

Aus der  
III. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Monitoring minimaler Resterkrankung akuter myeloischer Leukämien mittels  
NPM1-mutationsspezifischer RT-PCR zwecks prädiktiver Rezidiverkennung

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Johannes Barucha  
aus Dernbach

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 23. Januar 2025

# Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	V
II.	Abbildungsverzeichnis	VIII
III.	Tabellenverzeichnis	IX
1	Einleitung und Ziel	1
1.1	Ziel und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit	2
2	Literaturdiskussion	4
2.1	Akute myeloische Leukämie	4
2.1.1	Pathogenese und molekulare Landschaft	4
2.1.2	Klassifikation	12
2.1.3	Prognosefaktoren	13
2.1.4	Diagnostische Kriterien	16
2.1.5	Ätiologie	17
2.1.6	Klinisches Erscheinungsbild	18
2.1.7	Therapieprinzip	19
2.2	Nukleophosmin 1	20
2.2.1	Struktur und Funktion	20
2.2.2	NPM1-Mutationformen und deren klinische Merkmale	22
2.2.3	NPM1 und deren Assoziation zu anderen Mutationsformen	23
2.2.4	Mutationsprofil NPM1 <sup>mut</sup> gegen AML allgemein	25
2.2.5	Therapieansprechen der AML mit NPM1 <sup>mut</sup>	26
2.3	Monitoring minimaler Resterkrankung	27
2.3.1	Monitoring der MRD bei AML mit NPM1 <sup>mut</sup>	28
2.3.2	Prognostische Erkenntnisse der AML mit NPM1 <sup>mut</sup> unter MRD-Monitoring	30
3	Datenerwerb und Methoden	33
3.1	Studienaufbau	33
3.2	Endpunkte und Statistische Analysen	34
3.3	Material und Messmethoden	35
3.3.1	Materialgewinnung und Probenaufbereitung	35
3.3.2	Automatisierte RNA-Extraktion mittels QIAcube	36
3.3.3	Konzentrationsbestimmung der RNA	36
3.3.4	cDNA-Herstellung	37
3.3.5	Rotor-Gene-Lauf zur NPM1 <sup>mut</sup> A-Quantifizierung	38
3.3.6	Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR	39
3.3.7	Relative Quantifizierung	41
3.3.8	Auswertung der Rohdaten	42
3.3.9	Haushaltsgen	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Patientenkollektiv	45
4.2	Grenzwertanalyse zur Definition eines molekularen Rezidivs	46
4.3	Zeitanalyse zwischen MRD-Grenzwert und morphologischem Rezidiv	48
4.3.1	Zeitintervall zwischen MRD-Grenzwert und morphologischem Rezidiv	48
4.3.2	Vergleich des Zeitintervalls bei Erst- und Zweitrezidiven zwischen MRD-Grenzwert und morphologischem Rezidiv	49
4.3.3	Vergleich des Zeitintervalls vor und nach Transplantation zwischen MRD-Grenzwert und morphologischem Rezidiv	50

4.4	<i>Vergleich des Ereignis-freien Überlebens zwischen molekularer Progression und morphologischem Rezidiv</i>	51
4.5	<i>Vergleich der Überlebens-Raten zwischen den Gruppen molekularer Progression und morphologischem Rezidiv</i>	53
4.6	<i>Überlebensanalyse im Gesamtkollektiv bei NPM1-Mutation</i>	54
4.6.1	Gesamtüberleben bei NPM1-Mutation	54
4.6.2	Vergleich Gesamtüberleben NPM1 <sup>pos</sup> /FLT3 <sup>neg</sup> vs. NPM1 <sup>pos</sup> /FLT3 <sup>pos</sup>	55
4.6.3	Vergleich Gesamtüberleben oberhalb und unterhalb des Grenzwertes	56
4.6.4	Kumulative Rezidivinzidenz bei NPM1-Mutation	57
4.6.5	Vergleich kumulative Rezidivinzidenz NPM1 <sup>pos</sup> /FLT3 <sup>neg</sup> vs. NPM1 <sup>pos</sup> /FLT3 <sup>pos</sup>	58
4.7	<i>Korrelation der MRD-Messwerte zwischen den Laboren Mainz, Ulm und München</i>	59
4.7.1	Korrelation der MRD-Messwerte zwischen Mainz und Ulm	59
4.7.2	Korrelation der MRD-Messwerte zwischen Mainz und München	60
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
5.1	<i>Betrachtung des Kollektivs</i>	62
5.2	<i>Betrachtung der Grenzwertanalyse zur Definition eines molekularen Rezidivs</i>	62
5.3	<i>Betrachtung der Zeitanalyse zwischen MRD-Grenzwert und morphologischem Rezidiv</i>	64
5.4	<i>Betrachtung des Ereignis-freien Überlebens zwischen molekularer Progression und morphologischem Rezidiv</i>	65
5.5	<i>Betrachtung der Überlebens-Raten zwischen den Gruppen der molekularen Progression und dem morphologischen Rezidiv</i>	66
5.6	<i>Betrachtung des Gesamtüberlebens und der Rezidivinzidenz im Gesamtkollektiv</i>	67
5.7	<i>Betrachtung der MRD-Messwerte zwischen den PCR-Laboren Mainz, Ulm und München</i>	68
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>87</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson
ALL	akute lymphatische Leukämie
alloHSCT	allogene Blut-Stammzelltransplantation
AML	akute myeloische Leukämie
AML-MK	AML Monosomaler Karyotyp
APL	akute Promyelozytenleukämie
AUC	area under the curve
B2M	Beta-2-microglobulin
Bp	Basenpaare
CBF	core binding factor
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CEBPA	CCAAT enhancer binding protein alpha
CHIP	clonal hematopoiesis of indeterminate potential
CIR	cumulative incidence of relapse
CML	chronische myeloische Leukämie
CR	komplette morphologische Remission
CR <sub>LCN</sub>	molekulare Persistenz mit niedriger Kopienzahl
CR <sub>MRD</sub> <sup>-</sup>	vollständige molekulare Remission
DFS	disease-free survival
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT3A	DNA methyltransferase 3 alpha
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	event-free survival
ELN	European LeukemiaNet
FAB	French-American-British
FAM	Fluoreszenz-Energietransfer
FLT3	fms like tyrosine kinase 3
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GO	Gemtuzumab Ozogamicin
GUS	beta-glucuronidase
Hb	Hämoglobin
HDAC	hochdosiert Cytarabin
HMA	hypomethylating agents

HSC	hämatopoetische Stammzelle
HTS	Hochdurchsatz-Screening Methoden
IDAC	intermediär dosiert Cytarabin
IDH 1/2	isocitrate dehydrogenase 1 und 2
ITD	interne Tandemduplikation
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MFC	multiparametrische Durchflusszytometrie
MLL	mixed-lineage leukemia
MP	molekulare Progression
MR	molekulare Remission
MRD	minimale Resterkrankung
NCN	normalisierte Kopienzahl
NES	nukleares Exportsignal
NGS	Next-Generation Sequencing
NK-AML	normal Karyotyp AML
NLS	nukleares Lokalisierungssignal
NoLS	Lokalisierungssignal für den Nukleolus
NPM1	nucleophosmin 1
NPM1 <sup>mut</sup>	NPM1-Mutation
OS	overall survival
PB	peripheres Blut
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPC-ABL	Primers and Probe Mix zur detektion von ABL
PPM-NPM1 mutA	Primers and Probe Mix zur detektion der NPM1-Mutation A
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RFS	relapse-free survival
ROC	receiver operating characteristic
RR	relapse risk
RT	Reverse Transkriptase
RUNX1	runt related transcription factor 1
sAML	sekundäre akute myeloische Leukämie
Std.-Abw.	Standardabweichung

Taq	thermus aquaticus
TCGA	the cancer genome atlas
TET2	tet methylcytosine dioxygenase 2
TP53	Tumor Protein p53
WHO	World Health Organization

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Molekulare Heterogenität der NK-AML.....	7
<b>Abbildung 2:</b> Modell der AML-Pathogenese (34).....	9
<b>Abbildung 3:</b> Genetische Risikoklassifizierung der Alliance Studiengruppe für Patienten über 60 Jahre. ....	16
<b>Abbildung 4:</b> NPM1 Struktur (6) .....	21
<b>Abbildung 5:</b> Die häufigsten NPM1-Mutationsformen .....	22
<b>Abbildung 6:</b> Verteilung molekularer Klassen und deren Genmutationen bei AML (16) .....	26
<b>Abbildung 7:</b> Pipettiervorlage für die qRT-PCR mit einem Rotor-Gene mit 72-tube rotor .....	39
<b>Abbildung 8:</b> Reaktionsprinzip der qRT-PCR (138) .....	41
<b>Abbildung 9:</b> Standardkurven für NPM1 <sup>mut</sup> (links) und ABL (rechts)(138).....	43
<b>Abbildung 10:</b> ROC-Kurve des Gesamtkollektivs .....	46
<b>Abbildung 11:</b> Zeitintervall zwischen MRD-Grenzwert und morphologischem Rezidiv bei n=23 Patienten .....	48
<b>Abbildung 12:</b> Vergleich des Zeitintervalls zwischen Erst- und Zweitrezidiven während der Nachbeobachtungszeit bei n=23 Patienten .....	49
<b>Abbildung 13:</b> Vergleich des Zeitintervalls vor und nach Transplantation während der Nachbeobachtungszeit bei n=23 Patienten .....	50
<b>Abbildung 14:</b> Vergleich des EFS zwischen molekularem Progress und morphologischem Rezidiv über die Gesamtzeit .....	51
<b>Abbildung 15:</b> Vergleich des EFS zwischen molekularem Progress und morphologischem Rezidiv innerhalb der ersten zwei Jahre .....	52
<b>Abbildung 16:</b> Vergleich der Überlebens-Raten zwischen den Gruppen molekularer Progress und morphologisches Rezidiv .....	53
<b>Abbildung 17:</b> Gesamtüberleben bei n=88 Patienten .....	54
<b>Abbildung 18:</b> Vergleich Gesamtüberleben NPM1 <sup>pos</sup> /FLT3 <sup>neg</sup> vs. NPM1 <sup>pos</sup> /FLT3 <sup>pos</sup> .....	55
<b>Abbildung 19:</b> Vergleich Gesamtüberleben unterhalb und oberhalb des Grenzwertes .....	56
<b>Abbildung 20:</b> Kumulative Rezidivinzidenz des Gesamtkollektivs mit n=82 Patienten .....	57
<b>Abbildung 21:</b> Vergleich der kumulativen Rezidivinzidenz zwischen NPM1 <sup>pos</sup> /FLT3 <sup>neg</sup> und NPM1 <sup>pos</sup> /FLT3 <sup>pos</sup> .....	58
<b>Abbildung 22:</b> Streudiagramm NPM1 <sup>mut</sup> -Ratio zwischen Mainz und Ulm .....	59
<b>Abbildung 23:</b> Streudiagramm NPM1 <sup>mut</sup> -Ratio zwischen Mainz und München .....	60

### III. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> WHO-Klassifikation der AML (64).....	13
<b>Tabelle 2:</b> ELN-Klassifikation 2017 (16).....	15
<b>Tabelle 3:</b> Zusammensetzung des Erylysepuffers.....	36
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Materialien für die RNA-Extraktion.....	36
<b>Tabelle 5:</b> Materialien zur cDNA-Herstellung und NPM1 <sup>mut</sup> A Quantifizierung .....	37
<b>Tabelle 6:</b> cDNA-Mastermix Komponenten.....	37
<b>Tabelle 7:</b> Thermoblock-Protokoll zur cDNA-Synthese .....	38
<b>Tabelle 8:</b> Komponenten der qPCR Master-Mixe .....	38
<b>Tabelle 9:</b> Temperaturprofil des Rotor-Gene Q Thermocycler zur NPM1 <sup>mut</sup> A Quantifizierung	39
<b>Tabelle 10:</b> Patientenkollektiv.....	45
<b>Tabelle 11:</b> Wilcoxon-Rangtabelle Mainz vs. Ulm.....	59
<b>Tabelle 12:</b> Wilcoxon-Rangtabelle Mainz vs. München .....	61

# 1 Einleitung und Ziel

Diese Dissertation befasst sich mit der häufigsten Form der akuten Leukämie im Erwachsenenalter: der akuten myeloischen Leukämie (AML). Sie ist eine Erkrankung einer hämatopoetischen Progenitorzelle. Hierbei kommt es durch eine oder mehrere genetische Mutationen zu einer Dysregulation essenzieller Zellfunktionen wie Wachstum, Überleben, Splicing oder DNA-Regulation. Dies führt zu einem Überlebens- und Wachstumsvorteil mit massiver Expansion der erkrankten Zellen und Verdrängung der normalen Hämatopoese. Die myeloischen Zellen bilden eine gemeinsame Zelllinie und gehören zu dem Teil des blutbildenden Systems, der für die Bildung der Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten zuständig ist (1). Eine AML kann in jedem Alter auftreten, wobei mehr als die Hälfte der Patienten älter als 65 Jahre und ungefähr ein Drittel älter als 75 Jahre alt ist (2). Damit ist die AML überwiegend eine Erkrankung des älteren Menschen. Die AML geht mit einer Prävalenz von 3,8 Fällen pro 100.000 Einwohner und mit einem Anstieg auf 17,9 Fällen pro 100.000 Einwohner im Alter von über 65 Jahren einher. Männer sind von dieser Erkrankung häufiger betroffen als Frauen, im Verhältnis 3:2 (3). Obwohl die Erkrankung vor 50 Jahren noch unheilbar schien, liegt heute in der Altersgruppe unter 30 die 5-Jahres-Überlebensrate bei 60%, zwischen 30 und 54 Jahren bei 43 bis 49% und zwischen 55 und 64 Jahren bei 23% und sinkt bei über 65 Jahren auf 12% ab (4). Somit ist die AML immer noch mit einem verminderten Überleben und – je nach Risikofaktoren – hohen Rezidivraten assoziiert. Die enorme molekulare Heterogenität der Krankheit ist in den vergangenen Jahren deutlicher geworden und hat an prognostischer und therapeutischer Bedeutung rasant zugenommen. Die Umsetzung dieser neuen Informationen in eine verbesserte Therapie steht jedoch erst am Anfang (5). Diese Arbeit betrachtet eine der am häufigsten vorkommenden Mutationen der AML – die NPM1-mutierte AML (NPM1<sup>mut</sup>), die sich bei 20 bis 30% der erkrankten Patienten zeigt. Das NPM1 (Nucleophosmin 1) ist ein Protein, das beim Menschen vom NPM1-Gen kodiert wird. Es ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt und kann so Einfluss auf Zellwachstum und Proliferation nehmen. Kommt es bei diesem Gen zu einem Defekt, kann es durch Beteiligung an einem mehrstufigen Prozess zur Entstehung der AML beitragen (6). Die heutige Technik ist in der Lage, die NPM1<sup>mut</sup> als Marker zu nutzen, um eine minimale Resterkrankung (MRD) zu detektieren. Die Überwachung der MRD bietet die Möglichkeit, Patienten mit einem erhöhten Rückfallrisiko frühzeitig zu identifizieren. Studien zeigen das prognostische Potential

und untersuchen geeignete Kontrollpunkte und Grenzwerte (7-9). Eine zentrale Herausforderung liegt darin, dass ein einheitlicher Standard in der Vorgehensweise bei der Überwachung und Interpretation der MRD-Diagnostik fehlt. Dies erschwert den Vergleich der Studienergebnisse und eine damit einhergehende universelle Anwendung von MRD-Grenzwerten.

## **1.1 Ziel und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit**

Diese Herausforderung bringt uns zu der Fragestellung nach einem geeigneten MRD-Grenzwert für das NPM1<sup>mut</sup> Kollektiv der Patienten, deren MRD-Diagnostik im PCR-Labor der Universitätsmedizin Mainz erhoben wird. Das Hauptziel dieser Dissertation ist die Identifizierung eines geeigneten MRD-Grenzwertes, ab dem ein Rückfall der Erkrankung mit hoher Wahrscheinlichkeit eintritt; sowie seine prognostische und klinische Bedeutung und den Vergleich der MRD-Messwerte zwischen den PCR-Laboren der Universitätsmedizin Mainz, der Universitätsklinik Ulm und dem Münchner Leukämielabor. Untersuchungsgegenstand ist eine Kohorte von 88 Patienten mit einer NPM1<sup>mut</sup>-AML über einen Zeitraum von August 2003 bis Dezember 2017, deren MRD-Überwachung im PCR-Labor der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt wurde.

Es werden folgende Haupt- und Nebenfragen an diese Arbeit adressiert:

### **Hauptfrage:**

Ab welchem molekularen Grenzwert der minimalen Resterkrankung (MRD) der NPM1-Mutationslast, gemessen durch die quantitative RT-PCR, kann nach Therapieende mit hoher Wahrscheinlichkeit ein morphologisches Rezidiv vorhergesagt werden?

### **Nebenfragen:**

1. Wie viel früher erfolgt im Median die molekulare MRD-Grenzwertüberschreitung im Vergleich zum morphologisch ermittelten Rezidiv und hat dies eine klinische Relevanz für die Messintervalle der Nachbeobachtungszeit im peripheren Blut oder Knochenmark?
2. Gibt es einen zeitlichen Unterschied zwischen Überschreitung des MRD-Grenzwertes und dem Erreichen des morphologisch ermittelten Rezidivs vor gegenüber nach der Stammzelltransplantation und bei Erst- gegenüber Zweitrezidiv?

3. Wie unterscheidet sich das Ereignis-freie Überleben (EFS) nach dem molekularen Progress, definiert nach den ELN Empfehlungen, und dem morphologischen Rezidiv?
4. Bietet die direkte Intervention nach erstmalig gemessener molekularer Progression ein Überlebensvorteil gegenüber derer nach morphologischem Rezidiv?
5. Hat das Überschreiten des Grenzwerts eine prognostische Relevanz im Hinblick auf das Gesamtüberleben des Patienten?
6. Gibt es eine Korrelation zwischen den MRD-Messwerten der PCR-Labore der Universitätsmedizin Mainz, der Universitätsklinik Ulm und dem Münchener Leukämielabor?

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Akute myeloische Leukämie**

#### **2.1.1 Pathogenese und molekulare Landschaft**

Die Neubildung von Blutzellen findet im Extravasalraum des roten Knochenmarks statt. Innerhalb eines menschlichen Organismus stammen sämtliche Zellen des Blutes von einer einzigen Population multipotenter hämatopoetischer Stammzellen (HSC) ab. HSC befinden sich sowohl im Knochenmark, als auch im peripheren Blut (PB) (10). Verschiedene Faktoren wie zum Beispiel ionisierende Strahlung, chemotherapeutische Medikamente, Benzol oder das zunehmende Alter sind Faktoren, die in Zellen zu Veränderungen des Erbgutes durch Mutationen führen (siehe auch Kapitel 2.1.5). Mutationen kommen immer und in allen Geweben vor und Zellen besitzen eine Reihe von Reparatur- und Überwachungsmechanismen, die diese vor genetischen Schäden schützen. Ebenso kann das körpereigene Abwehrsystem (Immunsystem) Veränderung frühzeitig erkennen und unschädlich machen. Ist eine solche Reparatur nicht möglich oder verläuft fehlerhaft, wird die maligne Zelle erkannt und zur Apoptose gebracht (11). Wird ein genetischer Schaden dennoch nicht erkannt oder ausgeschaltet, kann es schrittweise zur Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie kommen. Hierbei verlieren die mutierten Zellen (AML-Blasten) ihre Fähigkeit sich normal zu differenzieren. Infolgedessen können die Zellen nicht vollständig ausreifen und akkumulieren in einem oder mehreren Reifestadien. Laborchemisch zeigen sich Zytopenien mit oder ohne Blasten im PB, klinisch Blutungszeichen, Leistungsminderung und eine Infektanfälligkeit durch Mangel an Erythrozyten, Neutrophilen und Blutplättchen (2, 3). Aufgrund der fehlenden Korrelation zwischen dem Grad der Zytopenie und der Anzahl der normalen Blasten im KM wird vermutet, dass dies nicht durch „Verdrängen“ normaler Blasten entsteht, sondern durch die Vermittlung von Chemokinen, welche durch AML-Blasten produziert werden (12).

##### *2.1.1.1 Karyotyp bei AML*

Genetische Mutationen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: chromosomale Aberrationen und Mutationen mit erhaltenem Karyotyp (13). Chromosomenanomalien werden bei etwa 55% der erwachsenen AML-Patienten festgestellt. Sieben Translokationen und Inversionen mit ihren entsprechenden molekularen Korrelaten bzw. Fusionsgenen sind in der derzeitigen WHO-Klassifikation von 2017

berücksichtigt. Darunter zählen folgende Aberrationen: t(8;21) mit RUNX1-RUNX1T1, t(15;17) mit PML/RAR $\alpha$ , inv(16) oder t(16;16) mit CBF $\beta$ /MYH11, t(9;11) mit MLLT3-MLL, t(6;9) mit DEK-NUP214, inv(3) oder t(3;3) mit RPN1-EVL1 und t(1;22) mit RBM15-MKL1 (14). Die klinische Bedeutsamkeit der chromosomalen Aberrationen bei der AML ist sehr unterschiedlich und kann zur besseren Übersicht in folgende Gruppen unterteilt werden:

### **1. Good risk**

Drei Aberrationen spielen eine dominante Rolle: t(8;21)(q22;q22.1), t(15;17)(q22;q21) und inv(16)(p13.1;q22). Sie kommen mit einer Häufigkeit von 7%, 13% und 5% vor. Wenn zu diesen günstigen Aberrationen weitere zusätzliche chromosomale Aberrationen hinzukommen, haben diese keinen bekannten Einfluss auf die Prognose der AML. Die dominanten Aberrationen können ein günstiges Risiko aufweisen, dies zeigt sich in einem 4-Jahres-Gesamtüberleben von etwa 62%, 80% und 82% (13, 15, 16).

### **2. monosomaler Karyotyp**

Von einer AML monosomalem Karyotyps (AML-MK) wird gesprochen, wenn eine einzelne autosomale Monosomie (ohne isolierten Verlust eines X- oder Y-Chromosoms) in Verbindung mit mindestens einer zusätzlichen autosomalen Monosomie oder einer strukturellen Chromosomenanomalie (ohne CBF-AML oder APL) vorliegt. Der monosomale Karyotyp stellt einen unabhängigen Prognosefaktor bei etwa 30% der erwachsenen Patienten dar. Die German-Austrian AML Study Group konnte für diese Patienten ein 4-Jahres-Gesamtüberleben von 9% ermitteln. Dies zeigt die schlechte Lebenserwartung in Assoziation mit einer AML-MK (17).

### **3. Poor risk**

Zu den Karyotypen, die mit einem ungünstigen Risiko verbunden sind, zählen: t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 mit 1%, t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 mit 1%, t(v;11q23.3); KMT2A rearranged mit 4%, inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2) mit 1% sowie -5/5q mit 7% und -7/7q mit 6%. Ebenfalls in diese Gruppe werden der komplex Karyotyp und weitere monosomale Karyotypen gezählt (15, 16).

### **4. Komplex Karyotyp**

Zeigen sich drei oder mehr Aberrationen ohne gleichzeitigem Vorliegen von t(8;21), t(15;17) und inv(16) wird von einem komplexen Karyotyp gesprochen.

Dieser kommt bei etwa 10% der AML-Patienten vor und hat ein Gesamtüberleben von etwa 20% (15).

## 5. Unbekannt / nicht definiert

Die Anzahl an chromosomalen Aberrationen, welche mit der AML assoziiert sind, ist sehr hoch. Viele davon kommen nur selten vor. In der ELN-Klassifikation von 2017 werden alle zytogenetischen Veränderungen, die nicht der Favorable- oder Adverse-Gruppe zugeordnet werden können zur Intermediate-Gruppe gezählt. Grund dafür ist, dass die Daten zur richtigen Prognoseeinordnung nicht ausreichend sind, oder es keinen Einfluss hat. Ein Beispiel ist die Trisomie 8, die eines der häufigsten zytogenetischen Veränderungen der AML ist. Sie ist klinisch sehr heterogen und geht vermutlich mit einer mittleren bis schlechten Prognose einher (18, 19). Eine scheinbar ähnliche Prognose haben auch die Trisomie 11 und 13, die aber seltener vorkommen (19-21). Eine ebenfalls intermediäre zytogenetische Veränderung mit etwa 1% ist die  $t(9;11)(p21.3;q23.3)$  (15).

Akute myeloische Leukämien mit fehlenden chromosomalen Aberrationen werden zu der Gruppe mit normalem Karyotyp (NK-AML) gezählt und weisen eine Häufigkeit von 40-49% auf (22). Die molekulare Landschaft ist hier ebenfalls sehr heterogen. Die in der Praxis standardmäßig zu bestimmenden und damit auch häufigsten Genmutationen unter der NK-AML sind NPM1 (54%), FLT3-ITD (32%), FLT3-TKD (12%), CEBPA (14%), MLL (7%) und NRAS (14%) (23). Diese können ebenfalls zur besseren Übersicht verschiedenen Gruppen zugeordnet werden, bei denen insbesondere die Interaktion zwischen den Genmutationen prognostisch ausschlaggebend sind:

### 1. Good risk

Ein günstiges Risiko zeigt die AML mit NPM1-Mutation ( $NPM1^{mut}$ ) ohne FLT3-ITD oder mit  $FLT3-ITD^{low}$  sowie die AML mit biallelischer CEBPA-Mutation.

### 2. Intermediate Risk

Die AML mit  $NPM1^{mut}$  und  $FLT3-ITD^{high}$  sowie die AML mit  $NPM1^{wildtyp}$  ohne FLT3-ITD oder mit  $FLT3-ITD^{low}$  weisen ein intermediäres Risiko auf.

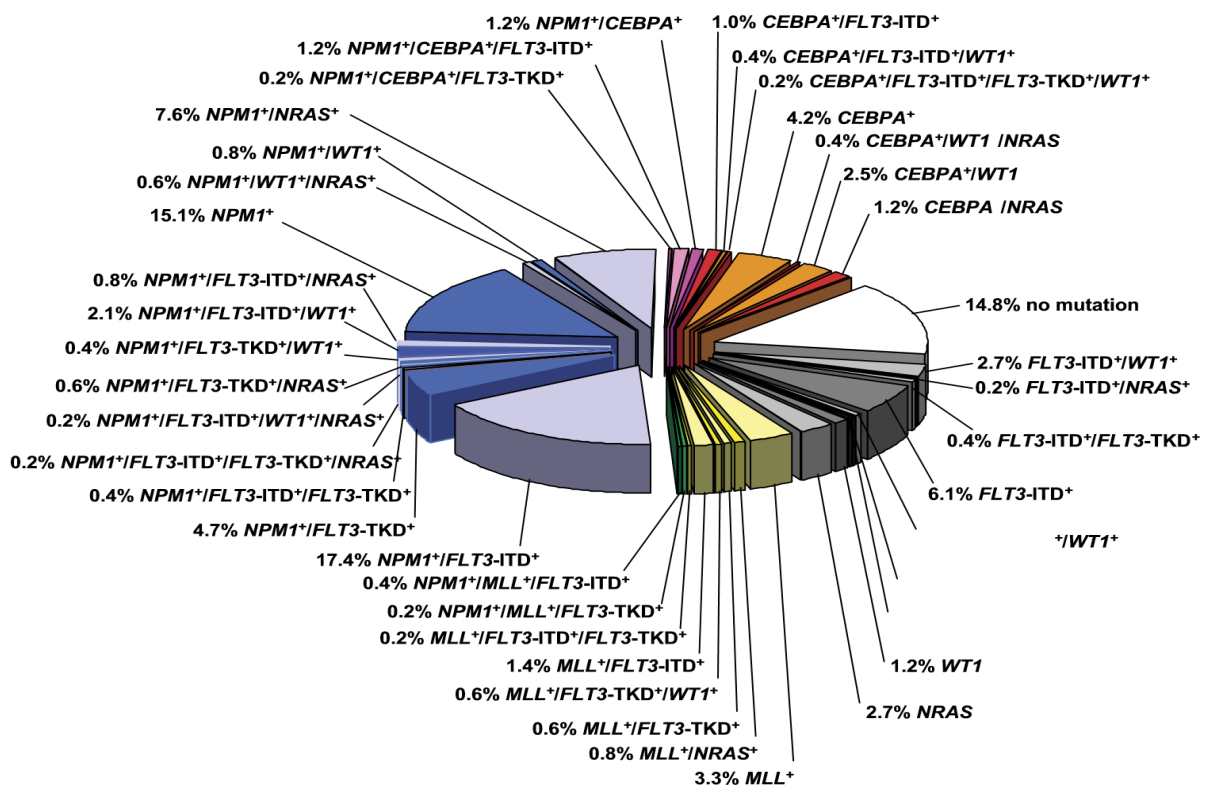
### 3. Poor risk

Im Kontrast dazu zeigt sich bei der AML mit  $NPM1^{wildtyp}$  und  $FLT3-ITD^{high}$  ein ungünstiges Risiko (23, 24).

### 4. TP53-Mutation

Die TP53-Mutation liefert ebenfalls eine unabhängige prognostische Information und geht gleichermaßen mit einer schlechten Prognose einher. Hier liegt das Gesamtüberleben bei etwa 28% und kommt bei etwa 6% der AML-Patienten vor. Die Kombination von komplexer Karyotyp und p53-Verlust hat die schlechteste Lebenserwartung mit einem Gesamtüberleben von unter 10% (15, 16, 25).

Zur ausführlichen Darstellung der Häufigkeitsprofile und der prognostischen Relevanz zwischen der NPM1-Mutation und anderen Mutationsformen siehe die Kapitel 2.1.3 und 2.2.3.



**Abbildung 1:** Molekulare Heterogenität der NK-AML

Das Kreisdiagramm zeigt in bläulichen Farben die NPM1-mutierten Teilmengen, in orange/rot die CEBPA-mutierten Teilmengen, in gelb/grün die MLL-mutierten Teilmengen, in grau die Teilmengen ohne hypothetische Klasse II Mutationen und in weiß die Menge ohne bekannte Mutation. Die Daten stammen aus einer Analyse von 485 jüngeren, erwachsenen Patienten mit NK-AML (26).

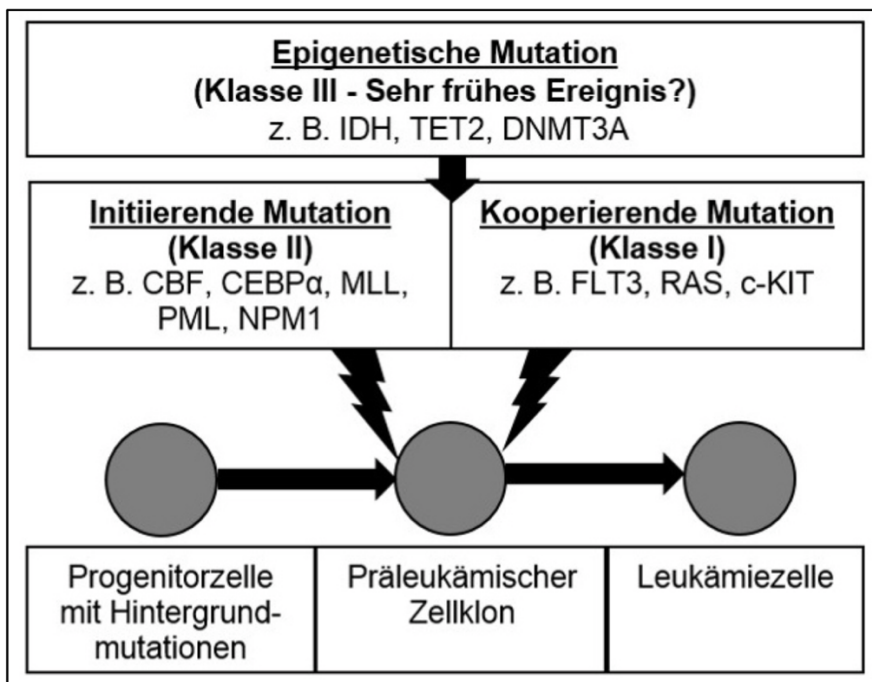
### 2.1.1.2 Molekulare Pathogenese der AML

Das Erforschen der molekularen Pathogenese der AML beginnt vor mehr als drei Jahrzehnten und zeigt sich heute in der Etablierung von diagnostischen und prognostischen Markern der häufigsten chromosomalen und molekulargenetischen Veränderungen. Die Möglichkeiten, die sich durch das Next-Generation Sequencing

(NGS) oder andere Hochdurchsatz-Screening Methoden (HTS) ergaben, steigerten das Wissen über die molekulare Heterogenität der AML deutlich (27). 2013 kann erstmals durch das Cancer Genome Atlas-Projekt (TCGA) das gesamte Genom von insgesamt 200 an de novo erkrankten AML-Patienten untersucht werden. Das AML-Genom zeigt weniger Mutationen als die meisten soliden Tumore. Im TCGA-Projekt wurden durchschnittlich 13 Mutationen pro Patient gefunden. Die am signifikant häufigsten mutierten Gene in diesem Kollektiv waren in absteigender Häufigkeit: fms like tyrosine kinase 3 (FLT3) mit 28%, Nucleophosmin 1 (NPM1) mit 27%, DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3A) mit 26%, Isocitrate dehydrogenase 1 und 2 (IDH1/2) mit 20%, NRAS/KRAS mit 12%, runt related transcription factor 1 (RUNX1) mit 10%, tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2) mit 8%, tumor protein p53 (TP53) mit 8% oder CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBP $\alpha$ ) mit 6% (28).

