Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Innere Medizin

Klinik für Innere Medizin III

Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie und Infektionskrankheiten

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

Monitoring der Minimalen Resterkrankung in der *NPM1* mutierten Akuten Myeloischen Leukämie mittels quantitativer Real-Time PCR

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der

Medizinischen Fakultät

der

Universität Ulm

vorgelegt von

Florian Jonas Tschürtz

aus

Mutlangen

2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Konstanze Döhner

2. Berichterstatter: PD Dr. Lüder Hinrich Meyer

Tag der Promotion: 09.05.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ..... **IV**

1. Einleitung **1**

1.1 Die Akute Myeloische Leukämie (AML) 1

1.1.1 Definition und Inzidenz 1
1.1.2 Allgemeine Charakteristika der AML 1
1.1.3 Klassifikation der AML 3
1.1.4 Zytogenetisch normale AML (CN-AML) 5

1.2 Nukleophosmin 1 (NPM1): Struktur und funktionelle Bedeutung 6

1.2.1 Gen und Struktur des Proteins 6
1.2.2 NPM1 Expression und Shuttlemechanismus 7
1.2.3 Funktion von NPM1 8

1.3 AML mit mutiertem *NPM1* (*NPM1*^{mut} *AML*) 10

1.3.1 Inzidenz und Assoziation mit anderen genetischen Veränderungen 10
1.3.2 Mutationstypen und deren Auswirkungen 11
1.3.3 Klinische Merkmale der *NPM1*^{mut} AML 13
1.3.4 Therapieansprechen und Prognose 14

1.4 Minimale Resterkrankung (MRD) 15

1.4.1 Bedeutung des Monitoring der MRD 15
1.4.2 Monitoring der *NPM1*^{mut} AML 17
1.4.3 Prädiktion von Rezidiven 17

1.5 Zielsetzung 19

2. Material und Methoden **20**

2.1 Reagenzien, Chemikalien und Geräte 20

2.1.1 RNA-Extraktion 20
2.1.2 cDNA-Synthese 21
2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese 21
2.1.4 Quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR) 22
2.1.5 Klonierung der Plasmide 23
2.1.6 Verwendete Primer 24

2.2 Patienten und Therapie 25

2.2.1 Patienten 25
2.2.2 Therapieschema 25
2.2.3 Zytogenetische und molekulare Analyse 27

2.3 Materialgewinnung und Probenaufbereitung 27

2.3.1 Materialgewinnung 27
2.3.2 Zellisolation und Zellarchivierung 27
2.3.3 RNA-Extraktion 28
2.3.4 cDNA-Sythese 31
2.3.5 Quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR) 32
2.3.6 Generierung und Präparation der Plasmid-DNA für die Standardreihe 38

2.4 Statistische Verfahren 45
2.4.1 Wilcoxon-Mann-Whitney-Test 45
2.4.2 Prädiktion der Rezidive 45

3. Ergebnisse **47**
3.1 Etablierung der RQ-PCR Assays für die Mutationstypen Km, Nm und Qm 47
3.1.1 Inzidenz der Mutationstypen 47
3.1.2 Design der RQ-PCR Assays und R‘-Primer 48
3.1.3 Spezifität der R‘-Primer 48
3.1.4 Reinheit und Menge der Plasmid-DNA 49
3.1.5 Gelelektrophoretische Überprüfung der Plasmid-DNA 50
3.1.6 Sequenzierung des Inserts 51
3.1.7 Herstellung der Plasmid-Stocks 52
3.1.8 Etablierung der RQ-PCR Standardkurven 53
3.1.9 Sensitivität und Spezifität 56
3.2 *NPM1*^{mut} Transkript-Level bei Diagnose und Rezidiv 57
3.3 Definition eines Schwellenwertes für die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit während der Nachbeobachtungsphase 58
3.4 Bestimmung eines optimalen Probenintervallabstandes im Follow-up 61
3.5 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analyse 66
3.5.1 Charakterisierung der Patienten 66
3.5.2 Veränderung des Karyotyps von Diagnose zum Rezidiv 66

4. Diskussion **72**
4.1 Nachweis Minimaler Resterkrankung bei der AML 72
4.2 RQ-PCR Assays für die Mutationstypen Km, Nm und Qm 73
4.3 Vergleich des *NPM1*^{mut} Transkript-Levels bei Diagnose und Rezidiv 75
4.4 Definition eines Schwellenwertes für die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit während der Nachbeobachtungsphase 76
4.5 Etablierung eines optimalen Probenintervallabstandes im Follow-up 77
4.6 Klonale Evolution von Diagnose zum Rezidiv 80

5. Zusammenfassung **85**

6. Literaturverzeichnis **87**

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABL	*Abelson murine leukemia virus oncogene* (engl.)
ALK	*Anaplastic lymphoma kinase* (engl.)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
Allo-SCT	Allogene Stammzelltransplantation
AML	Akute myeloische Leukämie
AMLSG	Deutsch-Österreichische Studiengruppe Akute Myeloische Leukämie
AMML	Akute myelomonozytische Leukämie
APL	Akute promyelozytische Leukämie
ARF	Alternate reading frame protein (engl.)
ASXL1	*Additional sex combs like 1* (engl.)
ATRA	All-trans-Retinsäure
Auto-SCT	Autologe Stammzelltransplantation
BAALC	*Brain and acute leukemia*, *cytoplasmic* (engl.)
BCR	*Breakpoint cluster region gene* (engl.)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBF	Core-binding-factor (engl.)
CBFB	*Core-binding factor*, beta subunit (engl.)
CCD	Charge-Coupled Device (engl.)
CDK2	Cyclin-dependent-kinase 2 (engl.)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEBPA	*CCAAT/enhancer-binding protein alpha* (engl.)
CML	Chronische myeloische Leukämie
CNA	Copy Number Alteration (engl.)
CN-AML	Karyotypisch-normale akute myeloische Leukämie
CR	Komplette Remission
CSR	Cycle sequencing reaction (engl.)
C_T	Threshold cycle (engl.)
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
Del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT3A	Desoxyribonukleinsäure-Methyltransferase 3a
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	*Ets Related Gene* (engl.)
et al.	et alii, et aliae, et alia
ETV6	*ETS variant gene 6* (engl.)

EVI1	*Ecotropic virus integration site 1* (engl.)
F‘-Primer	Forward-Primer (engl.)
FAB	French-American-British (engl.)
FAM	6-Carboxy-fluoreszein (engl.)
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLT3-ITD	*FMS-like tyrosine kinase 3* mit internen Tandemduplikationen
FLT3-TKD	*FMS-like tyrosine kinase 3* mit Mutation der Tyrosin-Kinase-Domäne
HAM	Hochdosis-Cytarabin plus Mitoxantron
HNPRK	*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (engl.)
HR	Hämatologisches Rezidiv
i.v.	Intravenös
IDH1	*Isocitrate dehydrogenase 1* (engl.)
IgVH	Immunoglobulin Heavy Chain Locus (engl.)
ISCN	International System for Cytogenetic Nomenclature (engl.)
kb	Kilo-Basenpaar
KIT	*V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog* (engl.)
KM	Knochenmark
LB	Lysogeny broth (engl.)
LDH	Laktatdehydrogenase
MDM2	Mouse double minutes 2 (engl.)
MDS	Myelodysplastische Syndrom
min	Minuten
MKL1	*Megakaryoblastic leukemia (translocation) 1* (engl.)
MLF1	*Myeloid leukemia factor 1* (engl.)
MLL-MLLT3	*Mixed-lineage leukemia translocated to chromosome 3* (engl.)
MLL-PTD	Partielle Tandem-Duplikation des *Mixed lineage leukemia*-Gens
MN1	*Meningioma 1* (engl.)
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MR	Molekulares Rezidiv
MRD	Minimal residual disease (engl.), Minimale Resterkrankung (dt.)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MYH11	Myosin heavy chain 11 (engl.)
NES	Nukleus-Exportsignal
NF1	*Neurofibromatose Typ 1*
NLS	Nukleus-Lokalisierungssignal
NPM1	*Nukleophosmin 1*
NPM1^{mut}	Mutiertes *Nukleophosmin 1*
NPM1^{wt}	*Nukleophosmin 1* Wild-Typ
NRAS	*Neuroblastoma RAS*
Nr.	Nummer
NTC	No-Template-Control (engl.)

NTRK2	*Neurotrophic tyrosine receptor kinase 2* (engl.)
NUP214	*Nucleoporin* 214 kDa (engl.)
OD	Optische Dichte
OS	Overall Survival (engl.)
p.o.	per os
PB	Peripheres Blut
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PR	Partielle Remission
R'-Primer	Reverse-Primer (engl.)
R^2	Korrelationskoeffizient
RARα	*Retinoic acid receptor-alpha* (engl.)
RD	Refraktäre Erkrankung
RDF	Relapse detection fraction (engl.)
RFS	Rezidivfreies Überleben
R_n	Normalisierte Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes
RNA	Ribonukleinsäure
RPN1	*Ribophorin I* (engl.)
RQ-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
rRNA	Ribosomale-Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RUNX1	*Runt-related transcription factor 1* (engl.)
RUNX1-RUNX1T1	*Runt-related transcription factor 1* translocated to 1 (engl.)
S	Svedberg-Einheit
s.c.	subkutan
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (engl.)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
t-AML	Therapieassoziierte akute myeloische Leukämie
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TET2	*Ten-Eleven-Translocation 2* (engl.)
t_m	Mediane Zeit vom molekularen zum hämatologischen Rezidiv
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPD	Uniparentale Disomien
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
V	Volt
WBC	White Blood Cell (engl.)
vs.	versus
WHO	World Health Organization (engl.)
WT1	*Wilms-Tumorsuppressorgen*

1. Einleitung

1.1 Die Akute Myeloische Leukämie (AML)

1.1.1 Definition und Inzidenz

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Neoplasie des Knochenmarks, die durch genetische Veränderungen in einer hämatopoetischen Stammzelle oder frühen Vorläuferzelle entsteht. Diese genetischen Veränderungen führen zu einer unkontrollierten Proliferation und mangelhaften Differenzierung der betroffenen Zellreihen und einer gleichzeitigen Expansion von unreifen Zellen (Blasten) im Knochenmark und peripheren Blut. Das Verdrängen der normalen Hämatopoese führt zu Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie mit der Folge von fatalen Infektionen, massiven Blutungen und Organinfiltrationen. Bei Erwachsenen stellt die AML die häufigste akute Leukämieform dar und hat eine Inzidenz von 3-4 Fällen pro 100.000 Einwohner. Die Häufigkeit nimmt mit dem Alter zu; das mediane Erkrankungsalter liegt bei 70 Jahren (Estey et al. 2006).

1.1.2 Allgemeine Charakteristika der AML

1.1.2.1 Ätiologie

Mit der Entstehung der AML wurden bisher verschiedene erbliche Erkrankungen wie die Fanconi-Anämie, Bloom-Syndrom, Ataxia telangiectasia und das Kostmann-Syndrom in Verbindung gebracht. Des Weiteren sind Syndrome, die mit einer Chromosomenaneuploidie somatischer Zellen einhergehen wie die Trisomie 21, mit einer erhöhten Inzidenz assoziiert. Eine sogenannte therapieassoziierte AML (t-AML) entsteht meist 1-3 Jahre nach der Applikation von Zytostatika, insbesondere Alkylanzien und Topoisomerase II-Inhibitoren. Eine AML kann sich außerdem aus anderen Erkrankungen der Hämatopoese entwickeln. Zu diesen gehören das myelodysplastische Syndrom (MDS), die aplastische Anämie und myeloproliferative Neoplasien. Weitere Risikofaktoren sind ionisierende Strahlung, chemische Substanzen wie Benzol und Tabakrauch.

1.1.2.2 Therapie

Die Therapie der AML erfolgt risikoadaptiert und ist meist eine intensivierte Chemotherapie. Zu Beginn erfolgt die Induktionstherapie überwiegend mit Cytarabin und einem Anthracyclin nach dem sogenannten 7+3 Schema (7 Tage Cytarabin, 3 Tage Anthracyclin), gegebenenfalls kombiniert mit Etoposid, 6-Thioguanin oder neuen, in der Prüfung befindlichen Substanzen. Hochdosis-Cytarabin-Regime oder eine Doppelinduktion sind Möglichkeiten auf Kosten einer erhöhten Toxizität die Rate der kompletten Remissionen (CR) zu steigern. Nach Erreichen einer CR erfolgt die Postremissionstherapie, die bei Standardrisiko- oder Niedrigrisiko-Patienten eine Konsolidierungstherapie mit mehreren Zyklen Hochdosis-Cytarabin umfasst. Bei Patienten mit ungünstiger Zytogenetik, Nichterreichen einer CR oder mit einem Rezidiv wird in der Regel eine allogene Stammzelltransplantationen (Allo-SCT) durchgeführt (Döhner et al. 2010).

1.1.2.3 Prognose

Bereits in den Achtzigerjahren konnte gezeigt werden, dass chromosomale Veränderungen mit dem klinischen Risikoprofil assoziiert sind (Bloomfield et al. 1984, Arthur et al. 1989). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die Patienten in eine Niedrig-, Standard- und Hochrisikogruppe eingeteilt. Zu den günstigen Veränderungen gehören unter anderem die Translokationen t(8;21)(q22;q22) *RUNX1-RUNX1T1* (*Runt-related transcription factor 1 - translocated to 1*), inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22) *CBFB-MYH11* (*Core-binding factor, beta subunit - Myosin heavy chain 11*) oder t(15;17)(q22;q12) *PML-RARα (Acute promyelocytic leukemia - Retinoic acid receptor-alpha*), zu den ungünstigen gehören inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) *RPN1-EVI1* (*Ribophorin 1 - Ecotropic virus integration site 1*), balancierter Translokation mit 11q23 und anderen als t(9;11)(p22;q23) *MLL-MLLT3* (*Mixed-lineage leukemia translocated to chromosome 3*) und komplexe Karyotypen. Die zytogenetisch normale AML (CN-AML) und weitere Aberrationen wurden der Standardrisikogruppe zugeordnet (Grimwade et al. 2001, Byrd et al. 2002). Das Gesamtüberleben (OS) nach 10 Jahren beträgt in der Niedrigrisikogruppe 69%, in der Standardrisikogruppe ohne CN-AML 30%, in der CN-AML Subgruppe 38% und in der Hochrisikogruppe 9% (Grimwade et al. 2010). Des Weiteren stellt das Alter einen unabhängigen und ungünstigen Prognosefaktor dar. Ebenso

korrelieren Leukozytenzahlen größer als 100.000/µl, erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH)-Werte und ein verlängertes symptomatisches Intervall mit Zytopenien oder hämatologische Störungen in der Anamnese mit einer schlechten Prognose. Nach Beginn der Therapie ist das Erreichen einer CR der bedeutendste prognostisch günstige Faktor. Insgesamt ist die Prognose der AML schlechter als die der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und chronischen Leukämieformen (Fauci et al. 2009, Herold 2013).

1.1.3 Klassifikation der AML

Als erste Klassifikation, die die verschiedenen Subtypen der AML beschreibt, wurde 1976 die French-American-British (FAB)-Klassifikation eingeführt (Bennett et al. 1976). Die Blut- und Knochenmarkausstriche von 200 AML-Fällen wurden anhand ihrer morphologischen und zytochemischen Charakteristika in die Gruppen M0 bis M7 eingeteilt. 1985 wurden diese Verfahren und die Klassifikation durch immunologische Untersuchungen ergänzt (Bennett et al. 1985).

Die FAB-Klassifikation wurde 2001 durch die World Health Organization (WHO)-Klassifikation abgelöst, die im Gegensatz zur FAB-Klassifikation auch auf zytogenetischen Veränderungen basiert, die in ca. 55% aller AML gefunden werden (Jaffe ES et al. 2001). Abgesehen von einigen Ausnahmen wie der akuten promyelozytischen Leukämie (APL) (FAB-Subtyp M3, t(15;17)) oder der akuten myelomonozytischen Leukämie (AMML) mit abnormen Eosinophilen (FAB-Subtyp M4Eo, inv(16)) korrelieren die genetischen Veränderungen nicht mit den morphologischen Eigenschaften. Neben der stärkeren Orientierung an der Pathogenese erlaubt die WHO-Klassifikation auch eine prognostische Einteilung verschiedener Subgruppen, da die zytogenetischen Veränderungen im Gegensatz zu den morphologischen Merkmalen aus der FAB-Klassifikation mit der Prognose korrelieren (Bacher et al. 2006, Mrozek et al. 2006). In der revidierten WHO-Klassifikation von 2008 wurden erstmals genetische Veränderungen, die *Nukleophosmin 1* (*NPM1)* und *CCAAT/enhancer-binding protein alpha* (*CEBPA*) Mutationen, als provisorische Entitäten zur Klassifizierung der AML aufgenommen, da diese eigene Phänotypen definieren (Tabelle 1). Anhand genetischer Veränderungen können nun mehr als 50% der de-novo-AML klassifiziert werden (Swerdlow SH et al. 2008).

Tabelle 1: World Health Organization (WHO)-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (AML) adaptiert nach Swerdlow SH et al. 2008.

Abkürzungen: *RUNX1-RUNX1T1 = Runt-related transcription factor 1 translocated to 1*; *CBFB = Core-binding factor, beta subunit; MYH11 = Myosin heavy chain 11;* PML = Promyelozytische Leukämie; *RARα = Retinoic acid receptor-alpha*; *MLL-MLLT3 = Mixed-lineage leukemia translocated to chromosome 3*; *NUP214 = Nucleoporin 214kDa*; *RPN1 = Ribophorin I*; *EVI1 = Ecotropic virus integration site 1 protein homolog*; *RBM15 = Ribonukleinsäure binding motif protein 15*; *MKL1 = Megakaryoblastic leukemia (translocation) 1*; *NPM1 = Nukleophosmin 1*; *CEBPA = CCAAT/enhancer binding protein alpha.*

Kategorie	Morphologie
AML mit rekurrenten genetischen Anomalitäten	AML mit t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1* AML mit inv(16)(p13.1q22) / t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11* Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)(q22;q12); *PML-RARα* AML mit t(9;11)(p22;q23); *MLL-MLLT3* AML mit t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214* AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1* AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1* AML mit mutiertem *NPM1* AML mit mutiertem *CEBPA*
AML mit Myelodysplasie assoziierten Veränderungen	Akute Leukämie mit morphologischen Merkmalen der Myelodysplasie oder ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) in der Vorgeschichte oder myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasien (MDS/MPN) Akute Leukämie mit MDS-bedingter zytogenetischer Anomalität
Therapieassoziierte myeloische Neoplasie	Therapieassoziierte akute myeloische Leukämie (t-AML) Therapieassoziiertes myelodysplastisches Syndrom (t-MDS) Therapieassoziierte myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasie (t-MDS/MPN)
Myeloische Proliferation assoziiert mit dem Down-Syndrom	Transiente anomale Myelopoiese Myeloische Leukämie assoziiert mit Down Syndrom
Myeloisches Sarkom	
Blastische plasmatytoide dendritische Zellneoplasie	

Fortsetzung auf Seite 5

Fortsetzung Tabelle 1

Kategorie	Morphologie
Akute myeloische Leukämie, nicht anders spezifiziert	AML mit minimaler Differenzierung
	AML ohne Maturation
	AML mit Maturation
	Akute myelomonozytische Leukämie
	Akute monoblastische/monozytische Leukämie
	Akute erythroide Leukämie
	Akute megakaryoblastische Leukämie
	Akute basophile Leukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose

1.1.4 Zytogenetisch normale AML (CN-AML)

Die größte zytogenetische Subgruppe der AML stellt die CN-AML mit ungefähr 45% aller AML-Fällen dar (Mrozek et al. 2007). Die Rate der CN-AML unter allen AML ändert sich mit steigendem Alter kaum, die absolute Häufigkeit nimmt jedoch zu (Grimwade et al. 2001, Bacher et al. 2005). In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Mutationen in Genen entdeckt, die eine weitere biologische sowie prognostische Unterteilung dieser auf molekularer Ebene sehr heterogenen Gruppe erlauben. Insgesamt konnten bei 79% der CN-AML genetische Veränderungen nachgewiesen werden (Schlenk et al. 2008). Hierzu gehören neben der *NPM1* Mutation, die in den folgenden Abschnitten gesondert diskutiert wird, die *FMS-like tyrosine kinase 3* (*FLT3*) Mutation und die *CEBPA* Mutation. *FLT3* mit internen Tandemduplikationen (*FLT3*-ITD) hat eine Inzidenz von ca. 31% in der Gruppe der CN-AML. Diese Patienten haben eine schlechtere Prognose im Vergleich zu Patienten ohne *FLT3*-ITD. *CEBPA* Mutationen wurden in 13% der Patienten mit CN-AML gefunden und sind mit einer guten Prognose assoziiert (Schlenk et al. 2008). Weitere Mutationen in Genen wie *MLL*-PTD (Tandem-Duplikationen innerhalb des *MLL*-Gens), *WT1* (*Wilms-Tumorsuppressorgen 1*), *RUNX1 (Runt-related transcription factor 1)*, *DNMT3A (Desoxyribonukleinsäure methyltransferase 3a*), *TET2* (*Ten-Eleven-Translocation 2*), *IDH1/2* (*Isocitrate dehydrogenase 1/2*) und deregulierte Expressionen wie bei *EVI1* (*Ecotropic virus integration site 1*), *ERG* (Ets related gene), *MN1* (*Meningioma 1*) und *BAALC* (*Brain and acute leukemia*, *cytoplasmic*) konnten in CN-AML nachgewiesen

werden. Die Anzahl der detektierten Mutationen und veränderten Genexpressionen wird sich durch die Einführung der Next Generation Sequencing weiter erhöhen (Ding et al. 2012). Bisher ist bei vielen dieser Gene unklar, ob sie eine klinisch-prognostische Bedeutung haben. Diese muss in größeren Studien validiert werden und ist aufgrund der oft niedrigen Frequenz dieser Mutationen schwierig.

1.2 Nukleophosmin 1 (NPM1): Struktur und funktionelle Bedeutung

1.2.1 Gen und Struktur des Proteins

NPM1 befindet sich auf dem Chromosom 5q35 und besteht aus 12 Exons (Chang et al. 1990). Das Protein existiert in drei verschiedenen Isoformen, die aufgrund unterschiedlicher Splicevorgänge entstehen. Die erste Isoform (B23.1), die aus 294 Aminosäuren besteht, kommt ubiquitär vor. Bei der Transkription wird Exon 1 bis 9 und Exon 11 bis 12 transkribiert. Die zweite Isoform (B23.2) hat mit 265 Aminosäuren 29 weniger als die erste Isoform. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass B23.2 nur in sehr geringem Maße exprimiert wird (Wang et al. 1993). In immunzytochemischen Analysen wurde B23.2 hauptsächlich im Nukleoplasma gefunden (Dalenc et al. 2002). Über die dritte Isoform (B23.3), die aus 259 Aminosäuren besteht, liegen keine detaillierten Untersuchungen vor.

NPM1 ist ein hoch konserviertes, etwa 37 kiloDalton schweres, nukleoläres Phosphoprotein (Yun et al. 2003). Es beinhaltet unterschiedliche Domänen, die verschiedene biochemische Funktionen ermöglichen. Das N-terminale hydrophobe Ende (Namboodiri et al. 2004) von NPM1 enthält die Region, die für die Selbstoligomerisierung verantwortlich ist (Yung et al. 1987). Deshalb existiert 95% des zellulären NPM1 als Oligomer (Chan et al. 1995). Des Weiteren befindet sich am N-terminalen Ende ein hoch konserviertes Motiv, das für die Bindung an ARF (Alternate reading frame protein) bedeutend ist (Enomoto et al. 2006). Für die Funktion als Chaperon sind sowohl die N-

terminale Domäne als auch die beiden sauren Domänen verantwortlich, die im mittleren Teil des Proteins lokalisiert sind (Hingorani et al. 2000). Damit hat NPM1 die Fähigkeit, die Proteinaggregation im Nukleolus zu verhindern und die Entfaltung von Histonen und Nukleosomen zu begünstigen (Namboodiri et al. 2004, Okuwaki et al. 2001). Das Segment zwischen den sauren Abschnitten sowie die C-terminale Region sind an der Ribonuklease-Aktivität des Proteins beteiligt (Hingorani et al. 2000). Das C-terminale Ende besteht aus einer kurzen aromatischen Strecke mit zwei Tryptophanen an Position 288 und 290, welche für die NPM1-Bindung an den Nukleolus essentiell sind (Nishimura et al. 2002). Die B23.1 Isoform enthält außerdem noch ein zweiteiliges Nukleus-Lokalisierungssignal (NLS)-Motiv (Hingorani et al. 2000), Leucin reiche Nukleus-Exportsignal (NES)-Motive (Wang et al. 2005, Yu et al. 2006) und verschiedene Phosphorylierungsstellen, die die Assoziation mit dem Zentrosom (Nishimura et al. 2002) und mit subnukleären Kompartimenten regulieren (Abb. 1) (Negi et al. 2006).

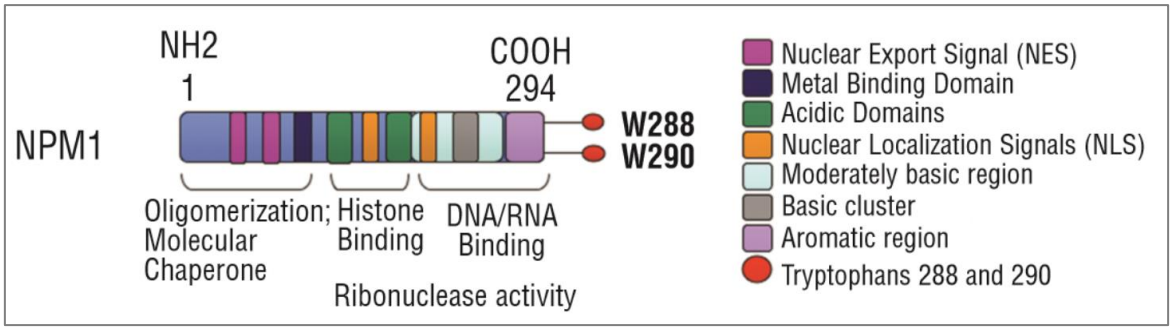

Abbildung 1: Struktur und funktionelle Domänen des Proteins Nukleophosmin 1 (NPM1) nach Falini et al. 2007a.

Abkürzungen: DNA = Desoxyribonukleinsäure; RNA = Ribonukleinsäure.

1.2.2 *NPM1* Expression und Shuttlemechanismus

NPM1 wird in nahezu allen Geweben exprimiert. Die Expression ist in proliferierenden Zellen höher als in ruhenden Zellen (Dergunova et al. 2002) und die Expression wird als Antwort auf Mitosestimuli gesteigert (Feuerstein et al. 1988). Das *Myc*-Protoonkogen, das viele Gene, die die Proliferationsrate erhöhen, beeinflusst, ist auch ein Transkriptionsfaktor für die *NPM1* Expression (Zeller et al. 2001). Eine Überexpression von *NPM1* begünstigt das Überleben und die Erholung von hämatologischen Stammzellen

unter Stressbedingungen (Li et al. 2006) und verringert die Sensitivität auf Retinolsäure induzierter Differenzierung und Apoptose (Hsu et al. 2000). Umgekehrt blockiert der Verlust von NPM1 oder die Inhibition des Shuttlemechanismus die Proteintranslation und bewirkt einen Arrest im Zellzyklus (Yu et al. 2006).

NPM1 pendelt ständig zwischen Nukleus und Zytoplasma, aber der Großteil des Proteins befindet sich in der Granularegion des Nukleolus (Yun et al. 2003, Borer et al. 1989). Der nukleozytoplasmatische Transport von NPM1 ist streng reguliert, da viele Funktionen von der Verteilung abhängen. Unter physiologischen Verhältnissen überwiegt der Import von NPM1 in den Nukleus den Export bei weitem. Der NPM1 Verkehr zwischen Nukleus und Zytoplasma wird größtenteils über die NLS- (Hingorani et al. 2000) und NES-Motive geregelt (Wang et al. 2005, Yu et al. 2006), wobei das NLS-Signal einen Import ins Nukleoplasma und das NES-Signal einen Export des NPM1 bewirkt.

1.2.3 Funktion von NPM1

NPM1 ist ein multifunktionelles Protein, das sowohl für Proteine als auch für Nukleinsäuren als Chaperon fungiert (Dumbar et al. 1989). Zu den Funktionen von NPM1 gehören solche, die das Zellwachstum fördern. So nimmt NPM1 an dem Transport von preribosomalen Partikeln und an der Ribosomenbiosynthese teil (Olson et al. 1986). Des Weiteren ist NPM1 daran beteiligt, die genomische Stabilität durch die Beteiligung an Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Reparaturmechanismen (Lee et al. 2005, Wu et al. 2002) und durch die Regulation der Zentrosomenduplikation zu erhalten (Okuda 2002). In diesen Fällen supprimiert NPM1 das Zellwachstum.

Eine weitere wichtige Funktion von NPM1 besteht in der Interaktion mit den Tumorsuppressorproteinen p53 und ARF. Unter physiologischen Umständen ist NPM1 hauptsächlich im Nukleolus zu finden. Dort formen NPM1 und ARF hochmolekulare Komplexe (Bertwistle et al. 2004). Durch diese Bindung verhindert NPM1 den Abbau von ARF (Kuo et al. 2004, Colombo et al. 2005) und erhält so ein basales ARF-Level im Nukleolus, da ARF wahrscheinlich, wenn nicht an NPM1 gebunden, sehr instabil ist (Sherr 2006).

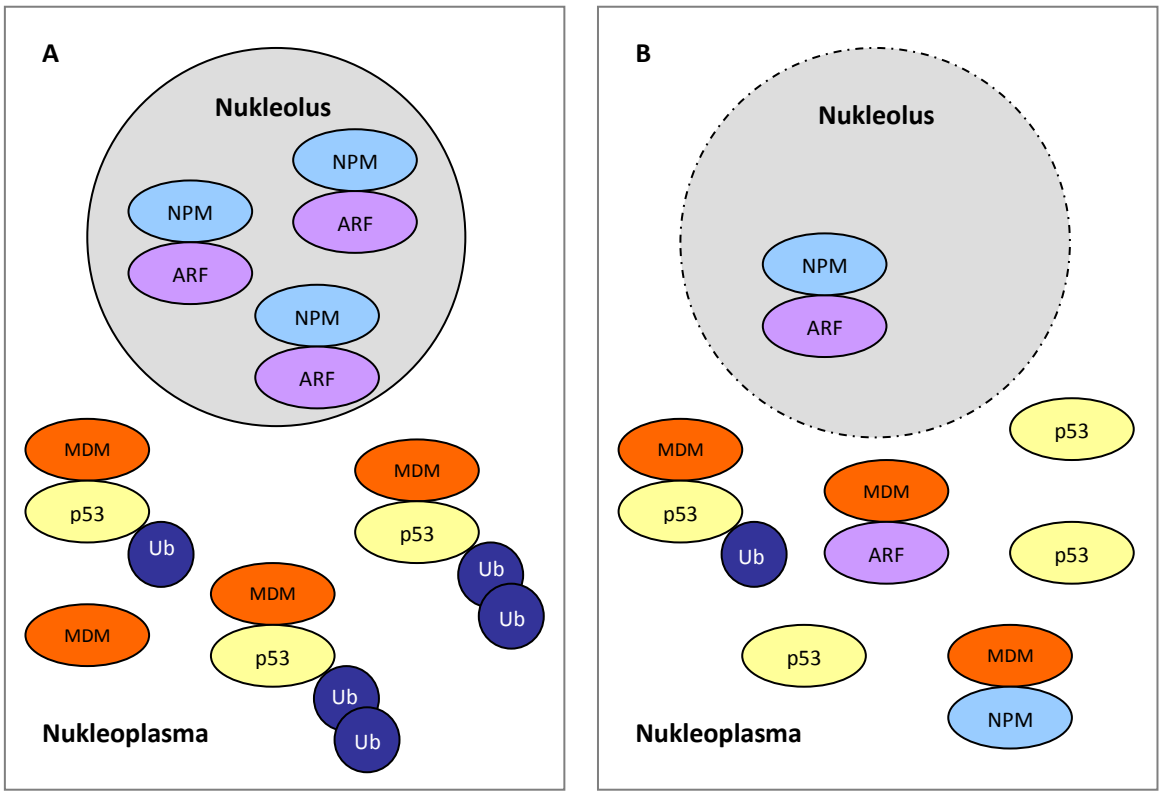

Abbildung 2: Interaktion zwischen Nukleophosmin 1 (NPM1) und Alternate reading frame protein (ARF) und Auswirkung auf das Tumorsuppressorprotein p53.

