

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. R. Haas

Untersuchung zum Stellenwert der quantitativen WT1-Gentranskript  
Messung für die Detektion der minimalen Resterkrankung bei Patienten  
mit myelodysplastischen Syndromen und akuter myeloischer Leukämie  
nach einer allogenen Blutstammzelltransplantation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Marius Lamers  
2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Thomas Schroeder

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Philipp Albrecht

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Rautenberg C, Germing U, Pechtel S, **Lamers M**, Fischermanns C, Jäger P, Geyh S, Haas R, Kobbe G, Schroeder T. Prognostic impact of peripheral blood WT1-mRNA expression in patients with MDS. *Blood Cancer Journal*. 9, 86 (2019)

## Zusammenfassung

Myelodysplastische Syndrome (MDS) und akute myeloische Leukämien (AML) sind klonale Erkrankungen der hämatopoietischen Stammzelle mit einer im Fall der Hochrisiko-MDS und der AML deutlich eingeschränkten Lebenserwartung. Eine allogene Blutstammzelltransplantation (allo-SZT) stellt die einzige kurative Therapieoption für Patienten mit MDS sowie eine häufig eingesetzte Salvage- oder Konsolidierungstherapie für Patienten mit AML dar. Ein Rezidiv der Grunderkrankung ist der häufigste Grund für ein Therapieversagen nach allo-SZT, die Prognose eines Rezidivs ist generell ungünstig und das Ansprechen auf eine *Salvage*-Therapie korreliert mit der Krankheitslast. Die frühe Identifikation von Patienten mit drohendem Rezidiv ist daher für die Therapie von großer Bedeutung. Der Detektion von nach der allo-SZT im Transplantatempfänger verbleibenden leukämischen bzw. dysplastischen Zellen, welche aufgrund ihrer geringen Quantität der mikroskopischen Untersuchung entgehen, kommt dabei eine wichtige Rolle zu. Dieses Konzept bezeichnet man als Prinzip der minimalen Resterkrankung (MRD). Für Patienten mit MDS sind bisher keine breit anwendbaren Methoden zur Bestimmung der MRD etabliert. Auch bei Patienten mit AML sind viele Ansätze zur Messung der MRD mit Nachteilen wie geringer Anwendbarkeit, mangelnder Sensitivität oder unzureichender Standardisierung assoziiert. In der hier vorgelegten Arbeit untersuchten wir die Anwendbarkeit einer standardisierten und zertifizierten Messung von *Wilms' Tumor 1* Genprodukt (WT1) in peripherem Blut (PB) mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) zur MRD-Diagnostik. Hierfür haben wir zunächst Patienten mit neu diagnostiziertem MDS die Expression von WT1 gemessen und mit klinischen Parametern korreliert. Danach monitorierten wir den MRD- und Krankheitsverlauf von Patienten mit Hochrisiko-MDS und AML longitudinal nach allo-SZT mittels WT1 und analysierten bei Patienten mit Rezidiv nach allo-SZT die Anwendbarkeit von WT1 zur Steuerung einer Salvagetherapie bestehend aus Azacitidine und Spenderlymphozyten. Dabei konnten wir neben einer breiten Anwendbarkeit bei den relevanten MDS-Patientensubgruppen eine signifikante Korrelation der WT1-Expression mit der prognostischen Einstufung der MDS-Patienten anhand von etablierten Scores zeigen. Bei den Patienten nach allo-SZT bzw. während einer Rezidivtherapie konnten wir eine eindeutige Korrelation der WT1-Expression mit der Krankheitsaktivität darlegen. Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die standardisierte Messung der WT1-Expression im PB bei Patienten mit MDS und AML ein breit anwendbarer und diagnostisch hochwertiger Ansatz zur MRD-Diagnostik und Steuerung therapeutischer Interventionen darstellen kann.

## **Abstract**

Myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML) are both clonal hematopoietic stem cell disorders. In case of high-risk MDS and AML survival is markedly impaired. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the only potentially curative treatment for MDS and is also widely used as salvage or consolidation therapy for AML. The most frequent reason for treatment failure after allo-HSCT is the relapse of the underlying disease. Outcome remains poor in this situation and treatment is more effective when initiated at low disease burden. Therefore, early diagnosis of imminent relapse is essential for successful therapy. The detection of lowest amounts of persisting malignant hematopoietic cells in stem cell recipients represents the major goal in this context. This concept is known as minimal residual disease (MRD). Although several methods and markers allow MRD detection in AML, many of them are limited relating to sensitivity, applicability or standardization. In case of MDS no MRD-marker could be broadly established until these days. We investigated the value of measuring Wilms' Tumor 1 (WT1) gene in peripheral blood samples using a standardized quantitative real-time PCR assay for MRD-detection after allo-HSCT. For this purpose, we screened patients with newly diagnosed MDS for WT1 expression and results were correlated with clinical parameters. In a second step, patients with AML or high-risk MDS undergoing allo-HSCT were monitored for WT1 expression during disease course. In addition, patients with relapse after allo-HSCT, who underwent salvage therapy consisting of Azacitidine and donor lymphocyte infusion were screened for WT1 expression and its clinical utility in this context. Our results show a broad applicability of using WT1 expression for MRD-detection in relevant subgroups of patients with MDS. Moreover, WT1 expression correlates with established prognostic scores in these patients. Regarding patients after allo-HSCT or during relapse therapy, our measurement of WT1 expression correlated with disease activity. In summary, our results indicate that peripheral blood WT1 expression, measured by a standardized assay is a useful diagnostic tool for MRD-detection and MRD-guided therapeutic interventions.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>(allo-)SZT</b>	(allogene) Stammzelltransplantation	<b>MNC</b>	mononukleäre Zellen
<b>(m)RNA</b>	( <i>messenger</i> ) Ribonucleinsäure	<b>MRD</b>	minimale Resterkrankung
<b>ALL</b>	Akute lymphatische Leukämie	<b>NCN</b>	normalisierte Kopienanzahl
<b>AML</b>	Akute myeloische Leukämie	<b>NMA</b>	nicht myeloablativ
<b>AraC</b>	Cytarabin	<b>NRM</b>	Nicht Rezidiv assoziierte Mortalität
<b>BM</b>	Knochenmark	<b>PB</b>	peripheres Blut
<b>BMSC</b>	Knochenmarksstromazelle	<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>CC</b>	kompletter Chimärismus	<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>	<b>PD</b>	Fortschreitende Erkrankung
<b>CML</b>	Chronische myeloische Leukämie	<b>RAEB</b>	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess
<b>CMML</b>	Chronische myelomonozytäre Leukämie	<b>RARS</b>	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus	<b>RCMD</b>	Refraktäre Anämie mit Dysplasien in mehreren Zellreihen
<b>CN</b>	zytogenetisch normal	<b>RCUD</b>	Refraktäre Zytopenie mit Dysplasien in einer Zellreihe
<b>CR</b>	komplette Remission	<b>RD</b>	verwandter Spender
<b>Ct</b>	<i>cycle of treshold</i>	<b>RIC</b>	Konditionierung mit reduzierter Intensität
<b>DGHO</b>	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie	<b>ROC</b>	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
<b>DLI</b>	Spenderlymphozyteninfusion	<b>rpm</b>	Umdrehungen/min
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinäure	<b>qRT-PCR</b>	<i>real-time quantitative PCR</i>
<b>DNMT1</b>	DNA-Methyltransferase-1	<b>RT</b>	Reverse Transkription
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure	<b>sAML</b>	sekundäre AML
<b>ELN</b>	<i>European Leukemia Network</i>	<b>SD</b>	Stabile Erkrankung
<b>ESA</b>	Erythropoiese stimulierende Faktoren	<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>FAB</b>	<i>French-American-British</i>	<b>SNP</b>	<i>Single nucleotid polymorphism</i>
<b>FAM</b>	6-Carboxyfluorescein	<b>STR</b>	<i>short tandem repeats</i>
<b>FISH</b>	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	<b>TAM</b>	Therapie assoziierte Mortalität
<b>FRET</b>	Förster-Energieresonanztransfer	<b>TAMRA</b>	5-Carboxytetramethylrhodamin
<b>G-CSF</b>	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor	<b>TBI</b>	Ganzkörperbestrahlung
<b>GVHD</b>	<i>Graft-versus-host disease</i>	<b>UKD</b>	Universitätsklinikum Düsseldorf
<b>GVL</b>	<i>Graft-versus-leukemia</i>	<b>URD</b>	nicht verwandter Spender
<b>HDAC</b>	Histon Deacetylase	<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>HLA</b>	<i>Human leukocyte antigens</i>	<b>WT1</b>	<i>Wilms' Tumor 1</i>
<b>ICUS</b>	Idiopathische Zytopenie unbestimmter Signifikanz	<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem
<b>IPSS(-R)</b>	<i>(Revised) International Prognostic Scoring System</i>		
<b>ITD</b>	<i>internal tandem duplications</i>		
<b>ITP</b>	Idiopathische Thrombozytopenie Purpura		
<b>LAIP</b>	Leukämie assoziierte Phänotypen		
<b>MC</b>	gemischter Chimärismus		

# Inhaltsverzeichnis

A Einleitung .....	1
A.1 Myelodysplastische Syndrome und Akute myeloische Leukämien .....	1
A.1.1 Myelodysplastische Syndrome .....	1
A.1.1.1 Definition .....	1
A.1.1.2 Epidemiologie, klinisches Bild und Diagnose .....	1
A.1.1.3 Klassifikation .....	2
A.1.1.4 Ätiologie und Pathogenese .....	3
A.1.1.5 Prognose .....	5
A.1.2 Akute myeloische Leukämie .....	7
A.1.2.1 Definition .....	7
A.1.2.2 Klinisches Bild, Diagnostik und Klassifikation .....	7
A.1.2.3 Ätiologie und Pathogenese .....	8
A.1.2.4 Prognose .....	10
A.1.3 Therapie des MDS und der AML .....	11
A.1.3.1 Grundsätzliche Therapieoptionen bei MDS .....	11
A.1.3.2 Grundsätzliche Therapieoptionen bei AML .....	13
A.1.3.3 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation bei Patienten mit MDS und AML .....	15
A.1.3.4 Rezidiv .....	17
A.1.3.5 Das Konzept der minimalen Resterkrankung .....	19
A.2 Wilms' Tumor 1 (WT1) .....	23
A.2.1 Struktur, Funktion und Vorkommen von WT1 .....	23
A.2.2 Die Rolle von WT1 in der gesunden und der malignen Hämatopoese .....	25
A.3 Fragestellung und Zielsetzung .....	28
B Material und Methoden .....	29
B.1 Patienten und Zellen .....	29
B.2 Dichtegradientenzentrifugation .....	33
B.2.1 Prinzip .....	33
B.2.2 Durchführung .....	34
B.3 RNA-Extraktion .....	35
B.4 Reverse Transkription (RT) .....	35
B.5 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) .....	36
B.5.1 Prinzip .....	36
B.5.2 Durchführung und Qualitätskontrolle .....	38
B.5.3 Statistische Analyse und Auswertung .....	39
C Ergebnisse .....	40
C.1 Quantitative WT1-Gentranskript Messung bei Patienten mit neu diagnostiziertem MDS .....	40
C.2 Longitudinale Messung des WT1-Gentranskript Messung bei Patienten mit sAML und MDS nach allogener Blutstammzelltransplantation .....	44
C.3 Quantitative WT1-Gentranskript Messung bei Patienten mit Rezidiv einer AML oder MDS während einer Therapie mit Azacitidine und Spenderlymphozyten .....	47
D Diskussion .....	50
D.1 WT1-Expression bei Patienten mit neu diagnostiziertem MDS .....	50
D.2 WT1-Messung bei Patienten mit MDS und sAML nach allogener Stammzelltransplantation .....	54

D.3	WT1-Messung bei Patienten mit AML und MDS und Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation unter Therapie mit Azacitidine und Spenderlymphozyten .....	57
D.4	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	59
E	Literaturverzeichnis .....	61
F	Anhang .....	78
F.1	AML-Subkategorien (s. Kapitel A.1).....	78

## **A Einleitung**

### **A.1 Myelodysplastische Syndrome und Akute myeloische Leukämien**

#### **A.1.1 Myelodysplastische Syndrome**

##### **A.1.1.1 Definition**

Die Myelodysplastischen Syndrome (MDS) sind eine sehr heterogene Gruppe klonaler Erkrankungen der hämatopoietischen Stammzelle. Gemeinsame Charakteristika der Gruppe sind die ineffektive, dysplastische Hämatopoiese mit Zytopenien im peripheren Blut bei gleichzeitig meist vorliegender Hyperzellularität des Knochenmarks sowie die Tendenz zum Übergang in eine akute myeloische Leukämie (AML), wobei auch Varianten mit normozellulärem oder sogar hypozellulärem Knochenmark vorkommen<sup>1</sup>. Verschiedene Begriffe wie refraktäre Anämie, hyperplastische refraktäre Anämie, präleukämische Anämie oder präleukämische akute Leukämie existierten ab den 1940er Jahren nebeneinander, betonten verschieden Teilaspekte und unterstreichen aus heutiger Sicht die große Variabilität der Erkrankung<sup>2-5</sup>. Ein allgemein akzeptiertes Klassifikationsschema wurde 1982 durch die *French-American-British (FAB) Cooperative Group* etabliert. Die aktuelle WHO-Klassifikation von 2016 unterteilt die MDS hinsichtlich des Vorliegens von Dysplasien und Zytopenien in den verschiedenen Zellreihen, des Vorkommens von Ringsideroblasten, des Blastengehalts und der Zytogenetik in sechs Hauptgruppen. Sie ist in Abschnitt A.1.1.3 aufgeführt<sup>6</sup>.

##### **A.1.1.2 Epidemiologie, klinisches Bild und Diagnose**

Die MDS treten mit einer Inzidenz von 4-5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei ca. 70 Jahren liegt und Männer etwas häufiger erkranken als Frauen<sup>7</sup>.

Die klinische Präsentation wird durch Zytopenien in ein oder mehreren Zellreihen bestimmt. Am häufigsten treten Leistungsminderung und Belastungsdyspnoe als Folgen der Anämie, gehäufte Infektionen auf Grund der Leukopenie und Blutungen infolge einer Thrombozytopenie auf. Viele Patienten sind jedoch symptomfrei, so

dass die Zytopenien häufig im Rahmen von Routinekontrollen als Zufallsbefund entdeckt werden<sup>8</sup>.

Zur Basisdiagnostik der MDS gehört das Anfertigen eines Blutbildes, eines Differentialblutbildes sowie die Knochenmarkaspiration. Die zytomorphologische Beurteilung steht dabei im Mittelpunkt, da hierbei der Nachweis von Dysplasiezeichen der verschiedenen Zellreihen sowie eine Bestimmung des Blastenanteils erfolgen kann, wobei als Mindestkriterium das Vorliegen von Dysplasien in 10% der Zellen einer myeloischen Reihe gilt<sup>9,10</sup>. Differentialdiagnostisch müssen Dysplasien und Zytopenien aufgrund reaktiver Veränderungen, Mangelzuständen, Vergiftungen oder als Folge anderer hämatologischer oder onkologischer Malignome ausgeschlossen werden. Die zweite Säule der Diagnostik stellt die Untersuchung chromosomaler und molekularer Veränderungen dar. Dies hat neben dem Stellenwert für die Diagnosestellung vor allem eine Bedeutung für die Risikostratifizierung der Patienten.

#### ***A.1.1.3 Klassifikation***

Die bereits erwähnte FAB-Klassifikation bediente sich als Einteilungskriterien des Blastenanteils im peripheren Blut und Knochenmark, Nachweis von Auerstäbchen und Ringsideroblasten sowie absoluter Monozytenzahl. Die Klassifikation stellte aufgrund der einfachen Handhabung, der guten Reproduzierbarkeit und der starken Korrelation mit der Prognose der Patienten lange den Goldstandard dar<sup>11</sup>. Es stellte sich jedoch heraus, dass die MDS heterogener waren, als bisher angenommen und sich weitere Subtypen definieren lassen, die sich hinsichtlich Morphologie, Zytogenetik und Prognose unterscheiden. Diese und andere Erkenntnisse bewegten die WHO zur Erstellung einer neuen Klassifikation, welche 1999 vorgeschlagen und in ihrer finalen Version 2001 publiziert wurde<sup>12,13</sup>. Zentrale Änderung war die Berücksichtigung des Dysplasieausmaßes in den verschiedenen Zellreihen und neuer zytogenetischer Befunde. Im Jahre 2016 erschien zuletzt eine neu überarbeitete Version der WHO-Klassifikation, welche kleinere Veränderungen beinhaltete und als aktuell gültige Einteilung in Tabelle 1.1 dargestellt ist<sup>14</sup>.

MDS-Subtyp	Dysplastische Zellreihen	Zytopenische Zellreihen*	Ring-Sideroblasten	Blasten in PB und BM	Zytogenetik	
MDS mit Dysplasie in einer Zellreihe (MDS-SLD)	1	1-2	<15%/<5%**	BM <5%, PB <1% Keine Auer-Stäbchen	Alle, bis auf del(5q)	
MDS mit Dysplasie in mehreren Zellreihen (MDS-MLD)	2-3	1-3	<15%/<5%**	BM <5%, PB <1% Keine Auer-Stäbchen	Alle, bis auf del(5q)	
<b>MDS mit Ringsideroblasten (MDS-RS)</b>						
MDS-RS mit Dysplasie in einer Zellreihe (MDS-RS-SLD)	1	1-2	≥15%/≥5%**	BM <5%, PB <1% Keine Auer-Stäbchen	del(5q) isoliert oder mit einer anderen non chr 7 Aberration	
MDS-RS mit Dysplasie in mehreren Zellreihen (MDS-RS-MLD)	2-3	1-3	≥15%/≥5%**	BM <5%, PB <1% Keine Auer-Stäbchen		
MDS mit del(5q)	1-3	1-2	Nicht relevant	BM <5%, PB <1% Keine Auer-Stäbchen		
<b>MDS mit Blastenzexzess (MDS-EB)</b>						
MDS-EB1	0-3	1-3	Nicht relevant	BM 5%-9%, PB 2%-4% Keine Auer-Stäbchen		Nicht relevant
MDS-EB2	0-3	1-3	Nicht relevant	BM 10%-19%, PB 5%-19% Keine Auer-Stäbchen	Nicht relevant	
<b>MDS, unklassifizierbar (MDS-U)</b>						
mit 1% PB Blasten	1-3	1-3	Nicht relevant	BM <5%, PB =1%*** Keine Auer-Stäbchen	Nicht relevant	
Mit Dysplasie in einer Zellreihe und Panzytopenie	1	3	Nicht relevant	BM <5%, PB <1% Keine Auer-Stäbchen	Nicht relevant	
Mit definierten zytogenetischen Befunden	0	1-3	<15%****	BM <5%, PB <1% Keine Auer-Stäbchen	MDS-definierende zytogenetische Befunde	
Refraktäre Zytopenie der Kindheit (provisorischer Eintrag)	1-3	1-3	keine	BM <5%, PB <2%	Nicht relevant	
Anmerkungen: *Zytopenien definiert als Hb < 10 g/dl, Thrombozytenzahl < 100000/μl, Leukozyten < 1800/μl; **falls SF3B1 mutiert; ***1%tiger Blastenteil zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen; ****Fälle mit ≥15 % Ringsideroblasten haben per Definition eine signifikante Dyserythropoese und sind daher MDS-RS-SLD						
Legende: MDS: Myelodysplastisches Syndrom; BM: Knochenmark; PB: Peripheres Blut; WHO: World Health Organization						
Tabelle 1.1: WHO-Klassifikation (2016) der MDS <sup>6</sup>						

#### A.1.1.4 Ätiologie und Pathogenese

In über 90% der Fälle bleibt die Ursache eines MDS unklar, diese idiopathischen Fälle werden als primäre oder *de novo* MDS bezeichnet<sup>7,15</sup>. In der Minderheit der sog. sekundären MDS, welche 5-10% aller Fälle ausmachen, tritt die Erkrankung infolge von Zytostatikatherapie, Radiatio oder Radiojodtherapie auf<sup>16</sup>. Einen prädisponierenden Faktor stellt auch die Exposition gegenüber Toxinen wie organischen Lösungsmitteln (insbesondere Benzol) und Tabakrauch dar<sup>17,18</sup>. Ein verhältnismäßig geringer Anteil von etwa 4 - 10% der MDS- oder AML-Fälle bei Kindern und jungen Erwachsenen ist auf hereditäre Erkrankungen zurückzuführen,

bei denen Keimbahn-Mutationen in Tumorsuppressor- oder onkogenen wie bspw. CEBPA, GATA2 oder RUNX1 von entscheidender pathophysiologischer Bedeutung sind<sup>19–21</sup>.

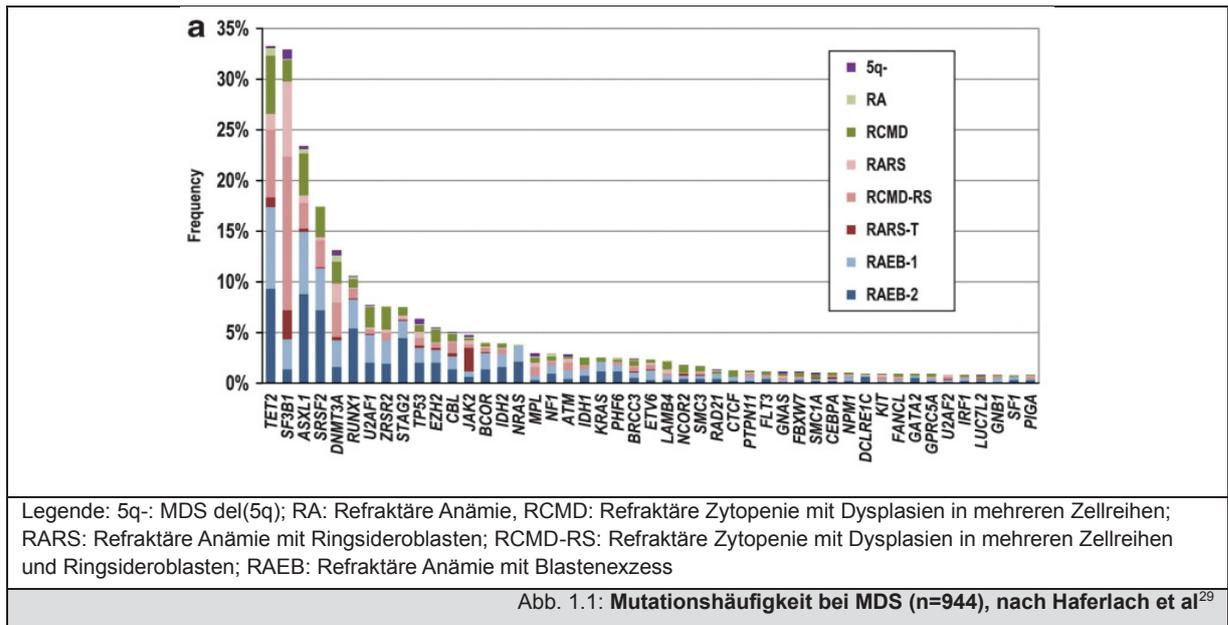
Der entscheidende Pathomechanismus, auf den die *de novo* MDS zurückzuführen sind, bleibt nach wie vor unklar. Die Entstehung und der Progress bis hin zur Transformation in eine AML lassen aber auf eine in zahlreichen Schritten ablaufende molekulare Dysregulation der hämatopoetischen Stammzelle schließen<sup>22</sup>. Diese Störungen können die Expression von Genen der Zellzyklusregulation, der Apoptose, von Transkriptionsfaktoren oder Tumorsuppressorgenen umfassen, die schließlich auf Stammzell- oder Progenitorebene akkumulieren und so den betroffenen Zellklon schrittweise entarten und expandieren lassen<sup>23</sup>.

Chromosomale Aberrationen sind mittels konventioneller zytogenetischer Diagnostik in etwa 50% aller MDS-Fälle nachweisbar<sup>24</sup>. Ergänzende sensitivere Methoden wie *single nucleotid polymorphism (SNP-) microarrays* weisen bei bis zu 82% der Patienten Anomalien nach<sup>25</sup>.

Durch Fortschritte in den Techniken der Gensequenzierung ist zudem in den vergangenen Jahren gezeigt worden, dass die meisten Patienten mit MDS rekurrente Mutationen aufweisen<sup>26</sup>. Die am häufigsten vorkommenden Mutationen sind in Tabelle 1.2 sowie in Abbildung 1.1 dargestellt. Einige der mutierten Gene kodieren für bekannte Effektorproteine der epigenetischen Regulierung wie TET2, IDH1 und IDH2 sowie ASXL1<sup>27</sup>, andere wiederum für Bestandteile des sogenannten *Splicosomes*. Bezüglich der bei den MDS und der *de novo* AML regelhaft vorkommenden Mutationen gibt es eine relevante, jedoch nicht vollständige Überlappung<sup>28</sup>.

Gen	Mutationshäufigkeit	Funktionelle Zuordnung
TET2	33%	DNA-Methylierung
SF3B1	33%	Spleißung
ASXL1	24%	Chromatinmodifikation
SRFS2	17%	Spleißung
DNMT3A	13%	DNA-Methylierung
RUNX1	11%	Transkriptionsfaktor

Tabelle 1.2: Häufige Mutationen bei MDS (n=944), nach Haferlach et al<sup>29</sup>



Diese Mutationen tragen wesentlich zur Entstehung der MDS und AML bei, wobei bisher nur für wenige Mutation eine direkte Korrelation zu einem spezifischen Phänotyp gezeigt werden konnte. Man geht mittlerweile vielmehr davon aus, dass viele Menschen im Laufe ihres Lebens wahrscheinlich als Folge von Alterungsprozessen und Umweltbedingungen Mutationen erwerben. Diese Menschen sind aus hämatologischer Sicht zunächst gesund, d. h. sie weisen keine Blutbild- und Knochenmarkveränderungen auf. Man bezeichnet diesen Zustand als klonale Hämatopoiese von unbestimmtem Potenzial (CHIP). Treten im Verlauf jedoch weitere molekulare oder chromosomale Veränderungen hinzu, dann setzt sich dieser Klon durch und es kann zur Entstehung eines MDS oder einer AML kommen. Hierzu tragen wahrscheinlich auch weitere Mechanismen, etwa Veränderungen des hämatopoietischen Mikromilieus im Knochenmark wie zum Beispiel die Interaktion zwischen hämatopoietischen Zellen und Knochenmarkstromazellen (BMSC) bei<sup>30-32</sup>.