Mausmodelle zeigen, dass die meisten genetischen Mutationen alleine nicht ausreichen, um eine Leukämie zu verursachen (29). Dies führt dazu, dass aus heutiger Sicht von einem mehrstufigen Prozess der AML-Pathogenese ausgegangen werden muss. Dabei entsteht zunächst ein „präleukämischer Zellklon“, der an sich noch keine klinisch sichtbare Leukämie auslösen kann. Erst wenn in einem zweiten Schritt zusätzlich ein Proliferationsvorteil der präleukämischen Zelle eintritt, kommt es zur Manifestation der AML (30, 31). Erklärt wird der Prozess durch ein Modell, bei dem es durch die Kooperation von genetischen Mutationen zur leukämischen Transformation kommt.

Man geht davon aus, dass HSC mit zunehmendem Alter des Patienten zwischen 100 und 1000 Hintergrundmutationen ansammeln. Durch das zeitlich versetzte Auftreten von einer initiierenden Mutation (Klasse II) und mindestens einer weiteren kooperierenden Mutation (Klasse I) kommt es zu einem Proliferationsvorteil der betroffenen HSC (32). Eine dritte Gruppe (Klasse III), die durch epigenetische Wirkmechanismen die Genese der AML beeinflusst, konnte zusätzlich identifiziert werden (33).



**Abbildung 2:** Modell der AML-Pathogenese (34)

### **Klasse I:**

Die erste Klasse umfasst Mutationen, die zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen führt. Dadurch entstehen Proliferations- und/oder Überlebensvorteile der hämatopoetischen Vorläuferzelle. Hierzu zählt das Protoonkogen RAS oder Rezeptortyrosinkinasen wie FLT3-ITD, FLT3-TKD und c-KIT (35).

Mutationen des FLT3-Gens kommen bei etwa 25% der AML vor (31). Das FLT3-Gen kodiert für eine aus zwei funktionellen Domänen bestehende Rezeptortyrosinkinase. Sie befindet sich auf der Oberfläche von HSC. Kommt es zur Bindung eines Liganden an den Rezeptor, wird über den Mechanismus der Autophosphorylierung die intrazelluläre Signaltransduktion eingeleitet und somit Einfluss auf die Proliferationsprozesse der Zelle genommen (36). Zudem besitzt die FLT3 autoinhibitorische Abschnitte, zu denen die juxtamembranäre Komponente und die Tyrosinkinasedomäne (Aktivierungsschleife) zählen (30). Die häufigste Form der FLT3-Mutation ist die Interne Tandem-Duplikation (ITD), die den juxtamembranären Abschnitt betrifft (25-30%). Deutlich seltener ist die Tyrosinkinasedomäne (TKD) betreffende FLT3-Mutation (6-8%). Beide haben den Verlust der Autoinhibition zur Folge und verursachen eine ligandenunabhängige Proliferation der HCS (31). Das c-KIT-Protoonkogen kodiert ebenfalls für eine Rezeptortyrosinkinase und wirkt somit ähnlich (37).

Die RAS-Familie (Rat Sarcoma) gehört ebenfalls zu den Protoonkogenen und kodiert für ein monomeres, membranassoziiertes GTP-bindendes Protein. Eine RAS-Mutation kommt mit einer Häufigkeit von etwa 12-25% in AML vor (38-40). Dieses Protein wirkt zusammen mit anderen Effektor-Proteinen als molekularer Schalter und vermittelt verschiedenen Signaltransduktionswege. Zusammen mit den Rezeptortyrosinkinasen nimmt es Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von HSC (41).

### **Klasse II:**

Die zweite Klasse beinhaltet NPM1-, CBF-, CEBP $\alpha$ -, MLL- und PML-Mutationen. Sie zeigen sich durch Differenzierungsstörungen in der Zelle, die aber alleine, wie in Klasse eins, nicht zur Leukämie führen (42).

Der Core-Binding-Factor (CBF) gehört zu einer Klasse der Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Regulierung der hämatopoetischen Differenzierung spielen. Er besteht aus einer DNA-bindenden Alpha-Untereinheit und einer nicht-DNA-bindenden Beta-Untereinheit (43). Das RUNX1-Gen (auch als AML1 bezeichnet) kodiert für die Alpha-Untereinheit. Im Rahmen der AML fusioniert es durch eine Translokation t(8;21) mit dem Gen RUNX1T1 (früher ETO genannt) (44). Mit 12-15% ist es eines der häufigsten Translokationen in der AML (45, 46). Das Fusionsgen CBF $\beta$ /MYH11 entsteht durch eine Inversion 16 oder durch eine Translokation t(16;16) und gehört der nicht-DNA-bindenden Beta-Untereinheit an (47). Dies betrifft etwa 3-8% aller AML (46). Die Expression der Fusionsgene RUNX1/RUNX1T1 und CBF $\beta$ /MYH11 scheint zu einer verminderten CBF-Funktion in HSC zu führen. Dies zeigt sich durch eine gesteigerte Aktivität der Histondeacetylase mit nachfolgender Unterdrückung der Transkription (31).

Das CEBP $\alpha$  (CCAAT-Enhancer-Binding-Protein-Alpha) ist ein linienspezifischer Transkriptionsfaktor, der für die hämatopoetische Differenzierung der Granulozyten-Linie wichtig ist. Mutationen im Gen, das für CEBP $\alpha$  kodiert, können mono- oder biallelisch vorliegen und zeigen sich in etwa bei 10-15% der AML (46). Die häufigsten Veränderungen sind Punktmutationen, die entweder die DNA-Bindungsdomäne betreffen oder die Translation des CEBP $\alpha$  aufheben (48). Seine Mutation verursacht daher eine frühe Blockierung der Granulozytenreifung (49).

Eine Leukämie mit gemischter Linienzugehörigkeit ist häufig durch das Vorhandensein von MLL-Fusionsproteinen gekennzeichnet. Diese Fusionsproteine entstehen durch chromosomale Translokationen im Mixed lineage leukemia-Gen (MLL-Gen), welches auf dem langen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert ist. Aberrationen im MLL-Gen

werden deshalb auch als 11q23-Rearrangements bezeichnet (50). Zu den häufigsten Translokationen zählen t(9;22), t(6;11) und t(11,19) (13). Das MLL-Gen codiert für ein MLL-Protein. Dabei handelt es sich um eine Histon-Methyltransferase, die Einfluss auf Proteinkomplexe nimmt, welche die Genregulation durch Chromatin-Modellierung beeinflussen (51, 52). Mit etwa 10% haben 11q23-Rearrangements einen häufigen Zusammenhang mit therapieassoziierten AML (t-AML). Bei einer de novo AML zeigt sich dies hingegen nur bei etwa 3% (53).

Das Hauptkennzeichen der akuten Promyelozyten Leukämie (APL), eine AML-Subgruppe, ist die Translokation t(15;17). Diese Aberration führt zu einer Fusion der beiden Gene Promyelocytic Leukemia Protein (PML) und Retinsäurerezeptor- $\alpha$  (RAR $\alpha$ ), die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Es betrifft etwa 5-10% der AML (46, 54). Physiologisch bindet RAR $\alpha$  in Abwesenheit des Liganden all-trans-Retinsäure an die DNA und interagiert dort mit einem Komplex, der Histon-Deacetylasen bindet. Die Deacetylierung der Histone hat die Entstehung von Heterochromatin und damit die Unterdrückung der Transkription zur Folge. Das Fusionsprotein PML/RAR $\alpha$  hält trotz der Bindung des Liganden all-trans-Retinsäure die Interaktion aufrecht. Dadurch entsteht ein Differenzierungsblock in den Progenitorzellen, die eine gestörte Zellreifung der Promyelozyten hervorruft (55). Die NPM1-Mutation wird gesondert im Kapitel 2.2 besprochen.

### **Klasse III:**

Zur Klasse III gehören Mutationen wie DNMT3A, TET2 und IDH, deren Wirkmechanismen auf frühester Ebene, der epigenetischen Regulation liegen. Dies unterscheidet sie wesentlich von denen der Klasse eins und zwei (33).

Das Gen DNMT3A kodiert für die DNA-Methyltransferase, ein Enzym, welches an der DNA-Methylierung beteiligt ist. Es reguliert die genomische Aktivität durch de novo Anfügen von Methylgruppen an den Cytosinrest von CpG-Dinukleotiden (Abschnitte auf der DNA). Eine Mutation kann bei etwa 20% aller AML-Fälle nachgewiesen werden und es wird angenommen, dass ein Missverhältnis zwischen Hypo- und Hypermethylierung vorliegt (56, 57).

IDH1 und IDH2 sind Enzyme, die normalerweise die Umwandlung von Isocitrat in Alpha-Ketoglutarat ( $\alpha$ KG) im Citratzyklus katalysieren. Kommt es zu einer Mutation im IDH-Gen, wird es zusätzlich zu einer Reduktion von  $\alpha$ KG zu 2-Hydroxyglutarat (2-HG) befähigt. Ein erhöhter Spiegel des Strukturanalogon 2-HG führt dann zur globalen DNA-Hypermethylierung und vermutlich zu einem Funktionsverlust von Enzymen, die

$\alpha$ KG als Substrat benötigen. TET2 ist ein solches Protoonkogen, welches aus der TET-Familie (Ten-Eleven-Translocation) stammt. Das  $\alpha$ KG-abhängige Enzym ist an der DNA-Hydroxymethylierung beteiligt, was eine Demethylierung der DNA induziert. Ein Funktionsverlust von TET2 führt wahrscheinlich ebenfalls zur Hypermethylierung (33, 58, 59).

Untersuchungen zeigen, dass diese Mutationen schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt in hämatopoetischen Stammzelle (HSC) vorliegen, zu dem aber noch keine weiteren Leukämie-spezifischen Mutationen wie beispielsweise NPM1 nachweisbar sind. Diese prämaligen HSC induzieren noch keine Leukämie. Erst eine zusätzliche Mutation mit beispielsweise NPM1 kann die Progression der AML vorantreiben. Die prämalige HSC kann auch bei gesunden Patienten nachgewiesen werden (60) und wird als klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potenzial (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP) bezeichnet (61). Ob dies eine eigenständige Krankheitsentität darstellt, ist weiterhin fraglich.

### **2.1.2 Klassifikation**

Zu Beginn fehlte ein einheitliches System zur Klassifizierung und Nomenklatur der AML. 1976 etabliert sich zunächst die French-American-British-Klassifikation (FAB-Klassifikation). Sie basiert auf morphologischen und zytochemischen Eigenschaften aus Blut- und Knochenmarksausstrichen und unterteilt die Merkmale in Subtypen M0 bis M7 (62). Das erweiterte Verständnis der molekularen Pathologien über myeloische Neoplasien ebnet den Weg zu einer Klassifikation nach den Kriterien der World Health Organization (WHO). 2001 erfolgt erstmals die Klassifikation der AML nach diesen Kriterien (63).

In der Erweiterung der Klassifikation von 2008 erfuhr die Zytogenetik einen besonderen Stellenwert. Acht AML-Typen, die zum Teil eine enge Beziehung zu den bekannten FAB-Formen hat, wurden durch das Vorhandensein einer bestimmten chromosomalen Anomalie definiert.

Die revidierte Ausgabe von 2016 fügt die zytogenetisch und molekulargenetisch relevanten Gruppen hinzu und stellt damit eine Überarbeitung der Veröffentlichung von 2008 dar (siehe Tabelle 1). Die zytogenetischen Anomalien, die von der Klassifikation nicht erkannt werden, sind bei Erwachsenen selten und klinisch von untergeordneter Bedeutung und meistens bei pädiatrischen Patienten zu finden (64). Eine aktuelle Überarbeitung läuft und wird für das Jahr 2022/2023 erwartet.

<b>Akute myeloische Leukämie (AML) und verwandte Neoplasien</b>
AML mit rekurrenter genetischer Anomalie
AML mit t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
Akute Promyelozytenleukämie (APL) mit <i>PML-RARA</i>
AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL T3-KMT2A</i>
AML mit t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML mit inv(3)(q21.3;q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2-MECOM</i>
AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
Provisorische Entität: AML mit <i>BCR-ABL1</i>
AML mit mutiertem <i>NPM1</i>
AML mit biallelischer Mutation von <i>CEBPA</i>
Provisorische Entität: AML mit mutiertem <i>RUNX1</i>
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasie
AML, nicht anderweitig klassifiziert (NOS)
AML mit minimaler Differenzierung (analog FAB M0)
AML ohne Ausreifung (analog FAB M1)
AML mit Ausreifung (analog FAB M2)
Akute myelomonozytäre Leukämie (analog FAB M4)
Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie (analog FAB M5a-b)
Reine Erythroleukämie (analog FAB M6)
Akute Megakaryoblastäre Leukämie (analog FAB M7)
Akute Basophilen-Leukämie
Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloisches Sarkom
Myeloische Down-Syndrom-assoziierte Proliferation
Transient abnorme Myelopoese (TAM)
Myeloische Leukämie mit Down Syndrom
<b>Akute Leukämien unklarer Linienzugehörigkeit</b>
Akute undifferenzierte Leukämie
Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp (MPAL) mit t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
MPAL mit t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearrangiert
MPAL, B/myeloisch, nicht weiter klassifiziert (NOS)
MPAL, T/myeloisch, nicht weiter klassifiziert (NOS)

**Tabelle 1:** WHO-Klassifikation der AML (64)

### 2.1.3 Prognosefaktoren

Die prognostischen Faktoren lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: Zum einen gibt es patientenbezogene, klinische Faktoren und zum anderen spielen die biologischen Faktoren der AML eine wichtige Rolle. Das Alter und die zunehmenden Komorbiditäten zählen zu den patientenbezogenen Faktoren und haben einen großen Einfluss auf das Management und den Erfolg der Therapie. Wenn vom Alter gesprochen wird, wird meistens zwischen zwei Perspektiven unterschieden. Das chronologische Alter betrachtet das Individuum als reine Zeitangabe. Betrachtet man jedoch das biologische Alter, so liegt der Blick auf zelluläre und molekulare Prozesse (65). Mit dem Alter verändert sich die Fähigkeit des Organismus zur Selbstregulation und Regeneration. Dadurch steigt die Anfälligkeit für Krankheiten und Infektionen und das Mortalitätsrisiko erhöht sich (66). Dies bedingt, dass ältere Patienten bei der

Diagnose meistens einen schlechteren Leistungsstatus und eine geringere Toleranz gegenüber intensiven Therapien haben. Aufgrund dessen werden sie seltener als geeignet für eine kurative oder remissions-induzierende Therapie eingestuft. Darüber hinaus geht ihnen häufiger eine myelodysplastische Phase voraus und weisen häufig eine ungünstigere Zytogenetik auf, welche häufig mit erhöhter Resistenz gegenüber den eingesetzten Therapien einhergeht (67, 68). Eine günstigere Zytogenetik zeigt sich in den jüngeren Altersgruppen hingegen häufiger (69). Teilt man die Altersspanne in vier Gruppen, so zeigt sich mit Zunahme des Alters eine signifikant schlechtere Prognose in Bezug auf die CR-Rate: Alter 16-49 Jahre (75%), 50-59 Jahre (66%), 60-69 Jahre (60%) und 70 Jahre oder älter (56%) (22).

Neben dem Alter gehen eine erhöhte Leukozytenzahl bei Erstdiagnose ( $> 100 \times 10^9/l$ ), eine sekundäre oder therapieassoziierte Leukämie mit einem schlechteren Erreichen der CR und einem häufigeren Auftreten von Rezidiven einher. Letztere zeigen zudem ein schlechteres Gesamtüberleben (overall survival, OS) (70).

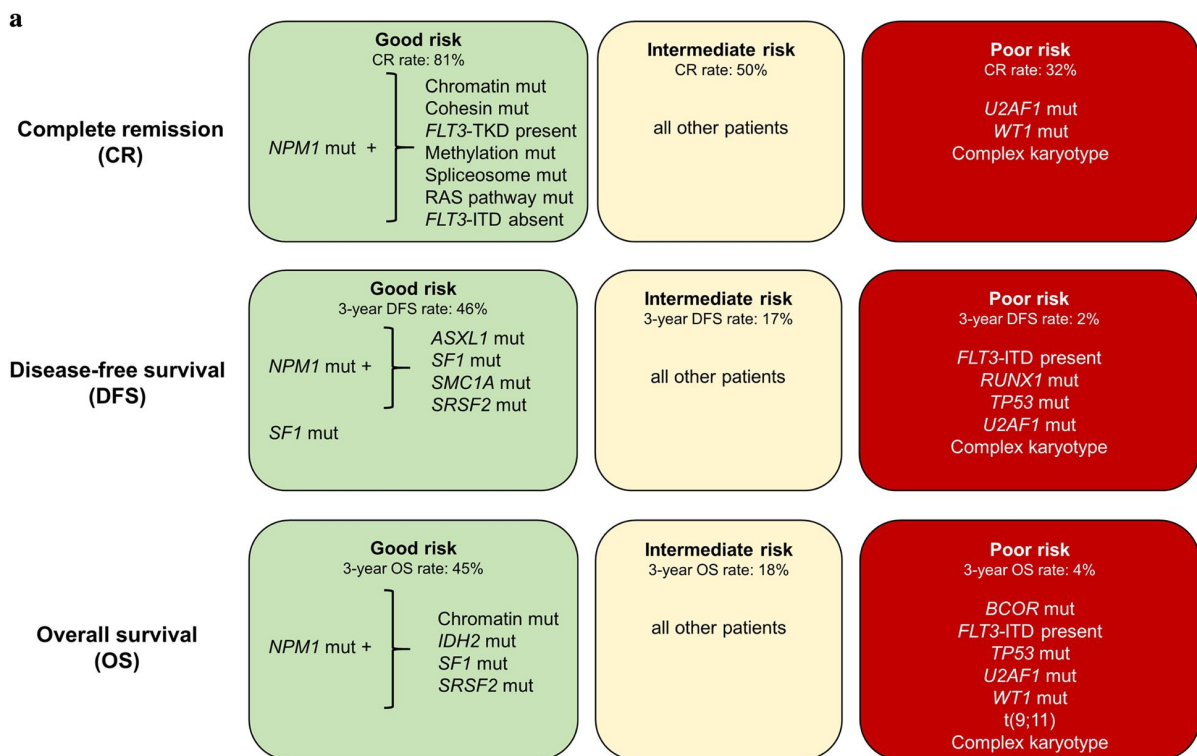
Um den biologischen Faktoren der AML ein Risikoprofil zuzuordnen, bringt das European LeukemiaNet (ELN) 2010 erstmals eine Empfehlung für die Risikoklassifizierung heraus. Sie berücksichtigt die molekularen und zytogenetischen Faktoren, die u.a. aus den Erkenntnissen der WHO-Klassifikation von 2008 stammen (71). Die ELN führt anfangs eine 4-Gruppen-Klassifizierung (günstig, intermediär I und II und ungünstig) ein. Eine spätere Studie von 2012 konnte zeigen, dass es keinen Unterschied im OS bei Erwachsenen über 60 Jahre, welche den Hauptanteil der AML-Patienten stellt, zwischen der Intermediärgruppe I und II gibt (72). Nach diesen Erkenntnissen entscheidet sich das Gremium die Klassifikation auf drei Gruppen zu vereinfachen (siehe Tabelle 2) (16). Weitere Änderungen beruhen auf der Beobachtung, dass bei AML mit NPM1- oder biallelischer CEBPA-Mutation, die der günstigen Risikogruppe zugeordnet werden, zusätzliche Mutationen den prognostischen Effekt nicht verändern. Bei Patienten mit einer FLT3-ITD-Mutation zeigen einzelne Daten folgendes: Wenn die Expression des mutierten Allels höher ist als die im gesunden Allel, ist die Prognose ungünstiger (24, 73, 74). Aufgrund ihrer unabhängigen Assoziation mit dem ungünstigen Ausgang werden RUNX1, ASXL1- und TP53-Mutationen zu der ungünstigen Gruppe hinzugefügt. Bei den Mutationen von DNMT3A, IDH1, IDH2 oder Genen in der Chromatin/Spliceosomen-Gruppe (außer ASXL1 und RUNX1) wird die Evidenz nicht als hoch genug angesehen, um sie einer prognostischen Gruppe zuzuordnen (15).

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> <sup>low</sup> † Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> <sup>high</sup> † Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> <sup>low</sup> † (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> ‡ Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype,§ monosomal karyotypell Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> <sup>high</sup> † Mutated <i>RUNX1</i> ¶ Mutated <i>ASXL1</i> ¶ Mutated <i>TP53</i> #

**Tabelle 2:** ELN-Klassifikation 2017 (16)

In einer Untersuchung der Alliance Studiengruppe an einer Kohorte von 423 älteren Patienten (Median 69 Jahre), an de novo AML erkrankt, wurde die ELN-Klassifikation von 2017 auf die Prognose älterer Patienten – die gleichzeitig den größten Anteil der AML-Patienten stellen – und die mit den aktuellen (Stand von 2017) Behandlungsansätzen therapiert werden, untersucht. Das krankheitsfreie Überleben (DFS, Disease-free Survival) über 3 Jahre beläuft sich in der günstigen ELN-Gruppe auf 25%, in der intermediären ELN-Gruppe auf 9% und in der ungünstigen ELN-Gruppe auf 3%. Für das 3-Jahres-OS zeigen sich 30%, 12% und 6%. Diese Ergebnisse wurden verglichen mit einem Schema zur genetischen Risikoklassifizierung, das durch die Alliance Studiengruppe selbst vorgeschlagen wurde (siehe Abbildung 3). Dazu wurden Kriterien erstellt, die das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von gleichzeitig auftretenden Mutationen bei *NPM1*<sup>mut</sup>-AML berücksichtigt. Es wurde ebenfalls in drei Gruppen eingeteilt. In diesen Gruppen liegt das 3-Jahres-DFS für die günstige Gruppe bei 46%, für die intermediäre Gruppe bei 17% und für die Gruppe mit ungünstigem Risiko bei 2%. Für das 3-Jahres-OS ergeben sich 45%, 18% und 4%. Auffällig ist, dass sich zwischen der intermediären und der ungünstigen ELN-Gruppe kaum ein Unterschied zeigt und die günstige ELN-Gruppe fast drei bis viermal so viele Patienten für DFS und OS umfasst wie in der Vergleichsgruppe der Alliance-Studiengruppe. Zu berücksichtigen ist hier die uneinheitliche Klassifizierung der Risikomarker für die verschiedenen Endpunkte, was

damit eine Nutzung im klinischen Umfeld schwierig macht (75). Im Allgemeinen zeigt sich, wie komplex die Biologie der AML ist und eine exakte Differenzierung zur Stratifizierung bedarf.



**Abbildung 3:** Genetische Risikoklassifizierung der Alliance Studiengruppe für Patienten über 60 Jahre.

Es zeigt die genetische Einteilung in günstiges, intermediäres und ungünstiges Risiko für komplette Remission (CR), krankheitsfreies Überleben (DFS) und Gesamtüberleben (OS) im Zeitraum von drei Jahren.

### 2.1.4 Diagnostische Kriterien

Bei Verdacht auf eine AML ist die Knochenmarkspunktion Teil der routinemäßigen diagnostischen Untersuchung. Die Blut- und Knochenmarksausstriche werden morphologisch mit einer May-Grünwald-Giemsa oder einem Wright-Giemsa-Farbstoff und zusätzlich zytochemisch mit Peroxidase und Esterasefärbung untersucht. Die Empfehlung liegt bei der Auszählung von 200 Leukozyten im Blutausstrich und 500 kernhaltigen Zellen im Knochenmarkausstrich.

Um die Diagnose einer AML zu stellen, ist eine Blastenzahl im peripheren Blut (PB) oder Knochenmark (KM) von 20% oder mehr Voraussetzung. Davon ausgenommen sind Erkrankungen mit AML-definierenden Chromosomenaberrationen t(15;17), t(8;21), inv(16) oder t(16;16) sowie einige Fälle von Erythroleukämie (76). In der Blastenzählung werden Myeloblasten, Monoblasten und Megakaryoblasten dazugezählt. Bei der AML mit monozytärer und myelomonozytärer Differenzierung werden Monoblasten und Promonozyten, nicht aber Erythroblasten als

Blastenäquivalent angenommen. Das Auffinden von Auer-Stäbchen ist beweisend für die myeloische Herkunft der Blastenpopulation (13).

Ist die Bestimmung der Linienzugehörigkeit einer neu aufgetretenen AML durch die Auer-Stäbchen oder zytochemischen Färbung nicht möglich, wird die Immunphänotypisierung unter Verwendung der multiparametrischen Durchflusszytometrie (MFC) zur Hilfe genommen. Noch gibt es keinen einheitlichen Konsens darüber, wann ein Marker positiv ist. Für die meisten Marker wird ein Cut-Off von 20% Positivität oder mehr der Leukämiezellen angenommen. Einen Ersatz für die morphologische Bestimmung stellt die Durchflusszytometrie nicht dar, vielmehr dient sie der Zuordnung zu einer hämatopoetischen Vorläuferzelle und als Messverfahren für die minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) im Therapieverlauf bei aberranter Markerexpression (26).

Die Zytogenetik ist ein wichtiger Baustein in der Diagnostik von AML-definierenden Veränderungen. Einige Veränderungen liefern zusätzliche prognostische Informationen, wobei viele Veränderungen bislang nicht abschließend klassifiziert wurden (siehe auch Kapitel 2.1.1.1). Das zytogenetische Bild der AML zeigt sich weit komplexer als zum Beispiel im Vergleich zur chronisch myeloischen Leukämie (CML). Es werden in etwa 200 verschiedene, wiederkehrende strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen gefunden. Die Inzidenz von abnormalen Karyotypen ist bei Erwachsenen (53-60%) generell geringer als bei Kindern (68-85%). Dieser Unterschied kann bisher noch nicht erklärt werden. Vermutlich ist es auf die biologischen Unterschiede in der Erkrankung zurückzuführen (77).

Molekulargenetische Methoden stellen eine wichtige Ergänzung zu der Zytogenetik dar. Dazu zählen spezielle Verfahren wie die quantitative und qualitative PCR, Fragmentanalysen, Schmelzkurvenanalysen oder die Nukleotidsequenzierung. Sie kommen zusätzlich zum Einsatz um z.B. FLT3-, NPM1-, oder CEBPA-Mutationen, welche einen Einfluss auf die Prognose der AML haben, nachzuweisen. Die Detektion kryptischer zytogenetischer Veränderungen sowie die molekulargenetische Bestimmung der zytogenetischen Veränderungen ist ebenfalls möglich (siehe auch Kapitel 2.1.1.2) (78).

### **2.1.5 Ätiologie**

Die Entwicklung der AML wird mit mehreren Risikofaktoren in Verbindung gebracht. Diese lassen sich im Allgemeinen aber nur bei einer geringen Anzahl der beobachteten Fälle finden. Die DNA ist von Natur aus instabil und unterliegt durch endogene und

exogene Faktoren einer kontinuierlichen Modifikation. Trotz der schützenden DNA-Reparatursysteme gibt es Evidenz, dass verschiedene Formen von DNA-Schäden, wie Strangbrüche, alkali-labile Stellen, Basenmodifikationen und Quervernetzungen von Protein-DNA sich im Alter anhäufen (79). Zunehmend fehlerhafte Reparaturmechanismen und DNA-Schäden dienen demnach als Ursache für maligne Transformationen der Zellen (80). Das Alter stellt somit den wichtigsten Risikofaktor dar. Im Median liegt das Alter bei Neuerkrankung um die 65 Jahre und wird selten vor dem 40. Lebensjahr diagnostiziert. Entsprechend ist die AML primär eine Erkrankung des späten Erwachsenenalters.

Umwelt- und Chemikalienexpositionen, die zu den exogenen Faktoren zählen, gehen mit einem unterschiedlich hohen Risiko einher. Darunter zählt die Exposition gegenüber natürlicher ionisierender Strahlung, die sekundäre Entstehung durch therapeutische Strahlung oder auch chemotherapeutische Wirkstoffe wie Alkylantien und Topoisomeraseinhibitoren. Unter den Chemikalien ist Benzol der am besten untersuchteste Stoff und zeigt ein eindeutig erhöhtes Risiko auf.

Weiterhin kann eine AML auch sekundär (sAML) aus einem myelodysplastischen Syndrom (MDS), einer aplastischen Anämie oder einer anderen Erkrankung der Hämatopoese erworben werden (81).

Mehrheitlich entstehen die AML ohne erkennbare Ursachen. Diese Form wird de novo Leukämie genannt. Je nach Alter tritt dies bei 60-70% der Patienten auf (4).

### **2.1.6 Klinisches Erscheinungsbild**

Die klinischen Anzeichen und Symptome der AML sind direkt auf die Blasteninfiltration des Knochenmarks und der daraus resultierenden hämatopoetischen Insuffizienz oder auf die periphere Ausschwemmung von Blasten (Leukostase) zurückzuführen.

Die meisten Patienten zeigen Symptome, die mit der Zytopenie vergesellschaftet sind: Müdigkeit, Blässe, Dyspnoe, Blutungen, Infektionen und Fieber. Die sogenannte „B-Symptomatik“ (Fieber, Nachtschweiß und ungewollter Gewichtsverlust) ist unspezifisch und kann wie bei anderen malignen Erkrankungen ebenfalls vorliegen.

Extramedulläre Manifestationen von Leukämiezellen in Leber (Hepatomegalie), Milz (Splenomegalie), Haut (Leukemia Cutis), Lymphknoten (Lymphadenopathie), Knochen (Knochenschmerzen), Gingiva und im Zentralnervensystem können eine Vielzahl anderer Symptome hervorrufen, sind aber extrem selten.

Übersteigt die Leukozytose eine Zellzahl von mehr als  $100 \times 10^9/l$  kann es zu einer Leukostase mit Mikrozirkulationsstörungen, Hypoxie, pulmonalen Verschattungen, retinalen Einblutungen und neurologischen Symptomen kommen (82, 83).

### **2.1.7 Therapieprinzip**

Da es sich bei der AML um eine seltene Erkrankung handelt, ist der Einschluss in eine Therapiestudie sowie die Behandlung an einem Therapiezentrum empfohlen. Allgemein kann die Behandlung der AML in zwei Phasen unterteilt werden: eine Induktionstherapie und eine Konsolidierungstherapie. Die Induktionstherapie hat das Erreichen einer kompletten hämatologischen Remission (CR) zum Ziel (84). Die CR ist definiert als normale Zellularität des KM mit  $<5\%$  Blasten und einer Normalisierung des peripheren Blutbildes (76). Ob eine CR erreicht wird, hängt vor allem vom genetischen Hintergrund der AML und weniger vom Alter des Patienten ab (85). Initial erfolgt die Induktionstherapie meistens mit einer Doppelinduktion im 3+7-Schema. Dies bedeutet drei Tage Anthracyclin (Daunorubicin) und sieben Tage Cytarabin (Ara-C). Je nach Studiengruppe können auch abweichende Protokolle Anwendung finden. Nach Erreichen der CR erfolgt die Konsolidierungstherapie, die dem Alter und dem Risikoprofil angepasst wird. Sie hat die weitere Reduktion der Leukämieast und die Verringerung des Rezidivrisikos zum Ziel. Für Patienten unter 60 Jahren mit Niedrigisiko (NR) wird Hochdosis-Ara-C (HDAC) gegeben. Bei einem Standardrisiko (SR) wird, sofern möglich, eine allogene Blut-Stammzelltransplantation (alloHSCT) empfohlen. Hochrisiko (HR)-Patienten erhalten eine alloHSCT von einem Familien- oder Fremdspender (78, 86). Ältere Patienten über 60 Jahre weisen einige Besonderheiten auf. Vermehrt liegen sekundäre Erkrankungen, Resistenzgenexpressionen, Hochrisikoaberrationen sowie Komorbiditäten vor (78). Dadurch kann die vorgesehene Therapie häufig nicht oder nur unvollständig durchgeführt werden, was wiederum eine schlechtere Prognose mit sich bringt. Um dies besser abschätzen zu können, kann die individuelle CR-Wahrscheinlichkeit und das Frühmortalitätsrisiko anhand eines Scores ermittelt werden. In den Score fließen das Alter, der Hb-Wert, die Thrombozyten sowie zytogenetische und molekulargenetische Mutationen ein (87). Die Patienten mit einem NR erhalten üblicherweise mehrere Zyklen HDAC oder intermediär dosiert Ara-C. Der Nutzen einer intensiven Konsolidierungstherapie ist bei älteren Patienten mit SR oder HR nicht gesichert (16).

