

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. rer. nat. Michael von Bergwelt



**MRD-Monitoring bei AML-Patienten
mittels Hochdurchsatz-Amplikonsequenzierung (NPM1 Mutation A)**

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

vorgelegt von

Christine Xiao-ting Gille geb. Wang

aus

München

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karsten Spiekermann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Katja Anslinger

Prof. Dr. Dr. Torsten Haferlach

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Philipp Greif

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Akute myeloische Leukämie	1
1.1.1	Definition und Klassifikationen	1
1.1.2	Klinik und Diagnose	2
1.1.3	Mutationen und Prognosegruppen.....	3
1.1.4	Therapie	4
1.2	Nucleophosmin 1 (NPM1)	5
1.2.1	Das NPM1-Gen	5
1.2.2	NPM1 und humane Neoplasien.....	5
1.2.3	Aufbau und Funktionen des Nucleophosmins.....	5
1.2.4	Das mutierte Protein und dessen Entdeckung bei der AML.....	9
1.2.5	NPM1-Mutationen bei der AML.....	9
1.2.5.1	Die Rolle der NPM1-Mutationen bei der Entstehung der AML	9
1.2.5.2	Mutationstypen und Nachweismethoden	10
1.2.5.3	Prognostische Relevanz der NPM1-Mutationen.....	11
1.3	Minimale Resterkrankung bei der AML.....	14
1.3.1	Definition und klinischer Nutzen.....	14
1.3.2	Mögliche MRD-Marker bei der AML.....	14
1.3.3	MRD-Diagnostikmethoden.....	15
2	Zielsetzung.....	17
3	Material und Methoden.....	18
3.1	Material	18
3.1.1	Oligonukleotide	18
3.1.1.1	Primer und Sonden für RT-PCR und NPM1-Schmelzkurvenanalyse ..	18
3.1.1.2	Primerdesign für die Sequenzierung	19
3.1.2	Zelllinien und Zellkultur	20
3.1.3	Patientenproben	20
3.1.4	Chemikalien.....	22
3.1.5	Geräte und Zubehör	23
3.1.6	Software und Datenbank	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	25
3.2.2	RQ-PCR	27

3.2.3	Schmelzkurvenanalyse.....	28
3.2.4	Gelelektrophorese	29
3.2.5	Aufreinigung	30
3.2.6	Bioanalyser-Messung und Verdünnung	30
3.2.7	Vorbereitungen für die Sequenzierung auf der <i>MiSeq</i> -Plattform.....	31
3.2.7.1	Probenvorbereitung	31
3.2.7.2	Sample sheet.....	32
3.2.8	Next Generation Sequencing.....	33
3.2.9	Datenauswertung auf der Galaxy-Plattform	35
3.2.10	Berechnung der relativen NPM1 Typ A Mutationslast	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Barcode-Tests	39
4.2	Verdünnungsreihe	42
4.3	NPM1-Ampliconsequenzierung von Patientenproben	44
4.3.1	Sequenzierung von 88 Patientenproben.....	44
4.3.1.1	Korrelation zwischen NGS- und RQ-PCR-Daten	46
4.3.1.2	Longitudinale Darstellung der NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse.....	47
4.3.1.2.1	Patienten ohne klinisches Rezidiv	48
4.3.1.2.2	Patienten mit Rezidiv	51
4.3.2	Sequenzierung von zusätzlichen Verlaufspuben ausgewählter Patienten	53
4.3.3	Patientenproben zu spezifischen Therapiezeitpunkten.....	54
4.3.3.1	Patientenproben nach Induktionstherapie.....	54
4.3.3.2	Patientenproben nach Konsolidierungstherapie.....	55
5	Diskussion.....	56
6	Zusammenfassung.....	60
7	Anhang.....	62
8	Abkürzungsverzeichnis	68
9	Abbildungsverzeichnis.....	70
10	Literaturverzeichnis.....	72
11	Danksagung.....	81
12	Curriculum vitae.....	82

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

1.1.1 Definition und Klassifikationen

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne klonale Neoplasie der myeloischen Zellreihe. Die Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie (DGHO) schätzte 2018 in ihrer Leitlinie die Inzidenz auf 3,7/100.000 Einwohner/Jahr (Röllig et al., 2018). Die AML ist vor allem eine Erkrankung des höheren Lebensalters, die Inzidenz steigt mit dem Alter an mit über 100 Fällen pro 100.000 Einwohner im Alter über 70 Jahren (Juliusson et al., 2009).

Die Einteilung der akuten myeloischen Leukämie erfolgt durch die FAB-Klassifikation (Tab. 1: FAB-Klassifikation der AML nach (Bennett et al., 1976)), die sich mit den morphologischen Merkmalen der AML befasst, und durch die WHO-Klassifikation (Tab. 2: WHO-Klassifikation der AML nach (Arber et al., 2016)), die sich auf zytogenetische und molekulargenetische Eigenschaften der Leukämiezellen stützt.

FAB-Subgruppe	Beschreibung	Häufigkeit [%]
M0	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung	<5
M1	Akute Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung	15-20
M2	Akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung	25-30
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie (APL)	5-10
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	20-30
M5a	Akute Monozytenleukämie ohne Ausreifung	5
M5b	Akute Monozytenleukämie mit Ausreifung	5-10
M6	Akute Erythroleukämie	5
M7	Akute megakaryoblastäre Leukämie	5

Tab. 1: FAB-Klassifikation der AML nach (Bennett et al., 1976)

Kategorie	Leukämieform
AML mit rekurrenten genetischen Veränderungen	<p>AML mit t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></p> <p>AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></p> <p>Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i></p> <p>AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i></p> <p>AML mit t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i></p> <p>AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i></p> <p>AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i></p> <p>AML mit <i>NPM1</i>-Mutation</p> <p>AML mit biallelischen <i>CEBPA</i>-Mutationen</p> <p>Provisorische Entitäten:</p> <p>AML mit <i>BCR-ABL1</i></p> <p>AML mit <i>RUNX1</i></p>
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien	
AML, nicht anderweitig klassifiziert	<p>AML mit minimaler Differenzierung</p> <p>AML ohne Ausreifung</p> <p>AML mit Ausreifung</p> <p>Akute myelomonozytäre Leukämie</p> <p>Akute monozytäre Leukämie</p> <p>Akute Erythrozytenleukämie</p> <p>Akute Megakaryoblastenleukämie</p> <p>Akute Basophilenleukämie</p> <p>Akute Panmyelose mit Myelofibrose</p>
Myeloisches Sarkom	
Mit dem Down-Syndrom assoziierte myeloische Proliferationen	

Tab. 2: WHO-Klassifikation der AML nach (Arber et al., 2016)

1.1.2 Klinik und Diagnose

Durch eine übermäßige Proliferation der malignen Zellen im Knochenmark kommt es zu einer Verdrängung der gesunden Hämatopoese. Dadurch äußert sich die AML häufig mit den Symptomen einer Anämie (z.B. Müdigkeit, Blässe, Verminderung der

Leistungsfähigkeit), einer Granulozytopenie (Infektanfälligkeit) und einer Thrombozytopenie (verstärkte Blutungsneigung). Außerdem können Symptome wie Appetitlosigkeit, Knochenschmerzen oder selten Lymphknotenschwellungen hinzukommen.

Die Diagnose einer AML wird gestellt, wenn der Blastenanteil im Knochenmark 20% übersteigt. Die Leukozytenzahl im peripheren Blut kann erhöht, jedoch auch normal oder sogar erniedrigt (sog. subleukämischer Verlauf) sein.

1.1.3 Mutationen und Prognosegruppen

Bisher konnten in einer Reihe von Publikationen zahlreiche AML-assoziierte Mutationen gefunden werden. Zu den häufigsten genetischen Läsionen bei Erwachsenen zählen Mutationen in den Genen *FLT3*, *NPM1*, *DNMT3A*, *NRAS*, *CEBPA*, *IDH1/2*, *WT1*, *TET2*, *KIT*, *KMT2A* (früher *MLL*) und *RUNX1* (Abb. 1: Driver-Mutationen bei AML-Patienten (Papaemmanuil et al., 2016))

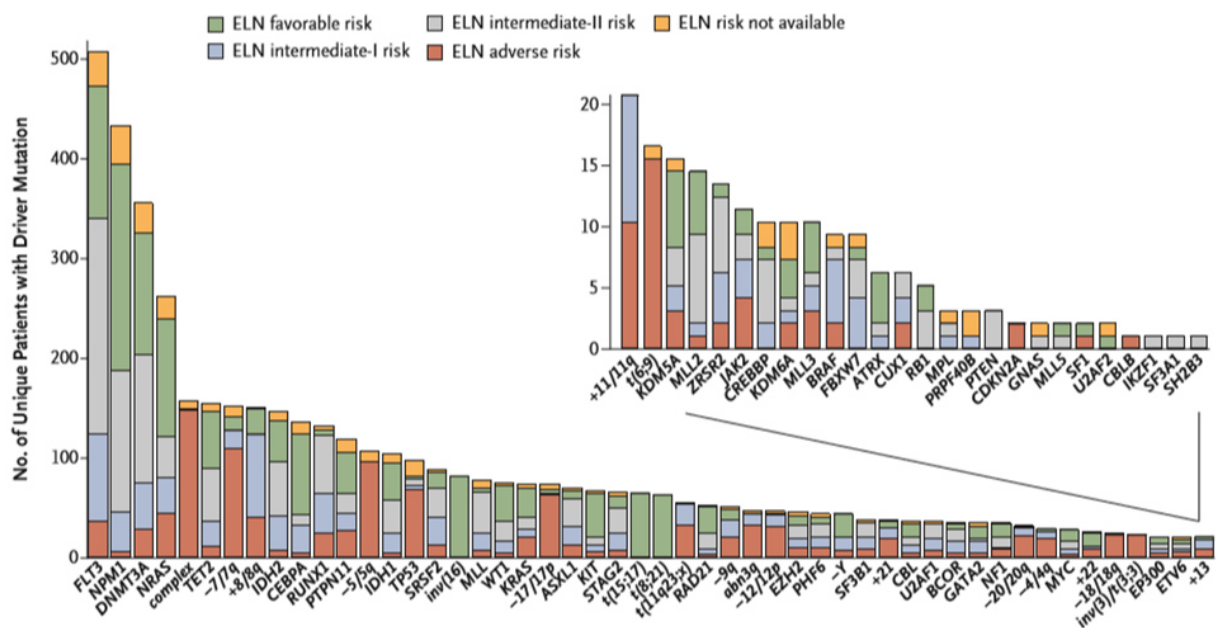


Abb. 1: Driver-Mutationen bei AML-Patienten (Papaemmanuil et al., 2016)

Anhand der Zytogenetik und den molekularen Mutationen können AML-Patienten in verschiedene Risikogruppen (Tab. 3) eingeteilt werden. Dies ist hilfreich bei weiteren Therapieentscheidungen; bei Patienten mit prognostisch ungünstigen genetischen

Veränderungen kann z.B. eine frühzeitige allogene Stammzelltransplantation eine sinnvolle Therapiemöglichkeit sein.

Risikogruppe	Aberrationen
Günstig	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> -Mutation ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD</i> ^{low} Biallelische <i>CEBPA</i> -Mutation
Intermediär	<i>NPM1</i> -Mutation und <i>FLT3-ITD</i> ^{high} Wildtyp- <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD</i> ^{low} t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft werden
Ungünstig	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearrangiert t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MECOM(EV11)</i> -5 oder del(5q); -7; -17/abn(17p) Komplexer Karyotyp Monosomaler Karyotyp Wildtyp- <i>NPM1</i> und <i>FLT3-ITD</i> ^{high} <i>RUNX1</i> -Mutation <i>ASXL1</i> -Mutation <i>TP53</i> -Mutation

Tab. 3: AML-Risikogruppen nach (Dohner et al., 2017)

1.1.4 Therapie

Es existieren Therapie-Protokolle verschiedener AML-Studiengruppen, jedoch sind die grundsätzlichen Konzepte weitgehend konsistent unter ihnen.

Zunächst besteht dieses aus einer Induktionstherapie, z.B. in Form des sogenannten „7+3“-Schemas. Hierbei erhalten die Patienten sieben Tage lang eine Cytarabin-Infusion und in den ersten drei Tagen zusätzlich eine Infusion oder einen Bolus eines Anthrazyklins (z.B. Daunorubicin, Idarubicin oder Mitoxantron). Das Ziel der Induktionstherapie ist das Erreichen einer Vollremission (engl. complete remission, CR), d.h. die Blastenzahl im Knochenmark fällt unter die Nachweisgrenze von 5% und es kommt zu einer Normalisierung der Blutwerte. Eine Remission kann in 60-80% der Fälle erreicht werden. Da jedoch ohne weitere Therapie der Großteil der Patienten innerhalb kurzer Zeit ein Rezidiv erleiden würde, erfolgt nach der Induktionstherapie eine sogenannte Konsolidierungstherapie aus weiteren Chemotherapiezyklen (z.B. (Hochdosis-)Cytarabin, Thioguanin und Daunorubicin). Anschließend wird von einigen Studiengruppen eine Erhaltungstherapie aus verschiedenen Chemotherapeutika für

bis zu drei Jahren eingeleitet. Je nach Risikoprofil des Patienten kann auch eine allogene Stammzelltransplantation nach Erreichen einer kompletten Remission in Erwägung gezogen werden.

1.2 Nucleophosmin 1 (NPM1)

1.2.1 Das NPM1-Gen

Das humane NPM1-Gen befindet sich auf Chromosom 5q35 (Huret et al., 1997). Es kodiert für das Phosphoprotein Nucleophosmin (NPM, auch B23, NO38 oder Numatrin).

NPM1 (NCBI Reference Sequence: NG_016018.1) besteht aus 12 Exons, das zugehörige Protein besitzt 294 Aminosäuren und hat eine Masse von ca. 37kDa (Chang and Olson, 1990).

1.2.2 NPM1 und humane Neoplasien

Eine NPM1-Überexpression findet sich in vielen soliden Tumoren, z.B. in Neoplasien der Schilddrüse (Pianta et al., 2010), der Leber (Yun et al., 2007) oder der Prostata (Leotoing et al., 2008). Das NPM1-Gen kann durch Translokationen mit Partnergenen fusionieren und scheint das onkogene Potential seiner Fusionspartner zu aktivieren. Beispiele für so entstandene Fusionsproteine sind z.B. NPM-ALK (z.B. Non-Hodgkin-Lymphom, (Morris et al., 1994)), NPM-MLF1 (z.B. myelodysplastisches Syndrom, (Yoneda-Kato et al., 1996)) und NPM-RARA (z.B. akute Promyelozytenleukämie, (Redner et al., 1996)).

NPM1-Mutationen hingegen scheinen AML-spezifisch zu sein (Jeong et al., 2007).

1.2.3 Aufbau und Funktionen des Nucleophosmins

Das Nucleophosmin ist ein nukleozytoplasmatisches Shuttle-Protein, das vorwiegend nukleolär lokalisiert ist (Borer et al., 1989). Es existieren drei Spleißformen R1 (B23.1), R2 (B23.2) und R3 (B23.3). Die vorherrschende Isoform R1 (Wang et al., 1993) wird von Exon 1 bis 9 und 11 bis 12 translatiert und umfasst einige charakteristische Segmente (Abb. 2). Bei der Isoform R2 fehlen die Exons 11 und 12, welche für die nukleoläre Lokalisationsdomäne kodieren, was zu einem verkürzten Protein führt (Wang et al., 1993, Zajac et al., 2017). Über das R3-Protein ist noch wenig bekannt.

Es ist durch das Fehlen eines innenliegenden Segments in der C-terminalen Region auch verkürzt (Dalenc et al., 2002).

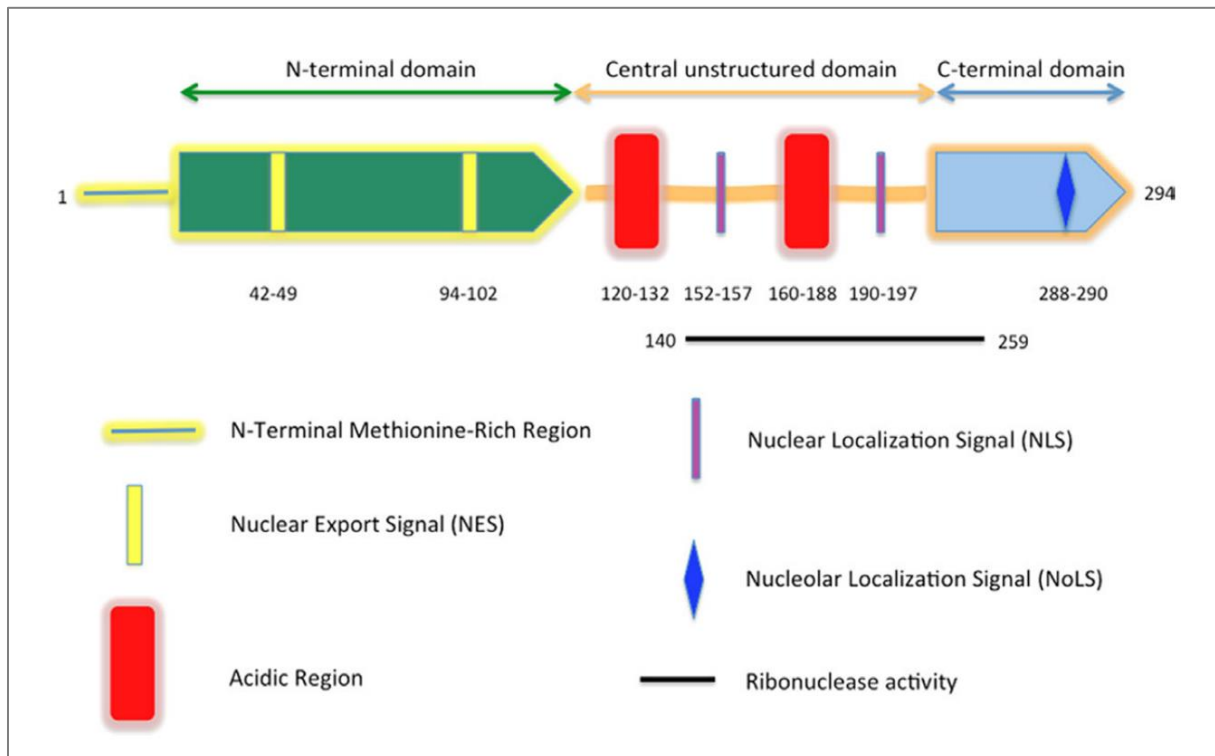


Abb. 2: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des Nucleophosmins (Federici and Falini, 2013)

Kennzeichen der Nucleophosmine ist die gemeinsame N-terminale Domäne (Frehlick et al., 2007). Diese umfasst Regionen, welche Chaperon-Aktivitäten besitzen und die Oligomerisierung regulieren (Yung and Chan, 1987, Szebeni and Olson, 1999, Okuwaki et al., 2001).

Im mittleren Teil der Primärstruktur sind zwei saure Regionen zu finden, die für die Bindung von Histonen benötigt werden (Okuwaki et al., 2001).

Der C-Terminus beinhaltet basische Regionen für die Nukleinsäurebindung (Hingorani et al., 2000, Dumbar et al., 1989, Wang et al., 1994) und besitzt Ribonuklease-Aktivität (Herrera et al., 1995, Hingorani et al., 2000). Diese Domäne wird von einem kurzen aromatischen Abschnitt gefolgt, der zwei Tryptophanreste an den Stellen 288 und 290

umfasst, welche eine wichtige Rolle für die nukleoläre Lokalisation des Proteins spielen (Nishimura et al., 2002, Falini et al., 2006a).

Als Shuttle-Protein pendelt das Nucleophosmin zwischen dem Nukleolus, dem Nukleoplasma und dem Zytoplasma. Dafür verfügt es über nukleäre Exportsignale (engl. nuclear export signal, NES) in der N-terminalen Domäne, die einen Export ins Zytoplasma ermöglichen (Wang et al., 2005). Zwischen den sauren Strecken in der Primärstruktur befindet sich außerdem ein zweiteiliges Kernlokalisierungssignal (engl. nuclear localization signal, NLS) (Hingorani et al., 2000, Wang et al., 2005), wodurch das Protein vom Zytoplasma ins Nukleoplasma gelangen kann. Der aromatische Abschnitt am C-Terminus verfügt darüberhinaus mit dem nukleolären Lokalisationssignal (engl. nucleolar localization signal/NoLS) über eine Nukleolus-bindende Domäne (Nishimura et al., 2002).

Die Shuttle-Fähigkeit des Proteins ist entscheidend für verschiedene Funktionen, die im Folgenden dargestellt werden.

Zum einen spielt das Nucleophosmin eine wichtige Rolle bei der Ribosomenbiogenese. Es verhindert eine vorzeitige Proteinaggregation mithilfe seiner Chaperonfunktion (Szebeni and Olson, 1999, Hingorani et al., 2000) und vermittelt den nukleären Export der ribosomalen Untereinheit L5/5S (Yu et al., 2006).

Yu et al. konnten außerdem zeigen, dass eine Inhibition des NPM1-Shuttlings oder ein NPM1-Verlust zu einer Blockade der Proteintranslation in der Zelle und somit zu einem Zellzyklusarrest führt. Durch eine Herunterregulation des Nucleophosmins kommt es darüber hinaus zu einer Reduzierung der Transkriptionsraten der rRNA (Murano et al., 2008).

Eine weitere Aufgabe des Nucleophosmins ist die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität (Grisendi et al., 2005, Colombo et al., 2005).

Es kann mithilfe seiner sauren Abschnitte die Histone H2A, H2B, H3 und H4 binden (Okuwaki et al., 2001), deren Aggregation durch seine Chaperonfunktion verhindern und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung von Nukleosomen.

Außerdem ist das Protein an der Kontrolle der Zentrosomenduplikation während der Mitose beteiligt. In der Interphase bindet es an Zentrosomen und kann durch eine Cdk2/Cyclin E-vermittelte Phosphorylierung wieder abgelöst werden, wodurch es dann zu einer Initiierung der Duplikation kommt (Okuda et al., 2000).

NPM1 scheint auch eine Rolle in der DNA-Reparatur zu spielen. Nach UV-Bestrahlung wird die Expression des Nucleophosmins hochreguliert (Wu and Yung, 2002); eine

Überexpression führt zu einer höheren Resistenz der Zellen gegenüber UV-induzierten Zellwachstumsarrest oder Zelltod (Wu et al., 2002).

Li et al. konnten außerdem in Versuchen zeigen, dass eine NPM1-Überexpression das Überleben von humanen Stammzellen gegenüber Stressbedingungen begünstigt und deren Erholung fördert (Li et al., 2006).

Darüberhinaus führt eine Überexpression von NPM1 zu einer Aktivierung von P-TEFb-abhängiger Transkription (Gurumurthy et al., 2008). P-TEFb (positive transcription elongation factor b) ist ein Regulator der RNA Polymerase II (Pol II) und wird durch HEXIM1 (Hexamethylene bis-acetamide-inducible protein 1) inhibiert. Nucleophosmin kann HEXIM1 binden und fungiert wiederum als dessen negativer Regulator. Interessanterweise konnten Gurumurthy et al. zeigen, dass das mutierte Nucleophosmin NPMc+ (aberrante zytoplasmatische Lokalisation) sogar zu einer noch stärkeren Aktivierung der Transkription führt.

Eine Reihe von Publikationen zeigen, dass das NPM1 auch mit verschiedenen Tumorsuppressoren und Protoonkogenen interagieren kann.

Das Protein TP53 fungiert als Tumorsuppressor und führt bei nicht zu reparierenden DNA-Schäden einen Zellzyklusarrest oder eine Apoptose herbei und verhindert somit die Proliferation aberranter Zellen. Die Funktion von TP53 wird vor allem durch das ARF (Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor)-Protein und Mdm2 (engl. murine double minute) reguliert. Mdm2 kann TP53 als negativer Regulator binden. ARF ist normalerweise im Nucleolus an Nucleophosmin gebunden und kann bei zellulären Stresssignalen freigesetzt werden (Gallagher et al., 2006). ARF assoziiert dann mit Mdm2 und inhibiert dessen Wirkung auf TP53. Somit fungiert ARF auch als Tumorsuppressor und stabilisiert TP53. NPM1 konnte als ein Bindungspartner von ARF identifiziert werden. Ein NPM1-Verlust führt zu einer Destabilisierung des ARF-Proteins und stört dessen nukleoläre Lokalisation und Funktion (Korgaonkar et al., 2005).

In Abwesenheit von TP53 (immortalisierte Zellen) führt eine NPM-Überexpression zu einem S-Phasen-Eintritt und somit verstärkter Proliferation. In Anwesenheit von TP53 induziert eine Überexpression von NPM1 einen Zellzyklusarrest (Itahana et al., 2003). Außerdem senkt NPM1 das Mdm2-Expressionsniveau unter Stress und stabilisiert somit TP53 (Kurki et al., 2004).

Colombo et al. konnten 2005 zeigen, dass ein NPM1-Knockout in Mäusen zu einer Akkumulation von DNA-Schäden, Aktivierung von TP53-induzierter Apoptose und embryonaler Letalität führt (Colombo et al., 2005).

1.2.4 Das mutierte Protein und dessen Entdeckung bei der AML

Die durch die Mutationen ausgelöste Leserasterverschiebung führt u.a. zum Verlust beider Tryptophanreste an Position 288 und 290 (oder nur an Position 290), welche essentiell für die nukleoläre Lokalisation des NPM1 sind (Falini et al., 2006a); außerdem entsteht aufgrund der Mutation ein neues nukleäres Exportsignal (NES).

Durch den Verlust der nukleolären Lokalisation und der Möglichkeit eines aberranten Crm1-vermittelten nukleären Exports ist das mutierte Protein im Gegensatz zum Wildtyp im Zytoplasma lokalisiert (NPM1c+).

Diese veränderte Lokalisation fielen Falini et al. zufällig während ihrer Forschungsarbeiten zum Nachweis eines seltenen NPM1-Fusionsproteins bei Lymphomen auf. In den AML-Proben, welche sie als Kontrollen verwendeten, zeigte sich die aberrante Lokalisation des NPM1c+. Falini et al. entwickelten 2006 einen immunhistochemischen Nachweis dieser zytoplasmatischen Expression als indirekte Methode zur Feststellung einer NPM1-Mutation (Falini et al., 2006b).

1.2.5 NPM1-Mutationen bei der AML

1.2.5.1 Die Rolle der NPM1-Mutationen bei der Entstehung der AML

Die mögliche Rolle des NPM1-Gens bei der Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie wird in zahlreichen Publikationen diskutiert.

NPM1-Mutationen bei AML-Patienten treten stets heterozygot auf, d.h. es existiert ein mutiertes und ein Wildtyp-Allel (Falini et al., 2005).

