

Universitätsklinikum Ulm - Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie und
Infektionskrankheiten
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

**Inzidenz und prognostische Bedeutung von Mutationen des
Nucleophosmin (NPM1) Gens bei der akuten myeloischen
Leukämie (AML) des älteren Patienten (>60 Jahre)**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Bernhard Peter Krebs
geb. in Landshut
2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Döhner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Kratzer
1. Wahlprüfer: Prof. Dr. J. Greiner
2. Wahlprüfer: PD Dr. G. von Boyen
Tag der Promotion: 20.04.2012

Für Sylvia, Sebastian und Emilia

	<u>Seite</u>
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Akute myeloische Leukämie (AML).....	1
1.2. Epidemiologie.....	3
1.3. Struktur und Funktion von <i>Nucleophosmin (NPM1)</i>	5
1.4. <i>Nucleophosmin (NPM1)</i> und AML.....	9
1.5. Prognostische Faktoren.....	11
1.6. Rekurrente Genmutationen bei der AML.....	14
1.7. All-trans Retinolsäure (ATRA).....	20
1.8. Zielsetzung.....	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Reagenzien- und Geräteverzeichnis.....	24
2.2. Patientenpopulation und -therapie.....	26
2.3. Materialgewinnung.....	30
2.4. Methodenübersicht.....	30
2.5. DNA-Extraktion.....	31
2.6. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	32
2.7. Gelelektrophorese.....	35
2.8. Aufreinigung der PCR-Produkte.....	37
2.9. Cycle Sequencing Reaction (CSR).....	38
2.10. DNA-Aufreinigung.....	40
2.11. Sequenzierung.....	41
2.12. Statistische Analysen.....	42

3. Ergebnisteil	43
3.1. Kurzer Überblick der Studien AML HD98-B und AMLSG 06-04.....	43
3.2. Inzidenz von Mutationen des <i>NPM1</i> Gens im Exon 12.....	44
3.3. Mutationstypen.....	46
3.4. Mutationen von <i>NPM1</i> in der zytogenetischen Subgruppe „AML mit normalem Karyotyp“.....	48
3.5. <i>NPM1</i> und <i>FLT3</i> -ITD.....	49
3.6. Prognostische Bedeutung von <i>NPM1</i> Mutationen bei der AML des älteren Patienten (>60 Jahre).....	50
4. Diskussion	56
4.1. Mutationen von <i>NPM1</i> bei der AML.....	56
4.2. Prognostische Bedeutung von <i>NPM1</i> Mutationen bei älteren AML-Patienten (>60 Jahre) innerhalb der Studien AML HD98-B und AMLSG 06-04.....	62
4.3. Perspektive.....	65
5. Zusammenfassung	66
6. Literaturverzeichnis	68
7. Anhang	81
7.1. Komplette genomische Sequenz <i>NPM1</i> Exon 12 und cDNA <i>NPM1</i>	81
7.2. Komplette cDNA aller gefundenen Mutationen.....	82
7.3. Vollständige Aminosäuresequenz <i>NPM1</i> Wildtyp und Mutationen.....	85
8. Danksagung	87
9. Curriculum vitae	88

Abkürzungen

4-JÜR	4-Jahresüberlebensrate
A	Adenosin
AL	Activation-Loop
ALCL	anaplastic large cell lymphoma
ALK	anaplastische Lymphom Kinase
AML	akute myeloische Leukämie
AMLSG	AML Study Group
AP	alkalische Phosphatase
APL	akuten Promyelozytenleukämie
ARF	Tumorsupressorprotein
AS	Aminosäure
ATRA	all-trans Retinsäure
B23/B23.1	Nucleophosmin/Nucleophosmin, Isoform 1
bcl-2	B-Zell Lymphom 2
cDNA	copy DNA
C	Cytosin
CBF β	core-binding factor β
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein α
CR	komplette Remission (complete remission)
CT	Chemotherapie
CSR	Cycle Sequencing Reaction
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphate
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
del	Deletion
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DSF	Erkrankungs-freies Überleben (disease-free survival)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EFS	Ereignis-freies Überleben (event-free survival)
ETO	eight twenty-one
FAB	French-American-British
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3
FLT3-ITD	fms-related tyrosine kinase 3 – internal tandem duplication
FR	frühe Remission
G	Guanin
HAE/A-HAE	Cytosin-Arabinosid, Etoposid/ plus all-trans Retinsäure
HAM/A-HAM	Cytosin-Arabinosid, Mitoxantrone/ plus all-trans Retinsäure
HPLC	high pressure liquid chromatography (Wasser)
ICE	Idarubicin, Cytosin-Arabinosid und Etoposid
IE	Idarubicin und Etoposid
Inv	Inversion
ITD	internal tandem duplication
i.v.	intravenös
JM	Juxtamembran-Domain
Kb	Kilo Basen
KM	Knochenmark
KMP	Knochenmarkspunktion
LDH	Laktat Dehydrogenase
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MLF1	Myelodysplasie/Myeloische Leukämie Faktor 1
MLL	myeloid-lymphoid- oder mixed-lineage leukemia
MPO	Myeloperoxidase
MYH11	myosin heavy chain 11
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NES	nukleares Export Signal

Abkürzungsverzeichnis

NK-AML	akute myeloische Leukämie mit normalem Karyotyp
NLS	nukleare Lokalisationssequenz
Np	Nukleoplasmin
NPM/NPM1	Nucleophosmin/Nucleophosmin, Isoform 1
NPM1c ⁺ AML	NPM1 cytoplasmic positive AML
NRAS	neuroblastome RAS viral oncogene homolog
NSCLC	nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
NSE	nicht spezifische Esterase
NTP	Nukleosidtriphosphat
NuLS	nukleolare Lokalisationssequenz
ORF	open reading frame
OS	Gesamtüberleben (overall survival)
p	kurzer Arm eines Chromosoms (petit)
P53	Tumorsupressorprotein
PB	peripheres Blut
PCR	Polymerase Chain Reaction
PML	Promyelozytenleukämie
POP-6	Performance Optimized Polymer 6
PR	partielle Remission
PTD	partial tandem duplication
p.o.	per os
q	langer Arm eines Chromosoms
RAR	Retinolsäure Rezeptor
RAR α	Retinolsäure Rezeptor α
RD	resistente Erkrankung
RNA	Ribonukleinsäure
RFS	Rezidiv-freiem Überleben (relapse-free survival)
RUNX1	runt-related transcription factor 1
SB	Sudanschwarz
SGOT	Glutamat-Oxalacetat-Transferase
SR	späte Remission
s-AML	sekundäre AML

t	Translation
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
t-AML	Therapie-bedingte AML
TKD	tyrosine kinase domain
W	Tryptophan
WBCC	white blood cell count
WCC	Leukozyten-Zellzahl
WHO	World Health Organization
WT1	Wilms tumor 1
+8	Trisomie 8
+11	Trisomie 11

1. Einleitung

1.1. Akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klinisch wie auch genetisch heterogene Erkrankung bei der unreife hämatopoetische Vorläuferzellen, auch Progenitorzellen genannt, durch eine klonale Funktionsstörung die Fähigkeit zur normalen Differenzierung und Proliferation verlieren. Sie wird charakterisiert durch den Anstieg myeloischer Vorstufen im Knochenmark und deren unvollständige Ausreifung, was zu einer Insuffizienz der normalen Hämatopoese führt. Konsekutiv resultiert daraus eine Granulozytopenie, Thrombozytopenie und Anämie mit oder ohne Leukozytose. Aus diesen Knochenmarks- und Blutbildungsstörungen ergeben sich eine erhöhte Infektionsanfälligkeit, Blutungsneigung und allgemeine Schwäche. Selten kann es durch Expansion der Blasten aus dem Knochenmark zur Infiltration weiterer Organe kommen (Estey und Döhner 2006, Löwenberg et al. 2003, Löwenberg et al. 1999).

Weltweit gibt es zwei verbreitete und anerkannte Klassifikationssysteme der AML. Bei der von Bennet et al. 1976 vorgeschlagenen und später eingeführten *French-American-British* (FAB) Klassifikation wird die AML nach morphologischen Kriterien eingeteilt. Bei Diagnosestellung werden im histologischen Bild des Knochenmarks (KM) leukämische Zellen beurteilt und entsprechend den FAB Subtypen M1-M7 eingeteilt. Weitere Charakterisierung erfolgt durch histochemische (z.B. Myeloperoxidase, Sudan-Schwarz oder unspezifische Esterasen) und immunhistochemische Färbungen sowie speziellen genetischen Aberrationen welche bestimmten Phänotypen entsprechen (siehe Tabelle 1) (Bennett et al. 1976, Bennett et al. 1985, Löwenberg et al. 1999).

In den letzten Jahren wurden wichtige Zusammenhänge erkannt welche bei der FAB Klassifikation unberücksichtigt bleiben. Die *World Health Organization* (WHO) versuchte dieser Entwicklung Rechnung zu tragen und so führte man fast drei Jahrzehnte später die WHO Klassifikation der AML ein (siehe Tabelle 2). Es wurde versucht Ätiologie, Pathogenese, Klinik und Prognose in die Einteilung mit

einzubinden. Das morphologische Erscheinungsbild vermag in einigen Fällen, wie z.B. der akuten Promyelozytenleukämie (APL) oder der AML vom Subtyp-M4eo, die damit verbundene genetische Veränderung voraussagen, in den meisten Fällen ist dies jedoch nicht möglich. Die zytogenetische Untersuchung der leukämischen Blasten korreliert besser mit den biologischen Eigenschaften und der Prognose der Leukämien. Weiterhin berücksichtigt die WHO Klassifikation ob der AML ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) (sekundäre AML, s-AML), die Behandlung eines soliden Tumor oder eine Bestrahlung vorausging und somit eine Therapie-bedingte AML (t-AML) vorliegt. Als eigenständige Gruppe wird die AML mit multilinearer Dysplasie geführt. Leider können nicht alle Fälle klassifiziert werden weshalb als letzte Gruppe „akute myeloide Leukämien, nicht anderweitig charakterisiert“ eingeführt wurde, mit weiterer Unterteilung ähnlich den FAB-Kriterien. Außerdem wurde der Anteil leukämischer Blasten zur Diagnosestellung einer AML, welche bei den FAB-Kriterien mit 30% festgesetzt war, auf 20% gesenkt und bleibt bei spezifischen genetischen Veränderungen unberücksichtigt (Vardiman et al. 2002).

Tabelle 1: FAB Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (AML) von Bennett et al. 1985 (modifiziert nach Löwenberg et al. 1999)

FAB, French-American-British; MPO, Myeloperoxidase; SB Sudanschwarz; NSE, nicht spezifische Esterase; t, Translation; inv, inversion; q, steht für den langen Arm eines Chromosoms;

FAB Subtyp	Morphologie	Häufigkeit (%)	Zytochemische Färbungen	Assoziierte zytogenetische Veränderungen (%)
M0	Akute myeloblastische Leukämie mit minimaler Differenzierung	3%	MPO: - SB: - NSE: -	inv(3q26) und t(3;3) (1%)
M1	Akute unreife Myeloblastenleukämie	15-20%	MPO: + SB: + NSE: -	-
M2	Akute reife Myeloblastenleukämie	25-30%	MPO: + SB: + NSE: -	t(8;21) (40%) t(6;9) (1%)
M3	Akute Promyelozytenleukämie (APL)	5-10%	MPO: + SB: + NSE: -	t(15;17) (98%) t(11;17) (1%) t(5;17) (1%)
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	20%	MPO: + SB: + NSE: +	11q23 (20%) inv(3q26) und t(3;3) (3%) t(6;9) (1%)
M4eo	Akute myelomonozytäre Leukämie (mit anormalen Eosinophilen)	5-10%	MPO: + SB: + NSE: +	inv(16), t(16;16) (80%)
M5	Akute Monozytenleukämie	2-9%	MPO: - SB: - NSE: +	11q23 (20%) t(8;16) (2%)
M6	Erythrozytenleukämie	3-5%	MPO: + SB: + NSE: -	-
M7	Akute megakaryozytäre Leukämie	3-12%	MPO: -	t(1;22) (5%)

SB: -
NSE: +

Tabelle 2: WHO Klassifikation der akuten myeloiden Leukämie (AML) (Vardiman et al. 2002)

WHO, world health organization; AML, acute myeloid leukemia; ETO, eight twenty-one; CBF β , core-binding factor β ; MYH11, myosin heavy chain 11; PML, Promyelozytenleukämie; RAR α , Retinolsäure-Rezeptor α ; MLL, mixed-lineage leukemia; t, translokation; p, kurzer Arm eines Chromosoms (von petit); q, langer Arm eines Chromosoms (p folgt auf q);

AML mit spezifischen genetischen Abnormalitäten
AML mit Translokation t(8;21)(q22;q22), [AML1/ETO]
AML mit abnormalen Eosinophilen und Inversion inv(16)(p13q22) oder Translokation t(16;16)(p13;q22), [CBF β /MYH11]
Akute Promyelozytenleukämie mit Translokation t(15;17)(q22;q12), [PML/RAR α]
AML mit Veränderungen an Chromosom 11q23 [MLL]
AML mit multilinearer Dysplasie
Mit vorhergegangenem myelodysplastischen Syndrom
Ohne vorhergegangenem myelodysplastischen Syndrom aber mit Dysplasien in mindestens 50% der Zellen in zwei oder mehr myeloischen Zellreihen
Therapiebedingte AML und MDS
Nach Therapie mit Alkylantien / Bestrahlung
Nach Therapie mit Topoisomerase II - Inhibitoren
Andere
AML, nicht anderweitig charakterisiert
AML mit minimaler Differenzierung
AML ohne Ausreifung
AML mit Ausreifung
Akute myelomonozytäre Leukämie
Akute monozytäre / monoblastische Leukämie
Akute erythroide Leukämie
Akute megakaryoblastische Leukämie
Akute basophile Leukämie
Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloisches Sarkom

2008 wurde eine Änderung der WHO Klassifikation der AML vorgenommen und die Genmutationen *NPM1* und *CEBPA* als eigenständige Entität vorläufig in den ersten Unterpunkt „AML mit rekurrenten genetischen Abnormalitäten“ mit aufgenommen (siehe unten 1.6.) (Vardiman et al. 2009).

1.2. Epidemiologie

Die Inzidenz der AML beträgt weniger als 1% aller Krebsarten und 34% aller Leukämien. Zu einem geringfügigen Anteil sind Männer häufiger betroffen als Frauen (1.2:1.0). Nur selten tritt die AML im Alter unter 40 Jahren auf (Ferrara et al. 2007). Die akute myeloische Leukämie ist die häufigste myeloische Leukämie

mit einer Inzidenz von 1/100.000 im Alter von 40 Jahren, durchschnittlich 3,8/100.000 in allen Altersgruppen. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg bis zu 17,9/100.000 Fälle von AML bei Patienten ≥ 65 Jahren (Ferrara et al. 2007, Estey und Döhner 2006). Mehr als die Hälfte aller neu diagnostizierten akuten myeloischen Leukämien sind derzeit bei Patienten über 60 Jahren zu finden. Auch bei stabiler Alters-spezifischer Inzidenz wird die Gesamtinzidenz der AML in den kommenden Jahren bei Patienten ≥ 60 Jahren steigen. Grund ist die steigende Lebenserwartung und das progressive Altern der gesamten Gesellschaft (siehe Abbildung 1), außerdem auch die steigende Anzahl an Überweisungen von Leukämie-Patienten in Zentren und damit verbunder zunehmender Registrierung (Ferrara et al. 2007).

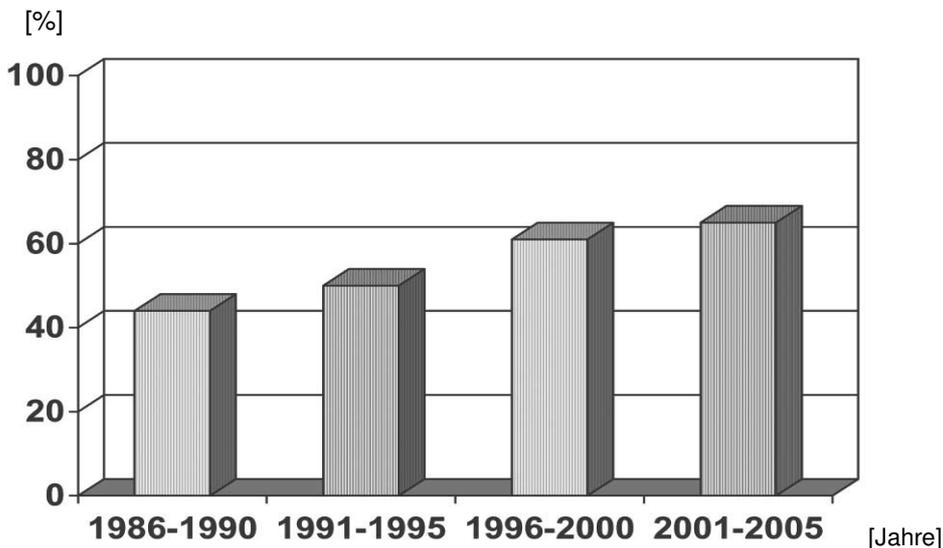


Abbildung 1: Anstieg (in Prozent) der Diagnose akute myeloische Leukämie (AML) bei Patienten über 60 Jahre über die letzten 20 Jahre hinweg (Ferrara et al. 2007)

Risikofaktoren um an einer AML zu erkranken sind unter anderem Exposition mit ionisierter Strahlung, Benzol oder zytotoxische Chemotherapie (CT). Beispielsweise ist ein signifikanter Anstieg der Inzidenz bei den Überlebenden des Atombombenunglücks von Nagasaki und Hiroshima zu verzeichnen, bei Arbeitern in Atomkraftwerken oder etwa bei Mitgliedern einer Cockpit Crew (Estey und Döhner 2006, Nakanishi 1999, Gundestrup 1999). Rauchen ist die häufigste Benzol-Exposition und geht mit einem 1,2-2,3-fachen Anstieg der Inzidenz von AML einher mit dem größten Risiko bei aktuellen Rauchern (Kane et al. 1999).

Eine t-AML, meist nach Behandlung von soliden Tumoren mittels Chemotherapie oder Bestrahlung, liegt in ca. 10-15% aller Fälle von AML vor (Döhner et al. 2006). Hier kommt es häufig zu Veränderungen an den Chromosomen 5 und 7 (del(5q), del(7q), Monosomie 5, Monosomie 7) (Smith et al. 2003).

1.3. Struktur und Funktion von *Nucleophosmin (NPM1)*

Das *Nucleophosmin* Gen beinhaltet 12 Exons, umfasst auf genomischer Ebene 25 kb (Kilo Basen) und codiert für das Protein *Nucleophosmin (NPM)*, auch bekannt als *Numatrin*, *NO38* oder *B23*. Es ist auf dem langen Arm von Chromosom 5 lokalisiert (5q35). Für das *Nucleophosmin* Protein existieren drei alternative Splice-Varianten *B23.1* (GenBank Eingangsnummer np_002511), *B23.2* (GenBank Eingangsnummer np_954654) und *B23.3* (GenBank Eingangsnummer np_001032827). Erstere ist die vorherrschende Isoform mit 294 Aminosäuren, welche in allen Gewebeformen vorkommt. Zweitere hingegen ist um die letzten 35 C-terminalen Aminosäuren verkürzt welche die *nucleolar-binding-domain* oder *nukleolare Lokalisationssequenz* (NuLS) enthält und wird nur sehr selten exprimiert. Über die dritte Isoform ist nur wenig bekannt. Sie besteht aus 259 Aminosäuren. Immunocytochemischen Analysen zufolge liegt eine Lokalisation im Nucleoplasma vor (Grisendi et al. 2006, Falini et al. 2007, Naoe et al. 2006).

NPM1 gehört zu einer Familie von nukleären Chaperonen, auch bekannt als Nucleoplasmine (Np), welche als gemeinsames Merkmal eine konservierte N-terminale Region besitzen (Grisendi et al. 2006). *Nucleophosmin1* ist ein ubiquitär exprimiertes Phosphoprotein mit einer vorherrschenden Lokalisation im Nucleolus, das kontinuierlich zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelt. Diese Aktivität wie auch die ordnungsgemäße subzelluläre Lokalisation ist ausschlaggebend für die Homeostase der Zelle. *NPM1* ist ein multifunktionelles Phosphoprotein mit onkogenen und Tumor-Suppressor-Eigenschaften. Die Ausprägung dieser Eigenschaften hängen jeweils von Dosierung, Expressionsgrad, Interaktionspartnern und Kompartimentalisation ab (Falini et al. 2007, Grisendi et al. 2006, Renneville et al. 2008, Naoe et al. 2006).

Unter nativen Bedingungen liegt das *Nucleophosmin* Protein als Oligomer vor. Studien weisen darauf hin, dass die Proteine sich als Pentamere und Dekamere formieren. Weniger gängig ist die Formierung als Monomer und Dimer. Das Gleichgewicht zwischen der Struktur als Monomer, Dimer und Oligomer ist wahrscheinlich abhängig von posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung oder Ubiquitinylierung, Konformationsänderungen oder Änderungen der intrazellulären Bedingungen (Grisendi et al. 2006, Herrera et al. 1996, Namboodiri et al. 2004, Lindström et al. 2006).

Im Folgenden werden einige Funktionen des *Nucleophosmin1* Proteins beschrieben, wobei die Pendel-Aktivität zwischen Zellkern und Zytoplasma Grundvoraussetzung für einige dieser Funktionen darstellt. *NPM1* besitzt die Fähigkeit als Chaperon für Proteine und Nukleinsäuren zu agieren, verhindert Protein-Aggregation im Nukleolus, reguliert Aufbau, Anordnung und Transport von prä-ribosomalen Partikeln durch die Kernmembran und die Aktivität der DNA-Polymerase (Rennville et al. 2008, Grisendi et al. 2006). Es besitzt die Fähigkeit Reaktionen auf Stress-Stimuli wie UV-Strahlung und/oder Hypoxie mit komplexen Prozessen zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität in Gang zu setzen und regelt diese durch Kontrolle der zellulären Ploidie und Teilnahme im DNA-Reperaturmechanismus. *NPM1* nimmt Teil in der Regulation der DNA-Transkription durch Modulation der Chromatinstruktur wie Kondensierung oder Dekondensierung. Es bindet die Histone H2A, H2B, H3 und H4, und baut Histon-Oktamere auf, auch Nukleosome genannt. Ausdruck des onkogenen Potentials sieht man in der Tatsache dass *NPM1* auf die Stabilität und Aktivität der Tumor-Suppressor Proteine P53 und ARF Einfluss nimmt (Grisendi et al. 2006, Colombo et al. 2002, Colombo et al. 2005, Lindström et al. 2006). Weiterhin nimmt es eine wichtige Stelle im Zellzyklus ein und fungiert als Substrat des Komplexes CDK2/Cyclin E bei der Duplikation der Centrosomen (Okuda et al. 2000, Renneville et al. 2008, Naoe et al. 2006). *B23* verbindet sich mit einem noch nicht dupliziertem Centrosom, was durch eine von CDK2/Cyclin E vermittelte Phosphorylierung der AS Threonin an der Stelle 199 (Thr199) im *NPM1* Protein ausgelöst wird (Lindström et al. 2006). Eine essenzielle Rolle bei der

Embryogenese und der Erhaltung der genomischen Stabilität wurde durch Beobachtung von *NPM* Knock-out Mäusen untermauert. Diese waren nicht lebensfähig und starben zwischen Tag 11.5 und 16.6 aufgrund Fehlentwicklung von Organen und schwerer Anämie. Dies wurde in Verbindung mit unbegrenzter Duplikation von Centrosomen und genomischer Instabilität gebracht. Die Kreuzung der *NPM1*-Null Mäuse mit P53-Null Mäusen führte zu einer Verzögerung des Tods, was für eine Interaktion zwischen *NPM1* und P53 spricht, einer Fehlregulation des P53 Tumor-Supressor Proteins durch das Fehlen von *NPM1* (Lindström et al. 2006).

NPM1 besitzt vielfältige Eigenschaften. Um diese funktionellen Eigenschaften auf molekularer Ebene zu realisieren benötigt ein Protein entsprechende strukturelle Voraussetzungen, sog. funktionelle Domänen (siehe Abbildung 2).

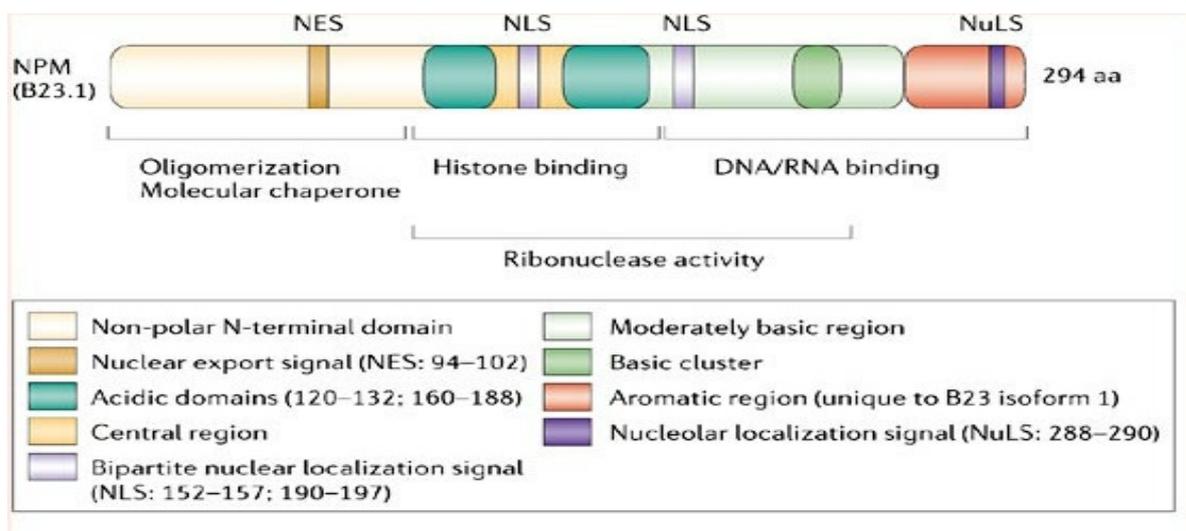


Abbildung 2: *NPM* Motive und funktionelle Domänen (Grisendi et al. 2006)

NPM/B23, Nucleophosmin; B23.1, Nucleophosmin Isoform 1; NES, nukleares Export Signal; NLS, nukleare Lokalisationssequenz; NuLS, nukleolare Lokalisationssequenz (NLS); Zahlen z.B. 94-120, Aminosäure 94 bis 120; 294aa, Aminosäure 294 mit Poly-Adenylierung am C-terminalen Ende

Die Polypeptidkette des Nucleophosmin besitzt eine modulare Struktur und beinhaltet in ihrer Sequenz spezielle Motive welche für die verschiedenen Funktionen des Proteins verantwortlich sind, sog. funktionelle Domänen. Die nicht-polare, hydrophobe N-terminale Region ist für die Oligomerisation sowie die

Aktivität der Funktion als Chaperon zuständig. Innerhalb dieser befindet sich ein *nukleares Export Signal* (NES) welches von AS 94 bis AS 102 reicht. Darauf folgen eine zentrale Region mit zwei Säure-reichen Domänen, wichtig für die Histon-Bindung, und einer *nuklearen Lokalisationssequenz* (NLS). Der zentrale Teil zwischen den zwei Säure-reichen Domänen besitzt Ribonuklease-Enzymaktivität. Zusammen mit einer basischen Region (basic cluster) im C-terminalen Teil wirkt dieser unter anderem Nukleinsäure-bindend. Das C-terminale Ende, eine aromatische Region mit einem Tryptophan an den Stellen der Aminosäuren 288 und 290 stellen eine *nukleolare Lokalisationssequenz* (NuLS) dar (Grisendi et al. 2006, Lindström et al. 2006).

