

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

Untersuchungen von NPM1-Mutationen bei Patienten
mit akuter myeloischer Leukämie bei Diagnosestellung
und im Verlauf

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katja Graul

aus Zeitz

Datum der Promotion: 12.09.2014

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Akute myeloische Leukämie.....	6
1.2	Einordnung nach der FAB-Klassifikation.....	6
1.3	Einordnung nach WHO-Klassifikation	7
1.4	Prognoseabschätzung.....	8
1.5	Zytogenetik	9
1.6	Chimärismus.....	9
1.7	Minimale Resterkrankung.....	10
1.8	Molekulargenetik	10
1.8.1	NPM1	10
1.8.2	FLT3	13
1.8.3	Weitere Mutationen	13
1.9	Fragestellung.....	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Kits und Chemikalien	16
2.1.2	Geräte	18
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	DNA-Gewinnung	19
2.2.2	DNA-Konzentrationsmessung	20
2.2.3	Polymerasekettenreaktion	20
2.2.4	NPM1 Sequenzierung	22
2.2.5	Quantitative Real-time PCR	23
2.2.6	Vergleich zwischen nicht amplifizierten und amplifizierten Proben	26
2.3	Patienten	26
2.3.1	Allgemeines	26
2.3.2	Patientencharakteristika	26
2.4	Statistik.....	27

3	ERGEBNISSE	28
3.1	NPM1-Mutationen.....	29
3.2	Vergleich der klinischen Parameter zwischen NPM1-positiven und -negativen Patienten.....	29
3.2.1	FLT3-Mutation	29
3.2.2	Alter	29
3.2.3	Geschlecht	30
3.2.4	FAB-Subtypen	31
3.2.5	Zytogenetik	32
3.2.5.1	Zytogenetik allgemein	32
3.2.5.2	Zytogenetik aberrant	32
3.2.6	Zellzahl bei Erstdiagnose	33
3.2.6.1	Leukozyten	33
3.2.6.2	Blasten	34
3.2.7	AML-Typ	34
3.2.8	Komplette Remission	35
3.2.9	Rezidiv	36
3.2.10	Todesursache	36
3.3	Überlebenszeitanalysen	37
3.3.1	Gesamtüberleben	37
3.3.2	Krankheitsfreies Überleben	38
3.3.3	Ereignis freies Überleben	40
3.4	Quantitative NPM1-Analyse	42
3.4.1	Patient 1	42
3.4.2	Patient 2	43
3.4.3	Patient 3	44
3.4.4	Patient 4	45
3.4.5	Patient 5	46
3.4.6	Patient 6	47
3.4.7	Patient 7	48
3.4.8	Patient 8	49
4	DISKUSSION	50
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
6	LITERATURVERZEICHNIS	60
7	ANHANG	68
	Lebenslauf	68
	Erklärung	69
	Danksagung	70

Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
APL	akute Promyelozytenleukämie
ARF	alternative reading frame
ASXL1	additional sex combs like 1
ATRA	all-trans-retinoic acid
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin-dependent kinase
CEBPA	CCAAT enhancer binding protein alpha
CR	komplette Remission
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT3A	DNA methyltransferase 3A
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ED	Erstdiagnose
FAB-Klassifikation	French-American-British-Klassifikation
FLT3	FMS-like Tyrosinkinase 3
- ITD	internal tandem duplication
- TKD	tyrosine kinase domain
FP	Vorwärtsprimer
FRET	fluorescence resonance energy transfer
ggf.	gegebenenfalls
IDH 1/2	isocitrate dehydrogenase 1/2
inter	intermediär
KM	Knochenmark
L. a.	Leukämie assoziiert
LAIPs	leukemia-associated aberrant immunophenotypes
LDH	Laktatdehydrogenase
MLL	mixed-lineage-leukemia
- PTD	partial tandem duplication
MRD	minimale Resterkrankung

n. n.	nicht nachweisbar
neg	negativ
NES	nuclear export signal
NPM1	Nukleophosmin
Pat	Patienten
pB	peripheres Blut
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHF6	plant homeodomain finger 6
pos	positiv
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Rückwärtsprimer
sec	sekundär
STR	short tandem repeats
T. a.	Therapie assoziiert
TET2	ten-eleven translocation 2
Tx	Transplantation
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen je Minute
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) stellt im Erwachsenenalter eine häufige leukämische Erkrankung dar. Diagnosestellung und Therapie folgen Empfehlungen, welche auf langjährigen Erfahrungen und intensiven Forschungsaktivitäten beruhen. Die Patienten bilden dennoch eine sehr heterogene Gruppe und um eine Prognoseabschätzung zu wagen und eine optimale Therapie zu ermöglichen, werden Stratifizierungsmuster gesucht. Beruhten erste Klassifizierungsversuche noch auf morphologischen Kriterien, bilden heute molekulargenetische Befunde die Grundlage hierfür (Bacher, Schnittger, et al., 2009; H Döhner et al., 2010).

1.2 Einordnung nach der FAB-Klassifikation

Auch wenn die French-American-British-Klassifikation (FAB) heute noch regelmäßig genutzt wird, besitzt sie nur eine äußerst begrenzte prognostische Aussagekraft und therapeutische Konsequenz. Die FAB-Klassifikation stellt ein Einteilungsprinzip für die leukämischen Erkrankungen des Blutes beruhend auf morphologischen und zytochemischen Eigenschaften der Blasten dar (Bennett et al., 1985). Die Diagnose der akuten myeloischen Leukämie setzt in dieser Klassifikation den Nachweis von mindestens 30% Blasten voraus, die auf Grund ihrer Zelllinienzugehörigkeit eine Einordnung in die Untergruppen M0-M7 ermöglichen.

Dabei hat sich mit dem technischen Fortschritt vor allem die Immunphänotypisierung als sinnvolle Ergänzung zu den ursprünglich rein morphologischen Kriterien erwiesen (Neame et al., 1986) und die CD-Oberflächenmarker (cluster of differentiation) der Blasten dienen heute der Zelllinienzuordnung.

Die ursprüngliche Idee war, durch eindeutige und klinikübergreifende Diagnosekriterien, Patienten zu größeren Gruppen zusammenfassen zu können und Aussagen zu Prognose und Behandlung möglich zu machen. Dieser Wunsch hat sich mit dieser Klassifikation nur in begrenztem Ausmaß erfüllen lassen. Beachtlich ist allerdings, dass mit wachsendem Verständnis der typischen zytogenetischen Veränderungen der AML

eine Zuordnung bestimmter Aberrationen zu den zuvor bestimmten morphologischen Gruppen möglich war. Dieser Zusammenhang zeigt sich zwischen AML M2 und t(8;21), AML M3 und t(15;17), sowie bei AML M4eo und inv16 bzw. t(16;16).

Patienten der Untergruppe M3, auch akute Promyelozytenleukämie (APL) genannt, fielen ursprünglich durch ihre hohen Komplikations- und Rezidivraten auf. Der Einsatz und die Wirksamkeit von ATRA (all-trans-retinoic acid) in der Therapie der APL verbesserte die Prognose der Patienten erheblich (Huang et al., 1988) und wie sich herausstellte, handelte es sich um eine Targettherapie, welche den Differenzierungsblock löst (Mueller et al., 2006). Es gelang der Nachweis einer für diese Untergruppe typischen Mutation t(15;17) (PML-RARA), welche den Retinoic Acid Receptor α betrifft und an der Leukämogenese durch Differenzierungsstopp beteiligt ist (de The et al., 1990; Reiter et al., 2004). Daneben bietet die PML-RARA-Mutation eine Grundlage für die MRD-Diagnostik (minimale Resterkrankung) und ermöglicht eine frühere Registrierung eines Rezidivs (Diverio et al., 1998; Jurcic et al., 2001), dessen zeitnahe Therapie zu einem Überlebensvorteil für die Patienten führt (Lo Coco et al., 1999).

1.3 Einordnung nach WHO-Klassifikation

Die WHO hat das Bestreben, eine auf anerkannten Diagnosekriterien beruhende Klassifikation für Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes zu erstellen, die morphologische, immunophänotypische, genetische und klinische Erkenntnisse Prognose und Therapie relevant erfasst.

Die aktuelle Version von 2008 setzt für die Diagnose der akuten myeloischen Leukämie in Abgrenzung zum myelodysplastischen Syndrom eine Anzahl von 20% Blasten im Knochenmark fest.

Darüber hinaus gibt es u. a. eine Gruppe mit bestimmten genetischen Aberrationen, die sich als krankheitsspezifisch erwiesen haben, eine Gruppe mit nicht näher spezifizierten Eigenschaften, die ähnlich der FAB-Klassifikation aufgebaut ist und eine Gruppe, die sekundäre oder Therapie assoziierte AML gesondert betrachtet.

Tabelle 1: Es existieren sieben Untergruppen der AML mit spezifischen genetischen Aberrationen in der WHO-Klassifikation (Vardiman, 2010).

Genetische Aberration	Assoziiertes Fusionsgen
AML mit t(8;21)(q22;q22)	(RUNX1-RUNX1T1)
AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(q13.1;q22)	(CBFB-MyH11)
APL mit t(15;17)(q22;q12)	(PML-RARA)
AML mit t(9;11)(p22;q2)	(MLL T3-MLL)
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 mit t(1;22)(p13;q13)	(RBM15-MKL1)

In dieser Version werden auch erstmals zwei vorläufige Untergruppen, AML mit mutiertem NPM1 (Nucleophosmin) bzw. CEBPA (CCAAT enhancer binding protein alpha), innerhalb der Gruppe der AML mit typischen genetischen Aberrationen aber ohne zytogenetische Veränderungen aufgenommen. Dies zeigt das Bemühen, aktuelle Erkenntnisse zeitnah zu integrieren (Vardiman, 2010; Vardiman et al., 2009).

1.4 Prognoseabschätzung

Es hat sich gezeigt, dass ein höheres Alter unabhängig von anderen Faktoren wie Karyotyp, NPM1pos/FLT3neg, Leukozytenzahl, LDH (Laktatdehydrogenase) und Blastenzahl an Tag 16 ein kürzeres Gesamtüberleben und eine kürzere Remissionsdauer bewirkt (Büchner et al., 2009).

Neben dem Erkrankungsalter hat man weitere Einflussfaktoren unter den bei Diagnose erhobenen Parametern gefunden und versucht, diese Erkenntnisse zur Bildung von Risikoscores und zur Unterstützung für die Therapieentscheidung zu verwenden.

Patienten zwischen 15 und 60 Jahren konnten drei prognostischen Gruppen zugeordnet werden, die von unterschiedlichen Therapieformen (allogene Transplantation, autologe Transplantation, Chemotherapie) unterschiedlich gut profitieren. Zur Scorebildung werden folgende Faktoren herangezogen: Alter, CD34-positive Blastenzahl,

FLT3-ITD/FLT3-Wildtyp-Verhältnis, zytogenetische Risikogruppe, de novo/sec AML (Pfirrmann et al., 2012).

Für über 60-jährige Patienten lässt sich ein Score basierend auf klinischen Daten (Temperatur, Alter, de novo/sec AML, Hämoglobin, Thrombozytenzahl, Fibrinogen und LDH) errechnen, der Aussagen zum Erreichen einer CR (kompletten Remission) oder auch eines zeitigen Todes ermöglicht (Krug et al., 2010).

1.5 Zytogenetik

Zytogenetische Aberrationen haben sich als gute Möglichkeit zur Risikostratifizierung erwiesen. Es können drei Risikogruppen gebildet werden, die Aussagen bezüglich des Erreichens einer CR, der Rezidivwahrscheinlichkeit und des Gesamtüberlebens zulassen.

In der Gruppe mit gutem Risiko befinden sich Patienten mit t(8;21), t(15;17) und inv(16). Komplexe Karyotypen, -5/del(5q), 3q-Aberrationen oder -7 werden einer schlechten Prognosegruppe mit hohem Risikoprofil zugeordnet. Ein normaler Karyotyp, alle restlichen Aberrationen und del(9q), sowie del(7q) werden einer intermediären Risikogruppe zugewiesen. Die prognostisch guten bzw. auch die prognostisch schlechten Aberrationen behalten auch bei Auftreten weiterer Veränderungen des Karyotyps ihre Aussagekraft (Grimwade et al., 1998).

1.6 Chimärismus

Der Begriff wird benutzt, um auszudrücken, dass ein Lebewesen Träger von Zellen mit genetischer Information verschiedener Individuen ist.

Im Tierexperiment konnte bewiesen werden, dass die Tiere hämatotoxische Strahlendosen durch einen Stammzelltransfer von anderen überlebten (Ford et al., 1956). Damals waren noch lichtmikroskopisch nachweisbare Chromosomenanomalien für die Unterscheidung von Spender- und Empfängerzellen nötig. Heute stellt die Nutzung von short tandem repeats (STR) eine verbreitete und gut praktikable Methode dar (Thiede et al., 1999). Durch Vergleich verschiedener Loci kann das Verhältnis von

Spender- und Empfängerzellen mit einer Sensitivität von 1-5% ermittelt werden. Ein kompletter bzw. ein gemischter Chimärismus lässt dann Aussagen bezüglich des Transplantatengraftments oder auch eines Rezidivs zu (Bader et al., 1997; Blau et al., 2007).

1.7 Minimale Resterkrankung

Unter minimaler Resterkrankung (MRD) versteht man die Möglichkeit des Nachweises von Leukämiezellen auf einem Niveau, das die herkömmliche morphologische Methode nicht erbringen kann. Es werden Methoden wie die Durchflusszytometrie oder die quantitative PCR (Polymerasekettenreaktion) genutzt. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf dem Nachweis so genannter LAIPs (leukemia-associated aberrant immunophenotypes), während die quantitativen PCR-Methoden Transkripte von Fusionsgenen, Genmutationen (wie beispielsweise NPM1) oder aberrant exprimierte Gene als Ziele nutzen (Kern et al., 2008). Während die Durchflusszytometrie bis zu einer aberranten Zelle unter 10 000 nachweisen kann (Kern et al., 2010), ist die quantitative PCR noch sensitiver (Campana, 2003; Shook et al., 2009).

Damit werden eine erheblich genauere Abschätzung der verbliebenen malignen Zellen mit entsprechender Einschätzung des Therapieerfolgs sowie prognostische Aussagen möglich (Campana, 2003; Kern et al., 2008).

1.8 Molekulargenetik

1.8.1 NPM1

Nukleophosmin (Chan et al., 1989), auch unter dem Namen B23 (Feuerstein et al., 1988) oder NO38 (Schmidt-Zachmann et al., 1987) beschrieben, ist ein vornehmlich nukleoläres Protein mit vielfältigen Aufgaben. Eine davon stellt die Transportfunktion zwischen Nukleus und Zytoplasma dar (Borer et al., 1989). Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass Nukleophosmin z. B. mit der Inhibierung der Aggregation von Proteinen, typische Eigenschaften eines Chaperons besitzt (Szebeni et al., 1999). Es ist an der Entwicklung des Ribosoms beteiligt (Itahana et al., 2003) und zeigt

Ribonukleaseaktivität (Herrera et al., 1995). Durch die Interaktion mit vielen verschiedenen Partnern, wie Nukleinsäuren oder Transkriptionsfaktoren, ist Nukleophosmin u. a. in der Lage, antiapoptotische Effekte zu vermitteln (Ahn et al., 2005). Daneben wird bei der Proliferation von Lymphozyten ein Anstieg von Nukleophosmin verzeichnet (Dergunova et al., 2002). Für eine erfolgreiche Zellteilung ist die Verdopplung des Zentromers essentiell und es wurde festgestellt, dass die CDK2/Cyclin E vermittelte Phosphorylierung von NPM1 für Duplikation bzw. die Initiierung der Duplikation des Zentromers nötig ist (Tarapore, Okuda et al. 2002). Außerdem kann NPM1 durch Verhinderung des Abbaus von ARF (alternative reading frame tumor suppressor) (Chen et al., 2010) mit p53 interagieren. Experimentell stabilisiert eine Überexpression von NPM1 p53 (Colombo et al., 2002).

Bedenkt man, dass Tumorzellen sich durch Eigenschaften wie unkontrollierte Proliferation, Immortalität und Dedifferenzierung auszeichnen, ist es nicht überraschend, dass Nukleophosmin in den Fokus der Leukämieforschung getreten ist.

Falini et al. gelang der Nachweis der NPM1-Mutation bei Leukämiepatienten. Mit Vorkommen bei 35% der Patienten mit primärer AML stellt sie eine häufige Mutation dar (Falini et al., 2005). Das physiologischer Weise hauptsächlich im Nukleolus vorhandene Protein zeigt in Leukämiezellen ein vermehrtes zytosolisches Vorkommen, was Ausdruck einer vorhandenen Mutation ist. Diese bedingt eine Veränderung des C-Terminus (Verlust von Tryptophan) des Proteins und führt zu einem nuclear export signal (NES) (Falini, Martelli, et al., 2006). Ging man am Anfang davon aus, dass die Veränderung des NES für die Rückführung in das physiologische Kompartiment ausreicht, hat man beobachtet, dass die Veränderungen im C-Terminus des Proteins zuvor ebenfalls korrigiert werden müssen, um dies zu erreichen (Falini, Bolli, et al., 2006). Im Normalzustand weist die Polypeptidkette unterschiedliche Abschnitte auf. N-terminal findet sich ein vorwiegend unpolarer Anteil, danach eine zentrale Region mit zwei sauren Abschnitten und einem Lokalisationssignal, gefolgt von einem basischen C-Terminus. Es kann eine Verbindung zwischen Struktur und Funktion des Proteins gezogen werden und dem N-Terminus eine Chaperon-Aktivität und der zentralen Region eine Ribonukleaseaktivität zugeschrieben werden (Hingorani et al., 2000).

