
Aus der Medizinischen Klinik und
Poliklinik III - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**Quantifizierung von minimaler Resterkrankung bei akuter myeloischer
Leukämie mit NPM1 Mutation mittels Real-Time-PCR**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marlene Seibl
aus München

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:
Mitberichterstatter:

PD Dr. med. Karsten Spiekermann
Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gert Riethmüller
Prof. Dr. Ralph Rupp
Prof. Dr. Georg W. Bornkamm

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. Annika Dufour

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

20.01.2011

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Die akute myeloische Leukämie	1
1.2	Nucleophosmin	3
1.2.1	Struktur des NPM Gens und Proteins	3
1.2.2	Expression und Funktionen des NPM Proteins	4
1.2.3	Entdeckung von NPM1 Mutationen bei AML	5
1.2.4	Nachweis der NPM1 Mutationen	6
1.2.4.1	Auftreten von NPM1 Mutationen	6
1.2.4.2	Typen, Häufigkeit und Stabilität von NPM1 Mutationen	6
1.2.4.3	Zusammenhang zwischen NPM1 Mutationen, Karyotyp und anderen Mutationen	8
1.2.5	Nukleo-zytoplasmatischer Transport von Wildtyp-NPM	9
1.2.6	Veränderter nukleo-zytoplasmatischer Transport von Nucleophosmin in NPMc+AML	9
1.2.7	Mögliche Rolle von NPM Mutanten bei der Entstehung von Leukämien	9
1.2.8	Pathologische und klinische Eigenschaften von NPMc+ AML	10
1.2.9	Klinische Bedeutung von NPM1 Mutationen	11
1.2.9.1	Ansprechen auf Therapie und prognostischer Wert von NPM1 Mutationen	11
1.2.9.2	Überwachung von minimaler Resterkrankung	12
2	Zielsetzung der Arbeit	14
3	Material und Methoden	16
3.1	Materialien	16
3.1.1	Oligonukleotide	16
3.1.2	Zelllinien	17
3.1.2.1	OCI/AML3	17
3.1.2.2	NPM1 A negative Zelllinien	17
3.1.3	Blut- und Knochenmarkproben	17
3.1.4	Chemikalien und Kits	20
3.1.5	Labora Ausstattung	21
3.1.6	Software	22
3.2	Methoden	22
3.2.1	Zellkultur	22
3.2.2	Isolierung von mononukleären Zellen	23
3.2.3	RNA Präparation	23
3.2.3.1	RNA-Isolierung aus Patientenproben	23
3.2.3.2	RNA-Isolierung aus Zellen	24
3.2.4	cDNA-Synthese	24
3.2.5	Real-Time-PCR	25
3.2.5.1	Detektion der PCR-Produkte	26
3.2.5.2	Relative Quantifizierung im LightCycler	27

3.2.6	Mutationsanalyse mittels Schmelzkurven-PCR	30
3.2.7	Gelelektrophorese	32
4	Ergebnisse	33
4.1	cDNA als aus OCI/AML3 Zellen als Positivkontrolle	33
4.2	Etablierung einer Real-Time PCR (RQ-PCR) für die quantitative Bestimmung von NPM1 Typ A	33
4.2.1	Prinzip der Relativen Quantifizierung	33
4.2.2	Normalisierung über einen Calibrator	33
4.2.3	Ermittlung der Primer-Paare und Sonden	34
4.2.4	Programmierung LightCycler	35
4.2.5	Optimierung der PCR-Bedingungen für NPM1 Typ A	35
4.2.6	Etablierung der PCR für das Referenzgen ABL1	37
4.2.7	Erstellen der Standardkurven für die relative Quantifizierung	37
4.2.8	Sensitivität und Spezifität in Zelllinien	40
4.2.9	Etablierung des Tests mit Patientenproben	41
4.2.10	Reproduzierbarkeit	42
4.3	Auswertung der RQ-PCR-Daten mithilfe der LC SW 4.05	43
4.3.1	Datentransfer in SW 4.05	43
4.3.2	Quantifizierungsanalyse	43
4.3.3	Effizienzkorrektur	44
4.4	Anwendung der RQ-PCR auf Patientenproben	46
4.4.1	MRD Monitoring mit ausgewählten Patientenproben	46
4.4.1.1	Charakterisierung der verwendeten Patientenproben	46
4.4.1.2	Vergleich von Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung	46
4.4.1.3	Fallbeispiele	47
4.4.2	Stabilität der NPM1 Mutation	51
5	Diskussion	52
5.1	NPM1 A RQ-PCR	52
5.1.1	Vergleich one-step zu two-step RT-PCR	52
5.1.2	Vergleich von LightCycler und ABI PRISM 7700 SDS	53
5.1.3	Hydrolysesonden im Vergleich mit anderen Detektionssystemen	53
5.1.4	Wahl des Referenzgens	54
5.1.5	Normalisierung	55
5.1.6	Sensitivität	57
5.1.7	Spezifität	57
5.1.8	Reproduzierbarkeit	58
5.1.9	Alternativen zur RQ-PCR	60
5.1.10	Vergleich der NPM1 A RQ-PCR mit anderen Arbeiten	60
5.2	Übertragung der Ergebnisse der OCI/AML3 Zellen auf Patientenproben	62
5.2.1	Datenauswertung der Patientenproben	62
5.2.2	Ergebnisse bei Beispielpatienten	63

5.3	Verwendung von peripherem Blut als Material für die RQ-PCR	63
5.4	Prognoseschätzung mithilfe NPM1	65
5.5	NPM1 als MRD-Marker	65
5.6	Ausblick	67
5.6.1	Reproduzierbarkeit und Stabilität	67
5.6.2	NPM1 Mutationen Typ B und D	67
5.6.3	Klassifikation von AML mithilfe von Genexpressionsprofilen	68
5.6.4	Klassifikationen für AML mit normalem Karyotyp	68
6	Zusammenfassung	70
7	Abstract	72
8	Literaturverzeichnis	73
9	Anhang	80
9.1	Danksagung	80
9.2	Abkürzungsverzeichnis	81
9.3	Curriculum vitae	84

1 Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne klonale Neoplasie myeloischer Zellen mit autonomer Proliferation und meist Ausschwemmung unreifer Blasten ins Blut. Die AML kann in jedem Lebensalter auftreten, wobei die Inzidenz bis zum 4. Lebensjahrzehnt 1/100 000 pro Jahr beträgt und bis zum 7. Lebensjahrzehnt bis auf 10/100 000 pro Jahr ansteigt. Bis in die 70er Jahre basierte die Diagnose ausschließlich auf pathologischen und zytologischen Untersuchungen von Knochenmark und Blut. Fünf-Jahres Überlebensraten betrugen weniger als 15%. Im Laufe der letzten Jahrzehnte verbesserten sich sowohl die Diagnose der verschiedenen Untergruppen als auch die Therapiemöglichkeiten der AML. Trotz dieser Fortschritte liegen die Überlebensraten heute bei unter 65-jährigen nur bei 40% (Löwenberg, 1999). Aus der ungehemmten Proliferation des leukämischen Klons im Knochenmark und der Verdrängung der präexistenten nichtneoplastischen Hämatopoese resultieren klinisch Anämie und Thrombozytopenie. Da die Blasten meist in das periphere Blut ausgeschwemmt werden, findet man in der Mehrzahl der Fälle eine erhebliche Leukozytose. Die Diagnosestellung erfolgt über blastäre Elemente im peripheren Blut und einem Blastenanteil von über 20% der kernhaltigen Zellen im Knochenmark. In der Regel findet man eine erhebliche Hyperzellularität des Knochenmarks.

Zurzeit werden sowohl die FAB (French-American-British-Cooperative Group) Klassifikation als auch die 2008 zuletzt revidierte WHO (World Health Organisation) Klassifikation zur Einteilung der akuten myeloischen Leukämien benutzt (Bennet, 1976 und Vardiman, 2009). Bei der FAB-Klassifikation erfolgt die Einteilung in acht Gruppen entsprechend des Reifegrades der Blasten und ihrer Zugehörigkeit zu einer hämatopoetischen Linie. Die WHO-Einteilung in vier Hauptgruppen berücksichtigt auch rekurrente zytogenetische Alterationen. Die Subtypisierung ist von therapeutischer und prognostischer Relevanz (Kriener, 2004).

Tabelle 1: WHO Klassifikation der AML auf der Basis zytogenetischer und molekulargenetischer Befunde

WHO-Klassifikation der AML und verwandte myeloische Neoplasien		
I.	AML mit rekurrenten genetischen Aberrationen, Translokationen/Inversionen	<p>AML mit t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></p> <p>AML mit inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22); <i>CBFβ/MYH11</i></p> <p>Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)(q22;q12); <i>PML/RARα</i></p> <p>AML mit t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i></p> <p>AML mit t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i></p> <p>AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVII</i></p> <p>AML (Megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKLI</i></p> <p>Genmutationen:</p> <p>Provisorische Entität: AML mit mutiertem <i>NPM1</i></p> <p>Provisorische Entität: AML mit mutiertem <i>CEBPA</i></p>
II.	AML mit Myelodysplasie-assoziierten Eigenschaften	<p>aus MDS entstanden oder</p> <p>MDS zugehörige zytogenetische Veränderung</p> <p>>50% der Zellen einer oder mehrerer myeloischen Zelllinien dysplastisch</p>
III.	Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien	
IV.	AML ohne weitere Spezifizierung	<p>AML mit minimaler Differenzierung</p> <p>AML ohne Ausreifung</p> <p>AML mit Ausreifung</p> <p>Akute myelomonozytäre Leukämie</p> <p>Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie</p> <p>Akute erythroide Leukämien</p> <p>Reine erythroide Leukämien</p> <p>Erythroleukämie erythroid/myeloisch</p> <p>Akute megakaryoblastäre Leukämie</p> <p>Akute basophile Leukämie</p> <p>Akute Panmyelose mit Myelofibrose</p>
V.	Myeloisches Sarkom	
VI.	Myeloische Proliferation assoziiert mit dem Down-Syndrom	
VII.	Blastische plasmatoide dendritische Zell Neoplasien	

Modifiziert nach: Vardiman, 2009

Tabelle 2: FAB-Klassifikation der AML nach morphologischen Kriterien

FAB-Subtyp		Häufigkeit (%)
AML-M0	akute myeloische Leukämie mit minimaler myeloischer Differenzierung	5-10
AML-M1	akute Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung	10-20
AML-M2	akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung	30-45
AML-M3	akute Promyelozytenleukämie	5-10
AML-M4	akute myelomonozytäre Leukämie	20
AML-M5a	akute Monoblastenleukämie	5
AML-M5b	akute Monozytenleukämie	5
AML-M6	akute Erythroleukämie	5
AML-M7	akute Megakaryoblastenleukämie	5

Modifiziert nach: Kriener, 2004

AML mit normalem Karyotyp (AML-NK), die 40-50% der Fälle ausmacht, ist die biologisch und klinisch am wenigsten erforschte und verstandene Gruppe. Bei molekulargenetischen Analysen von AML-NK wurden sowohl verschiedene Mutationen in Genen für Transkriptionsfaktoren (AML1 2%-3%, CEBPA 15%-20% der Fälle), Rezeptortyrosinkinasen (FLT3 25%-30%, KIT 1%) (Schnittger, 2002 und Thiede 2002) und der RAS-Gruppe (10% der Fälle), als auch partielle Tandemduplikation des MLL-Gens (MLL-PTD; 5%-10% der Fälle) gefunden. Nucleophosmin (NPM1)-Genmutationen liegen in 50-60% der AML-NK bei Erwachsenen vor (Falini, 2005) und sind damit die häufigsten Mutationen bei adulter de-novo AML die bis jetzt beschrieben wurden. Da bei NPM1 Mutationen Nucleophosmin in das Zytoplasma disloziert ist, wurde diese AML-Untergruppe auch „NPM-cytoplasmic positive“ (NPMc+) AML genannt (Falini, 2007a).

1.2 Nucleophosmin

Nucleophosmin (NPM), auch B23, Numatrin oder NO38 genannt, ist ein Transportprotein zwischen Nukleus und Zytoplasma mit vorwiegend nukleolärer Lokalisation. Das NPM-Gen umspannt 25kb, besteht aus 12 Exons und liegt auf dem Chromosom 5q35. Es kodiert für drei alternative Spleißformen: B23.1 (np_002511), B23.2 (np_954654) und B23.3 (np_001032827) (Falini, 2007a).

1.2.1 Struktur des NPM Gens und Proteins

Die häufigste Isoform, B23.1, ist ein aus 294 Aminosäuren bestehendes Protein von ungefähr 37 kD, welches die N-Terminus-Region mit den anderen Isoformen gemeinsam hat. Es hat zusätzlich noch weitere funktionelle Domänen (Hingorani, 2000). Der N-Terminus besteht aus einer hydrophoben Region (Hingorani, 2000) welche die Selbst-

Oligomerisierung steuert und Chaperon-Aktivität besitzt. In ruhenden und proliferierenden Zellen besteht NPM zu über 95% als Oligomer. Sowohl die hydrophobe N-Terminus-Region als auch der multimere Zustand des NPMs scheinen ausschlaggebend für die korrekte Zusammensetzung von Ribosomen im Nukleolus zu sein. Der mittlere Teil des NPM enthält zwei Regionen mit sauren Aminosäuren welche entscheidend für die Histone-Bindung sind. Das Segment dazwischen übt Ribonuklease-Aktivität aus (Hingorani, 2000). Die C-Terminus Domäne bindet Nukleinsäuren und besitzt Ribonuklease-Aktivität (Hingorani, 2000). Essentiell für die NPM Lokalisation im Zellkern ist jeweils ein Tryptophan an Position 288 und 290. B23.1 ist außerdem mit einem zweiteiligen nuklearen Lokalisationssignal (NLS) (Hingorani, 2000), einem Leucin-reichen nuklearen Exportsignal (NES-Motiv) und verschiedenen Phosphorylierungsstellen ausgestattet. Immunhistochemisch zeigt B23.1 auf den Zellkern begrenzte Verteilung. B23.2 ist eine um die letzten 35 c-terminalen Aminosäuren des B23.1 verkürzte Isoform welche in Geweben nur in geringen Mengen gefunden wird. Immunhistochemisch ist B23.2 im Zytoplasma lokalisiert. Über B23.3 welches aus 259 Aminosäuren besteht ist nur wenig bekannt (Falini, 2007a).

1.2.2 Expression und Funktionen des NPM Proteins

Nucleophosmin ist ein Phosphoprotein welches ubiquitär in Geweben vorkommt. Obwohl der Großteil des NPM in der granulären Region des Nukleolus lokalisiert ist, pendelt es kontinuierlich zwischen Nukleus und Zytoplasma. Der nukleo-zytoplasmatische Transport des NPM Protein ist streng reguliert. Bedeutende Funktionen, wie der Transport von ribosomalen Komponenten in das Zytoplasma und die Regulation der Zentromer-Teilung sind eng mit der Fähigkeit, aktiv in bestimmte zelluläre Kompartimente zu wandern, verknüpft (Falini, 2007a, Okuwaki, 2008). Einige der Hauptfunktionen des NPM die bis jetzt erforscht worden sind, werden im Folgenden vorgestellt.

NPM spielt mit der Regulierung von Exportsignalen, der nukleo-zytoplasmatischen Shuttle Eigenschaft, und der Fähigkeit Nukleinsäuren zu binden, eine Schlüsselrolle in der Biogenese von Ribosomen. Diese Eigenschaften sind notwendig um den Transport von Ribosomenkomponenten in Form von rRNA vom Nukleus zum Zytoplasma zu ermöglichen. Chaperon-Aktivität des NPM-Proteins verhindert Proteinaggregation im Nukleolus während des Zusammenbaus von Ribosomen (Falini, 2007a).

NPM scheint aufgrund der Mitwirkung bei der Regulation der Proteintranslation eine zentrale Rolle im Gleichgewicht von Proteinsynthese, Zellwachstum und Proliferation zu

spielen. NPM Überexpression wird eng mit Zellproliferation korreliert. Im Knochenmark z.B. steigt die NPM-Expression stufenweise während der Reifung von Pro-Erythroblasten zu Normoblasten und von Promyelozyten zu Neutrophilen (Falini, 2007a). Darüber hinaus begünstigt NPM Überexpression das Überleben und die Reaktivierung von hämatopoetischen Stammzellen unter Stressbedingungen (Li 2006). Die Inhibition des NPM Transports oder der Verlust von NPM blockiert dagegen die Translation von Proteinen und resultiert damit in einem Zellzyklusarrest.

Weitere Funktionen des NPM-Proteins sind die Unterstützung der genomischen Stabilität (Grisendi, 2005b), und die Kontrolle der DNA-Reparatur und der Zentrosomteilung während der Mitose. Die Duplikation des Zentrosoms erfolgt in Abstimmung mit der Duplikation der Chromosomen. NPM scheint vor Zentrosom-Hyperamplifizierung zu schützen, da seine Inaktivierung unrestriktive Zentrosomteilung und genetische Instabilität mit der erhöhten Gefahr von zellulärer Transformation bewirkt (Grisendi, 2005b).

Schließlich interagiert NPM mit den Tumorsuppressorgen p53 und p19Arf und deren Partnern und beeinflusst damit Zellproliferation und Apoptose. NPM reguliert p53 Level und Aktivität. Der Tumorsuppressor p53 spielt als Transkriptionsfaktor eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose-Induktion und der DNA-Reparatur.

Es existiert eine funktionelle Verbindung zwischen nukleolärer Integrität, NPM und p53 Stabilität (Colombo, 2002). Stimuli, die zellulären Stress (z.b. UV-Strahlung oder Medikamente die in die rRNA Prozessierung eingreifen) auslösen, führen zu einem Verlust von nukleolärer Integrität, zur Umlagerung von NPM vom Nukleolus ins Zytoplasma und zur Aktivierung von p53 (Falini, 2007a).

1.2.3 Entdeckung von NPM1 Mutationen bei AML

NPM wurde von Onkologen als Partnergen für mehrere chromosomale Translokationen erkannt. Diese Translokationen resultieren in chimären Genen, die für Fusionsproteine wie NPM-ALK (anaplastic lymphoma kinase), NPM RAR α (retinoic acid receptor α) oder NPM-MLF1 (myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1) kodieren, die wiederum Heterodimere mit NPM bilden und Zellveränderungen hervorrufen (Falini, 2007b). 1999 wurden die ersten AML Fälle mit zytoplasmatischem NPM ohne ein dazugehöriges bekanntes NPM Fusionsprotein entdeckt. Aufgrund der Dislokierung von Nucleophosmin vom Zellkern ins Zytoplasma wurde diese Untergruppe „NPM-cytoplasmic positive“ (NPMc+) AML genannt. In den darauf folgenden Jahren wurde beobachtet, dass das Auftreten von zytoplasmatischem NPM die wichtigsten Chromosomenaberrationen

ausschließt, eng mit einem normalen Karyotyp korreliert ist und bestimmte klinische und biologische Merkmale zeigt (Falini, 2005). Durch Gen-Sequenzierung wurden bei zytoplasmatischem NPM Exon 12 Mutationen im NPM-Gen aufgedeckt (Falini, 2005).

1.2.4 Nachweis der NPM1 Mutationen

NPM Mutationen können mithilfe von verschiedenen Techniken wie denaturierender HPLC, Kapillarelektrophorese, LNA-mediated PCR clamping, und wie in dieser Arbeit mithilfe von RT-PCR, zuverlässig identifiziert werden. (Ammatuna, 2005; Roti, 2006; Noguera, 2005; Lin, 2006; Thiede, 2006b).

Immunhistochemischer Nachweis von zytoplasmatischem NPM bei AML wurde als prädiktiv für NPM1 Mutationen gefunden (Falini, 2006a) und ist damit ein indirekter Nachweis von NPM1 Mutationen. Die Vorteile dieser Methode sind die einfache Anwendung, geringe Kosten und die Möglichkeit zytoplasmatisches NPM mit der Morphologie und topographischen Verteilung von leukämischen Zellen zu korrelieren.

1.2.4.1 Auftreten von NPM1 Mutationen

NPM1 Mutationen sind AML-spezifisch, da andere humane Neoplasien konsistent auf den Zellkern beschränkte NPM Expression zeigen und gezeigt werden konnte, dass mutiertes NPM zytoplasmatische Expression zeigt. (Falini, 2005). NPM Mutationen wurden auch sporadisch bei chronischen myeloproliferativen Krankheiten detektiert (5/200 Fällen; 2,5%) (Caudill, 2006). In allen fünf Fällen lagen myelo-monozytäre Leukämien vor, von denen vier innerhalb eines Jahres in einer AML endeten. Dies legt nahe, dass sie einer M4 oder M5 mit deutlicher Monozytendifferenzierung entsprachen, die häufig NPM Mutationen tragen (Falini, 2005; Schnittger, 2005a). Zudem wurden NPM1 Mutationen in 2 der 38 (5,2%) myelodysplastischen Patienten gefunden. (Zhang, 2007). Jedoch ist es nicht einfach einen Fall als „NPM1-mutiertes Myelodysplastisches Syndrom“ zu definieren, da NPMc+ AML häufig Beteiligung mehrerer Zelllinien, und somit dysplastische Eigenschaften zeigt (Pasqualucci, 2006). NPM1 Mutationen sind eng mit de-novo AML assoziiert. Sekundäre AMLs, nach myeloproliferativen Erkrankungen/Myelodysplasie und therapieassoziiierter AML exprimieren selten zytoplasmatisches NPM (Falini, 2005).

1.2.4.2 Typen, Häufigkeit und Stabilität von NPM1 Mutationen

NPM1 Mutationen sind typischerweise heterozygot, die Zellen behalten ein Wildtyp-Allel. Bei AML im Kindesalter reicht die Inzidenz von 2,1% in Taiwan (Chou, 2006) bis zu 6,5%

in westlichen Ländern (Cazzaniga, 2005), was 9 bis 26,9% aller AML-NK Fälle bei Kindern ausmacht (Chou, 2006; Cazzaniga, 2005). Bei ungefähr 3000 erwachsenen AML Patienten liegt die Häufigkeit von NPM1 Mutationen zwischen 25% und 35%, was 45,7 bis 63,8% der erwachsenen AML-NK Fälle ausmacht (Schnittger, 2005a; Döhner, 2005; Verhaak, 2005; Thiede, 2006a; Chou, 2006; Suzuki, 2005; Boissel, 2005).

Basierend auf diesen Untersuchungen wird von einer unterschiedlichen molekularen Pathogenese der AML-NK bei Erwachsenen und Kindern ausgegangen.

Bis auf zwei Fälle welche die Splice-Donor-Sequenz der NPM1 Exons 9 und 11 betrifft, sind Mutationen, soweit bekannt, auf das Exon 12 beschränkt. (Falini, 2005; Schnittger, 2005a; Döhner, 2005; Verhaak, 2005; Thiede, 2006a; Chou, 2006; Suzuki, 2005; Boissel, 2005). Die häufigste NPM1 Mutation, welche Mutation A genannt wurde (Falini, 2005), ist eine Duplikation eines TCTG Tetranukleotides an Position 956 bis 959 der Referenzsequenz (GenBank Accession Number NM_002520) und wurde in 75%-80% aller NPM1 Mutationen gefunden. Mutationen B und D wurden in ungefähr 10% und 5% der NPMc+ AML Fälle beobachtet. Alle anderen Mutationen sind selten. Bis 2007 sind insgesamt 37 verschiedene NPM1 Mutationen identifiziert worden (Falini, 2007a). Die bekanntesten sind folgend in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Die bekanntesten NPM Mutationen

Typ der Mutation	GenBank Accession No.	Sequenz
Wildtyp	NM_002520	GATCTCTG.....GCAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAATAG
Mutation A	AY740634	GATCTCTG CTGG CAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAATAG
Mutation B	AY740635	GATCTCTG CATG CAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAATAG
Mutation C	AY740636	GATCTCTG CGTG CAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAATAG
Mutation D	AY740637	GATCTCTG CCTG CAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAATAG
Mutation E	AY740638	GATCTCTG.....GCAGT CTCTTGCCCA AGTCTCTTTAAGAAATAG
Mutation F	AY740639	GATCTCTG.....GCAGT CCCTGGAGAA AGTCTCTTTAAGAAATAG

Modifiziert nach: Falini, 2005

Laut Suzuki et. al scheinen Veränderungen des NPM1 Gens stabiler zu sein, als Mutationen des Gens der Rezeptor Tyrosinkinase FLT3 (Suzuki, 2005), welche die häufigsten genetischen Alterationen in der AML darstellen. Nach Chou et. al ist ein Verlust der NPM1 Mutation bei einem Rezidiv selten, und könnte aufgrund der Proliferation eines anderen leukämischen Klons vorkommen (Chou, 2006). In einigen Fällen wurde der Verlust von NPM1 Mutationen mit dem Übergang von einem normalen zu einem abnormalen Karyotyp in Zusammenhang gebracht (Chou, 2006; Suzuki, 2005). AML Patienten mit einem Wildtyp NPM1 Gen zum Zeitpunkt der Diagnose scheinen im Laufe der Erkrankung keine NPM1 Mutation zu erwerben, was die Annahme nahe legt,

dass die Mutationen in der Progression der Erkrankung kaum eine Rolle spielen (Chou, 2006).

1.2.4.3 Zusammenhang zwischen NPM1 Mutationen, Karyotyp und anderen Mutationen
Zytoplasmatisches NPM ist, wie bei der NPM1 Mutationsanalyse von über Tausend AML Patienten bestätigt worden ist (Schnittger, 2005a; Döhner, 2005; Verhaak, 2005; Thiede, 2006a; Cazzaniga, 2005; Suzuki, 2005; Boissel, 2005), eng mit normalem Karyotyp assoziiert. Chromosomale Veränderungen, die nur in wenigen NPMc+ AML Fällen gefunden worden sind (14%) (Falini, 2005), sind wahrscheinlich sekundär da i) sie in Typ und Häufigkeit ähnlich zu sekundären chromosomalen Veränderungen bei AML mit rekurrenten Veränderungen sind, ii) Zellen mit einem abnormen Karyotyp Subklone in der leukämischen Population mit normalem Karyotyp darstellen, und iii) diese Veränderungen gelegentlich zum Zeitpunkt des Rezidivs von Patienten mit AML-NK bei Erstdiagnose auftreten (Falini, 2007a).

Mehrere Studien beschreiben, dass NPMc+ AML häufig von einer internen Tandem-Duplikation der Rezeptortyrosinkinase FLT3 (FLT3-ITD) begleitet ist (Falini, 2005; Schnittger, 2005a; Döhner, 2005; Verhaak, 2005; Thiede, 2006a). NPM1 und FLT3-TKD (Tyrosin-Kinase-Domäne) korrelierten in einigen Studien (Schnittger, 2005a; Döhner, 2005; Suzuki, 2005), in anderen nicht (Falini, 2005; Verhaak, 2005). Thiede et al. beobachteten, dass NPM1 Mutationen primäre Ereignisse sind, welche gefolgt werden von der Entstehung von FLT3-ITD oder anderen Mutationen (Thiede, 2006a).

Eine partielle Tandemduplikation des mixed-lineage-leukemia-Gens (MLL-PTD) fällt selten mit zytoplasmatischem/mutiertem NPM zusammen (Falini, 2005). Einige Autoren (Schnittger, 2005a; Döhner, 2005) berichten über keinen Unterschied in der Häufigkeit von CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA) Mutationen bei NPM1 mutierten, zu NPM1 unmutierten AML-NK, währenddessen Chou et al. eine negative Korrelation zwischen NPM1 und CEPBA Mutationen fanden (Chou, 2006).