A: Normale Lokalisation von NPM1 und ARF aneinander gebunden im Nukleolus. Im Nukleoplasma bewirkt MDM2 (Mouse double minutes 2) eine Degradation von p53 durch Polyubiquitinierung (Ub).

B: Nach zellulärem Stress wird der Nukleolus instabil und NPM1 und ARF translozieren ins Nukleoplasma. Dort gehen die Proteine eine Bindung mit MDM2 ein. Durch den verminderten Abbau liegt p53 in höheren Mengen vor und verursacht einen Arrest im Zellzyklus.

Infolge onkogener Stimulation wird NPM1 und ARF vermehrt exprimiert. Es bilden sich NPM1-MDM2 (Mouse double minutes 2) (Kurki et al. 2004) und ARF-MDM2 Komplexe (Lee et al. 2005). Das so inhibierte MDM2 kann p53 nun nicht mehr abbauen. Außerdem interagiert die C-terminale Region von NPM1 mit zwei Regionen von p53 (Aminosäurereste 175-196 und 343-363), was zu einer Aktivierung von p53 führt (Lambert et al. 2006). Diese beide Mechanismen, die Aktivierung und Verhinderung des Abbaus von p53, steigern das zelluläre p53-Level, was zu einem Zellzyklusarrest führt (Abb. 2). Zusätzlich blockiert ARF p53-unabhängig die Ribosomenbiogenese und damit die Zellproliferation (Sugimoto et al. 2003) und beeinträchtigt den Pendelmechanismus von NPM1 (Brady et al. 2004).

1.3 AML mit mutiertem *NPM1* (*NPM1*^{mut} *AML*)

1.3.1 Inzidenz und Assoziation mit anderen genetischen Veränderungen

NPM1 Mutationen lassen sich in 25% - 35% aller AML-Fälle nachweisen und sind somit die häufigste Genmutation bei der AML (Falini et al. 2005). Auch bei Patienten mit MDS finden sich *NPM1* Mutationen mit einer Prävalenz von ca. 5% (Zhang et al. 2007). *NPM1* Mutationen treten meist bei de novo AML auf (Falini et al. 2007b). AML, die sekundär als Folge von MDS, Myelodysplasie oder therapieassoziiert entstehen, zeigen dagegen sehr selten *NPM1* Mutationen (Falini et al. 2005).

Die Inzidenz der *NPM1* Mutation liegt bei der CN-AML zwischen 50% und 60%. Umgekehrt haben *NPM1* mutierte (*NPM1*^{mut}) AML-Patienten zu 86% keine chromosomalen Veränderungen. Somit ist die *NPM1* Mutation bei der AML signifikant mit einem normalen Karyotyp assoziiert (Falini et al. 2005, Falini et al. 2008). Mutationen im *NPM1* Gen schließen sich gegenseitig mit den meisten rekurrenten Translokationen aus (Falini et al. 2008). Die chromosomalen Anomalitäten, die bei wenigen *NPM1*^{mut} AML-Patienten (14%) beobachtet werden können, sind wahrscheinlich sekundäre Ereignisse (Falini et al. 2005). Erstens sind sie in Typ und Frequenz ähnlich wie sekundäre chromosomale Veränderungen, die in AML mit rekurrenten genetischen Anomalitäten auftreten (Slovak et al. 2000). Zweitens repräsentieren die Zellen mit anormalen Karyotyp oft Subklone innerhalb einer Population mit normalen Karyotyp (Falini et al. 2005). Bei den Interaktionen mit anderen genetischen Veränderungen in CN-AML fallen vor allem doppelt so häufig anwesende *FLT3*-ITD Mutationen in *NPM1*^{mut} AML im Vergleich zu *Nukleophosmin 1* Wild-Typ (*NPM1*^{wt}) AML-Fällen auf (Thiede et al. 2006). Auch *IDH* (Paschka et al. 2010) und *DNMT3A* Mutationen (Thol et al. 2011) sind mit *NPM1*^{mut} AML assoziiert. Im Gegensatz dazu schließen die *MLL*-PTD Mutation und die *NPM1* Mutation sich gegenseitig aus (Thiede et al. 2006, Schnittger et al. 2005). *CEBPA*, *KIT* (*V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) und *NRAS* (*Neuroblastoma RAS*) Mutationen kommen in *NPM1*^{mut} und *NPM1*^{wt} AML gleich häufig vor (Schnittger et al. 2005, Döhner et al. 2005). Entsprechend der Two-hit-Hypothese sind mehrere Mutationen aus unterschiedlichen Mutationsklassen zur Leukämieentstehung notwendig

(Gilliland et al. 2004). Diese Vermutung wird sowohl durch das überproportional häufige Auftreten verschiedener Mutationen in den vorher genannten Genen als auch durch experimentelle Untersuchungen an Mäusen unterstützt (Cheng et al. 2010).

NPM1^{mut} AML zeigen eine niedrige bis fehlende CD34- (Falini et al. 2005) sowie eine hohe CD33-Expression (De Propris et al. 2011). Die Auswirkungen spezifischer Antikörper gegen CD33 (Gemtuzumab-Ozogamicin) wurde mit unterschiedlichem Erfolg getestet (Lowenberg et al. 2010, Burnett et al. 2011). Bei *NPM1*^{mut} AML sind außerdem viele Gene aktiviert, die für Transkriptionsfaktoren mit einer Homöodomäne codieren (Alcalay et al. 2005, Verhaak et al. 2005).

1.3.2 Mutationstypen und deren Auswirkungen

NPM1 Mutationen sind durchweg heterozygot, so dass ein Wild-Typ Allel erhalten bleibt. Abgesehen von wenigen Ausnahmen, bei denen die Mutation auf Exon 11 (Albiero et al. 2007) und Exon 9 (Mariano et al. 2006) lokalisiert ist, sind die Mutationen auf das Exon 12 beschränkt. Insgesamt sind mehr als 40 verschiedene Mutationstypen bekannt (Falini et al. 2007b). Die häufigste Mutation, Mutationstyp A, tritt bei 75 – 80% der erwachsenen Patienten mit *NPM1*^{mut} AML auf. Mutationstyp A beschreibt eine Insertion eines Tetranukleotid, TCTG, an Position 956 bis 959 in Exon 12. Die Mutationstypen B und D werden in 10% beziehungsweise 5% der *NPM1*^{mut} AML Fälle gefunden, die weiteren Mutationstypen treten sehr selten auf (Falini et al. 2005).

Eines der wichtigsten Merkmale von *NPM1*-Mutanten ist ihre aberrante Lokalisation im Zytoplasma der leukämischen Zellen (Falini et al. 2005). Diese Tatsache hängt mit zwei Veränderungen am C-Terminus des *NPM1*-Gens zusammen, die durch das Verschieben des Leserasters verursacht werden. Zum einen wird ein zusätzliches Leucin-reiches NES Motiv, Leucin-xxx-Valin-xx-Valin-x-Leucin, generiert, zum anderen gehen die Trytophanreste an Position 288 und 290, die Nukleolus-Bindungsdomänen darstellen, verloren (Tabelle 2). Erst beide Veränderungen zusammen verursachen eine zytoplasmatische Dislokation des NPM1.

Tabelle 2: *Nukleophosmin 1* (*NPM1*)-Mutationstypen bei Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) mit entsprechender Proteinsequenz nach Falini et al. 2005.

Die roten Buchstaben zeigen die Insertion des jeweiligen Mutationstypes. Die Tryptophanreste (W) in der Aminosäuresequenz sind gelb, die veränderten Aminosäuren rosa hinterlegt. Die neue Aminosäuresequenz, die alle mutierten Proteine gemeinsam haben, ist in grün dargestellt. Abkürzungen: Desoxyribonukleinsäuresequenz: A = Adenin; G = Guanin; C = Cytosin; T = Thymin; Aminosäuresequenz: A = Alanin; C = Cystein; D = Asparaginsäure; E = Glutaminsäure; K = Lysin; L = Leucin; M = Methionin; Q = Glutamin; R = Arginin, S = Serin; V = Valin; W = Tryptophan.

Mutationstyp	Desoxyribonukleinsäuresequenz	Aminosäuresequenz
Wild Typ	GATCTCTG....GCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLWQWRKSL
Mutation A	GATCTCTGTCTGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCLAVEEVSLRK
Mutation B	GATCTCTGCATGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCMAVEEVSLRK
Mutation C	GATCTCTGCGTGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCVAVEEVSLRK
Mutation D	GATCTCTGCCTGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCLAVEEVSLRK
Mutation E	GATCTCTG....GCAGTCTCTTGCCCAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLWQSLAQVSLRK
Mutation F	GATCTCTG....GCAGTCCCTGGAGAAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLWQSLEKVSLRK
Mutation Nm	GATCTCTGCCAGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCQAVEEVSLRK
Mutation Km	GATCTCTGCCGGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCRAVEEVSLRK
Mutation Qm	GATCTCTGTCGGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCRAVEEVSLRK

Es gibt Mutationen, die nur mit dem Verlust von einem Tryptophan, das an Position 290, einhergehen und trotzdem eine Dislokation ins Zytoplasma verursachen (Tabelle 2). Bei diesen Varianten wurde immer ein abgeändertes NES-Motiv gefunden, in dem die Aminosäure Valin an der zweiten Position durch ein Leucin, Phenylalanin, Cystein oder Methionin ersetzt worden ist. Da dieser Genotyp auch disloziert, ist es wahrscheinlich, dass diese Variante des NES-Motivs effizienter eine Dislokation von NPM1 ins Zytoplasma verursacht (Falini et al. 2007a, Falini et al. 2005).

Mutantes NPM1 delokalisiert das Wild-Typ Protein und ARF vom Nukleolus ins Zytoplasma und beeinträchtigt so die Fähigkeit von ARF eine p53 Antwort zu initiieren und einen Zellzyklusarrest zu induzieren (den Besten et al. 2005). Außerdem bindet mutantes, zytoplasmatisches NPM1 im Zytoplasma die Caspasen 6 und 8 und verhindert

zum einen den dadurch vermittelten Zelltod, zum anderen die Caspasen-vermittelte Differenzierung der myeloischen Zellen (Leong et al. 2010).

NPM1 scheint in eine Kategorie von Genen zu fallen, die sowohl Funktionen als Onkogen als auch als Tumorsuppressorgen ausüben (Grisendi et al. 2006). Wenn die Expression von *NPM1* hoch ist, wird die Ribosomenproduktion erhöht und das Zellwachstum gefördert (Ruggero et al. 2003). Möglicherweise wird diese Funktion als Onkogen mit der Verhinderung des programmierten Zelltodes verstärkt (Grisendi et al. 2006). Wenn die Expression von *NPM1* reduziert ist und sich die subzelluläre Verteilung ändert, verhält sich *NPM1* wie ein Tumorsuppressorgen. Dieser Zustand fördert die Tumorentstehung zum einen durch die Destabilisierung und die Beeinträchtigung des ARF-Tumorsuppressor-Pfades (Gallagher et al. 2006), zum anderen durch die Erhöhung der genomischen Instabilität (Grisendi et al. 2006).

Die Tumorentstehung konnte anhand von Mausmodellen nachvollzogen werden. So zeigten Grisendi et al. 2005, dass ein totaler oder partieller Verlust von *NPM1* in vivo zu Zentrosomenduplikation, Genominstabilität und hämatologischen Syndromen führen kann (Grisendi et al. 2005). 2011 berichteten Vassiliou et al., dass ein Drittel der Mäuse mit einer knock-in Allele des *NPM1*-Mutationstyps A eine AML entwickelten. Die lange Latenz zwischen Induktion und Erkrankung legt nahe, dass weitere zusätzliche Mutationen benötigt werden (Vassiliou et al. 2011).

Vor den 2005 beschriebenen Mutationen bei der AML wurde *NPM1* als N-terminaler Fusionspartner in rekurrenten Translokationen bei Leukämien und Lymphomen entdeckt (Falini et al. 1999, Falini et al. 2002). Diese Fusion führt zu einer Aktivierung des jeweiligen Fusionspartners, unter diesen befindet sich *ALK* (*Anaplastic lymphoma kinase*), *MLF1* (*Myeloid leukemia factor 1*) oder *RARα* (Bischof et al. 1997).

1.3.3 Klinische Merkmale der *NPM1*^{mut} AML

Die Inzidenz von *NPM1* Mutationen steigt mit dem Alter bis ein Plateau erreicht ist. Die Rate an *NPM1*^{mut} AML liegt bei Kindern zwischen 2,1% - 6,5%, (9% - 26,9% der pädiatrischen CN-AML) (Chou et al. 2006, Cazzaniga et al. 2005) bei Erwachsenen dagegen

zwischen 25% - 35% (45,7% - 63,8% der erwachsenen CN-AML) (Döhner et al. 2005, Verhaak et al. 2005). Die altersabhängige Häufigkeitsverteilung der *NPM1*^{mut} AML lässt sich durch ein mathematisches Modell erklären, das eine *NPM1* Mutation als alleinige Ursache zur Entstehung der AML annimmt (Liso et al. 2008). Auffallend ist, dass Kinder eine andere Häufigkeitsverteilung der Mutationstypen zeigen als Erwachsene (Thiede et al. 2007). Weiterhin zeigt sich eine höhere Inzidenz von *NPM1* Mutationen bei Frauen (Thiede et al. 2006, Döhner et al. 2005) .

NPM1^{mut} AML korrelieren mit einer höheren Blastenzahl im Knochenmark (KM), einer größeren Anzahl weißer Blutzellen (WBC) und einer stärkeren extramedullären Beteiligung als CN-AML ohne *NPM1* Mutation. Vor allem ist die Gingivahyperplasie 4-fach häufiger. Außerdem ist bei *NPM1*^{mut} AML die Thrombozytenzahl und LDH höher als bei AML ohne *NPM1* Mutation. Dagegen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz einer sekundären AML (Thiede et al. 2006, Döhner et al. 2005).

1.3.4 Therapieansprechen und Prognose

Die Bedeutung der *NPM1*^{mut} AML zeigt sich in einem signifikant besseren OS im Vergleich zu einer Kohorte von AML-Patienten ohne *NPM1*^{mut} (Mediane OS: 16,2 vs. 11,5 Monaten). Dagegen konnte in der Gruppe der CN-AML kein signifikanter Unterschied des OS zwischen Patienten mit oder ohne *NPM1*^{mut} festgestellt werden (Thiede et al. 2006). Döhner et al. zeigten 2005, dass die Prognose der *NPM1*^{mut} AML stark von der An- oder Abwesenheit der *FLT3*-ITD Mutation abhängt. So haben Patienten mit *NPM1*^{mut}*/FLT3* Wild-Typ (*FLT3*^{wt}) Status eine höhere Rate an CR als Patienten, die sowohl eine *NPM1*- als auch eine *FLT3*-ITD Mutation (86% vs. 63%) aufweisen. Auch konnten signifikante Unterschiede im rezidivfreien Überleben (RFS) und im OS festgestellt werden. Die 5-Jahres Überlebensrate der *NPM1*^{mut}*/FLT3*^{wt} Patienten lag bei annähernd 60% vs. 30% bei *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD Patienten. In multivariablen Analysen stellte sich der *NPM1*^{mut}*/FLT3*^{wt} Status und im geringeren Ausmaß ein HLA-kompatibler familiärer Spender als ein für das OS günstiger, eine sekundäre AML oder eine hohe LDH bei Diagnose dagegen als ein prognostisch ungünstiger Faktor dar (Döhner et al. 2005). Die vorteilhafte Prognose von *NPM1*^{mut}*/FLT3*^{wt} AML-Patienten gegenüber *NPM1*^{mut}*/FLT3*-ITD

AML-Patienten konnten von anderen Autoren weitgehend bestätigt werden (Thiede et al. 2006, Verhaak et al. 2005). Schlenk et al. konnten 2008 nochmals zeigen, dass sowohl *NPM1*^{mut}*/FLT3*^{wt} Patienten als auch Patienten mit mutantem *CEBPA* eine ähnlich gute Prognose haben, wie Patienten mit Core-binding-factor (CBF)-AML, welche zu der Niedrigrisikogruppe gezählt werden (Schlenk et al. 2008).

Patienten mit *NPM1*^{mut}*/FLT3*^{wt} Status haben eine so günstige Prognose, dass diese durch eine Allo-SCT nicht weiter verbessert werden kann (Schlenk et al. 2008, Döhner et al. 2005). Dementsprechend wird heute in den Therapierichtlinien die Allo-SCT nicht mehr in erster CR bei *NPM1*^{mut}*/FLT3*^{wt} Patienten empfohlen. Metaanalysen deuten an, dass der Benefit einer Allo-SCT den Risiken überwiegt, wenn das Rezidivrisiko 35-40% übersteigt (Cornelissen et al. 2007).

1.4 Minimale Resterkrankung (MRD)

1.4.1 Bedeutung des Monitoring der MRD

In den letzten Jahren wurde das MRD-Monitoring mithilfe der quantitativen Real-Time Polymerasen-Kettenreaktion (RQ-PCR) und der Durchflusszytometrie als ein wichtiges diagnostisches Werkzeug zur Abschätzung des Therapieansprechens und zur Überwachung der Postremissionstherapie etabliert. Die MRD-Analyse kann zur frühen Detektion von Rezidiven und zur Anleitung einer präemptiven Therapie benutzt werden (Döhner et al. 2010, Freeman et al. 2008). Voraussetzung für das MRD-Monitoring ist das Vorhandensein eines molekularen Markers, der gezielt regelmäßig untersucht werden kann. Bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) kann das sogenannte *BCR*/*ABL* (*Breakpoint cluster region gene*/ *Abelson murine leukemia virus oncogene*) Fusionsgen, bei der ALL die Mutationen im Immunoglobulin Heavy Chain Locus (IgVH) als Marker verwendet werden. Für diese beiden Erkrankungen wird das MRD-Monitoring mittlerweile routinemäßig durchgeführt (Muller et al. 2009, Bruggemann et al. 2006). Die klinische Anwendung bei der AML war bisher auf einige Subtypen wie der APL mit t(15;17)(q22;q12) *PML-RARα* und AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22)

CBFB-MYH11 begrenzt. Ein klinischer Benefit der frühen therapeutischen Intervention nach einem molekularen Rezidiv konnte insbesondere für die APL nachgewiesen werden (Grimwade et al. 2009, Esteve et al. 2007). Die Aussagekraft der MRD bei AML mit anderen molekularen Marker wie t(8;21)(q22;q22) *RUNX1-RUNX1T1* und t(9;11)(p21 - p22;q23) *MLL-MLLT3* wurde untersucht und in Abhängigkeit des verwendeten Assays aufgezeigt (Perea et al. 2006, Scholl et al. 2005). Ein zentrales Problem aller Studien, die sich mit der klinischen Bedeutung der MRD beschäftigen, ist die sehr begrenzte Verfügbarkeit von seriellen KM- und/oder Blutproben, sodass die Aussagekraft der meisten publizierten Studien begrenzt ist. Derzeit können nur ca. 25% aller AML-Fälle auf das Vorliegen einer MRD untersucht werden, da nur in diesen Fällen ein stabiler molekularer Marker vorliegt, der sich für das Monitoring eignet. Insbesondere für die 40-50% der CN-AML Patienten war lange Zeit mangels eines geeigneten Markers kein MRD Monitoring möglich. Die *FLT3*-ITD Mutation kommt mit ungefähr 30% häufig bei der CN-AML vor, da jedoch bei jedem Patienten eine individuelle *FLT3*-ITD Mutation vorliegt, ist die Analyse technisch sehr aufwändig. Hinzu kommt, dass ungefähr 20% der *FLT3*-ITD Mutationen im Verlauf verloren gehen und im Rezidiv nicht mehr nachweisbar sind (Cloos et al. 2006, Schnittger et al. 2002).

Mit der Entdeckung der *NPM1* Mutation 2005 stand ein neuer genetischer Marker zur Verfügung, der für das MRD Monitoring aufgrund des konstanten Mutationsmuster und der Stabilität ideal zu sein scheint. *NPM1* Mutationen kommen, wie bereits erwähnt, bei 50-60% der CN-AML vor (Falini et al. 2008) und scheinen zudem als primäres Ereignis im Verlauf der Erkrankung stabil zu sein (Falini et al. 2008, Chou et al. 2007). Ein Verlust der Mutation bei einem Rezidiv ist sehr selten (Chou et al. 2006, Krönke et al. 2011). Obwohl bis zu 40 unterschiedliche Mutationstypen im *NPM1* Gen entdeckt worden sind, zeigen 75-80% der *NPM1*^{mut} AML Patienten den Mutationstyp A und weitere 15% den Mutationstyp B oder D (Falini et al. 2005). Alle Patienten, die in bisherigen Studien untersucht worden waren, zeigten dieselbe *NPM1* Mutation bei Diagnose und Rezidiv (Chou et al. 2007, Schnittger et al. 2009).

1.4.2 Monitoring der *NPM1*^{mut} AML

Gorello et al. zeigten 2006 erstmals die Machbarkeit des MRD Nachweises mithilfe der RQ-PCR unter Verwendung der *NPM1* Mutation als Marker auf. Die Messungen wurden sowohl mit DNA als auch mit Ribonukleinsäure (RNA) durchgeführt, wobei mit einem RNA basierten Assay eine höhere Sensitivität erreicht werden konnte, da die Expressionsrate des *NPM1* Transkriptes hoch ist (Gorello et al. 2006). Abhängig von den Transkript-Leveln bei Diagnose, die innerhalb zweier Zehnerpotenzen lagen, der individuellen Probenqualität und der Spezifität des Assays variierte die Sensitivität bei der Studie von Schnittger et al. zwischen $1:10^4$ bis $1:10^5$. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Zahl der *NPM1* Transkripte bei Diagnose keinen Einfluss auf die Prognose hat (Schnittger et al. 2009), wie es für verschiedene Fusionsgene gezeigt wurde (Schnittger et al. 2003). Dagegen konnten Schnittger et al. zeigen, dass das *NPM1* Transkript-Level als prädiktiver Parameter für das ereignisfreie Überleben (EFS) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Therapie verwendet werden kann. Die Zahl der *NPM1* Transkripte während eines Rezidivs lag innerhalb derselben zwei Zehnerpotenzen wie die bei Diagnosestellung (Schnittger et al. 2009).

1.4.3 Prädiktion von Rezidiven

Mithilfe der MRD-Detektion können molekulare Rezidive (MR) vor dem klinisch, hämatologischen Rezidiv (HR) durch steigende MRD-Level oder erstmaliges Nachweisen des Markers im Follow-up vorhergesagt werden. Ommen et al. definierten 2010 ein MR im Follow-up bei *NPM1*^{mut} AML mithilfe eines Schwellenwertes, da die alleinige Konversion vom negativen zum positiven Nachweis in der RQ-PCR zur Prädiktion eines Rezidivs nicht auszureichen schien. Dieser war erreicht, wenn der Quotient aus dem aktuellen *NPM1* Transkript-Level und dem Transkript-Level bei Diagnosestellung über 5×10^{-5} lag. Wenn ein Messwert diesen Schwellenwert überschritt, folgte bei 103 von 104 (99%) der Patienten ein HR (Ommen et al. 2010). Ommen et al. entwickelten mithilfe dieses Schwellenwertes ein mathematisches Modell für die Prädiktion von Rezidiven (Ommen et al. 2008).

Die Rezidivkinetik scheint nach der Studie von Ommen et al. abhängig zu sein von der An- oder Abwesenheit der *FLT3*-ITD Mutation. *NPM1*^{mut}*/FLT3*-ITD Patienten wiesen in dieser Studie eine mediane Verdopplungszeit der *NPM1*^{mut} Transkript-Level in KM-Proben von 7,4 Tagen auf, im Vergleich zu 15 Tagen bei Patienten mit *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wt} (Ommen et al. 2010). Infolgedessen war das Intervall, in dem ein MR detektiert werden konnte, bei *NPM1*^{mut}*/FLT3*-ITD Patienten wesentlich kürzer. Mit einem Probenintervallabstand im Follow-up von 4 Monaten bei *NPM1*^{mut}*/FLT3*-ITD Patienten und 6 Monaten bei *NPM1*^{mut}*/FLT3*^{wt} Patienten könnten nach der Arbeit von Hokland et al. 90% aller Rezidive vorhergesagt werden. Unabhängig vom *FLT3*-Status mussten Proben aus peripherem Blut (PB) häufiger untersucht werden, um die gleiche Prädiktionswahrscheinlichkeit zu erreichen. Die mediane Zeit vom Detektionszeitpunkt des MR bis zum klinisch, hämatologischen Rezidiv (t_m) würde bei den oben genannten Probenintervallabständen 120 Tage bei *NPM*1^{mut}*/FLT3*^{wt} Patienten und 105 Tage bei *NPM1*^{mut}*/FLT3*-ITD Patienten betragen (Hokland et al. 2011).

1.5 Zielsetzung

Die immer noch sehr schlechte Prognose der AML hat sich in den letzten Jahren durch risikoadaptierte Therapien verbessert. Durch eine zytogenetische Analyse erfolgt die Einteilung in eine prognostisch günstige, mittlere und eine ungünstige Risikogruppe. Diese Risikostratifikation lässt sich mithilfe der Quantifizierung der Minimalen Resterkrankung (MRD) während und nach der Therapie weiter verfeinern, mit dem Ziel möglichst früh ein eventuell auftretendes Rezidiv zu erkennen und entsprechend früh eine Therapie einzuleiten. Die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RQ-PCR) stellt eine hochsensitive Methode (bis zu 10^{-6}) zur Quantifizierung der MRD dar. Mithilfe der bislang etablierten Assays können circa 90% der AML-Patienten mit mutiertem *Nukleophosmin 1* (*NPM1*^{mut}) analysiert werden.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der prädiktiven Wertigkeit der MRD-Analyse bei *NPM1*^{mut} AML-Patienten nach Abschluss der Therapie. Zunächst sollte ein spezifischer und einfacher Schwellenwert etabliert werden, dessen Überschreiten ein klinisches Rezidiv ankündigt. Dabei sollte analysiert werden, mit welcher Wahrscheinlichkeit Rezidive vorhergesagt werden können und wie der optimale Zeitabstand für die Analyse der Proben im Follow-up ist, um möglichst frühzeitig und sicher ein Rezidiv prognostizieren zu können. Des Weiteren sollte der Einfluss der *FLT3*-ITD Mutation auf die Rezidivkinetik untersucht werden. Mithilfe der Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analyse sollte außerdem die klonale Evolution zwischen Diagnose und Rezidiv in *NPM1*^{mut} AML nachvollzogen werden und erforscht werden, welche genetischen Veränderungen rekurrent bis zum Zeitpunkt des Rezidivs neu erworben werden. Insbesondere sollten diejenigen Patienten näher analysiert und charakterisiert werden, die ihre *NPM1* Mutation zum Rezidiv verloren und deren Rezidive somit nicht durch ein *NPM1*^{mut} basiertes MRD-Monitoring vorhergesagt werden konnten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines sensitiven RQ-PCR Assays für die seltenen *NPM1*-Mutationstypen Km, Nm und Qm, um auch bei Patienten mit diesen Mutationstypen ein MRD-Monitoring durchführen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Chemikalien und Geräte

Folgende Reagenzien, Chemikalien und Geräte wurden benutzt und von den entsprechenden Unternehmen bezogen.

2.1.1 RNA-Extraktion

Reagenzien	
0,5M EDTA pH 8,0	Ambion, Foster City, USA
10x BlueJuice Loading Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarose, For Routine Use	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Allprep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Aqua ad iniectabilia Braun	Braun, Melsungen, Deutschland
DNase-Inkubation-Mix	10 µl DNase-Stock 70 µl RDD-buffer
Essigsäure, 2,5 L	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70% Lösung	15 ml DEPC-Wasser (Invitrogen) 35 ml Ethanol 100%
Ethanol absolute p.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethidiumbromid 1%, 10mg/ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
SUPERase IN (RNase Inhibitor)	Ambion, Foster City, USA
Tracklt 1Kb DNA-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trizma base, min. 99,9% titration	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Fortsetzung auf Seite 21

Fortsetzung RNA-Extraktion

Instrumente	
Eppendorf Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop ND1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific

2.1.2 cDNA-Synthese

Reagenzien	
TaqMan® Reverse Transcription Reagents bestehend aus:	Applied Biosystems, Foster City, USA
Genomic DNA Wipeout Buffer, 7X	
Quantiscript Reverse Transcriptase	
Quantiscript RT Buffer, 5X	
RT Primer Mix	
Geräte	
Eppendorf Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermocycler Gene Amp System 9700/2700/2720	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Reagenzien	
10X Blue Juice gel loading buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
1X TAE (Elektrophorese Puffer)	100 ml 50X TAE Stocklösung 4,9 l ddH_2O

Fortsetzung auf Seite 22

Fortsetzung Agarose-Gelelektrophorese

50X TAE (Stocklösung)	242 g Trizma base 57,1 ml Essigsäure 0,5 M 100 ml EDTA
Agarose, For Routine Use	Sigma, St. Louis, USA
Agarosegel 1%	1,2 g Agarose 120 ml 1X TAE buffer
Agarosegel 3%	9,0 g Agarose 300 ml 1X TAE buffer
Ethidiumbromid 1%, 10 mg/ml	Carl Roth GmbH, Mannheim, Deutschland
Tracklt 100 bp DNA-Ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tracklt 1Kb DNA-Ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Instrumente	
Elektrophoresekammer	Owl Separation System Incorporation, Portsmouth, NH, USA
Gene Genius BIO Imaging System	SynGene, Cambridge, United Kingdom
Power Supply EPS600	Pharmacia, Philadelphia, USA

2.1.4 Quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR)

Reagenzien	
Aqua ad iniectabilia Braun	Braun, Melsungen, Deutschland
TaqMan® PCR Core Reagent Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Geräte	
Multifuge 4KR Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
TaqMan® 7900Ht SDS Version 2.3	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.1.5 Klonierung der Plasmide

Reagenzien	
AmpliTaq Gold polymerase kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
dNTPs	Roche, Mannheim, Deutschland
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Chemokompetente One-Shot® TOP 10 Escherichia coli)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
S.O.C. Medium	2X Tryptone 0,5% Yeast Extract 10mM NaCl 2,5mM KCl 10mM $MgCl_2$ 10mM $MgSO_4$ 20mM Glukose
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Kanamicin 500X	Roche, Mannheim, Deutschland
EcoR I and digestion buffer	Roche, Mannheim, Deutschland
ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Geräte	
Thermocycler Gene Amp System 9700/2700/2720	Applied Biosystems, Foster City, USA
ABI-PRISM 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

2.1.6 Verwendete Primer

Alle Primer wurden von Thermo Scientific, Ulm, Deutschland bezogen.

Primer	Sequenz (5’ – 3’)	Fragment Größe
NPM1^{mut} F’-Primer	5‘-GAA GAA TTG CTT CCG GAT GAC T-3’	22
NPM1^{mut} A R’-Primer	5‘-CTT CCT CCA CTG CCA GAC AGA-3’	21
NPM1^{mut} B R’-Primer	5‘-TT CCT CCA CTG CCA TGC AG-3’	19
NPM1^{mut} Nm R’-Primer	5’ – T CCT CCA CTG CCT GGC AGA – 3’	19
NPM1^{mut} Km R’- Primer	5’ – CTT CCT CCA CTG CCC GGC AGA – 3’	21
NPM1^{mut} Qm R’- Primer	5’ – CTT CCT CCA CTG CCC GAC AGA – 3’	21
NPM1 Sonde	5’-FAM-ACC AAG AGG CTA TTC AAG AT-BHQ1-3’	20
ABL F’-Primer	5’-TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T-3’	31
ABL R’-Primer	5’ – GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA-3’	21
ABL Sonde	5’ -HEX – CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T – BHQ1 – 3’	28

2.2 Patienten und Therapie

2.2.1 Patienten

Die Patientenkohorte umfasste insgesamt 245 Patienten, bei denen eine *NPM1* Mutation bei Diagnose nachgewiesen worden war und mindestens eine Verlaufs-Knochenmark (KM)-Probe verfügbar war. Alle Patienten waren in zwei Behandlungsprotokollen (NCT00146120 AML HD98A (n=46) und NCT00151242 AMLSG 07-04 (n=199)) der Deutsch-Österreichischen Studiengruppe für die Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie (AMLSG) für jüngere Erwachsene (Alter von 18 bis 60 Jahre) eingeschlossen. Des Weiteren wurden 9 Patienten, die aus verschiedenen Studien stammten, zur Etablierung des RQ-PCR Assays für die Mutationstypen Nm, Km und Qm herangezogen. Davon hatten 4 Patienten den Mutationstyp Km, 3 Patienten den Typ Nm und 2 Patienten den Mutationstyp Qm.

