	stabil	positiv Shift	positiv Shift
CD 13-PE		stabil	positiv Shift		stabil
CD19-FITC	stabil	stabil	stabil	stabil	negativ Shift
CD19-APC		stabil	stabil	stabil	negativ Shift
CD20-PerCP		stabil	stabil	stabil	negativ Shift
CD22-APC		stabil	stabil	stabil	stabil
CD24-FITC		negativ Shift	stabil	positiv Shift	stabil
CD25-FITC		stabil			
CD 33-PE		stabil	positiv Shift		
CD34	stabil	stabil	positiv Shift	stabil	negativ Shift
CD 35-PE		stabil			
CD 36-FITC		stabil			
CD38-APC	stabil	stabil	stabil		positiv Shift
CD45	stabil	stabil	stabil	positiv Shift	stabil
CD56-PE		stabil	stabil	stabil	positiv Shift
cy79 $\alpha$ -PE		stabil			
CD99-PE		positiv Shift	positiv Shift	positiv Shift	stabil
CD 117-PE		positiv Shift	stabil		positiv Shift
CD123-PE	stabil	stabil			
HLA-DR-FITC		positiv Shift			
cyMPO-FITC		stabil	stabil	stabil	positiv Shift
cyTdT-FITC		stabil	stabil	positiv Shift	stabil
Shifts	1 von 6	4 von 23	4 von 16	5 von 12	9 von 15

## 4 Diskussion

Die Überlebensrate von Kindern, die an einer c-ALL erkranken ist deutlich gestiegen. Mitentscheidend für die Prognose und Therapieplanung ist die Erfassung der MRD während und nach Chemotherapie. Methode der Wahl ist, neben der PCR, die Durchflusszytometrie.

Der blastäre Phänotyp kann aber B-Zellvorstufen, die vor allem bei sehr jungen B-ALL-Patienten in hoher Anzahl vertreten sind<sup>[7]</sup>, sehr stark ähneln und so die Diagnose einer MRD zusätzlich erschweren. Essentiell ist also nicht nur die Kenntnis des blastären Phänotyps, sondern auch des Antigenexpressionsmusters auf gesunden B-Zellvorläufern, um eine korrekte Unterscheidung zwischen beiden vornehmen zu können.

In vorliegender Arbeiten wurden hierzu MFI Werte von 26 Oberflächenantigenen auf c-ALL Blasten in ED und Rezidiv und auf B-Zellvorstufen knochenmarksgesunder Kinder erhoben und miteinander verglichen. Ergänzt durch Literaturrecherchen sollten letztlich die Antigene identifiziert werden, die eine möglichst sichere Unterscheidung von malignen und gesunden Zellen gewährleisten.

### 4.1 Gating Strategie

Die Identifizierung der verschiedenen Zellen im FACS ist keine triviale Aufgabe. Viele Zelleigenschaften sind bekannt, Antigenverläufe gut beschrieben. Dennoch ist das Vorgehen den einzelnen Laboren überlassen und ist stark abhängig von den jeweiligen Erfahrungen. Einige Empfehlungen sollen hier dennoch versucht werden.

Li et al. beschreibt den Nutzen des CD45/SSC Plots zur Identifizierung von abnormen Zellpopulationen<sup>[47]</sup>. Auch Babusikova et al. beginnen das Gaten der Hämatogonen über einen derartigen Plot<sup>[7]</sup>. Coustan-Smith et al. dagegen definiert ein B-Zellgate über die Lymphozytenscattereigenschaften im SSC/FSC Plot in Kombination mit einem CD19+ Status. Diese Zellen werden weiterhin bezüglich ihrer CD10 und CD34 Expression untersucht<sup>[48]</sup>. Auch Obro et al. geht nach ähnlichem Prinzip vor<sup>[49]</sup>.



Das hier verwendete Vorgehen wurde von den vorhandenen Färbungen abhängig gemacht und war entsprechend variabel. Mischpopulationen konnten deshalb nicht immer sicher vermieden werden. Dies erschwert zwar die Interpretation der Ergebnisse sowie die Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten. Dennoch lieferten verschiedenste Wege der Gatingstrategie nachvollziehbare Ergebnisse. Dies belegt zwar die Gleichwertigkeit der Ansätze, um aber eine größere Aussagekraft der Daten zu erreichen, sollte von der ED an ein einheitliches Markerpanel beibehalten werden. Dies erleichtert nicht nur das Nachverfolgung der malignen Zellen, sondern auch deren Differenzierung von gesunden, sich regenerierenden B-Zellvorstufen. Hierfür geeignete Marker sind vor allem: CD10, CD19, CD34 und CD45. Mindestens drei dieser Marker sollten, als relativ stabile Identifizierungsmarker, mit jeweils variabel exprimierten Markern kombiniert werden. Sie zeigen auf B-Zellvorstufen einen gut definierten Verlauf und sind in der Mehrzahl der Fälle auf Blasten in ähnlicher Weise verändert, so dass bereits durch diese vier Marker entscheidende Hinweise gewonnen werden können. Weitere Marker, die in der ED auf Blasten verändert waren, sollten in den MRD Proben nachverfolgt werden.

#### **4.2 Markerexpression**

Zahlreiche Studien und Reviews existieren zur Beschreibung der Antigenexpression auf B-Zellvorstufen und B-Zelleukämien. Vor allem für die Vorläufermarker CD10 und CD34, sowie für CD19, CD20, CD22, CD45, cyCD79a und cyTdT fanden sich weitgehend übereinstimmende Ergebnisse, die auch in vorliegender Arbeit bestätigt werden konnten [2, 4, 7, 8, 13, 50-52].

Es kann also von einem stabilen und reproduzierbaren Verlauf auf gesunden B-Zellvorläufern für diese Marker ausgegangen werden. Auch die Expression auf Blasten ist in den Studien meist ähnlich verändert, wie auch in unserer Studie. Unterschiede ergeben sich meist nur in den Prozentzahlen der Über- oder Unterexpression. Dies ist wohl am ehesten durch die unterschiedlich angewendeten Messmethoden zu begründen.

So ergibt sich für CD10 in der Zusammenschau eine Überexpression auf Blasten, wobei hier die Überexpression mit 27,27% etwas niedriger lag als in anderen Studien (Sedek et al. 57,9%<sup>[8]</sup>, Seegmiller et al. 66,20%<sup>[53]</sup>, McKenna et al. 57,00%<sup>[50]</sup>). Für CD34 und CD45 wird, wie auch hier, eher eine niedrigere Expression, oder eine den Vorstufen ähnliche Expression beschrieben (Sedek et al, Seegmiller et al, McKenna et al.). Für CD19 finden sich weniger Daten. Seegmiller et al. zeigt eher eine Unterexpression im Vergleich zu Hämatogonen. Die kontinuierliche Expressionszunahme von CD19 auf Vorstufen wird auch von Lucio et al. beschrieben<sup>[54]</sup>. Eine Überexpression von CD19 auf Blasten gegenüber TdT+ gesunden Vorstufen wird von Farahat et al. beobachtet<sup>[55]</sup>. Unsere vergleichende Analyse zeigt nun die Überexpression von CD19 gegenüber H1 und H2, die bereits auf der Höhe von H3 liegt. Für CD20 und CD22 stimmen die Ergebnisse unserer Arbeiten mit denen von Sedek et al. überein und belegen die Überexpression beider Marker auf Blasten gegenüber H1. Für CD20 konnten wir zusätzlich eine Unterexpression gegenüber allen reiferen Stufen der B-Zellentwicklung und für CD22 die Expression auf Höhe von H3 zeigen. Dieser Antigenverlauf spiegelt eindrücklich den Entwicklungsarrest der Blasten wieder. Vor allem in Fällen wo die CD10, CD34 und CD45 Expression der Blasten H1 Zellen ähnelt, ist die mögliche Überexpression von CD19, CD20 und/oder CD22 auf Blasten von besonders diskriminativem Wert gegenüber H1 und H2. Andersherum gesagt lassen sich dann H3 von Blasten durch deren asynchron hohe CD10 und CD34 Expression differenzieren. Ein derartig vergleichendes Vorgehen in der Identifizierung einer MRD ist auch schon von anderen Autoren als erfolgreich bezeichnet worden<sup>[56]</sup>.

cyCD79 $\alpha$  und cyTdT sind (fast) immer positiv auf Leukämien der B-Zellreihe und eignen sich daher besonders gut zu deren Identifizierung<sup>[51]</sup>. Die Unterschiede zwischen Blasten und Vorläuferzellen für beide Marker ist weniger gut beschrieben. cyCD79 $\alpha$  ist hoch spezifisch für B-Zellen<sup>[57]</sup>, wird ab der frühen B-Zellentwicklung konstitutiv exprimiert<sup>[52]</sup> und bleibt also auch in reifen B-Zellen positiv<sup>[2]</sup>. Im Gegensatz dazu entsprechen die meisten cyTdT positiven Zellen im KM H1 Zellen. H2 sind bereits negativ für cyTdT<sup>[5, 6]</sup>.

In vorliegender Arbeit war cyCD79 $\alpha$  auf Blasten gegenüber H1 und H2 in 93,33% bzw. 53,33% der Fälle deutlich überexprimiert.