Veränderungen des *NPM1* Gens sind vielfach in die Genese von Tumoren verwickelt (siehe Tabelle 3). Dies betrifft solide Tumoren genauso wie Entartungen der lymphoiden und myeloiden Zellreihen.

Tabelle 3: Überblick über Veränderungen des *Nucleophosmin1* Gens in humanen Malignomen (nach Grisendi et al. 2006)

ALCL, großzelliges anaplastisches Lymphom; ALK, anaplastische Lymphom-Kinase; AML, akute myeloische Leukämie; APL, akute Promyelozytenleukämie; FAB, French–American–British Klassifikation der Leukämien und des MDS; MDS, myelodysplastisches Syndrom; MLF1, Myelodysplasie/Myeloische Leukämie Faktor 1; NPM, Nucleophosmin; RAR, Retinolsäure Rezeptor; NSCLC, nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom

Alteration	Mutierte Produkte	Malignome
Überexpression	Gesteigerte Expression des Proteins NPM1	Tumoren mit unterschiedlichem histologischem Ursprung (wie Magen-, Colon-, Ovarial- und Prostata CA)
Balancierte Translokationen		
t(5;17)(q35;q12)	NPM–RAR α	APL
t(2;5)(p23;q35)	NPM–ALK	ALCL
t(3;5)(q25;q35)	NPM–MLF1	MDS und AML
Mutation (Exon 12)	NPMc+ cytoplasmic mutant	AML mit normalem Karyoty (in den meisten Fällen FAB-M4 und FAB-M5)
Deletion (-5q35, -5)		MDS (<i>de novo</i> , Therapie-bedingt) AML (FAB-M6) und NSCLC

Wie in Tabelle 3 zu sehen ist das *NPM1* Gen bei mehreren hämatologischen Malignomen häufig mit chromosomalen Translokationen, Mutationen und/oder Deletionen involviert. Das *NPM-RAR α* Fusionsgen (Retinolsäurerezeptor, RAR) ist sehr selten zu finden, durch die Translokation t(5;17) verursacht und führt wie das häufigere *PML-RAR α* Fusionsgen zum Arrest der Reifung myeloider Zellen auf der Entwicklungsstufe von Promyelozyten. Das Gen beinhaltet die Regionen B bis F

des *RAR α* Gens und am N-terminalen Ende einen Teil des *NPM* Gens, welcher eine Oligomerisation als Funktion besitzt. Dadurch kommt es zur Bildung eines Heterodimers mit *NPM* oder *RXR* und Delokalisierung, woraus eine Supprimierung der Retinoid-bedingten Transkription resultiert. Dieser Typ von akuter Promyelozytenleukämie (APL) ist sensitiv gegenüber einer Therapie mit *all-trans Retinsäure* (ATRA). Dem anaplastischen großzelligen Lymphom (anaplastic large cell lymphoma, ALCL) liegt die Translokation t(2;5)(p23;q35) zugrunde. Hier kommt es zu einer Fusionierung des *NPM* Gens mit dem Gen der anaplastischen Lymphom Kinase (ALK), wodurch der N-terminale Teil des *NPM* (AS 1-117) mit der katalytisch wirkenden Domäne der *ALK* (AS 1058-1620) fusioniert. Es entsteht die chimärische Kinase *NPM-ALK* deren Expression durch den Promotor des *NPM* Gens reguliert wird, woraus letztendlich die ektop lokalisierte Expression in lymphoiden Gewebe resultiert. Die Translokation t(3;5)(q25;q35) führt zum *NPM-MLF1* Fusionsgen (Myelodysplasie/myeloide Leukämie Faktor 1, *MLF1*), was häufig beim FAB Subtyp M6, der Erythrozytenleukämie, beobachtet wird. Auch hier kommt es zur aberranten Lokalisation der Proteine *NPM* und *MLF1*. *MLF1* zeigt normalerweise kein Vorkommen in hämatopoetischem Gewebe. Über einen bis dato unbekanntem Mechanismus verursacht es die Genese eines MDS bzw. einer AML. Auch Überexpression, Verlust des *NPM* Gens durch Deletion oder Mutation tragen zur Tumorentstehung bei (Naoe et al. 2006, Grisendi et al. 2006, Falini et al. 2007).

1.4. Nucleophosmin (*NPM1*) und AML

2005 entdeckten Falini und Kollegen durch immunhistochemische Untersuchungen an mehr als 590 AML Fällen eine Akkumulation des Proteins *Nucleophosmin1* im Zytoplasma leukämischer Zellen, woraus der Begriff *NPM1 cytoplasmic positive* (*NPM1c⁺*) AML entstand. Es stellte sich heraus dass in den betroffenen Fällen Mutationen im Exon 12 des *NPM1* Gens vorliegen welche zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz am C-terminalen Ende des Proteins führen. In dieser Arbeit konnte erstmals *NPM1c⁺* AML mit oben genannten Mutationen assoziiert werden. Weiterhin wurde erstmals eine Assoziation der *NPM1* Mutationen mit zytogenetisch normalem Karotyp (NK-AML), insbesondere

NK-AML mit einer Mutation im *FLT3* Gen und dem Ansprechen auf eine Induktionschemotherapie beschrieben (siehe unten 1.6.) (Falini et al. 2005).

Die Verschiebung des Proteins ins Zytoplasma resultiert aus der Veränderung der Aminosäuren (AS) Tryptophan (W) an den Stellen 288 und 290 im Protein, oder auch nur an der Stelle 290. Hierbei kommt es zur Bildung eines zusätzlichen *nuklearen Export Signal* (NES) am COOH-Terminus des *NPM1* Proteins und infolgedessen zum Shift vom Nukleolus ins Zytoplasma. Beide AS288 und W290 sind maßgeblich an der *nukleolaren Lokalisationssequenz* (NuLS) beteiligt, welche verantwortlich für die hauptsächliche Lokalisation im Nukleolus sind. Somit resultiert die Akkumulation des Proteins im Zytoplasma also aus Kombination der Genese eines neuen NES Motives mit gleichzeitigem Verlust einer NuLS (Bolli et al. 2007, Falini et al. 2006, Falini et al. 2007).

Anfänglich wurden 6 verschiedene Mutationen A, B, C, D, E und F beschrieben. Die häufigste Mutation A (GenBank Eingangsnummer AY740634) ist die Duplikation des Tetranucleotids TCTG an Position 956 bis 959 der Referenz-Sequenz des Wild-Typ *NPM1* Gens (GenBank Eingangsnummer NM_002520). Daraus folgt eine Verschiebung des *open reading frame* (ORF) und somit der Ersatz der letzten sieben Aminosäuren 288-294 (WQWRKDL, nach single-letter code für AS) des *NPM1* Proteins durch 11 andere AS (CLAVEEVSLRK) (Falini et al. 2005).

Die Generation eines NES und der Verlust beider Tryptophan-AS (W288 und W290) sind ausschlaggebend für die aberrante zytoplasmatische Lokalisation des mutierten *NPM1* Gens. Eine experimentelle Studie von Bolli und Kollegen konnte zeigen dass die bei den verschiedenen Mutationen unterschiedlich gearteten NES Motive eine unterschiedliche Exporteffizienz des *Nucleophosmin* aus dem Zellkern in das Zytoplasma zeigen. Bei Erhaltung der AS W288 zeigt sich eine geringere Exportaktivität, das natürliche NES Motiv am N-terminalen Ende des Proteins ist ebenfalls relativ schwach. Die gegensätzlichen Kräfte (W288/W290 und NES) determinieren die subzelluläre Lokalisation des *Nucleophosmin*. Das Faktum, dass

Mutationen mit erhaltenem W288 immer in Kombination mit einem starken NES Motiv auftreten, weisen auf einen selektiven Druck in Richtung *NPM1c+* und sind kritisch für die Entwicklung einer Leukämie (Bolli et al. 2007).

1.5. Prognostische Faktoren

In großen zahlreichen Studien der 90er Jahre wurden sowohl klinische als auch biologische Prognosefaktoren bei der AML definiert. Klinisch sind dies das Erreichen einer kompletten Remission nach Doppelinduktionstherapie und das Alter. In einigen Studien werden noch die Leukozyten-Zellzahl $> 20000/m^3$ (white-cell count, WCC) und erhöhte Werte des Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH) hinzugezählt. Biologisch sind die chromosomalen Veränderungen der Leukämiezellen der wichtigste Prognosefaktor bei der AML (Löwenberg et al. 1999, Heilmeier et al. 2007).

Diese in den 90er Jahren durchgeführten Studien zur Identifizierung neuer Prognosemarker wurden überwiegend an jüngeren, das heißt Patienten unter 60 Jahren durchgeführt. Ein wesentlicher Grund hierfür basiert auf der Tatsache dass ältere Patienten aufgrund eines reduzierten Allgemeinzustandes und einer erhöhten Komorbidität nicht für intensive Therapieprotokolle geeignet sind. An dieser Tatsache hat sich auch bis heute nicht wesentlich viel geändert, sodaß ein Großteil der publizierten Daten an unter 60-jährigen Patienten erhoben wurde (Löwenberg et al. 1996).

Der Karyotyp stellt zur Zeit der Diagnosestellung die wichtigste prognostische Information dar, obwohl 40-50 % aller AML Patienten bei konventioneller Chromosomenanalyse inklusive *Fluoreszenz in situ Hybridisierung* (FISH) keine klonalen chromosomalen Aberrationen aufweisen. Alle Patienten mit normaler Zytogenetik werden in die Gruppe mit intermediärem Risiko eingestuft (¹¹Schlenk et al. 2008). Eine solche Population von AML-Patienten mit identischer Zytogenetik, wie beispielsweise Patienten mit normalem Karyotyp, stellt jedoch eine heterogene Gruppe dar und kann in weitere unterschiedliche prognostische Kategorien aufgeteilt werden, abhängig von dem Vorhandensein oder Nicht-

Vorhandensein von Genmutationen bzw. Veränderungen in der Genexpression. Diese Veränderungen auf molekularer Basis bilden potentielle Ziele für den Ansatz individueller Risiko-adaptierter Therapien. Die Prognose der AML ist folglich in großem Maße von erworbenen genetischen Veränderungen der leukämischen Zellen, wie chromosomale Aberrationen, aber auch Genmutationen inklusive veränderter Genexpression abhängig (Mrózek et al. 2006).

Eine Studie bei älteren Patienten (≥ 65 Jahre) mit AML ergab eine Mortalität von 86% bzw. 94% ein bzw. zwei Jahre nach Diagnosestellung, zudem findet sich eine hohe Rezidivrate. Lediglich 30% der Patienten erhielt hier eine intravenöse Chemotherapie (Erba et al. 2007). Diese Fakten sind zum Einen begründet in einer größeren Anzahl an zytogenetischen Aberrationen mit hohem Risiko, höheren Anteil an komplexen Karyotypen, häufigeres Vorkommen eines vorangegangenes MDS und somit Vorliegen einer sekundären AML (s-AML) und Zustand nach Behandlung solider Tumoren durch Chemotherapie oder Bestrahlung (t-AML) (Fröhling et al. 2006, Erba et al. 2007). Zum Anderen haben diese Patienten wie oben bereits kurz aufgeführt mehr Komorbiditäten, einen schlechteren Allgemeinzustand und Organdysfunktionen aus denen eine limitierte Fähigkeit zu intensivierter zytotoxischer Chemotherapie und konsekutiv eine größere frühe Mortalität resultiert (Erba et al. 2007).

Im Wesentlichen existieren drei größere Studien zur Identifizierung von Prognosefaktoren bei älteren Patienten mit AML.

Fröhling et al. untersuchten 2006 eine Population von 361 AML Patienten ≥ 61 Jahren mit der Fragestellung, ob die bei den jüngeren Patienten angewandte zytogenetische Risikoeinteilung auch bei älteren Patienten angewandt werden kann. Analog zu den jüngeren Patienten wurden die älteren Patienten in dieser Studie in die drei zytogenetischen Risikogruppen eingeteilt. Patienten mit niedrigem Risiko (low-risk) definiert durch t(15;17) und inv(16), mittleres Risiko (standard-risk) bei normalem Karyotyp, t(8;21), t(11q23), +8 innerhalb eines nicht-komplexen Karyotyps und +11 innerhalb eines nicht-komplexen Karyotyps. Ein

hohes Risiko (high-risk) weisen alle restlichen Aberrationen auf. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Karyotyp bei Diagnosestellung und das Alter, getrennt am Alter von 70 Jahren, die wesentlichen Prognosefaktoren für das Überleben bei älteren AML Patienten darstellen. Eine Zytogenetik mit hohem Risiko und ein Alter von über 70 Jahre waren unabhängige prognostische Faktoren für das Gesamtüberleben. Diese Gruppe mit entweder einer Hochrisiko-Zytogenetik oder Alter > 70 Jahre oder beides gemeinsam, welche insgesamt 55% der in diese Studie eingeschlossenen Patienten betraf, zeigten ungünstige Therapieergebnisse trotz einer intensiven Chemotherapie auf. Durchschnittlich ergab sich für diese Gruppe ein Gesamtüberleben (OS) von 7,2 Monaten und eine 3-Jahresüberlebensrate von 6%. Somit konnte die zytogenetische Einteilung in unterschiedliche Risikogruppierungen in Analogie zu jüngeren AML Patienten bestätigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Anteil an zytogenetischen Veränderungen bei älteren AML Patienten höher als bei jüngeren Patienten ist und Aberrationen mit niedrigem Risiko mit nur 7% wesentlich seltener vorkommen (Fröhling et al. 2006).

In einer Studie von Grimwade et al. 2001 wurden 1065 AML Patienten ≥ 55 Jahre eingeschlossen. Auch hier sollte vor allem untersucht werden, ob die prognostische Einteilung anhand des zytogenetischen Profils, wie sie bei den jüngeren AML Patienten gefunden wurde, auch bei älteren AML Patienten Gültigkeit hat. Dies wurde bestätigt und jeweils für die Gruppen mit niedrigem, mittlerem und hohem Risiko anhand der Raten für eine komplette Remission (CR), für eine resistente Erkrankung (RD), für das Rezidivrisiko (RR) und für das Gesamtüberleben (OS) unterlegt. Auch in dieser Studie wurden die günstigen zytogenetischen Veränderungen bei älteren AML Patienten seltener gefunden. Die Aberration t(8;21) wurde hier zur Gruppe mit niedrigem Risiko gezählt. Bei Patienten unter 55 Jahre findet sich in 24% der Fälle ein zytogenetischer Status mit niedrigem Risiko im Vergleich zu 7% bei den Patienten mit 55 Jahren und älter. Bei Patienten mit zytogenetisch hohem Risiko stehen hier 6% bei den jüngeren Patienten gegenüber 13% bei älteren Patienten. Somit wurde die Einteilung in zytogenetische Subgruppen als unabhängige prognostische Variable

bestätigt, jedoch mit signifikanter Zunahme der komplexen Karyotypen bei zunehmenden Alter und folglich ungünstigem Outcome der älteren AML Patienten (Grimwade et al. 2001).

2006 untersuchten Farag et al. 635 AML Patienten ≥ 60 Jahre. Auch hier war erklärtes Ziel die prognostische Relevanz der zytogenetischen Veränderungen bei Diagnosestellung zu beurteilen. Komplexe Karyotypen mit mindestens 3 Aberrationen inklusive seltener Aberrationen wiesen eine niedrigere Remissionsrate (CR) von 25-30% im Vergleich zu 56% bei den restlichen Patienten auf. Die Odds Ratio für die CR war signifikant höher bei den Patienten mit nicht-komplexen Karyotyp (ohne seltene Aberrationen). Insgesamt ergaben die Analysen dass der zytogenetische Befund neben anderen Faktoren wie der Leukozytenzahl, der Anzahl leukämischer Blasten im Knochenmark, das Geschlecht und das Alter prognostische Relevanz besitzen (Farag et al. 2006).

1.6. Rekurrente Genmutationen bei der AML

In den letzten Jahren wurden mehrere Genmutationen bei Patienten mit AML identifiziert. Diese sind unter anderem die *partial tandem duplications* (PTDs) des *myeloid-lymphoid- oder mixed-lineage-leukemia* Gens (*MLL*), *internal tandem duplications* (ITD) oder Mutationen der *tyrosine kinase domain* (TKD) des *fms-related tyrosine kinase 3* (*FLT3*) Gens, Mutationen des *nucleophosmin* (*NPM1*) Gens, des *Wilms tumor 1* (*WT1*) Gens, des *runt-related transcription factor 1* (*RUNX1*) Gens und des *CCAAT/enhancer binding protein α* (*CEBPA*) Gens (Döhner et al. 2008, Schlenk et al. 2008).

Analog zu den Untersuchungen zur Zytogenetik bei Patienten mit AML wurde auch bei der molekularbiologischen Erforschung einzelner Mutationen das Hauptaugenmerk auf Patienten ≤ 60 Jahre gelegt (Schlenk et al. 2008). Hier liegt ein deutlicher Unterschied in der Datenlage zwischen jüngeren und älteren AML-Patienten vor. Zu Beginn dieser Arbeit waren keine systematischen Analysen zur prognostischen Bedeutung dieser genetischen Aberrationen bei älteren AML-

Patienten bekannt, was unter anderem den Anlaß zur Anfertigung dieser Arbeit gab.

Es folgt eine kurze Charakterisierung der wichtigsten bei der AML bisher gefundenen Genmutationen.

MLL-PTD liegen bei NK-AML in 5-11% der Fälle vor (Döhner et al. 2008, Mrozek et al. 2007, Schlenk et al. 2008). Meistens kommt es hier auf molekularer Ebene zur Duplikation der genomischen Region des Gens von Exon 5 bis 11 und zur Insertion dieser Duplikation in das Intron 4. Dabei bleiben alle funktionellen Domänen des Proteins erhalten. Prognostisch wurde eine Assoziation von *MLL-PTD* mit einer kürzeren Dauer der kompletten Remission (CR), schlechterem Ereignis-freiem Überleben (event-free survival, EFS) und Rezidiv-freiem Überleben (relapse-free survival, RFS) gefunden, jedoch keine Assoziation mit dem Gesamtüberleben (overall survival, OS) (Döhner et al. 2008).

Mutationen des *WT1* Gens bei NK-AML wurden in ca. 10% der Fälle identifiziert. Meist liegt hier eine Deletion oder Insertion in Exon 7 und 9 des Gens vor. Für eine genauere Bewertung des Einflusses dieser Mutation sind jedoch noch weitere größere Studien und systematische Analysen notwendig (Döhner et al. 2008).

Mutationen des *RUNX1* Gens kommen in beinahe 10% der Fälle bei NK-AML vor (Schnittger et al. 2007). Das betroffene Protein codiert für einen Transkriptionsfaktor welcher mitverantwortlich für die Ausdifferenzierung der Zellen bei der Hämatopoese ist. Auch hier fehlen derzeit weitere Daten über die klinische Relevanz dieser Mutation (Döhner et al. 2008).

Mutationen des *CEBPA* Gens wurden in den letzten Jahren in mehreren Studien untersucht und bei Patienten mit AML als prognostisch relevanter Marker mit einem günstigen Outcome identifiziert. *CEBPA* Mutationen liegen in 5-14% bei AML Patienten vor. Obwohl mehrere unterschiedliche Mutationstypen bekannt sind können diese bezüglich der Lokalisation in 2 Typen eingeteilt werden. Dies sind die Mutationen am N-terminalen Ende zwischen dem Start-Codon für die Translation und einem zweiten ATG-Codon in selbigem Open Reading Frame (ORF), und die Mutationen am C-terminalen Ende im Bereich der basischen Leucin-Zipper Region (bZIP). Die meisten AML Patienten mit einer *CEBPA*

Mutation weisen kombinierte sog. compound-heterozygote Mutationen an beiden Lokalisationen gleichzeitig auf (*CEBPA^{double-mut}*), welche für gewöhnlich auf zwei verschiedenen Allelen zu finden sind. AML Patienten mit einer *CEBPA* Mutation weisen auf eine günstige Prognose auf. Neuere Daten belegen jedoch, dass nicht allein das Vorliegen einer Mutation des *CEBPA* Gens an sich sondern insbesondere das Vorhandensein einer Doppelmutation am N- und C-terminalen Ende des Gens mit einer günstigen Prognose assoziiert ist. (Dufour et al. 2010, Green et al. 2010, Wouters et al. 2009). Mehrere Studien haben hier die Assoziation einer Mutation des *CEBPA* Gens mit einer günstigen Prognose bzw. besserem Überleben aufgezeigt. Diese Prognose ist vergleichbar gut wie die bei AML Patienten mit *NPM1* Mutation in Abwesenheit einer *FLT3-ITD* Mutation (Schlenk et al. 2008, Wouters et al. 2009).

Zur Veranschaulichung siehe Abbildung 3. Diese Ergebnisse betreffen AML Patienten unter 60 Jahre (Schlenk et al. 2008).

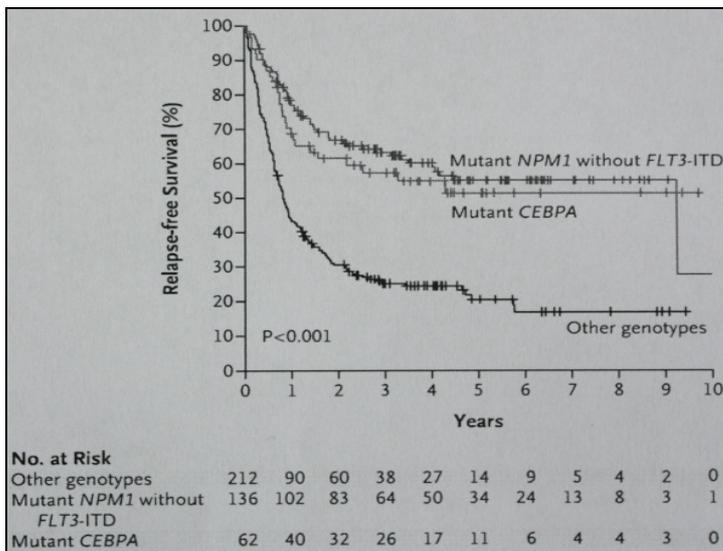


Abbildung 3: Kaplan-Meier Kurve nach Rezidiv-freiem Überleben (RFS) gemäß den Genotypen NPM1-positiver/FLT3-ITD-negativem Mutationsstatus, CEBPA Mutationen und restlicher Genotypen bei Patienten < 60 Jahre (Schlenk et al. 2008)

Mutant *NPM1* without *FLT3-ITD*: Vorhandensein einer *NPM1* Mutation in Abwesenheit einer *FLT3-ITD* Mutation

Mutant *CEBPA*: Vorhandensein einer *CEBPA* Mutation

Other genotypes: Alle restlichen Genotypen

Mutationen des *FLT3* Gens sind die zwei häufigsten Mutationen bei der AML. Hier lassen sich grundlegend 2 Mutationen unterscheiden. Einerseits Mutationen in der

Juxtamembran-Domain (JM), welche essentiell für die Auto-Inhibierung der Tyrosin-Kinase ist. Meist liegt hier eine ITD unterschiedlicher Länge und Insertionslokalisierung in ca. 28-34% der Fälle bei NK-AML vor (Döhner et al. 2008, Mrozek et al. 2007, Schlenk et al. 2008). Andererseits sind Punktmutationen, kurze Insertionen und Deletionen am Codon 835 und 836 bekannt. Diese Lokalisation stellt einen Teil der TKD dar und beinhaltet den Activation-Loop (AL) am C-terminalen Ende der TKD. *FLT3*-TKD liegen in ca. 11-14% aller Fälle bei NK-AML vor (Döhner et al. 2008, Mrozek et al. 2007, Schlenk et al. 2008). *FLT3*-ITD finden sich in ca. 25% der NK-AML. Hier bietet die konstitutiv aktivierte Kinase *FLT3* ein attraktives Target für eine molekulare Therapie, insbesondere da Patienten mit *FLT3*-ITD Mutation (unter NK-AML Patienten) ein signifikant schlechteres Outcome als Patienten ohne *FLT3*-ITD Mutation zeigen. Erste *FLT3*-Inhibitoren sind bereits in klinischer Erprobung (Döhner et al. 2008).

Die Analysen zur prognostischen Bedeutung der Genmutationen *CEBPA* und *FLT3* wurden an jüngeren erwachsenen AML Patienten durchgeführt. Systematische Analysen älterer AML Patienten sind derzeit nicht vorhanden.

Wie bereits in Absatz 1.4. genannt wurde von Falini et al. 2005 erstmals die Genmutation des *Nucleophosmin* mit der Erkrankung AML in Zusammenhang gebracht. Die Mutation des *NPM1* Gens ist die häufigste genetische Veränderung der AML des Erwachsenen. Bei der AML des Erwachsenen wird sie in ca. einem Drittel (25-35%) aller Fälle gefunden, AML Patienten mit normalem Karyotyp (NK-AML) weisen zu 45-64% eine Mutation auf. (Falini et al. 2007, Döhner H. 2007, Döhner K. et al. 2008, Schlenk et al. 2008).

Die prognostische Bedeutung der *NPM1* Genmutationen wurde in zahlreichen Studien untersucht wobei hier nur die wichtigsten erwähnt werden sollen.

Döhner et al. untersuchten 2005 in einer Studie an 300 jüngeren Patienten im Alter von 16-60 Jahren die prognostische Bedeutung von *NPM1* Mutationen. Es wurden nur Patienten mit normalem Karyotyp (NK-AML) in die Studie eingeschlossen. Bei 48% der Patienten wurde eine *NPM1* Mutation identifiziert

welche alle zu einem Frameshift im C-terminalen Ende des *NPM1* Proteins führen. Patienten mit einer *NPM1* Genmutation wiesen signifikant häufiger eine zusätzliche *FLT3*-ITD Genmutation auf. Eine *NPM1* Mutation sowie eine *FLT3*-ITD Mutation allein konnten als unabhängige prognostische Variable für das Erreichen einer kompletten Remission (CR) nicht bestätigt werden. Die Kombinationen beider vorhandenen bzw. nicht vorhandenen Mutationen ergaben jedoch ein signifikant häufigeres Erreichen einer kompletten Remission (CR) bei Vorliegen einer *NPM1* Mutation in Abwesenheit einer *FLT3*-ITD Mutation ($NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$). Die Rate für das Erreichen einer kompletten Remission (CR) lag für diese Gruppe bei 86%. In univariaten Analysen konnte das Vorhandensein der Genmutation *NPM1* auch ein signifikant besseres Rezidivfreies Überleben (RFS) und Gesamtüberleben (OS) aufzeigen. Dies ist im wesentlichen in der günstigen Prognose der Subgruppe $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$ begründet. Die restlichen 3 Subgruppen ($NPM1^{neg}/FLT3-ITD^{neg}$, $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{mut}$ und $NPM1^{neg}/FLT3-ITD^{mut}$) isoliert betrachtet ergaben in Analysen keinen Unterschied in Hinsicht auf RFS und OS (Döhner et al. 2005).