Alle Patienten gaben ihr Einverständnis sowohl zur Therapie als auch zur molekularen Analyse der KM- und PB-Proben entsprechend der Deklaration von Helsinki. In allen Studien wurden morphologische, zytogenetische und immunphänotypische Analysen bei Erstdiagnose durchgeführt. Bis 2004 wurden diese anhand der Kriterien der French-American-British Cooperative Group (Bennett et al. 1985) und danach anhand der WHO-Kriterien (Vardiman et al. 2002) durchgeführt.

2.2.2 Therapieschema

Alle Patienten, die in den Studien AML HD98A und AMLSG 07-04 eingeschlossen waren, erhielten eine intensive Doppelinduktion, gefolgt von einer Konsolidierungstherapie (Abb. 3). Die Doppelinduktion beinhaltete eine kontinuierliche intravenöse (i.v.) Gabe von Cytarabin 100 mg/m^2 an den Tagen 1 bis 7, eine i.v. Gabe über 2h von Idarubicin 12 mg/m² an den Tagen 1, 3 und 5 und Etoposid 100 mg/m² an den Tagen 1 bis 3. In der AMLSG 07-04 wurde randomisiert einem Arm in der Induktion 1 und 2 zusätzlich All-trans-Retinsäure (ATRA) 45 mg/m² per os (p.o.) an den Tagen 6 bis 8 sowie 15 mg/m² ATRA p.o. an den Tagen 9 bis 21 gegeben.

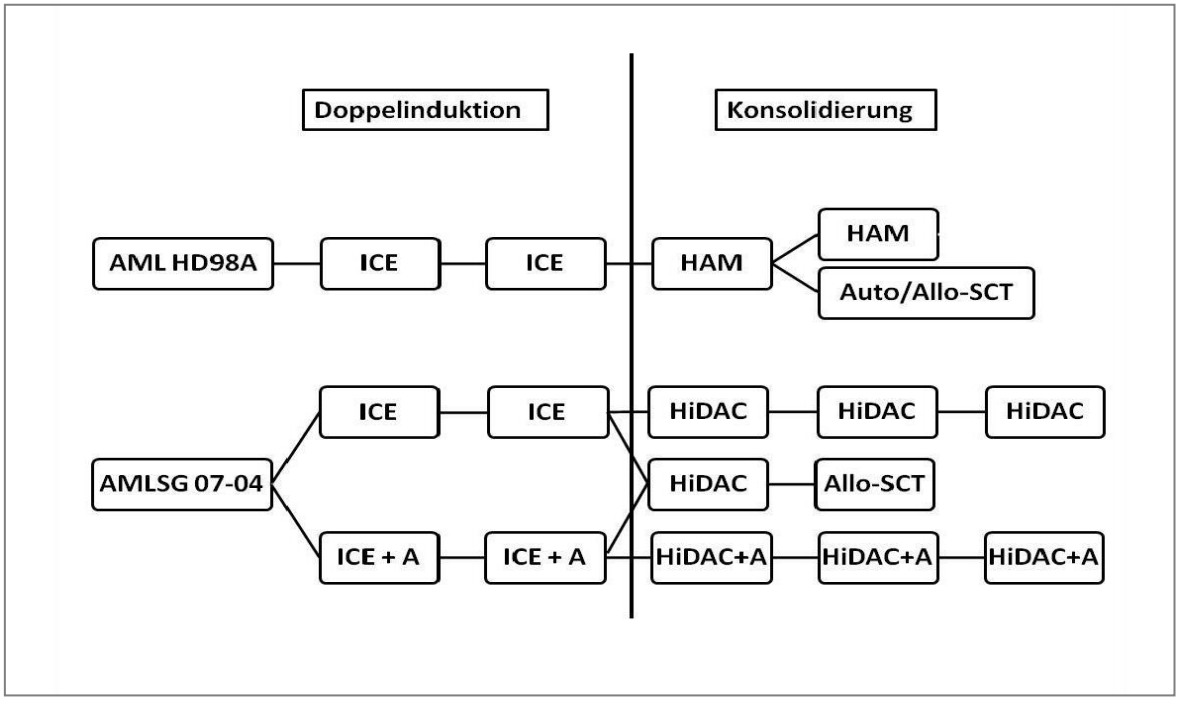

Abbildung 3: Behandlungsprotokolle der Deutsch-Österreichischen Studiengruppe Akute Myeloische Leukämie (AMLSG) der Studien AML HD98A und AMLSG 07-04.

Die Patienten der AML HD98A-Studie mit mittlerem Risiko wurden in der Konsolidierung, die Patienten der AMLSG 07-04 bereits vor dem Start der Induktion randomisiert. Abkürzungen: AML = Akute myeloische Leukämie; ICE = Idarubicin, Cytarabin, Etoposid; A = All-trans-Retinsäure; HAM = Hochdosis Cytarabin und Mitoxantron; HiDAC = Hochdosis Cytarabin; Auto-SCT = autologe Stammzelltransplantation; Allo-SCT = allogene Stammzelltransplantation.

Die Konsolidierungstherapie der AML HD98A erfolgte risikoadaptiert. Patienten mit einer CN-AML wurden der intermediären Risikogruppe zugeordnet und erhielten bei Ansprechen der Induktionstherapie den ersten Konsolidierungszyklus, bestehend aus 3 g/m² Mitoxantrone i.v. über 15 Minuten (min) an den Tagen 1 und 2 und 12 mg/m² Cytarabin i.v. über 3h an den Tagen 1 bis 3 (Hochdosis Cytarabin und Mitoxantron = HAM). Es folgte eine Randomisierung, wobei ein Teil der Patienten mit einem zweiten Zyklus HAM und der andere mit einer myeloablativen Therapie, gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation (Auto-SCT), behandelt wurde. Patienten wurden einer allogenen Stammzelltransplantation (Allo-SCT) zugewiesen, wenn ein HLA-kompatibler Familienspender verfügbar war. In den Konsolidierungszyklen der AMLSG 07-04 erhielten die Patienten Cytarabin 3 g/m² i.v. zweimal am Tag an den Tagen 1, 3 und 5, Pegfilgrastim 6 mg subkutan (s.c.) an Tag 10 und ein Arm zusätzlich ATRA 15 mg/m²

p.o. an den Tagen 6 bis 21. Bei Patienten der intermediären Risikogruppe wurde eine Allo-SCT bei verfügbarem Familienspender, bei Hochrisikopatienten auch mittels Fremdspender durchgeführt.

2.2.3 Zytogenetische und molekulare Analyse

Aus dem Diagnosematerial wurde bei allen Patienten eine Karyotypisierung mithilfe der G-Bänderungs-Analyse durchgeführt, um chromosomale Veränderungen nachzuweisen. Die chromosomalen Aberrationen wurden gemäß den Richtlinien des International System for Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (Mitelman F. 1995) bestimmt. Um die Genauigkeit der zytogenetischen Diagnose zu verbessern, wurde in einigen Fällen zusätzlich zur Chromosomenanalyse eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) unter Verwendung einer spezifischen DNA-Sonde durchgeführt (Fröhling et al. 2002). Außerdem wurde das Zellmaterial aller Patienten auf Mutationen in den Genen *NPM1* (Döhner et al. 2005), *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD (Mutation der Tyrosin-Kinase-Domäne des *FLT3*-Gens) (Fröhling et al. 2002), *CEBPA* (Fröhling et al. 2004) und *MLL*-PTD (Döhner et al. 2002) überprüft.

2.3 Materialgewinnung und Probenaufbereitung

2.3.1 Materialgewinnung

Es wurden sowohl PB mittels Venenpunktion als auch KM mittels Beckenkamm- oder Sternalpunktion zu folgenden Untersuchungen gewonnen. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Proben mit Heparin (1:10, Natrium-Heparin) oder mithilfe des Chelatbildners Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ungerinnbar gemacht.

2.3.2 Zellisolation und Zellarchivierung

Zuerst erfolgte eine Anreicherung von mononukleären Zellen mithilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation. Als Trennmittel wurden synthetische Polymere aus Saccharose (Ficoll-Lösung) verwendet. Diese Lösung wurde im Verhältnis von 2:1 mit dem

ungerinnbar gemachten PB- beziehungsweise KM-Material überschichtet. Aufgrund der größeren Dichte der Ficoll-Lösung reicherten sich die mononukleären Zellen bei einer Zentrifugation mit 2800 Umdrehungen pro Minute (U/min) für 20 Minuten (min) bei Raumtemperatur in einer Schicht zwischen Ficoll und Plasma an. Um die PB- beziehungsweise KM-Proben mit hohen Leukozytenzahlen denen mit niedrigeren anzugleichen, wurden sie zuvor mit RPMI 1640 Kulturmedium in einem Verhältnis 1:2 bis 1:3 verdünnt. Nach der Zentrifugation wurden die mononukleären Zellen mit einer sterilen Pipette abgenommen und mit 50 ml RPMI 1640 Medium zweimal gewaschen. Dies erfolgte durch eine Zentrifugation bei 1200 U/min für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Archivierung der mononukleären Zellen erfolgte bei -80 °C. Bei dieser Temperatur sind die Zellpellets nahezu unbegrenzt stabil. Die einzelnen Zellpellets enthielten zwischen $5x10^5$ bis $5x10^7$ Zellen.

2.3.3 RNA-Extraktion

Die gesamte RNA, sowohl ribosomale-RNA (rRNA), transfer-RNA (tRNA) als auch messenger-RNA (mRNA), der angereicherten mononukleären Zellen wurde mithilfe des ALLPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) extrahiert. Die Zellen wurden zunächst unter Verwendung des RLTplus-Puffers lysiert, wobei Zellpellets mit mehr als $0,5x10^7$ mit 600 µl und Zellpellets mit weniger als $0,5x10^7$ mit 350 µl resuspendiert wurden. Dieser Puffer, der mit Guanidin-Isothiocyanat versetzt war, inaktivierte sofort DNasen und RNasen, um sicherzustellen, dass die intakte DNA und RNA erhalten blieb. Das homogenisierte Lysat wurde auf einen QIAshredder überführt und bei 13.000 U/min für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Lysat in die Allprep DNA spin Säule pipettiert und nochmals für 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt nun die RNA. Die Allprep DNA Säulen mit der enthaltenen DNA wurden in neue 2 ml Collection-Tubes gesteckt und für die spätere DNA-Extraktion zwischengelagert. Diese wird nicht weiter beschrieben, da für die RQ-PCR nur RNA verwendet wurde.

Der RNA wurde nun 600 µl (>$0,5x10^7$ Zellen/Tube) beziehungsweise 350 µl (<$0,5x10^7$ Zellen/Tube) Ethanol 70% dazugegeben und sorgfältig durchmischt. Diese Suspension

wurde auf eine RNeasy Säule überführt und bei 13.000 U/min für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy Säule pipettiert. Nachdem die Probe nochmals bei 13.000 U/min für 1 min zentrifugiert worden war, wurden 80 µl DNase-Inkubations-Mix direkt auf die Membranmitte pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe zuerst mit 350 µl RW1-Puffer, dann zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Nach jeder Waschung wurde die Suspension für 1 min zentrifugiert und der Überfluss verworfen. Nach der letzten Zentrifugation wurde nochmals für 1 min trockenzentrifugiert und anschließend 40 µl (>0,5x10^7 Zellen/Tube) beziehungsweise 30 µl (<0,5x10^7 Zellen/Tube) RNase-freies Wasser auf die RNeasy Säulen pipettiert. Nach einer dreiminütigen Inkubation wurde die Probe bei 13.000 U/min für 1 min zentrifugiert und das Eluat, das die gereinigte RNA enthielt, in ein 2,0 ml SafeSeal-Tube überführt. Anschließend wurde 2,0 µl (>0,5x10^7 Zellen/Tube) beziehungsweise 1,5 µl (<0,5x10^7 Zellen/Tube) SUPERase Inhibitor hinzugegeben. Die im Allprep-Kit enthaltenen Puffer (RPE, AW1 und AW2) mussten vor der RNA-Extraktion mit Ethanol absolute verdünnt werden.

Zur Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese wurden 2 µl des RNA-Eluats mit 2 µl 10XBlueJuice und 8 µl RNase-freies Wasser versetzt. Das dazu benötige Gel wurde hergestellt, indem 1,2 g Agarose mit 120 ml 1X Tris-Acetat-EDTA (TAE)- Puffer aufgekocht wurde. Die mit dem Färbemittel versehene RNA wurde in die vorgesehenen Taschen pipettiert. Um eine Größenabschätzung der Fragmente durchführen zu können, wurde in einer separaten Ladetasche ein 1 Kilo-Basenpaar (Kb) Ladder (Tracklt 1Kb DNA-Ladder) mitgeführt. Die Elektrophorese wurde für 40 min bei 100 V/40 mA durchgeführt. Danach wurde das Gel in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid für 15-30 min gefärbt. Zur Dokumentation wurden die Banden durch Ultraviolett (UV)-Licht (302 nm) visualisiert und mithilfe einer digitalen Kamera fotografiert. Die Qualität der RNA zeigte sich durch die Reinheit der zwei Banden auf dem Agarosegel bei 4718 Nukleotide beziehungsweise 1874 Nukleotide. Diese spiegelten die 28 Svedberg-Einheiten (S) und 18 S große rRNA wider, da die rRNA mit 80-85% die größte RNA-Fraktion in einer eukariotischen Zelle darstellt. Die unterschiedlich lange mRNA war teilweise als diffuse Färbung zwischen den 28 S und 18 S rRNA-Banden erkennbar.

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde spektrophotometrisch (NanoDrop) über die optische Dichte λ=260nm (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum von RNA und DNA, gemessen. Dazu wurde, nach Kalibrierung mit einer Leerprobe, 1 µl RNA auf den Sensor pipettiert. Eine OD_{260} von 1 entspricht bei der RNA einer Konzentration von 40 µg/ml. Mit folgender Formel wurde die Konzentration errechnet:

$$RNA\ Konzentration = \mathrm{OD}_{260} \text{ x Verdünnungsfator x } 40\ \mu\mathrm{g/ml}$$

Die spektrophotometrische Messung gab zusätzlich Auskunft über die Reinheit der Probe, wobei ein OD_{260}/OD_{230} Ratio von unter 1,6 für eine Kontamination mit organischen Chemikalien und Lösungsmitteln und eine OD_{260}/OD_{280} Ratio von unter 1,8 für eine Proteinkontamination sprach (Abb. 4).

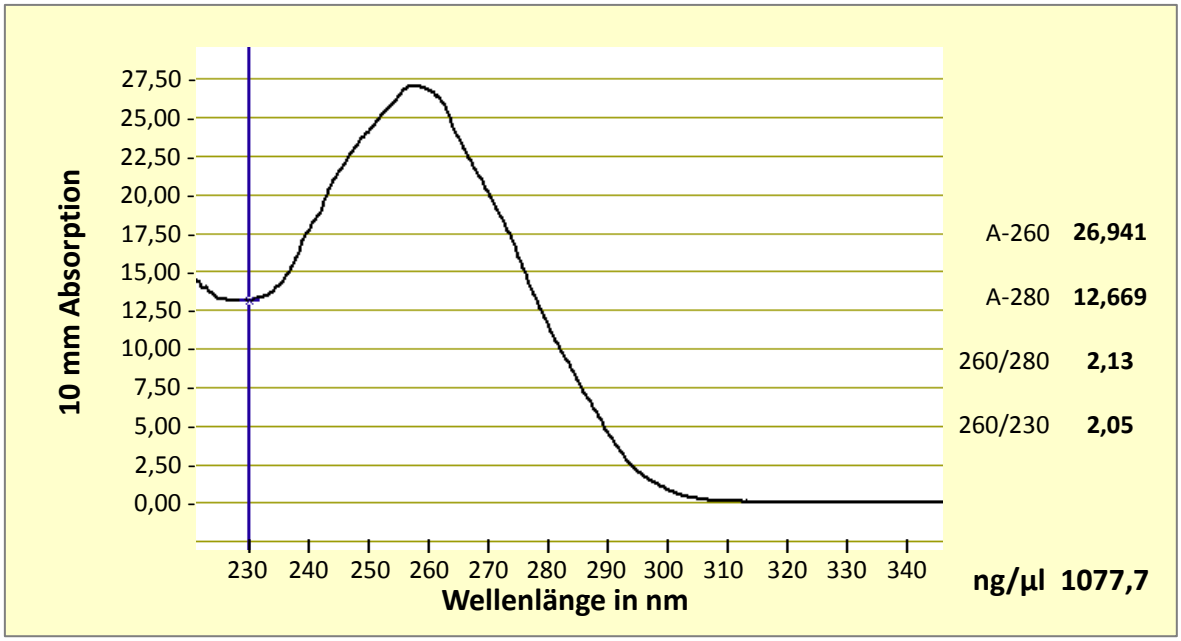

Abbildung 4: Die Absorptionskurve des Spektrophotometers (NanoDrop) und daraus berechnete Ribonukleinsäure (RNA)-Konzentration.

Es wurde beispielhaft die Absorptionskurve der extrahierten RNA eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie mit mutiertem *Nukleophosmin 1* dargestellt.

2.3.4 cDNA-Sythese

Die aus dem Zellpellet gewonnene mRNA musste in eine stabilere und für die DNA-Polymerase verwendbare komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, da sich die mRNA aufgrund ihrer Instabilität nicht mithilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) amplifizieren lässt.

Zur Synthese der cDNA wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) benutzt. Zuerst wurde anhand der Konzentration der RNA in ng/µl das benötigte Volumen der RNA und des RNase-freien-Wassers in µl ausgerechnet, sodass das addierte Volumen 24 µl ergab. Maximal wurden 2 µg RNA eingesetzt.

$$RNA\ Volumen\ [\mu l] = \frac{Benötige\ Masse\ RNA\ [\mu g]}{Gemessene\ Konzentration\ der\ RNA\ \left[\frac{ng}{\mu l}\right]}\ x\ 1000$$

$$H_20\ Volumen\ [\mu l] = 24\ \mu l - RNA\ Volumen\ [\mu l]$$

Zur Eliminierung genomischer DNA wurden der extrahierten RNA 4 µl 7X genomic DNA Wipeout Buffer hinzu pipettiert. Danach wurde die Probe bei 42 °C im Thermocycler für 2 min inkubiert. Aus einem MasterMix, der je Probe aus 2 µl Reverse Transkriptase (RT) Primer Mix, 2 µl Quantiscript Reverse Transcriptase und 8 µl 5X Quantiscript RT Buffer bestand, wurden 12 µl hinzugegeben. Die Probe mit dem Endvolumen von 40 µl wurde bei 42 °C weitere 20 min inkubiert und schließlich für 3 min auf 95 °C erhitzt, wobei die Reverse Transkriptase inaktiviert wurde. Nach diesem Vorgang wurde die Probe auf 4 °C herunter gekühlt und später bei -20 °C dauerhaft eingefroren.

2.3.5 Quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR)

2.3.5.1 Prinzip der Methode

Wie bei der konventionellen PCR werden auch bei der RQ-PCR spezifische Forward- (F‘-Primer) und Reverse-Primer (R‘-Primer) benötigt. Das besondere an der RQ-PCR ist, dass ein weiteres Oligonukleotid, die Sonde, sich zwischen dem F‘- und R‘-Primer an den zu amplifizierenden cDNA-Abschnitt anlagert. Die Sonde und der F‘-Primer sind universell für alle *NPM1*-Mutationstypen einsetzbar, da sie im konservierten Bereich des *NPM1*-Gens liegen. Die unterschiedlichen Mutationen sind dagegen im Bereich des R‘-Primers im Exon 12 des *NPM1* Gens lokalisiert (Abb. 7). Infolgedessen wurde je Mutationstyp ein spezifischer R‘-Primer entworfen. Die TaqMan-PCR-Sonde ist am 5‘ -Ende mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff (FAM = 6-Carboxy-fluoreszein) verbunden. Außerdem ist das Oligonukleotid am 3‘-Ende mit einem Rhodaminfarbstoff (TAMRA = 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin), dem sogenannten Quencher, modifiziert. Um eine Extension des 3‘-Endes während der PCR zu verhindern, ist ein Phosphat an das OH-Ende gebunden. Während der PCR lagern sich sowohl die Primer als auch die Sonde an die cDNA an. Die AmpliTaq DNA-Polymerase beginnt am F‘-Primer mit der Extension, trifft schließlich auf die fluorogene Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5‘-3‘-Exonuklease-Aktivität der Polymerase aktiviert wird. Die Sonde wird gelöst und hydrolysiert, dabei werden der Reporter und der Quencher räumlich voneinander getrennt. Wird nun die Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, kann der Quencher die Fluoreszenz nicht mehr durch den Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrücken. Die Sonde emittiert nun ein Signal (Emission von FAM: 518 nm), dass ab einer gewissen Stärke gemessen werden kann. Währenddessen wird das PCR-Produkt vollständig synthetisiert. Nicht hybridisierte Sonden werden nicht hydrolysiert und nur teilweise gebundene Sonden werden, noch bevor die Exonukleaseaktivität der Polymerase aktiviert wird, verdrängt. So ist das gebildete Signal strikt sequenzspezifisch. Die Fluoreszenz des Reporters steigt proportional mit der Anzahl der PCR-Produkte bei jedem Zyklus. Die Stärke des Signals wird mithilfe des ABI PRISM 7900HT Sequence Detektor (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) erfasst.

2.3.5.2 ABI PRISM™ 7900HT Sequence Detection System

Mithilfe des ABI PRISM™ 7900HT Sequence Detection System ist es möglich den gesamten Ablauf der PCR aufzunehmen und zu dokumentieren. Das System besitzt einen eingebauten Thermocycler, einen Argonlaser (488 nm) und eine Charge-Coupled Device (CCD) -Kamera. Der Strahl des Argonlasers wird auf einen Multiplexer gelenkt, der über 96 Lichtleiter mit dem optischen Heizdeckel des Thermocyclers verbunden ist. Durch eine Linse fokussiert dringen die Strahlen des Argonlasers in die Reaktionsgefäße der 96-Well Platte (MicroAmp® Optical 96-Well Plate) ein und regen dort die Fluoreszenzemission an. Die Emission besitzt eine andere Wellenlänge als der Laserstrahl. Deshalb wird dieser an einem dichroiden Spiegel reflektiert und gelangt zur CCD-Kamera, die das optische Signal in ein digitales umwandelt. Die Kamera sammelt Emissionsdaten von Wellenlängen zwischen 500 – 660 nm aus jedem der 96 Reaktionsgefäße. Ein kompletter Plattenscan erfolgt in 7 Sekunden.

2.3.5.3 Auswertung der Daten

Nach Ende der PCR erfolgt die automatische Auswertung der gewonnen Daten durch die Sequence Detection Software, Version 2.3. Mithilfe eines passiven Referenzfarbstoffes (ROX), der dem Reaktionspuffer zugesetzt ist, können störende Schwankungen im Reportersignal ausgeglichen werden, die in Folge von Konzentrationsänderungen aufgrund von Volumenschwankungen auftreten können. Der R_n-Wert spiegelt diesen normalisierten Wert wider. Er ist der Quotient aus der Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes und der Emissionsintensität des passiven Referenzfarbstoffes. Während der ersten PCR-Zyklen wird ein Hintergrundsignal nachgewiesen, während das eigentliche Signal aus der Hydrolyse der Sonden noch unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Damit dieses Signal, das nicht auf den PCR-abhängigen Nuklease-Verdau basiert, die Ergebnisse nicht verfälscht, wird es vom jeweiligen R_n-Wert abgezogen. Daraus ergibt sich der ΔR_n-Wert.

Der C_T -Wert (Threshold Cycle) gibt die Anzahl der Zyklen an, die abgelaufen sind, bevor ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird. Die Sequence Detection Software gibt die Daten als Exponentialfunktion des ΔR_n-Werts über der

Zyklenzahl wieder (Abb. 5). Über eine logarithmische Plasmid-Standardkurve kann aus dem C_T -Wert das Transkript-Level des untersuchten Gens vor der PCR errechnet werden.

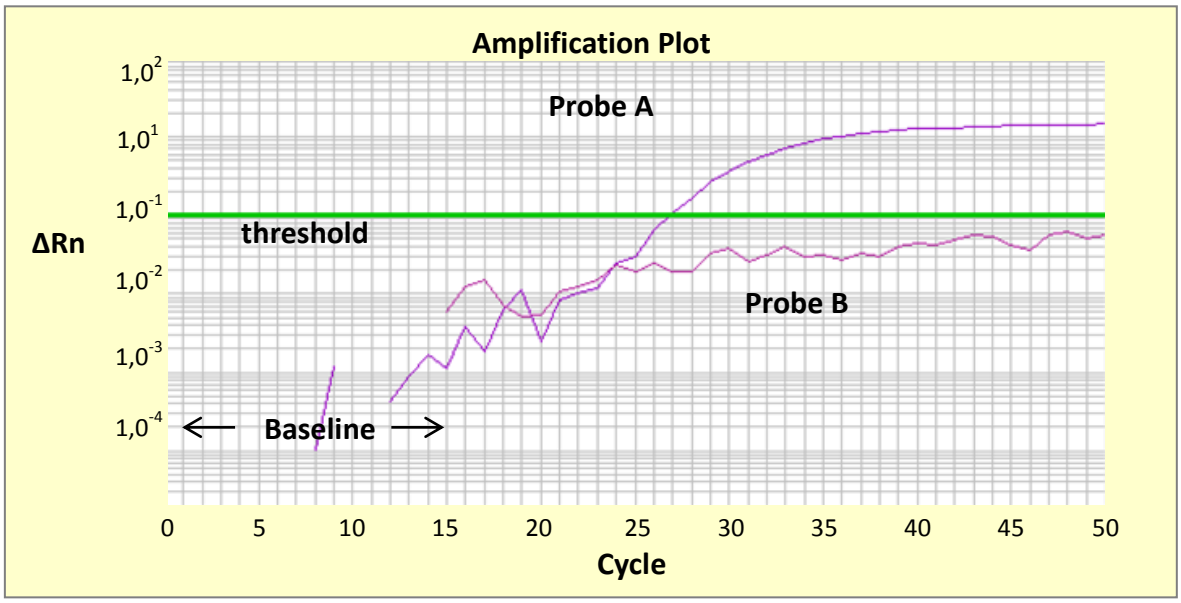

Abbildung 5: Amplification plot einer quantitativen Real-Time Polymerasen-Kettenreaktion (RQ-PCR).
Der ΔR_n-Wert ist der Quotient aus der Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes und der Emissionsintensität des passiven Referenzfarbstoffes. Der C_T -Wert (Threshold Cycle) beschreibt die Anzahl an RQ-PCR-Zyklen, die abgelaufen sind bis der Grenzwerte (threshold) erreicht ist.

2.3.5.4 Durchführung der RQ-PCR

Die RQ-PCR wurde bei jeder Patientenprobe sowohl für die spezifische *NPM1*-Mutante als auch für das Haushaltsgen *ABL* durchgeführt. Die Quantifizierung des Haushaltgens wurde benötigt, um cDNA-Konzentrationsunterschiede der einzelnen Proben auszugleichen. Es kann davon ausgegangen werden, dass in jeder Probe ein ungefähr gleich hoher Prozentsatz des Haushaltsgens vorhanden ist. Um die benötigte Sensitivität und Genauigkeit zu erreichen, wurden die Patienten-cDNA sowohl für *NPM1*^{mut} als auch für *ABL* in Tripletts, die *NPM1*^{mut}-und *ABL*-Standardreihe dagegen in Duplikaten pipettiert. Außerdem wurde eine No-Template-Control (NTC) für den *NPM1*^{mut}-MasterMix und zwei NTCs für den ABL-MasterMix pipettiert. Die MasterMixe wurden entsprechend des in Tabelle 3 dargestellten Ansatzes hergestellt.

Tabelle 3: Reaktionsansätze der MasterMixe zur Durchführung der quantitativen Real-Time Polymerasen-Kettenreaktion (RQ-PCR) mithilfe des ABI PRISM™ 7900HT Sequence Detection System.

Zu den mit * gekennzeichneten Mutationen gehören die *Nukleophosmin 1* (*NPM1*)-Mutationstypen A, D, Nm, Km und Qm. Die Sequenzen sind unter Kapitel 2.1.5 aufgeführt. Zur Herstellung der MasterMixe wurde das TaqMan® PCR Core Reagent Kit (Applied Biosystems) verwendet. Abkürzungen: dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphate; dUTP = Desoxyuridintriphosphat; $MgCl_2$ = Magnesiumchlorid; *ABL* = *Abelson murine leukemia virus oncogene.*

	***NPM1*^{mut} Typ * 48x**	***NPM1*^{mut} Typ B 48x**	***ABL* 48x**
Aqua ad iniectabilia	648 µl	672 µl	648 µl
10XTaqMan Buffer A	120 µl	120 µl	120 µl
dNTPs 25 mM (Core mit dUTP)	24 µl	24 µl	24 µl
$MgCl_2$ 25 mM	192 µl	168 µl	192 µl
Oligo-Mix (Zielgen)	48 µl	48 µl	
Oligo-Mix (*ABL*)			48 µl
AmpliTaq Gold	12 µl	12 µl	12 µl
Amp Erase UNG	12 µl	12 µl	12 µl
	1056 µl	**1056 µl**	**1056 µl**

Oligo-Mix *NPM1* bestehend aus:	
Forward-Primer (GC NPM C-F‘)	100 µl
Reverse-Primer (GC NPM mut*R’)	75 µl
Taqman-Probe (GC Probe NPM) (5’: 6-FAM 3’: BHQ1)	50 µl
Aqua ad iniectabilia	775 µl

Oligo-Mix *ABL* bestehend aus:	
Forward-Primer (ENF 1003 ABL F‘)	75 µl
Reverse-Primer (ENR 1063 ABL R’)	75 µl
Taqman-Probe (ENPR 1043 ABL Probe) (5’: HEX 3’: BHQ1)	50 µl
Aqua ad iniectabilia	800 µl

Entsprechend Abb. 6 wurde in jedes Reaktionsgefäß der oberen 4 Reihen der 96-well Platte (MicroAmp® Optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems) 22 µl des mutationsspezifischen *NPM1*^{mut} MasterMix und in den unteren 4 Reihen 22 µl des ABL-MasterMix pipettiert. Pro Patient wurden insgesamt 6 Reaktionsgefäße (3 für *NPM1*^{mut} und 3 für *ABL*) mit jeweils 3 µl cDNA befüllt. Am Plasmidarbeitsplatz wurden anschließend 3 µl Plasmide aus frisch erstellten Verdünnungsreihen mit den Konzentrationen von $0{,}33x10^6$ bis $0{,}33x10^1$ Plasmide/µl pipettiert. Die absolute Menge der *NPM1*^{mut}-Plasmide variierte dementsprechend von 10^6 bis 10^1 und die der *ABL*-Plasmide von 10^6 bis 10^2. In die NTC-Reaktionsgefäße wurden 3 µl Aqua ad iniectabilia hinzugefügt.

1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4
5	5	5	6	6	6	7	7	7	8	8	8
9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12
10^6	10^6	10^5	10^5	10^4	10^4	10^3	10^3	10^2	10^2	10^1	NTC
1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4
5	5	5	6	6	6	7	7	7	8	8	8
9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12
10^6	10^6	10^5	10^5	10^4	10^4	10^3	10^3	10^2	10^2	NTC	NTC

Abbildung 6: Pipettierschema einer 96-well Reaktionsplatte (MicroAmp® Optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems).