Bei Patienten mit einem biologischen Alter über 75 Jahren, signifikanten Komorbiditäten, einem ECOG-Status größer gleich drei oder geringe Heilungschancen aufgrund einer ungünstigen Zytogenetik steht die Lebensverlängerung bei Erhalt einer hohen Lebensqualität im Vordergrund. Um dies zu erreichen, werden die hypomethylierenden Substanzen (HMA) 5-Azacitidin und Decitabin empfohlen. Sie weisen einen signifikanten Vorteil gegenüber der Behandlung mit Cytarabin (88, 89) auf. Kommt es bei Patienten zu einem Rezidiv, ist die alloHSCT die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit. Die Reinduktionstherapie, bzw. die Therapie der refraktären Erkrankung erfolgt meist mit Protokollen, die hochdosiert Ara-C beinhalten (90, 91). Bei einem Rezidiv nach alloHSCT kann in Einzelfällen eine weitere HSCT in Erwägung gezogen werden (92).

In den letzten Jahren wurden ergänzend neue Substanzen zur Therapie der AML zugelassen. Dadurch kommt es zunehmend zur Erweiterung der begrenzten therapeutischen Optionen (93). Zu nennen ist hier die Tyrosinkinase-Inhibitoren Midostaurin und Gilteritinib, die IDH-Inhibitoren Invosidenib und Enasidenib, sowie der monoklonale Antikörper Gemtuzumab-Ozogamicin (GO) sowie der Bcl-2-Inhibitor Venetoclax. Hierzu wird im Kapitel 2.2.5 genauer eingegangen.

## **2.2 Nukleophosmin 1**

### **2.2.1 Struktur und Funktion**

NPM1 ist ein Gen, das für das Nukleophosmin Protein codiert, und kommt in allen Zellen ubiquitär vor. Seine Struktur ermöglicht eine zytoplasmatische, nukleoplasmatische und nukleoläre Lokalisation. Hauptsächlich befindet es sich aber im Nukleolus (6).

Das NPM1-Protein besteht im Wesentlichen aus drei Regionen: N-Terminus, Zentrum und C-Terminus (siehe Abbildung 4). Der N-Terminus ist hydrophob und enthält zwei nukleare Exportsignale (NES). Diese liegen eng mit anderen hydrophoben Aminosäuren zusammen und fördern durch die Wechselwirkung mit dem CRM1-Exportprotein die Translokation vom Nukleus zum Zytoplasma. Außerdem sind bestimmte Domänen des N-Terminus für die Selbst-Oligomerisation verantwortlich, indem fünf Monomere sich zu einem Pentamer formen und dabei helfen, dass NPM1 in den Nukleolus zu bringen (94).

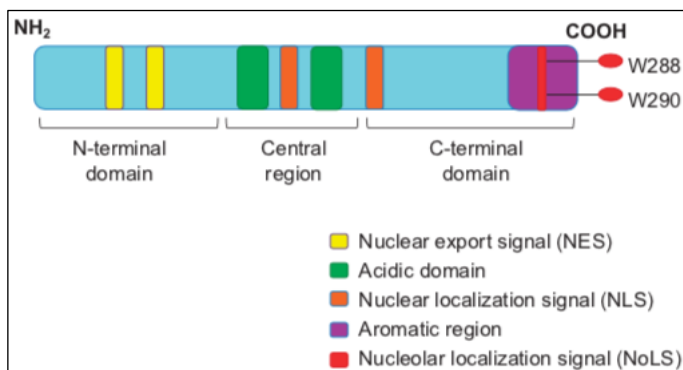
Die zentrale Region besteht aus zwei sauren Domänen und spielt zum einen eine wichtige Rolle bei der Histonenbindung und zum anderen bei der Shuttlefunktion zwischen Nukleus und Zytoplasma. Hier helfen zwei nukleare Lokalisationssignale

(NLS). Unter physiologischen Bedingungen überwiegt der Kernimport gegenüber dem Export.

Sowohl der N-Terminus als auch die zentrale Region sind an der Chaperonenaktivität beteiligt, da bewiesen ist, dass eine Deletion in einem der beiden Regionen zur Beeinträchtigung der Proteinfunktion führt.

Die C-terminale Region ist im Vergleich zu anderen Proteinen der Nukleophosmin- bzw. Nukleoplasmin-Familie einzigartig. Sie enthält eine basische und eine aromatische Domäne und ist für die Nukleinsäurebindung sowie für die Lokalisierung im Nukleolus, welche weitgehend von der Proteinfaltung abhängt, verantwortlich. Die aromatische Region ist vor allem in den Bereichen Trp-288 und Trp-290 stark konserviert und bildet das Lokalisierungssignal für den Nukleolus (NoLS). Eine Deletion in diesem Bereich hat eine Delokalisation des NPM1 aus dem Nukleolus ins Nukleoplasma zur Folge (6).

Das NPM1 wird posttranslational durch Phosphorylierung und Acetylierung modifiziert und so in seiner zellulären Funktion und subzellulären Lokalisation reguliert (95).



**Abbildung 4:** NPM1 Struktur (6)

Abkürzungen: NH<sub>2</sub> = Aminogruppe, COOH = Carboxygruppe

Bisher sind vier Hauptfunktionen vom NPM1 beschrieben. Erstens: Es spielt eine wichtige Rolle bei der Biogenese und dem Transport der Ribosomen. Zweitens: Um die genomische Stabilität aufrecht zu erhalten, hilft es bei der Regulierung der Duplikation von Zentrosomen während des Zellzyklus (96). Drittens: Es reguliert den Zellzyklus und die Apoptose durch Potenzierung der p53-Stressantwort. Es besteht eine funktionelle Verbindung zwischen der Integrität des Nukleus und der Stabilität von p53. Wird die Integrität des Nukleus durch Stress gestört, gelangt das NPM1 in das Nukleoplasma und interagiert dort direkt mit dem p53, um die Stabilität zu erhöhen und den Zellzyklus zu stoppen. Zusätzlich kann es indirekt, über die Bindung und Regulation des Proteins GADD45A, auf den p53-abhängigen Zellzyklus-Arrest Einfluss nehmen. Viertens: Es kann durch die Wechselwirkung mit dem Arf-

Tumorsuppressorprotein Einfluss auf das Zellwachstum (Suppression der Ribosomen-Biogenese) und die Proliferation (Induktion von Zellzyklus-Checkpoints) nehmen (6).

### 2.2.2 NPM1-Mutationformen und deren klinische Merkmale

Die Häufigkeit der NPM1-Mutation bei der AML beträgt in etwa 30%, hingegen bei der AML mit normalen Karyotyp 50-60% (97) und tritt in der erwachsenen Bevölkerung häufiger bei Frauen als bei Männern auf, obwohl letztere im Allgemeinen häufiger an einer AML erkranken. Tatsächlich weisen in etwa 85% der NPM1 mutierten AML-Fälle einen normalen Karyotyp auf, während die verbleibenden 15% nur eine geringe Chromosomenaberration – wahrscheinlich durch sekundäre Ereignisse verursacht – aufweisen (98).

Die NPM1<sup>mut</sup> ist klinisch mit einer häufigeren extramedullären Beteiligung, einer erhöhten Blastenzahl im KM und einer höheren Anzahl weißer Blutkörperchen (WBC) und Thrombozyten bei Diagnose assoziiert (99). Zusätzlich zeigt sich in der Durchflusszytometrie meistens eine typische Markerkonstellation mit niedriger bis fehlender CD34-Expression (97) sowie einer erhöhten CD33-Expression (100).

Es wurden über 55 Mutationen identifiziert, wovon die meisten eine Insertion von vier Basenpaaren zeigen. Eine der häufigsten Mutationen der AML liegt in Exon 12 des Gens NPM1. Die häufigste NPM1<sup>mut</sup> wird als Typ A bezeichnet und macht etwa 80% der Fälle aus. Typ-A-Mutationen beinhalten die Verdopplung von TCTG (Nukleotide 956 bis 959), wodurch eine Insertion an Position 960 erzeugt wird. Die Typ-B-Mutation kommt bei etwa 10% der Fälle vor, die Typ-D-Mutation bei etwa 5%. Sie produzieren beide 4-Basenpaar-Insertionen an Position 960. Andere Mutationen sind selten und treten nur bei unter 1% der Fälle auf (97, 99, 101). Obwohl diese Mutationsform vor über zehn Jahren entdeckt wurde, sind die genauen Mechanismen, mit denen sie zur Pathogenese der Leukämie beitragen, weitgehend unklar. Die Entschlüsselung dieser Mechanismen stellt aufgrund der Beteiligung an zahlreichen zellulären Prozessen eine große Herausforderung dar (6).

DNA	Protein	N	%
CAAGATCTCTG----GCAG----TGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	QDLWQWRKSL wt		
CAAGATCTCTG <b>TCTG</b> GCAG----TGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	QDLC <b>L</b> AVEEVSLRK Mut A	184	80.3
CAAGATCTCTG <b>CATG</b> GCAG----TGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	QDLC <b>M</b> AVEEVSLRK Mut B	21	9.2
CAAGATCTCTG <b>CCTG</b> GCAG----TGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	QDLC <b>L</b> AVEEVSLRK Mut D	7	3.1

**Abbildung 5:** Die häufigsten NPM1-Mutationsformen

Die Abbildung zeigt PCR-amplifizierte NPM1-Mutationen von 229 Patienten. Gegenübergestellt sind die Nukleotidsequenzen der DNA und die Aminosäuresequenzen des Proteins mit der jeweiligen Häufigkeit. Der DNA-

Abschnitt zeigt die Insertion der 4 Basen (rot). Die Aminosäuren des Protein-Abschnittes sind in einem Einbuchstabencode dargestellt. Die blauen Kästchen beschreiben die Aminosäure Tryptophan an den Positionen 288 und 290 (99).

### 2.2.3 NPM1 und deren Assoziation zu anderen Mutationsformen

Es konnte gezeigt werden, dass die NPM1-Mutation immer heterozygot ist (102) und sich auf die myeloische Linienzugehörigkeit beschränkt (103). Eine alleinige Mutation des Nucleophosmin-Gens in hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzellen führt in verschiedenen Mausmodellen zur genomischen Instabilität durch unkontrollierte Duplikationen der Zentrosomen (102), zu hämatologischen Neoplasien der myeloischen Reihe (104), zu Myelodysplasien in Megakaryozyten und Erythrozyten (102), zur Hemmung der Proliferation durch Destabilisierung des Arf-Tumorsuppressorproteins (105) sowie zu einer verminderten Apoptose durch Inhibierung des Arf-p53-Signalwegs (106).

Diese Ereignisse reichen aber, wie in Kapitel 2.1.1.2 besprochen, alleine nicht aus, um eine Leukämie zu erzeugen. Somit kann dies nicht die einzige Erklärung für die Leukämieentstehung sein. Eine auffällige Häufung zeigt sich beim Vorhandensein von Co-Mutationen (siehe Abbildung 6), die im Folgenden näher beleuchtet werden.

#### 2.2.3.1 Assoziation zu epigenetischen Mutationen (DNMT3A, TET2)

Die DNMT3A<sup>mut</sup> wird überwiegend bei NPM1<sup>mut</sup> beobachtet. Etwa 50% der NPM1<sup>mut</sup> tragen zusätzlich eine DNMT3A<sup>mut</sup> (16). Es wird davon ausgegangen, dass die NPM1<sup>mut</sup> sekundär für die DNMT3A<sup>mut</sup> ist (56). Die prognostische Auswirkung der DNMT3A<sup>mut</sup> ist nicht einheitlich geklärt. Eine Studie von Ley et al. zeigt einen signifikant negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben bei Erwachsenen mit de novo AML. Das mediane OS war unter den Patienten mit DNMT3A<sup>mut</sup> gegenüber Patienten mit DNMT3A<sup>wildtyp</sup> signifikant kürzer (12,3 Monate vs. 41,1 Monate) (57). Gestützt wird diese Erhebung von weiteren großen Studien. Bei diesen zeigt sich interessanterweise in der Analyse von genotypischen Untergruppen, dass bei NK-AML mit FLT3<sup>wildtyp</sup>/NPM1<sup>mut</sup> keine Auswirkung von DNMT3A<sup>mut</sup> auf das OS zu finden ist. Hingegen ist bei FLT3<sup>wildtyp</sup>/NPM1<sup>wildtyp</sup> wieder ein negativer prognostischer Effekt durch die DNMT3A<sup>mut</sup> zu finden (15, 74, 107, 108). Ein Vergleich dieser Studien machen die unterschiedlichen Patientenpopulationen, Behandlungsschemata und Endpunkte dennoch schwierig.

Das gemeinsame Auftreten einer NPM1<sup>mut</sup> mit einer TET2<sup>mut</sup> zeigt sich bei etwa 56% der Patienten. Die TET2<sup>mut</sup> zeigt insbesondere bei Patienten unter 65 Jahren einen

negativen Einfluss auf das EFS bei NPM1<sup>mut</sup>-FLT3<sup>neg</sup>-Patienten (109). Es scheint, dass diese Entitäten die intensive Chemotherapie überleben und trotz Verschwinden der NPM1-Mutationslast in der Remission persistieren. Später können sie dann als Reservoir für die Entstehung von Rezidiven dienen (110, 111).

### 2.2.3.2 Assoziation zur Treibermutation FLT3

Die interne Tandemduplikation FLT3 kommt bei NPM1<sup>mut</sup> AML zu ungefähr 40% vor (16), dies ist etwa doppelt so häufig wie bei AML mit NPM1<sup>wildtyp</sup>. Es wird derzeit davon ausgegangen, dass diese Mutation als sekundäres Ereignis entsteht (16). Die FLT3-ITD-Mutation wurde als der bedeutendste Prognosefaktor für die Vorhersage von Rezidiven und eines schlechteren Gesamtüberlebens identifiziert (15). Mehrere Studien zeigen den klinisch signifikanten Einfluss der Treibermutation FLT3 in Abhängigkeit der NPM1<sup>mut</sup> auf das OS und RR. In einer großen Kohorte junger AML-Patienten konnten drei prognostische Gruppen klassifiziert werden, die das OS und RR nach fünf Jahren zeigen: Eine ungünstige Prognose weisen Patienten mit der Konstellation NPM1<sup>neg</sup>/FLT3-ITD<sup>pos</sup> (OS 15% und RR 79%) auf. Patienten mit NPM1<sup>neg</sup>/FLT3-ITD<sup>neg</sup> (OS 34% und RR 57%) sowie Patienten mit NPM1<sup>pos</sup>/FLT3-ITD<sup>pos</sup> (OS 35% und RR 63%) haben ein intermediäres Risiko. Eine günstige Prognose zeigt sich bei der Konstellation NPM1<sup>pos</sup>/FLT3-ITD<sup>neg</sup> (OS 59% und RR 34%) (24). Der positive Einfluss der NPM1<sup>pos</sup>/FLT3-ITD<sup>neg</sup> auf OS und RR bestätigt sich auch in weiteren Untersuchungen, darunter auch bei älteren AML-Patienten (99, 112). Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die NPM1<sup>mut</sup> in Abwesenheit einer FLT3-ITD<sup>mut</sup> mit einem besseren Ansprechen auf die Behandlung assoziiert ist.

Einen zusätzlichen prognostischen Wert zeigt die FLT3-ITD/Wildtyp-Allellast unter den NPM1<sup>mut</sup> Patienten, bezogen auf das OS und RR nach fünf Jahren. Drei Gruppen werden unterteilt, um den prognostischen Wert zu bestätigen (FLT3<sup>wildtyp</sup>, FLT3-ITD<sup>low</sup> mit einer Ratio <0,5 und FLT3-ITD<sup>high</sup> mit einer Ratio >0,5). Für FLT3-ITD<sup>high</sup> zeigt sich ein deutlich höheres RR gegenüber FLT3-ITD<sup>low</sup> und FLT3-ITD<sup>wildtyp</sup> (79% vs. 20% vs. 38%) und ein schlechteres OS (29% vs. 47% vs. 56%) (113). In ähnlichen Studien kann der Trend für ein ungünstiges OS in der Gruppe mit hoher Mutationslast sowie der geringe Unterschied zwischen Wildtyp und ITD<sup>low</sup> bestätigt werden (24, 73, 74, 114).

Neuere Erkenntnisse legen dar, dass der Effekt der FLT3-Mutationslast, insbesondere bei Patienten mit einem niedrigen Mutationslevel, durch die NPM1<sup>mut</sup> direkt moduliert wird. Die Patientengruppe mit NPM1<sup>mut</sup> hat im Gegensatz zur Gruppe mit NPM1<sup>wildtyp</sup>,

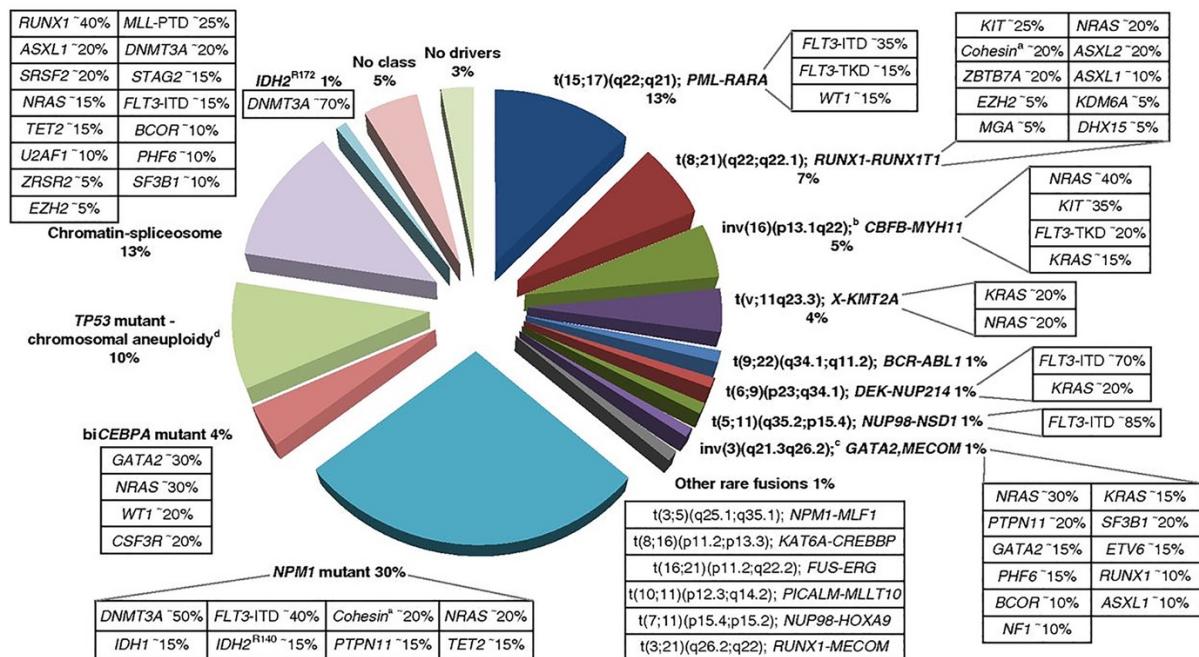
bezogen auf die FLT3-Mutationslast, ein niedrigeres RFS und ein höheres OS aufgezeigt (15, 113, 114). Ob die Einteilung der Mutationslast in Gruppen einen klinischen Nutzen bringt, wird seit der Einführung von Tyrosinkinase-Inhibitoren (Erstzulassung von Midostaurin im April 2017 durch die FDA) wieder zunehmend diskutiert (115).

#### 2.2.3.3 Häufige Kombination DNMT3A, NPM1 und FLT3

Die mit etwa 6% am häufigsten vorkommende Kombination mit drei Genmutationen ist DNMT3A<sup>mut</sup>/NPM1<sup>mut</sup>/FLT3<sup>ITD</sup>. Der Erwerb dieser Kombination an Mutationen scheint auch hier zuerst durch die DNMT3A<sup>mut</sup> und dann gefolgt von der NPM1<sup>mut</sup> und FLT3<sup>ITD</sup> zu sein (110). Dieser Genotyp zeigt ein besonders signifikant schlechtes Gesamtüberleben (HR: 1,5). Im Vergleich dazu haben NPM1<sup>mut</sup>/FLT3<sup>ITD</sup> (HR: 1,1), DNMT3A<sup>mut</sup>/NPM1<sup>mut</sup> (HR: 1,0), DNMT3A<sup>mut</sup>/FLT3<sup>ITD</sup> (HR: 1,2) und DNMT3A<sup>mut</sup> (HR: 1,1) ein besseres Gesamtüberleben. Auffallend ist, dass der Genotyp mit ebenfalls drei Mutationen NPM1<sup>mut</sup>/DNMT3A<sup>mut</sup>/NRAS<sup>G12/13</sup> eine unerwartet günstige Prognose aufweist (15).

#### 2.2.4 Mutationsprofil NPM1<sup>mut</sup> gegen AML allgemein

Klinisch tritt die NPM1 mutierte AML mit einer höheren Blastenzahl im KM, einer größeren Anzahl weißer Blutkörperchen, einer höheren Thrombozytenzahl und Serum-Laktat-Dehydrogenase sowie einer stärkeren extramedullären Beteiligung als die NK-AML ohne NPM1<sup>mut</sup> auf. Eine isolierte Betrachtung des Mutationsprofils der NPM1<sup>mut</sup> gegenüber dem Wildtyp macht sich auch hier durch eine Zunahme im Gesamtüberleben bemerkbar. Das mediane OS bei NPM1<sup>mut</sup> liegt bei etwa 16,2 Monaten gegenüber 11,5 Monaten bei NPM1<sup>wildtyp</sup>. Gleiches zeigt sich auch beim DFS. Dort sind es 19,7 Monate bei NPM1<sup>mut</sup> gegenüber 14,5 Monate bei NPM1<sup>wildtyp</sup>. Interessanterweise zeigt sich dieser Unterschied im gleichen Kollektiv bei isolierter Betrachtung der NK-AML im OS nicht mehr signifikant, im DFS nur noch geringfügig. Der Anteil von NPM1<sup>mut</sup> mit normalen Karyotyp liegt hier bei 46%. Ebenfalls positiv stellt sich die NPM1<sup>mut</sup> im signifikant längeren RFS gegenüber dem Genotyp NPM1<sup>wildtyp</sup> dar (99, 112).



**Abbildung 6:** Verteilung molekularer Klassen und deren Genmutationen bei AML (16)

Das Kreisdiagramm zeigt die Verteilung der molekularen Klassen bei Patienten bis zum Alter von etwa 65 Jahren. Bei der  $NPM1^{mut}$ , die mit etwa 30% vorkommt, zeigt sich eine Vielzahl an Co-Mutationen. Die häufigsten sind DNMT3A mit 50% und FLT3-ITD mit 40%.

## 2.2.5 Therapieansprechen der AML mit $NPM1^{mut}$

Die Mutationskonstellation bei Patienten mit AML sind über die Risikoklassifizierung hinaus klinisch bedeutende Faktoren für die Auswahl und das Ansprechen der Therapie. Durch die Zulassung neuerer Substanzen konnte in den letzten Jahren die Therapie erweitert werden. Patienten mit CD33-positiver  $NPM1^{mut}/FLT3^{wildtyp}$  AML profitieren von einer Hinzunahme von GO zur Induktionstherapie. Die AMLSG 09-09 Studie zeigt, dass der monoklonale Antikörper bei diesen Patienten nach Erreichen der CR ein signifikant verlängertes rezidivfreies Überleben bringt (116). Die europäische Zulassung erfolgte im April 2018. Eine noch nicht ausgewertete randomisierte Phase III Studie der AMLSG untersucht, ob niedrig dosiertes Cytarabin und Etoposid mit oder ohne All-trans Retinsäure bei älteren, für eine intensive Chemotherapie ungeeigneten Patienten mit  $NPM1^{mut}$  AML einen Vorteil bringt (117). Nach Erreichen der ersten CR profitieren Patienten mit dem Genotyp  $NPM1^{mut}/FLT3^{wildtyp}$  von einer alloHSCT nicht. Dies konnte in einer sog. Donor-vs.-no-donor-Analyse gezeigt werden. Die 4-Jahres-Überlebensrate beträgt bei diesen Patienten etwa 60% (23). Ein weiterer positiver prognostischer Effekt auf das OS zeigt sich in der Induktionsbehandlung mit Hochdosis ( $90\text{mg}/\text{m}^2$ ) Daunorubicin anstelle einer Niedrigdosis ( $45\text{mg}/\text{m}^2$ ). Hier profitieren Patienten mit  $NPM1^{mut}$  durch einen Anstieg des 4-Jahres-Gesamtüberlebens von 29% (Niedrigdosis) auf 52%

(Hochdosis). Es kann ebenfalls gezeigt werden, dass dieser Nutzen unabhängig einer FLT3<sup>ITD</sup>-Mutation besteht (118, 119).

Patienten mit einer FLT3-Mutation profitieren von einer Induktionstherapie mit der Hinzunahme des Tyrosinkinase-Inhibitors Midostaurin. Dieser erfolgt in Kombination mit der Standard-Chemotherapie. Im 4-Jahres-Gesamtüberleben zeigt sich ein Anstieg von 44,3% (Placebo) auf 51,4% (Midostaurin) und für das mediane EFS ein Vorteil von 3 Monaten (Placebo) gegenüber 8,2 Monate (Midostaurin) (115, 120). Bei Patienten mit zusätzlicher NPM1<sup>mut</sup> konnte zudem ein signifikant besserer Effekt in EFS und OS gezeigt werden (120, 121). Die europäische Zulassung erfolgte im September 2017. Für ältere AML-Patienten, Patienten mit einem schlechten Allgemeinzustand und für Patienten mit Hochrisikomutationen, die nicht für eine intensive Chemotherapie geeignet sind, erfolgte im Mai 2021 die Zulassung von Venetoclax in Kombination mit Azacitidin. Hier zeigt sich ein positives Ansprechen im Gesamtüberleben mit 14,7 Monaten gegenüber 9,6 Monate bei Monotherapie mit Azacitidin (122).

### **2.3 Monitoring minimaler Resterkrankung**

Trotz der Tatsache, dass 60-80% der erwachsenen Patienten mit AML nach der Induktionstherapie eine vollständige morphologische Remission (CR) erreichen, ist das Ergebnis durch die hohe Rezidivrate begrenzt, was zu OS-Raten von nur 20-30% führt. Eine CR ist die Voraussetzung für die Heilung in der AML-Therapie (123-125). Die meisten Patienten erleiden aufgrund der unvollständigen Elimination der Erkrankung ein frühes Rezidiv, welches innerhalb des ersten Jahres nach CR bzw. innerhalb der ersten zwei Jahre nach Erstdiagnose auftritt (126, 127).

Die Entwicklung neuerer und sensitiverer Techniken erlaubt es, die minimale oder messbare Resterkrankung (MRD) zu messen und bietet eine Erweiterung zur rein morphologisch definierten Remission. Die MRD bezeichnet das Vorhandensein von Leukämiezellen bis zu einer Konzentration von 1:10<sup>4</sup> bis 1:10<sup>6</sup> WBCs. Limitiert wird dies durch die Sensitivität der Methode, mit der gemessen wird. Eine morphologische Messung liegt vergleichsweise bei 1:20 WBCs (128). Eine etablierte Rolle spielt die MRD bereits in verschiedenen hämatologischen Malignitäten wie der chronischen myeloischen Leukämie (CML), der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und der akuten promyelozyten Leukämie (APL). Dort nehmen sie Einfluss auf die Therapie durch folgende Aufgaben: Monitoring der Therapie, Auswahl und Dosierung der Konsolidierung und die Verabreichung einer präemptiven Therapie durch die

Vorhersage von Rezidiven (129). Die zurzeit am häufigsten genutzten Techniken zur Erfassung der MRD sind die multiparametrische Durchflusszytometrie (MFC) und die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Jede dieser Methoden hat Vor- und Nachteile, dies macht die Wahl für den spezifischen AML-Subtyp schwierig. Sie unterscheiden sich in Bezug auf Sensitivität, Anwendbarkeit, Komplexität und die Fähigkeit, den spezifischen Mutationstyp zu bewerten (130).

### **2.3.1 Monitoring der MRD bei AML mit NPM1<sup>mut</sup>**

Die Messung der MRD stellt zusätzlich zu den etablierten klinischen, zytogenetischen und molekularen Risikomarkern bei Erstdiagnose, einen dynamischen Risikomarker für den Verlauf der AML dar (128). Eine entscheidende Diskussion im Zusammenhang mit der MRD ist die Frage nach dem optimalen Schwellenwert (Cut-Off) und dem idealen Zeitpunkt der MRD-Messung. Es gibt bereits für die MFC und qRT-PCR definierte Cut-Off-Werte, die versuchen den Erkrankungsverlauf für bestimmte Zeitpunkte vorherzusagen. Da die Technik zwischen den Laboren sowohl qualitativ als auch quantitativ nicht standardisiert ist, können diese Grenzwerte nicht universell angewendet werden. Dies macht zum einen den Vergleich zwischen Studien schwierig und zum anderen wird die Umsetzung der Studien in die Praxis zur Herausforderung (129). Das Beurteilen der MRD in der AML mit NPM1<sup>mut</sup> erfolgt durch eine mutationsspezifische qRT-PCR. Die Frameshift-Mutation in Exon 12 des NPM1-Gens bietet durch seine Häufigkeit von etwa einem Drittel aller AML-Patienten sowie der hohen Stabilität im Erkrankungsverlauf ein optimales Ziel für diese Messmethode. Sie weist eine Sensitivität von etwa  $1:10^4$ - $10^5$  Zellen auf und ist damit mindestens genauso sensitiv wie die MFC (131).

#### **Probenmaterial**

Für die Probenanalyse werden sowohl PB als auch KM genutzt. Welches Probenmaterial bevorzugt genutzt wird, hängt u.a. vom Zeitpunkt der MRD-Messung ab. Krönke et al. zeigen während der Induktions- und Konsolidierungstherapie eine höhere Sensitivität für die Messung im KM. Während dieser Zeit waren in 46% der negativen PB-Proben noch NPM1-Mutationslast im KM feststellbar. In der Nachbehandlungsphase flachte dieser Effekt merklich ab (132). Ob dies einen prognostischen Effekt hat, wurde nicht untersucht. Ivey et al. zeigen über alle gepaarten Proben hinweg, dass KM-Proben eine höhere Sensitivität des MRD-Mutationslevels von 1log-Stufe gegenüber den Proben im PB haben (133). Balsat et

al. kommen nach Induktionstherapie zu einem ähnlichen Effekt, der bei 0,8log-Stufen liegt (134). Um den MRD-Status des Patienten zu definieren, empfiehlt das ELN die standardmäßige Diagnostik aus dem KM (128).

### **Abnahmezeitpunkte der Proben**

Die Arbeitsgruppe MRD des ELN empfiehlt Messzeitpunkte für PB und KM während der Therapie zum Diagnosezeitpunkt, nach zwei Zyklen Induktionstherapie, nach jeder Konsolidierungstherapie und nach Therapieende. Wird eine alloHSCT durchlaufen, empfiehlt sich ebenfalls die Messung in PB und KM nach der letzten Chemotherapie. Für das Follow-Up sollte alle drei Monate eine Messung im PB und KM über zwei Jahre erfolgen. Nach zwei Jahren sollte das Zeitintervall individuell an das Rezidivrisiko angepasst werden (128).

### **Zielparameter der MRD**

Für die Phase nach der Behandlung wurden von der ELN Arbeitsgruppe MRD spezifische Zielparameter definiert. Patienten mit vollständiger morphologischer Remission können nach der Behandlung entweder in eine vollständige molekulare Remission ( $CR_{MRD}^-$ ) übergehen oder sie weisen eine molekulare Persistenz auf. Aus einer  $CR_{MRD}^-$  heraus kann sich ein molekulares Rezidiv (MR) entwickeln und Patienten mit molekularer Persistenz können in eine molekulare Progression (MP) übergehen. Ob das MR und die MP ähnliche klinische Merkmale oder Prognosen aufweisen, ist noch nicht bekannt. Aufgrund dessen wird empfohlen zwischen molekularem Rezidiv und Progression zu unterscheiden.

Diese werden hier nach den aktuellen Richtlinien des ELN kurz definiert (128):

- $CR_{MRD}^-$ : Patient in morphologisch kompletter Remission und MRD-Negativität in zwei konsekutiven Messungen in einem Intervall länger als vier Wochen und einer Sensitivität von 1:10000
- $MP_{LCN}$ : Patient in morphologischer Remission mit Persistenz niedriger Kopienzahl im KM ( $<100-200$  Kopien/ $ABL \times 10^4$ ) und eine relative Zunahme  $< 1\log_{10}$  zwischen zwei positiven Proben
- MP: Anstieg der MRD-Kopienzahl  $\geq 1\log_{10}$  zwischen zwei positiven Proben bei Patienten mit  $MP_{LCN}$
- MR: Patient in  $CR_{MRD}^-$  mit Anstieg der MRD-Kopienzahl  $\geq 1\log_{10}$  zwischen zwei positiven Proben

### **2.3.2 Prognostische Erkenntnisse der AML mit NPM1<sup>mut</sup> unter MRD-Monitoring**

Eine Reihe von Studiengruppen konnten den prognostischen Nutzen des MRD-Monitorings für die klinische Anwendung belegen. Im Folgenden werden die Erkenntnisse zu den jeweiligen Therapiezeitpunkten und in der Nachbeobachtungszeit beleuchtet.