Es wurden circa 50 verschiedene Mutationen im Exon 12 beschrieben und bei den meisten handelt es sich um eine Insertion von vier Basen. So auch bei den drei häufigsten Mutationstypen A (Insertion TCTG), B (Insertion CATG) und D (Insertion CCTG), die zusammen über 90% aller NPM1-Mutationen ausmachen (Falini et al., 2005; Schnittger et al., 2009). Darüber hinaus wurden auch auf Exon 11 Mutationen beschrieben (Albiero et al., 2007; Pitiot et al., 2007).

Die Funktionen von NPM1 sind offenbar elementar wichtig, so dass ein Knock-out-Versuch bei Mäuseembryonen nach einigen Tagen auf Grund von mangelnder Gehirnentwicklung und schwerwiegender hämatologischer Dysfunktion letal verlief (Grisendi et al., 2005) und in den Leukämiezellen auch immer Wildtyp-Nukleophosmin vorkommen muss. Bei Untersuchung von AML-Zelllinien auf das Vorhandensein einer NPM1-Mutation konnte in OCI/AML3 eine Mutation vom Typ A nachgewiesen werden (Quentmeier et al., 2005). So bietet sich die Möglichkeit, die Mutation in der Zellkultur zu erforschen. Auch an Tiermodellen ist dies möglich. Es ist gelungen, bei transgenen Mäusen mit zytoplasmatischem NPM1 eine Myeloproliferation in Milz und Knochenmark nachzuweisen (Cheng et al., 2010). Im Zebrafisch konnte bei Vorhandensein von zytoplasmatischem NPM1 ebenfalls ein Anstieg an frühen myeloischen Zellen gezeigt werden (Bolli et al., 2010).

Die bekannten Funktionen lassen durchaus an eine kausale Beteiligung der NPM1-Mutation an der AML-Entstehung denken. Darüber hinaus werden aber auch Korrelationen mit klinischen Parametern und ein Einfluss auf Therapieansprechen sowie Prognose berichtet.

So werden bei NPM1-positiven Patienten höhere Leukozyten- und Blastenwerte und CD34-Negativität bei Diagnosestellung beobachtet. Die Mutation tritt vor allem bei Patienten mit normalen Karyotyp auf und kommt häufig zusammen mit einer FLT3-ITD-Mutation vor. Außerdem wird von einem guten Therapieansprechen mit einer hohen CR-Rate berichtet (Becker et al., 2010; Falini et al., 2005; Suzuki et al., 2005; Thiede et al., 2006; Verhaak et al., 2005).

1.8.2 FLT3

Die FMS-like Tyrosinkinase 3 (FLT3) stellt einen Vertreter der Tyrosin-Kinasen der Gruppe 3 dar, der Einfluss auf Überleben und Differenzierung von Stammzellen hat (Small et al., 1994).

Es gibt zwei relevante Mutationen, die zu einer verstärkten Aktivierung der Kinase und nachfolgenden Signalwegen führen (Hayakawa et al., 2000; Yamamoto et al., 2001). Bei der so genannten FLT3-ITD-Mutation ist es zu einer internen Tandemduplikation in der Juxtamembrandomäne gekommen und bei der FLT3-TKD-Mutation handelt es sich um eine Punktmutation in der Tyrosinkinasedomäne.

Das Vorkommen von FLT3-ITD wird mit einer Häufigkeit von circa 20% unter AML-Patienten angegeben (Schnittger et al., 2002; Thiede et al., 2002; Yokota et al., 1997), während FLT3-TKD mit etwa 7% deutlich seltener vorkommt (Thiede et al., 2002; Yamamoto et al., 2001).

Wie eine NPM1-Mutation, sind auch FLT3-Mutationen mit bestimmten diagnostischen Werten signifikant verbunden. So wird die Assoziation mit erhöhten Leukozyten- und Blastenwerten und ein vermehrtes Vorkommen bei Patienten mit normalem Karyotyp beschrieben. Außerdem scheint das Verhältnis zwischen mutiertem und Wildtyp-FLT3 für FLT3-ITD prognostische Aussagen zuzulassen (Gale et al., 2008; Thiede et al., 2002).

1.8.3 Weitere Mutationen

Bei Untersuchung von AML-Patienten auf 18 Mutationen, konnte bei 97,3% festgestellt werden, dass sie Träger mindestens einer Mutation sind. Wobei FLT3- und NPM1-Mutationen die am häufigsten vorkommenden Mutationen darstellen. Neben der Erkenntnis, dass es ein bestimmtes Muster von regelmäßig miteinander vorkommenden und gar nicht kombinierten Mutationen gibt, konnte auch gezeigt werden, dass diese Mutationen eine verbesserte Risikostratifizierung ermöglichen. Die Gruppe mit zytogenetisch intermediärem Risikoprofil (aberranter Karyotyp der intermediären Risikogruppe oder normaler Karyotyp) kann nochmals stratifiziert werden. Dabei kommt

der FLT3-ITD-Mutation eine zentrale Rolle zu, da ihr Vorhandensein die prognostische Bedeutung weiterer Mutationen stark beeinflusst. So kommen FLT3-ITD-negative Patienten mit NPM1-Mutation und IDH1- oder IDH2-Mutation (isocitrate dehydrogenase) in die gute Risikogruppe, während FLT3-ITD-negative Patienten mit gleichzeitig mutierten TET2 (ten-eleven translocation 2), MLL-PTD (mixed-lineage-leukemia partial tandem duplication), ASXL1 (additional sex combs like 1) oder PHF6 (plant homeodomain finger 6) und FLT3-ITD-positive Patienten bei Abwesenheit einer CEBPA-Mutation oder zusätzlichem Auftreten einer Mutation von TET2, MLL-PTD oder DNMT3A (DNA methyltransferase 3A) oder Vorhandensein einer Trisomie 8 der Gruppe mit hohem Risikoprofil zugeordnet werden können. Darüber hinaus profitieren Patienten mit mutiertem DNMT3A, NPM1 oder MLL-Translokationen von einer dosisintensivierten Induktionstherapie (Patel et al., 2012).

1.9 Fragestellung

Für die heterogene Gruppe der AML-Patienten ein Klassifizierungssystem zu finden, das sowohl eine Risiko adaptierte, kausale Behandlung als auch eine optimale Verlaufsbetreuung ermöglicht, ist ein erstrebenswertes Ziel.

Dies wird mit den sich weiterentwickelnden technischen Möglichkeiten und entsprechendem Wissenszuwachs zwar immer wahrscheinlicher, setzt aber die beständige Suche nach neuen Leukämie assoziierten Veränderungen und Abgleich mit bereits bekannten voraus.

Zum einen erscheint es interessant, mit welchen prognostisch bekannten Parametern der vermutliche Einflussfaktor vergesellschaftet bzw. vielleicht sogar kausal verknüpft ist. Des Weiteren ist der Einfluss auf objektive Daten wie die Überlebenszeiten von enormer Wichtigkeit oder auch die Eignung als verlässlicher Verlaufsparemeter. Deshalb sollen nachfolgende Fragen mit dieser Arbeit beantwortet werden:

- I) Bestehen in unserem Patientenkollektiv signifikante Unterschiede zwischen NPM1-positiven und -negativen Patienten bezüglich des Erkrankungsalters, des Geschlechts, vorhandener FLT3-Mutationen, normaler oder aberranter Zytogenetik, bestimmter FAB-Untergruppen, der AML-Typen, der Leukozyten- und Blastenwerte bei Erstdiagnose, des Erreichens einer kompletten Remission oder des Auftretens eines Rezidivs und ggf. der Todesart?
- II) Zeigen sich Unterschiede im Gesamtüberleben, im krankheitsfreien und Ereignis freien Überleben in Bezug auf den NPM1-Status?
- III) Eignet sich die quantitative NPM1-Analyse, hier am Beispiel von 8 Patienten betrachtet, zur Verlaufskontrolle?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Kits und Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Kits und Chemikalien

Produkt	Hersteller
<i>AllPrep DNA/RNA Mini Kit</i> <ul style="list-style-type: none">- Buffer RLT Plus- Buffer AW1- Buffer AW2- Buffer EB	Qiagen, Hilden D
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i> <ul style="list-style-type: none">- Buffer PBI- Buffer PE- Buffer EB	Qiagen, Hilden D
<i>DyeEx 2.0 Spin Kit</i>	Qiagen, Hilden D
<i>BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i> <ul style="list-style-type: none">- Big Dye	Applied Biosystems, Darmstadt D
<i>REPLI-g UltraFast Mini Kit</i> <ul style="list-style-type: none">- Buffer DLB- Stop solution- REPLI-g UltraFast Reaction Buffer- REPLI-g UltraFast DNA Polymerase	Qiagen, Hilden D
MutaQuant Standards	Ipsogen, Marseille F
Ethanol	Baker, Deventer NL
Ficoll Paque Plus	GE Healthcare, München D
PBS-Lösung	Biochrom, Berlin D
Lysepuffer <ul style="list-style-type: none">- 8,29g Ammoniumchlorid- 1g Kaliumhydrogencarbonat- 0,3g Titriplex III (EDTA)	alle Merck, Darmstadt D

Produkt	Hersteller
ABQ-mix	Applied Biosystems, Darmstadt D
FP NPM1	Metabion, Martinsried D
RP NPM1 A/B/D	Metabion, Martinsried D
FP HCK	Metabion, Martinsried D
RP HCK	Metabion, Martinsried D
NPM1 FAM-MGB-Sonde	Applied Biosystems, Darmstadt D
HCK HEX-Sonde	Metabion, Martinsried D
MgCl ₂ -Lösung (25mM)	Applied Biosystems, Darmstadt D
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, Darmstadt D
POP6-Polymer	Applied Biosystems, Darmstadt D
Genetic Analyzer 10x Running Buffer	Applied Biosystems, Darmstadt D
dNTPs (25mM)	Amersham Bioscience, Freiburg D
10x PCR Puffer	Applied Biosystems, Darmstadt D
Ampli Taq Gold	Applied Biosystems, Darmstadt D
Aqua dest.	Braun, Melsungen D
Primer F	Metabion, Martinsried D
Primer R	Metabion, Martinsried D
Primer R2	Metabion, Martinsried D
5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems, Darmstadt D

2.1.2 Geräte

Tabelle 3 : Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
<i>Thermocycler</i>	
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Boston USA
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt D
DNA Engine Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, München D
<i>Lightcycler</i>	
Rotor Gene 6000	Corbett Research, Mortlake AUS
<i>Zentrifugen</i>	
Mikrozentrifuge Galaxy Mini	VWR, Darmstadt D
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg D
Eppendorf Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg D
<i>Kühlschränke/Gefrierschränke</i>	
Gefrierschrank (-25°C)	Bosch, Stuttgart D
Kühlschrank (4°C)	Bosch, Stuttgart D
<i>Vortexer</i>	
Reax control	Heidolph, Schwabach D
<i>Sequenzier</i>	
ABI 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt D
<i>Spektrometer</i>	
NanoDrop-ND-1000-Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington USA

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Gewinnung

Prinzip

Aus den Blut- bzw. Knochenmarkproben werden als erstes die Leukozyten mittels Zentrifugation extrahiert. Diese werden lysiert und die freiwerdende DNA (Desoxyribonukleinsäure) durch Bindung an eine Membran von der RNA (Ribonukleinsäure) getrennt. Es folgt ein Waschschrift, danach wird die DNA gelöst und steht zur weiteren Verwendung bereit.

Durchführung

Die Probe wurde mit PBS-Puffer gemischt und in ein Zentrifugenröhrchen mit Ficoll Paque Plus gegeben. Dieses wurde bei 2 000 U/min (Umdrehungen je Minute) für 15 min zentrifugiert. Dann konnte die Schicht der Leukozyten abpipettiert und erneut mit PBS-Puffer gemischt werden. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 2 000 U/min für 5 min. Im Sediment befanden sich die Leukozyten, die für die DNA-Extraktion benötigt wurden. Für die folgenden Schritte wurde das AllPrep DNA/RNA Mini Kit benutzt. Zuerst wurden die Zellen mit 600 µl Buffer RLT Plus für 30 min inkubiert. Die lysierten Zellen wurden dann auf eine QIAshredder spin column gegeben, für 2 min bei 14 000 U/min zentrifugiert und so gereinigt. Zur Bindung der DNA an die Säule wurde das homogenisierte Lysat auf die AllPrep DNA spin column gegeben und für 30 s bei 10 000 U/min zentrifugiert. Es waren noch zwei Waschschriffe nötig, bei denen 500 µl Buffer AW1 bzw. 500 µl Buffer AW2 auf die Säule gegeben wurde, gefolgt von Zentrifugationen bei 10 000 U/min für 30 s bzw. bei 14 000 U/min für 2 min. Danach wurden 50 µl oder 100 µl Buffer EB auf die Säule gegeben und diese nach 1 min Inkubationszeit für 1 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Dann stand die DNA für die PCR bereit.

2.2.2 DNA-Konzentrationsmessung

Prinzip

Die Photometrie basiert darauf, dass Substanzen Licht einer für sie typischen Wellenlänge absorbieren und damit ein Intensitätsunterschied vor bzw. nach Durchtritt durch entsprechende Substanz zu beobachten ist (Commoner et al., 1949). Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Dabei geht man davon aus, dass eine Absorptionseinheit A_{260} einer DNA-Konzentration von 50 ng/ μ l entspricht. Außerdem wird die Absorption bei 280 nm gemessen und ein Quotient (Absorption bei 260 nm/ Absorption bei 280 nm) gebildet, der Rückschlüsse auf die Reinheit zulässt. Er sollte für DNA circa 1,8 betragen.

Durchführung

Für die Konzentrationsmessungen wurde das NanoDrop-ND-1000-Spectrophotometer benutzt, um die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm zu bestimmen und daraus Konzentration und Reinheit der DNA.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion

Prinzip

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine einfache und schnelle Möglichkeit DNA-Abschnitte gezielt zu vervielfältigen (Mullis et al., 1987; Saiki et al., 1988). Das Grundprinzip beruht darauf, dass kurze Oligonucleotide spezifischer Sequenz, auch Primer genannt, an die zu amplifizierende DNA binden und den Startpunkt für das thermostabile Enzym Polymerase bilden. Um eine Bindung der Primer zu ermöglichen, muss die DNA denaturiert als Einzelstrang vorliegen. Bei Vorhandensein von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) dient dieser der Polymerase als Vorlage für die Neusynthese des komplementären Strangs in 5' → 3'-Richtung. Daraus ergibt sich auch die Notwendigkeit, einen Vorwärts- und einen Rückwärtsprimer zu verwenden. Nach der Aktivierung des Enzyms durch hohe Temperatur durchläuft die Reaktion mehrere Zyklen nach folgendem Schema:

Denaturierung, Primerhybridisierung/Annealing, DNA-Synthese/Elongation.

Ziel der ersten PCR ist die Vervielfältigung des NPM1-Gens. Die zweite PCR dient der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen und der Erzeugung unterschiedlich langer PCR-Produkte. Um Primer, Nukleotide, Polymerase und Salze zu entfernen, muss nach den Reaktionen jeweils ein Reinigungsschritt durchgeführt werden.

Durchführung

Zu 49 µl Master Mix wurde 1 µl DNA gegeben und dieser Reaktionsansatz wurde im Thermocycler für 5 min auf 95 °C erhitzt. Es folgten 40 Zyklen mit jeweils 30 s bei 94 °C, 1 min bei 55 °C und 1 min bei 72 °C. Den Abschluss bildete eine 10-minütige Phase bei 72 °C und dann konnte das PCR-Produkt aufgereinigt werden.

Tabelle 4 : Master Mix der ersten PCR

Reagenz	Menge
10x PCR-Buffer	5,0 µl
MgCl ₂	6,0 µl
dNTP	0,5 µl
Primer F (10 pmol)	1,0 µl
Primer R (10 pmol)	1,0 µl
Ampli Taq Gold	0,5 µl
Aqua dest.	35,0 µl
Summe	49,0 µl

Für die Aufreinigung nach der ersten PCR wurde das QIAquick PCR Purification Kit benutzt. Die Probe wurde mit 250 µl Buffer PBI gemischt und in 1 min bei 13 000 U/min an die QIAquick column gebunden. Danach folgte ein Waschschrift mit 750 µl Buffer PE und zwei Zentrifugationen für jeweils 1 min bei 13 000 U/min. Jetzt konnte die gereinigte DNA mit 50 µl Buffer EB wieder von der Säule gelöst werden. Dies geschah bei einer Zentrifugation für 1 min bei 13 000 U/min. Es folgte die zweite PCR unter Nutzung des BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits. Zu 13 µl Master Mix wurden 2 µl PCR Produkt aus der ersten PCR gegeben und im Thermocycler für 2 min auf 96 °C erhitzt. Dem folgten 35 Zyklen nach dem Schema 1 min bei 94 °C, danach 1 min bei 55 °C und 3 min bei 60 °C.

Tabelle 5: Master Mix der zweiten PCR

Reagenz	Menge
Primer R2 (10 pmol)	1,0 µl
5xBuffer	1,7 µl
Big Dye	2,0 µl
Aqua dest.	8,3 µl
Summe	13,0 µl

Tabelle 6: Primersequenzen für erste und zweite PCR

Primer	Sequenz
Primer F	5´- TTA ACT CTC TTG TGG TAG AAT GAA -3´
Primer R	5´- CAA GAC TAT TTG CCA TTC CTA AC -3´
Primer R2	5´- GGC ATT TTG GAC AAC ACA -3´

Bevor die Proben sequenziert werden konnten, mussten sie ein zweites Mal aufgereinigt werden. Dies geschah mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit beruhend auf dem Prinzip der Gelfiltration. Das PCR-Produkt wurde auf die vorbereitete Säule aufgetragen und für 3 min bei 3 000 U/min zentrifugiert.

2.2.4 NPM1 Sequenzierung

Prinzip

Die Sequenzierung beruht auf den Prinzipien der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) und der fluoreszenzbasierten Kapillarelektrophorese (Landers, 1993). Die Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP), die jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind (Rosenblum et al., 1997), können am 3´-Ende während der PCR nicht verlängert werden und führen zum vorzeitigen Synthesestopp. Damit liegen verschieden lange Produkte des Gens vor, die auf Grund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld die Bestimmung der Basenabfolge ermöglichen. Ein Argon-Ionen-Laser regt die Fluoreszenzfarbstoffe zum Leuchten an, das Licht spezifischer Wellenlänge wird mit einem CCD-

Kameradetektor registriert und dem entsprechenden Nukleotid zugeordnet. Die Daten werden gespeichert und über entsprechende Analysesoftware der Auswertung zugänglich gemacht.