#### **A.1.1.5 Prognose**

Die große phänotypische und molekulare Heterogenität der MDS spiegelt sich auch in der Variabilität der Prognose der betroffenen Patienten wider. Jahrelang stabile Verläufe kommen ebenso wie rasch progrediente Formen vor. In Abhängigkeit vom MDS-Subtyp gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation beträgt die mediane Überlebenszeit 12-77 Monate und das Risiko, innerhalb von 2 Jahren eine AML zu

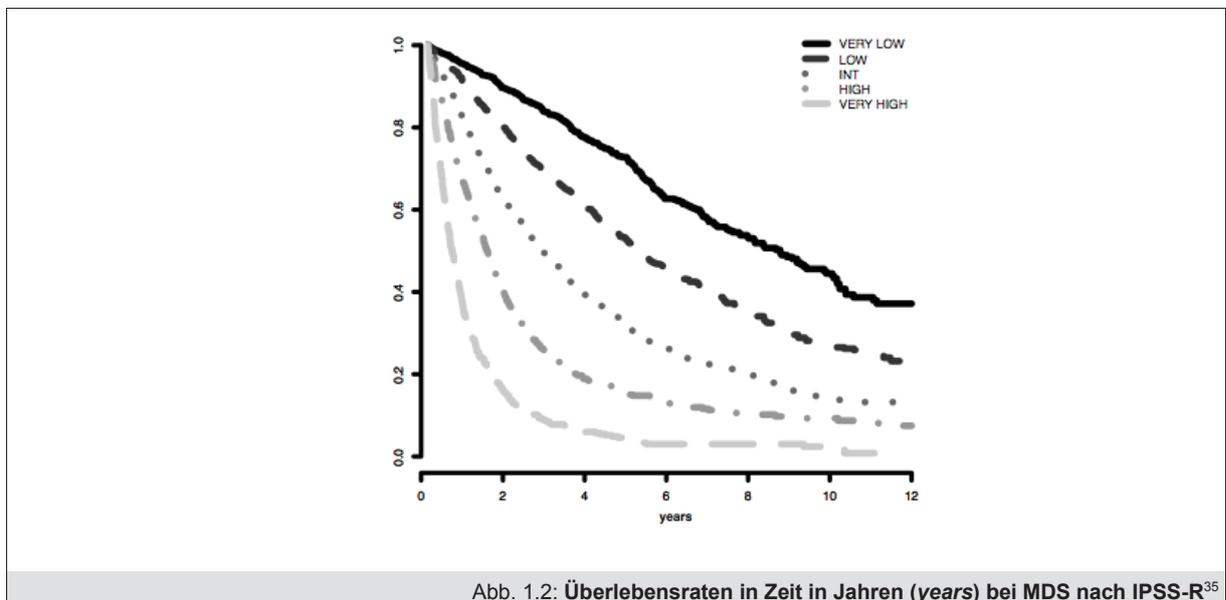
entwickeln, liegt zwischen 3% und 55%<sup>33</sup>. 1997 gelang mit dem *International Prognostic Scoring System* (IPSS)<sup>34</sup> die Entwicklung eines Instrumentes zur Prognoseabschätzung. Es berücksichtigt dabei den medullären Blastenanteil, das Ausmaß der Zytopenien und den Karyotyp. 2012 wurde das IPSS grundlegend überarbeitet und zum *revised IPSS* (IPSS-R) erweitert. In diesem sind mehr zytogenetische Risikogruppen einbezogen sowie der medulläre Blastenanteil und das Ausmaß der Zytopenien anders gewichtet, was zur Eingruppierung in fünf Risikokategorien führt<sup>35</sup>.

Variable	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Karyotyp	Sehr günstig	-	Günstig	-	Mittel	Ungünstig	Sehr ungünstig
KM-Blastenanteil	≤2%	-	>2% - <5%	-	5% - 10%	>10%	-
Hämoglobin (g/dl)	≥10	-	8 - <10	<8	-	-	-
Thrombozyten (x10 <sup>9</sup> /L)	≥100	50 - <100	<50	-	-	-	-
Leukozyten (x10 <sup>9</sup> /L)	≥0,8	<0,8	-	-	-	-	-

Risikokategorien: very low: ≤1,5, low: >1,5 - 3, intermediate: >3 – 4,5, high: >4,5 - 6, very high: >6

Tabelle 1.3: IPSS-R nach Greenberg et al.<sup>35</sup>

Die in Abb. 1.2 gezeigten Überlebensraten gemäß des *IPSS-revised* entstammen der Validierungskohorte (n=7012) von Greenberg et al<sup>35</sup>.



## **A.1.2 Akute myeloische Leukämie**

### **A.1.2.1 Definition**

Die AML ist ebenso wie die MDS eine Erkrankung der myeloischen hämatopoietischen Stammzelle. Sie zeigt eine ähnlich große Variabilität hinsichtlich Zytomorphologie, Zytogenetik und Molekulargenetik, während das klinische Bild vergleichsweise einheitlich durch die progrediente hämatopoietische Insuffizienz infolge der Knochenmarkinfiltration gekennzeichnet ist. Die jährliche Inzidenz liegt bei etwa 3,7 Fällen pro 100000 Einwohner und steigt mit dem Alter an. Der mediane Erkrankungsbeginn liegt bei 72 Jahren<sup>36</sup>. Erst mit Einführung wirkungsvoller Zytostatika, insbesondere Daunorubicin und Cytarabin konnten dauerhafte Remissionen erzielt werden<sup>37</sup>.

Die aktuelle WHO-Klassifikation von 2016 umfasst insgesamt 8 Gruppen und berücksichtigt neben zytomorphologischen und zytogenetischen Kriterien verstärkt molekularbiologische Besonderheiten<sup>6</sup>.

### **A.1.2.2 Klinisches Bild, Diagnostik und Klassifikation**

Das vorherrschende klinische Bild der hämatopoetischen Insuffizienz entspricht den in Kapitel A.1.1.2 beschriebenen Symptomen als Folge der Zytopenien, welche innerhalb kurzer Zeit auftreten<sup>38</sup>. Etwa zwei Drittel der Patienten zeigen eine periphere Leukozytose, die bei etwa 20% der Patienten mit Werten von  $>100.000/\mu\text{l}$  besonders stark ausgeprägt ist. Bei diesen Werten besteht die Gefahr eines Leukostasesyndroms mit respiratorischer Insuffizienz, neurologischen Ausfällen, retinalen Einblutungen und Priapismus. Aleukämische Verläufe finden sich seltener und vermehrt bei AML mit MDS-Vorphase. Extramedulläre Manifestationen sind insgesamt selten ( $<15\%$  der Patienten) und umfassen insbesondere Hautinfiltrate, Gingivahyperplasie, Meningiosis leucaemica und Infiltrationen von Milz und Leber.

Die Diagnose der AML beruht auf zwei Grundvoraussetzungen: Dem Nachweis eines Blastenanteils von  $>20\%$  im Knochenmarkaspirat sowie dem Nachweis der myeloischen Differenzierung des leukämischen Zellklons. Sowohl für die Auswahl der Therapie als auch die Prognose des Patienten ist die morphologische, immunphänotypische, zytogenetische und molekulargenetische Untersuchung notwendig. Die so erhobenen Befunde erlauben die Einteilung in die aktuellen

Klassifikationskategorien. Die komplette WHO-Klassifikation ist in Tabelle 1.4 dargestellt. Die Kombination der Befunde ergibt in der Regel eine unzweifelhafte Diagnose, die wichtigsten Differentialdiagnosen sind die akute Leukämie der lymphatischen Reihe (ALL) oder von unklarer Linienzugehörigkeit, MDS, aplastische Anämie sowie leukämisch verlaufende Lymphome.

### **A.1.2.3 Ätiologie und Pathogenese**

Ursachen einer AML können die Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung<sup>39,40</sup>, Chemotherapie (insbesondere Alkylantien und Topoisomerase-II Inhibitoren)<sup>41</sup> und Chemikalien (insbesondere Benzol und Mineralölprodukte)<sup>42</sup> sein. Hereditäre Erkrankungen wie die *Dyskeratosis congenita*, die Fanconi-Anämie oder Keimbahn-Mutation in Genen der hämatopoietischen Regulierung kommen ebenfalls vor, sie machen jedoch selbst im selektierten Patientengut einer Spezialklinik für hereditäre hämatologische Malignome nur etwa 12% der Fälle aus<sup>43,44</sup>. Die aus Umweltbelastung, medizinischer Behandlung oder hereditär entstandenen Fälle stellen nur einen kleinen Teil des Patientenguts dar, die Ätiologie der Mehrheit der Erkrankungen ist daher analog zu den MDS unklar.

Pathogenetisch kommt es zur klonalen Expansion von reifungsgestörten myeloischen Stamm- und Vorläuferzellen. Die Expansion verdrängt die gesunde Hämatopoiese und ist das Resultat zytogenetischer und molekularer Veränderungen, welche funktionell die Proliferation und Differenzierung beeinträchtigen<sup>45</sup>.

Chromosomale Aberrationen werden bei 50 – 60% der AML-Patienten mit Hilfe der konventionellen Zytogenetik gefunden, am häufigsten werden dabei Translokationen beobachtet<sup>46</sup>. Die so entstehenden Fusionsgene und -proteine sind an der Leukämieentstehung beteiligt<sup>47–49</sup>, bspw. das durch die t(8;21) Translokation entstehende Fusionsgen RUNX1-RUNX1T1, welches für ein Protein codiert, das zahlreiche Differenzierungs- und Proliferierungsprozesse des leukämischen Zellklons beeinflusst<sup>50</sup>. Tabelle 1.5 listet die häufigsten Aberrationen auf.

Zytogenetischer Befund	Häufigkeit
Normal	40%
t(15;17)(q24.1;q21.1) und Varianten	13%
Trisomie 8	10%
t(8;21)(q22;q22) und Varianten	7%
11q <i>Rearrangements</i>	6%
inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)	5%

Tabelle 1.5: Häufige chromosomale Aberrationen bei AML (n=5876) nach Grimwade et al<sup>46</sup>

Der Karyotyp stellt einen wichtigen unabhängigen Prognosefaktor sowohl für das Ansprechen auf die Induktionstherapie als auch das Gesamtüberleben dar und wird bei jüngeren Erwachsenen in die drei Risikokategorien günstig, intermediär und ungünstig eingeteilt<sup>51</sup>. Bei einigen selteneren Aberrationen ist die Einstufung aufgrund der eingeschränkten Fallzahl jedoch unsicher. Drei und mehr Aberrationen werden als komplexer Karyotyp bezeichnet, dieser hat eine schlechte Prognose<sup>52</sup>. Ausgenommen davon sind einige in der WHO Klassifikation definierte Aberrationen mit günstiger Prognose wie z. B. t(9;11). Die Aberrationen t(8;21), inv(16) und t(16;16) sind als *core binding factor* (CBF-) AML definiert, sie zeigt spezifische morphologische und molekulare Charakteristika. Für ältere Patienten wurden z. T. abweichende Risikokategorien vorgeschlagen<sup>53,54</sup>. Die Therapie von älteren und multimorbiden Patienten ist dadurch erschwert, dass diese Patienten häufig nicht für eine intensive Chemotherapie in Frage kommen (s. Kapitel A. 1.3.2).

Nahezu alle Patienten mit AML weisen Mutationen in für die Pathogenese der Erkrankung relevanten Genen auf, darunter Transkriptionsfaktoren, Transportproteinen, Tyrosinkinase, DNA-Methylierung assoziierte Proteine und Tumor-Suppressorgenen<sup>55</sup>. Die Identifizierung dieser Mutationen und das Verständnis der molekularen Pathogenese ermöglichen prognostische Aussagen und eröffnen neue Therapiemöglichkeiten, insbesondere bei zytogenetisch normaler (CN-) AML. Von zahlreichen bisher entdeckten Zielgenen haben bisher insbesondere NPM1, CEBPA, IDH1, IDH2 und FLT3 sowie die Fusionsgene RUNX1-RUNX1T1 und CBFB-MYH11 der CBF-AML Eingang in die Routinediagnostik, Klassifikation und Therapieauswahl gefunden<sup>56</sup>. Zielgerichtete Therapiemöglichkeiten bieten in diesem Zusammenhang bspw. der Tyrosinkinase-Inhibitor Midostaurin, welcher bei Patienten

mit FLT3-Mutation das Gesamtüberleben verlängert oder der Inhibitor der mutierten IDH2 Enasidenib, welcher bei Rezidiven oder refraktären Verläufen diese AML-Subgruppe zur Anwendung kommt<sup>57,58</sup>. Tabelle 1.6 listet eine Auswahl von relevanten Mutationen, ihre Funktion und klinische Relevanz auf.

Genmutation	Eigenschaft	Mutationshäufigkeit	Klinische Relevanz
NPM1	Mutation führt zu abnormaler Lokalisation des Proteins im Zytoplasma der Zelle; Beteiligt an ribosomalen Strukturen und am Proteintransport	AML: 25%-35%	Eintrag als eigene AML-Entität; Erhöht Wahrscheinlichkeit einer CR und verlängertes Gesamtüberleben
CEBPA	Transkriptionsfaktor in der Hämatopoese	CN-AML: 10%-18%	Eintrag als eigene AML-Entität; Erhöht Wahrscheinlichkeit einer CR und verlängertes Gesamtüberleben
FLT3 -ITD -TKD	Rezeptor-Tyrosinkinase, eingebunden in Zellüberleben, Proliferation und Differenzierungsprozessen Tandemduplikationen; eingeschoben in das FLT3-Gen Punktmutationen in der Tyrosinkinase-Domäne des Gens	AML: 20% AML: 5%-10%	FLT3-ITD Mutationen sind mit schlechter Prognose verknüpft FLT3-TKD Mutationen z. Z. prognostisch unklar FLT3-Inhibitoren werden als möglicher Therapieansatz z. Z. In Studien untersucht
IDH1, IDH2	Beteiligt an zellulären Mechanismen zur Bewältigung oxidativen Stresses und der epigenetischen Regulierung	AML: 10%-16%	Häufiger in alten Patienten gefunden, mit geringeren CR-Raten und schlechter Prognose assoziiert
ASXL1	Beteiligt an Chromatinmodifikation		Unklar
TET2	Beteiligt an epigenetischer Regulierung	sAML: 25%	Unklar
KIT	Rezeptor-Tyrosinkinase, eingebunden in Zellüberleben, Proliferation und Differenzierungsprozessen	CBF-AML: 25%-30%	Mit schlechter Prognose assoziiert, möglicher neuer Therapieansatz durch KIT-Inhibitoren

Legende: AML: Akute myeloische Leukämie; CN: Zytogenetisch normal; CR: Komplette Remission

Tabelle 1.6: Häufige Genmutationen bei AML nach Marcucci et al.<sup>56</sup>

#### A.1.2.4 Prognose

Die Prognose der AML ist variabel und hängt sowohl von patientenspezifischen, als auch von krankheitsspezifischen Faktoren ab. Das Patientenalter ist dabei nicht nur ein unabhängiger Prognosemarker, sondern es determiniert häufig auch die Durchführbarkeit einer intensiven (Chemo-) Therapie, welche i. d. R. eine Voraussetzung für ein langfristiges Therapieansprechen ist. In einem schwedischen Register mit 2697 behandelten und unbehandelten Patienten betrug die mediane Überlebenszeit aller Patienten nach Diagnosestellung 6,5 Monate, die der Patienten mit einem Alter unter 55 Jahren 37,3 Monate und die der über 75 Jahre alten Patienten nur 2,7 Monate<sup>36</sup>. Hinsichtlich der krankheitsspezifischen Faktoren sind das zytogenetische und molekularbiologische Profil des AML-Subtyps entscheidend.

## **A.1.3 Therapie des MDS und der AML**

### ***A.1.3.1 Grundsätzliche Therapieoptionen bei MDS***

Ob eine Therapie grundsätzlich indiziert ist, wie diese gestaltet sein sollte und welches Ziel man mit ihr verfolgt, hängt vom Schweregrad der Zytopenien, dem Subtyp und der Prognose des MDS sowie vom Alter, klinischen Zustand und dem Wunsch des Patienten ab. Die Unterscheidung zwischen Niedrigrisiko-MDS und Hochrisiko-MDS ist aufgrund der signifikant unterschiedlichen Prognose essentiell und zentrales Element aktueller Therapiealgorithmen.

Bei einem geringen Anteil der MDS-Patienten der Niedrigrisiko-Kategorie ist aufgrund von tolerablen peripheren Zytopenien und einer guten Prognose eine beobachtende und abwartende Haltung gerechtfertigt<sup>59</sup>. Besteht hingegen eine ausgeprägte Symptomatik infolge der Zytopenie, so ist eine Therapie indiziert. Diese sollte in jedem Fall eine bestmögliche supportive Therapie umfassen, welche konsequent angewendet zur Beherrschbarkeit der Symptomatik über Monate bis Jahre bei relativ guter Lebensqualität führen kann<sup>8</sup>. Eine solche supportive Therapie beinhaltet die bedarfsgerechte Transfusion von Erythrozytenkonzentraten, Thrombozytenkonzentraten und die frühzeitige Anwendung von Antibiotika im Fall eines Infekts, insbesondere bei Patienten mit Neutropenie. Hämatopoietische Wachstumsfaktoren wie Erythropoese-stimulierende-Faktoren (ESA) und Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor (G-CSF) können ergänzend zum Einsatz kommen. Patienten mit hohem Transfusionsbedarf sind jedoch prinzipiell durch eine Eisenüberladung gefährdet, welche hauptsächlich zu kardialen und hepatischen Funktionseinschränkungen führen kann<sup>60,61</sup>. Eisenchelatoren wie Deferasirox binden Eisen und führen zu einem negativen Gesamteisenstoffwechsel, sie sollten bei hohem Transfusionsbedarf frühzeitig eingesetzt werden.

Auch mit Blick auf die Therapie stellen Patienten mit MDS del(5q) eine besondere Untergruppe dar. Dieser Subtyp ist einer immunmodulatorischen Therapie mit Lenalidomid zugänglich, welches eines von zwei zugelassenen Medikamenten bei MDS ist. Bei etwa 70% der MDS del(5q)-Patienten führt eine solche Therapie zu zytogenetischer Remission und Transfusionsunabhängigkeit<sup>62</sup>. Eine weitere besondere Patientengruppe stellen Patienten mit hypozellulärem Knochenmark dar.

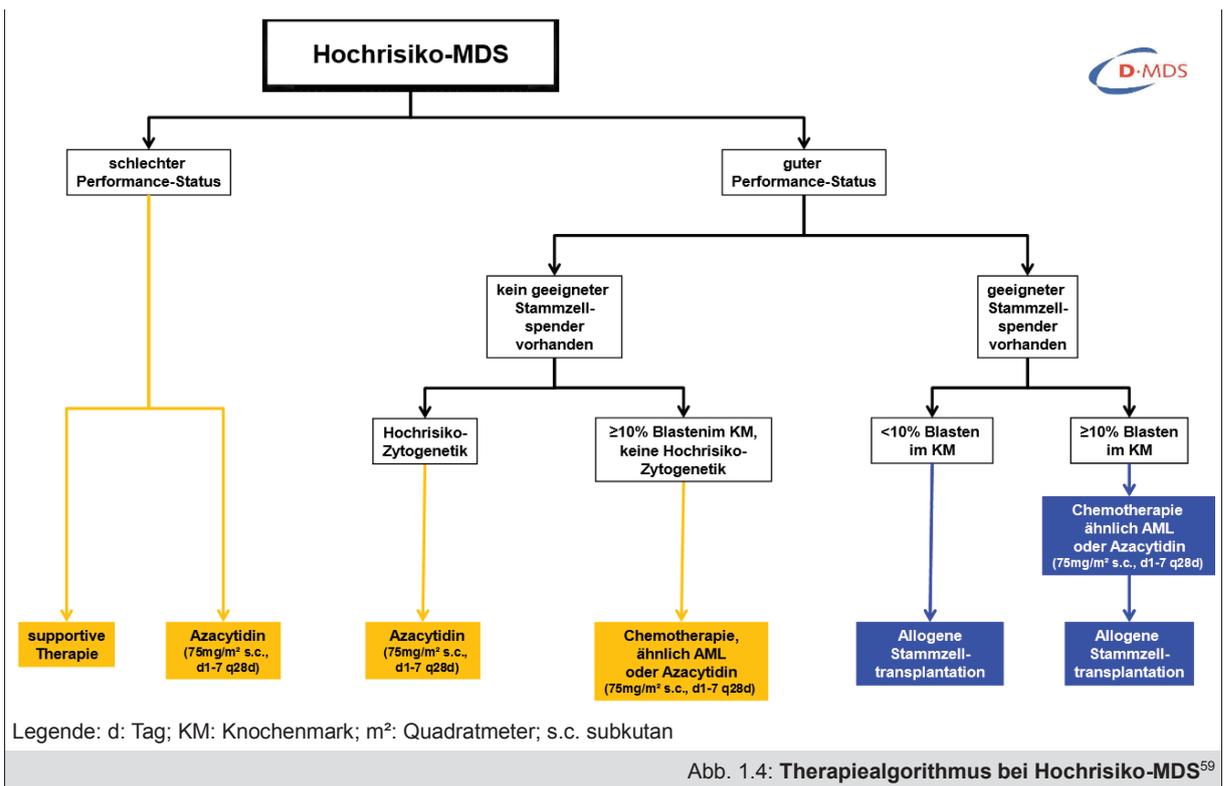
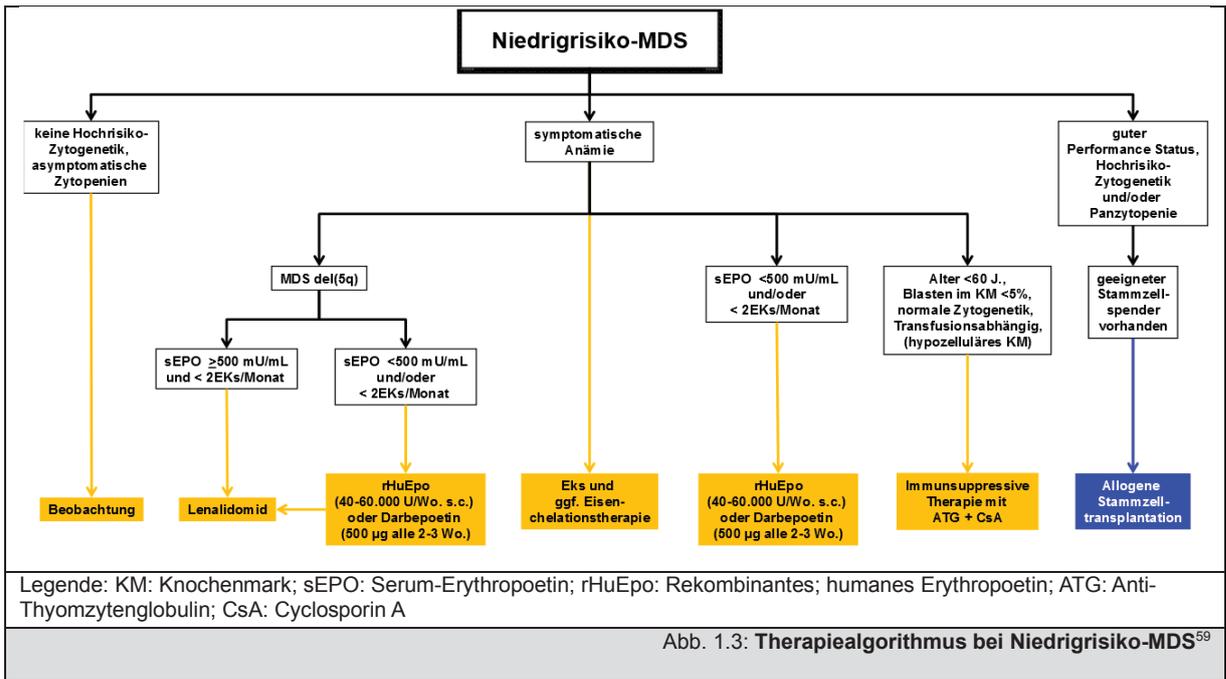
Bei Vorliegen von niedrigem Krankheitsrisiko und geringem Transfusionsbedarf profitieren diese Patienten unter Umständen von einer immunsuppressiven Therapie mit Antithymozytenglobulin und Cyclosporin, welche in ähnlicher Weise auch bei der schweren aplastischen Anämie durchgeführt wird<sup>63</sup>.

Patienten mit Hochrisiko-MDS sollten neben der supportiven Therapie für andere Behandlungsoptionen evaluiert werden. Die einzige potenziell kurative Möglichkeit ist die allogene Stammzelltransplantation (allo-SZT). Ihr Einsatz ist jedoch aufgrund der Nebenwirkungen und Risiken begrenzt möglich und muss daher individuell abgewogen werden. Auf sie wird in Abschnitt A.1.3.3 gesondert eingegangen.

Mit einer intensiven Chemotherapie gelingt es nur bei einzelnen Patienten mit Hochrisiko-MDS eine anhaltende Krankheitsfreiheit zu erreichen. Daher liegt ihr Stellenwert vor allem in der Remissionsinduktion vor geplanter allo-SZT. Nicht-intensive Chemotherapien werden ebenfalls nicht regelhaft eingesetzt, da ihre Bedeutung durch die Einführung der demethylierenden Medikamente (s. u.) in den Hintergrund gerückt ist. Bei erforderlicher Zytoreduktion und nach Ausschöpfen anderer Therapien kann ihr Einsatz jedoch gerechtfertigt sein.

Azacitidine (Aza) ist ein Cytidinanalogon. In niedrigen, nicht zytotoxischen Dosierungen hat es die Fähigkeit, die Differenzierung von Myeloblasten zu induzieren<sup>64</sup>. Aza hemmt die DNA-Methyltransferasen (DNMT). Über diesen epigenetischen Mechanismus ist es in der Lage, die Funktion von Genen, welche an der Differenzierung und Proliferationsregulation hämatopoietischer Zellen beteiligt sind, wiederherzustellen<sup>65</sup>. Für Azacitidine konnte in mehreren randomisierten Studien ein Überlebensvorteil für die Patienten im Vergleich zu konventionellen Therapieformen demonstriert werden. Aufgrund dessen wurde Azacitidine als erstes Medikament für Patienten mit Hochrisiko-MDS, AML aus MDS sowie mit CMML zugelassen, die für eine intensive Therapie wie die allogene Transplantation nicht in Frage kommen<sup>66,67</sup>.