Grisendi et al. zeigten 2005, dass die NPM1-Gendosis eine entscheidende Rolle für die genomische Stabilität in embryonalen Mäusefibroblasten (engl. mouse embryonic fibroblasts, MEFs) und Mäusen spielt. NPM1+/- Zellen zeigten immortale Phänotypen mit höheren Proliferationsraten und höherer Aneuploidie-Rate im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (NPM1+/+). Die funktionelle Inaktivierung von Nucleophosmin führte zu einer genomischen Instabilität aufgrund uneingeschränkter Zentrosomenduplikation *in vitro* und *in vivo*. Diese könnte wiederum als Antrieb für zusätzliche genetische Mutationen, welche für eine unkontrollierte Zellproliferation benötigt werden (z.B. ein TP53-

Verlust), fungieren. Interessanterweise wiesen NPM1+/- Mäuse auch einige Eigenschaften des humanen myelodysplastischen Syndroms (MDS) auf, wie z.B. Dysplasien der Erythrozyten- und Megakaryozytenreihe, was wiederum den Einfluss der NPM1-Genosis auf eine gesunde Hämatopoese unterstreicht (Grisendi et al., 2005).

Eine weitere mögliche Rolle des NPM1-Gens bei der Entstehung einer myeloischen Neoplasie ist seine Funktion als ARF-Bindungspartner. ARF fungiert selbst in seiner Rolle als stabilisierender Partner von TP53 als Tumorsuppressor. Korgaonkar et al. konnten 2005 zeigen, dass ein NPM1-Verlust zu einer Störung der Lokalisation und Funktion des ARF Proteins führt und somit auch TP53 in seiner Rolle als Wächter über maligne Zellproliferation stören könnte. (Korgaonkar et al., 2005)

1.2.5.2 Mutationstypen und Nachweismethoden

2005 beschrieben Falini et. al sechs NPM1-Mutationen (Typ A-F) bei AML-Patienten (Falini et al., 2005). Bis heute sind insgesamt etwa 40 Mutationen bekannt (Federici and Falini, 2013). Die häufigste NPM1-Mutation mit 75-80% ist der Typ A, eine TCTG-Insertion an Position 956-959 (Referenzsequenz GenBank Accession Number NM_002520). Weitere häufige Mutationstypen sind Typ B mit ca. 10% und Typ D mit ca. 5%. Durch die Mutationen kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters (Abb. 3) und somit zu Veränderungen des Nucleophosmins am C-Terminus (Falini et al., 2006a)

Type of Mutation	GenBank Accession No.	Sequence
None (wild type)	NM_002520	GATCTCTG . . . GCAGT . . . GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG
Mutation A	AY740634	GATCTCTG TCTG GCAGT . . . GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG
Mutation B	AY740635	GATCTCTG CATG GCAGT . . . GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG
Mutation C	AY740636	GATCTCTG CGTG GCAGT . . . GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG
Mutation D	AY740637	GATCTCTG CCTG GCAGT . . . GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG
Mutation E	AY740638	GATCTCTG . . . GCAGT TCTTGCC CAAGTCTCTTTAAGAAAATAG
Mutation F	AY740639	GATCTCTG . . . GCAGT CCCTGGAGA AAGTCTCTTTAAGAAAATAG

Abb. 3: Sequenzen einer Auswahl an NPM1-Mutationen nach (Falini et al., 2005)

Viele Studien konnten zeigen, dass NPM1-Mutationen bei AML-Patienten mit einem normalen Karyotypen (Falini et al., 2005, Suzuki et al., 2005, Verhaak et al., 2005,

Thiede et al., 2006b) und de-novo-AML assoziiert sind (Falini et al., 2005). Die meisten Mutationen befinden sich im Exon 12 und bestehen aus Insertionen oder Duplikationen kurzer Nukleotidsequenzen (Falini et al., 2005, Schnittger et al., 2005, Dohner et al., 2005). Selten finden sich die Mutationen im Exon 9 oder 11, welche zu einem Protein mit Verkürzung am C-Terminus führen (Mariano et al., 2006, Albiero et al., 2007).

Ca. 1/3 der erwachsenen AML-Patienten zeigen NPM1-Mutationen (Falini et al., 2005, Verhaak et al., 2005); bei Patienten mit einem normalen Karyotyp steigt der Anteil auf 40-62% (Falini et al., 2005, Suzuki et al., 2005, Boissel et al., 2005, Schnittger et al., 2005, Dohner et al., 2005, Chou et al., 2006, Thiede et al., 2006b). Die Mutationen lassen sich durch verschiedene Methoden nachweisen, wie z.B. Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) (Verhaak et al., 2005, Ammatuna et al., 2005), Kapillarelektrophorese (Noguera et al., 2005), LNA-mediated PCR clamping (Thiede et al., 2006a), direktes Sequenzieren (Falini et al., 2005) oder durch die indirekte Methode eines immunhistochemischen Nachweises der zytoplasmatischen NPM1-Lokalisation, welches mit der NPM1-Mutation korreliert (Falini et al., 2006b).

Um die Mutation als Marker für eine minimale Resterkrankung (MRD, s.u.) zu quantifizieren bieten sich Methoden wie die Echtzeit-PCR (Papadaki et al., 2009, Schnittger et al., 2009) oder wie in dieser Arbeit beschrieben die DNA-Sequenzierung im Hochdurchsatzverfahren an (Thol et al., 2012, Salipante et al., 2014).

1.2.5.3 Prognostische Relevanz der NPM1-Mutationen

Der Karyotyp bei Erstdiagnose ist bislang der wichtigste prognostische Marker einer AML.

Die meisten AML-Patienten weisen strukturelle oder numerische chromosomale Aberrationen auf. Als ungünstig zeigen sich Aberrationen von Chromosom 3, 5 oder 7, t(6;9)(p22;q34), t(v;11)(v;q23) und komplexe zytogenetische Aberrationen. Eine günstigere Prognose werden t(15;17), inv(16) und t(8;21) zugeschrieben.

Jedoch weisen bis zu 45% der Patienten einen normalen Karyotyp auf, so dass hier eine weitere Unterteilung dieser klinisch heterogenen Gruppe von Notwendigkeit ist.

Da der Anteil der NPM1-Mutationen in der Gruppe der Patienten mit einem normalen Karyotyp über 60% betragen kann (Falini et al., 2005), wurde in verschiedenen Studien der prognostische Wert der NPM1-Mutationen untersucht.

Es zeigte sich, dass NPM1-Mutationen zusammen mit FLT3-ITD-Mutationen eine prognostische Relevanz aufweisen. Es können drei Risikogruppen definiert werden:

eine günstige Prognosegruppe mit alleiniger NPM1-Mutation, eine mittlere Prognosegruppe (beide Mutationen sind positiv oder beide negativ) und eine ungünstige Prognosegruppe mit FLT3-ITD-Mutation und NPM1-Wildtyp (Gale et al., 2008).

Nur in Abwesenheit einer FLT3-ITD-Mutation prognostizierten NPM1-Mutationen ein besseres Gesamtüberleben und ereignisfreies Überleben bei AML-Patienten (Schnittger et al., 2005, Verhaak et al., 2005, Thiede et al., 2006b). Diese Gruppe zeigt auch eine bessere CR-Rate (Schlenk et al., 2008) und ein besseres Ansprechen auf die Induktionstherapie (Dohner et al., 2005). Die Prognose der NPM1+/FLT3-ITD-Gruppe ist ähnlich der von AML-Patienten mit günstigen genetischen Veränderung, wie z.B t(8;21) oder inv(16) (Brown et al., 2007, Schlenk et al., 2008). Auch Metzeler et. al konnten 2016 eine statistisch signifikante Assoziation zwischen NPM1-Mutationen und einem günstigeren Gesamtüberleben bei älteren Patienten (über 60 Jahren) mit intermediärem Risiko aufzeigen (Abb. 4).

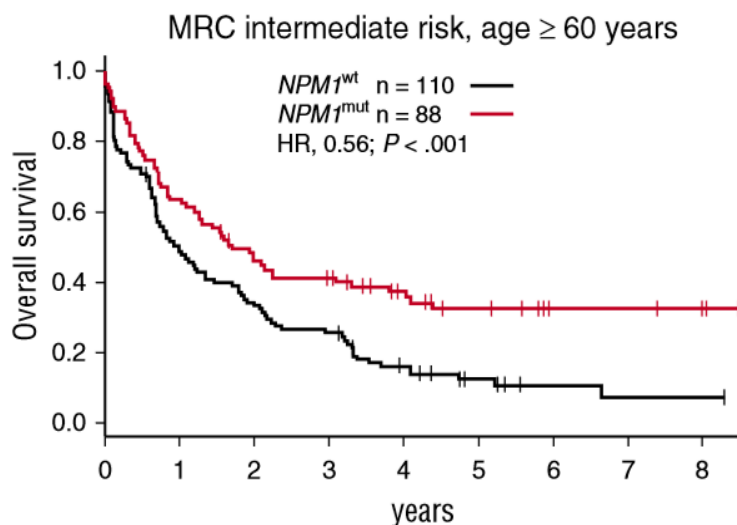


Abb. 4: NPM1-Mutationen und Gesamtüberleben bei Patienten > 60 Jahren mit intermediärem Risiko (Metzeler et al., 2016)

In derselben Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der intermediären Risikogruppe 73% der DNMT3A-mutierten Patienten auch eine NPM1-Mutation trugen (Metzeler et al., 2016). Das Auftreten von Wildtyp-DNMT3A und mutiertem NPM1 scheint bei

Patienten unter 60 Jahren zudem eine Tendenz zur besseren Prognose aufzuweisen (Abb. 5).

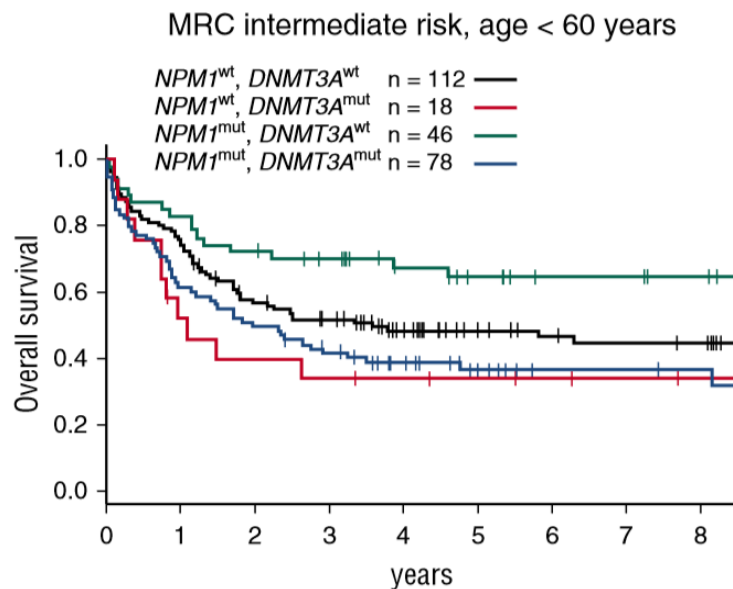


Abb. 5: Gesamtüberleben und NPM1- /DNMT3A-Status bei Patienten < 60 mit intermediärem Risiko (Metzeler et al., 2016)

Papaemmanuil et al. untersuchten darüberhinaus das gemeinsame Auftreten von NPM1-, DNMT3A- und FLT3-ITD- bzw. NRAS^{G12/13}-Mutationen. Bei NPM1- und DNMT3A-mutierten Patienten ist die Abwesenheit einer FLT-ITD-Mutation mit einer günstigeren Prognose assoziiert (Papaemmanuil et al., 2016). Überraschenderweise zeigte sich auch eine deutlich bessere Prognose bei NPM1- und DNMT3A-mutierten Patienten mit gleichzeitiger NRAS^{G12/13}-Mutation.

2016 wurden NPM1-Mutationen (zusammen mit CEBPA-Mutationen) in die WHO-Klassifikation von myeloischen Neoplasien aufgenommen (Arber et al., 2016). Interessanterweise konnten Zajac et al. 2017 zeigen, dass auch bei AML-Patienten mit normalem Karyotyp eine hohe Expression des Isoforms R2 (mit fehlender Kodierung für die nukleoläre Lokalisationsdomäne) mit einer besseren Prognose assoziiert ist (Zajac et al., 2017).

1.3 Minimale Resterkrankung bei der AML

1.3.1 Definition und klinischer Nutzen

Die minimale Resterkrankung (engl. minimal residual disease, MRD) beschreibt die Tumorzelllast, die nach bzw. während einer Therapie nur noch mit molekularbiologischen oder durchflusszytometrischen Methoden nachzuweisen ist. In der Literatur wird der Begriff in verschiedenen Zusammenhängen verwendet, so kann z.B. einerseits die Leukämiezelllast (nach Induktionstherapie) gemeint sein, wenn der Patient sich klinisch und morphologisch in kompletter Remission befindet oder andererseits die minimale Tumormasse bei maximalem Therapieansprechen im Krankheitsverlauf (Paietta, 2002).

Bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) wird die MRD-Diagnostik schon seit einiger Zeit durchgeführt, um eine risikoadaptierte Therapie zu ermöglichen. Hierbei können z.B. individuelle Immunglobulin-Rearrangements der Patienten als MRD-Marker etabliert werden. Ein hohes MRD-Niveau nach Induktionstherapie ist mit einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit assoziiert, ein niedriges bzw. negatives MRD-Niveau mit einer signifikant besseren Prognose (Cave et al., 1998).

Bei der AML hingegen ist die MRD-Diagnostik durch die Heterogenität der Erkrankung und das Fehlen universeller MRD-Marker limitiert. Mögliche Methoden zur MRD-Bestimmung und deren prognostischen Wert bei der AML werden im Folgenden erläutert.

1.3.2 Mögliche MRD-Marker bei der AML

MRD-Marker müssen spezifisch sein und im Krankheitsverlauf stabil bleiben, d.h. im Falle eines Rezidivs wieder nachweisbar sein, um falsch-negative Resultate zu minimieren. Außerdem wäre es von Vorteil wenn die Marker durch unkomplizierte und kostengünstige Methoden bestimmt und überwacht werden können, damit diese im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführt werden können.

Genetische Aberrationen, die zu Fusionsgenen führen (z.B. t(8;21), t(15;17) oder inv16) (Boeckx et al., 2002) oder Erkrankungs-assoziierte Überexpressionen (z.B. WT1) haben sich in der Routinediagnostik als MRD-Marker etabliert (Inoue et al., 1994).

In einer Reihe von Publikationen wurde gezeigt, dass eine MRD-Diagnostik auch mit verschiedenen Fusionstranskripten mittels quantitativer Echtzeit-PCR (engl. real time

quantitative PCR, RQ-PCR) durchführbar ist. Dazu gehören PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11, DEK-NUP 214, KMT2A-PTD und verschiedene KMT2A-Rearrangements. Weisser et al. konnten zeigen, dass eine MRD-Bestimmung mithilfe von KMT2A-PTD prinzipiell möglich ist (Weisser et al., 2005). Jedoch kann man häufig einen niedrigen Level auch bei Gesunden mit sensitiven Methoden, wie z.B. RQ-PCR, finden (Schnittger et al., 1998, Marcucci et al., 1998).

Aufgrund ihres häufigen Auftretens (ca. 20-25% der erwachsenen AML-Patienten) (Yokota et al., 1997, Thiede et al., 2002, Schnittger et al., 2002, Steudel et al., 2003) wurden FLT3-Mutationen schon früh auf ihre Eignung als MRD-Marker untersucht. Da jedoch einige Patienten mit einer FLT3-Mutation bei Erstdiagnose im Rezidiv keine FLT3-Mutation oder eine Veränderung des Mutationsmusters aufweisen, eignen sich diese Mutationen aufgrund ihrer Instabilität nicht ideal für eine MRD-Diagnostik (Shih et al., 2002, Hovland et al., 2002, Cloos et al., 2006).

NPM1-Mutationen zeigen sich stabiler im Krankheitsverlauf als z.B. FLT3-Mutationen (Chou et al., 2006, Ivey et al., 2016). Die drei häufigsten Mutationstypen A, B und D machen zusammen über 90% der NPM1-Mutationen aus (Thiede et al., 2006b), so dass hier mit standardisierten Diagnostikmethoden gearbeitet werden kann.

1.3.3 MRD-Diagnostikmethoden

Die häufigsten Verfahren zur Bestimmung der minimalen Resterkrankung sind die Multiparameter-Durchflusszytometrie (engl. multiparameter flow cytometry, MFC) und die RQ-PCR.

Bei der Durchflusszytometrie werden spezielle Oberflächenmarker der leukämischen Zellen, sogenannte LAIPs (leukemia associated immunophenotypes), genutzt. Diese können mithilfe Fluoreszenz-markierter Antikörper nachgewiesen werden. Die Sensitivität dieser Methode beträgt ca. 10^{-4} bis 10^{-2} (Drach et al., 1992, Babusikova et al., 1994, Grimwade and Freeman, 2014, Campana and Coustan-Smith, 1999), d.h. eine neoplastische Zelle kann in 100 bis 10.000 normalen Knochenmarkszellen detektiert werden. Diese Methode eignet sich für die Mehrheit der AML-Patienten, kann jedoch nicht universell eingesetzt werden.

Die RQ-PCR ist vielerorts Methode der Wahl. Ihre maximale Sensitivität wird mit bis zu 10^{-5} (Papadaki et al., 2009, Schnittger et al., 2009) angegeben. Das MRD-Niveau wird hierbei als Verhältnis vom Ziel-Gen zu einem Housekeeping-Gen (z.B. ABL1) angegeben. Der Nachteil dieser Methode ist, dass sie nur bei bestimmten Subgruppen

der AML mit passenden Markern (bestimmte reziproke Genfusionen oder Mutationen, wie z.B. in NPM1) anwendbar ist.

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die DNA-Sequenzierung im Hochdurchsatzverfahren (sog. Next Generation Sequencing, NGS) auch eine mögliche Methode zum MRD-Monitoring darstellen kann (Thol et al., 2012, Salipante et al., 2014). Hierbei können krankheitsspezifische Mutationen detektiert und quantifiziert werden. Dieses Verfahren ist prinzipiell bei allen Mutationen durchführbar, deren Sequenz bekannt und amplifizierbar ist. In dieser Arbeit wird das Verfahren der Sequenzierung mit Brückensynthese auf einem *MiSeq* der Firma *Illumina, Inc.* verwendet. Die ausführliche Beschreibung findet sich im Methodenteil unter 3.2.8.

MRD-Monitoring mithilfe von NPM1-Mutationen

In einigen Publikationen konnte gezeigt werden, dass ein hohes NPM1-MRD-Niveau nach Erreichen einer kompletten Remission ein Prädiktor für eine höhere Rezidiv-Wahrscheinlichkeit ist (Schnittger et al., 2009, Chou et al., 2007, Kronke et al., 2011). Ivey et al. zeigten 2016, dass ein Nachweis von NPM1-MRD in peripheren Blutproben bei AML-Patienten nach dem 2. Induktionstherapiezyklus mit einem höheren Rezidivrisiko innerhalb der nächsten drei Jahren assoziiert ist (Ivey et al., 2016).

Auch die Reduktion des MRD-Niveaus während Therapie ist eng mit dem Rezidiv-freien-Überleben (RFS) assoziiert (Kern et al., 2004). Vidriales et al. zeigten, dass AML-Patienten mit einer günstigen Zytogenetik, jedoch hohem MRD-Level trotzdem eine schlechte Prognose haben, wohingegen Patienten der ungünstigen Prognosegruppe ohne detektierbare MRD eine bessere Prognose aufweisen (Vidriales et al., 2016).

2 Zielsetzung

Die Bestimmung und Überwachung der minimalen Resterkrankung bei AML-Patienten liefert wichtige Informationen zum Therapieansprechen und zur Prognose der Erkrankten.

Zur MRD-Bestimmung bei AML-Patienten haben sich bis dato zwei Methoden etabliert: Die Multiparameter-Durchflusszytometrie und die quantitative Bestimmung der Mutationslast durch RQ-PCR.

Diese Arbeit fokussiert sich auf den NPM1 Mutationstyp A, da dieser sich durch seine Häufigkeit und Stabilität im Krankheitsverlauf gut als MRD-Marker eignet.

Das Ziel dieser Arbeit war es mithilfe von Hochdurchsatz-Amplikonsequenzierung eine NGS-Methode zu etablieren, die mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität die MRD-Diagnostik bei NPM1 Mutation A-positiven AML-Patienten ermöglicht. Dabei sollte zudem festgestellt werden, welche Faktoren in der Prä- und Postsequenzierungsphase die Sensitivität und Spezifität dieser Methode beeinflussen. Darüber hinaus sollte durch Messungen von 88 Patientenproben ein Vergleich zwischen NGS-Ergebnissen und Daten des etablierten RQ-PCR-MRD-Assays erfolgen und die NGS-Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf der Patienten korreliert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Oligonukleotide

3.1.1.1 Primer und Sonden für RT-PCR und NPM1-Schmelzkurvenanalyse

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden im Rahmen der Routinediagnostik im Labor für Leukämiediagnostik entwickelt und von der Firma *metabion international AG* hergestellt.

Oligonukleotide für NPM1	Sequenz 5' → 3'
Forward Primer	AAAGGTGGTTCTCTCCCAAAGT
Reverse Primer	CTTCCTCCACTGCCAGACAGA
Hydrolysesonde	6-FAM-CTCCGGATGACTGACCAAGAGGCTATTCA-BHQ1

Tab. 4: Verwendete NPM1 Primer- und Sondensequenzen für RQ-PCR

Oligonukleotide für ABL1	Sequenz 5' → 3'
Forward Primer	CCTTTTCGTTGCACTGTATGATT
Reverse Primer	GCCTAAGACCCGGAGCTTTT
Hydrolysesonde	6-FAM-TGGCCAGTGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAABHQ1

Tab. 5: Verwendete ABL1 Primer- und Sondensequenzen für RQ-PCR

Oligonukleotide für NPM1	Sequenz 5' → 3'
Forward Primer	TCCCAAAGTGGAAGCC
Reverse Primer	GGAAAGTTCTCACTCTGC
Detektionssonde	CGGATGACTGACCAAGAGGCTATTCA-Fluorescein
Anchorsonde	LC-Red-640-ATCTCTGGCAGTGGAGG-P

Tab. 6: Verwendete Primer und Sondensequenzen für die NPM1-Schmelzkurvenanalyse

3.1.1.2 Primerdesign für die Sequenzierung

Für die Generierung der NPM1-Amplikons wurden spezielle Primer entworfen. Sie bestehen jeweils aus einer spezifischen *Illumina*®-Adaptersequenz, einem Barcode für die Probenzuordnung und einer NPM1-Hotspot-bindenden Primersequenz (Abb. 6 und Abb. 7). Die Synthese der Primer mit anschließender Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Aufreinigung (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) wurde bei der Firma *metabion international AG* in Auftrag gegeben.

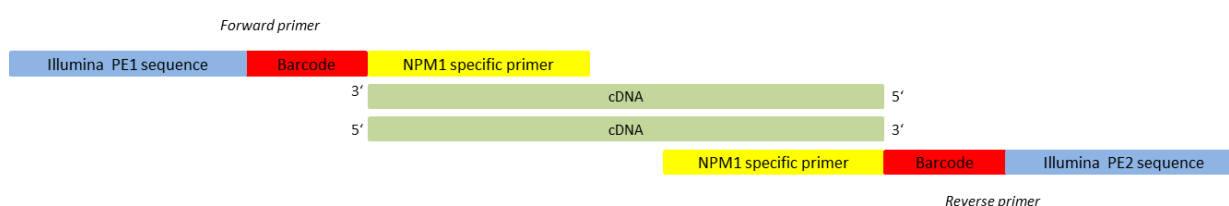


Abb. 6: Schematische Darstellung der Primer.

Blau: Illumina-Adaptersequenz zur Bindung an die Flow cell. Rot: Barcodesequenz um eine genaue Probenzuordnung zu ermöglichen. Gelb: NPM1 Mutation A Hotspot-bindende Primersequenz.

```

1  gggtgttctc  tggagcagcg  ttcttttata  tccgtccgcc  ttctctccta  cctaagtgcg
61  tgccgccacc  cgatggaaga  ttcgatggac  atggacatga  gccccctgag  gccccagaac
121  tatcttttcg  gttgtgaact  aaaggccgac  aaagattatc  actttaaggt  ggataatgat
181  gaaaatgagc  accagttatc  ttaagaacg  gtcagttag  gggctggtgc  aaaggatgag
241  ttgcacattg  ttgaagcaga  ggcaatgaat  tacgaaggca  gtccaattaa  agtaacactg
301  gcaactttga  aaatgtctgt  acagccaacg  gtttcccttg  ggggctttga  aataacacca
361  ccagtggctc  taaggttgaa  gtgtggttca  gggccagtgc  atattagtgg  acagcactta
421  gtagctgtgg  aggaagatgc  agagtcagaa  gatgaagagg  aggaggatgt  gaaactctta
481  agtatatctg  gaaagcggtc  tgcccctgga  ggtggtagca  aggttcaca  gaaaaaagta
541  aaacttgctg  ctgatgaaga  tgatgacgat  gatgatgaag  aggatgatga  tgaagatgat
601  gatgatgatg  attttgatga  tgaggaagct  gaagaaaaag  cgccagtgaa  gaaatctata
661  cgagatactc  cagccaaaaa  tgcacaaaag  tcaaatcaga  atggaaaaga  ctcaaaaacca
721  tcatcaacac  caagatcaaa  aggacaagaa  tccttcaaga  aacaggaaaa  aactcctaaa
781  acacaaaaag  gacctagttc  tgtagaagac  attaaagcaa  aaatgcaagc  aagtatagaa
841  aaagggtggt  ctcttcccaa  agtggaaagc  aaattcatca  attatgtgaa  gaattgcttc
901  cggatgactg  accaagaggc  tattcaagat  ctctgtctgg  cagtggagga  agtctcttta
961  agaaaatagt  ttaacaatt  tgttaaaaaa  ttttccgtct  tatttcattt  ctgtaaacagt
1021  tgatatctgg  ctgtcctttt  tataatgcag  agtgagaact  ttccctaccg  tgtttgataa
1081  atggtgtcca  gg

```

Abb. 7: NPM1-Sequenz mit einer Typ A Mutation.

Blau: Verwendete Primersequenzen. Rot: Hotspot der NPM1 Mutation A (Referenz: GenBankAY740634.1)

3.1.2 Zelllinien und Zellkultur

OCI-AML3 (DSMZ Nr. ACC 582) ist eine NPM1-mutierte Zelllinie, die aus dem peripheren Blut eines 57-jährigen AML-Patienten mit einer FAB-M4 etabliert wurde (Quentmeier et al., 2005). Die Zelllinie zeigt eine heterozygote TCTG-Duplikation im Exon 12 des NPM1-Gens und entspricht somit einer NPM1 Mutation vom Typ A (Falini et al., 2005). Außerdem präsentiert die OCI-AML3-Zelllinie in der Immunfärbung eine zytoplasmatische Lokalisation des Nucleophosmins, welche das Kennzeichen einer NPMc+-AML darstellt.