Multivariable Analysen ergaben neben dem kombinierten Mutationsstatus $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$ auch die Mutation des *CEBPA* Gens und die Verfügbarkeit eines HLA-kompatiblen Spenders als eigenständigen prognostisch günstigen Faktor für das Gesamtüberleben (OS), eine sekundäre AML (s-AML) und erhöhte Werte des Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) hingegen stellten einen ungünstigen Faktor für OS dar (Döhner et al. 2005).

Bei einem Vergleich von Schnittger et al. 2005 mit verschiedenen molekularen Markern (*MLL*-PTD, *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD, *NRAS*, *KIT*, *CEBPA*) incl. *NPM1* bezüglich des Outcome zeigte sich in der *NPM1* Gruppe eine höhere komplette Remissionsrate (complete remission, CR), ein längeres Gesamtüberleben (overall survival, OS) sowie ein signifikant längeres Ereignis-freies Überleben (event-free survival, EFS). Es wurden Patienten mit NK-AML im Alter von 17 – 82 Jahren in die Studie eingeschlossen. *NPM1* Mutationen waren signifikant häufiger kombiniert mit *FLT3*-ITD Mutationen. Auch hier zeigte der kombinierte Mutationsstatus $NPM1^{+}/FLT3-ITD^{-}$ einen besonders günstigem Einfluß auf OS und

EFS. Eine isolierte Betrachtung der Älteren Patienten erfolgte nicht (Schnittger et al. 2005).

Auch die Gruppe von Verhaak und Kollegen konnte analoge Ergebnisse aufzeigen. Wie bei Schnittger et al. waren hier Patienten nahezu aller Altersklassen (15-78 Jahre) in die Studie inkludiert. Die Patienten mit kombiniertem Mutationsstatus $NPM1^{pos}/FLT3-ITD^{neg}$ hatten einen günstigeres OS und EFS. Außerdem wurde eine inverse Korrelation von $NPM1$ Mutationen und $CEBPA$ Mutationen aufgezeigt. Auch hier wurden die Analysen an allen Patienten unabhängig vom Alter durchgeführt (Verhaak et al. 2005).

Becker und Kollegen untersuchten 2010 den günstigen prognostischen Einfluß von mehreren Genmutationen ($FLT3$, $CEBPA$, $WT1$) inklusive $NPM1$ bei 148 Patienten im Alter ≥ 60 Jahre mit de novo AML. Patienten mit $NPM1$ Mutation entsprachen 56% aller Patienten und hatten eine signifikant höhere Rate für komplette Remission (CR) mit 84% vs. 48%, eine signifikant längere Dauer des Erkrankungsfreien Überlebens (DFS) mit 23% vs 10% bzgl. der 3-Jahres-Rate und ein signifikant längeres Gesamtüberleben (OS) mit 35% vs 8% beim 3-Jahresüberleben. Eine Subanalyse zeigte, dass dieser prognostisch günstige Einfluß der $NPM1$ Mutation vor allem bei Patienten ≥ 70 Jahre vorlag. In dieser Studie waren nur Patienten mit NK-AML in die Studie aufgenommen (Becker et al. 2010).

Eine weitere Studie wurde 2009 von Büchner et al. veröffentlicht welche unter anderem den Einfluß des Alters und der Mutationen $NPM1$ und $FLT3$ auf die Prognose bei 1284 Patienten im Alter von 16 bis 85 Jahren beurteilte. Hier wurde neben dem Karyotyp eine erhöhte Leukozytenzahl, erhöhte Werte des Enzyms LDH und ein Alter über 60 mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert. In multivariaten Analysen wurde bei ausschließlich normalem Karyotyp (NK-AML) die kombinierte Genmutation $NPM1^{pos}/FLT3-ITD^{neg}$ als signifikant bessere Prognose aufgezeigt (Büchner et al. 2009).

AML mit *NPM1* Mutation sind sind mit bestimmten klinischen Eigenschaften. Immunphänotypischen Charakteristika und genetischen Aberrationen assoziiert. In der WHO-Klassifikation der AML wurde keine Gruppe mit „akuter myeloider Leukämie, nicht anderweitig charakterisiert“ beschrieben, worunter nun auch alle NK-AML mit bekannter *NPM1* Mutation eingeordnet wurden. In einem veröffentlichten Beitrag warfen Falini und Kollegen aufgrund der hohen Anzahl der *NPM1*^{pos} NK-AML in Assoziation mit der signifikante besseren Prognose die Frage auf die Mutation des *NPM1* als neue Entität in die WHO-Klassifikation der AML einzuführen (Falini et al. 2008, Pasqualucci et al. 2006). Dem wurde Rechnung getragen und 2008 die Genmutation *NPM1* gemeinsam mit der Genmutation *CEBPA* vorläufig als eigenständige Entität in den ersten Unterpunkt „AML mit rekurrenten genetischen Abnormalitäten“ aufgenommen (Vardiman et al. 2009).

1.7. All-Trans-Retinol-Säure (ATRA)

Retinsäure (Retinoic Acid, RA) ist ein biologisch aktives Derivat des Vitamin A (Retinol) und gehört zu den Retinoiden. Es ist ein kleines lipophiles Molekül und kann Zellmembranen passieren. Retinol wird im Gastrointestinaltrakt durch Spaltung von Retinylestern freigesetzt und dort resorbiert. Retinylesterverbindungen kommen unter anderem in tierischem Fett oder in pflanzlichen Karotinoiden vor (Napoli 1999, Gaines und Berliner 2003).

Retinol wird nach Resorption aus dem GI-Trakt in die Leber aufgenommen und dort von Retinoic Binding Proteins (RBP) gebunden und der Komplex über RBP-spezifische Membranrezeptoren in Targetzellen aufgenommen, wo Retinol von zellulären Retinol Binding Proteins (CRBP) gebunden wird. Nun greifen zwei Enzyme ein. Erstens kann die spezifische zytosolische NADP⁺-abhängige Retinol Dehydrogenase an diesem Komplex (Retinol-CRBP) ansetzen und die Konversion des Retinols in Retinal katalysieren. Im zweiten Schritt wird Retinal von der Retinal-Dehydrogenase irreversibel in all-trans Retinsäure (ATRA) umgewandelt (Gaines und Berliner 2003, Posch et al. 1992, Napoli 1999).

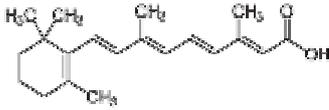


Abbildung 4: All-trans Retinsäure (ATRA) (Napoli et al. 1999)

Die Retinsäure stellt einen wichtigen Regulator in der Embryogenese und der Myelopoese dar und spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung der myeloiden Vorläuferzellen. Dies geschieht auf einem Pathway der vorwiegend über den Retinsäurerezeptor alpha ($RAR\alpha$) abläuft. Dieser ist im Zellkern lokalisiert, bindet an Retinsäure und nimmt Einfluss auf mehrere sog. Retinoic Acid Responsive Elements (RARE). Für den $RAR\alpha$ werden derzeit zwei gegensätzliche Funktionsmechanismen postuliert. Zum einen die Eigenschaft als Repressor der Genexpression durch das Fehlen eines Liganden, also der RA. Zum anderen die Eigenschaft als transkriptioneller Aktivator bei Bindung der RA. Transkriptionelle Corepressoren und Coaktivatoren wiederum können jede dieser Funktionen beeinflussen, wodurch ein empfindliches Gleichgewicht entsteht. Dieser Pathway ist vor allem wichtig für die Entwicklung der Zelllinie der Neutrophilen und wird gemeinsam mit weiteren Elementen auch als Retinoic Signalling Pathway bezeichnet. Retinsäurerezeptoren bilden eine Familie mit drei verwandten Rezeptoren ($RAR\alpha$, $RAR\beta$ und $RAR\gamma$). $RAR\alpha$ reguliert die Transkription von Retinsäure Target Genen als Komplex zusammen mit einem Retinoid X Rezeptor (RXR). Auch diese bilden eine Familie mit drei Isoformen ($RXR\alpha$, $RXR\beta$ und $RXR\gamma$). Nach Bildung des Heterodimers RAR/RXR kann der Komplex ATRA binden und hat eine hohe Affinität für DNA Response Elements (Gaines und Berliner 2003).

In der Therapie der akuten Promyelozytenleukämie (APL) konnten in den neunziger Jahren große Erfolge verbucht werden. Durch den Einsatz von ATRA konnte hier eine signifikante Verbesserung der Prognose erreicht werden. Dieser Effekt konnte ausschließlich beim Subtyp M3 (nach der FAB-Klassifikation der AML, siehe Kapitel 1.1.) gezeigt werden (Tallman et al. 1997). Durch die charakteristische, der APL zugrundeliegende Translokation $t(15;17)$ liegt ein Defekt des Retinsäurerezeptor alpha ($RAR\alpha$) vor. Dieser Rezeptordefekt kann

durch den Overload mit ATRA über komplexe Mechanismen überwunden werden und somit folgen die Ausdifferenzierung der leukaemischen Promyelozyten in reife Zellen (Tallman et al. 1997, Chomienne et al. 1996, Löwenberg et al. 2003). Patienten mit APL haben eine sehr gute Prognose. In mehreren Studien wurde über das Erreichen einer komplette Remission (CR) bei 86-100% der Patienten durch alleinige Behandlung mit ATRA berichtet (Tallman et al. 1997).

In den folgenden Jahren versuchte man die Wirkungen der Substanz ATRA bei leukämischen Blasten einer Non-APL AML zu erforschen. Bei in vitro Experimenten fiel eine Veränderung der Empfindlichkeit der leukämischen Zellen auf Apoptose-induzierende Chemotherapeutika auf, ausgelöst durch die Substanz ATRA. Als Mechanismus wurden eine Down-Regulation oder post-translationalen Modifikation wie Phosphorylierung des anti-apoptischen Proteins *bcl-2* und anderer Proteine wie z.B. Survivin postuliert. Weiterhin spielt die Reihenfolge der Gabe der Chemotherapeutika eine entscheidende Rolle. So muss die Substanz ATRA nach der Gabe der Chemotherapeutika verabreicht werden. Die Gabe vor Verabreichung der Chemotherapeutika scheint einen entgegengesetzten negativen Effekt auf die Apoptose-induzierende Wirkung der zytotoxischen Substanzen zu haben (Schlenk et al. 2008, Adreeff et al. 1999, Hu et al. 1995, Hu et al. 1998, Yang et al. 1993, Ketley et al. 1997, Carter et al. 2001).

In der Studie AML HD98B konnte dargestellt werden dass die Gabe von ATRA zusätzlich zur intensiven Chemotherapie die Prognose der AML Patienten über 60 Jahre verbesserte. In weiteren Analysen wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Genotyp $NPM1^{pos}/FLT3-ITD^{neg}$ und der Behandlung mit ATRA dargestellt und gezeigt, dass nur in dieser AML Subgruppe ein günstiger Effekt von ATRA auf die Rate des Rezidivfreien Überlebens (RFS) und des Gesamtüberlebens (OS) nachweisbar ist. Diese Daten legen nahe, dass der Genotyp $NPM1^{pos}/FLT3-ITD^{neg}$ einen prädiktiven Marker für die positive Wirkung von ATRA, zusätzlich zu intensiver Chemotherapie gegeben, darstellt (Schlenk et al. 2008).

1.8. Zielsetzung

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, eine 350 Personen fassende Kohorte älterer AML Patienten, die im Rahmen der Studien AML HD98-B und AMLSG 06-04 behandelt wurden, auf das Vorliegen einer *NPM1* Genmutation zu untersuchen.

Dabei sollten folgende Punkte adressiert werden: Die Inzidenz von *NPM1* Mutationen sollte bei älteren AML Patienten > 60 Jahre ermittelt werden und mit den Ergebnissen von jüngeren AML Patienten verglichen werden. Darüber hinaus sollte geprüft werden ob *NPM1* Mutationen mit bestimmten zytogenetischen Subgruppen assoziiert sind und wiederum das Verteilungsmuster mit den jüngeren Patienten verglichen werden.

Zuletzt sollten die aus der AMLHD98B Studie generierten Daten zum möglichen prädiktiven Wert von *NPM1* Mutationen für eine additive ATRA-Therapie bei AML Patienten evaluiert werden. Diese Arbeit sollte zur Beurteilung der klinischen Relevanz von *NPM1* Mutationen bei AML Patienten im Alter von über 60 Jahren beitragen. Bislang gibt es für diese älteren AML Patienten nur sehr wenige Daten zur prognostischen Bedeutung und Inzidenz von AML-relevanten Genmutationen. Somit ist diese Arbeit die erste, in der an einer größeren Patientenpopulation im Rahmen von Studien systematisch *NPM1* Mutationsanalysen durchgeführt wurden. Hinzu kommt, dass für einen großen Teil der Fälle der Mutationsstatus zum *FLT3*-ITD Status vorlag. Die Bedeutung dieser Genmutation im Kontext mit *NPM1* Mutationen wurde bereits bei jüngeren AML Patienten unter Punkt 1.5. erörtert. Durch Korrelation mit klinischen Daten wie dem Ansprechen auf die Therapie, Häufigkeit und Dauer der kompletten Remission, Rezidivrate und Überlebenszeit sollten Rückschlüsse auf die prognostische bzw. prädiktive Bedeutung von *NPM1* Mutationen aufgezeigt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien- und Geräteverzeichnis

2.1.1. Material

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
1,5 ml Tube	Eppendorf, Hamburg
100% Ethanol	RdH, Seelze
10x Blue Juice Gel loading buffer	Invitrogen, Groningen (NL)
8-cap strip	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit:	
-fluoreszenzmark. ddATP	Applied Biosystems, Darmstadt
-fluoreszenzmark. ddCTP	Applied Biosystems, Darmstadt
-fluoreszenzmark. ddGTP	Applied Biosystems, Darmstadt
-fluoreszenzmark. ddTTP	Applied Biosystems, Darmstadt
-dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Applied Biosystems, Darmstadt
-Ampli Taq DNA Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
-MgCl ₂	Applied Biosystems, Darmstadt
-Tris-HCl Puffer, pH 9.0	Applied Biosystems, Darmstadt
Agarose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
AmpliTaq Gold® with Gene Amp®	Applied Biosystems, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
DNA-Ladder	Invitrogen, Groningen (NL)
DNAzol-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
dNTP (dATP, dTTP, dGPT, dCPT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dye Ex Spin Kit	Qiagen, Hilden
DyeEx tm 96 plate (1)	Qiagen, Hilden
Erlenmeyerkolben 250ml	Schott Duran, Mainz
Ethanol	RdH, Seelze
Ethidiumbromidbad:	
-Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
-Ethidiumbromidlösung	Eurobio, Courtaboeuf (Frankreich)
HPLC-Wasser	Merck, Darmstadt

Mikrotiterplatte	Greiner bio-one, Frickenhausen
Optical 96-well reactic plate	Applied Biosystems, Darmstadt
PCR-Tubes	Applied Biosystems, Darmstadt
Primer F	Thermo Electron GmbH, Ulm
Primer R	Thermo Electron GmbH, Ulm
Primer R	Thermo Electron GmbH, Ulm
Primer R2	Thermo Electron GmbH, Ulm
QIAquick PCR Purification Set:	Qiagen, Hilden
- PE Puffer	Qiagen, Hilden
- PB Puffer	Qiagen, Hilden
- EB Puffer	Qiagen, Hilden
- QIAquick collection tube	Qiagen, Hilden
- QIAquick spin column	Qiagen, Hilden
RNAse A	Roche Diagnostics, Mannheim
TAE (Tris-Acetat-EDTA):	
- 100% Essigsäure	Roth, Karlsruhe
- EDTA	Merck, Darmstadt
- Tris-Acetate	USB, Cleveland (USA)
Zentrifuge: Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge: Heraeus Biofuge fresco	Thermo Electron Corporation, Ulm
Zentrifuge: Heraeus Biofuge Pico	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold

2.1.2. Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Computer: Power Macintosh 7200/90	Applied Biosystems, Darmstadt
Elektrophorese-Kammer	MBT Brand, Gießen
Gene Amp PCR System 2400	Applied Biosystems, Darmstadt
Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems, Darmstadt
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt

Heizblock: Grant QBT 2	Grant Instruments Ltd., Cambridge (GB)
Heraeus Multifuge 4 KR	Kendro Laboratory Products, Osterode
Horizontal Gel Electrophoresis System:	
- Horizon® 11.14	Gibco BRL, Gaithersburg (USA)
- Horizon® 20.25	Gibco BRL, Gaithersburg (USA)
Kapillare: 310 Genetic Analyzer	
- 47cm x 10µm Capillaries	Applied Biosystems, Darmstadt
Magnethörer MR 3002 S8	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle	Moulinex, München
Sequencing Analysis 3.4	Applied Biosystems, Darmstadt
Software: ABI PRISM 310 Collection	Applied Biosystems, Darmstadt
Syngene Biolmaging Systeme	VWR international GmbH, Ismaning
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Thermomixercomfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Photometer Ultrospec III	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Vortex Reax 1	Heidolph, Schwabach
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Waage: Precisa 220M	Oerlikon AG, Zürich (Schweiz)

2.2. Patientenpopulation und -therapie

2.2.1. Patientenpopulation

Insgesamt wurden 385 Patienten in die AML HD98-B Studie eingeschlossen. Von diesen 385 Patienten wurden im Rahmen dieser Arbeit 303 auf das Vorliegen einer *NPM1* Mutation untersucht. Zusätzlich wurden 47 Patienten mit NK-AML aus der AMLSG 06-04 Studie untersucht. Einschlusskriterium beider Studien waren jeweils ein Alter > 60 Jahre, eine obere Altersgrenze wurde nicht festgelegt. Die Diagnose musste hierbei morphologisch, zytochemisch und durch immunologische Phänotypisierung gesichert sein. Im Rahmen der beiden Studien sollte bei allen Patienten eine zytogenetische Analyse durchgeführt werden.

Bei Diagnosestellung wurden aus dem Knochenmark (KM) und/oder aus dem peripherem Blut (PB) Proben gewonnen. Eine morphologische Diagnose wurde anhand der Kriterien der FAB-Klassifikation gestellt, später erfolgte eine Einteilung nach der WHO-Klassifikation (siehe 1.1.). Aus diesen PB- und KM-Proben wurde DNA extrahiert und anschließend auf das Vorliegen von Mutationen des *NPM1* Gens untersucht.

Alle Patienten wurden über den Charakter der Studie aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung sowohl zur Therapie als auch zur Archivierung und genetischen Analyse der KM- und/oder PB-Proben gemäß der Helsinki-Deklaration.

2.2.2. Therapie der Patienten

Das AML HD98-B Protokoll der AML Study Group (AMLSG) bestand aus einer Doppelinduktionstherapie mit Idarubicin, Cytosin-Arabinosid und Etoposid (ICE). Die Doppelinduktion wurde randomisiert durchgeführt, es erfolgte die Unterteilung der Patienten in den Studienarm A1 mit ICE I versus den Studienarm B1 mit all-trans Retinolsäure (ATRA) plus ICE I (A-ICE I). Nach der ersten Induktionstherapie erfolgt zwischen Tag 28 und 35 unabhängig von der hämatologischen Rekonstitution eine Knochenmarkspunktion (KMP) zur Kontrolle und Evaluation des Remissionsstatus. Patienten mit einer resistenten Erkrankung (RD) erhalten nach dem ersten Induktionszyklus anstatt ICE II im Studienarm A1 bzw. A-ICE im Studienarm B1 einen Zyklus mit höherdosiertem Cytosin-Arabinosid und Etoposid (HAE) plus ATRA (A-HAE). RD wurde anhand des Blastenanteils im Knochenmark (KM) definiert. RD lag vor bei >25% Blasten im Knochenmark (KM) oder einer Reduktion des Blastenanteils im KM um <50% und/oder persistierender extramedullärer Manifestation nach ICE I. Im Falle eines Zyklus A-HAE wurde im Anschluss wiederum zwischen Tag 28 und 35 nach Beginn dieses Zyklus eine KMP zur Remissionskontrolle durchgeführt. Bei einer kompletten Remission (CR) oder partiellen Remission (PR) erfolgte eine zweite Induktionstherapie mit den gleichen Studienarmen (A1 und B1) ICE II versus A-

ICE II. Wieder wurde im Anschluss das Knochenmark (KM) nach einer KMP untersucht. Nun erhielten die Patienten drei bis vier Wochen nach Rekonstitution von ICE II, A-ICE II oder A-HAE in CR (<5% Blasten im KM) eine erste Konsolidierungstherapie mit Cytosin-Arabinosid und Mitoxantrone (HAM) für den Studienarm A1 versus ATRA plus HAM (A-HAM) für den Studienarm B1. Danach wurde erneut randomisiert zwischen einer zweiten Konsolidierungstherapie versus Erhaltungstherapie mit Beginn ca. vier Wochen nach Rekonstitution von HAM bzw. A-HAM. Der Studienarm A2 erhielt eine intensive Spätkonsolidierung mit einem Chemotherapiezyklus Idarubicin und Etoposid (IE) intravenös (i.v.), Patienten des Studienarms B2 dagegen eine Erhaltungstherapie mit 12 Zyklen IE per os (p.o.) mit einer Zyklusdauer von jeweils 28 Tagen (Döhner et al. 2000). Zur Übersicht des kompletten Therapieplans siehe Abbildung 5 (Döhner et al. 2000).

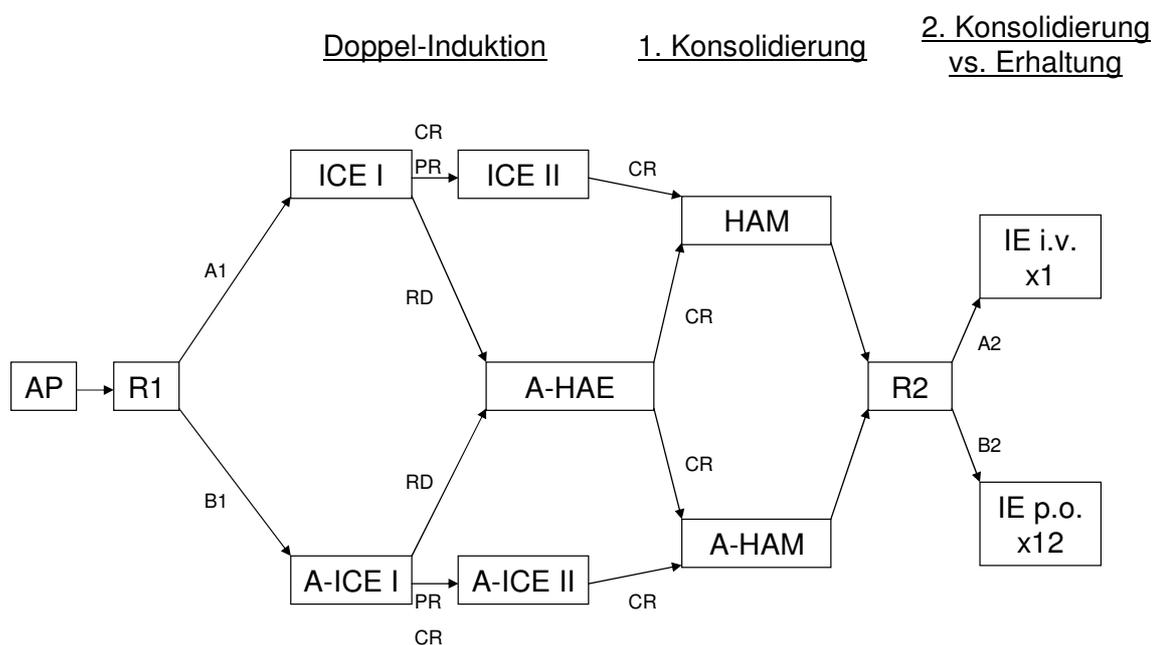


Abbildung 5: Schaubild zum Therapieplan der HD98-B Studie
 AP, alle Patienten; R1, Randomisierung 1; A1, Studienarm A1; B1, Studienarm B1; ICE, Idarubicin, Cytosin-Arabinosid und Etoposid; A-ICE all-trans Retinsäure (ATRA) + ICE; CR, komplette Remission; PR, partielle Remission; RD, refraktäre Erkrankung; A-HAE, Cytosin-Arabinosid, Etoposid und ATRA; HAM, Cytosin-Arabinosid und Mitoxantrone; A-HAM, HAM + ATRA; R2, Randomisierung 2; A2, Studienarm A2; B2, Studienarm B2; IE, Idarubicin und Etoposid; i.v., intravenös; p.o., per os;

Der Therapieplan der Studie AMLSG 06-04 basiert auf den Ergebnissen der AML HD98-B Studie, die einen signifikanten Überlebensvorteil für Patienten mit ATRA Therapie zeigen konnte. Wichtigste Modifikation des neuen Therapieplans war somit dass ausnahmslos alle Patienten ATRA erhielten. Wie in der AML HD98-B Studie wurde eine Doppelinduktion und eine erste und zweite Konsolidierungstherapie durchgeführt. In der ersten Induktion wurde wie im Studienarm B1 der AML HD98-B Studie Idarubicin, Cytosin-Arabinosid (Cytarabin) und ATRA (IC-A) gegeben, ATRA jedoch mit 45mg/m^2 von Tag 4-6 anstatt Tag 3-5 und mit 15mg/m^2 von Tag 7-28 anstatt Tag 6-28. Auf Etoposid innerhalb des Induktionszyklus wurde verzichtet. Wie in der AML HD98-B Studie wurde eine Evaluierung des Therapieerfolges durch eine KMP am Tag 28-35 nach Beginn des Induktionszyklus durchgeführt und bei kompletter Remission (CR) oder partieller Remission (PR) und fehlenden Kontraindikationen ein zweiter, mit dem ersten identischer, Induktionszyklus (IC-A II) gestartet. Im Falle eines Nicht-Ansprechens auf die erste Induktionstherapie (IC-A) erfolgte kein A-HAE Zyklus. Diese Patienten wurden aus der Studie herausgenommen und nachbeobachtet (off study). Bei kompletter Remission (CR) wurde die erste Konsolidierungstherapie mit Cytarabin, Mixantrone und ATRA (HAM-A) begonnen. Im Vergleich mit der AML HD98-B Studie wurde jedoch Cytarabin mit erhöhter Dosis und ATRA mit späterem Beginn (Tag 4-28 anstatt Tag 3-28) verabreicht. Nach erneuter Evaluierung des Therapieerfolges durch eine KMP am Tag 43-50 wurde eine zweite Konsolidierungstherapie angeschlossen. Angelehnt an den Studienarm A2 der AML HD98-B Studie wurde zur intravenösen Gabe von Idarubicin und Etoposid (IE) noch ATRA (IE-A) in niedriger Dosierung (15mg/m^2) von Tag 4-28 hinzugefügt (Schlenk et al. 2006).