Durchführung

1 µl PCR-Produkt wurde zu 18 µl Hi-Di Formamide pipettiert und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Dem schloss sich eine Kühlung auf Eis für mindestens 3 min an. Dann konnten die Proben in den Sequenzer gegeben werden. Die Sequenzierung erfolgte im ABI PRISM 310 Genetic Analyser und dem entsprechenden Auswertungsprogramm. Die Kapillare hatte eine Länge von 61 cm mit 50 µm Durchmesser und es wurde POP 6 als Trägermaterial genutzt. Die Elektrophorese fand bei 50 °C, einer Spannung von 15 kV und einem Laser von 9,9 mW statt.

2.2.5 Quantitative Real-time PCR

Prinzip

Hierbei wird das Konzept der PCR um den Anspruch, die Kopienzahl der Ziel-DNA zu kennen, erweitert (Kubista et al., 2006). Die Nutzung des FRET (fluorescence resonance energy transfer) (Selvin, 1995) macht dies möglich. Im PCR-Ansatz befinden sich farbstoffmarkierte Sonden für das Ziel-Gen und für ein Kontroll-Gen. Diese Sonden sind mit der Zielsequenz hybridisierbare Oligonukleotide, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, aber im Gegensatz zu den Primern nicht als Startpunkt für die Polymerase dienen können. Der erste Farbstoff gibt nach Anregung durch Licht mit Sonden-spezifischer Wellenlänge, Licht einer bestimmten Antwortwellenlänge ab. Sind beide Fluoreszenzfarbstoffe räumlich nah, nimmt der zweite das Antwortsignal auf, weil es sich um Licht seiner Anregungswellenlänge handelt. So wird kein Fluoreszenzsignal des ersten Farbstoffs registriert. Bei der Neusynthese der DNA werden beide Fluoreszenzfarbstoffe voneinander getrennt und es kommt zu einem Signalanstieg der Fluoreszenz des ersten, da der zweite sein Antwortlicht nicht mehr absorbiert. Dies wird von entsprechenden Detektoren registriert. Ein Signalanstieg korreliert also direkt mit der Zunahme der PCR-Produkte. Um daraus quantitative Aussagen über die Ziel-DNA in der Probe machen zu können, wird ein Standard bzw. eine Standardreihe mit bekannter Kopienzahl eingesetzt und beide

miteinander verglichen. Die PCR verläuft in verschiedenen Phasen. In der ersten Phase ist die Vermehrungsrate gering, dann folgt eine Phase exponentiellen Wachstums und dann wird eine Plateauphase erreicht und die Reaktion ist erschöpft. Die Quantifizierung ist nur in der exponentiellen Phase der PCR möglich. Deshalb legt man einen Grenzwert fest, ab dem ein Fluoreszenzanstieg als PCR-Produktzunahme gewertet wird. Alle Signale unter diesem Grenzwert entsprechen einer Basis- bzw. Störfluoreszenz. Übersteigt die Fluoreszenzzunahme in einer Probe diesen Wert, entspricht die Zyklusnummer dem C_T -Wert. Die C_T -Werte dienen als Bezugsgröße für die Quantifizierung. Der C_T -Wert verhält sich indirekt proportional zur Ausgangskonzentration der Template-DNA. Trägt man die C_T -Werte als Standardkurve auf, lassen sich zusätzlich Aussagen über die Effektivität der PCR treffen.

Durchführung

Die quantitative Real time PCR wurde im Rotor Gene 6000 durchgeführt und mit der Rotor-Gene Q Series Software ausgewertet. 10 μ l Probe mit einer Konzentration zwischen 48 und 52 ng/ μ l wurden zu 15 μ l Master Mix gegeben. Das zu untersuchende NPM1-Gen wurde durch die FAM-MGB-Sonde grün markiert und das Kontroll-Gen HCK (Quintrell et al., 1987) durch die HEX-Sonde gelb. Die PCR-Bedingungen waren: 95 °C für 15 min, gefolgt von 45 Zyklen jeweils mit 95 °C für 15 s und 60 °C für 1 min, zuletzt 25 °C für 3 min.

Tabelle 7: Pipettierschema pro Probe für die quantitative PCR

Reagenz	Menge
AB-Q-mix	12,50 μ l
FP NPM1 (30 pmol)	0,25 μ l
RP NPM1 A/B/D (30 pmol)	0,25 μ l
NPM1 FAM-MGB-Sonde (25 pmol)	0,25 μ l
FP HCK (5 pmol)	0,25 μ l
RP HCK (3 pmol)	0,25 μ l
HCK HEX-Sonde (10 pmol)	0,25 μ l
Aqua dest.	1,00 μ l
Summe	15,00 μ l

Tabelle 8: Primersequenzen für die quantitative PCR

Primer	Sequenz
FP NPM1	5´- GTG TTG TGG TTC CTT AAC CAC AT -3´
RP NPM1 A	5´- TCC TCC ACT GCC AGA CAG AG -3´
RP NPM1 B	5´- CCT CCA CTG CCA TGC AGA G -3´
RP NPM1 D	5´- CTG CAC TGC CAG GCA GAG -3´
NPM1 FAM-MGB-Sonde	5´- TTT TCC AGG CTA TTC AAG AT -3´
FP HCK	5´- TAT TAG CAC CAT CCA TAG GAG GCT T -3´
RP HCK	5´- GTT AGG GAA AGT GGA GCG GAA G -3´
HCK HEX-Sonde	5´- TAA CGC GTC CAC CAA GGA GCG GAA G -3´

War eine Probe nicht in ausreichender Menge oder Konzentration vorhanden, wurde das REPLI-g UltraFast Mini Kit genutzt, um genügend Ausgangsmaterial zu schaffen. Dieses Kit amplifizierte die gesamte DNA im Sinne einer unspezifischen PCR, wenn eine DNA-Vorlage einer Konzentration von 1-10 ng zur Verfügung stand. Dazu wurden 1 µl DNA und 1 µl Puffer D1 gut gemischt und bei Raumtemperatur (15-25 °C) für 3 min inkubiert. Dann wurden 2 µl Puffer N1 zugegeben. Zu diesem Ansatz wurden noch 15 µl REPLI-g UltraFast Reaction Buffer und 1 µl REPLI-g UltraFast DNA Polymerase hinzugefügt und alles zusammen für 90 min bei 30 °C inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch Aufheizen auf 65 °C für 3 min. Dann konnte die Konzentration des Produktes gemessen und auf 50 ng/µl eingestellt werden.

Tabelle 9: Puffer D1 und N1

Puffer	Herstellung
Puffer D1 (denaturation buffer)	5 µl Puffer DLB und 35 µl Aqua dest.
Puffer N1 (neutralization buffer)	8 µl Stop solution und 72 µl Aqua dest.

2.2.6 Vergleich zwischen nicht amplifizierten und amplifizierten Proben

Um abschätzen zu können, wie sehr die Amplifikation die quantitative Analyse beeinflusst, wurden amplifizierte Proben verschiedener Konzentration und nicht amplifizierte Proben parallel untersucht.

Tabelle 10: Dargestellt werden die quantitativen Ergebnisse von drei Proben eines Patienten, die parallel in amplifizierter (in zwei verschiedenen Konzentrationen) und nicht amplifizierter Form analysiert wurden.

	nicht amplifiziert (50ng/µl)		amplifiziert (50ng/µl)		amplifiziert (100ng/µl)	
Probe 1	178 119		4 846		10 783	
Probe 2	1 718	1×10^{-2}	351	7×10^{-2}	1 080	1×10^{-1}
Probe 3	330	2×10^{-3}	0	n. n.	0	n. n.

2.3 Patienten

2.3.1 Allgemeines

Es wurden 228 Patienten betrachtet, die in der Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie des CC14 der Charité am Campus Benjamin Franklin behandelt wurden und bei denen zwischen 01.01.1995 und 01.10.2011 eine akute myeloische Leukämie diagnostiziert wurde. Der Beobachtungszeitraum endete am 20.10.2011. Damit lag die mittlere Beobachtungsdauer bei 765 Tagen (Median 476 Tage, 13-5 323 Tage). Die Untersuchungen fanden im molekulargenetischen Labor der Klinik statt.

2.3.2 Patientencharakteristika

Von den 228 Patienten waren 122 männlich und 106 weiblich. Das Durchschnittsalter bei der Erstdiagnose betrug 55 Jahre (16-94 Jahre). Bei 167 Patienten handelte es sich um eine de novo AML. Die Erkrankung ließ sich anhand der FAB-Klassifikation folgendermaßen unterteilen: 4,8% M0, 27,6% M1, 18,4% M2, 2,2% M3, 21,1% M4, 17,5% M5, 5,3% M6, 1,8% M7, 1,3% konnten nicht sicher einer der Untergruppen zugeteilt werden.

2.4 Statistik

Um statistische Untersuchungen durchführen zu können, wurden die Patienten entsprechend ihres NPM1-Status eingeteilt. Nachfolgend wurde auch der FLT3-Status berücksichtigt. Damit ergaben sich folgende vier Gruppen: NPM1pos/FLT3neg, NPM1pos/FLT3pos, NPM1neg/FLT3pos, NPM1neg/FLT3neg. Zum Teil wurden diese Untergruppen auch zusammengefasst.

Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm SPSS Statistics 19 von IBM verwendet. Es wurde immer ein Signifikanzniveau von 0,05 genutzt. Für den Vergleich der Gruppen bezüglich der Patientencharakteristika auf signifikante Unterschiede wurde ein t-Test für unabhängige Variablen verwendet. Zuvor wurde mittels eines Levene-Tests festgestellt, ob die Varianzen gleich oder nicht gleich sind. Zur Darstellung des Gesamtüberlebens, des krankheitsfreien Überlebens und des Ereignis freien Überlebens wurde die Kaplan-Meier-Methode (Kaplan et al., 1958) genutzt. Zum Vergleich der Gruppen wurde der log-Rank-Test genutzt.

3 Ergebnisse

Tabelle 11: Patientencharakteristika

Parameter		Alle Patienten	NPM1 positive		NPM1 negative	
Geschlecht	männlich	122	22	(18%)	100	(82%)
	weiblich	106	21	(20%)	85	(80%)
Alter bei ED	in Jahren	55	51	(19-81)	56	(16-94)
FAB	M0	11	1	(9%)	10	(91%)
	M1	63	8	(13%)	55	(87%)
	M2	42	7	(17%)	35	(83%)
	M3	5	0	(0%)	5	(100%)
	M4	48	13	(27%)	35	(73%)
	M5	40	12	(30%)	28	(70%)
	M6	12	2	(17%)	10	(83%)
	M7	4	0	(0%)	4	(100%)
	biphänotypisch	3	0	(0%)	3	(100%)
AML-Typ	de novo	167	41	(25%)	126	(75%)
	sekundär	61	2	(3%)	59	(97%)
Zellzahl ED	Leukozyten/ μ l (pB)	37,4	62,5 (1,2-400)		31,6 (0,4-281)	
	Blasten % (KM)	74,0	80,6 (35-99)		72,5 (20-99)	
Zytogenetik	normal	112	36	(32%)	76	(68%)
	aberrant	116	7	(6%)	109	(94%)
Risiko	gut	20	0	(0%)	20	(100%)
	intermediär	41	6	(15%)	35	(85%)
	schlecht	55	1	(2%)	54	(98%)
FLT3	FLT3-ITD +	50	20	(40%)	30	(60%)
	FLT3-TKD +	11	4	(36%)	7	(64%)
CR		164	34	(21%)	130	(79%)
Rezidiv		104	18	(17%)	86	(83%)
Tod	Gesamt	100	19	(19%)	81	(81%)
	Leukämie assoziiert	55	11	(20%)	44	(80%)
	Therapie assoziiert	45	8	(18%)	37	(82%)

3.1 NPM1-Mutationen

Von 228 untersuchten Patienten wurden 43 (19%) positiv auf eine Mutation im NPM1-Gen getestet. Bei 51% (22) wurde die Variante A nachgewiesen, bei 21% (9) die Variante B und bei 16% (7) die Variante D. Weiterhin konnten die Mutationen 4 (2; 5%), G (1; 2%), Km (1; 2%) und eine neue Variante (Insertion CGGTTTCC, Deletion TGG) nachgewiesen werden.

3.2 Vergleich der klinischen Parameter zwischen NPM1-positiven und -negativen Patienten

3.2.1 FLT3-Mutation

In der Patientengruppe, welche eine Mutation im NPM1-Gen aufwies, kamen mit 47% mehr FLT3-ITD-Mutationen vor als in der Wildtyp-Patientengruppe mit einem Anteil von 16% ($p < 0,001$). Für die FLT3-TKD-Mutation konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Tabelle 12: Vorkommen von FLT3-Mutationen bei NPM1-positiven und -negativen Patienten (Ein Patient hat sowohl eine FLT3-ITD- als auch eine FLT3-TKD-Mutation.)

NPM1 positiv 43 Patienten		NPM1 negativ 185 Patienten	
FLT3 positiv 23 Patienten	FLT3 negativ 20 Patienten	FLT3 positiv 37 Patienten	FLT3 negativ 148 Patienten
FLT3-ITD 20 Pat		FLT3-ITD 30 Pat	
FLT3-TKD 4 Pat		FLT3-TKD 7 Pat	

3.2.2 Alter

Das mittlere Erkrankungsalter lag bei den NPM1-positiven Patienten bei 51 Jahren und bei den NPM1-negativen bei 56 Jahren (Median 50 bzw. 58 Jahre). Ein signifikantes Niveau wurde allerdings nicht erreicht ($p = 0,087$).

Bezieht man die Möglichkeit einer FLT3-Mutation in die Betrachtungen mit ein, kann man feststellen, dass das Erkrankungsalter in den drei Gruppen mit mindestens einer Mutation niedriger ist. Ein signifikanter Unterschied wird bei Zusammenführung dieser drei Untergruppen und Vergleich mit den Patienten, die keine Mutation tragen, erreicht ($p=0,006$). Vergleicht man daraufhin die NPM1-positiven Patienten unabhängig von ihrem FLT3-Status mit der Gruppe ohne Mutation, liegt das Erkrankungsalter in der ersten Gruppe signifikant niedriger ($p=0,024$). Dies lässt sich auch für die FLT3-positiven Patienten ohne Berücksichtigung des NPM1-Status zeigen ($p=0,017$).

Tabelle 13: Mittleres Alter bei Erstdiagnose der NPM1-positiven und -negativen Patienten unter Berücksichtigung ihres FLT3-Status

NPM1 positiv (43)		NPM1 negativ (185)	
51 Jahre		56 Jahre	
FLT3 positiv (23)	FLT3 negativ (20)	FLT3 positiv (37)	FLT3 negativ (148)
52 Jahre	50 Jahre	51 Jahre	57 Jahre

3.2.3 Geschlecht

Es gibt für eine NPM1-Mutation keine besondere Häufung bei einem Geschlecht. Das Verhältnis zeigt sich in der Patientengruppe mit NPM1-Mutation ähnlich wie in der Wildtypgruppe.

Betrachtet man die NPM1-positiven Patienten mit einer FLT3-Mutation und vergleicht sie mit denen ohne Veränderung im FLT3-Gen, stellt man fest, dass in der ersten Gruppe der Anteil der weiblichen Erkrankten mit 65% höher ist ($p=0,021$). Für die Patientengruppe mit Wildtyp-NPM1 ist der Unterschied nicht signifikant. Fasst man die Gruppen mit FLT3-Mutation zusammen, sind die Patienten dieser Gruppe signifikant häufiger weiblich (58,3% im Vergleich zu 42,3%, $p=0,032$), vergleicht man sie mit den FLT3-negativen Patienten unabhängig von ihrem NPM1-Status.

Tabelle 14: Geschlecht der NPM1-positiven und -negativen Patienten unter Berücksichtigung ihres FLT3-Status

NPM1 positiv (43) männlich 22 (51%) weiblich 21 (49%)		NPM1 negativ (185) männlich 100 (54%) weiblich 85 (46%)	
FLT3 positiv (23) männlich 8 (35%) weiblich 15 (65%)	FLT3 negativ (20) männlich 14 (70%) weiblich 6 (30%)	FLT3 positiv (37) männlich 17 (46%) weiblich 20 (54%)	FLT3 negativ (148) männlich 83 (56%) weiblich 65 (44%)

3.2.4 FAB-Subtypen

In der FAB-Klassifikation zeigen die vier Gruppen ein ähnliches Verteilungsmuster. Bei NPM1-positiven Patienten kommen die Subklassen M4 und M5 zusammen betrachtet häufiger vor ($p=0,003$).