Abb. 1.3 und 1.4 zeigen synoptisch den aktuellen Therapiealgorithmus für Patienten mit MDS gemäß der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie (DGHO).



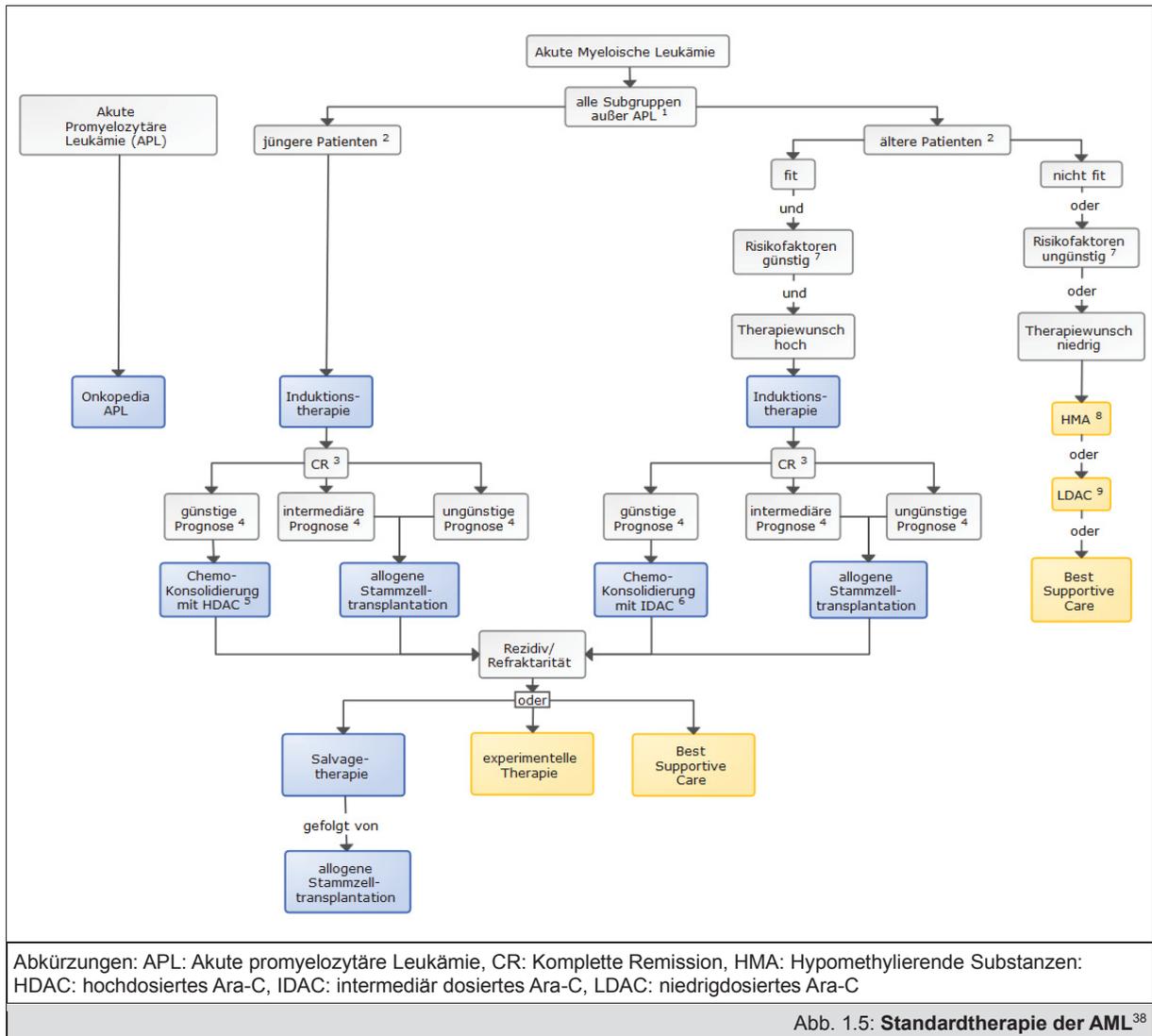
### A.1.3.2 Grundsätzliche Therapieoptionen bei AML

Die Therapie der AML sollte unmittelbar nach der diagnostischen Abklärung erfolgen, da bereits geringe Verzögerung mit einer schlechten Prognose assoziiert ist<sup>68</sup>. Bei jüngeren Patienten mit günstigem Gesundheitszustand gliedert sich die Therapie

grundsätzlich zunächst in die Induktionstherapie mit dem Ziel, eine komplette Remission (CR) zu erreichen. Die darauffolgenden Postremissionstherapie, hat das Ziel, eine Vertiefung und damit den langfristigen Erhalt der CR zu erreichen. Patienten, die nach der Induktionstherapie keine CR erreichen gelten als primär refraktär, dies ist mit einer schlechten Prognose verbunden und erfordert in der Regel eine *Salvage*-Chemotherapie.

Als Standard-Induktionstherapie hat sich eine Kombination aus dreitägiger Gabe eines Anthrazyklins (bspw. 60mg/m<sup>2</sup> Daunorubicin) und siebentägiger Gabe von Cytarabin (AraC, 100-200mg/m<sup>2</sup>) etabliert. In 60 – 80% der Fälle lässt sich hiermit eine CR erzielen<sup>69</sup>. Modifizierte Induktionskonzepte wie die höher dosierte Gabe von AraC oder andere Anthrazykline wie Idarubicin scheinen keinen signifikanten Überlebensvorteil zu bieten<sup>70,71</sup>.

In der Postremissionstherapie stehen verschiedene Konzepte zur Verfügung, die den erzielten Behandlungserfolg, also die Remission, konsolidieren sollen und die Wahrscheinlichkeit für einen Krankheitsrückfall minimieren sollen<sup>69</sup>. Es kommen chemotherapiebasierte Konsolidationstherapien und die allo-SZT zur Anwendung. Die Auswahl der Therapie richtet sich sowohl nach den krankheitsspezifischen Risikofaktoren wie Zytogenetik, Mutationsstatus und Ansprechen auf die Induktionstherapie als auch nach den patientenspezifischen Risikofaktoren wie Alter und Komorbiditäten. Insbesondere ältere Patienten mit ungünstigem Gesundheitszustand kommen jedoch häufig nicht mehr für eine solche intensive Chemotherapie in Frage, alternativ stehen dann demethylierende Substanzen wie Azacitidine und Decitabine oder nicht-intensive Chemotherapien wie niedrig dosiertes Cytarabine zur Verfügung<sup>72</sup>. Abb. 1.5 zeigt schematisch das Vorgehen bei der AML-Behandlung gemäß den aktuellen Leitlinien der DGHO<sup>38</sup>.



### A.1.3.3 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation bei Patienten mit MDS und AML

#### A.1.3.3.1 Prinzip

Die Transplantation allogener, hämatopoetischer Stammzellen (allo-SZT) stellt ein etabliertes, potentiell kuratives Verfahren bei verschiedenen hämatologischen Neoplasien dar. Die Therapie beruht auf der Grundannahme, dass sich durch eine normalerweise letale Ganzkörperbestrahlung (TBI) oder Chemotherapie die Zellen der Hämatopoese zusammen mit den malignen Zellen zerstören lassen und eine nachfolgende Transplantation fremder Stammzellen eine neue Hämatopoese etabliert und so das Überleben ermöglicht<sup>73</sup>. Nicht-myeloablative (NMA) und Konditionierungsregime mit reduzierter Intensität (RIC) stellen neuere Therapiekonzepte dar, reduzieren die therapieassoziierte Mortalität (TAM) und

ermöglichen so den Zugang zur allo-SZT auch für ältere Patienten mit etwaigen Komorbiditäten<sup>74</sup>. Zusätzlich zur zytotoxischen Wirkung einer Chemo- oder Strahlentherapie basiert die Wirkung insbesondere auf der Immunreaktion von Spender T-Zellen gegen noch vorhandene maligne Zellen, somit einem sogenannten *graft-versus-leukemia* (GVL) Effekt<sup>75</sup>. Grund für den gewünschten GVL Effekt sind trotz einer *human leukocyte antigens* (HLA-) basierten Auswahl des Spenders Unterschiede in den Gewebeeigenschaften zwischen Spender und Empfänger, welche auch zur unerwünschten *graft-versus-host disease* (GVHD) führen können<sup>75</sup>. Die GVHD äußert sich vor allem durch Immunreaktionen an Haut, Darm und Leber, stellt eine relevante Komplikation bei der allo-SZT dar und erfordert eine Intensivierung der immunsuppressiven Behandlung. Der genauen Spenderauswahl mittels *HLA-matching* und dem Abwägen zwischen GVL und GVHD kommt daher eine große Bedeutung zu.

Nach der Transplantation kann die Infusion von Spenderlymphozyten (DLI) die T-Zell vermittelte Immunreaktion und so den GVL Effekt verstärken, was bei einem drohendem oder manifestem Rezidiv eingesetzt wird<sup>76</sup>.

Als Stammzellquellen kommen verwandte Spender (RD) und nicht verwandte Spender (URD) aus großen Freiwilligenregistern in Frage. Die deutliche Zunahme an Stammzelltransplantationen in Europa zwischen 1990 und 2010 ist unter anderem auf die gestiegene Verfügbarkeit von URD zurückzuführen<sup>77</sup>.

#### **A.1.3.3.2 Indikation und Durchführung**

AML und MDS sind aktuell die häufigste Indikation für die allogene SZT bei Erwachsenen<sup>77</sup>. Leitlinien und Empfehlungen internationaler Fachgesellschaften unterscheiden sich jedoch hinsichtlich Risikostratifizierung, Stammzellquellen, optimalem Transplantationszeitpunkt, Konditionierungsregimen und der Vorgehensweise im Falle eines Rezidives<sup>78</sup>.

Generell sollten AML-Patienten mit mittlerem und hohem genetischen Risiko, wenn möglich in der ersten Remission (CR1) transplantiert werden. In diesen Risikokategorien ist die Prognose mit einer konventionellen Chemotherapie-basierten Behandlung ungünstiger. Hier überwiegt der gute anti-leukämische Effekt und somit eine niedrige Rezidivrate der allo-SZT gegenüber dem Risiko der TAM<sup>79</sup>. AML-

Patienten mit günstigem genetischen Risikoprofil werden primär mittels Chemotherapie behandelt. Die allo-SZT ist hier eine Option im Falle eines fehlenden Ansprechens oder Rezidives. Eine allo-SZT im fortgeschrittenen Krankheitsstadium und bei Patienten, die nicht in Remission sind, ist sowohl mit einer erhöhten Rezidivrate als auch mit einer erhöhten Rate an Nicht-Rezidiv assoziierter Mortalität (NRM) verbunden<sup>79</sup>. Die Indikation für eine allogene Transplantation besteht ebenfalls für Patienten mit intermediärem und Hochrisiko-MDS gemäß IPSS und IPSS-R sowie für Niedrigrisiko-Patienten mit ungünstiger Zytogenetik, ausgeprägten Zytopenien oder hohem Transfusionsbedarf.

Zusammengefasst basiert die Indikationsstellung immer individuell auf einer sorgfältigen Evaluation von patientenspezifische Faktoren wie Alter und Komorbiditäten, Krankheits-assoziierten Befunden wie Remissionsstatus, Zytogenetik und Molekularbiologie sowie Transplantations-relevanten Einflussgrößen wie Spendereigenschaften, Intensität des Konditionierungsregimes sowie dem Cytomegalievirus (CMV-) Status<sup>80</sup>.

Die Prophylaxe und das Management der Nebenwirkungen einer allo-SZT spielen eine wesentliche Rolle für den langfristigen Erfolg der Transplantation. Im Mittelpunkt stehen hier insbesondere die GVHD und das hohe Infektionsrisiko der immunsupprimierten Patienten.

#### **A.1.3.4 Rezidiv**

Erfreulicherweise haben Verbesserungen der supportiven Maßnahmen sowie auf dem Gebiet der HLA-Diagnostik über die vergangenen Jahrzehnte zu einer stetigen Reduktion der Transplantations-assoziierten Morbidität und Mortalität geführt. Die Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv nach der Transplantation zu erleiden, konnte hingegen bisher nicht wesentlich reduziert werden. Die Inzidenz eines Rezidivs beträgt weiterhin bei der AML in CR1 10 – 40% und in fortgeschrittenen Stadien >50%, bei MDS liegt sie zwischen 5 – 40%<sup>81</sup>. Daher stellt das Rezidiv nach Transplantation aktuell die häufigste Ursache für ein Therapieversagen dar. Die wichtigsten Risikofaktoren für ein Rezidiv sind bei der AML der Remissionsstatus bei Transplantation, die Transplantation nach der CR1 sowie eine ungünstige Zytogenetik bzw. Molekulargenetik. Bei den MDS sind der Blastengehalt, die

Zytogenetik und Molekulargenetik sowie der IPSS-Status wesentliche Faktoren, die die Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv zu erleiden, maßgeblich beeinflussen<sup>68</sup>. Ein Rezidiv der zu Grunde liegende Erkrankung geht mit einer schlechten Prognose einher, da die therapeutischen Möglichkeiten in einer solchen Situation neben einer geringen Ansprechrate auch durch den Allgemeinzustand der Patienten und der hierdurch oftmals eingeschränkten Möglichkeit für intensive Therapien limitiert sind<sup>82,83</sup>.

Grundsätzliche therapeutische Optionen im Falle eines Rezidivs nach allo-SZT sind *best supportive care* im Sinne eines rein palliativen Vorgehens, eine niedrig-dosierte oder eine intensive Chemotherapie, eine zweite allo-SZT und die Gabe von Spenderlymphozyten (DLI)<sup>84,85</sup>. Ein Vergleich der verschiedenen Therapieoptionen im Rezidivfall ist jedoch schwierig, da die meisten Daten aus retrospektiven Studien mit unterschiedlichem Patientencharakteristika stammen.

Bei 263 Patienten mit AML und allo-SZT nach RIC verglichen Schmid et al. diese Therapieoptionen miteinander<sup>86</sup>: DLI alleine erbrachten eine CR-Rate von 36% und eine 2-Jahres-Überlebensrate von 25%. Mit intensiver Chemotherapie war die Remission nur von kurzer Dauer und das Langzeitüberleben mit nur 4% nach 2 Jahren deutlich schlechter. Die Kombination von zytoreduktiver Chemotherapie und DLI zeigte in dieser Studie keinen Vorteil gegenüber DLI alleine und bei 8 Patienten mit der Kombination aus Chemotherapie und zweiter allo-SZT wurde eine CR-Rate von 56% und eine 2-Jahres-Überlebensrate von 42% erreicht. Die 2-Jahres-Überlebensrate der Gesamtgruppe lag bei 14%. Christopeit et al. konzentrierten sich in ihrer Arbeit an 179 Patienten auf den Stellenwert einer zweiten allo-SZT und konnten eine 2-Jahres-Überlebensrate von 25% zeigen<sup>87</sup>.

Die größtenteils enttäuschenden Langzeitergebnisse zeigen den Bedarf an neuen Optionen zur Behandlung des Rezidivs. Seit den 1970er Jahren gibt es einzelne Berichte über die Therapie myeloischer Neoplasien mit dem ursprünglich als Chemotherapeutikum synthetisierten Azacitidine<sup>85,88</sup>, welches seit 2004 bereits als wenig toxische Therapie in der Behandlung von Hochrisiko-MDS etabliert und auch bei der AML zugelassen ist. Die erste Arbeit über die Anwendung von Azacitidine im Rezidivfall nach allo-SZT erschien 2007 von Graef et al<sup>85</sup>. Czibere et al zeigten zwei Jahre später in einer retrospektiven Studie mit 22 AML- und MDS-Patienten, die eine

Therapie mit Azacitidine und DLI erhielten, CR-Raten von 23% und eine 2 Jahres-Überlebensrate von ebenfalls 23%<sup>89</sup>. Therapie-assoziierte Todesfälle traten nicht auf, die Nebenwirkungen beschränkten sich auf Zytopenien und lokale Hautreaktionen. Die prospektive AZARELA-Studie von Schroeder et al. mit 30 Patienten konnte diese retrospektiven Ergebnisse bestätigen<sup>90</sup>: Eine CR wurde von 23% der Patienten erreicht und die 2-Jahre-Überlebensrate betrug 17%. Azacitidine hat sich auf Basis dieser Ergebnisse und den Resultaten weiterer retrospektiver Analysen und einzelner prospektiver Studien als eine weitere therapeutische Option zur Behandlung des Rezidives nach allo-SZT im klinischen Alltag etabliert<sup>91,92</sup>.

#### **A.1.3.5 Das Konzept der minimalen Resterkrankung**

Aufgrund der bereits erwähnten schlechten Prognose der rezidierten AML und MDS trotz der aktuell verfügbaren Therapien liegt ein wesentlicher Schwerpunkt auf der Vermeidung eines hämatologischen Rezidivs. Ein solches ist definiert durch das Wiederauftreten von Blasten im peripheren Blut (PB) oder >5% Blastenanteil im Knochenmark (BM) oder in seltenen Fällen einer extramedullären Manifestation.

Zentrales Element dieses Bestrebens, ein drohendes Rezidiv bereits vor der klinischen Manifestation zu erkennen, ist das Konzept der minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD). MRD bezeichnet nach der Behandlung verbliebene maligne Zellen, die aufgrund ihrer geringen Anzahl und auch der teils morphologischen Ähnlichkeit mit gesunden Vorläuferzellen der zytologischen Diagnostik entgehen. Die MRD-Diagnostik kann durch verschiedene Methoden mit unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität erfolgen und wird im Folgenden näher erläutert. Nicht alle Optionen sind jedoch sinnvoll bei jedem Patienten anwendbar.

Die zytomorphologische Beurteilung von PB und BM gehört zur unabdingbaren Routinediagnostik und stellt damit keine MRD-Diagnostik im eigentlichen Sinn dar. Sie ist als Referenz der weiteren Methoden mit genannt. Ihre Vorteile sind die einfache und schnelle Durchführung bei allen Patienten und die nahezu ubiquitäre Verfügbarkeit. Von Nachteil ist die Subjektivität bei der Befundung der Zellen. Die Sensitivität ist niedrig und wird mit 1:20 angegeben, es kann also eine leukämische Zelle in bis zu 20 Zellen regelhaft detektiert werden<sup>93,94</sup>.

Die Bestimmung der Linienzugehörigkeit und des Differenzierungsgrades der analysierten Zellen wird dabei mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen zelltypspezifische Membranantigene (CD-Marker, *Cluster of differentiation*) im Durchflusszytometer ergänzt. Diese Immunphänotypisierung zielt darüber hinaus auch auf die Detektion von leukämieassoziierten Immunphänotypen (LAIP) zum MRD-Monitoring ab, also von Antigenprofilen, die bei gesunden Zellen der Hämatopoiese nicht oder nur in sehr geringem Maße vorkommen. Bei leukämischen Zellen kommt es zu Überexpression, fehlender Expression oder asynchroner Expression von normalerweise synchron auftretenden Oberflächenmarkern. Diese charakteristischen Veränderungen lassen sich bei 80 – 100% aller AML Patienten nachweisen<sup>95</sup>. Die breite Anwendungsmöglichkeit stellt den hauptsächlichsten Vorteil dieser Technik zur MRD-Detektion dar. Nachteilig ist die schwierige einheitliche Definition von LAIP sowie die Unterschiede hinsichtlich der technischen Voraussetzungen. Diese heterogenen Bedingungen machen eine Standardisierung bisher schwierig. Auch die Definition von MRD-Positivität bzw. –Negativität ist bisher für die Durchflusszytometrie nicht allgemein gültig definiert<sup>96</sup>. Die Sensitivität der Durchflusszytometrie wird unter optimalen Bedingungen mit  $10^{-3}$  –  $10^{-4}$  angegeben<sup>97</sup>. Als nächste Methode wird die Zytogenetik für das MRD Monitoring eingesetzt. Die konventionelle Metaphasenzytogenetik erlaubt die komplette Übersicht über das mikroskopisch sichtbare Genom. Sie dient der Sicherung der Diagnose, der notwendigen Klassifikation der Erkrankung und als Ausgangsbefunde für die MRD-Beobachtung. Vorteile wie einfache und schnelle Verfügbarkeit sind ähnlich denen der Zytomorphologie. Auch die Sensitivität ist mit 1:25 vergleichbar<sup>93,94</sup>. Diese kann mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf etwa 1:250 gesteigert werden<sup>93,94</sup>. Dabei werden DNA-Sonden zur Detektion bekannter chromosomaler Aberrationen eingesetzt. Die Methode weist dadurch jedoch nur Aberrationen nach, die bewusst mittels spezifischer Sonde gesucht werden. Sie kommt daher ergänzend und nicht ersetzend zur konventionellen Zytogenetik zur Anwendung. Beide Methoden eignen sich lediglich für Patienten, welche auch chromosomale Aberrationen aufweisen. Diese reduzierte Anwendbarkeit auf nur etwa 50% der MDS- und 50 - 60 % der AML-Patienten (siehe Kapitel A.1.2.3) ist der hauptsächlichste Nachteil der Methodik.

Molekularbiologische Methoden wie die *real-time quantitative PCR* (RQ-PCR) stellen die nächste Option zur MRD-Detektion dar und weisen eine noch höhere Sensitivität von  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$  auf<sup>96</sup>. Zu detektierende Zielstrukturen sind dabei Fusionsgene, Genmutationen und überexprimierte Wildtyp-Gene. Tabelle 1.7 verschafft einen Überblick über die molekularen Zielstrukturen. Der Nachweis von Fusionsgenen an den Bruchstellen der chromosomalen Translokationen erfolgt quantitativ mittels RQ-PCR. Gängige Ziele sind RUNX1-RUNX1T1 und CYBFB-MYH11, für die auch signifikante Schwellenwerte zur Identifizierung von Patienten mit erhöhtem Rezidivrisiko im Rahmen der konventionellen Behandlung etabliert sind<sup>98</sup>. Bei der Mehrheit der Patienten sind aufgrund fehlender Translokationen jedoch keine Fusionsgene detektierbar. Genmutationen stellen die nächste mögliche Zielstruktur dar. Es lassen sich zwar bei insgesamt 60% – 70% der AML-Patienten Genmutationen nachweisen, die Stabilität dieser Mutationen im Krankheitsverlauf ist jedoch teilweise noch unklar und kann evtl. zu falsch negativen Befunden führen. Zudem sind nicht für alle Mutationen standardisierte Diagnostikkits etabliert, so dass die praktische Anwendbarkeit geringer ist, als die Quote an Genmutationsträgern zunächst vermuten lässt<sup>96</sup>. Im Fokus stehen v. a. Mutationen von FLT3 und NPM1, für die beide kombinierte PCR- und Elektrophoreseassays zur Verfügung stehen. NPM1-Mutationen werden bspw. bei etwa 30% der CN-AML gefunden und scheinen eine große Stabilität im Verlauf aufzuweisen. Eine klinisch relevante Anwendbarkeit als MRD-Marker konnte gezeigt werden, ebenso wurden Schwellenwerte definiert<sup>99</sup>. Allerdings sind diese Schwellenwerte jeweils von der verwendeten Methode abhängig, daher fehlt meist die Vergleichbarkeit zwischen den in unterschiedlichen Laboren erhobenen Befunden.

Zielstruktur	Methode	Sensitivität	Anwendbarkeit bei AML
Fusionsgene (RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11, MLL)	RQ-PCR	0,01 – 0,001%	20,00%
NPM1-Mutationen	PCR-Amplifizierung, elektrophoretischer Nachweis	0,01 – 0,001%	30,00%
FLT3-ITD	PCR-Amplifizierung, elektrophoretischer Nachweis	0,01 – 0,001%	25,00%
DNMT3A-Mutationen	RQ-PCR, hybridization capture-based-next-generation sequencing	0,01 – 0,001%	20,00%

Legende: RQ-PCR: Quantitative *real-time* Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 1.7: Molekulare MRD-Zielstrukturen nach Coustan-Smith et al<sup>97</sup>

Im Gegensatz zur AML sind für MDS bisher keine der genannten quantitativen molekularbiologischen MRD-Ansätze etabliert. Demzufolge besteht Bedarf an hochsensitiven, quantitativen und vor allem breit anwendbaren Lösungen zum MRD-Monitoring.