Zur Übersicht des kompletten Therapieplans der AMLSG 06-04 Studie siehe Abbildung 6 (Schlenk et al. 2006).

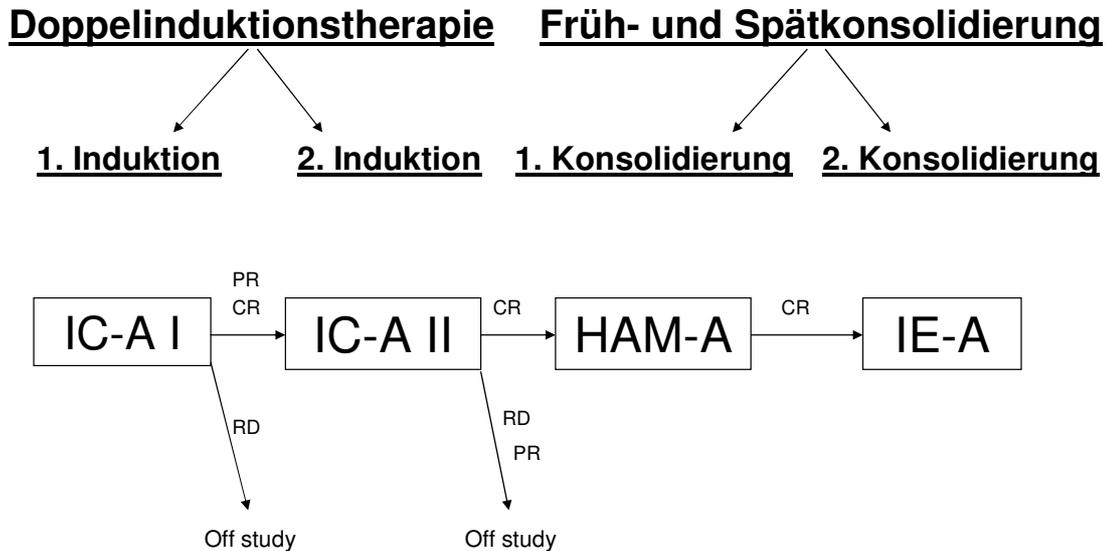


Abbildung 6: Schaubild zum Therapieplan der AMLSG 06-04 Studie
 IC, Idarubicin und Cytosin-Arabinosid; IC-A, IC plus all-trans Retinsäure (ATRA); IC-A I, erste Induktion mit IC-A; IC-A II, zweite Induktion mit IC-A; CR, komplette Remission; RD, refraktäre Erkrankung; PR, partielle Remission; HAM, Cytosin-Arabinosid und Mitoxantrone; HAM-A, HAM + ATRA;

2.3. Materialgewinnung

Für die zytogenetische und genetische Analyse wurde Knochenmark (KM) mittels einer Knochenmarkpunktion (KMP) im Bereich des Beckenkamms und/oder peripheres Blut (PB) durch eine Venenpunktion gewonnen. Durch Natrium-Heparin (Verhältnis 1:10) wurden die Proben unmittelbar nach Entnahme heparinisiert. Mononukleäre Zellen waren das Ausgangsmaterial für die durchzuführenden Untersuchungen. Diese wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen und im Anschluß bei -80°C archiviert.

2.4. Methodenübersicht

Hier soll eine kurze Auflistung die Abfolge der einzelnen Schritte zeigen um einen Überblick über die gesamte experimentelle Arbeit zu geben. Zuerst erfolgte die Extraktion der DNA aus den mononukleären Zellen der gewonnenen Proben. Im Anschluß wurde eine Polymerase Chain Reaction (PCR) durchgeführt um die relevanten Sequenzabschnitte der DNA zu vervielfältigen. Darauf folgte eine

Gelelektrophorese der entstandenen PCR-Produkten zur Qualitätskontrolle. Im Falle einer ungültigen Kontrolle musste die PCR wiederholt werden und erneut durch eine Gelelektrophorese kontrolliert werden. Sofern die Positiv- und Negativkontrollen unauffällig waren wurden die PCR-Produkte aufgereinigt. Diese wurden dann für die Sequenzierung mittels einer erneuten linearen PCR, auch Cycle Sequencing Reaction (CSR) genannt, amplifiziert. Diese CSR-Produkte wurden wieder aufgereinigt und anschließend sequenziert. Die ausgewerteten Sequenzen wurden anhand der Online-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI), welche hierfür das Online-Programm Blast zu Verfügung stellt, abgeglichen.

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)

2.5. DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde an mononukleären Zellen des Knochenmarks bzw. des peripheren Blutes durch eine DNAzol-Lösung (Fa. Gibco BRL, Eggenstein) vorgenommen. Im ersten Schritt wurden 2ml der DNAzol-Lösung mit den mononukleären Zellen gemischt, was eine Zellwandlyse zur Folge hat. Im Anschluss wurde 1ml Ethanol (100%) (Fa. RdH, Seelze) dazugegeben und durch Schwenken vermischt. Dieser Vorgang wurde zweimal nacheinander durchgeführt. Das entstandene Gemisch wurde dann auf zwei Eppendorf-Behälter aufgeteilt und bei 13.000 Umdrehungen pro Minute 15 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge Pico, Fa. Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold). Nach vorsichtigem Entfernen des Überstands wurde Ethanol (95%) zum Pellet zugegeben und 10 Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wieder erneut abgekippt. Auch dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und anschliessend der Eppendorf-Behälter für 5 Minuten kopfüber zum Trocknen aufgestellt. Danach wurde das Pellet mit 100µl Wasser für Infusionslösungen resuspendiert und über Nacht bei 37°C geschüttelt (Thermomixer 5437, Fa. Eppendorf, Hamburg). Am folgenden Tag wurden 5µl RNase A (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) pro Eppendorf-Gefäß zugegeben. Nach kurzem Zentrifugieren bei 13.000 Umdrehungen pro Minute wurden die Behälter für eine halbe Stunde bei 37°C auf den Heizblock (QBT2, Fa. Grant

Instruments Ltd., Cambridge, Großbritannien) gegeben, was in einem Verdau von RNA-Fragmenten resultiert. Nach Zentrifugation, Durchmischen der Lösung mit einer Pipette und Wiederholen der Zentrifugation war die DNA-Extraktion fertig. Eine photometrische Konzentrationsmessung (UV-Photometer Ultrospec III, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde zur Mengen- und Qualitätsbestimmung der entstandenen DNA-Lösung durchgeführt. Diese wurde zur weiteren Bearbeitung im Kühlfach bei -20 °C aufbewahrt wurde.

2.6. Polymerase Chain Reaction (PCR) aus genomischer DNA

Das NPM1 Gen besteht aus 12 Exons. Für die gezielte Amplifikation des zwölften Exons wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Als Ausgangsmaterial wurde genomische DNA verwendet welche zuvor, wie bereits erläutert, aus den mononukleären Zellen des Knochenmarks oder des peripheren Blutes extrahiert wurden.

2.6.1. Primer

Für die gezielte Amplifikation der Sequenz des zwölften Exons des *NPM1* Gens aus genomischer DNA wurden 2 Oligonucleotide generiert, welche sich komplementär an die angrenzende Intronsequenz anlagern (Falini et al. 2005). Diese synthetischen Oligonukleotide, auch Primer genannt, wurden über die Firma Thermo Electron GmbH, Ulm bezogen. Es wurden die Primer NPM1-F (5' - TTA ACT CTC TGG TGG TAG AAT GAA - 3') und NPM1-R (5' - CAA GAC TAT TTG CCA TTC CTA AC - 3') verwendet. F steht hierbei für Forward- und R für Reverse-Leserichtung.

Zur Orientierung der Primerlokalisierung zeigt die Abbildung 7 einen Ausschnitt der Sequenz von *NPM1* (GenBank Eingangsnummer AC093246). Diese Darstellung ermöglicht eine Übersicht der Sequenz von Exon 12 und die Lokalisation der Primer F, R und R2. Primer R2 wird bei der Cycle Sequence Reaction (CSR) benötigt (siehe Kapitel 2.9.).

```

84001 tcatcaggag gtgggaacac agcactaaat ccttatgatg aaaaagtggg tagctccaga
84061 gagaatattg aaggggaggg cagggacatt ctcatagaat tttacaagac tatttgccat Primer R
84121 ccctaactac attaattatt tctttgacaa agtataaagc agttaataaa gtcaatagaa
84181 accgtgctac tttattaataa tactgagttt tatttcacat gtatatTTTT gtctccccac
84241 catttccatg tctgaccacc gctactacta tgtcctatca taacattcca tacatactta
84301 aaaccaagca aaggggtggag ttccatcttt aaaaactaaa cagggcatttt ggacaacaca Primer R2
84361 ttcttggcaa tagaacctgg acaacattta tcaaacacgg tagggaaagt tctcactctg
84421 cattataaaa aggacagcca gatatcaact gttacagaaa tgaaataaga cggaaaattt
84481 tttacaacaaat tgtttaaaact attttcttaa agagacttcc tccactgcca gagatcttga
84541 atagcctgga aaaaaaaaaa aagaaatgtg gttaaggaac cacaacactt catagacatc
84601 aataaattaa atgtctcttt gcatagtcca acatctattt ttcattctac caccagagag Primer F
84661 ttaaactctag ataaagatat gactccaaga aaatttatac tcagatgtaa ttaattcca
84721 aacacttttaa tcagtcataa aaatgtgaac aaataactaa taattattta atagttagc
84781 attatttact taaggaaatc aacagaaaga acagagacc atatggcaa tgttacttcc
84841 aacttcatct cccgagatca gctttagagt tggccagatt tggcaataaa agttacataa
84901 acaccagaaa cttattctga attgcctgtg catgtgtgcc tgggcatgtg tacatttga
84961 aaaaactata tgctgaggct aggcacggct gctcacgctt gtaatcccta cactttggga
    
```

Abbildung 7: Ausschnitt der *NPM1* Exon 12 Sequenz auf Chromosom 5 (GenBank Eingangsnummer AC093246)

Gelb hinterlegt, Primer F/R/R2; **Hellblaue Schrift,** Bereich des Exon 12; **Dunkelblaue Schrift,** Bereich, welcher für die Aminosäuren 283 bis 294 codiert

Aus der jeweiligen Stocklösung wurden durch Verdünnung Gebrauchslösungen hergestellt. Für die Polymerase Chain Reaction (PCR) aus genomischer DNA wurden somit durch Zugabe von 10µl Stocklösung der Primer F und R zu 90µl Aqua ad iniectabilia (Fa. Braun, Melsungen) eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 10 pmol/µl hergestellt. Die fertigen Gebrauchslösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.2. Reagenzien

Für die PCR wurde der Hot Star Taq DNA Polymerase Kit (Applied Biosystems) verwendet. Er enthält folgende Lösungen: 10x Puffer, MgCl₂-Lösung und Gold Polymerase. Das Enzym Gold Polymerase wird erst bei Erhitzung auf 95 °C für 15 Minuten aktiviert. Bei Raumtemperatur zeigt es keine Aktivität, wodurch die Entstehung unerwünschter PCR Produkte und Primer-Dimere verhindert wird. Zusätzlich wurden eine dNTP-Stocklösung, Primer NPM1-F / NPM1-R (Firma Thermo Electron GmbH, Ulm) und Aqua ad iniectabilia (Fa. Braun, Melsungen) eingesetzt. Zum Bereiten der dNTP-Stocklösung wurden zu 60 µl Aqua ad iniectabilia je 10µl dATP, dTTP, dGTP und dCTP in der Konzentration 100mM zugegeben, um eine Konzentration von 10mM je dNTP zu erreichen (Firma Roche Diagnostics, Mannheim). Alle Lösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.3. Reaktionsansätze

Ein einzelner Ansatz bestand aus 35µl Aqua ad iniectabilia, 5 µl 10x Puffer, 6 µl MgCl₂-Lösung, 0,5 µl dNTP-Stocklösung, 0,5 µl Gold Polymerase, 1 µl Primer F und 1 µl Primer R. Konzentrationen dieser Bestandteile wurden bereits unter 2.6.1. und 2.6.2. beschrieben.

In der Regel wurde ein Master Mix zur Amplifikation von 10 DNA-Proben inclusive ein Leerwert als Negativ-Kontrolle zum Ausschluss einer Kontamination hergestellt. Somit wurde jeweils die 11-fache Menge der jeweiligen Substanzen wie oben angegeben verwendet.

Zuerst wurden die DNA-Proben (jeweils 10 Stück) aus dem Gefrierschrank genommen und für 15–30 min in den Thermomixer (Fa. Eppendorf, Hamburg) Stufe 0 (kein Schütteln) bei 37°C gegeben. Nun wurde der Master Mix erstellt. Man gab 385 µl Aqua ad iniectabilia in ein 1,5 ml Tube. Es folgten 55 µl 10x Puffer und 66 µl MgCl₂-Lösung, welche ebenfalls zuvor im Thermomixer aufgetaut und mit dem Vortex geschüttelt wurden. Dann wurden 5,5 µl dNTP-Stocklösung und jeweils 11 µl Primer F bzw. Primer R hinzugefügt, welche ebenfalls im Thermomixer aufgetaut und im Anschluß noch kurz (ca. 20 sec) mit der zentrifugiert (Centrifuge 5415 D, Fa. Eppendorf, Hamburg) wurden. Nun bereitete man 11 PCR-Tubes vor und gab in 10 davon jeweils 1 µl der verschiedenen DNA-Proben. Ein PCR-Tube blieb vorerst leer, da es als Negativ-Kontrolle fungierte. Der Master Mix wurde nun mit 5,5 µl Gold Polymerase vervollständigt, was letztendlich ein Volumen von 539 µl ergab. Dieses schüttelte und zentrifugierte man kurz und verteilte es anschliessend mit jeweils 49 µl auf die 11 PCR-Tubes. Bei erfolgloser PCR, also bei fehlender Bildung von Banden in der Gelelektrophorese, wurde die PCR mit doppelter DNA-Menge wiederholt.

2.6.4. PCR-Bedingungen

Das PCR-Gerät (Gene Amp PCR System 2400, Gene Amp System 9700 und 2700 der Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) wurde folgendermaßen programmiert: 5 Minuten lang 95°C (Denaturierung), dann 40 Zyklen mit je einer

halben Minute 94 °C (Denaturierung), 1 Minute 55 °C (Annealing), schließlich noch 1 Minuten bei 72 °C (Synthese). Am Ende der Reaktion wurde das Gerät auf unendlich 4 °C eingestellt bzw die entstandenen PCR-Produkte im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl.

2.7. Gelelektrophorese

Im Anschluß an die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde für jedes entstandene PCR-Produkt 10 µl zur Gelelektrophorese verwendet. Hier wurde verifiziert, ob der gewünschte Genabschnitt amplifiziert wurde und eine Kontamination des Materials ausgeschlossen.

Zur Herstellung eines Gels und Durchführung einer Gelelektrophorese wurden folgende Materialien verwendet. Agarose (Sigma Agarose Type I, low EEO), ein TAE-Puffer (1x) aus 0,04M Tris-Acetate, 0.001M EDTA und Essigsäure, ein Wasserbad bestehend aus Ethidiumbromid und demineralisiertem Wasser, Loading buffer (10x Blue Juice Gel loading buffer) und eine DNA-ladder (Ready-load 100bp DNA-ladder, Konzentration 0,1µg/µl). Der TAE-Puffer, die Agarose und das Ethidiumbromidbad wurden bei Raumtemperatur gelagert, Loading buffer und DNA-ladder hingegen im Kühlschrank bei 4 °C. Weitere Geräte, welche bei der Herstellung des Gels bzw. der Gelelektrophorese verwendet wurden, sind eine Waage (Precisa 220M), ein Erlenmeyerkolben mit 250ml Volumen, eine Mikrowelle, ein Magnethörer (Magnethörer MR 3002 S8) und eine Elektrophorese-Kammer.

Je nach Anzahl der PCR-Produkte wurden unterschiedlich große Gele hergestellt. Entweder eine kleines Gel mit 12 Taschen oder ein großes Gel mit 28 Taschen. Beim größeren Gel wurde jeweils die dreifache Menge der jeweiligen Substanzen verwendet. Zuerst wurden 50ml TAE-Puffer (1x) mit 1g Agarose in einem Erlenmeyerkolben vermischt und 1-2 Minuten lang in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde die Flüssigkeit auf dem Magnethörer einige Minuten lang gemischt. Dann wurde der Schlitten der Elektrophoresekammer vorbereitet in dem man ober- und unterhalb jeweils einen Kamm quer einsetzte, das noch flüssige,

leicht abgekühlte Gel einfüllte und 20-30 Minuten lang wartete bis es einen festen Zustand erreicht hatte.

Jeweils 10µl des entsprechenden PCR-Produkts wurde auf eine Mikrotiterplatte gegeben und mit 2µl des 10x Blue Juice Gel Loading Buffer vermischt. Das getrocknete Gel wurde in die mit TAE-Puffer (1x) gefüllte Elektrophoresekammer gestellt und die Kämme entfernt. Jeweils am Anfang und am Ende einer Reihe wurden 4µl der DNA-Ladder (100bp) in die Taschen eingefüllt. Diese DNA-Ladder dient zur Größenbestimmung und besteht aus 15 Fragmenten von 100bp, 200bp, 300bp, ... bis 1500bp Länge und einem zusätzlichen Fragment von 2072 bp Länge. Sie dient außerdem als Anhalt für die Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente. Zwischen die DNA-Ladder am linken und rechten Ende werden Proben (meistens elf) mit den zu untersuchenden PCR-Produkten, welche mit dem Loading Buffer vermischt wurden, und die Negativ-Kontrolle aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 120V, 500mA und 150Watt. Bei einem kleinen Gel betrug die Zeit für die Elektrophorese 20 Minuten, beim großen Gel 45 Minuten. Zum Schluß wurde das Gel für 5-10 Minuten in ein Ethidiumbromidbad gegeben und in einem Wasserbad gewaschen.

Die mit Ethidiumbromid angefärbten Banden wurden mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Die photographische Dokumentation der Resultate der Gelelektrophorese erfolgte mit Hilfe des Syngene BioImaging Systeme (Fa. VWR international GmbH, Ismaning). Mit diesem System konnte man zur Dokumentation ein Foto anfertigen und ausdrucken. Exemplarisch zeigt Abbildung 8 das Ergebnis einer Gelelektrophorese.

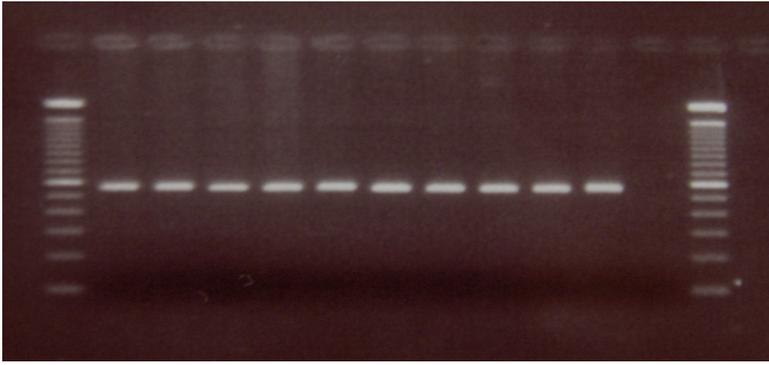


Abbildung 8: Beispiel einer Gelelektrophorese

Man kann am linken und rechten Rand (Bande 1 und 13) die 100bp-Markierungen der DNA-Ladder erkennen. Bande 2-11 zeigt ein Positives Resultat auf Höhe der 600bp-Marke. Bande 12 zeigt die Negativ-Kontrolle.

2.8. Aufreinigung der PCR-Produkte

Es wurden nur die Produkte aufgereinigt, die in der Gelelektrophorese die erwartete Bande in Begleitung einer korrekten Negativ- und Positiv-Kontrolle gezeigt hatten. Es wurde der QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet, welcher sich zur Aufreinigung von Einzel- oder Doppelstrang-PCR-Produkten der Größe 100bp bis 10kb eignet. Dieser wird bei Raumtemperatur gelagert und enthält QIAquick Spin Columns, QIAquick Collection Tubes, Buffer PB, Buffer PE-Konzentrat, Puffer EB. Die Aufreinigung mit einer Silikagel-Membran in der Säule der QIAquick Spin Columns erfolgt nach dem Prinzip der Gelchromatographie. Hierdurch werden Primerreste, ungebundene Nukleotide, Enzyme und Salze, welche in dem PCR-Produkt vorhanden sind, entfernt. Die DNA wird an die Membran gebunden und kann danach mit einem Lösungsmittel, dem EB-Puffer, eluiert werden.

Zur Vorbereitung wurde 55ml des Buffer PE-Konzentrats mit 220ml 100%-Ethanol (Fa. RdH, Seelze) vermischt. Die QIAquick Spin Columns, welche die Säulen enthalten, wurden in die Collection tubes, Tubes mit 2ml Volumen zum Auffangen des Durchflusses, gegeben. Das PCR-Produkt (40µl) wurde mit 200µl PB-Puffer gemischt und in eine Säule der Spin Columns gefüllt. Dann erfolgte 60 Sekunden lang eine Zentrifugation (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg) bei 13.000 Umdrehungen pro Minute. Der Durchfluß wurde abgekippt bzw. verworfen. Nun

wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und der Zentrifugationsschritt unter Verwerfung des Eluats zweimal wiederholt. Die Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen pro Minute wurde noch mal wiederholt, nur dass zuvor 50 µl EB-Puffer ins Zentrum der Säule auf die Silikagel-Membran pipettiert und eine Minute inkubiert wurden, und die QIAquick Spin Columns in ein Eppendorf-Tube der Größe 1,5 ml mit einem abgeschnittenen Deckel gestellt wurden. Das erhaltene Eluat wurde in ein neues Eppendorf-Tube mit 1,5 ml Volumen überführt, bei -20 °C gelagert und diente als Ausgangsprodukt für den nächsten Schritt die Cycle Sequencing Reaction (CSR).

2.9. Cycle Sequencing Reaction (CSR)

Für die Sequenzierung der zu untersuchenden Mutation im Exon 12 von *NPM1* wurde in einem zweiten Schritt die Cycle Sequencing Reaction (CSR) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden hier die aufgereinigten PCR-Produkte verwendet. Die CSR ist eine lineare PCR-Amplifikation mit nur einem Primer (siehe Kapitel 2.9.1.). Weiterhin werden bei der CSR fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) durch das Enzym Polymerase nach dem Zufallsprinzip in die entstehenden DNA-Fragmente eingebaut. Jeder Einbau eines ddNTP anstatt eines dNTP führt zum Stopp der Synthesekette. Es entstehen viele DNA-Fragmente aller möglichen Längen. So ist jedes einzelne Nukleotid, welches dem Primer folgt, als fluoreszenzmarkiertes Kettenabbruchnucleotid bzw. ddNTP vorhanden. Dies kann nun durch elektrophoretische Auftrennung und computergestützter Analyse ausgewertet und die entsprechende DNA Sequenz abgeleitet werden.

2.9.1. Primer

Alle bekannten Mutationen des *NPM1* Gens liegen innerhalb der Sequenz, welche für die letzten 10-15 Aminosäuren codiert. Aufgrund dessen wurde ein Oligonucleotid bzw. Primer verwendet das bzw. der innerhalb des Exon 12 ansetzt und bei Synthese in 5'-3'-Richtung durch eine DNA-Polymerase das Ende des Exons bzw. des kompletten Gens abliest. Dieser synthetisch erstellte Primer

NPM1-R2 wurde über die Firma Thermo Electron GmbH in Ulm bezogen (5' – GGC ATT TTG GAC AAC ACA - 3'). Das R bei NPM-R2 steht für die Reverse-Leserichtung der durch die DNA-Polymerase ansetzenden Synthese. Abbildung 2 im Kapitel 2.6.1. veranschaulicht die Lage des Primer NPM1-R2 im Exon 12. Aus der jeweiligen Stocklösung wurden durch Verdünnung Gebrauchslösungen hergestellt. Für die Cycle Sequencing Reaction (CSR) wurden durch Zugabe von 10µl Stocklösung zu 90µl Aqua ad iniectabilia (Fa. Braun, Melsungen) eine Gebrauchslösung der Konzentration 10 pmol/µl hergestellt. Die fertigen Gebrauchslösungen wurden bei –20°C aufbewahrt.

2.9.2. Reagenzien

Es wurde der ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Dieser wurde bei -20°C gelagert und enthält die vier fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) Didesoxyadenosintriphosphat (ddATP, grün markiert), Didesoxycytidintriphosphat (ddCTP, rot markiert), ddGTP (Didesoxyguanosintriphosphat, blau markiert) und Didesoxythymidintriphosphat (ddTTP, schwarz markiert), außerdem Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Didesoxythymidintriphosphat (dTTP) sowie eine Ampli Taq DNA Polymerase, Magnesiumchloridlösung (MgCl₂) und Tris-HCl Puffer (pH 9,0). Weiterhin wurden der Primer NPM1-R2 (10pmol/µl) und das aufgereinigte PCR-Produkt verwendet, welche ebenfalls bei -20°C gelagert wurden, und Aqua ad iniectabilia.

2.9.3. Reaktionsansätze

Ein Reaktionsansatz bestand aus 9 µl Aqua ad iniectabilia, 1 µl Primer R2 (10pmol/µl), 1 µl des aufgereinigten PCR-Produktes, 4 µl ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix.

In der Regel wurde ein Master Mix zur CSR mehrerer Templates hergestellt. Somit wurde jeweils ein Vielfaches der Menge der jeweiligen Substanzen wie oben angegeben verwendet, mit Ausnahme des aufgereinigten PCR-Produktes

(Template). Zuerst wurden die Templates aus dem Gefrierschrank genommen und für 15–30 min in den Thermomixer (Fa. Eppendorf, Hamburg) Stufe 0 (kein Schütteln) bei 37°C gegeben. Danach wurde bei z.B. 10 Templates 90 µl Aqua ad iniectabilia in ein 1,5 ml Tube. Es folgen 10 µl des Primers R2, welcher ebenfalls im Thermomixer aufgetaut und im Anschluß noch kurz (ca. 20 sec) zentrifugiert wurde. Der Master Mix wurde nun mit 40 µl ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix vervollständigt, was letztendlich ein Volumen von 140 µl ergab. Nun bereitete man eine optical 96-well reactic plate (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) und pipettierte jeweils 1µl von jedem Template in ein Feld, insgesamt 10 Felder. Schliesslich wurden jeweils 14 µl des Master Mix auf alle 10 Felder verteilt, woraus in jedem Feld ein Gesamtvolumen von 15 µl resultierte. Diese wurden mit Stripes verschlossen.