Mithilfe verschiedener Verdünnungen der OCI-AML3-Zelllinie wurde in dieser Arbeit eine Verdünnungsreihe hergestellt. Auch diente sie in einigen Sequenzierungen als Positivkontrolle für NPM1 Mutation A.

Die HL-60-Zelllinie wurde mithilfe peripherer Blutproben einer 36-jährigen Patientin mit der Diagnose einer akuten Promyelozytenleukämie etabliert (Gallagher et al., 1979). Die Zelllinie ist Wildtyp bzgl. NPM1 und zeigt immunhistochemisch eine streng auf den Nukleus beschränkte Lokalisation des Nucleophosmins. Die cDNA dieser Zelllinie wurde in allen Sequenzierungen als Negativkontrolle für NPM1 Mutationen verwendet.

3.1.3 Patientenproben

Für diese Arbeit wurden insgesamt 88 verschiedene cDNA-Proben von 22 AML-Patienten verwendet, welche eine NPM1 Mutation A zum Zeitpunkt der Erstdiagnose aufwiesen. Bei allen verwendeten Patientenproben erfolgte zuvor nach Aufklärung des Patienten eine Einverständniserklärung in schriftlicher Form.

Bei den Patienten wurden in den Jahren 2007-2013 eine akute myeloische Leukämie erstdiagnostiziert. Sie erhielten im Rahmen von AMLCG Studienprotokollen eine sHAM (sequenzielles hochdosiertes Cytarabin und Mitoxantron), HAM-HAM (zwei Zyklen HAM) oder TAD (Standarddosis Cytarabin, Daunorubicin, Thioguanin)-HAM-Induktionstherapie [AMLCG 2000 (*Clinicaltrials.gov* Nr. NCT00266136) und AMLCG 2008 (*Clinicaltrials.gov* Nr. NCT01382147)]. Zwei Patienten bekamen aufgrund ihres höheren Alters eine altersadjustierte sHAM-Induktion. Die Konsolidierungstherapie umfasste eine Behandlung nach dem TAD-Schema. Alternativ wurde bei entsprechendem Risikoprofil (z.B. FLT3-ITD+) und sonstigen Voraussetzungen (z.B. Spender verfügbar, fehlende Kontraindikationen, Einwilligung) eine allogene periphere

Blutstammzelltransplantation (PBSZT) bzw. eine Knochenmarkstransplantation (KMT) durchgeführt.

Die Knochenmarksproben dieser AML-Patienten wurden zur Diagnostik an das Labor für Leukämiediagnostik im Klinikum Großhadern gesendet. Im Rahmen der Routinediagnostik wurden mononukleäre Zellen mittels einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und daraus die RNA mit Hilfe des MagNA Pure LC Systems extrahiert (nach SOP M2, Freigabe 03/2015, Labor für Leukämiediagnostik). Es folgte eine reverse Transkription der RNA in cDNA mit dem Superscript II Reverse Transcriptase Kit von *Invitrogen* nach SOP-M3 des Labors für Leukämiediagnostik (Freigabe 03/2015).

Patienten	n=22
Medianes Alter bei Erstdiagnose in Jahren (Varianzbreite)	47 (24-73)
Männliches Geschlecht	5 (23%)
Mittlere Blastenzahl bei Erstdiagnose \pm SD	58% (\pm 27%)
Normaler Karyotyp	21 (95%)
FLT3-ITD	4 (18%)
CEBPA-Mutation	2 (9%)
IDH2-Mutation	1 (5%)

Tab. 7: Übersicht der verwendeten Patientenproben

3.1.4 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
DNA Dye Concentrate	Agilent Technologies, Inc.
DNA-Exitus Plus IF™	AppliChem GmbH
DNA molecular weight marker VI	Roche Deutschland Holding GmbH
EB Puffer	Qiagen N.V.
GelRed™ Nucleic Acid Stain	Biotium, Inc.
High Sensitivity DNA Gel Matrix	Agilent Technologies, Inc.
High Sensitivity DNA Ladder	Agilent Technologies, Inc.
High Sensitivity DNA Marker	Agilent Technologies, Inc.
High Sensitivity DNA Reagents	Agilent Technologies, Inc.
LightCycler TaqMan Master	Roche Deutschland Holding GmbH
LightCycler FastStart DNA Master HybProbe	Roche Deutschland Holding GmbH
MiSeq Reagent Kit v2, 300 cycles	Illumina, Inc.
Nuclease-Free Water	Thermo Fisher Scientific Inc.
PhiX Control v3	Illumina, Inc.
RNase-Free Water	Qiagen N.V.
Sodium hydroxide solution, 10M	Sigma-Aldrich Co. LLC.
SuperScript II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific Inc.
Taq PCR Master Mix	Qiagen N.V.
TBE Puffer	Roche Deutschland Holding GmbH
UltraPure™ Agarose	Thermo Fisher Scientific Inc.
Wasserstoffperoxid-Lösung 3%	Otto Fischar GmbH & Co. KG

3.1.5 Geräte und Zubehör

Gerät / Zubehör	Modell	Hersteller
Abwurfbehälter	Multi-Safe twin	Sarstedt AG & Co
Aufreinigungsplatte	NucleoFast® 96 PCR Plate	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Aufreinigungssäulen	Wash Plates	Princeton Separations, Inc.
Bioanalyzer	BioAnalyzer 2100	Agilent Technologies, Inc.
Bioanalyzer Chips	High Sensitivity DNA Chips	Agilent Technologies, Inc.
Gel-Dokumentationssystem	INTAS Science Imaging	INTAS Science Imaging Instruments GmbH
Gelelektrophoresekammer	Horizon 11·14	Thermo Fisher Scientific Inc.
Handschuhe	Vasco® Basic	Braun Melsungen AG
Handschuhe	Purple Nitrile-Xtra	Kimberly-Clark Worldwide, Inc.
Kühlschrank	Economy	Liebherr International AG
Kühlschrank	Premium NoFrost	Liebherr International AG
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Nukleinsäure-Aufreinigungssystem	MagNA Pure LC System	Roche Deutschland Holding GmbH
PCR 8er Strips	PCR SingleCap 8er-Softstrips 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH
PCR-Cycler	T3 Thermocycler	Biometra GmbH
Pipetten	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG
Pipettenspitzen	Biosphere® Filter tips	Sarstedt AG & Co
PCR Platte + Deckel	96-well PCR Plate	4titude Ltd.
PCR-Strips	MicroAmp® Optical 8-Cap Strips	Thermo Fisher Scientific Inc.

ReagiergefäÙe 0,5ml	PCR Soft Tubes 0,5ml	Biozym Scientific GmbH
ReagiergefäÙe 1,5ml	Safe Seal ReagiergefäÙe	Sarstedt AG & Co
Sequenzierungsplattform	MiSeq	Illumina, Inc.
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Vortexer	IKA MS 3 Vortexer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Vortexer	Vortex-Genie® 1	Scientific Industries, Inc.
Vortexer	Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc.
Waage	Sartorius BP1200	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Tischzentrifuge	PCR Plate Spinner	VWR International, LLC
Tischzentrifuge	Mini Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, inc.
Tischzentrifuge	Heraeus™ Biofuge pico	Thermo Fisher Scientific Inc.
Zentrifuge	Rotanta 460 R	Hettich Lab Technology

3.1.6 Software und Datenbank

Software / Datenbank	Vertreiber / Entwickler
Bioanalyzer 2100 Expert Software	Agilent Technologies, Inc.
Galaxy (NGS Fablab)	Center for Comperative Genomics and Bioinformatics (Penn State), Emory University
IntasGDS	INTAS Science Imaging Instruments GmbH
LfL Datenbank	Klinikum der Universität München
SPSS Statistics 23.0	IBM

Windows Word, Excel, PowerPoint	Microsoft
---------------------------------	-----------

3.2 Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) können cDNA-Fragmente in vitro amplifiziert werden. Die temperaturabhängige Reaktion läuft in drei Schritten ab.

Zunächst erfolgt die Denaturierung (oder das Melting) der Template-cDNA zur Auftrennung des Doppelstrangs in die Einzelstränge. Danach beginnt das sogenannte Annealing, bei dem spezielle Oligonukleotide (Primer) an die komplementären cDNA-Abschnitte binden und somit der DNA-Polymerase als Startsequenz dienen. Durch die Bindung von einem Forward- und einem Reverse-Primer wird zugleich auch die Länge des zu vervielfältigenden Fragments bestimmt.

Die hitzestabile DNA-Polymerase kann nun Anhand des vorgegebenen cDNA-Abschnitts den komplementären Strang aufbauen. Diese synthetisierten Stränge können wiederum als Vorlage (Matrize, Template) für die weitere Amplifikation dienen, so dass die Amplifikation insgesamt exponentiell abläuft.

In dieser Arbeit wurde eine sog. Touchdown-PCR (Tab. 8) verwendet, die dazu dient unspezifische bzw. unerwünschte PCR-Produkte zu reduzieren. Hierbei führt eine hohe Annealing-Temperatur zunächst zu einer verbesserten Spezifität der Primerbindung. Die Temperatur wird nach ein paar Zyklen schrittweise gesenkt, wobei die Bindung der Primer zwar weniger spezifisch wird, jedoch ist nach den ersten Zyklen das Verhältnis der PCR-Produkte schon ausreichend zugunsten der spezifischen Templates verschoben worden.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
1	95°C	5 min	1
2	95°C	30 s	2
3	63°C	30 s	
4	72°C	1 min	
5	95°C	30 s	2
6	61°C	30 s	
7	72°C	1 min	
8	95°C	30 s	2
9	59°C	30 s	
10	72°C	1 min	
11	95°C	30 s	30-35
12	58°C	30 s	
13	72°C	1 min	
14	72°C	5 min	1
15	14°C	Pause	1

Tab. 8: PCR-Programm „Touchdown 58“

	25 µl-Ansatz	50 µl-Ansatz
Taq PCR Master Mix	12,5 µl	25 µl
RNAse free H ₂ O	9,5 µl	19 µl
Forward primer [10pmol/µl]	1 µl	2 µl
Reverse primer [10pmol/µl]	1 µl	2 µl
cDNA	1 µl	2 µl

Tab. 9: PCR-Ansatz zur NPM1 Amplikongenerierung

Abhängig von der Menge des Ausgangsmaterials wurden für diese Arbeit 25µl bzw. 50µl Ansätze für die PCR-Reaktion hergestellt (Tab. 9). Als Negativkontrolle wurden bei jeder PCR-Reaktion Ansätze mit RNase-freiem H₂O verwendet.

3.2.2 RQ-PCR

Eine quantitative Echtzeit-PCR (engl. real-time quantitative PCR, RQ-PCR) beruht auf dem Prinzip einer klassischen PCR und ermöglicht eine zusätzliche Quantifizierung des PCR-Produkts.

Es existieren sequenzunabhängige (z.B. *SYBR Green I*) und sequenzspezifische (Hydrolyse- bzw. *TaqMan*-Sonden) Detektionsmethoden.

Die Quantifizierung der NPM1 Mutation A durch RQ-PCR erfolgte für diese Arbeit auf einem *LightCycler® 480 II* der Firma *Roche* mittels sequenzspezifischer Sonden. Diese sind mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff und einem Quencher (engl. Löscher)-Farbstoff ausgestattet. Wenn die Sonde an die komplementäre Sequenz bindet und intakt ist, wird die Energie des Reporter-Farbstoffs auf den Quencher durch einen sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) übertragen und nur der Quencher sendet ein Signal aus. Während der PCR jedoch kann die DNA-Polymerase durch ihre Nukleaseaktivität die gebundene Sonde abbauen, so dass Reporter und Quencher separiert werden und auch vom Reporter-Farbstoff ein Fluoreszenzsignal ausgeht. Dieses nimmt proportional zur Menge des PCR-Produkts zu und kann während des PCR-Zyklus in Echtzeit erfasst werden. Die NPM1 Mutation A wurde mittels relativer Quantifizierung bestimmt, d.h. es wurde ein Quotient aus der Expression des Zielgens (NPM1 Mutation A) und der Expression eines Referenzgens (in diesem Fall das Housekeeping Gen ABL1) gebildet:

$$\text{RQ-PCR ratio} = \frac{\text{NPM1 mutation A(sample)}/\text{ABL(sample)}}{\text{NPM1 mutation A(calibrator)}/\text{ABL(calibrator)}}$$

Außerdem erfolgte eine Kalibrierung durch cDNA-Proben aus kultivierten OCI-AML3-Zellen, bei denen eine gleichbleibende Expression von Ziel- und Referenzgen herrscht. Somit können Daten aus verschiedenen RQ-PCR-Läufen miteinander verglichen werden.

	Konzentration	Volumen pro Kapillare
RNAse freies H ₂ O	-	11,6 µl
Sonde [10 µM]	0,2 µM	0,4 µl
Forward primer [10 µM]	0,5 µM	1 µl
Reverse primer [10 µM]	0,5 µM	1 µl
TaqMan Master [5x]	1x	4 µl
cDNA	-	2 µl
Gesamtvolumen	-	20 µl

Tab. 10: RQ-PCR-Ansatz zur NPM1-Quantifizierung

Cycles	Step	Target Temperature	Hold Time
1	Incubation	95°C	10 min
45	Denaturation	95°C	10 sec
	Annealing	63°C	20 sec
	Extension	72°C	1 sec
1	Cooling	40°C	30 sec

Tab. 11: RQ-PCR-Programm zur relativen Quantifizierung der NPM1 Mutation A

3.2.3 Schmelzkurvenanalyse

Im Rahmen der Routinediagnostik wurden AML-Patientenproben auf NPM1-Mutationen gescreent. Die Schmelzkurvenanalyse hierfür erfolgte mit einem *LightCycler® 480 II* der Firma *Roche*.

Hierbei werden fluoreszenzfarbstoff-markierte Donor- bzw. Akzeptorsonden verwendet, welche nebeneinander an ihre DNA-Zielsequenz (z.B. NPM1-Wildtyp-Sequenz) binden können. Dabei kommt es zum Aussenden eines Fluoreszenzsignals. Dieses Signal steigt proportional mit der Konzentration der komplementären DNA an und wird in jedem PCR-Zyklus gemessen.

Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur nach Ablauf der PCR-Reaktion schrittweise erhöht, so dass sich die Sonden bei Überschreitung der Schmelztemperatur wieder vom PCR-Produkt ablösen und es dadurch zum Abbruch

des Fluoreszenzsignals kommt. Dabei ist die Schmelztemperatur bei einer Fehlpaarung zwischen Sonde und Einzelstrang aufgrund einer NPM1-Mutation niedriger als bei einem Komplex aus Sonde und Wildtypsequenz. So zeigen Patientenproben mit Wildtyp-NPM1 nur einen Peak in der Schmelzkurve auf, NPM1-mutierte Proben hingegen aufgrund ihrer Heterozygotie (jeweils ein mutiertes und ein Wildtyp-Allel) zwei Peaks (Abb. 8).

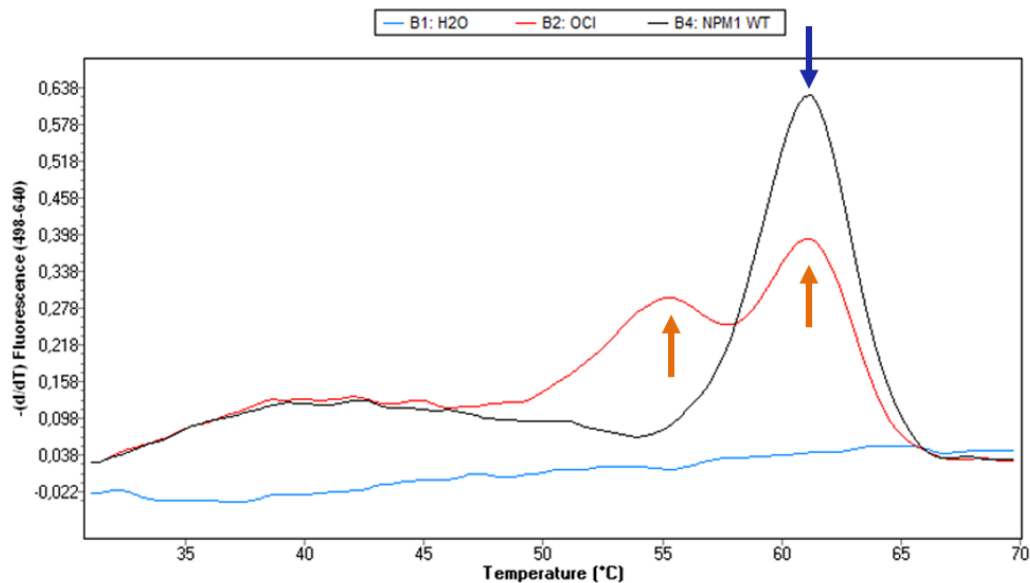


Abb. 8: Beispiel für ein NPM1 Screening mittels Schmelzkurvenanalyse

Blauer Pfeil: Ein Peak bei einem NPM1-Wildtyp.

Orange Pfeile: Zwei Peaks bei einem NPM1-Mutanten.

3.2.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem Gemisch anhand ihrer relativen Größe. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle durch das Gel vom Minuspol zum Pluspol; dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit indirekt proportional zur Molekülgröße.

In dieser Arbeit wurde mit 1,8%igen Agarosegelen gearbeitet, d.h. 1,8 g Agarosepulver wurden mit 100 ml TBE-Puffer aufgekocht und mit 10 µl *GelRed Nucleic Acid* in Form gegossen. Die cDNA-Proben wurden nach der PCR mit dem Farbstoff *Orange Dye*

versehen und mit einem Größenmarker auf das Gel aufgetragen. Nach der Auftrennung der cDNA-Fragmente wurde das Ergebnis unter UV-Licht fotografiert.

Mithilfe der Gelelektrophorese konnte somit die Größe der in der PCR-amplifizierten cDNA-Fragmente kontrolliert und mithilfe der Negativkontrollen (RNase-freies H₂O, siehe 3.2.1) auf eventuelle Kontaminationen untersucht werden.

3.2.5 Aufreinigung

Um unerwünschte Primer- oder Pufferrückstände zu entfernen, erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Produkte. Dafür wurde das PCR-Produkt auf insgesamt 100 µl Volumen mit Nuclease-freiem H₂O aufgefüllt und auf eine *NucleoFast® 96 PCR Plate* pipettiert. Diese Aufreinigungsplatte wurde auf die Aufreinigungsäulen der Firma *Princeton Separations, Inc.* gestellt und 15min lang bei 4230 rpm zentrifugiert. Danach wurden jeweils 100 µl Nuclease-freies H₂O zu jeder Probe gegeben und die Zentrifugation wiederholt. Zuletzt wurde das aufgereinigte PCR-Produkt in 25 µl Nuclease freiem H₂O auf einem Thermomixer (450 rpm bei Raumtemperatur) 10 min lang gelöst.

3.2.6 Bioanalyser-Messung und Verdünnung

Der *Bioanalyser* der Firma *Agilent* arbeitet mit einer Kombination aus Elektrophorese und Durchflussmetrie. Die Größenbestimmung von Nukleinsäurefragmenten basiert auf dem traditionellen Gelelektrophorese-Prinzip. Auf einem Chip befinden sich verschiedene Löcher für die zu messenden Proben und Reagenzien, welche zusammen mit Mikrokanälen einen elektrischen Kreislauf bilden. Geladene Moleküle wie cDNA oder RNA wandern durch einen Spannungsgradienten in den Mikrokanälen und werden anhand ihrer Wanderungsgeschwindigkeit, welche indirekt proportional zu ihrer Größe ist, getrennt. Spezielle Farbmoleküle bilden nun mit den cDNA- bzw. RNA-Strängen Komplexe und können durch Fluoreszenz detektiert werden. Die Ergebnisse werden in einem Elektropherogramm dargestellt (Abb. 9). Durch den Vergleich der Fläche unter der Kurve einer Probe mit der Fläche unter der Kurve eines Markers mit bekannter Konzentration wird die Konzentration der Probe berechnet.

Die Probenvorbereitung für die *Bioanalyser*-Messung wurde nach dem *High Sensitivity DNA Assay Protocol (Agilent Technologies, Inc., Edition 08/2013)* durchgeführt.

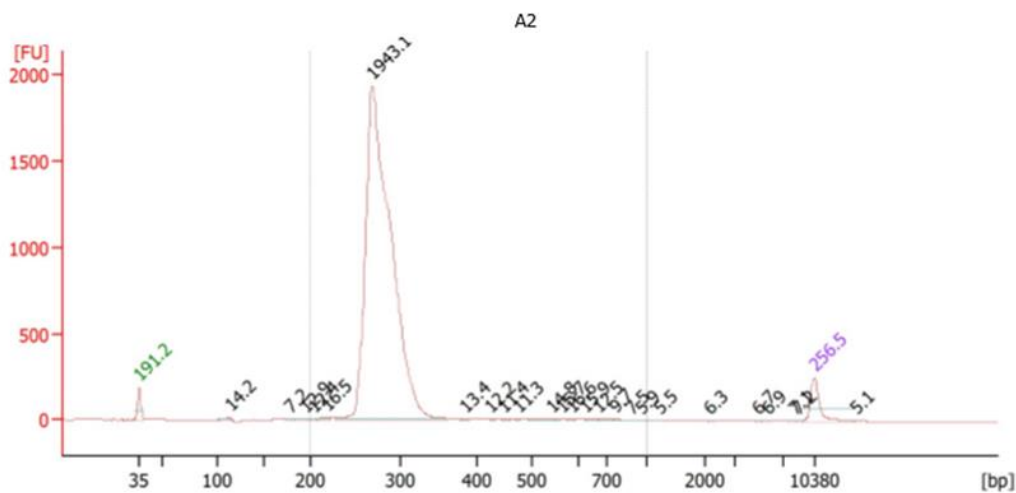


Abb. 9: Beispiel für ein Elektropherogramm einer Patientenprobe vor der Verdünnung. Der Peak befindet sich wie gewünscht bei ca. 268bp.

3.2.7 Vorbereitungen für die Sequenzierung auf der *MiSeq*-Plattform

3.2.7.1 Probenvorbereitung

Die zu sequenzierenden Proben wurden separat auf eine Konzentration von 2 nM mit *Nuclease free H₂O* der Firma *Ambion* verdünnt. Danach wurden die Proben mit jeweils 10 µl vereinigt. Die Weiterverarbeitung erfolgte danach gemäß des Protokolls „Preparing DNA Libraries for Sequencing on the *MiSeq*®“ (*Illumina*, Januar 2013).

5µl des 2nM Probengemisches wurden zunächst mit 5µl 0,2M NaOH zur Denaturierung der cDNA-Doppelstränge in Einzelstränge versetzt. Der denaturierten cDNA wurde 990µl vorgekühltes HT1 (Hybridisierungspuffer) hinzugefügt, was in einer 10pM cDNA-Mischung resultierte. Das Gemisch wurde auf Eis gelagert.

Als Kontroll-Sequenz diente eine *PhiX Control Library*, welches aus dem Genom von Bakteriophagen abgeleitet wurde. Die *PhiX Control Library* hat eine gut definierte Sequenz und besteht aus einer balancierten Nukleotidverteilung (ca. 45% GC und 55% AT). Somit kann sie zum einen als technische Kontrolle für die Clustergeneration und Sequenzierungsgenauigkeit dienen, zum anderen die Heterogenität der Sequenzierungsprobe erhöhen, was wiederum zu einem ausgeglichenerem Fluoreszenzsignal und somit zu einer besseren Sequenzierungsqualität führt.

2µl der *PhiX Control Library* wurde mit 3µl EB-Puffer (10mM Tris-Cl, pH 8,5 with 0,1% Tween 20) versehen. Dieses PhiX-Gemisch wurde mit 5µl 0,2M NaOH denaturiert und mit 990µl pre-chilled HT1 versehen, was in einem 20pM *PhiX*-Gemisch resultierte.

Die vereinten DNA-Proben und die *PhiX Control Library* wurden im Verhältnis 200µl:800µl gemischt, wovon 600µl auf die MiSeq-Kartusche aufgetragen wurde.

Wir wählten einen höheren *PhiX*-Anteil als im Protokoll vorgesehen, um die Heterogenität der Amplikon-Probenmischung zu erhöhen und somit eine bessere Sequenzierungsqualität zu erreichen.

3.2.7.2 Sample sheet

Vor dem Start jeder Sequenzierung muss ein spezieller *Sample Sheet* für den *MiSeq*-Lauf erstellt werden. Darin sind Informationen wie Projektname, Sequenzierungsdatum, Zykluslänge und das zu sequenzierende Gen enthalten.

3.2.8 Next Generation Sequencing

Die erste Generation der DNA-Sequenzierungsverfahren basieren zumeist auf der Didesoxymethode nach Sanger (Kettenabbruch-Synthese), welche während der 1970er Jahre entwickelt wurde. Als Sequenzierung der nächsten Generation (engl. next generation sequencing, NGS) werden moderne Verfahren mit hohem Durchsatz (engl. high throughput) bezeichnet, die es z.B. ermöglichen, ein menschliches Genom in wenigen Tagen zu sequenzieren.

Die Hochdurchsatz-Amplicon-Sequenzierung in dieser Arbeit wurde auf einem *MiSeq* der Firma *Illumina, Inc.* durchgeführt. Der *MiSeq* arbeitet mit dem Verfahren der Sequenzierung mit Brückensynthese.

Die zu sequenzierenden Amplikons können mithilfe ihrer *Illumina*-Adaptersequenz an die komplementären Oligonukleotide der sog. Flow cell binden (Abb. 10a). Es folgt die Synthese des komplementären Strangs und der Original-Strang wird nach einer Denaturierung gewaschen (Abb. 10b und c). Danach kommt es zur Brückenbildung (Abb. 10d), d.h. der noch gebundene Strang faltet sich, so dass der zweite Adapter an ein passendes Oligonukleotid der Flow cell binden und der komplementäre Strang gebildet werden kann (Abb. 10e). Diese Schritte wiederholen sich bis Cluster entstehen (Abb. 10f), wobei die Reverse-Stränge jedes Mal gewaschen werden (Abb. 10g). Am Ende dieser Cluster-Generierung mit Forward Strängen werden die Oligonukleotide blockiert. Die komplementären Stränge werden durch die sogenannte „Sequencing by synthesis“-Methode (modifiziert nach Sanger) mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden sequenziert (Abb. 11). Das Fluoreszenzsignal des jeweiligen Nukleotids wird ausgewertet und in Echtzeit die eingebaute Nukleinbase pro Zyklus in einem Cluster bestimmt. Alle Cluster werden parallel sequenziert. Die Anzahl der Zyklen determiniert die Länge der „reads“; die „Base call“ (Signalzuordnung zu einem Nukleotid) wird durch die Wellenlänge und die Intensität des Signals bestimmt.