Neuroblastoma RAS viral oncogene (NRAS) Mutationen und Mutationen der Rezeptortyrosinkinase KIT wurden nicht signifikant mit NPM1 Mutationen assoziiert (Schnittger, 2005a; Döhner, 2005). KRAS Mutationen wurden in 5/8 AML Fällen mit NPM1 Mutationen gemeldet (Verhaak, 2005). Wenig überraschend kommen Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53 selten bei NPMc+ AML vor (Suzuki, 2005), da sie hauptsächlich mit abnormalem Karyotyp in Verbindung gebracht werden.

1.2.5 Nukleo-zytoplasmatischer Transport von Wildtyp-NPM

Obwohl NPMwt ein nukleo-zytoplasmatisches Shuttle-Protein ist, ist die IHC-Lokalisation auf den Zellkern beschränkt. Von der Analyse der funktionellen Domänen ist bekannt, dass das Nukleäre-Lokalisations-Signal (NLS) NPM vom Zytoplasma zum Nukleoplasma steuert, wo es durch seine nukleoläre Bindungsdomäne in den Zellkern transloziert wird. Der nukleäre Export von NPM wird über einen Export-Rezeptor vermittelt. Unter physiologischen Umständen überwiegt der Import von NPMwt in den Zellkern gegenüber dem Export um ein Vielfaches (Falini, 2007a).

1.2.6 Veränderter nukleo-zytoplasmatischer Transport von Nucleophosmin in NPMc+AML

Bei NPMc+ AML überwiegt die zytoplasmatische Lokalisation von NPM aufgrund von zwei mutationsbedingten Veränderungen am C-Terminus von NPM (Falini, 2006b). Die zytoplasmatische Lokalisation von NPM1 kann anhand von Immunhistochemie nachgewiesen werden (Falini, 2007a). Die Veränderungen sind die Bildung eines zusätzlichen Leucin-reichen NES Motivs (Nakagawa, 2005) und der Verlust der AS Tryptophan an Position 288 und 290 (oder nur 290) (Falini, 2007a). Beide Veränderungen sind bedeutend für eine Störung des Transports des mutierten NPM (Falini, 2006b).

1.2.7 Mögliche Rolle von NPM Mutanten bei der Entstehung von Leukämien

NPM1 gehört einer Kategorie von Genen an, denen man abhängig von der Gendosis, dem Expressionslevel, interagierenden Partnern und Kompartimentierung, sowohl Onkogen-, als auch Tumorsuppressorgen-Eigenschaften zuschreibt (Grisendi, 2006).

Bei unterschiedlichen Tumoren und hämatologischen Erkrankungen kommen sowohl Überexpressionen, Transkolationen, Mutationen sowie auch Deletionen des NPM1 Gens vor. NPM Überexpression korreliert mit unkontrolliertem Zellwachstum und Zelltransformation. Aber auch die Reduzierung der NPM Expression kann in genomischer Instabilität und Zentromer-Amplifikation, mit dem Risiko zellulärer Veränderungen resultieren. NPM1 scheint Zellwachstum zu fördern, da als Antwort auf mitogene Stimuli die Expression zunimmt, und es in hochproliferierenden und malignen Zellen in besonders hohem Umfang detektiert werden kann. Andererseits kann NPM über eine positiv regulatorische Interaktion mit dem ARF-Protein, und damit über ARF Tumor-Suppressor-Wege, zu wachstumshemmenden Mechanismen beitragen. Dadurch kann auch ein Verlust der NPM Expression oder Funktion zur Tumorentstehung beitragen (Grisendi, 2006).

Zurzeit existiert kein experimentelles Modell für NPMc+ AML. In NPM Knock-out Mäusen ist NPM in die Kontrolle der Hämatopoese (speziell Erythropoese) involviert. NPM Haploinsuffizienz ist hier mit uneingeschränkter Zentromerduplikation assoziiert, was zu genomischer Instabilität, und der Entstehung eines hämatologischen Syndroms führt, welches an die Myelodysplasie beim Menschen erinnert (Grisendi, 2005b). Bei NPMc+ AML könnte man sagen, dass Blasten eine Form von NPM Haploinsuffizienz zeigen, da ein NPM Allel mutiert ist und die NPM Mutanten das NPMwt des nicht betroffenen Allels ins Zytoplasma dislozieren. NPMc+ AML ist allerdings mit einem normalen Karyotyp assoziiert und NPM1 Mutationen sind bei Myelodysplasie beim Menschen sehr selten.

Bei der Entstehung von AML beim Menschen werden andere Eigenschaften von mutiertem NPM diskutiert, die leukämische Transformation fördern. Zytoplasmatisches NPM könnte zur Entstehung von AML beitragen, indem es ARF, ein wichtiges Anti-Onkogen inaktiviert. In bestimmten Fibroblasten delokalisiert humanes leukämisches NPM1 Typ A Protein NPMwt und ARF vom Nukleolus zum Zytoplasma. Dies führt zu verminderter p53-abhängiger und p53-unabhängiger ARF Aktivität. Wenn ARF und mutiertes NPM-Protein in einem Komplex vorliegen führt dies zu einer Beeinträchtigung der Stabilität von ARF und am G1/S Übergang des Zellzyklus kommt es darauf folgend seltener zu einem p53-abhängigem Zellzyklusarrest. ARF ist nur eines der potenziellen Ziele von NPM Mutanten und es wird erwartet, dass neue Moleküle entdeckt werden, die mit mutiertem NPM interagieren und zur Entstehung von Leukämien beitragen.

1.2.8 Pathologische und klinische Eigenschaften von NPMc+ AML

NPMc+ AML zeigt ein weites morphologisches Spektrum (Falini, 2005), allerdings kommen NPM1 Mutationen in den FAB Kategorien M4 und M5 häufiger vor (Falini, 2005; Schnittger, 2005a; Döhner, 2005). Über 95% der NPMc+ AML Fälle sind CD34-negativ (Falini, 2005). Ein weiteres Merkmal ist die Beteiligung mehrerer Zelllinien (myeloid, monozyt, erythroid und megakaryozyt, jedoch nicht lymphoid) (Pasqualucci, 2006), unabhängig von weiteren genetischen Alterationen, wie FLT3-ITD. Die häufige Beteiligung mehrerer Zelllinien ist überraschend, da sie meist mit sekundären Leukämien vergesellschaftet wird und NPMc+ AML meistens de-novo Leukämien sind. Die Blastenzahl ist bei NPM Mutierten höher als bei NPMwt AML-NK (Döhner, 2005; Thiede, 2006a), und steigt bei gleichzeitiger FLT3-ITD Mutation (Thiede, 2006a) und mit dem LDH Serumspiegel (Döhner, 2005). NPM1 Mutationen korrelieren mit einer

extramedullären Beteiligung der AML, hauptsächlich Gingivahyperplasie und Lymphadenopathie, möglicherweise weil die extramedulläre Ausbreitung meist bei M4 und M5 auftritt und diese Subtypen häufig NPM1 Mutationen besitzen (Schnittger, 2005a; Döhner, 2005).

Thrombozytenzahlen sind bei AML mit NPMc+ höher als bei AML-NK mit Wildtyp NPM1 (Döhner, 2005; Thiede, 2006a). Interessanterweise zeigen Knochenmarkbiopsien von NPMc+ AML (besonders M4) häufig eine hohe Anzahl von Megakaryozyten die mutiertes NPM exprimieren und dysplastische Eigenschaften besitzen (Pasqualucci, 2006). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass Megakaryozyten mit NPM1 Mutationen eine bestimmte Kapazität für die Differenzierung von Thrombozyten beibehalten. NPM1 Mutationen sind bei Frauen häufiger (Schnittger, 2005a; Döhner, 2005; Thiede, 2006a), die Inzidenz von AML ist höher bei Männern (Thiede, 2006a). Diese Beobachtung scheint für NPM1 Mutationen spezifisch zu sein, da keine ähnliche Assoziation für FLT3-ITD (Thiede, 2006a), ebenfalls häufig bei AML-NK, zu sehen ist.

1.2.9 Klinische Bedeutung von NPM1 Mutationen

1.2.9.1 Ansprechen auf Therapie und prognostischer Wert von NPM1 Mutationen

Nach der Induktionstherapie zeigt AML-NK mit mutiertem, und damit zytoplasmatischem NPM eine höhere Rate von kompletter Remission als AML-NK ohne NPM1 Mutationen (Falini, 2005; Schnittger, 2005a; Thiede, 2006a; Suzuki, 2005). Döhner et al. schreiben, dass der NPM1 Mutationsstatus kein unabhängiger Vorhersagewert für das Ansprechen auf Chemotherapie ist, da die höchste Remissionsrate in der NPM1+/FLT-ITD negativen Gruppe beobachtet wurde, und die niedrigste Ansprechrate bei Patienten, die positiv für beide Mutationen sind (Döhner, 2005). In vier großen europäischen Studien (Schnittger, 2005a; Döhner, 2005; Verhaak, 2005; Thiede, 2006a) an über 1000 AML-NKs, kennzeichnen NPM1 Mutationen in Abwesenheit von FLT3-ITD eine Untergruppe von Patienten mit einer günstigen Prognose. Besonders jüngere NPM1+ AML Patienten (Döhner, 2005) ohne begleitendes FLT3-ITD zeigten eine 5-Jahres-Überlebens-Wahrscheinlichkeit von ungefähr 60%, das heißt ähnlich zu Langzeitverläufen von AML mit Core-Binding-Faktor (CBF) oder AML-NK mit CEBPA Mutationen (Falini, 2007a). Bei AML-NK gibt es also zwei Mutationen, NPM1 und FLT3-ITD, die mit guter bzw. schlechter Prognose assoziiert sind. Bei Patienten mit beiden Mutationen kann es sein, dass FLT3-ITD-induzierte, anti-apoptotische und proliferative Stoffwechselwege, besonders

über STAT5, den leukämischen Phänotyp dominieren. Dies würde erklären warum zwei andere Arbeitsgruppen (Suzuki, 2005; Boissel, 2005), die nicht nach NPM1 und begleitenden FLT3-ITD Mutationen unterschieden haben, keine Unterschiede im Überleben der NPM1 mutierten Fälle berichten können. Dies beweist den Nutzen von umfangreichem molekulargenetischem Screening bei AML-NK für die Risikostratifizierung von Patienten.

Es ist nicht klar, warum NPM1+/FLT-ITD- Patienten relativ gut auf Therapie ansprechen. Die Verteilung von nukleoplasmatischem und zytoplasmatischem NPMwt durch NPM Mutanten könnten die Proteinfunktionen beeinflussen. NPMwt schützt hämatopoetische Zellen vor p53 induzierter Apoptose bei zellulärem Stress (Li, 2005). Man könnte spekulieren, dass mutiertes NPM Zellen nicht schützen kann, was sie anfälliger für genotoxischen Stress der Chemotherapie macht. Naoe et. al haben die verschiedenen Studien zur Prognose von NPM1 positiver AML verglichen und die Ergebnisse als Tabelle veröffentlicht.

Tabelle 4: Klinische Relevanz der NPM1 Mutation bei AML

Referenz	Patientenzahl (normaler Karyotyp)	NPM1 mutiert (%) (normaler Karyotyp)	Prognose			
			CR	OS	EFS	RFS
Falini, 2005	591 (230)	35,2 (61,7)	F	NA	NA	NA
Suzuki, 2005	257 (97)	24,9 (47,4)	F	NS	NA	U
Boissel, 2005	(106)	(47)	NS	NS	NS	NS
Döhner, 2005	(300)	(48)	NS	NS	NA	F
Schnittger, 2005a	(401)	(52,9)	F	NS	F	NS
Verhaak, 2005	275 (116)	35 (64)	NA	NS	NS	NA
Thiede, 2006a	1485 (709)	27,5 (45,7)	F	F	F (DFS)	NA

(CR: komplette Remission; DFS: disease-free survival; EFS: event-free survival; F: favorable; NS: not significant; OS: overall survival; RFS: relapse-free survival; U: unfavorable; NA: not analyzed)

Modifiziert nach: Naoe, 2006

1.2.9.2 Überwachung von minimaler Resterkrankung

Als minimale Resterkrankung (MRD = minimal residual disease) bezeichnet man die im Körper verbliebene Tumorlast, im Fall der AML die nach einer Therapie verbliebenen Leukämiezellen. MRD Diagnostik gewinnt zunehmend an Bedeutung, begleitend zur Leukämiebehandlung und zur Erfolgsbeurteilung der durchgeführten Therapie. Auf der Grundlage dieses MRD-Monitorings sollen in Zukunft zunehmend risikoadaptierte Therapieprotokolle entwickelt werden, bei denen der Patient nicht nur anhand der zum Zeitpunkt der Diagnosestellung verfügbaren Risikomerkmale, sondern auch durch sein

individuelles Therapieansprechen einer weiteren Therapie zugeführt wird. Darüber hinaus verspricht man sich durch ein regelmäßiges MRD-Monitoring die Erkennung eines molekularen Rezidivs aufgrund residueller Leukämiezellen vor Auftreten der hämatologischen Manifestation, um damit eventuell eine erneute Therapie auch ohne den Nachweis eines hämatologischen Rezidivs beginnen zu können.

Da es notwendig ist eine geringe Anzahl von Tumorzellen zu detektieren, wird die minimale Resterkrankung üblicherweise anhand einer Genmutation oder Chromosomenaberration mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermittelt. Die relativ einfache Methode der Immunhistochemie ist nicht geeignet, da nicht annähernd die gleiche Sensitivität wie mit molekulargenetischen Methoden erreicht werden kann, worauf in der Zielsetzung dieser Arbeit noch mal eingegangen wird.

Die Diagnostik der minimalen Resterkrankung bei AML-NK ist erschwert durch das Fehlen von verlässlichen und eindeutigen molekularen Markern. Das Wilms' Tumor Gen 1 (WT1) (Weisser, 2005) oder FLT3-ITD (Schnittger, 2002) können z.B. für diesen Zweck verwendet werden. WT1 als molekularer Marker für MRD bei AML wird allerdings kontrovers diskutiert, da verschiedene Arbeitsgruppen unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Korrelation zwischen Klinik und WT1-Levels der Patienten sowie auch hinsichtlich der prognostischen Relevanz gefunden haben. Zudem konnte mit den bisher vorgestellten Assays keine sehr hohe Sensitivität in der Detektion des WT1-Gens erreicht werden (Weisser, 2005).

Der Nachteil der MRD Diagnostik über die FLT3-ITD Mutation ist, dass diese nur in 30% der AML-NK Fälle vorkommt (Schnittger, 2002; Thiede, 2002). Da NPM1 Mutationen über den Verlauf der Erkrankung zudem stabiler als FLT3-ITD Mutationen zu sein scheinen (Chou, 2006; Suzuki, 2005; Boissel, 2005; Gorello, 2006; Palmisano, 2007), und in 50-60% der AML-NK Fälle auftreten (Falini, 2005; Schnittger, 2005a; Döhner, 2005; Verhaak, 2005; Thiede, 2006a), könnten diese zu einem neuen Werkzeug für die MRD-Diagnostik werden. Vorläufige Ergebnisse mit sensitiven Real-Time quantitativen PCR-Assays (Gorello, 2006; Chou, 2007; Ottone, 2008) liegen vor, müssen jedoch in großen klinischen Studien validiert werden.

2 Zielsetzung der Arbeit

Es werden zunehmend prognostisch und therapeutisch relevante genetische Alterationen bei der AML entdeckt. Hierzu gehören Mutationen im NPM1 Gen bei Patienten mit normalem Karyotyp. Bei einer kompletten klinischen Remission, d.h. die Anzahl leukämischer Blasten fällt unter die Nachweisgrenze konventioneller diagnostischer Verfahren ($< 1\text{-}5\%$ maligne Zellen im Knochenmark), kann noch ein erheblicher Anteil residueller Leukämiezellen im Patienten vorhanden sein, ohne dass diese mit gängigen Nachweismethoden (Morphologie, Immunophänotypisierung, Zytogenetik und Southern Blot Analyse) identifiziert werden können. Einsatz der Real-Time quantitativen PCR-Technologie (RQ-PCR) ermöglicht eine sehr viel sensitivere Erfassung minimaler residueller Leukämiezellen, indem die mutierte mRNA des NPM1 Gens bestimmt werden kann.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen PCR-Assay zu etablieren, der die Quantifizierung von minimaler Resterkrankung (MRD) aus Knochenmarksproben von Patienten, mit für die NPM1 Mutation positiver AML, mit einer möglichst hohen Sensitivität und Spezifität ermöglicht. Der Test wird auf die NPM1 Mutation Typ A ausgelegt, da diese mit 80% die häufigste unter den NPM1 Mutationen ist. Da das NPM1 Wildtyp-Gen ubiquitär in Zellen exprimiert wird, muss diese Mutation in Gegenwart von großen Mengen NPM1 Wildtyp mRNA nachgewiesen werden.

Hierfür wird mRNA aus Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die quantitative PCR wird mithilfe der AML-Zelllinie OCI/AML3 etabliert, die positiv für die NPM1 Mutation ist. Die Zelllinie wird zusammen mit anderen Zelllinien für Negativ-Kontrollen im Hämatologikum des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit kultiviert. Nach der Etablierung des Tests mit den OCI/AML3 Zellen wird der Assay auf ausgewählte bekannt NPM1 A positive und bekannt NPM1 A negative Patientenproben übertragen. Diese Patientenproben wurden im Labor für Leukämiediagnostik für die NPM1 A Mutation gescreent. Patientenproben, die bisher noch nicht auf die NPM1 Mutation untersucht worden sind, werden im Rahmen dieser Arbeit getestet. Für diese Arbeit werden bis zum Herbst 2006 alle verfügbaren Patientenproben von NPM1 Typ A positiven Patienten, von denen zumindest zwei Proben zu verschiedenen Zeitpunkten vorhanden sind, quantifiziert.

Bei einzelnen Patienten sollen NPM1 A mRNA-Level im Verlauf der Erkrankung quantifiziert und mit der Klinik in Bezug gesetzt werden. Die Korrelation des quantitativen Nachweises der NPM1 A Mutation mit Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren hinsichtlich Krankheitsaktivität soll überprüft werden.

Passende Patientenproben sollen mithilfe der Datenbank des Labors für Leukämiediagnostik der Universität München ermittelt und herausgesucht werden.

Für diese Arbeit wird die vorhandene LightCycler-Technologie im Labor für Leukämiediagnostik der Universität München und vorhandene Patientenproben, sowie zum Teil cDNA von verschiedenen Zelllinien genutzt, welche im Rahmen der Routinediagnostik angefertigt wurden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (München) synthetisiert.

Die Sequenzen sind in 5' → 3' Richtung angegeben.

qNPM1 RT-PCR:

NPM1 Primer und Sonde:

Forward Primer: 5'-AAAGGTGGTTCTCTTCCCAAAGT-3'

Reverse Primer: 5'-CTTCCTCCACTGCCAGACAGA-3'

Hydrolysesonde: 5'-6-FAM-CTTCCGGATGACTGACCAAGAGGCTATTCA-BHQ1-3'

ABL1 Primer und Sonde:

Forward Primer: 5'-CCTTTTCGTTGCACTGTATGATTT-3'

Reverse Primer: 5'-GCCTAAGACCCGGAGCTTTT-3'

Hydrolysesonde: 5'-6-FAM-TGGCCAGTGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAA-BHQ1-3'

Schmelzkurvenanalyse NPM1:

Forward Primer: 5'-TCCCAAAGTGGAAGCC-3'

Reverse Primer: 5'-GGAAAGTTCTCACTCTGC-3'

Hybridisierungssonden:

Sensor: 5'-CGGATGACTGACCAAGAGGCTATTCA-Fluorescein-3'

Anchor: 5'-LC-Red-640-ATCTCTGGCCGTGGAGGp-3'

3.1.2 Zelllinien

3.1.2.1 OCI/AML3

Quentmeier et. al untersuchten zahlreiche Zelllinien auf Exon-12 NPM Genmutationen und identifizierten die Zelllinie OCI/AML3, die eine TCTG Duplikation auf Exon 12 trägt. Dies entspricht einer NPM Mutation Typ 1, die häufigste unter den NPM Mutationen. OCI/AML3 Zellen zeigen auch die phänotypischen Eigenschaften der NPMc+ AML: Expression von Makrophagenmarkern, Fehlen von CD34 und die immunhistochemische Eigenschaft dieser Leukämie-Untergruppe, die aberrante zytoplasmatische Expression von NPM. Quentmeier et. al schreiben, dass OCI/AML3 die einzige Zelllinie ist, die permanent alle molekularen und biologischen Eigenschaften von primärer NPMc+ AML zeigt, und damit ein geeignetes Werkzeug für die weitere Untersuchung dieses Leukämietyps darstellt. Die Zelllinie wurde aus dem peripheren Blut eines 57-jährigen Mannes mit AML FAB-M4 etabliert (Quentmeier, 2005). Die Zelllinie OCI/AML3 wurde in dieser Arbeit für die Etablierung der LightCycler PCR, für die Erstellung von Standardkurven und für Positivkontrollen des Tests verwendet. Standardkurven für NPM1 und ABL1 wurden mithilfe von Verdünnungen in 10er Schritten (10^{-6} - 10^{-1}) von cDNA der OCI/AML3-Zelllinie mit TE-Puffer erstellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde eine Vierfach-Bestimmung durchgeführt (Velden, van der, 2003). Die Zelllinie wurde unter der DSM ACC Nummer 582 von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) Zelllinienbank bezogen.

3.1.2.2 NPM1 A negative Zelllinien

Die Zelllinien K562, MV4-11 und MOLM-13 wurden als Negativkontrolle für die Etablierung der PCR verwendet. Die cDNA der Zelllinien wurde im Labor für Leukämiediagnostik im Rahmen der Routinediagnostik aufbereitet und zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Blut- und Knochenmarkproben

Knochenmark und/oder peripheres Blut von Leukämiepatienten wurde im Rahmen der Diagnostik an das Labor für Leukämiediagnostik geschickt. Von den auswärtigen Kliniken erfolgte der Versand in der Regel über Nacht, so dass das Material 24 Stunden nach Entnahme im Labor eintraf. Die AML wurde im Labor für Leukämiediagnostik mithilfe der FAB und WHO Klassifikation diagnostiziert (Bennet, 1976; Vardiman, 2009). Für alle in dieser Arbeit beschriebenen AMLs, wurde im Labor für Leukämiediagnostik eine

detaillierte Chromosomenanalyse, und zum Teil Mutationsanalysen, wie NPM1, FLT3-ITD und MLL-PTD durchgeführt. Als Referenz- bzw. Negativkontrollen für die Etablierung der quantitativen NPM1 RT-PCR wurden Blut- und Knochenmarkproben von CML-Patienten verwendet. Die verwendete cDNA wurde nach dem Schritt der reversen Transkription mithilfe einer bereits etablierten LightCycler-PCR auf ausreichende Qualität hin getestet und freigegeben.

Tabelle 5 gibt Auskunft über die Probenanzahl zu den untersuchten Zeitpunkten. Die klinischen Daten der Patienten deren Proben untersucht worden sind, sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

50 der insgesamt 51 Patienten wurden gemäß AMLCG 99 Studienprotokoll therapiert (Büchner, 1999; Büchner, 2003; Büchner, 2006). Eine Patientin wurde aufgrund ihres hohen Alters nicht gemäß dem AMLCG 99 Studienprotokolls therapiert, sie erhielt eine niedrigdosierte Chemotherapie.

Die AML-Patientenproben wurden im Labor für Leukämiediagnostik auf NPM1 Mutationen mit einem LightCycler-Assay mit Schmelzkurve untersucht (Schnittger, 2005). Bereits vorhandene Patientenproben, die noch nicht hinsichtlich der Mutationen analysiert waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit auf die NPM1 Mutation getestet. Auffällige Proben wurden sequenziert. In dieser Arbeit wurden dadurch charakterisierte AML-Proben mit einer NPM1 Typ A Mutation verwendet. Alle cDNA Proben wurden mit einer ABL1-PCR auf ausreichende Qualität untersucht.

Tabelle 5: vorhandene Patientenproben

<u>Patientenzahl 51 (2/51 PB)</u>	
Erstdiagnose	51
Tag 16	27
vor Konsolidierung	27
Rezidiv	21

Quelle: Papadaki, 2009

Tabelle 6: Klinische Daten der 51 analysierten Patienten

Alter (Jahre)	
Range	22,5 - 78
Median	58,1
WBC x 10³/ µl	
Range	0,6 - 315
Median	27
PLT x 10³/ µl	
Range	10 - 250
Median	62,5
FAB	
M0	5
M1	12
M2	11
M4	13
M5	9
M6	1
Zytogenetik	
Normal	47
Aberrant	4
zusätzliche Mutationen	
FLT3/ITD	
+	21
-	30
FLT3/D835	
+	4
-	37
nicht bestimmt	10
MLL-PTD	
+	0
-	49
nicht bestimmt	2
CEBPA	
+	0
-	11
nicht bestimmt	40

Quelle: Papadaki, 2009

3.1.4 Chemikalien und Kits

Zellkultur:

alpha-Minimum Essential Medium (α -MEM)	(Sigma, Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma, Taufkirchen)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	(PANBiotech, Aidenbach)
Fötales Kälberserum (FKS)	(Biochrom, Berlin)
Penicillin-Streptomycin	(Life Technologies, Karlsruhe)
RPMI 1640 Medium	(PANBiotech, Aidenbach)
Rinderserumalbumin (BSA)	(Fluka, Buch, Schweiz)
Trypan Blau	(Invitrogen, Karlsruhe)

Lösungen FACS:

Ficoll Isotonic Solution (Dichte 1,077 g/ml)	(Biochrom, Berlin)
PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)	(Biochrom, Berlin)
Türks Reagenz	(Merck, Darmstadt)

RNA-Isolierung:

RNeasy Mini-Kit	(Qiagen, Hilden)
RLT-Puffer	(Qiagen, Hilden)
β -Mercaptoethanol	(Sigma, Taufkirchen)

Reagenzien cDNA-Synthese:

Superscript II (Reverse Transkriptase)	(Invitrogen, Karlsruhe)
dNTP-Mix (10 mM)	(Invitrogen, Karlsruhe)
Random Primer (50 ng/ μ l)	(Roche, Mannheim)
RNasin Plus (40 U/ μ l)	(Promega, Mannheim)
RNase Inhibitor	(Promega, Mannheim)

Sonstige Chemikalien:

Agarose	(Invitrogen, Karlsruhe)
DNA molecular weight marker VI, 0.15-2.1 kbp	(Roche, Mannheim)
Ethidiumbromid 1%	(Carl Roth, Karlsruhe)
Loading buffer 6x	(Promega, Mannheim)
TBE-Puffer	(Roche, Mannheim)
TE-Puffer	pH 7,0 10mM Tris 1mM EDTA
Quicklyser-II	(Sysmex, Norderstedt)

Kits:

RNeasy Mini Kit	(Qiagen, Hilden)
MagNa Pure LC mRNA Isolation Kit	(Roche, Mannheim)
LightCycler TaqMan Master	(Roche, Mannheim)
LightCycler FastStart DNA Master HybProbe	(Roche, Mannheim)
Omniscript Reverse Transcriptase Kit	(Qiagen, Hilden)

3.1.5 Laborausstattung

CO2-Inkubator für Zellkultur	(Heraeus, Osterode)
Cyclone 25 Thermocycler	(peqlab Biotechnologie, Erlangen)
Eppendorf Zentrifuge 5415D	(Eppendorf, Hamburg)
Eppendorf Cups (0,5-1,5 ml)	(Eppendorf, Hamburg)
Eppendorf Tischzentrifuge 5415D	(Eppendorf, Hamburg)
FACS Calibur	(Beckton Dickinson, Heidelberg)
Falcon Röhrchen	(Beckton Dickinson, Heidelberg)
Flow Hood Werkbank	(Bio Flow Technik, Meckenheim)
Gefrierschränke (-80°C) UF80-450S	(Colora Messtechnik, Lorch)
Gelelektrophoresekammer	(GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein)
Gelelektrophoresesysteme	(Biorad, München)
Kühl-/Gefrierschränke (4°C, -20°C)	(Siemens, Erlangen)
LC Carousel Centrifuge 2.0	(Roche, Mannheim)
LightCycler 1.5 Instrument	(Roche, Mannheim)
MagNaPure LC	(Roche, Mannheim)
Megafuge	(Haereus, Osterode)
Mikroskop	(Zeiss, Oberkochen)
Pipette Accu-Jet	(Brand, Wertheim)
Pipettenspitzen	(Star Labs, München)
Pipetten	(Gilson, Langenfeld und Eppendorf, Hamburg)
QIAshredder	(Qiagen, Hilden)
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	(Applied Biosystems, Foster City, USA)
Vortexer	(Scientific Industries, Bohemia, USA)

Zellzähler	(Sysmex, Norderstedt)
Zentrifuge Rotanta 460R	(Hettich, Tuttlingen)
Zellkultur Flaschen	(Sarstedt, Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen	(Sarstedt, Nümbrecht)

3.1.6 Software

Adobe Illustrator	(Adobe Systems, Unterschleißheim)
Adobe Photoshop	(Adobe Systems, Unterschleißheim)
Microsoft Office 2003	(Microsoft, Redmond, USA)
LightCycler SW Version 3.5 und 4.05	(Roche Diagnostics, Mannheim)
Primer Express 2.0	(Applied Biosystems, FosterCity, USA)

Datenbanken

Patientendatenbank des Labors für Leukämiediagnostik (LfL), Klinikum der Universität München-Großhadern

Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, Bethesda, MD, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die AML-Zelllinie OCI/AML3 wurde in einem Inkubator bei 37°C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in Gegenwart von 5% CO₂ kultiviert. Dem verwendeten Kulturmedium, alpha-MEM wurde 20% fötales Kälberserum (FKS) sowie 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden in der Regel alle drei Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet.

Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem 37°C warmen Wasserbad. Die Zellsuspension, die das zelltoxische DMSO enthält, wurde sofort mit 20- 25 ml Medium verdünnt. Die Zellen wurden 5 min bei 1000 rpm (210 g) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in Medium resuspendiert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen vor Ansatz eines Experiments mindestens 3 Tage kultiviert.

Die Bestimmung der Viabilität und Zellzahl erfolgte unter Anfärbung eines Zellaliquots mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer.

3.2.2 Isolierung von mononukleären Zellen

Die Isolierung von mononukleären Zellen wurde im Rahmen der Routinediagnostik im Labor für Leukämiediagnostik, Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern durchgeführt. Aus den Knochenmarksaspiraten bzw. dem Gesamt-Blut wurden mononukleäre Zellen mittels einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt, um Leukämiezellen anzureichern und sie von Granulozyten und Erythrozyten abzutrennen. 5-10 ml Knochenmark oder Blut wurden mit einer gleichen Menge PBS vermischt. Das Gemisch wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vorsichtig auf eine gleiche Menge Ficoll geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation ohne Bremse bei Raumtemperatur für 20 min bei 2400 rpm in der Megafuge. Die mononukleären Zellen bilden nach der Zentrifugation einen Ring zwischen der wässrigen Phase und dem Ficoll. Der Ring wurde mit einer 10 ml Einwegpipette abgenommen. Die Zellen wurden mit 50 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 1500 rpm mit Bremse pelletiert und der Überstand abgenommen. Je nach Größe des Sediments wurde mit PBS verdünnt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem automatischen Zellzähler (Papadaki, 2009).

3.2.3 RNA Präparation

3.2.3.1 RNA-Isolierung aus Patientenproben

Die Isolierung von RNA aus Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini-Kits durchgeführt. Zur Analyse der Patientenproben wurde mRNA mittels des MagNA Pure LC Systems im Labor für Leukämiediagnostik, Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern, extrahiert: Direkt nach der Ficoll-Isolierung wurden jeweils $0,5-1 \times 10^7$ der mononukleären Zellen in 300 bzw. 350 µl RLT-Puffer (mit 10 µl β -Mercaptoethanol pro 10 ml RLT versetzt) aufgenommen und durch 4-5 maliges Auf- und Abpipettieren mit einer 1 ml Eppendorfspitze lysiert. Ein RLT-Lysat entspricht 30 µl RNA. Das Lysat wurde entweder gleich weiterverarbeitet, über Nacht bei -20°C oder bis zu 5 Jahre ohne merklichen Qualitätsverlust bei -80°C eingefroren. Alle Arbeiten mit RNA oder mRNA wurden mit Rnase-freien Plastikmaterialien (Pipettenspitzen und Reagenzgefäßen) durchgeführt. Die RLT-Lysate von je 300 µl wurden nach dem Auftauen bei RT zunächst mit einem QIAshredder homogenisiert. Die Aufreinigung von mRNA aus den Lysaten erfolgte automatisiert nach den Angaben des Herstellers mit dem MagNA Pure LC unter Zuhilfenahme des mRNA Isolierungs Kits für Zellen. Die Isolierung erfolgte nach dem

Protokoll „mRNA Isolation for cells“. Die finale Eluation der mRNA erfolgte in einem Volumen von 30 µl (Papadaki, 2009).

3.2.3.2 RNA-Isolierung aus Zellen

1x10⁷ OCI/AML3 Zellen wurden mit 300 µl RLT-Puffer versetzt und lysiert. Die weitere Prozessierung erfolgte analog zu den Patientenproben (Papadaki, 2009).

3.2.4 cDNA-Synthese

Isolierte RNA wurde in cDNA revers transkribiert. Bei der reversen Transkription dient mRNA als Matrize zur Synthese der komplementären DNA (cDNA). Die Synthese wird von einer RNA abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) katalysiert. Es wurde mit dem Omniscript Reverse Transcriptase Kit von Qiagen mit Oligo-dT-Primern nach Herstellerangaben gearbeitet. Pro Reaktion wurde maximal 2 µg Template-RNA eingesetzt. 30 µl eluierte mRNA wird aus bis zu 1 x 10⁷ Zellen isoliert. Aus 1 x 10⁷ Knochenmarkszellen ließen sich in der Regel ca. 0,3 µg mRNA gewinnen. Für die cDNA-Synthese von AML-Primärdiagnosen wurden 5 µl mRNA (entsprechend 2 µg mRNA) eingesetzt. Bei Verlaufskontrollen zur Detektion minimaler Resterkrankung wurden, um möglichst viele Zellen in einem Ansatz untersuchen zu können, 30 µl RNA eingesetzt. Bei Primärdiagnosen wurden 15 µl mRNA mit Rnase-freiem Wasser auf ein Volumen von 30 µl aufgefüllt. Diese 30 µl wurden für 10 min bei 70°C in einen Eppendorfinkubator gestellt, um die RNA zu denaturieren. Diese wurde anschließend für eine Minute auf Eis gestellt und dann kurz abzentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix pipettiert, der pro Reaktionsansatz folgende Volumina enthielt:

Tabelle 7: Pipettierschema MasterMix cDNA-Synthese

MasterMix cDNA Synthese	Volumen pro Ansatz
1st Strand Puffer	10,0 µl
NTPs (10 pmol/µl)	4,4 µl
Random Primer (50 µg/µl)	2,5 µl
Rnasin (40 U/µl)	1,2 µl
MasterMix	20µl
RNA	30µl

Zu jeder RNA wurden 20 µl dieses Mastermixes pipettiert und der Ansatz für 60 min bei 37°C inkubiert. Durch Inkubation für 5 min bei 95°C wurde die Reaktion abgestoppt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert (Papadaki, 2009). Für jede cDNA Probe wurde eine ABL-

spezifische RT-PCR durchgeführt, um die Integrität der DNA nachzuweisen (Schnittger, 2002).

3.2.5 Real-Time-PCR

Bei der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) werden in-vitro definierte DNA-Fragmente in einer enzymatischen Reaktion exponentiell vervielfältigt. Oligonukleotide, sogenannte Primer, dienen der thermostabilen DNA-Polymerase als Startsequenz. Die Primer binden spezifisch an einen bestimmten DNA-Abschnitt der als Vorlage für den Aufbau der komplementären Stränge dient. Die Reaktion wird durch zyklische Temperaturänderung gesteuert und läuft in drei Schritten ab: Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei über 90°C, Annealing der Primer sequenzabhängig bei 35 bis 65°C, und Extension der Primer komplementär zur gebundenen DNA-Vorlage bei etwa 70°C. Die PCR Reaktion kann zudem in drei Segmente eingeteilt werden: die Anfangsphase dauert bis das Signal des PCR Produktes größer ist als das Hintergrundsignal des Systems; Die Phase des exponentiellen Wachstums der Reaktion läuft nach der Gleichung $T_n = T_0 (E)^n$. Zum Schluss mündet die Reaktion in ein Plateau, weil die Primer mit PCR-Produkten im Annealing konkurrieren, eventuelle Nebenprodukte die Reaktion hemmen und die Enzyme zum limitierenden Faktor werden (Rasmussen, 2001).

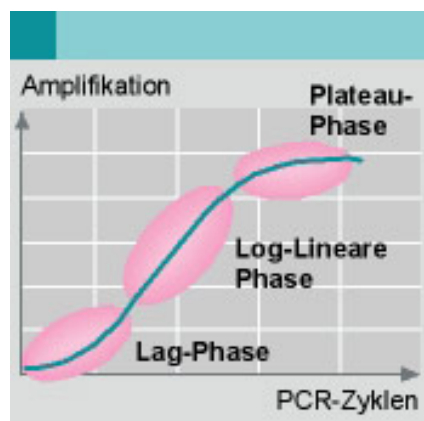


Abbildung 1: Phasen der PCR-Reaktion
Quelle: Roche Diagnostics

Der Name Kettenreaktion rührt daher, dass die Amplifikation exponentiell abläuft, weil bereits synthetisierte Stränge wiederum als Matrize dienen. Sind nach etwa 20 Zyklen ausreichend Kopien des gewünschten DNA-Abschnitts vorhanden kann diese mittels speziellen Farbstoffen nachgewiesen werden.

Real-Time-PCR bedeutet, dass Fluoreszenzsignale schon im Verlauf der Reaktion über mehrere Zyklen gemessen werden. Bei der quantitativen PCR erfolgt nicht nur der

Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz in einer Probe sondern zugleich eine Mengenbestimmung des DNA-Abschnittes. Quantitative RT-PCR ist die Konvertierung der Fluoreszenzsignale jeder Reaktion in einen numerischen Wert für jede Probe.

In dieser Arbeit wurde die RT-PCR am LightCycler durchgeführt.

In diesem Gerät werden die Reaktionen in Glaskapillaren durchgeführt, die in einem Karussell platziert werden. Ein eingebautes Fluorimeter misst Fluoreszenzsignale. Durch die Verwendung dünner Glaskapillaren und die Möglichkeit schneller Temperaturwechsel mittels eines Luftstroms ermöglicht der LightCycler schnelle PCR-Ansätze (Wittwer, 1997b). Während des Laufs kann der Fortschritt der Reaktion über eine Kurve am Bildschirm des angeschlossenen PCs mitverfolgt werden. Die Fluoreszenz repräsentiert die Menge an Produkt, die zu diesem Zeitpunkt der Reaktion vorhanden ist. Umso mehr Template am Anfang der Reaktion vorhanden ist, desto weniger Zyklen werden benötigt, um an den Punkt zu kommen, wo das gemessene Fluoreszenzsignal zum ersten Mal statistisch signifikant über dem Hintergrundsignal liegt. Dieser Zeitpunkt ist als Crossing Point (CP) definiert. Die Quantifizierung wird nicht durch limitierende Reaktionskomponenten in der Plateauphase beeinträchtigt, da sie nicht auf Messungen der gesamten Produktausbeute basiert. Somit können systemische Bias durch den Überschuss einiger Templates reduziert werden. (Bustin, 2000). Es wird für jede Probe ein CP angezeigt. Aus diesem Wert können quantitative Berechnungen des Produktes erfolgen.

3.2.5.1 Detektion der PCR-Produkte

Die gebräuchlichsten Formate der Detektion der PCR-Produkte teilen sich in zwei Kategorien auf: sequenzunabhängige Detektions-Assays wie mit SYBR Green I, und Assays mit sequenzspezifischen Sonden. Der LightCycler bietet mehrere Formate für die Detektion von PCR-Produkten, unter anderem über Hydrolyse- oder TaqMan-Sonden, welche in dieser Arbeit Anwendung fanden. Diese sind sequenzspezifisch und zweifach mit einem Farbstoff gelabelt. Hydrolyse-Sonden emittieren Fluoreszenz wenn sie von der 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq Polymerase hydrolysiert werden. Dieser Ansatz fundiert auf der Spaltung einer einzelnen, nicht amplifizierbaren 3'-Sonde, um die Bildung der spezifischen Ziel-Sequenz anzuzeigen. Diese Sonde enthält einen fluoreszierenden Reporter und einen fluoreszierenden Quencher, welche nahe beinander liegen. Solange die Sonde intakt ist, ist der Quencher-Farbstoff nahe genug am Reporter-Farbstoff lokalisiert, um diesen zu unterdrücken. Das Fluoreszenz-Quenching beruht auf fluorescence resonance energy transfer (FRET) (Clegg, 1995). Während der PCR, zerstört die 5'-Nuklease-

Aktivität der Polymerase die Sonde, separiert Reporter und Quencher, und erlaubt dem Reporter-Farbstoff Fluoreszenz freizusetzen. Die Vermehrung des PCR-Produktes wird direkt durch die proportionale Zunahme der Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs gemessen. In Abbildung 2 ist das Prinzip der Hydrolysesonden schematisch dargestellt.

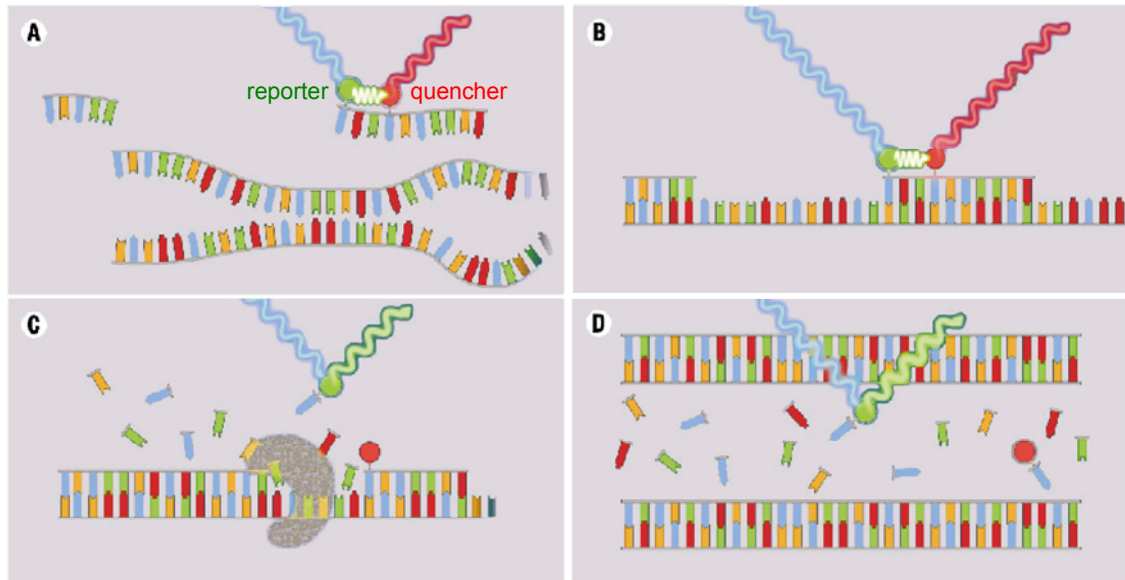


Abbildung 2: Prinzip der Hydrolysesonden

Quelle: Roche Applied Science, Technical Note No. LC 18/2004

Nach der Amplifikation in einem TaqMan PCR Assay sind die Sonden gespalten (Wittwer, 1997a und Bustin, 2000). Es kann daher keine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, was für diese Arbeit nicht nötig war, da die Schmelzkurvenanalyse bereits im Screeningverfahren auf NPM1 Mutationen angewendet wird. Falls das Screening positiv auf eine NPM1 Mutation Typ A ausfällt, kann anschließend eine Quantifizierung durchgeführt werden.

3.2.5.2 Relative Quantifizierung im LightCycler

Relative Quantifizierung bedeutet, die Ziel-Konzentration wird über das Ratio von Ziel- zu Referenz-Gen (Housekeeping-Gen) definiert. Im Gegensatz dazu, wird zur absoluten Quantifizierung die Ziel-Konzentration als absoluter Wert bestimmt (z.B. Kopienzahl, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Für die relative Quantifizierung werden externe Standards mit einer definierten Konzentration an Ziel- und Referenz-Gen verwendet. Die Berechnung erfolgt aus der PCR-Effizienz und dem Crossing Point der Probe, dadurch muss nicht in jedem Lauf eine Standardkurve generiert werden. Für die Berechnung der Ratios der relativen Quantifizierung werden Effizienzkorrekturen für die PCR Effizienz des Ziel- und des

Referenz-Gens berücksichtigt, welche in separaten Läufen bestimmt wurden. Durch die Normalisierung der Ratios über den Calibrator werden Schwankungen von Lauf zu Lauf, z.B. durch Unterschiede in der Ausführung oder bei den verschiedenen PCR-Reagenzien ausgeglichen. Die meisten Quantifizierungsmethoden verwenden eine Standardkurve für die Berechnung der unbekannten Proben, bei der relativen Quantifizierung mit Normalisierung über eine Calibrator und Effizienzkorrektur wird die Standardkurve zusätzlich als Maß für Amplifikationseffizienz verwendet. Die externe Standardkurve ist eine Funktion der Anzahl der Zyklen am Crossing Point (Y-Achse) gegen die initiale Template Menge (X-Achse). Die Standards sind Verdünnungsreihen mit repräsentativen Konzentrationen, welche den erwarteten Konzentrationen der Proben entsprechen. Die Steigung der Standardkurve ($-1/\log E$) entspricht der Effizienz (E) der PCR Reaktion, wobei unter optimalen Bedingungen ($E = 2$) die Steigung $-3,32$ entspricht. Die Formel zur Berechnung der Effizienz ist: $E = 10^{-1/\text{slope}}$. Die Berechnungen in dieser Arbeit sind um die Effizienz E korrigiert. Der Fehler r spiegelt Variationen von Kapillare zu Kapillare wieder.

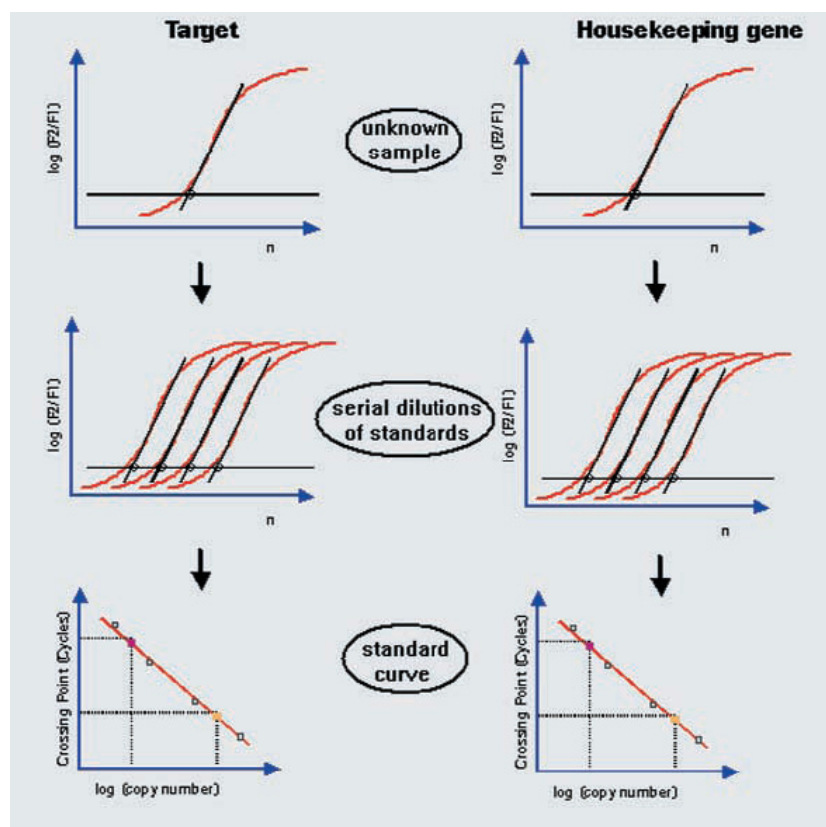


Abbildung 3: Prinzip der relativen Quantifizierung mit externen Standards
 Quelle: Roche Applied Science Technical Note No. LC 10/update 2003

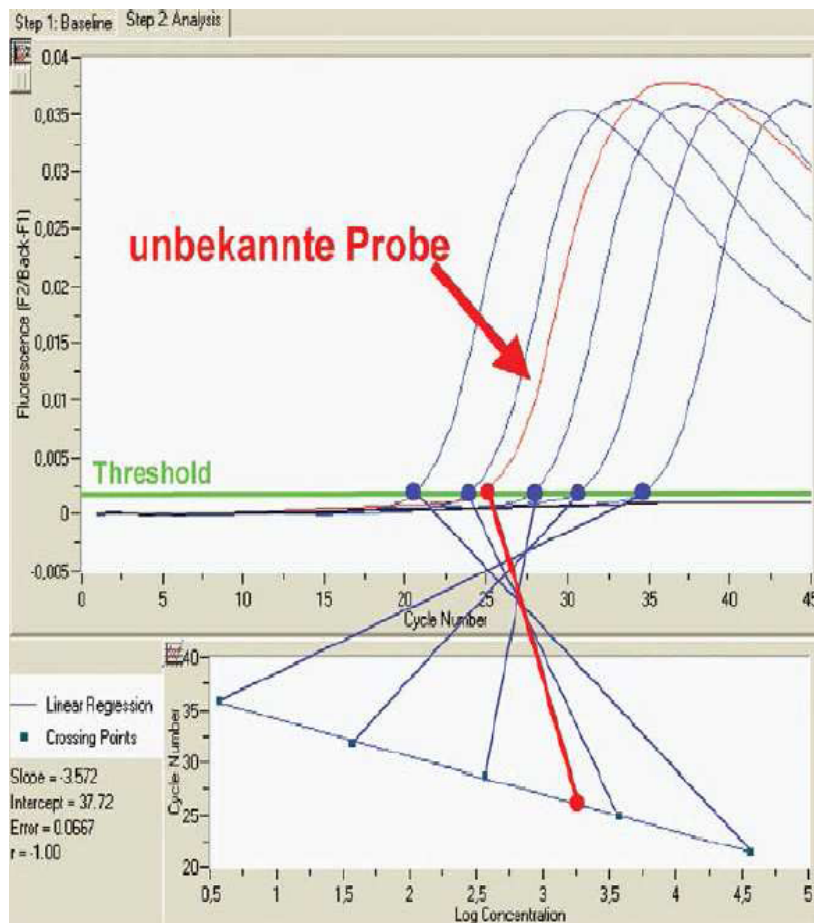


Abbildung 4: Ermittlung der Konzentration einer unbekannten Probe anhand ihres CP-Wertes und der Standardkurve

Quelle: Roche Diagnostics

Die Standardkurve wurde nach den Angaben des LightCycler Manual erstellt. Von allen Patientenproben wurden Duplikate gemessen, für die Berechnungen wurde der Mittelwert verwendet. In allen LightCycler-Läufen wurde cDNA aus OCI/AML3 Zellen als Positivkontrolle und H₂O als Negativkontrolle mitgeführt.

Die PCR Analyse für NPM1 A und ABL1 wurde mit einem LightCycler durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem SW 4.5 Software-Paket ausgewertet. Die RQ-PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Kapillare durchgeführt. Darin enthalten:

Tabelle 8: Pipettierschema RQ-PCR

MasterMix PCR	Konzentration	Volumen pro Kapillare
RNAse freies H ₂ O		11,6 µl
Sonde (probe) 10 µM	0,2 µM	0,4 µl
left primer 10 µM	0,5 µM	1 µl
right primer 10 µM	0,5 µM	1 µl
5x TaqMan Master	1x	4 µl
MasterMix		18 µl
cDNA		2 µl

Der TaqMan Master Reaktions-Mix wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die PCR wurde mit folgenden Reaktionskonditionen durchgeführt:

Tabelle 9: Protokoll RQ-PCR

Analysis Mode	Cycles	Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Pre-Incubation					
None	1		95°C	10 min	none
Amplification					
Quantification	45	Denaturation	95°C	10 s	none
		Annealing	63°C	20 s	none
		Extension	72°C	1 s	single
Cooling					
None	1		40°C	30 s	none

Die Inkubation wurde bei 95°C für 10 min durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet 45 Quantifizierungszyklen mit Denaturierung bei 95°C für 10 sec, Annealing der Primer bei 63°C für 20 sec und Extension bei 72°C für 1 sec. Zum Schluss erfolgt ein Abkühlungsschritt bei 40°C für 30 sec. Der Temperaturanstieg (Slope) wurde auf 20°C/sec eingestellt. Die Temperatur, bei der das Gerät die Proben erkennt (Seek Temperature) ist 30°C. Die Fluoreszenz wird im Kanal F1 während jedes Annealing-Schrittes gemessen und für die Auswertung wurde der Kanal F1/F3 (530/705) angezeigt. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen (Papadaki, 2009).

Zum Nachweis von spezifischer Amplifikation, d.h. Amplifikation des NPM1 bzw. ABL1 Gens, wurden in der Etablierungsphase die PCR Produkte sowie die Negativkontrollen (NPM1 negative Patienten und Zelllinien) mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.2.6 Mutationsanalyse mittels Schmelzkurven-PCR

Das Screening auf NPM1 Mutationen erfolgte in der Regel im Rahmen der Routinediagnostik mithilfe eines auf einer Schmelzkurve basierenden LightCycler Assays (Schnittger, 2005a). Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch ältere Proben, die noch nicht hinsichtlich der Mutationen analysiert waren, herausgesucht und getestet.