#### **Zum Zeitpunkt der Diagnose**

Zum Zeitpunkt der Diagnose kann kein Einfluss des absoluten NPM1-Mutationslevels auf RFS, EFS oder OS gezeigt werden (132). Hingegen ist in der Zeit der Aplasie nach Beginn der Induktionstherapie (Tag 16-18), bei Reduktion von 1log-Stufe gegenüber dem NPM1-Mutationslevel bei Diagnose, ein positiver Einfluss auf die kumulative Rezidivinzidenz (cumulative incidence of relapse, CIR) innerhalb von 100 Tagen festzustellen (7). Belegen konnte dies eine andere Studie aber nicht (132).

#### **Zum Zeitpunkt nach Induktionstherapie**

Für Patienten in CR nach Induktionstherapie kann gezeigt werden, dass es ein prognostischer Unterschied ist, ob ein Patient MRD<sup>pos</sup> oder MRD<sup>neg</sup> ist. Die CIR nach zwei Jahren beträgt bei MRD<sup>neg</sup> 6,4% gegenüber 53% bei MRD<sup>pos</sup> Patienten. Zudem führt die niedrigere CIR zu einem signifikant besseren OS (132). Eine Studie aus Großbritannien bestätigt dies. Hier haben MRD<sup>neg</sup> gegenüber MRD<sup>pos</sup> Patienten nach dem zweiten Zyklus Chemotherapie im PB ein ebenfalls geringeres Rezidivrisiko nach drei Jahren (30% vs. 82%) sowie ein längeres OS (75% vs. 24%) (133). Bei Patienten, die nach Induktionstherapie eine Reduktion von mindestens 3log-Stufen des MRD-Mutationslevels im KM erreichen, zeigt sich eine signifikant niedrigere CIR nach zwei Jahren (26,4% vs. 77,8%) und ein besseres OS gegenüber denen, die unterhalb einer solchen Reduktion bleiben. Dies ist unabhängig von der ELN-Risikoklassifizierung und der WBC-Anzahl (7). Eine Studiengruppe aus Frankreich kommt zu dem Ergebnis, dass eine Reduktion unterhalb von 4log-Stufen im PB mit einer ebenfalls signifikant niedrigeren CIR (nach drei Jahren; 20,5% vs. 65,8%) und einem verlängertem OS (nach drei Jahren; +- 92% vs. 40,8%) verbunden ist. Hier zeigt sich die Reduktion des MRD-Mutationslevels unabhängig vom abnormalen Karyotyp und der FLT3-ITD (134). Erstaunlicherweise ist in der Studie aus Großbritannien das Vorhandensein der MRD der einzige signifikante prognostische Faktor für ein Rezidiv in der multivariaten Analyse, unabhängig der Anzahl der WBCs und dem DMT3A- oder FLT3-Status (133). Somit zeigen diese Forschungsgruppen, dass die MRD schon zu diesem Zeitpunkt,

zusätzlich zu den bereits bekannten statischen Risikofaktoren, wertvolle prognostische Informationen liefert, um drohende Rezidive oder einen ungünstigen Therapieverlauf zu erkennen.

Zusätzlich zu den bisher genannten Erkenntnissen besagt die Studie aus Großbritannien, dass bei Patienten mit einem Hochrisiko-Genotyp wie DMT3A und/oder FLT3-ITD bei Abwesenheit der MRD nach zwei Zyklen Chemotherapie die Prognose signifikant günstiger ist (Überlebensrate nach drei Jahren 76%) (133). Dies zeigt sich auch in der Reduktion des NPM1-Mutationslevels in Abhängigkeit vom FLT3-ITD-Status. Patienten mit FLT3-ITD<sup>neg</sup> weisen ein signifikant besseres molekulares Ansprechen nach zwei Zyklen Induktionstherapie als Patienten mit FLT3-ITD<sup>pos</sup> (34.7 NPM1<sup>mut</sup>/10<sup>4</sup> ABL Kopien vs. 126.4 NPM1<sup>mut</sup>/10<sup>4</sup> ABL Kopien) auf (132).

### **Zum Zeitpunkt nach Therapie**

Auch nach Beendigung der Therapie ist ein höheres NPM1-Mutationslevel mit einer kürzeren Remissionsdauer und einem geringeren OS assoziiert (7, 132). Bei Patienten ohne Nachweis einer MRD nach Therapieende zeigt sich nach zwei Jahren eine geringere CIR (15,7% vs. 66,5%) und ein längeres OS (80% vs. 44%) (132). In der deutsch-österreichischen Studiengruppe sind das absolute NPM1-Mutationslevel (Cut-Off 0,01 NPM1<sup>mut</sup>/10<sup>4</sup> ABL Kopien) und die NPM1<sup>mut</sup>-Kinetic (Reduktion von 3 log-Stufen) die einzigen signifikanten prognostischen Indikatoren zu diesem Zeitpunkt für die CIR und das OS (7). Zusammenfassend scheint es, dass zu allen Therapiezeitpunkten das NPM1-Mutationslevel der prognostisch relevanteste Faktor ist.

### **Während der Nachbeobachtungszeit**

Während der Nachbeobachtungszeit können bei Patienten, die lange Zeit in CR sind, niedrige NPM1<sup>mut</sup>-Spiegel nachgewiesen werden. Die deutsch-österreichische Studiengruppe zeigt bei 51% von 136 Patienten mindestens eine positive Follow-Up-Probe im KM. Alle Werte waren niedrig und in der Mehrheit wurden die Folgemessungen negativ. Für die Nachbeobachtungszeit wird hier ein willkürlicher Grenzwert für das molekulare Rezidiv bei 200 NPM1<sup>mut</sup>/10<sup>4</sup> ABL Kopien definiert. Dieser beruht auf der Beobachtung, dass unter allen Patienten in CR, die kein Rezidiv erlangten, das NPM1-Mutationslevel von 145 NPM1<sup>mut</sup>/10<sup>4</sup> ABL Kopien nicht überschritten wird. Die mediane Zeit vom Überschreiten der molekularen Grenze bis zum Rezidiv beträgt 2,6 Monate (Spannweite: 0,4-23,6 Monate) (132). Hubmann et al.

definieren einen Grenzwert von  $1 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$  Kopien für eine Nachbeobachtungszeit von 100 Tagen. Kein Patient, der unter diesem Grenzwert blieb, bekam je ein Rezidiv innerhalb der 100 Tage. Hier beläuft sich die mediane Zeit nach Überschreitung dieses Wertes bis zum Rezidiv auf 58 Tage (Spannweite: 20-98 Tage) (7). Die Studiengruppe aus Großbritannien zeigt, dass bei Patienten in CR der Anstieg des NPM1-Mutationslevel von 0,7 log-Stufen pro Monat das Rezidiv relativ zuverlässig voraussagt. Die mediane Zeit bis zum Rezidiv im KM war länger als die im PB (133 Tage vs. 87 Tage) (133). Unter Betrachtung einer weiteren Studie kann in der Summe davon ausgegangen werden, dass bei einem Anstieg des NPM1-Mutationslevels im KM um 1log-Stufe während der Nachbeobachtungszeit ein klinisches Rezidiv innerhalb einer medianen Zeit von 62-133 Tagen zu erwarten ist (132, 133, 135).

## 3 Datenerwerb und Methoden

### 3.1 Studienaufbau

In dem Zeitraum von August 2003 bis Dezember 2017 wurden in der Hämatologie und Onkologie der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz 88 Patienten mit NPM1<sup>mut</sup> AML behandelt und in die retrospektive Untersuchung eingeschlossen. Diese Patienten erfüllten folgende zwei Einschlusskriterien zur Aufnahme in die Untersuchung: Erstens: Es ist eine NPM1<sup>mut</sup> nachgewiesen. Zweitens: Mindestens eine KM-Probe mit NPM1<sup>mut</sup> wurde als MRD-Verlaufsparemeter im PCR-Labor der Universitätsmedizin Mainz mittels qRT-PCR gemessen.

Der Datensatz umfasst folgende Werte und stammt aus der internen Erfassung der Universitätsmedizin Mainz: Die Diagnose nach WHO- und FAB-Klassifikation, die NPM1-Mutationsform, den FLT3-Status, die Risikoklassifikation nach ELN und die Durchführung einer alloHSCT, die MRD-Messwerte aus dem Labor Mainz und ggf. Messwerte aus den externen Laboren Ulm und dem Münchener, sowie deren molekularer und zytologischer Krankheitsverlauf. Zudem wurden als Prognosefaktoren das Hämoglobin (Hb), die Leukozytenanzahl, die Thrombozytenanzahl, der Blastenanteil im KM, die Laktatdehydrogenase (LDH), der Performancestatus der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (136) und das Vorhandensein extramedullärer Manifestationen in die Datensammlung aufgenommen. Diese wurden bei Diagnosestellung erhoben. Der molekulare Marker für die MRD-Diagnostik ist die NPM1-Mutation vom Typ A. Weitere Mutationsformen des NPM1 wurden nicht gemessen (siehe auch Kapitel 2.2.2). Die MRD-Messwerte für die Analysen stammen aus dem PCR-Labor der Universitätsmedizin Mainz und wurden mittels qRT-PCR-Verfahren gemessen. Für Vergleichsanalysen wurden zusätzlich Daten aus dem Labor der Universität Ulm sowie aus dem Münchener Leukämie Labor (MLL) erhoben. Die Proben sind dem KM und/oder dem PB entnommen. Während der Induktionstherapie und der Konsolidierungstherapie erfolgte nach jedem Zyklus eine MRD-Diagnostik aus dem KM. Bei Transplantation erfolgt im Rahmen des Staging ebenfalls MRD-Messungen im KM. Nach der Transplantation wird alle drei Monate über ein Jahr eine KM-Probe entnommen und anschließend lebenslang alle drei Monate eine PB-Probe. Erfolgt eine reine Chemotherapie, wird über zwei Jahre alle drei Monate eine KM-Probe entnommen und anschließend lebenslang alle drei Monate eine PB-Probe. Die molekularen Remissionskriterien wurden entsprechend

den aktuellen ELN-Richtlinien erhoben (128). Die hämatologische CR ist definiert als < 5% Basten im KM. Stichtag der Datenerhebung ist der 01.04.2019.

### **3.2 Endpunkte und Statistische Analysen**

Für die Definition der klinischen Endpunkte werden die Richtlinien der International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia herangezogen (76):

- Das Rezidiv-freie Überleben (RFS) ist ausschließlich für Patienten definiert, die eine komplette morphologische Remission (CR) erreicht haben. Gemessen wird der Zeitraum zwischen dem Tag, an dem eine CR erreicht wurde, und dem ersten morphologischen Rezidiv. Patienten mit unbekanntem Rezidiv- oder Überlebensstatus zum letzten Zeitpunkt der Nachbeobachtungszeit werden zensiert. Das Zensurdatum entspricht in diesem Fall dem Tag der letzten Untersuchung.
- Die kumulative Rezidivinzidenz (CIR) gibt die prozentuale Wahrscheinlichkeit an, ein morphologisches Rezidiv nach Erreichen einer CR zu entwickeln. Zensiert werden die Patienten mit unbekanntem Rezidivstatus zum letzten Zeitpunkt der Nachbeobachtung oder zum Zeitpunkt der alloHSCT.
- Das Ereignis-freie Überleben (EFS) ist für die Gesamtkohorte definiert. Gemessen wird der Zeitpunkt zwischen der Erstdiagnose der AML und dem morphologischen Rezidiv nach CR oder der Intervention mittels alloHSCT oder dem Tod jeglicher Ursache. Zensiert wird auch hier, wer zum Zeitpunkt der letzten Messung in der Nachbeobachtungszeit einen unbekanntem Ereignisstatus aufweist.
- Das Gesamtüberleben (OS) ist definiert für die Gesamtkohorte. Gemessen wird die Zeit zwischen der Erstdiagnose der AML und Tod jeglicher Ursache. Patienten mit unbekanntem Überlebensstatus zum letzten Zeitpunkt der Nachbeobachtungszeit werden zensiert. Das Zensurdatum entspricht in diesem Fall dem Tag der letzten Untersuchung.

Um einen statistischen Grenzwert für die NPM1<sup>mut</sup>-Ratio zu ermitteln, wurde die Receiver Operating Characteristic-Analyse (ROC) genutzt. Als Maß für die Testgenauigkeit der ROC-Kurve wurde der Flächenanteil unterhalb der Kurve (Area Under the Curve, AUC) herangezogen. Der Youden-Index (Sensitivität + Spezifität - 1)

wurde zur Beurteilung des Grenzwertes genutzt. Die Ereigniszeiten sind mit dem Kaplan-Meier-Schätzer bestimmt worden. Zum Vergleich zweier Ereignisraten wurde der Logrank-Test durchgeführt. Eine Zensierung der Daten wurde vorgenommen und ist im Kapitel 3.2 beschrieben. Die Unterschiede in der Verteilung zwischen den verschiedenen MRD-Messwerten der Labore wurde durch den Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben untersucht. Die Effektstärke wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson angegeben. Ein Effekt wird als signifikant angesehen, wenn  $p \leq 0,05$  ist. Statistische Auswertungen und die Erstellung von Diagrammen sind mit der Softwareumgebung IBM® SPSS® Statistics in der Version 23 durchgeführt worden.

### **3.3 Material und Messmethoden**

#### **3.3.1 Materialgewinnung und Probenaufbereitung**

Das Material wurde sowohl aus dem PB mittels Venenpunktion als auch aus dem KM durch eine Beckenkamm- oder Sternalpunktion zur Untersuchung gewonnen. Um eine Hämodilution in der KM-Probe zu vermeiden, wird empfohlen den ersten Sog aus dem KM bei Abnahme zu nutzen. Die gewonnene Probe wurde mit Heparin im Verhältnis 1:10 oder mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) versetzt, was das Einsetzen der Gerinnung verhindert. Zur Zellisolation wurden die mononukleären Zellen mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Bei diesem Trennverfahren werden verschieden gelöste Teilchen in einer Ultrazentrifuge anhand ihrer Dichte und unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte sortiert. Dazu wurde die Probe in ein Zentrifugalröhrchen gegeben und mit einem Erylysepuffer aufgefüllt und vermischt. Hierfür wurde mindestens das dreifache Volumen der Probe als Erylysepuffer verwendet. Danach inkubierte die Probe für zehn Minuten bei Raumtemperatur und wurde anschließend für fünf Minuten mit 1.200 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert. Aufgrund der größeren Dichte setzten sich die mononukleären Zellen als Zell-Niederschlag (Pellet) vom Plasma ab. Der Überstand konnte jetzt dekantiert und der Niederschlag resuspendiert werden. Nach erneuter Inkubation mit dem Erylysepuffer wurde mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) aufgefüllt und erneut für zwei Minuten bei 1.800 U/min zentrifugiert. Zur RNA-Konservierung wurden maximal  $1 \times 10^7$  Zellen in 50-75µl aus dem Pellet in ein 2ml Eppendorf Tube pipettiert und auf 600µl RNA-Lysepuffer aufgefüllt und resuspendiert. Der Zellen/Lysepuffer-Mix konnte im Anschluss direkt extrahiert oder bei -80°C gelagert werden. Die restlichen

Zellen wurden zur Asservierung mit 1000µl Einfriermedium in einem Cryoröhrchen bei ebenfalls -80°C gelagert.

Erylysepuffer	Endkonzentration für 1x Puffer
NH <sub>4</sub> CL (53,49 g/mol)	0,155M; 0,829%
KHCO <sub>3</sub> (100,1 g/mol)	0,001M
EDTA (372,24 g/mol)	0,1mM
Aqua dest. (pH 7,29)	

**Tabelle 3:** Zusammensetzung des Erylysepuffers

Abkürzungen: NH<sub>4</sub>CL = Ammoniumchlorid, KHCO<sub>3</sub> = Kaliumhydrogencarbonat, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

### 3.3.2 Automatisierte RNA-Extraktion mittels QIAcube

Standardmäßig erfolgt die RNA-Extraktion automatisiert mit dem QIAcube des Herstellers Qiagen. Zur Extraktion wurde das RNeasy Mini QIAcube Kit (240) gemäß den Herstellervorschriften vorbereitet und verwendet. Zur Vorbereitung musste die vorgelöste Qiagen DNase mit dem RDD-Inkubationspuffer angesetzt werden. Alle Reagenzien wurden im QIAcube nach den Herstellervorschriften im Bottle Rack angeordnet. Die RNA-Extraktion führte der QIAcube entlang eines vorgegebenen Protokolls durch. Hierfür wurde das RNA/QIAamp RNA Blood Mini/Blood Protokoll genutzt. Nach Beendigung des Protokolls konnte das fertige Eluat von 30µl aus dem Rotor Adapter entnommen und auf Eis gelegt werden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Wenn die Extraktion nicht mit dem QIAcube erfolgen konnte, wurde diese manuell mit dem RNEasy Mini Isolation Kit durchgeführt. Für die quantitative PCR (bcrab1+NPM1) wurden 1µl der RNA auf 10µl Aqua dest. verdünnt und zur Konzentrationsmessung herangezogen.

RNeasy Mini QIAcube Kit (240)	Fa. Qiagen, Cat.No. 74116
RNEasy Mini Isolation Kit	Fa. Qiagen, Cat.No. 74104
QIAcube Tip Adapter Ring Replacement Kit	Fa. Qiagen, Cat.No. 1044402
Filter-Tips, 1000µl	Fa. Qiagen, Cat.No. 990352
Rnase-Free Dnase Set (50)	Fa. Qiagen, Cat.No. 79254
RNA-Lysepuffer	40ml RLT Puffer aus Rneasy Mini QIAcube Kit 800µl DTT (2M Stammlösung: 25g ad 81,037ml aqua dest)

**Tabelle 4:** Verwendete Materialien für die RNA-Extraktion

### 3.3.3 Konzentrationsbestimmung der RNA

Mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrometer (PeqLab, Deutschland) konnte in Lösung die Konzentration von Nukleinsäuren gemessen werden. In dieser Studie wurde mit

dieser Methode die RNA-Konzentration bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der Software ND-1000 in der Version 3.8.1. Bevor die Messung startete, wurde ein Leerwert mittels 2µl Aqua dest erstellt. Die photometrische Bestimmung erfolgt bei Messung der Absorption bei 260nm mit einer Verdünnung des 1µl RNA-Alliquots mit 9µl RNase freiem destilliertem Wasser. Zur Bestimmung der Reinheit wurde der Quotient A260/A280 errechnet, welcher bei optimaler Reinheit zwischen 1,5 und 2 liegt. Zudem wurde jede Probe als Doppelwert gemessen, damit der Mittelwert dem tatsächlichen Gehalt an RNA näherliegt.

### 3.3.4 cDNA-Herstellung

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Fa. Qiagen
Mastercycler gradient	Fa. Eppendorf
Ipsogen RT Kit (33)	Fa. Qiagen
Ipsogen NPM1 mutA MutaQuant Kit (24)	Fa. Qiagen

**Table 5:** Materialien zur cDNA-Herstellung und NPM1<sup>mut</sup> A Quantifizierung

Nachdem die Konzentration der RNA gemessen wurde, konnte diese auf eine maximale Konzentration von 0,05µg/µl eingestellt werden. 10µl der Patienten RNA wurde jeweils in ein separates Gefäß pipettiert und für fünf Minuten bei 65°C im Thermoblock inkubiert. Dadurch wird die Sekundärstruktur der RNA aufgeschmolzen und eine Hybridisierung der Primer wird bei Raumtemperatur möglich (137). Im Anschluss wurde zentrifugiert und das Medium für kurze Zeit auf Eis gestellt. Um cDNA (complementary DNA) aus RNA zu synthetisieren, braucht es das Enzym Reverse Transkriptase (RT). Dazu wurde ein RT-Mix aus folgenden Komponenten hergestellt:

Komponenten	cDNA Mastermix 1x
Random-Nonamer (Primer)	5,25µl
5x-RT Puffer	5µl
dNTP	2µl
DTT	1,25µl
Reverse Transkriptase	1µl
Rnase-Inhibitor	0,5µl
<b>Total</b>	<b>15µl</b>

**Table 6:** cDNA-Mastermix Komponenten

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Thermocycler nach einem zyklischen, individuell programmierten Temperaturprotokoll. Dazu wurden die 15µl des RT-Mix zu den

jeweiligen Patienten-RNA-Proben pipettiert, gemischt, zentrifugiert und im Thermoblock nach folgendem Schema inkubiert:

Raumtemperatur	Temperatur: 25°C Zeit: 10min
Reverse Transkription	Temperatur: 50°C Zeit: 60min
Inaktivierung	Temperatur: 85°C Zeit: 5min
Abkühlung	Temperatur: 4°C Zeit: 5min

**Tabelle 7:** Thermoblock-Protokoll zur cDNA-Synthese

Nach Programmende wurden alle Reaktionsgefäße zentrifugiert und entweder kurzfristig auf Eis gelagert oder langfristig bei -20°C eingefroren.

### 3.3.5 Rotor-Gene-Lauf zur NPM1<sup>mutA</sup>-Quantifizierung

Für die die Quantifizierung der NPM1<sup>mutA</sup> wurde das Ipsogen NPM1 mutA MutaQuant Kit verwendet. Im Kit enthalten waren Primer und Sonden die sich über das NPM1-Exon 11 und 12 erstrecken und zum Nachweis der cDNA dienen. Zur Quantifizierung der NPM1-Kopienzahl waren zusätzliche Kontrollprimer und -sonden im Kit. Diese dienen dem Nachweis von Plasmiden, die für das Haushaltsgen Abelson (ABL) und das Zielgen NPM1 spezifisch sind (138). Bevor ein Rotor-Gene-Lauf gestartet werden konnte, mussten zunächst die qPCR Master-Mixe für die NPM1<sup>mutA</sup> und für das ABL angesetzt werden.

Komponenten	PPM-NPM1 <sup>mutA</sup> Mix 1x	PPC-ABL Mix (Kontrolle) 1x
TaqMan Universal PCR MasterMix, 2x	12,5µl	12,5µl
Nuclease-free PCR grade water	6,5µl	6,5µl
Primers and probe mix, 25x	1µl	1µl
Gesamt	<b>20µl</b>	<b>20µl</b>

**Tabelle 8:** Komponenten der qPCR Master-Mixe

PPM-NPM1 mutA = Primers and Probe Mix zur detektion der NPM1 mutA, PPC-ABL = Primers and Probe Mix zur detektion von ABL

Nach dem Ansetzen der 20µl qPCR Master-Mixe konnten diese zusammen mit 5µl cDNA in das entsprechende Reaktionsgefäß pipettiert und gemischt werden. Die Standardkontrollen wurden aus dem Kit aufgetaut, zentrifugiert und in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettiert. Mit jeder Patienten cDNA wurde eine qRT-

PCR sowohl für die NPM1<sup>mutA</sup> als auch für das Haushaltsgen ABL durchgeführt. Im gleichen Lauf wurde zusätzlich eine Standardkurve für den Mutationstyp (M1-M5) und eine für das Haushaltsgen (C1-C3), sowie ein Kontrolltemplate mit H<sub>2</sub>O mitgeführt. Alle Proben wurden als Duplikat nach einem definierten Belegungsschema im Kühlblock vorbereitet (siehe Abbildung 7). Danach konnten die Reaktionsgefäße entsprechend den Empfehlungen des Herstellers in dem Rotor-Gene Q Thermocycler eingesetzt werden. Die Quantifizierung erfolgte mit folgendem Temperaturprofil:

Analysemodus	Quantifizierung
Hold 1	Temperatur: 50°C Zeit: 2min
Hold 2	Temperatur: 95°C Zeit: 10min
Zykleneinstellungen der RQ-PCR („Cycling“)	50 Zyklen: Denaturierung: 95°C für 15sek Annealing und Elongation: 63°C für 60sek mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz

**Tabelle 9:** Temperaturprofil des Rotor-Gene Q Thermocycler zur NPM1<sup>mutA</sup> Quantifizierung

1 H2O	9 Probe 4 NPM1 mutA Standard M4 10 <sup>5</sup>	17 Probe 1	25 Probe 5	33 H2O	41 Probe 1	49 Probe 5	57 Probe 9		
2 H2O	10 Probe 4 NPM1 mutA Standard M4 10 <sup>5</sup>	18 Probe 1	26 Probe 5	34 H2O	42 Probe 1	50 Probe 5	58 Probe 9		
3 Probe 1 NPM1 mutA Standard M1 10 <sup>1</sup>	11 Probe 5 NPM1 mutA Standard M5 10 <sup>6</sup>	19 Probe 2	27 Probe 6	35 Probe 1 ABL Standard C1 10 <sup>3</sup>	43 Probe 2	51 Probe 6	59 Probe 10		
4 Probe 1 NPM1 mutA Standard M1 10 <sup>1</sup>	12 Probe 5 NPM1 mutA Standard M5 10 <sup>6</sup>	20 Probe 2	28 Probe 6	36 Probe 1 ABL Standard C1 10 <sup>3</sup>	44 Probe 2	52 Probe 6	60 Probe 10		
5 Probe 2 NPM1 mutA Standard M2 10 <sup>2</sup>	13	21 Probe 3	29 Probe 7	37 Probe 2 ABL Standard C2 10 <sup>4</sup>	45 Probe 3	53 Probe 7	61 Probe 9		
6 Probe 2 NPM1 mutA Standard M2 10 <sup>2</sup>	14	22 Probe 3	30 Probe 7	38 Probe 2 ABL Standard C2 10 <sup>4</sup>	46 Probe 3	54 Probe 7	62 Probe 9		
7 Probe 3 NPM1 mutA Standard M3 10 <sup>3</sup>	15	23 Probe 4	31 Probe 8	39 Probe 3 ABL Standard C3 10 <sup>5</sup>	47 Probe 4	55 Probe 8	63 Probe 10		
8 Probe 3 NPM1 mutA Standard M3 10 <sup>3</sup>	16	24 Probe 4	32 Probe 8	40 Probe 3 ABL Standard C3 10 <sup>5</sup>	48 Probe 4	56 Probe 8	64 Probe 10		

PPM-NPM1 mutA  
20µl  
M1-M5 mutA gene Standards

PPC-ABL  
20µl  
C1-C3 Control gene Standards

**Abbildung 7:** Pipettiervorlage für die qRT-PCR mit einem Rotor-Gene mit 72-tube rotor

Sie dient einem Durchlauf mit 10 Patientenproben von Leukämiepatienten mit NPM1 Typ A Mutation. Abkürzungen: H<sub>2</sub>O = Wasserkontrolle, M1-M5 (weiß) = Standardkontrollen für die NPM1 mutA, C1-C3 (grau) = Standardkontrollen für ABL; die 10er Potenzen beziehen sich auf die Konzentration der NPM1<sup>mut</sup>- bzw. der ABL-Plasmidverdünnungsreihen

### 3.3.6 Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt einen hochsensitiven und spezifischen in-vitro-Nachweis von DNA. Sie unterteilt sich in drei sich wiederholende Schritte: Erstens: Denaturierung, Zweitens: Primeranlagerung (Annealing) und Drittens:

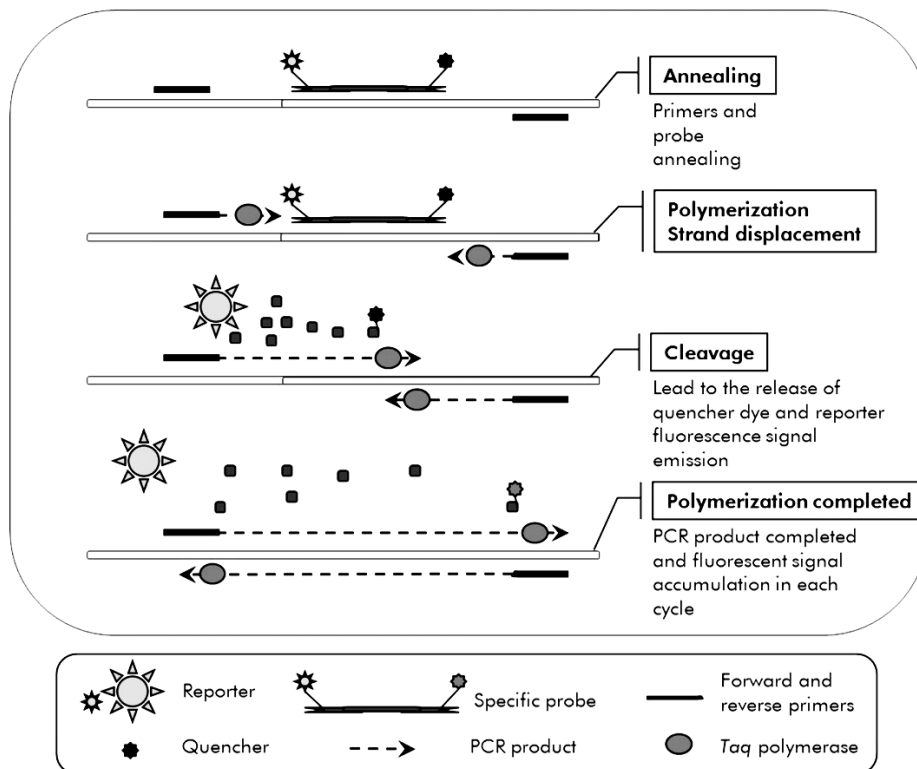
Verlängerung (Elongation). Ein PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung. Dabei wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 90-95°C voneinander getrennt und liegt als zwei einzelsträngige DNA-Moleküle vor. An diese können sich jetzt bei etwa 55-60°C zwei synthetische, gegenläufig orientierte Oligonukleotide (Primer) an die komplementäre Sequenz anlagern. Die Primer selbst dienen der DNA-Polymerase als Startpunkt. Die DNA-Polymerase synthetisiert die DNA vom 5'-Ende durch Anbau von Nucleotiden zum 3'-Ende. Die Temperatur für die meisten rekombinanten, hitzestabilen Polymerasen liegt bei 72°C (139). Hier wird eine Polymerase verwendet, die ihre Wirkung bei 60°C entfaltet. Daher sind Annealing und Extension ein gemeinsamer Temperaturschritt (sogenanntes „2-Schritt“-statt „3-Schritt“-PCR-Protokoll). Dieser Zyklus wird 50-mal wiederholt und führt so zu einer exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz, welche durch die Auswahl der Primer definiert wird. Analog zur konventionellen PCR dient die qRT-PCR der Vervielfältigung von Nukleotidsequenzen und bietet zusätzlich die Möglichkeit, durch die hier verwendete Methode der qPCR-Doppelfarbstoff-Oligonukleotidhydrolyse<sup>1</sup>, einer Quantifizierung in Echtzeit. Die Quantifizierung erfolgt mithilfe von Fluoreszenz-Messungen während jedes Annealing-Schritts der PCR. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Die verwendete Patienten-RNA wird revers transkribiert und die erzeugte cDNA unter Verwendung eines Paares spezifischer Primer und einer spezifischen internen Doppelfarbstoffsonde amplifiziert (138). Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, das am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (FAM=6-carboxy-fluoreszein), dem sog. Reporter und am 3'-Ende einen Rhodaminfarbstoff (TAMRA=6-carboxy-tetramethyl-rhodamin), dem sog. Quencher trägt. Das 3'-Ende ist zusätzlich mit einem Phosphatrest modifiziert, um eine Extension während der PCR zu verhindern. Durch die Nähe des Quencher zum Reporter ist es dem Reporter nicht möglich Fluoreszenz abzustrahlen, da dies durch einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)<sup>2</sup> unterdrückt wird. Während der PCR lagern sich zunächst die Sonde und dann die Primer an den Matrizenstrang an. In der anschließenden Extensionsphase trifft die *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA-Polymerase aufgrund ihrer 5'→3'-Exonukleaseaktivität auf die Sonde und beginnt diese vom Strang zu lösen und zu hydrolysieren. Dadurch liegt der Reporter und der Quencher räumlich getrennt voneinander vor. Dies führt zu einer Zunahme der Fluoreszenz vom FAM und eine Abnahme der Fluoreszenz vom TAMRA (siehe Abbildung 8). Wird jetzt

---

<sup>1</sup> In der englischsprachigen Fachliteratur: qPCR double-dye oligonucleotide hydrolysis principle

<sup>2</sup> In der englischen Fachliteratur: Fluorescence resonance energy transfer

der Reporter durch einen Laser mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt, kann dieser Fluoreszenz emittieren. Das Fluoreszenz Signal nimmt proportional zum gebildeten Amplifikat zu. Diese Messung findet in jedem Zyklus statt (139, 140).