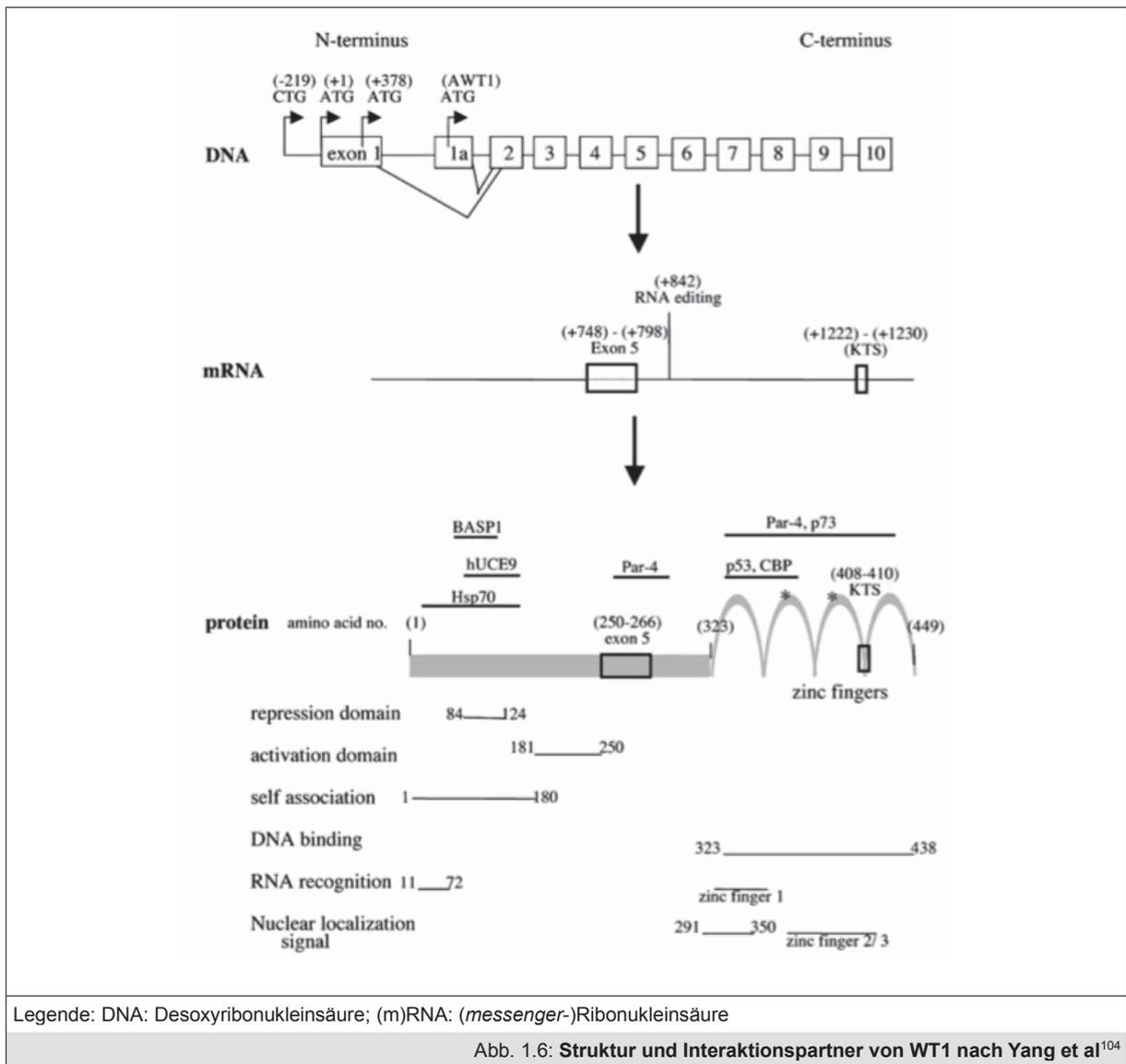
Eine gewisse Sonderstellung nimmt das MRD-Monitoring mittels Chimärismusanalytik ein. Diese Methode ist nur nach der allo-SZT anwendbar, da sie nicht auf dem Nachweis einer krankheitsspezifischen genetischen oder molekularen Veränderung beruht, sondern auf der Diskrimination zwischen Spender- und Empfängerzellen anhand von genetischen Unterschieden. Bei erfolgreichem Anwachsen der transplantierten Stammzellen liegt in den meisten Fällen etwa vier Wochen nach Transplantation ein kompletter Chimärismus (CC) vor, d. h. es lassen sich nur noch Zellen der Spender-Hämatopoiese nachweisen. Ein persistierender oder wieder auftretender gemischter Chimärismus (MC), also der Nachweis von verbliebenen Zellen der Empfänger-Hämatopoiese dient bei maligner Grunderkrankung als Surrogatparameter eines drohenden Rezidives, da die verbleibenden und nun wieder proliferierenden Zellen i. d. R. dem malignen Zellklon entsprechen<sup>100</sup>. Bei geschlechterungleichen Transplantationen kann das X- bzw. Y-Chromosom als zytogenetischer Unterschied zwischen Spender- und Empfängerzellen mittels FISH als Zielstruktur vergleichsweise einfach detektiert werden, dabei wird wie bereits zuvor beschrieben eine Sensitivität von etwa 1:250 erreicht. Als Methode sowie bei geschlechtsgleichen Transplantationen kommen Verfahren wie der PCR-Nachweis von *short tandem repeats* (STR) zum Einsatz, diese weisen eine Sensitivität von etwa 1:100 auf<sup>101</sup>. Diese Methode ist gegenwärtig als molekularbiologisches Standardverfahren der Chimärismusanalytik etabliert. Neuer und sensitiver ist der qPCR-Nachweis von sogenannten *indels*, kurzen Insertionen und Deletionen der DNA. Mittels dieser Methode wird eine Sensitivität von  $10^{-3}$  erreicht<sup>102</sup>. Die Sensitivität lässt sich bei allen genannten Chimärismusverfahren durch die vorhergehende Anreicherung von Zellsubpopulationen mittels CD-Markern erreichen, dabei kommt bspw. der myeloische Marker CD34 zum Einsatz und die Chimärismusanalyse wird nur an CD34+ Zellen vorgenommen. Hiermit wird eine Sensitivität von  $10^{-5}$  erreicht<sup>103</sup>.

Ein Ansatz, der sowohl vor als auch nach allo-SZT verfügbar ist und keine chromosomale Aberration oder genetische Mutation voraussetzt, kann die Messung des Expressionsniveaus von Wildtyp-Genen sein. Das Konzept ist durch die o. g. fehlenden Einschränkungen prinzipiell für die gesamte AML- und MDS-Population durchführbar. Durch Messung mittels RQ-PCR können zudem quantitative Aussagen getätigt werden. Notwendige Voraussetzung ist die Definition von Schwellenwerten, um zwischen physiologischer Expression und pathologischer Überexpression zu unterscheiden. Bei den myeloischen Neoplasien konzentriert sich dieser MRD-Ansatz dabei auf das *Wilms' Tumor 1* (WT1) Gen. Es wird im folgenden Abschnitt A.2 separat beschrieben.

## **A.2 *Wilms' Tumor 1* (WT1)**

### **A.2.1 Struktur, Funktion und Vorkommen von WT1**

Das auf Chromosom 11p13 lokalisierte WT1-Gen codiert für 10 Exons, die in eine 3kB große mRNA transkribiert werden<sup>104</sup>. Das resultierende Genprodukt ist ein Zinkfingerprotein, welches als Transkriptionsfaktor fungiert. Abbildung 1.6 verdeutlicht die Struktur auf DNA-, mRNA- und Proteinebene. Ursprünglich wurde das WT1-Gen als Tumorsuppressorgen beim *Wilms' Tumor*, einem kindlichen, malignen Nierentumor beschrieben. Mutationen des WT1-Gens werden jedoch nur bei 15% aller *Wilms' Tumoren* gefunden, in den übrigen Fällen wird die Wildtyp-Form des WT1-Gens exprimiert<sup>105</sup>.



Das WT1-Protein spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen Wachstums- und Differenzierungsprozessen. Während der Embryogenese wird WT1 vor allem im Urogenitaltrakt exprimiert, beim Erwachsenen wird es darüber hinaus im ZNS und in hämatopoietischen Zellen exprimiert<sup>104</sup>. Als Transkriptionsfaktor nimmt WT1 Einfluss auf die Expression von Wachstumsfaktoren wie *Colony-stimulating factor 1* und *Insulin growth factor II*, Rezeptoren wie *epidermal growth factor receptor*, *retinoic acid receptor alpha*, Zellzyklusregulatoren wie *c-myc*, *BCL-2* und anderen Transkriptionsfaktoren<sup>104</sup>. Neben dieser indirekten Regulation der Zellproliferation und -differenzierung interagiert das WT1-Protein auch direkt mit verschiedenen anderen, für den Zellzyklus wichtigen Proteinen wie bspw. p53.

Im Rahmen der zahlreichen Interaktionen sind für die resultierende Wirkung sowohl Eigenschaften im Sinne eines Onkogens als auch eines Tumorsuppressorgens beschrieben. Dieser Effekt beruht womöglich auf der Existenz von mindestens 36 Isoformen des Genprodukts, von denen vier Isoformen die Hauptformen darstellen und durch alternatives *Splicing* generiert werden<sup>106</sup>. Die Eigenschaften des WT1-Gens und des resultierenden Genproduktes rückten es ins Interesse der onkologischen Forschung, wobei der Schwerpunkt zunächst auf den soliden Malignomen lag. So wurde eine Überexpression von Wildtyp-WT1 bei u. a. bei ZNS-Tumoren, Ovarialkarzinomen und Mammakarzinomen beschrieben<sup>104</sup>. Im Bereich der Hämatologie beschrieben Inoue et al. 1994 erstmals die Überexpression auf RNA-Ebene in einer Gruppe von 45 Patienten mit AML und identifizierten somit WT1 als einen neuen potenziellen Krankheitsmarker<sup>107</sup>.

### **A.2.2 Die Rolle von WT1 in der gesunden und der malignen Hämatopoiese**

Im gesunden menschlichen Knochenmark werden sehr geringe Level von WT1 exprimiert. Der Effekt, den WT1 dabei ausübt, ist bisher nur unzureichend verstanden. Im Mausmodell führt die Überexpression von WT1 in hämatopoetischen Progenitorzellen zu einer erhöhten Zellularität des Knochenmarks ohne Tendenz zur spontanen Leukämieentstehung<sup>108</sup>. In humanen Progenitorzellen hingegen kommt es bei hohen WT1-Leveln zum Zellzyklusarrest und zur verringerter Bildung von Kolonien<sup>109</sup>.

Sowohl bei der AML, der CML als auch bei MDS wird regelmäßig eine Überexpression von WT1 auf RNA-Ebene nachgewiesen. Bei der AML zeigen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 91 – 100% der Patienten eine Überexpression von WT1<sup>110–112</sup>, während bei MDS auf Basis von weniger Daten ca. 60% der Patienten WT1 überexpremieren<sup>113,114</sup>. Bei der CML wird WT1 in der chronischen Phase in der Regel auf niedrigem Niveau exprimiert, wobei die Expressionslevel im Rahmen der Krankheitsprogression bis hin zur Blastenkrise kontinuierlich zunehmen<sup>115</sup>. Die Höhe der WT1-Expression korreliert dabei mit der Anzahl der leukämischen Zellen und eignet sich daher als Marker für die Existenz, Persistenz oder das Wiederauftreten des leukämischen Zellklones<sup>110</sup>. Diese Beobachtung ist die Grundlage für die Nutzung von quantitativen WT1-Gentranskript-Messungen als MRD-Marker.

Der MRD-Ansatz mittels Messung von Wildtyp-WT1 wurde für AML-Patienten erstmalig 2002 von Cilloni et al angewandt<sup>116</sup>. Die Gruppe untersuchte 119 Patienten mit akuter Leukämie, davon 71 mit AML sowie 53 gesunde Kontrollpersonen. In 100% der AML-Proben wurde mittels RQ-PCR ein erhöhtes Expressionsniveau gefunden, während bei den gesunden Kontrollpersonen negative oder sehr geringe Werte gemessen wurden, die signifikant von der pathologisch erhöhten Expression unterschieden werden konnten. Im zeitlichen Verlauf unter Chemotherapie zeigte sich eine parallele Dynamik der WT1-Expression mit verfügbaren spezifischen Fusionsgenen (n=10) sowie eine Expression auf niedrig-normalem Niveau bei Patienten in Langzeitremission. Bei Patienten mit Rezidiv ging das Rezidiv mit erhöhter WT1-Expression einher, der WT1-Anstieg ging dem hämatologischen Rezidiv um bis zu drei Monate voraus. Diese Ergebnisse wurden in den folgenden Jahren prinzipiell von mehreren Gruppen bestätigt, jedoch auf Basis von unterschiedlich selektierten Patientengruppen, technisch verschiedenen PCR-Assays und mangelhaft definierten Schwellenwerten<sup>117-119</sup>. Der Nutzen einer kurzfristigen WT1-Messung am ersten und sechsten Tag während der Induktionstherapie als prognostischen Marker hinsichtlich des Gesamtüberlebens wurde von Gianfaldoni et al demonstriert<sup>120</sup>. Die erste Studie zur Anwendbarkeit als MRD-Marker nach allo-SZT publizierten Candoni et al. 2009<sup>121</sup>. Dabei wurden 38 Patienten mit AML zum Zeitpunkt der Diagnose, der Transplantation und regelmäßig nach Transplantation gemessen. Alle Patienten zeigten bei Diagnose einer Überexpression von WT1. In der Gruppe der Transplantation in CR (n=25) wurden signifikant niedrigere Werte gemessen als bei den 13 Patienten mit aktiver Erkrankung, deren WT1-Werte während der Induktionstherapie nicht sanken oder sogar anstiegen. Die WT1-Werte aller Patienten mit dauerhafter CR nach Transplantation persistierten auf niedrig-normalem Niveau, während die der Patienten mit Rezidiv (n=6) zum Zeitpunkt des Rezidivs oder davor wieder über den anhand der gesunden Kontrollgruppe definierten Schwellenwert anstiegen. Zudem zeigte sich ein übereinstimmender Verlauf von WT1 und weiteren verfügbaren MRD-Markern.

Ein Vergleich der verschiedenen MRD-Ansätze Chimärismus und WT1-Expression erbrachten Lange et al 2011<sup>103</sup>. Die Gruppe zeigte an 68 Patienten mit AML und 20 Patienten mit MDS nach allo-SZT eine analoge Aussagekraft von WT1-Expression im

PB und von Donorchimärismus an selektionierten CD34+ Zellen und legte für WT1 eine Sensitivität von 79% und eine Spezifität von 89% hinsichtlich des Rezidivereignisses dar.

Der Schwellenwert, ab dem von einer WT1-Überexpression gesprochen werden kann, war jedoch bis 2009 uneinheitlich definiert. Eine wichtige und notwendige Standardisierung für die Bestimmung der WT1-Expression erfolgte durch Cilloni et al. 2009 in einer *European Leukemia Network* (ELN) Studie, in der sie neun verschiedene PCR-Assays verglichen und Schwellenwerte anhand von gesunden Probanden und AML-Patienten definierten<sup>110</sup>. Dabei wurde für PB-Proben der Schwellenwert von 50 WT1-Kopien pro 10.000 Kopien des Housekeeping-Gens ABL definiert und für KM-Proben ein Wert von 250 WT1 pro 10.000 ABL-Kopien. Der gefundene Assay deckt die meisten Isoformen und Mutationen des Gens ab und zeigte sich hinsichtlich Sensitivität und Spezifität gegenüber den anderen Assays als überlegen. Die Autoren schlugen bei gleicher Sensitivität und Spezifität die Verwendung von PB-Proben vor, um das MRD-Monitoring einer möglichst großen Patientengruppe engmaschig anbieten zu können.

Während für Patienten mit AML also mittlerweile zahlreiche Studien den Nutzen der WT1 Messung als unabhängigen prognostischen Marker für das Gesamtüberleben sowie als einen sensitiven und spezifischen MRD-Marker zur Überwachung des Rezidivrisikos darlegen, liegen für Patienten mit MDS nur wenige Daten vor. Tamura et al zeigten 2010 in einer Studie mit 80 MDS-Patienten eine WT1-Überexpression auf mRNA-Ebene bei 60% der Patienten, einen Anstieg der mittleren Expression mit steigender IPSS-Kategorie sowie eine signifikante Korrelation von WT1-Expression und Überlebensrate<sup>114</sup>.

### **A.3 Fragestellung und Zielsetzung**

Das Konzept der *minimal residual disease* bei AML und MDS ist ein etablierter Ansatz sowohl für die Prognoseabschätzung als auch zur Steuerung von therapeutischen Interventionen insbesondere vor, aber auch nach allogener Transplantation. Etablierte Ansätze zur MRD-Messung wie Zytogenetik, Durchflusszytometrie, Chimärismus und molekularbiologischer Fusionsgen- und Mutationsnachweis weisen häufig Defizite wie mangelnde Sensitivität, geringe Anwendbarkeit oder fehlende Standardisierung auf. Während die meisten Methoden für Patienten mit AML im klinischen Alltag etabliert sind, liegen für Patienten mit MDS bisher keine etablierten MRD-Marker vor, die universell und bei den meisten Patienten als quantitative Messung mit ausreichender Sensitivität eingesetzt werden können. Ferner stellt bei den genannten Methoden die hauptsächliche Verwendung von KM oder von angereicherten CD34+ Zellen aus PB als Untersuchungsmaterial eine Hürde hinsichtlich Patientenkomfort und -akzeptanz sowie Zeit- und Kosteneffizienz dar.

Es besteht demnach Bedarf an einer Methode, die bei möglichst vielen Patienten mit hoher Sensitivität, etablierter Standardisierung und unter Verwendung von PB einsetzbar ist.

Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation, ob die quantitative Messung von WT1-Gentranskripten mittels qRT-PCR als MRD-Marker bei MDS und AML nutzbar ist. Dazu betrachten wir drei Patientengruppen:

In der Gruppe der Patienten mit neu diagnostiziertem MDS untersuchen wir die qualitative und quantitative Verteilung der WT1-Expression in Korrelation mit anderen krankheitsspezifischen Charakteristika und Prognoseparametern.

In der Gruppe der Patienten mit MDS und AML nach allogener Stammzelltransplantation untersuchen wir den longitudinalen Verlauf des Parameters hinsichtlich der Anwendbarkeit als MRD-Marker.

In der dritten Gruppe untersuchen wir Patienten mit MDS und AML, welche nach allogener Stammzelltransplantation ein Rezidiv zeigten und im Rahmen einer klinischen Phase-II Studie mit Azacitidine und Spenderlymphozyten behandelt wurden. Dabei werden das klinische Ansprechen und der Verlauf mit den Resultaten der MRD-Messung korreliert.

## **B Material und Methoden**

### ***B.1 Patienten und Zellen***

Die Patienten mit MDS und AML sowie die gesunden Kontrollpersonen wurden vor Probenentnahme über den wissenschaftlichen Zweck der Untersuchung aufgeklärt und haben daraufhin schriftlich ihr Einverständnis gegeben (Ethikvoten 3768, 3973, 4138 und 2007-004860-37). Die Diagnose der Erkrankung stützte sich auf die in Kapitel A.1.1.2 und A.1.2.2 angegebenen Diagnosekriterien, wobei die Eingruppierung der Patienten auf Basis der zum damaligen Zeitpunkt gültigen WHO-Klassifikation von 2008 erfolgte<sup>14</sup>.

Die Tabellen 6.1, 6.2 und 6.3 stellen synoptisch die Charakteristika der Patienten mit neu diagnostiziertem MDS, der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation sowie der Patienten unter Therapie mit Azacitidine und Spenderlymphozyten dar.

	<b>Anzahl</b>		<b>%</b>
<b>No</b>	<b>73</b>		<b>100</b>
<b>Medianes Alter (Jahre)</b>		55	
Spannweite		39-86	
<b>Geschlecht</b>			
Männlich	40		55
Weiblich	33		45
<b>MDS</b>			
RA/RARS/hypoplastisch	8		11
RCMD	21		29
MDS del5q	7		10
CMML	7		10
RAEB-I	11		15
RAEB-II	9		12
sAML	10		14
<b>Karyotyp</b>			
<i>Good</i>	29		40
<i>Intermediate</i>	5		7
<i>Poor</i>	11		15
fehlende Daten	28		38
<b>Medullärer Blastenanteil</b>			
< 5%	36		49
> 5%	20		27
fehlende Daten	17		23
<b>IPSS</b>			
<i>low risk</i>	13		18
<i>intermediate I</i>	34		47
<i>intermediate II</i>	13		33
<i>high risk</i>	13		18
<b>IPSS-R</b>			
<i>very low risk</i>	7		10
<i>low risk</i>	19		26
<i>Intermediate</i>	19		26
<i>high risk</i>	18		25
<i>very high risk</i>	10		14
Anmerkung: Die Daten stammen aus den Patientenakten und wurden teils aus dem MDS-Register der Universitätsklinik Düsseldorf ergänzt.			
<b>Tabelle 6.1: Klinische Daten der Patienten mit MDS</b>			

ID	Geschlecht	Alter	WHO Subtyp	IPSS	Vorbehandlung vor Tx	Remission vor Tx	Typ der Konditionierung	Spender	HLA-Match	Stammzellquelle	Rezidiv	Zeit bis Rezidiv
Pat. 1	m	55	RCMD	intermediate risk II	BSC	unbehandelt	dosisreduziert	MUD	9/10; 1 HLA-A mismatch	PBSC	nein	-
Pat. 2	w	54	MDS/MPN	n. a.	BSC, Litalir	unbehandelt	fehlt	MUD	10/10	PBSC	nein	-
Pat. 3	m	59	RAEB-I	fehlt	BSC	unbehandelt	fehlt	MUD	9/10; 1 HLA-DBQ mismatch	PBSC	ja	517
Pat. 4	m	47	RAEB-I	high	BSC	unbehandelt	standard	MUD	10/10	PBSC	nein	-
Pat. 5	m	70	RAEB-I	intermediate risk II	BSC, Prednisolon	unbehandelt	dosisreduziert	MUD	9/10; 1 HLA-A mismatch	PBSC	nein	-
Pat. 6	w	49	sAML	n. a.	BSC, 1. Tx	refraktäres Rezidiv	dosisreduziert	MUD	10/10	PBSC	ja	98
Pat. 7	w	63	sAML	n. a.	Vidaza 4 Zyklen	aktive Erkrankung	dosisreduziert	MUD	10/10	PBSC	nein	-
Pat. 8	w	47	RAEB-II	fehlt	BSC	unbehandelt	standard	MUD	9/10	PBSC	nein	-
Pat. 9	m	53	RAEB-II	fehlt	BSC	unbehandelt	dosisreduziert	MUD	fehlt	PBSC	ja	130
Pat. 10	w	69	RAEB-II	intermediate risk II	6x Vidaza	aktive Erkrankung	dosisreduziert	MUD	9/10	PBSC	ja	328
Pat. 11	m	62	RAEB-II	intermediate risk II	2 Zyklen Vidaza	aktive Erkrankung	fehlt	MUD	9/10; HLA-A mismatch	PBSC	nein	-
Pat. 12	w	62	sAML	n. a.	BSC, Litalir	unbehandelt	dosisreduziert	MUD	10/10	PBSC	nein	-
Pat. 13	w	52	sAML	n. a.	6 Zyklen Vidaza	aktive Erkrankung CR1, zytogenetisch MRD+	standard	MUD	fehlt	PBSC	nein	-
Pat. 14	m	36	sAML	n. a.	Induktion	aktive Erkrankung, primäres Induktionsversagen	standard	MRD	10/10	PBSC	ja	99
Pat. 15	w	43	sAML	n. a.	Induktion, Salvage	aktive Erkrankung, primäres Induktionsversagen	standard	MUD	10/10	PBSC	ja	167
Pat. 16	m	49	RAEB-II	high	BSC	unbehandelt	standard	MRD	10/10	PBSC	nein	-
Pat. 17	m	46	CMML	n. a.	BSC	unbehandelt	standard	MUD	9/10;	PBSC	nein	-

Anmerkungen: Fehlt: fehlende Daten; n. a./-: nicht anwendbar; Angabe der inkompatiblen "mismatch" HLA-Alele sofern Daten verfügbar; Zeit bis Rezidiv in Tagen angegeben; Alter in Jahren angegeben

Abkürzungen: m/w: männlich/weiblich, BSC: Best supportive care, Tx: Transplantation, HLA: Humanes Leukozyten Antigen, PBSC: Stammzellen aus peripherem Blut, MUD: matched unrelated donor, MRD: matched related donor

Tabelle 6.2 Klinische Daten der Patienten nach allo-SZT

ID	Geschlecht	Alter bei Rezidiv	Diagnose	Follow up	Remissionsstatus last FU	Status	Überlebenszeit	Anzahl Zyklen AZA	Anzahl DLI
Pat. 2.1	w	63	AML	446	PD	tot	446	1	0
Pat. 2.2	w	48	AML	236	PD	tot	236	5	1
Pat. 2.3	w	68	AML	118	PD	tot	118	3	0
Pat. 2.4	w	51	AML	141	PD	tot	141	4	1
Pat. 2.5	w	36	AML	93	PD	tot	93	2	1
Pat. 2.6	w	29	AML	47	PD	tot	47	1	0
Pat. 2.7	m	41	AML	40	PD	tot	40	1	0
Pat. 2.8	w	60	AML	75	PD	lebendig	75	2	1
Pat. 2.9	w	50	AML	28	nicht beurteilbar	tot	28	1	0
Pat. 2.10	m	35	AML	54	SD	tot	54	2	1
Pat. 2.11	w	62	AML	113	PD	tot	113	2	0
Pat. 2.12	m	59	AML	83	PD	tot	83	3	1
Pat. 2.13	w	54	AML	57	PD	tot	57	2	1
Pat. 2.14	w	48	AML	235	PD	lebendig	235	6	2
Pat. 2.15	m	46	RAEB II	39	PD	tot	39	1	0
Pat. 2.16	w	54	AML	187	PD	tot	187	5	1
Pat. 2.17	m	68	RAEB II	240	PD	lebendig	240	6	2
Pat. 2.18	w	70	AML	228	PD	tot	228	6	2
Pat. 2.19	m	28	8	65	PD	tot	65	1	0
Pat. 2.20	m	31	AML	143	PD	tot	143	2	1
Pat. 2.21	m	35	AML	759	CR	lebendig	759	8	4
Pat. 2.22	m	57	AML	1776	CR	lebendig	1776	8	3
Pat. 2.23	m	42	RAEB II	1111	CR	lebendig	1111	6	4
Pat. 2.24	m	37	RAEB-I	1352	CR	lebendig	1352	7	4
Pat. 2.25	m	42	AML	1262	CR	lebendig	1262	6	3
Pat. 2.26	w	39	AML	896	CR	lebendig	896	7	3
Pat. 2.27	m	52	AML	947	CR	lebendig	947	11	1
Pat. 2.28	w	61	AML	663	CR	lebendig	663	11	4

Anmerkungen: Alter bei Rezidiv in Jahren; Zeiträume für follow-up und Überleben sind in Tagen angegeben

Abkürzungen: FU/follow up: Nachbeobachtungszeit, PD: Progressive Erkrankung, RD: Refraktäre Erkrankung, CR: Komplette Remission

Tabelle 6.3 Klinische Daten der Patienten mit Rezidiv und Salvagetherapie mit Aza und DLI

Um die Anwendbarkeit unserer Untersuchung als leicht zugänglichen MRD-Parameter zu überprüfen, haben wir mononukleäre Zellen (MNC) aus peripherem Blut (PB) gewonnen. Bei Patienten, denen im Rahmen der Routinediagnostik zusätzlich eine Knochenmarkpunktion (KM) vorgenommen wurde, haben wir diese Proben vergleichend ebenfalls untersucht.

Für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen haben wir vergleichsweise hohe Zellzahlen von  $1 \cdot 10^7$  MNC pro Untersuchung benötigt (Herstellerempfehlung zum *WT1-ProfileQuant® Kit*, ehemals Fa. Ipsogen, Marseille, Frankreich, jetzt Qiagen, Hilden, Deutschland). Zwar konnten wir mit zunehmender Routine und Etablierung des Verfahrens auch bis  $1 \cdot 10^6$  MNC verwertbare Ergebnisse erzielen, bei einigen Patienten, bspw. mit Zytopenie oder umfangreichen und bereits erfolgten klinischen Untersuchungen, standen jedoch nicht mehr genügend Zellen zur Verfügung. Daher fehlen vereinzelt Ergebnisse bei individuellen Patienten an einem oder mehreren Messpunkten. Details zur Durchführung und internen Qualitätskontrolle anhand des Housekeeping-Gens ABL sind im Abschnitt B.5.2 beschrieben.