Im Gegensatz zur oben beschriebenen NPM1 RQ-PCR werden hier die PCR-Produkte über Hybridisierungssonden qualitativ detektiert. Es findet keine relative Quantifizierung statt. Im Anschluss an die PCR wird automatisch eine Schmelzkurve erstellt. Die Sensorsonde ist komplementär zur Wildtyp-Sequenz, so dass der Komplex zwischen Sensorsonde und Wildtyp stabiler ist als der Komplex zwischen Sensorsonde und mutiertem Allel. Wenn die

hybridisierten Produkte langsam, unter stetiger Messung der Fluoreszenz erhitzt werden, kommt es zum Ablösen der Sonden und damit Abbruch des Fluoreszenzsignals bei Überschreiten der Schmelztemperatur. Liegt eine Fehlpaarung zwischen Sensor und Zielsequenz von zwei oder mehr Basen vor, löst sich die Sonde bereits bei niedrigeren Temperaturen und der Schmelzpunkt ist verschoben. So ergeben sich für die verschiedenen Mutationen unterschiedlich aussehende Schmelzkurven. Ein Basenaustausch alleine verursacht dabei eine Änderung von 2-10°C, abhängig von der Art des Austausches, und der Nachbarschaft dieser Base. Ist nur ein Allel mutiert, zeigt die Schmelzkurve zwei Peaks. Tabelle 10 zeigt das Pipettierschema für die Schmelzkurven-PCR, Tabelle 11 das Protokoll wie es im LightCycler programmiert wurde.

Tabelle 10: Pipettierschema Schmelzkurven-PCR

MasterMix PCR	Konzentration	Volumen pro Kapillare
RNAse freies H ₂ O		9,6 µl
MgCl ₂	4 mM	2,4 µl
Sensorsonde	0,75 µM	1 µl
Anchorsonde	0,75 µM	1 µl
left primer 10 µM	0,5 µM	1 µl
right primer 10 µM	0,5 µM	1 µl
LightCycler Fast Start DNA Master	1x	2 µl
MasterMix		18 µl
cDNA		2 µl

Tabelle 11: Protokoll Schmelzkurven-PCR

Analysis Mode	Cycles	Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Pre-Incubation					
None	1		95°C	10 min	none
Amplification					
Quantification	40	Denaturation	95°C	1 s	none
		Annealing	55°C	10 s	single
		Extension	72°C	26 s	none
Melting Curve					
Melting Curve	1		95°C	2 min	none
			33°C	20 s	none
			70°C	0	continuous
Cooling					
None	1		40°C	0	none

Die Fluoreszenz wurde nach Angaben des Herstellers gemessen.

Diejenigen Proben, die von der Wildtyp-Schmelzkurve abwichen, wurden sequenziert. In dieser Arbeit wurden Proben mit NPM1 Typ A Mutation, welches die häufigste unter den

NPM1 Mutationen ist, verwendet. In Abbildung 5 sind typische Schmelzkurven in der Auswertungsansicht zu sehen. Die Schmelzkurve mit einem einzelnen Peak entspricht der Wildtypsequenz, die doppelgipflige Kurve einer mutierten Sequenz, mit einem mutierten und einem Wildtyp-Allel.

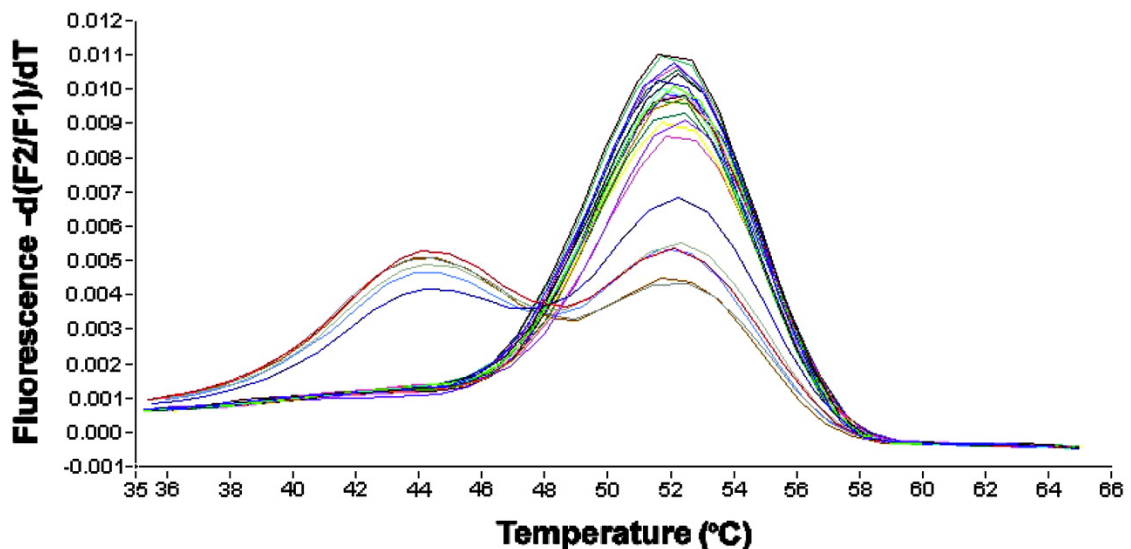


Abbildung 5: Screening mittels Schmelzkurvenanalyse
Quelle: Schnittger, 2005

3.2.7 Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten wurde DNA in einem 2%igen Agarosegel anhand der Größe und damit korrespondierend der Laufstrecke aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1xTBE-Puffer durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle aufgelöst, nach dem Abkühlen auf ungefähr 50°C mit 10 mg/ml Ethidiumbromid versetzt, und in einer Gelkammer polymerisiert. Die Proben wurden mit Ladepuffer verdünnt und in einer Gelelektrophoresekammer auf das Gel aufgetragen, das Gel mit 1xTBE überschichtet und durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein Marker mit definierten Fragmentgrößen (0.15-2.1 kbp) aufgetragen.

4 Ergebnisse

4.1 cDNA als aus OCI/AML3 Zellen als Positivkontrolle

Aus 4 x 30 µl RNA wurde, wie im Methodenteil beschrieben 4 x 300 µl cDNA generiert (Papadaki, 2009). Die insgesamt 1200 µl cDNA wurden gepoolt, aliquotiert und eingefroren. Für die Etablierung der LightCycler-PCR und Erstellen der Standardkurven wurden folgende Verdünnungen der OCI/AML3 cDNA in TE-Puffer pH 7,0 10mM Tris 1mM EDTA angefertigt: 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1 000, 1:5 000, 1:10 000, 1:100 000 und 1:1 000 000. Außerdem wurden 150 Aliquots a 10 µl mit einer 1:10 Verdünnung der OCI/AML3 cDNA in TE-Puffer pH 7,0 10mM Tris 1mM EDTA hergestellt. Diese Aliquots werden als Calibrator und Positivkontrolle verwendet. Zur Erläuterung des Calibrators siehe unten.

4.2 Etablierung einer Real-Time PCR (RQ-PCR) für die quantitative Bestimmung von NPM1 Typ A

4.2.1 Prinzip der Relativen Quantifizierung

Relative Quantifizierung meint eine quantitative PCR, mit der Genlevels eines Gens von Interesse, wie hier das NPM1 A Gen, in einer cDNA Probe relativ zu Genlevels eines Referenzgens in derselben Probe bestimmt werden.

$$\text{Relatives Ratio} = \frac{\text{Konzentration Zielgen}}{\text{Konzentration Referenzgen}}$$

Als Referenz für Quantifizierung von mRNA wird hier ein sogenanntes Housekeeping Gen, hier ABL1, verwendet. Dies ist ein Gen, dass konstitutiv auf dem gleichen Level in allen untersuchten Proben exprimiert wird. Über die Wahl des ABL1-Gens als Housekeeping-Gen wird im Abschnitt 4.2.3 näher eingegangen.

4.2.2 Normalisierung über einen Calibrator

Wenn zusätzlich eine Normalisierung der Ergebnisse mithilfe eines Calibrator erfolgt, können Ergebnisse, die in verschiedenen LightCycler Läufen ermittelt werden miteinander verglichen werden. Ein Calibrator ist eine positive Probe, die ein konstantes Ratio von

Zielgen- zu Referenzgenexpression besitzt, mit der alle anderen Proben verglichen werden. Hierfür wurde cDNA der OCI/AML3 Zelllinie, die positiv für die NPM1 A Mutation ist, verwendet (Papadaki, 2009).

$$\text{Calibrator-NormalizedRatio} = \frac{\text{RatioSample} \left(\frac{\text{TargetSample}}{\text{ReferenceSample}} \right)}{\text{RatioCalibrator} \left(\frac{\text{TargetCalibrator}}{\text{ReferenceCalibrator}} \right)}$$

Der in dieser Arbeit entwickelte Test kann Änderungen der Genexpression eines bestimmten Gens in Proben mit cDNA feststellen, auch wenn die Proben zu unterschiedlicher Zeit gewonnen wurden oder von unterschiedlicher Qualität sind.

4.2.3 Ermittlung der Primer-Paare und Sonden

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mithilfe der Primer Express Software 2.0 entworfen. Die cDNA Sequenz des NPM1 Gens wurde mit Hilfe der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) ermittelt (Genbank Accession Nr. AY740634). Das ABL1 Gen wurde als Housekeeping Gen, nach den Empfehlungen des „Europe Against Cancer Programs“ (Gabert, 2003 und Beillard, 2003) verwendet (Genbank Accession Nr. M14752). Ein Housekeeping Gen sollte konstitutiv in allen Zellarten exprimiert sein. Weitere wichtige Kriterien für ein Housekeeping Gen sind eine konstante Expression auch während der antileukämischen Behandlung, und die Abwesenheit von Pseudogenen.

Es wurden die Design-Guidelines der Primer Express Software berücksichtigt, welche auch den allgemeinen Vorgaben für Primerentwicklung entsprechen (Bustin, 2000 und Wang, 2006). Für die Sonden und Primer sollte der Gehalt an den Basen G und C zwischen 30 und 80% liegen, wobei Wiederholungen desselben Nukleotids, insbesondere eine Wiederholung von viermal Guanin vermieden werden sollten. Bei der Sonde sollte kein Guanin am 5'-Ende stehen. Der Schmelzpunkt einer TaqMan Sonde sollte 68-70°C betragen, die Schmelzpunkte der Primer 58-60°C. Der Schmelzpunkt der Sonde sollte um 10°C höher als der der Primer sein, um sicherzustellen, dass diese vor den Primern hybridisiert (Bustin, 2000). Die Primer werden nach der Sonde ausgewählt und sollten so nahe wie möglich an der Sonde liegen ohne zu überlappen. Innerhalb der letzten fünf Nukleotide am 3'-Ende der Sonde sollten nicht mehr als zwei G oder C Basen liegen. Diese Anforderungen werden von den ausgewählten Oligonukleotiden erfüllt. Die Primer-Express Software ermittelt nach einigen Eingaben selbstständig geeignete Abschnitte auf

der Gensequenz für das ausgewählte Amplikon. Die von der Software erbrachten Vorschläge für Primerpaare und Sonde wurden nochmals auf die vorgegebenen Empfehlungen hin geprüft. Mittels BLAST wurde eine Sequenzähnlichkeitssuche durchgeführt. Die ausgewählten Primerpaare für NPM1 A und ABL1 sind spezifisch für ihr Template. Es wurden keine anderen Zielsequenzen in der Datenbank NCBI Transcript Reference Sequences für Homo sapiens gefunden. Für die NPM1 A Primer gilt: Forward Primer mit GC-Gehalt von 43% und Schmelzpunkt von 58°C; Reverse Primer mit GC-Gehalt von 57% und Schmelzpunkt von 59°C. Für die ABL1 Primer gilt: Forward Primer mit GC-Gehalt von 38% und Schmelzpunkt von 58°C; Reverse Primer mit GC-Gehalt von 55% und Schmelzpunkt von 58°C. Diese Angaben wurden von der Primer-Express Software 2.0 ermittelt. Die TaqMan Sonden haben einen Schmelzpunkt von jeweils 70°C. Die NPM1 A Sonde überspannt die Exon 11/Exon 12 Grenze, um zu gewährleisten, dass die Amplifikation für mRNA spezifisch ist. Der reverse Primer überspannt die TCTG-Insertion (Papadaki, 2009). Die Amplikonlänge beträgt 112 Basenpaare bei NPM1 A und 85 Basenpaare bei ABL1. Bustin et al. empfehlen eine Amplikonlänge von weniger als 100 bp, da kürzere Amplikons effizienter amplifiziert werden, und toleranter hinsichtlich der Reaktionskonditionen sind (Bustin, 2000). Die verwendeten Primer überspannen zwischen 20 und 24 bp. Die Sonden sind 30 und 37 bp lang. Für TaqMan Sonden wird eine Länge von 30 Basen empfohlen, da ein Zusammenhang zwischen Sondenlänge und der Fähigkeit zu quenchen besteht (Shipley, 2006). Die Primer-Express Software prüft die Primer ebenfalls auf mögliche Primer-Dimer Bildung.

4.2.4 Programmierung LightCycler

Angaben zum Programmieren und Durchführen eines LightCycler Laufes siehe LightCycler Software Short Guide Version 3.3 April 2000 und LightCycler Operator's Manual Version 3.5 October 2000. Die Angaben in der Packungsbeilage für den LightCycler TaqMan Master, Enzymmix für die PCR mit Hydrolysesonden, hinsichtlich der Reaktionskonditionen wurden berücksichtigt.

4.2.5 Optimierung der PCR-Bedingungen für NPM1 Typ A

Das Austesten der Primer und Sonden und die Optimierung der PCR-Bedingungen wurden mit cDNA durchgeführt, die aus der Zelllinie OCI/AML3 gewonnen wurde. Die cDNA wurde unverdünnt und in mehreren Verdünnungen eingesetzt. Die Reaktionskonditionen

wurden in mehreren Schritten optimiert, um eine möglichst hohe Spezifität bei gleichzeitig hoher Ausbeute zu erreichen. Das heißt möglichst hohe Amplifikation des NPM1 A mutierten Gens, nicht aber des Wildtyp-Gens oder anderer Gene. Die Mutation A unterscheidet sich vom NPM1 Wildtyp-Gen, das in allen Zellen exprimiert wird, um eine Insertation von vier Basen. Es wurden Annealing-Temperaturen von 55, 57, 59, 60, 61, 63 und 64°C getestet. Die Annealingzeit wurde zwischen 15 sec und 30 sec variiert. Die besten Ergebnisse hinsichtlich Ausbeute, Spezifität und Sensitivität konnten mit einer Annealing-Temperatur von 63°C bei einer Annealing-Zeit von 20 sec erreicht werden (siehe Tabelle 12). Unter diesen Konditionen war die Effizienz hoch, es wurden keine Wildtyp-NPM1 Sequenz oder andere Gensequenzen amplifiziert und NPM1 A wurde auch in höheren Verdünnungen noch zuverlässig amplifiziert. Bei niedrigeren Annealing-Temperaturen und längeren Annealing-Zeiten war das PCR-Produkt nicht spezifisch genug. In der Gelelektrophorese der PCR-Produkte konnten bei Produkten aus weniger stringenten Protokollen andere, zusätzliche Genbanden sichtbar gemacht werden, und zum Teil konnte ein PCR-Produkt aus NPM1 A negativen Proben nachgewiesen werden. Andersherum war die Effizienz, oder Ausbeute bei stringenteren Bedingungen mit höherer Annealing-Temperatur und kürzeren Annealing-Zeiten nicht optimal. Geringe Ausbeute heißt, wenig oder kein PCR-Produkt in höheren Verdünnungen der cDNA, und hohe CP-Werte im Gegensatz zu optimalen Protokollen.

Tabelle 12: Optimierte Protokoll RQ-PCR

Analysis Mode	Cycles	Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Pre-Incubation					
None	1		95°C	10 min	none
Amplification					
Quantification	45	Denaturation	95°C	10 s	none
		Annealing	63°C	20 s	none
		Extension	72°C	1 s	single
Cooling					
None	1		40°C	30 s	none

Die initiale Denaturierung wurde bei 95°C für 10 min durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet 45 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 10 sec, Annealing der Primer bei 63°C für 20 sec und finaler Extension bei 72°C für 1 sec. Unter diesen Reaktionsbedingungen läuft bereits während der Annealing-Phase die Extension der Primer ab. Zum Schluss erfolgt ein Abkühlungsschritt bei 40°C für 30 sec. Der Temperaturanstieg (Slope) wurde auf den maximalen Wert von 20°C/sec eingestellt. Die

Fluoreszenz wird nach Angaben des Herstellers gemessen und ausgewertet. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen (Papadaki, 2009).

4.2.6 Etablierung der PCR für das Referenzgen ABL1

In der fertig entwickelten RQ-PCR werden NPM1 A und ABL1 gleichzeitig, und damit unter den gleichen Bedingungen amplifiziert. Die ermittelten optimierten Bedingungen für die NPM1 A PCR wurden also auch für das Referenzgen ABL1 ausgetestet. Auch wenn die Sensitivität niedriger ist als bei der Amplifizierung des Zielgens, ist sie ausreichend für die Verwendung als Referenz für die Berechnung der Ziel- zu Referenzgen-Ratios. Ein Kriterium für die Verwendung von ABL1 als Referenzgen ist unter anderem eine konstante Exprimierung in allen kernhaltigen Zellen, auch unter antileukämischer Therapie. Somit kann davon ausgegangen werden, dass jede cDNA-Probe genügend Genkopien des ABL1 Gens enthält, um unter den ermittelten Bedingungen ausreichend amplifiziert zu werden. Alle verwendeten cDNAs wurden hinsichtlich ihrer Qualität in einer im Labor für Leukämiediagnostik etablierten ABL1-PCR getestet, um Fehler in den Schritten der RNA-Isolierung oder cDNA-Synthese auszuschließen.

4.2.7 Erstellen der Standardkurven für die relative Quantifizierung

Als die Bedingungen für die PCR festgelegt waren, wurden Standardkurven mit diesen Bedingungen für die NPM1 A und ABL1 PCR erstellt. Die Standardkurven wurden für NPM1 A und ABL1 gesondert durchgeführt, da die NPM1 A PCR, wie oben bereits erwähnt, sensitiver als die ABL1 PCR ist und in der Standardkurve höhere Verdünnungsstufen berücksichtigt werden. Für die NPM1 Standardkurve wurde cDNA in folgenden Konzentrationen jeweils in vierfach Replikaten eingesetzt: cDNA unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000 und 1:1 000 000 (Papadaki, 2009).

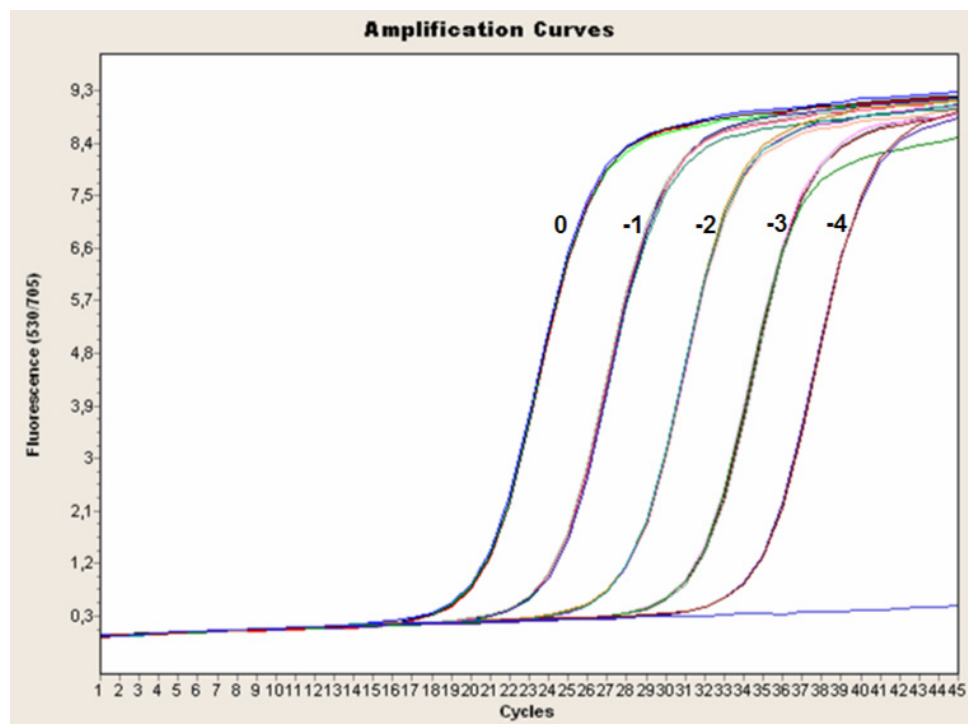


Abbildung 6: Amplifikationskurven für die Verdünnungsreihe der OCR/AML3 cDNA
Quelle: Papadaki, 2009

Die CP Differenzen zwischen den Mittelwerten der 10er Verdünnungen sollten theoretisch, jeweils 3,3 betragen, was einer Steigung der Standardkurve von -3,3 und einer maximalen Effizienz = 2 entspricht (Velden, van der, 2003). Die CP Differenzen zwischen den 10er Verdünnungen der Standardkurve betragen: 3,62; 3,79; 3,58; 3,43 und 2,4. Das heißt, die Standardkurve ist in der höchsten Verdünnungsstufe nicht mehr linear, die Effizienz fällt ab. Tabelle 13 stellt nochmals die CP-Werte der unterschiedlichen Verdünnungen zusammen.

Tabelle 13: Zusammenstellung CP-Werte aus Verdünnungsexperiment

Verdünnung OCI/AML3	CP-Wert
1	20,38
1:10	24
1:100	27,79
1:1 000	31,37
1:10 000	34,8
1:100 000	37,2
1:1 000 000	

Die Amplifizierung des Ziel- und des Referenzgens wird in einem LightCycler-Lauf durchgeführt. Da die ABL1 Amplifizierung eine niedrigere Sensitivität als die NPM1 A Amplifizierung zeigt, weil die Optimierung der Temperaturen und Zeiten im Protokoll

hinsichtlich der Primer und der Sequenz des Zielgens optimiert wurden, sind die cDNA Verdünnungsstufen der NPM1 A Standardkurve in der ABL1 Reaktion nicht mehr nachweisbar. Für die ABL1 Standardkurve wurden daher folgende Verdünnungsstufen der cDNA jeweils in vierfach Replikaten eingesetzt: cDNA unverdünnt, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1 000 und 1:5 000. Es ist sinnvoll, den Konzentrationsbereich der ABL1 Genkopien der von der Standardkurve abgedeckt wird, an die tatsächlich zu erwartenden Konzentrationen der zu messenden Patientenproben anzupassen. Eine Voraussetzung für die Freigabe der cDNA Patientenproben hinsichtlich ihrer Qualität ist eine ausreichende Nachweisbarkeit von ABL1 in einer ABL-spezifischen PCR wie schon im Materialenteil beschrieben. Somit kann von einer ausreichenden cDNA Konzentration in jeder Probe ausgegangen werden. Die Quantifizierung des Ziel- und des Referenzgens wurde also einzeln, mithilfe der erstellten Standardkurven auf den zu erwartenden Konzentrationsbereich der Patientenproben kalibriert, so dass die Berechnungen der Software aus der Effizienz der einzelnen Reaktionen, und nicht aus extrapolierten Werten erfolgen.

Nach der Optimierung zeigt die relative Quantifizierung anhand der Standardkurven eine gute Linearität und Reproduzierbarkeit. Die von der Software ermittelte Amplifikationseffizienz beträgt 1,89 für beide Sequenzen. Der von der Software angegebene Fehlerwert („Error“) zu jeder Standardkurve beschreibt die mittlere quadratische Abweichung der einzelnen Datenpunkte zur Funktion. Er ist ein Maß für die Genauigkeit der Quantifikation, basierend auf der Standardkurve. Der für die Standardkurven ermittelte Wert beträgt 0,00974 für NPM1 A und für ABL1 0,0128. Nach Herstellerangaben ist ein Fehler unter 0,2 akzeptabel (Roche Applied Science, Technical Note No. LC 11/update 2003).

Die European Study Group on MRD detection on ALL (Europäische Studiengruppe zur Bestimmung von minimaler Resterkrankung bei ALL) fordert in den gegenwärtigen Leitlinien (Velden, van der, 2003) eine Steigung der Standardkurve zwischen -3,0 und -3,9. Mit einer Effizienz von 1,89, was einer Steigung von -3,617 entspricht, erfüllt der in dieser Arbeit entwickelte Test diese Leitlinie. Auf das Prinzip der Efficiency Correction wird unter 4.3.3, Effizienzkorrektur bei der Auswertung mithilfe der LightCycler Software näher eingegangen. Die Standardkurve für das Target-Gen NPM1 ist in Abbildung 7 zu sehen.

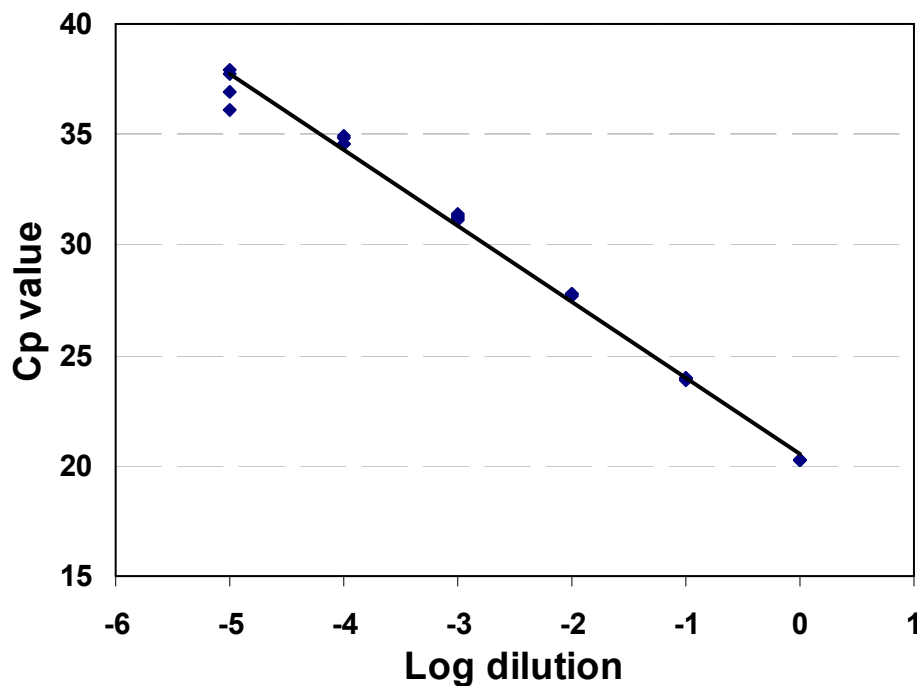


Abbildung 7: Die Standardkurve für die Amplifikation des Target-Gens mit einer Effizienz von 1,89
Quelle: Papadaki, 2009

4.2.8 Sensitivität und Spezifität in Zelllinien

Um den Assay möglichst spezifisch zu machen überspannt der reverse Primer für NPM1 A die Insertion der vier Basen, um die sich die mutierte Sequenz vom Wildtyp unterscheidet. Sensitivität wurde mittels Verdünnungsreihen von cDNA mit TE-Puffer bestimmt, wobei die maximale Sensitivität der niedrigste Verdünnungsschritt ist, der spezifische Amplifikation zeigt. Bei der Verwendung von cDNA aus der Zelllinie OCI/AML3 ist 1:100 000 die maximale Verdünnung die reproduzierbar Amplifikation des NPM1 A Gens zeigt (Papadaki, 2009). Die Verdünnung 1:1 000 000 zeigt nur in einem von acht Replikaten Amplifikation. Für die Amplifikation des ABL1 Gens aus OCI/AML3 cDNA ist 1:10 000 die höchste Verdünnung, die verlässlich amplifiziert wird. Bei der Verdünnung 1:100 000 werden zwei von acht Replikaten amplifiziert. Für ein weiteres Experiment für die Ermittlung der Sensitivität des Test wurde cDNA aus OCI/AML3 Zellen mit cDNA aus K562 Zellen, die keine NPM1 Mutation tragen, in verschiedenen Verhältnissen gemischt, und im LightCycler amplifiziert. Auch hier war die höchste zuverlässig für NPM1 A amplifizierte Probe die Verdünnung 1:100 000. Das Experiment wurde zweimal mit je 2 Replikaten durchgeführt. Hiermit konnte gezeigt

werden, dass der Test auch in höheren Verdünnungen in Wildtyp-cDNA nicht negativ beeinflusst wird. Dieses Experiment simuliert MRD-Verhältnisse mit zwei verschiedenen Zelllinien.