2.9.4. CSR-Bedingungen

Das Gerät (Gene Amp PCR System 2400, Gene Amp System 9700 und 2700 der Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) wurde folgendermaßen programmiert: Zwei Minuten lang bei 96°C zur initiale Denaturierung. Im Anschluß 45 Zyklen mit je einer Minute zur Denaturierung bei 94°C, eine Minute bei 55°C (Annealing) und drei Minuten für die Elongation bei 60°C. Zuletzt wurde die Maschine auf unendlich 4°C programmiert bzw. die CSR-Produkte bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Zum Schutz der fluoreszenzmarkierte ddNTP wurden die entstandenen Produkte in Alufolie gewickelt sofern sie nicht unmittelbar zum Sequenzieren verwendet wurden.

2.10. DNA-Aufreinigung

Die DNA-Aufreinigung wurde mittels Dye Ex Spin Kit (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt. Dieser Kit wird bei Raumtemperatur gelagert und enthält Dye Ex Spin Columns, welche Säulen enthalten, und Collection Tubes mit 2ml Volumen, die als Auffanggefäß dienen. Die Säulen der Dye Ex Spin Columns funktionieren ähnlich wie die Säulen der QIAquick Spin Columns beim QIAquick PCR Purification Kit nach dem Prinzip der Gelchromatographie. Die Trennung von

Stoffen basiert auf deren Molekulargewicht. Somit wurden überflüssige ddNTPs, welche beim Sequenzieren störend wirken würden, aus dem CSR-Produkt entfernt. Die kleineren Dye-Terminators (ddNTPs) diffundieren in die Poren und werden somit im Gel zurückgehalten, größere DNA-Fragmente können hindurchfließen.

Die Deckel der Dye Ex Spin Columns wurden leicht aufgedreht und der untere Verschluss entfernt. Diese wurden dann in die Collection Tubes mit 2ml Volumen gestellt und bei 2800 Umdrehungen pro Minute 3 Minuten lang zentrifugiert. Die Auffanggefäße wurden verworfen und die Säulen, die nur noch Gel enthielten, in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß mit abgeschnittenem Deckel überführt. Der Deckel der Säulen wurde ganz abgedreht, das gesamte CSR-Produkt in die Mitte des Gels pipettiert, der Deckel wieder aufgeschraubt und das Ganze bei 2800 Umdrehungen pro Minute 3 Minuten lang zentrifugiert (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg). Der Durchfluss wurde in ein Tube mit 0,5 ml Volumen überführt. Danach wurde es bei -20°C bis zur CSR vorübergehend gelagert.

2.11. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde computergestützt durchgeführt. Es wurde der ABI PRISM 310 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems in Darmstadt verwendet, welcher eine Kapillare (310 Genetic Analyzer 47cm x 10µm Capillaries), den ABI PRISM buffer (10x, mit EDTA) und POP-6 (Performance Optimized Polymer 6) beinhaltet. Zusätzlich wurden der Heizblock Grant QBT 2 (Fa. Grant Instruments Ltd., Cambridge, Großbritannien), der Computer Power Macintosh 7200/90 mit der Software ABI PRISM 310 Collection Sequencing Analysis 3.4 (Fa. Applied Biosystems) sowie high pressure liquid chromatography Wasser (HPLC-Wasser) (Fa. Merck, Darmstadt) für die Chromatographie verwendet.

Die aufgereinigte DNA der CSR-Produkte wurde aufgetaut und zwei Minuten lang bei 95°C auf einen Heizblock gestellt, was zur Denaturierung der DNA diente und für die elektrophoretische Trennung der einzelnen DNA-Fragmente nötig war. Die

Deckel der Reaktionsgefäße wurden entfernt und mit speziellen Deckeln für das Sequenzieren versehen. Das Gerät wurde in allen Einstellungen auf die „Home-Position“ gebracht. Dann wurde der Puffer mit HPLC-Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt. Nun wurden die entsprechenden Gefäße mit dieser Mischung bzw. mit HPLC-Wasser gefüllt. Das Polymer wurde in die Spritze des Geräts aufgezogen und der Block mit demselben gefüllt. Es wurde ein neues Sequence Sample Sheet und eine Sequence Injection List angelegt. Die Läufe wurden bei einer Temperatur von 50°C und mit einer Injektionszeit von 20 Sekunden durchgeführt. Nach Beendigung des Durchlaufs konnte die Sequenz ausgedruckt werden. Zwei Beispiele hierfür sind im Ergebnisteil zu sehen (Abbildung 9 und 10, Kapitel 3.3.).

2.12. Statistische Analysen

Schwerpunkt der Dissertationsarbeit war der Nachweis der *NPM1* Genmutation an einer definierten Patientenpopulation mit AML, die im Rahmen der AML HD98B und AMLSG 06-04 Studie behandelt wurde. Es handelte sich um eine rein experimentelle Arbeit. Die Ergebnisse dieser Arbeit waren jedoch Grundlage für die Durchführung der in der Arbeit erwähnten klinischen Korrelationen, die im Rahmen eines größeren Forschungsprojektes analysiert wurden. Durch diese Korrelationen ergaben sich neue, klinisch signifikante Aspekte, die im Ergebnisteil vorgestellt und im Diskussionsteil der Arbeit integriert und diskutiert wurden.

Die statistischen Analysen zur Korrelation der experimentellen Daten mit den klinischen Daten wurden von einem Biostatistiker und dem Leiter der Studienzentrale der Abteilung Innere Medizin III durchgeführt. Da der Schwerpunkt der Dissertationsarbeit nicht in der Durchführung dieser Korrelationen und der damit verbundenen statistischen Analysen, sondern im Nachweis der krankheitsspezifischen Genmutation lag, erfolgt keine Beschreibung der statistischen Analysen.

3. Ergebnisse

3.1. Kurzer Überblick der Studien AML HD98-B und AMLSG 06-04

Bei 303 Patienten innerhalb der AML HD98-B Studie und 47 Patienten innerhalb der AML 06-04 Studie wurden Mutationsanalysen aus peripheren Blutproben (PB) bzw. Knochenmarksproben (KM), welche vor Behandlung entnommen wurden, durchgeführt. Hiervon wiesen die 47 Proben der Studie AMLSG 06-04 ausschließlich einen normalen Karyotyp (NK-AML) auf, die 303 Proben der Studie AML HD98-B hatten unterschiedliche Karyotypen (AP-AML). Bei 286 von diesen 303 Patienten der AML HD98-B Studie war der Karyotyp bekannt, bei 17 von 303 lag kein zytogenetischer Befund vor (siehe Tabelle 4). Insgesamt wurden 350 Proben auf eine Mutation des *NPM1* Gens im Exon 12 untersucht.

Es folgte zuerst die Auswertung der Inzidenzen und Mutationstypen der AML HD98-B Patientenpopulation. Hier wurden zunächst die drei Gruppen anhand des genetischen Risikoprofils (low-risk, intermediate-risk/standard-risk und high-risk) betrachtet, eingeteilt nach dem Vorschlag von Mrózek und Bloomfield (Mrozek und Bloomfield 2006). Zu der Gruppe mit intermediärem Risiko zählten neben dem normalen Karyotyp auch andere zytogenetische Varianten (siehe Kapitel 1.5.). Besonderes Augenmerk lag auf der Gruppe der NK-AML die mit 40–50% aller Fälle der AMLs die größte Gruppe darstellt (Gaidzik et al. 2008). Aus diesem Grund wurde diese nochmals gesondert betrachtet und die Ergebnisse aus der Studie AML 06-04 hier miteinbezogen. In der AML HD98-B Studie lag in 141 von 303 Fällen ein normaler Karyotyp (NK-AML) vor, was 46,5% der Fälle entsprach. Zu diesen 141 Patienten kamen noch 47 Patienten aus der AML 06-04 Studie mit allesamt normalem zytogenetischen Befund. Insgesamt wurden somit 188 Patienten vom zytogenetischen Typ NK-AML untersucht. Einen Überblick der Verteilung auf die einzelnen Gruppen gibt Tabelle 4.

17 Proben sind keinem speziellen Karyotypen zuzuordnen, da bei der zytogenetischen Untersuchung keine analysierbaren Metaphasen aufzufinden waren bzw. keine Untersuchungsdaten über die zytogenetische Untersuchung vorlagen.

Tabelle 4: Übersicht der Verteilung der Patienten beider Studien auf die Gruppierungen mit hohem, intermediärem und niedrigem Risiko incl. normaler Karyotypen

	Studie AML HD98-B (%)	Studie AML 06-04	gesamt
Niedriges Risiko	21 (7%)	–	21
Intermediäres Risiko	170 (56%)	47	217
Hohes Risiko	95 (31,4%)	–	95
Nicht zuzuordnen	17 (5,6%)	–	17
Alle Patienten	303 (100%)	47	350

Von den 303 Patienten der HD98-B Studie wurden 21 Patienten (entspricht 7%) der Gruppe mit günstiger Prognose, 170 Patienten (entspricht 56%) der Gruppe mit intermediärem Risiko und 95 Patienten (entspricht 31,4%) der Gruppe mit ungünstiger Prognose zugeordnet. Bei den 170 Patienten der intermediate-risk Gruppe sind, wie bereits genannt, die 141 Patienten mit NK-AML inkludiert.

3.2. Inzidenz von Mutationen des *NPM1* Gens im Exon 12

Von den im Rahmen der Promotionsarbeit 303 untersuchten Patienten der AML HD98-B Studie zeigten 78 (entspricht 25,7%) eine Genmutation. 67 von 78 (85,9 %) wiesen den Mutationstyp A auf, 6 von 78 (8,9 %) den Mutationstyp B, 3 von 78 (4,4 %) den Mutationstyp D und jeweils einer von 78 (1,5 %) Patienten den bislang nicht bekannten Mutationstyp X1 und X3.

Innerhalb der Niedrigrisiko-Gruppe (low-risk) zeigten 9% der Patienten (2 von 21) eine *NPM1* Genmutation, beide waren Mutationstyp A. Bei diesen zwei Patienten lagen folgende Karyotypen vor: 46, XX, t(15;17) und 46, XY, t(8;21)(q13;q22).

In der Gruppe mit intermediärem Risiko (intermediate-risk oder standard-risk) wiesen 38,8% der Patienten (66 von 170) eine Mutation auf. Es kam bei 59 von 66 (89,4%) die Mutation A vor, bei 4 von 66 (6%) die Mutation B, bei 2 von 66 (3%) die Mutation D und in einem Fall (1,5%) ein bisher unbekannter Mutationstyp, hier

als X1 bezeichnet. Von den 170 Patienten dieser Gruppe zählten 141 zu der zytogenetisch einheitlichen Gruppe mit normalem Karyotyp (NK-AML). Hier wird unter 3.4. gesondert berichtet.

In der Gruppe vom Typ Hochrisiko zeigten 3,15% der Patienten (3 von 95) eine Mutation. Bei 2 der 3 (66,6%) handelt es sich um Mutation A, bei einem der 3 (33,3%) um Mutation B.

In der Gruppe der Proben ohne zytogenetischen Befund lag in 7 von 17 Fällen eine Mutation vor. Hierbei war in 4 von 7 Fällen (57%) die Mutation A vorzuweisen und in jeweils einem Fall die Mutation B, D und eine neu gefundene Mutation, hier als X3 bezeichnet.

Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf die untersuchte Patientenpopulation der AML HD98-B Studie, nicht auf die Gesamtpopulation dieser Studie. Somit können diese Zahlen im Vergleich zu den in der Literatur publizierten Prozentzahlen etwas diskrepant sein. Letztlich liegt dieser Diskrepanz die Auswahl der hier untersuchten Patienten aus der AML HD98-B Studie zugrunde.

Tabelle 5: Übersicht der NPM1-Mutationsinzidenzen und -Mutationstypen der untersuchten Fälle der AML HD98-B Studie

	Niedrig Risiko (%)	Intermediäres Risiko (%)	Hoch Risiko (%)	Nicht zuzuordnen (%)	Alle Patienten HD98-B
Wildtyp	19/21 (91%)	104/170 (61%)	92/95 (97%)	10/17 (59%)	225/303 (74%)
Mutiert	2/21 (9%)	66/170 (39%)	3/95 (3%)	7/17 (41%)	78/303 (26%)
Typ A	2/2 (100%)	59/66 (89%)	2/95 (2%)	4/7 (57%)	67/78 (86%)
Typ B	—	4/66 (6%)	1/95 (1%)	1/7 (14%)	6/78 (8%)
Typ D	—	2/66 (3%)	—	1/7 (14%)	3/78 (4%)
Typ X1	—	1/66 (1,5%)	—	—	1/78 (1,3%)
Typ X3	—	—	—	1/17 (14%)	1/78 (1,3%)
Gesamt	21	170	95	17	303

3.3. Mutationstypen

Alle gefundenen Mutationstypen waren Tetranucleotid-Insertionen mit Bruchpunkt bei Basennummer 956 im Exon 12 des Nucleophosmin Gens. Insgesamt konnten 103 Mutationen nachgewiesen werden. Hiervon sind 99 bekannte Mutationen welche bereits 2005 durch Falini und Kollegen charakterisiert wurden (Falini et al. 2005). 88 (85,5%) mal fanden wir die Mutation A (GenBank Eingangsnummer AY740634), 6 (5,8%) mal die Mutation B (GenBank Eingangsnummer AY740635) und 5 (4,8%) mal die Mutation D (GenBank Eingangsnummer AY740637) nach Falini. Außerdem fanden wir drei weitere Mutationen welche bisher noch nicht im Genebanksystem verzeichnet sind. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit als X1, X2 und X3 bezeichnet. Mutation X3 lag zwei mal vor.

Tabelle 6: Sequenzvarianten von NPM1 Exon 12 Mutationen bei 351 Patienten

NPM1, Nucleophosmin, Isoform 1; a, Adenin; c, Cytosin; g, Guanin; t, Thymin; A, Alanin; C, Cystein; D, Asparaginsäure; E, Glutaminsäure; K, Lysin; L, Leucin; M, Methionin; Q, Glutamin; R, Arginin; S, Serin; V, Valin; W, Tryptophan; Stop, steht für Stopcodon, welches für die Termination der Aminosäurenkette steht

Mutations- typ	NPM1 Exon 12 Nukleotid und Proteinsequenz					Häufigkeit (%)
Wildtyp	5' gat ctc D L	tgg W	cag Q	tgg W	agg aag tct ctt taa gaa aat ag 3' R K S L Stop	—
Typ A	5' gat ctc D L	tgt C	ctg L	gca A	gtg gag gaa gtc tct tta aga aaa tag 3' V E E V S L R K Stop	88/103 (85,5%)
Typ B	5' gat ctc D L	tgc C	atg M	gca A	gtg gag gaa gtc tct tta aga aaa tag 3' V E E V S L R K Stop	6/103 (5,8%)
Typ D	5' gat ctc D L	tgc C	ctg L	gca A	gtg gag gaa gtc tct tta aga aaa tag 3' V E E V S L R K Stop	5/103 (4,8%)
X1	5' gat ctc D L	tgc C	ttg L	gca A	gtg gag gaa gtc tct tta aga aaa tag 3' V E E V S L R K Stop	1/103 (<1%)
X2	5' gat ctc D L	tgc C	aga R	gca A	gtg gag gaa gtc tct tta aga aaa tag 3' V E E V S L R K Stop	1/103 (<1%)
X3	5' gat ctc D L	tgc C	cag Q	gca A	gtg gag gaa gtc tct tta aga aaa tag 3' V E E V S L R K Stop	2/103 (1,9%)

Die vollständigen mRNA Sequenzen und daraus resultierende Aminosäurenabfolge sind im Anhang (Kapitel 7) dargestellt.

In Tabelle 7 sind die Basen, welche für die jeweils letzten 9 bzw. 13 Aminosäuren codieren, dargestellt. Beim Wildtyp kann man an Stelle 288 und 290 der Aminosäurenkette ein Tryptophan (W) erkennen, welches für die Lokalisation des Nucleophosmin im Nukleolus Bedeutung hat. An dieser Stelle liegt bei jeder gefundenen Mutation ein Verlust des Tryptophan W288 und W290 vor. Ebenso ist bei jeder Mutation die Aminosäure an Stelle 289 verändert. Durch Insertion eines Tetranucleotids ergeben sich Nonsense-Mutationen durch eine Verschiebung des Leserasters mit konsekutiv veränderter Aminosäurenabfolge. Ab Aminosäure Alanin 290 (A290) gleichen sich bei allen Mutationen die C-terminalen Enden der entstandenen Proteine, da jeweils 4 Basen eingefügt wurden und somit das Leseraster bei allen Mutationen gleich ist. Seit der Aufdeckung der ersten *NPM1* Mutationen 2005 wurden mittlerweile ca. 40 verschiedene Mutationsvarianten beschrieben. Alle finden sich am C-terminalen Ende des Proteins und gehen mit einer Verschiebung des Leserasters einher (Falini et al. 2007, Liso et al. 2008).

Die folgenden Abbildungen (Abb. 9 und Abb. 10) zeigen beispielhaft Ausschnitte zweier *NPM1* Exon 12 Gensequenzen. Abb. 9 zeigt den Wildtyp und Abb. 10 die häufigste Mutation Typ A. Die Farben der einzelnen Peaks spiegeln hier die fluoreszenzmarkierten 2'3'-Didesoxynukleotide wieder, welche bei der Cycle Sequencing Reaction (CSR) Verwendung fanden und zum Abbruch der Polymerasereaktion führten.

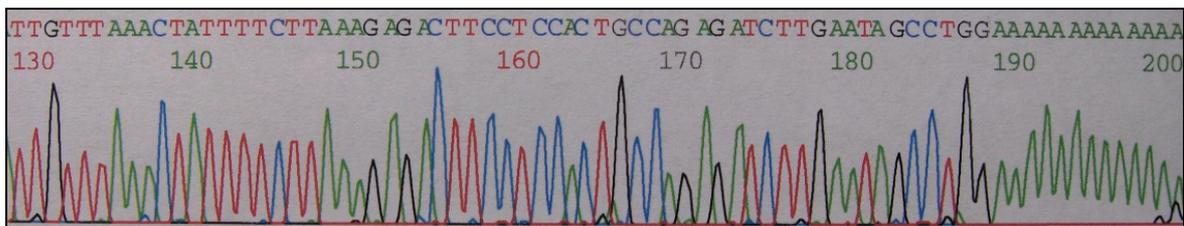


Abbildung 9: Ausschnitt einer Gensequenz mit Wildtyp *NPM1* Gen (GenBank Accession No. NM_002520)
Abkürzungen: T: Thymin; G: Guanin; C: Cytosin; A: Adenin

3.5. *NPM1* und *FLT3-ITD*

Neben dem Vorliegen der *NPM1* Mutation ist für die Prognose einer AML der Mutationsstatus des *FLT3* Gens (*FLT3-ITD*) von großer Bedeutung. Dies wurde bereits in der Einleitung (siehe Punkt 1.5.) erläutert. Ca. 40 % der Patienten mit *NPM1* Mutation weisen gleichzeitig eine *FLT3-ITD* Mutation auf. Hier wurde in mehreren Studien der besondere Stellenwert der prognostisch günstigen Kombination einer *NPM1* Mutation mit Abwesenheit einer *FLT3-ITD* Mutation hervorgehoben, also der *NPM1^{mut}-FLT3-ITD^{neg}*-Genotyp, wohingegen alle anderen Genotypen einen signifikant schlechteren Verlauf aufweisen. Wie bereits erwähnt basieren diese Daten im Wesentlichen auf Studien an jüngeren Patienten.

Bei den Patienten innerhalb der AML HD98-B Studie wurden umfassende Mutationsanalysen zum Zeitpunkt der Diagnose aus Proben des peripheren Blutes (PB) und/oder des Knochenmarks (KM) durchgeführt. Neben Mutationen des *Nucleophosmin (NPM1)* Gens waren dies die Mutationen im *FLT3* Gen (*FLT3-ITD* und *FLT3-TKD*) sowie die Mutationen der Gene *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha) und *MLL* (mixed-lineage-leukemia-Gen) (partial tandem duplications). Aufgrund der enormen prognostischen Bedeutung des kombinierten Mutationsstatus *NPM1/FLT3-ITD*, wie oben kurz erläutert, wurden die Daten zum *FLT3-ITD* Mutationsstatus für diese Arbeit zur Verfügung gestellt und integriert. Die statistischen Analysen wurden von Herrn PD Dr. Schlenk, Leiter der Studienzentrale der AML Study Group (AMLSG), durchgeführt (Schlenk/Döhner et al. 2008).

Insgesamt zählen 188 Patienten, 141 der AML HD98-B Studie und 47 Patienten der Studie AMLSG 06-04, zu der NK-AML Gruppe. Bei 33 lagen keine Ergebnisse bzgl. des *FLT3-ITD* Mutationsstatus vor, weshalb die Auswertung des kombinierten Mutationsstatus nur bei 155 Patienten durchgeführt werden konnte und somit nicht vollständig repräsentativ ist. Die Inzidenzen für die Patienten mit bekanntem *NPM1* und *FLT3-ITD* Mutationsstatus für NK-AML sind in Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 8: Inzidenzen des kombinierten Mutationsstatus des *NPM1/FLT3*-ITD für Patienten mit normalem Karyotyp (NK) aus der AML HD98-B und AMLSG 06-04 Studie

50/155 (32,3%)	<i>NPM1</i> ^{mut} - <i>FLT3</i> -ITD ^{neg}
27/155 (17,4%)	<i>NPM1</i> ^{mut} - <i>FLT3</i> -ITD ^{mut}
67/155 (43,2%)	<i>NPM1</i> ^{neg} - <i>FLT3</i> -ITD ^{neg}
11/155 (7,1%)	<i>NPM1</i> ^{neg} - <i>FLT3</i> -ITD ^{mut}

49,7% der Patienten mit normalem Karyotyp zeigten eine Mutation des *NPM1* Gens, eine ITD Mutation des *FLT3* Gens lag lediglich bei 24,5% vor.

Die Mutation *FLT3*-ITD war häufiger bei Patienten mit mutiertem *NPM1* Gen vorzufinden im Vergleich zum normalen *NPM1* Status. Der Anteil einer Überlappung mit einer *FLT3*-ITD Mutation lag bei bereits vorhandener *NPM1* Mutation bei 17,4%.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dass die Inzidenzen von *NPM1* und *FLT3*-ITD Genmutationen bei NK-AML älterer Patienten mit denen der Jüngeren vergleichbar sind.

3.6. Prognostische Bedeutung von *NPM1* Mutationen bei der AML des älteren Patienten (>60 Jahre)

Die hier folgenden Ergebnisse und statistischen Berechnungen wurden von Herrn PD Dr. R. Schlenk, Leiter der Studienzentrale in der Abteilung für Innere Medizin III und Leiter der Deutsch-Österreichischen AML Study Group (AMLSG), durchgeführt und im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt (Schlenk/Döhner et al. 2009).

Die folgenden Analysen, welche in 3.6.1. und 3.6.2. (siehe unten) genannt werden, wurden ausschließlich an Patienten der Studie AML HD98-B durchgeführt. Somit sind hier die Ergebnisse der 303 Patienten aus der HD98-B Studie eingegangen. Die Patientendaten, die im Rahmen der AMLSG 06-04 Studie erhoben wurden, sind hier nicht berücksichtigt.

3.6.1. Ansprechen auf die Induktionschemotherapie

Das Ansprechen auf Induktionstherapie wurde nach 2 Zyklen Induktionschemotherapie beurteilt. Eine komplette Remission (CR) wurde nach Standard-Kriterien definiert. Diese beinhalteten den Anteil an Blasten im Knochenmark (KM) bei <5%, die absolute Anzahl an Neutrophilen von $1,5 \times 10^9/l$ oder mehr, Anzahl an Thrombozyten von $100 \times 10^9/l$ oder mehr, keine Blasten im peripheren Blut und keine extramedulläre Leukämie (Cheson et al. 1990).

Von 242 Patienten, welche in der AML HD98-B Studie für den Studienarm mit ATRA Therapie randomisiert wurden, erreichten 114 (47%) eine komplette Remission (CR), 92 (38%) zeigten eine refraktäre Erkrankung (RD) und 36 Patienten (15%) starben. Die Randomisierung für eine ATRA Therapie zur Standardchemotherapie hatte keinen signifikanten Einfluß auf das Erreichen einer CR (Schlenk/Döhner et al. 2009).

Eine multivariable Analyse von 206 Patienten mittels logistischer Regression, bei welcher der Genmutations-Status von *NPM1*, *FLT3* (ITD und TKD) und *MLL* miteinging, konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem Erreichen einer kompletten Remission (CR) und dem Vorliegen einer *NPM1* Mutation (odds ratio [OR], 3.17; 95% confidence intervall [CI], 1.37-7.35; $p=0.02$), dem Logarithmus der Leukozytenzahl [white blood cell count (WBCC)] (OR 0.58; 95% CI, 0.35-0.96; $p=0.03$) und einem ungünstigem zytogenetischem Risikoprofil (OR, 0.46; 95% CI, 0.21-0.99; $p=0.05$) aufzeigen. Keinen signifikanten Einfluss auf das Erreichen einer kompletten Remission (CR) hingegen hatten die molekularen Marker *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD und *MLL*-PTD, klinische Charakteristika wie das Alter, die Anzahl der Thrombozyten, der Anteil an Blasten im Knochenmark und der Typ der AML, außerdem wie bereits genannt (s.o.) die Randomisation in den ATRA-Arm der Studie (Schlenk/Döhner et al. 2009).

3.6.2. Überlebensanalyse

Die Definition einer kompletten Remission (CR) wurde bereits im Kapitel 3.6.1. erläutert. Eine refraktäre Erkrankung (RD) lag vor wenn keine CR erreicht werden konnte. Ein Rezidiv (relapse) setzte eine früher dokumentierte CR voraus. Es wurde durch Blasten im KM >5% bestimmt. Endpunkte für das Gesamtüberleben (OS) war Tod (failure) und Leben beim letzten Follow-Up, beginnend vom Tag des Studieneintritts an. Endpunkt für ein Ereignis-freies Überleben (RFS) war Tod in kompletter Remission, ein Rezidiv oder Leben in kompletter Remission beim letzten Follow-Up. Als therapeutisches Versagen wurde ein früher bzw. hypoplastischer Tod (ED bzw. HD) oder eine refraktäre Erkrankung (RD) bestimmt. ED war der Tod innerhalb der ersten 6 Tage nach Vollendung des ersten Chemotherapiezyklus der Induktionstherapie. HD bezeichnete den Tod während des zweiten Chemotherapiezyklus der Doppelinduktionstherapie (Cheson et al. 1990, Schlenk/Döhner et al. 2008).