Tabelle 15: Verteilung der verschiedenen FAB-Subtypen auf die NPM1/FLT3-Untergruppen

	NPM1 pos/ FLT3 pos		NPM1 pos/ FLT3 neg		NPM1 neg/ FLT3 pos		NPM1 neg/ FLT3 neg	
M0	1	(4%)	0	(0%)	4	(11%)	6	(4%)
M1	5	(22%)	3	(15%)	9	(24%)	46	(31%)
M2	4	(17%)	3	(15%)	7	(19%)	28	(19%)
M3	0	(0%)	0	(0%)	2	(5%)	3	(2%)
M4	6	(26%)	7	(35%)	4	(11%)	31	(21%)
M5	7	(31%)	5	(25%)	9	(24%)	19	(13%)
M6	0	(0%)	2	(10%)	0	(0%)	10	(7%)
M7	0	(0%)	0	(0%)	1	(3%)	3	(2%)
biphänotypisch	0	(0%)	0	(0%)	1	(3%)	1	(1%)

3.2.5 Zytogenetik

3.2.5.1 Zytogenetik allgemein

NPM1-Mutationen sind offenbar mit einer normalen Zytogenetik verbunden. Bei Patienten ohne Mutation im NPM1-Gen kommt ein aberranter Genotyp signifikant häufiger vor ($p < 0,001$). Vergleicht man daraufhin die entsprechenden Untergruppen, nämlich NPM1-positiv mit NPM1-negativen Patienten in Abhängigkeit vom FLT3-Status, stellt man fest, dass sowohl in der Gruppe der FLT3-negativen ($p < 0,001$), als auch bei FLT3-positiven Patienten ($p = 0,004$) bei positivem NPM1-Status ein normaler Genotyp häufiger vorkommt. Betrachtet man FLT3-positiv bzw. -negative Patienten in Abhängigkeit vom NPM1-Status, tritt in den FLT3-positiven Gruppen häufiger ein normaler Genotyp auf, allerdings nicht auf signifikantem Niveau (NPM1-positiv $p = 0,549$, NPM1-negativ $p = 0,074$). Sind bei Patienten beide Mutationen vorhanden, erreicht der Vergleich mit NPM1/FLT3-negativen Patienten Signifikanz ($p < 0,001$).

Tabelle 16: Zytogenetik unterschieden nach aberrant oder normal der NPM1-positiven und -negativen Patienten unter Berücksichtigung ihres FLT3-Status

NPM1 positiv (43)		NPM1 negativ (185)	
normal 36 (84%)		normal 76 (41%)	
aberrant 7 (16%)		aberrant 109 (59%)	
FLT3 positiv (23)	FLT3 negativ (20)	FLT3 positiv (37)	FLT3 negativ (148)
normal 20 (87%)	normal 16 (80%)	normal 20 (54%)	normal 56 (38%)
aberrant 3 (13%)	aberrant 4 (20%)	aberrant 17 (46%)	aberrant 92 (62%)

3.2.5.2 Zytogenetik aberrant

Bei Nachweis einer zytogenetischen Aberration sind diese bei NPM1-positiven Patienten häufiger aus einer Gruppe mit intermediärem Risiko ($p < 0,001$), während in der NPM1-negativen Patientengruppe gehäuft Veränderungen mit schlechter Prognose zu finden sind ($p = 0,045$). Auch Aberrationen mit guter Prognose kommen häufiger bei NPM1-Wildtyp Patienten vor ($p < 0,001$).

Tabelle 17: Risikoeinschätzung der aberranten Zytogenetik für die NPM1-positiven und -negativen Patienten unter Berücksichtigung ihres FLT3-Status

NPM1 positiv (7)		NPM1 negativ (109)	
gut 0 (0%)		gut 20 (18%)	
intermediär 6 (86%)		intermediär 35 (32%)	
schlecht 1 (14%)		schlecht 54 (50%)	
FLT3 positiv (3)	FLT3 negativ (4)	FLT3 positiv (17)	FLT3 negativ (92)
gut 0 (0%)	gut 0 (0%)	gut 3 (18%)	gut 17 (18%)
inter 2 (67%)	inter 4 (100%)	inter 6 (35%)	inter 29 (32%)
schlecht 1 (33%)	schlecht 0 (0%)	schlecht 8 (47%)	schlecht 46 (50%)

3.2.6 Zellzahl bei Erstdiagnose

Die Leukozyten- und Blastenzahl bei Diagnosestellung ist bei NPM1-Mutationsträgern höher ($p=0,022$ und $p=0,004$).

3.2.6.1 Leukozyten

Kommt keine NPM1/FLT3-Mutation bei den Patienten vor, liegen die Leukozytenzahlen bei Erstdiagnose mit $18,9/\mu\text{l}$ deutlich niedriger, als wenn eine oder beide Mutationen bei den Patienten vorkommen ($71,6/\mu\text{l}$, $p<0,001$). Vergleicht man die Gruppen mit jeweils nur einer der beiden Mutationen, zeigt sich mit $82,2/\mu\text{l}$ ein sehr viel höherer Leukozytenwert für die Patienten mit FLT3-Mutation ohne NPM1-Mutation im Vergleich zu $26,80/\mu\text{l}$ bei Patienten, die nur eine NPM1-Mutation haben ($p<0,001$). Ebenfalls signifikant sind die Unterschiede zwischen FLT3-positiven und -negativen Patienten, wenn man sie in Abhängigkeit ihres NPM1-Status betrachtet. In der NPM1-positiven Gruppe beträgt der Unterschied $66,79$ Leukozyten/ μl ($p=0,005$) und in der NPM1-negativen Gruppe $63,25$ Leukozyten/ μl ($p<0,001$). Führt man die Untersuchungen für Patienten mit und ohne Mutation im NPM1-Gen in Abhängigkeit ihres FLT3-Status durch, erhält man dagegen keine signifikanten Ergebnisse. Sind beide Mutationen vorhanden, zeigt sich ein signifikant höherer Leukozytenwert ($p=0,002$) im Vergleich zur Gruppe ohne Mutation.

3.2.6.2 Blasten

Die Blastenzahl bei Erstdiagnose liegt bei Vorhandensein einer NPM1- und/oder FLT3-Mutation höher als in der Gruppe ohne Mutationen ($p < 0,001$). Die Unterschiede zeigen sich nicht so deutlich, wie für die Leukozytenzahlen, aber es ist eine Erhöhung durch eine FLT3-Mutation wahrzunehmen. Mit 86% liegt die Zahl bei den Patienten, die beide Mutationen haben am höchsten und unterscheidet sich signifikant von den FLT3neg/NPM1pos Patienten ($p = 0,011$). Bei negativem NPM1-Status lassen sich in der FLT3-positiven Gruppe mehr Blasten nachweisen als in der FLT3-negativen Gruppe ($p < 0,001$). Umgekehrt lassen sich keine signifikanten Unterschiede für NPM1-positive und -negative Patienten in Abhängigkeit ihres FLT3-Status nachweisen.

Tabelle 18: Leukozyten- und Blastenzahlen der NPM1-positiven und -negativen Patienten bei Erstdiagnose unter Berücksichtigung ihres FLT3-Status

NPM1 positiv (43) Leuko: 62,5/ μ l (1,2-400) Blasten: 80,6% (35-99)		NPM1 negativ (185) Leuko: 31,6/ μ l (0,4-281) Blasten: 72,5% (20-99)	
FLT3 positiv (23) L: 93,6/ μ l (1,2-400) B: 86,1% (58-99)	FLT3 negativ (20) L: 26,8/ μ l (1,5-69,1) B: 74,2% (35-90)	FLT3 positiv (37) L: 82,2/ μ l (2,3-281) B: 84,2% (50-98)	FLT3 negativ (148) L: 18,9/ μ l (0,4-204) B: 68,6% (20-99)

3.2.7 AML-Typ

Mit 32% ist die sekundäre AML in der Patientengruppe ohne NPM1-Mutation erheblich häufiger vertreten ($p < 0,001$).

Wurde mindestens eine Mutation nachgewiesen, war der Anteil der sekundären AML signifikant niedriger (8% im Vergleich zu 37%, $p < 0,001$). Vergleicht man Patienten, die jeweils nur für eine NPM1- oder FLT3-Mutation positiv sind, lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Betrachtet man NPM1-positive und -negative Patienten und bezieht ihren FLT3-Status mit ein, stellt man fest, dass in der FLT3-negativen Gruppe, die NPM1-positiven Patienten häufiger eine de novo AML aufweisen ($p < 0,001$), während in der Gruppe mit positivem FLT3-Status kein signifikanter Unterschied festgestellt werden kann. Gleiches lässt sich für die FLT3-positiven und -negativen

Patienten in Abhängigkeit des NPM1-Status feststellen. Auch hier kann bei FLT3-positiven Patienten ein vermehrtes Auftreten von de novo AML im Gegensatz zu FLT3-negativen Patienten gesehen werden, wenn beide NPM1-negativ sind ($p < 0,001$). Ist eine NPM1-Mutation nachgewiesen, lässt sich hier kein Unterschied zeigen.

Tabelle 19: AML-Typ der NPM1-positiven und -negativen Patienten unter Berücksichtigung ihres FLT3-Status

NPM1 positiv (43) de novo 41 (95%) sec 2 (5%)		NPM1 negativ (185) de novo 126 (68%) sec 59 (32%)	
FLT3 positiv (23) de novo 22 (96%) sec 1 (4%)	FLT3 negativ (20) de novo 19 (95%) sec 1 (5%)	FLT3 positiv (37) de novo 33 (89%) sec 4 (11%)	FLT3 negativ (148) de novo 93 (63%) sec 55 (37%)

3.2.8 Komplette Remission

Es konnte für das Erreichen einer kompletten Remission (CR) nach der Induktionstherapie kein Unterschied zwischen NPM1-positiven und -negativen Patienten aufgezeigt werden.

Betrachtet man die Gruppe der Patienten, welche nur eine Mutation im NPM1-Gen haben, kann man feststellen, dass in dieser Gruppe 90% eine komplette Remission nach Therapiebeginn erreichten, in der Gruppe ohne Mutation waren nur 72% in Remission ($p = 0,030$). Bei vorhandener FLT3-Mutation lässt sich zwischen NPM1-positiven und -negativen Patienten allerdings kein Unterschied für das initiale Erreichen einer kompletten Remission nachweisen. Vergleicht man die Gruppen mit jeweils nur einer Mutation, erreichen in der NPM1-positiven Gruppe mehr Patienten eine komplette Remission ($p = 0,011$).

Tabelle 20: Erreichen einer kompletten Remission der NPM1-positiven und -negativen Patienten unter Berücksichtigung ihres FLT3-Status

NPM1 positiv (43) 34 (79%)		NPM1 negativ (185) 130 (70%)	
FLT3 positiv (23) 16 (70%)	FLT3 negativ (20) 18 (90%)	FLT3 positiv (37) 23 (62%)	FLT3 negativ (148) 107 (72%)

3.2.9 Rezidiv

Es sind keine Unterschiede bezüglich der Rezidivwahrscheinlichkeit zwischen den vier Gruppen festzustellen.

Tabelle 21: Vorkommen eines Rezidivs in der NPM1-positiven und -negativen Patientengruppe unter Berücksichtigung ihres FLT3-Status

NPM1 positiv (43) 18 (42%)		NPM1 negativ (185) 86 (47%)	
FLT3 positiv (23) 12 (52%)	FLT3 negativ (20) 6 (30%)	FLT3 positiv (37) 19 (51%)	FLT3 negativ (148) 67 (45%)

3.2.10 Todesursache

Bezüglich eines Leukämie oder Therapie assoziierten Todes lassen sich keine Häufungen bei Vergleich der vier Gruppen erkennen.

Tabelle 22: Todesursache der NPM1-positiven und -negativen Patienten unter Berücksichtigung ihres FLT3-Status

NPM1 positiv (19) Leukämie assoziiert 11 (58%) Therapie assoziiert 8 (42%)		NPM1 negativ (81) Leukämie assoziiert 44 (54%) Therapie assoziiert 37 (46%)	
FLT3 positiv (13) L. a. 8 (62%) T. a. 5 (38%)	FLT3 negativ (6) L. a. 3 (50%) T. a. 3 (50%)	FLT3 positiv (18) L. a. 11 (61%) T. a. 7 (39%)	FLT3 negativ (63) L. a. 33 (52%) T. a. 30 (48%)

3.3 Überlebenszeitanalysen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Überlebenszeitanalysen dargestellt, beginnend mit dem Vergleich zwischen NPM1-positiven und -negativen Patienten, gefolgt von den Untergruppen.

3.3.1 Gesamtüberleben

Für das Gesamtüberleben ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen NPM1-positiven und -negativen Patienten (log rank; $p=0,561$). Bei Vergleich der Untergruppen zeigt sich die kürzeste Überlebenszeit bei Patienten, die eine NPM1- und FLT3-Mutation haben. Sie unterscheidet sich signifikant von der der Patientengruppe mit NPM1-Mutation ohne FLT3-Mutation (log rank; $p=0,007$) und von der der Patienten ohne Mutation (log rank; $p=0,008$). Die Überlebenszeit von Patienten mit FLT3-Mutation ohne NPM1-Mutation ist ebenfalls länger als von Patienten mit beiden Mutationen, erreicht allerdings kein signifikantes Niveau (log rank; $p=0,052$).

Gesamtüberleben

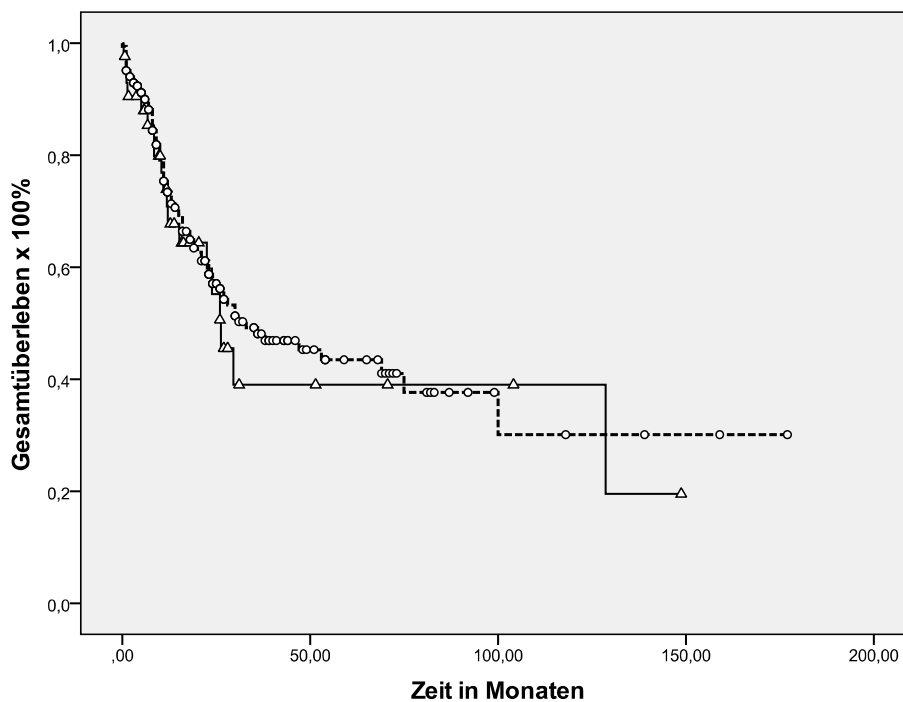


Abbildung 1: Vergleich des Gesamtüberlebens der NPM1-positiven (Δ) und -negativen (○) Patientengruppe, log rank $p=0,561$

Gesamtüberleben

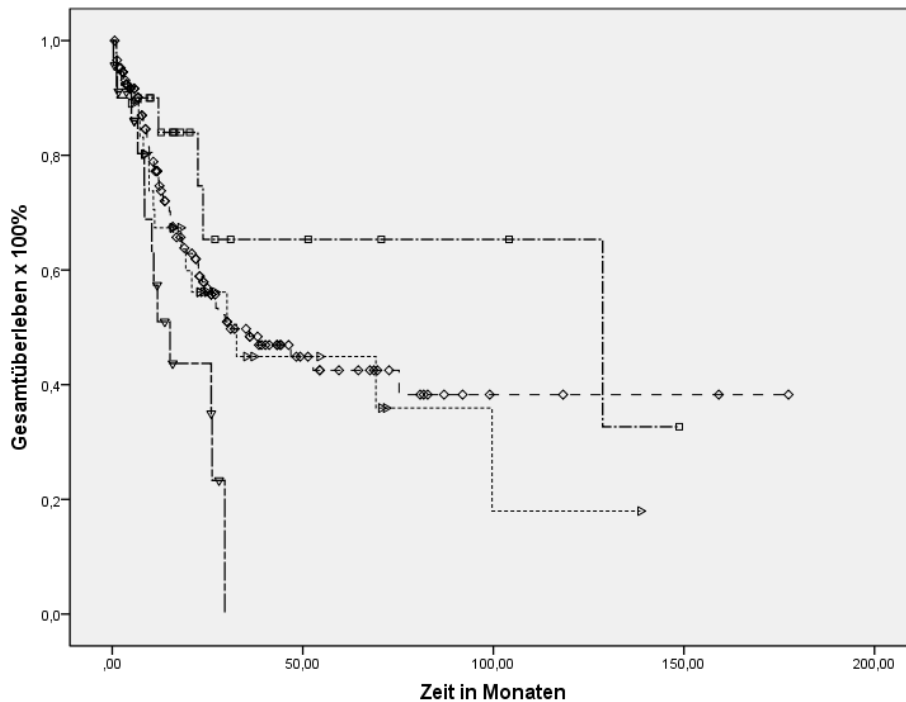


Abbildung 2: Vergleich des Gesamtüberlebens der Untergruppen NPM1positiv/FLT3negativ (□), NPM1negativ/FLT3negativ (◇), NPM1negativ/FLT3positiv (▽) und NPM1positiv/FLT3positiv (▾)

3.3.2 Krankheitsfreies Überleben

Ein Unterschied für das krankheitsfreie Überleben zwischen Patienten mit und ohne NPM1-Mutation kann nicht gezeigt werden (log rank; $p=0,835$). Die Untergruppen zeigen signifikante Unterschiede beim Vergleich von NPM1/FLT3-positiven Patienten mit NPM1-positiven/FLT3-negativen Patienten (log rank; $p=0,004$) und von NPM1/FLT3-positiven Patienten mit NPM1-negativen/FLT3-negativen Patienten (log rank; $p=0,047$).