Die konstante ABL1-Expression in den beiden Zelllinien zeigt sich durch CP-Werte im Bereich von 20,94 bis 23,75 bei einer ABL1 Amplifikation in allen Proben.

Außerdem wurde cDNA aus K562, MV4-11 und MOLM-13 Zellen gemessen. Die Zelllinien zeigten keine falsch positive Amplifikation für NPM1 A in Form einer Amplifikationskurve (Papadaki, 2009).

4.2.9 Etablierung des Tests mit Patientenproben

Der Test mit den optimierten Bedingungen aus Material von Zelllinien wurde im Folgenden auf cDNA aus Knochenmark von Patienten angewendet.

Um die Spezifität der PCR zu testen, wurden cDNA-Proben von 79 NPM1 A negativen Patienten gemessen. Darunter 15 Patienten mit AML, 9 mit MDS und 56 mit CML. NPM kommt bei allen cDNA-Proben als Wildtyp vor. Da kein PCR-Signal nachweisbar war, bedeutet dies, dass die NPM1 Typ A PCR spezifisch für die Mutation ist, und die Wildtypsequenz nicht amplifiziert wird.

Bei NPM1 A positiven Patienten zeigt sich analog zu cDNA aus OCI/AML3 Zellen Amplifikation des NPM1 Gens in Form einer Amplifikationskurve in der PCR und einer Bande in der zusätzlich zur Kontrolle durchgeführten Gelelektrophorese.

Es konnte gezeigt werden, dass die mit cDNA aus OCI/AML3 Zellen erhobenen Ergebnisse mit denen aus cDNA aus Patientenproben korrelieren. Patientenproben zur Erstdiagnose zeigen eine ähnlich hohe Expression von NPM1 A, das heißt ähnlich hohe NPM1 A zu ABL1 Ratios, wie eine 1:10 Verdünnung der OCI/AML3 cDNA in TE-Puffer. Wie erwartet ist die NPM1 A Expression in Patienten-cDNA zur Erstdiagnose höher als nach Therapiebeginn, z.B. am Tag 16 der Therapie oder vor der Konsolidierungstherapie. Bei den meisten Patienten kann, wenn diese sich in Krankheitsremission befinden, mittels RQ-PCR kein NPM1 A mehr nachgewiesen werden. Wenn die Krankheit rezidiert, ist NPM1 A in den meisten Fällen wieder nachweisbar. Siehe dazu auch Gliederungspunkt 4.4.2, in dem auf die Stabilität der NPM1 Mutation eingegangen wird. NPM1 A RNA Expressionslevel wurden von 51 Patienten in 154 Knochenmark- und Blutproben zu unterschiedlichen Stadien der Krankheit bestimmt (Papadaki, 2009).

Um die Aussagekraft des Tests bei echter minimaler Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) zu bewerten, wurde cDNA von 5 NPM1 A mutierten Patienten mit einem

Pool von cDNA von mehr als 50 NPM1 A negativen Patienten in verschiedenen Verhältnissen verdünnt. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Die höchste nachweisbare Verdünnungsstufe von cDNA von NPM1 A positiven Patienten in NPM1 A negativen Patienten war 1:100 000 (Papadaki, 2009). Mit cDNA aus Patientenproben werden die Kurvenverläufe unruhiger als mit cDNA aus Zelllinien, und die Software berechnet bei einzelnen Proben CP-Werte zwischen 33,75 und >41. Die nachträgliche Überprüfung der einzelnen Amplifikationskurven zeigt keine tatsächliche Amplifikation des NPM1 A Gens, das heißt keinen echten Anstieg der Kurve über das Hintergrundsignal. Die Software erkennt in diesen Fällen eine Unregelmäßigkeit im Kurvenverlauf als signifikanten Anstieg, entsprechend wird der Probe ein CP-Wert zugeordnet. In der Elektrophorese zeigt sich keine spezifische NPM1 A Bande, jedoch unspezifische Amplifikation in Form von mehreren dünnen Banden kleinerer Fragmente. Alle CP-Werte aller LightCycler-Läufe wurden anhand der dazugehörigen Kurven auf Amplifikation bei dem angegebenen Zyklus überprüft. Die in manchen Fällen mittels Gelelektrophorese nachgewiesene unspezifische Amplifikation kann vernachlässigt werden, da keine Bande mit der NPM1 A Bande übereinstimmt. Im Rahmen der Routinediagnostik wird in der Regel keine Gelelektrophorese zusätzlich zur Auswertung mittels LightCycler durchgeführt.

4.2.10 Reproduzierbarkeit

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Daten, die bei der RQ-PCR Analyse erhoben werden, reproduzierbar sind. Die European Study Group on MRD detection on ALL (Europäische Studiengruppe zur Bestimmung von minimaler Resterkrankung bei ALL) (Velden, van der, 2003) fordert in den gegenwärtigen Leitlinien zur MRD bei Leukämie, dass solange der CP-Wert einer Probe unter 36 ist, die Varianz zwischen den Replikaten unter 1,5 sein sollte. Wenn der mittlere CP-Wert höher ist, wird auch die Varianz innerhalb der CP-Werte höher. Das bedeutet, dass man zwei Sensitivitäten definieren könnte: eine reproduzierbare Sensitivität, die das Level bis zu dem präzise quantifiziert werden kann angibt, und eine maximale Sensitivität, die das gerade noch detektierbare, aber nicht genau reproduzierbare Level angibt (Velden, van der, 2003). Bei dieser PCR wurde der Mittelwert von 6 Replikaten gegen den kleinsten und größten CP-Wert innerhalb der Replikate aufgetragen. Die Variation des mittleren CP-Wertes bis zu 37 Zyklen war mit unter 1,5 Zyklen niedrig (Papadaki, 2009). Dieses Ergebnis ist in Abbildung 8 zu sehen.

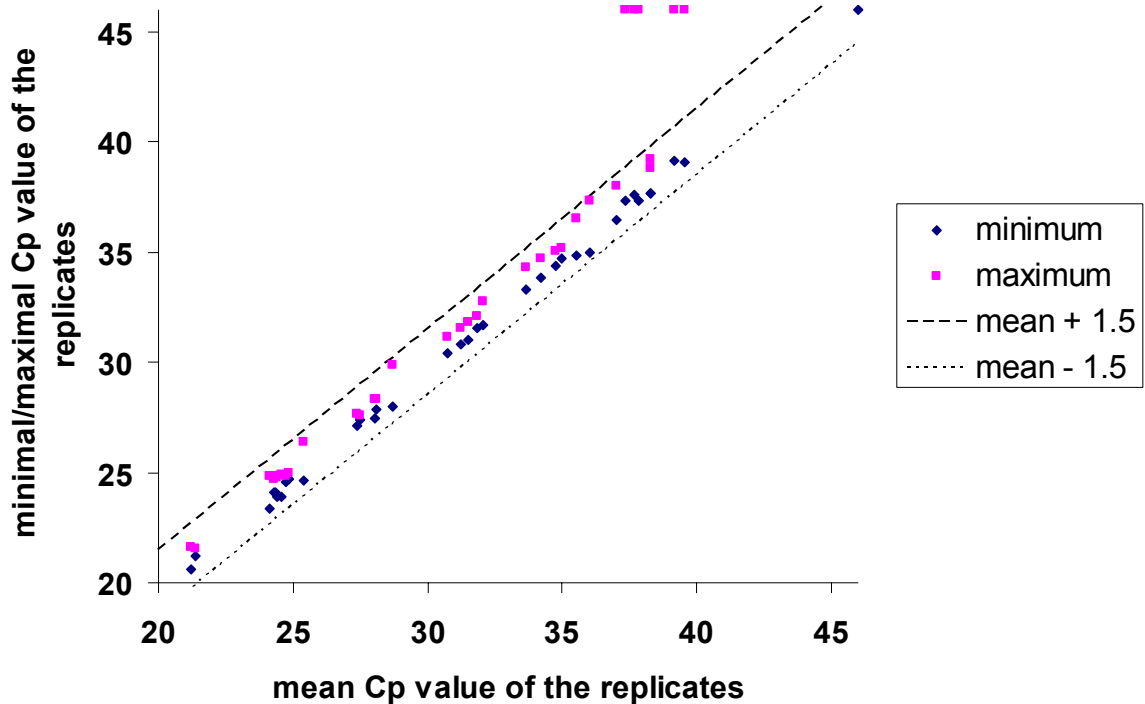


Abbildung 8: Variation der minimalen und maximalen CP-Werte der RQ-PCR für die Detektion von NPM1 A
Quelle: Papadaki, 2009

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb des gleichen LightCycler-Laufs zu bestimmen wurde OCI/AML3 cDNA 1:10 mit Wasser verdünnt und NPM1 A und ABL1 in jeweils 15 Replikaten aus demselben Ansatz amplifiziert.

Der Mittelwert der 15 NPM1-Replikate beträgt 24,24, die Standardabweichung 0,189. Für ABL 1 beträgt der Mittelwert der 15 Replikate 29,25 und die Standardabweichung 0,167.

4.3 Auswertung der RQ-PCR-Daten mithilfe der LC SW 4.05

4.3.1 Datentransfer in SW 4.05

Für die Auswertung wurden die Daten, die mit der LightCycler Software 3.5 erhoben wurden, in die LightCycler Software 4.05 importiert, da diese die Quantifizierungsanalyse unter Berücksichtigung der Standardkurven für Ziel- und Referenzsequenz automatisch durchführt.

4.3.2 Quantifizierungsanalyse

Die Quantifizierungsanalyse benutzt die CP-Werte der einzelnen Proben um die relative Konzentration der Ziel-Sequenz (target DNA) in unbekannten Proben zu bestimmen. Hier wurde die Quantifizierungsanalyse „Relative Quantifikation – Monocolor“ verwendet,

wobei das Ratio zweier DNA-Sequenzen (target und reference) in unbekannten Proben mit dem Ratio der beiden Sequenzen in einem Calibrator verglichen wird. Das Prinzip der CP-Werte und Standardkurven wurde unter 3.2.5.2, wo auf die relative Quantifizierung im LightCycler eingegangen wird, bereits erläutert. In diesem Test wurde zur Auswertung eines jeden Laufes eine externe, einmalig erstellte Standardkurve in das Auswertungsprogramm geladen. Bei der Verwendung von externen Standardkurven müssen die Reaktions- und Detektionsbedingungen der auszuwertenden Experimente und der Erstellung der Standardkurve identisch sein. Die Berechnung der CP-Werte erfolgt durch die vom Hersteller empfohlene automatische Methode („Automated Method“), da diese Methode, im Gegensatz zur „Fit Point“ keine Eingabe seitens des Nutzers erfordert. Die Software führt alle weiteren Berechnungen schnell und mit hoher Reproduzierbarkeit aus. Für die Berechnung der Ratios der unbekannten Proben definiert der Benutzer je nach Probe die einzelnen Positionen im Lauf mit Target Unknown, Target Calibrator, Target Negative, Reference Unknown, Reference Calibrator, und Reference Negative. Die Software berechnet die Ratios für die vom Benutzer definierten Probenpaare und zeigt diese im Ergebnis („Results“)-Fenster an.

Für weitere Angaben siehe auch LightCycler Software 4.05 Handbuch.

4.3.3 Effizienzkorrektur

In Calibrator-normalisierten Tests der relativen Quantifizierung ist die Genauigkeit des Ergebnisses von Unterschieden der Effizienz von Ziel- und Referenzgenamplifikation beeinflusst. Die Effizienzkorrektur wird nach einigen manuellen Eingaben automatisch von der Software durchgeführt und ermöglicht eine höhere Genauigkeit der Ratios von Ziel- zu Referenzgen. Für die Berechnung der Genexpression der einzelnen unbekannten Proben wurden Standardkurven mit bekannten Konzentrationen verwendet um einen möglichen Analysefehler durch Verwendung einer falschen PCR-Effizienz zu umgehen. Die Calibrator-normalisierte relative Quantifizierung eliminiert praktisch alle Faktoren, die das Ergebnis verzerren könnten. Zwei verschiedene Gene werden normalerweise nicht mit der gleichen Effizienz amplifiziert, da diese von Faktoren wie Primer-Annealing, GC-Gehalt und Größe des Produktes beeinflusst wird. Um die jeweilige Effizienz für eine Reaktion zu bestimmen wird eine relative Standardkurve erstellt, indem der Logarithmus der Konzentration der Standardverdünnungen gegen die Zykluszahl aufgetragen wird. Aus der Steigung dieser Kurve kann die Effizienz der Reaktion mithilfe der Formel $E = 10^{-1/\text{slope}}$ ermittelt werden. Eine Steigung von -3,32 entspricht der maximal möglichen Effizienz von

2,0, was bedeutet, dass das PCR-Produkt sich in jedem Zyklus verdoppelt. Abbildung 9 veranschaulicht die Auswirkungen der Effizienz einer PCR auf das Ergebnis einer unbekannten Probe. Tabelle 14 gibt Rechenbeispiele über den möglichen systematischen Fehler bei der Verwendung einer unkorrekten Effizienz.

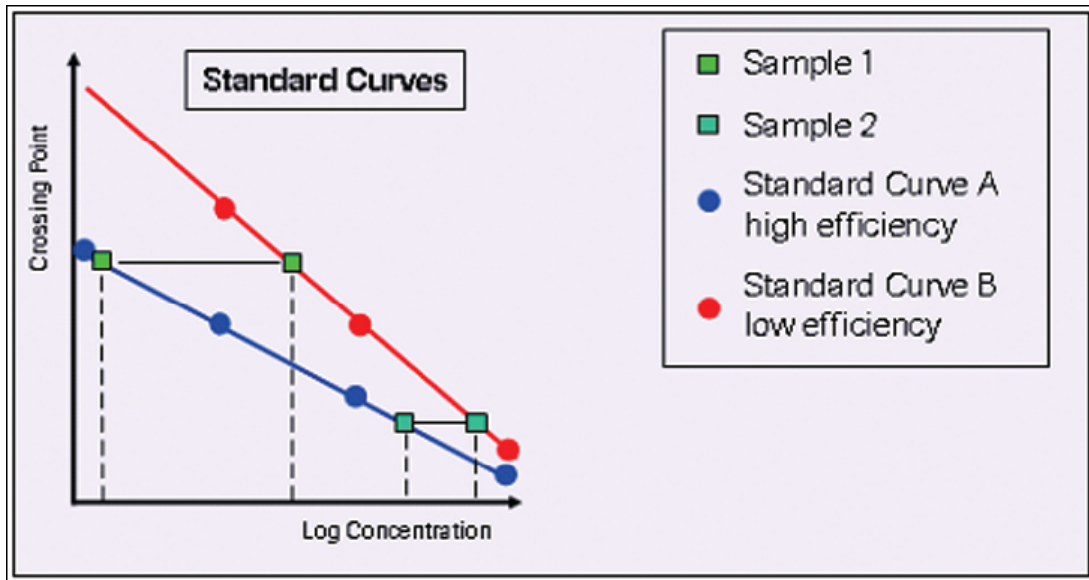


Abbildung 9: Auswirkungen der Effizienz auf das Ergebnis

Quelle: Roche Applied Science, Technical Note No. LC 16/2005

Tabelle 14: systematischer Fehler von PCR-Effizienzen

PCR-Effizienz (E)	Detektionszyklus (n)		
	10	20	30
2,00	-	-	-
1,97	16%	35%	57%
1,95	29%	66%	113%
1,90	67%	179%	365%
1,80	187%	722%	2260%
1,70	408%	2480%	13000%

Berechnung des Fehlers: $(2^n/E^n - 1) \times 100$

Quelle: Roche Applied Science, Technical Note No. LC 26/2005

Für beide Gene wurde bei der Erstellung der Standardkurven eine Effizienz von 1,89 ermittelt. Auch wenn die Effizienz nicht bei jedem Experiment exakt dieselbe ist, kann doch davon ausgegangen werden, dass sie in etwa gleich für die Amplifikation von NPM1 und ABL1 ist. Je näher die eigentliche Effizienz an 2,00 liegt desto geringer wird der systematische Fehler wenn eine fiktive Effizienz von 2,00 für die Berechnungen angenommen wird. Wenn bei einer Relativen Quantifizierung beide Gene mit derselben Effizienz amplifiziert werden, gleicht sich der systematische Fehler wieder aus. Für den

vorliegenden Test unterscheiden sich die Ergebnisse deshalb relativ wenig, unabhängig davon ob die tatsächliche, ermittelte Effizienz in Form einer Standardkurve für die Berechnungen in die Software geladen wird, oder ob von einer fiktive Effizienz von 2,00 ausgegangen wird.

4.4 Anwendung der RQ-PCR auf Patientenproben

4.4.1 MRD Monitoring mit ausgewählten Patientenproben

4.4.1.1 Charakterisierung der verwendeten Patientenproben

Die untersuchte Gruppe von 51 NPM1 A positiven Patienten wurde in der Arbeitsgruppe Molekulargenetik im Labor für Leukämiediagnostik auch auf andere genetische Alterationen untersucht (Schnittger, 2003; Schnittger, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit von FLT3-ITD Mutationen bei 41,18% (21/51), und von FLT3-D835 bei 9,76% (4/41) lag. Keiner der Patienten hatte eine MLL-PTD Mutation. Diese Ergebnisse zeigen eine Übereinstimmung mit früheren Publikationen (Chou, 2007, Schnittger, 2005a und Döhner, 2005).

4.4.1.2 Vergleich von Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung

Um eine Aussage über die Eignung der RQ-PCR für NPM1 A für die Detektion von MRD treffen zu können, wurden cDNA Proben von 51 NPM1 A positiven Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose und zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Therapie analysiert. Zum Zeitpunkt der Diagnose reichte das NPM1 A / ABL1 Ratio von 11,39 bis 249,00 mit einem Mittelwert von 52,35. Bei 27 Patienten konnten Daten zum Zeitpunkt der Diagnose und nach Induktionstherapie erhoben werden. Nach der Induktionstherapie war das mittlere NPM1 A / ABL1 Ratio 0,00571 (Bereich von 0,0 bis 13,81). Das entspricht einer \log_{10} -Reduktion von 0,34 bis 4,91 (Mittelwert 2,48) (Papadaki, 2009). Dieses Ergebnis wird in Abbildung 10 veranschaulicht. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Erfolg der Behandlung, da jeweils auch die Blastenzahl im Knochenmark der Patienten rückläufig war.

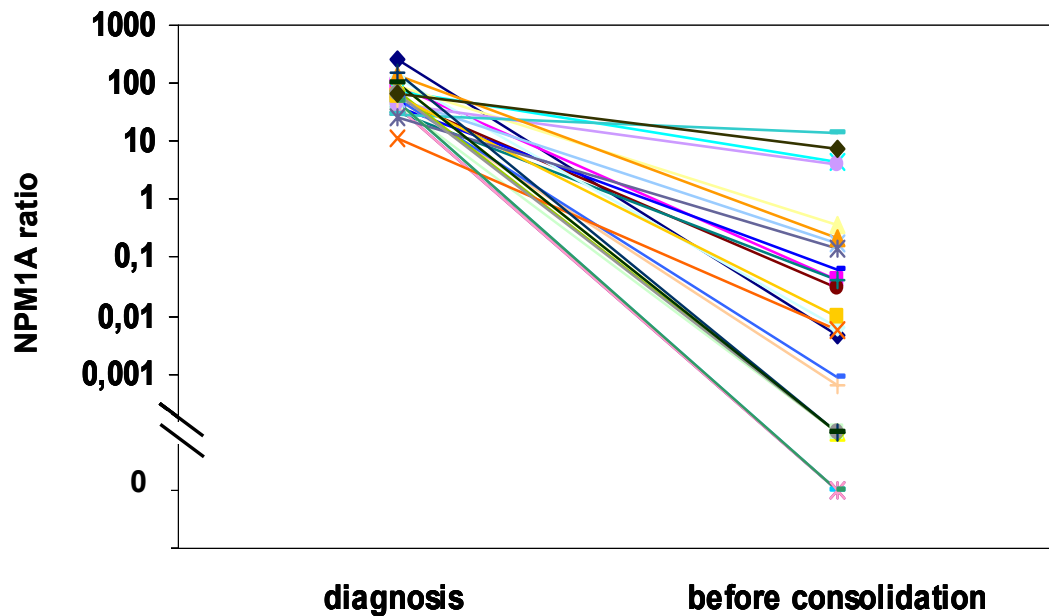


Abbildung 10: NPM1 A Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose und vor Konsolidierung. Die Ergebnisse sind als NPM1 A / ABL1 Ratios dargestellt

Quelle: Papadaki, 2009

21 der 51 Patienten erlitten ein, in der Datenbank des Labors für Leukämiediagnostik dokumentiertes Rezidiv. Bekannt ist außerdem, dass ein Patient ein myelodysplastisches Syndrom entwickelte. Die mittlere Follow-up-Zeit der einzelnen Patienten betrug 12,5 Monate. Es ist unbekannt ob weitere Patienten ein Ereignis wie ein Rezidiv hatten, und dem Labors für Leukämiediagnostik keine Dokumentation darüber vorliegt. Von 6 der 21 Patienten mit bekanntem Rezidiv war Probenmaterial nach Induktionstherapie und zum Zeitpunkt des Rezidivs verfügbar. 2 der 6 Patienten erlitten ein Rezidiv nach 1 und 2 Jahren. Keiner der Patienten mit einem frühen Rezidiv zwischen 5 bis 8 Monate nach der Diagnose hatte eine negative PCR nach der Induktionstherapie. Diese Rezidive wurden begleitet von einer Zunahme des NPM1 A / ABL1 Ratios mit einer mittleren Zunahme von 0,18fach (Bereich 0,04 bis 4,42). Bei der Mehrzahl der Patienten korrelierte ein Anstieg der Blastenzahl im Knochenmark mit einem angestiegenen NPM1 A / ABL1 Ratio (Papadaki, 2009).

4.4.1.3 Fallbeispiele

Die Quantifizierung von NPM1 A Levels in zwei repräsentativen Patienten, die Chemotherapie und allogene Knochenmarktransplantation im Krankheitsverlauf erhalten haben, wird im Folgenden näher vorgestellt. Bei diesen Patienten konnte auf mehrere

Knochenmarksproben im Verlauf der Erkrankung zurückgegriffen werden. In Abbildung 11 wird das NPM1 A / ABL1 Ratio zweier Patienten im Verlauf über die Zeit dargestellt. Die Punkte auf der Kurve repräsentieren eine Knochenmarkspunktion mit Probenentnahme. Die erste Entnahme war jeweils zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der AML. Die entnommenen Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben prozessiert, und in cDNA synthetisiert. Bei Patient 1 fällt nach Therapiebeginn, also zur zweiten Entnahme das Ratio im Vergleich zur Erstdiagnose. Es ist gut zu erkennen, dass das NPM1 A / ABL1 Ratio zu jedem Rezidiv ansteigt, nachdem es nach Therapie jeweils abgefallen war. Nach einer ersten Knochenmarkstransplantation rezidiert die Krankheit erneut. Nach der zweiten Knochenmarkstransplantation stirbt der Patient an einer Graft-versus-Host (Transplantat gegen Wirt) Reaktion, einer immunologischen Reaktion die nach einer allogenen Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation auftreten kann (Papadaki, 2009). Bei Patient 2, anders als Patient 1, bei dem zu jedem Zeitpunkt der Krankheit NPM1 A nachweisbar war, ist das NPM1 A / ABL1 Ratio nach der Therapie zunächst nicht mehr nachweisbar. Wie schnell das Ratio angestiegen ist, ist nicht bekannt, da vor dem Rezidiv keine weitere Probe vorliegt. Auch nach dem Rezidiv fällt das NPM1 A / ABL1 Ratio wieder unter die Nachweisgrenze. Nach der Knochenmarkstransplantation, die in Remission durchgeführt wurde, ist kein NPM1 A mehr nachweisbar (Papadaki, 2009).

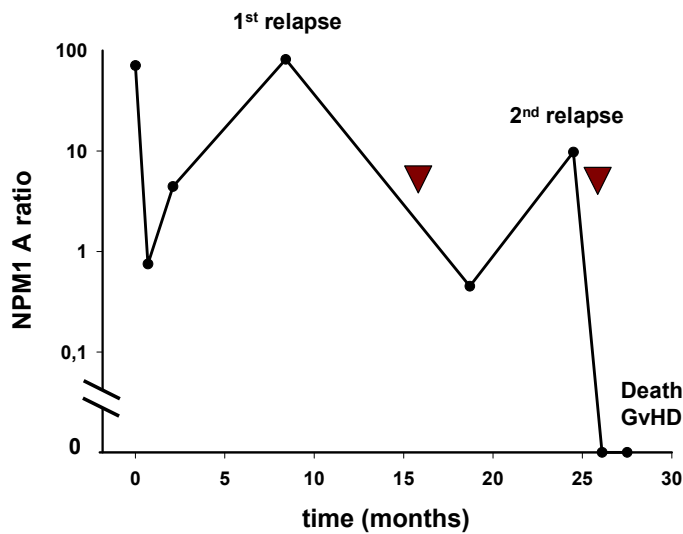
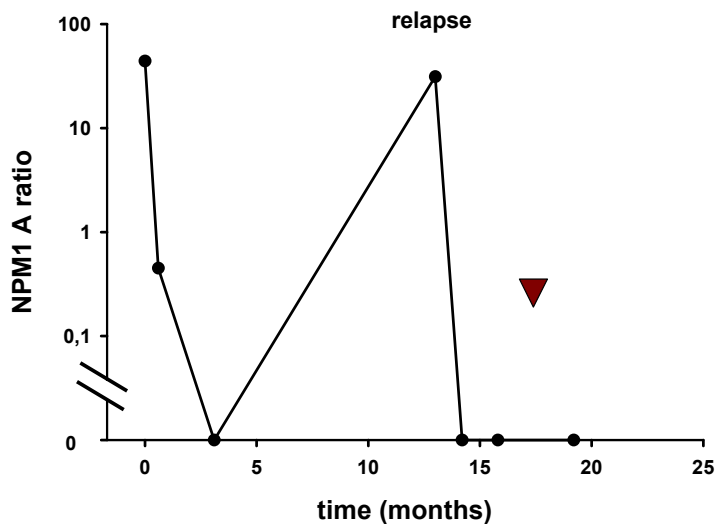
Patient 1**Patient 2**

Abbildung 11: NPM1 A Levels bei zwei repräsentativen Patienten

Das braune Dreieck markiert die allogene Knochenmarkstransplantation

Quelle: Papadaki, 2009

Ein weiteres Fallbeispiel einer Patientin, die lediglich low dose AraC und palliative Therapie erhalten hat wird im Folgenden vorgestellt. Die Patientin wurde aufgrund ihres hohen Alters nicht gemäß Studienprotokoll therapiert. Auch bei dieser Patientin wurde die NPM1 A Expression im Verlauf der Krankheit quantifiziert. Die Ergebnisse wurden mit der Blastenzahl und Thrombozytenzahl korreliert. Wie man in Abbildung 12 sieht, ist die PCR sensitiv genug um NPM1 A Mutationslevel bei Abwesenheit von Blasten im peripheren Blut detektieren zu können. Wieder repräsentiert ein schwarzer Punkt auf der Kurve eine Probenentnahme, das heißt einen Messwert. Vor der vierten Gabe von AraC stieg das NPM1 A Ratio deutlich stärker als die Blastenzahl (Papadaki, 2009).