Die bereits beschriebene, asynchron niedrige cyTdT-Expression auf Blasten gegenüber H1 kann hier bestätigt werden, wobei unsere Werte mit 37,50% deutlich geringer ausfallen als die 85,15% bei Sedek et al<sup>[8]</sup>. Zusätzlich zeigen wir den Verlauf der cyTdT Expression mit einer deutlich höheren Expression auf Blasten im Vergleich zu H2 (81,25%). Die cyTdT Expression ist wiederum ein gutes Beispiel für den Stopp im Reifungsprozess der Blasten.

Auch die beiden letzten genannten Marker können, ähnlich wie oben beschrieben, zur Differenzierung von Blasten und Vorläufern genutzt werden. Wie die Zusammenhänge zu andern Oberflächenmarkern wie z. B. CD10, CD20 und CD22 sind, wurde bislang noch nicht untersucht.

Zu den Markern CD11b, CD38, CD58, CD123 und CD133 konnten weniger vergleichende Daten in der Literatur gefunden werden. Sie waren oft hilfreich bei der Identifizierung eines LAIP auf Blasten.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Karawajew et al. war in vorliegendem Patientenkollektiv CD58 hilfreicher zur Identifizierung der Blasten als CD38. Auch andere Arbeitsgruppen bezeichnen CD58 als vielversprechenden Marker in der MRD Diagnostik<sup>[58, 59]</sup>. Coustan-Smith et al. wies eine Überexpression in 81,9% der Fälle nach<sup>[60]</sup>, was durch unsere Arbeiten bestätigt werden konnte, wobei die Überexpression mit 36,36% niedriger lag. Loghavi et al. stellt einen Fall vor, in dem die Überexpression von CD58 den entscheidenden Hinweis zur Diagnose erbrachte<sup>[61]</sup>. Weiterhin scheint CD58 unabhängig von der Therapie stabil exprimiert zu werden<sup>[36]</sup>.

Dagegen scheint CD38 auf Blasten insgesamt unterexprimiert. Wobei zum Ausmaß der Unterexpression in der Literatur unterschiedliche Angaben gefunden werden können: 41%<sup>[50]</sup>, 54%<sup>[53]</sup>, 73,7%<sup>[60]</sup> und 86%<sup>[8]</sup>. Die eigenen Arbeiten bewegten sich mit 44,44% im unteren Feld. Insgesamt war CD38 auch auf den Vorstufen in sehr unterschiedlichem Maß exprimiert, so dass sich für diesen Marker eine Unschärfe ergibt, die eine eindeutige Differenzierung von gesunden und malignen Zellen nur im

Einzelfall möglich machte. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz von Karawajew et al., wo die Hämatogonen einen sehr engen MFI Bereich der CD38 Expression aufwiesen [56].

B-Zellvorstufen exprimieren CD123 erst nach Verlust der CD34 Expression, während Blasten beide Marker häufig gleichzeitig exprimieren [62]. Erneut gab es in der Literatur unterschiedliche Angaben zur Häufigkeit der Koexpression: 31% [63], 50,70 % [60] und 80% [62]. Auch in vorliegender Arbeit wurde gezeigt, dass die CD123 Expression auf Blasten gegenüber CD34+ Vorstufen signifikant höher liegt, wobei eine eindeutige Abgrenzung in 12,5% der Fälle gelang und damit deutlich unter den oben genannten Arbeiten lag. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass zwei der 11 CD123positiven Fälle CD34 negativ waren, zwei weitere erlitten ein Rezidiv, wobei CD123 in beiden Rezidivfärbungen konstant blieb.

Für CD11b und CD133 1+2 konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden, nur in zwei bzw. drei Fällen wurde eine Koexpression gefunden, dennoch bleiben beide Marker interessant, nicht nur zur Identifizierung eines LAIP, sondern auch zur Risikostratifizierung. So zeigte Rhein et al., dass die CD11b Expression in therapieresistenten Blastenpopulationen weiter ansteigt [37]. Cox et al. zeigt, dass CD133+/CD19-/CD38- Zellen therapieresistente leukemia initiating cells sind [64] und Tolba et al. bezeichnet eine CD133 Positivität in ALL als prognostisch ungünstigen Marker im Sinne einer Therapieresistenz [65].

In unserer Arbeit erlitt einer der beiden CD11b positiven Patienten ein Rezidiv und einer der drei CD133 1+2 positiven Patienten. Beide Marker wurden in Rezidivfärbungen nicht berücksichtigt.

Zur weiteren Validierung potentiell aussagekräftiger Marker wie CD11b, CD38, CD58, CD123 und CD133 müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Weniger hilfreich zur Beschreibung des LAIP auf Blasten waren die Marker CD21, CD24, CD25, CD56, CD99 und HLA-DR. Dies lag nicht nur daran, dass, außer bei CD24, keine signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten, sondern auch an der teilweise

sehr unscharfen Expression (v. a. CD99) einerseits und einer sehr heterogenen Expression der Marker sowohl auf Blasten als auch auf den Vorstufen andererseits.

Im besonderen Maße traf letzteres für CD24 zu. Die Verteilung auf den Vorstufen und den Blasten war sehr unterschiedlich. Dies spiegelte sich ebenfalls in der Literaturrecherche wieder. Ayre et al. beschreibt die hoch dynamische CD24 Expression auf unreifen B-Zellen, mit verschiedensten Einflussfaktoren <sup>[18]</sup>. Bei Coustan-Smith et al. war CD24 auf Blasten sowohl niedriger, als auch höher exprimiert als auf den Vorstufen <sup>[60]</sup>.

Insgesamt muss hier für CD24, und auch für CD21, ein eher geringer Nutzen für die MRD Diagnostik konstatiert werden, auch wenn VanDongen et al. beide Marker durchaus zur Beschreibung des LAIP auf Blasten verwenden <sup>[19]</sup>.

Bezüglich CD25 und HLA-DR sind unsere Daten mit der Meinung von VanDongen et al. zum eher untergeordneten Stellenwert beider Marker in der B-ALL Diagnostik kongruent.

Die aberrante Expression eines oder mehrerer myeloider Marker auf lymphatischen Blasten ist häufig <sup>[66]</sup> und ist wahrscheinlich mit verschiedenen chromosomalen Aberrationen assoziiert.

In unserer Arbeit wurden folgende myeloischen Marker untersucht: CD13, CD15, CD33, CD35, CD36, CD117 und cyMPO. Nur für CD13 und CD33 konnten signifikante Unterschiede gesehen werden, wobei die Koexpression bei 15,63% bzw. 12,50% lag. In keinem Fall waren beide Marker positiv. Unsere Daten lagen damit insgesamt niedriger als in anderen Arbeiten. Z.B. wird für CD13 in der Literatur eine Koexpression von 14% - 47% gefunden, für CD15 20%-39%, für CD33 23-51% <sup>[50, 62, 66, 67]</sup>. CD35 und CD36 können in der Diagnostik von cALL-Blasten vernachlässigt werden.

Bezüglich CD117 ist zu erwähnen, dass es eine Koexpression auf Zellen der B-Zellreihe quasi nicht gibt <sup>[19]</sup>. Da CD117 (c-kit Rezeptor) jedoch ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen einer lymphatischen und einer myeloischen Leukämie darstellt, sollte CD117 Teil des Primärpanels sein <sup>[68, 69]</sup>. Li et al. wiesen eine CD117 Expression in zwei von 13 ALL-Rezidiven nach <sup>[47]</sup>. Auch in einem Rezidiv der

vorliegenden Arbeit ist ein teilweise CD117 Expression zu vermuten. Bei einem weiteren Patienten kam es ebenfalls zu einem positiven Shift von CD117, allerdings lagen sowohl die Werte der ED, als auch des Rezidivs im einstelligem MFI Bereich.

Ähnliches gilt für cyMPO, welches nur in Zellen der myeloischen Reihe exprimiert wird. Auch wenn im vorliegenden Kollektiv keine Expression von MPO ermittelt werden konnte, ist eine Koexpression von MPO in Fällen von biphänotypischer Leukämie möglich <sup>[61, 70]</sup>. Auch die Abgrenzung einer ALL zu einer mixed-phenotype acute leukemia steht vor allem in Zusammenhang mit der Expression von MPO. Sie sollte also initial erhoben werden. Weiterhin ist zu erwähnen, dass in vorliegender Arbeit in einem Rezidiv ein gering positiver Shift für cyMPO festzustellen war.

Insgesamt ist die Erfassung der myeloiden Expression wichtig zur Differenzierung zu anderen leukämischen Subklassen <sup>[71, 72]</sup> einerseits und kann andererseits hilfreich in der MRD Diagnostik sein, da eine Koexpression myeloischer Marker auf gesunden B-Zellvorläufern nicht vorkommt.

#### **4.3 Rezidive**

Im Falle eines Rezidivs kann die Veränderung der Antigenpräsentation auf den Blasten diagnostische Schwierigkeiten bereiten. Die Studienlage ist uneinheitlich und z. T. widersprüchlich. Gesetzmäßigkeiten können weder in der Literatur noch in vorliegender Arbeit festgestellt werden. Insgesamt können hier nur stichpunktartige Angaben gemacht werden.

Antigenshifts werden in 69 – 92% der Leukämien nachgewiesen <sup>[45, 47]</sup>.

Stass et al. beschreibt zwei mögliche Mechanismen des Antigenshifts: zum einen die Selektion einer therapieresistenten Blastenpopulation, zum anderen die therapieinduzierte Modulation der Antigenpräsentation auf den Blasten <sup>[73]</sup>.