Krankheitsfreies Überleben

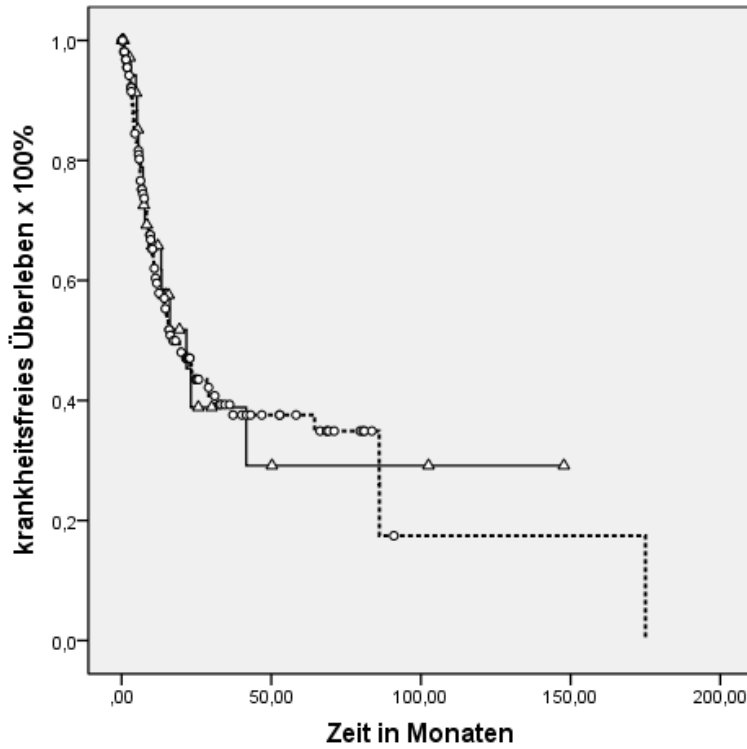


Abbildung 3:
Vergleich krankheitsfreies Überleben
der NPM1-positiven (△) und
NPM1-negativen (○) Patienten,
log rank p= 0,835

Krankheitsfreies Überleben

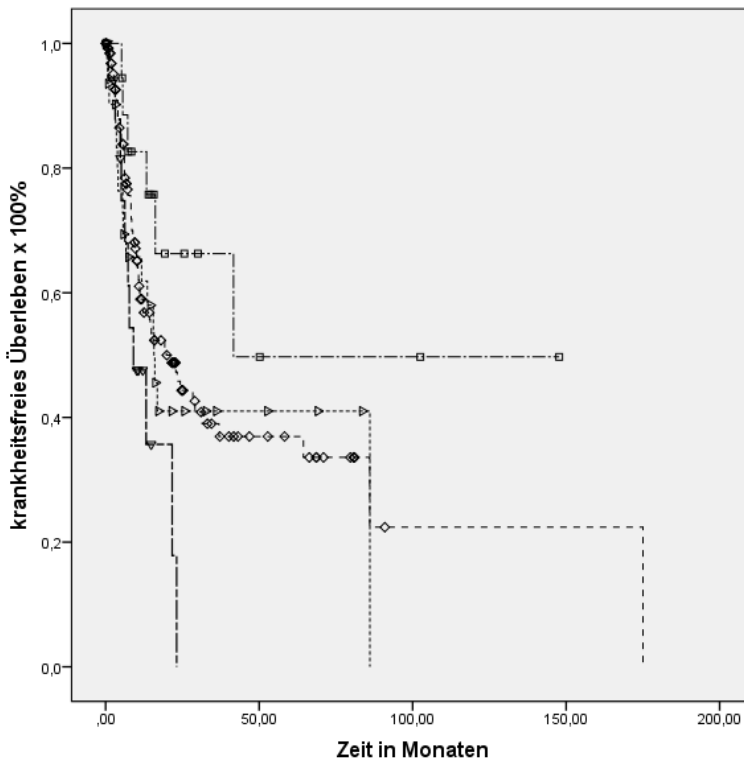


Abbildung 4:
Vergleich krankheitsfreies Überleben
der Untergruppen
NPM1positiv/FLT3negativ (□)
NPM1negativ/FLT3negativ (◇)
NPM1negativ/FLT3positiv (△)
NPM1positiv/FLT3positiv (▽)

3.3.3 Ereignis freies Überleben

Für das Ereignis freie Überleben zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der NPM1-positiven und -negativen Patientengruppe (log rank; $p=0,781$). In den Untergruppen lässt sich ein signifikant kürzeres Ereignis freies Überleben in der NPM1-positiv/FLT3-positiv Patientengruppe nachweisen, bei Vergleich mit der NPM1-positiv/FLT3-negativ Patientengruppe (log rank; $p=0,003$) und mit der NPM1-negativ/FLT3-negativ Patientengruppe (log rank; $p=0,042$).

Ereignis freies Überleben

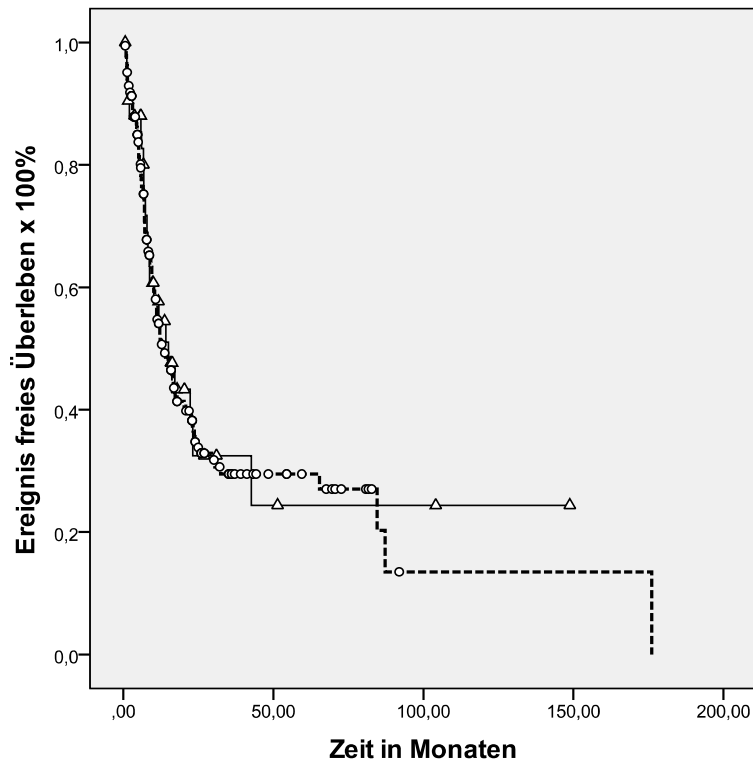


Abbildung 5:
Vergleich Ereignis freies Überleben
der NPM1-positiven (\triangle) und NPM1-
negativen (\circ) Patienten,
log rank $p= 0,781$

Ereignis freies Überleben

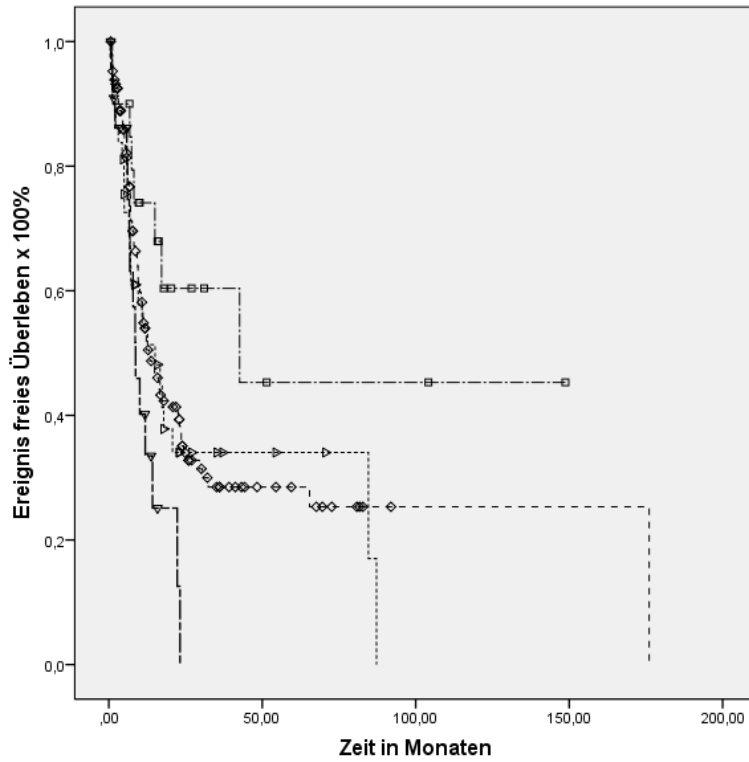


Abbildung 6:
Vergleich Ereignis freies Überleben
der Untergruppen
NPM1 positiv/FLT3 negativ (■)
NPM1 negativ/FLT3 negativ (◇)
NPM1 negativ/FLT3 positiv (△)
NPM1 positiv/FLT3 positiv (▽)

3.4 Quantitative NPM1-Analyse

3.4.1 Patient 1

Der Patient war bei Diagnosestellung 67 Jahre alt, hatte neben der NPM1-Mutation vom Typ B auch eine FLT3-ITD-Mutation und erreichte nach Ersttherapie keine komplette Remission. Ein Rezidiv trat 42 Tage nach Transplantation auf und der Patient verstarb 54 Tage später am Rezidiv.

Tabelle 23: Gezeigt ist eine Gegenüberstellung von relativem NPM1-MRD-Level und dem entsprechenden Ergebnis der Chimärismusanalyse derselben Probe des Patienten 1 an entsprechendem Zeitpunkt. Das NPM1-MRD-Level bezieht sich auf die Kopienanzahl bei Erstdiagnose. Die Ergebnisse der Chimärismusanalyse wurden im molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin erhoben und mir freundlicherweise von Frau Dr. Olga Blau zur Verfügung gestellt.

Zeitpunkt	NPM1	Chimärismus
vor Tx	3×10^{-3}	
Tag 30	9×10^{-3}	gemischt – 95% Spender
Tag 52	4×10^{-1}	gemischt – 30% Spender

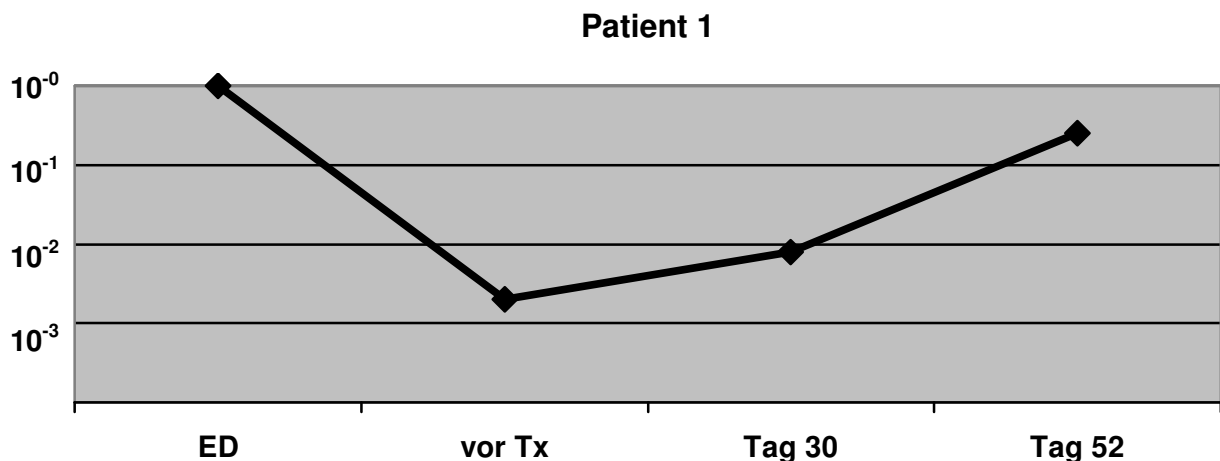


Abbildung 7: Dargestellt ist das NPM1-MRD-Level im Krankheitsverlauf des Patienten 1 beginnend mit der Erstdiagnose, einer Probe vor Transplantation und zwei an den Tagen 30 und 52 nach Transplantation.

3.4.2 Patient 2

Die Diagnose wurde bei diesem Patienten im Alter von 46 Jahren gestellt. Der Patient hatte eine NPM1-Mutation Typ D und eine FLT3-ITD-Mutation. Nach Ersttherapie, welche eine allogene Transplantation (1.Tx) beinhaltete, wurde eine komplette Remission erreicht, allerdings erlitt der Patient 136 Tage nach erster Transplantation ein Rezidiv und wurde erneut transplantiert (2.Tx). Auf Grund eines Transplantatversagens kam es zu einer erneuten Transplantation (3.Tx) mit Zellen des ersten Spenders. Der Patient verstarb an infektiösen Komplikationen.

Tabelle 24: Gezeigt ist eine Gegenüberstellung von relativem NPM1-MRD-Level und dem entsprechenden Ergebnis der Chimärismusanalyse derselben Probe des Patienten 2 an entsprechendem Zeitpunkt. Das NPM1-MRD-Level bezieht sich auf die Kopienanzahl bei Erstdiagnose. Die Ergebnisse der Chimärismusanalyse wurden im molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin erhoben und mir freundlicherweise von Frau Dr. Olga Blau zur Verfügung gestellt.

Zeitpunkt	NPM1	Chimärismus
vor Tx	2×10^{-5}	
Tag 18 (2.Tx)	3×10^{-5}	gemischt- 20% Spender 1, 30% Spender 2
Tag 134 (3.Tx)	1×10^{-5}	komplett- 100% Spender 1
Tag 315 (3.Tx)	2×10^{-6}	komplett- 100% Spender 1

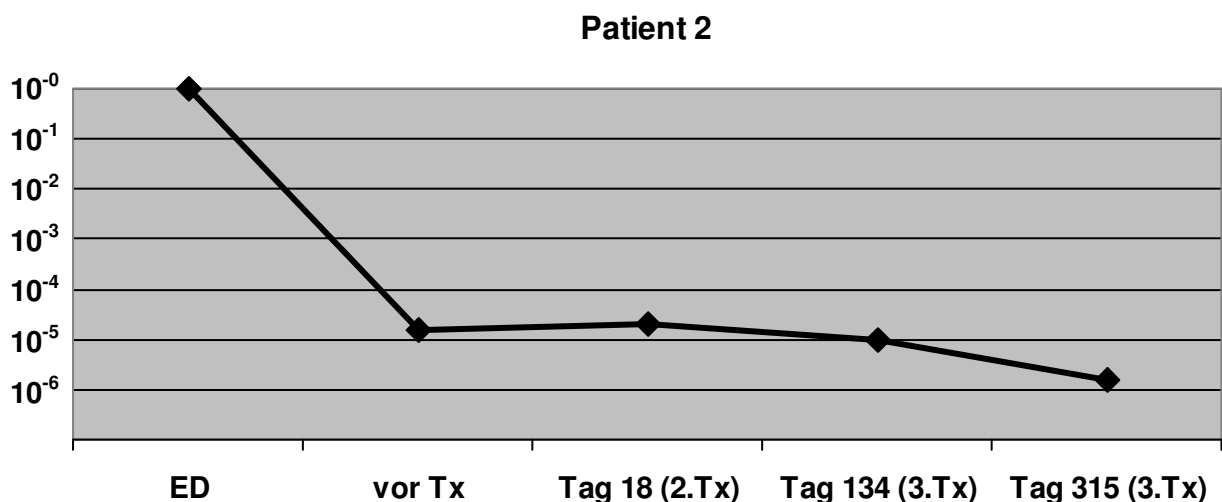


Abbildung 8: Dargestellt ist das NPM1-MRD-Level im Krankheitsverlauf des Patienten 2 beginnend mit der Erstdiagnose, einer Probe vor Transplantation und drei weiteren im Verlauf. Da der Patient mehrmals allogent transplantiert wurde, ist in Klammern der Bezug zwischen Tageszählung und Transplantation erfasst.

3.4.3 Patient 3

Bei diesem 51-jährigen Patienten konnte eine NPM1-Mutation vom Typ A nachgewiesen werden. Der Patient erreichte zwar eine komplette Remission, erlitt aber kurze Zeit später ein Rezidiv und wurde transplantiert. Dieser Patient verstarb an einer Infektion. Es wurden amplifizierte Proben verwendet.

Tabelle 25: Gezeigt ist eine Gegenüberstellung von relativem NPM1-MRD-Level und dem entsprechenden Ergebnis der Chimärismusanalyse derselben Probe des Patienten 3 an entsprechendem Zeitpunkt. Das NPM1-MRD-Level bezieht sich auf die Kopienanzahl bei Erstdiagnose. Die Ergebnisse der Chimärismusanalyse wurden im molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin erhoben und mir freundlicherweise von Frau Dr. Olga Blau zur Verfügung gestellt. n. n.- nicht nachweisbar

Zeitpunkt	NPM1	Chimärismus
vor Tx	8×10^{-2}	
Tag 30	n. n.	komplett- 100% Spender
Tag 324	n. n.	komplett- 100% Spender

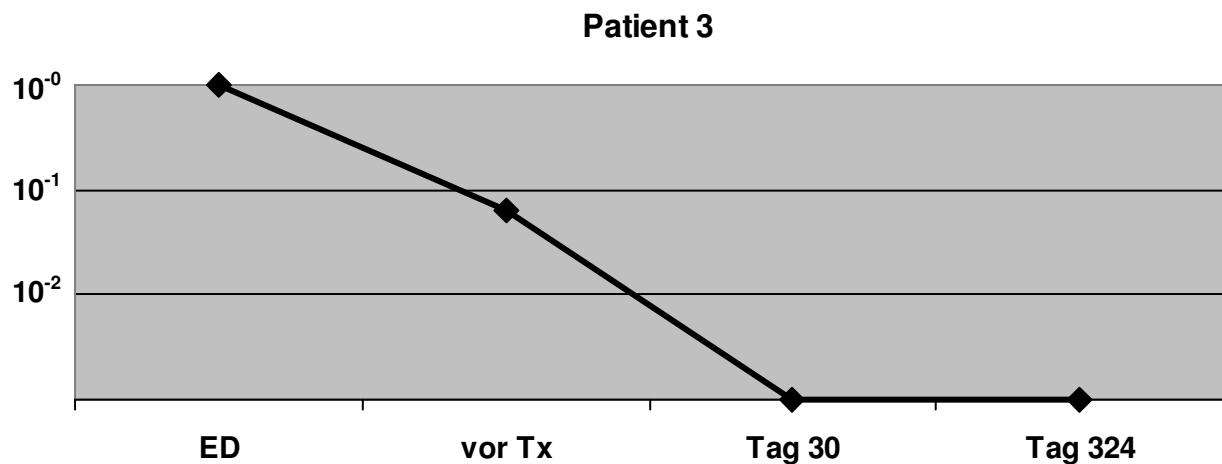


Abbildung 9: Dargestellt ist das NPM1-MRD-Level im Krankheitsverlauf des Patienten 3 beginnend mit der Erstdiagnose, einer Probe vor Transplantation und zwei an den Tagen 30 und 324 nach Transplantation.