Es wurden Intention-to-Treat- und Per-Protocol-Analysen durchgeführt. Bei der Intention-to-Treat-Analyse wurden sämtliche Daten ausgewertet. Alle Patienten wurden berücksichtigt welche im Vornherein dafür vorgesehen waren. Bei der Per-Protocol-Analyse wurden zur Auswertung nur die Patienten berücksichtigt die alle Studienauflagen wie unter anderem auch das Therapieprotokoll korrekt erfüllt haben.

Folgende Analysen und Ergebnisse beziehen sich wie oben bereits genannt ausschließlich auf Patienten aus der AML HD98-B Studie.

Wie bereits genannt (s.o.) konnte beim Ansprechen der Induktionschemotherapie (siehe 3.6.1.) eine signifikante Assoziation zwischen dem Erreichen einer kompletten Remission (CR) und dem Vorliegen einer Mutation des *NPM1* Gens aufgezeigt werden. Keinen signifikanten Einfluss auf das Erreichen einer kompletten Remission (CR) hingegen hatte die Randomisation in den ATRA Arm der Studie (Schlenk/Döhner et al. 2009).

Das mediane Follow-Up für das Überleben (survival) lag bei 68,5 Monaten. Patienten, die in den ATRA Arm der Studie AML HD98-B randomisiert wurden, zeigten ein signifikant besseres Rezidiv-freies Überleben (RFS) ($p=0.006$) und Gesamtüberleben (overall survival, OS) ($p=0.003$) im Vergleich zu den Patienten im Standard-Arm. Die 4-Jahres-Rate für RFS lag bei Patienten mit ATRA Therapie bei 20,9% (95% CI, 12.5%-30.8%) im Vergleich zu 4,8% (95% CI, 1.6-10.9%) bei Patienten im Standard-Arm der Studie, ebenso standen bei der 4-Jahres-Rate für OS 10,8% (95% CI, 6.1-17%) mit ATRA gegenüber 5% (95% CI, 2-10%) ohne ATRA Therapie (Schlenk/Döhner et al. 2009).

Insgesamt zeigte sich hier ein deutlicher Vorteil der mit ATRA therapierten Patienten weshalb als Nächstes eine Überlebensanalyse in Abhängigkeit der molekularen Marker und der Behandlung mit ATRA durchgeführt wurde. Bezüglich der molekularen Marker wurde alle Kombinationsmöglichkeiten von *NPM1* und *FLT3*-ITD getestet. Die prädiktiven Faktoren wurde in einer Intention-to-Treat Analyse bewertet (Schlenk/Döhner et al. 2009).

In univariaten Überlebensanalysen zeigte sich eine Interaktion zwischen den Genotypen und dem Effekt der ATRA behandelten Patienten. Insbesondere war hier ein signifikanter Unterschied sowohl im RFS ($p=0.0009$) als auch im OS ($p=0,0001$) zugunsten der mit ATRA behandelten Patienten mit dem Genotyp *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{neg} zu erkennen, wohingegen RFS und OS für alle anderen Patienten mit den restlichen Genotyp-Kombinationen signifikant schlechter waren, unabhängig davon ob sie eine ATRA-Therapie erhielten oder nicht. (Schlenk/Döhner et al. 2009).

Zusammenfassend lässt sich also sagen dass die Behandlung mit ATRA zusätzlich zur Standardchemotherapie einen Vorteil beim RFS als auch beim OS zeigte. Eine Subgruppenanalyse bzgl. der molekularen Marker ergab einen zusätzlichen Benefit bei dem Genotyp *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{neg}.

Zur Veranschaulichung siehe Abbildung 11 A und 11 B. Hier lässt sich anhand der blauen Kurve, welche die Gruppe der mit ATRA therapierten Genotypen $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$ darstellt, deutlich die bessere Prognose für das Rezidiv-freie Überleben und das Gesamtüberleben dieser Subgruppe erkennen. Im Gegensatz zur Abbildung 12 A und 12 B, bei der nur die Subgruppe mit NK-AML Patienten betrachtet wurden, waren hier unabhängig vom zytogenetischen Befund alle Patienten der AML HD98-B Studie eingeschlossen.

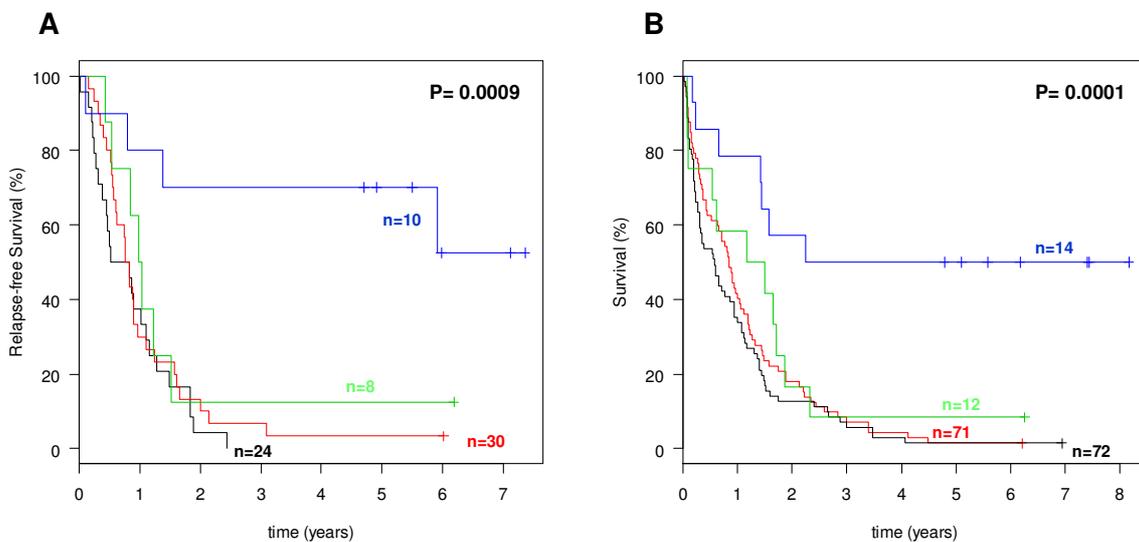


Abbildung 11: Rezidiv-freies Überleben (RFS) und das Gesamtüberleben (OS) gemäß der Behandlung mit all-trans Retinolsäure (ATRA) und dem Genotyp auf der Basis einer Intention-to-Treat-Analyse (Schlenk/Döhner et al. 2009).

Abb. 11A: Gesamtüberleben (OS). Abb. 11B: Rezidiv-freies Überleben (RFS).

Blau, $NPM1$ -mutiert/ $FLT3-ITD$ -negativ mit ATRA-Therapie;

Grün, $NPM1$ -mutiert/ $FLT3-ITD$ -negativ ohne ATRA-Therapie;

Rot, alle anderen Kombinationen der Marker $NPM1$ und $FLT3-ITD$ mit ATRA-Therapie;

Schwarz, alle anderen Kombinationen der Marker $NPM1$ und $FLT3-ITD$ ohne ATRA-Therapie;

Bekanntermaßen lassen sich $NPM1$ und $FLT3-ITD$ Mutationen überwiegend in der Population NK-AML nachweisen. Aus diesem Grund wurden dieselben univariaten Analysen für diese Gruppe durchgeführt und auch hier zeigte sich eine signifikante Differenz sowohl für das RFS ($p=0.002$) als auch für das OS ($p=0.01$) zugunsten des ATRA Arms bei Patienten mit dem Genotyp $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$ (Schlenk/Döhner et al. 2009).

Zur Veranschaulichung der Patienten mit NK-AML siehe Abbildung 12 A und 12 B. Wie in der Gruppe mit allen zytogenetischen Typen (AP-AML) lässt sich auch in der Subgruppe der Patienten mit zytogenetisch normalem Karyotyp (NK-AML) die deutlich bessere Prognose für RFS und OS bei Patienten mit dem Genotyp $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$ mit ATRA-Therapie erkennen.

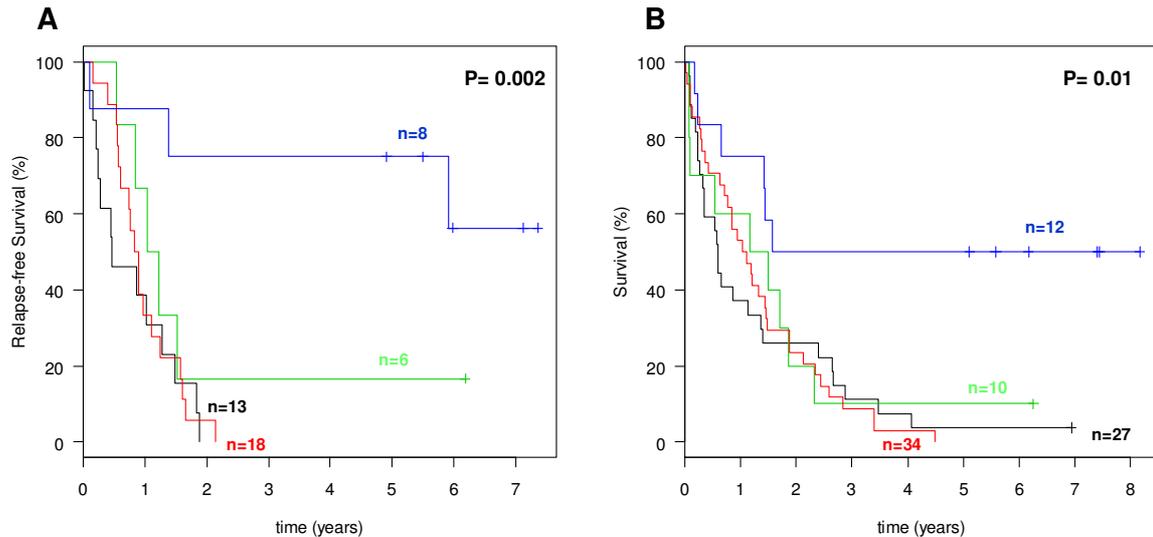


Abbildung 12: Rezidiv-freies Überleben (RFS) und das Gesamtüberleben (OS) gemäß der Behandlung mit all-trans Retinolsäure (ATRA) und dem Genotyp bei Patienten mit zytogenetisch normalem Karyotyp der leukämischen Zellen (NK-AML) auf der Basis einer Intention-to-Treat-Analyse (Schlenk/Döhner et al. 2009).

Abb. 12A: Gesamtüberleben (OS). Abb. 12B: Rezidiv-freies Überleben (RFS).

Blau, $NPM1$ -mutiert/ $FLT3-ITD$ -negativ mit ATRA-Therapie;

Grün, $NPM1$ -mutiert/ $FLT3-ITD$ -negativ ohne ATRA-Therapie;

Rot, alle anderen Kombinationen der Marker $NPM1$ und $FLT3-ITD$ mit ATRA-Therapie;

Schwarz, alle anderen Kombinationen der Marker $NPM1$ und $FLT3-ITD$ ohne ATRA-Therapie;

Zusätzlich wurde eine multivariate Analyse mittels Cox-Regression durchgeführt, in welche die Interaktion zwischen den $NPM1$ -mutierten/ $FLT3-ITD$ -negativen Genotypen und ATRA inkludiert wurde. Auch hier ergab die Analyse für die Endpunkte RFS und OS eine signifikante Interaktion zwischen dem $NPM1$ -mutierten/ $FLT3-ITD$ -negativen Genotyp und der Randomisation in den ATRA Arm. Die Hazard Ratios und 95% Konfidenzintervalle betragen hier für RFS (HR, 0.27; 95% CI, 0.07-0.95; $p=0.04$) und für OS (HR, 0.28; 95% CI, 0.1-0.75; $p=0.01$).

4. Diskussion

4.1. Mutationen von *NPM1* bei der AML

In dieser Arbeit wurden Patienten, 61 Jahre und älter, mit akuter myeloischer Leukämie (AML) auf Mutationen des *Nucleophosmin* (*NPM1*) Gens untersucht. Es wurde die Inzidenz der Mutationen in der Gesamtpopulation der AML HD98-B Studie bzgl. unterschiedlicher zytogenetischer Subgruppierungen ermittelt und mit der Prognose dieser Patienten korreliert. In Analogie zu den Daten jüngerer Patienten wurde gezeigt dass der kombinierte Mutationsstatus *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{neg} eine eindeutig günstigere Prognose gegenüber anderen Genotypen besitzt. Deshalb wurden die Analysen der Mutationen (Internal Tandem Duplication, ITD) des *Fms-related Tyrosine Kinase 3* (*FLT3*) Gens in diese Arbeit miteinbezogen.

Im Gegensatz zu den Patienten mit Alter <60 Jahre ist die Bedeutung molekularer Aberrationen bei älteren Patienten weitgehend unklar. Zentrale Fragestellung dieser Arbeit war es die häufigste Genmutation bei der AML, nämlich die *NPM1* Genmutation, und hier insbesondere den Genotyp *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{neg} in einer gut definierten Kohorte älterer AML Patienten zu untersuchen und bezüglich der prognostischen und prädiktiven Rolle zu evaluieren. Die AML HD98-B Studie enthielt einen Arm Standard-Chemotherapie plus all-trans Retinolsäure (ATRA) sodass auch die Beurteilung des Nutzens einer additiven ATRA-Therapie untersucht werden konnte.

Die Prognose der AML des Älteren ist äußerst schlecht mit einer 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 5-15% (Rathnasabapathy et al. 2003, Wedding et al. 2004). Während bei der AML des jüngeren Erwachsenen (≤60 Jahre) die Prognose klar vom Karyotyp abhängig ist und die Einteilung in die drei Gruppen mit unterschiedlichem Risikoprofil (favorable, intermediate und adverse) gut mit dem Überleben korreliert, spielen bei älteren Patienten multiple Faktoren eine Rolle (Mrózek and Bloomfield 2006, Estey und Döhner 2006, Erba 2007). Bislang gibt es nur wenige Studien die den Stellenwert der Zytogenetik und weiterer Risikofaktoren bei der AML des älteren Patienten systematisch untersucht haben. Fröhling und Kollegen konnten in einer Studie zeigen dass die Zytogenetik und

das Alter die Hauptfaktoren für die Prognose und das Outcome älterer Patienten darstellen, wobei signifikante Unterschiede bei den Patienten von 61 bis 70 Jahren und von 71 Jahren und älter vorlagen. Die Inzidenz der günstigen zytogenetischen Karyotypen [in dieser Studie t(15;17) und inv(16)] ist im Vergleich mit jüngeren Patienten seltener vorzufinden, die Inzidenz von intermediären und hohen zytogenetischen Risikoprofil dementsprechend höher. In der intermediate-risk Gruppe, welche 58% der gesamten Studienteilnehmer angehörten, kam es in 53% der Fälle zu einer kompletten Remission (CR), das Gesamtüberleben (overall survival, OS) nach 3 Jahren lag bei 18% (3-JÜR). In der high-risk Gruppe kam es in lediglich 19% zu CR, die 3-JÜR betrug lediglich 5%. (Fröhling et al. 2006).

Ahnliche Ergebnisse erbrachten folgende Studien. Grimwade und Kollegen untersuchten eine Kohorte von Patienten im Alter von ≥ 56 Jahren. Ein wesentlicher Unterschied zu jüngeren AML Patienten zeigte sich auch hier in den Häufigkeiten der jeweiligen Karyotypen. Patienten mit günstigem Risikoprofil [hier t(15;17), t(8;21) oder inv(16)] kamen signifikant seltener vor, Patienten mit komplexem Karyotyp häufiger. In der intermediate-risk Gruppe, ca. 70% aller Studienteilnehmer, kam es in 54-63% der Fälle zu CR, das OS nach 5 Jahren lag bei 5-15% (5-JÜR). In der high-risk Gruppe, nahezu 20% der Fälle, erreichten 26-45% der Patienten eine CR, das Gesamtüberleben nach 5 Jahren lag ebenfalls bei nur 2-7% (Grimwade et al. 2001).

Farag und Kollegen untersuchten ein Kollektiv von AML Patienten im Alter ≥ 60 Jahren. Die Verteilung von unterschiedlichen zytogenetischen Aberrationen mit mehr ungünstigen und weniger günstigen Veränderungen konnte auch hier betätigt werden. Patienten mit komplexen Karyotyp und/oder seltenen Aberrationen zeigten hier niedrigere CR Raten mit 25-30%, die 5-JÜR betrug 0-2%. Diese Patienten profitieren nur minimal von einer Chemotherapie (Farag et al. 2006).

Bei der AML des jüngeren Erwachsenen hat in den letzten Jahren vor allem eine Intensivierung der Induktions- sowie der Postremissionstherapie zur Verbesserung der Prognose der Patienten geführt. Die Ergebnisse in der Therapie von Patienten im Alter ≥ 61 Jahren sind deutlich schlechter. Hier erreichen nur 40-60% eine

komplette Remission und 10-20% überleben die folgenden vier Jahre nach Diagnosestellung (4-JÜR). Diese Patienten profitieren nicht von einer Hochdosis-Chemotherapie (Schlenk et al. 2004, Löwenberg et al. 2003). Häufig besteht eine deutliche Resistenz gegenüber einer Chemotherapie. Damit im Zusammenhang stehen eine erhöhte Expression des *multi-drug resistance Glykoproteins* (MDR1), das höhere Alter und der höhere Anteil an ungünstigen zytogenetischen Veränderungen wie bereits weiter oben erläutert. Aus dem fortgeschrittenen Alters wiederum folgt eine schlechtere Verträglichkeit intensiver Chemotherapie und eine zunehmende Komorbidität der Patienten. Hinzu kommt eine erhöhte Inzidenz an AML Fällen welchen eine myelodysplastische Phase oder eine Behandlung anderer maligner Tumoren vorausging (sekundäre AML, sAML). Diese sind signifikant assoziiert mit einer niedrigen kompletten Remissionsrate (CR) und resistenten Erkrankung (resistant disease, RD). (Leith et al. 1997, Schlenk et al. 2004, Farag et al. 2006, Löwenberg et al. 2003).

Wie bereits erläutert bietet der Karyotyp neben dem Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die beste und wichtigste prognostische Information bei der AML des Erwachsenen. Dies trifft sowohl für jüngere (≤ 60 Jahre) als auch für ältere (> 60 Jahre) AML Patienten zu (Grimwade et al. 1998, Fröhling et al. 2006, Byrd et al. 2002). In 40-50 % aller Patienten, sowohl bei den jüngeren Erwachsenen als auch bei den Älteren, können keine klonalen Aberrationen mittels konventioneller Chromosomenanalyse nachgewiesen werden (Grimwade et al. 2001, Farag et al. 2006, Byrd et al. 2002). Diese Gruppe von Patienten mit normalem Karyotyp (NK-AML), welche alle der Gruppe mit intermediärem Risiko zugeordnet werden, ist jedoch klinisch sehr heterogen (Löwenberg et al. 2003, Estey und Döhner 2006, Schlenk et al. 2008). In den letzten Jahren wurden mehrere Genmutationen bei der NK-AML identifiziert, allerdings wurden diese überwiegend in der Population jüngerer AML-Patienten untersucht. Diese Mutationen sowie die dadurch verursachte Deregulation bei der Expression dieser Gene werden für die enorme Heterogenität in bestimmten zytogenetisch definierten Subgruppen, vor allem der Gruppe mit normalem Karotyp, verantwortlich gemacht (Döhner und Döhner 2008, Döhner 2007, Mrozek et al. 2007, Schlenk et al. 2008, Falini et al. 2005). Durch

die Charakterisierung dieser Genmutationen steigt auch das Verständnis für den pathophysiologischen Hintergrund und Mechanismus der Genese einer Leukämie. Aus dieser Entwicklung heraus lassen sich zwei wichtige Aussagen treffen. Erstens, manche dieser Genmutationen nehmen eine Stellung als weitere wichtige prognostische Information ein. Zweitens, basierend auf dem besseren Verständnis der Pathophysiologie und Leukämogenese können neue Therapien entwickelt werden mit dem Ziel in diese pathologischen molekularen Abläufe einzugreifen. Folglich sollte bei jeder neu diagnostizierten AML neben den Routineuntersuchungen inklusive zytogenetischen Untersuchungen auch ein Status dieser molekularen Marker erstellt werden (Döhner und Döhner 2008).

In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung von Mutationen des *NPM1* Gens an einer großen gut definierten Kohorte älterer AML Patienten. Mit einer Prävalenz von ca. einem Drittel aller Patienten unabhängig von Karyotyp und 45-64% der Patienten mit normalem Karyotyp (NK-AML) stellt die *NPM1* Mutation die häufigste genetische Veränderung bei der AML des Erwachsenen dar (Döhner 2007, Döhner und Döhner 2008, Thiede et al. 2006, Falini et al. 2005, Döhner et al. 2005, Mrózek et al. 2007). Inwieweit die *NPM1* Mutation bei der AML des älteren Patienten eine Rolle spielt, insbesondere ob ihr die gleiche prognostische Bedeutung zukommt, sollte anhand der vorliegenden Arbeit geprüft werden.

2005 wurde von Falini und Kollegen erstmals die Mutation des *NPM1* Gens mit der zytoplasmatischen Lokalisation und Expression von *Nucleophosmin* (*NPM1c*⁺) in Zusammenhang gebracht und ein gutes Ansprechen auf eine Induktionschemotherapie bei *NPM1c*⁺ Patienten beobachtet. Diese signifikante Verbesserung der Prognose wurde durch mehrere Studien bestätigt (Falini et al. 2005, Döhner et al. 2005, Schnittger et al. 2005, Thiede et al. 2007, Boonthimat et al. 2008). In diesen Studien wurde ebenfalls gezeigt dass die *FLT3*-ITD Mutation häufig gemeinsam mit einer *NPM1* Mutation auftritt. Dies ist in ca. 40% aller *NPM1* Mutationen der Fall. Von den vier möglichen Kombinationen (*NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{neg}, *NPM1*^{neg}/*FLT3*-ITD^{neg}, *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{mut}, *NPM1*^{neg}/*FLT3*-ITD^{mut}) weist das Auftreten einer *NPM1* Mutation ohne *FLT3*-ITD Mutation die beste Prognose auf. Dies wird vor allem deutlich in der Gruppe mit normalem Karyotyp, *NPM1*

Mutation und fehlender *FLT3*-ITD Mutation, welche mit einer deutlichen Verbesserung des Gesamtüberlebens (OS) und Ereignis-freiem Überleben (EFS) einhergeht (Döhner et al. 2005, Schnittger et al. 2005, Thiede et al. 2006, Boonthimat et al. 2008, Döhner und Döhner 2008, Estey und Döhner 2008, Döhner H 2007). Bis dato gibt es nur wenige Studien die an einem Kollektiv mit ausschließlich Patienten ≥ 61 Jahren durchgeführt wurden, was letztendlich Fokus dieser Arbeit war.

Becker und Kollegen untersuchten 2009 an 148 Patienten mit NK-AML im Alter ≥ 60 Jahren mehrere Genmutationen. Eine *NPM1* Genmutation kam hier bei 56% der Studienteilnehmer vor. Diese hatten eine höhere Rate an CR mit 84% gegenüber 48% der *NPM1*^{neg} Patienten und ein besseres Gesamtüberleben (OS) mit einer 3-JÜR von 35% versus 8% bei Vorliegen von Wild-Typ *NPM1*. Somit wurde auch hier, ebenso wie in dieser Arbeit gezeigt, die herausragende Prognose einer *NPM1* Mutation bei älteren Patienten mit NK-AML bestätigt. Besonders wurde diese Beobachtung für Patienten ≥ 70 Jahre beschrieben.

Auch Büchner et al. betrachteten 2008 AML Patienten sowohl jüngeren als auch älteren Alters und untersuchten unter anderem die Genmutationen *NPM1* und *FLT3*-ITD. Auch hier wurde die günstige Prognose bei NK-AML für das OS genannt und hier vor allem die Untergruppe mit einer *NPM1* Mutation, unabhängig vom Alter.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit war es den Nutzen einer additiven Therapie mit all-trans Retinolsäure (ATRA) zur Standard-Chemotherapie zu prüfen. Hierzu wurden die beiden Standard-Induktionsarme der AML HD98-B Studie (ein Arm mit Standard-Chemotherapie und ein Arm mit Standard-Chemotherapie plus ATRA) miteinander verglichen. Die Ergänzung der Chemotherapie mit ATRA erbrachte eine signifikante Besserung des klinischen Verlaufs. Bei additiver Gabe von ATRA zur Induktions- und Konsolidierungschemotherapie verbesserten sich die Raten von kompletten Remissionen (CR), Ereignis-freiem Überleben (EFS) und Gesamtüberleben (OS) der älteren Patienten (Schlenk et al. 2004).

Anfang der neunziger Jahre wurde die Aufmerksamkeit auf das Protein *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)* gerichtet. Dieses Proto-Onkogen codiert für ein mitochondriales Protein der inneren Membran und supprimiert bzw. verzögert den programmierten Zelltod, die sog. Apoptose, in dem es das transmembranäre Potential der Mitochondrien stabilisiert. In den leukämischen Zellen von AML Patienten mit schlechtem Outcome wurden hohe Konzentrationen des Proteins *bcl-2* gefunden. Bei genauerer Analyse stellte sich ein signifikanter Zusammenhang von hoher Expressionsrate des *bcl-2* Gens und einer niedrigen CR nach intensiver Chemotherapie, kürzerer DFS und OS heraus. Hohe Konzentrationen des Proteins *bcl-2* wirkten anti-apoptotisch und ließen leukämische Zellen länger leben (Campos et al. 1993, Maung et al. 1994, Hu et al. 1995, Karakas et al. 1998, Karakas et al. 2002). In-vitro Experimente mit der Substanz all-trans Retinolsäure (ATRA) zeigten eine Down-Regulation der *bcl-2* Expression, was einen möglichen Ansatzpunkt für den therapeutischen Nutzen des Vitamin A Derivats darstellte. Weiter wurde gezeigt dass dieser Effekt von ATRA nur dann vorliegt und wenn zuerst die chemotherapeutischen Agenzien und danach ATRA gegeben wird. Kein Effekt hatte die umgekehrte Abfolge der Medikamentenverabreichung (Yang et al. 1993, Andreef et al. 1999, Hu et al. 1995, Hu et al. 1995, Hu et al. 1998, Karakas et al. 1998).

Venditti und Kollegen führten 1995 eine Studie mit low-dose Cytarabin subkutan und oraler ATRA-Gabe, welche eine höhere CR Rate in der Gruppe mit ungünstiger Zytogenetik aufwies (Venditti et al 1995). Zwei weitere Studien wurden mit älteren Patienten durchgeführt. Schlenk und Kollegen konnten hier 2004 eine bessere CR Rate, EFS und OS für die Patienten aufzeigen, welche zu Induktion und Konsolidierung für den ATRA-Arm randomisiert wurden. Auch di Febo und Kollegen konnte 2007 in einer kleinen Studie ein längeres OS bei additiver ATRA-Therapie sehen (Schlenk et al. 2004, di Febo et al. 2007).