Ersteres lässt sich gut am Beispiel von Pat. 19.1 nachvollziehen. Die Blastenpopulation in der ED war inhomogen z. T. CD34+, z. T. CD34-. Die CD34+ Teilpopulation war positiv sowohl für CD13 als auch für CD33. Im Rezidiv war die Blastenpopulation homogen CD34+/CD13+/CD33+, die MFI Werte lagen in ähnlichen Bereichen wie die der

Teilpopulation der ED. Insgesamt ist also eine Expansion der CD34+ Teilpopulation wahrscheinlicher als ein echter Shift.

Den Wandel einer inhomogenen zu einer homogenen Verteilung eines Markers wird auch durch Borowitz et al. 2005<sup>[45]</sup> beschrieben, so z. B. auch für CD20, welches meist heterogen in der ED exprimiert wird und homogen negativ im Rezidiv. Bei Li et al. wird eher ein Zugewinn der MFI beobachtet. In vorliegender Arbeit war CD20 in 3 von 4 Fällen stabil. Ein Fall zeigte zwar definitionsgemäß einen negativen Shift, wobei die MFI Werte von ED und Rezidiv beide < 10 waren und die Populationen Überschneidungen zeigten. Wir postulieren also einen insgesamt stabilen Verlauf für CD20.

Weitere stabilere Marker scheinen CD19, CD22, CD38 und HLA-DR zu sein <sup>[35, 45, 47, 74, 75]</sup>. Auch in unserer Arbeit kann CD22 als stabilster Marker (wie auch CD20) bestätigt werden.

Der instabilste Marker war mit 3 von 4 Shifts CD99. Wobei die Aussagefähigkeit aufgrund der schlechten Differenzierung zwischen gesunden und leukämischen Zellen eingeschränkt bleibt.

In einigen Fällen können Artefakt durch eine hohe Kompensation nicht ausgeschlossen werden. So z. B. für CD56, CD117 und cyMPO. Wirkliche Shifts können hier nicht sicher nachgewiesen werden.

#### **4.4 Fehlerquellen**

##### **Auswahl der Patienten**

In der KG gab es Patienten, die lediglich zu konsiliarischen Zwecken in der Universitätskinderklinik Würzburg aufgenommen waren. Es erfolgte in diesen Fällen keine Nachverfolgung des weiteren Krankheitsverlaufs.

Nicht für alle Patienten lag eine Untersuchung bezüglich IgM vor, so dass nicht eindeutig zwischen einer cALL und einer prä-B ALL unterschieden werden konnte. Solche Patienten waren: Pat. 3.2, Pat. 8.2, 30.1 und 32.1.

Die Anzahl der Hämatogonen ist abhängig vom Alter <sup>[7, 43, 50]</sup>. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

### **Unterschiede zwischen den Panels und den Farbstoffen**

Vor allem in der KG im Panel 1 bestand mit sieben Fällen eine geringe Fallzahl. Um diese zu erhöhen wurde, falls möglich, versucht beide Panel in Einklang zu bringen.

Von den 29 evaluierten Antikörpern waren 14 sowohl in Panel 1 als auch in Panel 2 vorhanden. Um methodische Fehlerquellen zu identifizieren wurde eine vergleichende Analyse zwischen beiden Panels, innerhalb einer Population durchgeführt.

Für folgende Variablen gab es, nach Bonferroni-Korrektur, Unterschiede:

1. CD38 APC Lymphozyten cALL ( $p = 0,020$ )
2. CD56 PE Blasten ( $p = 0,009$ )
3. CD117 PE Blasten ( $p < 0,001$ )
4. cyMPO FITC Blasten ( $p = 0,011$ )
5. cyTdT FITC Blasten ( $p = 0,009$ )

In allen Fällen waren die MFI Werte im Panel 1 niedriger als in Panel 2. Mehrere Ursachen müssen in Betracht gezogen werden. Systemische Fehler bei der Messung, andersartige Kompensation und Systemeinstellungen über die Jahre, unterschiedliche Erstellung der Gates in den beiden Panels oder auch der Einfluss der Antikörperkombination im Tube auf das Färbeverhalten können hier eine Rolle spielen. CD34 und CD45 waren in den beiden Panels mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen beladen (siehe Tab. 7 und 8). Es wurde eine zusammenfassende Auswertung durchgeführt und, zur Evaluierung der Methode, ein Vergleich der Farbstoffe innerhalb einer Population durchgeführt. Die MFI Werte für PerCP lagen bei den Lymphozyten in der cALL Gruppe ( $p < 0,001$ ) und der KG ( $p 0,002$ ) für CD34 und in der cALL Gruppe auch für CD45 ( $p < 0,001$ ) höher als APC. Da PerCP stärker fluoresziert als APC kann dieser Fehler aus methodischen Gründen kaum umgangen werden.



#### 4.5 Ausblick

Die MRD-Diagnostik ist ein wichtiger Teil der Therapiestratifizierung kindlicher Leukämien. Die hohe Anzahl an Studien zur Markerexpression mit z. T. gegensätzlichen Aussagen macht eine abschließende Bewertung schier unmöglich, spiegelt aber auch die hohe Dynamik der FACS Analyse wieder.

Im EuroFlow Consortium haben sich 20 Arbeitsgruppen zusammengeschlossen und versucht Standards für Färbungen, Kompensations- und Instrumenteneinstellungen festzulegen, sowie einheitliche Panels, Gatingstrategien und Analysemöglichkeiten zu definieren <sup>[19, 76]</sup>. Weiterhin hat das EuroFlow Consortium ein Quality Assessment Programm entwickelt, dass die korrekte Ausführung des gesamten durchflusszytometrischen Prozesses evaluiert <sup>[77]</sup>. Zahlreiche weitere Programme zur Standardisierung und Qualitätssicherung mit verschiedensten Ansätzen bestehen, z. B. UK NEQAS Leucocyte Immunophenotyping oder College of American Pathologists um nur einige zu nennen <sup>[78, 79]</sup>.

Diese Bemühungen fördern die bessere Vergleichbarkeit der Studien und damit die Aussagekraft der in verschiedenen FACS-Laboren erhobenen Befunde.

Insgesamt ist der Trend zu kleineren Panels mit gut definierten Markern und durchgehendem Backbone, wie auch in unserer Arbeit postuliert, ersichtlich <sup>[8, 19, 48, 56]</sup>.

Nichts desto trotz ist es wichtig, vielversprechende neue Marker zu identifizieren und zu validieren. Coustan-Smith et al. z. B. verglichen 30 Marker zwischen Blasten und gesunden CD19+/CD10+ B-Zellvorläufern. 22 davon waren auf Blasten unterschiedlich exprimiert: CD44, BCL2, HSPB1, CD73, CD24, CD123, CD72, CD86, CD200, CD79b, CD164, CD304, CD97, CD102, CD99, CD300a, CD130, PBX1, CTNNA1, ITGB7, CD69 und CD49f <sup>[60]</sup>.

Zusätzlich werden immer mehr Assoziationen zwischen der phänotypischen Präsentation der Blasten und molekularen Aberrationen bekannt. BCR/ABL positive Fälle sind z. B. assoziiert mit der myeloischen Koexpression von CD13 und CD33 bei CD34 hoch positivem und CD38 niedrigem Status. Weiterhin ist auch CD66c von Leukämien mit BCR-ABL Translokation und hyperdiploiden Karyotyp exprimiert. Leukämien mit MLL Rearrangement können CD9 positiv sein, während TEL-AML1

positive Fälle sich durch eine CD9 und CD66c Negativität auszeichnen <sup>[19]</sup>. Diese Erkenntnisse können genutzt werden um Screening Methoden zu vereinfachen und zu beschleunigen <sup>[80]</sup>.

Die Etablierung und der Nutzen der genannten Punkte müssen weiterhin beobachtet werden. Ermutigend ist zusätzlich, dass auch die verfügbaren Durchflusszytometer atemberaubende Entwicklungen durchmachen. So werden zunehmend mehr Laser und Photomultiplier eingesetzt, was die Anzahl der simultan messbaren Parameter erheblich steigert. Mittlerweile gibt es Geräte, die bis zu 32 Farben gleichzeitig messen können <sup>[81]</sup>. Auch neue Softwareentwicklungen, wie die Infinicyt™ Software, ermöglichen eine differenziertere Analyse der Daten, mit neuen Verrechnungsmöglichkeiten bei verminderter Anzahl von Störfaktoren.

Das Wissen um die Verläufe der Antigenexpression in der B-Zellentwicklung ist nicht nur wichtig für die Risikostratifizierung sondern bietet auch Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten, vor allem wenn ein Rezidiv vorliegt. So ist CD22, wie auch in vorliegender Arbeit gezeigt, nahezu immer positiv auf Blasten einer cALL und zusätzlich auch im Rezidiv besonders stabil exprimiert. Dies sind vielversprechende Argumente zur Nutzung von CD22 für zielgerichtete Therapien. Zahlreiche Antikörper befinden sich bereits in der klinischen Erprobung, wie z. B. Epratuzumab in der IntReALL 2010 Studie <sup>[26]</sup>.

Die Bemühungen zur Identifizierung therapeutisch nutzbarer Antigene zielen sowohl auf eine Herstellung monoklonaler Antikörper als auch auf die Nutzung als Zielantigen für gentechnisch modifizierte T-Zellen mit einem chimären Antigenrezeptor ab.

Husak et al. weist einen Apoptose induzierenden Effekt durch CD99 Antikörper auf Blasten mit TEL/AML1 positivem Karyotyp nach. Leider wären hier jedoch auch normale B-Zellvorläufer betroffen. Nichts desto trotz ist hier ein weiteres potentielles Antigen zur individuellen Therapie einer ALL vorhanden <sup>[82]</sup>.

## 5 Zusammenfassung

Die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter ist die cALL. Eine schnelle Diagnosefindung ist von überlebenswichtiger Bedeutung für die kleinen Patienten. Die FACS-Analyse ist eine weit verbreitete Diagnosemethode. Die ED ist durch die hohe Blastenlast meist eindeutig und schnell zu realisieren. Schwieriger ist die Nachverfolgung der Erkrankung, zum einen aufgrund der geringen Anzahl der Blasten, die der Chemotherapie entgehen können (MRD), zum andern aufgrund des sich unter Therapie verändernden Phänotyps der malignen Zellen. Zusätzliche Schwierigkeiten bereitet die Unterscheidung zu sich regenerierenden, gesunden B-Zellvorläufern. Die Höhe der MRD ist aber auch Teil der Risikostratifikation und ist daher ein wichtiger Teil zur weiteren Therapieplanung.

Von besonders diskriminativem Wert waren die Vorläufermarker CD10, CD34, sowie die lymphatischen Marker CD19, CD20, CD22, CD45, cyCD79a und cyTdT. Die Antigenverläufe auf B-Zellvorstufen und die veränderte Expression auf Blasten war meist so charakteristisch, dass die Kombination der genannten Marker eine Unterscheidung von gesunden und malignen Zellen in der Mehrzahl der Fälle ermöglichte. Um aber die Marker in Beziehung setzen zu können ist die Definition der Subgruppen durch eine einheitliche Markerkombination im Panel entscheidend. Hierzu geeignet sind vor allem die Marker CD10, CD34, CD45 und CD19. Mindestens drei dieser Marker sollten in jeder Färbung vorhanden sein und, wenn möglich, durchweg mit dem gleichen Farbstoff beladen sein, auch in der Nachverfolgung der MRD.

Zur Beschreibung des individuellen LAIP eigneten sich vor allem die Marker CD11b, CD38, CD58, CD123 und CD133, sowie die myeloischen Marker CD13 und CD33. Die Veränderungen dieser Marker auf Blasten waren zwar nicht durchweg gleichartig, im Einzelfall aber zielführend, so dass die Erfassung einer Veränderung in der ED und die Weiterverfolgung in der MRD Diagnostik durchaus lohnenswert erscheint.

Die Datenlage zur Antigenexpression auf Rezidiven ist ebenfalls sehr individuell. Etliche Veränderung, ob durch tatsächliche Shifts oder durch Selektionsprozesse bedingt, können die Diagnose erschweren. Durch ein Rezidiv wird aber die Überlebensrate der Patienten drastisch verringert.

Der am kontinuierlichsten exprimierte Marker war CD22, welches nicht nur durchweg auf Blasten positiv ist, sondern auch als einziger Marker im Rezidiv stabil bleibt. Daher eignet sich dieser Marker nicht nur zur Diagnostik, sondern auch als Angriffspunkt einer Targeted Therapie und die Resultate entsprechender klinischer Studien können mit Spannung erwartet werden.

Die Hinzunahme neuer, validierter Oberflächenmarker sowie technisch noch bessere Durchflusszytometer, mit immer mehr simultan messbaren Parametern und neuen Softwarelösungen werden die Präzision und Sensitivität der MRD-Diagnostik in Zukunft sicherlich weiter verbessern. Eine bessere MRD-Erfassung, wird zu exakter stratifizierten und damit schonenderen Therapieprotokollen führen, die in Kombination mit neuen Medikamenten die Prognose von ALL-Patienten, auch im Rezidiv, weiter anheben wird.

## 6 Anhang

Tabelle 19: MFI Werte

<b>CD10 PE</b>	Blasten	H1	H2	H3		Lymphozyten	B-Zellen
n	33	20	21	21		32	21
mittlerer MFI	1666,82	1259,39	421,93	100,22		6,3	5,55
Minimum	128,01	634,94	184,34	27,63		3,18	2,48
Maximum	6756,52	1980,96	756,67	339,82		20,72	14,92
<b>CD13 PE</b>	Blasten	CD34+				Granulozyten	Granulozyten
n	32	20				32	22
mittlerer MFI	18,76	14,85				138,34	118,97
Minimum	2,50	4,87				16,70	20,72
Maximum	83,54	35,55				787,92	371,80
<b>CD19 FITC</b>	Blasten	H1	H2	H3		B-Zellen	B-Zellen
n	33	19	21	21		33	24
mittlerer MFI	176,76	46,86	88,83	122,85		151,75	143,14
Minimum	46,44	15,75	32,2	35,23		50,29	13,1
Maximum	1036,31	79,86	166,98	258,29		244,53	266,03
<b>CD19 APC</b>	Blasten	19+/99++				19+/99+	19+/99+
n	32	17				22	17
mittlerer MFI	361,67	109,93				298,48	275,65
Minimum	152,61	48,92				106,5	95,6
Maximum	1810,56	173,09				491,37	500,29

<b>CD20 PerCP</b>	Blasten	H1	H2	H3		B-Zellen 20+	B-Zellen 20+
n	33	20	21	21		33	21
mittlerer MFI	6,85	1,49	6,15	281,38		158,83	212,02
Minimum	1,00	1,00	1,75	86,21		32,2	59,09
Maximum	82,05	3,25	11,65	441,09		537,61	412,32
<b>CD22 APC</b>	Blasten	H1	H2	H3		B-Zellen 22+	B-Zellen 22+
n	33	20	21	21		33	21
mittlerer MFI	101,64	49,36	43,9	160,87		239,64	300,21
Minimum	24,14	17,78	13,95	31,62		31,91	98,22
Maximum	278,81	70,73	76,69	442,08		537,61	484,78
<b>CD24 FITC</b>	Blasten	H1	H2			B-Zellen	B-Zellen
n	33	14	14			15	14
mittlerer MFI	319,1	569,46	779,86			44,42	112,6
Minimum	9,82	73,32	16,11			8,74	13,76
Maximum	1843,42	1998,85	2044,31			130,97	435,18
<b>CD33 PE</b>	Blasten	CD34+				Granulozyten	Granulozyten
n	16	10				16	14
mittlerer MFI	27,17	12,53				139,21	174,28
Minimum	3,00	7,99				12,41	95,60
Maximum	235,01	17,00				330,77	271,39
<b>CD34</b>	Blasten	Blasten > 10	Blasten < 10	H1		Lymphozyten	Lymphozyten
n	33	23	10	24		33	23
mittlerer MFI	101,15	143,38	4,01	130,06		3,71	3,63
Minimum	1,09	27,6	1,09	30,46		1,00	1,00
Maximum	648,29	648,29	7,75	307,81		13,21	9,47

<b>CD34 PerCP</b>	Blasten	Blasten > 10	Blasten < 10	H1		Lymphozyten	Lymphozyten
n	17	11	6	7		17	7
mittlerer MFI	74,84	113,93	3,17	84,71		4,53	6,23
Minimum	2,43	27,6	2,43	60,78		2,77	2,12
Maximum	287,69	287,69	4,45	175,06		9,38	9,47
<b>CD34 APC</b>	Blasten	Blasten > 10	Blasten < 10	H1		Lymphozyten	Lymphozyten
n	16	12	4	17		16	16
mittlerer MFI	129,1	170,38	5,26	148,73		2,84	2,49
Minimum	1,09	43,83	1,09	30,46		1,00	1,00
Maximum	648,29	648,29	7,75	307,81		13,21	8,57
<b>CD38 APC</b>	Blasten	H1	H2			Lymphozyten	Lymphozyten
n	27	21	14			27	21
mittlerer MFI	231,81	374,87	587,2			48,88	102,88
Minimum	2,76	74,99	3,35			1,72	1,02
Maximum	1654,82	982,17	1472,21			268,96	469,76
<b>CD45</b>	Blasten	Blasten > 30	Blasten < 30	H1	H2	Lymphozyten	Lymphozyten
n	33	13	20	24	24	33	24
mittlerer MFI	41,08	89,72	9,47	66,75	193,48	596,14	607,74
Minimum	3,06	35,33	3,06	26,76	53,71	77,82	231,11
Maximum	246,05	246,05	20,85	103,66	427,42	1111,67	991,05
<b>CD45 PerCP</b>	Blasten	Blasten > 30	Blasten < 30	H1	H2	Lymphozyten	Lymphozyten
n	16	6	10	17	17	16	17
mittlerer MFI	42,81	100,39	8,25	66,01	193,27	754	622,27
Minimum	3,06	35,33	3,06	40	53,71	448,63	231,11
Maximum	246,05	246,05	19,02	103,66	306,43	1050,51	991,05

<b>CD45 APC</b>	Blasten	Blasten > 30	Blasten < 30	H1	H2	Lymphozyten	Lymphozyten
n	17	7	10	7	7	17	7
mittlerer MFI	39,46	80,57	10,69	68,55	193,99	447,57	572,44
Minimum	3,22	45,22	3,22	26,76	74,99	77,82	251,31
Maximum	126,38	126,38	20,85	97,38	427,42	1111,67	739,57
<b>CD58 FITC</b>	Blasten	Blasten ohne 24.1	H1			B-Zellen	B-Zellen
n	11	10	7			11	6
mittlerer MFI	128,61	141	45,89			25,73	24,28
Minimum	4,66	57,25	12,08			8,62	11,81
Maximum	327,81	327,81	106,98			46,14	37,86
<b>CD79<math>\alpha</math> PE</b>	Blasten	H1	H2			B-Zellen	B-Zellen
n	15	15	15			14	15
mittlerer MFI	125,23	23,9	45,93			74	72,39
Minimum	54,25	4,07	5,05			21,87	5,45
Maximum	239,28	57,25	104,6			116,52	189,38
<b>CD99 PE</b>	Blasten	19+/99++				19+/99+	19+/99+
n	32	17				20	17
mittlerer MFI	1679,55	1544,66				85,42	80,43
Minimum	9,06	330,77				5,52	17,78
Maximum	8582,1	4332,3				406,79	252,55
<b>CD117 PE</b>	Blasten	CD34+/117+				Granulozyten	Granulozyten
n	33	21				17	7
mittlerer MFI	4,60	233				6,17	8,39
Minimum	2,09	57,51				4,51	5,67
Maximum	18,11	1235,37				8,82	12,08



<b>CD123 PE</b>	Blasten	CD34+				Monozyten	Monozyten
n	16	14				16	14
mittlerer MFI	132,48	15,72				145,38	33,47
Minimum	4,74	3,96				11,81	13,58
Maximum	449,1	42,74				1394,86	53,52
<b>CD133 1+2 PE</b>	Blasten	10+/34+				Lymphozyten	Lymphozyten
n	17	7				17	7
mittlerer MFI	22,87	18,14				5,47	7,39
Minimum	2,69	7,4				2,81	4,87
Maximum	177,83	41,79				12,86	10,75
<b>cyTdT FITC</b>	Blasten	H1	H2			B-Zellen	B-Zellen
n	32	14	14			28	20
mittlerer MFI	116,79	207,93	7,79			7,68	8,36
Minimum	10,65	85,82	1,32			1,13	1,37
Maximum	523,3	495,81	38,2			24,14	39,24

**Tabelle 20:** MFI und log10 Daten von Erstdiagnose und Rezidiv

CD10-PE	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED	128,01	2,11	584,85	2,77	1044,48	3,02	806,46	2,91	636,65	2,80
Rez	11,34	1,05	1423,00	3,15	3062,92	3,49	5679,96	3,75	2010,32	3,30
Rez-ED	-116,67	-1,05	838,15	0,39	2018,44	0,47	4873,5	0,85	1373,67	0,50
Beurteilung		negativ Shift		stabil		stabil		positiv Shift		positiv Shift
CD 13-PE	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			78,44	1,89	26,54	1,42			5,05	0,70
Rez			41,79	1,62	147,22	2,17	2,5		7,04	0,85
Rez-ED			-36,65	-0,27	120,68	0,74			1,99	0,14
Beurteilung				stabil		positiv Shift				stabil
CD19-FITC	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED	281,7	2,45	1036,31	3,02	130,89	2,12	178,48	2,25	201,72	2,30
Rez	391,35	2,59	427,64	2,63	90,73	1,96	227,24	2,36	56,17	1,75
Rez-ED	109,65	0,14	-608,67	-0,38	-40,16	-0,16	48,76	0,10	-145,55	-0,56
Beurteilung		stabil		stabil		stabil		stabil		negativ Shift
CD19-PE	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			4755,57	3,68						
Rez			1690,35	3,23	385,62		1107,62		428,67	
Rez-ED			-3065,22	-0,45						
Beurteilung				stabil						

CD19-APC	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			1810,56	3,26	243,62	2,39	361,9	2,56	392,42	2,59
Rez			1124,04	3,05	155,38	2,19	299,61	2,48	116,52	2,07
Rez-ED			-686,52	-0,21	-88,24	-0,20	-62,29	-0,08	-275,9	-0,53
Beurteilung				stabil		stabil		stabil	stabil	negativ Shift
CD20-PerCP	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			2,48	0,39	1,37	0,14	7,5	0,88	8,66	0,94
Rez			1,54	0,19	1,98	0,30	9,91	1,00	1,61	0,21
Rez-ED			-0,94	-0,21	0,61	0,16	2,41	0,12	-7,05	-0,73
Beurteilung				stabil		stabil		stabil		negativ Shift
CD22-APC	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			278,81	2,45	54,74	1,74	86,6	1,94	128,64	2,11
Rez			276,32	2,44	40,32	1,61	54,49	1,74	45,73	1,66
Rez-ED			-2,49	0,00	-14,42	-0,13	-32,11	-0,20	-82,91	-0,45
Beurteilung				stabil		stabil		stabil	stabil	
CD24-FITC	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			938,98	2,97	201,69	2,30	198,1	2,30	9,82	0,99
Rez			134,56	2,13	127,49	2,11	1154,78	3,06	22,07	1,34
Rez-ED			-804,42	-0,84	-74,2	-0,20	956,68	0,77	12,25	0,35
Beurteilung				negativ Shift		stabil		positiv Shift		stabil
CD25-FITC	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			12,75	1,11						
Rez			12,24	1,09	4,03		11,34		10,18	
Rez-ED			-0,51	-0,02						
Beurteilung				stabil						

CD 33-PE	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			15,54	1,19	CD33 APC: 7,80	0,89				
Rez			13,64	1,13	60,98	1,79			9,91	
Rez-ED			-1,9	-0,06	53,18	0,89				
Beurteilung				stabil		positiv Shift				
CD34-PerCP	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED					75,49	1,88	27,6	1,44	89,17	1,95
Rez	474,18	2,68								
Rez-ED		0,27								
Beurteilung		stabil								
CD34-APC	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED	252,4	2,40	648,29	2,81						
Rez			245,71	2,39	264,52	2,42	12,78	1,11	3,27	0,51
Rez-ED				-0,42		0,54		-0,33		-1,44
Beurteilung				stabil		positiv Shift		stabil		negativ Shift
CD 35-PE	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			12,86	1,11						
Rez			20,54	1,31	3,4		18,43		16,85	
Rez-ED			7,68	0,20						
Beurteilung				stabil						
CD 36-FITC	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			13,95	1,14						
Rez			13,89	1,14	4,45				13,34	
Rez-ED			-0,06	0,00						
Beurteilung				stabil						

CD38-APC	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED	756,67	2,88	7,84	0,89	74,32	1,87			54,74	1,74
Rez	1684,85	3,23	23,29	1,37	130,97	2,12	552,32		685,39	2,84
Rez-ED	928,18	0,35	15,45	0,47	56,65	0,25			630,65	1,10
Beurteilung		stabil		stabil		stabil				positiv Shift
CD45-PerCP	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED	152,55	2,18	4,87	0,69	44,11	1,64				
Rez	138,24	2,14	7,29	0,86	64,4	1,81				
Rez-ED	-14,31	-0,04	2,42	0,18	64,4	0,16				
Beurteilung		stabil		stabil		stabil				
CD45-APC	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED							50,06	1,70	90,89	1,96
Rez (CD45-PerCP)							181,11	2,26	84,46	1,93
Rez-ED								0,56		-0,03
Beurteilung								positiv Shift		stabil
CD56-PE	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			6,21	0,79	5,57	0,75	8,58	0,93	7,23	0,86
Rez			7,4	0,87	4,26	0,63	14,2	1,15	36,19	1,56
Rez-ED			1,19	0,08	-1,31	-0,12	5,62	0,22	28,96	0,70
Beurteilung				stabil		stabil		stabil		positiv Shift
cy79 $\alpha$ -PE	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			130,97	2,12						
Rez			319,08	2,50	69,78		216,74		257,13	
Rez-ED			188,11	0,39						
Beurteilung				stabil						

CD99-PE	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			1009,04	3,00	307,81	2,49	1582,04	3,20	710,5	2,85
Rez	17,47		5623,41	3,75	1252,15	3,10	8058,42	3,91	1445,96	3,16
Rez-ED			4614,37	0,75	944,34	0,61	6476,38	0,71	735,46	0,31
Beurteilung				positiv Shift		positiv Shift		positiv Shift		stabil
CD 117-PE	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			5,05	0,70	2,55	0,41	2,09		2,55	0,41
Rez			23,08	1,36	6,98	0,84			9,22	0,96
Rez-ED			18,03	0,66	4,43	0,44			6,67	0,56
Beurteilung				positiv Shift		stabil				positiv Shift
CD123-PE	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED	77,74	1,89	133,35	2,12						
Rez	72,34	1,86	122,43	2,09	28,39				147,22	
Rez-ED	-5,4	-0,03	-10,92	-0,04						
Beurteilung		stabil		stabil						
HLA-DR-FITC	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			1651,69	3,22						
Rez			5450,52	3,74	1436,73				2425,33	
Rez-ED			3798,83	0,52						
Beurteilung				positiv Shift						
cyMPO-FITC	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			26,18	1,42	9,22	0,96	10,75	1,03	5,67	0,75
Rez			29,96	1,48	6,21	0,79	16,85	1,23	24,58	1,39
Rez-ED			3,78	0,06	-3,01	-0,17	6,1	0,20	18,91	0,64
Beurteilung				stabil		stabil		stabil		positiv Shift

cyTdT-FITC	Pat. 12.2	log10	Pat. 13.2	log10	Pat. 19.1	log10	Pat. 20.1	log10	Pat. 34.1	log10
ED			168,49	2,23	127,49	2,11	35,55	1,55	166,98	2,22
Rez			62,08	1,79	139,49	2,14	791,48	2,90	196,32	2,29
Rez-ED			-106,41	-0,43	12	0,04	755,93	1,35	29,34	0,07
Beurteilung				stabil		stabil		positiv Shift		stabil