**Abbildung 8:** Reaktionsprinzip der qRT-PCR (138)

Diese Abbildung stammt aus dem Handbuch des Qiagen ipsogen® NPM1 mutA MutaQuant® und beschreibt das Reaktionsprinzip der qRT-PCR. Die gesamte RNA wird revers transkribiert und die erzeugte cDNA durch die PCR unter Verwendung eines Paares spezifischer Primer und einer spezifischen Dopplerfarbstoffsonde (FAM-TAMRA) amplifiziert. In jedem Annealing-Schritt binden die Primer und die Sonde an das Applikon. Die Taq-DNA-Polymerase, für die der Primer als Startpunkt dient, baut beginnend am 5'-Ende die Sonde durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität ab. Dadurch kommt es zur räumlichen Trennung von Quencher und Reporter. Diese Trennung führt zur Zunahme der Fluoreszenz von FAM und der Abnahme der Fluoreszenz von TAMRA (138).

### 3.3.7 Relative Quantifizierung

Die PCR kann in eine Startphase, in der die DNA-Menge begrenzt vorliegt und in eine Plateauphase, in der die DNA-Menge so massiv ansteigt, dass immer häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren und die PCR gehemmt wird, eingeteilt werden. Der Zeitraum, in dem die ideale Bedingung für die Verdopplung der Zielsequenz herrscht, nennt sich exponentielle Phase. Dieser Zeitraum befindet sich zwischen der Startphase und der Plateauphase und weist kaum miteinander hybridisierende Produktfragmente auf. Zur Quantifizierung wird der Beginn der exponentiellen Phase genutzt. Schafft es das Fluoreszenz-Signal in der exponentiellen Phase signifikant über das im Hintergrund herrschende Fluoreszenz-Signal

anzusteigen, wird dieser Punkt als  $C_t$ -Wert (Threshold Cycle, Schwellenwert-Zyklus) bezeichnet und ermittelt (140).

Um die relative Genexpression letztlich zu berechnen, gibt es verschiedene Ansätze. Allen Ansätzen gemein ist der Versuch, eine möglichst geringe Schwankungsbreite im PCR-Verfahren zu erzielen. Dafür bedarf es zum einen einer optimalen PCR-Effizienz, da ein großer Unterschied in der Berechnung schon bei geringer Schwankung in der Effizienz gezeigt werden kann. Eine optimale Effizienz liegt bei einem Wert von zwei vor und bedeutet, dass sich bei jedem PCR-Zyklus die Anzahl der Zielsequenzen verdoppelt. In der Praxis werden Werte zwischen 1,7-1,9 erreicht. Zum anderen ist die Auswahl des richtigen Referenzgens (Haushaltsgens) wesentlich (141).

### **3.3.8 Auswertung der Rohdaten**

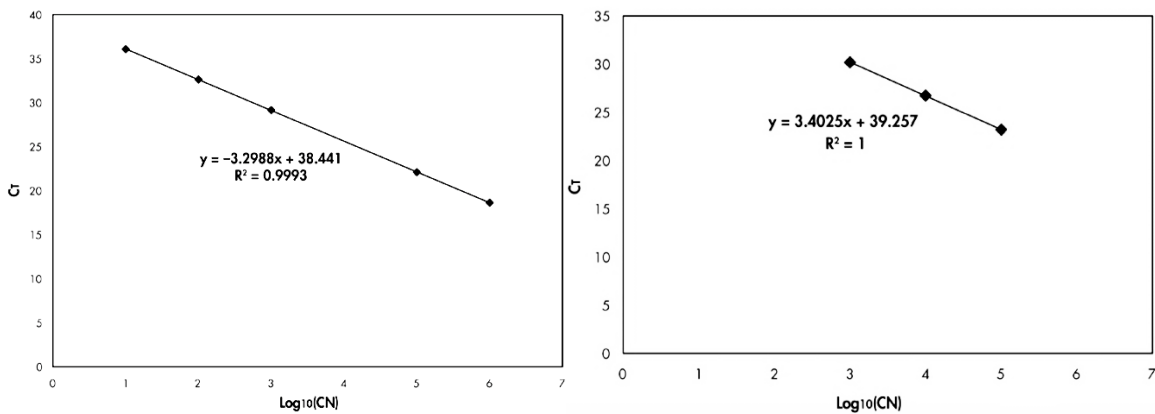
#### *3.3.8.1 TaqMan-Amplifikations-Kurve*

Die gewonnenen  $C_t$ -Rohdaten wurden durch die TaqMan-Technologie detektiert (139) und nach dem Ende der PCR mit der Rotor-Gene Q Series Software (Virtual Mode) in der Version 2.3.1 dargestellt. Bevor die Rohdaten in einer TaqMan-Amplifikations-Kurve abgebildet werden konnten, wurde der Schwellenwert (Threshold) auf 0,03 eingestellt und eine Korrektur der Steigung („Slope Correction“) durchgeführt. Die Amplifikations-Kurve basiert auf Plasmiden. Es wurden drei Plasmid-Standardverdünnungen für die Kontrollen und fünf Plasmid-Standardverdünnungen für das mutierte Gen mit einer bekannten Anzahl an Kopien verwendet.

Die Analyse erfolgte durch die Überführung der gewonnenen  $C_t$ -Werte in eine vom Hersteller erstellten Excel-Auswertungstabelle.

#### *3.3.8.2 Standardkurven und Berechnung der normalisierten Kopienzahl*

Nachdem die  $C_t$ -Werte in die Auswertungstabelle implementiert wurden, konnten Mittelwerte und Standardkurven, sowohl für NPM1<sup>mut</sup> und ABL, erstellt werden. Anschließend erfolgte eine Berechnung der normalisierten Kopienzahl (NCN). Für jedes Gen (Kontrollgen und mutiertes Gen) wurden die  $C_t$ -Rohdaten gemäß ihrer logarithmischen Kopienzahl aufgetragen (3,4 und 5 für C1-C3; 1,2,3,5 und 6 für M1-M5).



**Abbildung 9:** Standardkurven für NPM1<sup>mut</sup> (links) und ABL (rechts)(138)

Eine lineare Regressionskurve wird durch  $y = ax + b$  berechnet. Dabei ist  $a$  die Steigung der Geraden und  $b$  der  $Y$ -intercept, d.h. der Schnittpunkt der Geraden auf der  $y$ -Ache unter Verwendung vorhandener  $C_t$ - und  $CN$ -Werte. In der Grafik angegeben sind die Gleichung und der Korrelationskoeffizient  $R^2$ .

Der Standardkurvenvergleich des Kontrollgens wurde verwendet, um die  $C_t$ -Rohwerte für die PPC-Patientenproben in Kontrollgen-Kopienzahlen ( $ABL_{CN}$ ) umzuwandeln. Der Standardkurvenvergleich des mutierten Gens wurde verwendet, um die  $C_t$ -Rohwerte für die PPM-Patientenproben in mutierte Genkopienzahlen ( $NPM1\ mutA_{CN}$ ) umzuwandeln. Die Ratio dieser  $CN$ -Werte ergibt die  $NCN$ :

$$NCN = \frac{NPM1\ mutA_{CN}}{ABL_{CN}} \times 100$$

### 3.3.8.3 Qualitätskriterien

Ein Lauf wurde erst dann ausgewertet, wenn folgende Qualitätskriterien erfüllt waren:

- Eine Steigung der Standardkurven zwischen -3,0 und -3,9
- Ein Korrelationskoeffizient  $R^2 > 0,95$
- Ein  $ABL_{CN}$ -Wert von Patientenproben  $> 4246,2$  Kopien
- $H_2O$ -Kontrolle  $< 1$  Kopie
- Eine hoch positive RNA-Kontrolle muss detektiert werden

### 3.3.9 Haushaltsgen

Die Verwendung eines Kontrollgens in der qRT-PCR ist aus verschiedenen Gründen wichtig. Es ermöglicht die Beurteilung der RNA-Menge und Qualität. Gleichzeitig können Schwankungen in diesen Parametern normalisiert und Proben mit schlechter Qualität aussortiert werden und die Berechnung der Sensitivität jeder Messung kann erfolgen. Dies wird erreicht durch die parallele Amplifikation von Zielgen und Kontrollgen. Ein wesentliches Merkmal, um als Kontrollgen geeignet zu sein, ist die

stabile Expression in allen kernhaltigen Zellen. Zudem sollte es durch experimentelle Behandlungen nicht beeinflusst werden. Beillard et al. und mehrere Forschungsgruppen untersuchten im Europe Against Cancer Program mehrere Kontrollgene auf ihre Eignung. Drei Gene ABL, Beta-2-microglobulin (B2M) und Beta-glucuronidase (GUS) wurden als geeignet identifiziert. Sie weisen keine Pseudogene auf und sind in ihrem Grad der Expression sehr stabil. Das ABL-Gen auf Chromosom 9q34 kann verlässlich für die Diagnose und den MRD-Nachweis bei Patienten mit AML genutzt werden und weist entscheidende Vorteile auf. Zum einen unterscheidet sich die ABL-Genexpression nicht zwischen normalen und leukämischen Proben und zum anderen ist die Korrelation zwischen ABL-Genexpression und Zielgenexpression unter den oben genannten Genen am höchsten (142).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv

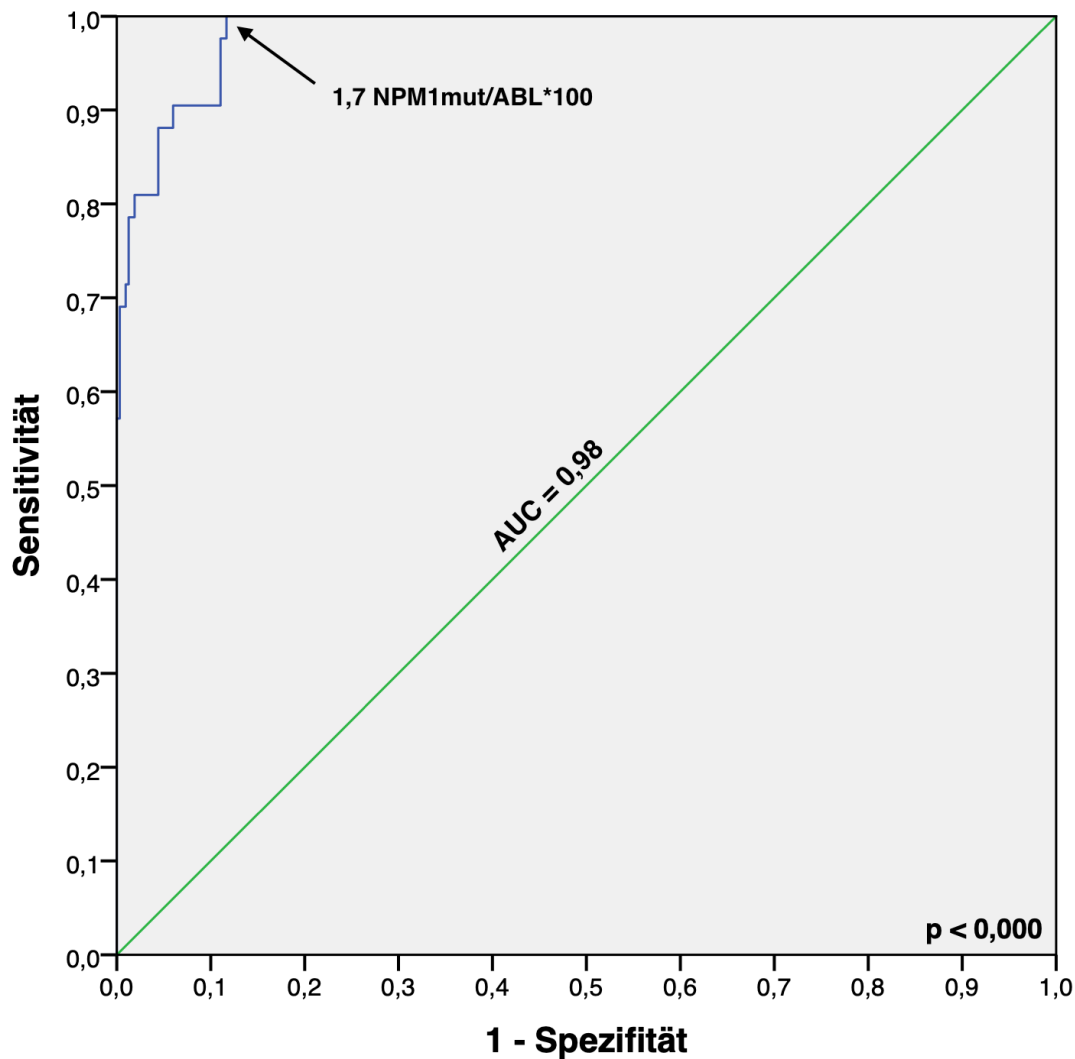
Das Gesamtkollektiv umfasst 88 Patienten mit NPM1-mutierter AML. Das Alter liegt im Median bei 55 Jahren, mit einer Breite zwischen 17 und 81 Jahren. Mit 96% ist die NPM1<sup>mut</sup> vom Typ A der häufigste Mutationstyp. Zusätzlich haben 45,5% eine FLT3-ITD Mutation. Laut der ELN-Klassifikation haben 52,3% ein günstiges, 44,3% ein intermediäres und 3,4% der Patienten ein ungünstiges Risiko. Nach der Induktionstherapie haben 75 Patienten die komplette hämatologische Remission erreicht und 13 Patienten bleiben nach Induktionstherapie refraktär. Eine alloHSCT haben insgesamt 63 (71,6%) Patienten erhalten, wovon 7 Patienten refraktär in die Transplantation gegangen sind. Nach Erreichen der CR haben 41 Patienten (47%) ein Rezidiv entwickelt, bei 12 Patienten zeigte sich nach erneuter Therapie ein Zweitrezidiv. Die mediane Beobachtungszeit nach Beendigung der Therapie (Follow-Up) liegt bei 30 Monaten (Spannweite: 1-169 Monate).

Gesamtkollektiv			
Alter (Jahre)	55 (17-81)	Extramedulläre Manifestation	
Geschlecht		Ja	7 (9,6%)
männlich	45 (51%)	Nein	66 (90,4%)
weiblich	43 (49%)	Gesamt	73 (100%)
Gesamt	88 (100%)		
		ECOG-Status bei Diagnose	
NPM1 <sup>mut</sup> -Typ		0	39 (56,5%)
A	85 (96%)	1	26 (37,7%)
B	1 (1%)	2	2 (2,3%)
S	1 (1%)	3	1 (1,1%)
YQ	1 (1%)	4	1 (1,1%)
Gesamt	88 (100%)	Gesamt	69 (100%)
		Prognosefaktoren bei Diagnose	
FLT3-Status		Hb (g/dl)	9,1 (3,5-14,2)
ITD	40 (45,5%)	Leukozyten (/nl)	26 (1,2-469)
negativ	48 (54,5%)	Thrombozyten (/nl)	81 (10-412)
Gesamt	88 (100%)	Blasten (%) im KM	25 (1-94)
		LDH (U/l)	463 (163-5246)
ELN-Risikoklassifikation			
günstig	46 (52,3%)		
intermediär	38 (43,2%)		
ungünstig	4 (4,5%)		
Gesamt	88 (100%)		

**Tabelle 10:** Patientenkollektiv

Die Tabelle zeigt das Gesamtkollektiv mit folgenden Parametern: Alter, Geschlecht, NPM1<sup>mut</sup>-Typ, FLT3-Status, ELN-Risikoklassifikation, Extramedulläre Manifestation und ECOG-Status. Zusätzlich wird der Hb, die Leukozytenzahl, die Thrombozytenzahl, der Blastenanteil und die LDH bei Diagnose erhoben.

## 4.2 Grenzwertanalyse zur Definition eines molekularen Rezidivs



**Abbildung 10:** ROC-Kurve des Gesamtkollektivs

Für die ROC-Kurve werden die MRD-Messwerte aus dem KM des Gesamtkollektivs  $n=86$  herangezogen. Der definierte Grenzwert ist mit einem Pfeil markiert und liegt bei  $1,7 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$ . Dieser Punkt hat auf der Kurve eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 88,3%. Die  $AUC_{\text{ROC}}$  (area under the curve) liegt bei 0,98 (95% KI: 0,97 – 1; Signifikanz  $p < 0,000$ ). Youden-Index des definierten Grenzwertes 0,88.

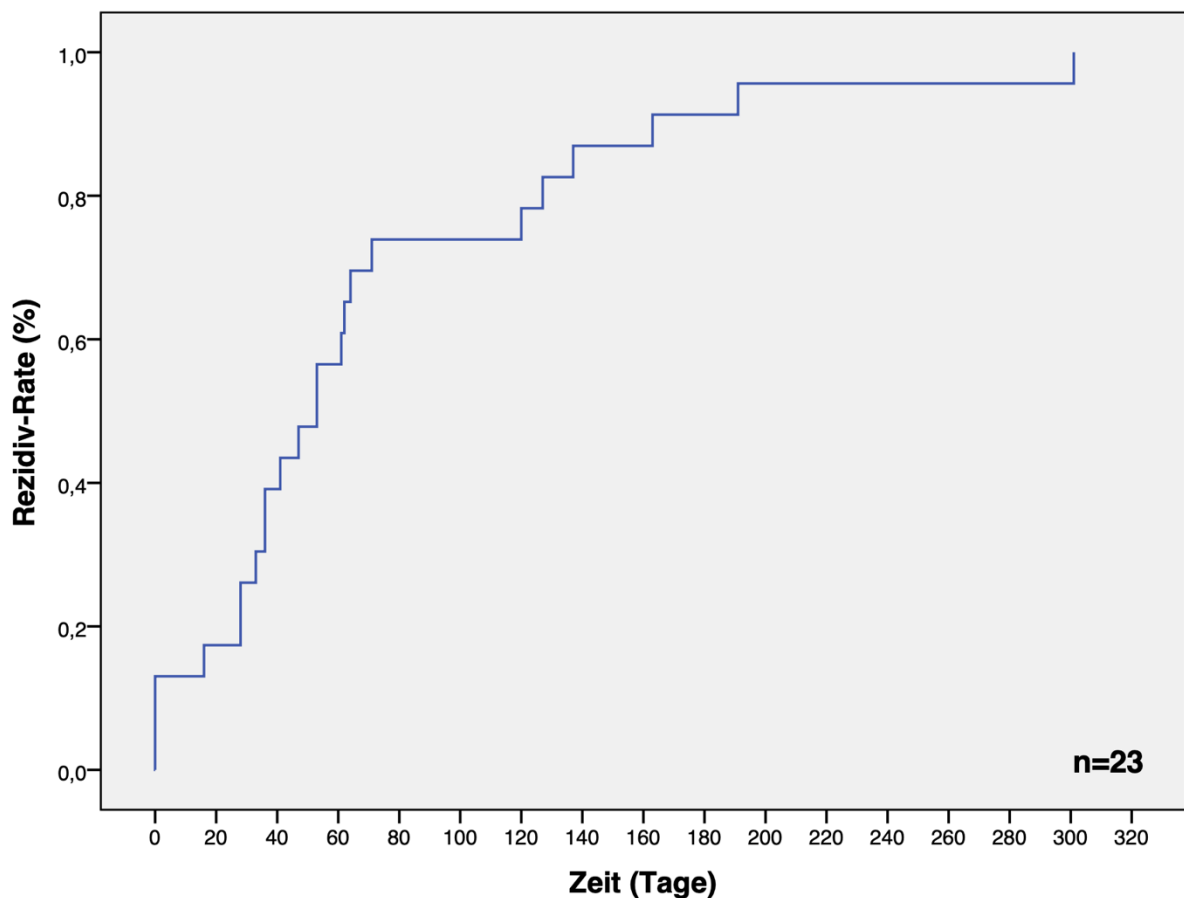
In einem ersten Schritt ist das Kollektiv aller Patienten angeschaut worden, die bis zum Ende der Erhebung im KM oder im PB kein morphologisches Rezidiv nach CR entwickelt haben. Dieses Rezidiv-freie-Kollektiv ( $n=42$ ) umfasst 361 Messungen. Fünf Patienten (Patienten: 11, 15, 16, 37 und 48) werden aus der Beobachtung ausgeschlossen. Patient 15, 16 und 48 werden mit MRD-Werten von 33,5, 52,5 und 2,5  $\text{NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$  als molekulares Rezidiv gewertet ohne Nachweis eines morphologischen Rezidivs. Patient 11 zeigt mit MRD-Werten von 8,8 und 87,4  $\text{NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$  zwei aufeinanderfolgende Grenzwertüberschreitungen. In der

Folgemessung ist der Patient in die molekulare Remission übergegangen. Pat 37 ist einmalig auf 3,6 NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100 angestiegen, ging ebenfalls in der Folgemessung wieder in die Remission. Aus dem übrigen Kollektiv (n=37) kann kein Patient eine MRD-Ratio von mehr als 1,16 NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100 aufweisen.

In einem zweiten Schritt werden für alle möglichen Grenzwerte in einer ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristic) die richtig-positiv-klassifizierten Fälle (Sensitivität) gegen die falsch-positiv-klassifizierten Fälle (1-Spezifität) aufgetragen, um dadurch ein Maß für die Güte des Messverfahrens zu erhalten. Aus dieser Analyse werden zwei Patienten (28 und 67) ausgeschlossen, da diese ohne MRD-Anstieg ein hämatologisches Rezidiv entwickelten. Somit bleibt für die Analyse ein Gesamtkollektiv von 86 Patienten. Bei den verarbeiteten Fällen sind 42 positive (morphologisches Rezidiv) und 317 negative (komplette morphologische Remission) KM-Messungen eingegangen. Die Güte des diagnostischen Tests kann mit einer AUC<sub>ROC</sub> (area under the curve) von 0,98 (95% CI: 0,97 – 1; Signifikanz p<0,000) angegeben werden. Betrachtet man die Einzelvariablen auf der Kurve, zeigt sich eine stabile Sensitivität von 100% und eine Zunahme der Spezifität auf 88,3% im Bereich von 0-1,66 NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100. In diesen Bereich fällt auch der zuvor beobachtete Höchstwert von 1,16 NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100 und zeigt sich auf der ROC-Kurve bei einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 87,7%. Unter Berücksichtigung des Youden-Index, definieren wir einen Grenzwert von 1,7 NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100 (Sensitivität 100%, Spezifität 88,3%, Youden-Index = 0,88) (siehe Abbildung 10).

## 4.3 Zeitanalyse zwischen MRD-Grenzwert und morphologischem Rezidiv

### 4.3.1 Zeitintervall zwischen MRD-Grenzwert und morphologischem Rezidiv

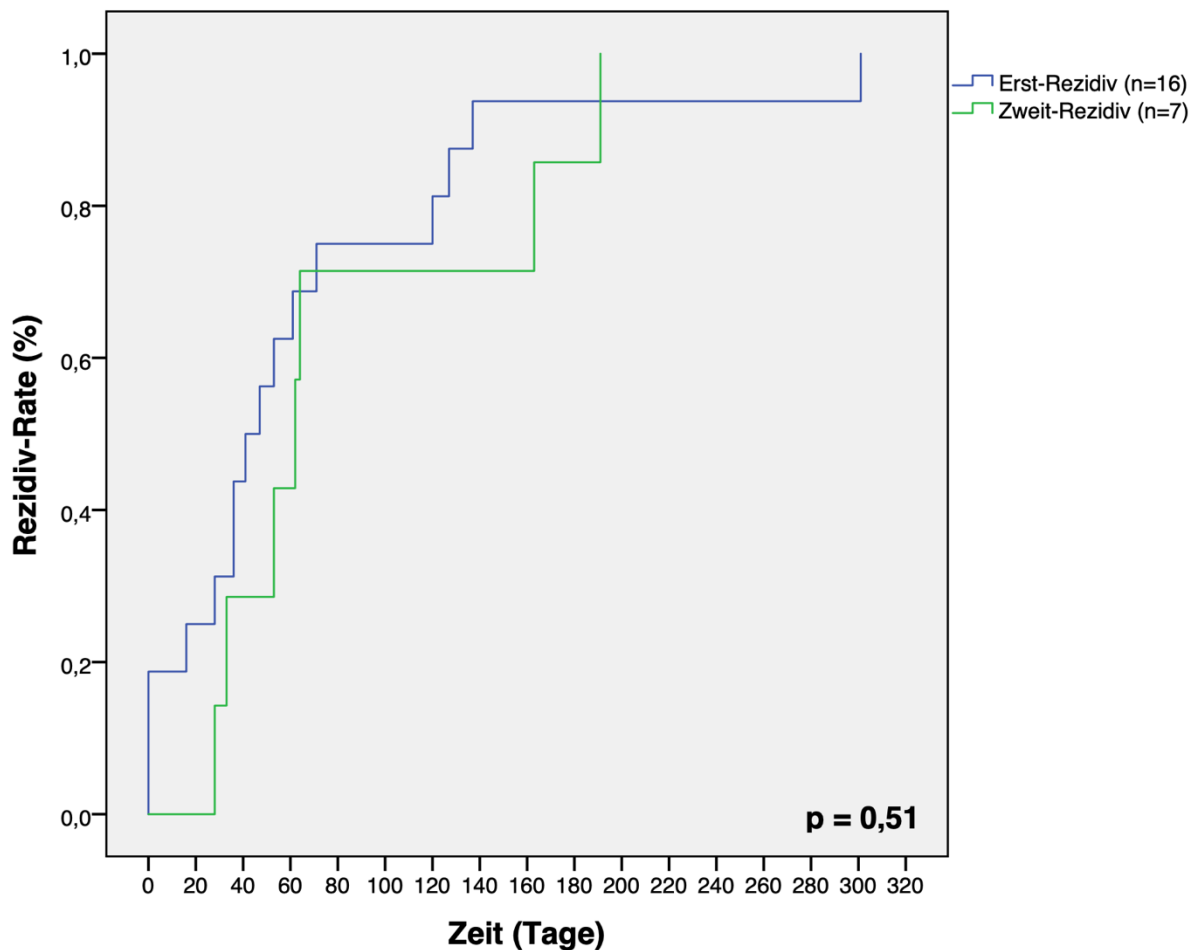


**Abbildung 11:** Zeitintervall zwischen MRD-Grenzwert und morphologischem Rezidiv bei n=23 Patienten

Die Grafik zeigt die Zeitdauer während der Nachbeobachtungszeit für Erst- und Zweitrezidive zwischen erstmaligem Überschreiten des molekularen Grenzwertes von  $1,7 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} * 100$  und dem Erreichen des morphologischen Rezidivs. Im Median liegt diese bei 53 Tagen.

Nach Erreichen der kompletten Remission haben 41 Patienten ein molekulares Rezidiv entwickelt. Bei 23 Patienten kann die Zeitspanne zwischen erstmaligem Überschreiten des molekularen Grenzwertes von  $1,7 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} * 100$  und dem Erreichen des morphologischen Rezidivs berechnet werden. Bei 16 Patienten sind keine ausreichenden Verlaufsdaten der MRD-Messwerte vorhanden und zwei Patienten (Patient 28 und 67) haben den molekularen Grenzwert bis zum Rezidiv nicht überschritten. Die mediane Zeit ab überschreiten des Grenzwertes liegt bei 53 Tagen. Die Spannweite liegt zwischen 0 und 300 Tagen (siehe Abbildung 11). Die mediane Nachbeobachtungszeit nach CR liegt bei 22 Monaten (Spannweite: 5-73 Monate; n=23). Drei Patienten haben den Grenzwert erst zum Zeitpunkt des Rezidivs überschritten.

#### 4.3.2 Vergleich des Zeitintervalls bei Erst- und Zweitrezidiven zwischen MRD-Grenzwert und morphologischem Rezidiv

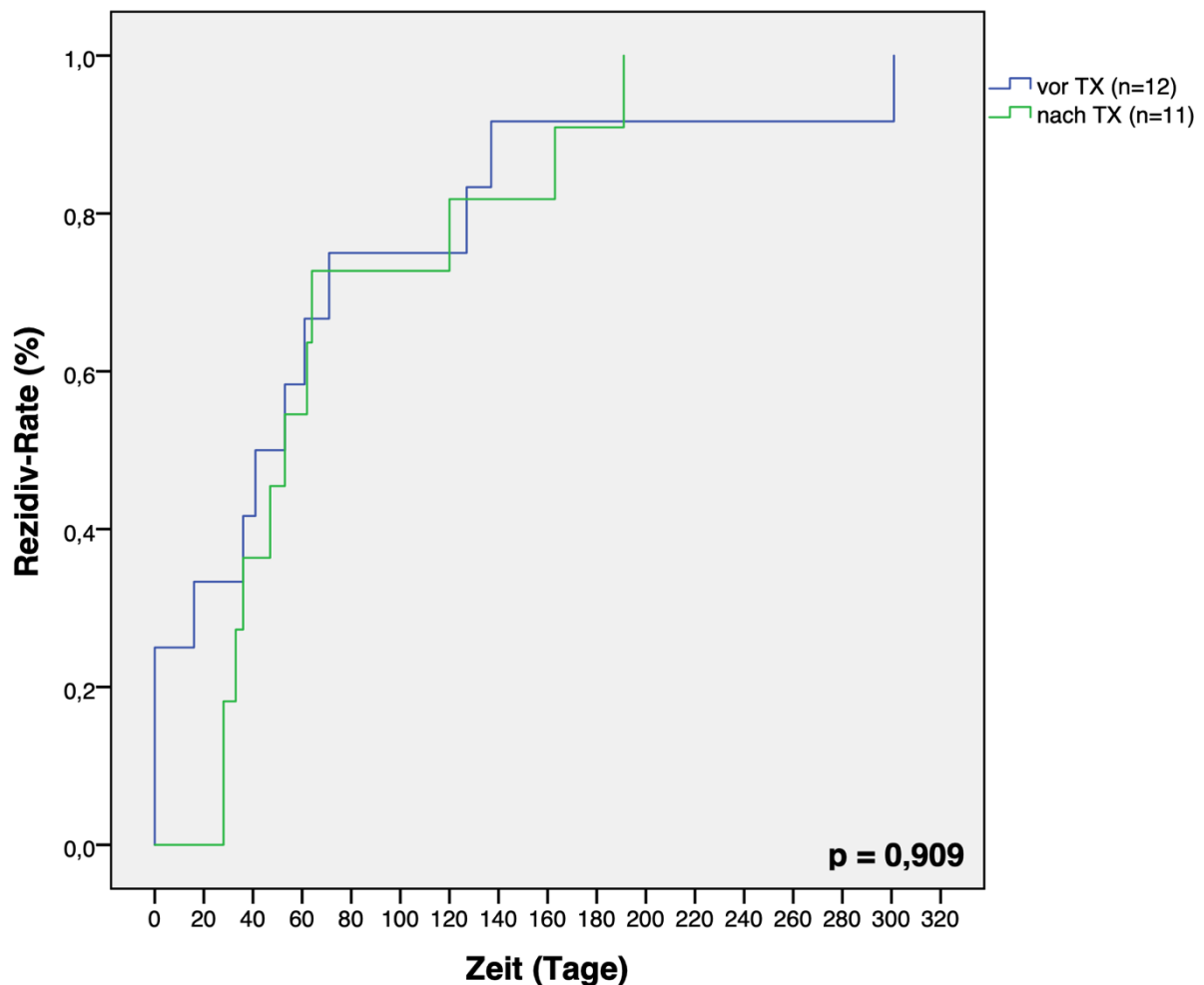


**Abbildung 12:** Vergleich des Zeitintervalls zwischen Erst- und Zweitrezidiven während der Nachbeobachtungszeit bei n=23 Patienten

Die Grafik zeigt die Zeitintervalle zwischen erstmaligem Überschreiten des molekularen Grenzwerts von 1,7  $NPM1^{mut}/ABL*100$  und dem Erreichen des morphologischen Rezidivs bei Erst- und Zweitrezidiven. Median für Erstrezidive (blau, n=16) 41 Tage. Median für Zweitrezidive (grün, n=7) 62 Tage. Das Signifikanzniveau liegt bei  $p=0,51$ .

Im Vergleich des Zeitintervalls zwischen Erst- und Zweitrezidiv werden 23 Patienten beobachtet. Analysiert wird das Zeitintervall zwischen erstmaligem Überschreiten des molekularen Grenzwertes von 1,7  $NPM1^{mut}/ABL*100$  und dem Erreichen des morphologischen Rezidivs. Die mediane Zeit für die Erstrezidive (n=16) liegt bei 41 Tagen (CI 95%: 29,8 bis 104,4). Die Spannweite liegt zwischen 0 und 300 Tagen. Die mediane Zeit für die Zweitrezidive (n=7) liegt bei 62 Tagen (CI 95%: 36,8 bis 132,9). Die Spannweite liegt zwischen 28 und 191 Tagen. Die Ergebnisse der beiden Gruppen zeigen, dass sich die Verteilung im Log-Rank-Test nicht signifikant voneinander unterscheiden,  $p=0,51$  (siehe Abbildung 12).