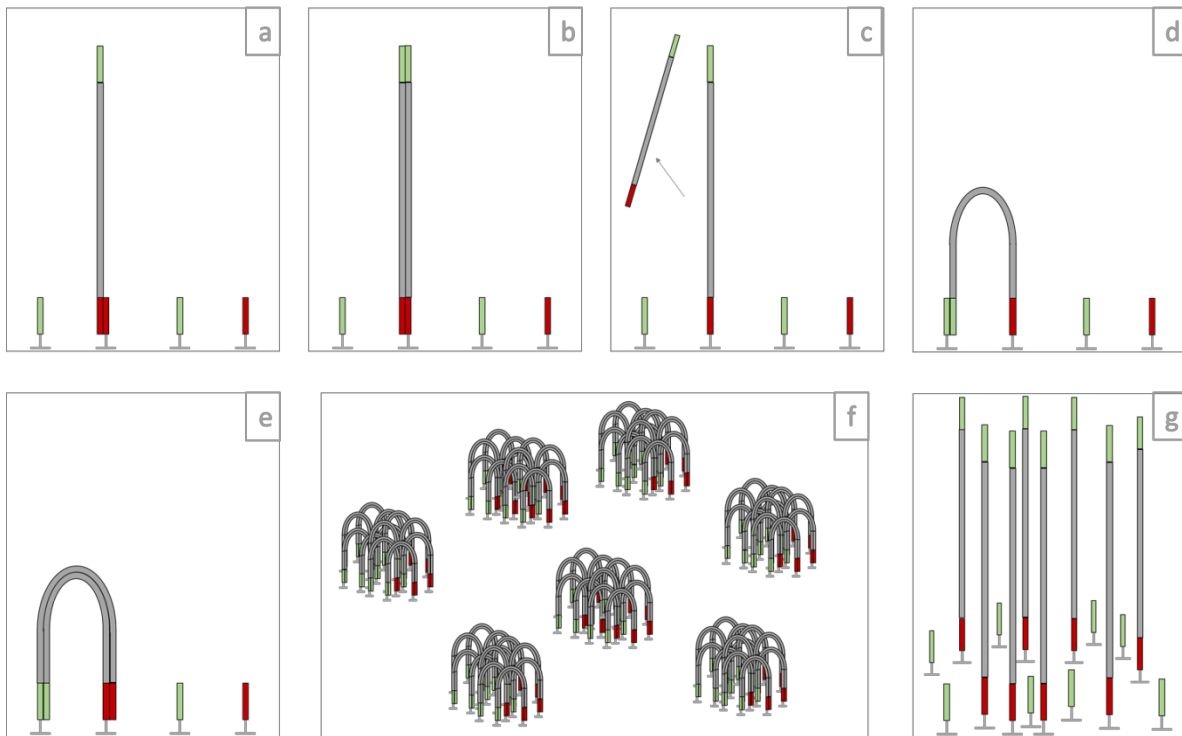


Abb. 10: Cluster-generierung auf der Flow cell

Die Amplicons binden mit ihrem Illumina-Adapter an die entsprechenden Oligonukleotide der Flow cell (a), so dass der komplementäre Strang gebildet werden kann (b). Der ursprüngliche Strang wird weggewaschen (c). Es folgt eine Brückenbildung, so dass der zweite Adapter auch an ein Oligonukleotid binden kann (d). Der komplementäre Strang wird nun synthetisiert (e). Durch den zeitlich parallelen Ablauf dieser Schritte entstehen viele Cluster auf der Oberfläche der Flow cell (f). Nachdem der jeweilige Reverse-Strang weggewaschen wurde, sind die Cluster bereit zur Sequenzierung (g). Modifiziert nach Illumina.

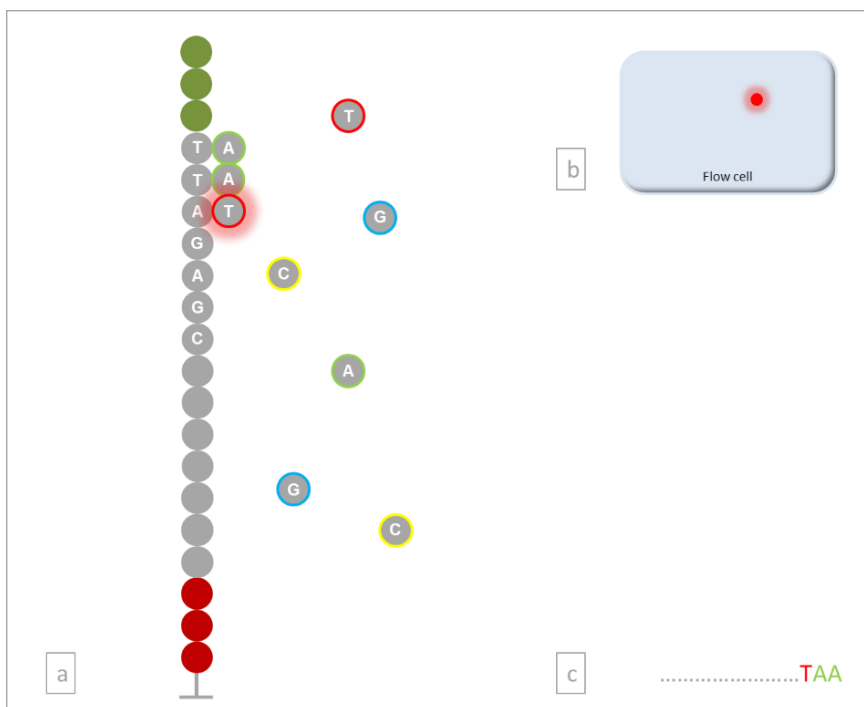


Abb. 11: Sequencing by synthesis

Nach dem zufälligen Einbau eines passenden Nukleotids (a) sendet dieses ein spezifisches Fluoreszenzsignal aus (b), welches aufgenommen und ausgewertet wird. Somit kann durch die Synthese eines Lesestrangs die Sequenz des Matrizenstrangs nachvollzogen werden (c). Modifiziert nach Illumina.

3.2.9 Datenauswertung auf der Galaxy-Plattform

Die Auswertung der Sequenzierungsdaten erfolgte auf der *Galaxy* Plattform.

Galaxy ist eine offene, web-basierte Plattform um zugängliche, reproduzierbare und transparente genomische Wissenschaft durchzuführen (Goecks et al., 2010). Sie wurde von Mitgliedern des *Center for Comperative Genomics and Bioinformatics* in Penn State und der *Emory University* entwickelt. Im *Galaxy*-Programm gibt es die Möglichkeit eigene automatisierte Arbeitsabläufe zu erstellen, also einzelne aneinander geknüpfte Arbeitsschritte zur Analyse von Daten. Diese sogenannten Workflows können für beliebige Daten benutzt und mit anderen Nutzern geteilt werden. Der Workflow für die Analyse unserer Sequenzierungsdaten bestand im Wesentlichen aus vier Einheiten (Abb. 13 und Abb. 14).

Zunächst wurden die gewünschten fastq.gz Dateien des *MiSeq* hochgeladen und entpackt. Danach folgte die Entfernung der vier Zufalls-Basen (siehe 4.1) am Anfang der Barcodes durch einen „FASTQ Trimmer“. Durch die vorgegebenen Barcodesequenzen der Forward und Reverse Primer konnten die Daten „demultiplext“ werden, d.h. anhand der vorgegebenen Barcode-Kombinationen sortiert werden. In diesen Ergebnissen wiederum wurde nach der NPM1-Wildtyp- bzw. der NPM1 Mutation A-Sequenz gesucht (Abb. 12). Bei der Suche wurde kein „Mismatch“ erlaubt, d.h. die Zielsequenz musste 100% mit der Referenz-Sequenz übereinstimmen.

Referenzsequenz des Wildtyp-Allels	AAGATCTCTGGCAGTG
Referenzsequenz des mutierten Allels (Typ A)	GATCTCTGTCTGGCAG

Abb. 12: Referenzsequenzen für Wildtyp- und mutiertes Allel

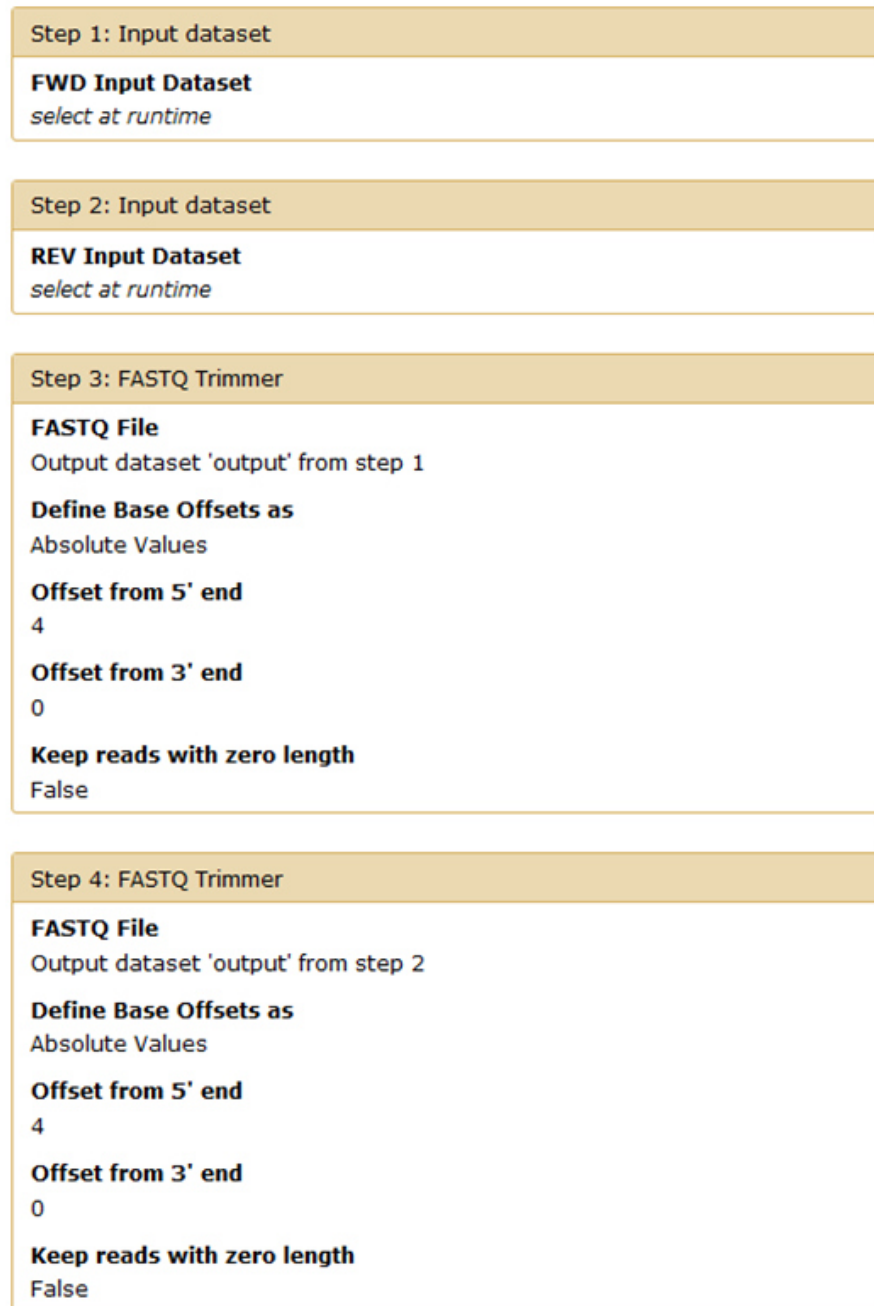


Abb. 13: Workflow zur Auswertung der MiSeq-Daten

Step 1 und 2: Auswahl und Entpacken der gewünschten fastq.gz Dateien.

Step 3 und 4: Verwendung eines Trimmers um die vier Zufalls-Basen am Anfang des Barcodes zu entfernen.

Step 5: Demultiplex 96 Illumina PE reads

FWD fastq file
Output dataset 'output_file' from step 3

REV fastq file
Output dataset 'output_file' from step 4

Select barcode position
FWD and REV

List of FWD Barcodes, comma-seperated
GAGATCATCG,ATAGCGTCGT,CATCAGACAC,GTATGCTGTC,AGCTCTGATC,AGTAGAC

Number of FWD barcodes
8

List of REV Barcodes, comma-seperated
GAGATCATCG,ATAGCGTCGT,CATCAGACAC,GTATGCTGTC,AGCTCTGATC,AGTAGAC

Number of REV barcodes
12

Minimum base calling quality of barcodes
20

Step 6: Detect sequence pattern in FASTQ

Single-end or paired-end?
Paired-end

Forward FASTQ file (fastq, fastqsanger, fastqillumina)
Output dataset 'fwdOutput1_1' from step 5

Reverse FASTQ file (fastq, fastqsanger, fastqillumina)
Output dataset 'revOutput1_1' from step 5

Sequence pattern defining wild-type allele
AAGATCTCTGGCAGTG

Sequence pattern defining mutant allele
GATCTGTCTGGCAG

Allow mismatch in sequence pattern?
Yes

Abb. 14: Workflow zur Auswertung der MiSeq-Daten

Step 5: Demultiplexen der Daten anhand der vorgegebenen Fwd- und Rev-Barcodesequenzen.
Step 6: Beispiel für die Detektion der vorgegebenen NPM1-Wildtyp- bzw. Mutantensequenzen in den demultiplexten Daten. Auswertung mit keinem bzw. einem erlaubten Basen-Mismatch.

3.2.10 Berechnung der relativen NPM1 Typ A Mutationslast

Die NPM1 Typ A Mutationsrate wurde aus dem Anteil der NPM1 A mutierten Leseabschnitte (engl. NPM1 A mutant reads) von der Gesamtheit der Leseabschnitte (engl. total reads) berechnet:

$$\text{NGS ratio} = \frac{\text{NPM1 A mutant reads}}{\text{total reads}}$$

Die Gesamtanzahl der *reads* setzt sich wiederum aus den NPM1 A mutierten *reads* und den NPM1 A Wildtyp *reads* zusammen.

4 Ergebnisse

4.1 Barcode-Tests

Um in einem *MiSeq*-Lauf verschiedene Proben gleichzeitig sequenzieren zu können wurden spezielle Barcodes mit einer Sequenz aus jeweils zehn Basen in Kooperation mit Dr.-Ing. Steffen Schober der Universität Ulm entworfen (Tab. 12). Diese Barcodes befinden sich zwischen der Primersequenz und der Illumina-Adaptersequenz. Um eine schlechte Lesequalität zu vermeiden, die vor allem zu Beginn einer Sequenz auftreten kann, beinhalten die Barcodes zudem am Anfang vier Basen („N“), die per Zufallsgenerator bei der Synthese ausgewählt wurden. Diese wurden vor der Auswertung *in silico* entfernt und bei der Datenauswertung nicht berücksichtigt.

Zunächst wurde eine Sequenzierung mit vier NPM1 Mutation A-positiven (Amplikons der AML-OCI3-Zelllinie, entspricht der Positivkontrolle) und vier NPM1-Wildtyp-Proben (Amplikons der HL60-Zelllinie, entspricht der Negativkontrolle) durchgeführt.

In der ersten Auswertung wurde nur nach einem Barcode (Forward-Barcode oder Reverse-Barcode) gesucht. Hierbei fiel auf, dass sich in allen Negativkontrollen NPM1 A mutierte reads im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-4} zeigten.

Wurden hingegen bei der Auswertung nur reads gesucht, die beide Barcodes (Forward- und Reverse-Barcode) zugleich besaßen, zeigten sich alle NPM1-Wildtyp-Proben NPM1 A-negativ (Abb. 15).

	10b Barcode (fwd)	10b Barcode (rev)
1	NNNNGAGATCATCG	NNNNGAGATCATCG
2	NNNNATAGCGTCGT	NNNNATAGCGTCGT
3	NNNNCATCAGACAC	NNNNCATCAGACAC
4	NNNNGTATGCTGTC	NNNNGTATGCTGTC
5	NNNNAGCTCTGATC	NNNNAGCTCTGATC
6	NNNNAGTAGACGAC	NNNNAGTAGACGAC
7	NNNNTCAGAGCATG	NNNNTCAGAGCATG
8	NNNNCTGTGTCAGA	NNNNCTGTGTCAGA
9		NNNNTACTGAGCAG
10		NNNNTCTCGTGTCT
11		NNNNCTCACACTCT
12		NNNNTGTGTGAGCA

Tab. 12: Übersicht der verwendeten Barcodesequenzen (b: bases, fwd: forward, rev: reverse)

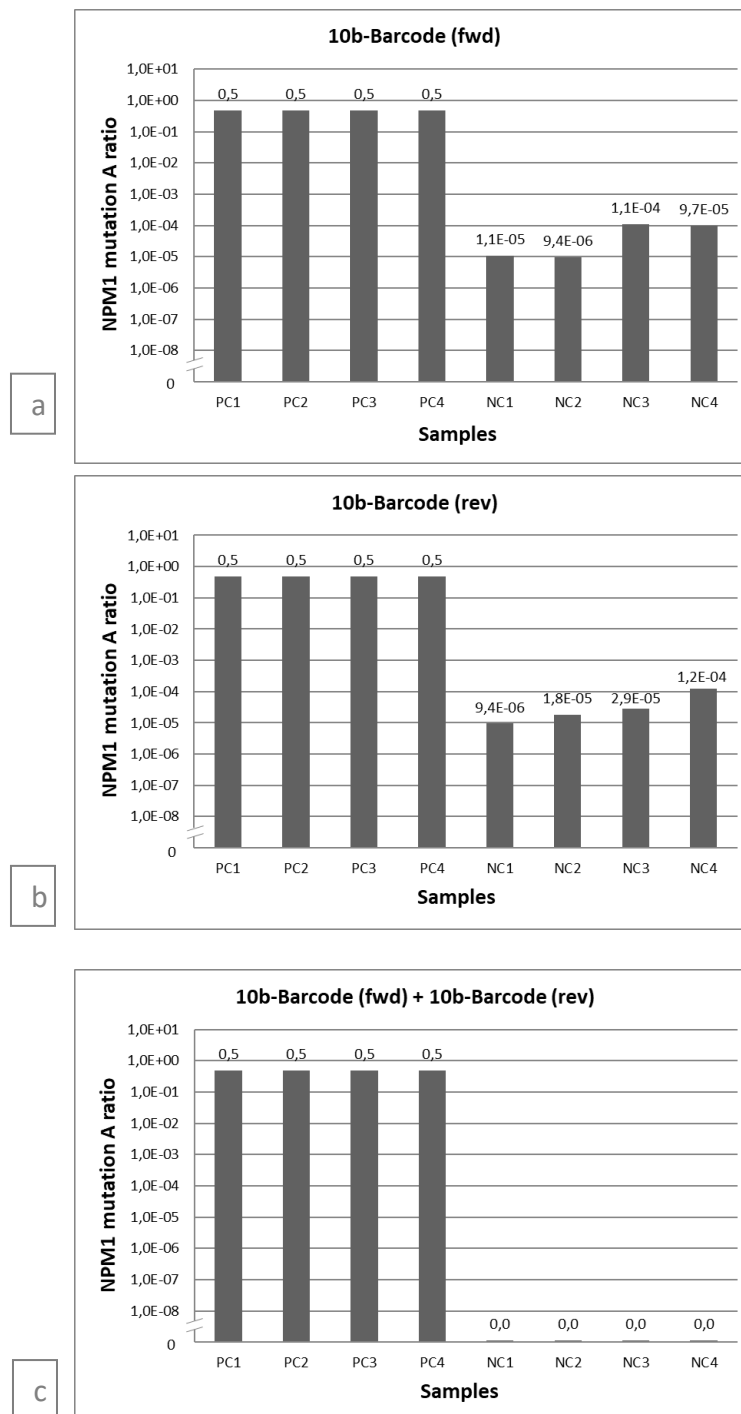


Abb. 15: Übersicht der Sequenzierungsergebnisse mit 10b-Barcodes.
 Auswertung nach dem Fwd-Barcode (a), nach dem Rev-Barcode (b) oder nach beiden Barcodes (c). PC: Positivkontrolle, NC: Negativkontrolle.

In einem zweiten Lauf wurden acht Negativkontrollen (HL60) sequenziert. Hierbei zeigten sich alle Proben in allen drei Auswertungsmethoden (Suche nur nach

Forward-, nur nach Reverse- oder nach Forward- und Reverse-Barcode) negativ für NPM1 Mutation A (Abb. 16).

Für alle weiteren Sequenzierungsläufe dieser Arbeit wurden nur paired-end Auswertungen (reads besitzen den Forward- und Reverse-Barcode) verwendet.

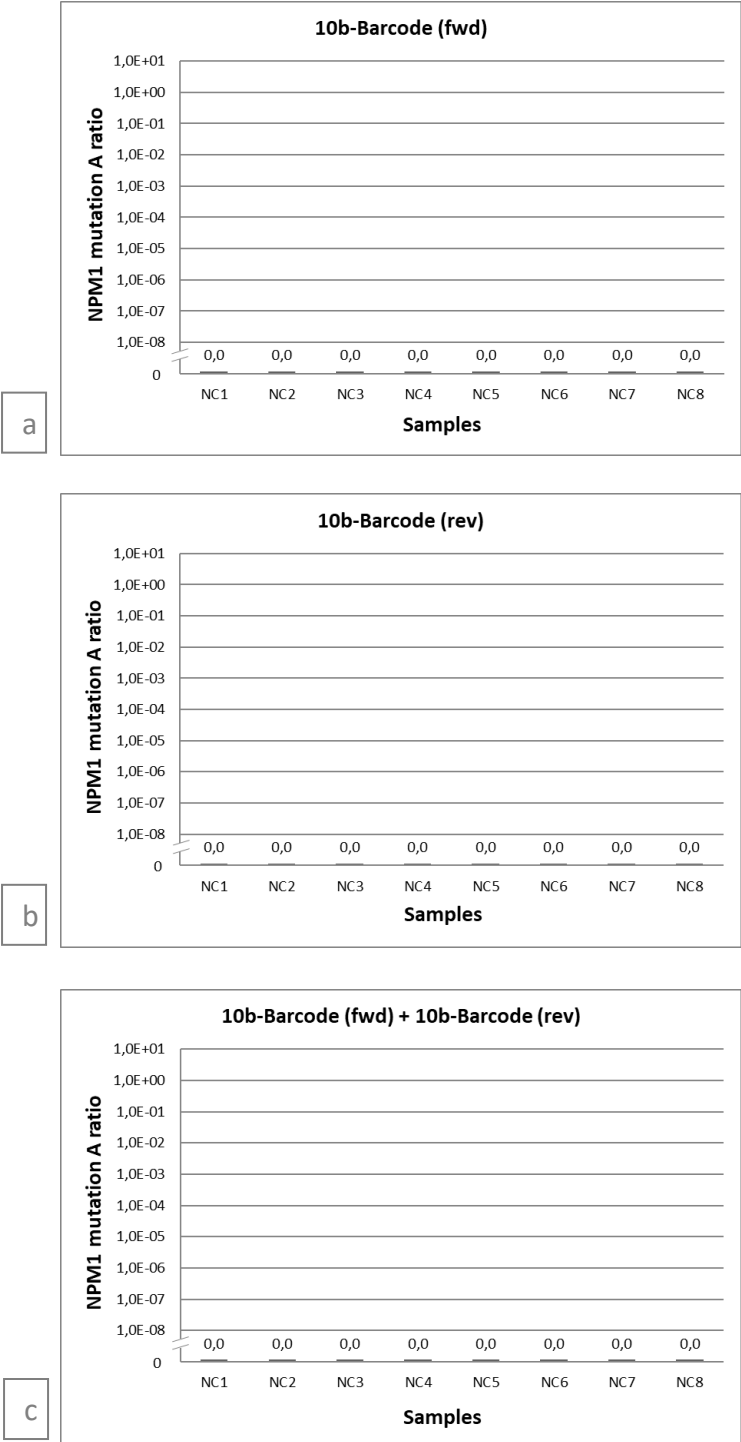


Abb. 16: Übersicht der Sequenzierungsergebnisse mit 10b-Barcodes. Auswertung nach dem Fwd-Barcode (a), nach dem Rev-Barcode (b) oder nach beiden Barcodes (c).

4.2 Verdünnungsreihe

Um das Next-Generation-Sequencing als Methode für die MRD-Diagnostik zu testen, wurden Triplikate einer Amplikon-Verdünnungsreihe aus der NPM1 Typ A-mutierten Zelllinie OCI-AML3 und der NPM1-Wildtyp-Zelllinie HL60 hergestellt, die in drei verschiedenen Läufen auf der *MiSeq*-Plattform sequenziert und mittels drei separaten RQ-PCR-Läufen gemessen wurden (technische Triplikate). Für die Verdünnungen 1:10 bis 1:10.000 zeigten sich in der RQ-PCR-Messung annähernd lineare Ergebnisse in der exponentiellen Darstellung (Abb. 17). Bei der Verdünnung 1:100.000 vergrößerte sich die relative Standardabweichung zwischen den Läufen (vgl. Tab. A 2). In der 1:1.000.000-Verdünnung konnte die Mutation mittels RQ-PCR nur in einer der drei technischen Replikate detektiert werden, ab 1:10.000.000 konnte die Mutation in keiner der Proben mehr nachgewiesen werden.

Die Proben der Verdünnungsreihe wurden als Amplikons aufbereitet und in drei separaten Läufen auf der *MiSeq*-Plattform sequenziert. Hier zeigten sich annähernd linear verlaufende Ergebnisse in der exponentiellen Darstellung bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 (Abb. 18), wobei ab einer Verdünnung von 1:10.000 die relative Standardabweichung der drei Läufe stark anstieg (vgl. Tab. A 4). NPM1 Mutation A konnte in der 1:100.000-Verdünnung noch in allen drei Proben mit einer relativen Standardabweichung von 41% nachgewiesen werden, die 1:1.000.000-Verdünnung zeigte sich für alle drei Proben NPM1 Mutation A negativ (vgl. Tab. A 3). Auch alle Negativkontrollen (HL60-Zelllinie) waren für NPM1 Mutation A negativ.