3.4.4 Patient 4

Der Patient erkrankte im Alter von 48 Jahren und es konnte eine NPM1-Mutation Typ A und eine FLT3-TKD-Mutation nachgewiesen werden. Eine komplette Remission nach Ersttherapie wurde erreicht. 96 Tage nach Transplantation kam es zu einem Rezidiv, an dem der Patient kurze Zeit später verstarb. Es wurden amplifizierte Proben verwendet.

Tabelle 26: Gezeigt ist eine Gegenüberstellung von relativem NPM1-MRD-Level und dem entsprechenden Ergebnis der Chimärismusanalyse derselben Probe des Patienten 4 an entsprechendem Zeitpunkt. Das NPM1-MRD-Level bezieht sich auf die Kopienanzahl bei Erstdiagnose. Die Ergebnisse der Chimärismusanalyse wurden im molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin erhoben und mir freundlicherweise von Frau Dr. Olga Blau zur Verfügung gestellt.

Zeitpunkt	NPM1	Chimärismus
vor Tx	n. n.	
Tag 75	n. n.	komplett- 100% Spender
Tag 103	7×10^{-1}	gemischt- 20% Spender

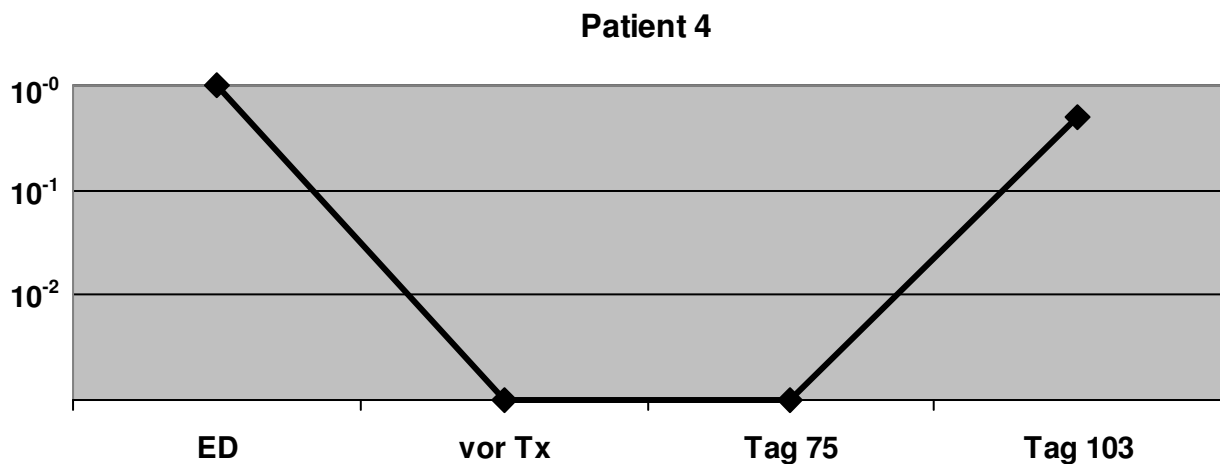


Abbildung 10: Dargestellt ist das NPM1-MRD-Level im Krankheitsverlauf des Patienten 4 beginnend mit der Erstdiagnose, einer Probe vor Transplantation und zwei an den Tagen 75 und 103 nach Transplantation.

3.4.5 Patient 5

Bei dem 63-jährigen Patienten wurde eine NPM1-Mutation Typ A nachgewiesen. Der Patient erreichte eine komplette Remission, wurde transplantiert und verstarb 316 Tage nach Transplantation an einer Infektion. Es wurden amplifizierte Proben verwendet.

Tabelle 27: Gezeigt ist eine Gegenüberstellung von relativem NPM1-MRD-Level und dem entsprechenden Ergebnis der Chimärismusanalyse derselben Probe des Patienten 5 an entsprechendem Zeitpunkt. Das NPM1-MRD-Level bezieht sich auf die Kopienanzahl bei Erstdiagnose. Die Ergebnisse der Chimärismusanalyse wurden im molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin erhoben und mir freundlicherweise von Frau Dr. Olga Blau zur Verfügung gestellt.

Zeitpunkt	NPM1	Chimärismus
vor Tx	n. n.	
Tag 18	n. n.	komplett- 100% Spender
Tag 255	n. n.	komplett- 100% Spender

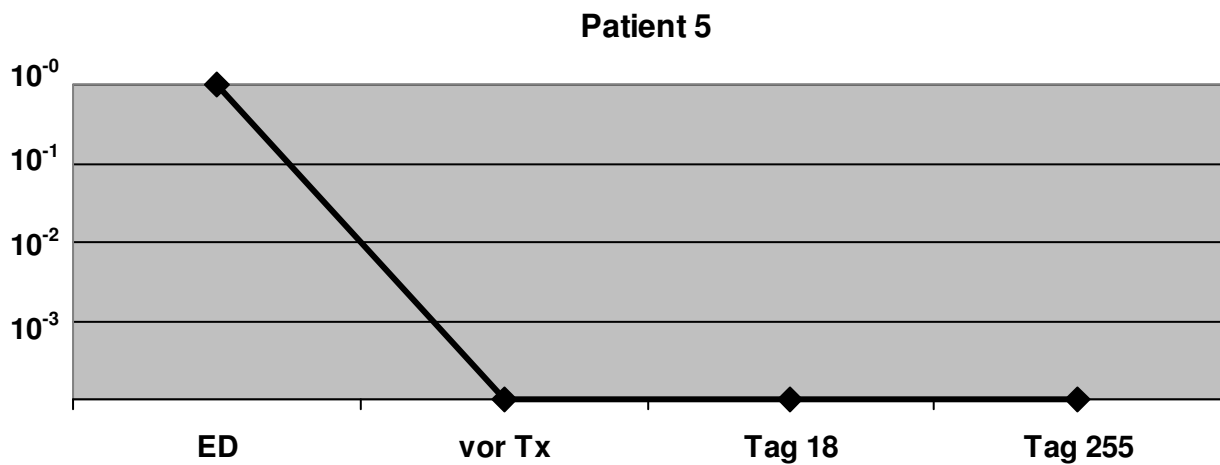


Abbildung 11: Dargestellt ist das NPM1-MRD-Level im Krankheitsverlauf des Patienten 5 beginnend mit der Erstdiagnose, einer Probe vor Transplantation und zwei an den Tagen 18 und 255 nach Transplantation.

3.4.6 Patient 6

Bei dem 52-jährigen Patienten konnte eine NPM1-Mutation vom Typ B nachgewiesen werden. Der Patient erreichte eine komplette Remission, erlitt ein Rezidiv und wurde danach transplantiert. Nach erfolgter Transplantation kam es erneut zu einem Rezidiv und der Patient verstarb an Tag 121. Es wurden amplifizierte Proben verwendet.

Tabelle 28: Gezeigt ist eine Gegenüberstellung von relativem NPM1-MRD-Level und dem entsprechenden Ergebnis der Chimärismusanalyse derselben Probe des Patienten 6 an entsprechendem Zeitpunkt. Das NPM1-MRD-Level bezieht sich auf die Kopienanzahl bei Erstdiagnose. Die Ergebnisse der Chimärismusanalyse wurden im molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin erhoben und mir freundlicherweise von Frau Dr. Olga Blau zur Verfügung gestellt.

Zeitpunkt	NPM1	Chimärismus
vor Tx	5×10^{-2}	
Tag 69	n. n.	komplett- 100% Spender
Tag 118	1×10^{-1}	gemischt- 5% Spender

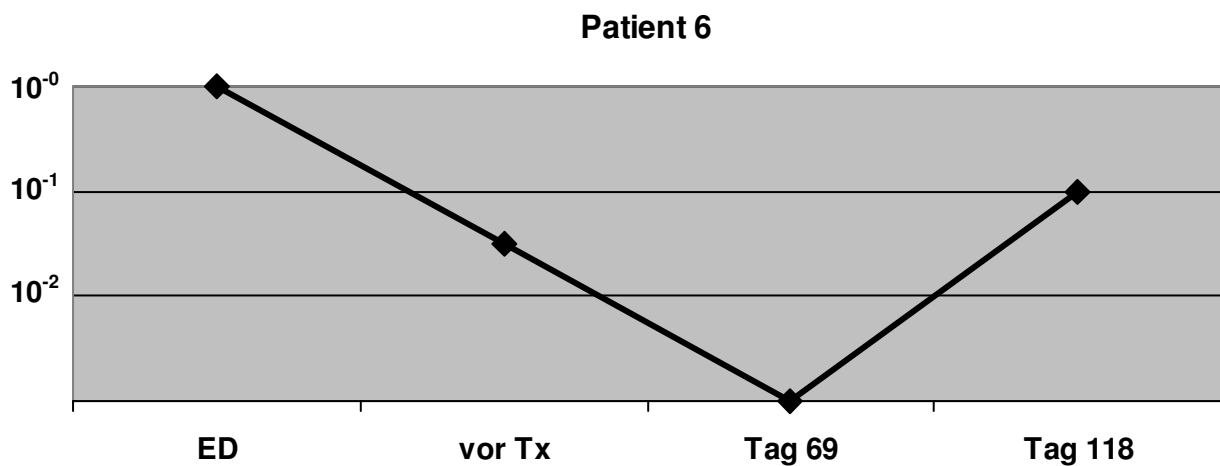


Abbildung 12: Dargestellt ist das NPM1-MRD-Level im Krankheitsverlauf des Patienten 6 beginnend mit der Erstdiagnose, einer Probe vor Transplantation und zwei an den Tagen 69 und 118 nach Transplantation.

3.4.7 Patient 7

Der 55 Jahre alte Patient hatte bei Diagnosestellung eine NPM1-Mutation vom Typ D. Der Patient erreichte eine komplette Remission und wurde transplantiert. Es trat kein Rezidiv auf. Es wurden amplifizierte Proben verwendet.

Tabelle 29: Gezeigt ist eine Gegenüberstellung von relativem NPM1-MRD-Level und dem entsprechenden Ergebnis der Chimärismusanalyse derselben Probe des Patienten 7 an entsprechendem Zeitpunkt. Das NPM1-MRD-Level bezieht sich auf die Kopienanzahl bei Erstdiagnose. Die Ergebnisse der Chimärismusanalyse wurden im molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin erhoben und mir freundlicherweise von Frau Dr. Olga Blau zur Verfügung gestellt.

Zeitpunkt	NPM1	Chimärismus
vor Tx	5×10^{-3}	
Tag 1118	n. n.	komplett- 100% Spender
Tag 4052	n. n.	komplett- 100% Spender

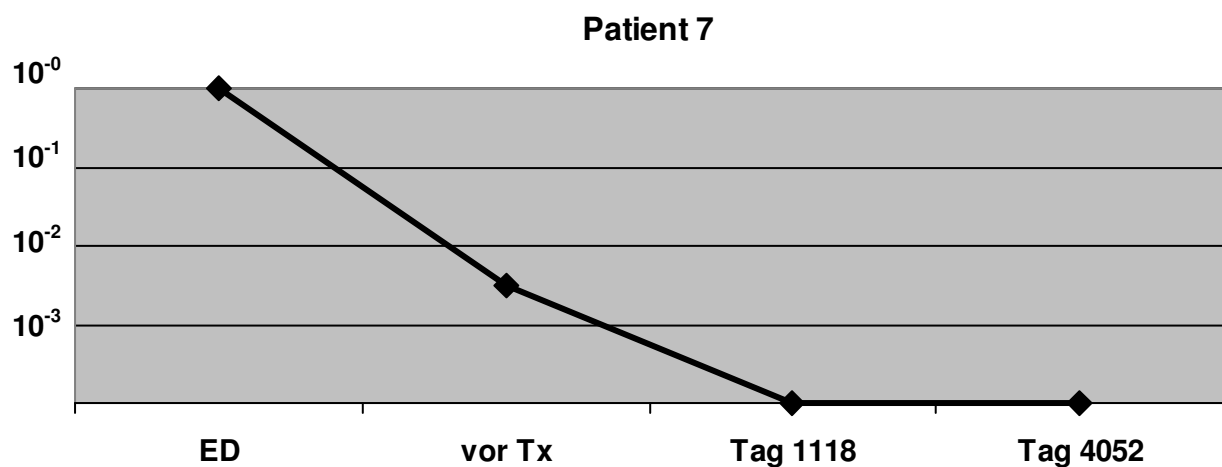


Abbildung 13: Dargestellt ist das NPM1-MRD-Level im Krankheitsverlauf des Patienten 7 beginnend mit der Erstdiagnose, einer Probe vor Transplantation und zwei an den Tagen 1118 und 4052 nach Transplantation.

3.4.8 Patient 8

Dieser Patient war bei Diagnosestellung 47 Jahre alt und hatte sowohl eine NPM1-Mutation Typ D als auch eine FLT3-ITD-Mutation. Eine komplette Remission wurde nicht erreicht. An Tag 58 nach Transplantation wurde ein Rezidiv festgestellt und der Patient verstarb 25 Tage später. Es wurden amplifizierte Proben verwendet.

Tabelle 30: Gezeigt ist eine Gegenüberstellung von relativem NPM1-MRD-Level und dem entsprechenden Ergebnis der Chimärismusanalyse derselben Probe des Patienten 8 an entsprechendem Zeitpunkt. Das NPM1-MRD-Level bezieht sich auf die Kopienanzahl bei Erstdiagnose. Die Ergebnisse der Chimärismusanalyse wurden im molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin erhoben und mir freundlicherweise von Frau Dr. Olga Blau zur Verfügung gestellt.

Zeitpunkt	NPM1	Chimärismus
vor Tx	n. n.	
Tag 58	5×10^{-2}	gemischt- 75% Spender

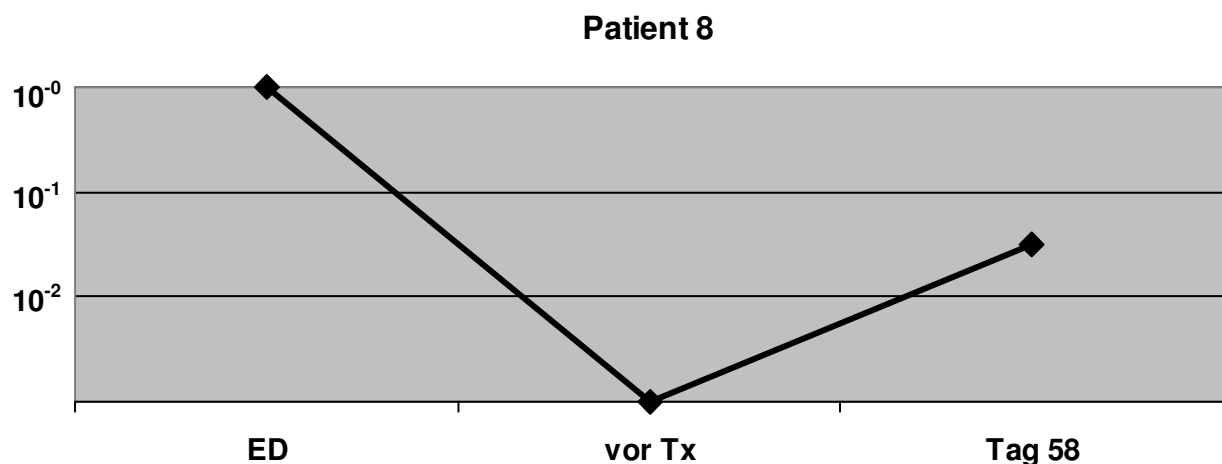


Abbildung 14: Dargestellt ist das NPM1-MRD-Level im Krankheitsverlauf des Patienten 8 beginnend mit der Erstdiagnose, einer Probe vor Transplantation und einer an Tag 58 nach Transplantation.

4 Diskussion

Die Möglichkeit der Diagnosestellung einer akuten myeloischen Leukämie auf molekularer Ebene stellt neue Herausforderungen an Identifizierung, Erhebung und Interpretation der neuen Erkenntnisse, bietet aber gleichzeitig neue Möglichkeiten. Patienten mit normalem Genotyp sind in der heterogenen Gruppe der AML-Erkrankten bezüglich prognostischer Aussagemöglichkeiten problematisch. Deshalb erscheint die Erforschung von Mutationen, wie der im NPM1-Gen, als Ziel führende Aufgabe. Sie werden im Klinikalltag immer häufiger verwendet und finden Berücksichtigung in der WHO-Klassifikation.

Mit einem Anteil NPM1-positiver Patienten von 19% erscheint die Anzahl im betrachteten Patientenkollektiv niedriger als vorbeschrieben mit 35,2% (Falini et al., 2005) oder 27,4% (Thiede et al., 2006). Beachtet man, dass sich die Daten von Falini et al. auf primäre AML beziehen und diese, wie gezeigt, mit einer höheren NPM1-Mutationsrate einhergehen, ergibt sich ein Anteil an NPM1-Mutationen von 25% (41 von 167) in unserer de novo AML-Untergruppe.

Die Variante A der NPM1-Mutation ist am häufigsten vertreten, gefolgt von den Varianten B und D. Dies entspricht den Beobachtungen Anderer (Schnittger et al., 2009; Thiede et al., 2006). Obwohl in unserer Patientengruppe im Vergleich ein geringerer Anteil der Mutation A vertreten ist, lassen sich mit den drei genannten Mutationstypen fast 90% der Patienten mit positivem NPM1-Status erfassen.