### 4.3.3 Vergleich des Zeitintervalls vor und nach Transplantation zwischen MRD-Grenzwert und morphologischem Rezidiv



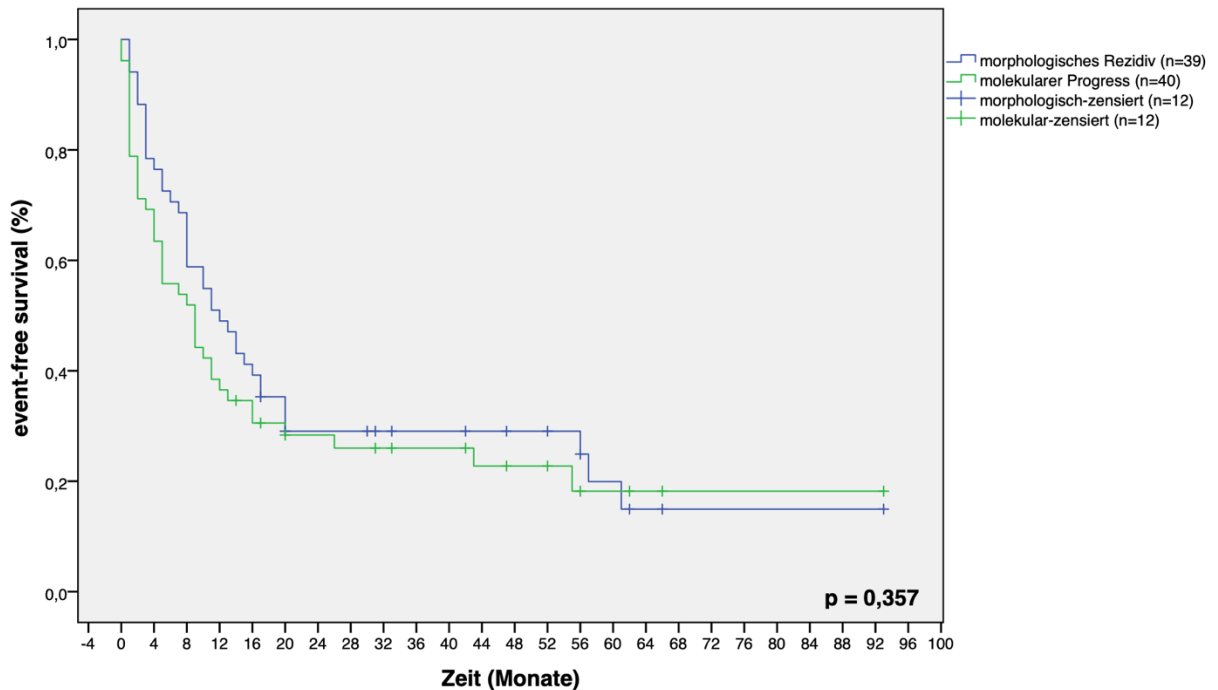
**Abbildung 13:** Vergleich des Zeitintervalls vor und nach Transplantation während der Nachbeobachtungszeit bei n=23 Patienten

Die Grafik zeigt die Zeitintervalle zwischen erstmaligem Überschreiten des molekularen Grenzwertes von 1,7  $NPM1^{mut}/ABL * 100$  und dem Erreichen des morphologischen Rezidivs vor und nach Transplantation. Mediane Zeit für Rezidive vor Transplantation (blau, n=12) 41 Tage. Mediane Zeit für Rezidive nach Transplantation (grün, n=11) 53 Tage. Das Signifikanzniveau liegt bei  $p=0,909$ .

Im Vergleich des Zeitintervalls vor und nach Transplantation werden 23 Patienten beobachtet. Analysiert werden die Zeitintervalle zwischen erstmaligem Überschreiten des molekularen Grenzwertes von 1,7  $NPM1^{mut}/ABL * 100$  und dem Erreichen des morphologischen Rezidivs. Das mediane Zeitintervall vor Transplantation (n=12) liegt bei 41 Tagen (CI 95%: 21,7 bis 118,8). Die Spannweite liegt zwischen 0 und 300 Tagen. Das mediane Zeitintervall nach Transplantation (n=11) liegt bei 53 Tagen (CI 95%: 41,3 bis 108,7). Die Spannweite liegt zwischen 28 und 191 Tagen. Die

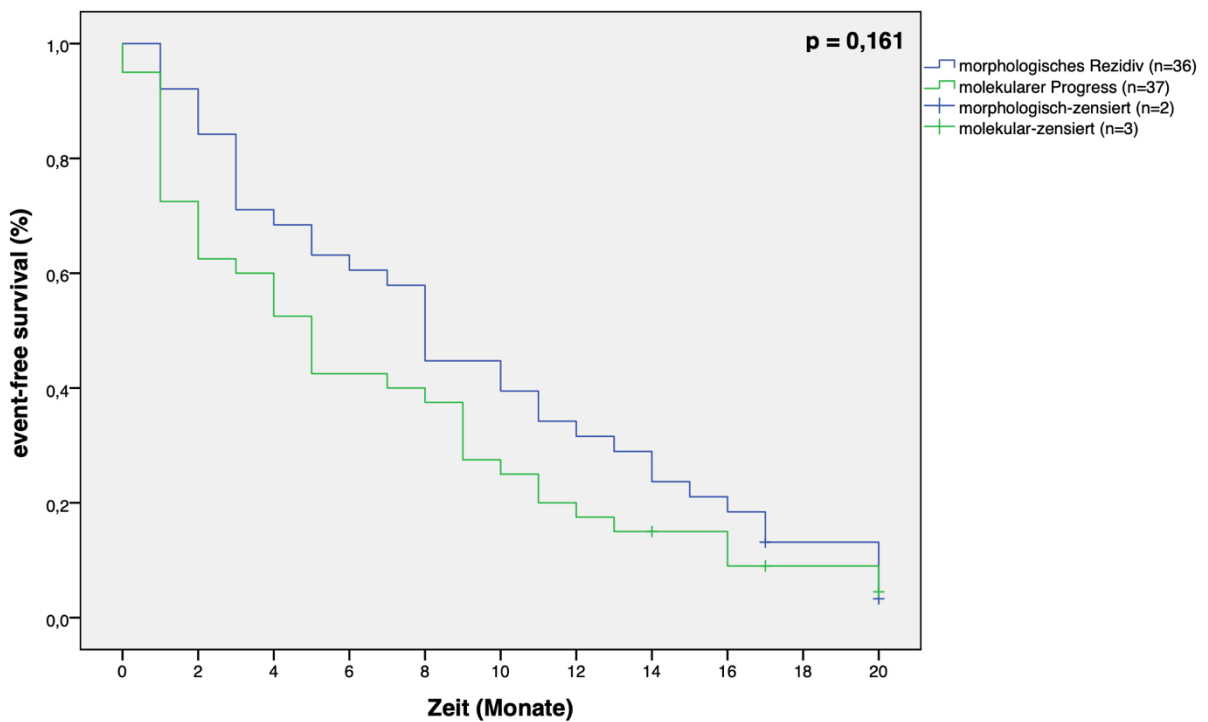
Ergebnisse der beiden Gruppen zeigen, dass sich die Verteilung im Log-Rank-Test nicht signifikant voneinander unterscheiden,  $p=0,909$  (siehe Abbildung 13).

#### 4.4 Vergleich des Ereignis-freien Überlebens zwischen molekularer Progression und morphologischem Rezidiv



**Abbildung 14:** Vergleich des EFS zwischen molekularem Progress und morphologischem Rezidiv über die Gesamtzeit

Die Grafik zeigt den Vergleich des EFS zwischen dem molekularen Progress (grün,  $n=40$ ) und dem morphologischen Rezidiv (blau,  $n=39$ ) über die gesamte Nachbeobachtungszeit von 93 Monate. Signifikanzniveau liegt bei  $p=0,357$ .

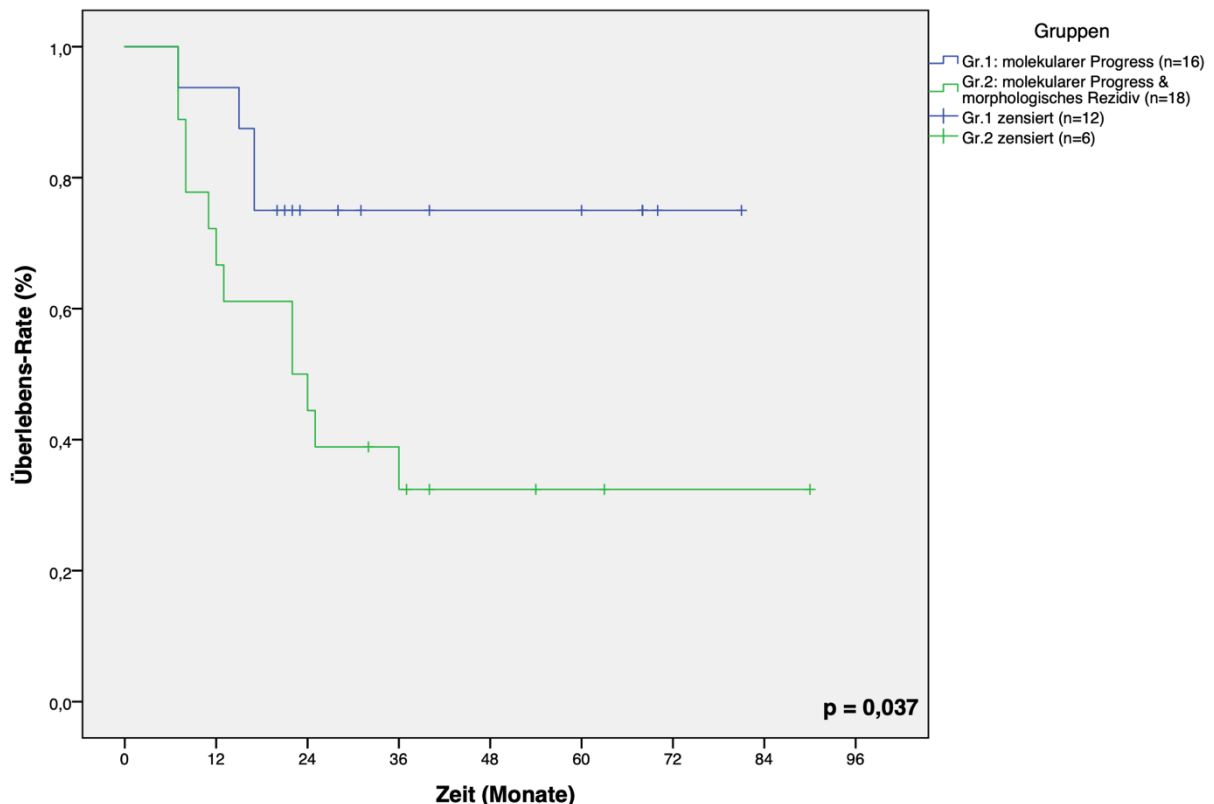


**Abbildung 15:** Vergleich des EFS zwischen molekularem Progress und morphologischem Rezidiv innerhalb der ersten zwei Jahre

Die Grafik zeigt den Vergleich des EFS zwischen dem molekularen Progress (grün, n=37) und dem morphologischen Rezidiv (blau, n=36) innerhalb der ersten zwei Jahre der Nachbeobachtungszeit. Signifikanzniveau liegt bei  $p=0,161$ .

Das Ereignis-freie Überleben (EFS) für die Gesamte Nachbeobachtungszeit von 93 Monaten zeigt sich beim morphologischen Rezidiv im Median bei 12 Monate (n=39; 95% CI: 6,8 bis 17,2 Monate) und für den molekularen Progress bei 9 Monate (n=40; 95% CI: 4,3 bis 13,7 Monate). Der molekulare Progress tritt somit im Median 3 Monate vor dem morphologischen Rezidiv ein. Das Signifikanzniveau liegt im Log Rank Test bei  $p=0,357$  (siehe Abbildung 14). In den ersten zwei Jahren liegt das EFS für das morphologische Rezidiv im Median bei 8 Monate (n=36; 95% CI: 6,8 bis 9,2 Monate) und für den molekularen Progress bei 5 Monate (n=37; 95% CI: 3,2 bis 6,8 Monate). Die Differenz zwischen molekularem Progress und dem morphologischen Rezidiv liegt ebenfalls bei 3 Monaten. Hier fällt das Signifikanzniveau im Log Rank Test auf  $p=0,161$  (siehe Abbildung 15). Das Ereignis-freie Überleben definiert den Zeitpunkt zwischen der Erstdiagnose der AML und dem morphologischem Rezidiv nach CR oder dem molekularen Progress (definiert nach den ELN Kriterien, siehe auch Kapitel 2.3.1) oder der Intervention mittels alloHSCT oder dem Tod jeglicher Ursache. Zensiert wird, wer zum Zeitpunkt der letzten Messung in der Nachbeobachtungszeit einen unbekanntem Ereignisstatus aufweist.

## 4.5 Vergleich der Überlebens-Raten zwischen den Gruppen molekularer Progression und morphologischem Rezidiv



**Abbildung 16:** Vergleich der Überlebens-Raten zwischen den Gruppen molekularer Progression und morphologisches Rezidiv

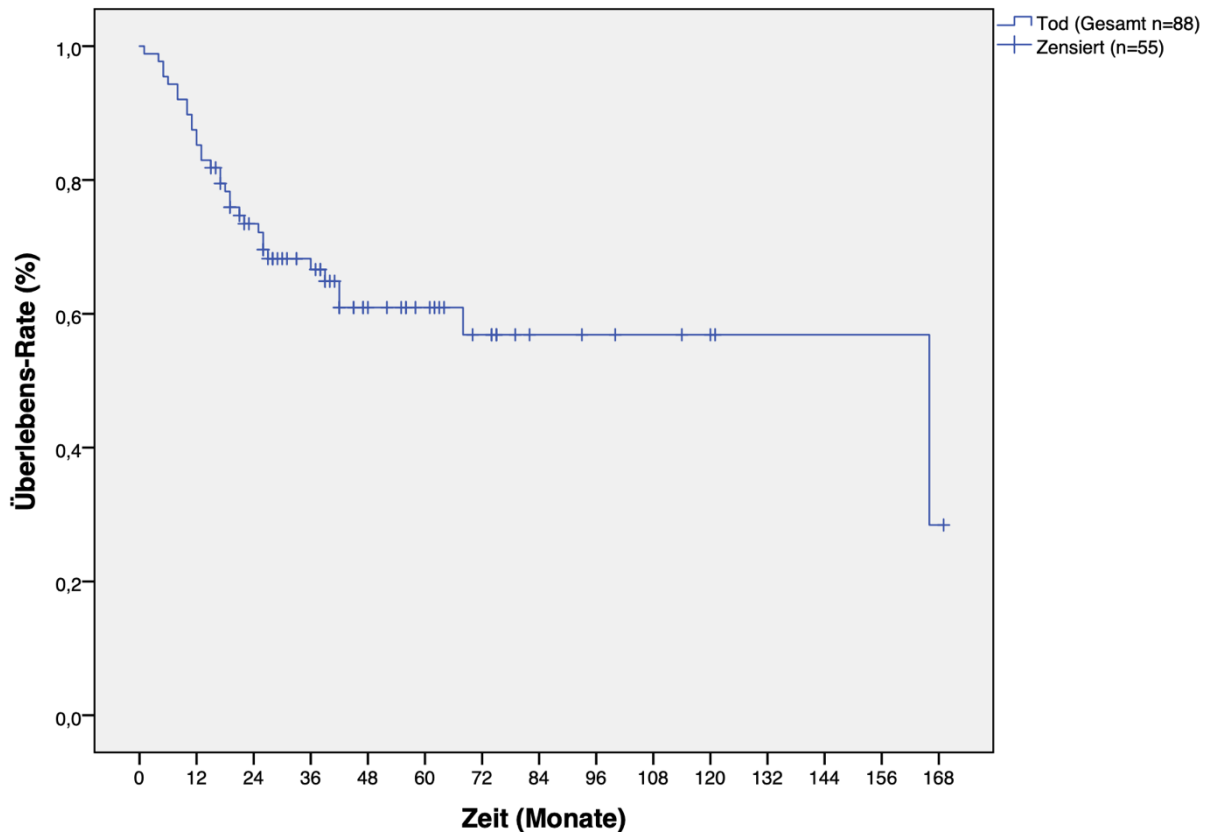
Die Grafik zeigt die Überlebens-Raten zwischen der Gruppe 1, dem molekularen Progress (blau, n=16) und der Gruppe 2, molekularer Progress mit Übergang in ein morphologisches Rezidiv (grün, n=18). Überlebens-Rate nach einem Jahr für Gruppe 1 bei 93,8% und für Gruppe 2 bei 66,7%. Nach drei Jahren 75% und 32,4%. Das Signifikanzniveau liegt bei  $p=0,037$ .

Diese Grafik zeigt den Vergleich zweier Gruppen hinsichtlich dem Endpunkt Tod. Gruppe eins zeigt diejenige Patientengruppe aus dem Gesamtkollektiv, bei denen sich ein messbarer molekularer Progress zeigte und diese nach anschließender Intervention kein morphologisches Rezidiv entwickelten. Gruppe zwei beinhaltet diejenigen, die nach dem molekularen Progress in ein morphologisches Rezidiv übergehen. Die Überlebens-Raten nach einem Jahr liegen bei Gruppe 1 (blau, n=16) bei 93,8% im Vergleich zu Gruppe 2 (grün, n=18) bei 66,7%. Nach drei Jahren liegen diese für Gruppe 1 bei 75% und für Gruppe 2 bei 32,4%. Das OS ist definiert als die Zeit zwischen Erreichen der kompletten Remission und Tod jeglicher Ursache. Patienten mit unbekanntem Überlebensstatus zum letzten Zeitpunkt der Nachbeobachtungszeit sind zensiert (Gruppe 1: n=12, 75%; Gruppe 2: n=6, 33,3%). Das Zensurdatum entspricht in diesem Fall dem Tag der letzten Untersuchung. Ein

Log-Rank-Test wurde durchgeführt, um festzustellen, ob signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bestehen. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Überlebensverteilung der zwei Gruppen signifikant voneinander unterscheiden,  $p=0,037$  (siehe Abbildung 16).

## 4.6 Überlebensanalyse im Gesamtkollektiv bei NPM1-Mutation

### 4.6.1 Gesamtüberleben bei NPM1-Mutation

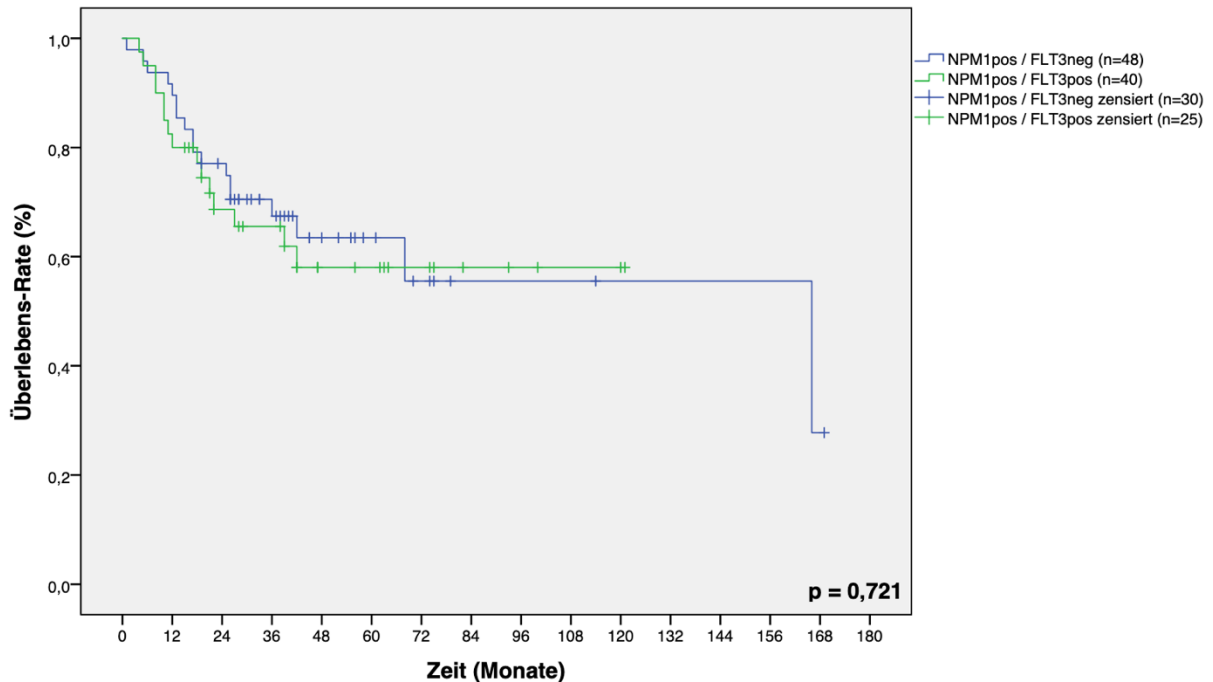


**Abbildung 17:** Gesamtüberleben bei  $n=88$  Patienten

Die Grafik zeigt das Gesamtüberleben für alle Patienten ( $n=88$ ) mit NPM1-Mutation.

Das Gesamtüberleben (OS) für alle NPM1<sup>mut</sup>-Patienten ( $n=88$ ) liegt nach drei Jahren bei 66,6% und nach fünf Jahren bei 60,9% (siehe Abbildung 17). Die Mediane Nachbeobachtungszeit liegt bei 32 Monaten. Die Spannweite umfasst zwischen 1 und 169 Monate. Das OS ist definiert als die Zeit zwischen der Erstdiagnose der AML und Tod jeglicher Ursache. Patienten mit unbekanntem Überlebensstatus zum letzten Zeitpunkt der Nachbeobachtungszeit sind zensiert ( $n=55$ , 62,5%). Das Zensurdatum entspricht in diesem Fall dem Tag der letzten Untersuchung.

#### 4.6.2 Vergleich Gesamtüberleben NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> vs. NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup>

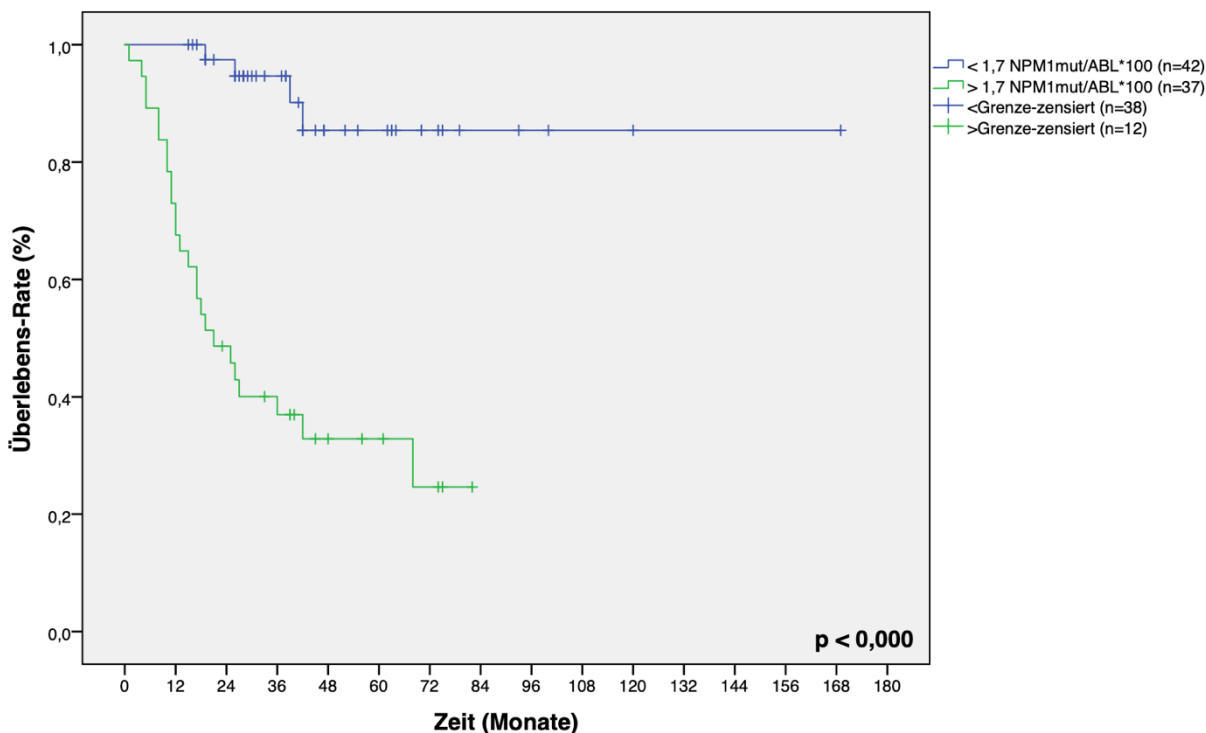


**Abbildung 18:** Vergleich Gesamtüberleben NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> vs. NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup>

Diese Grafik zeigt den Vergleich des Gesamtüberlebens der Patienten mit dem Genotyp NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> (blau, n=48) und NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup> (grün, n=40). Signifikanzniveau bei p=0,721.

Im Vergleich des OS zwischen den Patienten mit dem Genotyp NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> (n=48) und NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup> (n=40) zeigt das Ergebnis im Log-Rank-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen, p=0,721. Das OS für Patienten mit dem Genotyp NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> liegt nach drei Jahren bei 67,4% und nach fünf Jahren bei 63,4% und für den Genotyp NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup> bei 65,5% und 58% (siehe Abbildung 18). Die Mediane Nachbeobachtungszeit für NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> liegt bei 33 Monaten (Spannweite zwischen 1 und 169 Monate). Für NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup> liegt sie im median bei 28,5 Monate (Spannweite zwischen 4 und 121 Monate). Das OS ist definiert als die Zeit zwischen der Erstdiagnose der AML und Tod jeglicher Ursache. Patienten mit unbekanntem Überlebensstatus zum letzten Zeitpunkt der Nachbeobachtungszeit sind zensiert. Das Zensurdatum entspricht in diesem Fall dem Tag der letzten Untersuchung.

### 4.6.3 Vergleich Gesamtüberleben oberhalb und unterhalb des Grenzwertes



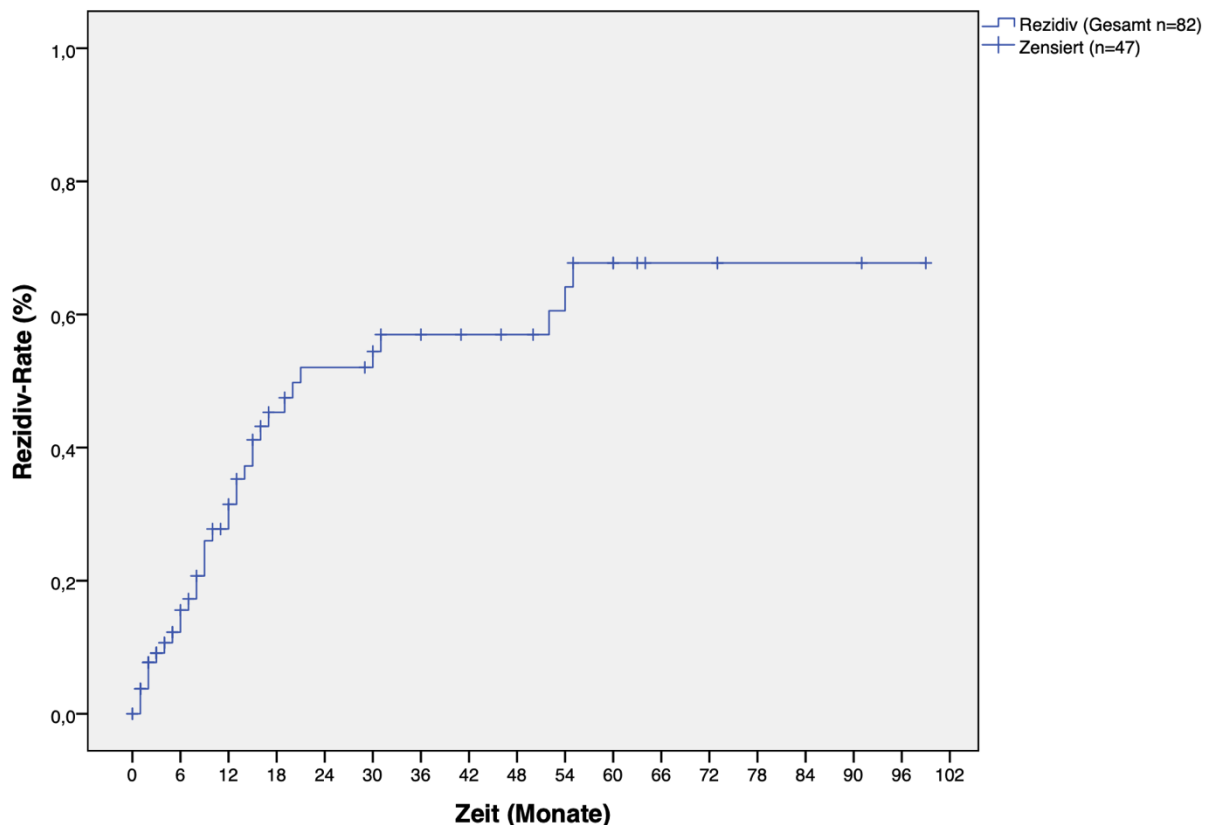
**Abbildung 19:** Vergleich Gesamtüberleben unterhalb und oberhalb des Grenzwertes

Die Grafik vergleicht das Gesamtüberleben aller Patienten die unterhalb des Grenzwertes von 1,7 NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100 bleiben (blau, n=42) mit denen, die diesen überschreiten (grün, n=37). Signifikanzniveau bei p=0,000.

Das Gesamtüberleben für alle NPM1<sup>mut</sup>-Patienten, die den Grenzwert von 1,7 NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100 nicht überschreiten (n=42) liegt nach drei Jahren bei 95% und nach fünf Jahren bei 85%. Vier Patienten haben den Endpunkt Tod erreicht, 38 Patienten (91%) sind zensiert. Die Mediane Nachbeobachtungszeit liegt unterhalb des Grenzwertes bei 38 Monaten (Spannweite zwischen 14 und 169 Monaten).

Dem gegenüber liegt das Gesamtüberleben für alle NPM1<sup>mut</sup>-Patienten, die den Grenzwert von 1,7 NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100 überschreiten (n=37) nach drei Jahren bei 37% und nach fünf Jahren bei 33%. Die mediane Überlebenszeit liegt bei 21 Monaten. Hier haben den Endpunkt Tod 25 Patienten erreicht und 12 Patienten (32%) sind zensiert. Oberhalb des Grenzwertes liegt die Nachbeobachtungszeit im Median bei 19 Monaten (Spannweite zwischen 1 und 81 Monaten). Die Ergebnisse der beiden Gruppen zeigen, dass sich die Verteilung im Log-Rank-Test hoch signifikant voneinander unterscheiden, p<0,000 (siehe Abbildung 19).

#### 4.6.4 Kumulative Rezidivinzidenz bei NPM1-Mutation

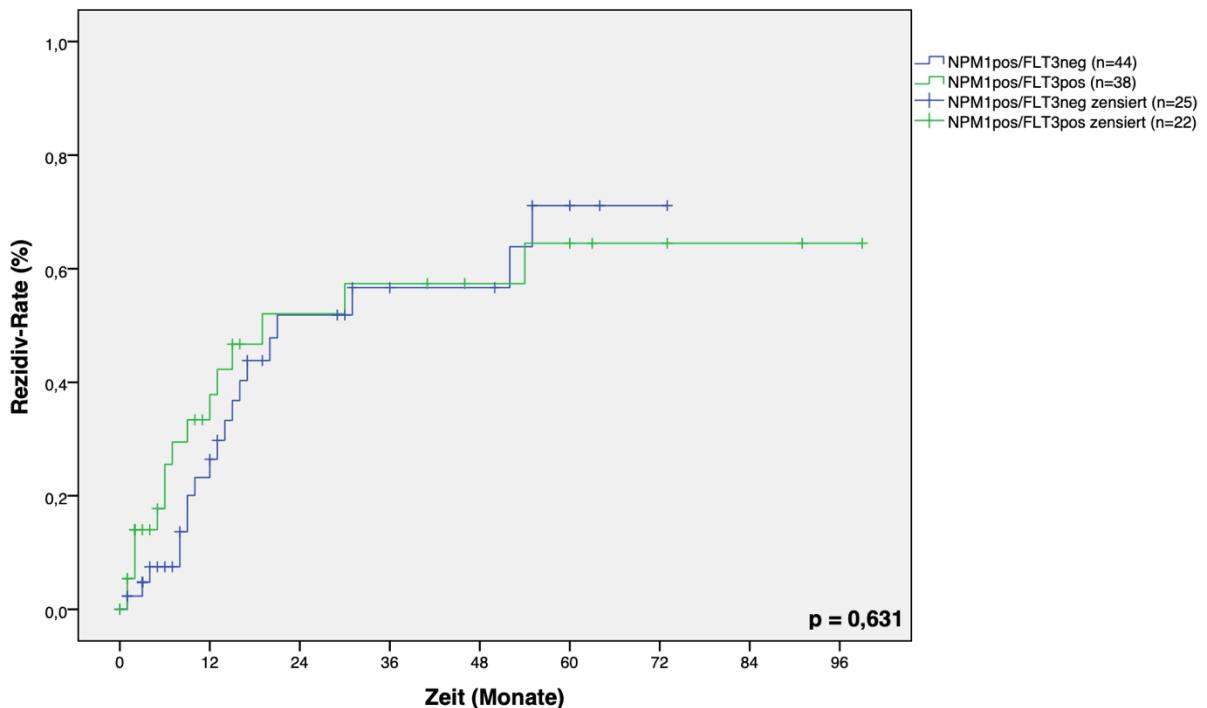


**Abbildung 20:** Kumulative Rezidivinzidenz des Gesamtkollektivs mit n=82 Patienten

Die Grafik zeigt die kumulative Rezidivinzidenz (CIR) für alle Patienten (n=82) mit NPM1-Mutation. 35 Patienten (43%) erreichen das Rezidiv und 47 Patienten (57%) sind zensiert.