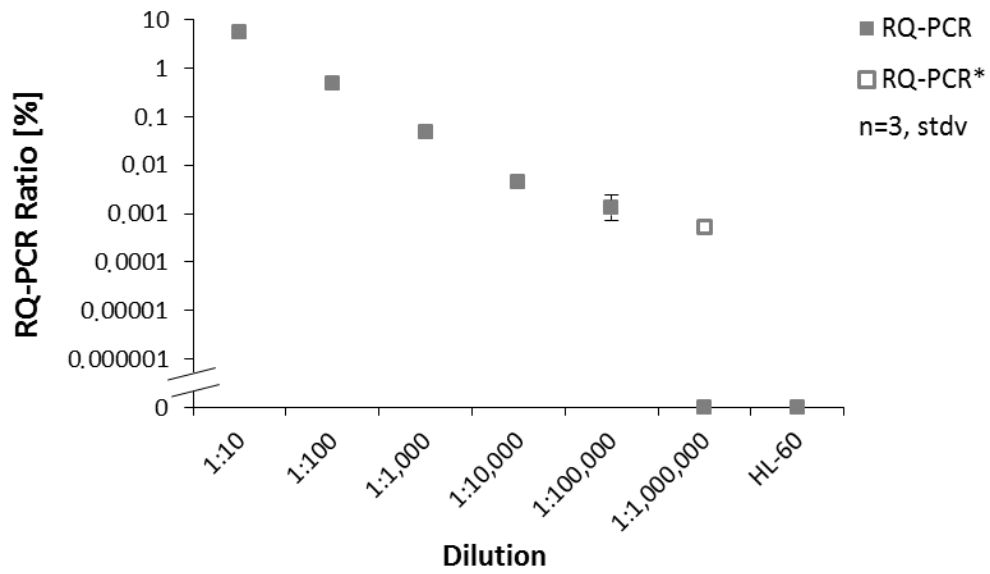


Abb. 17: Graphische Darstellung der RQ-PCR-Ergebnisse der Verdünnungsreihe

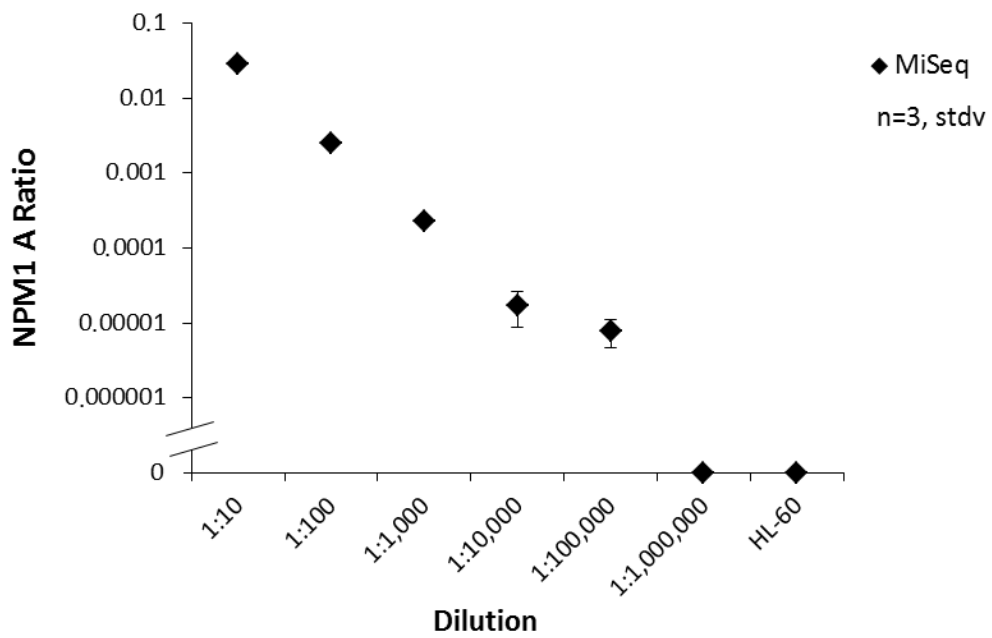


Abb. 18: Graphische Darstellung der NGS-Ergebnisse der Verdünnungsreihe

4.3 NPM1-Ampliconsequenzierung von Patientenproben

4.3.1 Sequenzierung von 88 Patientenproben

Es wurden 88 cDNA-Proben aus Knochenmarkspunktionen von insgesamt 22 erwachsenen AML-Patienten sequenziert. Pro Patient wurden jeweils vier Proben zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten verwendet (Erstdiagnose- und Verlaufspalten, nähere Angaben siehe Anhang Tab. A 5).

Zunächst wurden 88 Patientenproben mit vier Positiv- und vier Negativkontrollen in einem Lauf sequenziert. Dabei wurden die maximalen Kombinationsmöglichkeiten von acht Forward-Barcodes und zwölf Reverse-Barcodes ausgenutzt (Barcoding 1, Abb. 19). Es konnte eine durchschnittliche Lesetiefe von 176.989 ± 57.889 reads pro Sample (Mittelwert \pm Standardabweichung) erreicht werden. Die „Kontamination“ (NPM1 Mutation A positive reads) der Negativkontrollen befand sich im Bereich von $3,44 \times 10^{-6}$ bis $3,09 \times 10^{-5}$.

Barcoding 1

		REV												
		bc 1	bc 2	bc 3	bc 4	bc 5	bc 6	bc 7	bc 8	bc 9	bc 10	bc 11	bc 12	
FWD	bc 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X = samples
	bc 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	bc 3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	bc 4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	bc 5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	bc 6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	bc 7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	bc 8	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

Abb. 19: Barcoding Methode 1

Acht Forward- und zwölf Reverse-Primer werden miteinander kombiniert um 96 verschiedene Barcode-Paare zu erhalten.

Aufgrund der vorangegangenen Barcode-Testläufe wurde eine NPM1 A Mutationsratio von 10^{-4} als Cut-off (Proben mit einer Ratio von $>10^{-4}$ sahen wir als deutlich NPM1 A-positiv an) definiert. Proben mit einer Mutationsrate von $\leq 10^{-4}$ wurden in weiteren Läufen mit einer spezifischen Barcode-Zuordnung pro Probe sequenziert, d.h. jedes Barcode-Paar (Fwd-Rev) wurde nur für jeweils eine Probe verwendet (Barcoding 2,

Abb. 20). Somit konnte die Möglichkeit einer *in silico* Falschzuordnung reduziert werden. Dabei konnte eine durchschnittliche Lesetiefe von $2.429.061 \pm 1.527.003$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) erreicht werden. Die Negativkontrollen dieser Sequenzierungsläufe waren alle stets negativ für NPM1 Mutation A.

Barcoding 2

		REV											
		bc 1	bc 2	bc 3	bc 4	bc 5	bc 6	bc 7	bc 8	bc 9	bc 10	bc 11	bc 12
FWD	bc 1	x											
	bc 2		x										
	bc 3			x									
	bc 4				x								
	bc 5					x							
	bc 6						x						
	bc 7							x					
	bc 8								x				

X = samples

Abb. 20: Barcoding Methode 2

Acht Forward- und acht Reverse-Primer werden jeweils nur für eine Probe verwendet, so dass acht mögliche Barcode-Paare entstehen.

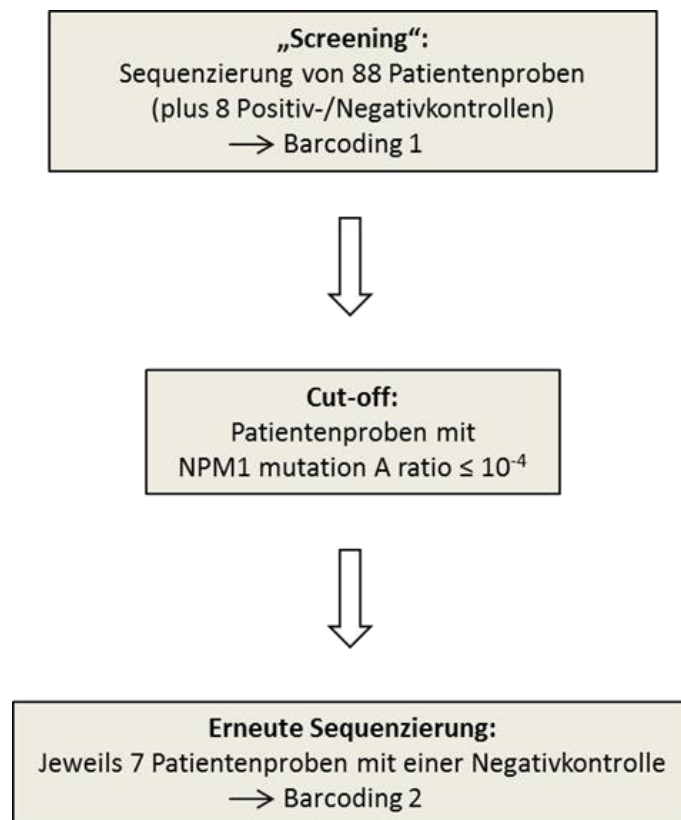


Abb. 21: Zweistufiges Vorgehen bei der Sequenzierung der Patientenproben.

4.3.1.1 Korrelation zwischen NGS- und RQ-PCR-Daten

Anschließend wurden die Proben aus beiden Sequenzierungsläufen gepoolt. Wir verwendeten nur die Proben mit einem NPM1 A Ratio von $>10^{-4}$ aus dem ersten Sequenzierungslauf und alle Proben aus dem zweiten Sequenzierungslauf. In Abb. 22 wurden diese gepoolten NGS-Mutationsraten gegen die NPM1 A Ratios aus der RQ-PCR derselben Proben aufgetragen.

Der Pearson-Korrelationskoeffizient beträgt hierbei 0,851 bei einem p-Wert von $<0,001$.

Die Anreicherung von NGS-Werten bei einer Ratio von ca. 0,5 resultiert aus der Tatsache, dass die NPM1 Mutation A heterozygot auftritt, d.h. ein Wildtyp-Allel bleibt immer erhalten.

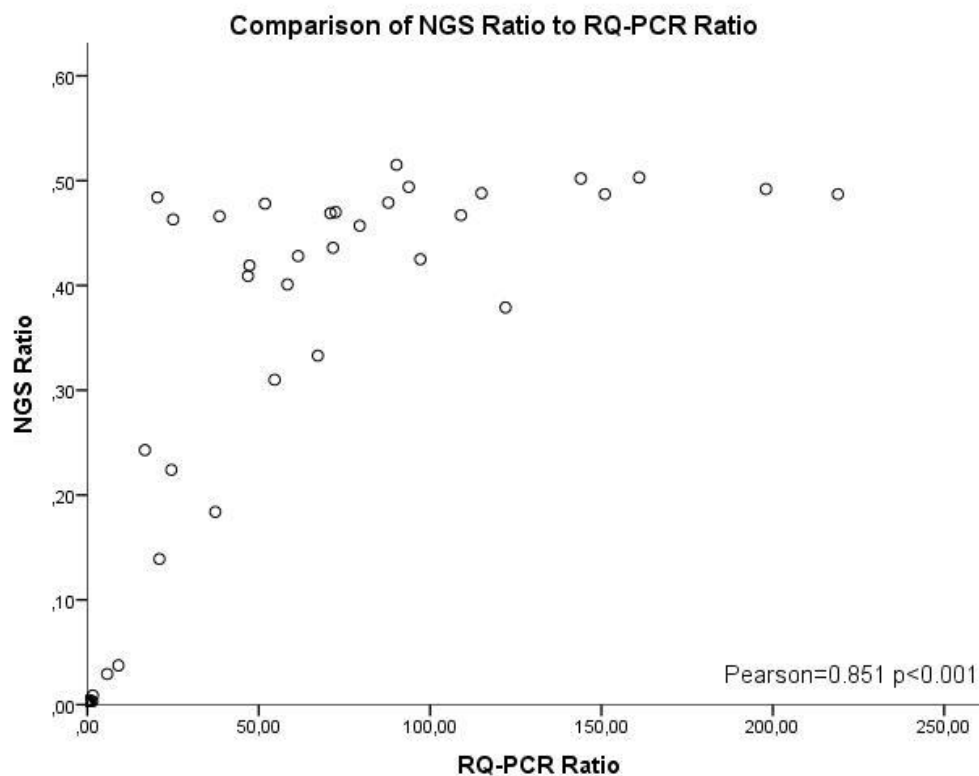


Abb. 22: Korrelation zwischen RQ-PCR- und NGS-Ergebnissen

NGS Ratio = NPM1 A mutierte reads/Gesamtanzahl der reads

RQ-PCR Ratio =

$$\frac{[\text{NPM1 Mutation A (sample)}/\text{ABL (sample)}]}{[\text{NPM1 Mutation A (calibrator)}/\text{ABL (calibrator)}]}$$

4.3.1.2 Longitudinale Darstellung der NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse

Wir waren in der Lage mittels NGS bei 16 Patientenproben (Patienten 2, 3, 5, 6, 8, 9, 13, 14, 16, 17, 19, 21) ein niedriges NPM1 A-Mutationslevel während bzw. nach Therapie zu detektieren, wohingegen diese Proben in der RQ-PCR MRD negativ waren.

Umgekehrt zeigte eine Probe (Patient 7) eine niedrige Mutationsrate in der RQ-PCR (Ratio: 0,02), wohingegen diese Probe im NGS MRD negativ war (Tab. 13).

	RQ-PCR positiv	RQ-PCR negativ
NGS positiv	49	16
NGS negativ	1	22

Tab. 13: MRD-Status in NGS und RQ-PCR

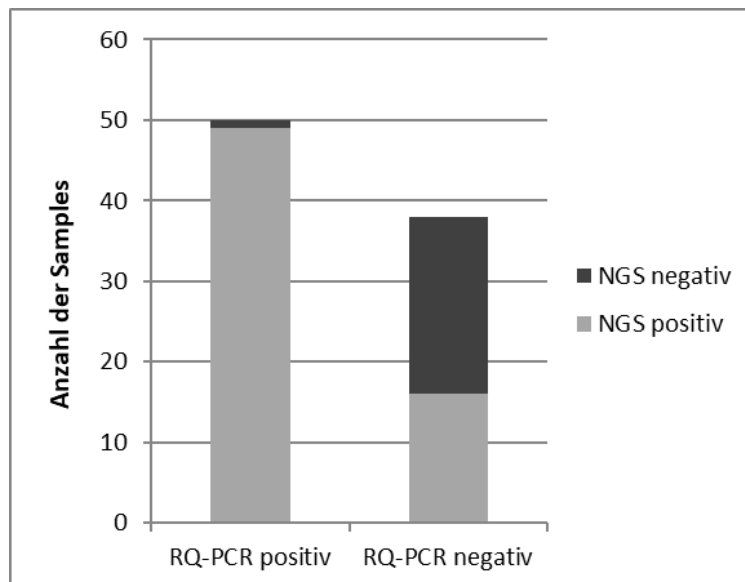


Abb. 23: MRD-Status in NGS und RQ-PCR

4.3.1.2.1 Patienten ohne klinisches Rezidiv

Folgende Abbildungen (Abb. 24 - Abb. 26) stellen die Ergebnisse der Patienten dar, die nach Induktions- und/oder Konsolidierungstherapie eine Vollremission und MRD-Negativität in RQ-PCR erreicht und im Verlauf kein klinisches Rezidiv erlitten haben. Patient Nr. 20 (Abb. 26d) ist ohne die Diagnose eines AML-Rezidivs verstorben; die übrigen Patienten befinden sich bis dato (Stand 01/2020) in Remission.

In zehn von 27 RQ-PCR MRD-negativen Proben (acht von 14 Patienten) konnte mittels NGS noch eine niedrige NPM1 A Mutationsrate von $3,29 \cdot 10^{-7}$ bis $5,00 \cdot 10^{-4}$ (0,00007% - 0,10244% der NPM1 A Ratio bei Erstdiagnose) detektiert werden.

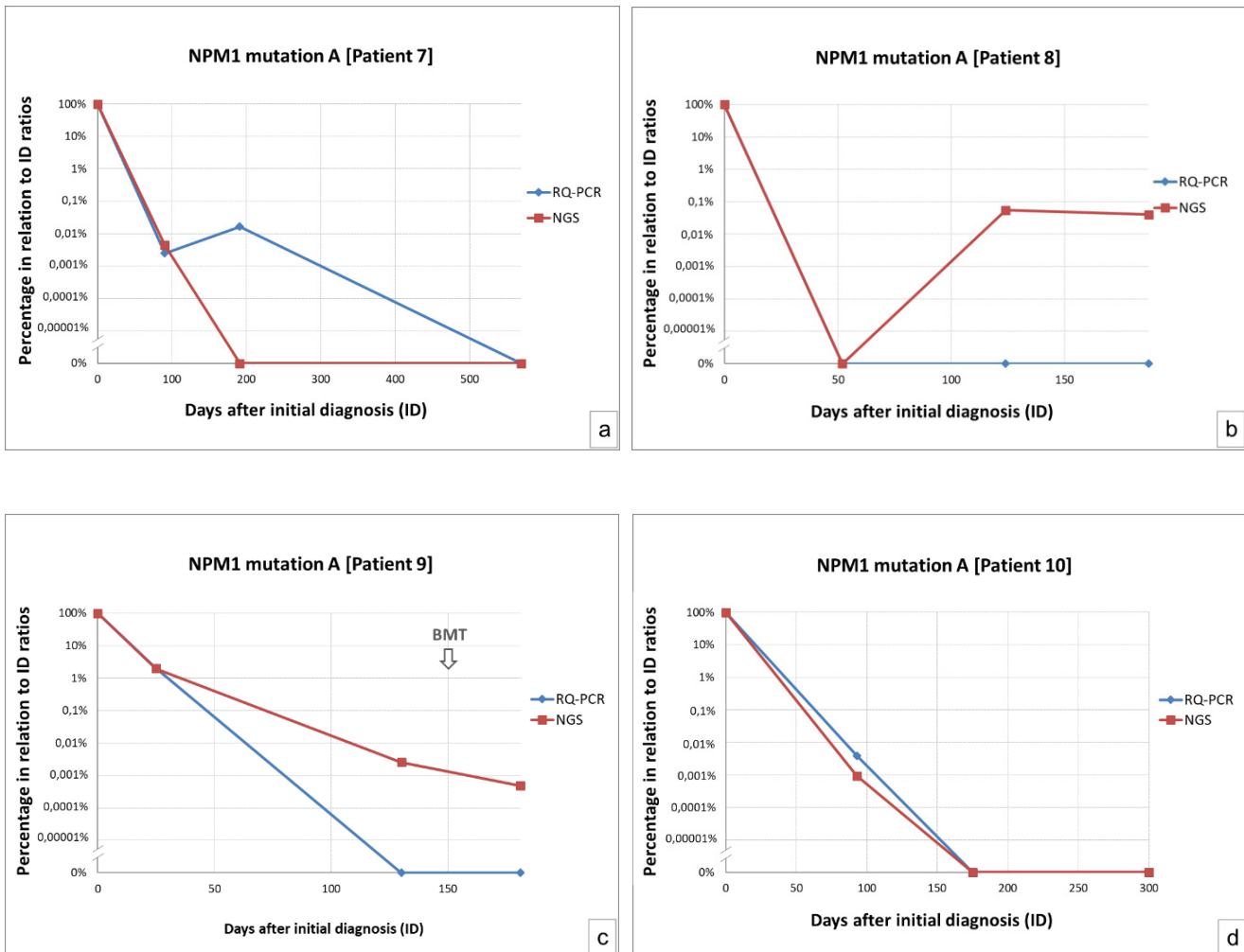


Abb. 24 (a-d): NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse der Patienten ohne klinisches Rezidiv (Patienten 7, 8, 9, 10). BMT: Knochenmarkstransplantation.

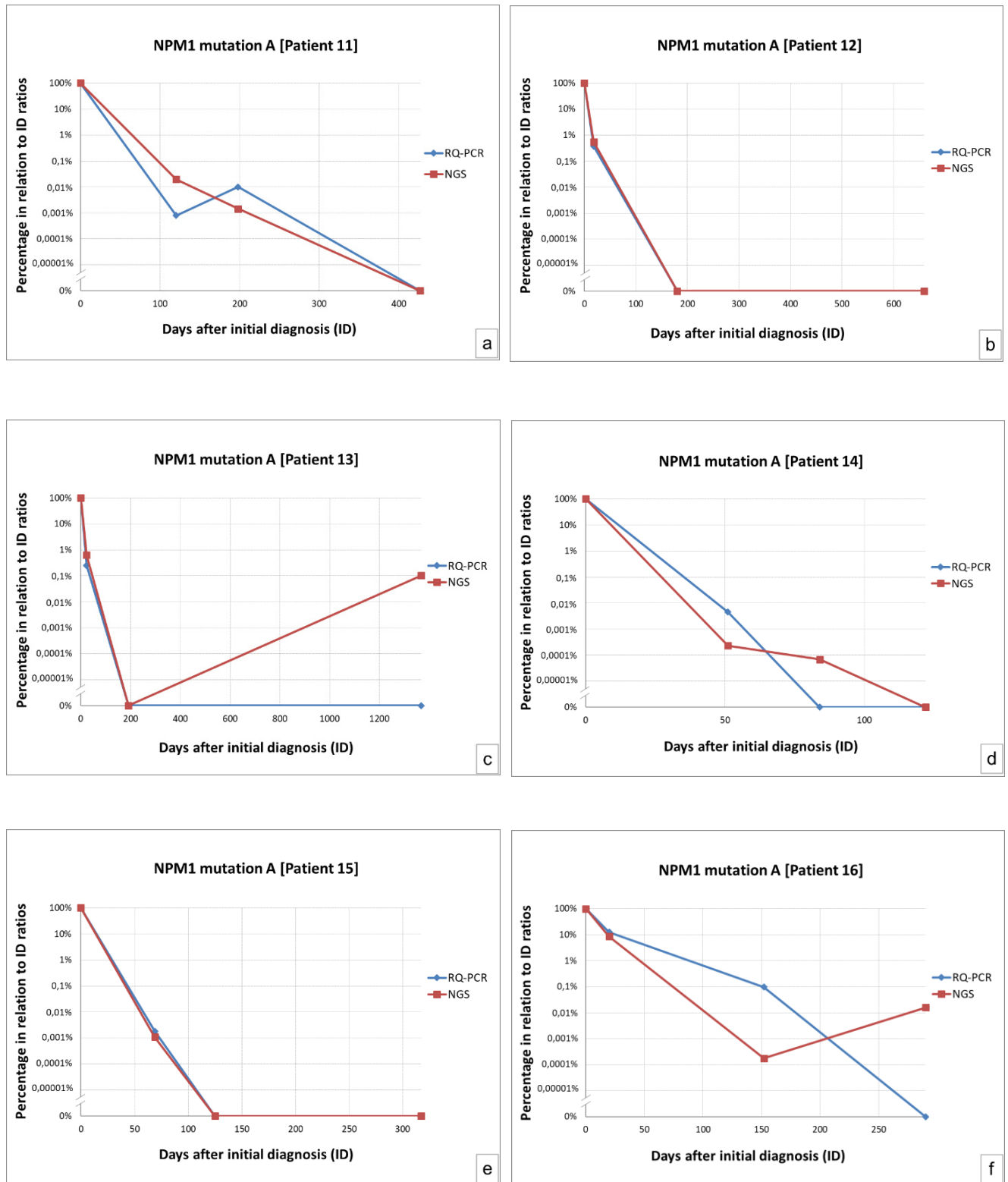


Abb. 25 (a-f): NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse der Patienten ohne klinisches Rezidiv (Patienten 11, 12, 13, 14, 15, 16)

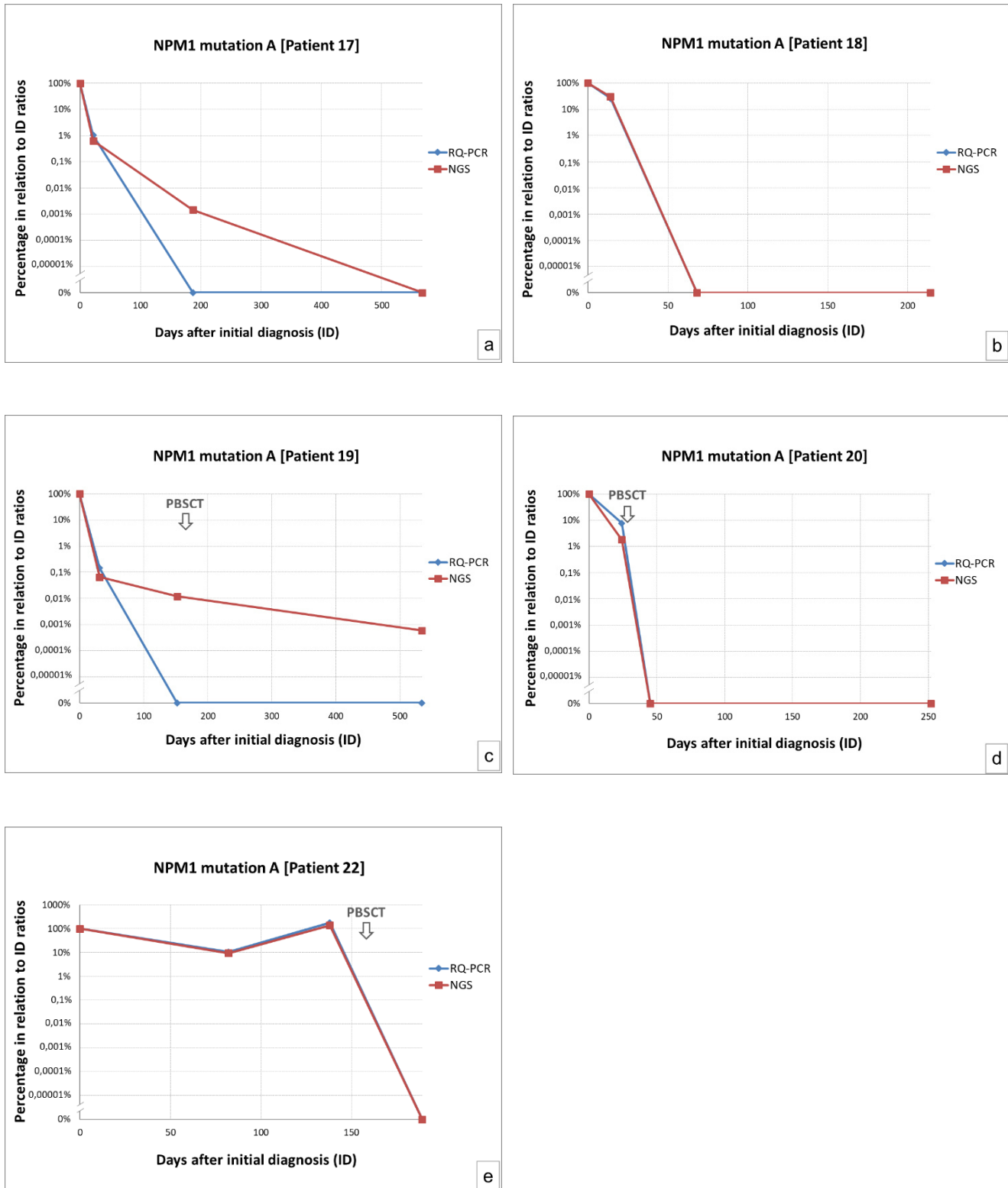


Abb. 26 (a-e): NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse der Patienten ohne klinisches Rezidiv (Patienten 17, 18, 19, 20, 22). PBSCT: Periphere Blutstammzelltransplantation.

4.3.1.2.2 Patienten mit Rezidiv

Folgende Abbildungen (Abb. 27 und Abb. 28) zeigen Daten von Patienten, die nach der Induktions- und/oder Konsolidierungstherapie eine Vollremission und ein negatives MRD-Level in der RQ-PCR erreicht haben, jedoch im Verlauf ein klinisches Rezidiv erlitten haben (bei Patient 6 wurde keine Rezidivprobe aufgrund fehlendes Materials sequenziert). Die Pfeile („Relapse“) zeigen den Diagnosezeitpunkt des klinischen Rezidivs. Bei Patient 6 wurde diese auswärts gestellt, so dass der genaue Zeitpunkt unklar ist. Patient 21 rezidierte an Tag 350 nach Erstdiagnose (s. 4.3.2).