Mit Hilfe dieser Reaktionsplatte wurde die quantitative Real-Time Polymerasen-Kettenreaktion (RQ-PCR) mit dem ABI PRISM™ 7900HT Sequence Detection System durchgeführt. Weiße Zahlen: *NPM1*^{mut} MasterMix (Reihe 1 – 4); Schwarze Zahlen: *ABL* MasterMix (Reihe 5 – 8). In die Reihen 1 - 3 und 5 - 7 wurde Patientenmaterial (Probe 1 bis 12), in die Reihe 4 mutationsspezifische *NPM1*-Plasmide und in die Reihe 8 *Abelson murine leukemia virus oncogene* (*ABL*)-Plasmide mit angegebener absoluter Anzahl, pipettiert. Abkürzung: NTC = No-Template-Control.

Die Reaktionsgefäße der Platte wurden mit einer optischen Folie (MicroAmp® Optical Adhesive Film; Applied Biosystems) verschlossen und die gesamte Platte für einige Sekunden bei 1000 U/min zentrifugiert. Die RQ-PCR wurde mit dem ABI PRISM™ 7900HT Sequence Detection System durchgeführt. Der initiale Schritt erfolgte bei 50 °C für 2 min zur Aktivierung der AmpErase® UNG. Daraufhin wurde die Reaktionsplatte auf die optimale Reaktionstemperatur der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase von 95 °C für 10 min erhitzt. Die RQ-PCR lief insgesamt über 50 Zyklen bei einer Denaturierungstemperatur von 95 °C für 15 Sekunden und einer Annealing- und Extensionstemperatur von 62 °C für 1 min ab. Der PCR-Run konnte nach Ende der RQ-PCR mithilfe des Sequence Detection Software analysiert und ausgewertet werden.

2.3.5.5 Auswertung der RQ-PCR und Berechnung des Transkript-Levels

Vor der Analyse wurden die Detektoren für *NPM1*^{mut} und *ABL* manuell auf eine Reizschwelle (threshold) von 0,1 ΔR_n-Wert und eine Baseline von 3 – 15 Zyklen eingestellt. Für jedes Reaktionsgefäß wurde automatisch durch die Sequence Detection Software der dazugehörige C_T-Wert ermittelt. Die Genauigkeit der Plasmidstandardkurven wurde manuell überprüft. Der Korrelationskoeffizienten R^2 musste bei allen Mutationstypen und auch beim Haushaltsgen ABL über 0,990 liegen, damit die PCR ausgewertet werden konnte. Bis zu zwei Ausreißer in der Standardreihe durften gelöscht werden, wenn der R^2-Wert kleiner als 0,990 war. Lag der R^2-Wert nun über 0,990, wurde der PCR-Run normal ausgewertet, wenn nicht, wurde der RQ-PCR Run mit einer neuen Plasmid-Verdünnungsreihe wiederholt. Zusätzlich mussten die C_T-Werte der NTC größer als 50 sein. Die Absolutwerte der einzelnen Proben sowie der Durchschnittswert und die Standardabweichung eines Triplikates wurden anhand der Standardkurven automatisch durch die Sequence Detection Software berechnet.

Die weiteren Auswertungskriterien und die Befundinterpretation folgten folgendem Schema:

- Das Ergebnis eines Ansatzes war negativ, wenn der C_T-Wert einer Messung größer als der Y-Intercept (Y-Achsenabschnitt) + 1 war.
- Waren zwei C_T-Werte im Triplett positiv, so wurden diese beiden Werte für die Berechnung des Transkript-Levels herangezogen.
- Die Messung der Probe musste wiederholt werden, wenn nur ein C_T-Wert im Triplett positiv war.
- War bei der Wiederholungsmessung wieder ein C_T-Wert von drei positiv, wurde der Durchschnitt beider Ergebnisse als Transkript-Level verwendet (2/6 positiv).
- Falls in der Wiederholungsmessung kein C_T-Wert positiv war, betrug das Transkript-Level null.
- Lag der C_T-Wert bei *ABL* ≥ 35 und war *NPM1*^{mut} nicht detektierbar, so galt das Ergebnis als nicht auswertbar.
- War der C_T-Wert für *ABL* ≥ 35 und war *NPM1*^{mut} detektierbar, so war das Ergebnis trotz eingeschränkter Materialqualität auswertbar.

2.3.5.6 Berechnung des gemessenen Transkript-Levels

Die Durchschnittsmenge der 3 *ABL*-Messungen (Ø Qty Mean) wurde durch die Durchschnittsmenge der drei *NPM1*^{mut}-Messungen (Ø Qty Mean) der Probe geteilt. Das Ergebnis wurde mit dem Faktor 10^4 multipliziert.

$$\text{Gemessenes Transkript} - \text{Level} = \frac{\emptyset\ Qty\ Wert\ NPM1^{mut}}{\emptyset\ Qty\ Wert\ ABL}\ x\ 10^4$$

Außerdem wurde das Transkript-Level anhand einer idealen Standardkurve berechnet. Diese Werte wurden zur internen Qualitätskontrolle der aktuellen Plasmidstandardreihe in die Ergebnisliste mit aufgenommen. Zur Befundung und statistischen Analyse wurden aber die exakteren gemessenen Werte verwendet. Eventuell vorhandene Pipettierfehler beeinflussen bei dieser Rechnung die Werte der Standardreihe und Patientenprobe in gleicher Richtung, sodass der Effekt minimiert wird. Außerdem rechnet das Sequence Detection System mit mehr Nachkommastellen, so dass Rundungsfehler ausgeschlossen sind. Sowohl das errechnete als auch das gemessene Transkript-Level wurden farblich unterschieden in chronologischer Reihenfolge in die Übersichtsliste eingetragen.

2.3.6 Generierung und Präparation der Plasmid-DNA für die Standardreihe

2.3.6.1 Generierung der PCR-Produkte

Die Plasmide für die *NPM1* Mutationstypen A und B und für das Haushaltsgen wurden mithilfe der unten beschriebenen Methoden hergestellt; für beide *NPM1* Mutationstypen standen spezifische Zelllinien zur Verfügung. Zur Herstellung der Plasmide mit den *NPM1* Mutationstypen Nm, Km und Qm musste dagegen auf Patientenmaterial zurückgegriffen werden, bei dem durch Sequenzierung die jeweilige Mutation nachgewiesen wurde. Die mutationsspezifischen R‘-Primer wurden entsprechend der Lage und Länge des R‘-Primers für den Mutationstyp A konstruiert. Wie bereits beschrieben liegen der F‘-Primer und die Sonde im konservierten Bereich des *NPM1*-Gens, sodass sie universell für verschiedene Mutationstypen einsetzbar waren (Abb. 7).

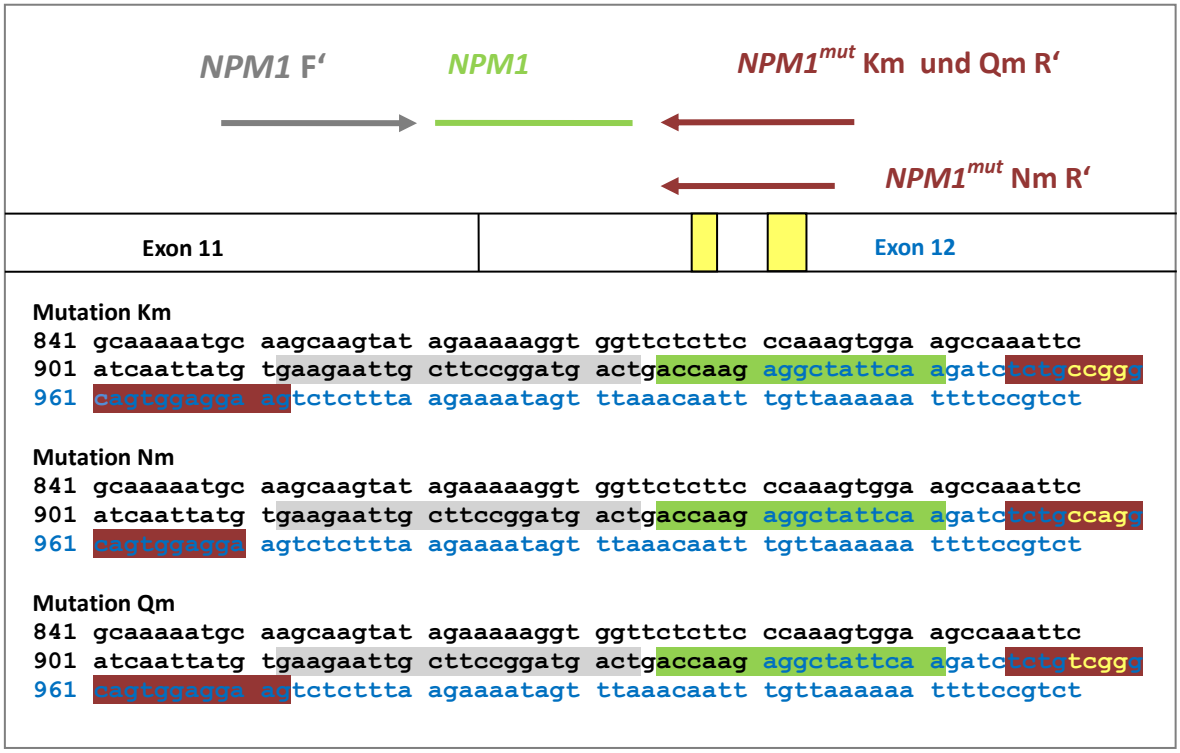

Abbildung 7: Lokalisation der Primer und der Sonde in *Nukleophosmin 1* bei den Mutationstypen (*NPM1*^{mut}) Km, Nm und Qm.

Sowohl in der oberen schematischen Darstellung der Exons als auch in der darunter liegenden Sequenz sind der Forward-Primer (F‘) grau, die Sonde grün und die mutationsspezifischen Reverse-Primer (R‘) dunkelrot hinterlegt. Die Sonde liegt am Übergang zwischen Exon 11 (schwarze Buchstaben) und Exon 12 (blaue Buchstaben). Die Mutationstypen A, B, D, Km, Nm und Qm befinden sich in der schematischen Darstellung an der ersten (linken) gelb markierten Stelle im Exon 12, die Mutationstypen E und F an der zweiten (rechten) Stelle. Die Insertionen in den Sequenzen der Mutationstypen Km, Nm und Qm im Exon 12 sind ebenfalls mit gelber Schriftfarbe hervorgehoben.

Die Amplifikation des mutierten Genabschnittes wurde mithilfe einer PCR durchgeführt. Das Reaktionsvolumen der PCR enthielt 50 ng cDNA, 5 µl 10X PCR Puffer, 0,5 µl 50 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), 1 µmol der jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimer und 1 unit (1 unit/ìl) Taq Polymerase. Um auf die benötigten 50 µl Reaktionsvolumen zu kommen, wurde abhängig von der cDNA-Konzentration Aqua ad iniectabilia hinzugefügt. Die Proben wurden in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen amplifiziert: Denaturierung mit 95 °C für 5 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95 °C für 1 min, 60 °C für 1 min, 72 °C für 1 min. Zum Abschluss wurden die Proben für

7 min bei 72 °C inkubiert, um sicherzustellen, dass alle PCR Produkte die volle Länge erreichten und am 3‘-Ende adenyliert waren.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde mit einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Größe der PCR-Fragmente ließ sich aus der Summe der Längen des F‘-Primers (22 Basen), des R‘-Primers (Km, Qm: 21; Nm 19: Basen) und des Abschnittes zwischen den Primern (22 Basen) errechnen (Abb. 7). Somit ergab sich eine Größe der PCR-Fragmente von 65 Basenpaaren (bp) bei den Mutationstypen Km und Qm und 63 bp bei Mutationstyp Nm. Den PCR-Produkten wurden 5 µl Loading-Buffer hinzugefügt und diese dann auf ein 3%iges Agarosegel, das mit 300 ml TAE-Puffer aufgekocht worden ist, aufgetragen. Ein 100 bp DNA-Ladder wurde zur Größenabschätzung der Fragmente in eine Tasche hinzugefügt. Die Gelelektrophorese lief bei 140 V /80 mA für 40 min. Danach wurde das Gel in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid für 15-30 min gefärbt. Zur Dokumentation wurden die Banden durch UV-Licht (302 nm) visualisiert und mithilfe einer digitalen Kamera fotografiert.

2.3.6.2 Klonierung, Transformierung und Kultivierung der PCR-Produkte

Zur Klonierung der PCR-Produkte in ein Vektorsystem wurde das TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) verwendet. 2 µl des frischen PCR-Produktes wurden zusammen mit 1 µl Salzlösung (1,2 mol NaCl und 0,06 mol $MgCl_2$), 2 µl Wasser und 1 µl pCR®4-TOPO® Vektor vermischt. Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf Eis zwischengelagert. Chemokompetente One-Shot® TOP 10 Escherichia coli wurden mit 2 µl der Klonierungsreaktionslösung transformiert. Dieser Vorgang beinhaltete eine 30 minütige Inkubation auf Eis, ein Hitzeschock für exakt 30 Sekunden bei 42 °C mithilfe eines Thermoblocks, eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min und eine Applikation von 250 µl S.O.C Medium bei Raumtemperatur. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend für 1 Stunde bei 37 °C horizontal im Schüttel-Brutschrank inkubiert. Daraus wurden jeweils 50 µl und 100 µl auf vorgewärmte, 50 µg/ml Kanamycin enthaltende Lysogeny broth (LB)-Platten pipettiert, die über Nacht im Brutschrank inkubiert wurden. Da der pCR®4-TOPO® Vektor ein Gen für die Kanamycinresistenz enthält, konnten nur diejenige Escherichia coli Kolonien wachsen, die den Vektor aufgenommen hatten. Außerdem beinhaltete der Vektor das ccdB Gen,

das mit dem C-Terminus des LacZalpha-Fragments verbunden ist. Die Aufnahme des PCR-Produktes in den Vektor unterbricht die Expression des lacZalpha-ccdB Fusionsgens, welches letal für die Escherichia coli ist. Deshalb überlebten nur diejenigen Zellen, die einen Vektor mit einem Insert aufgenommen hatten. 6 dieser so selektionierten Kolonien wurden pro Platte entnommen. Jede Kolonie wurde in ein separates Reaktionsgefäß mit 5 ml LB-Medium, welches mit 50 µg/ml Kanamycin versetzt war, gegeben. Diese Reaktionsgefäße wurden eine weitere Nacht bei 37 °C kultiviert.

Das LB-Medium wurde zuvor aus 10 g Tryptone, 5 g Yeast, 10 g NaCl und 1 Liter Aqua destillata hergestellt und autoklaviert. Für die Herstellung der LB-Platten wurde 15 g Bacto Agar mit 1 Liter LB-Medium und 2 ml Kanamycin vermischt. Jede Platte enthielt 20 ml dieses Mediums.

2.3.6.3 Isolierung der Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA aus den über Nacht inkubierten transformierten Zellen wurde mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) aus jeder Kultur isoliert. Zuerst wurden die Bakterien-Tubes bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Bakterien-Pellets mit 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Überführung in ein 1,5 ml Safe-Lock-Tube wurden jeweils 250 µl P2-Puffer dazugegeben und invertiert bis die Lösungen zähflüssig, aber klar wurden. Daraufhin wurden 350 µl N3-Neutralisiserungspuffer hinzugegeben und wiederum invertiert. Nachdem die Lösungen bei 1300 U/min 10 min zentrifugiert worden waren, wurde der jeweilige Überstand auf eine QIAprep Spin Säule pipettiert und erneut 1 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Dann wurden 500 µl PB-Puffer und 750 µl PE-Puffer auf die Membran pipettiert. Nach jedem Schritte erfolgte wieder eine Zentrifugation mit 1300 U/min für 1 min. Der Durchfluss wurde nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen. Als letzter Schritt wurde jeweils 50 µl EB-Puffer auf die Membranmitte pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 1 min wurden die Tubes für 60 Sekunden bei 1300 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt nun die isolierte Plasmid-DNA, welche bei -20 °C für den weiteren Gebrauch gelagert wurde.

Die DNA-Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer (NanoDrop) bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm durchgeführt. Eine optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) von 1 entspricht bei der DNA einer Konzentration von 50 µg/ml. Mithilfe der folgenden Formel wurde die DNA-Konzentration der Probe errechnet.

$$DNA - Konzentration = \mathrm{OD}_{260} \text{ x Verdünnungsfator x } 50\ \mu\mathrm{g/ml}$$

2.3.6.4 Spaltung der Plasmid-DNA und Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung und Visualisierung der DNA-Fragmente wurde wiederum eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Ein eventuell doppelter Einbau des PCR-Produktes konnte so erkannt werden. Hierzu wurde die Plasmid-DNA mithilfe der EcoR I Restriktionsenzyme aus dem Vektor geschnitten. Die EcoR I Schnittstellen befanden sich 6 Basen nach dem adenylierten 3‘-Ende und 11 Basen vor dem 5‘-Ende des PCR-Produktes in dem pCR®4-TOPO® Vektor. Die Normgröße des Amplikons war bei den Mutationstypen Km und Qm 65 bp, bei dem Mutationstyp Nm 63 bp. Hinzu kam bei allen Mutationstypen ein Vektoranteil von 17 bp. Dies ergab eine Produktgröße von 82 bp bei den Mutationstypen Km und Qm und 80 bp bei Mutation Nm. Das Volumen von 1 µg DNA wurde zusammen mit 1 µl Buffer H, 1 µl EcoR I Restriktionsenzym vermischt und mit Aqua ad iniectabilia auf insgesamt 10 µl Reaktionsansatz aufgefüllt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Aus jedem Reaktionsansatz wurden 10 µl entnommen und mit je 5 µl Orange G Loading-Buffer vermischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Zur Größenabschätzung der Fragmente wurde ein 100 bp DNA-Ladder mitgeführt. Für diese Agarose-Gelelektrophorese wurde ein 2%iges Agarosegel benutzt. Die Gelelektrophorese lief eine Stunde bei 160 V. Das Gel wurde in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid für 15-30 min gefärbt, mit UV-Licht visualisiert und anschließend digital fotografiert.

2.3.6.5 Cycle Sequencing Reaction (CSR)

Um die Richtigkeit der Plasmidsequenz sicherzustellen, musste das Insert sequenziert werden. Die Cycle Sequencing Reaction (CSR) wurde mithilfe des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Das darin beinhaltete BigDye 1.1 enthielt neben den vier mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen

markierten Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTP) (Adenin-grün, Thymin-rot, Guanin-schwarz und Cytosin-blau) auch modifizierte Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), $MgCl_2$, Tris-HCl-Puffer und die thermostabile AmpliTaq-DNA-Polymerase. Die Reaktion wurde mit einem Volumen von insgesamt 14 µl pro Ansatz durchgeführt. Jeder Ansatz beinhaltete 9,3 µl Aqua ad iniectabilia, 2 µl BigDye 1.1 und 1,7 µl 5x Puffer. Es wurden je Probe 2 Ansätze mit entweder 1 µl M13F (3 pmol/µl) oder 1 µl M13R (3 pmol/µl) pipettiert, um eine Sequenzierung des PCR-Abschnittes vom 3‘-Ende und vom 5‘-Ende beginnend durchführen zu können. Vor Beginn des ersten Zyklus der CSR wurden die Proben für 45 Sekunden bei 96 °C denaturiert. Dann folgten 35 Zyklen mit 15 Sekunden bei 96 °C, 10 Sekunden bei 55 °C und 4 min bei 60 °C.

2.3.6.6 Aufreinigung der DNA

Um die ungebundenen, fluoreszenzmarkierten ddNTP zu entfernen, wurde das DyeEx 2.0 Spin (Kit Qiagen) benutzt. Bei der Aufreinigung wurde die unterschiedliche Größe der gebundenen und ungebundenen Moleküle, entsprechend einer Gelfiltrations-chromatographie, ausgenutzt. Das flüssige Gelfiltrationsharz in den Collection Tubes wurde durch eine Zentrifugation bei 3000 U/min für 3 min verdichtet und verhärtet. Die Harzsäule wurde in ein Tube transferiert und die Probe hinzu pipettiert. Daraufhin folgte eine weitere Zentrifugation bei 3000 U/min für 3 min und der DNA-Anteil wurde im Eluat gesammelt. Die überschüssigen Anteile des BigDye ebenso wie die ungebundenen ddNTPs wurden in den Poren des Harzes zurückgehalten.

2.3.6.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung des Inserts wurde mit dem ABI-PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt. Der Vorgang begann mit einer 2 minütigen Denaturierung bei 95 °C. Die DNA-Fragmente wurden durch eine angelegte Spannung elektrophoretisch aufgetrennt und passierten nacheinander den Argon-Ionen-Laser. Dieser regte die an die DNA-Fragmente gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission an. Die Signale wurden von einer CCD-Kamera (Charge-Coupled Device Kamera) detektiert. Jede der vier verschiedenen Farbstoffe besitzt eine spezifische Wellenlänge,

die zur Unterscheidung der vier Nukleotide benutzt wird. Es erfolgte eine graphische Darstellung der DNA-Sequenz.

2.3.6.8 Berechnung der Plasmid-Transkripte

Aus der mit dem NanoDrop bestimmten DNA-Konzentration musste als letzter Schritt die Plasmid-Anzahl pro µl errechnet werden. Dazu mussten die Größe des Vektors pCR®4-TOPO® und die Insert-Größe in bp bekannt sein. Das durchschnittliche Gewicht eines Basenpaares liegt bei ungefähr 660 Dalton. Das bedeutet, dass ein Mol eines Basenpaares 660 g schwer ist.

$$Gewicht\ \ [g/mol] = Vektor\ Größe\ [bp] + Insert\ Größe\ [bp] x \frac{660g}{Mol}$$

$$Stoffmenge\ [mol/\mu l] = \frac{Gemessene\ Kozentration\ [\mu g/\mu l]}{Gewicht\ [g/mol]\ x\ 1.000.000}$$

Mithilfe der Avogadro-Konstante ließ sich nun die Teilchenanzahl in 1 µl bestimmen.

$$Teilchenanzahl\ pro\ \mu l = 6{,}022x10^{23}\ x\ Stoffmenge\ [mol/\mu l]$$

Es wurden Stocks mit $0{,}33x10^{9}$ und $0{,}33x10^{7}$ Plasmide/µl hergestellt, die bei – 20 °C eingefroren wurden. Aus der $0{,}33x10^{7}$ Plasmide/µl Verdünnung wurden schließlich die Standardreihen mit den Verdünnungen von $0{,}33x10^{6}$ bis $0{,}33x10^{1}$ Plasmide/µl hergestellt.

2.4 Statistische Verfahren

2.4.1 Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Zur Überprüfung der Unterschiede der medianen Zeit von Überschreiten des Schwellenwertes bis zum Rezidiv zwischen *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{mut} und *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wt} Genotypen wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Dieser Test setzt keine Normalverteilung voraus und gilt für unabhängige Stichproben. Die Anzahl der Aberrationen bei Diagnose und Rezidiv wurden mit dem verbundenen t-Test verglichen. Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf $p<0,05$ gesetzt.

2.4.2 Prädiktion der Rezidive

Die Prädiktion der Rezidive wurde nach dem Verfahren von Ommen et al. 2008 berechnet, das trotz unterschiedlicher Intervallabstände eine gute Annäherung erreicht (Ommen et al. 2008). Zuerst wurden die Fraktionen der Proben (y-Achse), die oberhalb des Schwellenwerts lagen, alle 5 Tage bis zum Rezidiv über die Zeit (x-Achse) graphisch aufgetragen. An Punkt 0 auf der x-Achse musste die Kurve den Wert 1 annehmen, da alle Patienten zu diesem Zeitpunkt ihr hämatologisches Rezidiv bekommen hatten und somit 100 % der Rezidive detektiert wurden. Aus der Verteilung dieser Punkte wurde ein Polynom 6. Grades ($f_{(t)}$) errechnet, das den Verlauf der Punkte möglichst genau wiedergab. Mithilfe einer Integralfunktion lässt sich die Fraktion der detektierbaren Rezidive (RDF) in Abhängigkeit des Probenintervalls I berechnen:

$$RDF = \frac{\int_{-I}^{0} F(t)}{I}$$

Die mediane Zeit t_m zwischen dem Detektionszeitpunkte des MR und HR wurde bei einem bestimmten Intervallabstand mit folgender Gleichung berechnet, wobei t_0 den Schnittpunkt der Funktion mit der x-Achse ist.

$$\int_{tm}^{0} \big(F(t) - F(t+I)\big)dt = \int_{to}^{tm} \big(F(t) - F(t+I)\big)dt$$

Diese Gleichungen wurden von Ommen et al. veröffentlicht (Ommen et al. 2008).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der RQ-PCR Assays für die Mutationstypen Km, Nm und Qm

3.1.1 Inzidenz der Mutationstypen

Die Inzidenz der Mutationstypen wurde aus der Gesamtheit der *NPM1*^{mut} AML-Patienten errechnet, die zum Zeitpunkt der Analyse in Ulm untersucht worden waren. Die meisten dieser Patienten waren in den Studien AML HD98-A, AMLSG 07-04, RATIFY und AMLSG 09-09 eingeschlossen. Insgesamt lag von 449 *NPM1*^{mut} AML-Patienten eine Typbestimmung durch eine Sequenzierung vor. Typ A war die mit 76,30% die am häufigsten gefundene Mutation, gefolgt von Typ D (8,69%) und Typ B (7,13%). Die Patienten mit seltenen Mutationen machten insgesamt 7,80% der Kohorte aus. Die Mutationstypen Km und Nm waren mit je 4 Patienten und einer Inzidenz von 0,89% etwas häufiger als der Mutationstyp Qm mit einer Inzidenz von 0,67% (Tabelle 4).

Tabelle 4: Inzidenz der *Nukleophosmin 1* (*NPM1*)-Mutationstypen.

Die Kohorte bestand aus allen zum Zeitpunkt der Analyse in Ulm untersuchten Patienten (n=449) mit akuter myeloischer Leukämie und *NPM1* Mutation. Die meisten Patienten waren in die Studien AMLSG 07-04, AML HD98-A, RATIFY und AMLSG 09-09 eingeschlossen, die Übrigen sind analog dieser Studien behandelt worden.

	Anzahl der Patienten	Inzidenz
A	343	76,39 %
B	32	7,13 %
D	39	8,69 %
Km	4	0,89 %
Nm	4	0,89 %
Qm	3	0,67 %
Restliche	24	5,35 %
Summe	**449**	**100 %**

3.1.2 Design der RQ-PCR Assays und R‘-Primer

Die RQ-PCR Assays für die seltenen Mutationstypen Km, Nm und Qm wurden in Anbetracht verschiedener Gesichtspunkte etabliert. Das Ziel war sowohl eine mit den bereits etablierten Mutationstypen A, B und D vergleichbare Sensitivität und Spezifität als auch eine ebenso gute PCR-Effizienz und hohe Korrelationskoeffizienten der Standardreihen zu erreichen. Die Temperaturen der RQ-PCR sollten dabei, wenn möglich, nicht verändert werden, weil sie auch auf das Haushaltsgen *ABL*, das zusammen mit der spezifischen Mutation auf einer Platte gemessen wird, abgestimmt sind. Um diese Bedingungen zu erfüllen, wurden die mutationsspezifischen R‘-Primer in Anlehnung an den Mutation A R‘-Primer zunächst mit einer Länge von 21 Basen entworfen. Die 4 Nukleotid große Insertion lag bei allen R‘-Primern 4 Basen vor dem 3‘-Ende.

3.1.3 Spezifität der R‘-Primer

Bei der Überprüfung des R‘-Primers des Mutationstyps Nm wurde sowohl bei der konventionellen PCR als auch bei der RQ-PCR Amplifikationsvorgänge bei *NPM1* Wild-Typ (*NPM1*^{wt}) Zelllinien beobachtet. Bei der RQ-PCR wurde der Threshold nach etwa 35 Zyklen überschritten und der Nm R‘-Primer galt somit als unspezifisch, da er nicht zwischen *NPM1*^{mut} und *NPM1*^{wt} Proben differenzieren konnte. Deshalb wurde die Länge des Nm R‘-Primer um zwei Basen reduziert, um durch eine niedrigere Schmelztemperatur die Spezifität des Primers zu erhöhen. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden alle mit diesem verkürzten R‘-Primer durchgeführt.

Zunächst wurde eine konventionelle PCR zur Überprüfung der Spezifität der Primer durchgeführt. Die Gelelektrophorese zeigte bei allen Mutationstypen Banden, die unterhalb der 100 Basenpaarmarkierung des TrackIt 100 bp DNA-Ladder lagen. Somit stimmte die Lage der Banden mit der berechneten Größe der PCR-Fragmente überein. Weitere Banden, die eine mangelnde Spezifität der Primer bedeuten könnten, wurden in der Gelelektrophorese nicht nachgewiesen. Die unterschiedliche Stärke der Banden bei den Mutationstypen Nm und Qm lässt sich auf unterschiedliche Patientenproben zurückführen. Die No-Template-Kontrollen (NTC) mit Aqua ad iniectabilia zeigten wie

erwartet keine Banden, was ansonsten auf eine Verunreinigung der Primer hätte schließen lassen können (Abb. 8).

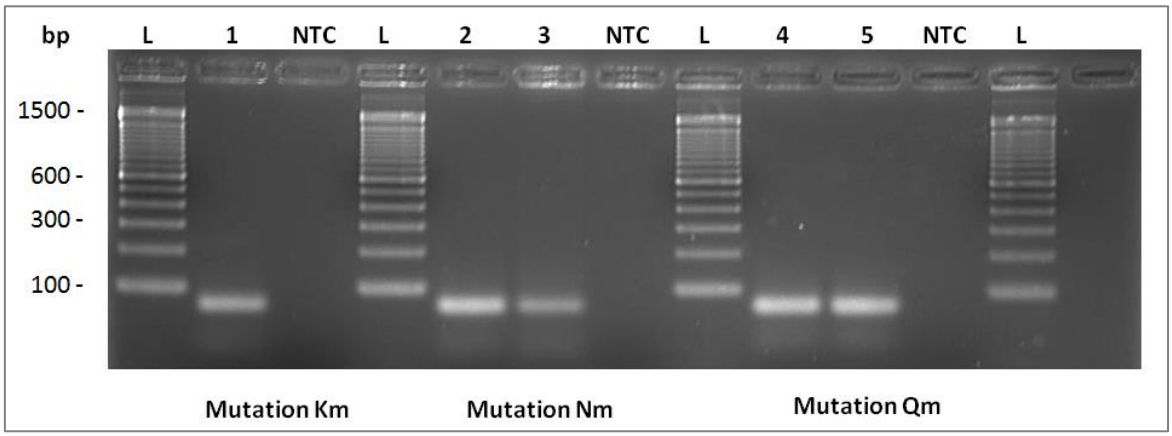

Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung der für die Mutationstypen spezifischen *Nukleophosmin 1* (*NPM1*) Reverse-Primer.

Die Primer der Mutationstypen Km, Nm und Qm wurden mit dem Patientenmaterial von 5 Patienten mit *NPM1* mutierter akuter myeloischer Leukämie überprüft. Als Ladder (L) wurde der 100 Basenpaar (bp) TrackIt DNA-Ladder verwendet. Jeder Reaktionsansatz wurde durch eine No-Template-Kontrolle (NTC) verifiziert.

3.1.4 Reinheit und Menge der Plasmid-DNA

Nach der Herstellung der spezifischen Plasmide in 6 Ansätzen je Mutationstyp mithilfe eines Vektors wurde die Plasmid-DNA mit dem Spektrophotometer (Nanodrop) überprüft. Die gemessene Konzentration der Plasmid-DNA lag bei allen Ansätzen zwischen 195 und 303 ng/µl. Die OD_{260}/OD_{230} Ratio lag durchgehend über 1,6 und die OD_{260}/OD_{280} Ratio über 1,8 (Tabelle 5). Beides deutete auf eine sehr gute Qualität und eine ausreichende Menge der Plasmid-DNA hin, was für die weiteren Analysen entscheidend war.

Tabelle 5: Spektrophotometrische Messung der hergestellten Plasmide.