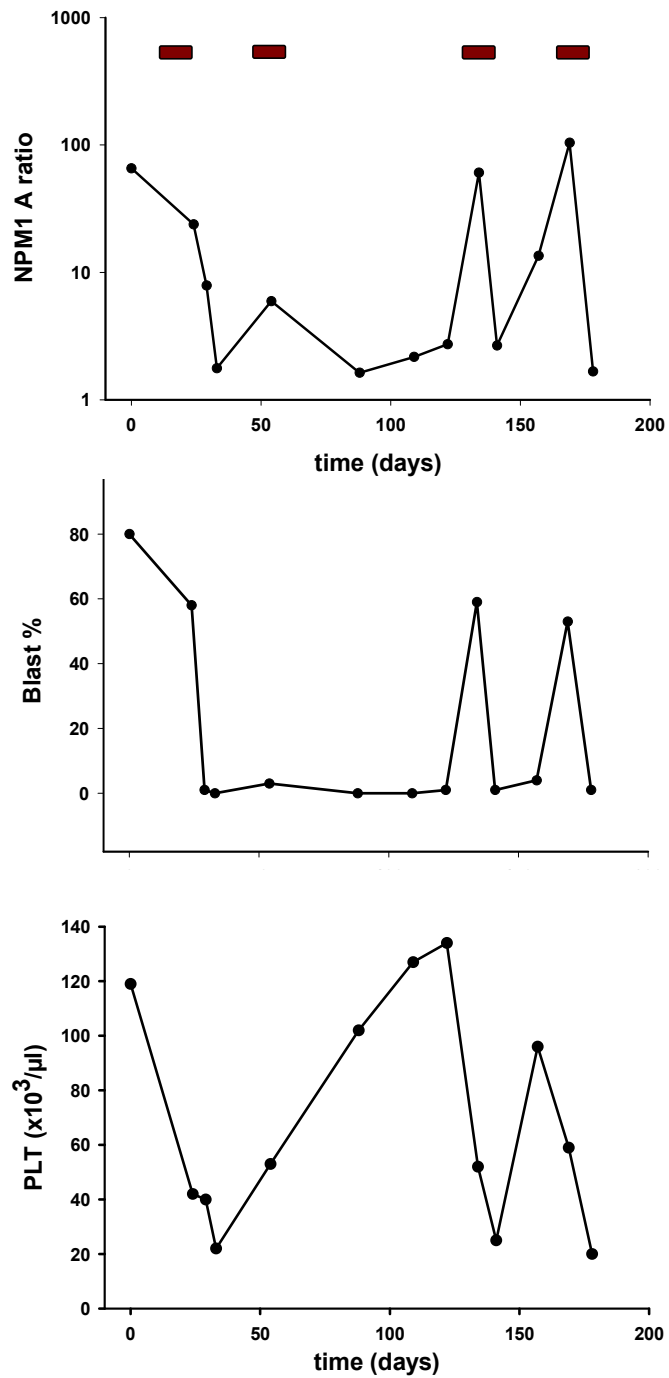


Abbildung 12: Quantifikation einer NPM1 A Mutation eines Patienten in mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Die braunen Balken markieren die Gabe von AraC

Quelle: Papadaki, 2009

4.4.2 Stabilität der NPM1 Mutation

Es ist aufgefallen, dass bei zwei NPM1 A positiven Patienten, die klinisch und im Knochenmarksaustich ein Rezidiv erlitten kein NPM1 A nachgewiesen werden konnte. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurde erneut eine Schmelzkurven-PCR durchgeführt, welche sonst nur als Screening-Verfahren zur Erstdiagnose eingesetzt wird.

Interessanterweise zeigte die Schmelzkurve in beiden Fällen nur einen Peak, den für das Wildtyp NPM1 Gen. Von 21 Patienten mit Rezidiv verloren somit 9,5% die NPM1 A Mutation. Bei den anderen 19 Patienten konnte die Mutation zum Rezidiv per RQ-PCR nachgewiesen werden. Beide betroffenen Patienten hatten zum Zeitpunkt der Diagnose einen normalen Karyotyp. Die Chromosomeneigenschaften der beiden Patienten sind in Tabelle 15 zusammengestellt. Zum Zeitpunkt des Rezidivs hatte einer der Patienten eine neuerworbene Chromosomenaberration, eine unbalancierte Translokation der(7), t(1; 7)(q21; q22), die die Chromosomen 1 und 7 betraf. Derselbe Patient verlor auch seine FLT3-ITD Mutation zum Rezidiv. Bei dem anderen Patienten fand sich auch zum Zeitpunkt des Rezidivs kein Hinweis auf numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen.

Der Verlust der NPM1 Mutation bei diesen Patienten zum Rezidiv kann durch klonale Evolution erklärt werden (Papadaki, 2009).

Tabelle 15: Patienten die im Verlauf der Krankheit die NPM1 A Mutation verloren haben. Genetische Eigenschaften zum Zeitpunkt der Diagnose und des Rezidivs

Diagnose	Rezidiv
46XX [28] NPM1+ FLT3 ITD+ /FLT3 D835- MLL-	46XX,der(7)t(1;7)(q21;q22) [23] NPM1- FLT3 ITD- /FLT3 D835- MLL-
46XY [25] NPM1+ FLT3 ITD- /FLT3 D835- MLL-	46XY [25] NPM1- FLT3 ITD- /FLT3 D835- MLL-

Quelle: Papadaki, 2009

5 Diskussion

5.1 NPM1 A RQ-PCR

Real-Time reverse transcription PCR (Real-Time RT PCR) ist eine etablierte Technik um mRNA in biologischen Proben zu quantifizieren. Vorteile gegenüber konventionellen Methoden RNA zu messen sind die hohe Sensitivität, der relativ große messbare Bereich, schnelle Prozessierung und genaue Quantifizierung (Huggett, 2005). Trotzdem gibt es eine Reihe von Schwachpunkten bei der Real-Time RT PCR, wie natürliche Schwankungen der RNA, Schwankungen in den Extraktionsprotokollen und damit unterschiedliche Effizienzen bei der reversen Transkription und PCR.

Die Durchführung einer RQ-PCR mit dem LightCycler Instrument ist sehr flexibel, da verschiedene Protokolle und Anwendungen möglich sind. Die von der Maschine benötigte Zeit ist je nach Protokoll verschiedenen, bleibt aber meistens unter einer Stunde. Die Auswertung der Daten erfolgt durch eine Software, so dass keine händische Auswertung oder Weiterverarbeitung der PCR-Produkte notwendig ist. Die Kapillaren müssen nicht geöffnet werden, um z.B. das PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufzutragen um Menge und Größe des Produkts zu bestimmen. Das Kontaminationsrisiko lässt sich dadurch erheblich reduzieren. Die Auftrennung von PCR-Produkten über eine Gelelektrophorese erfolgte im Rahmen dieser Arbeit lediglich in der Entwicklungs- und Optimierungsphase der PCR, um Produkte auf Nebenprodukte hin zu untersuchen. Die Probenanzahl ist bei dem LightCycler 1.5 und 2.0 auf 32 limitiert. Die Standardkurven mussten nicht für jeden Lauf neu generiert werden, sondern wurden in separaten Läufen mit Replikaten bestimmt (Papadaki, 2009). Die Daten der Standardkurve werden zur Auswertung der unbekannten Proben importiert. Der Calibrator wird in jedem Lauf im Duplikat bestimmt und dient hierbei als Referenz für die Standardkurve.

5.1.1 Vergleich one-step zu two-step RT-PCR

Für die PCR muss RNA in cDNA umgeschrieben werden. Es gibt hierbei zwei Ansätze die reverse Transkription und PCR kombinieren. Bei der Durchführung in einem Schritt erfolgt die manuellen Arbeiten und die Analyse in kürzerer Zeit, allerdings wird für jede zu untersuchende RNA eine extra RT-Reaktion benötigt. Bei der RT-PCR in zwei Schritten

wird die reverse Transkription von der PCR getrennt. Dies birgt den Vorteil, dass mehrere PCR-Reaktionen von einer cDNA Probe angesetzt werden. Die aus Patientenproben generierte cDNA wird im Labor für Leukämiediagnostik sowohl im Screening auf Mutationen als auch bei der Verlaufskontrolle verwendet. Die einmal generierte cDNA kann über längere Zeit gelagert, und zu einem späteren Zeitpunkt nochmals für Experimente herangezogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hauptsächlich auf bereits bestehende, eingefrorene cDNA Proben zurückgegriffen. Dagegen bietet die Durchführung der RT-PCR in einem Schritt den Vorteil, dass das Risiko einer Kontamination verringert wird, da der Assay in nur einem Probengefäß abläuft.

5.1.2 Vergleich von LightCycler und ABI PRISM 7700 SDS

Bei einem Vergleich von den beiden meist gebrauchten RQ-PCR Instrumenten, dem LightCycler (Roche Diagnostics) und dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System („TaqMan“) (Applied Biosystems), wurden bei der Quantifizierung von minimaler Resterkrankung bei ALL mithilfe von Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Genen in einer Arbeit von Eckert et. al vergleichbare Ergebnisse erzielt. Beide Systeme produzieren reproduzierbare, spezifische und sensitive Ergebnisse für die MRD-Quantifizierung in dem Bereich, der für die klinische Entscheidungsfindung wichtig ist. Eckert et al. schließen daraus, dass, solange dasselbe Detektionsformat verwendet wird, beide Techniken zusammen in Multicenter MRD-Studien, Anwendung finden können (Eckert, 2003).

5.1.3 Hydrolysesonden im Vergleich mit anderen Detektionssystemen

Es gibt verschiedene Detektionssysteme bei denen über die Änderung der Fluoreszenz der Probe der Anstieg an PCR-Produkt ermittelt werden kann. Für diese Arbeit wurden Hydrolysesonden, auch TaqMan-Sonden genannt, verwendet. Die Sonde wird während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende von der Taq-Polymerase, die zusätzlich eine Exonuclease-Aktivität besitzt, abgebaut. Dadurch entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander, und es kann, proportional zur Produktmenge, eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden. Chou et al. verwenden bei ihrem quantitativen NPM1 Assay (Chou, 2007) sogenannte minor groove-binding (MGB)-Sonden. Diese Sonden besitzen ein Molekül, das stark an der kleinen Furche (minor groove) der DNA bindet. Damit ist die Bindung der Sonde insgesamt verbessert, was in einer Erhöhung des Schmelzpunktes resultiert. Deswegen können MGB-Sonden kürzer und damit, besonders in AT-reichen Regionen, potentiell spezifischer sein (Velden, van der, 2003). Da MGB-

Sonden deutlich teurer als herkömmliche Hydrolysesonden sind, und der Assay in der Routinediagnostik angewendet werden soll, wurden in dieser Arbeit keine MGB-Sonden verwendet.

Eine weitere Möglichkeit die Bildung von spezifischem Produkt nachzuweisen, ist über zwei Hybridisierungssonden, von denen die eine am 3'-Ende, die andere am 5'-Ende mit einem Farbstoff gelabelt sind. Wenn diese beiden Farbstoffe benachbart hybridisieren, interagieren beide Sonden über Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET), und Signalfluoreszenz wird proportional zur Menge an Zielsequenz emittiert. Dieses Format lässt eine Schmelzkurvenanalyse des PCR-Produkts zu, was mit Hydrolysesonden nicht möglich ist. Man benötigt allerdings immer 2 Hybridisierungssonden, wodurch ein Experiment etwas aufwändiger und teurer wird.

Eine andere Möglichkeit des Nachweises von PCR-Produkten bietet der Farbstoff SYBR Green. Er detektiert die Akkumulierung von dsDNA, indem der Farbstoff an dsDNA bindet und somit nicht nur spezifische Produkte nachweist, was in einer Einschränkung der Spezifität resultieren kann. Je mehr dsDNA in einer Lösung vorliegt, desto stärker ist das Signal des Farbstoffs. Bei den anderen beiden Techniken wird ausschließlich die Akkumulation von spezifischem Produkt gemessen, da die Sonde sequenzspezifisch bindet.

Mit keiner Detektionstechnik ist die Fluoreszenz streng proportional zur Menge an spezifischem Produkt. Bei Hydrolysesonden z.B. steigt das Fluoreszenzsignal auch nach der Plateauphase weiter an (Wittwer, 1997b). Wittwer et al. verglichen Hydrolysesonden, Hybridisierungssonden und die Detektion über SYBR Green und kommen zu dem Schluss, dass alle drei Techniken amplifizierte Produkte mit der gleichen Sensitivität zu detektieren scheinen, und alle drei Techniken Artefakte in späteren Zyklen zeigen, die nicht mit der spezifischen Produktakkumulation korrelieren (Wittwer, 1997b).

5.1.4 Wahl des Referenzgens

Um quantitative MRD-Daten zu erhalten müssen Kontrollgene in die Analyse eingeschlossen werden um hinsichtlich der Quantität und Qualität der cDNA korrigieren zu können. Bei MRD-PCR sollte ein Kontrollgen auf einem Chromosom gewählt werden, welches nicht oft an Chromosomenverlust oder -gewinn beteiligt ist (Velden, van der, 2003). Das ABL1 Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 9 (9q34) (Beillard, 2003). Weitere Kriterien für die Wahl des Referenzgens sind laut van der Velden et al. ein ähnliches Expressionslevel in verschiedenen Zellen, kein Zusammenhang mit dem

Zellzyklus, und eine Stabilität und Expression die mit der der MRD-Zielsequenz vergleichbar ist. Innerhalb des Europe Against Cancer Programms wurden verschiedene Kontrollgene in Leukämie-Studien untersucht. ABL1 scheint das am besten geeignete zu sein, da seine Expression stabil und vergleichbar zwischen peripherem Blut und Knochenmark, und zwischen normalen und leukämischen Proben ist (Velden, van der, 2003; Beillard, 2003).

Beillard et. al äußern allerdings auch zwei Einwände gegen ABL1 als Housekeeping-Gen. Infolge des relativ kurzen Introns wird zum Teil auch genomische DNA amplifiziert. Und zweitens wurden gemäß der Lage der ABL Primer und Sonde zwischen den Exons 2 und 3 sowohl Wildtyp-, als auch BCR-ABL Transkripte amplifiziert. Diese Begebenheiten wurden von Beillard et. al als vernachlässigbar eingestuft (Beillard, 2003).

5.1.5 Normalisierung

Es ist notwendig, eine oder mehrere Methoden zur Normalisierung der Ergebnisse anzuwenden, um die bereits angesprochenen Fehlerquellen der RQ-PCR auszugleichen (Huggett, 2005). Bei diesem Test wurde zuerst über die Probengröße normalisiert, indem die Zellzahl nach der Ficollisolierung gemessen wurde, und jeweils $0,5-1 \times 10^7$ der mononukleären Zellen aus den Patientenproben in 300 µl RLT lysiert wurden. Für die OCI/AML3 Zellen erfolgte eine Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer-Zählkammer vor der Zentrifugation. Es wurden je 1×10^7 Zellen in 300 µl RLT lysiert. Eine Normalisierung über die RNA Menge vor der reversen Transkription, wie von Huggett et al. gefordert, wurde bei unseren Proben nicht durchgeführt. Es wurde statt dessen jeweils für Erstdiagnose-Proben und Verlaufspuben immer die gleiche Menge an Zellen in RLT verwendet, und zu cDNA umgeschrieben. Die Qualität der gewonnenen cDNA wurde mithilfe eines PCR-Assays zur Quantifizierung des ABL1 Gens kontrolliert, welches theoretisch immer auf einem ähnlichen Level exprimiert, und somit bei ausreichender cDNA-Qualität immer ausreichend nachzuweisen ist.

Eine weitere Normalisierung der Ergebnisse fand über die Verwendung eines Referenz-Gens bei der Quantifizierung der NPM1 A Expression statt. Referenz- oder Housekeeping-Gene gleichen Fehler bei allen Schritten der Quantifizierung des Target-Gens aus, indem die Expression des Target-Gens immer mit der Expression des Referenz-Gens in der gleichen Probe verglichen wird. Einer der größten Einflussfaktoren auf das Ergebnis einer PCR, ist die Ausbeute in der RNA- oder DNA-Isolierung. Mit der Normalisierung über ein Referenzgen ist dieser Faktor ausgeglichen. Auch Qualitätsunterschiede von

Patientenmaterial nach dem Verschicken, und eine mögliche Degradierung von RNA oder cDNA nach längerem Einfrieren können so kompensiert werden. Einige Autoren wie Huggett et. al fordern auch die Verwendung von mehreren Referenz-Genen gegen die normalisiert wird (Huggett, 2005). Es ist allerdings aufgrund von damit verbundenen höheren Kosten und der limitierten Verfügbarkeit mancher Patientenproben nicht immer machbar und praktikabel, gleichzeitig die Expression mehrerer Referenz-Gene zu bestimmen. Das Europe Against Cancer Programm favorisiert die Verwendung von ABL1 als Kontroll-Gen für die MRD Diagnostik, da seine Expression stabil und vergleichbar zwischen peripherem Blut und Knochenmark, und normalen und leukämischen Proben ist (Velden, van der, 2003; Beillard, 2003).

Die dritte Maßnahme der Normalisierung der ermittelten Gen-Levels ist die Verwendung eines Calibrators in jedem LightCycler-Lauf. Der Calibrator ist eine cDNA Probe aus kultivierten OCI/AML3 Zellen mit gleichbleibender Expression des Target- und Referenz-Gens. Es wurden größere Mengen dieses Calibrators hergestellt und aliquotiert. Treten z.B. Unterschiede in der Effizienz der PCR-Reaktion von Ziel- und Referenzsequenz auf, so werden diese Unterschiede dadurch ausgeglichen, dass alle ermittelten Expressions-Ratios durch das Ratio des Calibrators geteilt werden. Dadurch können Unterschiede in der Detektionssensitivität zwischen Ziel- und Referenzgen ausgeglichen, und Daten aus verschiedenen LightCycler-Läufen miteinander verglichen werden. Bei einigen käuflich erwerblichen Kits ist ein Calibrator im Lieferumfang enthalten. Damit wird das Problem umgangen, selber große Mengen an Calibrator herstellen zu müssen. Gleichzeitig garantiert die Firma, von der das Kit erworben wurde für die Integrität und Stabilität des Calibrators. Für den Fall, dass ein solches Kit, aus welchen Gründen auch immer, vom Markt genommen wird, ist allerdings eine dauerhafte Verfügbarkeit des darin enthaltenen Calibrators nicht garantiert.

Für Unterschiede zwischen verschiedenen Abfüllchargen eines nicht kommerziellen Calibrators findet ein Korrekturfaktor Anwendung. Diesen Korrekturfaktor kann man mithilfe einer PCR nach bekanntem Schema ermitteln. In der Roche Applied Science Technical Note No. LC 16/2005 wird empfohlen immer einige Aliquots des ersten verwendeten Calibrators aufzubewahren. Für eine statistisch gültige Bestimmung werden 12 Proben des neuen mit 12 Proben des alten Calibrators verglichen. Die LightCycler Software 4.05 berücksichtigt einen solchen Korrekturfaktor bei der Auswertung der Daten, die mit der neuen Charge des Calibrators produziert werden. Somit können Experimente mit altem bzw. Original-Calibrator mit neuen Experimenten direkt verglichen werden.

5.1.6 Sensitivität

Van der Velden et al. gehen davon aus, dass mit RQ-PCR-Analysen eine Sensitivität von mindestens 10^{-3} , besser 10^{-4} bis 10^{-5} erreicht werden sollte. Bei anderen MRD-PCR Zielsequenzen wie z.B. FLT3-ITD und WT-1 können Sensitivitäten von mindestens 10^{-4} erreicht werden (Velden, van der, 2003). Für die quantitative Bestimmung von NPM1 als MRD-PCR Ziel wurde mit cDNA aus OCI/AML3 Zellen eine Sensitivität von 10^{-5} ermittelt (Papadaki, 2009). Für die Bestimmung der Sensitivität werden Verdünnungsexperimente mit einem Standard, z.B. cDNA einer Zelllinie, vorgeschlagen (Velden, van der, 2003). Für diese Arbeit wurde cDNA aus OCI/AML3 Zellen mit TE-Puffer verdünnt. Die höchste Verdünnung die verlässlich nachgewiesen werden kann ist 1:100 000. Die Sensitivität bei der Verwendung von cDNA aus Patientenproben wurde durch Verdünnung von NPM1 A positiver Patienten-cDNA mit NPM1 A negativer Patienten-cDNA ermittelt. Sie ist ebenfalls 1:100 000 (Papadaki, 2009). Indem man den logarithmischen Wert der Verdünnung gegen den CP-Wert aufträgt, wird eine Standardkurve generiert, die optimalerweise eine Steigung von -3,3 (in der Praxis -3,0 bis -3,9) aufweist (Velden, van der, 2003). Die Steigung der Standardkurven für NPM1 und ABL1 bei dem hier entwickelten Test beträgt jeweils -3,617. Weitere Parameter, die die Sensitivität beeinflussen, sind die untersuchte Zellzahl, damit verbunden die Menge an analysierter RNA bzw. cDNA, und die Anzahl der PCR-Zyklen (Velden, van der, 2003). Die Sensitivität der NPM1 A Analyse ist größtenteils von der Wahl der Primer und Sonde und den Reaktionskonditionen abhängig. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Sensitivität nicht von ähnlichen Sequenzen in normalen Zellen beeinflusst wird.

5.1.7 Spezifität

Der Nachweis einer bestimmten Gensequenz in einer DNA-Probe mittels PCR sollte spezifisch für diese Sequenz sein. Für die NPM1 A Mutation bedeutet dies, dass nur die gewünschte cDNA Sequenz mit der NPM1 Typ A Mutation, und nicht die Wildtyp-Sequenz, andere Gene oder genomische DNA amplifiziert werden. Im Etablierungsprozess des PCR-Assays wurden zum Nachweis von spezifischer Amplifikation, die PCR-Produkte zusammen mit einem Längenmarker auf ein Agarosegel aufgetragen und fotografiert. In den für NPM1 A positiven Proben konnte unter den finalen Reaktionsbedingungen jeweils nur eine Bande in der entsprechenden Größe des Amplikons nachgewiesen werden. In NPM1 A negativen Patienten findet sich zum Teil unspezifische Amplifikation in der

Gelelektrophorese in Form von kleineren Banden unterschiedlicher Größe. Im LightCycler wurde keine Amplifikationskurve angezeigt, das heißt, es fand keine Bindung der produktspezifischen Sonden an mögliche unspezifische Nebenprodukte statt.

Schnelle Temperaturänderungen und -kontrolle der temperaturabhängigen Schritte der DNA-Amplifikation kann Produktspezifität signifikant verbessern, wobei die nötige Amplifikationszeit verringert werden kann (Wittwer, 1991). Der LightCycler kann diese schnellen Temperaturänderungen mithilfe von heißer und kalter Luft bewerkstelligen und schnell auf die Proben in den dünnen Glaskapillaren übertragen.

Durch eine Optimierung der Amplifikationsszeit und -temperatur in der RQ-PCR in mehreren Schritten wurde die größtmögliche Spezifität mit gleichzeitig größtmöglicher Ausbeute gewählt. Eine höhere Annealing-Temperatur bedeutet eine spezifischere Bindung der Primer an die Zielsequenz, gleichzeitig aber auch eine niedrigere Produktausbeute, die wahrscheinlich aus inkomplettem Annealing resultiert (Wittwer, 1991). Die optimale Annealing-Temperatur für DNA-Amplifikation ist abhängig vom Basengehalt, der Nukleotidsequenz und Primerlänge und -schmelztemperatur. Sie ist meist um etwa 10°C höher als die Schmelztemperatur der Primer. Wittwer et al. beschreiben, dass Protokolle mit kürzest möglicher Annealingzeit (unter 1 s) und schnellst möglichem Wechsel zwischen Denaturierung und Annealing die höchste Ausbeute hervorbringen, bei gleichzeitig niedriger unspezifischer Amplifikation. Solange die DNA bereits vor der Amplifikation durch Erhitzen denaturiert wurde, findet eine ausreichende Denaturierung in weniger als 1 s statt. Diese Bedingungen konnten durch die Verwendung des LightCyclers erfüllt werden.

5.1.8 Reproduzierbarkeit

Real-Time RT-PCR Assays unterliegen signifikant weniger Schwankungen als konventionelle Methoden der RNA-Quantifizierung (Bustin, 2000).

Reproduzierbarkeit wird auch von Parametern wie die statistische Verteilung nach dem Gesetz von Poisson beeinflusst. So werden CP-Werte mit sinkender Kopienzahl aufgrund von stochastischen Effekten in der Quantifizierung von wenigen Zielmolekülen weniger reproduzierbar (Bustin, 2000). Die Verteilungsstatistik sagt aus, dass eine viel größere Zahl an Replikaten braucht um 5 von 10 RNA-Kopien zu unterscheiden, als 5 000 von 10 000 RNA-Kopien zu differenzieren. Die Variation des mittleren CP-Wertes von 6 Replikaten war bei diesem Test bei bis zu 37 Zyklen unter 1,5 Zyklen (Papadaki, 2009).

Nach Bustin et al. wird bei der RNA-Isolierung mithilfe des MagNA Pure LC Systems gute reproduzierbare mRNA-Qualität erzielt (Bustin, 2002). Das Gerät arbeitet nach einem festgelegten Protokoll. Die Reagenzien und Einwegmaterialien zur Bestückung des Geräts wurden streng nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Bustin et al. schreiben, dass eine Ursache für erhebliche Unterschiede innerhalb von RT-PCR-Ergebnissen die Variabilität zwischen verschiedenen Anwendern und Reagenzien ist (Bustin, 2002). So kann es sein, dass besonders fluoreszierende Sonden im Laufe der Zeit degradieren, und sich daraus Unterschiede bei CP-Werten ergeben. Diese Unterschiede können mit dem Calibrator eruiert werden, da dieser eine gleichbleibende Expression der Gene zeigt und somit der CP-Wert in einem bestimmten Bereich konstant sein sollte. In der LightCycler Software 4.05 gibt es ein Werkzeug, um LightCycler-Läufe mit niedriger Effizienz oder anderen Abweichungen automatisch zu markieren. Es kann ein Soll-Bereich für die CP-Werte des Calibrators eingegeben werden. Für den Fall, dass einer der Werte vom angegebenen Minimum oder Maximum abweicht, wird dies angezeigt. Bei sämtlichen Experimenten dieser Arbeit wurden die CP-Werte des Calibrators kritisch verglichen.

Die Varianz innerhalb eines LightCycler Laufs war mit einer Standardabweichung von 0,189 für NPM1 A und 0,167 für ABL1 bei jeweils 15 Replikaten niedrig. Durch die relative Quantifizierung werden Variationen aufgrund Probenqualität oder Degradierung der Reagenzien ausgeglichen. Das NPM1 A zu ABL1 Ratio des Calibrators variiert in einem Zeitraum von September 2006 bis Januar 2007 von 0,23 bis 1,08 bei 31 gemessenen Werten. Das entspricht einer Standardabweichung von 0,205. Die Varianz zwischen den einzelnen Versuchen müsste weiter reduziert werden. Für eine Anwendung des Assays im Klinikalltag müsste in weiteren Experimenten die Stabilität der Proben und Reagenzien näher untersucht und verbessert werden um eine solche Streuung zu vermeiden.