Dass eine NPM1-Mutation vermehrt mit FLT3-ITD- aber nicht mit FLT3-TKD-Mutationen vorkommt (Thiede et al., 2006), zeigt sich auch in unserem Patientenkollektiv.

Obwohl kein signifikanter Unterschied bezüglich des Erkrankungsalters zwischen NPM1-positiven und -negativen Patienten erreicht wird, liegt die Vermutung nahe, dass die NPM1-positiven Patienten bei Diagnosestellung jünger sind. Die erreichte Differenz des Erkrankungsalters scheint nicht ausreichend für die unterschiedliche Gruppengröße zu sein. Erhöht man die Patientenzahl der kleineren Gruppe durch Zusammenführung mit den FLT3-positiven Patienten, ist das Ergebnis signifikant, obwohl das mittlere Alter

um ein Jahr angestiegen ist. Beide Mutationen scheinen also das Erkrankungsalter in die gleiche Richtung zu beeinflussen. Beachtlich ist, dass der Vergleich mit der Patientengruppe ohne Mutation sowohl für die Gruppe der FLT3-positiven Patienten als auch die der NPM1-positiven Patienten ein signifikantes Ergebnis zeigt, obwohl letztere Gruppe eine geringere Patientenzahl aufweist. Somit erhält man signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, wenn man die NPM1-positive Gruppe vergrößert oder die NPM1-negative Gruppe jeweils durch Untergruppierungen verkleinert.

Eine NPM1-Mutation zeigt in unserer Patientengruppe keine Geschlechterpräferenz. Es wurde aber schon ein höheres Vorkommen bei weiblichen Erkrankten beschrieben (Thiede et al., 2006). Das Patientenkollektiv dieser Gruppe zeigte keine FLT3-ITD spezifische Tendenz. Dagegen ist bei unseren Patienten aufgefallen, dass eine FLT3-Mutation vermehrt bei Frauen nachzuweisen war. Inwiefern sich beide Ergebnisse bestätigen werden oder nicht, bleibt abzuwarten. Eine klinische Relevanz scheint eher unwahrscheinlich.

Zytogenetische Aberrationen bieten vor allem die Möglichkeit zur prognostischen Risikostratifizierung. In unserem Patientenkollektiv weist etwa die Hälfte der Patienten einen aberranten Genotyp auf und liegt damit ungefähr im vorbeschriebenen Bereich (Grimwade et al., 2010; Grimwade et al., 1998). Der hohe Anteil der Patienten mit normaler Zytogenetik zeigt noch einmal, wie wichtig die Suche nach molekularen Markern ist.

NPM1-Mutationen sind mit normaler Zytogenetik assoziiert (Falini et al., 2005). Dies gilt sowohl für die Haupt- als auch die Untergruppen. Dieser Einfluss zeigt sich unabhängig von einer FLT3-Mutation, welche hier kein vermehrtes Auftreten in der Gruppe der normalen Karyotypen zeigt.

Bei Betrachtung der aberranten Zytogenetik ist die eingeschränkte Aussagefähigkeit zu beachten, da die NPM1-positive Gruppe mit zytogenetischer Aberration durch die Assoziation mit normalem Karyotyp erwartungsgemäß sehr klein ist. Durch die größere Patientenzahl in der negativen Gruppe ist auch mit mehr prognostisch günstigen Aberrationen zu rechnen. Von größerer Bedeutung sind aber die prognostisch

ungünstigen, welche bei der Hälfte der NPM1-negativen Patienten mit aberrantem Karyotyp deutlich stärker vertreten sind.

Das Vorkommen höherer Leukozyten- und Blastenwerte (Thiede et al., 2006) lässt sich auch hier bestätigen. Auffällig ist, dass ohne Berücksichtigung des FLT3-Status signifikant höhere Werte bei den NPM1-positiven Patienten vorkommen. Wenn bei den Untergruppen der FLT3-Status beachtet wird, ist dies nicht mehr der Fall. Das erlaubt die Frage, ob das signifikante Ergebnis für die NPM1-Hauptgruppen nur durch die gezeigte hohe Vergesellschaftungsrate zwischen NPM1- und FLT3-Mutationen entsteht. Zumal FLT3-Mutationen für höhere Leukozyten- und Blastenwerte bekannt sind (Kuchenbauer et al., 2005). Allerdings ist auch beschrieben, dass bei jüngeren Patienten höhere Leukozyten- und Blastenzahlen vorkommen (Appelbaum et al., 2006) und über eine Tendenz zu einem jüngeren Erkrankungsalter ließ sich für die NPM1-positiven Patienten diskutieren. Trotzdem überwiegt wohl der Einfluss einer FLT3-Mutation.

Bei alleiniger Betrachtung des Einflusses einer NPM1-Mutation kann kein signifikanter Unterschied für das Gesamtüberleben, das krankheitsfreie oder auch das Ereignis freie Überleben erkannt werden.

Das war in dieser Form nicht unbedingt zu erwarten, da bezüglich der erhobenen Parameter signifikante Unterschiede festzustellen waren. Wenn man davon ausgeht, dass sich ein niedrigeres Erkrankungsalter, das Vorhandensein einer normalen Zytogenetik oder zumindest die Abwesenheit von prognostisch ungünstigen Karyotypen, niedrige Leukozyten- und Blastenwerte bei Erstdiagnose, eine de novo AML, das Erreichen einer CR oder auch eine geringe Rezidivwahrscheinlichkeit vorteilhaft auf die Überlebenszeiten auswirken müssten. Demnach stellen das vermehrte Auftreten der normalen Karyotypen und die Abwesenheit prognostisch als schlecht einzuordnender Aberrationen in Kombination mit dem vermehrten Vorkommen der de novo AML einen Vorteil für die Patienten mit einer NPM1-Mutation dar. Demgegenüber stehen die erhöhten Leukozyten- und Blastenwerte bei der Diagnosestellung, die bei den Wildtyp-NPM1 Patienten geringer waren. Andere signifikante Differenzen konnten bei den erhobenen Parametern nicht festgestellt

werden und es wäre ein Unterschied in den Überlebenszeiten mit Vorteil für die NPM1-Mutation denkbar gewesen.

Erkenntnisreicher ist die Betrachtung der Untergruppen, welche für alle drei Überlebenszeiten in der gleichen Konstellation signifikante Unterschiede verdeutlichen. Hier steht die Gruppe von Patienten, bei denen sowohl eine NPM1- als auch FLT3-Mutation nachgewiesen werden konnte, im Mittelpunkt. Ihr Gesamtüberleben, wie auch ihr Ereignis freies und krankheitsfreies Überleben sind signifikant kürzer als das der Patienten ohne Mutation und der mit alleiniger NPM1-Mutation. Während bei unseren Patienten gezeigt werden konnte, dass die Doppelmutation mit schlechteren Überlebenszeiten einherging, zeigten sich in anderen Untersuchungen Patienten mit alleiniger NPM1-Mutation als Gruppe mit den besten Überlebenszeiten (Schnittger et al., 2005). Dass das alleinige Vorhandensein einer NPM1-Mutation ohne FLT3-Mutation mit einem besseren Gesamtüberleben, Ereignis freien und krankheitsfreien Überleben verbunden ist, wurde mehrfach vorbeschrieben (K Döhner et al., 2005; Haferlach et al., 2009; Thiede et al., 2006). Allerdings kommen auch Andere bei alleiniger NPM1-Betrachtung ohne Beachtung des FLT3-Status zu keinen signifikanten Ergebnissen bezüglich der Überlebenszeiten, aber in der multivarianten Analyse zeigte sich eine NPM1- neben FLT3-ITD-Mutation, Alter und Zytogenetik als unabhängiger Faktor (Verhaak et al., 2005).

Signifikante Unterschiede zwischen den Patienten, die nur eine NPM1-Mutation haben und Patienten mit beiden Mutationen bestehen in unserer Patientengruppe lediglich darin, dass in letzterer Gruppe mehr weibliche Erkrankte und höhere Leukozyten- und Blastenwerte bei Diagnosestellung vorkommen. Auch wenn die höheren Werte durchaus für eine schlechtere Prognose sprechen, ist es doch als unwahrscheinlich einzuschätzen, dass sie allein der Grund für den Überlebensnachteil sind.

Betrachtet man die Differenzen zwischen den NPM1/FLT3-positiven Patienten und den Patienten ohne Mutation, treten auch hier die höheren Werte bei den Patienten mit beiden Mutationen auf. Allerdings spricht der zytogenetische Befund und das häufigere Vorkommen der de novo AML für einen Überlebensvorteil.

Der Vergleich des Erreichens einer CR und des Auftretens eines Rezidivs ergab keine signifikanten Ergebnisse für die genannten Gruppenkonstellationen. Dies macht das gleichzeitige Erscheinen des Überlebensnachteils für die Patienten mit beiden Mutationen in allen drei Überlebenszeiten nachvollziehbar.

Während die Risikoabschätzung durch die Zytogenetik (Grimwade et al., 2010) ungünstigerweise keine Auswirkung zu haben scheint, kommt den erhöhten Leukozyten- und Blastenwerten bei dieser Betrachtungsweise zu viel Bedeutung zu und muss auf die geringe Patientenzahl zurückgeführt werden. Schaut man auf die Gruppe NPM1positiv/FLT3negativ und sieht sie im Vergleich zur Gruppe NPM1negativ/FLT3positiv, finden sich bei letzterer Gruppe ebenfalls höhere Leukozyten- und Blastenwerte sowie in der ersten Gruppe weniger Aberrationen des Karyotyps. Trotzdem zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Überlebenszeiten, wenngleich der zu sehende Trend gut erklärbar ist.

Damit lässt sich wohl nur schlussfolgern, dass das gleichzeitige Auftreten von NPM1- und FLT3-Mutationen als prognostisch schlecht zu werten ist (Haferlach et al., 2009), wohingegen die gefundenen Assoziationen mit den erhobenen Parametern für die Prognoseeinordnung der NPM1-Mutation nicht Ziel führend sind. Deshalb sollte eine NPM1- mit einer FLT3-Mutationsanalyse kombiniert sein, um eine prognostische Aussage zu erlauben. Bei Untersuchung des Einflusses von FLT3-Leveln auf das Gesamtüberleben und das Rezidiv freie Überleben konnte gezeigt werden, dass nur in der NPM1-positiven Patientengruppe (altersunabhängig) ein signifikanter prognostischer Aussagewert des FLT3-Levels festzustellen ist (Schneider et al., 2012). Wie auch in unserer Patientengruppe, in der der NPM1-Status allein für die Überlebenszeiten keinen wirklichen Stellenwert hat, gilt dies offenbar auch für die FLT3-Mutation.

Für die Frage der Eignung der NPM1-Mutation als Verlaufsparemeter wurde die quantitative Analyse genutzt. Da es sich bei den betrachteten acht Patienten ausschließlich um Patienten nach Transplantation handelt, bietet die Verfügbarkeit der Chimärismusdaten eine gute Kontroll- und Einschätzungsmöglichkeit für die Verlässlichkeit und Sensitivität der quantitativen NPM1-Analyse. Die retrospektive Betrachtung und der damit verbundene eingeschränkte Materialzugriff machten eine

Amplifikation bei sechs Patienten nötig. Das Ausmaß der eingeschränkten Sensitivität durch die Amplifikation lässt sich bei der parallelen Analyse von Originalprobe und amplifizierter Probe abschätzen. Hier zeigt sich bei letzterer nur eine maximale Sensitivität bis 10^{-2} , während in den Originalproben ein Niveau von 10^{-3} sicher zu erreichen war.

Trotz dieser Einschränkung kann bei gemischtem Chimärismus immer auch ein NPM1-Anstieg gezeigt werden und damit ist bei allen Patienten eine sichere, sowohl durch klinische als auch andere molekulargenetische Verlaufsparemeter abgesicherte Aussage zum Krankheitsverlauf möglich. Eine beschriebene Korrelation zwischen NPM1-Level und Chimärismus (Bacher, Badbaran, et al., 2009), als auch die Verbindung von NPM1-Level und Krankheitsverlauf (Chou et al., 2007; Gorello et al., 2006) kann damit unterstützt werden.

Patient 7 lebt in CR und zeigt entsprechend keinen Anstieg. Die Patienten 2, 3 und 5 sind Therapie bzw. infektionsbedingt in CR verstorben. Auch hier zeigt sich kein NPM1-Anstieg. Die Pat. 1, 4, 6 und 8 sind Leukämie bedingt verstorben und zeigten entsprechend wieder mehr NPM1-Kopien.

Bei Patient 2 kann man das eigentliche Potential der quantitativen Analyse erkennen. Hier wird eine Sensitivität bis 10^{-6} erreicht, was eine deutliche Steigerung im Vergleich zu anderen MRD-Techniken bedeutet.

Der Einsatz bei nicht transplantierten Patienten erscheint ebenfalls erstrebenswert. In ihrem Fall ist eine Analyse des Chimärismus nicht möglich und neben dem Vorteil der hohen Sensitivität, bietet sich die quantitative NPM1-Analyse als Möglichkeit zur verlässlichen molekulargenetischen Verlaufsbeobachtung an.

Außerdem wird berichtet, dass eine Prognosebestimmung über NPM1-Level und deren Reduktion zu bestimmten Zeitpunkten möglich sein soll (Krönke et al., 2011). Damit würde ein konsequent durchgeführtes, quantitatives MRD-Monitoring viele Aussagemöglichkeiten bieten. Dieses Monitoring sollte nach einem auf die Mutation abgestimmten Zeitplan erfolgen. So ist es sinnvoll, NPM1positive/FLT3negative Patienten alle sechs Monate auf ihren MRD-Status hin zu untersuchen, während bei

NPM1/FLT3positiven ein kürzeres Zeitintervall von vier Monaten nötig ist (Ommen et al., 2010).

Die Beurteilung der Aussagekraft einer NPM1-Mutation in den verschiedenen Feldern der AML-Diagnostik, -Prognosefindung und -Verlaufskontrolle lässt folgende Überlegungen zu. Es zeigen sich eindeutig Assoziationen mit einigen Parametern, am bedeutendsten ist wohl die Verbindung mit einem normalen Karyotypen zu werten. Es wurde bereits die Vermutung geäußert, dass es sich bei der Mutation um eine sehr frühe (Schnittger et al., 2009) und kausale Mutation der AML handelt (Falini et al., 2008), die den zytogenetisch sichtbaren Veränderungen vorausgeht. Bleibt die Frage, ob bei dem Anteil der Patienten mit NPM1-Mutation und aberrantem Karyotyp die Aberration der Mutation folgte bzw. wenn man von der Stabilität der Mutation ausgeht (Bacher, Badbaran, et al., 2009; Bolli et al., 2006; Falini et al., 2008; Meloni et al., 2009), ob bei der Krankheitsprogression neue aberrante Karyotypen erscheinen. Letztendlich muss man sagen, dass die signifikanten Unterschiede zwischen NPM1-positiven und -negativen Patienten innerhalb der untersuchten Parameter auf die Überlebenszeiten und damit auch für die Prognoseabschätzung in unserem Patientenkollektiv keinen nennenswerten Effekt hatten. Inwiefern das vermehrte Vorkommen in den monozytischen Reihen (M4/5) (Boissel et al., 2005), ein potentiell besseres Therapieansprechen oder die anderen gefundenen Differenzen einmal über die Funktion bzw. den Funktionsverlust des Proteins zu erklären und im idealen Fall therapierbar sein werden, lässt sich mit dieser Arbeit nicht beantworten, stellt allerdings einen sehr attraktiven Forschungsschwerpunkt dar.

Wenn NPM1 hinsichtlich der Prognoseabschätzung hier enttäuschende Ergebnisse gezeigt hat, stellt sich dies in der Verlaufsbeurteilung ganz anders dar. Hier scheint die quantitative Analyse eine sehr viel sensitivere und zugleich verlässliche Methode für das MRD-Monitoring zu sein. Der Großteil der Patienten kann mit drei Mutationstypen erfasst werden. Dies ist praktisch, weil die Verfahren Primer spezifisch funktionieren und ermöglicht gleichzeitig ein sinnvolles und ökonomisches Arbeiten.

Erste, viel versprechende Ergebnisse bezüglich einer möglichen Therapie wurden veröffentlicht und das Vorhandensein einer NPM1-A positiven Zellkultur eröffnet viele Möglichkeiten. So konnte experimentell eine Reduktion der Zellen in der Synthese-

Phase, eine Induktion der Differenzierung, eine Sensitivierung gegenüber ATRA (all-trans-retinoic acid) und Cytarabin, sowie eine vermehrte Apoptose erreicht werden (Balusu et al., 2011). Es wird sich zeigen, inwiefern dies auch im Tierexperiment bestätigt werden kann. Verschiedene Konzepte einer Targettherapie wären denkbar. So stellt das zytoplasmatische Vorkommen des mutierten NPM1 und dessen Rücktransport in das physiologische Kompartiment ein mögliches Ziel dar oder die Zerstörung des verbliebenen Wildtyp-NPM1 des gesunden Allels, um die Leukämiezelle dessen offenbar überlebenswichtigen Funktionen zu berauben (Falini et al., 2011). Eine gezielte Therapie würde in diesem Fall, ähnlich dem Beispiel der AML M3, wohl zu einer Prognoseverbesserung führen und die eigene Untergruppe in der WHO-Klassifikation rechtfertigen und verteidigen.

5 Zusammenfassung

Die Diagnostik bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie bezieht neben lang bekannten morphologischen Kriterien heute auch molekulargenetische Veränderungen, wie zum Beispiel eine NPM1-Mutation mit ein, die zunehmend mehr Bedeutung für Prognoseabschätzung und Verlaufsbeobachtung im Rahmen der minimalen Resterkrankung erlangen.

Es wurden 228 AML-Patienten auf Vorhandensein einer NPM1-Mutation mittels Sequenzierung getestet und die NPM1-positiven und -negativen Gruppen bezüglich routinemäßig erhobener Parameter verglichen und auf Unterschiede in den Überlebenszeiten untersucht. Des Weiteren wurde bei acht transplantierten Patienten eine quantitative NPM1-Analyse zur Verlaufsbeurteilung durchgeführt.