## ***B.2 Dichtegradientenzentrifugation***

### **B.2.1 Prinzip**

Für unsere Untersuchung werden die zellulären Bestandteile des peripheren Blutes bei einer Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe eines Phasentrennmittels (Lymphoprep®-Medium, Progen, Heidelberg, Deutschland) dichteabhängig aufgetrennt. Dazu wird das Blut auf das Lymphoprep®-Medium aufgeschichtet und anschließend zentrifugiert. Aufgrund ihrer hohen relativen Dichte durchwandern die Erythrozyten und Granulozyten das Medium und lagern sich unterhalb von diesem ab. Die MNC reichern sich aufgrund der ähnlichen Dichte innerhalb des Mediums im Interphasering an. Thrombozyten und Blutplasma befinden sich nach der Zentrifugation oberhalb des Phasentrennmittels.

## B.2.2 Durchführung

Zunächst werden 20 ml Lymphoprep®-Medium in ein Falcon®-Tube (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) vorgelegt. Daraufhin werden 12 bis 24 ml mit EDTA antikoaguliertes PB vorsichtig auf das Medium aufgeschichtet, ohne dass eine Durchmischung der Flüssigkeiten erfolgt. Nun folgt die Zentrifugation mit 1600 Umdrehungen/min (rpm) bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Anschließend wird die Probe aus der Zentrifuge entnommen und die Aufteilung in die verschiedenen, oben genannten Phasen ist sichtbar. Mit Hilfe einer Einmalpipette wird der Interphasering nun abgenommen und in ein neues Falcon®-Tube überführt. Um die gewonnenen MNC von azellulären Bestandteilen zu reinigen erfolgt anschließend ein Waschschrift. Hierfür wird die Zellsuspension mit 35 ml PBS-Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgefüllt und die Zellen werden nochmals mit 1600 rpm bei Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Bei sichtbaren Verunreinigungen durch Erythrozyten kann anschließend fakultativ noch eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt werden. Hierbei wird das Zellpellet in 20 ml Ammoniumchlorid-haltigem Erythrozyten-Lysepuffer (Apotheke Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland) resuspendiert, 5 Minuten inkubiert und anschließend bei 1600 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Durch Diffusion von  $\text{NH}_3$  und  $\text{CO}_2$  durch die Erythrozytenmembran werden diese lysiert, während die Leukozyten aufgrund ihrer höheren osmotischen Resistenz unbeschädigt bleiben. Im Anschluss wird der oben erwähnte Waschschrift mit PBS-Puffer wiederholt. Das gewonnene Zellpellet wird jetzt in einem definierten Volumen PBS-Puffer resuspendiert und die Anzahl der enthaltenen Zellen mittels eines Zellzählautomaten (CASY TT®, Roche Innovatis, Reutlingen, Deutschland) gemessen. Als nächstes werden jeweils  $1 \cdot 10^7$  MNC in ein Eppendorf Safe Lock Tube® (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und abzentrifugiert. Die Zellen werden mit 600  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland), versetzt mit 10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pro ml RLT-Puffer, resuspendiert. In diesem Zustand können die Zellen direkt der RNA-Extraktion zugeführt oder bei  $-20^\circ\text{C}$  für eine Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt gelagert werden.

### **B.3 RNA-Extraktion**

Die RNA der MNC wird mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit*<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Dafür werden die Zellen lysiert, RNasen denaturiert und die RNA von Proteinen und DNA isoliert.

Zunächst werden zu den  $1 \cdot 10^7$  Zellen in 600  $\mu$ l RLT-Puffer 600  $\mu$ l Ethanol 70% hinzugefügt und gut gemischt. Die Suspension wird danach in QIAshredder-Säulen (im o. g. Kit enthalten) gegeben und bei 10.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule in ein neues „*Collection Tube*“ eingesetzt. Im nächsten Schritt werden 650  $\mu$ l RW1-Puffer (im o. g. Kit enthalten) auf die Säule gegeben und eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird abermals verworfen und es werden 500  $\mu$ l RPE-Puffer (im o. g. Kit enthalten) auf die Säule gegeben. Daraufhin wird eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wird auf ein neues „*Collection Tube*“ gesetzt und es werden erneut 500  $\mu$ l RPE-Puffer hinzugefügt. Nun wird für zwei Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wird jetzt auf ein Eppendorf *Tube* gesetzt und es werden 35  $\mu$ l RNase freies Wasser zugegeben. Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm für eine Minute ist die RNA aus der Säule eluiert.

Daraufhin erfolgt die spektralphotometrische Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und Proteinen (NanoDrop<sup>®</sup>, Thermo Scientific, Waltham, USA). Damit wird Reinheit und Konzentration der RNA bestimmt<sup>122</sup>. In der Regel wurde die RNA unmittelbar im Anschluss an die Extraktion der reversen Transkription zugeführt. War dies nicht möglich, so wurde sie bei -80°C gelagert.

### **B.4 Reverse Transkription (RT)**

Für die Synthese der copy-DNA (cDNA) verwenden wir die isolierte Gesamt-RNA der MNC unter Einsatz von zufällig ausgewählten *Primern* (N6 Random Primer, New England Biolabs, Ipswich, USA). Dabei wird jeweils 1  $\mu$ g RNA pro Probe revers transkribiert.

Der zunächst hergestellte Reaktionsansatz enthält pro Probe folgende Reagenzien: 4  $\mu$ l reverse Transkriptase Puffer (Life Technologies, Carlsbad, USA), 2  $\mu$ l  $MgCl_2$  (50 mM), 2  $\mu$ l dNTPs zu jeweils 10 mM (Qiagen, Hilden, Deutschland), 2  $\mu$ l DTT 0,1 mM

(Life Technologies, Carlsbad, USA), 0,5 µl RNase-Inhibitor RNasin® (Promega, Madison, USA), 5 µl N6 Random Primer (100 µM) und 0,5 µl SuperScript II® reverse Transkriptase (Life Technologies, Carlsbad, USA).

Zunächst wird die RNA für 10 Minuten bei 70°C inkubiert (Mastercycler gradient®, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und danach auf Eis gelagert. Nun wird der oben beschriebene Reaktionsansatz zur RNA hinzugefügt. Es folgt die Inkubation für 10 Minuten bei 20°C, für 45 Minuten bei 42°C und für 3 Minuten bei 99°C. Im Anschluss wird die cDNA auf Eis gekühlt und mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl pro Probe verdünnt. Die Proben werden jetzt bei -20°C gelagert oder direkt der qRT-PCR zugeführt.

## **B.5 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)**

### **B.5.1 Prinzip**

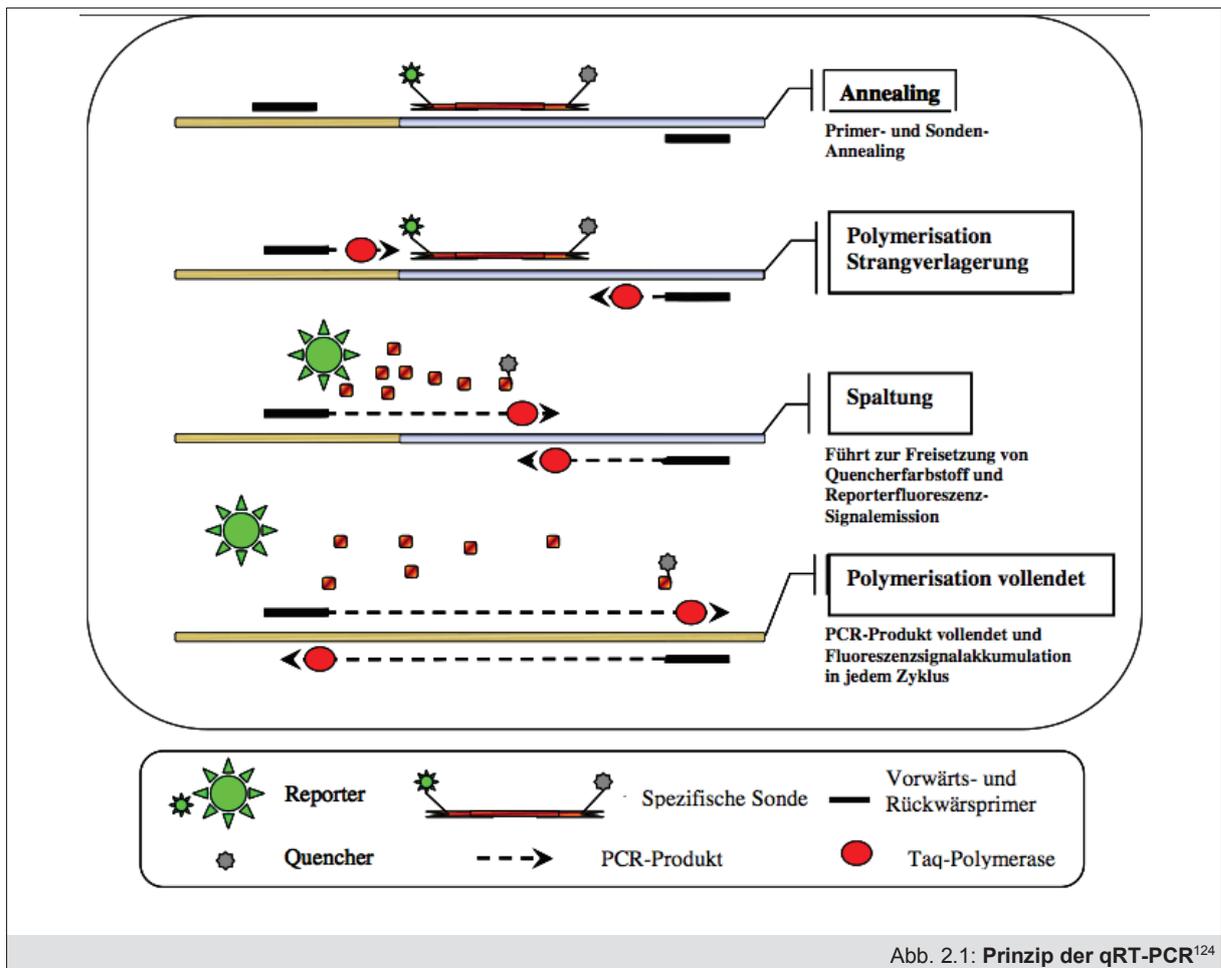
Zur absoluten Quantifizierung der WT1-Gentranskripte in den jeweiligen Proben führen wir eine quantitative *real-time* PCR mit spezifischen Doppelfarbstoff-Hydrolyse-Sonden auf einem LightCycler® Instrument (Roche, Basel, Schweiz) durch. Die spezifischen Sonden und *Primer* entstammen dem kommerziellen *WT1-ProfileQuant® Kit* (ehemals Fa. Ipsogen, Marseille, Frankreich, jetzt Qiagen, Hilden, Deutschland). Im Gegensatz zur gewöhnlichen *real-time* PCR mittels DNA-Fluoreszenz Farbstoff erlauben die spezifischen Sonden eine präzise Messung des gewünschten PCR-Amplifikats und verringern so das Risiko einer Kontamination durch unspezifisch amplifizierte PCR-Produkte.

An die Sonden sind dafür zwei Fluoreszenzfarbstoffe gebunden. Am 5'-Ende befindet sich 6-FAM-phosphoramidit (FAM), der *reporter*. Das 3'-Ende ist mit dem Rhodaminderivat (TAMRA), dem *quencher*, verbunden. Während des „*Annealing-Schritts*“ des PCR-Zyklus, also der Temperatur- und Zeitspanne, während der die *Primer* an die zu diesem Zeitpunkt in Einzelsträngen vorliegenden DNA binden, hybridisiert die Sonde an eine komplementäre Zielsequenz innerhalb des PCR-Produkts zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer. Die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe führt zu einer Fluoreszenzauslöschung vom Typ des Förster-Energieresonanztransfers (FRET)<sup>123</sup>. Es wird zu diesem Zeitpunkt also keine Lichtemission des *FAM-reporters* detektiert.

Während der Polymerisation des DNA-Stranges spaltet die verwendete TaqMan®-Polymerase (Roche, Basel, Schweiz) aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleasefähigkeit die Sonde beginnend am 5'-Ende. Der *FAM-reporter* wird freigesetzt und entfernt sich vom *TAMRA-quencher*. Da die Effizienz des FRET mit der sechsten Potenz des Abstandes von *reporter* und *quencher* abnimmt, kommt es zu einer starken Fluoreszenzzunahme aus dem reporter, welche vom System detektiert wird. Dieser Mechanismus findet während eines jeden PCR-Zyklus statt. Unspezifische Amplifikationen werden aufgrund der fehlenden Bindung der Sonden nicht detektiert. Somit ist die Zunahme des Fluoreszenzsignals während der PCR-Zyklen proportional zur Amplifikation der Zielsequenz. Abbildung 2.1 verdeutlicht den Mechanismus.

Der Zyklus, ab dem die gemessene Fluoreszenz ein definiertes Niveau im Sinne eines Hintergrundsignals übersteigt, wird als *cycle of threshold* (Ct) bezeichnet. Aus dem Ct-Wert lässt sich die in der Probe ursprünglich enthaltene Ausgangsmenge der Zielsequenz berechnen. Zur Vergleichbarkeit unterschiedlicher Proben und zur Qualitätskontrolle findet eine Normalisierung über das Referenzgen ABL statt. Pro Ansatz werden somit zwei verschiedene qRT-PCR durchgeführt. Störfaktoren wie unterschiedliche Zellmengen und Effizienz der reversen Transkription werden folglich weitgehend ausgeschaltet.

Zur absoluten Quantifizierung der Ergebnisse wird eine Standardkurve aus Kontrollen mit bekannten Konzentrationen erzeugt. Dafür sind WT1- und ABL-DNA-Plasmide in bekannter Verdünnung im Kit enthalten. Das Resultat wird somit absolut und bezogen auf die endogene ABL-Kontrolle ausgedrückt, als x WT1-Kopien pro 10000 ABL-Kopien (normalisierte Kopienanzahl, NCN). In Übereinstimmung mit bisherigen Publikationen<sup>110</sup> (siehe Kapitel A.2) sehen wir Werte von >50 WT1 NCN in PB als WT1-positiv an. Die Vorteile dieses Ansatzes sind zahlreich, zum einen hat sich das verwendete Assay mit den u. g. *Primer*- und SONDENSEQUENZEN im Vergleich mit neun weiteren Assay als überlegen in Bezug auf Sensitivität und Spezifität herausgestellt und ist so vom *European Leukemia Network* standardisiert, zum anderen ist es kommerziell erhältlich und des Weiteren ist über PB als Ausgangsmaterial eine vergleichsweise häufige und wenig belastende Materialgewinnung zum engmaschigen Monitoring möglich.



## B.5.2 Durchführung und Qualitätskontrolle

In einem LightCycler® Lauf testen wir 5 Proben, jeweils im Doppelansatz für WT1 und ABL. Zusätzlich werden in einem Lauf 5 WT1-Standards, 3 ABL-Standards und 2 H<sub>2</sub>O-Proben untersucht. Folgende *Primer* und Sonde werden verwendet:

Vorwärtsprimer: 5'-CGCTATTCGCAATCAGGGTTA-3'

Rückwärtsprimer: 5'-GGCGTGTGACCGTAGCT-3'

Sonde: 5'-FAM-AGCACGGTCACCTTCGACGGGA-TAMRA-3'

Zunächst wird der PCR-Reaktionsansatz wie folgt hergestellt: 4 µl TaqMan Master® Polymerase, 0,8 µl Primer- und Sondenmischung und 10,2 µl H<sub>2</sub>O. Dieser Reaktionsansatz wird vorsichtig in die eisgekühlten und lichtgeschützten LightCycler®-Kapillaren pipettiert. Daraufhin werden pro Kapillare 5 µl cDNA- bzw. Plasmidlösung hinzugefügt. Die Kapillaren werden im Folgenden in Zentrifugenadaptern bei 2.000 rpm für 10 Sekunden zentrifugiert, so dass sich der Reaktionsansatz und die DNA komplett in der Kapillare befinden. Nun wird das

LightCycler® Karussell mit den Kapillaren bestückt und das Karussell in den LightCycler® eingesetzt. Das PCR-Programm läuft wie folgt ab: Vor-Inkubation von 10 Minuten bei 95°C, 50 Zyklen Denaturierung von 10 Sekunden bei 95°C und Annealing sowie Polymerisation von einer Minute bei 60°C, Beenden bei 45°C für eine Minute. Während der 50 Annealing- und Polymerisationszyklen wird die Fluoreszenz in zwei Kanälen bei 530nm und 640nm von der LightCycler® II Software detektiert und die Ct-Werte analysiert. Die Standardkurve wird daraufhin ebenfalls automatisch berechnet. Bei Darstellung der Ct-Werte gegenüber der Log<sub>10</sub>-Kopienanzahl ergibt sich eine Standardkurve von  $y = -3,32x + 39,84$ , Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 1$ .

Die von uns genutzten Qualitätskontrolle orientiert sich an den vom Kit-Hersteller angegebenen Kriterien, wendet im Einzelnen jedoch strengere Werte an. Als Ergebnis der absoluten Quantifizierung werden nur Standardkurven mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 > 0,98$  akzeptiert. Alle Standardverdünnungen müssen detektiert sein. Die Variation der Ct-Werte innerhalb der Doppelansätze muss  $< 1$  Zyklus sein. Geringe Zellzahl, mangelhafte RNA-Qualität oder Fehler während der qRT-PCR resultieren in geringer Kopienanzahl der endogenen ABL-Kontrolle. Ergebnisse mit  $< 4246$  ABL-Kopien werden verworfen, ebenso wie Läufe mit positiven H<sub>2</sub>O-Kontrollen.

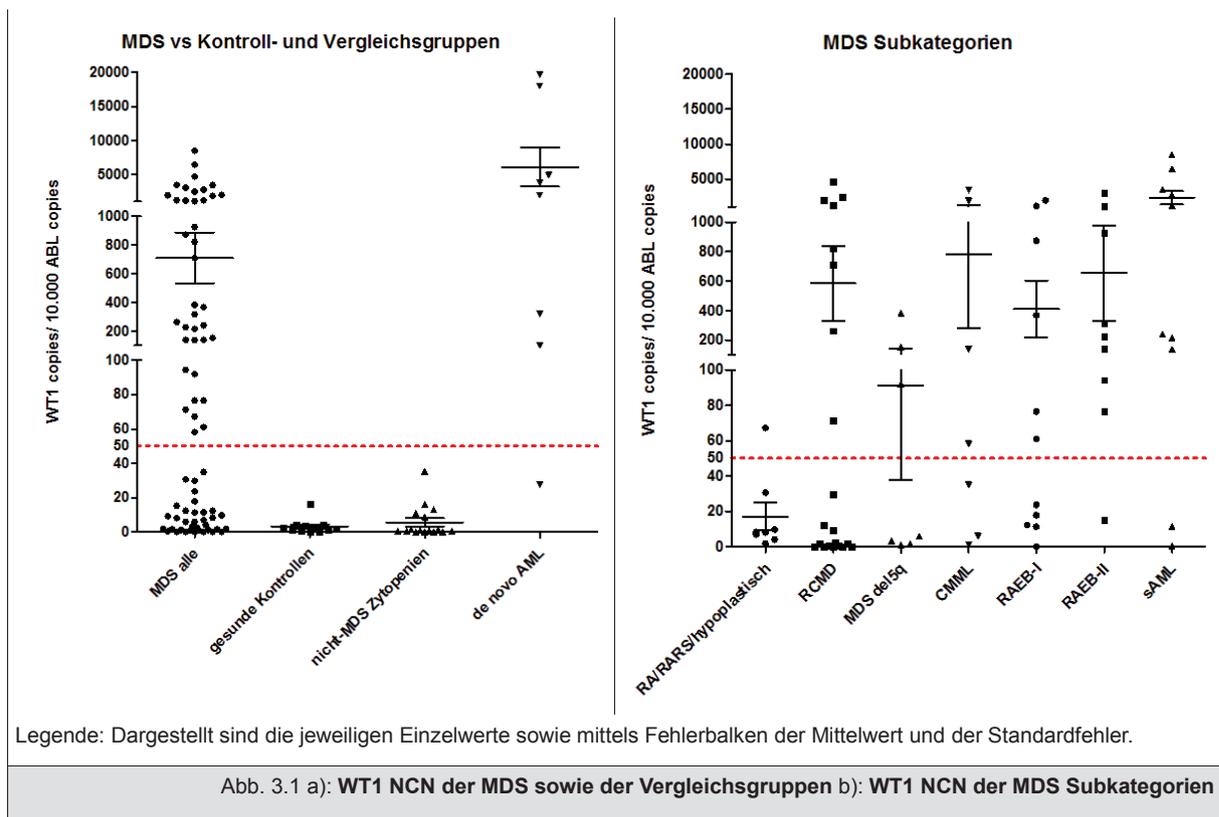
### **B.5.3 Statistische Analyse und Auswertung**

Die statistische Analyse sowie die grafischen Auswertungen und Darstellung erfolgten mit der Software GraphPad Prism 5.0.1. Es wurden Mittelwert-, Median- und Standardabweichungen berechnet. Die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse auf ihre Unterschiedlichkeit getestet. Die Kontingenzanalysen der Vierfeldertafeln erfolgte mittels *Fisher's exact test*. Die Testung auf Unterschiedlichkeit der Mittelwerte der Patienten- und Vergleichsgruppen erfolgte je nach Stichprobenumfang mittels *Mann Whitney U-Test* oder mittels *t-Test*. Bei allen statistischen Auswertungen wurde ein p-Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

## C Ergebnisse

### C.1 Quantitative WT1-Gentranskript Messung bei Patienten mit neu diagnostiziertem MDS

Um die Verteilung der WT1-Expression bei MDS-Patienten und somit die Anwendbarkeit als MRD-Marker zu evaluieren, untersuchten wir als erstes die Expression des WT1-Gentranskript bei 73 Patienten mit neu diagnostiziertem MDS. Als Kontroll- und Vergleichsgruppen standen darüber hinaus 12 gesunde Probanden (8 männlich, 4 weiblich, medianes Alter 22 Jahre), 16 Patienten mit Zytopenien auf dem Boden anderer Erkrankungen (ICUS: 7, aplastische Anämie: 2, toxischer Knochenmarkschaden: 2, ITP: 2, zyklische Neutropenie: 1, renale Anämie: 1, *Anemia of chronic disease*: 1) und 8 Patienten mit de novo AML zur Verfügung. Abb. 8 verdeutlicht die quantitative Verteilung der Messwerte in den einzelnen MDS-Subkategorien nach WHO und den Kontrollgruppen.



Im Folgenden beschreibe ich zur Einordnung zunächst die Ergebnisse der verschiedenen Kontrollgruppen, bevor ich mich detailliert mit den Ergebnissen der MDS-Gruppe auseinandersetze. In der gesunden Kontrollgruppe (n=12) gibt es

keine WT1-positiven Probanden. Der Mittelwert der Expression liegt bei 3,25 WT1-Kopien/10000 ABL-Kopien, die Standardabweichung bei 4,28. Ebenso sind in der Gruppe der Patienten mit nicht-MDS Zytopenien (n=16) sämtliche Messwerte unterhalb des Schwellenwertes von 50 WT1-Kopien/10000 ABL-Kopien (Mittelwert  $5,62 \pm 9,57$ ). Mit einem Mittelwert von  $6097 \pm 8089$  WT1 NCN sind in der Gruppe der de novo AML-Patienten (n=8) die höchsten Messwerte zu finden. Lediglich ein Patient (12,5%) ist hier als WT1-negativ einzustufen.

Betrachtet man die gesamte Gruppe der MDS-Patienten (n=73), so liegen 38 Patienten (52,1%) oberhalb des Grenzwertes und sind als WT1-positiv zu bewerten. Die WT1-Expression der Gesamtgruppe liegt im Mittel bei  $702,9 \pm 1540$  WT1 NCN.

In den jeweiligen Subkategorien gemäß WHO-Klassifikation 2008 ergibt sich folgendes Bild: In der kombinierten Gruppe RA/RARS/hypoplastisches MDS (n=8) ist lediglich ein Patient (12,5%) WT1-positiv. Der Mittelwert beträgt  $17,1 \pm 22$  WT1 NCN. In der Kategorie RCMD (n=21) sind 8 Patienten (38,1%) WT1-positiv. Der Mittelwert beträgt  $584,3 \pm 1173$  WT1 NCN. Von den Patienten mit MDS del(5q) (n=7) sind 3 Patienten (42,9%) WT1-positiv, der Mittelwert liegt bei  $91,39 \pm 141,6$  WT1 NCN. Bei den Patienten mit CMML (n=7) beträgt der Anteil an WT1-positiven Patienten 4 bzw. 57,1% bei einem Mittelwert von  $784,8 \pm 1340$  WT1 NCN. In der Gruppe der Patienten mit RAEB I (n=11) sind 6 Patienten (54,6%) WT1-positiv, der Mittelwert beträgt  $410,4 \pm 638,7$  WT1 NCN). In der Kategorie RAEB II (n=9) sind 8 Patienten (88,9%) WT1-positiv, der Mittelwert liegt bei  $654,5 \pm 967,5$  WT1 NCN. Bei den Patienten mit sAML (n=10) beträgt der Mittelwert  $2294 \pm 3020$  WT1 NCN, 8 (80%) Patienten sind WT1-positiv. Mittels Varianzanalyse über alle Subtypen findet sich ein mit  $p < 0,0001$  hochsignifikanter Unterschied, die Varianz der WT1 NCN zwischen den Gruppen der verschiedenen MDS-Subtypen ist also größer als die Varianz innerhalb der Gruppen. Vergleicht man die Gesamtgruppe der MDS-Patienten mit den gesunden Kontrollen in einer Kontingenztafel (Tabelle 3.1) unter Verwendung des Merkmals WT1-positiv oder WT1-negativ mittels des *Fisher's exact test* so ergibt sich mit  $p = 0,0004$  ein signifikanter Unterschied. Beim Vergleich der absoluten Messwerte mittels *Mann Whitney Test* ist dieser mit  $p = 0,0006$  jedoch signifikant.