Gabert et al. stellten bei einer Studie bei der Protokolle für die RQ-PCR-Analyse für Fusionstranskripte erstellt wurden fest, dass die Ergebnisse zum Teil erhebliche Schwankungen zwischen teilnehmenden Laboren zeigten, die vor allem mit den Aufreinigungs-Schritten vor der eigentlichen PCR zusammenhingen (Gabert, 2003). Es ist wahrscheinlich, dass diese Abweichungen aus RNA-Degradation während Lagerung oder Versand, oder aus Variationen zwischen den Laboren in der Effizienz der reversen Transkription folgen. Durch die Verwendung eines Kontroll-Gens um Daten zu normalisieren konnten Gabert et al. die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen zwischen verschiedenen Labors erheblich verbessern, was nahe legt, dass Variationen in der RNA

Qualität und Quantität und die Effizienz der reversen Transkription wenigstens zum Teil durch Normalisierung kompensiert werden können (Gabert, 2003). Obwohl durch Normalisierung der Effekt von RNA-Degradation oder unterschiedlicher Effizienz der reversen Transkription reduziert werden kann, ist es wichtig daran zu denken, dass diese Einflüsse die Sensitivität der MRD Detektion deutlich reduzieren können.

5.1.9 Alternativen zur RQ-PCR

Nach gängiger Lehrmeinung ist eine nested PCR sensitiver als andere PCR Verfahren. Mit der nested PCR kann man geringe Mengen an Template nachweisen. Das Produkt einer ersten PCR wird in eine zweite eingesetzt. Das Primerpaar der zweiten, inneren PCR liegt dabei zwischen den Primern der ersten, äußeren Reaktion. Dadurch sollen falsche Amplifikationen der ersten PCR ausgesondert werden.

Der Versuch eine nested Hot-Block PCR mit ähnlicher Sensitivität und Spezifität der RQ-PCR zu etablieren war nicht erfolgreich. Die Sensitivität war deutlich geringer als bei der RQ-PCR, bei gleichzeitig unspezifischen Produkten bei dem Einsatz cDNA von NPM1 A negativen Patienten und Zellen. Es wurden zwei verschiedene Primer Paare für die erste, also die externe PCR, und drei verschiedene Primer Paare für die zweite, also die nested PCR ausgetestet. Die Annealing-Zeiten und -temperaturen für die Primer der primären und nested PCR erfolgten in einem weitläufigen Rahmen ohne durchschlagenden Erfolg. Tabelle 16 zeigt das Protokoll mit den Temperaturen und Zeiten zwischen denen variiert worden ist.

Tabelle 16: Protokoll mit den ausgetesteten Variationen der nested hot-block-PCR

Zyklen	Segment	Temperatur	Zeit
Prä-Inkubation			
1		95°C	5 min
Amplifikation			
25 bis 35	Denaturation	95°C	30 s
	Annealing	47°C bis 59°C	30 s
	Extension	72°C	60 s
Elongation			
1		72°C	10 min

5.1.10 Vergleich der NPM1 A RQ-PCR mit anderen Arbeiten

Es liegen Arbeiten anderer Gruppen vor, die Ergebnisse mit NPM1 als MRD-Marker in einer RQ-PCR vorstellen.

Gorello et al. entwickelten einen Assay für DNA und RNA, bzw. cDNA der für verschiedene NPM1 Mutationen spezifisch ist. Es wurden Patientenproben von 13 NPM1 positiven Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose untersucht. Mithilfe des cDNA Assays können NPM1 Mutationen Typ A und B quantitativ nachgewiesen werden. Die Standardkurve wurde mithilfe eines Plasmids generiert. ABL1 fungierte als Housekeeping-Gen gegen das normalisiert wurde. Der NPM1 A Mutationsstatus wurde als Anzahl der mutierten NPM1 A Kopien über 10^4 Kopien des ABL Gens wiedergegeben. Für die PCR wurde ein gemeinsamer Forward Primer und eine gemeinsame Sonde und ein unterschiedlicher Reverse Primer für die Mutationen A und B verwendet. Die Sensitivität variierte zwischen 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} . Mithilfe des DNA Assays konnten zusätzlich zu den NPM1 Mutationen Typ A und B auch die Mutationen Typ D, E, G und H nachgewiesen werden. Es wurde dieselbe Sonde und, bis auf Mutation A, derselbe Reverse Primer verwendet, sowie ein jeweils für die Mutation spezifischer Forward Primer. Mithilfe des Albumin Gens wurde hinsichtlich Quantität und Qualität normalisiert. Es konnte eine Sensitivität von 10^{-3} bzw. 10^{-4} erreicht werden. Die Anzahl der ermittelten mutierten Genkopien korrelierte mit dem klinischen Status der Patienten (Gorello, 2006).

Chou et al. untersuchten 194 Knochenmarksproben von 38 NPM1 positiven Patienten. Die Standardkurven bei diesem Assay wurden ebenfalls mit Plasmiden generiert. Die Reversen Primer sind mutationsspezifisch während die Sonde und der Forward Primer für die Amplifikation des Wildtyp-Gens sowie alle untersuchten Mutationen benutzt wurden. Normalisiert wurde gegen die Anzahl von detektiertem mutierten NPM1 plus Wildtyp NPM1. Die Sensitivität dieses Assays wird mit 10^{-5} angegeben. Die ermittelte Kopienzahl des mutierten Gens korrelierte mit dem klinischen Status der Patienten. Laut Chou et al. ermöglicht die absolute Quantifikation der NPM1 Mutation die Identifikation von Patienten mit höherem Rezidivrisiko und kürzerem Überleben. Sie sehen eine starke prognostische Bedeutung im Monitoring von NPM1 Mutationen mithilfe eines RQ-PCR Assays. Alle 38 von dieser Gruppe untersuchten Patienten mit einem echten Rezidiv behielten die NPM1 Mutation zum Rezidiv. Ein Patient entwickelte 56 Monate nach der Erstdiagnose der AML eine zweite, von der ersten unabhängige Leukämie. Bei diesem Patienten konnten maligne Zellen mit neuen klonalen chromosomalen Veränderungen nachgewiesen werden, allerdings nicht die NPM1 Mutation (Chou, 2007).

Ottone et al. stellten einen Allel-spezifischen (ASO)-RT-PCR Assay vor, der kostengünstig schnelle und sensitive Detektion von NPM1 A Mutationen ermöglicht, besonders in Ländern mit limitierten Ressourcen ohne die Technologie der Real-Time quantitative PCR.

Es wurden Knochenmarksproben von 21 NPM1 positiven Patienten untersucht. Die Spezifität des Assays wurde mithilfe von Kapillarelektrophorese und DNA-Sequenzierung nachgewiesen. Die Sensitivität des ASO-RT-PCR Assays und semi-nested ASO-PCR Assays wird mit 10^{-2} bzw. 10^{-5} angegeben. Dieser Ansatz ist nicht quantitativ, ist allerdings laut Ottone et al. für das molekulare Monitoring von NPM1 A positiven AML Patienten geeignet auch wenn zu keinem der untersuchten Patienten eine Knochenmarkspalte, die zeitlich kurz vor einem Rezidiv entnommen worden ist, vorlag. Es konnte somit nicht nachgewiesen werden, ob der entwickelte Ansatz dazu verwendet werden kann, ein Rezidiv auf molekularer Ebene zu diagnostizieren (Ottone, 2008). Alle aufgeführten Arbeiten konnten lediglich auf eine limitierte Patientenzahl und Probenzahl zurückgreifen. Es bleibt zu sehen ob die Ergebnisse mit weiteren Proben bestätigt werden können.

5.2 Übertragung der Ergebnisse der OCI/AML3 Zellen auf Patientenproben

5.2.1 Datenauswertung der Patientenproben

Die erhobenen MRD-Daten eines Patienten wurden immer mit dem Genexpressionslevel desselben Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose verglichen. Das von der Software ermittelte Expressionsratio der unbekannten Probe wurde jeweils durch das Expressionsratio des Calibrators geteilt, und somit normalisiert. Der Verlauf der MRD-Ratios durch das Ansprechen auf Therapie ist wahrscheinlich wichtiger als die absoluten Werte zu einem bestimmten Zeitpunkt. Expression kann nur im reproduzierbaren Bereich also gleich oder höher als die reproduzierbare Sensitivität, verlässlich quantifiziert werden. Der Messwert einer Patientenprobe wurde als positiv gewertet, wenn der CP-Wert eines oder mehrerer Replikate dieser Probe deutlich außerhalb des Bereichs der Negativkontrollen war. Das heißt der CP-Wert der Patientenprobe war mindestens einen Zyklus niedriger als der niedrigste CP-Wert der unspezifischen Amplifikation, und zugleich innerhalb des Bereichs des letzten Verdünnungsschritts der für die Ermittlung der maximalen Sensitivität verwendet wurde (Velden, van der, 2003). Der Messwert einer Patientenprobe wurde als negativ gewertet, wenn keinerlei Amplifikation zu sehen war, wenn der CP-Wert der Zielsequenz innerhalb oder nahe der CP-Werten der Negativkontrollen lag, oder wenn der CP-Wert weit weg vom höchsten CP-Wert der

maximalen Sensitivität war (Velden, van der, 2003). Eine positive Probe deren CP-Wert höher als der CP-Wert der maximalen reproduzierbaren Sensitivität ist, sollte als positiv, mit einem maximalen MRD-Level, dass niedriger als das reproduzierbare Level ist (positiv; $< 10^{-5}$), ausgewiesen werden. Niedrige MRD-Level sollten mit Bedacht, auch hinsichtlich der cDNA Qualität, welche durch einen ausreichend niedrigen CP-Wert der Referenz-Sequenz bestätigt werden kann, interpretiert werden.

Bei der Auswertung der LightCycler-Daten sollten für jede Probe die Amplifikationskurven zusammen mit dem von der Software ermittelten CP-Wert berücksichtigt werden. Es kommt vor, dass die Software einen CP-Wert ermittelt, die dazugehörige Kurve aber negativ ist. Dabei wird ein Schwanken auf der Ebene der unspezifischen Amplifikation als Kurvenanstieg gewertet und ein CP-Wert ermittelt. Fehler können durch manuelle Zuordnung der einzelnen CP-Werten zu ihrem Kurvenverlauf und Überprüfung der Plausibilität bei der Auswertung eines jeden Experiments verhindert werden.

5.2.2 Ergebnisse bei Beispielpatienten

Es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse mit der Zelllinie OCI/AML3 mit denen mit Patientenmaterial korrelieren. An einem Kollektiv von 51 Patienten wurde aufgezeigt, dass die NPM1 A Ratios sich wie erwartet verhalten und mit dem klinischen Verlauf und der Diagnostik aus dem Knochenmarksausstrich korrelieren. Bei Erstdiagnose ist das NPM1 A Ratio hoch, es nimmt nach Therapiebeginn ab und steigt im Falle eines Rezidivs erneut an. Anhand einzelner Patientenfallstudien wurde dies noch mal anschaulich dargelegt (Papadaki, 2009). Es bleibt diese Ergebnisse an einem größeren Kollektiv nochmals zu zeigen, um später eventuell bereits nach der Induktionstherapie anhand des gemessenen NPM1 A / ABL1 Ratios eine Aussage über die Prognose eines bestimmten Patienten treffen zu können. Auch für die Klärung der Frage, ob Patienten, deren NPM1 A Ratio mit oder nach Therapie nicht vollständig gegen Null geht, ein höheres Risiko für die Erleidung eines Rezidivs haben, werden weitere Ergebnisse mit größeren Patientenzahlen benötigt.

5.3 Verwendung von peripherem Blut als Material für die RQ-PCR

Standardprotokolle zur Verlaufskontrolle der AML-Patienten schlagen vor, bei Patienten in kompletter Remission (CR) im ersten Jahr nach Erreichen der CR alle zwei bis drei Monate, und für die nächsten zwei Jahre alle zwei bis sechs Monate eine Knochenmarksaspiration und -biopsie durchzuführen. Man weiß heutzutage, dass eine

regelmäßige Kontrolle der minimalen Resterkrankung posttherapeutisch essentiell für die Identifikation der Patienten mit einem höheren Rezidivrisiko ist, und dabei hilft, diese Patienten früher und effektiver zu behandeln. Bei einem AML Patienten, der lediglich niedrigdosiertes AraC als palliative Therapie bekommen hat, wurde in dieser Arbeit peripheres Blut verwendet um NPM1 A Transkriptionslevel zu quantifizieren. Mit der Verwendung von Blut für die Quantifizierung bestand die Möglichkeit die minimale Resterkrankung ungefähr zweimal pro Monat zu erfassen. Die NPM1 A Mutationslevel korrelierten mit der Klinik des Patienten, der Thrombozyten-, und Blastenzahl. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist kann ein Anstieg der NPM1 A Level noch bei Abwesenheit von morphologisch detektierbaren Blasten im peripheren Blut detektiert werden.

Peripheres Blut als Alternative für MRD Monitoring wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen vorgeschlagen und diskutiert.

Maurillo et al. beobachteten 50 AML Patienten nach dem Erreichen einer kompletten Remission auf minimale Resterkrankung. Mithilfe einer Durchflusszytometrie wurden die MRD-Level von 50 und 48 Probenpaaren mit Knochenmark und peripherem Blut nach Induktionstherapie bzw. Konsolidierung untersucht. Aus den vorläufigen Ergebnissen wurde interpretiert, dass die Untersuchung von peripherem Blut die Beurteilung von Knochenmark für MRD Detektion bei AML Patienten ergänzen kann, und der MRD Status in peripherem Blut am Ende der Konsolidierung eventuell hilfreiche prognostische Informationen liefern kann (Maurillo, 2007).

Tobal et al. kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass auch peripheres Blut anstatt von Knochenmark für die Bestimmung von minimaler Resterkrankung, in ihrem Fall des AML1-MTG8 Transkripts, verwendet werden kann. Die von ihnen detektierten MRD-Level in peripherem Blut waren 1-2 log-Stufen niedriger, als die in Knochenmarkproben. Es konnten aber in den Proben, die aus Blut gewonnen waren trotzdem Unterschiede in der Expression der AML1-MTG8 Transkripte festgestellt werden, die von den Veränderungen in den Knochenmarkproben widergespiegelt wurden (Tobal, 2000).

Gabert et al. untersuchten bei der RQ-PCR-Analyse von Fusionstranskripten bei AML gepaarte und ungepaarte Knochenmark- und Blutproben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und stellten fest, dass nach der Korrektur um die Blastenzahl und Normalisation über ein Kontroll-Gen die relative Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen dem unterschiedlichem Probenursprung zeigte (Gabert, 2003). Dieses Ergebnis legt nahe, dass sowohl Knochenmark, als auch peripheres Blut für die Einschätzung der Expressionlevel der Fusionstranskripte oder des veränderten Gens in

individuellen Leukämiefällen zum Zeitpunkt der Diagnose genutzt werden kann, um als Referenz für MRD Bewertungen im Verlauf der Krankheit zu dienen. Es bleibt zu untersuchen ob dies auch für spätere Zeitpunkte im Krankheitsverlauf gilt. Für diese Arbeit gab es keine Probenpaare, also cDNA aus Knochenmark und cDNA aus Blut von einem Patienten zu einem bestimmten Zeitpunkt, an denen man den direkten Vergleich vornehmen hätte können.

5.4 Prognoseschätzung mithilfe NPM1

Informationen über minimale Resterkrankung sind bei verschiedenen Krankheiten, wie ALL des Kindesalters, CML mit BCR-ABL und APL mit PML-RARA bereits als unabhängiger, prognostischer Faktor etabliert worden (Gabert, 2003). Der klinische Einfluss von minimaler Resterkrankung bei NPM1 positiver AML-NK konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (Schnittger, 2005a; Döhner, 2005; Verhaak, 2005; Thiede, 2006a). Tabelle 4 zeigt in der Einleitung dieser Arbeit einen Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden Daten zur prognostischen Bedeutung von NPM1 (und FLT3) Mutationen erhoben, die im Rahmen des AMLCG-Studientreffen in Essen am 09.06.2006 vorgestellt wurden. Es wurden 803 Patienten mit AML-NK bei Erstdiagnose auf eine NPM1 Mutation gescreent. 690 der 803 Patienten (85,9%) waren positiv für eine NPM1 Mutation. Die mediane Beobachtungszeit betrug 23 Monate. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass NPM1 positive Patienten in 87,3% der Fälle ein gutes Induktionsergebnis erzielt haben, d.h. dass die Blastenzahl an Tag 16 der Therapie unter 10% lag. NPM1 negative Patienten erreichten dies nur in 65,7% der Fälle. Die Patienten mit NPM1 Mutation zeigten auch ein längeres Gesamtüberleben als Patienten ohne diese Mutation.

5.5 NPM1 als MRD-Marker

Verschiedene Arbeitsgruppen haben NPM1 Mutationen auch hinsichtlich ihrer Stabilität im Laufe der Erkrankung untersucht.

Boissel et al. fanden bei 50 von 106 Patienten (47%) mit AML-NK zur Diagnosestellung eine NPM1 Mutation mithilfe von PCR und Fragmentanalyse. Bei allen 10 NPM1 positiven Patienten die auch zum Zeitpunkt des Rezidivs untersucht wurden, konnte auch zum Zeitpunkt des Rezidivs die NPM1 Mutation diagnostiziert werden. Von den 5 NPM1

negativen Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und des Rezidivs untersucht worden sind, hat kein Patient zum Rezidiv eine NPM1 Mutation erworben (Boissel, 2005). Suzuki et al. screenen 257 Patienten mit AML auf eine NPM1 Mutation durch Sequenzierung und Klonierung. Bei 64 der 257 Patienten (24,9%) konnte eine NPM1 Mutation gefunden werden. Von 17 NPM1 positiven Patienten mit Probenpaaren von Diagnose und Rezidiv haben zwei Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose NPM1 positiv waren, die Mutation beim Rezidiv verloren. Ein Patient zeigte einen normalen Karyotyp bei Diagnose (46XY) und zum Zeitpunkt des Rezidivs einen abnormen Karyotyp 46XYdel (20) (q1?). Eine FLT3, NRAS und TP53 Mutation lag bei diesem Patienten zu keinem Zeitpunkt vor. Der andere Patient zeigte weder Veränderungen im Karyotyp noch hinsichtlich des Mutationsstatus im Verlauf der Erkrankung. Sein Karyotyp ist 46XX, FLT3-ITD positiv (Suzuki, 2005).

Palmisano et al. untersuchten den NPM1 und FLT3 Mutationsstatus im Krankheitsverlauf von 28 erwachsenen AML Patienten mithilfe von Denaturing High Performance Liquid Chromatography (D-HPLC) und direkter Sequenzierung. 11 der 28 Patienten (39%) zeigten eine NPM1 Mutation bei Diagnosestellung. Von allen Patienten waren Probenpaare für die Diagnose und das Rezidiv, bei einem Patienten auch eine weitere Probe bei einem zweiten Rezidiv vorhanden. Alle Patienten zeigten dieselbe NPM1 Mutation bei Diagnose und erstem, bzw. zweitem Rezidiv. Im rezidivfreien Verlauf, solange sich die Patienten in kompletter Remission befanden, konnte die Mutation nicht detektiert werden. Dies zeige laut Palmisano et al., dass die Mutationen somatische Mutationen in Verbindung eines leukämischen Klons seien (Palmisano, 2007).

In einer Studie von Gorello et al. wird aufgezeigt, dass NPM1 ein stabiler MRD-Marker ist. Allerdings lagen dieser Gruppe lediglich für 3 Patienten Proben im Verlauf der Krankheit vor (Gorello, 2006).

Auch Chou et al. berichten in einer Studie mit insgesamt 38 NPM1 positiven AML Patienten, dass die NPM1 Mutation in leukämischen Zellen während einer mittleren Verlaufsperiode von 20,6 Monaten sehr stabil ist. Ein Patient entwickelte eine zweite, eigenständige Leukämie 56 Monate nach der initialen AML Diagnose. Alle der 22 Patienten die im Beobachtungszeitraum rezidierten zeigten einen Anstieg in der mutierten Genkopienzahl (Chou, 2007).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 21 NPM1 A positiven Probenpaaren von Diagnose und Rezidiv konnten bei 2 Proben nur zur Diagnose eine NPM1 Mutation nachgewiesen werden, d.h. 2 der 21 Patienten (9,5%) haben die Mutation im

Krankheitsverlauf verloren. Beide Patienten hatten zum Zeitpunkt der Diagnose einen normalen Karyotyp. Zum Zeitpunkt des Rezidivs hatte einer der Patienten eine neuerworbene Chromosomenaberration, eine unbalancierte Translokation der (7), t (1; 7) (q21; q22), die die Chromosomen 1 und 7 betraf. Derselbe Patient verlor auch seine FLT3-ITD Mutation zum Rezidiv (Papadaki, 2009). Dies kann mit der Differenzierung und Proliferation eines neuen leukämischen Klons erklärt werden. Klonale Evolution führt zu genetischen Veränderungen einer Zellpopulation. Während einer antileukämischen Behandlung überlebt eine kleine Population von leukämischen Stammzellen, die als minimale Resterkrankung detektiert werden kann. Der Erwerb zusätzlicher Mutationen im Laufe der Erkrankung kann weitere Selektionsvorteile bieten, und somit zur fortschreitenden Entartung maligner Tumorzellen führen. Aufgrund dieser genetischen Veränderungen in Tumorzellen kann es zum Verlust der NPM1 Mutation im Laufe einer AML kommen. Angesichts dieser Ergebnisse ist der Nutzen der NPM1 Mutation als MRD Marker möglicherweise limitiert (Papadaki, 2009).

5.6 Ausblick

Trotz der bemerkenswerten Fortschritte in der biologischen, diagnostischen und klinischen Charakterisierung von NPM1 Mutationen seit ihrer Entdeckung 2005, bleiben noch wichtige Rückschlüsse für die Krankheit AML mit normalem Karyotyp offen. Die neuen Errungenschaften in Diagnose und Subtypisierung von AML müssen im klinischen Alltag ihre Signifikanz und Zuverlässigkeit beweisen.

5.6.1 Reproduzierbarkeit und Stabilität

Für eine Verwendung des Assays in der klinischen Routine wäre eine Prüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch über mehrere Monate oder Jahre hinweg notwendig. Es müsste ausgeschlossen werden können, dass verwendetes Material mit der Lagerung degradiert.

5.6.2 NPM1 Mutationen Typ B und D

Die hier etablierte RQ-PCR liefert lediglich den Nachweis der Expression von NPM1 Typ A. Da diese Mutation A für den hohen Prozentsatz von, je nach Quelle 75%- 80% aller NPM1 Mutationen verantwortlich ist, wurde der Test auf diese Mutation ausgelegt. Der nächste Schritt wäre die Entwicklung eines quantitativen Nachweisverfahrens für die Mutationen B und D, die immerhin noch 10% und 5% aller NPM1 Mutationen ausmachen.

5.6.3 Klassifikation von AML mithilfe von Genexpressionsprofilen

Mit der in dieser Arbeit entwickelten RQ-PCR kann nur eine Mutation, die NPM1 A Mutation nachgewiesen werden. Mithilfe von DNA-Chips kann die Expression mehrerer Tausend Gene in einer DNA-Probe innerhalb eines Experiments nachgewiesen werden. Sogenannte Genexpressionsprofile wurden als nützliches Werkzeug für die Klassifizierung von Leukämien entdeckt, da verschiedenste Varianten vieler Gene gleichzeitig bestimmt werden können. Alcalay et al. haben gezeigt, dass NPMc+ AML ein bestimmtes Genexpressionsmuster exprimiert, dass mit der Hochregulierung von Genen verknüpft ist, die mutmaßlich an der Erhaltung von Stammzellen beteiligt sind. Daraus werden Rückschlüsse auf mögliche Entstehungsweisen von Leukämieerkrankungen gezogen (Alcalay, 2005). Wilson et al. identifizierten mithilfe von Genexpressionsprofilen bei AML neue biologische Cluster für Risikoklassifikation und Prognose (Wilson, 2006). Es bleibt zu sehen, ob die Microarray Technologie sich bei der Prognosebestimmung der AML mit normalem Karyotyp bewährt, und möglicherweise die Testung auf verschiedene einzelne Genalterationen mit prognostischer Signifikanz ablösen wird.

5.6.4 Klassifikationen für AML mit normalem Karyotyp

Aufgrund des Fehlens spezifischer klonaler Marker gibt es keine Information zur Beteiligung unterschiedlicher Zelllinien, und der Ursprungszelle bei AML mit normalem Karyotyp. Da das NPM-Gen häufig bei AML-NK mutiert ist und aberrante zytoplasmatische Lokalisation hervorruft (NPMc+), wurde es als Klonalitäts-Marker für AML Linien benutzt. Pasqualucci et al. entdeckten klonale NPM Exon 12 Mutationen in myeloiden, monozytischen, erythroiden und megakaryozytischen Zellen. Aberrante zytoplasmatische Expression von mutiertem NPM Protein wurde mithilfe von anti-NPM-Antikörpern in zwei oder mehr myeloiden hämatopoetischen Zellreihen in 99 von 161 (61,5%) in paraffin-gebetteten Knochenmarkbiopsien von NPMc+ AML gefunden (Pasqualucci, 2006). Lymphoide Beteiligung konnte in 3 untersuchten Fällen ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NPMc+ AML entweder von einer gemeinsamen myeloiden, oder einer frühen Vorläuferzelle abstammt. Immunhistochemische Studien zeigen, dass verschiedene Kombinationen und Anteile der NPMc+ leukämischen Zellen von verschiedenen Linien verantwortlich für die Heterogenität innerhalb jedes FAB Klassifikationstyps sind, und dafür, dass NPMc+ AML in verschiedene FAB Kategorien fällt (Pasqualucci, 2006). Die FAB Kriterien sind somit nicht für NPMc+ AML anwendbar. Die WHO Klassifikation, die auch zytogenetische und

molekulargenetische Merkmale berücksichtigt, ist 2008 revidiert worden. Wie von Pasqualucci et al. schon 2006 gefordert, ist für den klinischen Gebrauch, unter anderen, NPMc+ AML als provisorische Entität als eigenständige AML mit prognostischer Bedeutung eingeführt worden (Pasqualucci, 2006 und Vardiman 2009).

Auch Mrózek et al. weisen auf die Bedeutung von rekurrierenden molekularen genetischen Veränderungen bei zytogenetisch normaler AML hinsichtlich der Prognose, und somit der Möglichkeit von risikoadaptierter Postremissionstherapie, hin. Sie werteten die Datenlage über verschiedene Genmutationen und Veränderungen in der Genexpression (FLT3-, NPM1, und CEBPA- Genmutation, partielle Tandem Duplikation des MLL-Gens, Überexpression des BAALC- und ERG-Gens) aus, und unterbreiteten einen Vorschlag für ein Schema, dass Patienten risiko-adaptierter Therapie zuführt, indem Informationen über alle bekannten prognostischen Marker verwendet wird (Mrózek, 2007). AML mit FLT3 Mutation wird bisher nicht in der WHO Klassifikation geführt. Die FLT3 Mutation begleitet häufig andere Mutationen wie t (15; 17) (q22; q12) und t (6; 9) (p23; q34). Dennoch ist es sinnvoll, aufgrund der prognostischen Aussage, in allen Fällen von AML, besonders bei zytogenetisch normaler AML, den Mutationsstatus hinsichtlich der FLT3 Mutationen zu bestimmen (Vardiman, 2009).