Die häufigste Mutation bei AML mit normalem Karyotyp ist die NPM1-Mutation. Die von uns untersuchten NPM1-positiven Patienten haben oft ebenfalls eine FLT3-ITD-Mutation, wir sehen vermehrt einen normalen Karyotyp und bei aberranten Karyotypen sind diese oft mit einem intermediären Risiko assoziiert. Die Leukozyten- und Blastenzahlen bei Erstdiagnose sind höher, wenn eine NPM1-Mutation vorliegt. Der Anteil der sekundären AML liegt in der Patientengruppe ohne NPM1-Mutation höher. Für FLT3-TKD, Erkrankungsalter, Geschlecht, Erreichen einer CR und dem Auftreten eines Rezidivs konnten keine Unterschiede zwischen NPM1-positiven und -negativen Patienten gezeigt werden. Bezüglich der Überlebenszeiten konnten zwischen Patienten mit und ohne NPM1-Mutation keine Unterschiede im Gesamtüberleben, im Ereignis freien und krankheitsfreien Überleben gezeigt werden. Allerdings zeigt sich ein signifikanter Überlebensnachteil für Patienten, die gleichzeitig eine NPM1- und FLT3-ITD-Mutation aufweisen. Die Verlaufbetrachtung von acht NPM1-positiven Patienten mittels quantitativer PCR zeigt in allen Fällen eine Korrelation zwischen Krankheitsverlauf und MRD-Nachweis.

NPM1-Mutationen erweisen sich als nützlich für die MRD-Diagnostik auf Grund der von uns etablierten hoch auflösenden quantitativen PCR. Da die FLT3-ITD-Mutation häufig

gemeinsam mit NPM1-Mutationen auftritt und negativen Einfluss auf das Überleben hat, ist eine gleichzeitige Bestimmung für prognostische Aussagen heran zu ziehen.

6 Literaturverzeichnis

- Ahn, JY, Liu, X, Cheng, D, et al. (2005). Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD. *Mol Cell*, 18(4), 435-445. doi: 10.1016/j.molcel.2005.04.010
- Albiero, E, Madeo, D, Bolli, N, et al. (2007). Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 NPM1 mutation. *Leukemia*, 21(5), 1099-1103. doi: 10.1038/sj.leu.2404597
- Appelbaum, FR, Gundacker, H, Head, DR, et al. (2006). Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, 107(9), 3481-3485. doi: 10.1182/blood-2005-09-3724
- Bacher, U, Badbaran, A, Fehse, B, Zabelina, T, Zander, AR, & Kroger, N. (2009). Quantitative monitoring of NPM1 mutations provides a valid minimal residual disease parameter following allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol*, 37(1), 135-142. doi: 10.1016/j.exphem.2008.09.014
- Bacher, U, Schnittger, S, Haferlach, C, & Haferlach, T. (2009). Molecular diagnostics in acute leukemias. *Clin Chem Lab Med*, 47(11), 1333-1341. doi: 10.1515/cclm.2009.324
- Bader, P, Holle, W, Klingebiel, T, et al. (1997). Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant*, 19(7), 697-702. doi: 10.1038/sj.bmt.1700721
- Balusu, R, Fiskus, W, Rao, R, et al. (2011). Targeting levels or oligomerization of nucleophosmin 1 induces differentiation and loss of survival of human AML cells with mutant NPM1. *Blood*, 118(11), 3096-3106. doi: 10.1182/blood-2010-09-309674
- Becker, H, Marcucci, G, Maharry, K, et al. (2010). Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*, 28(4), 596-604. doi: 10.1200/jco.2009.25.1496
- Bennett, JM, Catovsky, D, Daniel, MT, et al. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*, 103(4), 620-625.
- Blau, IW, Schmidt-Hieber, M, Leschinger, N, et al. (2007). Engraftment kinetics and hematopoietic chimerism after reduced-intensity conditioning with fludarabine and treosulfan before allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol*, 86(8), 583-589. doi: 10.1007/s00277-007-0294-6

- Boissel, N, Renneville, A, Biggio, V, et al. (2005). Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*, 106(10), 3618-3620. doi: 10.1182/blood-2005-05-2174
- Bolli, N, Galimberti, S, Martelli, MP, et al. (2006). Cytoplasmic nucleophosmin in myeloid sarcoma occurring 20 years after diagnosis of acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*, 7(4), 350-352. doi: 10.1016/s1470-2045(06)70661-1
- Bolli, N, Payne, EM, Grabher, C, et al. (2010). Expression of the cytoplasmic NPM1 mutant (NPMc+) causes the expansion of hematopoietic cells in zebrafish. *Blood*, 115(16), 3329-3340. doi: 10.1182/blood-2009-02-207225
- Borer, RA, Lehner, CF, Eppenberger, HM, & Nigg, EA. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, 56(3), 379-390.
- Büchner, T, Berdel, WE, Haferlach, C, et al. (2009). Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 27(1), 61-69. doi: 10.1200/jco.2007.15.4245
- Campana, D. (2003). Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol*, 121(6), 823-838.
- Chan, WY, Liu, QR, Borjigin, J, et al. (1989). Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry*, 28(3), 1033-1039.
- Chen, D, Yoon, JB, & Gu, W. (2010). Reactivating the ARF-p53 axis in AML cells by targeting ULF. *Cell Cycle*, 9(15), 2946-2951. doi: 10.4161/cc.9.15.12355
- Cheng, K, Sportoletti, P, Ito, K, et al. (2010). The cytoplasmic NPM mutant induces myeloproliferation in a transgenic mouse model. *Blood*, 115(16), 3341-3345. doi: 10.1182/blood-2009-03-208587
- Chou, WC, Tang, JL, Wu, SJ, et al. (2007). Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (NPM1) mutations. *Leukemia*, 21(5), 998-1004. doi: 10.1038/sj.leu.2404637
- Colombo, E, Marine, JC, Danovi, D, Falini, B, & Pelicci, PG. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol*, 4(7), 529-533. doi: 10.1038/ncb814
- Commoner, B, & Lipkin, D. (1949). The Application of the Beer-Lambert Law to Optically Anisotropic Systems. *Science*, 110(2845), 41-43. doi: 10.1126/science.110.2845.41-a

- de The, H, Chomienne, C, Lanotte, M, Degos, L, & Dejean, A. (1990). The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*, *347*(6293), 558-561. doi: 10.1038/347558a0
- Dergunova, NN, Bulycheva, TI, Artemenko, EG, et al. (2002). A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes. *Immunol Lett*, *83*(1), 67-72.
- Diverio, D, Rossi, V, Avvisati, G, et al. (1998). Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RARalpha fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter "AIDA" trial. GIMEMA-AIEOP Multicenter "AIDA" Trial. *Blood*, *92*(3), 784-789.
- Döhner, H, Estey, EH, Amadori, S, et al. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, *115*(3), 453-474. doi: 10.1182/blood-2009-07-235358
- Döhner, K, Schlenk, RF, Habdank, M, et al. (2005). Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*, *106*(12), 3740-3746. doi: 10.1182/blood-2005-05-2164
- Falini, B, Bolli, N, Shan, J, et al. (2006). Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood*, *107*(11), 4514-4523. doi: 10.1182/blood-2005-11-4745
- Falini, B, Gionfriddo, I, Cecchetti, F, Ballanti, S, Pettirossi, V, & Martelli, MP. (2011). Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): any hope for a targeted therapy? *Blood Rev*, *25*(6), 247-254. doi: 10.1016/j.blre.2011.06.001
- Falini, B, Martelli, MP, Bolli, N, et al. (2006). Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, *108*(6), 1999-2005. doi: 10.1182/blood-2006-03-007013
- Falini, B, Martelli, MP, Mecucci, C, et al. (2008). Cytoplasmic mutated nucleophosmin is stable in primary leukemic cells and in a xenotransplant model of NPMc+ acute myeloid leukemia in SCID mice. *Haematologica*, *93*(5), 775-779. doi: 10.3324/haematol.12225
- Falini, B, Mecucci, C, Tiacci, E, et al. (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, *352*(3), 254-266. doi: 10.1056/NEJMoa041974

- Feuerstein, N, Chan, PK, & Mond, JJ. (1988). 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(22), 10608-10612.
- Ford, CE, Hamerton, JL, Barnes, DW, & Loutit, JF. (1956). Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*, 177(4506), 452-454.
- Gale, RE, Green, C, Allen, C, et al. (2008). The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 111(5), 2776-2784. doi: 10.1182/blood-2007-08-109090
- Gorello, P, Cazzaniga, G, Alberti, F, et al. (2006). Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*, 20(6), 1103-1108. doi: 10.1038/sj.leu.2404149
- Grimwade, D, Hills, RK, Moorman, AV, et al. (2010). 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(3), 354-365. doi: 10.1182/blood-2009-11-254441
- Grimwade, D, Walker, H, Oliver, F, et al. (1998). The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*, 92(7), 2322-2333.
- Grisendi, S, Bernardi, R, Rossi, M, et al. (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature*, 437(7055), 147-153. doi: 10.1038/nature03915
- Haferlach, C, Mecucci, C, Schnittger, S, et al. (2009). AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*, 114(14), 3024-3032. doi: 10.1182/blood-2009-01-197871
- Hayakawa, F, Towatari, M, Kiyoi, H, et al. (2000). Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene*, 19(5), 624-631. doi: 10.1038/sj.onc.1203354
- Herrera, JE, Savkur, R, & Olson, MO. (1995). The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res*, 23(19), 3974-3979.
- Hingorani, K, Szebeni, A, & Olson, MO. (2000). Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem*, 275(32), 24451-24457. doi: 10.1074/jbc.M003278200
- Huang, ME, Ye, YC, Chen, SR, et al. (1988). Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 72(2), 567-572.

- Itahana, K, Bhat, KP, Jin, A, et al. (2003). Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell*, 12(5), 1151-1164.
- Jurcic, JG, Nimer, SD, Scheinberg, DA, DeBlasio, T, Warrell, RP, Jr., & Miller, WH, Jr. (2001). Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR-alpha isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 98(9), 2651-2656.
- Kaplan, EL, & Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282), 457-481. doi: 10.1080/01621459.1958.10501452
- Kern, W, Bacher, U, Haferlach, C, Schnittger, S, & Haferlach, T. (2010). The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best Pract Res Clin Haematol*, 23(3), 379-390. doi: 10.1016/j.beha.2010.06.007
- Kern, W, Haferlach, C, Haferlach, T, & Schnittger, S. (2008). Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer*, 112(1), 4-16. doi: 10.1002/cncr.23128
- Krönke, J, Schlenk, RF, Jensen, KO, et al. (2011). Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Oncol*, 29(19), 2709-2716. doi: 10.1200/JCO.2011.35.0371
- Krug, U, Rollig, C, Koschmieder, A, et al. (2010). Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. *Lancet*, 376(9757), 2000-2008. doi: 10.1016/s0140-6736(10)62105-8
- Kubista, M, Andrade, JM, Bengtsson, M, et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27(2-3), 95-125. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007
- Kuchenbauer, F, Kern, W, Schoch, C, et al. (2005). Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 90(12), 1617-1625.
- Landers, JP. (1993). Capillary electrophoresis: pioneering new approaches for biomolecular analysis. *Trends Biochem Sci*, 18(11), 409-414.
- Lo Coco, F, Diverio, D, Avvisati, G, et al. (1999). Therapy of molecular relapse in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 94(7), 2225-2229.
- Meloni, G, Mancini, M, Gianfelici, V, Martelli, MP, Foa, R, & Falini, B. (2009). Late relapse of acute myeloid leukemia with mutated NPM1 after eight years: evidence of NPM1 mutation stability. *Haematologica*, 94(2), 298-300. doi: 10.3324/haematol.2008.000059

- Mueller, BU, Pabst, T, Fos, J, et al. (2006). ATRA resolves the differentiation block in t(15;17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. *Blood*, *107*(8), 3330-3338. doi: 10.1182/blood-2005-07-3068
- Mullis, KB, & Faloona, FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, *155*, 335-350.
- Neame, PB, Soamboonsrup, P, Browman, GP, et al. (1986). Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB-immunologic classification of AML. *Blood*, *68*(6), 1355-1362.
- Ommen, HB, Schnittger, S, Jovanovic, JV, et al. (2010). Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBFβ-MYH11 acute myeloid leukemias. *Blood*, *115*(2), 198-205. doi: 10.1182/blood-2009-04-212530
- Patel, JP, Gonen, M, Figueroa, ME, et al. (2012). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, *366*(12), 1079-1089. doi: 10.1056/NEJMoa1112304
- Pfirschmann, M, Ehninger, G, Thiede, C, et al. (2012). Prediction of post-remission survival in acute myeloid leukaemia: a post-hoc analysis of the AML96 trial. *Lancet Oncol*, *13*(2), 207-214. doi: 10.1016/s1470-2045(11)70326-6
- Pitiot, AS, Santamaria, I, Garcia-Suarez, O, et al. (2007). A new type of NPM1 gene mutation in AML leading to a C-terminal truncated protein. *Leukemia*, *21*(7), 1564-1566. doi: 10.1038/sj.leu.2404679
- Quentmeier, H, Martelli, MP, Dirks, WG, et al. (2005). Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin. *Leukemia*, *19*(10), 1760-1767. doi: 10.1038/sj.leu.2403899
- Quintrell, N, Lebo, R, Varmus, H, et al. (1987). Identification of a human gene (HCK) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic cells. *Mol Cell Biol*, *7*(6), 2267-2275.
- Reiter, A, Lengfelder, E, & Grimwade, D. (2004). Pathogenesis, diagnosis and monitoring of residual disease in acute promyelocytic leukaemia. *Acta Haematol*, *112*(1-2), 55-67. doi: 10.1159/000077560
- Rosenblum, BB, Lee, LG, Spurgeon, SL, et al. (1997). New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res*, *25*(22), 4500-4504.
- Saiki, RK, Gelfand, DH, Stoffel, S, et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, *239*(4839), 487-491.
- Sanger, F, Nicklen, S, & Coulson, AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *74*(12), 5463-5467.

- Schmidt-Zachmann, MS, Hügler-Dorr, B, & Franke, WW. (1987). A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family. *EMBO J*, 6(7), 1881-1890.
- Schneider, F, Hoster, E, Unterhalt, M, et al. (2012). The FLT3ITD mRNA level has a high prognostic impact in NPM1 mutated, but not in NPM1 unmutated, AML with a normal karyotype. *Blood*, 119(19), 4383-4386. doi: 10.1182/blood-2010-12-327072
- Schnittger, S, Kern, W, Tschulik, C, et al. (2009). Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*, 114(11), 2220-2231. doi: 10.1182/blood-2009-03-213389
- Schnittger, S, Schoch, C, Dugas, M, et al. (2002). 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(1), 59-66.
- Schnittger, S, Schoch, C, Kern, W, et al. (2005). Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, 106(12), 3733-3739. doi: 10.1182/blood-2005-06-2248
- Selvin, PR. (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol*, 246, 300-334.
- Shook, D, Coustan-Smith, E, Ribeiro, RC, Rubnitz, JE, & Campana, D. (2009). Minimal residual disease quantitation in acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma*, 9 Suppl 3, S281-285. doi: 10.3816/CLM.2009.s.024
- Small, D, Levenstein, M, Kim, E, et al. (1994). STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(2), 459-463.
- Suzuki, T, Kiyoi, H, Ozeki, K, et al. (2005). Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 106(8), 2854-2861. doi: 10.1182/blood-2005-04-1733
- Szebeni, A, & Olson, MO. (1999). Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci*, 8(4), 905-912. doi: 10.1110/ps.8.4.905
- Thiede, C, Florek, M, Bornhauser, M, et al. (1999). Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant*, 23(10), 1055-1060. doi: 10.1038/sj.bmt.1701779
- Thiede, C, Koch, S, Creutzig, E, et al. (2006). Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 107(10), 4011-4020. doi: 10.1182/blood-2005-08-3167

- Thiede, C, Steudel, C, Mohr, B, et al. (2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 99(12), 4326-4335.
- Vardiman, JW. (2010). The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact*, 184(1-2), 16-20. doi: 10.1016/j.cbi.2009.10.009
- Vardiman, JW, Thiele, J, Arber, DA, et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937-951. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262
- Verhaak, RG, Goudswaard, CS, van Putten, W, et al. (2005). 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(12), 3747-3754. doi: 10.1182/blood-2005-05-2168
- Yamamoto, Y, Kiyoi, H, Nakano, Y, et al. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97(8), 2434-2439.
- Yokota, S, Kiyoi, H, Nakao, M, et al. (1997). Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*, 11(10), 1605-1609.

7 Anhang

Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Katja Graul, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Untersuchungen von NPM1-Mutationen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie bei Diagnosestellung und im Verlauf* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke meinen Doktoreltern Herrn PD Dr. med. Igor Wolfgang Blau und Frau Dr. Olga Blau für dieses spannende Thema, die stete Unterstützung bei allen Fragen und Problemen, sowie die lückenlose Betreuung zwischen Praxis und Theorie. Sie schufen eine Atmosphäre, die sowohl genügend Entwicklungsfreiräume, als auch wichtige Impulse zur richtigen Zeit enthielt.

Des Weiteren gilt mein Dank dem gesamten Team des molekulargenetischen Labors der Charité am Campus Benjamin Franklin, das mich sehr freundlich aufgenommen und viel Geduld mit mir bewiesen hat. Insbesondere trifft dies auf Annette Sindram zu, welche nie müde wurde, mir mit Klugheit und Witz zur Seite zu stehen.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken. Im Besonderen bei meinen Eltern, Claudia und Dietmar Abendroth, welche in jeder Lebenslage zu mir stehen und mich immer bedingungslos unterstützen. Bei Katharina Hofheinz, die vor allem dem Prozess des Schreibens viel Schrecken nahm, und Yeji Kim.

Für Oma in ewiger Liebe und Dankbarkeit.