Interessante Daten zu ATRA und *NPM1* Mutationen in Bezug auf Regulation von Zellwachstum und Differenzierung wurden erstmals 2007 von Liu und Kollegen beschrieben. Demzufolge bildet *NPM1* während der durch Retinolsäure induzierten Zelldifferenzierung einen Komplex mit dem *Activating Protein*

Transcription Factor 2α (AP2α). Dieser Komplex wird zu mehreren Promotoren von *Retinoic-Acid-Responsive* Genen beordert, wozu auch das *Nucleophosmin* Gen selbst gehört. Dieser Kontakt ist abhängig von einer AP2α Konsensus Sequenz. Gestützt wird diese Beobachtung durch eine Veränderung der durch Retinolsäure und AP2α vermittelten Genexpression bei Suppression des *Nucleophosmin* durch RNA Interferenz (Liu et al. 2007).

Dies ist vor allem interessant, weil hier eine direkte Schnittstelle zwischen *Nucleophosmin* und ATRA aufgezeigt wird und durch eine verminderte Funktion von *NPM1* konsekutiv eine Störung der für die Zelldifferenzierung wichtigen Genexpression nachvollzogen werden kann. Dies könnte somit zur fehlenden Ausdifferenzierung von Zellen und dem erhöhtem Blastenanteil führen wie es bei der AML beobachtet wird. Weiter könnte durch oben genannte Ausführungen postuliert werden dass durch die *NPM1* Mutationen eine Komplexbildung zwischen *NPM1* und *AP2α* verhindert bzw. gestört wird, woraus letztlich auch eine Störung der Zelldifferenzierung resultiert. Diese Störung könnte womöglich mit der Gabe von All-trans Retinolsäure (ATRA), ähnlich wie bei der akuten Promyelozytenleukämie (APL), kompensiert werden.

4.2. Prognostische Bedeutung von *NPM1* Mutationen bei älteren AML-Patienten (>60 Jahre) innerhalb der Studien AML HD98-B und AMLSG 06-04

Die Häufigkeit einer *NPM1* Mutation aller Patienten (AP-AML) lag bei 26% und bei Patienten mit normalem Karyotyp (NK-AML) bei 47%. In Studien mit jüngeren Patienten wurden ebenfalls Werte von 25-35% bei allen Karyotypen (AP-AML) und 45-64% bei NK-AML gefunden (Döhner und Döhner 2008). Somit sind die Inzidenzen der *NPM1* Mutationen in den einzelnen Risikogruppierungen vergleichbar mit den Inzidenzen bei jüngeren Erwachsenen. In 85,5% der Fälle fanden wir bei Vorliegen einer Mutation den Mutationstyp A. Danach folgten die Typen B und D mit gemeinsam über 11% und drei weitere Mutationstypen mit <4%. Diese Verteilungen entsprechen in etwa den Ergebnissen bei der Population

der Patienten $\leq 60/\leq 55$ Jahren (Thiede et al. 2006, Falini et al. 2005, Döhner et al. 2005).

Aufgrund der prognostischen Bedeutung des *NPM1/FLT3-ITD* Genotyps wurde in die statistischen Auswertung der *FLT3-ITD* Mutationsstatus miteinbezogen. Die prognostische Relevanz des kombinierten *NPM1/FLT3-ITD* Genotyps wurde bereits mehrfach erläutert (siehe Kapitel 4.1.). Hier liegen die Inzidenzen mit 23% bei NK-AML und 17,3% bei allen Karyotypen in ähnlichem Bereich wie bei den AML Patienten $\leq 60/\leq 55$ Jahren in denen Werte um die 20% bei normalem Karyotyp und ca. 28-34% bei allen Karyotypen gefunden wurden (¹⁷Döhner und Döhner 2008). Ein signifikant häufigeres Auftreten der *FLT3-ITD* Mutation bei positivem *NPM1* Mutationsstatus konnte ebenfalls, wie bereits bei den jüngeren Patienten bekannt, bestätigt werden. Die Zahlen wurden bereits im Kapitel 3.5. erläutert.

Die prognostische Bedeutung einer Mutation des *NPM1* Gens bei neu diagnostizierter AML ist enorm. Diese Aussage wurde durchweg bei Studien mit jüngeren Patientenpopulationen gezeigt, so bestätigte sich diese Aussage auch in dieser Arbeit an älteren Patienten definiert mit 61 Jahren und älter. In mehreren Studien (mit jüngeren Erwachsenen AML Patienten) wurde ein günstiger Einfluss einer *NPM1* Mutation auf die Prognose nachgewiesen. Schon 2005, als der Zusammenhang zwischen *NPM1* Mutation und zytosolischer Lokalisation des *NPM1* Proteins veröffentlicht wurde beschrieben Falini und Kollegen eine Assoziation zwischen vorhandener *NPM1* Mutation und kompletter Remission (CR) (Falini et al. 2005). Da die Inzidenz einer *NPM1* Mutation innerhalb der NK-AML Gruppe durchschnittlich ca. 40-50% beträgt stellt sich die Frage ob diese Mutation für die Heterogenität der Prognose innerhalb dieser Gruppe verantwortlich ist (Döhner und Döhner 2008, Schlenk et al. 2008). Auch bei den älteren AML Patienten (≥ 61 Jahre) konnten wir eine signifikant bessere Prognose für Patienten mit dem Genotyp *NPM1*^{mut}/*FLT3-ITD*^{neg} aufzeigen

Dies traf sowohl für das Erreichen einer kompletten Remission als auch für die Endpunkte Rezidiv-freies Überleben und das Gesamtüberleben zu und dies nicht nur für die Gruppe der NK-AML sondern auch für die Gruppe aller AML Patienten. Besonders deutlich wurden diese Unterschiede in der Gruppe der AML Patienten mit normalem Karyotyp (NK-AML). Hier zeigten die Patienten mit dem Genotyp $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$ einen deutlich signifikanten Unterschied im Hinblick auf die Endpunkte Rezidiv-freies Überleben und Gesamtüberleben.

Basierend auf diesen Daten ergab sich die Frage ob eine ganz bestimmte genetische Subgruppe von der ATRA Therapie profitiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden dass Patienten mit dem Genotyp $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$ von einer additiven ATRA Therapie signifikant profitieren und das Gesamtüberleben (OS) signifiaknt verbessert werden konnte, wie eindrucksvoll in den Abbildungen 11 und 12 im Ergebnisteil dargestellt ist. Die Häufigkeiten für Rezidiv-freies Überleben (RFS) und Gesamtüberleben (OS) waren mit additiver ATRA-Therapie bei NK-AML und $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$ Genotyp deutlich höher im Vergleich zu Patienten ohne ATRA-Therapie. Somit konnten mit dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass der $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$ Genotyp nicht nur prognostisch relevant ist, sondern auch eine prädiktive Bedeutung im Hinblick auf eine ATRA-Therapie besitzt.

Im vorangegangenen Abschnitt (siehe 4.1.) wurden bereits die Interaktionen zwischen *bcl-2*, *NPM1* und *AP2 α* erläutert. Dieser Zusammenhang, welcher auf Daten von in vitro Experimenten basiert, konnte durch die Randomisierung der AML HD98-B Studie in Studienarme mit und ohne additive ATRA-Therapie zur Standardchemotherapie inklusive Subgruppenanalyse bestätigt werden. Es konnte deutlich gezeigt werden dass ältere AML Patienten mit dem Genotyp $NPM1^{pos}/FLT3-ITD^{neg}$ einen günstigen Verlauf aufweisen, insbesondere wenn sie eine ATRA-Therapie erhalten (Schlenk/Döhner et al. 2009).

4.3. Perspektive

Es konnte nachgewiesen werden dass der Genotyp $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$ bei der AML des älteren AML Patienten von enormer prognostischer Bedeutung ist und mit einem besonders günstigen Verlauf assoziiert ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden dass der günstige Effekt vor allem durch die Gabe von ATRA zur Standardchemotherapie innerhalb dieser Gruppe erwirkt wird.

Basierend auf diesen Ergebnissen kann man empfehlen bei jeder neu diagnostizierten AML neben den Standardanalysen wie der zytogenetischen Untersuchung auch den $NPM1$ und $FLT3$ Genotyp zu bestimmen, da dieser unabhängig vom Alter prognostische und therapeutische Bedeutung besitzt. Im Falle des Genotyps $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$ sollte im Rahmen von Studien eine zur Standardchemotherapie additive ATRA Therapie gegeben und weiter geprüft werden um die hier aufgezeigten Effekte zu validieren.

Die Daten stützen darüber hinaus die derzeit postulierte Hypothese $NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}$ als eigene Entität aufzuführen.

5. Zusammenfassung

2005 wurden erstmals Mutationen im *NPM1* Gen mit einer Inzidenz von 35,2% bei AML nachgewiesen und der Zusammenhang zwischen *NPM1* Mutation und Fehllokalisation im Zytoplasma bei AML Patienten hergestellt. Bei fast allen Mutationen findet sich ein Verlust der Codons W288 und W290 wodurch ein neues nukleäres Exportsignal (NES) am C-terminalen Ende von *NPM1* entsteht, welches für die aberrante zytoplasmatische Lokalisation verantwortlich ist. Klinisch sind *NPM1* Mutationen mit einer günstigen Prognose assoziiert sind, insbesondere wenn gleichzeitig keine *FLT3*-ITD Mutation vorliegt. Die Bedeutung von *NPM1* Mutationen vor allem im Kontext mit *FLT3* Mutationen ist bei älteren Patienten bislang weitgehend unklar. Ziel der Arbeit war es an einer großen Kohorte von älteren AML Patienten, welche im Rahmen der AML HD98-B Studie und AMLSG 06-04 Studie therapiert wurden, die Inzidenz von *NPM1* Mutationen zu untersuchen und den prognostischen Stellenwert dieser Genmutation zu evaluieren. Auf Grund der prognostischen Bedeutung des Genotyps *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{neg} wurden für diese Analysen der *FLT3*-ITD Status miteinbezogen. Ein weiterer wichtiger Aspekt war es zu prüfen, inwieweit eine Therapie mit ATRA zusätzlich zur Standard-Induktionstherapie einen prognostischen Einfluß in Abhängigkeit des Genotyps aufweist.

Nachdem sich der therapeutische Nutzen von ATRA vor allem bei der akuten Promyelozyten-leukämie (APL) etabliert hatte wurde in weiteren Studien versucht einen ähnlichen Effekt auch bei der Non-APL AML nachzuweisen. Hier gab es einige Hinweise für einen positiven Effekt, wobei die exakten Mechanismen jedoch unbekannt sind. Ein direkter Zusammenhang von *NPM1* und ATRA wurde erstmals 2007 publiziert. Hier wurde der Transkriptionsfaktor *AP2α* als Bindungspartner des *NPM1* nachgewiesen, welcher Einfluss auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung hat. Dieser Komplex reguliert die Transkription von Genen und deren Expression während der durch Retinsäure induzierten Differenzierung. Unter anderem wird hier die Transkription des *Nucleophosmin* Gens selbst reguliert. Basierend auf diesen Erkenntnissen war eine weitere wichtige Fragestellung inwieweit sich das Zusammenspiel zwischen *NPM1* und ATRA, das in vitro nachgewiesen werden konnte, auch klinische

Relevanz besitzt. Hierfür wurde ein Teil der AML HD-98B Studie für den Studienarm B1 und somit für eine zusätzliche ATRA Therapie zur Standardchemotherapie randomisiert. Im Rahmen der hier durchgeführten Analysen konnte der prognostische und prädiktive Wert des *NPM1/FLT3*-ITD Genotyps sowie einer additiven ATRA-Therapie evaluiert werden.

Die gefundenen Inzidenzen von *NPM1* und *FLT3-ITD* Mutationen waren nur geringfügig niedriger als bei jüngeren AML Patienten (≤ 55 -60 Jahre). Die Häufigkeit einer *NPM1* Mutation aller Patienten (AP-AML) lag bei 26% und bei NK-AML 47%. Bei Studien mit jüngeren Patienten wurden ebenfalls Werte von 25-35% über alle Karyotypen (AP-AML) und 45-64% bei NK-AML gefunden. Die Ergebnisse sind somit vergleichbar mit denen von jüngeren Patienten.

In mehreren Studien an jüngeren Patienten wurde der Genotyp *NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}* mit einer besonders günstigen Prognose verknüpft. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl im univariaten als auch im multivariaten Modell für den Genotyp *NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}* ein signifikant besseres RFS und OS im Vergleich zu allen anderen Genotypen gezeigt werden. Dieses Ergebnis konnte nicht nur bei allen Patienten sondern vor allem in der Subgruppe der NK-AML aufgezeigt werden. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass in der Subgruppe mit NK-AML und dem Genotyp *NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}* die Prognose bezüglich RFS und OS bei additiver ATRA Therapie signifikant besser war.

Aufgrund der klinischen Relevanz des Genotyps *NPM1/FLT3*-ITD im Hinblick auf die Prognose und das Ansprechen auf eine ATRA-haltige Therapie ist die Erhebung des *NPM1/FLT3* Mutationsstatus bei Diagnose altersunabhängig obligat, da hierdurch Patienten identifiziert werden können, die eine besonders gute Prognose aufweisen, insbesondere wenn sie eine additive Therapie mit ATRA erhalten. Somit liefern diese Daten eine grundlegende Basis in der Therapieentscheidung und für die Durchführung weiterer ATRA-haltiger Therapiestudien, insbesondere für Patienten mit *NPM1* Mutation.

6. Literaturverzeichnis

1. Andreeff M, Jiang S, Zhang X, Konopleva M, Estrov Z, Snell VE, Xie Z, Okcu MF, Sanchez-Williams G, Dong J, Estey EH, Champlin RC, Kornblau SM, Reed JC, Zhao S: Expression of bcl-2-related genes in normal and AML progenitors: changes induced by chemotherapy and retinoic acid. *Leukemia* 13: 1881-92 (1999).
2. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Whitman SP, Wu YZ, Schwind S, Paschka P, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD: Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 28: 596-604 (2010).
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33: 451-458 (1976).
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103: 620-625 (1985).
5. Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, Terre C, Tigaud I, Castaigne S, Raffoux E, De Botton S, Fenaux P, Dombret H, Preudhomme C: Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood* 106: 3618-3620 (2005).
6. Bolli N, Nicoletti I, de Marco MF, Bigerna B, Pucciarini A, Mannucci R, Martelli MP, Liso A, Mecucci C, Fabbiano F, Martelli MF, Henderson BR, and Falini B: Born to Be Exported: COOH-terminal nuclear export signals of different strength ensure cytoplasmic accumulation of nucleophosmin leukemic mutants. *Cancer Res* 67: 6230-6237 (2007).
7. Boonthimat C, Thongnoppakhun W, Auewarakul CU: Nucleophosmin mutation in Southeast Asian acute myeloid leukemia: eight novel variants, FLT3

- coexistence and prognostic impact of NPM1/FLT3 mutations. *Haematologica* 93: 1565-1569 (2008).
8. Büchner T, Berdel WE, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S, Müller-Tidow C, Braess J, Spiekermann K, Kienast J, Staib P, Grüneisen A, Kern W, Reichle A, Maschmeyer G, Aul C, Lengfelder E, Sauerland MC, Heinecke A, Wörmann B, Hiddemann W: Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. *J Clin Oncol* 27: 61-69 (2009).
9. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD: Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100: 4325-4336 (2002).
10. Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, Archimbaud E, Magaud JP, Guyotat D: High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 81: 3091-3096 (1993).
11. Carter BZ, Milella M, Altieri DC, Andreeff M: Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood* 97: 2784-2790 (2001).
12. Chen W, Rassidakis GZ, Medeiros LJ: Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 130: 1687-92 (2006).
13. Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, Schiffer CA, Bennett JM, Bloomfield CD, Brunning R, Gale RP, Grever MR and Keating MJ: Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukaemia. *J Clin Oncol* 8: 813-819 (1990).
14. Chommienne C, Fenaux P, Degos L: Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB J* 10: 1025-1030 (1996).
15. Chou WC, Tang JL, Lin LI, Yao M, Tsay W, Chen CY, Wu SJ, Huang CF, Chiou RJ, Tseng MH, Lin DT, Lin KH, Chen YC, Tien HF: Nucleophosmin

mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res* 66: 3310-3316 (2006).

16. Colombo E, Bonetti P, Lazzerini Denchi E, Martinelli P, Zamponi R, Marine JC, Helin K, Falini B, Pelicci PG: Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Mol Cell Biol* 25: 8874-8886 (2005).

17. Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG: Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4: 529-533 (2002).

18. Dhar SK, Lynn BC, Daosukho C, St Clair DK: Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene. *J Biol Chem* 279: 28209-28219 (2004).

19. Di Febo A, Laurenti L, Falcucci P, Tosti ME, Fianchi L, Pagano L, Leone G: All-trans retinoic acid in association with low dose cytosine arabinoside in the treatment of acute myeloid leukemia in elderly patients. *Am J Ther* 14: 351-355 (2007).

20. Döhner H: AML HD98-B Therapieprotokoll zur Behandlung der AML des älteren (>60 Jahre) Patienten. Randomisierte Doppelinduktion mit ICE versus ICE + ATRA gefolgt von Frühkonsolidierung und anschließender Randomisation zwischen intensiver Spätkonsolidierung- versus Erhaltungstherapie (2000).

21. Döhner H: Implication of the molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007: 412-419 (2007).

22. Döhner K, Döhner H: Rush hour in AML: news on NPM traffic. *Blood* 107: 4200-4201 (2006).

23. Döhner K and Döhner H: Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 93: 976-982 (2008).

24. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, and Döhner H, for the AML Study Group (AMLSG): Mutant Nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 106: 3740-3746 (2005).

25. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, Hoster E, Schneider S, Zellmeier E, Benthaus T, Sauerland MC, Berdel WE, Büchner T, Wörmann B, Braess J,

- Hiddemann W, Bohlander SK, Spiekermann K: Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol* 28: 570-577 (2010).
26. Erba HP: Prognostic factors in elderly patients with AML and the implications for treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007: 420-428 (2007).
27. Estey E, Döhner H: Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368: 1894-1907 (2006).
28. Falini B, Bolli N, Shan J, Martelli MP, 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 MF, Gu W, Mecucci C, Nicoletti I: Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood* 107: 4514-4523 (2006).
29. 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 PG, Martelli MF: GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 352: 254-266 (2005).
30. Falini B, Mecucci C, Saglio G, Lo Coco F, Diverio D, Brown P, Pane F, Mancini M, Martelli MP, Pileri S, Haferlach T, Haferlach C, Schnittger S: NPM1 mutations and cytoplasmic nucleophosmin are mutually exclusive of recurrent genetic abnormalities: a comparative analysis of 2562 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 93: 439-442 (2008).
31. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, Mandelli F, Mecucci C, Martelli MF: Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 92: 519-532 (2007).
32. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, and Mecucci C: Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biological and clinical features. *Blood* 109: 874-885 (2007).

33. Farag SS, Archer KJ, Mrózek K, Ruppert AS, Carroll AJ, Vardiman JW, Pettenati MJ, Baer MR, Qumsiyeh MB, Koduru PR, Ning Y, Mayer RJ, Stone RM, Larson RA, Bloomfield CD: Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood* 108: 63-73 (2006).
34. Fenaux P, Chastang C, Chevret S, Sanz M, Dombret H, Archimbaud E, Fey M, Rayon C, Huguet F, Sotto JJ, Gardin C, Makhoul PC, Travade P, Solary E, Fegueux N, Bordessoule D, Miguel JS, Link H, Desablens B, Stamatoullas A, Deconinck E, Maloisel F, Castaigne S, Preudhomme C, and Degos L for the European APL Group. A randomized comparison of all transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 94: 1192-1200 (1999).
35. Ferrara F, Pinto A: Acute myeloid leukemia in the elderly: current therapeutic results and perspectives for clinical research. *Rev Recent Clin Trials* 2: 33-41 (2007).
36. Fröhling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Döhner K, and Döhner H for the German-Austrian AMLSG: Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood* 108: 3280-3288 (2006).
37. Gaidzik V, Döhner K: Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Semin Oncol* 35: 346-355 (2008).
38. Gaines P, Berliner N: Retinoids in myelopoiesis. *J Biol Regul Homeost Agents* 17: 46-65 (2003).
39. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE: Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol* 28: 2739-2747 (2010).

40. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, Medical Research Council Adult Leukemia Working Party: The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 98: 1312-1320 (2001).
41. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92: 2322-2333 (1998).
42. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP: Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 493-505 (2006).
43. Grisendi S, Pandolfi PP: NPM mutations in acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 352: 291-292 (2005).
44. Gundestrup M, Storm HH: Radiation-induced acute myeloid leukaemia and other cancers in commercial jet cockpit crew: a population-based cohort study. *Lancet* 354: 2029-2031 (1999).
45. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD: The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 10: 1419-1432 (1999).
46. Heilmeyer B, Buske C, Spiekermann K, Bohlander S, Feuring-Buske M, Hiddemann W, Braess J: Diagnostik, Klassifikation und Prognosefaktoren der akuten myeloischen Leukämie. *Med Klin (Munich)* 102: 296–308 (2007).
47. Herrera JE, Correia JJ, Jones AE, Olson MO: Sedimentation analyses of the salt- and divalent metal ion-induced oligomerization of nucleolar protein B23. *Biochemistry* 35: 2668– 2673 (1996).
48. Hu ZB, Minden MD, McCulloch EA: Direct evidence for the participation of bcl-2 in the regulation by retinoic acid of the Ara-C sensitivity of leukemic stem cells. *Leukemia* 9: 1667–1673 (1995).

49. Hu ZB, Minden MD, McCulloch EA: Phosphorylation of bcl-2 after exposure of human leukemic cells to retinoic acid. *Blood* 92: 1768-1775 (1998).
50. Hu ZB, Yang GS, Li M, Miyamoto N, Minden MD, McCulloch EA: Mechanism of cytosine arabinoside toxicity to the blast cells of acute myeloblastic leukemia: involvement of free radicals. *Leukemia* 9: 789-798 (1995).
51. Inouye CJ, Seto EJ: Relief of YY1-induced transcriptional repression by protein-protein interaction with the nucleolar phosphoprotein B23. *J Biol Chem* 269: 6506-6510 (1994).
52. Kane EV, Roman E, Cartwright R, Parker J, Morgan G: Tobacco and the risk of acute leukaemia in adults. *Br J Cancer* 81: 1228-1233 (1999).
53. Karakas T, Maurer U, Weidmann E, Miething CC, Hoelzer D, Bergmann L: High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Ann Oncol* 9: 159-165 (1998).
54. Karakas T, Miething CC, Maurer U, Weidmann E, Ackermann H, Hoelzer D, Bergmann L: The coexpression of the apoptosis-related genes bcl-2 and wt1 in predicting survival in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia* 6: 846-854 (2002).
55. Ketley NJ, Allen PD, Kelsey SM, Newland AC: Modulation of idarubicin-induced apoptosis in human acute myeloid leukemia blasts by all-trans retinoic acid, 1,25(OH)₂ vitamin D₃, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 90: 4578-4587 (1997).
56. Kondo T, Minamino N, Nagamura-Inoue T, Matsumoto M, Taniguchi T, Tanaka N: Identification and characterization of nucleophosmin/B23/ numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene* 15: 1275-1281 (1997).
57. Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, Frazier AA, Allamargot C, Quelle FW, Quelle DE: Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol* 25: 1258-1271 (2005).
58. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, Head DR, Appelbaum FR, Willman CL: Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* 89: 3323-3329 (1997)

59. Lindström MS, Zhang Y: B23 and ARF: friends or foes? *Cell Biochem Biophys* 46: 79-90 (2006).
60. Liso A, Castiglione F, Cappuccio A, Stracci F, Schlenk RF, Amadori S, Thiede C, Schnittger S, Valk PJ, Döhner K, Martelli MF, Schaich M, Krauter J, Ganser A, Martelli MP, Bolli N, Löwenberg B, Haferlach T, Ehninger G, Mandelli F, Döhner H, Michor F, Falini B: A one-mutation mathematical model can explain the age incidence of acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1). *Haematologica* 93: 1219-1226 (2008).
61. Liu H, Tan BC, Tseng KH, Chuang CP, Yeh CW, Chen KD, Lee SC, Yung BY: Nucleophosmin acts as a novel AP2alpha-binding transcriptional corepressor during cell differentiation. *EMBO Rep* 8: 394-400 (2007).
62. Löwenberg B: Treatment of the elderly patient with acute myeloid leukaemia. *Baillieres Clin Haematol* 9: 147-59 (1996).
63. Löwenberg B: Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 65-75 (2001).
64. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341: 1051-1062 (1999).
65. Löwenberg B, Griffin JD, Tallman MS: Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003: 82-101 (2003).
66. Maung ZT, MacLean FR, Reid MM, Pearson AD, Proctor SJ, Hamilton PJ, Hall AG: The relationship between bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukaemia. *Br J Haematol* 88: 105-109 (1994).
67. Mrózek K and Bloomfield CD: Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 169-177 (2006).
68. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, and Bloomfield CD: Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 109: 431-448 (2007).
69. Nakagawa M, Kameoka Y, Suzuki R: Nucleophosmin in acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 352: 1819-1820 (2005).

70. Nakanishi M, Tanaka K, Shintani T, Takahashi T, Kamada N: Chromosomal instability in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome patients among atomic bomb survivors. *J Radiat Res (Tokyo)* 40: 159-167 (1999).
71. Namboodiri VM, Akey IV, Schmidt-Zachmann MS, Head JF, Akey CW: The structure and function of Xenopus NO38-core, a histone chaperone in the nucleolus. *Structure* 12: 2149-2160 (2004).
72. Naoe T, Suzuki T, Kiyoi H, Urano T. Nucleophosmin: a versatile molecule associated with hematological malignancies. *Cancer Sci* 97: 963-969 (2006).
73. Napoli JL: Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1440: 139-162 (1999).
74. Napoli JL: Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 63: 139-188 (1999).
75. Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, Witz F, Blaise D, Pigneux A, Thomas X, Rigal-Huguet F, Lioure B, Auvrignon A, Fièrè D, Reiffers J, Castaigne S, Leverger G, Harousseau JL, Socié G, Dombret H: A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 99: 3517-3523 (2002).
76. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder JD, Bove KE, Fukasawa K: Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103: 127-140 (2000).
77. Pasqualucci L, Liso A, Martelli MP, Bolli N, Pacini R, Tabarrini A, Carini M, Bigerna B, Pucciarini A, Mannucci R, Nicoletti I, Tiacci E, Meloni G, Specchia G, Cantore N, Di Raimondo F, Pileri S, Mecucci C, Mandelli F, Martelli MF, Falini B: Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: Impact on WHO classification. *Blood* 108: 4146-4155 (2006).
78. Posch KC, Burns RD, Napoli JL: Biosynthesis of all-trans-retinoic acid from retinal. Recognition of retinal bound to cellular retinol binding protein (type I) as substrate by a purified cytosolic dehydrogenase. *J Biol Chem* 267: 19676-19682 (1992).
79. Radich PR, Hutchinson F: Molecular classification of acute myeloid leukemia: are we there yet? *J Clin Oncol* 26: 4293-4295 (2008).