6 Zusammenfassung

Exon 12 Nucleophosmin (NPM1) Mutationen stellen die häufigsten molekularen Aberrationen bei Erwachsenen mit akuter myeloischer Leukämie (AML) dar. Molekulare Detektion der Mutation Typ A (NPM1 A), welche 80% aller NPM1 Mutationen ausmacht, könnte für die Bestimmung von minimaler Resterkrankung (MRD) eingesetzt werden. Der molekulardiagnostische Nachweis minimaler Resterkrankung mittels RQ-PCR ist von wesentlichem prognostischem Wert, um in Zukunft eine möglichst präzise Abschätzung des individuellen Rezidivrisikos, sowie eine risikoadaptierte Behandlung des Patienten zu ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde ein RT-PCR-Test für die relative Quantifizierung von NPM1 Mutation A Expressionslevels im Vergleich zu Genlevels des Housekeeping-Gens ABL1 entwickelt. Die Expressionsratios wurden zusätzlich zur Normalisierung über das Referenz-Gen ABL1 über das Expressionsratio von NPM1 A zu ABL1 eines Calibrators normalisiert. Die PCR wurde mithilfe der Zelllinie OCI/AML3, welche positiv für die NPM1 A Mutation ist, etabliert. Der Calibrator entspricht einer Probe OCI/AML3 cDNA. Mithilfe einer Verdünnungsreihe von OCI/AML3 cDNA wurden getrennte Standardkurven für die Amplifikation von NPM1 und ABL1 erstellt. Der Assay hat eine Sensitivität von 10^{-5} , das heißt die letzte nachweisbare Verdünnung von für die Mutation positive cDNA ist 1:100 000. Die Spezifität der PCR konnte mit mehreren Zelllinien, welche negativ für die NPM1 Mutation sind und keine Amplifikation gezeigt haben, nachgewiesen werden. Die Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität und Spezifität konnten mit ausgewählten Patientenproben bestätigt werden.

Die klinische Anwendung wurde mithilfe von Verlaufsmessungen von 51 NPM1 A positiven Patienten durchgeführt. NPM1 A mRNA Expressionslevel wurden in 154 Knochenmark- und Blutproben zu unterschiedlichen Stadien der Krankheit bestimmt. Bei 27 Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose und nach Induktionstherapie analysiert worden sind, zeigten die NPM1 A Expressionsratios eine mittlere \log_{10} -Reduktion von 2,48. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Erfolg der Behandlung, auch sichtbar in der Reduzierung der Blastenzahlen im Knochenmark.

Von den 51 Patienten die zur Diagnosestellung untersucht worden sind, erlitten 21 ein Rezidiv. Zwei der 21 Patienten mit Rezidiv verloren die NPM1 A Mutation im Rezidiv,

was durch eine Schmelzkurven-PCR bestätigt wurde. Die Beobachtung vom Verlust der Mutation durch klonale Evolution bei 9,5% der untersuchten Probenpaare von Diagnose und Rezidiv limitiert den Wert der NPM1 Mutation als molekularer Marker für MRD.

7 Abstract

Nucleophosmin (NPM1) mutations in exon 12 represent the most frequent molecular aberrations in adult patients with acute myeloid leukemia (AML). Molecular detection of the most prevalent nucleophosmin mutation A (NPM1 A), accounting for 80% of all NPM1 mutations, could be a useful marker for minimal residual disease (MRD). MRD detection using RQ-PCR is of importance for future individual risk assessment and subsequent risk adapted therapy for each patient.

A calibrator normalized relative quantification assay for NPM1 A levels, suitable for routine diagnostics was developed. A real-time polymerase chain reaction (PCR) assay was established for NPM1 A using the OCI/AML3 cell line which carries the NPM1 A mutation. ABL1 served as a reference housekeeping gene. Relative quantification was performed by calculating the NPM1 A / ABL1 ratio which was further normalized to the NPM1 A / ABL1 ratio of a calibrator containing OCI/AML3 cDNA. Separate standard curves for the amplification of the NPM1 and ABL1 gene were created using dilutions of the OCI/AML3 cDNA. The assay showed a sensitivity of 10^{-5} , which means the highest dilution of NPM1 positive cDNA to be detected, was 1:100 000. Specificity was proved with several NPM1 A negative cell lines which showed no amplification. The results regarding sensitivity and specificity obtained with cDNA from cell lines could be shown with several patient cDNA as well.

The clinical usefulness was evaluated by monitoring MRD in 51 AML patients with NPM1 A. We quantified mutant NPM1 RNA levels in 154 bone marrow and peripheral blood samples from different phases of the disease. In 27 patients analyzed at diagnosis and after induction treatment, NPM1 A ratios showed a median \log_{10} reduction of 2.48, which correlated with the treatment outcome also shown as blast count. Among the 51 patients diagnosed at the beginning of the disease, 21 relapsed and two of them lost the mutation. The loss of the NPM1 A mutation at the time of the relapse was shown with a melting curve PCR as well. Clonal evolution was observed in 9.5% limiting the usefulness of the NPM1 A mutation as a molecular marker in these patients (Papadaki, 2009).

8 Literaturverzeichnis

- Alcalay, M., Tiacci, E., Bergomas, R., Bigerna, B., Venturini, E., Minardi, S., Meani, N., Diverio, D., Bernhard, L., Tizzoni, L., Volorio, S., Luzi, L., Colombo, E., Lo Coco, F., Mecucci, C., Falini, B., Pelicci, P. 2005: Acute myeloid leukaemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. **Blood** 106: 899-902
- Ammatuna, E., Noguera, N., Zangrilli, D., Curzi, P., Panetta, P., Bencivenga, P., Amadori, S., Federici, G., Lo-Coco, F. 2005: Rapid detection of nucleophosmin (NPM1) mutations in acute myeloid leukaemia by denaturing HPLC. **Clinical Chemistry** 51: 2165-7
- Beillard, E., Pallisgaard, N., van der Velden, V., Bi, W., Dee, R., van der Schoot, E., Delabesse, E., Macintyre, E., Gottardi, E., Saglio, G., Watzinger, F., Lion, T., van Dongen, J., Hokland, P., Gabert, J. 2003: 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** 17: 2474-86
- Bennet, J., Catovsky, D., Daniel, M., Flandrin, G., Galton, D., Gralnick, H. 1976: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **British Journal of Haematology** 33: 451-8
- Boissel, N., Renneville, A., Biggio, V., Philippe, N., Thomas, X., Cayuela, J., Terre, C., Tigaud, I., Castaigne, S., Raffoux, E., De Botton, S., Fenaux, P., Dombret, H., Preudhomme, C. 2005: Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. **Blood** 106: 3618-20
- Büchner, T., Hiddemann, W., Wörmann, B., Löffler, H., Gassmann, W., Haferlach, T., Fonatsch, C., Haase, D., Schoch, C., Hossfeld, D., Lengfelder, E., Aul, C., Heyll, A., Maschmeyer, G., Ludwig, W., Sauerland, M., Heinecke, A. 1999: Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML cooperative Group. **Blood** 93: 4116-24
- Büchner, T., Hiddemann, W., Wörmann, B., Löffler, H., Gassmann, W., Haferlach, T., Fonatsch, C., Haase, D., Schoch, C., Hossfeld, D., Lengfelder, E., Aul, C., Heyll, A., Maschmeyer, G., Ludwig, W., Sauerland, M., Heinecke, A. 2003: 6-Thioguanine, cytarabine, and daunorubicin (TAD) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (HAM) for induction, TAD for consolidation, and either prolonged maintenance by reduced monthly TAD or TAD-HAM-TAD and one course of intensive consolidation by sequential HAM in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia (AML): a randomized trial by the German AML cooperative Group. **Journal of Clinical Oncology** 21: 4496-504

- Büchner, T., Berdel, W., Schoch, C., Haferlach, T., Serve, H., Kienast, J., Schnittger, S., Kern, W., Tchinda, J., Reichle, A., Lengfelder, E., Staib, P., Ludwig, W., Aul, C., Eimermacher, H., Balleisen, L., Sauerland, M., Heinecke, A., Wörmann, B., Hiddemann, W. 2006: Double induction containing either two courses or one course of high-dose cytarabine plus mitoxantrone and postremission therapy by either autologous stem-cell transplantation or by prolonged maintenance for acute myeloid leukemia. **Journal of Clinical Oncology** 24: 2480-9
- Bustin, S. 2000: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology** 25: 169-93
- Bustin S. 2002: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology** 29: 23-39
- Caudill, J., Sternberg, A., Li, C., Tefferi, A., Lasho, T., Steensma, D. 2006: C-terminal nucleophosmin mutations are uncommon in chronic myeloid disorders. **British Journal of Haematology** 133: 638-41
- Cazzaniga, G., Dell'Oro, M., Mecucci, C., Giarin, E., Masetti, R., Rossi, V., Locatelli, F., Martelli, M., Basso, G., Pession, A., Biondi, A., Falini, B. 2005: Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukaemia with normal karyotype. **Blood** 106: 1419-22
- Chou, W.C., Tang, J. L., Lin, L. I., Yao, M., Tsay, W., Chen, C. Y., Wu, S. J., Huang, C. F., Chiou, R. J., Tseng, M. H., Lin, D. T., Lin, K. H., Chen, Y. C., Tien, H. F. 2006: Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: The age-dependent incidences and the stability during disease evolution. **Cancer Research** 66: 3310-6
- Chou, W.C., Tang, J. L., Wu, S. J., Tsay, W., Yao, M., Huang, S. Y., Huang, K. C., Chen, C. Y., Huang, C. F., Tien, H. F. 2007: Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing Nucleophosmin (NPM1) mutations. **Leukemia** 21: 998-1004
- Clegg, M., 1995: Fluorescence resonance energy transfer. **Current Opinion in Biotechnology** 6: 103-10
- Colombo, E., Marine, J., Danovi, D., Falini, B., Pelicci, G. 2002: Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. **Nature Cell Biology** 4: 529-33
- Döhner, K., Schlenk, R., Habdank, M., Scholl, C., Rücker, F., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Fröhling, S., Döhner, H. 2005: Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favourable prognosis in younger adults with acute myeloid leukaemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. **Blood** 106: 3740-6

- Eckert, C., Scrideli, C. A., Taube, T., Songia, S., Wellmann, S., Manenti, M., Seeger, K., Biondi, A., Cazzaniga, G. 2003: Comparison between TaqMan and LightCycler technologies for quantification of minimal residual disease by using immunoglobulin and T-cell receptor genes consensus probes. **Leukemia** 17: 2517-24
- Falini B., Martelli M., Bolli N., Bonasso R., Ghia E., Palotta M., Diverio D., Nicoletti I., Pacini R., Tabarrini A., Galetti B., Mannucci R., Roti G., Rosati R., Specchia G., Liso A., Tiacci E., Alcalay M., Luzi L., Volorio S., Bernhard L., Guarini A., Amadori S., Mandelli F., Pane F., Lo-Coco F., Saglio G., Pelicci P., Martelli M., Mecucci C. 2006a: Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukaemia. **Blood** 108: 1999-2005
- Falini, B., Bolli, N., Shan, J., Martelli, M., Liso, A., Pucciarini, A., Bigerna, B., Pasqualucci, L., Mannucci, R., Rosati, R., Gorello, P., Diverio, D., Roti, G., Tiacci, E., Cazzaniga, G., Biondi, A., Schnittger, S., Haferlach, T., Hiddemann, W., Martelli, M., Gu, W., Mecucci, C., Nicoletti, I. 2006b: Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. **Blood** 107: 4514-23
- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., Bigerna, B., Pacini, R., Pucciarini, A., Liso, A., Vignetti, M., Fazi, P., Meani, N., Pettrossi, V., Saglio, G., Mandelli, F., Lo-Coco, F., Pelicci, P., Martelli, M. 2005: Cytoplasmatic nucleophosmin in acute myelogenous leukaemia with a normal karyotype. **The New England Journal of Medicine** 352: 254-66
- Falini, B., Nicoletti, I., Martelli, M., Mecucci, C. 2007a: Acute Myeloid Leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biological and clinical features. **Blood** 109: 874-85
- Falini, B., Nicoletti, I., Bolli, N., Martelli, M., Liso, A., Gorello, P., Mandelli, F., Mecucci, C., Martelli, M. 2007b: Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. **Haematologica** 92: 519-32
- Gabert, J., Beillard, E., van der Velden, V., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G., Cazzaniga, G., Cayuela J., Cané, H., Pane, F., Aerts, J., De Micheli, D., Thirion, X., Pradel, V., González, M., Viehmann, S., Malec, M., Saglio, G., van Dongen, J. 2003: Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe against Cancer program. **Leukemia** 17: 2318-57
- Gorello, P., Cazzaniga, G., Alberti, F., Dell'Oro, M., Gottardi, E., Specchia, G., Roti, G., Rosati, R., Martelli, M., Diverio, D., Lo Coco, F., Biondi, A., Saglio, G., Mecucci, C., Falini, B. 2006: Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. **Leukemia** 20: 1103-8

- Grisendi, S., Berhardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K., Pandolfi, P. P., 2005b: Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. **Nature** 437: 147-53
- Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., Pandolfi, P. 2006: Nucleophosmin and cancer. **Nature Reviews Cancer** 6: 493-505
- Hingorani, K., Szebeni, A., Olson, M. 2000: Mapping the functional domains of nuclear protein B23. **Journal of Biological Chemistry** 275: 24451-7.
- Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A 2005: Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity** 6: 279-84
- Kriener, S., Fellbaum, C., Hansmann, M. 2004: Akute myeloische Leukämie (AML). In: Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. (Hrsg.), **Pathologie**. Elsevier GmbH, München, Seite 530-3
- Li J., Zhang X., Sejas D., Pang Q. 2005: Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells. **Leukemia Research** 29: 1415-23
- Li, J., Sejas, D., Rani, R., Koretsky, T., Bagby, G., Pang, Q. 2006: Nucleophosmin regulates cell cycle progression and stress response in hematopoietic stem/progenitor cells. **Journal of Biological Chemistry** 281:16536-45.
- Lin, L., Lin T., Chou, W., Tang, J., Lin, D., Tien, H. 2006: A novel fluorescence-based multiplex PCR assay for rapid simultaneous detection of CEBPA mutations and NPM mutations in patients with acute myeloid leukemias. **Leukemia** 20: 1899-903
- Löwenberg, B., Downing, J., Burnett, A. 1999: Acute myeloid leukaemia. **The New England Journal of Medicine** 341: 1051-62
- Maurillo, L., Buccisano, F., Spagnoli, A., del Poeta, G., Panetta, P., Neri, B., del Principe, M., Mazzone, C., Consalvo, M., Tamburini, A., Ottaviani, L., Fraboni, D., Sarlo, C., de Frabitiis, P., Amadori, S., Venditti, A. 2007: Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow. **Haematologica** 92: 605-11
- Mrózek, K., Marcucci, G., Paschka, P., Whitman, S. P., Bloomfield, C. D. 2007: Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? **Blood** 109: 431-48
- Nakagawa, M., Kameoka, Y., Ritsuro, S. 2005: Nucleophosmin in acute myelogenous leukemia. **The New England Journal of Medicine** 352: 1819-20
- Naoe T., Suzuki T., Kiyoi H., Urano T. 2006: Nucleophosmin: a versatile molecule associated with haematological malignancies. **Cancer Science** 97: 963-9

- Noguera, N., Ammatuna, E., Zangrilli, D. 2005: Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. **Leukemia** 19: 1479-82.
- Okuwaki, M. 2008: The Structure and Functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a Multifunctional Nucleolar Acidic Protein. **The Journal of Biochemistry** 143: 441-8
- Ottone, T., Ammantuna, E., Lavorgna, S., Noguera, N., Buccisano, F., Venditti, L., Postorino, G., Amadori, S., Lo-Coco, F. 2008: An allele-specific RT-PCR assay to detect type A mutation of the Nucleophosmin-1 gene in acute myeloid leukemia. **Journal of Molecular Diagnostics** 10: 212-6
- Palmisano, M., Grafone, T., Ottaviani, N. T., Baccarani, M., Martinelli, G. 2007: NPM1 mutations are more stable than FLT3 mutations during the course of disease in patients with acute myeloid leukemia. **Haematologica** 92: 1268-9
- Papadaki, C., Dufour, A., Seibl, M., Schneider, S., Bohlander, S., Zellmeier E., Mellert, G., Hiddemann, W., Spierkermann, K. 2009: Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. **British Journal of Haematology** 144: 517-23
- Pasqualucci, L., Liso, A., Martelli, M., Bolli, N., Pacini, R., Tabarrini, A., Carini, M., Bigerna, B., Pucciarini, A., Mannucci, R., Nicoletti, I., Tiacci, E., Meloni, G., Specchia, G., Cantore, N., Di Raimondo, F., Pileri, S., Mecucci, C., Mandelli, F., Martelli, F. M., Falini, B. 2006: Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: Impact on WHO classification. **Blood** 108: 4146-55
- Quentmeier, H., Martelli, M. P., Dirks, W. G., Bolli, N., Liso, A., MacLeod, R. A. F., Nicoletti, I., Mannucci, R., Pucciarini, A., Bigerna, B., Martelli, M. F., Mecucci, C., Drexler, H. G., Falini, B. 2005: Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin. **Leukemia** 19: 1760-7
- Rasmussen, R. 2001: Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S. Wittwer, C. Nakagawara, K. (Hrsg.): **Rapid Cycle Real-Time PCR : Methods and Applications**; 1. Aufl., Springer, Heidelberg, S. 21-34
- Roche Applied Science, **Technical Notes** No. LC 10/update 2003; LC 11/update 2003; 18/2004; 16/2005, Roche Applied Science, Penzberg
- Roti, G., Rosati, R., Bonasso, R., Gorello, P., Diverio, D., Martelli, M., Falini, B., Mecucci, C. 2006: Denaturing high-performance liquid chromatography: a valid approach for identifying NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. **Journal of Molecular Diagnostics** 8: 254-9
- Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M, et al. 2002: Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. **Blood** 100: 59-66.

- Schnittger, S., Weissner, M., Schoch, C., Hiddemann, W., Haferlach, T., Kern, W. 2003: New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+. Or CBFMBYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. **Blood** 102: 2746-55
- Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., Hiddemann, W., Haferlach, T. 2004: FLT3 length mutations as marker for follow-up studies in acute myeloid leukemia. **Acta Haematologica** 112: 68-78
- Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., Mecucci, C., Tschulik, C., Martelli, F., Haferlach, T., Hiddemann, W., Falini, B. 2005a: Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. **Blood** 106: 3733-9
- Shipley, G. 2006: An introduction to real-time PCR. In Dorak, T. (Hrsg.): **Real-time PCR**. 1. Aufl., Taylor & Francis Group, New York, S.1-37
- Suzuki, T., Kiyoi, H., Ozeki, K., Tomita, A., Yamaji S., Suzuki R., Kidera Y., Miyawaki A., Asou N., Kuriyama K., Yagasaki F., Shimazaki C., Akiyama H., Nishimura M., Motoji T., Shinagawa K., Takeshita A., Ueda R., Kinoshita T., Emi N., Naoe T. 2005: Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukaemia. **Blood** 106: 2854-61
- Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., et al. 2002: Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. **Blood** 99: 4326-35.
- Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., Steudel, C., Illmer, T., Schaich, M., Ehninger, G. 2006a: Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukaemia (AML). **Blood** 107: 4011-20
- Thiede, C., Creutzig, E., Illmer, T., Schaich, M., Heise, V., Ehninger, G., Landt, O. 2006b: Rapid and sensitive typing of NPM1 mutations using LNA-mediated PCR clamping. **Leukemia** 20: 1897-9
- Tobal, K., Newton, J., Macheta, M., Chang, J., Morgenstern, G., Evans, P., Morgan, G., Lucas, G., Liu Yin, J. 2000: Molecular quantification of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. **Blood** 95: 815-9
- Velden, van der, V., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., van Dongen, J. 2003: Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. **Leukemia** 17: 1013-34
- Vardiman, J., Thiele, J., Arber, D., Brunning, R., Borowitz, M., Porwit, A., Lee Harris, N., Le Beau, M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A., Bloomfield, C. 2009: The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood** 114: 937-51

- Verhaak, R., Goudswaard, C., Putten, van W., Bijl, M., Sanders, M., Hagens, W., Uitterlinden, C., Erpelinck, J., Delwel, R., Löwenberg, B., Valk, P. 2005: Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. **Blood** 106: 3747-54
- Wang, X., Seed, B. 2006: High-throughput primer and probe design. In Dorak, T. (Hrsg.): **Real-time PCR**. 1. Aufl., Taylor & Francis Group, New York, S. 93-106
- Weisser, M., Kern, W., Rauhut, S., Schoch, C., Hiddemann, W., Haferlach, T., Schnittger, S. 2005: Prognostic impact of RT-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. **Leukemia** 19: 1416-23
- Wilson C., Davidson G., Martin S., Andries E., Potter J., Harvey R., Ar K., Xu Y., Kopecky K., Ankerst D., Gundacker H., Slovak M., Mosquera-Caro M., Chen M., Stirewalt D., Murphy M., Schultz F., Kang H., Wang X., Radich J., Appelbaum F., Altas S., Godwin J., Willman C. 2006: Gene expression profiling of adult myeloid leukaemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. **Blood** 108: 685-96
- Wittwer, C., Garling, D. 1991: Rapid Cyclor DNA Amplification: Time and Temperature Optimization. **BioTechniques** 10: 76-83
- Wittwer, C., Herrmann, M., Moss, A., Rasmussen, R. 1997a: Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. **BioTechniques** 22: 130-8
- Wittwer, C. Ririe, K., Andrew, D., David, R., Gundry, R., Balis, U. 1997b: The LightCycler: A Microvolume Multisample Fluorimeter with Rapid Temperature Control. **BioTechniques** 22: 176-81
- Zhang Y, Zhang M, Yang L, Xiao Z. 2007: NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. **Leukemia Research** 31: 109-11

9 Anhang

9.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann für die Ermöglichung der Arbeit in der Medizinischen Klinik III an der Ludwig-Maximilians-Universität München Großhadern.

Herrn Dr. habil. Karsten Spiekermann für die Betreuung und Korrektur dieser Arbeit.

Frau Dr. Annika Dufour bei der Unterstützung in technischen und theoretischen Fragen.

Frau Christina Papadaki für die gute Zusammenarbeit und Fortführung des Projektes mithilfe weiterer Experimente und Patientenproben.

Herrn Dr. Rudolf Seibl für die Expertise über das Schreiben einer Dissertation und Unterstützung bei molekularbiologischen Fragestellungen .

Den Mitarbeitern des Labors für Leukämiediagnostik, besonders Frau Evelyn Zellmeier und Frau Gudrun Mellert für die Hilfestellung und Mitwirkung bei der Durchführung der technischen Arbeiten im Labor für Leukämiediagnostik.

Frau Carola Reindl für die Einführung in die Arbeiten der Zellkultur.

Außerdem bei sämtlichen Mitarbeitern der AML CG-Studie, bei den behandelnden Ärzten und den Patienten für ihr Mitwirken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zum Teil in folgender Publikation veröffentlicht:

Papadaki, C., Dufour, A., Seibl, M., Schneider, S., Bohlander, S., Zellmeier E., Mellert, G., Hiddemann, W., Spiekermann, K. 2009: Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. **British Journal of Haematology** 144: 517-23

9.2 Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson-Gen
ALK	anaplastic lymphoma kinase
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AMLCG	AML Cooperative Group
AML-NK	akute myeloische Leukämie mit normalem Karyotyp
APL	akute Promyelozytenleukämie
AraC	Arabinosyl-Cytosin
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
AS	Aminosäure
ASO-PCR	allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction
BAALC	brain and acute leukemia gene, cytoplasmic
BCR	breakpoint cluster region
BCR/ABL	Fusionsgen der Gene BCR und ABL
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BM	bone marrow; Knochenmark
BP	Basenpaare
CBF	core binding factor
CD	cluster of differentiation; Zell-Oberflächenmarker
CEBPA	CCAAT enhancer binding protein alpha
CML	chronische myeloische Leukämie
CP	Crossing Point
CR	complete remission; komplette Remission
DEK	DEK Onkogen
DEK/NUP214	Fusionsgen der Gene DEK und NUP214
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EVI1	ecotropic viral integration site 1

FAB	French-American-British
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLT3	FMS-like Tyrosine Kinase 3
FLT3 ITD	Interne Tandem Duplikation des FMS-like Tyrosine Kinase 3 Gens
FLT3 TKD	Tyrosinkinase Domäne Mutationen des FMS-like Tyrosine Kinase 3 Gens
FLT3 D835	Mutation der Aminosäure 835 von FLT3
GvHD	Graft-versus-host-disease
HPLC	high-performance liquid chromatography
IHC	immunhistochemistry
ITD	internal tandem duplication
kD	kilo Dalton
KIT	Tyrosinkinase
KM	Knochenmark
k-RAS	Kirsten-Ras, Proto-Oncogen
LfL	Labor für Leukämiediagnostik
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MKL1	megakaryoblastic leukemia (translocation) 1
MLF1	myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1
MLL	mixed-lineage Leukemia Gen
MLL1 PTD	Partielle Tandemduplikation des mixed-lineage Leukemia Gens
MLLT3	mixed-lineage Leukemia Gen auf Chromosom 3 transloziert
MLLT3/MLL	Fusionsgen der Gene MLLT3 und MLL
MRD	minimal residual disease; minimale Resterkrankung
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localization signal
NPM	Nucleophosmin
NPMwt	Nucleophosmin Wildtyp
NUP214	Nucleoporin 214kDa

p53	Tumorsuppressorgen
PB	peripheral blood; peripheres Blut
PBS	phosphat buffer saline
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PLT	platelets; Thrombozyten
PML	ProMyelocytic Leukemia
PML/RAR α	Fusionsgen der Gene PML und RAR α
RAR α	Retinoic Acid Rezeptor alpha
RAS	rat sarcoma, Proto-Oncogen
RBM15	RNA binding motif Protein 15
RBM15/MKL1	Fusionsgen der Gene RBM15 und MKL1
RPN1	Ribophorin 1
RPN1/EVI1	Fusionsgen der Gene RPN1 und EVI1
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tm	Schmelzpunkt
WBC	white blood cells; weiße Blutzellen
WHO	World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation

9.3 Curriculum vitae

Marlene Seibl

Geburtsdatum: 12. Februar 1983 in München
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademische Ausbildung

Okt. 2002 – August 2004	Studium der Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt nach alter ÄAppO an der LMU München
Aug. 2004	Ärztliche Vorprüfung
Okt. 2004 – Mai 2009	Studium der Humanmedizin, klinischer Abschnitt nach neuer ÄAppO an der LMU München
Mai 2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Dissertation

Mai 2006 – Jan. 2011	Doktorandin Medizinische Klinik III Labor für Leukämiediagnostik Klinikum der Universität München-Großhadern, Arbeitsgruppe Molekulargenetik PD Dr. Spiekermann Thema: Quantifizierung von minimaler Resterkrankung bei akuter myeloischer Leukämie mit NPM1 Mutation mittels Real-Time- PCR
----------------------	--

Publikation

Feb. 2009	Papadaki, C., Dufour, A., Seibl, M. , Schneider, S., Bohlander, S., Zellmeier E., Mellert, G., Hiddemann, W., Spiekermann, K. 2009: Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. British Journal of Haematology 144: 517-23
-----------	--

München, 20. Januar 2011