Die Plasmide der *Nukleophosmin 1* (*NPM1*)-Mutationstypen Km, Nm und Qm wurden in je 6 Ansätzen überprüft. Das Spektrophotometer wurde vor der Messung der Proben mit TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) kalibriert. Abkürzungen: OD = Optische Diche, A260 = Absorption bei 260 nm, A280 = Absorption bei 280 nm.

	ng/µl	A260	A280	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}
Km1	289,74	5,795	3,020	1,92	2,41
Km2	259,95	5,199	2,727	1,91	2,43
Km3	253,60	5,072	2,676	1,90	2,42
Km4	258,36	5,167	2,704	1,91	2,44
Km5	268,77	5,375	2,838	1,89	2,44
Km6	291,41	5,828	3,082	1,89	2,42
Nm1	281,06	5,621	2,974	1,89	2,43
Nm2	250,69	5,014	2,628	1,91	2,47
Nm3	268,52	5,370	2,806	1,91	2,41
Nm4	237,01	4,740	2,499	1,90	2,43
Nm5	303,37	6,067	3,192	1,90	2,40
Nm6	303,10	6,062	3,198	1,90	2,38
Qm1	235,72	4,714	2,482	1,90	2,43
Qm2	195,78	3,916	2,059	1,90	2,51
Qm3	246,72	4,934	2,607	1,89	2,46
Qm4	216,22	4,324	2,271	1,90	2,49
Qm5	201,35	4,027	2,123	1,90	2,49
Qm6	279,45	5,589	2,924	1,91	2,43
TE-Puffer	-0,63	-0,013	-0,033	0,38	0,61

3.1.5 Gelelektrophoretische Überprüfung der Plasmid-DNA

Die Agarosegelelektrophorese zeigte bei allen 18 Klonierungsansätzen nach Spaltung der Plasmid-DNA Banden knapp unterhalb der 100 Basenpaar-Markierungen des TrackIt 100 bp DNA-Ladder, welche das Insert verkörperten. Dies bedeutete einen einfachen Einbau des PCR-Produktes bei allen 18 Klonierungsvorgängen. Die dicke Bande über der 2072 bp Markierung stellte den restlichen Anteil der Plasmid-DNA, den Vektor, dar

(Abb. 9). Eventuell vorkommende Punktmutationen und Insertionen oder Deletionen einzelner Basen konnten durch die Gelelektrophorese nicht ausgeschlossen werden.

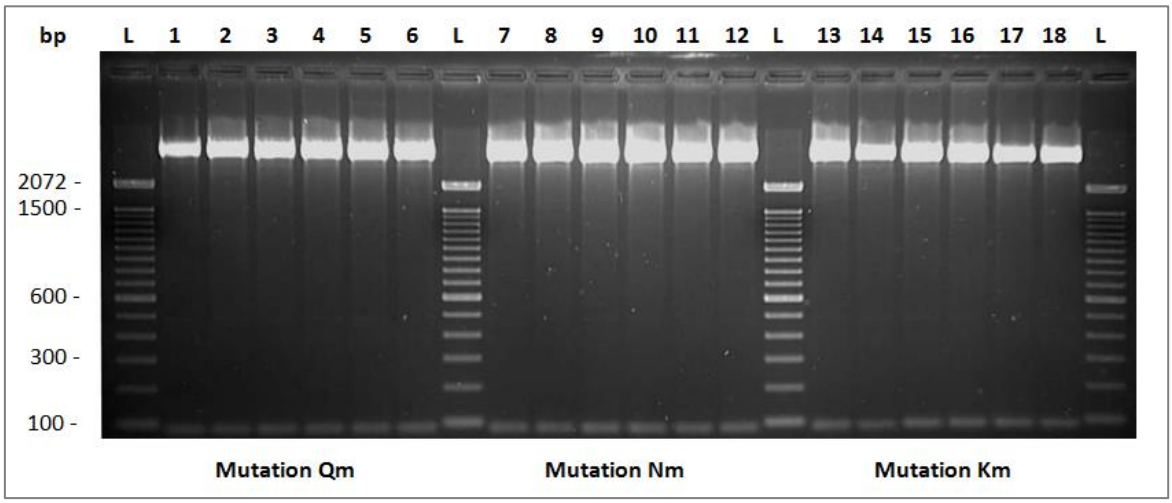

Abbildung 9: Agarose-Gelelektrophorese der isolierten und gespalteten Plasmid-Desoxyribonukleinsäure. Je *Nukleophosmin 1* (*NPM1*)-Mutationstyp (Qm, Nm, Km) wurden 6 unterschiedlichen Ansätzen pipettiert. Als Ladder (L) wurde der 100 Basenpaar (bp) TrackIt DNA-Ladder verwendet.

3.1.6 Sequenzierung des Inserts

Zum Ausschluss von Punktmutationen und Insertionen, die möglicherweise durch die Klonierung induziert wurden, erfolgte eine Sequenzierung des Inserts. Um eine höhere Genauigkeit zu erreichen, wurde sowohl vorwärts als auch rückwärts sequenziert. Bei drei Klonierungsvorgängen haben sich Mutationen ereignet (Tabelle 6). Bemerkenswerterweise liegen alle drei Mutationen innerhalb von 3 Basenpaaren im *NPM1* F‘-Primer. Anhand dieser Daten und den Konzentrationen wurden für die weitere Etablierung die Plasmide aus den Ansätzen Km6, Nm6 und Qm6 ausgewählt. Diese hatten von allen verwertbaren Ansätzen die höchsten Plasmid-Konzentrationen aufzuweisen.

Tabelle 6: Sequenzierung des Plasmid-Inserts.

Die *Nukleophosmin 1* (*NPM1*)-Mutationen der Typen Km, Nm und Qm sind mit gelber Farbe hinterlegt. Die Mutationen, die im Rahmen der Klonierung erworben wurden, sind mit roter Farbe dargestellt. Abkürzungen: G = Guanin; A = Adenin; C = Cytosin; T = Thymin; K = Überlagerung von G und T; Y = Überlagerung von C und T.

	3‘ F‘-Primer		R’-Primer 5‘
Km1	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGCCGGGCAGTGGAGGAAG
Km2	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGCCGGGCAGTGGAGGAAG
Km3	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGCCGGGCAGTGGAGGAAG
Km4	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGCCGGGCAGTGGAGGAAG
Km5	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGCCGGGCAGTGGAGGAAG
Km6	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGCCGGGCAGTGGAGGAAG
Nm1	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGCCAGGCAGTGGAGGA
Nm2	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGCCAGGCAGTGGAGGA
Nm3	GAAGAATTGCKTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGCCAGGCAGTGGAGGA
Nm4	GAAGAATTGATTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGCCAGGCAGTGGAGGA
Nm5	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGCCAGGCAGTGGAGGA
Nm6	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGCCAGGCAGTGGAGGA
Qm1	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGTCGGGCAGTGGAGGAAG
Qm2	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGTCGGGCAGTGGAGGAAG
Qm3	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGTCGGGCAGTGGAGGAAG
Qm4	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGTCGGGCAGTGGAGGAAG
Qm5	GAAGAATTGCTYCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGTCGGGCAGTGGAGGAAG
Qm6	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT	GACCAAGAGGCTATTCAAGATC	TCTGTCGGGCAGTGGAGGAAG

3.1.7 Herstellung der Plasmid-Stocks

Anhand der Plasmid-Konzentration, die mit dem Spektrophotometer bestimmt worden war, wurde das benötigte Volumen an Plasmid und Aqua ad iniectabilia zur Herstellung von Stocks mit 0,33x10^9 *NPM1*-Plasmide pro µl berechnet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Konzentrationen und Volumina zur Herstellung von Stocks mit 0,33x10^9 Plasmide/µl.

Anhand der Plasmidkonzentration, Plasmid- und Insert-Größe in Basenpaare (bp) wurde für jeden *Nukleophosmin 1* (*NPM1*) Mutationstyp die Menge an Plasmidvolumen berechnet, in der sich 0,33x10^9 Plasmide befinden. Das übrige Volumen wurde mit Aqua ad iniectabilia (A.d.) aufgefüllt

NPM1 Mutations-typ	Plasmid-Konzentration [µg/µl]	Insert-Größe [bp]	Plasmid-Größe gesamt [bp]	Volumen Plasmide [µl]	Volumen A.d. [µl]
Km	291,41	65	4021	4,5	995,5
Nm	303,10	63	4019	4,4	995,6
Qm	279,45	65	4021	4,7	995,3

3.1.8 Etablierung der RQ-PCR Standardkurven

Um eine quantitative Aussage über die Transkript-Level der *NPM1*^{mut} Proben machen zu können, wurde eine Standardreihe benötigt. Diese wurde etabliert, indem auf der RQ-PCR Reaktionsplatte absolute Plasmidmengen von 10^1 bis 10^6, hergestellt durch eine Verdünnungsreihe, aufgetragen und der dazugehörige C_T-Wert bestimmt wurde. Die Sequence Detection Software, Version 2.3 errechnete selbstständig die Parameter der Standardkurve und stellte diese graphisch im Standard Curve Plot dar. Die Software errechnete außerdem den Korrelationskoeffizient R^2, der die Exaktheit der Standardkurve angibt (Abb. 10).

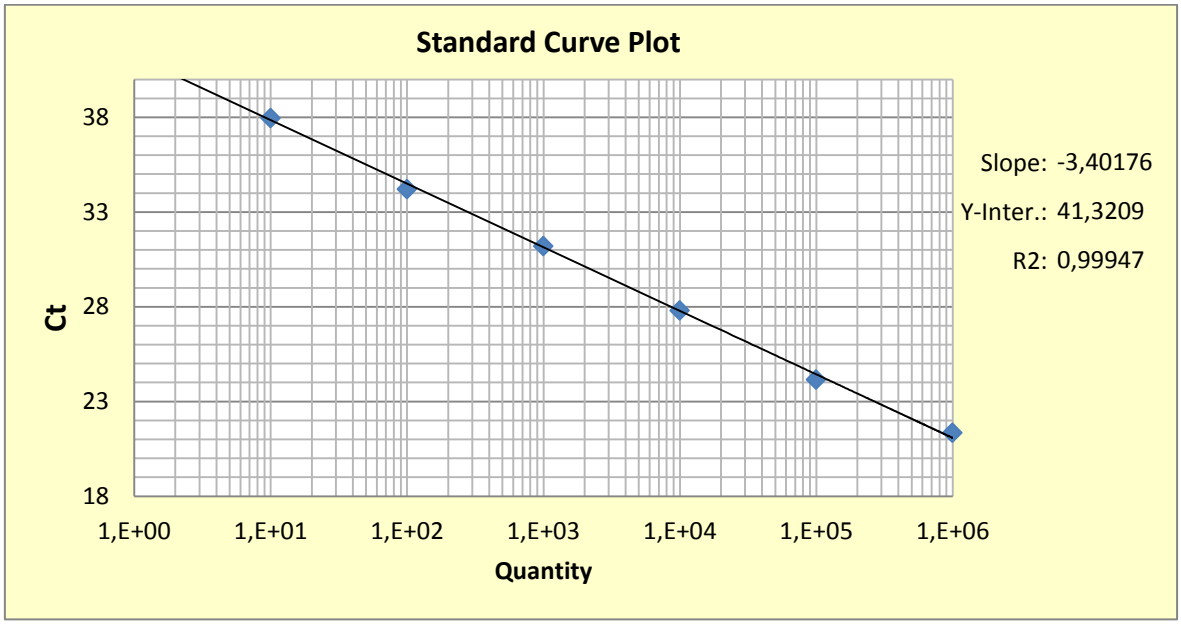

Abbildung 10: *Nukleophosmin 1* (*NPM1)*-Standardkurve bei der quantitativen Real-Time Polymerasen-Kettenreaktion (RQ-PCR).

Die Kurve wurde mit ABI PRISM™ 7900HT Sequence Detection System, Version 2.3, im Standard Curve Plot erstellt. Der C_T-Wert (Threshold Cycle) gibt die Anzahl der Zyklen an, die abgelaufen sind, um einen Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Schwelle zu erfassen. Der Y-Intercept (Y-Inter.) bezeichnet den C_T-Wert, den eine Probe mit einer absoluten Plasmidanzahl von 1 hat. Abkürzung: R^2 = Korrelationskoeffizient.

In der Tabelle 8 sind die Parameter der Standardreihen mit den hergestellten Plasmiden zusammengefasst. Der Korrelationskoeffizient R^2 lag bei allen RQ-PCR-Runs über der 0,990 Grenze, sodass alle Runs dieses Kriterium zur Auswertbarkeit erfüllten. Die mittleren R^2-Werte lagen bei 0,997, was für eine sehr gute Qualität der Standardreihe spricht. Die Effizienz (E) der PCR wurde anhand der Steigung (S) mit folgender Formel errechnet:

$$E = 10^{\frac{-1}{S}} - 1$$

Bei allen Runs lag die Effizienz zwischen 90% und 110% mit einem durchschnittlichen Wert bei Km von 98,37%, Nm 97,52% und Qm 96,82%. Dies bedeutet bei allen Mutationstypen eine sehr gut abgelaufene Amplifikationsreaktion mit einer annähernden Verdopplung der Amplikate pro Zyklus.

Tabelle 8: Vergleich der Parameter der mutationsspezifischen Standardreihen.

Aufgeführt sind alle bisher durchgeführten Runs mit den *Nukleophosmin 1* (*NPM1*)-Mutationstypen Km, Nm und Qm und die Durchschnittswerte der etablierten Mutationstypen A und B und des Haushaltsgens *Abelson murine leukemia virus oncogene* (*ABL*). Der Y-Intercept, Slope und Korrelationskoeffizient R^2 wurden durch das ABI PRISM™ 7900HT Sequence Detection System bestimmt. Die Effizienz der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) wurde aus diesen Werten berechnet.

Km	**Run 1**	**Run 2**	**Run 3**	**Run 4**	**Run 5**	**Mittelwert**
Slope	-3,2889476	-3,4270742	-3,3685575			**3,36152643**
Y-Intercept	39,685177	40,362545	38,454178			**39,5006333**
R^2	0,99780846	0,99872226	0,99660563			**0,99771212**
PCR-Effizienz	101,39%	95,79%	98,09%			**98,37%**
Nm						
Slope	-3,3938022	-3,4438407	-3,325093	-3,412036	-3,339392	**3,38283292**
Y-Intercept	40,806828	41,318237	40,96318	41,083546	40,76087	**40,9865322**
R^2	0,99817264	0,9966904	0,9987089	0,99613506	0,9981052	**0,99756244**
PCR-Effizienz	97,09%	95,15%	99,87%	96,37%	99,28%	**97,52%**
Qm						
Slope	-3,563973	-3,3081045	-3,4017603	-3,328723		**-3,4006402**
Y-Intercept	40,87875	39,315502	41,320984	39,262196		**40,194358**
R^2	0,99221677	0,998824	0,9994758	0,9982169		**0,99718337**
PCR-Effizienz	90,80%	100,58%	96,77%	99,72%		**96,82%**

Mutation	**A**	**B**	***ABL***
Slope	-3,4622643	-3,3910289	-3,6110905
Y-Intercept	41,7737126	40,6399395	42,7792615
R^2	0,99629589	0,9950525	0,9943079
PCR-Effizienz	**94,46%**	**97,19%**	**89,20%**

3.1.9 Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität der RQ-PCR für die *NPM1*-Mutationstypen Nm, Km und Qm wurde anhand einer Verdünnungsreihe berechnet. Dazu wurde Patienten-RNA mit dem jeweiligen Mutationstyp mit RNA aus der *NPM1*^{wt} Zelllinie HL60 verdünnt. Es wurden Verdünnungen bis zu einer Konzentration von 10^{-7} hergestellt. Außerdem wurde zur nochmaligen Überprüfung der Spezifität der Assays auch eine HL60-Probe mit den mutationsspezifischen R'-Primern gemessen. Tabelle 9 zeigt das *NPM1* Transkript-Level bei den verschiedenen Verdünnungsstufen. Die Sensitivität des jeweiligen Mutationstyps stellt die letzte Reduktion des Transkript-Levels um annährend den Faktor 10 dar. Bei den Mutationstypen Km und Qm konnte auf diese Weise eine Sensitivität von 10^{-5} ermittelt werden.

Tabelle 9: Sensitivitätsmessung der neu etablierten quantitativen Real-Time Polymerasen-Kettenreaktion (RQ-PCR)-Assays.

Das *Nukleophosmin 1* Transkript-Level wurde im Verhältnis zu 10^4 Transkripte des Haushaltgens *Abelson murine leukemia virus oncogene* (*ABL*) berechnet. Die HL60 Zelllinie weist einen *NPM1* Wild-Typ auf. Neben dem Diagnosematerial von Patienten mit *NPM1*^{mut} akuter myeloischer Leukämie, der HL60 Zelllinien, wurden die *NPM1*^{mut} Transkript-Level bei den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-7} gemessen.

	Nm	Km	Qm
Diagnosematerial	1.218.051	331.346	348.258
10^{-1}	55.812	15.318	21.501
10^{-2}	6.247	2.223	3.316
10^{-3}	1.359	574	771
10^{-4}	121	20	60
10^{-5}	35	3	7
10^{-6}	12	1	2
10^{-7}	12	0	1
HL60	6	0	0
Sensitivität	(10^{-5})	10^{-5}	10^{-5}

Die Sensitivität ist von der Qualität des Patientenmaterials, zum Beispiel von der RNA-Konzentration, abhängig. Aus diesem Grund kann die erreichbare Sensitivität in minderwertigen Proben sich von der hier errechneten unterscheiden. Die Assays der Mutationstypen Km und Qm waren sehr spezifisch, der C_T -Wert der *NPM1*^{wt} Zelllinie lag für diese beiden Mutationstypen oberhalb der quantitativen Spanne (C_T > 45). Bei dem Mutationstyp Nm lag der C_T -Wert bei 38, was für eine nicht 100% ige Spezifität des R'-Primers spricht.

Tabelle 10: Vergleich der Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Assays.

Die Sensitivität und Spezifität wurde mit der quantitativen Real-Time Polymerasen-Kettenreaktion (RQ-PCR) bestimmt. Der Threshold Cycle (C_T) stellte die Anzahl der abgelaufen Zyklen der RQ-PCR dar, bis das Fluoreszenzsignal erstmalig die voreingestellte Schwelle überschritten hat. Die Sensitivität des *Nukleophosmin 1* (*NPM1*) Mutationstyps Nm konnte nicht exakt bestimmt werden, da der Reverse-Primer nicht mutationsspezifisch ist.

***NPM1*-Mutationstyp**	**Sensitivität**	**Spezifität**
Nm	(10^{-5})	$C_T = 38$
Km	10^{-5}	$C_T > 50$
Qm	10^{-5}	$C_T > 45$
A	10^{-6}	$C_T > 50$
B	10^{-6}	$C_T > 45$
D	10^{-6}	$C_T > 50$

3.2 *NPM1*^{mut} Transkript-Level bei Diagnose und Rezidiv

Rezidive stellen ein für die Prognose entscheidendes Kriterium dar, deshalb ist ein gutes Verständnis des Ablaufes und die richtige Interpretation der MRD-Werte entscheidend. Aus diesem Grund wurden 42 *NPM1*^{mut} AML-Patienten, die ein Rezidiv erlitten hatten, untersucht, bei denen sowohl bei Diagnosestellung als auch zum Zeitpunkt des Rezidivs ein *NPM1*^{mut} Transkript-Level aus KM-Material zur Verfügung stand. Insgesamt wurden 259 KM-Proben untersucht, bei einer mittleren Probenzahl pro Patient von 6,2, einem

Minimum von 2 und Maximum von 14 Proben. 32 der 42 Patienten waren in der AMLSG 07-04 und 10 Patienten in der AML HD98A Studie eingeschlossen. Das *NPM1*^{mut} Transkript-Level wird im Folgenden immer im Verhältnis zu 10^4 *ABL* Transkripten dargestellt. Der Median der Transkript-Level zum Zeitpunkt der Diagnose (n=42) lag bei 625.306 mit einem maximalen Level von 10.126.291 und einen minimalen Level von 114.894. Zum Zeitpunkt des Rezidivs waren 6 der 42 Patienten (14%) RQ-PCR negativ. Bei diesen Patienten konnte auch mit dem diagnostischen DNA-Assay keine *NPM1*^{mut} im Rezidivmaterial nachgewiesen werden. Bei den Rezidiven mit Nachweis der *NPM1*^{mut} lag das mediane Transkript-Level (n=36) bei 1.000.287 mit einem maximalen Level von 3.729.080 und einen minimalen Level von 125.219. Sowohl bei Diagnosestellung als auch beim Rezidiv lagen die *NPM1*^{mut} Transkript-Level somit zwischen 10^5 und 10^7. Die *NPM1*^{mut} Transkript-Level im Rezidiv variierten bei 32 (89%) der Patienten maximal um den Faktor 10 verglichen mit dem Level bei Diagnosestellung, bei 2 (6%) Patienten lag das Level um mehr als das 10fache über, bei weiteren 2 (6%) um mehr als das 10fache unter dem Transkript-Level bei Diagnosestellung (Abb. 11). Die medianen Werte der *NPM1*^{mut} Transkript-Level variierten zwischen beiden Zeitpunkten sogar nur um den Faktor 2.

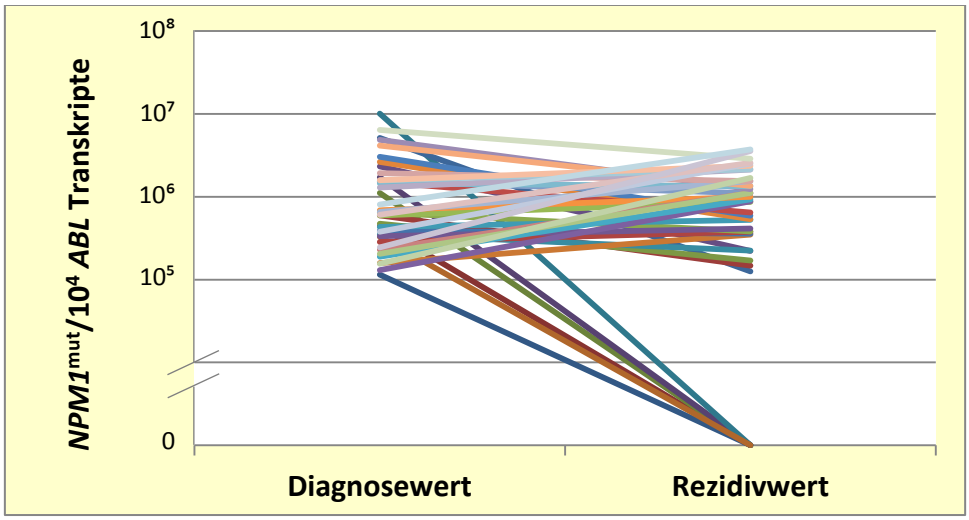

Abbildung 11: Vergleich der Transkript-Level zwischen Diagnose und Rezidiv.

Das mutierte *Nukleophosmin 1* (*NPM1*^{mut}) Transkript-Level wurde von 42 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) bestimmt. Die Patienten waren in zwei Behandlungsprotokolle der Deutsch-Österreichischen Studiengruppe AML (AMLSG) für jüngere Erwachsene mit dem Alter von 18 bis 60 Jahren eingeschlossen, AML HD98A (n=10) und AMLSG 07-04 (n=32), und wurden im Universitätsklinikum Ulm und anderen teilnehmenden Zentren behandelt. Abkürzung: *ABL = Abelson murine leukemia virus oncogene.*

3.3 Definition eines Schwellenwertes für die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit während der Nachbeobachtungsphase

Um das Risiko eines Rezidivs während der Nachbeobachtungsphase (Follow-up) zu bestimmen und dieses möglicherweise vor seiner hämatologischen Manifestation vorhersagen zu können, wurden die *NPM1*^{mut} Transkript-Level im Verlauf untersucht. Dazu wurden 392 KM-Proben, die nach Abschluss der Therapie entnommen wurden, von insgesamt 136 Patienten ausgewertet. Bei 69 (51%) der 136 Patienten war mindestens eine KM-Probe während der Follow-up Periode RQ-PCR positiv. Von diesen Patienten bekamen 43 (62%) ein Rezidiv, wohingegen die übrigen 26 (38%) Patienten in anhaltender CR verblieben (mediane Follow-up Zeit nach einer positiven Probe: 24,8 Monate; Minimum 1,8, Maximum 80,5 Monate).

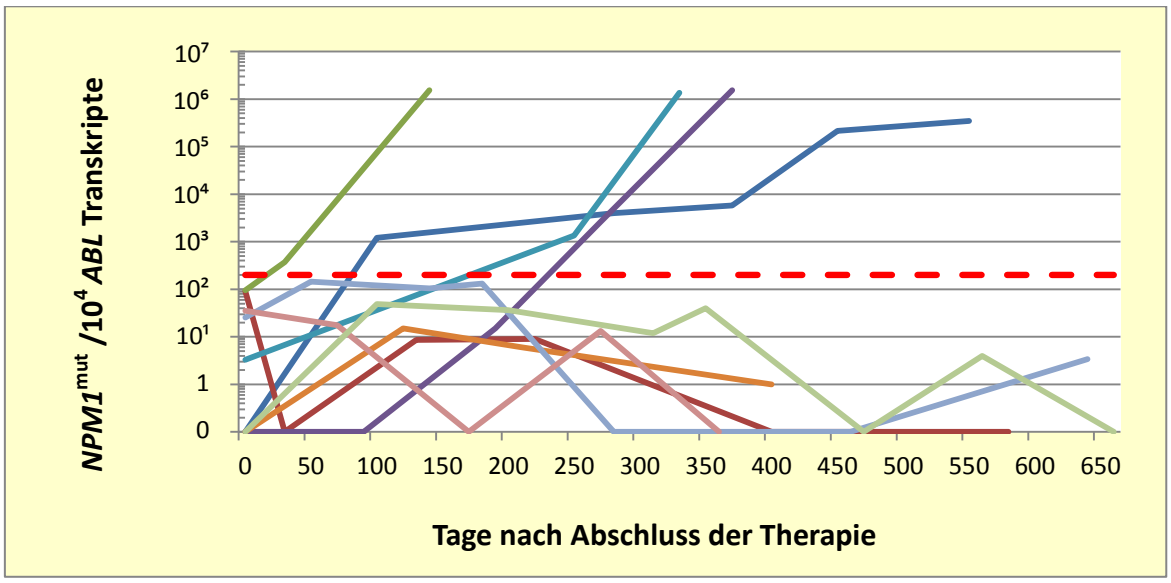

Abbildung 12: Verläufe der minimalen Resterkrankung (MRD).

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Verläufe von nur 9 der insgesamt 136 verfügbaren Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) mit mutiertem *Nukleophosmin 1* (*NPM1*^{mut}) dargestellt. Die Patienten wurden im Zentrum Ulm und anderen teilnehmenden Kliniken im Rahmen der Behandlungsprotokolle AML HD98A und AMLSG 07-04 der Deutsch-Österreichischen Studiengruppe AML (AMLSG) behandelt. Die rote gestrichelte Linie gibt die Höhe des Cut-offs bei 200 *NPM1*^{mut}/10^4 *ABL* Transkripten wider. Abkürzung: *ABL* = *Abelson murine leukemia virus oncogene.*

Bei diesen 26 Patienten war das *NPM1*^{mut} Transkript-Level zu allen gemessenen Zeitpunkten unter 145 *NPM1*^{mut}/10^4 *ABL* Transkripte und 15 der 26 (58%) Patienten wurden in darauf folgenden Proben RQ-PCR negativ. Die möglichen MRD-Verläufe wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit beispielhaft anhand 9 Patienten in Abb. 12 skizziert.

Bei 5 der 43 (12%) Patienten mit Rezidiv konnte zum Rezidivzeitpunkt kein oder ein nur minimales *NPM1*^{mut} Transkript-Level detektiert werden, 2 weitere Patienten wurden aufgrund fehlender Daten exkludiert. Die übrigen 36 Patienten, die alle mindestens eine KM-Probe über einem arbiträr gewählten Schwellenwert von 200 *NPM1*^{mut}/10^4 *ABL* Transkripte vorweisen konnten, rezidivierten (Abb. 13). Diese Kohorte mit den *NPM1*^{mut} AML-Patienten mit Rezidiv überschneidet sich mit der in Kapitel 3.2 definierten Kohorte, entspricht ihr aber nicht vollständig.

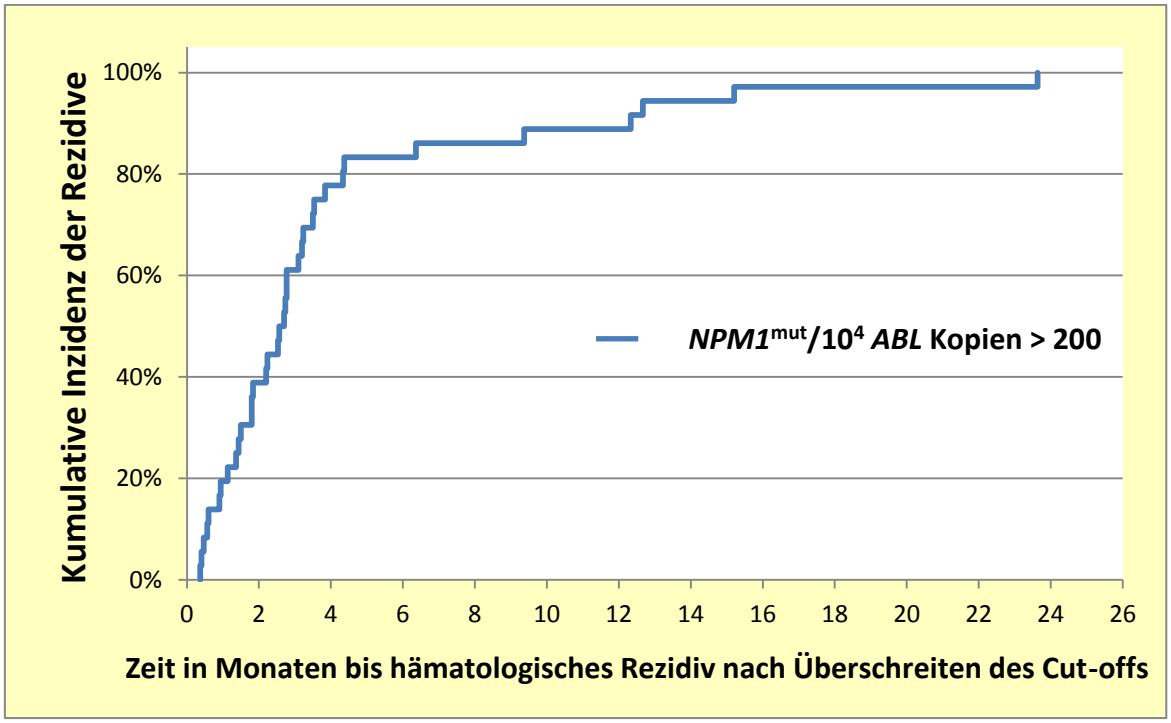

Abbildung 13: Kumulative Inzidenz der Rezidive während des Follow-ups.

Es wurden 36 Patienten der Behandlungsprotokolle AML HD98A und AMLSG 07-04 mit akuter myeloischer Leukämie (AML) mit mutiertem *NPM1* in diese Berechnungen eingeschlossen, bei denen mindestens eine Probe im Follow-up über dem Cut-off von 200 *NPM1*^{mut} Transkripte im Verhältnis zu 10^4 Transkripte des Haushaltgens *Abelson murine leukemia virus oncogene* (*ABL*) lag.

Die mediane Zeit zwischen dem Überschreiten des oben beschriebenen Schwellenwertes, was als molekulares Rezidiv (MR) definiert wurde, bis zum klinisch, hämatologischen Rezidiv (HR) lag bei 2,6 Monaten mit einer breiten Spannweite von 0,4 bis 23,6 Monaten. Patienten mit einer *FLT3*-ITD Mutation hatten eine signifikant schnellere Rezidivkinetik. So betrug die mediane Zeit zwischen MR und HR bei diesen Patienten 1,4 Monate, bei Patienten ohne diese Mutation dagegen 3,2 Monate (p=0,036). Der Zeitraum, in der eine Detektion vor der hämatologischen Erscheinung möglich war, war damit bei Patienten mit einer *FLT3*-ITD Mutation deutlich kürzer (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zeitspanne zwischen molekularen Rezidiv (MR) und hämatologischen Rezidiv (HR).