Aus dem Gesamtkollektiv erreichen 82 Patienten (93%) eine komplette Remission. Aus diesem Kollektiv entwickeln 35 Patienten (43%) ein Rezidiv. Die kumulative Rezidivinzidenz beträgt nach 24 Monaten 52% und nach 48 Monaten 57% (siehe Abbildung 20). Die Mediane Zeit bis zum Rezidiv beträgt 9 Monate. Die Spannweite umfasst zwischen 16 Tage und 99 Monate. Angegeben ist die Zeit zwischen dem Erreichen der CR und dem ersten morphologischen Rezidiv. Zensiert (n=47, 57%) sind die Patienten mit unbekanntem Rezidivstatus zum letzten Zeitpunkt der Nachbeobachtung oder zum Zeitpunkt der alloHSCT.

#### 4.6.5 Vergleich kumulative Rezidivinzidenz NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> vs. NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup>



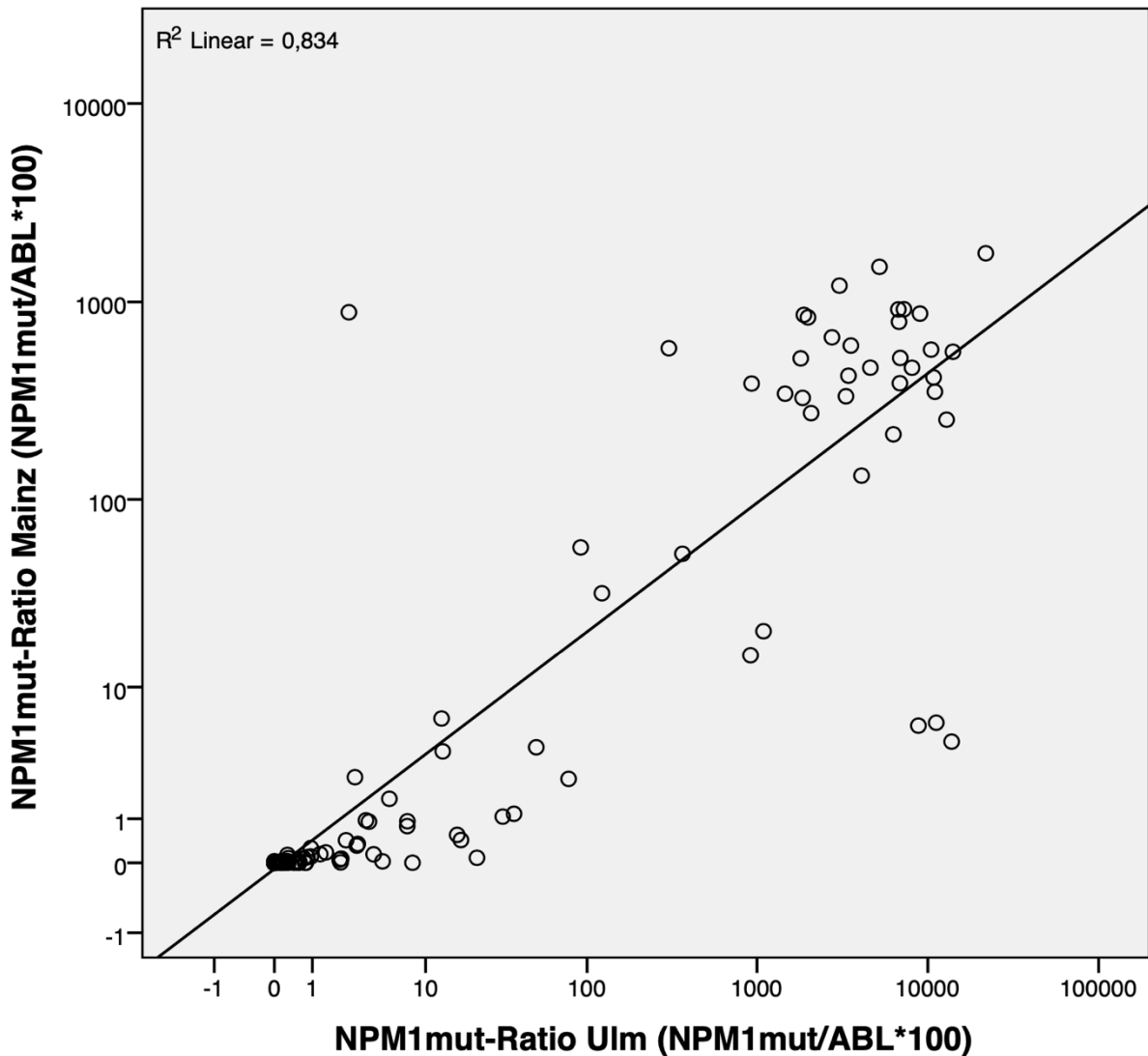
**Abbildung 21:** Vergleich der kumulativen Rezidivinzidenz zwischen NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> und NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup>

Diese Grafik zeigt den Vergleich der kumulativen Rezidivinzidenz zwischen den Patienten mit dem Genotyp NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> (blau, n=44) und NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup> (grün, n=38). Signifikanzniveau bei p=0,631.

Im Vergleich der CIR zwischen Patienten mit dem Genotyp NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> (n=44) und NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup> (n=38) zeigt das Ergebnis im Log-Rank-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, p=0,631. Die CIR beträgt bei dem Genotyp NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> nach 24 Monaten 51,9% und nach 48 Monaten 56,7% und beim Genotyp NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup> 52,1% und 57,4% (siehe Abbildung 21). Die Mediane Zeit bis zum Rezidiv beträgt für NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> 10 Monate (Spannweite zwischen 0 und 73 Monate) und für NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup> 6 Monate (Spannweite zwischen 0 und 99 Monate). Angegeben ist die Zeit zwischen dem Erreichen der CR und dem ersten morphologischen Rezidiv. Zensiert sind Patienten mit unbekanntem Rezidivstatus zum letzten Zeitpunkt der Nachbeobachtung oder zum Zeitpunkt der alloHSCT.

## 4.7 Korrelation der MRD-Messwerte zwischen den Laboren Mainz, Ulm und München

### 4.7.1 Korrelation der MRD-Messwerte zwischen Mainz und Ulm



**Abbildung 22:** Streudiagramm  $NPM1^{mut}$ -Ratio zwischen Mainz und Ulm

Logarithmisch skaliertes Streudiagramm für alle gepaarten KM- und PB-Proben ( $n=168$ ) zwischen den Laboren der Universitätsmedizin Mainz und dem der Universitätsklinik Ulm.  $R^2$  wird mit 0,834 angegeben.

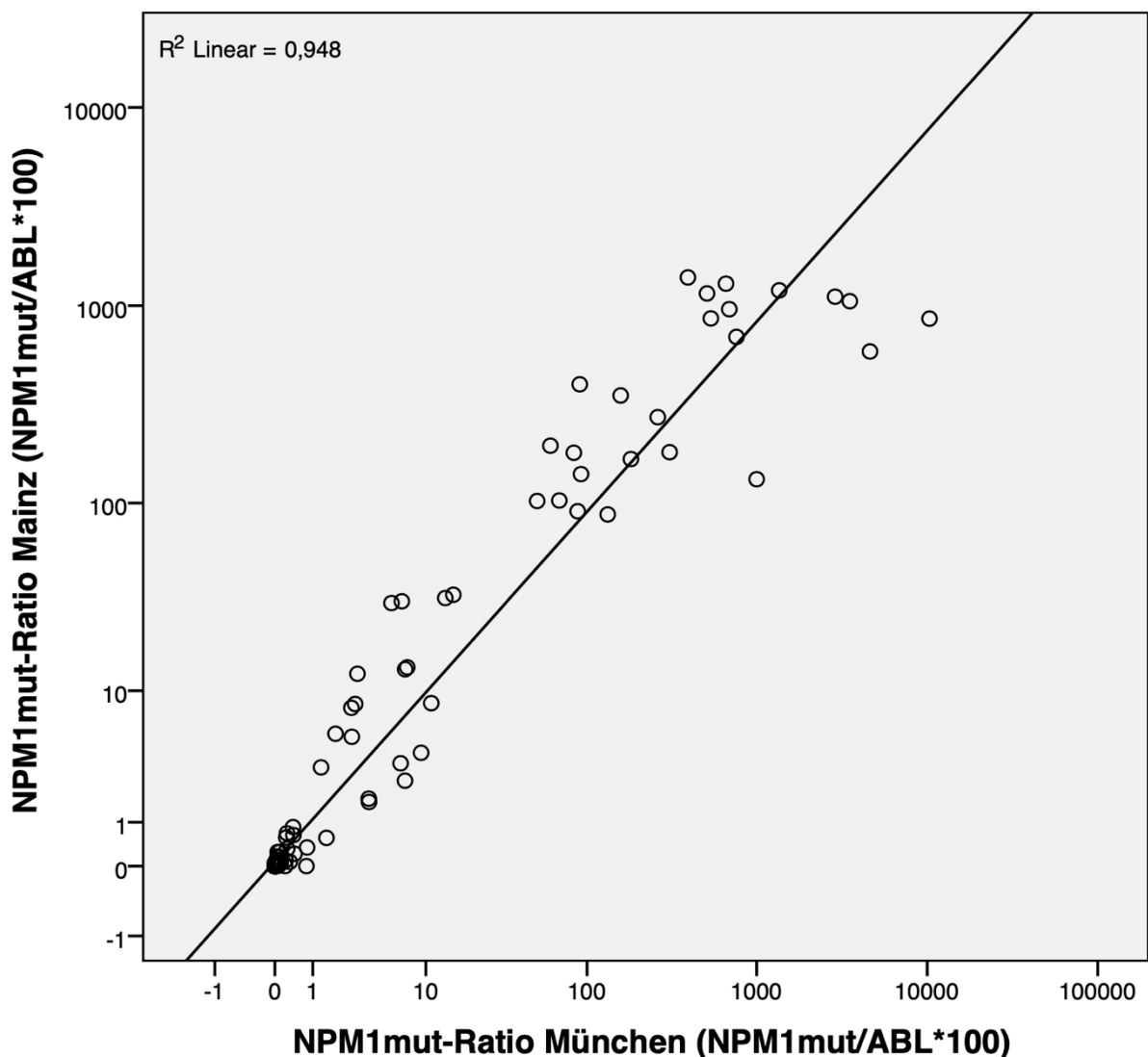
	Anzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
$\text{Ratio}_{\text{Ulm}} < \text{Ratio}_{\text{Mainz}}$	27	20,26	547
$\text{Ratio}_{\text{Ulm}} > \text{Ratio}_{\text{Mainz}}$	112	81,99	9183
$\text{Ratio}_{\text{Ulm}} = \text{Ratio}_{\text{Mainz}}$	29		
Gesamt	168		

**Tabelle 11:** Wilcoxon-Rangtabelle Mainz vs. Ulm

Die Tabelle zeigt, dass in 112 Fällen die  $NPM1^{mut}$ -Ratio in Ulm höher ist (Rangsumme: 9183) und in 27 Fällen die  $NPM1^{mut}$ -Ratio in Mainz (Rangsumme: 547). In 29 Fällen sind die MRD-Messwerte gleich groß. Asymptomatischer Wilcoxon-Test:  $z=-9,079$ ;  $p<0,000$ .

Untersucht wird der Zusammenhang zwischen den MRD-Messwerten des Labors der Universitätsmedizin Mainz und dem Labor der Universitätsklinik Ulm. Hierzu werden 168 gepaarte KM- oder PB-Proben miteinander verglichen. Im Streudiagramm mit logarithmischer Skalierung (siehe Abbildung 22) zeigt sich ein positiver linearer Zusammenhang. In 112 Fällen liegt die NPM1<sup>mut</sup>-Ratio in Ulm höher (Rangsumme: 9183) und in 27 Fällen die NPM1<sup>mut</sup>-Ratio in Mainz (Rangsumme: 547). In 29 Fällen sind die MRD-Messwerte gleich groß. (siehe Tabelle 11). Asymptomatischer Wilcoxon-Test:  $z=-9,079$ ,  $p<0,000$ . Die Effektstärke nach Pearson liegt bei  $r=0,642$ ,  $p<0,000$ .

#### 4.7.2 Korrelation der MRD-Messwerte zwischen Mainz und München



**Abbildung 23:** Streudiagramm NPM1<sup>mut</sup>-Ratio zwischen Mainz und München

Logarithmisch skaliertes Streudiagramm für alle gepaarten KM- und PB-Proben ( $n=215$ ) zwischen dem Labor der Universitätsmedizin Mainz und dem Münchener Leukämielabor.  $R^2$  wird mit 0,948 angegeben.

	Anzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
Ratio <sup>München</sup> < Ratio <sup>Mainz</sup>	111	63,93	7096
Ratio <sup>München</sup> > Ratio <sup>Mainz</sup>	35	103,86	3635
Ratio <sup>München</sup> = Ratio <sup>Mainz</sup>	69		
Gesamt	215		

**Tabelle 12:** Wilcoxon-Rangtabelle Mainz vs. München

Die Tabelle zeigt, dass in 111 Fällen die NPM1<sup>mut</sup>-Ratio in Mainz höher ist (Rangsumme: 7096) und in 24 Fällen die NPM1<sup>mut</sup>-Ratio in Münchener (Rangsumme: 3635). In 69 Fällen sind die MRD-Messwerte gleich groß. Asymptomatischer Wilcoxon-Test:  $z=-3,381$ ;  $p<0,001$ .

Untersucht wird der Zusammenhang zwischen den MRD-Messwerten des Labors der Universitätsmedizin Mainz und dem Münchener Leukämielabor. Hierzu werden 168 gepaarte KM- oder PB-Proben miteinander verglichen. Im Streudiagramm mit logarithmischer Skalierung (siehe Abbildung 23) zeigt sich ein positiver linearer Zusammenhang. In 111 Fällen liegt die NPM1<sup>mut</sup>-Ratio in Mainz höher (Rangsumme: 7096) und in 24 Fällen die NPM1<sup>mut</sup>-Ratio in Münchener (Rangsumme: 3635). In 69 Fällen sind die MRD-Messwerte gleich groß. (siehe Tabelle 12). Asymptomatischer Wilcoxon-Test:  $z= -3,381$ ,  $p< 0,001$ . Die Effektstärke nach Pearson liegt bei  $r= 0,536$ ,  $p< 0,000$ .

## 5 Diskussion

### 5.1 Betrachtung des Kollektivs

Das Patientenkollektiv von 88 Personen mit NPM1<sup>mut</sup>-AML, welches in dieser Arbeit betrachtet wird, hat ein Durchschnittsalter von 55 Jahren. Das deckt sich mit Erkenntnissen aus anderen Studien, in denen das Durchschnittsalter bei NPM1<sup>mut</sup> zwischen 46-58 Jahren im Vergleich zum NPM1<sup>wildtyp</sup> bei 39-47 Jahren liegt (24, 101, 143). Bei der Inzidenz an AML erkrankten Personen ist der männliche Anteil höher als der weibliche. Allerdings ist der weibliche Anteil bei NPM1<sup>mut</sup> höher als bei NPM1<sup>wildtyp</sup> (99, 112, 144). In unserem Kollektiv dagegen bestätigt sich diese Beobachtung nicht. Hier ist die Geschlechterverteilung zwischen männlich (51%) und weiblich (49%) ausgeglichen. Der Anteil der internen Tandemduplikation FLT3 am Gesamtkollektiv der NPM1<sup>mut</sup> liegt in dieser Studie bei 45,5%, was in etwa der Metaanalyse des ELN entspricht. Hier liegt der Anteil bei 40% (16). Dies spiegelt sich auch in der Einteilung der ELN-Risikoklassifizierung wider. Hier beläuft sich der Anteil mit einem günstigen Risiko auf 52,3%, mit einem intermediären Risiko auf 43,2% und einem ungünstigen Risiko auf 4,5%. Die vier Patienten mit einem ungünstigen Risikoprofil zeigen entweder einen komplex aberranten Karyotyp oder eine Monosomie 7. Die häufigste Chromosomenaberration ist die Trisomie 8 mit 4,5%, einen normalen Karyotyp hingegen haben 86,4% des Gesamtkollektivs. Das Verteilungsmuster der NK-AML mit NPM1<sup>mut</sup> kann in andere Studien mit einem deutlich größeren Gesamtkollektiv, wie die von Haferlach et. al. (85,3%) bestätigt werden (98). Andere Studien wie die von Verhaak et. al. (64%) oder Gale et. al. (62%) zeigen hingegen einen geringeren Anteil (24, 143). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das hier betrachtete Gesamtkollektiv repräsentativ ist.

### 5.2 Betrachtung der Grenzwertanalyse zur Definition eines molekularen Rezidivs

Die Hauptfrage, mit der sich diese Arbeit befasst, ist die Definition eines Grenzwertes der NPM1-Mutationslast, gemessen nach Therapieende, bei dem mit hoher Wahrscheinlichkeit ein morphologisches Rezidiv im Verlauf erwartet werden kann. Es konnte ein solcher Grenzwert aus dem Gesamtkollektiv von 88 Patienten aus dem PCR-Labor der Universitätsmedizin Mainz, die an NPM1<sup>mut</sup>-AML erkrankt sind, ermittelt werden. Einige Arbeitsgruppen haben bereits über die prognostische Relevanz eines solchen Grenzwertes für die Nachbeobachtungszeit berichtet (7, 9,

132, 135). In dem besagten Kollektiv sind 37 Patienten (42%), die kein morphologisches Rezidiv nach CR im KM oder PB aufweisen. Eine NPM1-Mutationslast von  $1,16 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$  wird in der Nachbeobachtungszeit, deren Spannweite 16 bis 99 Monate beträgt, nicht überschritten. Anhand der ROC-Analyse des Gesamtkollektivs und der Berechnung des Youden-Index auf der ermittelten Kurve kann für das Mainzer Kollektiv ein MRD-Grenzwert von  $1,7 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$  definiert werden. Dieser Wert bietet einen guten Kompromiss zwischen Sensitivität (100%) und Spezifität (88,3%) und erlaubt die sichere Vorhersage des Auftretens eines zukünftigen Rezidivs. Mit einer AUC von 0,98 zeigt der ROC-Wert ein hohes Qualitätsmaß. Zu beachten ist, dass aus dieser Beobachtung fünf Patienten ausgeschlossen werden, die den ermittelten Grenzwert überschreiten, ohne ein morphologisches Rezidiv entwickelt zu haben. Bei den Patienten 15, 16 und 48 liegt kein morphologisches Rezidiv vor. Aufgrund ihres erhöhten MRD-Verlaufs (siehe Ergebnisse im Kapitel 4.2) werden sie dennoch als solches gewertet und haben eine allogene Transplantation erhalten. Patient 11 überschreitet in zwei aufeinanderfolgenden MRD-Messungen den Grenzwert, geht jedoch nach zweimaliger DLI-Gabe in die morphologische Remission über. Patient 37 überschreitet einmalig den Grenzwert, fällt aber in der darauffolgenden Kontrollmessung unter den Grenzwert. Bei diesem Patienten liegt ein extramedullärer Befall vor, der unter Behandlung, ohne morphologischen Nachweis einer KM-Beteiligung zur MRD-Überschreitung führte. In der Forschung der akuten lymphatischen Leukämie kann dies bereits in mehreren Studien an kleinen Kohorten bei isoliert extramedullären Organbefall im ZNS und in den Testes gezeigt werden. Diese Studien untersuchen bei isoliert extramedullären Rezidiven die KM-Beteiligung unterhalb der morphologischen Nachweisgrenze (145-149).

In einem ähnlichen Kollektiv der Deutsch-Österreichischen-Studiengruppe von Krönke et al. bleiben 26 Patienten weiterhin in CR und überschreiten einen MRD-Wert von  $1,45 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$  nicht. Aus dieser Erkenntnis wird ein Grenzwert von  $2 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$  mit einer Sensitivität von 100% definiert (132). Zu beachten ist hier, dass dieser Wert willkürlich aus der zuvor gemachten Beobachtung getroffen wird. Eine Studie von Hubmann et al. ermittelt, ebenfalls unter der Verwendung einer ROC-Analyse, einen Grenzwert von  $1 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$ . Mit einer Sensitivität und Spezifität von 100% erleiden alle Patienten innerhalb von 100 Tagen bei Überschreitung des Grenzwertes ein morphologisches Rezidiv. Bei dieser Untersuchung ist ein Kollektiv von 73 Patienten verfügbar (7). Bei einer Kohorte von 101 Patienten kommt die Studie

von Shayegi et al. auf einen ähnlichen Grenzwert von 1% NPM1<sup>mut</sup>/ABL (entspricht 1 NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100). Hier liegt der Nachbeobachtungszeitraum bei 360 Tagen (9). Stellt man diese Studienergebnisse mit ähnlichen Kollektiven gegenüber, so liegt der von uns ermittelte Grenzwert mit 1,7 NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100 genau in dessen Spektrum. Bei diesem Vergleich ist darauf zu achten, dass die untersuchten Nachbeobachtungszeiträume unterschiedlich lang sind. Zusammenfassend können wir für die Nachbeobachtungszeit einen hoch signifikanten Grenzwert identifizieren, mit dem zuverlässig ein zukünftiges Rezidiv vorhergesagt wird. Dies unterstreicht zudem die klinische Bedeutung einer frequentierten MRD-Überwachung während der Nachbeobachtungszeit.

### **5.3 Betrachtung der Zeitanalyse zwischen MRD-Grenzwert und morphologischem Rezidiv**

Nachdem wir für unser Kollektiv einen relevanten MRD-Grenzwert von 1,7 NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100 definiert haben, wird geprüft, ob dieser MRD-Grenzwert gegenüber dem morphologisch ermittelten Rezidiv einen zeitlichen Vorteil bringt. Für 23 Patienten, die alle in CR sind, kann die Zeitspanne zwischen der Überschreitung des MRD-Grenzwertes von 1,7 NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100 und dem Erreichen des morphologischen Rezidivs ermittelt werden. Auffällig ist, dass zwei Patienten aus dem Kollektiv der morphologischen Rezidive den MRD-Grenzwert bis zu ihrem Rezidiv nie überschreiten. Bereits andere Studien zeigen in einzelnen Fällen (bei 1-3%), dass zwischen Diagnose und Rezidiv ein Verlust der NPM1<sup>mut</sup> zu beobachten ist (101, 132, 150, 151). Ungeachtet dessen bleibt die Mutation des NPM1 ein sehr stabiler Marker (98, 133, 152). Zum Ergebnis der ermittelten Zeitintervalle: Ab Überschreitung des Grenzwertes bis zum Erreichen des morphologischen Rezidivs liegt das mediane Zeitintervall bei 53 Tagen. Beim Vergleich zwischen Erst- und Zweitrezidiv (Median: 41 vs. 62 Tage) kann kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Ebenso nicht signifikant ist der Zeitraum im Vergleich vor oder nach Stammzelltransplantation (Median: 41 vs. 52 Tage). Zu berücksichtigen ist, dass der Zeitraum von 0 bis 300 Tagen sehr groß ist und die Fallzahl von 23 Patienten klein ausfällt. Die Entnahmezeitpunkte im KM liegen in diesem Kollektiv nach Beendigung der Chemotherapie oder der Transplantation bei einmal in drei Monaten. In den überwiegenden Fällen werden die Messintervalle nach Überschreitung der MRD-Grenzwerte auf einen Monat gekürzt – was auch aus den ELN-Empfehlung hervorgeht (128). Zu beachten ist, dass sich Unregelmäßigkeiten der Messintervalle auf die

Aussagekraft auswirken. Die Studie von Krönke et al. ermittelt in einem ähnlichen Kollektiv eine mediane Zeit bei Überschreitung des Grenzwertes von 79 Tagen. Der Grenzwert wird hier auf  $2 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$  angesetzt. Auch hier ergibt sich eine große Zeitspanne von 0,4 bis 23,6 Monaten (12 bis 718 Tage). Anzumerken ist, dass die Autoren von teils heterogenen Messintervallen berichten (132). Die Studie von Hubmann et al. betrachtete einen Zeitraum von 100 Tagen. Hier ergibt sich eine mediane Zeit von 58 Tagen (Zeitspanne: 20 bis 98 Tage) zwischen einem Grenzwert von  $1 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$  bis zum morphologischen Rezidiv (7).

Vergleicht man diese Ergebnisse miteinander, zeigt sich für unsere Daten eine Übereinstimmung mit denen von Hubermann et al. (53 und 58 Tage). Die Zeit in der Studie von Krönke et al. ist etwas länger (79 Tage). Unabhängig dieser Differenz stellt sich für das klinische Vorgehen die Frage, ob aufgrund dieser Erkenntnisse ein zyklisches Messintervall von drei Monaten – wie überwiegend in den Kollektiven erfolgt – ausreichend ist. Dies sollte in größeren Kollektiven neu evaluiert werden. Die German-Austrian AML Study Group kann bei der AML mit  $t(8;21)(q22;q22.1)$ ; RUNX1-RUNX1T1 einen Vorteil für monatliche Messintervall der MRD im PB nach Therapieende aufzeigen. Hier zeigt sich die Rezidivrate innerhalb des ersten Jahres nach Erreichen der CR am höchsten (153).

Auch nach einem Zweitrezidiv und nach einer Stammzelltransplantation sollte – wie auch nach der Ersttherapie – ein zyklisches Messintervall der MRD von mindestens drei Monaten eingehalten werden. Dies bringen die Erkenntnisse aus der Untergruppenanalyse, bei der kein signifikanter Unterschied zwischen Erst- und Zweitrezidiv sowie vor und nach Stammzelltransplantation gezeigt wird (siehe Abbildung 12 und 13).

#### **5.4 Betrachtung des Ereignis-freien Überlebens zwischen molekularer Progression und morphologischem Rezidiv**

Auf der Basis von zahlreichen Studien verfasste das European LeukemiaNet 2018 ein Konsensus-Dokument zum Umgang mit der MRD-Diagnostik bei AML. Darin sind für die Nachbeobachtungszeit spezifische molekulare Zielparameter definiert. Die molekulare Progression wird hier definiert als Anstieg der MRD-Kopienzahl  $\geq 1 \log_{10}$  zwischen zwei positiven Proben bei Patienten mit  $\text{MP}_{\text{LCN}}$  (siehe auch Kapitel 2.3.1) (128). Diesen molekularen Zielparameter nutzen wir, um das EFS zwischen dem molekularen Progress und dem morphologischen Rezidiv zu vergleichen. Trotz der fehlenden Signifikanz können wir für die ersten zwei Jahre der Nachbeobachtungszeit

– innerhalb derer die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv am höchsten ist (154) – einen klaren Trend aufzeigen. Es zeigt sich der molekulare Progress im Median drei Monate vor dem Auftreten des morphologischen Rezidivs. Vergleicht man diese drei Monate mit den 53 Tagen im Median zwischen Überschreitung des ermittelten MRD-Grenzwertes und dem morphologischen Rezidiv, zeigt sich der molekulare Progress etwas früher. Zu beachten ist, dass die Datenmenge zum einen nach zwei Jahren beträchtlich abnahm, was sich u.a. damit erklären lässt, dass die Rezidivinzidenz nach zwei Jahren deutlich sinkt und zum anderen in diesem Kollektiv die Materialgewinnung zur MRD-Diagnostik nach zwei Jahren nur noch standardmäßig aus dem PB und nicht mehr primär aus dem KM gewonnen wird, was einen Verlust der Sensitivität zur Folge hat (155). Der Trend innerhalb der ersten zwei Jahre lässt aber vermuten, dass das Zeitintervall zwischen dem molekularen Progress und dem morphologischen Rezidiv in einem ähnlichen Zeitraum liegt wie zwischen dem ermittelten MRD-Grenzwert und dem morphologischen Rezidiv. Abschließend sollte dies mit einer größeren Fallzahl bestätigt werden.

## **5.5 Betrachtung der Überlebens-Raten zwischen den Gruppen der molekularen Progression und dem morphologischen Rezidiv**

Der hier betrachteten Analyse geht die Fragestellung voran, ob die direkte Intervention nach erstmalig gemessener molekularer Progression ein Überlebensvorteil gegenüber denen nach morphologischem Rezidiv bietet. Um den prognostischen Wert dieser molekularen Messungen zu ermitteln, sind zwei Patientengruppen hinsichtlich des Endpunktes Tod miteinander verglichen worden. Die erste Gruppe bildet diejenigen Patienten aus dem Gesamtkollektiv ab, die nach molekularer Progression eine Intervention erhalten haben und nicht in ein morphologisches Rezidiv übergegangen sind. Die zweite stellt jene Patientengruppe dar, die vom molekularen Progress in ein morphologisches Rezidiv übergegangen sind. Hierbei zeigt sich für die erste Gruppe – ohne Übergang in ein morphologisches Rezidiv – nach einem Jahr ein signifikanter Überlebensvorteil von 27,1% gegenüber der zweiten Gruppe mit Ausbildung eines morphologischen Rezidivs (93,8% vs. 66,7%). Auffallend ist das Plateau in beiden Vergleichsgruppen nach 17 und 36 Monaten. Hier ist der Unterschied nach drei Jahren zwischen den Vergleichsgruppen auf Höhe des Plateaus konstant mit 42,6% (75% vs. 32,4%). Der Überlebensvorteil der Gruppe ohne Ausbildung eines morphologischen Rezidivs zeigt sich somit noch deutlicher. Diese Daten sind aufgrund der relativ kleinen Patientenkohorte und einer fehlenden Vergleichsgruppe mit alleiniger Ausbildung

eines morphologischen Rezidivs und ohne vorangegangene molekulare Progression, als limitiert zu betrachten. Dies sollte an einer größeren Kohorte im Rahmen einer klinischen Studie validiert werden. Zusammenfassend bestätigt diese Analyse jedoch den prognostischen Nutzen einer molekularen Messung und dessen Möglichkeit der früheren Intervention.

## **5.6 Betrachtung des Gesamtüberlebens und der Rezidivinzidenz im Gesamtkollektiv**

In der Betrachtung des Gesamtüberlebens und der Rezidivinzidenz im Gesamtkollektiv beurteilen wir den prognostischen Wert der minimalen Resterkrankung für den häufigsten Subtyp der AML (28). Wir haben gezeigt, dass bei Nichtüberschreitung des ermittelten Grenzwertes von  $1,7 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$  ein signifikanter Überlebensvorteil besteht. Das OS für Patienten, die unterhalb dieses Grenzwertes in der Nachbeobachtungszeit bleiben, liegt nach fünf Jahren bei 85%. Wird der Grenzwert überschritten, sinkt das OS nach fünf Jahren erheblich auf 33% ab (siehe Abbildung 19). Dies erhärtet die prognostische Relevanz für den von uns ermittelten Grenzwert auf das hier angewendete Gesamtkollektiv. Andere Studien bestätigen die prognostische Bedeutung der MRD in ähnlichen Kollektiven. Die Studien von Ivey et al. vergleicht Patienten, die nach zwei Zyklen Chemotherapie  $\text{MRD}^{\text{negativ}}$  bleiben, mit denen, die  $\text{MRD}^{\text{positiv}}$  sind. Hier zeigt sich ein OS nach fünf Jahren von 73% gegenüber 24% (133). Die Studie von Balsat et al. fokussiert sich auf die Reduktion von Log-Stufen nach Induktionstherapie. Einen signifikanten Überlebensvorteil ergibt sich hier bei einem OS nach drei Jahren für Patienten mit einer Reduktion von vier Log-Stufen (91,2%) gegenüber jenen, die unterhalb der Grenze bleiben (40,8%) (134). Damit liegt der von uns ermittelte Überlebensvorteil in einem vergleichbaren Verhältnis.