In sechs von elf Proben (fünf von sieben Patienten), die MRD negativ in RQ-PCR waren, konnte mittels NGS noch ein niedriger MRD-Level im Bereich von $6,37 \cdot 10^{-6}$ bis $6,80 \cdot 10^{-4}$ (0,002% - 0,204% der NPM1 A Ratio bei Erstdiagnose) festgestellt werden.

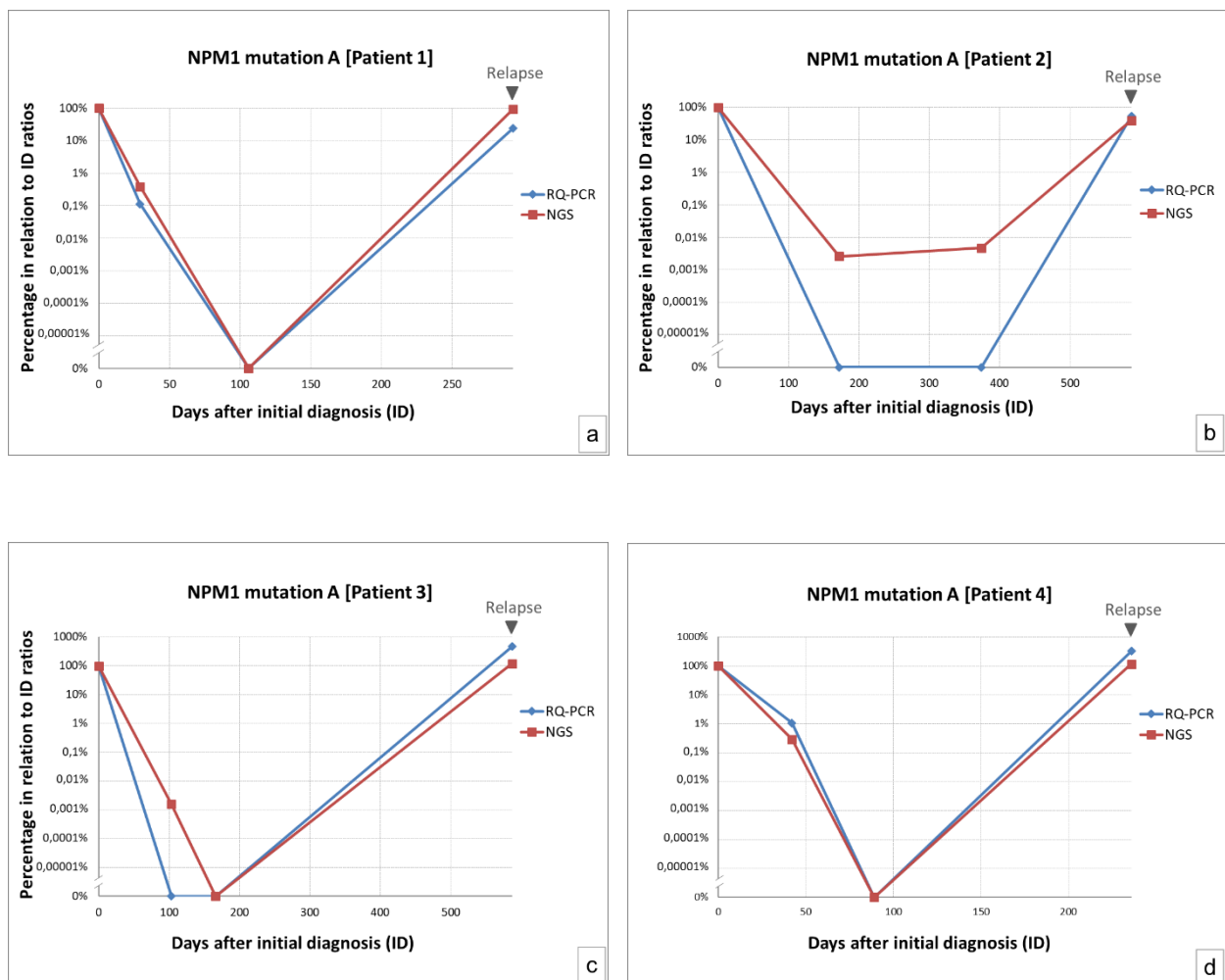


Abb. 27 (a-d): NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse der Patienten mit klinischem Rezidiv (Patienten 1, 2, 3, 4)

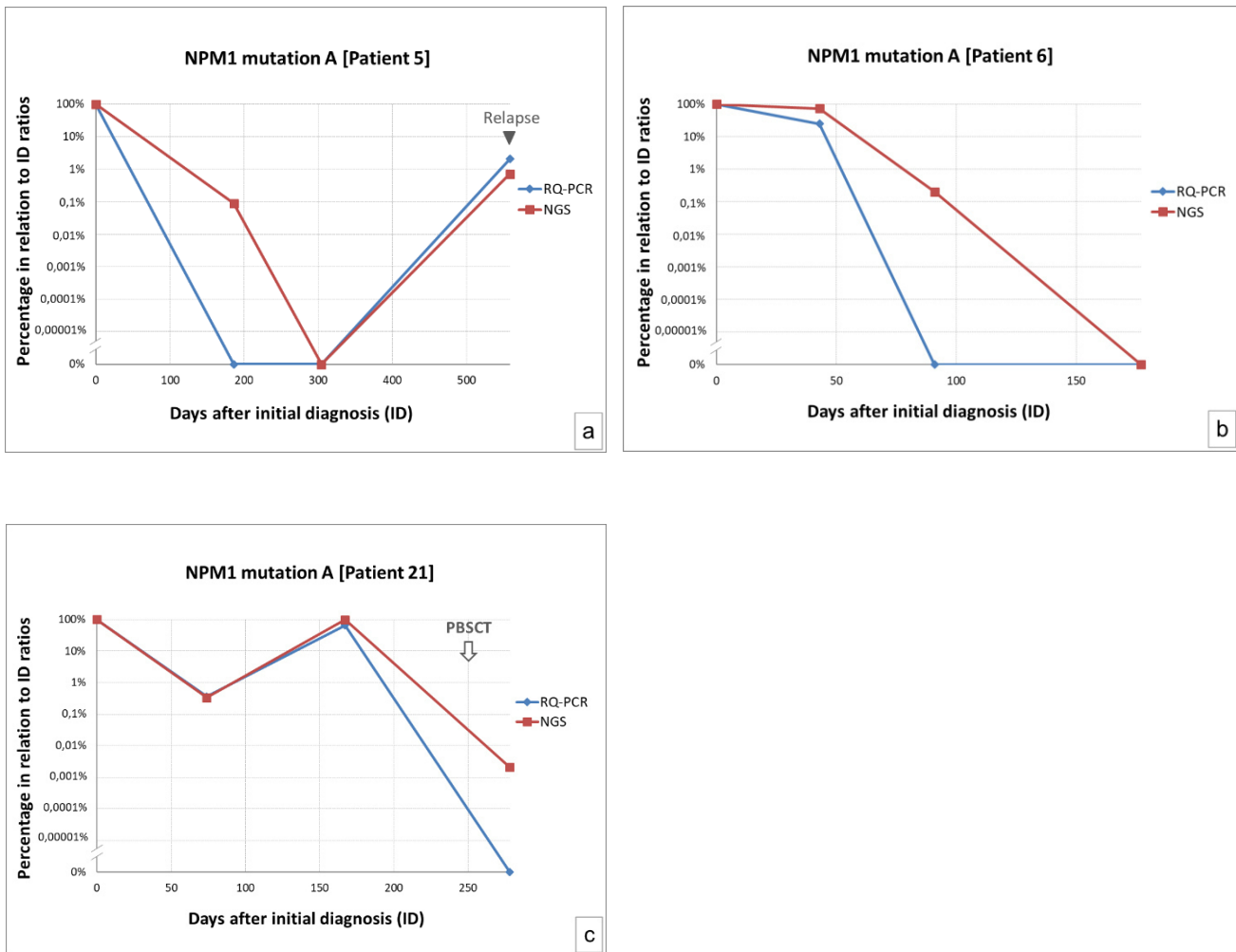


Abb. 28 (a-c): NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse der Patienten mit klinischem Rezidiv (Patienten 5, 6, 21)

4.3.2 Sequenzierung von zusätzlichen Verlaufspunkten ausgewählter Patienten

In einem weiteren Sequenzierlauf wurden Verlaufspunkten von ausgewählten Patienten (9, 13, 19, 21) untersucht um die Dynamik der NPM1 A Mutationslast während des Therapieverlaufs noch besser beurteilen zu können (Abb. 29). Diese Patienten wurden ausgewählt, da manche Proben in vorherigen Sequenzierungen eine Diskrepanz zwischen NGS- und RQ-PCR-Daten zeigten (NGS positiv, RQ-PCR negativ) und aktuellere Verlaufspunkte verfügbar waren.

Bei 9, 13 und 19 waren insgesamt fünf Proben in der Sequenzierung NPM1 A positiv und in der RQ-PCR MRD negativ. Die mittels NGS detektierbare Mutationslast sank jedoch im Therapieverlauf und wurde zu einem späteren Zeitpunkt (im Vergleich zu den RQ-PCR-Daten) auch MRD-negativ.

Bei Patient Nr. 21 konnte an Tag 278 per NGS eine niedrige Mutationslast nach PBSZT bestimmt werden, wohingegen die RQ-PCR in der derselben Knochenmarkspalte keine NPM1 A Mutation mehr detektieren konnte. 73 Tage später erlitt dieser Patient ein AML-Rezidiv ohne eine MRD-Negativität im NGS erreicht zu haben.

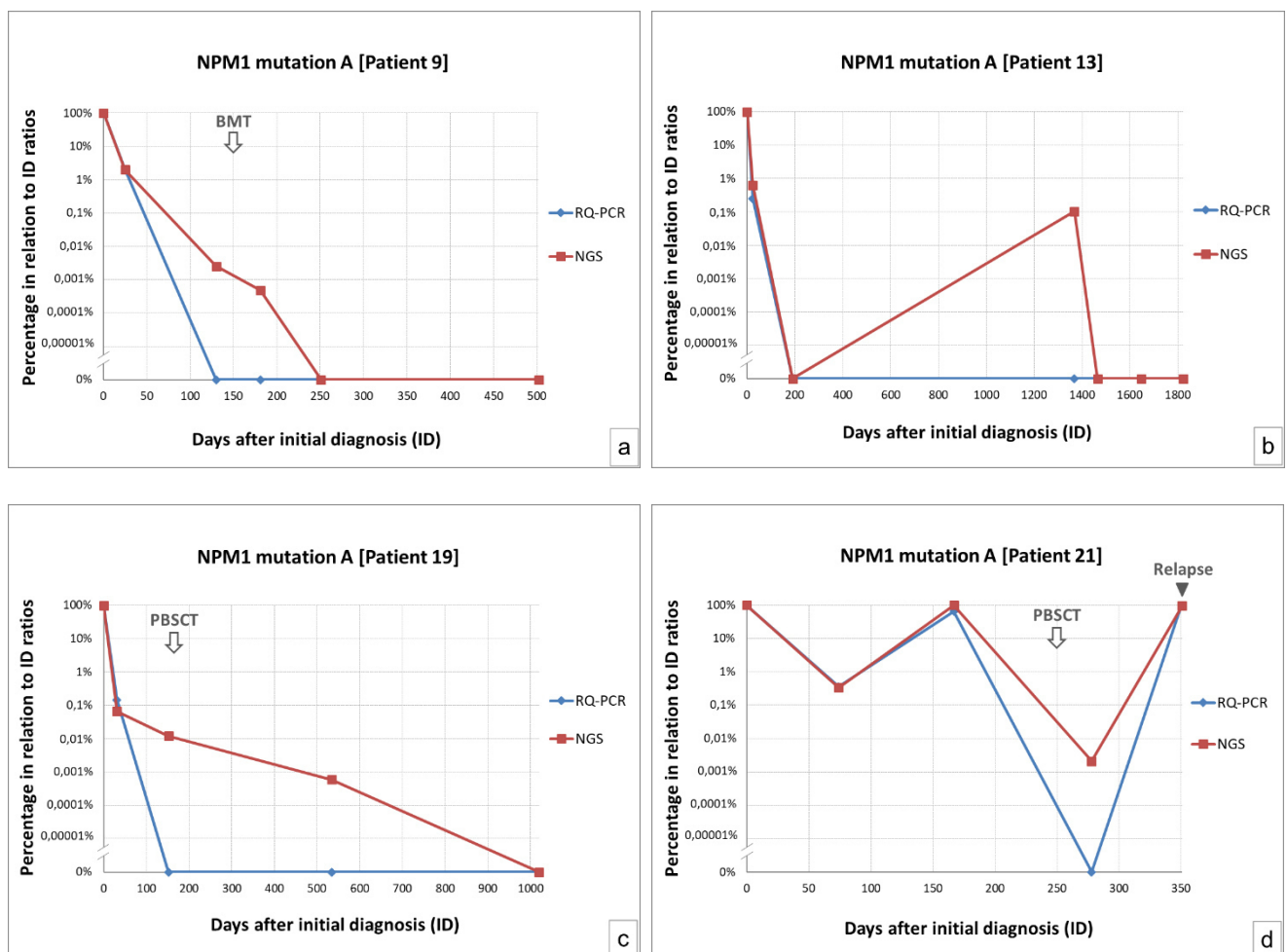


Abb. 29 (a-d): NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse der Patienten 9, 13, 19 und 21 mit zusätzlichen Verlaufspunkten

4.3.3 Patientenproben zu spezifischen Therapiezeitpunkten

4.3.3.1 Patientenproben nach Induktionstherapie

Es wurden zehn Patientenproben, welche direkt nach der Induktionstherapie gesammelt wurden, sequenziert (Abb. 30). Davon haben drei Patienten ein Rezidiv erlitten und sieben befinden sich bis dato in Remission. Alle drei Proben der Patienten, die im Verlauf rezidiert sind, waren MRD-positiv im NGS (Range: $6,37 \cdot 10^{-6}$ bis $1,21 \cdot 10^{-3}$). In zwei dieser Proben waren jedoch per RQ-PCR keine MRD messbar.

Fünf von sieben Proben von Patienten ohne Rezidiv waren sowohl im NGS als auch in der RQ-PCR MRD-positiv. In den übrigen zwei Proben konnten durch beide Methoden kein MRD-Level festgestellt werden.

Die NGS-Werte der Postinduktions-Proben von Patienten mit einem Rezidiv im Verlauf unterschieden sich signifikant von den Werten der Patienten, die in Remission blieben ($p=0,043$).

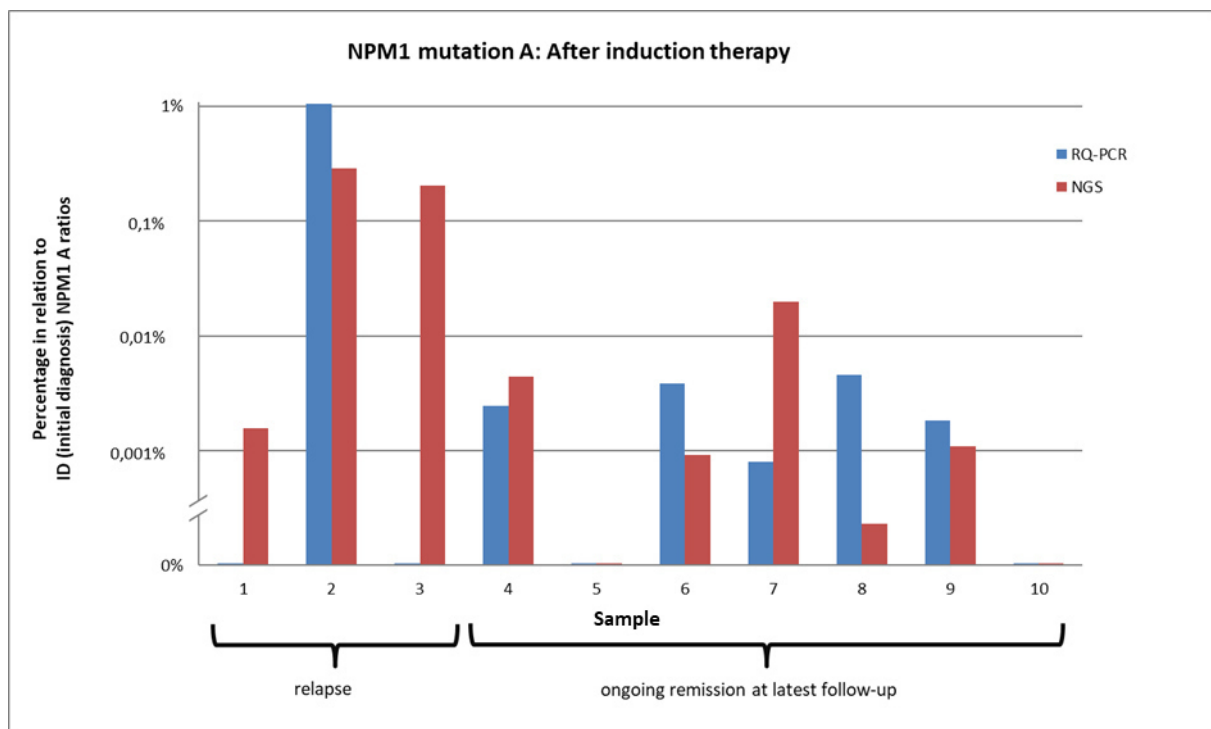


Abb. 30: Übersicht der RQ-PCR- und NGS-Daten nach Induktionstherapie

4.3.3.2 Patientenproben nach Konsolidierungstherapie

Zehn der sequenzierten Proben wurden direkt nach der Konsolidierungstherapie von verschiedenen Patienten entnommen (Abb. 31). Davon erlitten fünf Patienten im Verlauf ein Rezidiv und fünf befinden sich bis dato in Remission.

In einem der Patienten, die zum späteren Zeitpunkt rezidiert sind, konnte mittels NGS ein MRD-Level detektiert werden, wohingegen die Probe in der RQ-PCR MRD negativ war.

Zwei der fünf Patienten, die in Remission blieben, waren MRD positiv im NGS, jedoch konnte nur bei einem ein MRD-Level in der RQ-PCR bestimmt werden. Ein weiterer nicht-rezidivierter Patient zeigte ein positives MRD-Level in RQ-PCR, wohingegen diese Probe im NGS MRD negativ war.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den NGS-Werten der Patienten mit einem Rezidiv im Verlauf und denen, die in Remission blieben ($p=0,552$).

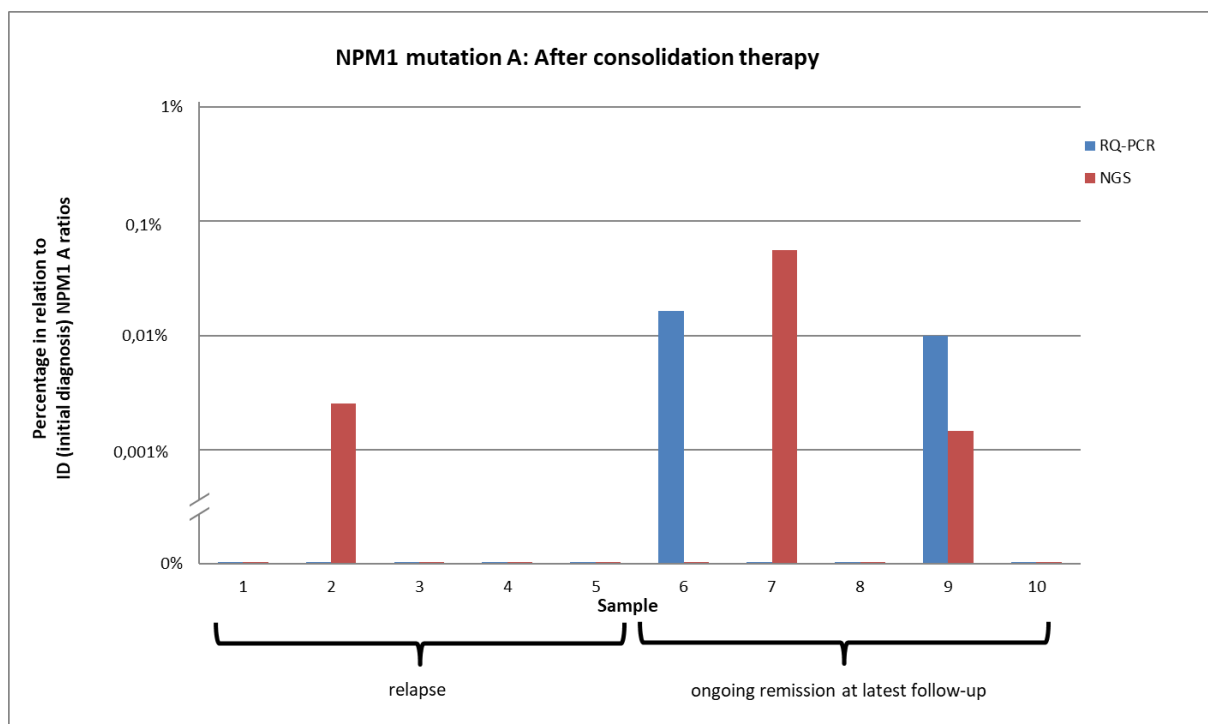


Abb. 31: Übersicht der RQ-PCR- und NGS-Ergebnisse nach Konsolidierungstherapie (die Nummerierung der Proben bezieht sich nur auf dieses Diagramm)

5 Diskussion

In den letzten Jahren hat die Messung der minimalen Resterkrankung bei AML-Patienten für Therapiekontrolle und -entscheidungen durch die Möglichkeit einer Patienten-orientierten und somit individuelleren Therapiestrategie stetig an Bedeutung zugenommen.

Hierfür eignen sich NPM1-Mutationen, die sich bei ca. 1/3 der erwachsenen AML-Patienten feststellen lassen, als MRD-Marker. In dieser Arbeit wurde sich auf die NPM1 Mutation Typ A konzentriert, die mit 75-80% die häufigste Unterform der NPM1 Mutationen darstellt (Falini et al., 2005).

Die Methode der Wahl zur Bestimmung der minimalen Resterkrankung mittels NPM1 Mutation A ist heutzutage die RQ-PCR. Ihre maximal erreichbare Sensitivität wird mit 10^{-4} bis 10^{-5} (Papadaki et al., 2009, Schnittger et al., 2009) angegeben. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sie nur bei bestimmten Subgruppen der AML aufgrund der Notwendigkeit mutationsspezifischer Marker anwendbar ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Next Generation Sequencing sich zur relativen Quantifizierung der NPM1 Mutation Typ A und somit prinzipiell zum MRD-Monitoring der entsprechenden AML-Patienten eignen könnte.

Bei der Sequenzierung einer Amplikon-Verdünnungsreihe einer OCI-AML3-Zelllinie (NPM1 A-mutiert), die in Amplikons einer HL60-Zelllinie (NPM1-Wildtyp) verdünnt wurde, konnte eine durchschnittliche Coverage von 2,1 Millionen reads pro Probe erreicht werden. Hierbei betrug die erreichte Sensitivität 10^{-5} in Bezug auf die Verdünnung. In der HL60-Probe wurden keine NPM1 A-mutierten reads detektiert, was die hohe Spezifität der Methode in diesem experimentellen Rahmen widerspiegelt.

Bei der Sequenzierung von acht HL60-Zelllinie-Proben (NPM1-Wildtyp) zeigte sich eine hohe Spezifität der Methode. Bei einer durchschnittlichen Lesetiefe von 1,6 Millionen reads pro Probe wurde kein einziger Leseabschnitt mit NPM1 A Mutation detektiert.

Wir sequenzierten 88 Patientenproben nach einem Zweistufensystem. Die NGS-Ergebnisse korrelierten stark mit den RQ-PCR-Werten der Proben (Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,85 bei einem p-Wert von $<0,001$).

Bei der Sequenzierung von Patientenproben konnten bei 16 von 88 Proben mittels NGS noch ein niedriges NPM1 A Mutationsniveau im Bereich von $3,29 \cdot 10^{-7}$ bis $6,80 \cdot 10^{-4}$ detektiert werden, obwohl diese Proben in der RQ-PCR MRD negativ waren.

Umgekehrt konnte bei einer Probe, die im NGS MRD-negativ war, mittels RQ-PCR noch ein NPM1 A-Mutationslevel von 0,02% nachgewiesen werden. Dieser Patient befindet sich bis dato (Stand 01/2020) in Remission. Leider konnte eine Wiederholung der Messung um eine eventuelle Kontamination während der RQ-PCR-Vorbereitung zu evaluieren aufgrund einer zu geringen Probenmenge nicht mehr erfolgen.

Bei der Sequenzierung von weiteren Verlaufsproben ausgewählter Patienten, welche in der RQ-PCR MRD-negativ und im NGS MRD-positiv waren, zeigte sich im Therapieverlauf bei den Patienten, die bis dato in Remission sind, eine Senkung der Mutationslast im NGS bis hin zu einer MRD-Negativität. Ein Patient dagegen wurde nie MRD-negativ im NGS und erlitt im Verlauf ein AML-Rezidiv.

Ob diese durch das NGS detektierbare MRD-Level bei Patienten ein Hinweis auf ein sich anbahnendes Rezidiv darstellt oder z.B. auch als gutartige Verlaufsvariante bei einigen Patienten in anhaltender Remission auftritt ist derzeit unklar.

Hubmann et al. ermittelten für NPM1 A positive Postinduktionsproben einen Cut-off von 0,01 in RQ-PCR, um die Rezidivwahrscheinlichkeit der Patienten vorauszusagen (Hubmann et al., 2014). Von den in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden jeweils zehn direkt nach Beendigung der Induktionstherapie oder der Konsolidierungstherapie entnommen. Konzentriert man sich nur auf die Patientenproben nach Induktionstherapie, zeigen Patienten, die im Verlauf rezidiert sind, eine NPM1 A Ratio (in Verhältnis zur Erstdiagnose) von $0,204\% \pm 0,121\%$ (Median \pm SD) und die Patienten, die kein Rezidiv erlitten haben eine Ratio von $0,001\% \pm 0,007\%$ (Median \pm SD). Es ist zu berücksichtigen, dass trotz signifikanten p-Werts ($p=0,043$) Aussagen aufgrund der sehr kleinen Fallzahl nur mit Vorsicht getroffen werden können, jedoch würden sich die Ergebnisse als Ansatz für weitere Experimente anbieten.

Eine wichtige Rolle bzgl. der Sensitivität und auch der Spezifität unserer Methode ist die Auswahl der geeigneten Barcodes für die Zuordnung der Sequenzierungsergebnisse. In den Testsequenzierungen konnten gezeigt werden, dass die Zuordnung der Barcodes (d.h. wie oft ein Barcode in einem Lauf für Kombinationen verwendet wird) eine entscheidende Rolle bezüglich der Sensitivität und Spezifität spielt. Es scheint, als ob eine spezifische Zuordnung der Barcodes zu den Samples sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität dieser Methode erhöht.