In die Berechnung wurde 36 Patienten der Behandlungsprotokolle AML HD98A und AMLSG 07-04 mit akuter myeloischer Leukämie (AML) mit mutiertem *Nukleophosmin 1* (*NPM1*^{mut}) einbezogen. Das MR wurde als Überschreiten des Schwellenwertes von 200 *NPM1*^{mut}/10^4 *Abelson murine leukemia virus oncogene* (*ABL*) Transkripte im Follow-up definiert. Abkürzungen: *FLT3*-ITD = *FMS-like tyrosine kinase 3* mit internen Tandemduplikationen.

Zeit zwischen MR und HR (in Monaten)	Alle Patienten (n=36)	*FLT3*-ITD (n=15)	*FLT3*-Wild Typ (n=21)
Median	2,6	1,4	3,2
Minimum	0,4	0,4	0,4
Maximum	23,6	12,3	23,6

3.4 Bestimmung eines optimalen Probenintervallabstandes im Follow-up

Zur Berechnung des Zeitpunktes, an dem ein Rezidiv frühzeitig mithilfe der MRD erkennbar ist, wurden KM-Proben von insgesamt 27 Patienten untersucht, von denen alle benötigten Daten vorhanden waren und die im Follow-up ein *NPM1*^{mut} positives Rezidiv erlitten hatten. Von diesen 27 Patienten wiesen 10 (37%) Patienten eine *FLT3*-ITD Mutation auf, die übrigen 17 (63%) dagegen waren *FLT3*-ITD negativ. Die erste Probe (n=22) im Follow-up, die oberhalb des zuvor beschriebenen Schwellenwertes lag, aber nicht das HR darstellte, hatte ein medianes Transkript-Level von 5.985 (Minimum 298,

Maximum 795.082). Zur Berechnung, wie viele Rezidive bei einem festgelegten Probenintervall erkannt werden können, wurde das von Ommen et al. 2008 beschriebene Verfahren angewendet, das die intra- und interindividuell unterschiedlichen Probenintervallabstände in die Berechnungen mit einbezieht.

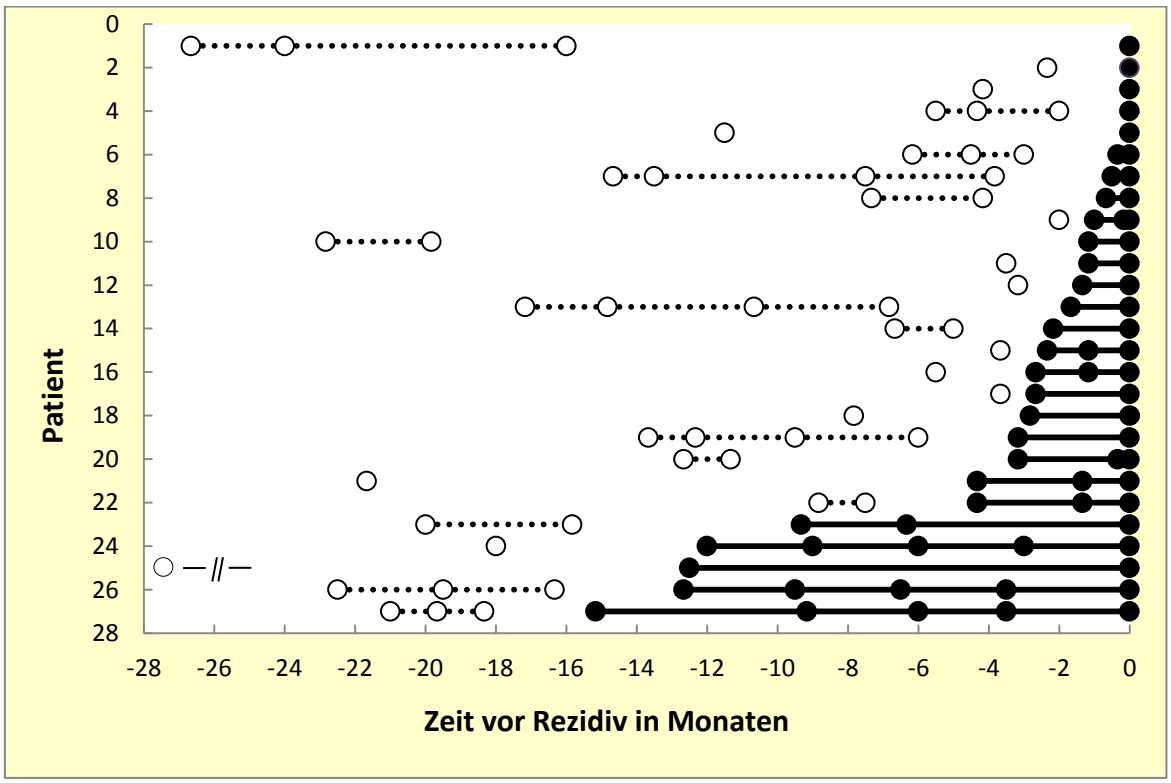

Abbildung 14: Verfügbare Follow-up-Proben (n=111) von 27 Patienten.

Alle Patienten hatten eine akute myeloische Leukämie mit mutiertem *Nukleophosmin 1* und wurden im Rahmen der Behandlungsprotokolle AML HD98A und AMLSG 07-04 therapiert. Weiße Punkte bedeuten gemessene Proben, die unterhalb, schwarze Punkte, die oberhalb des Schwellenwerts von 200 $NPM1^{mut}$ Transkripte im Verhältnis zu 10^4 Transkripte des Haushaltgens *Abelson murine leukemia virus oncogene* (*ABL*) lagen. Nach dem von Ommen et al. 2008 etablierten Verfahren wird der Zeitraum, der mit einer gestrichelter Linie dargestellt ist, als durchgehend negativ, der mit einer durchgezogenen Linie, als durchgehend positiv und der Zeitraum ohne Linie, als unbekannt betrachtet (Ommen et al. 2008).

Bei diesem Verfahren wird angenommen, dass zu jedem Zeitpunkt zwischen zwei oberhalb des Schwellenwertes liegenden Proben (positive Proben), die nicht gemessenen Proben auch darüber liegen würden. Vice versa wird angenommen, dass zwischen zwei negativen Proben (unterhalb des Schwellenwertes liegend) alle weiteren Proben ebenfalls negativ wären. Der Zeitraum zwischen einer negativen und positiven Probe wird als

unbekannt angesehen (Abb. 14) (Ommen et al. 2008). Diese Zeitspanne hatte einen Median von 2,8 Monaten mit einem Minimum von 0,9 und einem Maximum von 23,7 Monaten. Die breite Spannweite spiegelt die inhomogenen Probenintervallabstände der einzelnen Patienten wider.

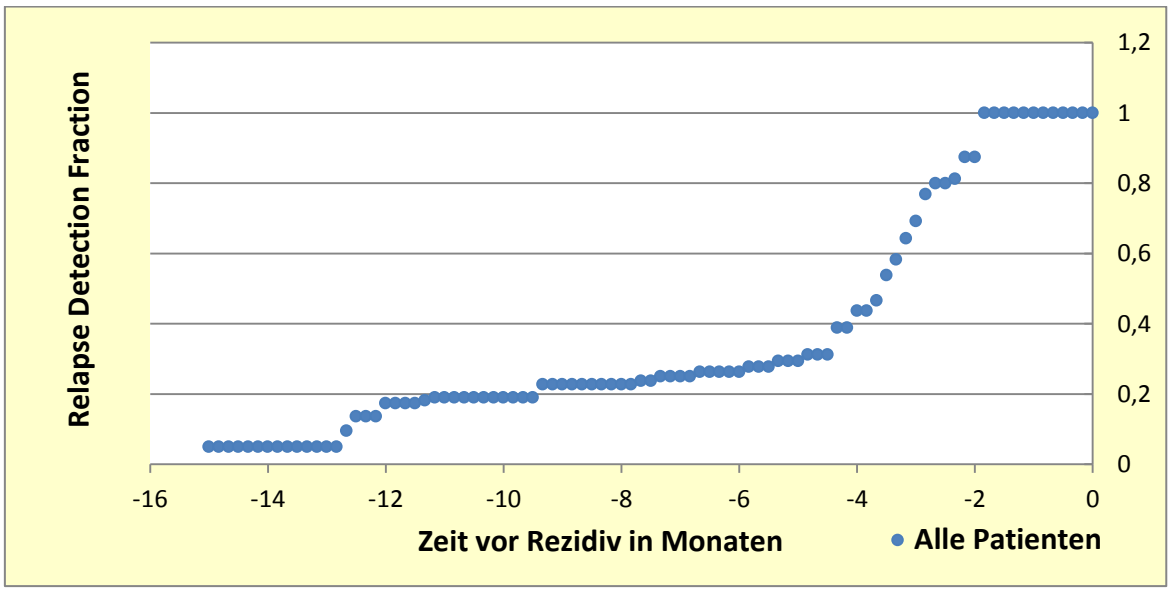

Abbildung 15: Berechnete Fraktionen der detektierten, molekularen Rezidive nach Ommen et al. 2008.
Für die Berechnung wurden die in Abbildung 14 dargestellten Follow-up Knochenmark-Proben von 27 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) mit mutiertem *Nukleophosmin 1* aus den Behandlungsprotokollen AML HD98A und AMLSG 07-04 herangezogen.

Die Fraktionen der sicher positiven Patienten gegenüber allen Patienten, deren Status zu diesem Zeitpunkt bekannt ist, wurden in einem 5 Tage Intervall über die Zeit graphisch aufgetragen (Abb. 15) und daraus eine Funktion (Polynom 6. Grades) mit Hilfe des Programmes MATLAB von The MathWorks berechnet (Abb. 16 A). Mithilfe dieses Polynoms ließ sich der Intervallabstand der Follow-up Proben bei einer beliebigen Relapse Detection Fraction (RDF) errechnen (Abb. 16 B). In dieser Kohorte mit den inter- und intraindividuell unterschiedlichen Probenintervallabständen konnten retrospektiv gesehen 3 Monate vor dem hämatologischen Rezidiv 66% der Rezidive vorhergesagt werden. Bei *FLT3*^{wt} Patienten lag das *NPM1*^{mut} Transkript-Level von 75% der Patienten oberhalb des Schwellenwerts, so dass ein Rezidiv prognostiziert werden konnte. Dagegen kündigten sich in der Kohorte der Patienten mit *FLT3*-ITD nur 48% der Rezidive zu diesem Zeitpunkt durch eine Überschreitung des Schwellenwertes an (Abb. 16 A).

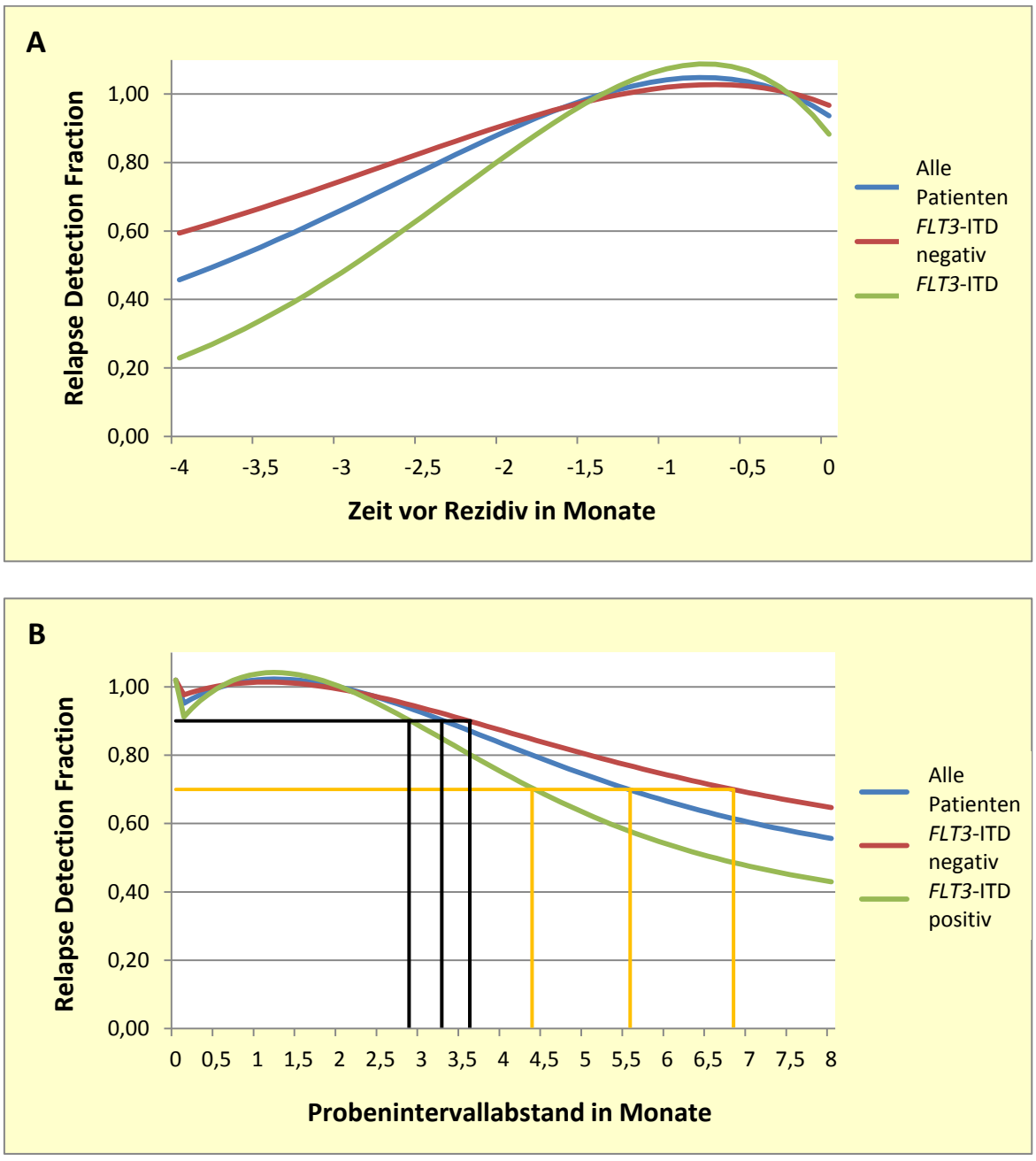

Abbildung 16: Polynome der Relapse Detection Fraction nach Ommen et al. 2008.

A: Mithilfe des Software-Programmes MATLAB von The MathWorks wurden die Fraktionen der sicher positiven Patienten gegenüber allen Patienten, deren Status zu diesem Zeitpunkt bekannt ist (Abb. 15) in einem Polynom 6. Grades dargestellt. Die Patienten (n=27) hatten alle eine akute myeloische Leukämie (AML) mit mutiertem *Nukleophosmin 1* und wurden nach den Behandlungsprotokollen AML HD98A und AMLSG 07-04 behandelt.

B: Aus diesen Polynomen wurden Aufleitungsfunktionen erstellt. Die Schnittpunkte mit der schwarzen horizontalen Linie geben das Probenintervall in Monaten bei einer Relapse Detection Fraction (RDF) von 0,9, die Schnittpunkte mit der orangenen Linie bei einer RDF von 0,7 wider.

Abkürzung: *FLT3*-ITD = *FMS-like tyrosine kinase 3* mit internen Tandemduplikationen.

Für die klinische Anwendung ist es bedeutend, ein sinnvolles Probenintervall zu bestimmen, bei dem die meisten Rezidive vorhergesagt werden können. Diese Intervalle konnten nach Ommen et al. 2008 mithilfe der Aufleitungsfunktionen errechnet werden (Ommen et al. 2008). Um in zukünftigen Studien eine RDF von ungefähr 90% erreichen zu können, muss nach diesen Daten alle 3 Monate im Follow-up KM-Material auf MRD untersucht werden. Hierbei konnte ein nur kleiner Unterschied zwischen Patienten mit beziehungsweise ohne *FLT3*-ITD festgestellt werden (Tabelle 12). Außerdem konnte berechnet werden, wie viel Zeit im Median von der Detektion des molekularen Rezidivs bis zum hämatologischen Ausbruch (t_m) der Erkrankung verstreicht. Die klinische Bedeutung liegt darin, dass in diesem Zeitraum das Rezidiv durch eine mögliche präemptive Therapie behandelt werden kann. Wie das Probenintervall ist auch die t_m abhängig von einer gewählten RDF. Für die gesamte Kohorte konnte bei einer RDF von ca. 90% eine t_m von 77 Tagen errechnet werden. Bei Patienten, die keine *FLT3*-ITD Mutation vorwiesen, lag t_m bei 113 Tagen und damit um 60 Tagen höher als bei Patienten mit einer *FLT3*-ITD Mutation.

Tabelle 12: Vergleich des errechneten Probenintervallabstandes bei einer Relapse Detection Fraction (RDF) von 90% und 70%.

RDF, das errechnete Probenintervall und die mediane Zeit von der Detektion des molekularen Rezidivs bis zum hämatologischen Rezidiv (t_m) wurde anhand von 27 Patienten aus den Behandlungsprotokollen AML HD98A und AMLSG 07-04 mit akuter myeloischer Leukämie (AML) mit mutiertem *Nukleophosmin 1* errechnet. Abkürzung: *FLT3*-ITD = *FMS-like tyrosine kinase 3* mit internen Tandemduplikationen.

	Alle Patienten (n=27)	***FLT3*-ITD (n=10)**	***FLT3*-Wild Typ (n=17)**
RDF	87,96%	88,24%	90,54%
Probenintervall	3,5 Monate	3 Monate	3,5 Monate
t_m	77 Tage	53 Tage	113 Tage
RDF	70,90%	68,57%	69,01%
Probenintervall	5,5 Monate	4,5 Monate	7 Monate
t_m	81 Tage	50 Tage	131 Tage

3.5 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analyse

3.5.1 Charakterisierung der Patienten

Zur weiteren Charakterisierung der rezidivierten *NPM1*^{mut} AML wurde eine Kohorte von Patienten in den Fokus genommen, von denen sowohl zur Diagnosestellung als auch zum Zeitpunkt des Rezidivs eine Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analyse (SNP Array 6.0 Affymetrix) vorlag. Insgesamt wurden 42 Patienten mit *NPM1*^{mut} AML bezüglich genetischer Aberrationen untersucht. 32 der 42 Patienten waren in der AMLSG 07-04 und 10 Patienten in der AML HD98A Studie eingeschlossen. In dieser Kohorte war der Mutationstyp A mit 81% der häufigste, gefolgt von Typ B (12%), Typ D (5%) und Jt (2%). Eine zusätzliche *FLT3*-ITD Mutation wurde bei 15 Patienten (36%) gefunden. Nach der ersten Induktionstherapie erreichten 29 Patienten (69%) eine komplette Remission (CR), 12 (29%) eine partielle Remission (PR) und 1 Patient (2%) war refraktär (RD). Die Anzahl der Patienten mit CR erhöhte sich nach dem zweiten Induktionszyklus auf 40 (95%), 1 Patient rezidivierte und 1 Patient war refraktär. Eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (Allo-SCT) wurde bei 3 (7%) Patienten in erster CR durchgeführt.

3.5.2 Veränderung des Karyotyps von Diagnose zum Rezidiv

Mit Hilfe der SNP Analyse wurde die klonale Evolution bei diesen 42 Patienten untersucht. Der *NPM1* Status wurde bei allen Patienten zum Zeitpunkt des Rezidivs nochmals überprüft. Bei 6 der 42 (14%) Patienten konnte zu diesem Zeitpunkt keine *NPM1* Mutation mehr nachgewiesen werden. Bei den restlichen Patienten (n=36) wurde dieselbe *NPM1* Mutation wie bei Diagnosestellung gefunden. Mithilfe des SNP Arrays konnten bei 13 Patienten (31%) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Aberrationen nachgewiesen werden, davon hatten 11 (26%) Patienten eine und 2 (5%) Patienten zwei Aberrationen. Die insgesamt 15 detektierten Aberrationen beinhalteten 9 somatische Copy Number Alterations (CNAs) (Amplifikationen n=2, Deletionen (del) n=7) und 6 uniparentale Disomien (UPDs) (Abb. 17). Als häufigste Aberrationen konnten del9q21 (5 von 15 (33%) Aberrationen) und UPD13q (4 von 15 (27%) Aberrationen) identifiziert

werden (Tabelle 13). Ein Patient (Nr. 2 Tabelle 14) hatte einen 47,XYY Karyotyp, der sowohl bei Diagnosestellung und zum Zeitpunkt des Rezidivs als auch in der Keimbahn präsent war und deshalb keine AML bedingte Aberration darstellte.

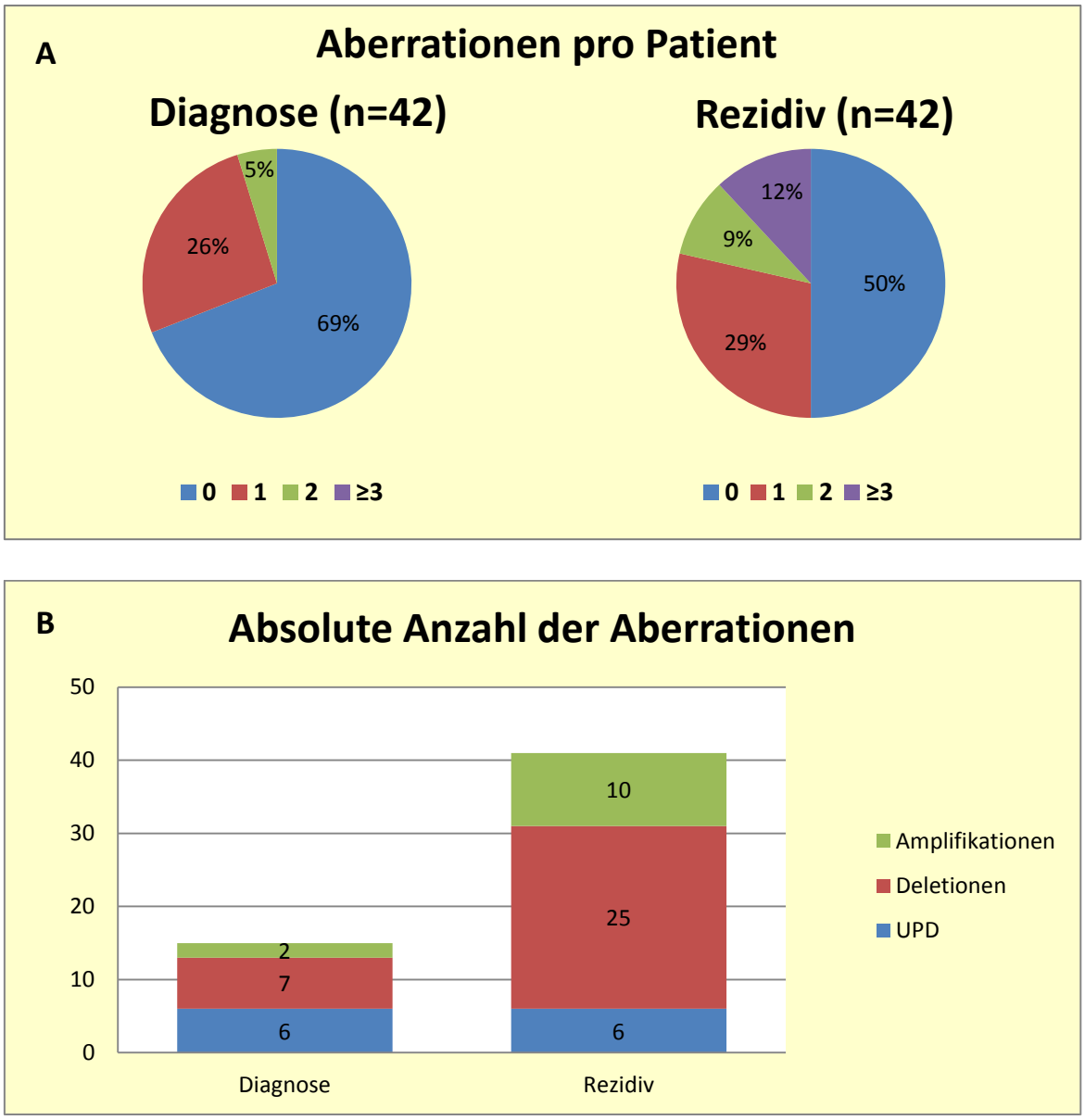

Abbildung 17: Relative (A) und absolute (B) Anzahl an Aberrationen.

In die Untersuchung waren 42 Patienten aus den Behandlungsprotokollen AML HD98A und AMLSG 07-04 mit akuter myeloischer Leukämie (AML) mit mutiertem *Nukleophosmin 1* eingeschlossen. Die Aberrationen wurden mithilfe durch Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysen (SNP Array 6.0 Affymetrix) nachgewiesen. Abkürzungen: UPD = uniparentale Disomie.

Zum Zeitpunkt des Rezidivs konnten bei 21 (50%) Patienten insgesamt 41 Aberrationen detektiert werden. Darunter befanden sich 35 somatische CNAs (Amplifikationen n=10, Deletionen n=25) und 6 UPDs. 12 (29%) Patienten hatte eine, 4 (10%) Patienten hatten zwei und 5 (12%) Patienten drei oder mehr Aberrationen. Damit erhöhte sich die durchschnittliche Anzahl der Aberrationen pro Patient von 0,36 bei Diagnosestellung auf 0,98 bei Rezidiv (Verbundener T-Test: p=0,015).

Tabelle 13. Rekurrente Aberrationen bei Diagnosestellung und Rezidiv.

In die Untersuchung waren 42 Patienten aus den Behandlungsprotokollen AML HD98A und AMLSG 07-04 mit akuter myeloischer Leukämie (AML) mit mutiertem *Nukleophosmin 1* eingeschlossen. Die Aberrationen wurden mithilfe durch Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysen (SNP Array 6.0 Affymetrix) nachgewiesen. Abkürzungen: *HNPRK = Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*; *NTRK2 = Neurotrophic tyrosine receptor kinase 2*; *FLT3 = FMS-like tyrosine kinase 3; MLL = Mixed-lineage leukemia*; *ETV6 = ETS variant gene 6*; *WT1 = Wilms-Tumorsuppressorgen 1*; *NF1 = Neurofibromatose Typ 1*; *TP53 = Tumorsuppressorgen p53*.

Aberration	Gen	Diagnose	Verlust	Gewinn	Rezidiv
Del 9q21	*HNPRK, NTRK2*	5	-3		2
UPD13q	*FLT3*	4	-1	+3	6
UPD1	?	1	-1		0
Sonstige Aberrationen		5	-3		2
Gain 11q23.3	*MLL*	0		+3	3
Del 12p	*ETV6*	0		+3	3
Del 11p13	*WT1*	0		+2	2
Del 17q11.2	*NF1*	0		+2	2
Del 17p	*TP53*	0		+1	1
Trisomie 5	?	0		+1	1
Monosomie 7	?	0		+1	1
Sonstige Aberrationen		0		+16	16
Insgesamt		15	-8	+32	39

Zum Zeitpunkt des Rezidivs war UPD13q (6 von 41 (15%) Aberrationen) die häufigste Aberration, gefolgt von del12p und gain11q23.3 (jeweils 3 von 41 (7%) Aberrationen) und del9q21, del11p13 und del17q11.2 (jeweils 2 von 41 (5%) Aberrationen). 23 der insgesamt 31 (74%) unterschiedlichen Aberrationen fanden sich ausschließlich in Rezidivproben (Tabelle 13).

20 (48%) Patienten hatten bei Diagnose und bei Rezidiv denselben SNP-Karyotyp. 12 (29%) Patienten mit normalen Karyotyp bei Diagnosestellung erwarben beim Rezidiv neue Aberrationen. Dagegen verloren 4 (10%) Patienten die bei Diagnosestellung nachgewiesenen Aberrationen zum Zeitpunkt des Rezidivs. 3 (7%) Patienten mit aberrantem Karyotyp bei Diagnose gewannen neue Veränderungen hinzu und 3 (7%) Patienten hatten beim Rezidiv einen vollständig anderen Karyotyp als bei Diagnose. Die Aberration del 9q21 verloren 3 Patienten. UPD13q konnte bei einem Patient weniger nachgewiesen werden, aber 3 andere Patienten gewannen diese Aberration hinzu. Je dreimal wurden die Aberrationen del12p und gain11q23.3, je zweimal die Aberrationen del9q21, del11p13 und del17q11.2 zum Rezidiv erworben (Tabelle 13).

Die 6 Patienten, bei denen im Rezidiv keine *NPM1* Mutation mehr nachweisbar war, hatten ein medianes rezidivfreies Überleben (RFS) von 31,9 Monaten (Maximum 110 Monate, Minimum 2,7 Monate). Zwei der 6 Patienten (Nr. 4 und 5 aus Tabelle 14) rezidivierten innerhalb der ersten 7 Monaten, die übrigen 4 zwischen 2 und 9 Jahren. Die Patienten mit nachweisbarer *NPM1* Mutation im Rezidiv hatten dagegen ein medianes RFS von nur 9,3 Monaten. Hier lagen das Minimum des RFS bei 3 Monaten und das Maximum bei 4,7 Jahren. Bei näherer Untersuchung der bei Rezidiv *NPM1 Wild-Typ* Patienten fiel auf, dass bei 3 der 6 (50%) Patienten (Nr. 1, 2 und 3 aus Tabelle 14) vollkommen andere Aberrationen zum Zeitpunkt des Rezidivs als zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nachweisbar waren. Außerdem erwarben alle 3 Patienten im Rezidiv die Aberration +11q23.3. 2 (33%) der 6 Patienten (Nr. 4 und 5 aus Tabelle 14) hatten weder bei Diagnosestellung noch im Rezidiv in der SNP-Analyse nachweisbare Veränderungen. 1 (17%) Patient (Nr. 6 aus Tabelle 14) hatte bei Diagnosestellungen einen normalen SNP-Karyotyp und verlor zum Zeitpunkt des Rezidivs das Chromosom 7.

Tabelle 14: Vergleich der Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Arrays bei Diagnosestellung und Rezidiv. Dargestellt sind 42 Patienten aus den Behandlungsprotokollen AML HD98A und AMLSG 07-04 mit akuter myeloischer Leukämie (AML) mit bei Diagnosestellung mutiertem *Nukleophosmin 1* (*NPM1*), von denen ein SNP Array (SNP array 6.0 Affymetrix) zu beiden Zeitpunkten verfügbar war. Mit roter Schrift sind die im Rezidiv neu aufgetreten Mutationen markiert. Abkürzungen: Nr. = Nummer.