Merkmal	MDS alle	Gesunde Kontrollen	Total
WT1 >50 NCN	38	0	38
WT1 <50 NCN	35	12	47
Total	73	12	85
Fisher's exact test: p<0,0004			
Tabelle 3.1: Kontingenztafel WT1-Positivität bei MDS vs. Gesunde Kontrollen			

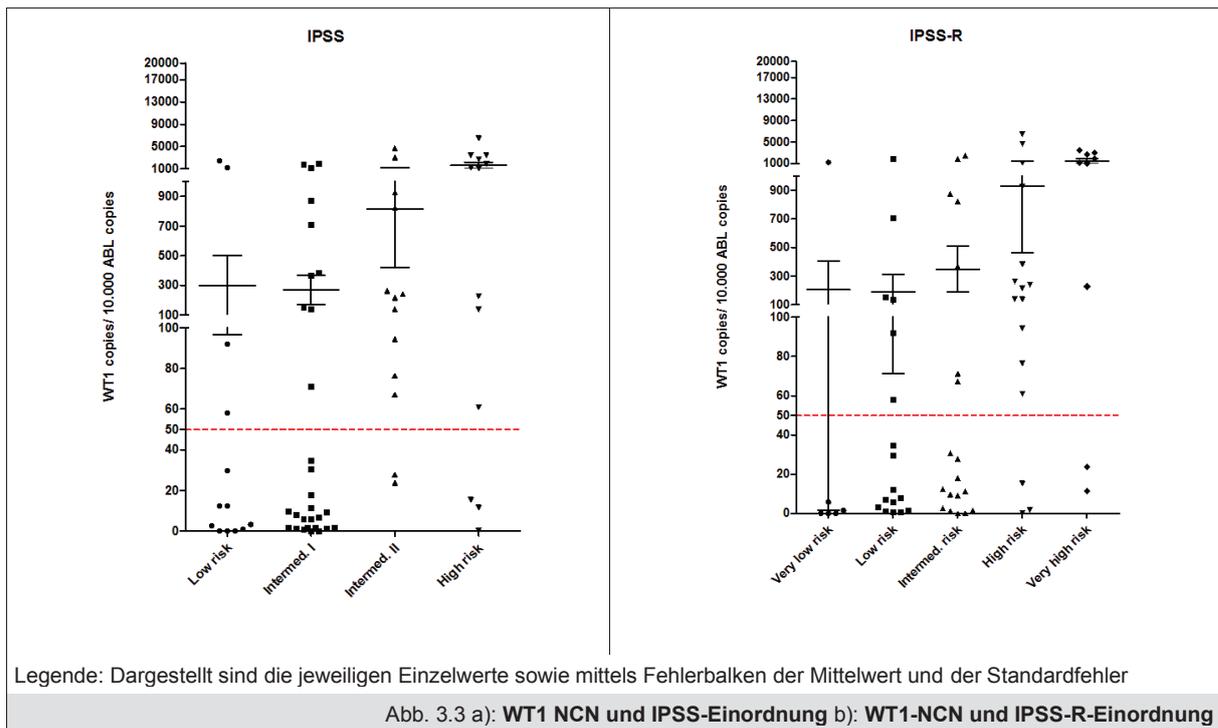
Vergleicht man die Gesamtgruppe der MDS-Patienten mit den nicht-MDS Zytopenien in einer Kontingenztafel (Tabelle 3.2) unter Verwendung des Merkmals WT1-positiv oder WT1-negativ mittels des *Fisher's exact test* so ergibt sich mit  $p < 0,0001$  ein signifikanter Unterschied. Beim Vergleich der absoluten Messwerte mittels *Mann Whitney Test* ergibt sich mit  $p = 0,0001$  ebenfalls ein signifikanter Unterschied.

Merkmal	MDS alle	nicht-MDS Zytopenie	Total
WT1 >50 NCN	38	0	38
WT1 <50 NCN	35	16	51
Total	73	16	89
Fisher's exact test: p<0,0001			
Tabelle 3.2: Kontingenztafel WT1-Positivität bei MDS vs. nicht-MDS Zytopenien			

Vergleicht man die Gesamtgruppe der MDS-Patienten mit den Patienten mit de novo AML in einer Kontingenztafel (Tabelle 3.3) unter Verwendung des Merkmals WT1-positiv oder WT1-negativ mittels des *Fisher's exact test* so ergibt sich mit  $p = 0,07$  zwar kein signifikanter Unterschied, beim Vergleich der absoluten Messwerte mittels *Mann Whitney Test* ergibt sich mit  $p = 0,003$  jedoch ein signifikanter Unterschied.

Merkmal	MDS alle	de novo AML	Total
WT1 >50 NCN	38	7	45
WT1 <50 NCN	35	1	36
Total	73	8	81
Fisher's exact test: p<0,07			
Tabelle 3.3 Kontingenztafel WT1-Positivität MDS vs. AML			

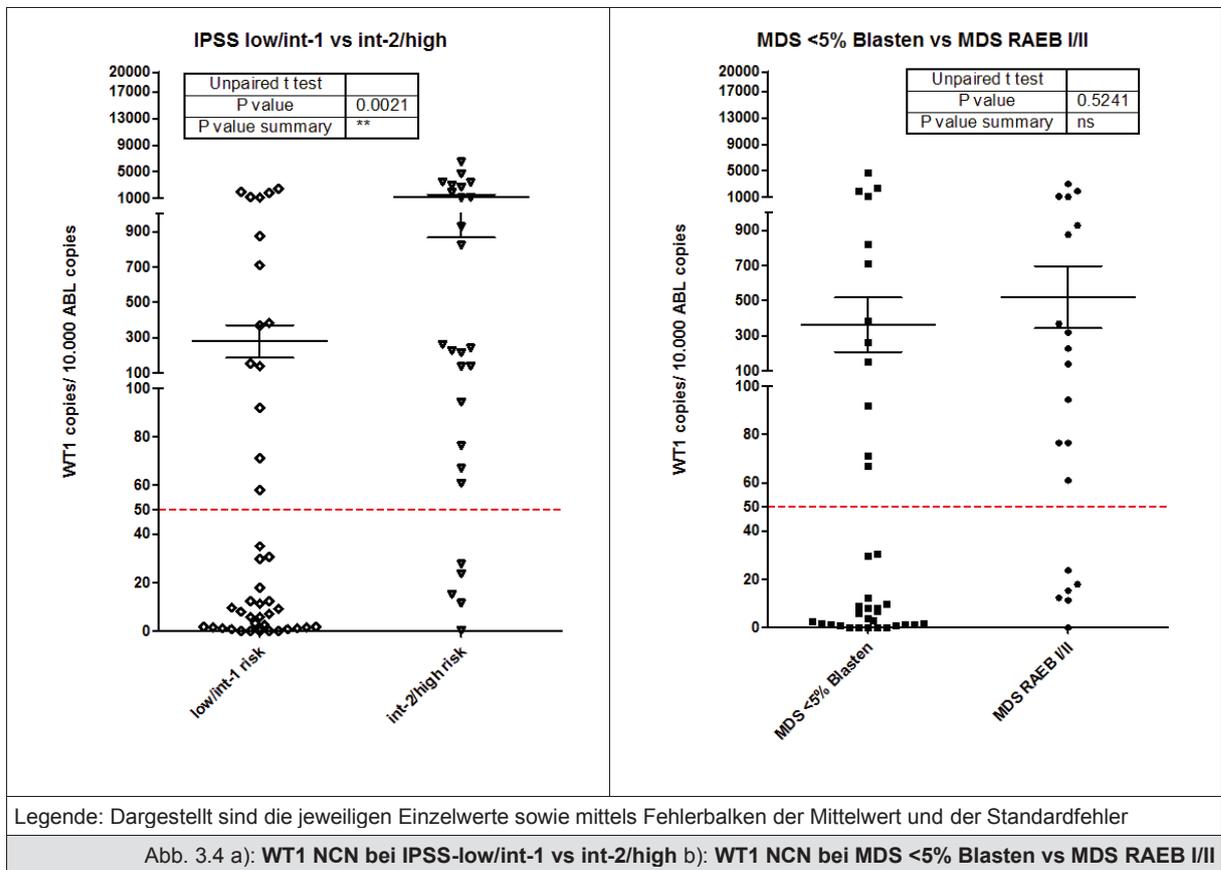
Legt man als Einteilung die Risikokategorien des IPSS bzw. des IPSS-R zugrunde, so zeigt sich die in Abbildung 3.3 dargestellte Verteilung.



In beiden Prognosesystemen ist eine positive Korrelation der mittleren WT1 NCN mit ansteigender Risikokategorie ersichtlich. Die IPSS-Gruppen *low risk* und *intermediate I* sowie *intermediate II* und *high risk* haben wir in Abbildung 3.4 a) zusammengefasst, der Mittelwert der kombinierten Gruppe *low risk* und *intermediate I* beträgt hier  $278 \pm 594$  WT1 NCN, in der kombinierten Gruppe *intermediate II* und *high risk* beträgt der Mittelwert  $1205 \pm 1725$  WT1 NCN. Der Unterschied ist signifikant ( $p=0,0012$ ). Betrachtet man die Hochrisikogruppe mit der Eingruppierung im IPSS bei *intermediate II* und *high risk* isoliert, so sind hier 21 bzw. 80,8% ( $n=26$ ) der Patienten WT1 positiv, in der Niedrigrisikogruppe sind nur 14 bzw. 33,3% ( $n=42$ ). Während die Höhe der WT1-Expression demnach signifikant mit der prognostischen Einstufung zusammen hängt, können wir einen Zusammenhang mit der Blastenzahl im Knochenmark nicht nachweisen. Dafür haben wir, wie in Abbildung 3.4 b) dargestellt, die MDS Subkategorien RA/RARS/hypoplastisch, RCMD und  $\text{del}(5q)$  sowie RAEB I/II zusammengefasst und einander gegenübergestellt ( $p=0,5241$ ).

Die Grundvoraussetzung für eine Anwendbarkeit der WT1-Messung als MRD-Marker, nämlich der Nachweis einer pathologischen Überexpression, findet sich also mit 52% der Patienten bei einer Mehrheit der Patienten mit MDS und er erhöht sich bei

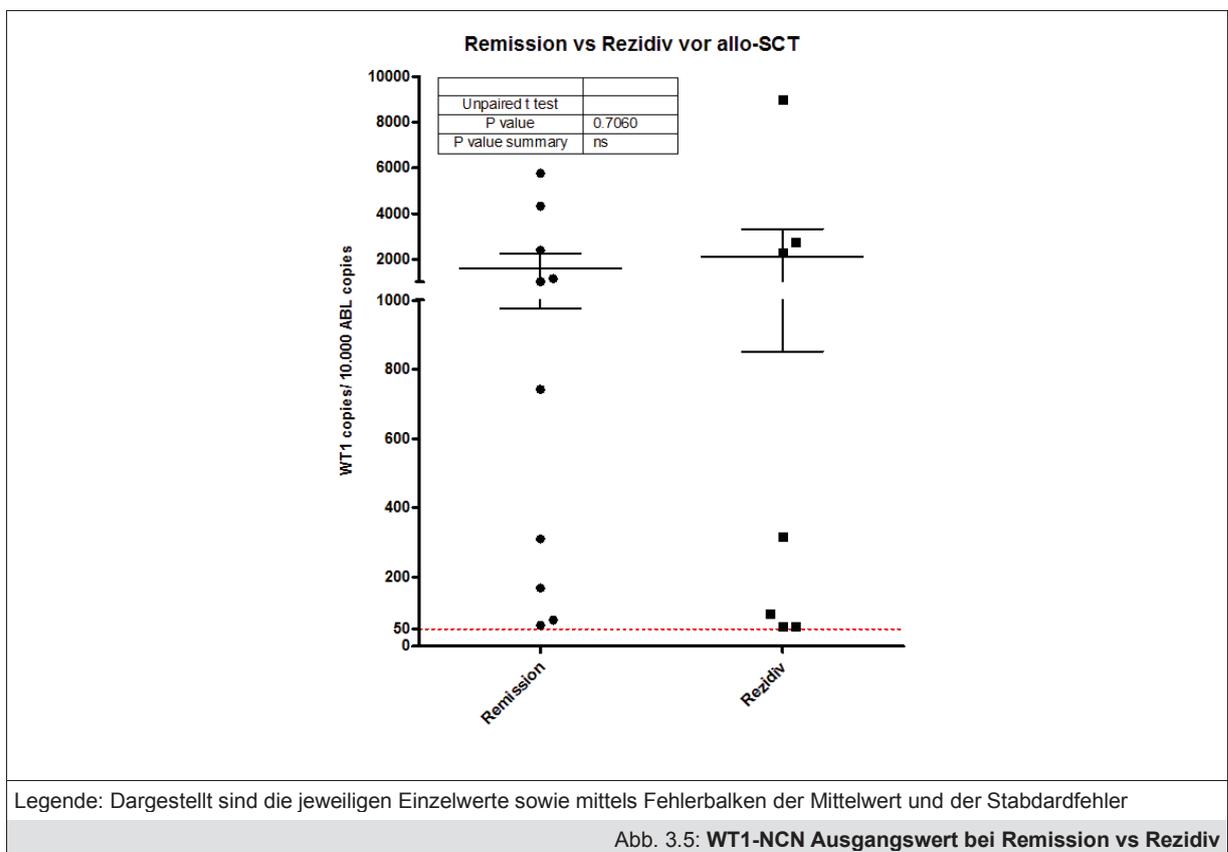
isolierter Betrachtung der für eine allo-SZT relevanten Zielgruppe der Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung und entsprechend schlechter Prognose auf 80% der Patienten.



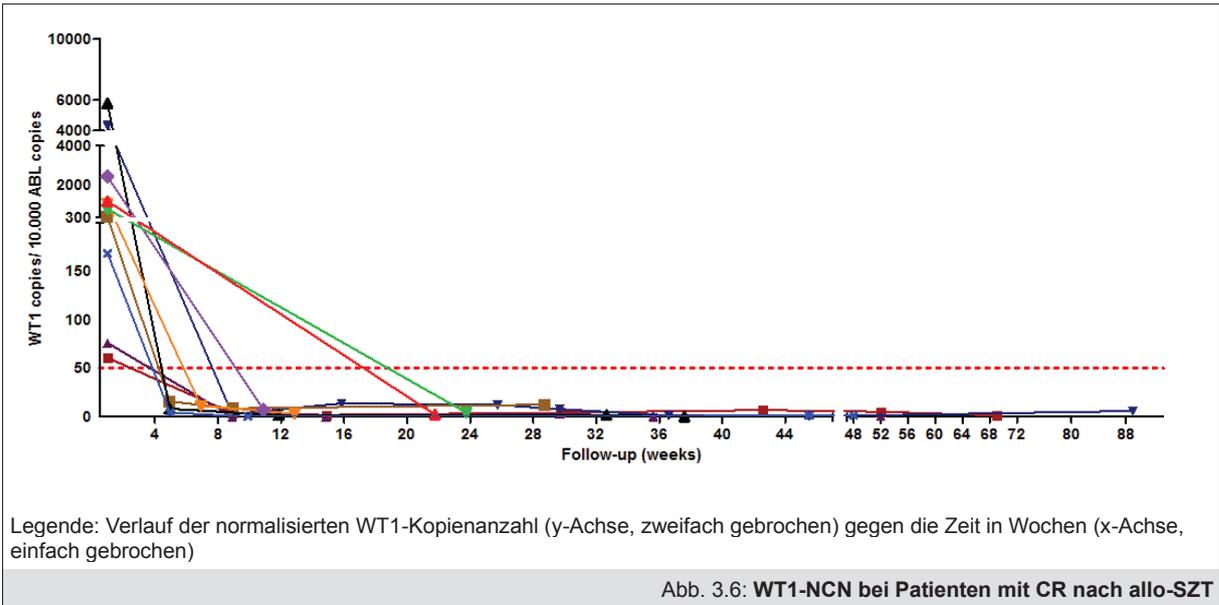
## C.2 Longitudinale Messung des WT1-Gentranskript Messung bei Patienten mit sAML und MDS nach allogener Blutstammzelltransplantation

Wie in Abschnitt C.1 gezeigt, ist der Einsatz von WT1 als MRD-Marker nach einer allogenen Transplantation bei einer relevanten Anzahl von MDS-Patienten prinzipiell möglich. Um dieses auch in einer realen Kohorte zu überprüfen, untersuchten wir den zeitlichen Verlauf der WT1-Expression bei 17 Patienten mit MDS und sAML, welche allogent transplantiert wurden. Die Nachbeobachtungszeit beträgt im Median 28 Wochen (Spannweite: 4-82 Wochen). Insgesamt wurden nach der Transplantation 57 Proben untersucht, was einem Mittelwert von 3 Proben (Spannweite: 1-14 Proben) pro Patienten entspricht. Alle 17 Patienten sind zum letzten Messzeitpunkt vor allo-SZT WT1-positiv und 16 der 17 Patienten (94%) erhielten die Transplantation

im Zustand der aktiven Erkrankung. Der Mittelwert der WT1 NCN vor allo-SZT beträgt  $1621,8 \pm 2417,4$  WT1 NCN. Nach der Transplantation blieben 10 Patienten (59%) über einen durchschnittlichen Beobachtungszeitraum von 53 Wochen (Spannweite 14 – 87 Wochen) in kompletter Remission. Die übrigen 7 Patienten (41%) erlitten ein hämatologisches oder molekulares Rezidiv der Erkrankung im Median 16,5 Wochen (Spannweite 4-74 Wochen) nach der Transplantation. Wie in Abbildung 11 dargestellt, unterscheiden sich die WT1 NCN Ausgangswerte vor Transplantation zwischen den beiden Patientengruppen mit Remission im Verlauf oder Rezidiv im Verlauf dabei nicht ( $p=0,7060$ ).

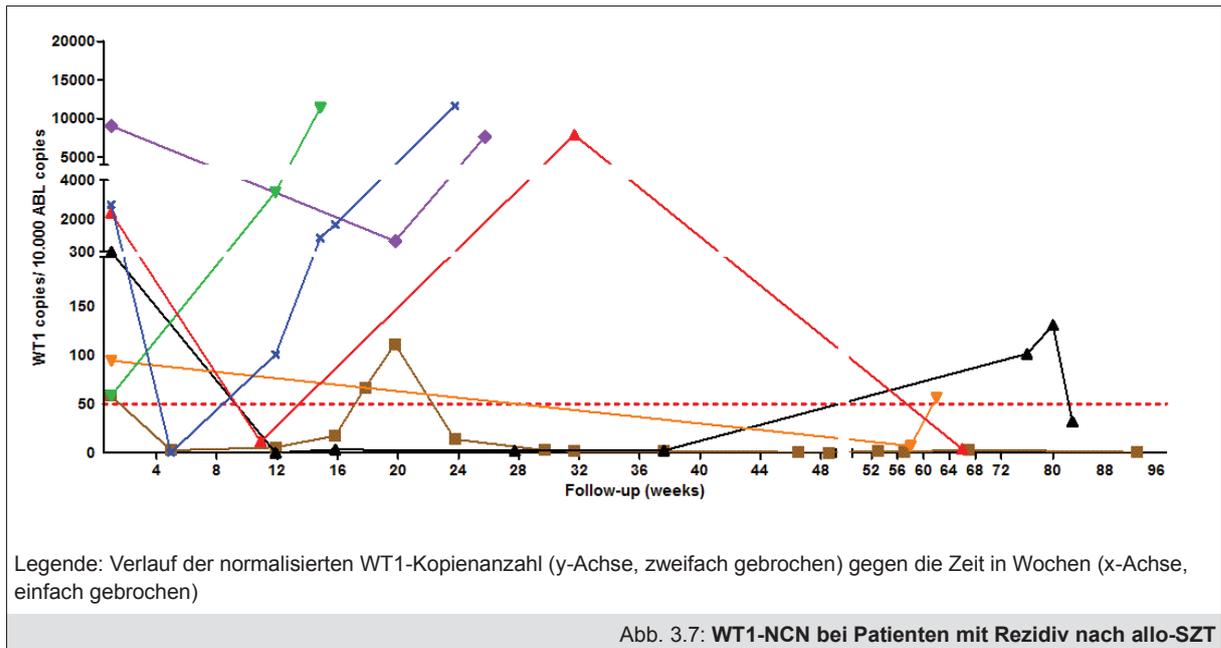


Im zeitlichen Verlauf zeigen alle 10 Patienten in CR einen raschen Abfall der WT1 NCN unter den oben angegebenen Schwellenwert und eine Persistenz der WT1-Werte unterhalb des Grenzwertes zu allen Messzeitpunkten (Abbildung 3.6), womit sich bei 0 falsch positiven und 10 richtig negativen Patienten eine Spezifität von 100% ergibt. Es zeigt sich also starke und stabile Korrelation zwischen der WT1-Negativität und der anhaltenden Remission der Patienten.



Von den 7 Patienten mit Rezidiv zeigen 2 (29%) eine permanente Persistenz der WT1 NCN über dem Schwellenwert, während 5 Patienten (71%) nach der Transplantation zunächst WT1-negativ werden, im weiteren Verlauf jedoch wieder eine Expression über dem Grenzwert aufweisen. Alle 7 Patienten (100%) zeigen vor oder zum Zeitpunkt des Rezidivs mindestens einen positiven WT1-Wert. Bei 2 der 5 Patienten mit WT1-Konversion ging diese dem Rezidivnachweis um 2 Wochen voraus, bei den anderen 3 Patienten ist aufgrund von fehlenden Daten oder zu grobmaschigen Messungen keine sinnvolle dementsprechende Aussage möglich. Abbildung 3.7 verdeutlicht diesen Verlauf graphisch.

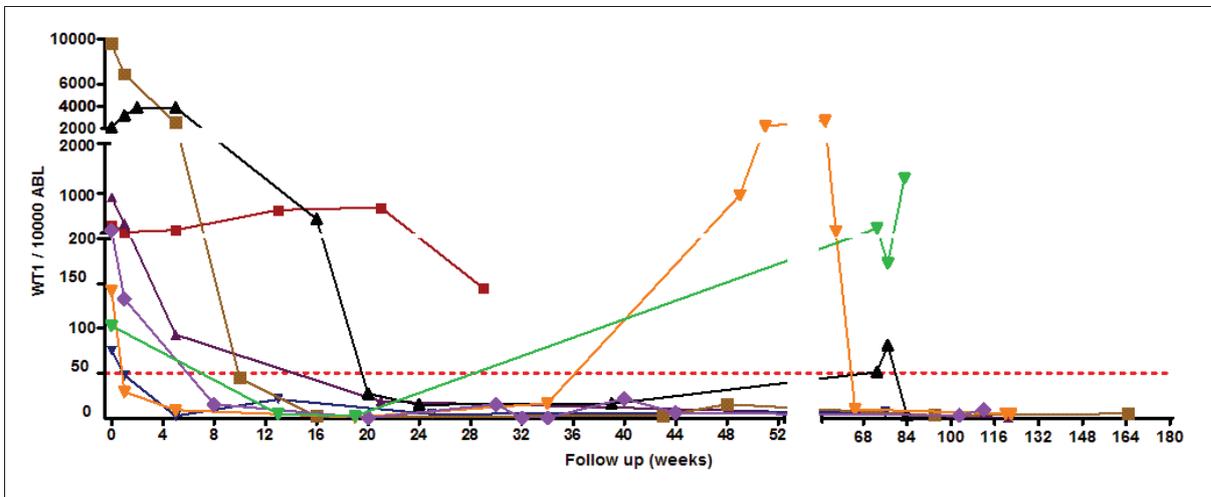
Auch hier zeigt sich prinzipiell die stabile Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und WT1-Expressionsniveau, zum Rezidivzeitpunkt ergibt sich eine Sensitivität von 100%.



### ***C.3 Quantitative WT1-Gentranskript Messung bei Patienten mit Rezidiv einer AML oder MDS während einer Therapie mit Azacitidine und Spenderlymphozyten***

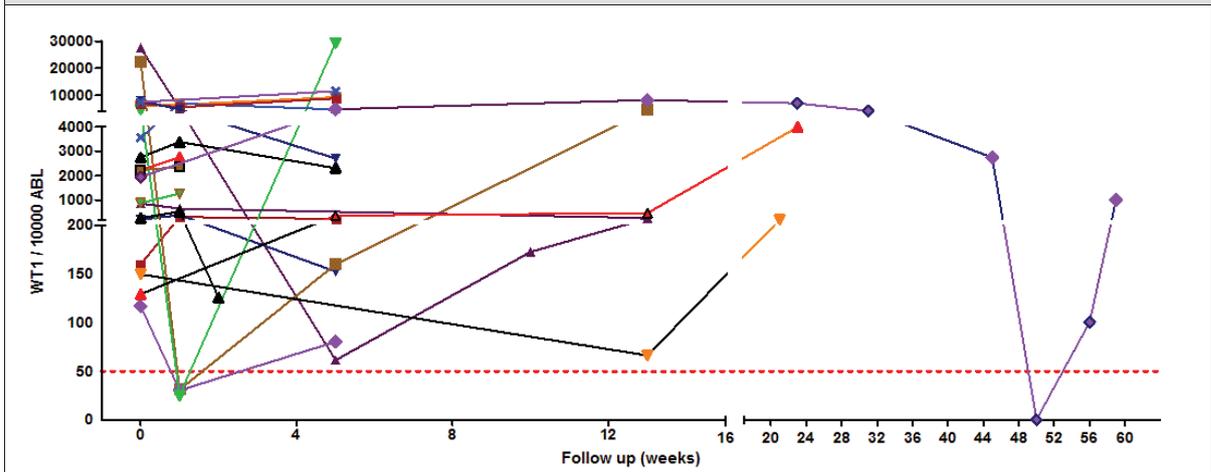
Wir konnten bei 28 Patienten mit MDS und AML, welche nach allogener Stammzelltransplantation ein Rezidiv nach durchschnittlich 47 Wochen (Spannweite 4 – 211 Wochen) zeigten und von denen 15 im Rahmen einer klinischen Phase-II Studie mit Azacitidine und Spenderlymphozyten behandelt wurden (AZARELA-Studie)<sup>90</sup>, die WT1-Expression im zeitlichen Verlauf messen, um die Anwendbarkeit als MRD-Marker zur Steuerung dieser Salvage-Therapie zu überprüfen. Die Kombination aus Aza und DLI war für alle Patienten die erste Behandlung des Rezidives. Bei 25 der 28 (89,3%) Patienten lag ein manifestes hämatologisches Rezidiv vor, die übrigen 3 Patienten zeigten diagnostische Hinweise eines anstehenden Rezidives wie einen gemischten Chimärismus oder einen Anstieg molekularer Erkrankungsmarker. Insgesamt erhielten die Patienten im Median 3,5 Zyklen Aza (Spannweite 1 - 11 Zyklen) und 20 Patienten (71,4%) erhielten im Median 1,5 DLI (Spannweite 1 - 4 DLI). Infolge dieser Therapie erreichten 8 Patienten (28,6%) eine komplette Remission, die übrigen 20 Patienten (71,4%) zeigten kein dauerhaftes Ansprechen auf diese Therapie. In der Gruppe der Patienten, die eine erneute Remission erreichten, beträgt die Nachbeobachtungszeit im Median 97 (29 –

164) Wochen, in der Gruppe der Patienten, die nicht ansprechen, im Median 5 (1 – 58) Wochen. Voraussetzung für den Einschluss in die hier untersuchte Patientenkohorte ist eine positiver WT1 NCN zum Zeitpunkt des Rezidivs, in der Gruppe der Patienten mit CR liegt der WT1 NCN im Durchschnitt bei  $1688 \pm 3241$ , in der Gruppe der Patienten ohne CR bei  $4923 \pm 7333$ . Die Unterschiede sind nicht signifikant ( $p=0,2442$ ). Somit lässt sich in unserer Patientengruppe anhand der Höhe des WT1-Wertes keine Voraussage ableiten, welcher Patient auf die Therapie ansprechen wird. Die Abbildungen 3.8 und 3.9 zeigen den zeitlichen Verlauf der WT1 NCN in der Gruppe der Patienten mit Erreichen einer CR (Abb. 3.8) und ohne dauerhaftes Ansprechen (Abb. 3.9).