Betrachten wir das Gesamtkollektiv aller NPM1 mutierten Patienten können wir ein OS nach drei Jahren von 66,6% und nach fünf Jahren von 60,9% aufzeigen (siehe Abbildung 17). Ein ähnliches Kollektiv aus dem Schwedischen AML Register kommt auf vergleichbare Ergebnisse mit einem OS nach drei Jahren von 59% und nach fünf Jahren von 57% (144). Für die Inzidenz der Rezidive zeigt sich in den ersten zwei Jahren der größte Anstieg, danach ist die Zunahme merklich geringer. Dies zeigt sich in unseren Daten mit einer CIR nach zwei Jahren von 52% und nach vier Jahren von 57% (siehe Abbildung 20). Eine vergleichbare Kohorte zeigt einen etwas flacheren Anstieg mit einer CIR nach zwei Jahren von 37% (154). Auffällig ist, dass sich in

unserem Kollektiv kein signifikanter Unterschied im Subgruppenvergleich zwischen dem Genotyp NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>neg</sup> und NPM1<sup>pos</sup>/FLT3<sup>pos</sup> sowohl für das OS (nach fünf Jahren: 63,4% vs. 58%) als auch für die CIR (nach vier Jahren: 56,7% vs. 57,4%) ergibt (siehe Abbildungen 18 und 21). Im Gegensatz dazu können andere Studien für die FLT3-Mutation – die mit 40% eine der häufigsten Co-Mutationen bei NPM1<sup>mut</sup>-AML ist (16) – ein signifikant schlechteres OS und RR bei gleichzeitigem Vorliegen einer NPM1<sup>mut</sup> zeigen (siehe auch Kapitel 2.2.3.2) (24, 99, 112). Als eine mögliche und wahrscheinliche Ursache für diese Unterschiede könnte der relativ breite Einsatz von FLT3-Inhibitoren in unserem Kollektiv sein.

## **5.7 Betrachtung der MRD-Messwerte zwischen den PCR-Laboren Mainz, Ulm und München**

Um Grenzwerte und Ergebnisse aus Studien auf das eigene Kollektiv anzuwenden, bedarf es einer Vergleichbarkeit der Messdaten. Da ein einheitlicher Standard in der Vorgehensweise bei der Überwachung der MRD-Diagnostik fehlt, bleibt die allgemeine Anwendung von Grenzwerten schwierig. Das Fehlen solcher Grenzwerte führt dazu, dass Patienten aus dem PCR-Labor der Universitätsmedizin Mainz häufig parallel in dem Labor des Universitätsklinikums Ulm und dem Leukämielabor München gemessen wird. Dies ermöglicht uns den Vergleich von MRD-Messwerten gepaarter Proben aus den drei Laboren. In den gepaarten Messproben tritt ein signifikanter Unterschied zwischen den relativen MRD-Werten (NPM1<sup>mut</sup>/ABL\*100) auf: Das Labor in Ulm misst im Mittel höhere MRD-Werte als das Labor in Mainz (Ratio<sup>Ulm</sup> > Ratio<sup>Mainz</sup> = 127 Proben vs. Ratio<sup>Ulm</sup> < Ratio<sup>Mainz</sup> = 27 Proben). Im Streudiagramm zeigen sich überwiegend Differenzen um eine Log-Stufe mit großen Ausreißern bis zu vier Log-Stufen (siehe Abbildung 22). Im Labor in München sehen wir das umgekehrte Bild: Die Messproben zeigen im Mittel einen niedrigeren MRD-Wert als im Labor Mainz (Ratio<sup>Mainz</sup> > Ratio<sup>München</sup> = 111 Proben vs. Ratio<sup>Mainz</sup> < Ratio<sup>München</sup> = 35 Proben). Im Streudiagramm sind vorrangig Differenzen unterhalb einer Log-Stufe mit wenigen Ausreißern oberhalb einer Log-Stufe (siehe Abbildung 23). Waren die MRD-Werte zwischen den Laboren gleich, handelt es sich hauptsächlich um negative Messwerte. Große Ausreißer nach unten lassen sich teilweise durch die langen Lagerungs- und Transportzeiten der Proben erklären. Zwischen der Abnahme der Probe und der Auswertung lagen vereinzelt mehrere Tage. Dies kann einen Materialzerfall zur Folge haben, der zu falsch niedrigen Zellzahlen in der PCR-Auswertung führt. Eine weitere Fehlerquelle birgt die Qualität der Abnahme des Aspirats. Die Abnahme mehrerer

Proben aus derselben Punktionsstelle – für jedes Labor werden hintereinander einzelne Proben entnommen – kann die Anzahl leukämischer Zellen mit zunehmender Probenanzahl abnehmen lassen, was wiederum Unterschiede in der PCR-Messung erklärt (156). Zusammengefasst bestätigen diese Ergebnisse zum einen die fehlende Vergleichbarkeit zwischen den Laboren und zum anderen bekräftigen sie den Nutzen eines individuellen MRD-Grenzwertes für das PCR-Labor der Universitätsmedizin Mainz. Außerhalb von Studien kann so die parallele Messung in den verschiedenen Laboren eingespart werden, was die Fehleranfälligkeit und die Kosten reduziert.

## 6 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie ist eine Erkrankung mit einer äußerst heterogenen molekularen Landschaft, dessen Entschlüsselung in den letzten Jahren zu neuen prognostischen und therapeutischen Erkenntnissen geführt hat. Mit etwa 30% ist die NPM1-Mutation der häufigste molekulare Gendefekt, der zur Ausbildung der AML beiträgt. Die Technik der quantitativen Real-Time-PCR ermöglicht heute die NPM1<sup>mut</sup> als Marker zu messen und dadurch eine minimale Resterkrankung (MRD) im Krankheitsverlauf zu detektieren. Diese Arbeit leistet einen Beitrag zur Ermittlung eines MRD-Grenzwertes für die Prädiktion von morphologischen Rezidiven bei NPM1<sup>mut</sup>-AML sowie seine prognostische Bedeutung. Ferner zeigen wir die Unterschiede der MRD-Messwerte in den gepaarten Proben zwischen den Laboren der Universitätsmedizin Mainz, der Uniklinik Ulm und dem Leukämielabor München auf. Hierfür haben wir die Daten aus dem Labor der Universitätsmedizin Mainz aus einem Kollektiv von 88 Patienten mit NPM1<sup>mut</sup>-AML retrospektiv analysiert.

Mit einem MRD-Wert von  $1,7 \text{ NPM1}^{\text{mut}}/\text{ABL} \cdot 100$  können wir einen prognostisch hoch signifikanten Grenzwert definieren, ab dem ein morphologisches Rezidiv mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 88,3% zu erwarten ist (AUC 0,98). Die Zeit zwischen dem MRD-Grenzwert und dem morphologischen Rezidiv liegt im Median bei 53 Tagen. Hierbei zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Erst- und Zweitrezidiven sowie vor und nach einer Stammzelltransplantation, wobei die Aussage durch die kleine Fallzahl limitiert ist. Für das Patientenkollektiv bei denen eine molekulare Progression messbar wird und es durch eine anschließende Intervention zu keinem Übergang ins morphologische Rezidiv kommt, zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber denen, die anschließend in ein morphologisches Rezidiv übergegangen sind. Diese Ergebnisse beweisen den prognostischen Nutzen einer molekularen Diagnostik zur frühzeitigen Intervention bei NPM1<sup>mut</sup>-AML. Ebenso können wir einen deutlichen Überlebensvorteil aufzeigen, wenn der MRD-Grenzwert nicht überschritten wird. Hier liegt das OS nach fünf Jahren bei 88%. Wird dieser überschritten, sinkt das OS auf 33%. Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit den Daten aus anderen Studien. Allerdings sind die Nachbeobachtungszeiträume bei der Grenzwertanalyse in den Studien unterschiedlich gewählt worden. Ebenso sind die Messintervalle teilweise unregelmäßig, was die Vergleichbarkeit und Aussagekraft der Studienergebnisse erschwert. Die Ergebnisse im Vergleich gepaarter Messproben zwischen den Laboren Mainz, Ulm und München bekräftigen den Nutzen eines individuellen Grenzwertes für die einzelnen Labore. Das Labor in Ulm misst im Mittel

höhere MRD-Werte, das Labor in München im Mittel niedrigere MRD-Werte als das Labor in Mainz. Große Differenzen sind vermutlich auf lange Lagerungs- und Transportzeiten sowie auf die Qualität des Aspirats bei Probenabnahme selbst zurückzuführen. Somit lässt sich durch die hier gewonnen Erkenntnisse klar aufzeigen, dass die MRD Diagnostik wichtige und hoch relevante Aussagen über den Erkrankungsverlauf und dessen therapeutischen Nutzen liefert. Um dies abschließend zu klären bedarf es weiterer Studien mit größeren Fallzahlen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz der überwiegenden Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Daten aus anderen Studien ein klinisch einheitlicheres Vorgehen sowie ein definierter Messstandard in der Überwachung der MRD notwendig ist. Damit ließen sich MRD-Grenzwerte einheitlicher nutzen, die Vergleichbarkeit von Studien verbessern und die Evidenz für die prognostische Relevanz der MRD-Diagnostik abschließend sichern.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Kaufmann SHE. Zellen des Immunsystems. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Berlin: Springer-Verlag; 2016. p. 41-4.
2. Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *The Lancet*. 2013;381(9865):484-95.
3. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*. 2006;368(9550):1894-907.
4. Juliusson G, Lazarevic V, Horstedt AS, Hagberg O, Hoglund M, Swedish Acute Leukemia Registry G. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood*. 2012;119(17):3890-9.
5. Döhner H, Longo DL, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(12):1136-52.
6. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. 2017;31(4):798-807.
7. Hubmann M, Kohnke T, Hoster E, Schneider S, Dufour A, Zellmeier E, et al. Molecular response assessment by quantitative real-time polymerase chain reaction after induction therapy in NPM1-mutated patients identifies those at high risk of relapse. *Haematologica*. 2014;99(8):1317-25.
8. Krönke J, Bullinger L, Teleanu V, Tschürtz F, Gaidzik VI, Kühn MWM, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(1):100-8.
9. Shayegi N, Kramer M, Bornhäuser M, Schaich M, Schetelig J, Platzbecker U, et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood*. 2013;122(1):83-92.
10. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. Biology of Hematopoietic Stem Cells and Progenitors: Implications for Clinical Application. *Annual Review of Immunology*. 2003;21(1):759-806.
11. Burmester G-R, Pezzutto A, Ulrichs T. Taschenatlas der Immunologie: Thieme; 2006.
12. Youn BS, Mantel C, Broxmeyer HE. Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol Rev*. 2000;177:150-74.
13. Fuchs R, Staib P, Brümmendorf T. Manual Hämatologie. 26 ed. Stolberg: Nora Verlag; 2016.

14. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews*. 2004;18(2):115-36.
15. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-21.
16. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.
17. Kayser S, Zucknick M, Dohner K, Krauter J, Kohne CH, Horst HA, et al. Monosomal karyotype in adult acute myeloid leukemia: prognostic impact and outcome after different treatment strategies. *Blood*. 2012;119(2):551-8.
18. Bakshi SR, Brahmabhatt MM, Trivedi PJ, Dalal EN, Patel DM, Purani SS, et al. Trisomy 8 in leukemia: A GCRI experience. *Indian J Hum Genet*. 2012;18(1):106-8.
19. Pourrajab F, Zare-Khormizi MR, Hashemi AS, Hekmatimoghaddam S. Genetic Characterization and Risk Stratification of Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Manag Res*. 2020;12:2231-53.
20. Farag SS, Archer KJ, Mrózek K, Ruppert AS, Carroll AJ, Vardiman JW, et al. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood*. 2006;108(1):63-73.
21. Frohling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Dohner K, et al. Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood*. 2006;108(10):3280-8.
22. Schoch C, Kern W, Schnittger S, Buchner T, Hiddemann W, Haferlach T. The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. *Haematologica*. 2004;89(9):1082-90.
23. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(18):1909-18.
24. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. 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*. 2008;111(5):2776-84.
25. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelder-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, Mellink CH, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a

better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol.* 2008;26(29):4791-7.

26. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115(3):453-74.

27. Bullinger L, Dohner K, Dohner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35(9):934-46.

28. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059-74.

29. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 2002;100(5):1532-42.

30. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:179-98.

31. Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2005;23(26):6285-95.

32. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012;150(2):264-78.

33. Abdel-Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;121(18):3563-72.

34. Ihlow J. Langzeitprognose der Akuten Myeloischen Leukämie in Abhängigkeit von klinischen und biologischen Risikofaktoren in einem großen hämatologischen Zentrum innerhalb der letzten 15 Jahre. *Molekulare Pathogenese der AML.* Berlin: Medizinischen Fakultät der Charité Berlin; 2017.

35. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood.* 2000;96(12):3907-14.

36. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* 2004;4(5):361-70.

37. Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, et al. Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood.* 1991;78(11):2962-8.

38. Bowen DT, Frew ME, Hills R, Gale RE, Wheatley K, Groves MJ, et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups

but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*. 2005;106(6):2113-9.

39. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97(11):3589-95.

40. Illmer T, Thiede C, Fredersdorf A, Stadler S, Neubauer A, Ehninger G, et al. Activation of the RAS Pathway Is Predictive for a Chemosensitive Phenotype of Acute Myelogenous Leukemia Blasts. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(9):3217-24.

41. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):11-22.

42. Downing JR. The core-binding factor leukemias: lessons learned from murine models. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2003;13(1):48-54.

43. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):502-13.

44. Tonks A, Tonks AJ, Pearn L, Pearce L, Hoy T, Couzens S, et al. Expression of AML1-ETO in human myelomonocytic cells selectively inhibits granulocytic differentiation and promotes their self-renewal. *Leukemia*. 2004;18(7):1238-45.

45. Peterson LF, Zhang DE. The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene*. 2004;23(24):4255-62.

46. Naoe T, Kiyoi H. Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. *Int J Hematol*. 2013;97(2):165-74.

47. Shurtleff SA, Meyers S, Hiebert SW, Raimondi SC, Head DR, Willman CL, et al. Heterogeneity in CBF beta/MYH11 fusion messages encoded by the inv(16)(p13q22) and the t(16;16)(p13;q22) in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1995;85(12):3695-703.

48. Nerlov C. C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(5):394-400.

49. Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(2):89-101.

50. Slany RK. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica*. 2009;94(7):984-93.

51. Muntean AG, Hess JL. The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:283-301.

52. Guenther MG, Jenner RG, Chevalier B, Nakamura T, Croce CM, Canaani E, et al. Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(24):8603-8.
53. Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood*. 2003;102(7):2395-402.
54. Vickers M, Jackson G, Taylor P. The incidence of acute promyelocytic leukemia appears constant over most of a human lifespan, implying only one rate limiting mutation. *Leukemia*. 2000;14(4):722-6.
55. Puccetti E, Ruthardt M. Acute promyelocytic leukemia: PML/RARalpha and the leukemic stem cell. *Leukemia*. 2004;18(7):1169-75.
56. Yang L, Rau R, Goodell MA. DNMT3A in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(3):152-65.
57. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2424-33.
58. Inoue S, Lemonnier F, Mak TW. Roles of IDH1/2 and TET2 mutations in myeloid disorders. *Int J Hematol*. 2016;103(6):627-33.
59. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18(6):553-67.
60. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *The New England journal of medicine*. 2014;371(26):2488-98.
61. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9-16.
62. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-8.
63. Vardiman JW, Brunning RD, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. p. 18.
64. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.

65. Behl C, Moosmann B. Molekulare Mechanismen des Alterns Über das Altern der Zellen und den Einfluss von oxidativem Stress auf den Alternsprozess. In: Staudinger UM, Häfner H, editors. Was ist Alter(n)? Neue Antworten auf eine scheinbar einfache Frage. Berlin: Springer-Verlag; 2008. p. 9-32.
66. Wilson DM, Bohr VA, McKinnon PJ. DNA damage, DNA repair, ageing and age-related disease. *Mech Ageing Dev.* 2008;129(7-8):349-52.
67. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood.* 2006;107(9):3481-5.
68. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood.* 2009;113(18):4179-87.
69. Creutzig U, Zimmermann M, Reinhardt D, Rasche M, von Neuhoff C, Alpermann T, et al. Changes in cytogenetics and molecular genetics in acute myeloid leukemia from childhood to adult age groups. *Cancer.* 2016;122(24):3821-30.
70. Lowenberg B. Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001;14(1):65-75.
71. Rollig C, Bornhauser M, Thiede C, Taube F, Kramer M, Mohr B, et al. Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *J Clin Oncol.* 2011;29(20):2758-65.
72. Mrozek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2012;30(36):4515-23.
73. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, et al. Absence of the Wild-Type Allele Predicts Poor Prognosis in Adult Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics and the Internal Tandem Duplication of FLT3. A Cancer and Leukemia Group B Study. 2001;61(19):7233-9.
74. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis: Presented in part at the 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 2334). *Blood.* 2002;99(12):4326-35.
75. Eifeld AK, Kohlschmidt J, Mrozek K, Blachly JS, Walker CJ, Nicolet D, et al. Mutation patterns identify adult patients with de novo acute myeloid leukemia aged 60 years or older who respond favorably to standard chemotherapy: an analysis of Alliance studies. *Leukemia.* 2018;32(6):1338-48.

76. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* 2003;21(24):4642-9.
77. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood* 2004;18(2):115-36.
78. Schaich M. Akute Leukämien. In: Possinger K, Regierer AC, Eucker J, editors. *Facharztwissen Hämatologie Onkologie 4ed.* München: Urban & Fischer; 2017. p. 353-80.
79. Bohr VA, Michael Anson R. DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging. *Mutation Research/DNAging.* 1995;338(1):25-34.
80. Gensler HL, Bernstein H. DNA Damage as the Primary Cause of Aging. *The Quarterly Review of Biology.* 1981;56(3):279-303.
81. Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer.* 2006;107(9):2099-107.
82. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 1999;341(14):1051-62.
83. Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R. *Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie.* 5 ed. Heidelberg: Hüthig Jehle Rehm GmbH; 2014.
84. Molica M, Breccia M, Foa R, Jabbour E, Kadia TM. Maintenance therapy in AML: the past, the present and the future. *American Journal of Hematology.* 2019.
85. Schlenk RF, Dohner H. Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. *American Society of Hematology.* 2013;2013:324-30.
86. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, et al. Intensive Postremission Chemotherapy in Adults with Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 1994;331(14):896-903.
87. Krug U, Röllig C, Koschmieder A, Heinecke A, Sauerland MC, Schaich M, et al. 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. *The Lancet.* 2010;376(9757):2000-8.
88. Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Kuliczowski K, Mayer J, Shelekhova T, et al. Results from a randomized phase III trial of decitabine versus supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed AML. *Journal of Clinical Oncology.* 2011;29(15):6504-.

89. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(4):562-9.
90. Kern W, Schleyer E, Unterhalt M, Wörmann B, Büchner T, Hiddemann W. High antileukemic activity of sequential high dose cytosine arabinoside and mitoxantrone in patients with refractory acute leukemias. *Cancer*. 1997;79(1):59-68.
91. Kern W, Aul C, Maschmeyer G, Kuse R, Kerkhoff A, Grote-Metke A, et al. Granulocyte colony-stimulating factor shortens duration of critical neutropenia and prolongs disease-free survival after sequential high-dose cytosine arabinoside and mitoxantrone (S-HAM) salvage therapy for refractory and relapsed acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology*. 1998;77(3):115-22.
92. Fathi AT, Chen Y-B. Treatment of Relapse of Acute Myeloid Leukemia After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2014;9(2):186-92.
93. Talati C, Sweet K. Recently approved therapies in acute myeloid leukemia: A complex treatment landscape. *Leukemia Research*. 2018;73:58-66.
94. Federici L, Falini B. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: a tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Sci*. 2013;22(5):545-56.
95. Mitrea DM, Grace CR, Buljan M, Yun MK, Pytel NJ, Satumba J, et al. Structural polymorphism in the N-terminal oligomerization domain of NPM1. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111(12):4466-71.
96. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan P-K, et al. Nucleophosmin/B23 Is a Target of CDK2/Cyclin E in Centrosome Duplication. *Cell*. 2000;103(1):127-40.
97. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(3):254-66.
98. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*. 2009;114(14):3024-32.
99. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107(10):4011-20.
100. De Propriis MS, Raponi S, Diverio D, Milani ML, Meloni G, Falini B, et al. High CD33 expression levels in acute myeloid leukemia cells carrying the nucleophosmin NPM1 mutation. *Haematologica*. 2011;96(10):1548-51.

101. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;106(8):2854-61.
102. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K, et al. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature*. 2005;437(7055):147-53.
103. Pasqualucci L, Liso A, Martelli MP, Bolli N, Pacini R, Tabarrini A, et al. Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: Impact on WHO classification. *Blood*. 2006;108(13):4146-55.
104. Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM, Cheng K, Clohessy JG, Viale A, et al. Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood*. 2008;111(7):3859-62.
105. den Besten W, Kuo ML, Williams RT, Sherr CJ. Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. *Cell Cycle*. 2005;4(11):1593-8.
106. Bonetti P, Davoli T, Sironi C, Amati B, Pelicci PG, Colombo E. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma. *J Cell Biol*. 2008;182(1):19-26.
107. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, Becker H, Maharry K, Mrozek K, et al. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012;30(7):742-50.
108. Ribeiro AF, Pratcorona M, Erpelinck-Verschueren C, Rockova V, Sanders M, Abbas S, et al. Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;119(24):5824-31.
109. Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, Kowarsch A, Nadarajah N, Eder C, et al. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26(5):934-42.
110. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014;506(7488):328-33.
111. Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(7):2548-53.
112. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106(12):3740-6.

113. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedeu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*. 2013;121(14):2734-8.
114. Linch DC, Hills RK, Burnett AK, Khwaja A, Gale RE. Impact of FLT3(ITD) mutant allele level on relapse risk in intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Blood*. 2014;124(2):273-6.
115. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(5):454-64.
116. Schlenk RF, Paschka P, Krzykalla J, Weber D, Kapp-Schwoerer S, Gaidzik VI, et al. Gemtuzumab Ozogamicin in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML): Results from the Prospective Randomized AMLSG 09-09 Phase-III Study. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):81-.
117. Leukämie-Studienregister D. Randomisierte Phase III Studie zu niedrig dosiertem Cytarabin und Etoposid mit oder ohne All-trans Retinsäure bei älteren, für eine intensive Chemotherapie ungeeigneten Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie und NPM1-Genmutation [Internet] Letzte Aktualisierung: 21.02.2017, Zitiert am 02.04.2020. URL: <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/trial/detail.html?id=399>. 2010.
118. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079-89.
119. Luskin MR, Lee J-W, Fernandez HF, Abdel-Wahab O, Bennett JM, Ketterling RP, et al. Benefit of high-dose daunorubicin in AML induction extends across cytogenetic and molecular groups. *Blood*. 2016;127(12):1551-8.
120. Schlenk RF, Weber D, Fiedler W, Salih HR, Wulf G, Salwender H, et al. Midostaurin added to chemotherapy and continued single-agent maintenance therapy in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD. *Blood*. 2019;133(8):840-51.
121. Voso MT, Larson RA, Prior T, Marcucci G, Jones D, Krauter J, et al. Ratify (Alliance 10603): Prognostic Impact of FLT3 tyrosine Kinase Domain (TKD) and NPM1 Mutation Status in Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) Treated with Midostaurin or Placebo Plus Standard Chemotherapy. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):2668-.
122. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2020;383(7):617-29.

123. Michallet M, Thomas X, Vernant J, Kuentz M, Socie G, Esperou-Bourdeau H, et al. Long-term outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for advanced stage acute myeloblastic leukemia: a retrospective study of 379 patients reported to the Societe Francaise de Greffe de Moelle (SFGM). *Bone marrow transplantation*. 2000;26(11):1157-63.
124. Singhal S, Powles R, Henslee-Downey P, Chiang K, Treleaven J, Godder K, et al. Allogeneic transplantation from HLA-matched sibling or partially HLA-mismatched related donors for primary refractory acute leukemia. *Bone marrow transplantation*. 2002;29(4):291-5.
125. Fung H, Stein A, Slovak M, O'donnell M, Snyder D, Cohen S, et al. A long-term follow-up report on allogeneic stem cell transplantation for patients with primary refractory acute myelogenous leukemia: impact of cytogenetic characteristics on transplantation outcome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2003;9(12):766-71.
126. Xu WL, Shen HL, Ao ZF, Chen BA, Xia W, Gao F, et al. Combination of tetrandrine as a potential-reversing agent with daunorubicin, etoposide and cytarabine for the treatment of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia. *Leuk Res*. 2006;30(4):407-13.
127. Jackson GH. Use of fludarabine in the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematol J*. 2004;5 Suppl 1:S62-7.
128. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131(12):1275-91.
129. Moors I, Vandepoele K, Philippe J, Deeren D, Selleslag D, Breems D, et al. Clinical implications of measurable residual disease in AML: Review of current evidence. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;133:142-8.
130. Beneton CB, Ravandi F. A Mind Map for Managing Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. 2017;15(11).
131. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Blood*. 2014;124(23):3345-55.
132. Kronke J, Schlenk RF, Jensen KO, Tschurtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol*. 2011;29(19):2709-16.
133. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(5):422-33.

134. Balsat M, Renneville A, Thomas X, de Botton S, Caillot D, Marceau A, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol*. 2017;35(2):185-93.
135. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Falini B, et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*. 2009;114(11):2220-31.
136. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *American Journal of Clinical Oncology*. 1982;5(6):649-56.
137. Mülhardt C. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 6 ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009. p. 84-120.
138. GmbH Q. ipsogen® NPM1 mutA MutaQuant® Handbook [Internet] Letzte Aktualisierung: 01.03.2015, Zitiert am 02.05.2019. URL: <https://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=a35d5c51-c107-42d9-92f9-333d2e02c93a&lang=en2015>.
139. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*. 1995;4(6):357-62.
140. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit*. 2007;37(2):120-6.
141. Rutledge RG, Cote C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(16):e93.
142. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2474-86.
143. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, et al. 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*. 2005;106(12):3747-54.
144. Juliusson G, Jadersten M, Deneberg S, Lehmann S, Mollgard L, Wennstrom L, et al. The prognostic impact of FLT3-ITD and NPM1 mutation in adult AML is age-dependent in the population-based setting. *Blood Adv*. 2020;4(6):1094-101.

145. Lal A, Kwan E, al Mahr M, Zhou L, Ferrara D, Tobias V, et al. Molecular detection of acute lymphoblastic leukaemia in boys with testicular relapse. *Molecular pathology*. 1998;51(5):277-81.
146. Goulden N, Langlands K, Steward C, Katz F, Potter M, Chessells J, et al. PCR assessment of bone marrow status in 'isolated' extramedullary relapse of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 1994;87(2):282-5.
147. Neale GA, Pui CH, Mahmoud HH, Mirro J, Jr., Crist WM, Rivera GK, et al. Molecular evidence for minimal residual bone marrow disease in children with 'isolated' extra-medullary relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1994;8(5):768-75.
148. O'Reilly J, Meyer B, Baker D, Herrmann R, Cannell P, Davies J. Correlation of bone marrow minimal residual disease and apparent isolated extramedullary relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 1995;9(4):624-7.
149. Uckun FM, Gaynon PS, Stram DO, Sensel MG, Sarquis MB, Willoughby M. Bone marrow leukemic progenitor cell content in pediatric T-lineage acute lymphoblastic leukemia patients with an isolated extramedullary first relapse. *Leuk Lymphoma*. 2001;40(3-4):279-85.
150. Bachas C, Schuurhuis GJ, Hollink IH, Kwidama ZJ, Goemans BF, Zwaan CM, et al. High-frequency type I/II mutational shifts between diagnosis and relapse are associated with outcome in pediatric AML: implications for personalized medicine. *Blood*. 2010;116(15):2752-8.
151. Papadaki C, Dufour A, Seibl M, Schneider S, Bohlander SK, Zellmeier E, et al. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. *British Journal of Haematology*. 2009;144(4):517-23.
152. Chou W-C, Tang J-L, Lin L-I, Yao M, Tsay W, Chen C-Y, et al. Nucleophosmin Mutations in De novo Acute Myeloid Leukemia: The Age-Dependent Incidences and the Stability during Disease Evolution. *Cancer Research*. 2006;66(6):3310.
153. Rücker FG, Agrawal M, Corbacioglu A, Weber D, Kapp-Schwoerer S, Gaidzik VI, et al. Measurable residual disease monitoring in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22.1): results from the AML Study Group. *Blood*. 2019;134(19):1608-18.
154. Schlenk RF, Paschka P, Krzykalla J, Weber D, Kapp-Schwoerer S, Gaidzik VI, et al. Gemtuzumab ozogamicin in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: early results from the prospective randomized AMLSG 09-09 phase III study. *Journal of clinical oncology*. 2020;38(6):623-32.
155. Heuser M, Freeman SD, Ossenkoppele GJ, Buccisano F, Hourigan CS, Ngai LL, et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2021;138(26):2753-67.

156. Ossenkoppele G, Schuurhuis GJ. MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? *Hematology*. 2016;2016(1):356-65.

## 8 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz für die Bereitschaft, mir die Durchführung dieser Arbeit zu ermöglichen.

Ein besonderer Dank gebührt auch Dr. med. Oliver Kriege für seine stets verfügbare Unterstützung und Bereitschaft zur Diskussion. Für die Inspiration für das Thema bin ich sehr dankbar.

Zuletzt, aber nicht weniger wichtig, möchte ich meiner Ehefrau Amelie, meinen Kindern Mattea und Jonah sowie meinen Eltern Luise und Stephan meinen tiefsten Dank aussprechen. Ohne ihre unermüdliche, geduldige und liebevolle Unterstützung sowie Ermutigung während meines gesamten Studiums wäre diese Doktorarbeit nicht realisierbar gewesen.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Johannes Barucha, geb. Hilckmann  
Geburtsdatum, -ort: 03.11.1988, Dernbach

### Studium

10/2015-11/2021 Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Ärztliche Prüfung und Approbation erfolgten 11/2021

Seit 07/2019 Arbeit an der Dissertation „Monitoring minimaler Resterkrankung akuter myeloischer Leukämien mittels NPM1-mutationsspezifischer RT-PCR zwecks prädiktiver Rezidiverkennung“, III. Medizinische Klinik und Poliklinik für Hämatologie, Internistische Onkologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Mainz, Univ.-Prof. Dr. med. Theobald

2008-2009 Studiengang Informationstechnik an der Fachhochschule Koblenz (nicht beendet, da berufliche Neuorientierung)

06/2007 Carl-Benz-Schule Koblenz, Abschluss: Fachhochschulreife und staatlich geprüfter Assistent für Informatik

### Klinische Erfahrungen

07-10/2021 PJ-Tertial am Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein Koblenz/Kemperhof in der Kinder- und Jugendmedizin

11/2020-06/2021 PJ-Tertiale der Inneren Medizin und der Chirurgie am Robert- Bosch-Krankenhaus Stuttgart

02/2020 Einmonatige Famulatur in der Abteilung für Anästhesie und operative Intensivmedizin am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart, Prof. Dr. med. Wunder

09/2019 Einmonatige Famulatur in der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik für Hämatologie, Internistische Onkologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Mainz, Univ.-Prof. Dr. med. Theobald

03/2019 Einmonatige Famulatur in der Praxis für Innere Medizin, Dr. med. Schmittinger, Stuttgart

02/2018 Einmonatige Famulatur in der Facharztpraxis für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie, Dr. med. Peseschkian, Wiesbaden

### **Beruflicher Werdegang und Berufserfahrungen**

Seit 01/2021 Assistenzarzt an der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, Klinikum Esslingen

- Weiterbildung Fachkunde Verhaltenstherapie an der Akademie für Ärztliche Fortbildung der Bezirksärztekammer Südwürttemberg in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Tübingen

04/2013-12/2020 Vollzeittätigkeit als Gesundheits- und Krankenpfleger auf der Station Knochenmarks- und Stammzelltransplantation an der Universitätsmedizin Mainz (mit Aufnahme des Studiums als Teilzeitkraft bis 12/2020)

04/2010-04/2013 Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger an der Universitätsmedizin Mainz mit erfolgreichem Abschluss (Abschlussnote: 1,6)

09/2011 2-monatiger praktischer Einsatz an der Universitätsmedizin Schleswig-Holstein an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin im Bereich der Sozialpädiatrie (Programm für ausgewählte Schüler in der Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger)

05/2009-02/2010 Zivildienst beim DRK Rhein-Lahn-Westerwald mit der erfolgreichen Ausbildung zum Rettungssanitäter

### **Sonstiges**

Sprachen: Deutsch (Muttersprache)  
Englisch (Niveau B2)

IT-Kenntnisse: Geschulter Umgang mit Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint, Access, Outlook)  
Grundkenntnisse in IBM SPSS