80. Rathnasabapathy R, Lancet JE: Management of acute myelogenous leukemia in the elderly. *Cancer Control* 10: 469-477 (2003).
81. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C: Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 22: 915-931 (2008).
82. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467 (1977).
83. Schlenk R: AMLSG 06-04 Therapieprotokoll. Studie zur Kombination von All-trans Retinsäure mit Standard-Induktions- und Konsolidierungstherapie bei älteren Patienten mit neu diagnostizierter akuter myeloischer Leukämie (2006).
84. Schlenk RF, Döhner K, Kneba M, Götze K, Hartmann F, del Valle F, Kirchen H, Koller E, Fischer JT, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Groner S, Krebs B, Kayser S, Corbacioglu A, Anhalt A, Benner A, Fröhling S, and Döhner H for the German-Austrian AMLSG: Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from AMLSG trial AML HD98B. *Haematologica* 94: 54–60 (2009).
85. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, and Döhner H for the German-Austrian AMLSG: Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 358: 1909-1918 (2008).
86. Schlenk RF, Fröhling S, Hartmann F, Fischer JT, Glasmacher A, del Valle F, Grimminger W, Götze K, Waterhouse C, Schoch R, Pralle H, Mergenthaler HG, Hensel M, Koller E, Kirchen H, Preiss J, Salwender H, Biedermann HG, Kremers S, Griesinger F, Benner A, Addamo B, Döhner K, Haas R, Döhner H for the AML Study Group Ulm: Phase III study of all-trans retinoic acid in previously untreated patients 61 years or older with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 18: 1798-1803 (2004).
87. Schnittger S, Dicker F, Kern W., Haferlach T, Haferlach C: Cooperating molecular mutations in AML/RUNX1 mutated AML differ dependent on the cytogenetic subgroup. *Blood* 110: 114a (2007).

88. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B: Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 106: 3733-3739 (2005).
89. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J, Vardiman JW, Rowley JD, Larson RA: Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* 102: 43-52 (2003).
90. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, Kodaera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Kinoshita T, Emi N, Naoe T: Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 106: 2854-2861 (2005).
91. Tan AY, Westerman DA, Carney DA, Seymour JF, Juneja S, Dobrovic A: Detection of NPM1 exon 12 mutations and FLT3 - internal tandem duplications by high resolution melting analysis in normal karyotype acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 1: 10 (2008).
92. Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Ogden A, Shepherd L, Willman C, Bloomfield CD, Rowe JM, Wiernik PH: All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 337: 1021-1028 (1997).
93. Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Woods WG, Ogden A, Weinstein H, Shepherd L, Willman C, Bloomfield CD, Rowe JM, Wiernik PH: All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. *Blood* 100: 4298-4302 (2002).
94. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, Ehninger G: Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 107: 4011-4020 (2006).
95. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD: The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100: 2292-2302 (2002).
96. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD: The 2008

revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114: 937-951 (2009).

97. Venditti A, Stasi R, Del Poeta G, Buccisano F, Aronica G, Bruno A, Pisani F, Caravita T, Masi M, Tribalto M: All-trans retinoic acid and low-dose cytosine arabinoside for the treatment of 'poor prognosis' acute myeloid leukemia. *Leukemia* 9: 1121-1125 (1995).

98. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CA, Delwel R, Löwenberg B, Valk PJ: Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 106: 3747-3754 (2005).

99. Wedding U, Bokemeyer C, Meran JG, Working Group Geriatric Oncology of the German Society for Haematology and Oncology (DGHO), Austrian Society for Haematology and Oncology (OGHO), German Society for Geriatrics (DGG): Elderly patients with acute myeloid leukaemia: characteristics in biology, patients and treatment. *Onkologie* 27: 72-82 (2004).

100. Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, Gray RG, Hann IM, Harrison CJ, Rees JK, Stevens RF, Walker H: A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br J Haematol* 107: 69-79 (1999).

101. Wilson CS, Davidson GS, Martin SB, Andries E, Potter J, Harvey R, Ar K, Xu Y, Kopecky KJ, Ankerst DP, Gundacker H, Slovak ML, Mosquera-Caro M, Chen IM, Stirewalt DL, Murphy M, Schultz FA, Kang H, Wang X, Radich JP, Appelbaum FR, Atlas SR, Godwin J, Willman CL: Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. *Blood* 108: 685-696 (2006).

102. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R: Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile

that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 113: 3088-3091 (2009).

103. Yang GS, Minden MD, McCulloch EA: Influence of schedule on regulated sensitivity of AML blasts to cytosine arabinoside. *Leukemia* 7: 1012–1019 (1993).

7. Anhang

7.1. Genomische Sequenz NPM Exon 12 und cDNA NPM1

GenBank Eingangsnummer AC093246, genomische DNA:

```

84001 tcatcaggag gtgggaacac agcactaaat ccttatgatg aaaaagtggg tagctccaga
                                     NPM1-R>>>>>
84061 gagaatattg aaggggaggg caggacatt  ctcatagaat tttacaagac tatttgccat
84121 tcctaactac  attaattatt tctttgacaa agtataaagc agttaaataa gtcaatagaa
84181 accgtgctac  tttattaataa tactgagttt tatttccacat gtatatTTTT gtctccccac
84241 catttccatg tctgaccacc gctactacta tgcctatca taacattcca tacatactta
                                     NPM1-R2>>>>>
84301 aaaccaagca aagggtggag ttccatcttt aaaaactaaa cagggcatttt ggacaacaca
84361 ttcttggcaa tagaacctgg acaacattta tcaaacacgg tagggaaagt tctcactctg
84421 cattataaaa aggacagcca gatatcaact gttacagaaa tgaaataaga cggaaaatTT
84481 tttaacaaat tgtttaaaact attttcttaa agagacttcc tccactgcca gagatcttga
84541 atagcctgga aaaaaaaaaa aagaaatgtg gtttaaggaac cacacaactt catagacatc
84601 aataaattaa atgtctcttt gcatagtcca acatctattt ttcattctac caccagagag
84661 ttaactctag ataaagatat gactccaaga aaatttatac tcagatgtaa ttttaattcca
<<<<<NPM1-F
84721 aacactttta tcagtcataa aaatgtgaac aatatactaa taattattta atagtttagc
84781 attattttact taaggaaatc aacagaaaga acagagacc c atatggccaa tgttacttcc
84841 aacttcatct cccgagatca gcttttagagt tggccagatt tggcaaataa agttacataa
84901 acaccagaaa cttattctga attgacctgtg catgtgtgcc tgggcatgtg tacattttaga
84961 aaaaactata tgctgaggct aggcattggg gctcacgct gtaatcccta cactttggga
    
```

Exon 12

Abbildung 8: Auszug aus der genomische Sequenz des NPM Exon 12

Blaue Schrift, Bereich des Exon 12; **Blau Schrift fett gedruckt**, codierender Bereich; **Gelb hinterlegt**, Bereich der Primer.

Hier ist ersichtlich, dass die Primer R und F im Intron, Primer R2 in der untranslated region des Exon 12 liegen und durch Pfeile veranschaulicht in welche Richtung die Synthese der entstehenden mRNA läuft.

GenBank Eingangsnummer NM_002520 (wild type), cDNA:

```

1 ccctgggtgtg attccgctcct gcgcggttgt tctctggagc agcgttcttt tatctccgctc
61 cgccttctct cctacctaag tgcgtgccgc caccgatgg aagattcgat ggacatggac
121 atgagccccc tgaggcccca gaactatctt ttcggttggg aactaaaggc cgacaaagat
181 tatcacttta agtgggataa tgatgaaaat gagcaccagt tatctttaag aacggtcagt
241 ttaggggctg gtgcaaagga tgagttgcac attggtgaa gaggagcaat gaattacgaa
301 ggcagtcctc ttaaagtaac actggcaact ttgaaatgt cgtacagcc aacggtttcc
361 cttgggggct ttgaaataac accaccagtg gtcttaaggt tgaagtgtgg ttcagggccca
421 gtgcatatta gtggacagca cttagtagct gtggaggaa atgcagagtc agaagatgaa
481 gaggaggagg atgtgaaact cttaaagtata tctggaaagc ggtctgcccc tggagggtggg
541 agcaaggttc cacagaaaaa agtaaaactt gctgctgatg aagatgatga cgatgatgat
601 gaagaggatg atgatgaaga tgatgatgat gatgattttg atgatgagga agctgaagaa
661 aaagcggcag tgaagaaatc tatacgagat actccagcca aaaatgcaca aaagcaaat
721 cagaatggaa aagactcaaa accatcatca acaccaagat caaaaggaca agaatccttc
781 aagaaacagg aaaaaactcc taaaacacca aaaggaccta gttctgtaga agacattaaa
841 gcaaaaatgc aagcaagtat agaaaaaggt ggttctcttc ccaaagtgga agccaaattc
901 atcaattatg tgaagaattg cttccggatg actgaccaag aggctattca agatctctgg
961 cagtggagga agtctcttta agaaaatagt ttaacaatt tgttaaaaaa ttttccgctc
1021 ttttccattt ctgtaacagt tgatatctgg ctgtcctttt tataatgcag agtgagaact
1081 ttccctaccg tgtttgataa atgttgtcca ggttctattg ccaagaatgt gttgtccaaa
1141 atgcctgttt agtttttaa gatggaactc caccttttgc ttggttttaa gtatgtatgg
1201 aatgttatga taggacatag tagtagcggg ggtcagacat ggaaatggg gggagacaaa
1261 aatatacatg tgaataataa ctcagtattt taataaagta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1321 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
    
```

Exon12

Abbildung 8: cDNA des NPM1 Gens

Blaue Schrift (941-1350), Bereich des Exon 12; **Blau und schwarze Schrift fett gedruckt (97-981)**, codierender Bereich; Schwarze Schrift (1-96), 5' untranslated region (5'UTR); Blaue Schrift nicht fett gedruckt (982-1350), 3' untranslated region (3'UTR) mit poly-A-tail.

7.2. Komplette cDNA aller gefundenen Mutationen

GenBank Eingangsnummer AY740634, cDNA der NPM1 Mutation A:

```

1 ggttgttctc tggagcagcg ttcttttata tccgtccgcc ttctctccta cctaagtgcg
61 tgccgccacc cgatggaaga ttcgatggac atggacatga gccccctgag gccccagaac
121 tatcttttcg gttgtgaact aaaggccgac aaagattatc actttaaggt ggataatgat
181 gaaaatgagc accagttatc ttttaagaacg gtcagtttag gggctgggtc aaaggatgag
241 ttgcacattg ttgaagcaga ggcaatgaat tacgaaggca gtccaattaa agtaacact
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 gaaaaagta
541 aaacttgctg ctgatgaaga tgatgacgat gatgatgaag aggatgatga tgaagatgat
601 gatgatgatg attttgatga tgaggaagct gaagaaaaag cgccagtgaa gaaatctata
661 cgagatactc cagccaaaaa tgcacaaaag tcaaatcaga atggaaaaga ctcaaaacca
721 tcatcaacac caagatcaaa aggacaagaa tccttcaaga aacaggaaaa aactcctaaa
781 acacaaaaag gacctagttc tgtagaagac attaaagcaa aaatgcaagc aagtatagaa
841 aaagggtggt ctcttcccaa agtgggaagcc aaattcatca attatgtgaa gaattgcttc
901 cggatgactg accaagaggc tattcaagat ctctgtctgg cagtggagga agtctcttta
961 agaaaatagt ttaaacaatt tgtaaaaaaa ttttccgtct tatttcattt ctgtaacagt
1021 tgatatctgg ctgtcctttt tataatgcag agtgagaact ttcctaccg tgtttgataa
1081 atgttggtcca gg

```

GenBank Eingangsnummer AY740635, cDNA der NPM1 Mutation B:

```

1 ggttgttctc tggagcagcg ttcttttata tccgtccgcc ttctctccta cctaagtgcg
61 tgccgccacc cgatggaaga ttcgatggac atggacatga gccccctgag gccccagaac
121 tatcttttcg gttgtgaact aaaggccgac aaagattatc actttaaggt ggataatgat
181 gaaaatgagc accagttatc ttttaagaacg gtcagtttag gggctgggtc 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 gaaaaagta
541 aaacttgctg ctgatgaaga tgatgacgat gatgatgaag aggatgatga tgaagatgat
601 gatgatgatg attttgatga tgaggaagct gaagaaaaag cgccagtgaa gaaatctata
661 cgagatactc cagccaaaaa tgcacaaaag tcaaatcaga atggaaaaga ctcaaaacca
721 tcatcaacac caagatcaaa aggacaagaa tccttcaaga aacaggaaaa aactcctaaa
781 acacaaaaag gacctagttc tgtagaagac attaaagcaa aaatgcaagc aagtatagaa
841 aaagggtggt ctcttcccaa agtgggaagcc aaattcatca attatgtgaa gaattgcttc
901 cggatgactg accaagaggc tattcaagat ctctgcatgg cagtggagga agtctcttta
961 agaaaatagt ttaaacaatt tgtaaaaaaa ttttccgtct tatttcattt ctgtaacagt
1021 tgatatctgg ctgtcctttt tataatgcag agtgagaact ttcctaccg tgtttgataa
1081 atgttggtcca gg

```

GenBank Eingangsnummer AY740637, cDNA der NPM1 Mutation D:

```
1 ggttggttctc 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 ggggcttga aataacacca
361 ccagtggctc taaggttgaa gtgtggttca gggccagtgc atattagtgg acagcactta
421 gtagctgtgg aggaagatgc agagtcagaa gatgaagagg aggaggatgt gaaactctta
481 agtataatctg gaaagcggtc tgcccctgga ggtggtagca aggttcaca gaaaaagta
541 aaacttgctg ctgatgaaga tgatgacgat gatgatgaag aggatgatga tgaagatgat
601 gatgatgatg attttgatga tgaggaagct gaagaaaaag cgccagtgaa gaaatctata
661 cgagatactc cagccaaaaa tgcacaaaag tcaaatcaga atggaaaaga ctcaaaacca
721 tcatcaaacac caagatcaaa aggacaagaa tccttcaaga aacaggaaaa aactcctaaa
781 acaccaaaaag gacctagtgc tgtagaagac attaaagcaa aatgcaagc aagtatagaa
841 aaaggtgggtt ctcttcccaa agtggaaagc aaattcatca attatgtgaa gaattgcttc
901 cggatgactg accaagaggc tattcaagat ctctgcctgg cagtggagga agtctcttta
961 agaaaatagt ttaaacaatt tgtaaaaaa ttttccgtct tatttcattt ctgtaacagt
1021 tgatatctgg ctgtcctttt tataatgcag agtgagaact ttcctaccg tgtttgataa
1081 atgttggtcca gg
```

cDNA NPM1 Mutation X1:

```
1 ggttggttctc 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 ggggcttga aataacacca
361 ccagtggctc taaggttgaa gtgtggttca gggccagtgc atattagtgg acagcactta
421 gtagctgtgg aggaagatgc agagtcagaa gatgaagagg aggaggatgt gaaactctta
481 agtataatctg gaaagcggtc tgcccctgga ggtggtagca aggttcaca gaaaaagta
541 aaacttgctg ctgatgaaga tgatgacgat gatgatgaag aggatgatga tgaagatgat
601 gatgatgatg attttgatga tgaggaagct gaagaaaaag cgccagtgaa gaaatctata
661 cgagatactc cagccaaaaa tgcacaaaag tcaaatcaga atggaaaaga ctcaaaacca
721 tcatcaaacac caagatcaaa aggacaagaa tccttcaaga aacaggaaaa aactcctaaa
781 acaccaaaaag gacctagtgc tgtagaagac attaaagcaa aatgcaagc aagtatagaa
841 aaaggtgggtt ctcttcccaa agtggaaagc aaattcatca attatgtgaa gaattgcttc
901 cggatgactg accaagaggc tattcaagat ctctgcctgg cagtggagga agtctcttta
961 agaaaatagt ttaaacaatt tgtaaaaaa ttttccgtct tatttcattt ctgtaacagt
1021 tgatatctgg ctgtcctttt tataatgcag agtgagaact ttcctaccg tgtttgataa
1081 atgttggtcca gg
```

cDNA NPM1 Mutation X2:

```

1 ggttggttctc tggagcagcg ttcttttatac 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 ggggcttga aataacacca
361 ccagtggctc taaggttgaa gtgtggttca gggccagtgc atattagtgg acagcactta
421 gtagctgtgg aggaagatgc agagtcagaa gatgaagagg aggaggatgt gaaactctta
481 agtataatctg gaaagcggtc tgcccctgga ggtggtagca aggttcaca gaaaaagta
541 aaacttgctg ctgatgaaga tgatgacgat gatgatgaag aggatgatga tgaagatgat
601 gatgatgatg attttgatga tgaggaagct gaagaaaaag cgccagtgaa gaaatctata
661 cgagatactc cagccaaaaa tgcacaaaag tcaaatcaga atggaaaaga ctcaaaacca
721 tcatcaaacac caagatcaaa aggacaagaa tccttcaaga aacaggaaaa aactcctaaa
781 acaccaaaaag gacctagttc tgtagaagac attaaagcaa aatgcaagc aagtatagaa
841 aaaggtgggt ctcttcccaa agtggaaagc aaattcatca attatgtgaa gaattgcttc
901 cggatgactg accaagaggc tattcaagat ctctgcagag cagtggagga agtctcttta
961 agaaaatagt ttaaacaatt tgtaaaaaa ttttccgtct tatttcattt ctgtaacagt
1021 tgatatctgg ctgtcctttt tataatgcag agtgagaact ttcctaccg tgtttgataa
1081 atgttgtcca gg

```

cDNA NPM1 Mutation X3:

```

1 ggttggttctc tggagcagcg ttcttttatac 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 ggggcttga aataacacca
361 ccagtggctc taaggttgaa gtgtggttca gggccagtgc atattagtgg acagcactta
421 gtagctgtgg aggaagatgc agagtcagaa gatgaagagg aggaggatgt gaaactctta
481 agtataatctg gaaagcggtc tgcccctgga ggtggtagca aggttcaca gaaaaagta
541 aaacttgctg ctgatgaaga tgatgacgat gatgatgaag aggatgatga tgaagatgat
601 gatgatgatg attttgatga tgaggaagct gaagaaaaag cgccagtgaa gaaatctata
661 cgagatactc cagccaaaaa tgcacaaaag tcaaatcaga atggaaaaga ctcaaaacca
721 tcatcaaacac caagatcaaa aggacaagaa tccttcaaga aacaggaaaa aactcctaaa
781 acaccaaaaag gacctagttc tgtagaagac attaaagcaa aatgcaagc aagtatagaa
841 aaaggtgggt ctcttcccaa agtggaaagc aaattcatca attatgtgaa gaattgcttc
901 cggatgactg accaagaggc tattcaagat ctctgccagg cagtggagga agtctcttta
961 agaaaatagt ttaaacaatt tgtaaaaaa ttttccgtct tatttcattt ctgtaacagt
1021 tgatatctgg ctgtcctttt tataatgcag agtgagaact ttcctaccg tgtttgataa
1081 atgttgtcca gg

```

Abbildung 10: NPM cDNA der gefundenen Mutationen A, B, D, X1, X2 und X3

Blaue Schrift, codierender Bereich; **Rote Schrift,** Mutation (Insertion eines Tetranucleotids; **Schwarze Schrift,** 5' untranslated region (5'UTR) und 3' untranslated region (3'UTR) mit poly-A-tail

7.3. Aminosäuresequenz NPM1 Wildtyp und Mutationen

Proteinsequenz NPM1 Wildtyp:

```
1 MEDSMDMDMS PLRPQNYLFG CELKADKDYH FKVDNDENEH QLSLRTVSLG AGAKDELHIV
61 EAEAMNYEGS PIKVTLATLK MSVQPTVSLG GFEITPPVVL RLKCGSGPVH ISGQHLVAVE
121 EDAESEDEEEE EDVKLLSISG KRSAPGGGSK VPQKKVKLAA DEDDDDDDEE DDEDDDDDDD
181 FDDEEAEEKA PVKKSIRDTP AKNAQKSNQN GKDSKPSSTP RSKGQESFKK QEKTPKTPKG
241 PSSVEDIKAK MQASIEKGGG LPKVEAKFIN YVKNCFRMTD QEAIQDLWQW RKSL
```

Proteinsequenz Mutation A:

```
1 MEDSMDMDMS PLRPQNYLFG CELKADKDYH FKVDNDENEH QLSLRTVSLG AGAKDELHIV
61 EAEAMNYEGS PIKVTLATLK MSVQPTVSLG GFEITPPVVL RLKCGSGPVH ISGQHLVAVE
121 EDAESEDEEEE EDVKLLSISG KRSAPGGGSK VPQKKVKLAA DEDDDDDDEE DDEDDDDDDD
181 FDDEEAEEKA PVKKSIRDTP AKNAQKSNQN GKDSKPSSTP RSKGQESFKK QEKTPKTPKG
241 PSSVEDIKAK MQASIEKGGG LPKVEAKFIN YVKNCFRMTD QEAIQDLCLA VEEVSLRK
```

Proteinsequenz Mutation B:

```
1 MEDSMDMDMS PLRPQNYLFG CELKADKDYH FKVDNDENEH QLSLRTVSLG AGAKDELHIV
61 EAEAMNYEGS PIKVTLATLK MSVQPTVSLG GFEITPPVVL RLKCGSGPVH ISGQHLVAVE
121 EDAESEDEEEE EDVKLLSISG KRSAPGGGSK VPQKKVKLAA DEDDDDDDEE DDEDDDDDDD
181 FDDEEAEEKA PVKKSIRDTP AKNAQKSNQN GKDSKPSSTP RSKGQESFKK QEKTPKTPKG
241 PSSVEDIKAK MQASIEKGGG LPKVEAKFIN YVKNCFRMTD QEAIQDL CMA VEEVSLRK
```

Proteinsequenz Mutation D:

```
1 MEDSMDMDMS PLRPQNYLFG CELKADKDYH FKVDNDENEH QLSLRTVSLG AGAKDELHIV
61 EAEAMNYEGS PIKVTLATLK MSVQPTVSLG GFEITPPVVL RLKCGSGPVH ISGQHLVAVE
121 EDAESEDEEEE EDVKLLSISG KRSAPGGGSK VPQKKVKLAA DEDDDDDDEE DDEDDDDDDD
181 FDDEEAEEKA PVKKSIRDTP AKNAQKSNQN GKDSKPSSTP RSKGQESFKK QEKTPKTPKG
241 PSSVEDIKAK MQASIEKGGG LPKVEAKFIN YVKNCFRMTD QEAIQDLCLA VEEVSLRK
```

Proteinsequenz Mutation X1:

```
1 MEDSMDMDMS PLRPQNYLFG CELKADKDYH FKVDNDENEH QLSLRTVSLG AGAKDELHIV
61 EAEAMNYEGS PIKVTLATLK MSVQPTVSLG GFEITPPVVL RLKCGSGPVH ISGQHLVAVE
121 EDAESEDEEEE EDVKLLSISG KRSAPGGGSK VPQKKVKLAA DEDDDDDDEE DDEDDDDDDD
181 FDDEEAEEKA PVKKSIRDTP AKNAQKSNQN GKDSKPSSTP RSKGQESFKK QEKTPKTPKG
241 PSSVEDIKAK MQASIEKGGG LPKVEAKFIN YVKNCFRMTD QEAIQDLCLA VEEVSLRK
```

Proteinsequenz Mutation X2:

```
1 MEDSMDMDMS PLRPQNYLFG CELKADKDYH FKVDNDENEH QLSLRTVSLG AGAKDELHIV
61 EAEAMNYEGS PIKVTLATLK MSVQPTVSLG GFEITPPVVL RLKCGSGPVH ISGQHLVAVE
121 EDAESEDEEE EDVKLLSISG KRSAPGGGSK VPQKKVKLAA DEDDDDDDEE DDEDDDDDD
181 FDDEEAEEKA PVKKSIRDTP AKNAQKSNQN GKDSKPSSTP RSKGQESFCK QEKTPKTPKG
241 PSSVEDIKAK MQASIEKGGG LPKVEAKFIN YVKNCFRMTD QEAIQDL CRA VEEVSLRK
```

Proteinsequenz Mutation X3:

```
1 MEDSMDMDMS PLRPQNYLFG CELKADKDYH FKVDNDENEH QLSLRTVSLG AGAKDELHIV
61 EAEAMNYEGS PIKVTLATLK MSVQPTVSLG GFEITPPVVL RLKCGSGPVH ISGQHLVAVE
121 EDAESEDEEE EDVKLLSISG KRSAPGGGSK VPQKKVKLAA DEDDDDDDEE DDEDDDDDD
181 FDDEEAEEKA PVKKSIRDTP AKNAQKSNQN GKDSKPSSTP RSKGQESFCK QEKTPKTPKG
241 PSSVEDIKAK MQASIEKGGG LPKVEAKFIN YVKNCFRMTD QEAIQDL CQA VEEVSLRK
```

Abbildung 10: Vollständige Proteinsequenzen des Wildtyp Nucleophosmin 1 sowie die gefundenen Mutationen A, B, D, X1, X2 und X3

Gelb hinterlegt, veränderte Aminosäureabfolge durch Nonsense-Mutation

8. Danksagung

Diese Arbeit hat mir für meinen weiteren Lebensweg sehr geholfen und ich möchte mich deshalb an dieser Stelle bei allen Beteiligten recht herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hartmut Döhner für die Möglichkeit in seiner Abteilung arbeiten und promovieren zu können.

Frau Prof. Dr. Konstanze Döhner für die Bereitstellung der Thematik und vor allem für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Viele Ratschläge und Anregungen Ihrerseits haben mir beim Schreiben dieser Arbeit wertvolle Hilfe geleistet.

Frau Marianne Habdank für die tatkräftige Unterstützung beim Arbeiten im Labor. Ihre fachliche Kompetenz hat mir für die Einarbeitung im Labor und die Durchführung des gesamten experimentellen Teils und darüber hinaus zur Verfügung gestanden.

Meiner Familie für den notwendigen moralischen Rückhalt über mein ganzes Studium hinweg und auch darüber hinaus für die Erstellung dieser Arbeit.

9. Curriculum vitae

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutz entfernt

Veröffentlichungen (Ko-Autor)

1. Döhner K, Corbacioglu A, Krebs B, Hein S, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H, Schlenk RF.

Prognostic impact of the NPM1/FLT3-ITD mutation status in AML patients > 60 years with normal karyotype: results of the AML HD98B trial for the AML study group (AMLSG).

Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO), 4.-8. November 2006, Leipzig. Abstract in: Onkologie 29, Supplement 3: Seite 90.

2. Schlenk RF, Döhner K, Kneba M, Götze K, Hartmann F, del Valle F, Kirchen H, Koller E, Fischer JT, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Groner S, Krebs B, Kayser S, Corbacioglu A, Anhalt A, Benner A, Fröhling S, and Döhner H for the German-Austrian AMLSG.

Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukaemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B.

Haematologica, the Hematology Journal 94(1): 54-60 (2009).