Legende: Verlauf der normalisierten WT1-Kopienanzahl (y-Achse, zweifach gebrochen) gegen die Zeit in Wochen (x-Achse, einfach gebrochen)

Abb. 3.8: WT1-NCN bei Patienten mit CR unter Rezidivtherapie mit Aza und DLI



Legende: Verlauf der normalisierten WT1-Kopienanzahl (y-Achse, zweifach gebrochen) gegen die Zeit in Wochen (x-Achse, einfach gebrochen)

Abb. 3.9: WT1-NCN bei Patienten mit Rezidiv unter Rezidivtherapie mit Aza und DLI

Wie aus Abbildung 3.8 ersichtlich, zeigen 7 der 8 Patienten (87,5%) mit CR ein rasches Absinken der WT1 NCN bis zur maximal 19. Woche nach Therapiebeginn unter den Schwellenwert von 50. Bei 4 von diesen 7 Patienten bleibt der WT1-Wert im Verlauf kontinuierlich unterhalb des Cut-offs. Lediglich ein Patient zeigt eine persistierende WT1-Gentranskript Expression auf einem Niveau über dem Grenzwert. Im zeitlichen Verlauf kommt es bei 3 der initial 7 negativ gewordenen Patienten (37,5%) zum erneuten Anstieg der WT1 NCN in den positiven Bereich, wobei jedoch 2 dieser Patienten im Verlauf wieder unter den Schwellenwert absinken. Der eine Patient konvertierte dabei (schwarze Kurve) spontan wieder in den negativen Bereich, möglicherweise als Folge eines Immuneffektes im Rahmen der GvHD. Der andere Patient (gelbe Kurve) erhielt erneut Azacitidine und erreichte eine erneute Remission. Lediglich ein Patient zeigt nach der Konversion bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes anhaltend positive Werte (grüne Kurve). Dieser Patient erlitt nach Erreichen einer CR einen erneuten Progress und verstarb letztlich an der Grunderkrankung.

Bei den Patienten, welche keine CR erreichen, ergibt sich wie aus Abbildung 15 ersichtlich ein anderes Bild. Hier zeigen lediglich 3 Patienten (15%) einen passageren Abfall des Expressionsniveaus unter den Schwellenwert. Keiner dieser Patienten persistiert mit der WT1 NCN unter dem Schwellenwert, bei allen drei zeigt sich bereits bei der nächsten Messung 4 Wochen später ein Wiederanstieg in den WT1-positiven Bereich. Die übrigen 17 Patienten (85%) bleiben primär WT1-positiv, so dass am Ende des jeweiligen Beobachtungszeitraumes alle Patienten dieser Gruppe WT1-positiv sind.

## **D Diskussion**

In dieser Arbeit untersuchten wir die Anwendbarkeit eines standardisierten, ELN-zertifizierten kommerziell erhältlichen Assay zur Bestimmung der WT1-Genexpression im peripheren Blut als Marker zur Bestimmung der minimalen Resterkrankung bei Patienten mit MDS und AML nach einer allogenen Blutstammzelltransplantation. Um die Verteilung des Markers in Kombination mit weiteren klinischen Charakteristika zu zeigen, untersuchten wir zunächst Patienten mit neu diagnostiziertem und unbehandeltem MDS sowie Vergleichsgruppen. Hierbei zeigte sich eine breite Anwendbarkeit insbesondere bei den Patienten mit Hochrisiko-MDS, für die bisher wenige MRD-Ansätze etabliert sind. In einem nächsten Schritt führten wir wiederholte Messungen durch bei Patienten, welche eine allogene Stammzelltransplantation erhielten und korrelierten die Daten mit dem klinischen Verlauf, wobei sich eine eindeutige Korrelation der WT1-Expression mit der Krankheitsaktivität zeigte. Als weitere Gruppe betrachteten wir Patienten, welche nach allogener Stammzelltransplantation ein Rezidiv erlitten und von denen ein Teil innerhalb einer Phase II Studie und der restliche Teil analog der Studie mit Azacitidine und Spenderlymphozyten behandelt wurden. Auch hier korrelierten wir die Daten mit dem klinischen Verlauf und fanden erneut eine Korrelation unserer Messwerte mit der Krankheitsaktivität.

### ***D.1 WT1-Expression bei Patienten mit neu diagnostiziertem MDS***

Hierbei fanden wir, basierend auf einer Gruppe von 73 MDS-Patienten, eine WT1-Überexpression bei 52% der Patienten. Zur Einordnung dieses Wertes untersuchten wir zudem als Vergleichsgruppen eine gesunde Kontrollgruppe (n=12, 0% mit WT1-Überexpression), Patienten mit Zytopenien auf dem Boden anderer Erkrankungen (n=16, 0% mit WT1-Überexpression) sowie Patienten mit de novo AML (n=8, 87,5% mit WT1-Überexpression).

Bei der Betrachtung der MDS-Subgruppen findet sich die niedrigste Rate an WT1-Überexpression in der Gruppe der Patienten mit RA, RARS und hypoplastischem MDS, die höchste Rate findet sich in der Gruppe der Patienten mit RAEB II. Diese Unterschiede finden auch in Korrelation mit der klinischen Prognose mit Hilfe des IPSS Ausdruck. Hier zeigt sich eine signifikant höhere WT1-Expression bei Patienten

in den beiden höheren Risikokategorien gegenüber den Patienten in den beiden niedrigeren Risikokategorien ( $p=0,0012$ ). Eine WT1-Überexpression findet sich somit insbesondere bei Patienten, die gemäß IPSS und IPSS-revised zu den Hochrisiko-Patienten gehören.

Vergleicht man unsere Daten mit der bisherigen Literatur, so ergibt sich ein uneinheitliches Bild. In der ersten Arbeit zum Thema durch Cilloni et al. 2003 wird anhand einer Gruppe von 42 MDS-Patienten mit PB-Proben eine WT1-Überexpression auf mRNA-Ebene bei 78% der Patienten demonstriert. Die Arbeitsgruppe konnte zudem eine positive Korrelation der WT1-Expression mit ansteigendem IPSS-Score zeigen. Während diese Korrelation auch durch unsere Daten bestätigt wird, so liegt der Anzahl der WT1-positiven Patienten bei uns deutlich niedriger. Hierfür dürften vor allem methodische Unterschiede die Ursache sein. Cilloni et al. verwendeten einen Ansatz, welcher vor der ELN-Standardisierung publiziert wurde und einen niedrigeren Schwellenwert zur Diskrimination zwischen WT1-negativ und WT1-positiv hatte<sup>125</sup>. In der 2010 von Tamura et al. publizierten Studie mit 80 MDS Patienten fand sich eine WT1-Überexpression bei 60% der Patienten. Trotz methodischer Unterschiede aufgrund eines eigenen, nicht standardisierten PCR-Assays ohne internes Kontroll-Gen deckt sich dieser Wert mit unseren Daten. Betrachtet man die MDS-Subkategorien, so ergibt sich ebenfalls ein ähnliches Bild mit vergleichsweise geringer Rate an WT1-positiven Patienten in den Kategorien RA, RARS und RCMD, einer höheren Rate an WT1-positiven Patienten in der Kategorie RAEB-I und den höchsten Raten von WT1-positiven Patienten in den Kategorien RAEB-II und sAML. Auch die von der Arbeitsgruppe dargelegte positive Korrelation zwischen WT1-Expression und IPSS-Kategorie konnte von uns bestätigt werden<sup>114</sup>.

Es stellt sich die Frage, ob die höhere Rate an WT1-Überexpression im Bereich der Hochrisiko-MDS ein quantitativer Marker für die Erkrankungslast, also für die Anzahl der Blasten ist. Hierfür stellten wir zwei Gruppen von MDS-Patienten mit unterschiedlichem Blastenanteil gegenüber. Die wesentliche Ursache des unterschiedlichen Expressionsniveaus scheint dabei nicht der Anteil an Blasten zu sein, da sich das Expressionsniveau von den Patienten mit weniger als 5% Blastenanteil nicht signifikant von dem der Patienten mit mehr als 5% Blastenanteil

unterscheidet ( $p=0,52$ ). Neben der rein quantitativen Anzahl der Blasten spielen also wahrscheinlich auch qualitative Faktoren der Erkrankung eine Rolle. Diese postulierten qualitativen Faktoren könnten insbesondere bei einer Subgruppe von Patienten von Interesse sein, welche eine Niedrigrisikoeinstufung gemäß IPSS (*low- und intermediate risk*) aufweisen, in Diskrepanz hierzu jedoch eine WT1-Überexpression mit absoluten Werten im Bereich von Hochrisiko-MDS- oder sogar AML-Patienten aufweisen. Möglicherweise hat die WT1 NCN hier einen eigenständigen prognostischen Wert, was Gegenstand aktueller Untersuchungen ist<sup>126</sup>.

Neben der bloßen Korrelation der WT1 NCN mit steigender Risikokategorie im IPSS ergibt sich hieraus eine relevante praktische Konsequenz im weiteren Therapieverlauf der Patienten mit Hochrisiko-MDS. Diese Patienten kommen für eine allo-SZT in Frage und bedürfen somit auch der Möglichkeit eines *MRD-Monitorings* (s. auch Kapitel A.1.3). Von den Patienten mit Hochrisiko-MDS waren 80% in unserer Untersuchungsgruppe WT1-positiv und kommen somit für ein WT1-basiertes *MRD-Monitoring* aus PB in Betracht. Dieser Wert ist von hoher klinischer Relevanz, da bei MDS-Patienten bisher Ansätze für ein breit anwendbares und bei hohem Patientenkomfort mit günstiger Zeit- und Kosteneffektivität engmaschig durchführbares MRD-Verfahren fehlen. Durchflusszytometrische Methoden sind für MDS im Gegensatz zur AML bisher nicht in der Routine etabliert und unzureichend standardisiert. Die quantitativen, hoch-sensitiven molekularbiologischen Methoden wie der Nachweis von Fusionsgenen oder Genmutationen mittels RQ-PCR mangeln an relativ geringer Anwendbarkeit bezogen auf das gesamte Patientenkollektiv und können im Falle der Genmutationen auch eine unzureichende Stabilität im Krankheitsverlauf aufweisen<sup>127–129</sup>.

Neben der dargestellten Korrelation mit Risikoklassifikation und Subkategorie stellt sich die Frage, ob die WT1-Messung bei MDS-Patienten auch diagnostischen Wert besitzt, also bei der Erst- und Differentialdiagnose der Erkrankung hilft. Interessant ist hierbei vor allem der praxisrelevante Vergleich von Patienten mit MDS und von Patienten mit Zytopenien aufgrund von anderen, nicht neoplastischen Erkrankungen. Diese Fragestellung ist häufig und besonders in frühen Krankheitsstadien der MDS häufig nicht einfach zu beantworten. In unserer entsprechenden Vergleichsgruppe

waren 16 Patienten mit ICUS, aplastischer Anämie, toxischen Knochenmarkschäden, ITP, zyklischer Neutropenie, renaler Anämie und *Anemia of chronic disease* eingeschlossen. Keiner dieser Patienten war WT1-positiv, womit sich eine Spezifität von 100% ergibt. Hier ergibt sich eine mögliche differentialdiagnostische Bereicherung, da bei diagnostischen Unsicherheiten, ob bei einem Patienten mit Zytopenie ein MDS vorliegt, ein positiver WT1-Wert einen Hinweis für ein MDS geben kann. Ähnliches wurde auch in der Arbeit von Baba et al. an 56 Patienten mit MDS und 47 Kontrollpatienten gezeigt<sup>130</sup>. Vor einem routinemäßigen klinischen Einsatz wären jedoch noch weitere validierende Untersuchungen sinnvoll, da unsere Vergleichsgruppe mit nicht-MDS Zytopenien relativ klein ist und einige in Frage kommende Differentialdiagnosen nicht enthalten sind. So konnten wir bspw. keine Patienten mit bestimmten reaktiven Knochenmarks-Veränderungen (z. B. bei chronischen Infektionen, Autoimmunkrankheiten) oder metabolisch bedingten Zytopenien (z. B. Kupfermangel, Vitamin B12- und Folsäuremangel) einschließen. Auch wenn sich in der Literatur keine Hinweise dafür finden, dass Patienten mit solchen Erkrankungen WT1-positiv sein können, so ist vor dem klinischen differentialdiagnostischen Gebrauch eine entsprechende Untersuchung zu empfehlen.

Innerhalb der Gruppe anderer, insbesondere myeloischer hämatologischer Neoplasien ist nicht von einem differentialdiagnostischen Zugewinn durch WT1-Messung auszugehen. WT1 stellt keinen spezifischen Krankheitsmarker dar und ist bspw. auch regelhaft bei Patienten mit CML oder auch bei Patienten mit primärer Myelofibrose pathologisch erhöht<sup>131,132</sup>, (s. auch Kapitel A.2.2).

Ein weiterer Ansatz wäre auch die Untersuchung, ob und in welchem Ausmaß eine WT1-Überexpression bei Patienten mit klonaler Hämatopoiese von unbestimmtem Potenzial (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*, CHIP) vorkommt, und ob sich hierbei ein diagnostischer oder prognostischer Stellenwert ergibt. Zu dieser Fragestellung existieren bisher keine Daten.

## ***D.2 WT1-Messung bei Patienten mit MDS und sAML nach allogener Stammzelltransplantation***

Bei 17 Patienten mit Hochrisiko-MDS oder sAML konnten wir zunächst vor allo-SZT als auch nach allo-SZT wiederholte WT1-Messungen durchführen, um den Krankheitsverlauf mit dem Verlauf der WT1-Expression als potenziellen MRD-Marker zu korrelieren. Von besonderem Interesse ist hierbei nicht nur das Ausmaß der Korrelation, sondern auch die Betrachtung der zeitlichen Dynamik, also letztendlich die Suche nach einem MRD-Marker, der möglichst früh einen ungünstigen Verlauf anzeigt.

Die absolute Höhe der WT1-Expression vor allo-SZT unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Patienten mit Remission von denjenigen mit Rezidiv im weiteren Verlauf und erlaubt somit keine frühe Deskrimination der beiden Gruppen. Ein solches Ergebnis wäre angesichts der Tatsache, dass die meisten Patienten sich in der aktiven Erkrankung befanden auch nicht zu erwarten gewesen. Erst wiederholte Messungen im Verlauf nach allo-SZT zeigen hier deutliche Unterschiede zwischen den Patienten mit Remission und denen mit Rezidiv. Die klinische Remission ging also bei allen Patienten mit einem unmittelbaren und andauernden Abfall der WT1-Expression von initial positiven auf negative Werte einher, während ein klinisches Rezidiv bei allen Patienten mit positiven WT1-Werten (persistierend oder erneut angestiegen) einherging.

Vergleichbare Studien, bei denen ebenfalls der klinische Verlauf von Patienten mit AML und Hochrisiko-MDS nach allo-SZT in Korrelation mit der WT1-Expression gemessen wurde, liefern trotz gewisser Einschränkungen hinsichtlich der Vergleichbarkeit tendenziell ähnliche Ergebnisse. Die Gruppe um Candoni et al. untersuchte dafür 38 Patienten<sup>103</sup>. Auch hier fanden sich bei allen Patienten initial erhöhte WT1-Werte. Zum Zeitpunkt der allo-SZT und im weiteren Beobachtungszeitraum erreichten 25 Patienten eine CR. Diese ging mit einer Normalisierung WT1-Werten einher. Zudem fand sich eine komplette Übereinstimmung mit weiteren MRD-Markern, in diesem Fall Donorchimärismus und molekularen Markern (AML/ETO1 bzw. MLL sofern verfügbar). Sechs Patienten zeigten nach allo-SZT ein Rezidiv der Erkrankung. Bei allen Patienten fand sich dabei bereits davor oder zum Zeitpunkt des Rezidivs ein Anstieg der WT1-

Expression in den positiven Bereich. Insofern decken sich zwei Kernaussagen unserer Arbeit, nämlich dass eine Remission nach allo-SZT mit negativen WT1-Werten einhergeht, und dass ein Rezidiv nach allo-SZT mit positiven WT1-Werten einhergeht, mit den Ergebnissen von Candonis Publikation. Die Vergleichbarkeit ist dabei jedoch durch methodische Unterschiede eingeschränkt. WT1 erwies sich im Rezidiv zudem als stabiler Marker, während andere Marker wie bspw. FLT3 aufgrund von Mutationen des malignen Zellklons, der sog. *clonal evolution* im Verlauf instabil werden können und so ihre Anwendbarkeit als zuverlässigen Verlaufsparemeter eingeschränkt ist<sup>127</sup>.

Von besonderem Interesse ist auch die zeitliche Dynamik des WT1-Verlaufes als Marker in Verhältnis zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose, insbesondere bei jenen Patienten, welche zunächst WT1 negativ sind und dann im Verlauf positiv werden. Aufgrund der geringen Patientenzahl, teilweise fehlender Daten aufgrund unzureichender Probenqualität sowie teilweise weniger engmaschig erfolgten WT1-Messungen als ursprünglich geplant sind hier nur bei drei Patienten belastbare Daten zu berichten. Bei zwei Patienten erfolgte die WT1-Konversion zwei Wochen vor der Rezidivdiagnose und bei einem Patienten erfolgte die Rezidivdiagnose 12 Wochen vor der WT1-Konversion, wobei hier einschränkend zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose keine WT1-Messung erfolgte. Aus diesen Einzelbeobachtungen mit retrospektiven Daten an einer kleinen Fallzahl ist keine statistisch signifikante Aussage möglich, man kann sie jedoch als Hinweis dafür sehen, dass ein Anstieg der WT1-Expression in den positiven Bereich bei zuvor negativen Werten der hämatologischen Rezidivdiagnose vorausgehen kann. Die Messung der WT1-Expression im Verlauf als MRD-Marker kann somit durchaus eine Ergänzung der bisher etablierten Diagnostik darstellen und erlaubt möglicherweise die frühe Identifikation von Patienten mit drohendem Rezidiv. Eine hierhingehende belastbare Aussage kann aber nur mittels auf diesen Beobachtungen aufbauenden, prospektiven Untersuchungen der verschiedenen verfügbaren MRD-Ansätze erfolgen. Unsere Beobachtungen decken sich grundsätzlich mit den Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen:

Eine ebenfalls diese Fragestellung adressierende Arbeit wurde von der Gruppe Lange et al. publiziert<sup>105</sup>. Hierfür wurden 86 Patienten mit AML und Hochrisiko-MDS

nach allo-SZT beobachtet und die WT1-Expression gemessen sowie Chimärismusanalysen durchgeführt. Mittels ROC-Analysen berechnete die Gruppe für die WT1-Expression über dem definierten Schwellenwert dabei eine Sensitivität von 79% und eine Spezifität von 89% hinsichtlich eines hämatologischen Rezidives innerhalb der nächsten 28 Tage. Durch kombinierte Betrachtung von CD34+ Chimärismus und WT1-Expression ließ sich zwar die Spezifität noch weiter steigern, die Sensitivität sank aber deutlich. Auf Basis dieser Ergebnisse sieht die Gruppe die WT1-Expression als aussagekräftigen und der Chimärismusanalytik überlegenen Marker eines drohenden Rezidivs an und empfiehlt die Verwendung von WT1 als MRD-Marker zur Optimierung der Therapieüberwachung. Eingeschränkt wird die Aussagekraft und Übertragbarkeit der Ergebnisse durch die Verwendung eines hausinternen Assay, auch der Grenzwert, den die Gruppe in ihrem RQ-PCR Ansatz für WT1 verwendet hat lag mit 24 WT1-Kopien/10000 ABL-Kopien niedriger als im standardisierten ELN-Assay.

Israyelyan et al. untersuchten an einer Gruppe von 82 Patienten mit akuten Leukämien und MDS nach allo-SZT die Aussagekraft der WT1-Expression hinsichtlich eines zukünftigen Rezidives<sup>133</sup>. Bezogen auf den etablierten Schwellenwert konnte die Gruppe eine Sensitivität von 75% und eine Spezifität von 100% für ein Rezidivereignis zeigen, wobei auch diese Gruppe kein kommerziell verfügbares, standardisiertes ELN-Assay verwendete. So ist der WT1-Schwellenwert zwar formal gleich definiert, der RQ-PCR Ansatz weicht jedoch deutlich ab, da im Gegensatz zum von uns verwendeten ELN-Assay keine spezifischen DNA-Sonden verwendet werden.

Eine weitere Arbeit an 59 Patienten mit AML und MDS wurde von Rautenberg et al publiziert. Neben den WT1-Messungen, welche hier mit dem standardisierten ELN-Assay erfolgten, verglichen die Autoren auch ergänzende oder konkurrierende MRD-Ansätze wie Chimärismus, XY-FISH, Zytogenetik oder molekulare Marker, sofern diese anwendbar waren. Es konnte eine Sensitivität von 83% und eine Spezifität von 97% hinsichtlich eines Rezidivs gezeigt werden, zudem erwies sich die WT1-Messung gegenüber den übrigen Verfahren als überlegen<sup>126</sup>.

### ***D.3 WT1-Messung bei Patienten mit AML und MDS und Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation unter Therapie mit Azacitidine und Spenderlymphozyten***

Das in Kapitel D.2 dargestellte Potenzial der WT1-Messung als MRD-Marker eröffnet auch die Einsatzmöglichkeit zur Steuerung therapeutischer Interventionen. So ist es bspw. denkbar, bei einem Patienten mit über den Schwellenwert ansteigenden WT1-Werten die antineoplastische Therapie zu intensivieren oder die Immunsuppression zu reduzieren zur Verstärkung des GvL-Effektes. Diesen MRD-geleiteten Therapieansatz überprüften wir im Weiteren bei Patienten, welche nach allo-SZT ein Rezidiv der AML oder des MDS zeigten und innerhalb oder analog einer Phase II-Studie mit Azacitidine sowie mit Spenderlymphozyten behandelt wurden<sup>90</sup>. Dabei ist zum einen von Interesse, ob auch während dieser Salvagetherapie eine Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und WT1-Expressionsniveau besteht. Zum anderen ist es von hoher Relevanz, ob sich aus dem Verlauf der WT1-Expression gegebenenfalls auch die Indikation zu einer Therapiemodifikation zur Verhinderung eines manifesten hämatologischen Rezidivs ergeben kann.

Insgesamt standen 28 Patienten mit Rezidiv und positiven WT1-Werten zur Verfügung, wobei 8 Patienten (28,57%) eine CR erreichten. Mit einem Anteil von 7/8 Patienten (87,5%) fiel eine deutliche Mehrheit dieser Patienten mit CR innerhalb von 12-20 Wochen nach allo-SZT in den WT1-negativen Messbereich, während alle 20 Patienten (100%) ohne Remission ab Woche 5 nach allo-SZT WT1-positiv wurden bzw. blieben. Vergleicht man die in Abschnitt D.2 diskutierten Ergebnisse der Patienten mit Rezidiv nach allo-SZT mit den Ergebnissen der soeben betrachteten Patienten, so fällt folgendes auf: Unter beiden Therapieregimen geht ein Rezidiv mit positiven WT1-Werten einher, die Konversion von WT1-negativ zu WT1-positiv kann dem Rezidiv dabei vorausgehen. Patienten in CR sind in der überwiegenden Mehrheit (100% bzw. 87,5%) WT1-negativ. Unterschiedlich ist jedoch, wie schnell die WT1-Werte nach Therapieeinleitung bei jenen Patienten, welche auf die Therapie ansprechen, abfallen. Während man in der allo-SZT Gruppe einen raschen Abfall der WT1-Werte in den negativen Bereichen bis zur 9. Woche (Median, SD 6,9 Wochen) nach allo-SZT sieht, so kommt es in der Azacitidine Gruppe erst zwischen Woche 12 und Woche 20 zu einem Abfall bis in den WT1-negativen Bereich. Ein Grund hierfür kann sein, dass Azacitidine in der eingesetzten Dosierung einen nur gering

ausgeprägten direkten zytotoxischen und damit schnell einsetzenden Effekt besitzt. Der Wirkmechanismus scheint eher eine Umstimmung des immunologischen Milieus im Knochenmark durch die epigenetische Hochregulation von verschiedenen Oberflächenantigenen der neoplastischen Zellen sowie eine erhöhte Aktivität der CD8+ T-Zellen mit entsprechend stärkerer GvL- Aktivität zu sein<sup>134,135</sup>.

Diese Daten zeigen eine starke Korrelation der WT1 NCN mit der Krankheitsaktivität auch unter dem Salvagetherapieregime mit Azacitidine und DLI. In gemeinsamer Betrachtung mit der bereits in Kapitel D.2 bei Patienten nach allo-SZT dargestellte Korrelation ist sie von klinischer Relevanz. Eine Rezidivtherapie mit Azacitidine ist von höherer Effektivität, wenn sie bereits im Stadium des molekularen Rezidivs erfolgt und nicht erst das Auftreten eines manifesten hämatologischen Rezidivs abgewartet wird<sup>136</sup>. Die frühe Detektion eines drohenden Rezidivs mittels MRD-Diagnostik ist daher notwendig, um eine erfolgreiche therapeutische Intervention durchführen zu können.