Nr.	*NPM1* Status Rezidiv	Tage bis zum Rezidiv	SNP Array Diagnose	SNP Array Rezidiv
1	negativ	886	UPD1pter-p32.3	gain11q23.3, del12p13.2
2	negativ	2931	+Y, del9q21.32-q21.33	+Y, +8, gain11q23.3
3	negativ	1028	del9q21.1-q31.1	gain11q23.3
4	negativ	82	-	-
5	negativ	205	-	-
6	negativ	3300	-	del7
7	positiv	1717	del9q21.32	+5, del9q21.32
8	positiv	227	UPD13q	UPD13q, del12p, del17p
9	positiv	126	UPD13q, del13q21.1	UPD13q, del13q21.1, del11p14.1
10	positiv	406	del9q12-q31.1	del7p15.1, gain7q22.1, del9q, del17q11.2
11	positiv	273	gain4p16.3	gain4p16.3
12	positiv	155	UPD13q	UPD13q
13	positiv	211	-	del13q14.11
14	positiv	107	-	del11p14-12
15	positiv	352	-	del12pter-p11.1, del17p
16	positiv	282	-	del2q34
17	positiv	250	-	del3p22.1
18	positiv	336	-	del3q14.2, del3q26.31, del4q22.1, del7q11.22, gain7q21.2, del17q11.2, delXp22.31, delXp22.12
19	positiv	393	-	gain13q12.2

Fortsetzung auf Seite 71

Fortsetzung Tabelle 14

	NPM1 Status Rezidiv	Tage bis zum Rezidiv	SNP Array Diagnose	SNP Array Rezidiv
20	positiv	739	-	gain6q22.1
21	positiv	263	-	UPD13q
22	positiv	252	-	UPD13q
23	positiv	306	-	UPD13q, del7p12.2, delXq22
24	positiv	221	del16p, gain17q	-
25	positiv	92	UPD13q	-
26	positiv	565	UPD17p12	-
27	positiv	196	del9q	-
28	positiv	481	-	-
29	positiv	1543	-	-
30	positiv	246	-	-
31	positiv	330	-	-
32	positiv	151	-	-
33	positiv	385	-	-
34	positiv	888	-	-
35	positiv	204	-	-
36	positiv	779	-	-
37	positiv	266	-	-
38	positiv	1015	-	-
39	positiv	265	-	-
40	positiv	1429	-	-
41	positiv	240	-	-
42	positiv	388	-	-

4. Diskussion

4.1 Nachweis Minimaler Resterkrankung bei der AML

Die häufigste Ursache für das Scheitern der Therapie der AML ist ein Rezidiv der Erkrankung. Dieses kann trotz primären Erreichens einer kompletten hämatologischen Remission (CR) auftreten. Daher ist davon auszugehen, dass einzelne Tumorzellen die Chemotherapie überleben und nach kurzer oder längerer Zeit erneut proliferieren. Diese verbleibenden Leukämiezellen werden deshalb auch als Minimale Resterkrankung (MRD) bezeichnet. Die Entwicklung einer Technik, die diese residualen Tumorzellen im Stadium einer CR identifiziert, kann dazu beitragen, ein molekulares Rezidiv (MR) schon vor dem hämatologischen Rezidiv (HR) zu erkennen, wodurch Patienten früher behandelt werden können. Viele Methoden wie zum Beispiel die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder die Zytogenetik sind aufgrund ihrer mangelnden Sensitivität und Spezifität zur Quantifizierung und zum Nachweis der MRD ungeeignet. Mithilfe der quantitativen Real-Time PCR (RQ-PCR) kann dagegen eine Leukämiezelle unter 10^4 bis 10^6 normalen Zellen (Sensitivität von 10^{-4} bis 10^{-6}) bei gleichzeitig hoher Spezifität nachgewiesen werden. Die RQ-PCR ermöglicht die quantitativen Analysen mithilfe eines fluoreszierenden Signals, das durch die Hydrolysierung einer Sonde während jeder Amplifikation entsteht. Anhand einer Standardreihe kann das absolute Transkript-Level des Zielgens bezogen auf ein Haushaltsgen errechnet werden. Die MRD in der akuten promyelozytischen Leukämie (APL) mit t(15;17)(q22:q12) *PML-RARα* (Grimwade et al. 2009, Chendamarai et al. 2012) und AML mit inv(16)(p13.1q22) und t(8;21)(q22;q22) (Perea et al. 2006) konnte mithilfe dieses Verfahrens bestimmt werden. Durch die Detektion der MRD und einer daraus resultierenden präemptiven Therapie nach einem molekularen Rezidiv kann bei der APL die Rate von klinischen Rezidiven reduziert werden (Grimwade et al. 2009). Die RQ-PCR wurde für den Marker *NPM1* erstmalig von Gorello et al. 2006 etabliert. Diese Arbeit beschränkte sich auf die häufigsten Mutationstypen A, B und D (Gorello et al. 2006). Bis heute wurden nur wenige Studien zur Quantifizierung von MRD mittels RQ-PCR bei der *NPM1*^{mut} AML durchgeführt (Schnittger et al. 2009, Papadaki et al. 2009). Alle Studien konnten zeigen, dass diese Methode ein sensitives Verfahren für den Nachweis der MRD

bei AML-Patienten mit unterschiedlichen *NPM1* Mutationstypen ist. Um die Patientenkohorte, bei der der Nachweis und das Monitoring der MRD möglich ist, weiter zu vergrößern, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit RQ-PCR Assays für die *NPM1* Mutationstypen Km, Nm und Qm zu etablieren.

4.2 RQ-PCR Assays für die Mutationstypen Km, Nm und Qm

Die *NPM1* Mutationstypen Km, Nm und Qm wurden erstmalig von Schnittger et al. 2005 beschrieben. Sie werden durch eine 4 Nukleotid große Insertion im Exon 12 des *NPM1* Gens hervorgerufen (Schnittger et al. 2005). Daraus resultiert ein Frame-Shift der Proteinfolge. In Tabelle 2 ist zu sehen, dass alle drei Mutationen mit einem Verlust der für die Lokalisation im Nukleolus essentiellen Tryptophane einhergehen (Falini et al. 2005). Die hier festgestellte Inzidenz der Mutationstypen Km und Nm lag bei 0,89% aller bisher in Ulm untersuchten Patienten mit einer *NPM1*^{mut} AML. Somit war die Inzidenz etwas mehr als doppelt so groß wie bei Schnittger et al. 2009, die eine Inzidenz von 0,4% für diese Mutationstypen festgestellt hatten (Schnittger et al. 2009).

Zur Etablierung der RQ-PCR Assays wurden wie beschrieben Plasmide mit den entsprechenden *NPM1*-Mutanten hergestellt und auf ihre Reinheit und Sequenz überprüft. Die Analyse der Plasmidstandardreihe der RQ-PCR ergab einen Korrelationskoeffizient R^2 bei allen Mutationstypen von durchschnittlich 0,997 mit einem Minimalwert von 0,992 und einem Maximalwert von 0,999. Somit waren die Kriterien für die Auswertbarkeit, die für die Mutationstypen A, B und D etabliert wurden, auch für die neuen Mutationstypen erfüllt. Die PCR-Effizienz lag im Durchschnitt für die Mutation Km bei 98,37%, Nm bei 97,52% und Qm bei 96,82%. Somit wurden in den neu etablierten Assays mindestens ebenso gute PCR-Effizienzen erreicht wie die über Jahre gemessenen durchschnittlichen PCR-Effizienzen des Mutationstyps A (94,46%) und des Mutationstyps B (97,19%). Im letzten Schritt wurde die Sensitivität und Spezifität der Assays mit der RQ-PCR getestet. Dabei wurde das Diagnosematerial von Patienten mit den verschiedenen *NPM1* Mutationstypen jeweils mit der *NPM1*^{wt} Zelllinie HL60 bis auf

10^{-7} verdünnt. Für die Mutationstypen Km und Qm konnte mit jeweils 10^{-5} eine ausgezeichnete Sensitivität erreicht werden. Sie lag etwas unterhalb der maximal erreichbaren Sensitivität bei den etablieren Mutationstypen A, B und D von 10^{-6} (Krönke et al. 2011). Andere Studien errechneten für den Mutationstyp A eine durchschnittliche Sensitivität von 10^{-4} bis 10^{-5} (Schnittger et al. 2009, Hokland et al. 2011). Diese Unterschiede sind in der Tatsache begründet, dass die in Realität erreichbare Sensitivität stark von dem *NPM1*^{mut} Transkript-Level bei Diagnose und von der Materialqualität abhängig ist. Die C_T -Werte der *NPM1*^{wt} Proben lagen jeweils außerhalb des quantitativen Bereichs (C_T > 45). Folglich waren die RQ-PCR Assays der Mutationstypen Km und Qm spezifisch.

Der Assay für den Mutationstyp Nm zeigte dagegen in der HL60 Wild-Typ Probe unspezifische Amplifikationen ab einem C_T -Wert von 38. Die Sensitivität konnte deshalb nicht exakt bestimmt werden, lag aber mit etwa 10^{-5} im Bereich der anderen neu etablierten Mutationen. Möglichkeiten einer Verbesserung der Spezifität bestehen in der Wahl eines neuen R‘-Primers, in der Veränderung der Annealing-Temperatur oder der Konzentration der Bestandteile des MasterMix zum Beispiel von $MgCl_2$. Eine weitere Verkürzung des R‘-Primers ist schwierig, da meist mindestens eine Länge von 16 Basen benötigt wird, um zu verhindern, dass zufällig im Genom eine gleiche Sequenz vorhanden ist. Die Temperaturen der RQ-PCR können aufgrund der gleichzeitigen Messung von ABL nur auf Kosten eines Verlustes der Spezifität der *ABL*-Primer verändert werden. Eine Senkung der $MgCl_2$ Konzentration wäre eine einfache Möglichkeit zur Erhöhung der Spezifität, obwohl darunter voraussichtlich die PCR-Effizienz leiden würde. Die Auswertbarkeit dieses Assays ist aufgrund der mangelnden Spezifität eingeschränkt. Alle Berechnungen der Rezidivwahrscheinlichkeit und Prognose, die als Kriterium die RQ-PCR Negativität mit einbeziehen (Krönke et al. 2011), können somit nicht durchgeführt werden. Dennoch kann das Therapieansprechen anhand des Transkript-Levels verfolgt werden.

Zusammenfassend konnte durch unsere Analysen ein spezifischer und sehr sensitiver RQ-PCR Assay für die *NPM1* Mutationstypen Km und Qm etabliert werden. Somit steht für weitere 1,5-2% der *NPM1*^{mut} AML-Patienten ein Verfahren zur Detektion der MRD zur

Verfügung, das eine verbesserte Risikoabschätzung und eine zukünftige präemptive Therapie ermöglicht. Entsprechend des hier dargestellten Verfahrens können zukünftig RQ-PCR Assays für weitere seltene Mutationstypen wie Jt, 4 oder Gm etabliert werden.

4.3 Vergleich des *NPM1*^{mut} Transkript-Levels bei Diagnose und Rezidiv

Die Prognose der AML wird durch das Auftreten eines Rezidivs nach Abschluss der Therapie stark beeinträchtigt. Daher war das Hauptziel dieser Arbeit die Analyse der Kinetik der MRD und die Prädiktion des Rezidivs. Zuerst wurde untersucht, inwieweit sich die Transkript-Level zwischen Diagnose und Rezidiv bei 42 Patienten mit *NPM1*^{mut} AML unterscheiden. Die 6 *NPM1*^{mut} negativen Rezidive wurden für diese Berechnungen exkludiert, da deren Genese und Evolution mit den anderen Rezidiven nicht vergleichbar sind. Die *NPM1*^{mut} Transkript-Level im Rezidiv variierten bei 89% der Patienten maximal um den Faktor 10 verglichen mit dem Level bei Diagnosestellung. Die medianen Werte der *NPM1*^{mut} Transkript-Level variierten zwischen beiden Zeitpunkten sogar nur um den Faktor 2. Bemerkenswerterweise befanden sich alle Diagnose- und Rezidivwerte innerhalb 2 Zehnerpotenzen von 10^5 bis 10^7 Transkript-Leveln. Exakt diese Spannweite der Diagnose- und Rezidivwerte wurde auch von Schnittger et al. 2009 ermittelt (Schnittger et al. 2009). Dies deutet darauf hin, dass die Leukämiezellen im Rezidiv eine ähnlich hohe Expression von *NPM1*^{mut} Transkripten aufweisen wie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der Erkrankung.

Anhand dieser Erkenntnis, dass das *NPM1*^{mut} Transkript-Level bei Rezidiv sich kaum von dem bei Diagnosestellung unterscheidet, kann in zukünftigen Arbeiten überprüft werden, ob anhand der Höhe des *NPM1*^{mut} Transkript-Levels über dem weiter unten diskutierten Schwellenwert eine genauere Vorhersage über den Zeitpunkt des hämatologischen Rezidivs möglich ist.

4.4 Definition eines Schwellenwertes für die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit während der Nachbeobachtungsphase

Mehrere MRD-Studien haben gezeigt, dass ein detektierbares Transkript-Level des jeweiligen Markers nicht nur während, sondern auch nach Abschluss der Therapie eine prognostische Relevanz hat (Grimwade et al. 2009, Corbacioglu et al. 2010). Außerdem konnte unter anderem für den Marker *NPM1* gezeigt werden, dass bei einigen Patienten ein geringer Anstieg des Transkript-Levels kein Rezidiv zu Folge hat (Ommen et al. 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls 26 Patienten mit positiver RQ-PCR nach Abschluss der Therapie beobachtet, die sich nach einem Median von 24,8 Monaten immer noch in CR befanden. Ein Teil dieser Patienten (n=15; 58%) konvertierte in darauffolgenden Proben ohne weitere Behandlung zur RQ-PCR Negativität. Diese Tatsache bedeutet, dass nicht die alleinige Konversion zur RQ-PCR Positivität als Prädikator für ein Rezidiv gelten kann, da in diesem Fall bei 38% der Patienten ein Rezidiv falsch positiv angenommen werden würde. Aufgrund der daraus folgenden potentiellen Überbehandlung der Patienten wurde hier versucht, die Spezifität durch einen Schwellenwert zu erhöhen. Mit dem Cut-off von 200 $NPM1^{mut}/10^4$ *ABL* Transkripten wurde eine 100%ige Spezifität erreicht; es folgte also bei allen 36 Patienten, die im Follow-up bei einer Probe diesen Cut-off überschritten, ein Rezidiv. Der Zeitpunkt der ersten Probe innerhalb des Follow-ups, die oberhalb dieses Schwellenwertes lag, wurde als molekulares Rezidiv (MR) definiert. Dieser absolute Cut-off hat gegenüber dem von Ommen et al. beschriebenen Schwellenwert von $5x10^{-5}$ $NPM1^{mut}$ Transkripten relativ zu dem Transkript-Level bei Diagnosestellung den Vorteil, dass er zum einen nicht berechnet werden muss und zum anderen auch bei Patienten, bei denen kein MRD-Wert bei Diagnosestellung verfügbar ist, angewendet werden kann. Außerdem erreichte der relative Cut-off von Ommen et al. keine 100 prozentige Spezifität, da bei einem von 104 Patienten kein HR folgte (Ommen et al. 2010).

Die mediane Zeit von dem hier definierten MR zu HR (t_m) lag bei den 36 Patienten bei 2,6 Monaten mit einer breiten Spannweite von 0,4 bis 23,6 Monaten. Da bei gleichzeitigem Vorliegen einer *FLT3*-ITD Mutation bei Diagnose ein höheres Rezidivrisiko und eine

schlechtere Prognose besteht als bei Patienten ohne *FLT3*-ITD Mutation (Schlenk et al. 2008, Döhner et al. 2005), wurde untersucht, ob sich dieser Unterschied auch in der Rezidivkinetik widerspiegelt. Die mediane Zeit zwischen MR zu HR ergab einen signifikanten Unterschied zwischen *FLT3*-ITD negativen und positiven Patienten (p=0,036). *FLT3*-ITD mutierte Patienten (n=15) hatten mit 1,4 Monaten einen deutlich kürzeren Zeitraum bis zum klinisch, hämatologischen Rezidiv als Patienten ohne *FLT3*-ITD Mutation (n=21, t_m=3,2 Monate). Die schnellere Rezidivkinetik *FLT3*-ITD mutierter Patienten wurde auch in anderen Studien nachgewiesen (Ommen et al. 2010). Dies hat Konsequenzen für die Festlegung eines optimalen Probenintervallabstandes, da *FLT3*-ITD mutierte Patienten in kürzeren Abständen analysiert werden müssen, um gleich viele Rezidive zu erkennen. Außerdem ist auch der Zeitraum für eine mögliche präemptive Therapie bei *FLT3*-ITD Patienten kürzer, sodass die Therapie schneller begonnen und durchgeführt werden muss.

4.5 Etablierung eines optimalen Probenintervallabstandes im Follow-up

Mithilfe eines mathematischen Modells entwickelten Ommen et al. 2008 eine Möglichkeit, trotz eines inter- und intraindividuell sehr heterogenen Probenintervallabstandes im Follow-up die mediane Zeit von MR zu HR exakter zu berechnen. Außerdem konnten sie mit diesem Verfahren bestimmen, welcher Probenintervallabstand benötigt wird, um einen gewissen Prozentsatz an Rezidiven (Relapse detection fraction = RDF) vor dem HR detektieren zu können. Dieses Modell geht von der Annahme aus, dass alle nicht gemessenen Werte zwischen zwei negativen Proben auch negativ und ebenso alle Werte zwischen zwei positiven Proben ebenfalls positiv sind (Ommen et al. 2008). Die Positivität einer Probe wurde hier als oberhalb, die Negativität als unterhalb des vorher bestimmten Schwellenwerts von 200 $NPM1^{mut}/10^4$ *ABL* Transkripte liegend definiert.

Zur Errechnung der Rezidivwahrscheinlichkeit bei einem gewissen Probenintervall musste eine Funktion erstellt werden, die die bekannten Fraktionen der sicher molekular rezidivierten Patienten (Abb. 15) möglichst genau und in einer logischen Art und Weise verbindet (Abb. 16 A). Retrospektiv konnten 3 Monate vor dem HR 66% der Rezidive vorhergesagt werden. Das größte Problem bei der Erstellung der Funktionen war die relativ kleine Kohorte. Alle 3 erstellten Funktionen (Abb. 16 A und B) weisen im Zeitraum zwischen -2 und 0 Monaten eine gewisse Ungenauigkeit auf, da die Funktionen zum Zeitpunkt 0 nicht bei 1,00 (100%) und im Zeitraum davor kurzzeitig oberhalb 1,00 verlaufen. Der weitere Funktionsverlauf ist dennoch auswertbar, da sich zur Berechnung der Integralfunktion die Fläche, die oberhalb und unterhalb von 1,00 liegt, im Bereich von -2 bis 0 ausgleicht. Mithilfe der Funktionen konnte für *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wt} Patienten ein benötigtes KM-Probenintervall von 3,5 Monaten und für *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD mutierte Patienten ein Intervall von 3 Monaten errechnet werden, um 90% der Rezidive vorzeitig detektieren zu können. Dieser Unterschied, der mit größerem Intervallabstand immer deutlicher wird, zeigt, dass die *FLT3*-ITD Mutation die Rezidivkinetik negativ beeinflusst. Der scheinbare Widerspruch, dass retrospektiv 3 Monate vor dem HR nur 66% der Rezidive erkannt worden sind, aber prospektiv bei einem einheitlichen Probenintervallabstand von 3,5 Monaten 90% detektiert werden sollen, ist durch die unterschiedliche Betrachtungsweise erklärbar. MRs, die sich innerhalb von weniger als 3 Monaten hämatologisch zeigen, können trotzdem zu einer gewissen Wahrscheinlichkeit detektiert werden. Für eine präemptive Therapie ist außerdem die Zeit entscheidend, die zwischen der Detektion des MR und HR liegt. Diese wurde nach dem Modell von Ommen et al. 2008 für die oben genannten Intervallabständen berechnet und lag bei *FLT3*^{wt} Patienten im Median bei 113 Tagen und bei *FLT3*-ITD mutierten Patienten im Median bei 53 Tagen (Ommen et al. 2008). Dieser Unterschied spiegelt den schnelleren Verlauf des Rezidivs bei *FLT3*-ITD positiven Patienten wider. Hokland und Ommen berechneten mit 6 bzw. 4 Monaten für *FLT3*-ITD Wild-Typ bzw. mutierte Patienten einen deutlich längeren Intervallabstand bei einer RDF von 90%. Ein Grund für diese Unterschiede könnte darin liegen, dass diese Autoren nur Patienten, die eine molekulare Remission nach der Induktionstherapie erreichten, in ihre Auswertung einschlossen (Hokland et al. 2011). Diese könnten eine langsamere Rezidivkinetik als Patienten mit persistierender MRD

zeigen. Schnittger et al. bestimmten 2009 bei einem zweimonatigen Probenintervall für alle Patienten eine RDF von nur 50%. Diese Daten lassen eine schnellere Rezidivkinetik vermuten, aber das Patientenkollektiv war im Bezug auf Alter und Behandlung sehr heterogen und deshalb weniger aussagekräftig (Schnittger et al. 2009).

Eine RDF von 90% mit den oben beschriebenen Probenintervallen erscheint sinnvoll, da so die meisten Rezidive vorzeitig entdeckt werden können. Um eine höhere RDF zu erreichen, müsste das Probenintervall, wie an dem Verlauf der Funktionen in Abb. 16 B zu sehen ist, deutlich verkürzt werden. Die Belastung der Patienten durch wiederholte Knochenmarkpunktionen würde dadurch erheblich zunehmen. Regelmäßige Knochenmarkuntersuchungen sollten in die AML Verlaufsuntersuchungen einfließen, um eine potentielle präemptive Therapie zu ermöglichen. Dies kann sowohl eine Chemotherapie zur Therapie des Rezidivs als auch eine supportive Therapie zur Prophylaxe schwerwiegender Komplikationen des Rezidivs, wie zum Beispiel Infektionen oder Blutungen, umfassen. Im Gegensatz zur APL, wo der Nutzen der präemptiven Therapie zur Reduktion der klinischen Rezidive bereits bewiesen worden ist (Grimwade et al. 2009), gibt es bei der *NPM1*^{mut} AML noch keine Daten, ob eine Therapie vor dem hämatologischen Rezidiv prognostisch günstiger ist als zuzuwarten.

Mithilfe des in dieser Arbeit ermittelten sehr spezifischen, absoluten Grenzwertes für die Prädiktion eines hämatologischen Rezidivs und der Festlegung eines sinnvollen Probenintervalls kann die Wirksamkeit der präemptiven Therapie in *NPM1*^{mut} AML in zukünftigen Arbeiten überprüft und so möglicherweise die Überlebenschance von Patienten mit *NPM1*^{mut} AML verbessert werden.

4.6 Klonale Evolution von Diagnose zum Rezidiv

Eine Ursache, dass Rezidive nicht prädiktiert werden können, ist der Verlust des untersuchten Markers zwischen Diagnosestellung und Rezidiv. Die *NPM1* Mutation gilt im Allgemeinen als ein stabiler Marker. So waren in der Kohorte von Schnittger et al. 2009 alle 81 Patienten sowohl bei Diagnosestellung als auch im Rezidiv *NPM1*^{mut} positiv (Schnittger et al. 2009). Andere Gruppen berichteten dagegen von einem Verlust der *NPM1* Mutation beim Rezidiv einzelner Patienten (Papadaki et al. 2009, Suzuki et al. 2005). In der hier untersuchten Kohorte konnte ebenfalls bei 6 von 42 Patienten (14%) ein *NPM1*^{mut} Verlust festgestellt werden. Da die Patienten mit einem *NPM1*^{wt} Rezidiv bevorzugt analysiert wurden und noch weitere Patienten ohne *NPM1*^{mut} Verlust ausstehend sind, wird sich der Prozentsatz im weiteren Verlauf der Untersuchungen verringern.

Um die klonale Evolution der *NPM1*^{mut} AML mit Rezidiv näher bestimmen zu können, wurden SNP Analysen bei Diagnosestellung und Rezidiv bei 42 Patienten durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung konnten nur wenige genomische Aberrationen (Mittelwert: 0,36/Patient) festgestellt werden, was die chromosomale Stabilität der leukämischen Zellen in de-novo *NPM1*^{mut} AML bekräftigt. Zum Zeitpunkt des Rezidivs erhöhte sich die Anzahl der Aberrationen signifikant auf durchschnittlich 0,98 pro Patient ($p=0,015$). Die Progression zu einer höheren genomischen Komplexität in Rezidiv AML wurde auch in anderen Studien mithilfe der Karyotypisierung beobachtet (Bacher et al. 2011). Die Copy Number Alterations (CNAs) und Uniparentale Disomien (UPDs), die bei Diagnosestellung gefunden wurden, konnten nicht zwangsläuft auch in den entsprechenden Rezidivproben nachgewiesen werden. So verloren 3 von 5 (60%) Patienten die rekurrente Aberration del9q21. Im Gegensatz dazu wurden spezifische chromosomale Regionen nachgewiesen, die rekurrent von CNAs zum Zeitpunkt des Rezidivs betroffen waren wie gain11q23 (n=3), del12p (n=3), del17q (n=2) und del11p (n=2). Diese chromosomalen Regionen beinhalten unter anderem die Tumorsuppressorgene ETV6 (12p), NF1 (17q) und WT1 (11p). Eine weitere rekurrente Aberration war UPD13q. Bei Diagnosestellung konnte diese bei 4 (10%) Patienten, zum Zeitpunkt des Rezidivs bei 6 (14%) Patienten nachgewiesen werden und war damit im

Rezidiv die häufigste gefundene Aberration. Jedoch verlor ein Patient diese Aberration auch zum Rezidiv. Raghavan et al. beobachteten 2008 ebenfalls bei 6 von 27 (22%) Patienten einen Erwerb von UPD13q zum Zeitpunkt des Rezidivs und eine gleichzeitige Evolution von heterozygoten zu homozygoten *FLT3*-ITD Mutationen in 6 der 6 (100%) Fälle (Raghavan et al. 2008).

In einer Kohorte, die unterschiedliche zytogenetische und genetische AML-Subgruppen einbezog, beobachteten Parkin et al., dass alle CNAs und UPDs, die bei Diagnosestellung detektiert wurden, auch zum Zeitpunkt des Rezidivs gefunden wurden. Diese Tatsache wurde als ein Beleg dafür gedeutet, dass der Erwerb dieser Aberrationen sich in der klonalen Evolution der AML früh ereignet haben muss (Parkin et al. 2012). Dies stellt einen Widerspruch zu den hier gezeigten Daten dar, da insgesamt nur 7 von 15 (47%) UPDs und CNAs von Diagnosestellung zum Rezidiv stabil waren. Das belegt, dass diese genomischen Aberrationen zumindest in der *NPM1*^{mut} AML-Subgruppe spätere Ereignisse in der Entwicklung der AML darstellen.

Die Beobachtung, dass die meisten Aberrationen (74%) ausschließlich in Rezidivproben gefunden wurden, deutet an, dass diese durch die Chemotherapie induziert wurden oder in kleinen Subklonen bei Diagnosestellung bereits präsent waren und durch die Therapie selektiert wurden. Die meisten der für ein Rezidiv spezifischen Aberrationen sind mit Hoch-Risiko-AML assoziiert. Dies könnte eine Erklärung zu der schlechten Prognose von AML-Patienten mit Rezidiv sein (Rucker et al. 2012, Kayser et al. 2011). Die limitierte Sensitivität der hier angewandten Technik erlaubt keine exakte Differenzierung, ob genomische Aberrationen in kleinen Subklonen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits existierten oder ob sie während oder nach der Chemotherapie erworben wurden. Eine genomweite Sequenzierung dagegen kann Aberrationen detektieren, die nur in sehr kleinen Subklonen (>2% der Zellen) vorkommen. Mithilfe dieser Technik analysierten Ding et al. 2012 Hautzellen und Leukämiezellen bei Diagnosestellung und Rezidiv von 8 AML Patienten, darunter 2 mit einer *NPM1* Mutation, mit dem Ergebnis, dass AML Zellen zusätzliche Aberrationen, vor allem Transversionen, während der Therapie und bei der Entstehung eines Rezidivs erwerben. Die meisten der hier erkannten rezidiv-spezifischen Aberrationen konnten auch mithilfe dieser Methode im Diagnosematerial nicht

nachgewiesen werden, was für eine Anwesenheit in sehr kleinen Subklonen (<2%) bei Diagnosestellung oder für einen Erwerb während oder nach der Chemotherapie spricht (Ding et al. 2012).

Neben den Patienten, die zum Zeitpunkt des Rezidivs den gleichen SNP-Karyotyp wie bei Diagnosestellung hatten und den Patienten, die zusätzliche Aberrationen zum Rezidiv erwarben, konnte bei 7 (17%) Patienten ein Verlust aller bei Diagnosestellung detektierten Aberrationen festgestellt werden. Unter diesen hatten 3 (43%) Patienten beim Rezidiv neu erworbene Aberrationen. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass präleukämische Zellen, die diese Aberrationen noch nicht erworben hatten, therapieresistent gewesen sein könnten. Aus diesen Zellen, die eventuell während der Therapie oder danach andere Aberrationen erworben haben, entwickelte sich schließlich das Rezidiv. Diese Ergebnisse bestätigten die Analysen von Ding et al., die zwei Hauptmuster in der klonalen Evolution erkannten. Bei 3 von 8 (37,5%) Patienten erwarb der bei Diagnosestellung dominante Klon zusätzliche Mutationen und entwickelte sich weiter zum rezidivierenden Klon. Die restlichen 5 (62,5%) Patienten entwickelten das Rezidiv aus einem kleinem Subklon, der die meisten, aber nicht alle Mutationen des dominanten Klons trug (Ding et al. 2012). Parkin et al. dagegen postulierten nach SNP-Analysen aus Diagnose- und Rezidivmaterial von 28 Patienten, dass einem Rezidiv der AML eine inkomplette Eradikation des dominaten Klons bei Diagnosestellung zugrunde liegt (Parkin et al. 2012).

Für den Verlust des Markers *NPM1*^{mut} bei 6 Patienten gibt es mehrere Erklärungsansätze. Die erste Möglichkeit wäre, dass die *NPM1* Mutation nicht am Anfang der Evolution der Leukämiezellen steht und es somit Vorläuferzellen ohne *NPM1* Mutation gibt, die durch die Therapie selektiert wurden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass das Rezidiv in Wirklichkeit eine therapieassoziierte AML (t-AML) darstellt, die mit ganz anderen Mutationen und Aberrationen einhergehen kann. Des Weiteren kann auch eine fehlerhafte Sequenzierung der Proben ursächlich sein. Dies wurde aber wiederholt mit verschiedenen Tests überprüft und somit ausgeschlossen. Die ersten 3 Patienten der Tabelle 14, bei denen keine *NPM1* Mutation zum Zeitpunkt des Rezidivs nachgewiesen werden konnte, hatten bei Diagnosestellung einen anomalen SNP-Karyotyp. Beim Rezidiv

war keine der früheren Läsionen detektierbar, während neue Aberrationen auftraten. Jeder dieser 3 Patienten erwarb einen Hinzugewinn von 11q23, welches das MLL-Gen umfasst. Zusätzlich war die Zeit zwischen Diagnosestellung und Rezidiv bei allen 3 Patienten größer als 2,4 Jahre und damit deutlich länger als der Median von 9,3 Monaten bei *NPM1*^{mut} Rezidiven. Basierend auf diesen Tatsachen kann vermutet werden, dass zumindest diese 3 Fälle eher t-AML darstellen und deshalb nicht mit der primären AML verwandt sind. Der Hinzugewinn von 11q23 könnte eine Folge der Chemotherapie sein. Gegen diese Theorie spricht, dass auch Patienten detektiert wurden, die sowohl bei Diagnosestellung als auch bei Rezidiv eine *NPM1* Mutation hatten, aber ansonsten vollständig unterschiedliche Aberrationen aufwiesen (Schnittger et al. 2009). Die Patienten 4 und 5 der Tabelle 14 scheinen durch die kurze Zeit zwischen Diagnosestellung und Rezidiv und durch die fehlenden Veränderungen des SNP-Karyotyps eher ein Rezidiv aus selektierten *NPM1* negativen Vorläuferzellen als eine t-AML zu sein. Patient 6 zeigte mit über 9 Jahren die längste Zeit bis zum Rezidiv, was eher für eine t-AML sprechen würde. Leider kann anhand der fehlenden Aberrationen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine nähere Aussage über die Ätiologie des Rezidivs gemacht werden.

Die Frage, ob es sich bei den 6 *NPM1* negativen Patienten eher um eine t-AML oder ein Rezidiv handelt, kann bis jetzt noch nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Zur weiteren Abklärung müssten neben den SNP Arrays und der *NPM1* Mutation der Status weiterer Mutationen wie *DNMT3A*, *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD, *NRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *TP53*, *MLL*-PTD und *ASXL1* (*Additional sex combs like 1*) bei Diagnosestellung und Rezidiv erhoben werden. Idealerweise sollte eine genomweite Sequenzierung dieser Patienten, wie von Ding et al. 2012 beschrieben, durchgeführt werden, um alle eventuell noch unbekannten Mutationen zu entdecken und Rückschlüsse auf die Genese des Rezidivs ziehen zu können (Ding et al. 2012).

Zusammengefasst bilden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die Festlegung eines absoluten sehr sensitiven Cut-offs zur Vorhersage eines Rezidivs und die Berechnung eines idealen Probenintervallabstandes im Follow-up, die Grundlage die Wirksamkeit einer präemptiven Therapie bei *NPM1*^{mut} AML zu überprüfen. Des Weiteren konnte anhand der SNP-Analysen, insbesondere der *NPM1*^{wt} Rezidive, zum einen die klonale

Evolution im Sinne von zusätzlichen, meist rezidiv-spezifischen Aberrationen nachgewiesen werden, was die Basis für eine aberrationsspezifische Therapie ist, und zum anderen konnte die Notwendigkeit gezeigt werden, Therapien zu entwickeln, die auch alle präleukämischen Zellen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung abtöten.