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
AIEOP-BFM-ALL	Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica-acute lymphocytic leukemia-Berlin Frankfurt Muenster
Ak	Antikörper
ALL-REZ-BFM 2012	Beobachtungsstudie und Biobank für Rezidive einer akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindes – und Jugendalter
ALOT	acute leukemia orientation tube
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanine
BCR	B-cell receptor
bzw.	beziehungsweise
ALL	Akute lymphatische Leukämie
cALL	common Akute lymphatische Leukämie
CD	Cluster of Differentiation
CLP	common lymphoid progenitor
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMP	common myeloid progenitor
COALL-08-09	Cooperative ALL-Studie
cy	cytoplasmatisch
ED	Erstdiagnose
EGIL	European Group for the Immunological Classification of Leukemias
et al.	et alii/et aliae – lateinisch für und andere
F+P	Fix and Perm
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescein
G	Gate



## Abkürzungsverzeichnis

---

H	Hämatogonen
HIV	human immunodeficiency virus
HLA-DR	human leukocyte antigen DR
HSC	hematopoeitic stem cell
FSC	forward scatter
Ig	Immunglobulin
InReALL	Internationale Pädiatrische Phase III Studie bei Standard Risiko Relapsed ALL
ISO	Isotypenkontrolle
KG	Kontrollgruppe
KM	Knochenmark
LAIP	leukemia associated immunophenotype
M	marker bounds
MDS	Myeloisch dysplastisches Syndrom
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
ml	Milliliter
MPO	Myeloperoxidase
MRD	Minimal Residual Disease
Pat.	Patient
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
R	Region
rpm	rounds per minute
sm	surface membrane
SSC	side scatter
SZT	Stammzelltransplantation
Tab.	Tabelle
TdT	terminale Desoxynukleotidyl-Transferase

## 8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1:</b> VEREINFACHTE DARSTELLUNG DER HÄMATOPOESE GESUNDER BLUTZELLEN. MODIFIZIERT NACH KRUSE, A. <sup>[1]</sup> , KRAUS ET AL. <sup>[2]</sup> .....	1
<b>ABBILDUNG 2:</b> SSC VS. FSC-PLOT: KG 0.5.2; TUBE 10.ALL, NO GATE .....	15
<b>ABBILDUNG 3:</b> PAT. 25.1 TUBE 2 (19-10-20-22) <b>A</b> FSC/SSC PLOT: ALLE EVENTS WERDEN ANGEZEIGT; R1: BLASTENREGION <b>B</b> GATE G1 = R1; CD19 FITC VS. CD10 PE PLOT; R10 RESIDUELLE B-ZELLEN, R11: BLASTEN <b>C</b> GATE G1 = R1; CD20 PERCP VS. CD22 APC PLOT .....	18
<b>ABBILDUNG 4:</b> LOGISCHE VERKNÜPFUNG VON REGIONEN (R) ZU GATES (G) .....	18
<b>ABBILDUNG 5:</b> PAT. 25.1 TUBE 2 19-10-20-22 <b>A</b> EXPRESSION VON CD20 UND CD22 AUF BLASTEN G11 = R1 UND R11 <b>B</b> EXPRESSION VON CD20 UND CD22 AUF GESUNDEN NAIVEN B-ZELLEN G10 = R1 UND R10 .....	19
<b>ABBILDUNG 6:</b> PAT. 25.1: HISTOGRAMME UND STATISTIK FÜR CD19 FITC AUF <b>A</b> BLASTEN G11; <b>B</b> RESIDUELLE NORMALEN B-ZELLEN G10 .....	19
<b>ABBILDUNG 7:</b> PAT. 25.1; RESIDUELLE NORMALE B-ZELLEN (G10) HISTOGRAMM MIT M1 <b>A:</b> CD20 PERCP <b>B:</b> CD22 APC .....	20
<b>ABBILDUNG 8:</b> PAT. 19.1; TUBE 6 19-21-34-33; G1 = R1 IN R13 LIEGEN SOWOHL GESUNDE B-ZELLEN (CD19+/CD34-), ALS AUCH MALIGNEN BLASTEN .....	23
<b>ABBILDUNG 9:</b> PAT. 19.1: TUBE 6: 19-21-34-33; BLASTEN IM HISTOGRAMM; SETZEN VON M1.....	23
<b>ABBILDUNG 10:</b> KG 0.3.2 TUBE 20: CYTDT-19-45-34; <b>A</b> SSC/FSC PLOT; R1: LYMPHOZYTENREGION <b>B</b> G1; R12: CD45 <sup>HIGH+</sup> /CD19 <sup>+</sup> UNREIFE UND REIFE B-ZELLEN; R13: CD45 <sup>LOW+</sup> /CD19 <sup>+</sup> B-ZELLVORLÄUFER <b>C</b> G13 = CD19 <sup>+</sup> /CD45 <sup>LOW+</sup> ; R15: PRE-BII ZELLEN (H2); R16: PRE-BI ZELLEN (H1) .....	24
<b>ABBILDUNG 11:</b> KG 0.3.2 TUBE 20 <b>A</b> G16 (R1*R13*R16) = PRE-BI (H1) = CD19 <sup>+</sup> /CD45 <sup>LOW+</sup> /CD34 <sup>+</sup> /CYTDT <sup>+</sup> <b>B</b> G15 (R1*R13*R15) = PRE-BII (H2) = CD19 <sup>+</sup> /CD45 <sup>LOW+</sup> /CD34 <sup>-</sup> /CYTDT <sup>-</sup> .....	25
<b>ABBILDUNG 12:</b> KG 0.3.2 HISTOGRAMME FÜR CYTDT FITC <b>A:</b> G16 = PRE-BI (H1) <b>B:</b> G15 = PRE-BII (H2) .....	25
<b>ABBILDUNG 13:</b> CD99 PE VS. CD19 APC PLOT; KG 0.1.2 TUBE 22; DER PLOT BEINHÄLTET ZELLEN IN G1; R9 = CD19+ VORSTUFEN, R10 = REIFERE ZELLEN .....	26
<b>ABBILDUNG 14:</b> ALTERSVERTEILUNG IM KOLLEKTIV .....	29
<b>ABBILDUNG 15:</b> BOXPLOT ZUR EXPRESSION VON <b>A</b> CD11b, <b>B</b> CD13, <b>C</b> CD33 UND <b>D</b> CD133 1+2 .....	30
<b>ABBILDUNG 16:</b> BOXPLOT CD10 PE EXPRESSION; DIE BOX BEINHÄLTET DIE WERTE ZWISCHEN DER 75% UND DER 25% PERZENTILE, DER STRICH IN DER MITTE STELLT DEN MEDIAN DAR (50% PERZENTILE). DARÜBER UND DARUNTER IST DER GRÖSSTE BZW. DER KLEINSTE NICHT EXTREME WERT DURCH DIE BALKEN ANGEZEIGT. ....	34
<b>ABBILDUNG 17:</b> CD34 ODER CD45 ALS DISKRIMINATOREN <b>A</b> BOXPLOT CD34; DIE ERSTE BOX ZEIGT DIE BLASTEN MIT MFI WERTEN > 10, DIE ZWEITE BOX MIT MFI WERTEN < 10 <b>B</b> CD45 EXPRESSION; ERSTE BOX ZEIGT DIE BLASTEN MIT MFI WERTEN > 30, DIE ZWEITE BOX MIT MFI WERTEN < 30;.....	35
<b>ABBILDUNG 18:</b> BOXPLOT DER <b>A</b> CYTDT FITC, <b>B</b> CD38 APC UND <b>C</b> CD24 FITC EXPRESSION .....	36
<b>ABBILDUNG 19:</b> BOXPLOT DER CD20 PERCP EXPRESSION; ZUR BESSEREN DARSTELLUNG WURDE DIE SKALA LOGARITHMIERT .....	37
<b>ABBILDUNG 20:</b> BOXPLOT ZUR <b>A</b> CD19 FITC, <b>B</b> CYCD79 A PE UND <b>C</b> CD22 APC EXPRESSION .....	38
<b>ABBILDUNG 21:</b> KG 0.1.2 TUBE 22 R9 = B-VORLÄUFERZELLEN MIT HOHER CD99 EXPRESSION UND MITTLERER CD19 EXPRESSION R10 = REIFERE B-ZELLEN MIT NIEDRIGER CD99 EXPRESSION BEI HÖHERER CD19 EXPRESSION .....	39
<b>ABBILDUNG 22:</b> BOXPLOT ZUR <b>A</b> CD58 FITC, <b>B</b> CD99 PE, <b>C</b> CD117 UND <b>C</b> CD123 PE EXPRESSION .....	40

## Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

---

<b>TABELLE 1:</b> ANTIGENEXPRESSIONSMUSTER AUF B-ZELLVORLÄUFERN; NACH GHIA ET AL. UND NOORDZIJ ET AL., AUS DEM BUCH „ZELLULÄRE DIAGNOSTIK“ SACK ET AL. <sup>[4-6]</sup> .....	2
<b>TABELLE 2:</b> ANTIGENEXPRESSIONSMUSTER AUF HÄMATOGONEN NACH SEDEK ET AL. 2014 .....	3
<b>TABELLE 3:</b> IN DIESER ARBEIT BERÜCKSICHTIGTE CDS .....	4
<b>TABELLE 4:</b> SONSTIGE IN DIESER ARBEIT VERWENDETE ANTIGENE <sup>[13-15]</sup> .....	7
<b>TABELLE 5:</b> EINTEILUNG DER B-ALL NACH EGIL .....	8
<b>TABELLE 6:</b> ÜBERSICHT PATIENTENKOLLEKTIV .....	14
<b>TABELLE 7:</b> PANEL 1; GRAU HINTERLEGTE MARKER WURDEN IN DIESER ARBEIT NICHT BERÜCKSICHTIGT. TUBE NUMMERIERUNG: ACUTE MYELOID LEUKEMIA (AML); ISOTYPENKONTROLLE (ISO) .....	16
<b>TABELLE 8:</b> PANEL 2; GRAU UNTERLEGTE MARKER WURDEN IN DIESER ARBEIT NICHT BERÜCKSICHTIGT. TUBE NUMMERIERUNG: MYELOISCH DYSPLASTISCHES SYNDROM (MDS); FIX AND PERM (F+P) .....	17
<b>TABELLE 9:</b> PANEL 1; DEFINITION DER GATES IN DER CALL GRUPPE - BEZEICHNET NEGATIVE ZELLEN; + BEZEICHNET LOW POSITIVE ZELLEN; ++ BEZEICHNET HIGH POSITIVE ZELLEN WENN NICHT ANDERS GEKENNZEICHNET LIEGEN DIE AUSGEWÄHLTEN ZELLEN IN R1 .....	21
<b>TABELLE 10:</b> PANEL 2 DEFINITION DER GATES IN DER CALL GRUPPE - BEZEICHNET NEGATIVE ZELLEN; + BEZEICHNET LOW POSITIVE ZELLEN; ++ BEZEICHNET HIGH POSITIVE ZELLEN WENN NICHT ANDERS GEKENNZEICHNET LIEGEN DIE AUSGEWÄHLTEN ZELLEN IN R1 .....	22
<b>TABELLE 11:</b> DEFINITION DER B-ZELLVORLÄUFER.....	24
<b>TABELLE 12:</b> PANEL 1; DEFINITION DER GATES IN DER KONTROLLGRUPPE - BEZEICHNET NEGATIVE ZELLEN; + BEZEICHNET LOW POSITIVE ZELLEN; ++ BEZEICHNET HIGH POSITIVE ZELLEN; WENN NICHT ANDERS GEKENNZEICHNET LIEGEN DIE AUSGEWÄHLTEN ZELLEN IN R1 <sup>[2, 4, 7, 8]</sup> .....	26
<b>TABELLE 13:</b> PANEL 2; DEFINITION DER GATES IN DER KONTROLLGRUPPE - BEZEICHNET NEGATIVE ZELLEN; + BEZEICHNET LOW POSITIVE ZELLEN; ++ BEZEICHNET HIGH POSITIVE ZELLEN; WENN NICHT ANDERS GEKENNZEICHNET LIEGEN DIE AUSGEWÄHLTEN ZELLEN IN R1 <sup>[2, 4, 7, 8]</sup> .....	27
<b>TABELLE 14:</b> MARKER, MIT AUFTEILUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS.....	28
<b>TABELLE 15:</b> GESCHLECHTSVERTEILUNG IM KOLLEKTIV .....	29
<b>TABELLE 16:</b> LISTE DER OBERFLÄCHENMARKER MIT SIGNIFIKANTEM UNTERSCHIED ZWISCHEN BLASTEN UND NORMALEN ZELLEN; K = ANZAHL DER TESTS ZWISCHEN BLASTEN- UND NORMALKOLLEKTIV; NACH BONFERRONI KORRIGIERTES NEUES SIGNIFIKANZNIVEAU SIND FÜR JEDEN MARKER IM GRÜNEN FELD EINGETRAGEN. UNTER DEN P-WERTEN IST DIE RICHTUNG DES UNTERSCHIEDES EINGETRAGEN UND BEZIEHT SICH IMMER AUF BLASTEN IM VERGLEICH ZUR ENTSPRECHENDEN SPALTE. EINE TABELLE DER ABSOLUTEN MFI WERTE IST IM ANHANG ZU FINDEN. % ÜBER-, UNTEREXPRESSION: EINGETRAGEN IST HIER WIE VIEL PROZENT DER MFI WERTE AUF BLASTEN ÜBER DEM GRÖßTEN BZW. UNTER DEM KLEINSTE MFI-WERT DER VERGLEICHSGRUPPE LIEGEN. FARBKODIERUNG: .....	31
<b>TABELLE 17:</b> CD34 UND CD45 STATUS DER C-ALL GRUPPE .....	36
<b>TABELLE 18:</b> ANTIGENSHIFTS ZWISCHEN ERSTDIAGNOSE UND REZIDIV .....	41
<b>TABELLE 19:</b> MFI WERTE .....	55
<b>TABELLE 20:</b> MFI UND LOG10 DATEN VON ERSTDIAGNOSE UND REZIDIV .....	60

## 9 Literatur

1. Kruse, A., *Blutbildung und Konferenzzentren - Aus Rink, L., Kruse, A., Hajo, H. - Immunologie für Einsteiger*. 2015.
2. Kraus, H., et al., *A feeder-free differentiation system identifies autonomously proliferating B cell precursors in human bone marrow*. J Immunol, 2014. **192**(3): p. 1044-54.
3. Schütt, C.B., B., *Grundwissen Immunologie*. Vol. 3. Auflage. 2011, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
4. Schlesier M., W.K., *Charakterisierung der B-Lymphozyten - aus Sack U.; Tárnok A.; Rothe G. Zelluläre Diagnostik - Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 2006.
5. Ghia, P., et al., *Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci*. J Exp Med, 1996. **184**(6): p. 2217-29.
6. Noordzij, J.G., et al., *Composition of precursor B-cell compartment in bone marrow from patients with X-linked agammaglobulinemia compared with healthy children*. Pediatr Res, 2002. **51**(2): p. 159-68.
7. Babusikova, O., et al., *Hematogones in acute leukemia during and after therapy*. Leuk Lymphoma, 2008. **49**(10): p. 1935-44.
8. Sedek, L., et al., *The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: how different are they from their normal counterparts?* Cytometry B Clin Cytom, 2014. **86**(5): p. 329-39.
9. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
10. *Human Cell Differentiation Molecules*. Oktober 2015]; Available from: <http://www.hcdm.org/>.
11. Zola, H., *Medical applications of leukocyte surface molecules--the CD molecules*. Mol Med, 2006. **12**(11-12): p. 312-6.
12. Luttmann, W.B., Kai; Küpper, Michael; Myrtek, Daniel, *Der Experimentator: Immunologie*. Vol. 4. Auflage. 2014, Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
13. Bene, M.C., *Immunophenotyping of acute leukaemias*. Immunol Lett, 2005. **98**(1): p. 9-21.
14. *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*. 2015 Oktober 2015]; Available from: <http://omim.org/>.
15. *Pathologyoutlines.com*. Oktober 2015]; Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd21.html>.
16. Greaves, M.F., et al., *Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia*. Blood, 1986. **67**(1): p. 1-11.
17. Schrappe M., Harbott J., and Riehm H., *Akute lymphatische Leukämien aus Gadner, H., Gaedicke, G., Niemeyer, C., Ritter, J. - Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. 2006: Springer.
18. Ayre, D.C., et al., *Dynamic Regulation of CD24 Expression and Release of CD24-Containing Microvesicles in immature B cells in response to CD24 engagement*. Immunology, 2015.
19. van Dongen, J.J., et al., *EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes*. Leukemia, 2012. **26**(9): p. 1908-75.

20. Borowitz, M.J. and J.K.C. Chan, Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al WHO *Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4. ed. ed. 2008, Lyon, France: IARC.
21. Reinhardt, D. and J. Ritter, *Klassifikation der Leukämie und malignen Lymphome aus Gadner, H., Gaedicke, G., Niemeyer, C., Ritter, J. - Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. 2006: Springer.
22. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
23. Bene, M.C., et al., *Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)*. Leukemia, 1995. **9**(10): p. 1783-6.
24. Kaatsch, P. *Jahresbericht 2013/14 Deutsches Kinderkrebsregister*. 2013.
25. Henze, G., aus Speer, C. P., Gahr, M. *Pädiatrie*. Vol. 4., überarb. Aufl. 2013, Berlin: Springer. XXIV, 1123.
26. *IntReALL 2010*. 29.10.2015]; Available from: <http://www.intreall-fp7.eu>.
27. Lion, T.D., M., *Minimale Resterkrankung - aus Gadner; Gaedicke; Niemeyer; Ritter: Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. 2006: Springer.
28. Kerst, G., et al., *Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR*. Br J Haematol, 2005. **128**(6): p. 774-82.
29. Borowitz, M.J., et al., *Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5477-85.
30. Coustan-Smith, E., et al., *Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse*. Leukemia, 2004. **18**(3): p. 499-504.
31. Eckert, C., et al., *Monitoring minimal residual disease in children with high-risk relapses of acute lymphoblastic leukemia: prognostic relevance of early and late assessment*. Leukemia, 2015. **29**(8): p. 1648-55.
32. Henze, G.F., R.; von Stackelberg, A.; Kretschmann, A. *ALL-REZ BFM 2002*. 2003.
33. *AIEOP-BFM ALL 2009*. 29.10.2015]; Available from: [http://www.bfm-international.org/aieop/aieop\\_index.html](http://www.bfm-international.org/aieop/aieop_index.html).
34. Health, U.S.N.I.o. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01117441>. 16.07.2016].
35. Tomova, A. and O. Babusikova, *Shifts in expression of immunological cell markers in relapsed acute leukemia*. Neoplasma, 2001. **48**(3): p. 164-8.
36. Gaipa, G., et al., *Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection*. Leukemia, 2005. **19**(1): p. 49-56.
37. Rhein, P., et al., *CD11b is a therapy resistance- and minimal residual disease-specific marker in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2010. **115**(18): p. 3763-71.
38. Gaipa, G., et al., *Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in nonapoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells*. Cytometry B Clin Cytom, 2008. **74**(3): p. 150-5.
39. *International Society for Advancement of Cytometry*. 20.10.2015]; Available from: [www.isac-net.org](http://www.isac-net.org).
40. Sack, U.T., A.; Rothe, G., *Zelluläre Diagnostik - Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 2007. XXIV + 1112.
41. Hawley, T.S.H., Robert G., *Flow cytometry protocols*. Humana Press, 2011. **3rd ed.**: p. 486 pages.
42. *Laborjournal online*. 21.10.2015]; Available from: <http://www.laborjournal.de/>.

43. Ratei, R., et al., *Lineage classification of childhood acute lymphoblastic leukemia according to the EGIL recommendations: results of the ALL-BFM 2000 trial*. *Klin Padiatr*, 2013. **225 Suppl 1**: p. S34-9.
44. Weiß, C., *Basiswissen Medizinische Statistik*. Vol. 5. Auflage. 2010, Heidelberg: Springer.
45. Borowitz, M.J., et al., *Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: implications for residual disease detection: a report from the children's oncology group*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2005. **68(1)**: p. 18-24.
46. Brosius, F., *SPSS 21*. Vol. 1. Auflage. 2013, Heidelberg, München, Landsberg, Frechen, Hamburg mitp, eine Marke der Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH
47. Li, X., et al., *Comprehensive flow cytometry phenotype in acute leukemia at diagnosis and at relapse*. *APMIS*, 2010. **118(5)**: p. 353-9.
48. Coustan-Smith, E., et al., *A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome*. *Blood*, 2006. **108(1)**: p. 97-102.
49. Obro, N.F., et al., *Identification of residual leukemic cells by flow cytometry in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: verification of leukemic state by flow-sorting and molecular/cytogenetic methods*. *Haematologica*, 2012. **97(1)**: p. 137-41.
50. McKenna, R.W., et al., *Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry*. *Blood*, 2001. **98(8)**: p. 2498-507.
51. Szczepanski, T., V.H. van der Velden, and J.J. van Dongen, *Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes*. *Clin Chem Lab Med*, 2006. **44(7)**: p. 775-96.
52. Dworzak, M.N., et al., *Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny*. *Blood*, 1998. **92(9)**: p. 3203-9.
53. Seegmiller, A.C., et al., *Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of B acute lymphoblastic leukemia*. *Am J Clin Pathol*, 2009. **132(6)**: p. 940-9.
54. Lucio, P., et al., *Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL*. *Leukemia*, 1999. **13(3)**: p. 419-27.
55. Farahat, N., et al., *Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukaemic B-cell precursors*. *Br J Haematol*, 1995. **91(3)**: p. 640-6.
56. Karawajew, L., et al., *Minimal residual disease analysis by eight-color flow cytometry in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2015. **100(7)**: p. 935-44.
57. Lai, R., et al., *Flow cytometric detection of CD79a expression in T-cell acute lymphoblastic leukemias*. *Am J Clin Pathol*, 2000. **113(6)**: p. 823-30.
58. Campana, D. and E. Coustan-Smith, *Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia*. *Acta Haematol*, 2004. **112(1-2)**: p. 8-15.
59. Veltroni, M., et al., *Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia*. *Haematologica*, 2003. **88(11)**: p. 1245-52.
60. Coustan-Smith, E., et al., *New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2011. **117**: p. 6267-6276.

61. Loghavi, S., J.L. Kutok, and J.L. Jorgensen, *B-acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma*. *Am J Clin Pathol*, 2015. **144**(3): p. 393-410.
62. Hassanein, N.M., et al., *Distinct expression patterns of CD123 and CD34 on normal bone marrow B-cell precursors ("hematogones") and B lymphoblastic leukemia blasts*. *Am J Clin Pathol*, 2009. **132**(4): p. 573-80.
63. Djokic, M., et al., *Overexpression of CD123 correlates with the hyperdiploid genotype in acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2009. **94**(7): p. 1016-9.
64. Cox, C.V., et al., *Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL*. *Blood*, 2009. **113**(14): p. 3287-96.
65. Tolba, F.M., et al., *Expression of CD133 in acute leukemia*. *Med Oncol*, 2013. **30**(2): p. 527.
66. Kalina, T., et al., *Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens*. *BMC Cancer*, 2005. **5**: p. 38.
67. Suggs, J.L., J.M. Cruse, and R.E. Lewis, *Aberrant myeloid marker expression in precursor B-cell and T-cell leukemias*. *Exp Mol Pathol*, 2007. **83**(3): p. 471-3.
68. Hans, C.P., et al., *Usefulness of anti-CD117 in the flow cytometric analysis of acute leukemia*. *Am J Clin Pathol*, 2002. **117**(2): p. 301-5.
69. Ahmadi, A., et al., *Diagnostic value of CD117 in differential diagnosis of acute leukemias*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(7): p. 6763-8.
70. Borowitz, M.J., *Mixed phenotype acute leukemia*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014. **86**(3): p. 152-3.
71. Manivannan, P., et al., *Can threshold for MPO by flow cytometry be reduced in classifying acute leukaemia? A comparison of flow cytometric and cytochemical myeloperoxidase using different flow cytometric cut-offs*. *Hematology*, 2014.
72. Porwit, A. and M.C. Bene, *Acute leukemias of ambiguous origin*. *Am J Clin Pathol*, 2015. **144**(3): p. 361-76.
73. Stass, S., et al., *Lineage switch in acute leukemia*. *Blood*, 1984. **64**(3): p. 701-6.
74. van Wering, E.R., et al., *Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 1995. **9**(9): p. 1523-33.
75. Shah, N.N., et al., *Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2015. **62**(6): p. 964-9.
76. Kalina, T., et al., *EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols*. *Leukemia*, 2012. **26**(9): p. 1986-2010.
77. Kalina, T., et al., *Quality assessment program for EuroFlow protocols: summary results of four-year (2010-2013) quality assurance rounds*. *Cytometry A*, 2015. **87**(2): p. 145-56.
78. Homburger, H.A., et al., *Assessment of interlaboratory variability of immunophenotyping. Results of the College of American Pathologists Flow Cytometry Survey*. *Ann N Y Acad Sci*, 1993. **677**: p. 43-9.
79. Reilly, J.T. and D. Barnett, *UK NEQAS for leucocyte immunophenotyping: the first 10 years*. *J Clin Pathol*, 2001. **54**(7): p. 508-11.
80. Gandemer, V., et al., *CD9 expression can be used to predict childhood TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia: proposal for an accelerated diagnostic flowchart*. *Leuk Res*, 2010. **34**(4): p. 430-7.
81. Beckman Coulter. 04.12.2015]; Available from: <http://www.beckmancoulter.de/>.
82. Husak, Z., et al., *Death induction by CD99 ligation in TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia and normal B cell precursors*. *J Leukoc Biol*, 2010. **88**(2): p. 405-12.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Stammzelllabor der Kinderklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der unermüdlichen Leitung von Professor Dr. med. M. K. E. Eyrich angefertigt. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank, für seine endlose Geduld, Unterstützung und Zeit die er trotz seiner zahlreichen Aufgaben immer wieder für mich gefunden hat.

Für die Möglichkeit an der Universitätskinderklinik Würzburg zu promovieren möchte ich mich bei Professor Dr. med. C. P. Speer bedanken.

Herzlichen Dank an Heidi Tscherner, die mich, besonders in der Anfangsphase, in die Mysterien der FACS Technologie und Auswertung eingewiesen hat.

Ohne meine Familie und meine Freunde wäre ich keinen Zoll weit durch dieses Studium und noch weniger durch die Promotion oder das Arbeitsleben gekommen. Danke für euer Lachen, eure Geschichten, eure Freundschaft.

Mit Worten nur unzureichend zu formulieren ist der Dank an meine Mutter, die immer für mich da ist und mich immer meinen Weg gehen lässt, meine aufgeschlagenen Knie verarztet, wenn ich wieder mal falle und sich uneingeschränkt für mich freut, wenn etwas gelingt. Es ist geschafft. Danke.



## **Lebenslauf**

Aus Datenschutzgründen erscheint der aktuelle Lebenslauf nicht in der elektronischen Version.