Für einen alternativen MRD-Ansatz, nämlich den molekularbiologischen Nachweis von NPM1-Mutationen bei Patienten mit AML und molekularem Rezidiv nach intensiver Chemotherapie oder allo-SZT wurde der Erfolg einer MRD-geleiteten Therapie mit Azacitidine von Sockel et al. demonstriert<sup>137</sup>. Die stark eingeschränkte Anwendbarkeit auf die Minderheit der Patienten mit NPM1-Mutation im Vergleich zur breiten Anwendbarkeit bei der Mehrheit der Patienten mit WT1-Überexpression ist der hauptsächliche Nachteil der Methode und gleichzeitig der Vorteil der von uns durchgeführten MRD-Messung.

Eine weitere, in diesem Zusammenhang relevante Arbeit, ist die prospektive RELAZA-Studie<sup>138</sup>. Dabei erfolgte ebenfalls eine MRD-geleitete Azacitidine-Therapie bei AML- und MDS-Patienten mit Rezidiv nach allo-SZT, wobei als MRD-Marker hier ein Abfall des Donorchimärismus unter 80%, gemessen an CD34+ Zellen aus PB, zur Anwendung kam. In der Studie konnte eine Verhinderung oder eine Verzögerung eines hämatologischen Rezidivs durch den oben genannten Ansatz gezeigt werden. Die Selektion von CD34+ Zellen ist verglichen mit unserer WT1-Messung jedoch ein aufwendiges Verfahren mit hohem Zeit- und Ressourceneinsatz, dennoch unterstreicht die Studie prinzipiell die Vorteile eines MRD-geleiteten Therapieregimes.

#### ***D.4 Schlussfolgerungen und Ausblick***

Ziel dieser Arbeit war es, die diagnostische Qualität und praktische Anwendbarkeit einer standardisierten, zertifizierten und qRT-PCR basierten WT1-Messung aus PB bei Patienten mit MDS und AML zu untersuchen.

Hier konnten wir zunächst bei Patienten mit neu diagnostiziertem MDS eine positive Korrelation zwischen der Höhe der WT1-Expression und der prognostischen Eingruppierung der Patienten gemäß IPSS bzw. IPSS-R demonstrieren. Resultat dieser Korrelation war dabei auch, dass wir bei 80% der Patienten mit Hochrisiko-MDS eine WT1-Überexpression nachweisen konnten, so dass bei diesen Patienten grundsätzlich ein Therapiemonitoring mittels WT1 möglich ist. Diese breite und vom individuellem Karyotyp oder Genotyp unabhängige Anwendbarkeit als MRD-Marker ist bei diesen, für eine allo-SZT in Frage kommenden Patienten besonders relevant. Desweiteren konnten wir eine hohe Spezifität (100%) bei jedoch nur geringer Sensitivität (52%) der WT1-Überexpression im Vergleich zu Patienten mit nicht neoplastischen Zytopenien darlegen.

Als nächsten Schritt führten wir WT1-Messungen bei Patienten mit Hochrisiko-MDS und AML nach allo-SZT durch. Hier konnten wir eine eindeutige Korrelation der WT1-Expression mit der Krankheitsaktivität zeigen. Zudem ergaben sich Hinweise darauf, dass ein Wiederanstieg der WT1-Expression i. S. einer Konversion von WT1-negativ zu WT1-positiv einem Rezidiv vorausgehen kann.

Als dritten Teilaspekt untersuchten wir WT1-positive Patienten mit Rezidiv eines MDS oder einer AML nach allo-SZT, welche mit Azacitidine und DLI behandelt wurden. Auch hier sahen wir eine eindeutige Korrelation der WT1-Expression mit der Krankheitsaktivität.

In der Gesamtbetrachtung war es uns möglich, zunächst die breite Anwendbarkeit der WT1-Messung bei Patienten mit Hochrisiko-MDS und AML zeigen, welche zudem mit hohem Patientenkomfort und günstigem Ressourcen- und Zeitaufwand durchgeführt werden kann. Desweiteren konnten wir, unter Berücksichtigung der Limitationen einer retrospektiven Untersuchung an kleinen Patientengruppen, eine starke Korrelation der WT1-Expression mit der Krankheitsaktivität nach allo-SZT bzw.

im Rezidivfall und unter einer Salvagetherapie mit Azacitidine und DLI demonstrieren.

Auf der Basis dieser Arbeit ist die Messung der WT1-Expression als MRD-Marker mittlerweile als Teil der Routinediagnostik am UKD etabliert. Der frühe, MRD-geleitete Therapieeinsatz bei Patienten mit Rezidiv nach allo-SZT wird zudem im Rahmen von Studien wie der AZALENA-Studie (*ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02472691*) in größerem und prospektivem Rahmen untersucht.

Weitere beachtenswerte und in dieser Arbeit unbeantwortete Fragen haben sich bzgl. einer möglichen eigenständigen prognostischen Aussagekraft einer pathologischen WT1-Überexpression ergeben, welche insbesondere für Patienten mit MDS und Niedrigrisiko-Klassifikation im IPSS, aber auch bspw. für Patienten mit CHIP von Interesse ist.

## E Literaturverzeichnis

1. Germing, U. *Myelodysplastische Syndrome: Bilanz des aktuellen Wissens, Kapitel 2, Seite 3f.* (Dup, 2009).
2. Bomford, R. R. Refractory Anaemia. *Br. Med. J.* **1**, 565 (1942).
3. Vilter, R. W. *et al.* Hyperplastic Refractory Anemia. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **70**, 142–151 (1959).
4. Hamilton-Paterson, J. L. Pre-leukaemic anaemia. *Acta Haematol.* **2**, 309–316 (1949).
5. Block, M., Jakobson, L. O. & Bethard, W. F. Preleukemic acute human leukemia. *J. Am. Med. Assoc.* **152**, 1018–1028 (1953).
6. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
7. Germing, U. *et al.* No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **89**, 905–910 (2004).
8. Andreesen, R. *Klinische Hämatologie, Kapitel 5, Seite 94f.* (Elsevier Urban & Fischer, 2009).
9. Bowen, D. *et al.* Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* **120**, 187–200 (2003).
10. Bain, B. J. The bone marrow aspirate of healthy subjects. *Br. J. Haematol.* **94**, 206–209 (1996).
11. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* **51**, 189–199 (1982).
12. Harris, N. L. *et al.* 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. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **17**, 3835–3849 (1999).
13. Vardiman, J. W., Harris, N. L. & Brunning, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **100**, 2292–2302 (2002).
  14. Vardiman, J. W. *et al.* 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).
  15. Aul, C., Gattermann, N. & Schneider, W. Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* **82**, 358–367 (1992).
  16. Aul, C., Bowen, D. T. & Yoshida, Y. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **83**, 71–86 (1998).
  17. Strom, S. S., Gu, Y., Gruschkus, S. K., Pierce, S. A. & Estey, E. H. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* **19**, 1912–1918 (2005).
  18. Du, Y., Fryzek, J., Sekeres, M. A. & Taioli, E. Smoking and alcohol intake as risk factors for myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk. Res.* **34**, 1–5 (2010).
  19. Keel, S. B. *et al.* Genetic features of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia in pediatric and young adult patients. *Haematologica* **101**, 1343–1350 (2016).
  20. Wlodarski, M. W. *et al.* Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood* **127**, 1387–1397; quiz 1518 (2016).

21. Churpek, J. E. Familial myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **30**, 287–289 (2017).
22. Nolte, F. & Hofmann, W.-K. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Ann. Hematol.* **87**, 777–795 (2008).
23. Chao, M. P., Seita, J. & Weissman, I. L. Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **73**, 439–449 (2008).
24. Haase, D. *et al.* New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* **110**, 4385–4395 (2007).
25. Gondek, L. P. *et al.* Detection of cryptic chromosomal lesions including acquired segmental uniparental disomy in advanced and low-risk myelodysplastic syndromes. *Exp. Hematol.* **35**, 1728–1738 (2007).
26. Bejar, R. & Ebert, B. L. The genetic basis of myelodysplastic syndromes. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **24**, 295–315 (2010).
27. Abdel-Wahab, O. & Levine, R. L. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 3563–3572 (2013).
28. Galm, O., Herman, J. G. & Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev.* **20**, 1–13 (2006).
29. Haferlach, T. *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **28**, 241–247 (2014).
30. Sperling, A. S., Gibson, C. J. & Ebert, B. L. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat. Rev.*

- Cancer* **17**, 5–19 (2017).
31. Steensma, D. P. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* **126**, 9–16 (2015).
  32. Ghobrial, I. M., Detappe, A., Anderson, K. C. & Steensma, D. P. The bone-marrow niche in MDS and MGUS: implications for AML and MM. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 219–233 (2018).
  33. Germing, U., Aul, C., Niemeyer, C. M., Haas, R. & Bennett, J. M. Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. *Ann. Hematol.* **87**, 691–699 (2008).
  34. Greenberg, P. *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* **89**, 2079–2088 (1997).
  35. Greenberg, P. L. *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* **120**, 2454–2465 (2012).
  36. Juliusson, G. *et al.* Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* **113**, 4179–4187 (2009).
  37. Crowther, D. *et al.* Combination chemotherapy using L-asparaginase, daunorubicin, and cytosine arabinoside in adults with acute myelogenous leukaemia. *Br. Med. J.* **4**, 513–517 (1970).
  38. Röllig, C. *et al.* DGHO-Leitlinie Akute Myelische Leukämie (AML), 2017. Available at: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/archive/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/version-04042018T133140>. (Accessed: 11th April 2018)
  39. Bizzozero, O. J., Jr, Johnson, K. G. & Ciocco, A. Radiation-related leukemia in

- Hiroshima and Nagasaki, 1946-1964. I. Distribution, incidence and appearance time. *N. Engl. J. Med.* **274**, 1095–1101 (1966).
40. Shuryak, I. *et al.* Radiation-induced leukemia at doses relevant to radiation therapy: modeling mechanisms and estimating risks. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 1794–1806 (2006).
  41. Darrington, D. L. *et al.* Incidence and characterization of secondary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia following high-dose chemoradiotherapy and autologous stem-cell transplantation for lymphoid malignancies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **12**, 2527–2534 (1994).
  42. Brandt, L., Nilsson, P. G. & Mitelman, F. Occupational exposure to petroleum products in men with acute non-lymphocytic leukaemia. *Br. Med. J.* **1**, 553 (1978).
  43. DiNardo, C. D. *et al.* Evaluation of Patients and Families With Concern for Predispositions to Hematologic Malignancies Within the Hereditary Hematologic Malignancy Clinic (HHMC). *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **16**, 417-428.e2 (2016).
  44. Deschler, B. & Lübbert, M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* **107**, 2099–2107 (2006).
  45. Fialkow, P. J. *et al.* Acute nonlymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin. *Blood* **57**, 1068–1073 (1981).
  46. Grimwade, D. *et al.* Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the

- United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* **116**, 354–365 (2010).
47. Haferlach, T., Schnittger, S., Kern, W., Hiddemann, W. & Schoch, C. Genetic classification of acute myeloid leukemia (AML). *Ann. Hematol.* **83 Suppl 1**, S97-100 (2004).
  48. Rowley, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290–293 (1973).
  49. Rowley, J. D. Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood* **112**, 2183–2189 (2008).
  50. Reikvam, H., Hatfield, K. J., Kittang, A. O., Hovland, R. & Bruserud, Ø. Acute Myeloid Leukemia with the t(8;21) Translocation: Clinical Consequences and Biological Implications. *BioMed Research International* (2011).  
doi:10.1155/2011/104631
  51. Haferlach, T. *et al.* Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 256–265 (2003).
  52. Mrózek, K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin. Oncol.* **35**, 365–377 (2008).
  53. Fröhling, S. *et al.* Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood* **108**, 3280–3288 (2006).
  54. Cancer and Leukemia Group B 8461 *et al.* Pretreatment cytogenetics add to

- other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood* **108**, 63–73 (2006).
55. Brewin, J., Horne, G. & Chevassut, T. Genomic landscapes and clonality of de novo AML. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1472–1473 (2013).
56. Marcucci, G., Haferlach, T. & Döhner, H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 475–486 (2011).
57. Stein, E. M. *et al.* Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* **130**, 722–731 (2017).
58. Stone, R. M. *et al.* Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 454–464 (2017).
59. Hofmann, W.-K. *et al.* DGHO Leitlinie Myelodysplastische Syndrome (MDS), 2016. (2016). Available at:  
<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/myelodysplastische-syndrome-mds>. (Accessed: 4th April 2018)
60. Zurlo, M. G. *et al.* Survival and causes of death in thalassaemia major. *Lancet* **2**, 27–30 (1989).
61. Hershko, C., Link, G. & Cabantchik, I. Pathophysiology of iron overload. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **850**, 191–201 (1998).
62. List, A. *et al.* Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1456–1465 (2006).
63. Passweg, J. R. *et al.* Immunosuppressive Therapy for Patients With Myelodysplastic Syndrome: A Prospective Randomized Multicenter Phase III

- Trial Comparing Antithymocyte Globulin Plus Cyclosporine With Best Supportive Care—SAKK 33/99. *J. Clin. Oncol.* **29**, 303–309 (2011).
64. Pinto, A. *et al.* 5-Aza-2'-deoxycytidine induces terminal differentiation of leukemic blasts from patients with acute myeloid leukemias. *Blood* **64**, 922–929 (1984).
65. Keating, G. M. Azacitidine: a review of its use in the management of myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukaemia. *Drugs* **72**, 1111–1136 (2012).
66. Fenaux, P. *et al.* Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* **10**, 223–232 (2009).
67. Silverman, L. R. *et al.* Continued azacitidine therapy beyond time of first response improves quality of response in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer* **117**, 2697–2702 (2011).
68. Sekeres, M. A. *et al.* Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood* **113**, 28–36 (2009).
69. Estey, E. & Döhner, H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* **368**, 1894–1907 (2006).
70. Vogler, W. R. *et al.* A phase III trial comparing idarubicin and daunorubicin in combination with cytarabine in acute myelogenous leukemia: a Southeastern Cancer Study Group Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **10**, 1103–1111 (1992).
71. Petersdorf, S. H. *et al.* Phase II evaluation of an intensified induction therapy

- with standard daunomycin and cytarabine followed by high dose cytarabine for adults with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study (SWOG-9500). *Am. J. Hematol.* **82**, 1056–1062 (2007).
72. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).
73. Thomas, E. D. *et al.* One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* **49**, 511–533 (1977).
74. Taussig, D. C. *et al.* Durable remissions of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after reduced-intensity allografting. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 3060–3065 (2003).
75. Horowitz, M. M. *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555–562 (1990).
76. Kolb, H. J. *et al.* Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* **86**, 2041–2050 (1995).
77. Passweg, J. R. *et al.* The EBMT activity survey: 1990-2010. *Bone Marrow Transplant.* **47**, 906–923 (2012).
78. Hübel, K. *et al.* Allogeneic stem cell transplant in adult patients with acute myelogenous leukemia: a systematic analysis of international guidelines and recommendations. *Leuk. Lymphoma* **52**, 444–457 (2011).
79. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **115**, 453–474 (2010).

80. Gratwohl, A. *et al.* Risk score for outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis. *Cancer* **115**, 4715–4726 (2009).
81. Pavletic, S. Z. *et al.* NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: report from the Committee on the Epidemiology and Natural History of Relapse following Allogeneic Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **16**, 871–890 (2010).
82. Mortimer, J. *et al.* Relapse of acute leukemia after marrow transplantation: natural history and results of subsequent therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **7**, 50–57 (1989).
83. Phillips, G. L. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for high-risk acute myeloid leukemia (AML)/myelodysplastic syndrome (MDS): how can we improve outcomes in the near future? *Leuk. Res.* **36**, 1490–1495 (2012).
84. van den Brink, M. R. M. *et al.* Relapse after allogeneic hematopoietic cell therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **16**, S138–S145 (2010).
85. Graef, T. *et al.* Successful treatment of relapsed AML after allogeneic stem cell transplantation with azacitidine. *Leuk. Res.* **31**, 257–259 (2007).
86. Schmid, C. *et al.* Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **119**, 1599–1606 (2012).
87. Christopeit, M. *et al.* Second allograft for hematologic relapse of acute leukemia after first allogeneic stem-cell transplantation from related and unrelated donors: the role of donor change. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 3259–3271 (2013).

88. Saiki, J. H. *et al.* 5-azacytidine in acute leukemia. *Cancer* **42**, 2111–2114 (1978).
89. Czibere, A. *et al.* 5-Azacytidine for the treatment of patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome who relapse after allo-SCT: a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant.* **45**, 872–876 (2009).
90. Schroeder, T. *et al.* Azacitidine and donor lymphocyte infusions as first salvage therapy for relapse of AML or MDS after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* **27**, 1229–1235 (2013).
91. Schroeder, T., Rautenberg, C., Haas, R. & Kobbe, G. Hypomethylating agents after allogeneic blood stem cell transplantation. *Stem Cell Investig.* **3**, 84 (2016).
92. Schroeder, T., Rautenberg, C., Haas, R., Germing, U. & Kobbe, G. Hypomethylating agents for treatment and prevention of relapse after allogeneic blood stem cell transplantation. *Int. J. Hematol.* **107**, 138–150 (2018).
93. Bacher, U. *et al.* Evaluation of complete disease remission in acute myeloid leukemia: a prospective study based on cytomorphology, interphase fluorescence in situ hybridization, and immunophenotyping during follow-up in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* **106**, 839–847 (2006).
94. Thiede, C. & Müller-Tidow, C. Onkodin. Onkologie, Hämatologie - Daten und Informationen. Kapitel 6.5. Molekulargenetische Diagnostik. (2008). Available at: <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52556/e52881/#e52892>. (Accessed: 14th February 2014)
95. Feller, N. *et al.* Defining consensus leukemia-associated immunophenotypes for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia in a multicenter setting. *Blood Cancer J.* **3**, e129 (2013).
96. Buccisano, F. *et al.* Prognostic and therapeutic implications of minimal residual

- disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* **119**, 332–341 (2012).
97. Coustan-Smith, E. & Campana, D. Should evaluation for minimal residual disease be routine in acute myeloid leukemia?. [Miscellaneous Article]. *Curr. Opin. Hematol. March 2013* **20**, 86–92 (2013).
98. Corbacioglu, A. *et al.* Prognostic impact of minimal residual disease in CBFβ-MYH11-positive acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 3724–3729 (2010).
99. Krönke, J. *et al.* Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 2709–2716 (2011).
100. Hochberg, E. P. *et al.* A novel rapid single nucleotide polymorphism (SNP)-based method for assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **101**, 363–369 (2003).
101. Sufliarska, S. *et al.* Establishing the method of chimerism monitoring after allogeneic stem cell transplantation using multiplex polymerase chain reaction amplification of short tandem repeat markers and Amelogenin. *Neoplasma* **54**, 424–430 (2007).
102. Bach, C. *et al.* Monitoring of Hematopoietic Chimerism by Real-Time Quantitative PCR of Micro Insertions/Deletions in Samples with Low DNA Quantities. *Transfus. Med. Hemotherapy* **42**, 38–45 (2015).
103. Lange, T. *et al.* Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(+) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* **25**, 498–505 (2011).

104. Yang, L., Han, Y., Saiz, F. S. & Minden, M. D. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* **21**, 868–876 (2007).
105. Rivera, M. N. & Haber, D. A. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 699–712 (2005).
106. Kramarzova, K. *et al.* Real-time PCR quantification of major Wilms' tumor gene 1 (WT1) isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences. *Leukemia* **26**, 2086–2095 (2012).
107. Inoue, K. *et al.* WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* **84**, 3071–3079 (1994).
108. Nishida, S. *et al.* AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood* **107**, 3303–3312 (2006).
109. Svedberg, H., Richter, J. & Gullberg, U. Forced expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene inhibits proliferation of human hematopoietic CD34(+) progenitor cells. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* **15**, 1914–1922 (2001).
110. Cilloni, D. *et al.* Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Minimal Residual Disease by Standardized WT1 Assay to Enhance Risk Stratification in Acute Myeloid Leukemia: A European LeukemiaNet Study. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5195–5201 (2009).
111. Gray, J. X. *et al.* WT1 expression as a marker of minimal residual disease predicts outcome in acute myeloid leukemia when measured post-consolidation. *Leuk. Res.* (2011). doi:10.1016/j.leukres.2011.09.005
112. Rossi, G. *et al.* Comparison between multiparameter flow cytometry and WT1-

- RNA quantification in monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia without specific molecular targets. *Leuk. Res.* (2011).  
doi:10.1016/j.leukres.2011.11.020
113. Yamauchi, T. *et al.* Wilms' Tumor-1 Transcript in Peripheral Blood Helps Diagnose Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome in Patients with Pancytopenia. *Anticancer Res.* **32**, 4479–4483 (2012).
114. Tamura, H. *et al.* Prognostic significance of WT1 mRNA and anti-WT1 antibody levels in peripheral blood in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* **34**, 986–990 (2010).
115. Varma, N., Anand, M. S., Varma, S. & Juneja, S. S. Role of hTERT and WT1 gene expression in disease progression and imatinib responsiveness of patients with BCR-ABL positive chronic myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **52**, 687–693 (2011).
116. Cilloni, D. *et al.* Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* **16**, 2115–2121 (2002).
117. Ogawa, H. *et al.* The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* **101**, 1698 (2003).
118. Weisser, M. *et al.* Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* **19**, 1416–1423 (2005).
119. Østergaard, M., Olesen, L. H., Hasle, H., Kjeldsen, E. & Hokland, P. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of

- acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br. J. Haematol.* **125**, 590–600 (2004).
120. Gianfaldoni, G. *et al.* Early reduction of WT1 transcripts during induction chemotherapy predicts for longer disease free and overall survival in acute myeloid leukemia. *haematologica* **95**, 833 (2010).
121. Candoni, A. *et al.* Quantitative assessment of WT1 gene expression after allogeneic stem cell transplantation is a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Eur. J. Haematol.* **82**, 61–68 (2009).
122. Wilfinger, W. W., Mackey, K. & Chomczynski, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474–476, 478–481 (1997).
123. Didenko, V. V. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *BioTechniques* **31**, 1106–1116, 1118, 1120–1121 (2001).
124. IPSOGEN Krebs-Profiler. Gebrauchsanweisung WT1 ProfileQuant®-Kit. (2009).
125. Cilloni, D. *et al.* Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 1988–1995 (2003).
126. Rautenberg, C. *et al.* Wilms' Tumor 1 (WT1) Expression Using a Standardized European Leukemia Net-Certified Assay Compared to Other Methods for Detection of Minimal Residual Disease in MDS and AML Patients after Allogeneic Blood Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* (2018). doi:10.1016/j.bbmt.2018.05.011

127. Cloos, J. *et al.* Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia* **20**, 1217–1220 (2006).
128. Ivey, A. *et al.* Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N. Engl. J. Med.* **374**, 422–433 (2016).
129. Jongen-Lavrencic, M. *et al.* Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1189–1199 (2018).
130. Baba, M. *et al.* The level of bone marrow WT1 message is a useful marker to differentiate myelodysplastic syndromes with low blast percentage from cytopenia due to other reasons. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* **54**, 445–451 (2015).
131. Gallo, D. *et al.* The Wilms' tumor (WT1) gene expression correlates with the International Prognostic Scoring System (IPSS) score in patients with myelofibrosis and it is a marker of response to therapy. *Cancer Med.* **5**, 1650–1653 (2016).
132. Lopotová, T., Polák, J., Schwarz, J., Klamová, H. & Moravcová, J. Expression of four major WT1 splicing variants in acute and chronic myeloid leukemia patients analyzed by newly developed four real-time RT PCRs. *Blood Cells. Mol. Dis.* **49**, 41–47 (2012).
133. Israyelyan, A. *et al.* Real-time assessment of relapse risk based on the WT1 marker in acute leukemia and myelodysplastic syndrome patients after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* (2014).  
doi:10.1038/bmt.2014.209
134. Almstedt, M. *et al.* The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine induces expression of NY-ESO-1 and other cancer/testis antigens in myeloid leukemia cells. *Leuk. Res.* **34**, 899–905 (2010).

135. Goodyear, O. *et al.* Induction of a CD8+ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Blood* **116**, 1908–1918 (2010).
136. Schroeder, T. *et al.* Treatment of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome relapse after allogeneic stem cell transplantation with azacitidine and donor lymphocyte infusions--a retrospective multicenter analysis from the German Cooperative Transplant Study Group. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **21**, 653–660 (2015).
137. Sockel, K. *et al.* Minimal residual disease-directed preemptive treatment with azacitidine in patients with NPM1-mutant acute myeloid leukemia and molecular relapse. *Haematologica* haematol–2011 (2011).
138. Platzbecker, U. *et al.* Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial. *Leukemia* **26**, 381–389 (2012).

# F Anhang

## F.1 AML-Subkategorien (s. Kapitel A.1)

AML-Subkategorien
<i>Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms</i>
<i>AML with recurrent genetic abnormalities</i>
<i>AML with t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1</i>
<i>AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11</i>
<i>APL with PML-RARA</i>
<i>AML with t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A</i>
<i>AML with t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214</i>
<i>AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2);GATA2, MECOM</i>
<i>AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1</i>
<i>Provisional entity: AML with BCR-ABL1</i>
<i>AML with mutated NPM1</i>
<i>AML with biallelic mutations of CEBPA</i>
<i>Provisional entity: AML with mutated RUNX1</i>
<i>AML with myelodysplasia-related changes</i>
<i>Therapy-related myeloid neoplasms</i>
<i>AML, NOS</i>
<i>AML with minimal differentiation</i>
<i>AML without maturation</i>
<i>AML with maturation</i>
<i>Acute myelomonocytic leukemia</i>
<i>Acute monoblastic/monocytic leukemia</i>
<i>Pure erythroid leukemia</i>
<i>Acute megakaryoblastic leukemia</i>
<i>Acute basophilic leukemia</i>
<i>Acute panmyelosis with myelofibrosis</i>
<i>Myeloid sarcoma</i>
<i>Myeloid proliferations related to Down syndrome</i>
<i>Transient abnormal myelopoiesis (TAM)</i>
<i>Myeloid leukemia associated with Down syndrome</i>

Tabelle 1.4: WHO Klassifikation 2016 der AML<sup>6</sup>