5. Zusammenfassung

Die Prognose von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) hat sich in den letzten Jahren durch die genetische Charakterisierung der Erkrankung und die Entwicklung risiko-adaptierter Therapieansätze verbessert. Etwa 45% der Patienten zeigen keine zytogenetischen Veränderungen und haben einen sogenannten normalem Karyotyp, von denen 40 - 50% eine Mutation im *Nukleophosmin 1* (*NPM1*^{mut}) Gen aufweisen. Diese wurden in AML erstmals 2005 beschrieben. Aufgrund der relativ hohen Inzidenz und Stabilität wurden *NPM1* Mutationen als molekulares Target für den Nachweis der minimalen Resterkrankung (MRD) mittels quantitativer Real-Time Polymerasen-Kettenreaktion (RQ-PCR) identifiziert, die eine sehr sensitive und quantitative Messung von *NPM1*^{mut} erlaubt. Der Nachweis gelang bisher bei den *NPM1* Mutationstypen A, B und D, die etwa 95% aller bekannten Mutationen ausmachen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst durch eine gezielte Auswahl von Primern und Sonden RQ-PCR Assays für zwei weitere Mutationstypen, Km und Qm, etabliert, um auch bei diesen AML Patienten eine MRD-Analyse durchführen zu können. Für diese Assays konnte eine sehr hohe Sensitivität von 10^{-5} erreicht werden. Der RQ-PCR Assay für den Mutationstyp Nm ist nur mit Einschränkungen anwendbar, da unspezifische Amplifikationen von Wild-Typ *NPM1* in der RQ-PCR vorlagen.

Mithilfe der RQ-PCR konnte der Verlauf der *NPM1*^{mut} basierten MRD nach Abschluss der Therapie bei insgesamt 136 AML-Patienten mit den Mutationstypen A, B, D, Qm und Km aus den Studien AMLSG 07-04 und AML HD98-A analysiert werden. Dabei wurde ein Wert von 200 *NPM1*^{mut} Transkripten im Verhältnis zu 10^4 Transkripten des Haushaltsgens *ABL* (*Abelson murine leukemia virus oncogene*) als Grenzwert für ein molekulares Rezidiv (MR) definiert, dessen Überschreiten bei 100% aller Patienten mit einem Rezidiv assoziiert war. Bei Patienten mit internen Tandemduplikationen des *FLT3*-Gens (*FLT3*-ITD) konnte eine signifikant kürzere Zeit zwischen molekularem und hämatologischem Rezidiv (HR) festgestellt werden (Median: 1,4 Monate versus 3,2 Monate bei Patienten ohne *FLT3*-ITD Mutation; p=0,036). Den großen inter- und intraindividuellen Unterschieden bei der Analyse der Follow-up-Proben wurde mit einem mathematischen Modell anhand von 27

Patienten Rechnung getragen. Mit diesem Modell wurde ein idealer Probenintervallabstand im Follow-up von 3,5 Monaten errechnet, bei dem 90% aller Rezidive vorzeitig erkannt werden können. Auch hier konnte für Patienten mit *FLT3*-ITD Mutation ein deutlich schnellerer Rezidivverlauf nachgewiesen werden, so betrug der Zeitraum zwischen Entdeckung und Ausbruch des Rezidivs bei Patienten mit *FLT3*-ITD Mutation 53 Tage und bei *FLT3* Wild-Typ Patienten 113 Tage.

Die klonale Evolution der Rezidive wurden mithilfe von Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysen nachvollzogen. Diese zeigte sich in der Steigerung der durchschnittlichen Anzahl an Aberrationen pro Patient von 0,36 bei Diagnosestellung auf 0,98 bei Rezidiv (p=0,015). Die häufigsten Aberrationen waren bei Diagnosestellung UPD13q (n=4) und del9q21 (n=5), bei Rezidiv UPD13q (n=6) und rekurrente Deletionen verschiedener Tumorsuppressorgene. 74% der Aberrationen traten ausschließlich in Rezidivproben auf. Bei 6 (14%) Patienten konnte zum Zeitpunkt des Rezidivs keine *NPM1* Mutation mehr nachgewiesen werden. Bei 3 (50%) dieser Patienten kam es zu einem Verlust aller bei Diagnose vorhandenen Aberrationen mit einem gleichzeitigen Erwerb eines Zugewinns von 11q23.3 im Rezidiv. Zusätzlich war das rezidivfreie Überleben bei allen 3 Patienten größer als 2,4 Jahre und damit deutlich länger als bei Patienten mit einem *NPM1*^{mut} Rezidiv (Median: 9,3 Monate). Dies könnte darauf hindeuten, dass zumindest diese 3 Rezidive eher therapieassoziierte AMLs darstellen. Die übrigen 3 *NPM1* Wild-Typ Rezidive sind jedoch höchst wahrscheinlich aus einem prämalignen Klon vor Erwerb der *NPM1* Mutation entstanden, da das rezidivfreie Überleben kürzer war und keine signifikanten Veränderungen im SNP-Karyotyp stattgefunden haben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen unter anderem, dass mithilfe der *NPM1*^{mut} basierten MRD-Analysen bei einem Probenintervallabstand im Follow-up von 3,5 Monaten 90% der Rezidive durch ein Überschreiten des Schwellenwertes von 200 *NPM1*^{mut}/10^4 *ABL* Transkripten vorhersagbar sind. Das mediane Interventionsfenster bis zum klinischen Ausbruch des Rezidivs beträgt 53 Tage bei *FLT3*-ITD mutierten und 113 Tage bei *FLT3* Wild-Typ Patienten. Dies könnte in Zukunft eine präemptive Therapie erlauben und die im Vergleich zu anderen AML-Subtypen ohnehin schon guten Überlebensraten bei Patienten mit *NPM1*^{mut} AML weiter verbessern.

6. Literaturverzeichnis

1. Albiero E, Madeo D, Bolli N, Giaretta I, Bona E D, Martelli M F, Nicoletti I, Rodeghiero F, Falini B: Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 NPM1 mutation. Leukemia, 21: 1099-1103 (2007)
2. Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi S P, Meani N, Diverio D, Bernard L, Tizzoni L, Volorio S, Luzi L, Colombo E, Lo Coco F, Mecucci C, Falini B, Pelicci P G: Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. Blood, 106: 899-902 (2005)
3. Arthur D C, Berger R, Golomb H M, Swansbury G J, Reeves B R, Alimena G, Van Den Berghe H, Bloomfield C D, de la Chapelle A, Dewald G W: The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. Cancer Genet.Cytogenet., 40: 203-216 (1989)
4. Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, Kern W, Schnittger S, Haferlach T: Comparison of genetic and clinical aspects in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes all with more than 50% of bone marrow erythropoietic cells. Haematologica, 96: 1284-1292 (2011)
5. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S: Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. Blood, 107: 3847-3853 (2006)
6. Bacher U, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Schoch C: Population-based age-specific incidences of cytogenetic subgroups of acute myeloid leukemia. Haematologica, 90: 1502-1510 (2005)
7. Bennett J M, Catovsky D, Daniel M T, Flandrin G, Galton D A, Gralnick H R, Sultan C: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann.Intern.Med., 103: 620-625 (1985)
8. Bennett J M, Catovsky D, Daniel M T, Flandrin G, Galton D A, Gralnick H R, Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br.J.Haematol., 33: 451-458 (1976)
9. Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr C J: Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. Mol.Cell.Biol., 24: 985-996 (2004)
10. Bischof D, Pulford K, Mason D Y, Morris S W: Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. Mol.Cell.Biol., 17: 2312-2325 (1997)
11. Bloomfield C D, Goldman A, Hassfeld D, de la Chapelle A: Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Clinical significance of chromosomal

abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia. Cancer Genet.Cytogenet., 11: 332-350 (1984)

12. Borer R A, Lehner C F, Eppenberger H M, Nigg E A: Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. Cell, 56: 379-390 (1989)
13. Brady S N, Yu Y, Maggi L B,Jr, Weber J D: ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway. Mol.Cell.Biol., 24: 9327-9338 (2004)
14. Bruggemann M, Raff T, Flohr T, Gokbuget N, Nakao M, Droese J, Luschen S, Pott C, Ritgen M, Scheuring U, Horst H A, Thiel E, Hoelzer D, Bartram C R, Kneba M, German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. Blood, 107: 1116-1123 (2006)
15. Burnett A K, Hills R K, Milligan D, Kjeldsen L, Kell J, Russell N H, Yin J A, Hunter A, Goldstone A H, Wheatley K: Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. J.Clin.Oncol., 29: 369-377 (2011)
16. Byrd J C, Mrozek K, Dodge R K, Carroll A J, Edwards C G, Arthur D C, Pettenati M J, Patil S R, Rao K W, Watson M S, Koduru P R, Moore J O, Stone R M, Mayer R J, Feldman E J, Davey F R, Schiffer C A, Larson R A, Bloomfield C D, Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461): Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood, 100: 4325-4336 (2002)
17. Cazzaniga G, Dell'Oro M G, Mecucci C, Giarin E, Masetti R, Rossi V, Locatelli F, Martelli M F, Basso G, Pession A, Biondi A, Falini B: Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. Blood, 106: 1419-1422 (2005)
18. Chan P K, Chan F Y: Nucleophosmin/B23 (NPM) oligomer is a major and stable entity in HeLa cells. Biochim.Biophys.Acta, 1262: 37-42 (1995)
19. Chang J H, Olson M O: Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. J.Biol.Chem., 265: 18227-18233 (1990)
20. Chendamarai E, Balasubramanian P, George B, Viswabandya A, Abraham A, Ahmed R, Alex A A, Ganesan S, Lakshmi K M, Sitaram U, Nair S C, Chandy M, Janet N B, Srivastava V M, Srivastava A, Mathews V: Role of minimal residual disease monitoring in acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide in frontline therapy. Blood, 119: 3413-3419 (2012)
21. Cheng K, Sportoletti P, Ito K, Clohessy J G, Teruya-Feldstein J, Kutok J L, Pandolfi P P: The cytoplasmic NPM mutant induces myeloproliferation in a transgenic mouse model. Blood, 115: 3341-3345 (2010)
22. Chou W C, Tang J L, Lin L I, Yao M, Tsay W, Chen C Y, Wu S J, Huang C F, Chiou R J, Tseng M H, Lin D T, Lin K H, Chen Y C, Tien H F: Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. Cancer Res., 66: 3310-3316 (2006)

23. Chou W C, Tang J L, Wu S J, Tsay W, Yao M, Huang S Y, Huang K C, Chen C Y, Huang C F, Tien H F: Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (NPM1) mutations. Leukemia, 21: 998-1004 (2007)
24. Cloos J, Goemans B F, Hess C J, van Oostveen J W, Waisfisz Q, Corthals S, de Lange D, Boeckx N, Hahlen K, Reinhardt D, Creutzig U, Schuurhuis G J, Zwaan C, Kaspers G J: Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. Leukemia, 20: 1217-1220 (2006)
25. Colombo E, Bonetti P, Lazzerini Denchi E, Martinelli P, Zamponi R, Marine J C, Helin K, Falini B, Pelicci P G: Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. Mol.Cell.Biol., 25: 8874-8886 (2005)
26. Corbacioglu A, Scholl C, Schlenk R F, Eiwen K, Du J, Bullinger L, Fröhling S, Reimer P, Rummel M, Derigs H G, Nachbaur D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Döhner K: Prognostic impact of minimal residual disease in CBFB-MYH11-positive acute myeloid leukemia. J.Clin.Oncol., 28: 3724-3729 (2010)
27. Cornelissen J J, van Putten W L, Verdonck L F, Theobald M, Jacky E, Daenen S M, van Marwijk Kooy M, Wijermans P, Schouten H, Huijgens P C, van der Lelie H, Fey M, Ferrant A, Maertens J, Gratwohl A, Lowenberg B: Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? Blood, 109: 3658-3666 (2007)
28. Dalenc F, Drouet J, Ader I, Delmas C, Rochaix P, Favre G, Cohen-Jonathan E, Toulas C: Increased expression of a COOH-truncated nucleophosmin resulting from alternative splicing is associated with cellular resistance to ionizing radiation in HeLa cells. Int.J.Cancer, 100: 662-668 (2002)
29. De Propris M S, Raponi S, Diverio D, Milani M L, Meloni G, Falini B, Foa R, Guarini A: High CD33 expression levels in acute myeloid leukemia cells carrying the nucleophosmin (NPM1) mutation. Haematologica, 96: 1548-1551 (2011)
30. den Besten W, Kuo M L, Williams R T, Sherr C J: Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. Cell.Cycle, 4: 1593-1598 (2005)
31. Dergunova N N, Bulycheva T I, Artemenko E G, Shpakova A P, Pegova A N, Gemjian E G, Dudnik O A, Zatsepina O V, Malashenko O S: A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes. Immunol.Lett., 83: 67-72 (2002)
32. Ding L, Ley T J, Larson D E, Miller C A, Koboldt D C, Welch J S, Ritchey J K, Young M A, Lamprecht T, McLellan M D, McMichael J F, Wallis J W, Lu C, Shen D, Harris C C, Dooling D J, Fulton R S, Fulton L L, Chen K, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Magrini V J, Cook L, McGrath S D, Vickery T L, Wendl M C, Heath S, Watson M A, Link D C, Tomasson M H, Shannon W D, Payton J E, Kulkarni S, Westervelt P, Walter M J, Graubert T A, Mardis E R, Wilson R K, DiPersio J F: Clonal evolution in relapsed acute

myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. Nature, 481: 506-510 (2012)

33. Döhner H, Estey E H, Amadori S, Appelbaum F R, Buchner T, Burnett A K, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson R A, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele G J, Sanz M A, Sierra J, Tallman M S, Lowenberg B, Bloomfield C D, European LeukemiaNet: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood, 115: 453-474 (2010)
34. Döhner K, Schlenk R F, Habdank M, Scholl C, Rucker F G, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H: Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. Blood, 106: 3740-3746 (2005)
35. Döhner K, Tobis K, Ulrich R, Fröhling S, Benner A, Schlenk R F, Döhner H: Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. J.Clin.Oncol., 20: 3254-3261 (2002)
36. Dumbar T S, Gentry G A, Olson M O: Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. Biochemistry, 28: 9495-9501 (1989)
37. Enomoto T, Lindstrom M S, Jin A, Ke H, Zhang Y: Essential role of the B23/NPM core domain in regulating ARF binding and B23 stability. J.Biol.Chem., 281: 18463-18472 (2006)
38. Esteve J, Escoda L, Martin G, Rubio V, Diaz-Mediavilla J, Gonzalez M, Rivas C, Alvarez C, Gonzalez San Miguel J D, Brunet S, Tomas J F, Tormo M, Sayas M J, Sanchez Godoy P, Colomer D, Bolufer P, Sanz M A, Spanish Cooperative Group PETHEMA: Outcome of patients with acute promyelocytic leukemia failing to front-line treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy (PETHEMA protocols LPA96 and LPA99): benefit of an early intervention. Leukemia, 21: 446-452 (2007)
39. Estey E, Döhner H: Acute myeloid leukaemia. Lancet, 368: 1894-1907 (2006)
40. Falini B, Mason D Y: Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. Blood, 99: 409-426 (2002)
41. Falini B, Mecucci C, Saglio G, Lo Coco F, Diverio D, Brown P, Pane F, Mancini M, Martelli M P, Pileri S, Haferlach T, Haferlach C, Schnittger S: NPM1 mutations and cytoplasmic nucleophosmin are mutually exclusive of recurrent genetic abnormalities: a comparative analysis of 2562 patients with acute myeloid leukemia. Haematologica, 93: 439-442 (2008)
42. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettirossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci P G, Martelli M F, GIMEMA Acute Leukemia Working Party: Cytoplasmic nucleophosmin in acute

myelogenous leukemia with a normal karyotype. N.Engl.J.Med., 352: 254-266 (2005)

43. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli M P, Liso A, Gorello P, Mandelli F, Mecucci C, Martelli M F: Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. Haematologica, 92: 519-532 (2007a)
44. Falini B, Nicoletti I, Martelli M F, Mecucci C: Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. Blood, 109: 874-885 (2007b)
45. Falini B, Pileri S, Zinzani P L, Carbone A, Zagonel V, Wolf-Peeters C, Verhoef G, Menestrina F, Todeschini G, Paulli M, Lazzarino M, Giardini R, Aiello A, Foss H D, Araujo I, Fizzotti M, Pelicci P G, Flenghi L, Martelli M F, Santucci A: ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. Blood, 93: 2697-2706 (1999)
46. Fauci A S, Dietel M, Harrison T R, Charité - Universitätsmedizin: Harrisons Innere Medizin. 17 Aufl, dt Ausg, ABW Wissenschaftsverl. u.a., Berlin: 845-857 (2009)
47. Feuerstein N, Chan P K, Mond J J: Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. Implication for the role of the nucleolus in early transduction of mitogenic signals. J.Biol.Chem., 263: 10608-10612 (1988)
48. Freeman S D, Jovanovic J V, Grimwade D: Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. Semin.Oncol., 35: 388-400 (2008)
49. Fröhling S, Schlenk R F, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K, AML Study Group Ulm. Acute myeloid leukemia: Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. Blood, 100: 4372-4380 (2002)
50. Fröhling S, Schlenk R F, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K: CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. J.Clin.Oncol., 22: 624-633 (2004)
51. Fröhling S, Skelin S, Liebisch C, Scholl C, Schlenk R F, Döhner H, Döhner K, Acute Myeloid Leukemia Study Group, Ulm: Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. J.Clin.Oncol., 20: 2480-2485 (2002)
52. Gallagher S J, Kefford R F, Rizos H: The ARF tumour suppressor. Int.J.Biochem.Cell Biol., 38: 1637-1641 (2006)
53. Gilliland D G, Jordan C T, Felix C A: The molecular basis of leukemia. Hematology Am.Soc.Hematol.Educ.Program., 80-97 (2004)
54. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro M G, Gottardi E, Specchia G, Roti G, Rosati R, Martelli M F, Diverio D, Lo Coco F, Biondi A, Saglio G, Mecucci C, Falini B: Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. Leukemia, 20: 1103-1108 (2006)

55. Grimwade D, Hills R K, Moorman A V, Walker H, Chatters S, Goldstone A H, Wheatley K, Harrison C J, Burnett A K, National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group: Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. Blood, 116: 354-365 (2010)
56. Grimwade D, Jovanovic J V, Hills R K, Nugent E A, Patel Y, Flora R, Diverio D, Jones K, Aslett H, Batson E, Rennie K, Angell R, Clark R E, Solomon E, Lo-Coco F, Wheatley K, Burnett A K: Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. J.Clin.Oncol., 27: 3650-3658 (2009)
57. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison C J, Wheatley K, Burnett A K, Goldstone A H, Medical Research Council Adult Leukemia Working Party: The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. Blood, 98: 1312-1320 (2001)
58. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K, Pandolfi P P: Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. Nature, 437: 147-153 (2005)
59. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi P P: Nucleophosmin and cancer. Nat.Rev.Cancer., 6: 493-505 (2006)
60. Herold G: Innere Medizin 2013: eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Selbstverl, Köln: 91-97 (2013)
61. Hingorani K, Szebeni A, Olson M O: Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. J.Biol.Chem., 275: 24451-24457 (2000)
62. Hokland P, Ommen H B: Towards individualized follow-up in adult acute myeloid leukemia in remission. Blood, 117: 2577-2584 (2011)
63. Hsu C Y, Yung B Y: Over-expression of nucleophosmin/B23 decreases the susceptibility of human leukemia HL-60 cells to retinoic acid-induced differentiation and apoptosis. Int.J.Cancer, 88: 392-400 (2000)
64. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW: World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press, (2001)
65. Kayser S, Döhner K, Krauter J, Kohne C H, Horst H A, Held G, von Lilienfeld-Toal M, Wilhelm S, Kundgen A, Gotze K, Rummel M, Nachbaur D, Schlegelberger B, Göhring G, Spath D, Morlok C, Zucknick M, Ganser A, Döhner H, Schlenk R F, German-Austrian AMLSG: The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. Blood, 117: 2137-2145 (2011)

66. Krönke J, Schlenk R F, Jensen K O, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik V I, Paschka P, Onken S, Eiwen K, Habdank M, Spath D, Lubbert M, Wattad M, Kindler T, Salih H R, Held G, Nachbaur D, von Lilienfeld-Toal M, Germing U, Haase D, Mergenthaler H G, Krauter J, Ganser A, Göhring G, Schlegelberger B, Döhner H, Döhner K: Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. J.Clin.Oncol., 29: 2709-2716 (2011)
67. Kuo M L, den Besten W, Bertwistle D, Roussel M F, Sherr C J: N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. Genes Dev., 18: 1862-1874 (2004)
68. Kurki S, Peltonen K, Latonen L, Kiviharju T M, Ojala P M, Meek D, Laiho M: Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. Cancer.Cell., 5: 465-475 (2004)
69. Lambert B, Buckle M: Characterisation of the interface between nucleophosmin (NPM) and p53: potential role in p53 stabilisation. FEBS Lett., 580: 345-350 (2006)
70. Lee S Y, Park J H, Kim S, Park E J, Yun Y, Kwon J: A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks. Biochem.J., 388: 7-15 (2005)
71. Leong S M, Tan B X, Bte Ahmad B, Yan T, Chee L Y, Ang S T, Tay K G, Koh L P, Yeoh A E, Koay E S, Mok Y K, Lim T M: Mutant nucleophosmin deregulates cell death and myeloid differentiation through excessive caspase-6 and -8 inhibition. Blood, 116: 3286-3296 (2010)
72. Li J, Sejas D P, Rani R, Koretsky T, Bagby G C, Pang Q: Nucleophosmin regulates cell cycle progression and stress response in hematopoietic stem/progenitor cells. J.Biol.Chem., 281: 16536-16545 (2006)
73. Liso A, Castiglione F, Cappuccio A, Stracci F, Schlenk R F, Amadori S, Thiede C, Schnittger S, Valk P J, Döhner K, Martelli M F, Schaich M, Krauter J, Ganser A, Martelli M P, Bolli N, Lowenberg B, Haferlach T, Ehninger G, Mandelli F, Döhner H, Michor F, Falini B: A one-mutation mathematical model can explain the age incidence of acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1). Haematologica, 93: 1219-1226 (2008)
74. Lowenberg B, Beck J, Graux C, van Putten W, Schouten H C, Verdonck L F, Ferrant A, Sonneveld P, Jongen-Lavrencic M, von Lilienfeld-Toal M, Biemond B J, Vellenga E, Breems D, de Muijnck H, Schaafsma R, Verhoef G, Döhner H, Gratwohl A, Pabst T, Ossenkoppele G J, Maertens J, Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group (HOVON), German Austrian AML Study Group (AMLSG), Swiss Group for Clinical Cancer Research Collaborative Group (SAKK): Gemtuzumab ozogamicin as postremission treatment in AML at 60 years of age or more: results of a multicenter phase 3 study. Blood, 115: 2586-2591 (2010)

75. Mariano A R, Colombo E, Luzi L, Martinelli P, Volorio S, Bernard L, Meani N, Bergomas R, Alcalay M, Pelicci P G: Cytoplasmic localization of NPM in myeloid leukemias is dictated by gain-of-function mutations that create a functional nuclear export signal. Oncogene, 25: 4376-4380 (2006)
76. Mitelman F.: Guidelines for Cancer Cytogenetics Supplement to ISCN 2005:An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. (1995)
77. Mrozek K, Bloomfield C D: Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. Hematology Am.Soc.Hematol.Educ.Program., 169-177 (2006)
78. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman S P, Bloomfield C D: Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? Blood, 109: 431-448 (2007)
79. Muller M C, Cross N C, Erben P, Schenk T, Hanfstein B, Ernst T, Hehlmann R, Branford S, Saglio G, Hochhaus A: Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. Leukemia, 23: 1957-1963 (2009)
80. Namboodiri V M, Akey I V, Schmidt-Zachmann M S, Head J F, Akey C W: The structure and function of Xenopus NO38-core, a histone chaperone in the nucleolus. Structure, 12: 2149-2160 (2004)
81. Negi S S, Olson M O: Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. J.Cell.Sci., 119: 3676-3685 (2006)
82. Nishimura Y, Ohkubo T, Furuichi Y, Umekawa H: Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. Biosci.Biotechnol.Biochem., 66: 2239-2242 (2002)
83. Okuda M: The role of nucleophosmin in centrosome duplication. Oncogene, 21: 6170-6174 (2002)
84. Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K: Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. FEBS Lett., 506: 272-276 (2001)
85. Olson M O, Wallace M O, Herrera A H, Marshall-Carlson L, Hunt R C: Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction. Biochemistry, 25: 484-491 (1986)
86. Ommen H B, Nyvold C G, Braendstrup K, Andersen B L, Ommen I B, Hasle H, Hokland P, Ostergaard M: Relapse prediction in acute myeloid leukaemia patients in complete remission using WT1 as a molecular marker: development of a mathematical model to predict time from molecular to clinical relapse and define optimal sampling intervals. Br.J.Haematol., 141: 782-791 (2008)
87. Ommen H B, Schnittger S, Jovanovic J V, Ommen I B, Hasle H, Ostergaard M, Grimwade D, Hokland P: Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBFB-MYH11 acute myeloid leukemias. Blood, 115: 198-205 (2010)

88. Papadaki C, Dufour A, Seibl M, Schneider S, Bohlander S K, Zellmeier E, Mellert G, Hiddemann W, Spiekermann K: Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. Br.J.Haematol., 144: 517-523 (2009)
89. Parkin B, Ouillette P, Li Y, Keller J, Lam C, Roulston D, Li C, Shedden K, Malek S N: Clonal evolution and devolution following chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia. Blood, (2012)
90. Paschka P, Schlenk R F, Gaidzik V I, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, Spath D, Kayser S, Zucknick M, Gotze K, Horst H A, Germing U, Döhner H, Döhner K: IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. J.Clin.Oncol., 28: 3636-3643 (2010)
91. Perea G, Lasa A, Aventin A, Domingo A, Villamor N, Queipo de Llano M P, Llorente A, Junca J, Palacios C, Fernandez C, Gallart M, Font L, Tormo M, Florensa L, Bargay J, Marti J M, Vivancos P, Torres P, Berlanga J J, Badell I, Brunet S, Sierra J, Nomdedeu J F, Grupo Cooperativo para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Miel: Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16). Leukemia, 20: 87-94 (2006)
92. Raghavan M, Smith L L, Lillington D M, Chaplin T, Kakkas I, Molloy G, Chelala C, Cazier J B, Cavenagh J D, Fitzgibbon J, Lister T A, Young B D: Segmental uniparental disomy is a commonly acquired genetic event in relapsed acute myeloid leukemia. Blood, 112: 814-821 (2008)
93. Rucker F G, Schlenk R F, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, Habdank M, Kugler C M, Holzmann K, Gaidzik V I, Paschka P, Held G, von Lilienfeld-Toal M, Lubbert M, Fröhling S, Zenz T, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Lichter P, Döhner K, Döhner H: TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. Blood, 119: 2114-2121 (2012)
94. Ruggero D, Pandolfi P P: Does the ribosome translate cancer? Nat.Rev.Cancer., 3: 179-192 (2003)
95. Schlenk R F, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Spath D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H, German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group: Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. N.Engl.J.Med., 358: 1909-1918 (2008)
96. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Falini B, Haferlach C, Haferlach T: Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. Blood, 114: 2220-2231 (2009)
97. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Loffler H, Sauerland C M, Serve H, Buchner T, Haferlach T, Hiddemann W: Analysis of FLT3 length mutations in

1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. Blood, 100: 59-66 (2002)

98. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli M F, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B: Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. Blood, 106: 3733-3739 (2005)
99. Schnittger S, Weisser M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W: New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFBMYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. Blood, 102: 2746-2755 (2003)
100. Scholl C, Schlenk R F, Eiwen K, Döhner H, Fröhling S, Döhner K, AML Study Group: The prognostic value of MLL-AF9 detection in patients with t(9;11)(p22;q23)-positive acute myeloid leukemia. Haematologica, 90: 1626-1634 (2005)
101. Sherr C J: Divorcing ARF and p53: an unsettled case. Nat.Rev.Cancer., 6: 663-673 (2006)
102. Slovak M L, Kopecky K J, Cassileth P A, Harrington D H, Theil K S, Mohamed A, Paietta E, Willman C L, Head D R, Rowe J M, Forman S J, Appelbaum F R: Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. Blood, 96: 4075-4083 (2000)
103. Sugimoto M, Kuo M L, Roussel M F, Sherr C J: Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. Mol.Cell, 11: 415-424 (2003)
104. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Kinoshita T, Emi N, Naoe T: Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. Blood, 106: 2854-2861 (2005)
105. Swerdlow SH, Campo E, HNarris NL: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press, (2008)
106. Thiede C, Creutzig E, Reinhardt D, Ehninger G, Creutzig U: Different types of NPM1 mutations in children and adults: evidence for an effect of patient age on the prevalence of the TCTG-tandem duplication in NPM1-exon 12. Leukemia, 21: 366-367 (2007)
107. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, Ehninger G: Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). Blood, 107: 4011-4020 (2006)
108. Thol F, Damm F, Ludeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, Yun H, Göhring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, Lubbert M, Kanz L, Fiedler W, Kirchner H, Heil G, Krauter J, Ganser A, Heuser M: Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. J.Clin.Oncol., 29: 2889-2896 (2011)

109. Vardiman J W, Harris N L, Brunning R D: The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood, 100: 2292-2302 (2002)
110. Vassiliou G S, Cooper J L, Rad R, Li J, Rice S, Uren A, Rad L, Ellis P, Andrews R, Banerjee R, Grove C, Wang W, Liu P, Wright P, Arends M, Bradley A: Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice. Nat.Genet., 43: 470-475 (2011)
111. Verhaak R G, Goudswaard C S, van Putten W, Bijl M A, Sanders M A, Hugens W, Uitterlinden A G, Erpelinck C A, Delwel R, Lowenberg B, Valk P J: Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. Blood, 106: 3747-3754 (2005)
112. Wang D, Umekawa H, Olson M O: Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. Cell.Mol.Biol.Res., 39: 33-42 (1993)
113. Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang X W: Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. Nat.Cell Biol., 7: 823-830 (2005)
114. Wu M H, Chang J H, Yung B Y: Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. Carcinogenesis, 23: 93-100 (2002)
115. Yu Y, Maggi L B,Jr, Brady S N, Apicelli A J, Dai M S, Lu H, Weber J D: Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. Mol.Cell.Biol., 26: 3798-3809 (2006)
116. Yun J P, Chew E C, Liew C T, Chan J Y, Jin M L, Ding M X, Fai Y H, Li H K, Liang X M, Wu Q L: Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. J.Cell.Biochem., 90: 1140-1148 (2003)
117. Yung B Y, Chan P K: Identification and characterization of a hexameric form of nucleolar phosphoprotein B23. Biochim.Biophys.Acta, 925: 74-82 (1987)
118. Zeller K I, Haggerty T J, Barrett J F, Guo Q, Wonsey D R, Dang C V: Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation. J.Biol.Chem., 276: 48285-48291 (2001)
119. Zhang Y, Zhang M, Yang L, Xiao Z: NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. Leuk.Res., 31: 109-111 (2007)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Konstanze Döhner für die interessante und wissenschaftlich bedeutende Aufgabenstellung, zahllose hilfreiche Korrekturvorschläge und vor allem für die gute Betreuung. Ebenso möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Jan Krönke für seine Hilfe bei zahlreichen Fragen, sein Geduld und für die Möglichkeit, als Co-Autor an seinen Veröffentlichungen mitzuarbeiten, bedanken.

Ein großer Dank geht außerdem an das gesamte Laborteam, im Besonderen an Shiva Onken, für die vielen Anregungen hinsichtlich meiner wissenschaftlichen Arbeit und die freundlichen Unterstützung, wenn Versuche wieder einmal nicht funktioniert haben.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meinen Schwestern, ohne die mein Studium und meine Doktorarbeit niemals möglich geworden wären und die meine Doktorarbeit in mühsamen Stunden auf Grammatik-, Rechtschreib- und Logikfehler durchsuchten.

Ebenfalls geht ein großer Dank an meine Freunde, die mich immer, wenn es nötig war, mit abenteuerlichen Unternehmungen und Urlauben ablenkten.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.