Des Weiteren hat auch die Auswahl der untersuchten Proben einen wichtigen Einfluss auf die Skalierung der Sensitivität und Spezifität. Insbesondere wenn Proben mit niedrigem MRD-Niveau bzw. negativem MRD-Status (z.B. Remissionsproben) mit

Proben mit hohem Mutationsniveau (z.B. Erstdiagnose-Proben) zusammen sequenziert wurden, stieg die Wahrscheinlichkeit der falschen Zuordnung *in silico* und somit falsch-positiven Ergebnissen (vgl. Abb. 15). Dieses Risiko konnte reduziert werden indem eine spezifische Barcodezuordnung und paired-end-Auswertung benutzt und nur Remissionsproben zusammen sequenziert wurden. Hierbei zeigte sich eine sehr gute Spezifität; die verwendeten Negativkontrollen waren stets negativ in Bezug auf die NPM1 Mutation A.

Um eine mögliche Kontamination durch das Sequenzierungsgerät selbst zwischen verschiedenen Läufen aufzudecken, sequenzierten wir im Wechsel NPM1 Mutation A positive und FLT3-ITD-positive Amplikons. In keinen der Läufe wurde die jeweils andere Mutation nachgewiesen, so dass unter Einhaltung der Waschvorgaben durch den Hersteller eine Kontamination zwischen verschiedenen Sequenzierungsläufen weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

Salipante et al. erreichten durch die Sequenzierung einer Verdünnungsreihe eine vergleichbare Sensitivität des NGS und schätzten das Limit der Sensitivität dieser Methode bei einer MRD-Last von 10^{-5} (Salipante et al., 2014). Außerdem sequenzierten sie 22 longitudinale Proben von sechs verschiedenen Patienten und erreichten eine durchschnittliche Lesetiefe von 443.100 pro Probe. Sie konnten dabei bei drei Patienten noch niedrige NPM1 A MRD-Levels detektieren, die in der Durchflusszytometrie MRD-negativ waren. Allerdings beschrieben sie in ihrem Fachartikel nicht, ob sie Negativkontrollen in ihren Versuchen verwendeten um mögliche *in silico* Falschzuordnungen und somit falsch-positive Ergebnisse aufzudecken.

Ein großer Vorteil des NGS gegenüber dem RQ-PCR-Assay ist die bereits erwähnte Skalierbarkeit der Sensitivität. Diese ist abhängig von der Lesetiefe der einzelnen Proben und somit auch von der Gesamtanzahl der Proben, die in einem Lauf sequenziert werden. In unserem Setting lag die zu erwartende Lesetiefe einer Probe bei insgesamt 96 Proben (Stufe 1, vgl. Abb. 21) und gleichmäßiger Verteilung bei ca. 150.000 und somit die maximal zu erreichende Sensitivität bei 10^{-5} .

Bei acht Proben pro Sequenzierungslauf (Stufe 2) wäre die zu erwartende Lesetiefe einer Probe bei gleichmäßiger Verteilung mindestens 1.000.000, womit eine Sensitivität von 10^{-6} theoretisch möglich wäre. In der Praxis wird diese Sensitivität meist aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Stichproben nicht erreicht.

Ein weiterer Vorteil des Next Generation Sequencing gegenüber RQ-PCR-Assays ist, dass keine mutations-spezifische Primer benötigt werden. Werden die NPM1-Primer beim NGS so gewählt, dass sie außerhalb der Mutations-Hotspots von den verschiedenen NPM1-Mutationstypen liegen, könnte man Patientenproben gleichzeitig auf verschiedene NPM1 Mutationstypen untersuchen – unabhängig von der veränderten Sequenz. Somit könnten auch seltene Mutationsformen detektiert werden, für die noch keine etablierten RQ-PCR-Assays zur Verfügung stehen.

Auch ist es denkbar, dass das NGS sich für das Monitoring von anderen AML-assoziierten Mutationen, wie z.B. FLT3-ITD, IDH1/2, etc., anwenden lässt. Auch hier wird die Etablierung mutations-spezifischer Primer und Sonden im Gegensatz zur RQ-PCR nicht benötigt. Jedoch muss mit einer geringeren Sensitivität bei Punktmutationen gerechnet werden, die durch Lesefehler bzw. fehlerhaften Einbau einzelner Basen während der PCR zustande kommen kann.

Eine mögliche prognostische Bedeutung des Next Generation Sequencing bei der Behandlung von AML-Patienten beschrieben Jongen-Lavrencic et al. 2018 (Jongen-Lavrencic et al., 2018). In ihrer Arbeit zeigten sie bei einer Lesetiefe von bis zu 10^{-4} , dass das Vorhandensein von molekularer MRD bei Nicht-DTA-Mutationen (z.B. Mutationen von IDH 1 und 2, STAG2, TP53) bei AML-Patienten nach Induktionstherapie signifikant mit einer höheren Rezidivrate und schlechterem Gesamtüberleben in einem vierjährigen Follow-Up-Zeitraum assoziiert ist.

Zusammengefasst stellt das NGS eine mögliche Methode zur MRD-Untersuchung bei NPM1 A positiven AML-Patienten dar. Aufgrund des Risikos einer falschen *in silico* Zuordnung bei mehrfacher Barcodeverwendung ist diese Methode für die gleichzeitige Untersuchung von vielen unterschiedlichen AML-Patientenproben auf NPM1 Mutation A ungeeignet. Die Untersuchung von wenigen Proben pro Sequenzierungslauf ist prinzipiell mit hoher Sensitivität und Spezifität mithilfe spezieller Barcodezuordnung möglich, allerdings derzeit noch vergleichsweise kostspielig. Es bietet sich jedoch an Remissionsproben von bereits (z.B. mit RQ-PCR-Assays) auf NPM1 Mutation A untersuchten Patienten mittels NGS zu untersuchen, da diese Methode bei spezifischer Barcode-Zuordnung und entsprechender Lesetiefe eine höhere Sensitivität als die gängigen RQ-PCR-Assays aufweisen kann.

6 Zusammenfassung

Leukämie-spezifische Mutationen werden als Biomarker zur Überwachung der minimalen Resterkrankung verwendet. Stand der Technik sind mutationsspezifische Echtzeit-quantitative PCR-Messungen (RQ-PCR), welche jedoch durch die Vielfalt der mutierten Nukleotidsequenzen und die Notwendigkeit von Standardisierungen limitiert sind. In dieser Arbeit wurde mit einer Hochdurchsatz-Amplikonsequenzierung als eine Form des Next Generation Sequencing (NGS) gearbeitet. Hierdurch können Mutationen unabhängig von ihrer veränderten Nukleotidsequenz quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde sich auf die NPM1 Mutation Typ A konzentriert, die mit 75-80% die häufigste Unterform der NPM1 Mutationen bei Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) darstellt. Für die Amplifikation der cDNA wurden spezielle Primer verwendet, die mit verschiedenen 10-Basen-Barcodes versehen waren, um die Sequenzierungsergebnisse den Ausgangsproben zuordnen zu können.

Zunächst durchgeführte Barcode-Tests zeigten, dass die Kombination der Barcodes untereinander und eine paired-end Auswertung einen wichtigen Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität dieser Methode hat.

Die Sequenzierung einer Amplikon-Verdünnungsreihe (NPM1 A-mutierte Zelllinie in NPM1 A-Wildtyp Zelllinie verdünnt) zeigte detektierbare Mutationen bis zur 1:100.000-Verdünnung, was auf eine hohe Sensitivität der Methode hinweist.

Bei der Sequenzierung von 88 Patientenproben von 22 verschiedenen AML-Patienten, die bei Diagnosestellung NPM1 Mutation A positiv waren, verwendeten wir ein Zwei-Stufen-System. Die NGS Ergebnisse korrelierten mit den entsprechenden RQ-PCR-Werten der jeweiligen Proben; der Pearson-Korrelationskoeffizient betrug 0,85 bei einem p-Wert von <0,001.

Bei 16 Patientenproben waren wir mittels NGS in der Lage niedrige NPM1 A-Mutationslevel während bzw. nach Therapie zu detektieren, während diese Proben in der RQ-PCR MRD-negativ waren. Zwei dieser Patienten erlitten im Verlauf ein AML-Rezidiv ohne eine MRD-Negativität im NGS erreicht zu haben. Umgekehrt zeigte eine Probe eine niedrige Mutationsrate in der RQ-PCR, wohingegen diese Probe im NGS MRD-negativ war. Dieser Patient befindet sich bis dato (Stand 01/2020) in Remission. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Hochdurchsatz-Amplikonsequenzierung eine mögliche Methode zur MRD-Bestimmung und Überwachung darstellt. Durch ihre skalierbare Sensitivität und ihre potenzielle Anwendbarkeit auf alle AML-spezifische Mutationen, deren Sequenz bekannt und

amplifizierbar ist, kann sie einen Vorteil zu den gängigen Methoden in der MRD-Diagnostik darstellen.

7 Anhang

Probennr.	Verdünnung	Ratio der NPM1 Mutation A		
		RQ-PCR I	RQ-PCR II	RQ-PCR III
1	1:10	6,10	3,53	6,79
2	1:100	0,49	0,33	0,62
3	1:1.000	5,62E-02	2,90E-02	5,63E-02
4	1:10.000	4,82E-03	3,06E-03	5,29E-03
5	1:100.000	1,88E-03	5,61E-04	1,43E-03
6	1:1.000.000	5,31E-04	0,00	0,00
7	HL60	0,00	0,00	0,00

Tab. A 1: Übersicht der qPCR-Ergebnisse der Verdünnungsreihe

Verdünnung	Mittelwert	SD	relative SD
1:10	5,47	1,40E+00	25,64%
1:100	0,48	1,21E-01	25,27%
1:1.000	0,05	1,28E-02	27,23%
1:10.000	0,00	9,60E-04	21,86%
1:100.000	0,00	5,47E-04	42,43%

Tab. A 2: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verdünnungsreihe (qPCR)

Probennr.	Verdünnung	Ratio der NPM1 Mutation A		
		MiSeq I	MiSeq II	MiSeq III
1	1:10	0,03	0,03	0,03
2	1:100	2,45E-03	2,44E-03	2,48E-03
3	1:1.000	2,39E-04	2,44E-04	2,08E-04
4	1:10.000	1,27E-05	9,91E-06	2,92E-05
5	1:100.000	7,63E-06	3,98E-06	1,19E-05
6	1:1.000.000	0,00	0,00	0,00
7	HL60	0,00	0,00	0,00

Tab. A 3: Übersicht der NGS-Ergebnisse der Verdünnungsreihe

Verdünnung	Mittelwert	SD	relative SD
1:10	2,83E-02	0,00015383	0,54%
1:100	2,46E-03	1,7395E-05	0,71%
1:1.000	2,30E-04	1,5878E-05	6,89%
1:10.000	1,73E-05	8,5038E-06	49,22%
1:100.000	7,82E-06	3,2156E-06	41,12%

Tab. A 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verdünnungsreihe (NGS)

Patient	Tag nach ED	Probeentnahmezeitpunkt
1	0	Erstdiagnose
	29	Während Induktionstherapie
	106	Nach Konsolidierungstherapie
	293	V.a. Rezidiv
2	0	Erstdiagnose
	172	Nach Konsolidierungstherapie
	374	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
	587	V.a. Rezidiv
3	0	Erstdiagnose
	103	Nach Induktionstherapie
	166	Nach Konsolidierungstherapie
	587	V.a. Rezidiv
4	0	Erstdiagnose
	42	Nach Induktionstherapie
	89	Nach Konsolidierungstherapie
	236	V.a. Rezidiv
5	0	Erstdiagnose
	186	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
	304	Verlauf während Erhaltungstherapie
	558	V.a. Rezidiv
6	0	Erstdiagnose
	43	Während Induktionstherapie
	91	Nach Induktionstherapie
	177	Nach Konsolidierungstherapie
7	0	Erstdiagnose
	90	Nach Induktionstherapie
	191	Nach Konsolidierungstherapie
	569	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
8	0	Erstdiagnose
	52	Nach Induktionstherapie
	124	Nach Konsolidierungstherapie
	187	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
9	0	Erstdiagnose
	25	Während Induktionstherapie
	130	Nach Konsolidierungstherapie
	181	Nach allogener KMT
10	0	Erstdiagnose
	93	Nach Induktionstherapie
	175	Nach Konsolidierungstherapie
	300	Verlauf während Erhaltungstherapie
11	0	Erstdiagnose
	120	Nach Induktionstherapie
	198	Nach Konsolidierungstherapie
	427	Verlauf während Erhaltungstherapie

12	0	Erstdiagnose
	18	Während Induktionstherapie
	180	Nach Konsolidierungstherapie
	659	Verlauf während Erhaltungstherapie
13	0	Erstdiagnose
	23	Während Induktionstherapie
	191	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
	1367	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
14	0	Erstdiagnose
	51	Nach Induktionstherapie
	84	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
	122	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
15	0	Erstdiagnose
	69	Nach Induktionstherapie
	125	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
	317	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
16	0	Erstdiagnose
	20	Während Induktionstherapie
	152	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
	290	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
17	0	Erstdiagnose
	22	Während Induktionstherapie
	187	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
	567	Verlauf während Erhaltungstherapie
18	0	Erstdiagnose
	14	Vor Induktionstherapie
	68	Nach Induktionstherapie
	214	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
19	0	Erstdiagnose
	31	Nach Induktionstherapie
	152	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
	534	Verlauf während Erhaltungstherapie
20	0	Erstdiagnose
	24	Während Induktionstherapie
	45	Nach allogener PBSZT
	252	Verlaufskontrolle
21	0	Erstdiagnose
	74	Nach Induktionstherapie
	167	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
	278	Nach allogener PBSZT
22	0	Erstdiagnose
	82	Verlauf nach Induktionstherapie
	138	Verlauf nach Konsolidierungstherapie
	189	Nach allogener PBSZT

Tab. A 5: Übersicht über die Entnahmezeitpunkte der verwendeten Patientenproben

Patient	Days after initial diagnosis	RQ-PCR ratio ¹	NGS ratio ² (Barcoding 1)	NGS ratio (Barcoding 2)
1	0	161	0,50	
	29	0,18	1,95E-03	
	106	0		0,00
	293	38,54	0,47	
2	0	70,93	0,47	
	172	0		1,44E-05
	374	0		2,61E-05
	587	37,33	0,18	
3	0	46,88	0,41	
	103	0		7,64E-06
	166	0		0,00
	587	219	0,49	
4	0	47,28	0,42	
	42	0,5	1,21E-03	
	89	0		0,00
	236	151	0,49	
5	0	72,44	0,47	
	186	0		4,63E-04
	304	0		0,00
	558	1,48	3,29E-03	
6	0	67,23	0,33	
	43	16,79	0,24	
	91	0		7,01E-04
	177	0		0,00
7	0	122	0,38	
	90	0,003		1,63E-05
	191	0,02		0,00
	569	0		0,00
8	0	198	0,49	
	52	0		0,00
	124	0		2,29E-04
	187	0		1,69E-04
9	0	24,52	0,22	
	25	0,5	4,49E-03	
	130	0		5,15E-06
	181	0		8,49E-07
10	0	51,81	0,48	
	93	0,002		3,80E-06
	175	0		0,00
	300	0		0,00
11	0	25,01	0,46	
	120	0,0002		9,49E-05
	198	0,0025		7,03E-06
	427	0		0,00
12	0	58,37	0,40	
	18	0,22	2,23E-03	
	180	0		0,00
	659	0		0,00

13	0	115	0,49	
	23	0,29	3,06E-03	
	191	0		0,00
	1367	0		5,10E-04
14	0	87,8	0,48	
	51	0,004		1,08E-06
	84	0		6,41E-07
	122	0		0,00
15	0	109	0,47	
	69	0,002		4,93E-06
	125	0		0,00
	317	0		0,00
16	0	71,65	0,44	
	20	9,06	0,04	
	152	0,07		2,70E-04
	290	0		6,85E-05
17	0	90,2	0,52	
	22	0,93	3,23E-03	
	187	0		8,38E-06
	567	0		0,00
18	0	79,46	0,46	
	14	21,02	0,14	
	68	0		0,00
	214	0		0,00
19	0	61,49	0,43	
	31	0,09		2,82E-04
	152	0		5,31E-05
	534	0		2,41E-06
20	0	20,43	0,48	
	24	1,59	8,79E-03	
	45	0		0,00
	252	0		0,00
21	0	144	0,50	
	74	0,52	1,73E-03	
	167	93,77	0,49	
	278	0		1,06E-05
22	0	54,63	0,31	
	82	5,76	0,03	
	138	97,15	0,43	
	189	0		0,00

Tab. A 6: Übersicht der gepoolten NGS- und RQ-PCR-Daten der 88 AML-Patientenproben

Patient	Rezidiv	RQ-PCR ratio (NPM1 A)	RQ-PCR ratio/ED ratio	NGS ratio (NPM1 A)	NGS ratio /ED ratio
3	1	0,0000	0,0000%	6,37E-06	0,0016%
4	1	0,5000	1,0575%	1,21E-03	0,2899%
6	1	0,0000	0,0000%	6,80E-04	0,2041%
7	0	0,0030	0,0025%	1,67E-05	0,0044%
8	0	0,0000	0,0000%	0,00E+00	0,0000%
10	0	0,0020	0,0039%	4,43E-06	0,0009%
11	0	0,0002	0,0008%	9,13E-05	0,0197%
14	0	0,0040	0,0046%	1,11E-06	0,0002%
15	0	0,0020	0,0018%	5,07E-06	0,0011%
18	0	0,0000	0,0000%	0,00E+00	0,0000%

Tab. A 7: Übersicht der RQ-PCR- und NGS-Daten der Proben nach Induktionstherapie

Patient	Rezidiv	RQ-PCR ratio (NPM1 A)	RQ-PCR ratio/ED ratio	NGS ratio (NPM1 A)	NGS ratio/ED ratio
1	1	0,0000	0,0000%	0,00E+00	0,0000%
2	1	0,0000	0,0000%	1,20E-05	0,0026%
3	1	0,0000	0,0000%	0,00E+00	0,0000%
4	1	0,0000	0,0000%	0,00E+00	0,0000%
6	1	0,0000	0,0000%	0,00E+00	0,0000%
7	0	0,0200	0,0164%	0,00E+00	0,0000%
8	0	0,0000	0,0000%	2,73E-04	0,0555%
10	0	0,0000	0,0000%	0,00E+00	0,0000%
11	0	0,0025	0,0100%	6,76E-06	0,0015%
12	0	0,0000	0,0000%	0,00E+00	0,0000%

Tab. A 8: Übersicht der RQ-PCR- und NGS-Daten der Proben nach Konsolidierungstherapie

8 Abkürzungsverzeichnis

ABL 1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
abnl	abnormalities
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Arf	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CR	komplette Remission, engl. complete remission
(c)DNA	(complementary) desoxyribonucleic acids
del	Deletion
DNMT3	DNA methyltransferase 3
DSMZ	Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ED/ID	Erstdiagnose, engl. initial diagnosis
ELN	European Leukemia Net
EFS	Ereignis-freies Überleben, engl. event-free survival
FAB	French-American-British
FLT3-ITD	Internal tandem duplication of the FMS-related tyrosine kinase 3 gene
FLT-TKD	tyrosine kinase domain mutations of the FMS-related tyrosine kinase 3 gene
fwd	forward
HAM	Hochdosiertes Cytarabin, Mitoxantron
IDH1/2	Isocitrate dehydrogenase 1/2
inv	Inversion
kDa	kilodalton
KMT, BMT	Knochenmarkstransplantation, engl. bone marrow transplantation
KNL	Kompetenznetz für Akute und chronische Leukämie
LAIP	leukemia associated immunophenotype
LfL	Labor für Leukämiediagnostik, Klinikum der Universität München
M	molar
Mdm2	murine double minute
MFC	Multiparameter-Durchflusszytometrie, engl. multiparameter flow cytometry
MLF1	Myeloid Leukemia Factor 1
KMT2A-PTD	partial tandem duplication of the lysine methyltransferase 2A
MRD	Minimale Resterkrankung, engl. minimal residual disease
NC	Negativkontrolle, engl. negative control
NES	Nukleäres Exportsignal
NGS	Next Generation Sequencing
NK	normaler Karyotyp
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NoLS	Nukleoläres Lokalisationssignal
NPM1	Nucleophosmin 1(-Gen)
NPM1 A	NPM1 Mutation Typ A
NPMc+	aberrante zytoplasmatische Lokalisation des Nucleophosmins
NRAS	Neuroblastoma RAS gene

OS	Gesamtüberleben, engl. overall survival
PBSZT/PBSCT	periphere Blutstammzelltransplantation, engl. peripheral blood stem cell transplantation
PC	Positivkontrolle, engl. positive control
P-TEFb	positive transcription elongation factor b
RARA	Retinoic Acid Receptor Alpha
rev	reverse
RFS	Rezidiv-freies Überleben, engl. relapse-free survival
(r)RNA	(ribosomal) ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RQ-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR, engl. real-time quantitative PCR
t	Translokation
TAD	Thioguanin, Standarddosis Cytarabin, Daunorubicin
WHO	World Health Organization

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Driver-Mutationen bei AML-Patienten (Papaemmanuil et al., 2016)	3
Abb. 2: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des Nucleophosmins (Federici and Falini, 2013)	6
Abb. 3: Sequenzen einer Auswahl an NPM1-Mutationen nach (Falini et al., 2005)..	10
Abb. 4: NPM1-Mutationen und Gesamtüberleben bei Patienten > 60 Jahren mit intermediärem Risiko (Metzeler et al., 2016)	12
Abb. 5: Gesamtüberleben und NPM1- /DNMT3A-Status bei Patienten < 60 mit intermediärem Risiko (Metzeler et al., 2016)	13
Abb. 6: Schematische Darstellung der Primer	19
Abb. 7: NPM1-Sequenz mit einer Typ A Mutation.	19
Abb. 8: Beispiel für ein NPM1 Screening mittels Schmelzkurvenanalyse	29
Abb. 9: Beispiel für ein Elektropherogramm einer Patientenprobe vor der Verdünnung	31
Abb. 10: Cluster-generierung auf der Flow cell	34
Abb. 11: Sequencing by synthesis	34
Abb. 12: Referenzsequenzen für Wildtyp- und mutiertes Allel	35
Abb. 13: Workflow zur Auswertung der MiSeq-Daten	36
Abb. 14: Workflow zur Auswertung der MiSeq-Daten	37
Abb. 15: Übersicht der Sequenzierungsergebnisse mit 10b-Barcodes	40
Abb. 16: Übersicht der Sequenzierungsergebnisse mit 10b-Barcodes	41
Abb. 17: Graphische Darstellung der RQ-PCR-Ergebnisse der Verdünnungsreihe .	43
Abb. 18: Graphische Darstellung der NGS-Ergebnisse der Verdünnungsreihe	43
Abb. 19: Barcoding Methode 1	44
Abb. 20: Barcoding Methode 2	45
Abb. 21: Zweistufiges Vorgehen bei der Sequenzierung der Patientenproben	45
Abb. 22: Korrelation zwischen RQ-PCR- und NGS-Ergebnissen	46
Abb. 23: MRD-Status in NGS und RQ-PCR	47
Abb. 24 (a-d): NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse der Patienten ohne klinisches Rezidiv (Patienten 7, 8, 9, 10). BMT: Knochenmarkstransplantation.	48
Abb. 25 (a-f): NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse der Patienten ohne klinisches Rezidiv (Patienten 11, 12, 13, 14, 15, 16)	49
Abb. 26 (a-e): NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse der Patienten ohne klinisches Rezidiv (Patienten 17, 18, 19, 20, 22). PBSCT: Periphere Blutstammzelltransplantation.	50
Abb. 27 (a-d): NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse der Patienten mit klinischem Rezidiv (Patienten 1, 2, 3, 4)	51
Abb. 28 (a-c): NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse der Patienten mit klinischem Rezidiv (Patienten 5, 6, 21)	52
Abb. 29 (a-d): NGS- und RQ-PCR-Ergebnisse der Patienten 9, 13, 19 und 21 mit zusätzlichen Verlaufspuren	53
Abb. 30: Übersicht der RQ-PCR- und NGS-Daten nach Induktionstherapie	54

Abb. 31: Übersicht der RQ-PCR- und NGS-Ergebnisse nach Konsolidierungstherapie (die Nummerierung der Proben bezieht sich nur auf dieses Diagramm)	55
Tab. 1: FAB-Klassifikation der AML nach (Bennett et al., 1976)	1
Tab. 2: WHO-Klassifikation der AML nach (Arber et al., 2016)	2
Tab. 3: AML-Risikogruppen nach (Dohner et al., 2017)	4
Tab. 4: Verwendete NPM1 Primer- und Sondensequenzen für RQ-PCR	18
Tab. 5: Verwendete ABL1 Primer- und Sondensequenzen für RQ-PCR	18
Tab. 6: Verwendete Primer und Sondensequenzen für die NPM1-Schmelzkurvenanalyse	18
Tab. 7: Übersicht der verwendeten Patientenproben	21
Tab. 8: PCR-Programm „Touchdown 58“	26
Tab. 9: PCR-Ansatz zur NPM1 Amplikongenerierung	26
Tab. 10: RQ-PCR-Ansatz zur NPM1-Quantifizierung	28
Tab. 11: RQ-PCR-Programm zur relativen Quantifizierung der NPM1 Mutation A... ..	28
Tab. 12: Übersicht der verwendeten Barcodesequenzen (b: bases, fwd: forward, rev: reverse)	39
Tab. 13: MRD-Status in NGS und RQ-PCR	47
Tab. A 1: Übersicht der qPCR-Ergebnisse der Verdünnungsreihen	62
Tab. A 2: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verdünnungsreihe (qPCR) ..	62
Tab. A 3: Übersicht der NGS-Ergebnisse der Verdünnungsreihe	62
Tab. A 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verdünnungsreihen (NGS) ...	62
Tab. A 5: Übersicht über die Entnahmezeitpunkte der verwendeten Patientenproben	64
Tab. A 6: Übersicht der gepoolten NGS- und RQ-PCR-Daten der 88 AML-Patientenproben	66
Tab. A 7: Übersicht der RQ-PCR- und NGS-Daten der Proben nach Induktionstherapie	67
Tab. A 8: Übersicht der RQ-PCR- und NGS-Daten der Proben nach Konsolidierungstherapie	67

10 Literaturverzeichnis

- ALBIERO, E., MADEO, D., BOLLI, N., GIARETTA, I., BONA, E. D., MARTELLI, M. F., NICOLETTI, I., RODEGHIERO, F. & FALINI, B. 2007. Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 NPM1 mutation. *Leukemia*, 21, 1099-103.
- AMMATUNA, E., NOGUERA, N. I., 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 leukemia by denaturing HPLC. *Clin Chem*, 51, 2165-7.
- ARBER, D. A., ORAZI, A., HASSERJIAN, R., THIELE, J., BOROWITZ, M. J., LE BEAU, M. M., BLOOMFIELD, C. D., CAZZOLA, M. & VARDIMAN, J. W. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127, 2391-405.
- BABUSIKOVA, O., GLASOVA, M., KUSENDA, J., KONIKOVA, E. & MESAROSOVA, A. 1994. Flow cytometric determination of leukemia-associated marker combinations for the study of minimal residual disease. *Neoplasma*, 41, 305-13.
- BENNETT, J. M., CATOVSKY, D., DANIEL, M. T., FLANDRIN, G., GALTON, D. A., GRALNICK, H. R. & SULTAN, C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 33, 451-8.
- BOECKX, N., WILLEMSE, M. J., SZCZEPANSKI, T., VAN DER VELDEN, V. H., LANGERAK, A. W., VANDEKERCKHOVE, P. & VAN DONGEN, J. J. 2002. Fusion gene transcripts and Ig/TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR-based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 16, 368-75.
- BOISSEL, N., RENNEVILLE, A., BIGGIO, V., PHILIPPE, N., THOMAS, X., CAYUELA, J. M., 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.
- BORER, R. A., LEHNER, C. F., EPPENBERGER, H. M. & NIGG, E. A. 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, 56, 379-90.
- BROWN, P., MCINTYRE, E., RAU, R., MESHINCHI, S., LACAYO, N., DAHL, G., ALONZO, T. A., CHANG, M., ARCECI, R. J. & SMALL, D. 2007. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood*, 110, 979-85.
- CAMPANA, D. & COUSTAN-SMITH, E. 1999. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry*, 38, 139-52.
- CAVE, H., VAN DER WERFF TEN BOSCH, J., SUCIU, S., GUIDAL, C., WATERKEYN, C., OTTEN, J., BAKKUS, M., THIELEMANS, K., GRANDCHAMP, B. & VILMER, E. 1998. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*, 339, 591-8.
- CHANG, J. H. & OLSON, M. O. 1990. Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *J Biol Chem*, 265, 18227-33.
- 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 Res*, 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.
- CLOOS, J., GOEMANS, B. F., HESS, C. J., VAN OOSTVEEN, J. W., WAISFISZ, Q., CORTHALS, S., DE LANGE, D., BOECKX, N., HAHLEN, K., REINHARDT, D., CREUTZIG, U., SCHUURHUIS, G. J., ZWAAN CH, M. & KASPERS, G. J. 2006. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia*, 20, 1217-20.
- COLOMBO, E., BONETTI, P., LAZZERINI DENCHI, E., MARTINELLI, P., ZAMPONI, R., MARINE, J. C., HELIN, K., FALINI, B. & PELICCI, P. G. 2005. Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Mol Cell Biol*, 25, 8874-86.
- DALENC, F., DROUET, J., ADER, I., DELMAS, C., ROCHAIX, P., FAVRE, G., COHEN-JONATHAN, E. & TOULAS, C. 2002. Increased expression of a COOH-truncated nucleophosmin resulting from alternative splicing is associated with cellular resistance to ionizing radiation in HeLa cells. *Int J Cancer*, 100, 662-8.
- DOHNER, H., ESTEY, E., GRIMWADE, D., AMADORI, S., APPELBAUM, F. R., BUCHNER, T., DOMBRET, H., EBERT, B. L., FENAUX, P., LARSON, R. A., LEVINE, R. L., LO-COCO, F., NAOE, T., NIEDERWIESER, D., OSSENKOPPELE, G. J., SANZ, M., SIERRA, J., TALLMAN, M. S., TIEN, H. F., WEI, A. H., LOWENBERG, B. & BLOOMFIELD, C. D. 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129, 424-447.
- DOHNER, K., SCHLENK, R. F., HABDANK, M., SCHOLL, C., RUCKER, F. G., CORBACIOGLU, A., BULLINGER, L., FROHLING, S. & DOHNER, H. 2005. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*, 106, 3740-6.
- DRACH, J., DRACH, D., GLASSL, H., GATTRINGER, C. & HUBER, H. 1992. Flow cytometric determination of atypical antigen expression in acute leukemia for the study of minimal residual disease. *Cytometry*, 13, 893-901.
- DUMBAR, T. S., GENTRY, G. A. & OLSON, M. O. 1989. Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry*, 28, 9495-501.
- FALINI, B., BOLLI, N., SHAN, J., MARTELLI, M. P., 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. F., GU, W., MECUCCI, C. & NICOLETTI, I. 2006a. 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., MARTELLI, M. P., BOLLI, N., BONASSO, R., GHIA, E., PALLOTTA, M. T., DIVERIO, D., NICOLETTI, I., PACINI, R., TABARRINI, A., GALLETI, B. V., MANNUCCI, R., ROTI, G., ROSATI, R., SPECCHIA, G., LISO, A., TIACCI, E., ALCALAY, M., LUZI, L., VOLORIO, S., BERNARD, L., GUARINI, A., AMADORI, S., MANDELLI, F., PANE, F., LO-COCO, F., SAGLIO, G., PELICCI, P. G., MARTELLI, M. F. & MECUCCI, C. 2006b. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 108, 1999-2005.

- FALINI, B., MECUCCI, C., TIACCI, E., ALCALAY, M., ROSATI, R., PASQUALUCCI, L., LA STARZA, R., DIVERIO, D., COLOMBO, E., SANTUCCI, A., BIGERNA, B., PACINI, R., PUCCIARINI, A., LISO, A., VIGNETTI, M., FAZI, P., MEANI, N., PETTIROSSI, V., SAGLIO, G., MANDELLI, F., LO-COCO, F., PELICCI, P. G., MARTELLI, M. F. & PARTY, G. A. L. W. 2005. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, 352, 254-66.
- FEDERICI, L. & FALINI, B. 2013. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: a tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Sci*, 22, 545-56.
- FREHLICK, L. J., EIRIN-LOPEZ, J. M. & AUSIO, J. 2007. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Bioessays*, 29, 49-59.
- GALE, R. E., GREEN, C., ALLEN, C., MEAD, A. J., BURNETT, A. K., HILLS, R. K., LINCH, D. C. & MEDICAL RESEARCH COUNCIL ADULT LEUKAEMIA WORKING, P. 2008. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 111, 2776-84.
- GALLAGHER, R., COLLINS, S., TRUJILLO, J., MCCREDIE, K., AHEARN, M., TSAI, S., METZGAR, R., AULAKH, G., TING, R., RUSCETTI, F. & GALLO, R. 1979. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54, 713-33.
- GALLAGHER, S. J., KEFFORD, R. F. & RIZOS, H. 2006. The ARF tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 1637-41.
- GOECKS, J., NEKRUTENKO, A., TAYLOR, J. & GALAXY, T. 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol*, 11, R86.
- GRIMWADE, D. & FREEMAN, S. D. 2014. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Blood*, 124, 3345-55.
- GRISENDI, S., BERNARDI, R., ROSSI, M., CHENG, K., KHANDKER, L., MANOVA, K. & PANDOLFI, P. P. 2005. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature*, 437, 147-53.
- GURUMURTHY, M., TAN, C. H., NG, R., ZEIGER, L., LAU, J., LEE, J., DEY, A., PHILP, R., LI, Q., LIM, T. M., PRICE, D. H., LANE, D. P. & CHAO, S. H. 2008. Nucleophosmin interacts with HEXIM1 and regulates RNA polymerase II transcription. *J Mol Biol*, 378, 302-17.
- HERRERA, J. E., SAVKUR, R. & OLSON, M. O. 1995. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res*, 23, 3974-9.
- HINGORANI, K., SZE BENI, A. & OLSON, M. O. 2000. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem*, 275, 24451-7.
- HOVLAND, R., GJERTSEN, B. T. & BRUSERUD, O. 2002. Acute myelogenous leukemia with internal tandem duplication of the Flt3 gene appearing or altering at the time of relapse: a report of two cases. *Leuk Lymphoma*, 43, 2027-9.
- HUBMANN, M., KOHNKE, T., HOSTER, E., SCHNEIDER, S., DUFOUR, A., ZELLMEIER, E., FIEGL, M., BRAESS, J., BOHLANDER, S. K., SUBKLEWE, M., SAUERLAND, M. C., BERDEL, W. E., BUCHNER, T., WORMANN, B., HIDDEMANN, W. & SPIEKERMANN, K. 2014. Molecular response assessment by quantitative real-time polymerase chain reaction

- after induction therapy in NPM1-mutated patients identifies those at high risk of relapse. *Haematologica*, 99, 1317-25.
- HURET, J.L. 1997. NPM1 (nucleophosmin). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology - 1997 (No. 2).
- INOUE, K., SUGIYAMA, H., OGAWA, H., NAKAGAWA, M., YAMAGAMI, T., MIWA, H., KITA, K., HIRAOKA, A., MASAOKA, T., NASU, K. & ET AL. 1994. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*, 84, 3071-9.
- ITAHANA, K., BHAT, K. P., JIN, A., ITAHANA, Y., HAWKE, D., KOBAYASHI, R. & ZHANG, Y. 2003. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell*, 12, 1151-64.
- IVEY, A., HILLS, R. K., SIMPSON, M. A., JOVANOVIC, J. V., GILKES, A., GRECH, A., PATEL, Y., BHUDIA, N., FARAH, H., MASON, J., WALL, K., AKIKI, S., GRIFFITHS, M., SOLOMON, E., MCCAUGHAN, F., LINCH, D. C., GALE, R. E., VYAS, P., FREEMAN, S. D., RUSSELL, N., BURNETT, A. K., GRIMWADE, D. & GROUP, U. K. N. C. R. I. A. W. 2016. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med*, 374, 422-33.
- JEONG, E. G., LEE, S. H., YOO, N. J. & LEE, S. H. 2007. Absence of nucleophosmin 1 (NPM1) gene mutations in common solid cancers. *APMIS*, 115, 341-6.
- JONGEN-LAVRENCIC, M., GROB, T., HANEKAMP, D., KAVELAARS, F. G., AL HINAI, A., ZEILEMAKER, A., ERPELINCK-VERSCHUEREN, C. A. J., GRADOWSKA, P. L., MEIJER, R., CLOOS, J., BIEMOND, B. J., GRAUX, C., VAN MARWIJK KOOY, M., MANZ, M. G., PABST, T., PASSWEG, J. R., HAVELANGE, V., OSSENKOPPELE, G. J., SANDERS, M. A., SCHUURHUIS, G. J., LOWENBERG, B. & VALK, P. J. M. 2018. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 378, 1189-1199.
- JULIUSSON, G., ANTUNOVIC, P., DEROLF, A., LEHMANN, S., MOLLGARD, L., STOCKELBERG, D., TIDEFELT, U., WAHLIN, A. & HOGLUND, M. 2009. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*, 113, 4179-87.
- KERN, W., VOSKOVA, D., SCHOCH, C., HIDDEMANN, W., SCHNITTGER, S. & HAFERLACH, T. 2004. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 104, 3078-85.
- KORGAONKAR, C., HAGEN, J., TOMPKINS, V., FRAZIER, A. A., ALLAMARGOT, C., QUELLE, F. W. & QUELLE, D. E. 2005. Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol*, 25, 1258-71.
- KRONKE, J., SCHLENK, R. F., JENSEN, K. O., TSCHURTZ, F., CORBACIOGLU, A., GAIDZIK, V. I., PASCHKA, P., ONKEN, S., EIWEN, K., HABDANK, M., SPATH, D., LUBBERT, M., WATTAD, M., KINDLER, T., SALIH, H. R., HELD, G., NACHBAUR, D., VON LILIENFELD-TOAL, M., GERMING, U., HAASE, D., MERGENTHALER, H. G., KRAUTER, J., GANSER, A., GOHRING, G., SCHLEGELBERGER, B., DOHNER, H. & DOHNER, K. 2011. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol*, 29, 2709-16.

- KURKI, S., PELTONEN, K., LATONEN, L., KIVIHARJU, T. M., OJALA, P. M., MEEK, D. & LAIHO, M. 2004. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell*, 5, 465-75.
- LEOTOING, L., MEUNIER, L., MANIN, M., MAUDUIT, C., DECAUSSIN, M., VERRIJDT, G., CLAESSENS, F., BENAHMED, M., VEYSSIERE, G., MOREL, L. & BEAUDOIN, C. 2008. Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell. *Oncogene*, 27, 2858-67.
- LI, J., SEJAS, D. P., RANI, R., KORETSKY, T., BAGBY, G. C. & PANG, Q. 2006. Nucleophosmin regulates cell cycle progression and stress response in hematopoietic stem/progenitor cells. *J Biol Chem*, 281, 16536-45.
- MARCUCCI, G., STROUT, M. P., BLOOMFIELD, C. D. & CALIGIURI, M. A. 1998. Detection of unique ALL1 (MLL) fusion transcripts in normal human bone marrow and blood: distinct origin of normal versus leukemic ALL1 fusion transcripts. *Cancer Res*, 58, 790-3.
- MARIANO, A. R., COLOMBO, E., LUZI, L., MARTINELLI, P., VOLORIO, S., BERNARD, L., MEANI, N., BERGOMAS, R., ALCALAY, M. & PELICCI, P. G. 2006. Cytoplasmic localization of NPM in myeloid leukemias is dictated by gain-of-function mutations that create a functional nuclear export signal. *Oncogene*, 25, 4376-80.
- METZELER, K. H., HEROLD, T., ROTHENBERG-THURLEY, M., AMLER, S., SAUERLAND, M. C., GORLICH, D., SCHNEIDER, S., KONSTANDIN, N. P., DUFOUR, A., BRAUNDL, K., KSIENZYK, B., ZELLMEIER, E., HARTMANN, L., GREIF, P. A., FIEGL, M., SUBKLEWE, M., BOHLANDER, S. K., KRUG, U., FALDUM, A., BERDEL, W. E., WORMANN, B., BUCHNER, T., HIDDEMANN, W., BRAESS, J., SPIEKERMANN, K. & GROUP, A. S. 2016. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 128, 686-98.
- MORRIS, S. W., KIRSTEIN, M. N., VALENTINE, M. B., DITTMER, K. G., SHAPIRO, D. N., SALTMAN, D. L. & LOOK, A. T. 1994. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, 263, 1281-4.
- MURANO, K., OKUWAKI, M., HISAOKA, M. & NAGATA, K. 2008. Transcription regulation of the rRNA gene by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity. *Mol Cell Biol*, 28, 3114-26.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI): „NPM1 nucleophosmin 1 [Homo sapiens (human)] “, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4869>, Abruf: 28.07.2018
- NISHIMURA, Y., OHKUBO, T., FURUICHI, Y. & UMEKAWA, H. 2002. Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66, 2239-42.
- NOGUERA, N. I., AMMATUNA, E., ZANGRILLI, D., LAVORGNA, S., DIVONA, M., BUCCISANO, F., AMADORI, S., MECUCCI, C., FALINI, B. & LO-COCO, F. 2005. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 19, 1479-82.
- OKUDA, M., HORN, H. F., TARAPORE, P., TOKUYAMA, Y., SMULIAN, A. G., CHAN, P. K., KNUDSEN, E. S., HOFMANN, I. A., SNYDER, J. D., BOVE, K. E. & FUKASAWA, K. 2000. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*, 103, 127-40.
- OKUWAKI, M., MATSUMOTO, K., TSUJIMOTO, M. & NAGATA, K. 2001. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett*, 506, 272-6.

- PAIETTA, E. 2002. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept? *Bone Marrow Transplant*, 29, 459-65.
- PAPADAKI, C., DUFOUR, A., SEIBL, M., SCHNEIDER, S., BOHLANDER, S. K., ZELLMEIER, E., MELLERT, G., HIDDEMANN, W. & SPIEKERMANN, K. 2009. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. *Br J Haematol*, 144, 517-23.
- PAPAEMMANUIL, E., GERSTUNG, M., BULLINGER, L., GAIDZIK, V. I., PASCHKA, P., ROBERTS, N. D., POTTER, N. E., HEUSER, M., THOL, F., BOLLI, N., GUNDEM, G., VAN LOO, P., MARTINCORENA, I., GANLY, P., MUDIE, L., MCLAREN, S., O'MEARA, S., RAINE, K., JONES, D. R., TEAGUE, J. W., BUTLER, A. P., GREAVES, M. F., GANSER, A., DOHNER, K., SCHLENK, R. F., DOHNER, H. & CAMPBELL, P. J. 2016. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 374, 2209-2221.
- PIANTA, A., PUPPIN, C., FRANZONI, A., FABBRO, D., DI LORETO, C., BULOTTA, S., DEGANUTO, M., PARON, I., TELL, G., PUXEDDU, E., FILETTI, S., RUSSO, D. & DAMANTE, G. 2010. Nucleophosmin is overexpressed in thyroid tumors. *Biochem Biophys Res Commun*, 397, 499-504.
- QUENTMEIER, H., MARTELLI, M. P., DIRKS, W. G., BOLLI, N., LISO, A., MACLEOD, R. A., 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.
- REDNER, R. L., RUSH, E. A., FAAS, S., RUDERT, W. A. & COREY, S. J. 1996. The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood*, 87, 882-6.
- ROELLIG et al., Onkopedia Leitlinie für akute myeloische Leukämie, <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@/view/html/index.html>, Abruf: 31.03.2019
- SALIPANTE, S. J., FROMM, J. R., SHENDURE, J., WOOD, B. L. & WU, D. 2014. Detection of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia by next-generation sequencing. *Mod Pathol*, 27, 1438-46.
- SCHLENK, R. F., DOHNER, K., KRAUTER, J., FROHLING, S., CORBACIOGLU, A., BULLINGER, L., HABDANK, M., SPATH, D., MORGAN, M., BENNER, A., SCHLEGELBERGER, B., HEIL, G., GANSER, A., DOHNER, H. & GERMAN-AUSTRIAN ACUTE MYELOID LEUKEMIA STUDY, G. 2008. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 358, 1909-18.
- SCHNITTGER, S., KERN, W., TSCHULIK, C., WEISS, T., DICKER, F., FALINI, B., HAFERLACH, C. & HAFERLACH, T. 2009. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*, 114, 2220-31.
- SCHNITTGER, S., SCHOCH, C., DUGAS, M., KERN, W., STAIB, P., WUCHTER, C., LOFFLER, H., SAUERLAND, C. M., SERVE, H., BUCHNER, T., HAFERLACH, T. & HIDDEMANN, W. 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., SCHOCH, C., KERN, W., MECUCCI, C., TSCHULIK, C., MARTELLI, M. F., HAFERLACH, T., HIDDEMANN, W. & FALINI, B. 2005. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, 106, 3733-9.
- SCHNITTGER, S., WORMANN, B., HIDDEMANN, W. & GRIESINGER, F. 1998. Partial tandem duplications of the MLL gene are detectable in peripheral blood and bone marrow of nearly all healthy donors. *Blood*, 92, 1728-34.
- SHIH, L. Y., HUANG, C. F., WU, J. H., LIN, T. L., DUNN, P., WANG, P. N., KUO, M. C., LAI, C. L. & HSU, H. C. 2002. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood*, 100, 2387-92.
- STEUDEL, C., WERMKE, M., SCHAICH, M., SCHAKEL, U., ILLMER, T., EHNINGER, G. & THIEDE, C. 2003. Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 37, 237-51.
- SUZUKI, T., KIYOI, H., OZEKI, K., TOMITA, A., YAMAJI, S., SUZUKI, R., KODERA, Y., MIYAWAKI, S., ASOU, N., KURIYAMA, K., YAGASAKI, F., SHIMAZAKI, C., AKIYAMA, H., NISHIMURA, M., MOTOJI, T., SHINAGAWA, K., TAKESHITA, A., UEDA, R., KINOSHITA, T., EMI, N. & NAOE, T. 2005. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 106, 2854-61.
- SZEBENI, A. & OLSON, M. O. 1999. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci*, 8, 905-12.
- THIEDE, C., CREUTZIG, E., ILLMER, T., SCHAICH, M., HEISE, V., EHNINGER, G. & LANDT, O. 2006a. Rapid and sensitive typing of NPM1 mutations using LNA-mediated PCR clamping. *Leukemia*, 20, 1897-9.
- THIEDE, C., KOCH, S., CREUTZIG, E., STEUDEL, C., ILLMER, T., SCHAICH, M. & EHNINGER, G. 2006b. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 107, 4011-20.
- THIEDE, C., STEUDEL, C., MOHR, B., SCHAICH, M., SCHAKEL, U., PLATZBECKER, U., WERMKE, M., BORNHAUSER, M., RITTER, M., NEUBAUER, A., EHNINGER, G. & ILLMER, T. 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.
- THOL, F., KOLKING, B., DAMM, F., REINHARDT, K., KLUSMANN, J. H., REINHARDT, D., VON NEUHOFF, N., BRUGMAN, M. H., SCHLEGELBERGER, B., SUERBAUM, S., KRAUTER, J., GANSER, A. & HEUSER, M. 2012. Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer*, 51, 689-95.
- VERHAAK, R. G., GOUDSWAARD, C. S., VAN PUTTEN, W., BIJL, M. A., SANDERS, M. A., HUGENS, W., UITTERLINDEN, A. G., ERPELINCK, C. A., DELWEL, R., LOWENBERG, B. & VALK, P. J. 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.
- VIDRIALES, M. B., PEREZ-LOPEZ, E., PEGENAUTE, C., CASTELLANOS, M., PEREZ, J. J., CHANDIA, M., DIAZ-MEDIAVILLA, J., RAYON, C., DE LAS HERAS, N.,

- FERNANDEZ-ABELLAN, P., CABEZUDO, M., DE COCA, A. G., ALONSO, J. M., OLIVIER, C., HERNANDEZ-RIVAS, J. M., MONTESINOS, P., FERNANDEZ, R., GARCIA-SUAREZ, J., GARCIA, M., SAYAS, M. J., PAIVA, B., GONZALEZ, M., ORFAO, A., SAN MIGUEL, J. F. & FOR, P. P. P. E. E. D. L. T. E. H. M. C. S. G. 2016. Minimal residual disease evaluation by flow cytometry is a complementary tool to cytogenetics for treatment decisions in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res*, 40, 1-9.
- WANG, D., BAUMANN, A., SZE BENI, A. & OLSON, M. O. 1994. The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end. *J Biol Chem*, 269, 30994-8.
- WANG, D., UMEKAWA, H. & OLSON, M. O. 1993. Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell Mol Biol Res*, 39, 33-42.
- WANG, W., BUDHU, A., FORGUES, M. & WANG, X. W. 2005. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol*, 7, 823-30.
- WEISSER, M., KERN, W., SCHOCH, C., HIDDEMANN, W., HAFERLACH, T. & SCHNITTGER, S. 2005. Risk assessment by monitoring expression levels of partial tandem duplications in the MLL gene in acute myeloid leukemia during therapy. *Haematologica*, 90, 881-9.
- WU, M. H., CHANG, J. H. & YUNG, B. Y. 2002. Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. *Carcinogenesis*, 23, 93-100.
- WU, M. H. & YUNG, B. Y. 2002. UV stimulation of nucleophosmin/B23 expression is an immediate-early gene response induced by damaged DNA. *J Biol Chem*, 277, 48234-40.
- YOKOTA, S., KIYOI, H., NAKAO, M., IWAI, T., MISAWA, S., OKUDA, T., SONODA, Y., ABE, T., KAHSIMA, K., MATSUO, Y. & NAOE, T. 1997. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*, 11, 1605-9.
- YONEDA-KATO, N., LOOK, A. T., KIRSTEIN, M. N., VALENTINE, M. B., RAIMONDI, S. C., COHEN, K. J., CARROLL, A. J. & MORRIS, S. W. 1996. The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene*, 12, 265-75.
- YU, Y., MAGGI, L. B., JR., BRADY, S. N., APICELLI, A. J., DAI, M. S., LU, H. & WEBER, J. D. 2006. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol Cell Biol*, 26, 3798-809.
- YUN, J. P., MIAO, J., CHEN, G. G., TIAN, Q. H., ZHANG, C. Q., XIANG, J., FU, J. & LAI, P. B. 2007. Increased expression of nucleophosmin/B23 in hepatocellular carcinoma and correlation with clinicopathological parameters. *Br J Cancer*, 96, 477-84.
- YUNG, B. Y. & CHAN, P. K. 1987. Identification and characterization of a hexameric form of nucleolar phosphoprotein B23. *Biochim Biophys Acta*, 925, 74-82.
- ZAJAC, M., DOLNIK, A., STASIAK, G., ZALESKA, J., KIELBUS, M., CZAPINSKI, J., SCHUNN, M., CORREA, S. C., GLODKOWSKA-MROWKA, E., SUNDARAM, R. C., JANKOWSKA-LECKA, O., SCHLENK, R. F., DOHNER, H., DOHNER, K., STEPULAK, A., BULLINGER, L. & GIANNOPOULOS, K. 2017. Analysis of NPM1 splice variants

reveals differential expression patterns of prognostic value in acute myeloid leukemia.
Oncotarget, 8, 95163-95175.

11 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt, dem Direktor, und Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann, dem ehemaligen Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, Klinikum der Universität München, für die Möglichkeit, meine Promotion an der Klinik realisieren zu können.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Karsten Spiekermann für die Bereitstellung des Themas und seine wertvolle Unterstützung und Anregungen bei der Verwirklichung dieser Dissertation bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorarbeitsbetreuer und AG-Leiter PD Dr. med. Philipp Greif für seine intensive Unterstützung und Anregungen in dem Prozess der Entstehung dieser Dissertation.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem Team des Labors für Leukämiediagnostik bedanken, ohne die die Laborarbeit nur halb so viel Freude gemacht hätte. Insbesondere Bianka Ksienzyk, Sabrina Opatz und Nikola Konstandin gilt mein Dank für ihre grenzenlose Geduld, Unterweisung in verschiedene molekularbiologische Methoden und fortwährende Unterstützung. Ein großer Dank gilt auch Stephanie Schneider für ihre Hilfe und Motivation im Labor.

Vielen Dank auch an das ELLF (Experimentelle Leukämie- und Lymphomforschung)-Team, insbesondere an Sebastian Vosberg für seine bioinformatische Unterstützung bei der Auswertung der Daten dieser Arbeit und an Katrin Reiter für ihre Unterstützung bei der Durchführung von Versuchen.

Ferner möchte ich mich bei Max Gille, Anja Zhang, Max Grüber, Caro Deimel und Bene Daschner für ihre moralische Unterstützung bei der Entstehung dieser Dissertation bedanken.

Schließlich möchte ich noch meinen Eltern Weihong Bu und Zhiguo Wang für ihre unermüdliche Unterstützung meinen allergrößten Dank aussprechen.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Gille, Christine

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**MRD-Monitoring bei AML-Patienten mittels Hochdurchsatz-Amplikonsequenzierung
(NPM1 Mutation A)**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 07.02.2021

Ort, Datum

Christine Gille

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand