

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

Wilms' Tumor 1 (WT1) - mRNA Expression im peripheren Blut zum Nachweis
minimaler Resterkrankung bei Patienten mit myeloischen Neoplasien nach
allogener Blutstammzelltransplantation

Dissertation

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

vorgelegt von
Christina Rautenberg
2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Rainer Haas

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Wilfried Budach

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht

Originalarbeit:

Christina Rautenberg, Sabrina Pechtel, Barbara Hildebrandt, Beate Betz, Ariane Dienst, Kathrin Nachtkamp, Mustafa Kondakci, et al. 2018.

'Wilms' Tumor 1 Gene Expression Using a Standardized European LeukemiaNet-Certified Assay Compared to Other Methods for Detection of Minimal Residual Disease in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myelogenous Leukemia after Allogeneic Blood Stem Cell Transplantation. Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation, May 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.05.011>.

Zusammenfassung

Das Rezidiv ist die häufigste Ursache für ein Therapieversagen nach allogener Stammzelltransplantation (allo-SZT). Je früher dieses entdeckt wird, umso größer sind die Erfolgsaussichten für eine Therapie, wobei ein ausschließlich molekulares Rezidiv die beste Ausgangslage darstellt. Diesem Ziel kommt man durch Bestimmung der minimalen Resterkrankung, der sog. *minimal residual bzw. minimal measurable disease* (MRD) näher. Ein „optimaler“ MRD-Marker sollte bei möglichst vielen der Patienten mittels eines standardisierten Assay mit hoher Sensitivität und Spezifität idealerweise in peripherem Blut (PB) quantifizierbar sein. Viele der zyto- und molekulargenetischen Aberrationen bei AML und MDS erfüllen die genannten Kriterien nicht, da sie entweder nur in einer Subgruppe von Patienten zu finden sind oder im Verlauf der Erkrankung – zum Teil auch als Folge der Therapie - nicht stabil bleiben. Ein geeigneter Marker ist das *Wilms' Tumor 1 (WT1)* - Gen, da es auf mRNA-Ebene von 90% der AML- und dem Großteil der MDS-Patienten überexprimiert wird und mittels standardisierten qRT-PCR Assays in PB quantifizierbar ist. Um dessen diagnostische Relevanz als MRD-Marker bei Patienten nach allo-SZT zu evaluieren, wurden die Verläufe der *WT1*-Expression bei 59 Patienten mit AML und MDS retrospektiv untersucht, mit den klinischen Verläufen korreliert und mit anderen Methoden des MRD-Monitoring verglichen. Von 24 rezidierten Patienten wiesen 20 vor Diagnose des Rezidivs eine erhöhte *WT1*-Expression auf, während nur ein Patient von denjenigen, die in Remission blieben, eine transiente Erhöhung der *WT1*-Expression in PB zeigte. Dies entspricht einer Sensitivität von 83% bzw. einer Spezifität von 97%. Die Sensitivität, mit der die *WT1*-Überexpression ein Rezidiv im PB nachweist, war der Sensitivität von zytogenetischen und Chimärismus Analysen aus dem Knochenmark (jeweils 33%) signifikant überlegen ($p=0.0094$) und vergleichbar mit der von molekulargenetischen bzw. XY-FISH Analysen (67% bzw. 78%). Verglichen mit der Spezifität, die durch Chimärismus (91%), XY-FISH (73%), zytogenetische (77%) oder molekulargenetische Analysen (85%) erreicht wurde, zeigte sich ein Trend zu Gunsten der *WT1*-Expression, wobei dieser keine statistische Signifikanz erreichte. Bei 62% der rezidierten Patienten war der Nachweis einer erhöhten *WT1*-Expression Anlass für eine Knochenmarkpunktion, welche das Rezidiv diagnostizierte. Die Ergebnisse dieser retrospektiv angelegten Arbeit zeigen, dass bei Patienten mit AML und MDS durch serielle Messung der *WT1*-Expression im PB ein beginnendes Rezidiv nach allo-SZT mit hoher Sensitivität und Spezifität ohne Belastung des Patienten nachgewiesen werden kann und damit eine Therapie zu einem frühen Zeitpunkt ermöglicht wird.

Abstract

Relapse remains the main cause of treatment failure after allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT). Treatment of relapse is most effective when initiated at molecular relapse. Monitoring of minimal residual or more suitable minimal measurable disease (MRD) enables early detection of relapse. An “ideal” marker for MRD-detection should be applicable in the majority of patients (pts) and should be measurable using a standardized assay with high sensitivity and specificity in peripheral blood (PB). Despite of a multitude of cyto- and molecular genetic alterations that have been identified in pts with myeloid neoplasms, many of these do not fulfill these properties: they are present only in subgroups of pts, are instable during disease course, lack standardized assays or require bone marrow (BM) as sample source. A marker that may fulfill these requirements is *Wilms-Tumor 1 (WT1)* – gene as it is overexpressed in 90% of AML and the majority of MDS pts and is measurable in PB using a standardized assay. To estimate the value of *WT1*-mRNA expression as an MRD-marker after allo-SCT, we retrospectively analyzed kinetics of *WT1*-mRNA expression in 59 pts with AML and MDS, correlated this with clinical course and compared its results to those of other methods for MRD monitoring. Out of 24 relapsed pts, 20 showed *WT1*-overexpression in PB at or before relapse, whereas only one patient out of those with sustained remission showed transient increase of *WT1*-expression in PB, reflecting a sensitivity of 83% and a specificity of 97%. Sensitivity of *WT1*-expression was significantly superior compared to sensitivity of STR-based chimerism analyses and cytogenetics (33% each, $p=0.0094$) and comparable to sensitivity of molecular genetic or XY-FISH analyses from BM biopsy (67% and 78% respectively). Compared to specificity of STR-based chimerism (91%), XY-FISH analyses (73%), cytogenetic (77%) or molecular genetic analyses (85%) there may be a trend in favor for *WT1*-expression, but without gaining statistical significance. In 62% of relapsed pts elevated *WT1*-expression prompted an earlier BM biopsy that consecutively lead to diagnosis of relapse. Given the intrinsic limitations of a retrospective analysis, the results indicate that serial measurement of *WT1* expression in patients with myeloid neoplasms using a standardized assay can predict imminent relapse with high sensitivity and specificity ensuring patients' comfort and can enable early therapeutic interventions.

Abkürzungsverzeichnis

ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
Allo-SZT	allogene Stammzelltransplantation
Allo-SCT	<i>allogeneic hematopoietic stem cell transplantation</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
ASXL1	<i>additional sex combs-like 1</i>
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
Ca.	circa
CBL	<i>Casitas B-lineage Lymphoma</i>
CHIP	<i>clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>
Chr	Chromosom
CR	<i>complete remission</i>
DfN	<i>Different from normal</i>
DNMT3A	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A</i>
ELN	<i>European LeukemiaNet</i>
EZH2	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLT3-ITD	<i>fms like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication</i>
FLT3-TKD	<i>fms like tyrosine kinase 3 tyrosine kinase domaine</i>
IDH	<i>isocitrate dehydrogenase</i>
IPSS	<i>International Prognostic Scoring System</i>
IPSS-R	<i>International Prognostic Scoring System revised</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LAIP	<i>Leukaemia-associated immunphenotype</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
MDS EB	<i>MDS with excess of blasts</i> ; MDS mit Blastenexzess
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDS-MLD	<i>MDS with multilineage dysplasia</i> ; MDS mit multilineärer Dysplasie
MDS-SLD	<i>MDS with single lineage dysplasia</i> ; MDS mit unilineärer Dysplasie
MHY11	<i>myosin heavy chain 11</i>

MRD	<i>minimal residual disease; minimal measureable disease</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS</i>
ns	<i>nicht signifikant</i>
PML	<i>promyelocytic leukemia</i>
POX	<i>Peroxidase</i>
Pts	<i>patients</i>
qRT-PCR	<i>quantitative realtime polymerase chain reaction</i>
RARA	<i>retinoic acid receptor alpha</i>
RS	<i>Ringsideroblasten</i>
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
STR	<i>short tandem repeat</i>
TET2	<i>Tet methylcytosine dioxygenase</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
u.a.	<i>unter anderem</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT1	<i>Wilms' Tumor 1</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Methoden der MRD-Diagnostik, jeweilige Sensitivität und Untersuchungsmaterial	9
--	---

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Myeloische Neoplasien	1
1.1.1	Epidemiologie, klinische Präsentation und Pathogenese	1
1.1.2	Diagnostik und Klassifikation	2
1.1.3	Prognostische Faktoren und Risikostratifizierung	3
1.1.4	Therapie	4
1.2	Minimale Resterkrankung in myeloischen Neoplasien	5
1.2.1	Definition und Rationale	5
1.2.2	Empfehlungen zur Diagnostik minimaler Resterkrankung	6
1.2.3	MRD-Monitoring nach allogener Stammzelltransplantation	8
1.3	<i>Wilms' Tumor 1 (WT1) - Gen</i>	9
1.3.1	Grundlagen und prognostische Bedeutung in myeloischen Neoplasien	9
1.3.2	Quantifizierung der <i>WT1</i> -mRNA Expression	10
1.3.3	<i>WT1</i> -mRNA Expression als MRD-Marker nach allogener Stammzelltransplantation 10	
1.4	Ziele dieser Arbeit	11
2.	Publikation	13
3.	Diskussion	21
3.1	Frequenz der <i>WT1</i> -mRNA Überexpression und Anwendbarkeit als MRD-Marker im Vergleich zu anderen Methoden der MRD-Diagnostik in myeloischen Neoplasien	21
3.2	Vergleich der Sensitivität und Spezifität verschiedener Methoden der MRD- Diagnostik im Hinblick auf den Nachweis eines Rezidivs	21
3.3	Zeitliches Intervall zwischen Detektion einer Überexpression von <i>WT1</i> -mRNA in peripherem Blut und Nachweis des hämatologischen Rezidivs	23
3.4	Schlussfolgerung	23
	Literaturverzeichnis	25
	Danksagung	36

1 Einleitung

1.1 Myeloische Neoplasien

1.1.1 Epidemiologie, klinische Präsentation und Pathogenese

Der Begriff „myeloische Neoplasien“ umfasst die Erkrankungen der myelodysplastischen und myeloproliferativen Syndrome sowie die akuten myeloischen Leukämien. Da die Patienten, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, entweder an einem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder einer akuten myeloischen Leukämie (AML) erkrankt sind, beziehen sich die weiteren Ausführungen auf diese beiden Entitäten. Die myelodysplastischen Syndrome beinhalten eine heterogene Gruppe von Stammzellerkrankungen, welche durch eine klonale Hämatopoiese mit typischen molekular- und zytogenetischen Aberrationen und je nach Subtyp auch durch einen erhöhten Blastenanteil gekennzeichnet sind (Lowenthal and Marsden 1997; Cazzola and Malcovati 2005; Tefferi and Vardiman 2009; Nimer 2008; Steensma and Tefferi 2003). Sie treten mit einer Inzidenz von ca. 4 pro 100.000 Einwohner pro Jahr sowie einer Prävalenz von ca. 7 pro 100.000 Einwohner auf und gehören damit zu den häufigsten Stammzellerkrankungen (Neukirchen et al. 2011). Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 72 – 75 Jahren, wobei weniger als 10% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger als 50 Jahre alt sind (Kuendgen et al. 2006). Die Diagnosestellung erfolgt meist im Rahmen der Abklärung einer inzidentell aufgefallenen Zytopenie, vorwiegend einer Anämie, welche je nach Schweregrad für den Patienten zumeist durch eine Leistungsminderung klinisch apparent wird. Seltener liegt initial eine Leukopenie oder Thrombopenie vor, welche sich entweder durch eine Häufung bzw. protrahierte Ausheilung von Infektionen oder durch eine meist petechiale Blutungsneigung äußert (Hamblin 1992; Foran and Shammo 2012). Ursache für die Zytopenie im peripheren Blut sind Reifungs- und Differenzierungsstörungen der hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark, wobei auch Veränderungen des Knochenmarkstromas hierbei eine Rolle zu spielen scheinen (Geyh et al. 2013). Die mediane Überlebenszeit kann je nach vorliegendem Subtyp von wenigen Monaten bis vielen Jahren variieren. Zwischen 20 und 25% der Patienten mit MDS erleiden im Laufe der Erkrankung einen Progress in eine AML, wobei dieser Anteil ebenfalls je nach vorliegendem Subtyp variiert (Ulrich Germing et al. 2008; Ulrich Germing and Kündgen 2012). Die AML repräsentiert ebenfalls eine biologisch heterogene klonale Stammzellerkrankung, welche je nach Subtyp die unterschiedlichen Reihen der Myelopoiese

betrifft. Die Indizenz liegt bei 3,7 pro 100.000 Einwohner pro Jahr und steigt mit dem Alter an, wobei das mediane Erkrankungsalter bei 72 Jahren liegt (Juliussen et al. 2009). Der myeloische Stammzellklon ist zumeist hoch proliferativ und führt im Knochenmark zu einer Verdrängung der gesunden Hämatopoiese, woraus in der Regel eine ausgeprägtere Zytopenie im peripheren Blut resultiert, als bei Patienten mit MDS. Entsprechend häufiger und in stärker Ausprägung zeigen Patienten mit AML auch die aus der Zytopenie resultierenden Symptome, wie Infektanfälligkeit, Blutungsstigmata oder Leistungsminderung (Porcu et al. 2000; Shahab and Raziq 2014; Hamid 2013). Risikofaktoren für das Auftreten eines MDS oder einer AML sind die Exposition gegenüber organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Benzolen, oder eine vorhergehende Zytostatika-, Strahlen- oder Radiojodtherapie, wobei man dann von therapieassoziiert spricht (Leone et al. 2007; Thomas Schroeder et al. 2012; Sill et al. 2011).

1.1.2 Diagnostik und Klassifikation

Zur Diagnostik einer klonalen myeloischen Knochenmarkerkrankung gehört die Untersuchung des peripheren Bluts (u.a. Blutbild, Differenzialblutbild, LDH, Ferritin, Retikulozytenzahl) und des Knochenmarks mittels zytologischer Ausstrichpräparate. Auf dieser Grundlage erfolgt die Einordnung in eine der nach WHO definierten Subgruppen von MDS und AML (Arber et al. 2016). Die Klassifikation der MDS beruht im Wesentlichen auf dem Vorliegen und der Ausprägung von Dysplasiezeichen sowie auf einer Quantifizierung des Blastenanteils. Dabei wird unterschieden, ob eine (unilineäre Dysplasie, sog. MDS *single lineage dysplasia*, MDS-SLD) bzw. zwei oder alle drei Zellreihen (multilineäre Dysplasie, sog. MDS *multi lineage dysplasia*, MDS-MLD) von dysplastischen Veränderungen betroffen sind. Falls in den beiden letzteren Gruppen mehr als 15% Ringsideroblasten und/oder eine Mutation im *SF3B1*-Gen vorliegen, spricht man von MDS-SLD RS (*MDS single lineage dysplasia with ringsideroblasts*) bzw. MDS-MLD RS (*MDS multi lineage dysplasia*). Eine weitere Gruppe von Patienten weisen eine Deletion am langen Arm des Chromosom 5 (sog. MDS del5q) auf, welche entweder isoliert oder mit weiteren Aberrationen vorkommt, wobei davon Aberrationen am Chromosom 7 explizit ausgeschlossen sind. Im Falle eines erhöhten Blastenanteils bzw. Blastenexzess, wird zwischen MDS-EB1 (*MDS with excess of blasts*) mit 5 bis 9% Blasten und einem MDS-EB2 mit 10 bis 19% Blasten unterschieden. Bei Überschreiten eines Anteils von 20% myeloischer Blasten handelt es sich um eine AML. Eine seltene Entität sind die MDS vom „unklassifizierten Typ“, bei denen ohne zytologisch charakteristische Veränderungen die Diagnose allein auf dem Nachweis MDS-typischer zytogenetischer Aberrationen beruht. Da zytogenetische Aberrationen nicht nur die

Einordnung gemäß WHO-Klassifikation bestimmen, sondern auch die krankheitsspezifische Risikostratifizierung beeinflussen, ist eine solche Analyse mittlerweile obligater Bestandteil der Knochenmarkdiagnostik (siehe Punkt 1.1.3) (P. L. Greenberg et al. 2012; Malcovati et al. 2013). Auch somatische Mutationen haben einen Einfluss auf die Prognose der Patienten mit MDS (Bejar et al. 2011, 2012; Haferlach et al. 2014; Kennedy and Ebert 2017), sodass bei Diagnosestellung eines MDS auch eine molekulargenetische Untersuchung distinkter Mutationen, z.B. ASXL1, RUNX1, EZH2, TP53, empfohlen wird (Bejar 2015; Malcovati et al. 2013). Im Gegensatz hierzu sind zytogenetische und molekulargenetische Aberrationen neben den zytologischen Aspekten bereits fester Bestandteil bei der diagnostischen Einordnung einer AML gemäß aktueller WHO-Klassifikation (Arber et al. 2016). So bilden der Nachweis vier distinkter somatischer Mutationen (AML with mutated NPM1, AML with biallelic mutations of CEBPA, AML with BCR-ABL1, AML with mutated RUNX1) sowie mehrere Translokationen bzw. Inversionen eigenständige Entitäten innerhalb der aktuellen WHO-Klassifikation 2016. Zudem wird eine weitere Gruppe der AML mit bestimmten, für MDS typischen zytogenetischen Aberrationen als sog. „AML mit MDS-assoziierten Veränderungen“ abgegrenzt. Circa die Hälfte aller AML können somit beruhend auf dem Nachweis bestimmter molekular- oder zytogenetischer Veränderungen klassifiziert werden, sodass entsprechende Untersuchungen bei Erstdiagnose empfohlen werden (Arber et al. 2016; Döhner et al. 2017).

1.1.3 Prognostische Faktoren und Risikostratifizierung

Zur Abschätzung der Prognose von MDS-Patienten wurden der Internationale Prognose-Score (sog. *International Prognostic Scoring System*, IPSS) bzw. eine im Jahr 2012 revidierte Version (sog. *International Prognostic Scoring System revised*, IPSS-R) etabliert (P. Greenberg et al. 1997; P. L. Greenberg et al. 2012), durch welche anhand des Blastenanteils im Knochenmark, des Ausprägungsgrades der Zytopenien sowie des Vorliegens chromosomaler Aberrationen eine Einteilung in fünf Risikogruppen (sehr niedrig, niedrig, intermediär, hoch, sehr hoch) erfolgt. Diese weisen signifikante Unterschiede hinsichtlich des medianen Gesamtüberlebens (8,8 Jahre für die sehr niedrige vs. 0,8 Jahre für die sehr hohe Risikogruppe) sowie hinsichtlich des Risikos für einen Progress in eine AML auf (P. L. Greenberg et al. 2012; Ulrich Germing and Kündgen 2012). Weitere Parameter, die zwar nicht Eingang in dieses Prognosesystem gefunden haben, aber in verschiedenen Arbeiten validiert wurden und daher zur individuellen Prognoseabschätzung herangezogen werden können sind u.a. eine Erhöhung der LDH (U. Germing et al. 2005), das Ausmaß der Transfusionsbedürftigkeit (Hiwase et al., n.d.) sowie der

Nachweis distinkter somatischer Mutationen (Bejar et al. 2011, 2012; Kennedy and Ebert 2017; Lindsley et al. 2017; Haferlach et al. 2014; Gerstung et al. 2015). Die Risikostratifizierung der Patienten mit AML erfolgt nach den im Jahr 2017 aktualisierten Empfehlungen des European LeukemiaNet. Basierend auf verschiedenen somatischen Mutationen und zytogenetischen Veränderungen erfolgt eine Einteilung in drei Risikogruppen (günstig, intermediär und ungünstig) (Döhner et al. 2017). Die Zuordnung eines Patienten zu einer dieser Risikogruppen hat direkten Einfluss auf die Therapieentscheidung hinsichtlich konventioneller Chemotherapie bzw. Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation (siehe Abschnitt 1.1.4). Neben den krankheitsassoziierten zytogenetischen und molekulargenetischen Risikofaktoren beeinflussen auch patientenassoziierte Faktoren wie Alter und Komorbiditäten die individuelle Prognose, da diesen Parametern auch eine wesentliche Rolle bei der Therapieauswahl zukommt (Röllig et al. 2011; Döhner et al. 2017). Aber nicht nur Faktoren, die bereits bei Diagnosestellung vorliegen, sind prognosebestimmend, auch der individuelle Krankheitsverlauf, insbesondere die Tiefe der erreichten Remission, hat eklatanten Einfluss auf die individuelle Prognose. So konnten verschiedene Arbeiten zeigen, dass das Vorliegen einer minimalen Resterkrankung nach abgeschlossener Primärtherapie prognostische Relevanz hinsichtlich des Rückfallrisikos hat (Ossenkoppele and Schuurhuis 2014; Buccisano et al. 2010; Chen et al. 2015; Freeman et al. 2013; Terwijn et al. 2013). Dieser Aspekt findet in den aktualisierten Empfehlungen des European LeukemiaNet Beachtung, da entsprechende Empfehlungen zur MRD-Diagnostik gegeben werden (Döhner et al. 2017; Bullinger, Döhner, and Döhner 2017).

1.1.4 Therapie

Die Auswahl der Therapie von Patienten mit MDS ist neben Alter und Komorbiditäten vor allem von der Risikostratifizierung nach IPSS bzw. IPSS-R abhängig (Steensma 2018). Da es sich bei den Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, ganz überwiegend um Patienten mit einem intermediären oder hohen Risikoprofil handelt, beschränken sich die weiteren Ausführungen auf die Therapiemöglichkeiten für Patienten dieser Risikogruppen und im Besonderen auf die Therapieform der allogenen Stammzelltransplantation. Diese stellt einen chemo-/immuntherapeutischen Ansatz dar und ist die einzige kurative Therapieoption für Patienten mit MDS. Bei Patienten mit Hochrisiko-MDS sollte diese, falls ein passender Familien- oder Fremdspender vorliegt, möglichst frühzeitig durchgeführt werden, wohingegen Patienten mit Niedrig- oder Intermediärrisiko-MDS erst im Falle eines Progresses stammzelltransplantiert werden sollten (Malcovati et al. 2013). Auch bei Patienten mit AML spielt das zytogenetische

bzw. molekulargenetische Risikoprofil eine wesentliche Rolle bei der Therapieentscheidung. Bei Patienten mit ungünstigem Risikoprofil sollte eine Stammzelltransplantation mit einem passenden Familien- oder Fremdspender idealerweise in erster kompletter Remission als konsolidierende Maßnahme erfolgen und bei Patienten mit intermediärem Risikoprofil abhängig von der Spenderverfügbarkeit sowie der Komorbiditäten zumindest diskutiert werden. Für Patienten, die eine primäre Refraktärität gegenüber Chemotherapie aufweisen, besteht unabhängig vom Risikoprofil die Indikation zur Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation (Döhner et al. 2017). Im Kontext der Stammzelltransplantation wird zunächst eine vorbereitende Chemotherapie, sog. Konditionierungskemotherapie, verabreicht, mit dem Ziel den malignen Zellklon möglichst zu eradizieren. Hiernach folgt die eigentliche Stammzelltransplantation, die langfristig eine Krankheitskontrolle durch das transplantierte Immunsystems ermöglichen soll (Kolb 2008; Dickinson et al. 2017). Bei jungen Patienten sowie in Abwesenheit von relevanten Komorbiditäten handelt es sich um eine myeloablative Konditionierungskemotherapie (Gyurkocza and Sandmaier 2014; Jethava et al. 2017). Jedoch wurden in den letzten Jahren zunehmend Konditionierungsregime mit reduzierter Intensität entwickelt, welche zwar nicht myeloablativ wirken, jedoch auch älteren Patienten bis ungefähr 75 Jahre den Zugang zu dieser Therapieform ermöglicht haben (Savani et al. 2016; Sengsayadeth et al. 2015; Lekakis and de Lima 2008; Kröger 2012).

1.2 Minimale Resterkrankung in myeloischen Neoplasien

1.2.1 Definition und Rationale

Bisher wurde das Vorliegen einer Remission auf Basis der Knochenmarkzytologie überprüft. Dies ermöglicht den Nachweis einer kranken unter ca. 20 gesunden Zellen, welches einer Sensitivität von 5% entspricht. Der Begriff „minimale Resterkrankung“ (sog. *minimal residual disease*, MRD) oder „messbare Resterkrankung“ (sog. *minimal measureable disease*) bezeichnet den Nachweis kranker Zellen auf einem Niveau von $1:10^4$ bis $1:10^6$ (Schuurhuis et al. 2018). Zahlreiche Arbeiten konnten darstellen, dass neben den bei Erstdiagnose erhobenen klinischen, zytogenetischen und molekulargenetischen Befunden auch der Nachweis einer minimalen Resterkrankung bei Patienten mit myeloischen Neoplasien prognostische Relevanz hat (Krönke et al. 2011; Shayegi et al. 2013; Grimwade, Vyas, and Freeman 2010; Uwe Platzbecker et al. 2017; Agrawal et al. 2016; Yin et al. 2012; Balsat et al. 2017). Ziel eines im klinischen Alltag etablierten MRD-Monitorings ist zum einen die Tiefe einer Remission noch genauer bestimmen zu können, wobei

diesem Aspekt bereits in der aktuellen ELN-Guideline zur Behandlung von akuten myeloischen Leukämien mit der Einführung einer neuen Kategorie, die den Zustand einer „kompletten Remission ohne MRD“ (sog. CR_{MRD}-) definiert, Rechnung getragen wurde (Döhner et al. 2017). Zum anderen ermöglicht ein regelmäßiges MRD-Monitoring bereits während der Primärtherapie eine Prädiktion des Patientenoutcomes hinsichtlich des Rezidivrisikos (Shayegi et al. 2013; Krönke et al. 2011; Cilloni et al. 2009). Des Weiteren dient regelmäßiges MRD-Monitoring nach abgeschlossener Konsolidierung dazu, im Falle eines Rezidivs dieses möglichst früh zu detektieren und somit eine zeitnahe therapeutische Intervention zu erlauben (Schoorhuis et al. 2018; Hourigan and Karp 2013; Kröger et al. 2010; Ravandi et al. 2017; Benton and Ravandi 2017). Dies ist insbesondere im Kontext der allogenen Stammzelltransplantation von Bedeutung, da Patienten im Falle eines Rezidivs von einer möglichst frühzeitigen Rezidivtherapie, idealerweise noch zum Zeitpunkt des molekularen Rezidivs, profitieren (Bacher, Talano, and Bishop 2012; Kröger et al. 2010; Schmid et al. 2018; Thomas Schroeder et al. 2015; Tsirigotis et al. 2016). Die aktuell vorliegenden Arbeiten, welche das Thema der minimalen Resterkrankung behandeln, beziehen sich ganz überwiegend auf die Gruppe der Patienten mit AML. MRD-Diagnostik bei Patienten mit MDS spielt, abgesehen vom Kontext der allogenen Stammzelltransplantation bzw. im Posttransplantationsverlauf, im klinischen Alltag bisher keine Rolle.

1.2.2 Empfehlungen zur Diagnostik minimaler Resterkrankung

Es gibt zwei wesentliche methodische Ansätze, die das Monitoring einer minimalen Resterkrankung ermöglichen. Zum einen die multiparametrische Flow-Zytometrie, die entweder Leukämie-assoziierte Immunphänotypen, sog. *Leukaemia-associated immunophenotype* (LAIP), oder aberrante Koexpressionsmuster, sog. *different from normal* (DfN), untersucht und hiermit üblicherweise eine Sensitivität von 1×10^{-4} erreicht (Hourigan and Karp 2013; Schoorhuis et al. 2018; Terwijn et al. 2013). Zum anderen werden auch molekulargenetische Untersuchungsmethoden wie qRT-PCR oder zunehmend auch NGS-basierte Ansätze zur MRD-Diagnostik genutzt (Schoorhuis et al. 2018). Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der molekularen MRD-Diagnostik liegt, werden sich die weiteren Ausführungen auf diesen Aspekt beschränken. Zwar wurden in den letzten Jahren sowohl in AML, als auch in MDS eine Vielzahl krankheitsspezifischer zytogenetischer und molekulargenetischer Marker identifiziert (Bejar et al. 2011, 2012; Haferlach et al. 2014; Papaemmanuil et al. 2016; Bullinger, Döhner, and Döhner 2017), jedoch sind die einzelnen Aberrationen jeweils nur in einem geringen Anteil der Patienten

nachweisbar. So stellen die NPM1- und FLT3-ITD Mutationen mit einer Frequenz von ca. 20% und 35% sowie die TET2-Mutation mit einer Frequenz von 34% die häufigsten in AML bzw. MDS nachweisbaren Mutationen dar (Papaemmanuil et al. 2016; Haferlach et al. 2014). Mittels moderner Sequenzieretechniken wiesen umfangreiche Arbeiten zwar in 96% der Patienten mit AML (Papaemmanuil et al. 2016) und 89,5% der Patienten mit MDS (Haferlach et al. 2014) mindestens eine Mutation nach, jedoch ist eine so umfassende Diagnostik im klinischen Alltag aufgrund von Kosten-/Nutzen-Effizienz nicht umsetzbar. Daher steht mit den aktuell in der Routinediagnostik etablierten zytogenetischen und molekulargenetischen Methoden nur für ungefähr die Hälfte der Patienten mit myeloischen Neoplasien ein MRD-Marker zur Verfügung. Hinzukommt, dass etablierte Methoden der MRD-Diagnostik an verschiedenen Standorten nach unterschiedlichen Protokollen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten im klinischen Verlauf durchgeführt werden, weshalb eine Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Laboren aktuell nur sehr begrenzt möglich ist. Um diesbezüglich eine Vereinheitlichung zu erreichen, wurden 2018 vom European LeukemiaNet Empfehlungen zur MRD-Diagnostik bei Patienten mit AML herausgegeben (Schuurhuis et al. 2018). Da in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen werden konnte, dass sowohl eine Persistenz einer NPM1-Mutation (Shayegi et al. 2013; Krönke et al. 2011; Balsat et al. 2017), als auch der persistierende Nachweis der Fusionsgene *RUNX1-RUNX1T1* (Agrawal et al. 2016; Willekens et al. 2016), *CBF-MYH11* (Yin et al. 2012) und *PML-RARA* (Uwe Platzbecker et al. 2017; Grimwade et al. 2009) prädiktiv für einen drohenden Rückfall ist, wird ein Monitoring dieser Mutation bzw. Genfusionen per qRT-PCR vom European LeukemiaNet empfohlen. Hierbei wird üblicherweise eine Sensitivität von 1×10^{-3} – 1×10^{-6} erreicht (Hourigan and Karp 2013; Schuurhuis et al. 2018). Falls keiner der gerade genannten Marker bei Erstdiagnose nachweisbar ist, sollte ein MRD-Monitoring mittels *WT1*-Expression erfolgen. Da bestimmte Marker wie z.B. die FLT3-ITD/TKD-Mutation, NRAS- bzw. KRAS-Mutationen sowie IDH1/2-Mutationen im Rezidiv nicht stabil nachweisbar sind (Schnittger et al. 2012; Meggendorfer et al. 2014), wird ein alleiniges Monitoring dieser Mutationen nicht empfohlen. Auch Mutationen im ASXL1-, TET2- oder DNMT3A-Gen sollten im Rahmen eines MRD-Monitoring nur in Kombination mit anderen MRD-Markern, jedoch nicht alleine verfolgt werden, da diese zum einen trotz Erreichen einer morphologisch kompletten Remission auf relevantem Niveau bestehen bleiben können ohne einen wirklichen Krankheitswert anzuzeigen (Corces-Zimmerman et al. 2014). Zum anderen sind diese Mutationen teils auch bei gesunden Individuen fortgeschrittenen Alters nachweisbar und bezeichnen dann den Zustand einer sog. *age related clonal hematopoiesis* oder einer sog. *clonal hematopoiesis of indetermined potential* (CHIP) (Xie et al. 2014; Jaiswal et al. 2014; Steensma et al. 2015). Bzgl. der Zeitpunkte wird ein MRD-Assessment

nach erfolgter Induktion bzw. unmittelbar vor Beginn sowie nach Abschluss der Konsolidierung für 2 Jahre alle 3 Monate aus dem Knochenmark oder alle 4 bis 6 Wochen aus peripherem Blut empfohlen (Schuurhuis et al. 2018). Für ein MRD-Monitoring nach allogener Stammzelltransplantation existieren keine Empfehlungen bzgl. Auswahl der MRD-Marker und Zeitpunkten der MRD-Detektion.

1.2.3 MRD-Monitoring nach allogener Stammzelltransplantation

Ein Rezidiv der malignen Grunderkrankung repräsentiert die häufigste Ursache für ein Therapieversagen nach allogener Stammzelltransplantation bei AML- und MDS-Patienten und ist mit einer sehr ungünstigen Prognose verbunden (Barrett and Battiwalla 2010; Schmid et al. 2018, 2012). Verschiedene Arbeiten konnten belegen, dass Patienten auf eine Rezidivtherapie beispielsweise mit hypomethylierenden Substanzen und/oder Donor-Lymphozyten Infusionen (DLI) besser ansprechen, je kleiner der leukämische Zellklon ist (Thomas Schroeder et al. 2015, 2018; T. Schroeder et al. 2013; U. Platzbecker et al. 2012). Wie im Vorfeld beschrieben profitieren Patienten daher von einem frühzeitigen Beginn der Rezidivtherapie, weshalb zahlreiche Arbeiten sich in den letzten Jahren mit der Fragestellung befasst haben, mit welcher Diagnostik ein drohendes hämatologisches Rezidiv möglichst frühzeitig detektiert werden kann (Kröger, Miyamura, and Bishop 2011). Da ein Großteil der Rezidive innerhalb der ersten beiden Jahre nach Stammzelltransplantation auftritt, ist diese Phase durch regelmäßige Knochenmarkpunktionen zur Remissionskontrolle, typischerweise an Tag +28, +60, +100, +200 und +300, geprägt. Dabei erfolgen zytologische und immunzytologische Untersuchungen sowie die Analyse krankheitsspezifischer Marker. Im Vergleich zur MRD-Diagnostik im Setting vor Stammzelltransplantation kann im Posttransplantationsverlauf neben dem Monitoring zytogenetischer und/oder molekulargenetischer Alterationen auch die Quantifizierung des Spender- bzw. Empfängeranteils als Marker für das Vorliegen einer minimalen Resterkrankung genutzt werden. Die klassische Analyse des Donorchimärismus erfolgt durch Amplifikation und Abgleich sog. *Short tandem repeat* – Sequenzen von Spender und Empfänger und erreicht eine Sensitivität von 1×10^{-2} (Hourigan and Karp 2013; Bader et al. 2005), wobei durch vorhergehende Vorbereitung des Knochenmarkaspirates dieser Untersuchung auch lediglich die CD34+ Progenitoren zugeführt werden können, was die Sensitivität erhöht (Bornhäuser et al. 2009; Mattsson et al. 2001; Scheffold et al. 2004). Im Falle einer Transplantation mit einem gegengeschlechtlichen Spender wird der Spenderanteil auch durch XY-FISH Analysen quantifiziert, wobei die Sensitivität mit 1×10^{-2} geringer ist, da bei dieser Untersuchung auch

Knochenmarkstromazellen, die den Chromosomensatz des Empfängers aufweisen, artifiziell mit untersucht werden (Rieger et al. 2005; Dickhut et al. 2005). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Methoden der MRD-Diagnostik im Posttransplantationsverlauf und die jeweils erreichten Sensitivitäten.

Tabelle 1: Methoden der MRD-Diagnostik, jeweilige Sensitivität und Untersuchungsmaterial

Methode	Flow-Zytometrie	Zytogenetik/ FISH-Analyse	qRT-PCR/ NGS	XY-FISH	Donor-chimärismus	<i>WT1</i> qRT-PCR
Sensitivität	10 ⁻⁴	10 ⁻¹ - 10 ⁻²	10 ⁻³ - 10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻² - 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
favorisiertes Untersuchungsmaterial	KM	KM	KM	KM	KM	PB

1.3 *Wilms' Tumor 1 (WT1)* - Gen

1.3.1 Grundlagen und prognostische Bedeutung in myeloischen Neoplasien

Das *Wilms' Tumor 1 (WT1)* – Gen ist auf der Bande 13 des kurzen Arms von Chromosom 11 (Chr. 11p13) lokalisiert, kodiert für einen Transkriptionsfaktor (Call et al. 1990; Haber and Buckler 1992) und wurde initial im Kontext der kindlichen Wilms' Tumore beschrieben (Gessler et al. 1990; Algar et al. 1995). Zahlreiche Mutationen führen zur klinischen Ausprägung dieser Tumore, sodass das *WT1*-Gen in deren Pathogenese als Tumorsuppressorgen fungiert (Huff, n.d.; Ruteshouser, Robinson, and Huff, n.d.). Die Rolle des *WT1*-Gens im Kontext myeloischer Neoplasien ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht eindeutig eruiert. Ungefähr 6-15% der Patienten mit AML weisen Mutationen im *WT1*-Gen auf (Hou et al. 2010; Summers et al. 2007; King-Underwood, Renshaw, and Pritchard-Jones 1996; King-Underwood and Pritchard-Jones 1998; Pritchard-Jones and King-Underwood 1997), wobei nicht klar ist, inwieweit diese von prognostischer Bedeutung hinsichtlich Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben sind (Paschka et al. 2008; Virappane et al. 2008; Gaidzik et al. 2009). Der überwiegende Anteil der Patienten mit AML sowie ca. 50% der Patienten mit MDS weisen im Vergleich zu gesunden Individuen eine Überexpression von *WT1* auf mRNA Ebene auf (Tamaki et al. 1999; Cilloni and Saglio 2004; Østergaard et al. 2004, 1; Rosenfeld, Cheever, and Gaiger 2003), welche bei Patienten mit AML von prognostischer Bedeutung ist (Nomdedeu et al., Bergmann et al. Blood 1997, Barragan et al. Haematologica 2004, cilloni). So konnten Cilloni et al. nachweisen, dass eine stärkere Reduktion des *WT1*-Transkriptionslevel nach Induktionstherapie mit einem signifikant reduzierten

Rückfallrisiko verknüpft ist (Cilloni et al. 2009, 2008). Entsprechend resultiert eine persistierende Überexpression der *WT1*-mRNA nach abgeschlossener Konsolidierung in einem erhöhten Rezidivrisiko (Cilloni et al. 2009). Dies führte dazu, dass von Seiten des European LeukemiaNet eine Empfehlung ausgegeben wurde die *WT1*-Expression aus peripherem Blut als MRD-Marker in AML zu nutzen, falls keine bereits als MRD-Marker etablierten Mutationen (*NPM1*-Mutationen) bzw. Genfusionen (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBF-MYH11*, *PML-RARA*) vorliegen (Schuurhuis et al. 2018). Auch bei Patienten mit MDS ist eine *WT1*-mRNA Überexpression mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien und Gesamtüberleben verknüpft (Cilloni and Saglio 2004). Ob und insbesondere durch welche präzisen Mechanismen Mutationen des *WT1*-Gens oder eine Überexpression auf mRNA-Ebene in die Genese myeloischer Neoplasien eingebunden sind, ist ungeklärt.

1.3.2 Quantifizierung der *WT1*-mRNA Expression

Die *WT1*-mRNA Expression wird üblicherweise mittels qRT-PCR aus peripherem Blut oder Knochenmark bestimmt. Es existieren unterschiedliche, nicht standardisierte qRT-PCR Assays, die dementsprechend mit unterschiedlichen Sensitivitäten von 1×10^{-2} bis 1×10^{-4} *WT1*-mRNA nachweisen können (Ogawa et al. 2003; Østergaard et al. 2004, 1; Osborne et al. 2005; Van Dijk et al. 2002). Hieraus resultieren wiederum verschiedene cut-off Level, welche zwischen normaler und erhöhter *WT1*-mRNA Expression differenzieren. Daher ist zum einen eine Vergleichbarkeit der Werte eines individuellen Patienten, bei dem die Quantifizierung der *WT1*-Expression in unterschiedlichen Laboren durchgeführt wurde, zum anderen eine Vergleichbarkeit wissenschaftlicher Arbeiten, die verschiedene cut-off Level benutzen, nicht möglich. Dem hat das European LeukemiaNet in den aktuellen Empfehlungen zur MRD-Diagnostik Rechnung getragen, indem es zur *WT1*-mRNA Expressionsanalyse die Benutzung eines zertifizierten, standardisierten qRT-PCR Assay, welcher über einen validierten cut-off Level verfügt und in peripherem Blut eine Sensitivität von 1×10^{-4} erreicht, empfohlen hat (Schuurhuis et al. 2018),.

1.3.3 *WT1*-mRNA Expression als MRD-Marker nach allogener Stammzelltransplantation

Aufgrund der nachgewiesenen prognostischen Bedeutung einer *WT1*-mRNA Überexpression während konventioneller Chemotherapie bei Patienten mit AML (Barragán et al. 2004; Cilloni et al. 2008, 2009; Nomdedéu et al. 2013) ist auch eine mögliche Funktion von *WT1* als MRD-Marker nach allogener Stammzelltransplantation in den Fokus wissenschaftlichen Interesses

gerückt. Ogawa et al. zeigten in einer Arbeit, welche 72 Patienten mit akuter Leukämie umfasste, dass das Risiko binnen 40 Tagen zu rezidivieren signifikant mit der Höhe des im Knochenmark bestimmten *WT1*-mRNA Expressionslevel korreliert (Ogawa et al. 2003). Auch Kwon et al. konnten in einer Kohorte von 21 Patienten nachweisen, dass ein erhöhtes *WT1*-Expressionslevel im peripherem Blut nach allogener Stammzelltransplantation das Rezidivrisiko signifikant erhöht. Zudem war bei sieben von insgesamt neun rezidierten Patienten die *WT1*-mRNA Überexpression der erste Hinweis auf das Rezidiv während die Chimärismusanalyse und die multiparametrische Flow-Zytometrie aus dem Knochenmark initial noch unauffällige Ergebnisse erbrachten (Kwon et al. 2012). Auch Lange et al. verglichen in 88 Patienten mit AML und MDS nach allogener Stammzelltransplantation, welche Methode des MRD-Monitoring ein Rezidiv zum frühesten Zeitpunkt nachweisen konnte. Hier zeigte sich, dass eine Erhöhung der *WT1*-mRNA Expression neben einem Abfall des CD34-selektierten Donorchimärismus auf <90% ein Rezidiv mit höherer Sensitivität und Spezifität nachweist, als dies durch unselektierte Donorchimärismusanalysen oder FISH-Analysen krankheitsspezifischer Aberrationen möglich ist (Lange et al. 2011). Inwieweit die *WT1*-mRNA Expression bei Patienten mit AML und MDS im Posttransplantationsverlauf im Vergleich zu den bisher im klinischen Alltag etablierten MRD-Methoden wie qRT-PCR, NGS oder der konventionellen Zytogenetik als zuverlässiger MRD-Marker dienen kann, ist bislang nicht untersucht.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Wie unter 1.3.3 beschrieben gibt es bisher nur wenige Daten, welche die Bedeutung der *WT1*-mRNA Expression als MRD-Marker bei Patienten mit AML und MDS nach allogener Stammzelltransplantation beleuchten. Insbesondere fehlen Daten, welche die Sensitivität und Spezifität der *WT1*-mRNA Expression hinsichtlich Nachweis eines drohenden Rezidivs mit der Sensitivität und Spezifität vergleichen, die andere etablierte Methoden erreichen. Auch die Frage des Zeitraumes, der zwischen der Detektion eines erhöhten *WT1*-mRNA Expressionslevel und der Diagnose des Rezidivs liegt und somit Möglichkeit für therapeutische Intervention, wie rasches Ausschleichen der Immunsuppression oder präemptive Donorlymphozyten-Infusion bietet, ist bisher unzureichend untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher folgende Fragen zu beantworten:

- Lässt sich durch serielle Messungen der *WT1*-mRNA Expression in peripherem Blut von

Patienten mit AML und MDS nach allogener Stammzelltransplantation ein Rezidiv der Grunderkrankung detektieren?

- Mit welcher Sensitivität/Spezifität lässt sich durch Messung der *WT1*-mRNA Expression in peripherem Blut von Patienten mit AML und MDS nach allogener Stammzelltransplantation ein Rezidiv detektieren?
- Mit welcher Sensitivität/Spezifität lässt sich im Vergleich durch andere bereits im klinischen Alltag etablierte Methoden der MRD-Diagnostik (STR-basierter Chimärismus, konventionelle Zytogenetik, FISH, qRT-PCR, NGS) ein Rezidiv detektieren?
- Wie viel Zeit liegt im Median zwischen einem in peripherem Blut gemessenen erhöhten *WT1*-mRNA Expressionslevel und der Diagnose des hämatologischen Rezidivs?

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen basieren auf den folgenden positiv bewerteten Ethikvoten: 3768 und 3973.

2. Publikation

'Wilms' Tumor 1 Gene Expression Using a Standardized European LeukemiaNet-Certified Assay Compared to Other Methods for Detection of Minimal Residual Disease in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myelogenous Leukemia after Allogeneic Blood Stem Cell Transplantation'

Christina Rautenberg, Sabrina Pechtelt, Barbara Hildebrandt, Beate Betz, Ariane Dienst, Kathrin Nachtkamp, Mustafa Kondakci, Stefanie Geyh, Dagmar Wieczorek, Rainer Haas, Ulrich Germing, Guido Kobbe and Thomas Schroeder

Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation, May 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.05.011>.

PMID 29753838



Biology of Blood and Marrow Transplantation

journal homepage: www.bbmt.org



Wilms' Tumor 1 Gene Expression Using a Standardized European LeukemiaNet-Certified Assay Compared to Other Methods for Detection of Minimal Residual Disease in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myelogenous Leukemia after Allogeneic Blood Stem Cell Transplantation

Christina Rautenberg¹, Sabrina Pechtel¹, Barbara Hildebrandt², Beate Betz², Ariane Dienst¹, Kathrin Nachtkamp¹, Mustafa Kondakci¹, Stefanie Geyh¹, Dagmar Wieczorek², Rainer Haas¹, Ulrich Germing¹, Guido Kobbe¹, Thomas Schroeder^{1,*}

¹ Department of Hematology, Oncology and Clinical Immunology, Medical Faculty, University of Duesseldorf, Duesseldorf, Germany

² Institute of Human Genetics, Medical Faculty, Heinrich Heine-University, Duesseldorf, Germany

Article history:

Received 24 January 2018

Accepted 8 May 2018

Key Words:

WT1
Minimal residual disease
Myelodysplastic syndromes
Acute myelogenous leukemia
Relapse
Allogeneic transplantation

A B S T R A C T

Overexpression of the Wilms' tumor 1 (*WT1*) gene is informative in many patients with acute myelogenous leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS) and is measurable in peripheral blood (PB). Despite these advantages, *WT1* has not broadly been established as a marker for minimal residual disease (MRD) monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) due to limited patient numbers, differing sample sources, and nonstandardized in-house methods. To estimate the value of *WT1* as an MRD marker, we serially quantified PB *WT1* expression using a standardized European LeukemiaNet-certified assay in 59 patients with AML and MDS after allo-HSCT. We compared its performance with routine methods such as chimerism, XY-fluorescence in situ hybridization (FISH), disease-specific cytogenetic, and molecular analyses, which were accessible in 100%, 34%, 68%, and 37%, respectively. Twenty-four patients (41%) relapsed within a median of 126 days after allo-HSCT, and 20 of them showed at least 1 elevated *WT1* value above the validated cutoff. The other 35 patients (59%) remained in complete remission, and only 1 patient had a transient increase in *WT1* expression. This reflects a sensitivity of 83% and a specificity of 97% for *WT1* and appears to be favorable compared with the sensitivities and specificities observed for chimerism (33% and 91%), XY-FISH (67% and 73%), cytogenetic (33% and 77%), and molecular (78% and 85%) analyses. Further supporting its predictive impact, elevated *WT1* expression prompted an earlier BM biopsy and consecutively the diagnosis of relapse in 62% of patients. The results of this real-life experience imply that PB *WT1* expression is measurable by a standardized assay and predicts imminent relapse after allo-HSCT with high sensitivity and specificity in most patients with AML and MDS.

© 2018 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

INTRODUCTION

In patients with myeloid malignancies, such as acute myelogenous leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS), relapse remains the main cause of treatment failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) [1–4]. Several studies addressing therapeutic strategies for relapse after allo-HSCT have shown that treatment is more

effective when initiated at molecular relapse rather than at hematologic relapse [5]. Therefore, early detection of imminent relapse, ideally at a molecular level, is a prerequisite for successful therapeutic intervention and can be achieved by regular monitoring of minimal residual disease (MRD) after allo-HSCT [6–8]. Indeed, cytogenetics and indirect methods, such as chimerism analysis, are broadly established in clinical routine, but have a limited sensitivity and thus cannot provide an early reliable detection of relapse [9].

Although several molecular aberrations allowing detection of MRD with higher sensitivity using quantitative RT-PCR (qRT-PCR) or next-generation sequencing (NGS) have recently been identified in patients with AML and MDS [10], they

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 2342.

* Correspondence and reprint requests: Thomas Schroeder, MD, Department of Hematology, Oncology and Clinical Immunology, University of Duesseldorf, Medical Faculty, Moorenstr 5, Düsseldorf 40225, Germany. (T. Schroeder).

E-mail address: thomas.schroeder@med.uni-duesseldorf.de (T. Schroeder).

<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.05.011>

1083-8791/© 2018 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

currently do not fulfill the requirements of an “ideal” MRD marker. For instance, they are present only in subgroups of patients and may show instability during the disease course as a consequence of clonal evolution [11–13]. In addition, there is often a lack of standardized assays and the need for bone marrow (BM) as the optimal sample source, both attributes also applying to multiparameter flow cytometry.

A molecular marker that may provide the properties of an “ideal” MRD marker is the Wilms' tumor gene (*WT1*), which encodes for a transcription factor that is overexpressed in the majority of AML cases and approximately one-half of MDS cases [14–16]. In addition, a European LeukemiaNet (ELN)-certified qRT-PCR assay that allows standardized measurement and offers a reproducible cutoff value to distinguish between healthy state and disease is commercially available. Another advantage of *WT1* as MRD marker is a similar or even higher sensitivity and specificity when measured in peripheral blood (PB) compared with BM, enabling regular monitoring while maintaining patient comfort [17]. Several previous reports have focused on the role of *WT1* expression for monitoring of MRD in AML after conventional chemotherapy to predict imminent relapse [17–20]. In contrast, to date, only a limited number of studies have examined the use of *WT1* measurement to monitor MRD in patients with myeloid malignancies after allo-HSCT [21–23]. Nonetheless, the limited number of patients, differing sample sources (PB or BM), and use of in-house methods have impeded a definitive ranking of *WT1* as an MRD marker after allo-HSCT. In the present analysis, we aimed to expand the knowledge of and estimate the value of *WT1* as an MRD marker in patients with AML and MDS in a real-life setting, and to compare its capability of predicting relapse after allo-HSCT with that of other, established methods of routine clinical MRD monitoring.

PATIENTS AND METHODS

Patients and Study Design

Between 2012 and 2016, 104 patients with AML ($n=61$) or MDS ($n=43$) underwent allo-HSCT at our center and had been previously screened for *WT1* expression at the time of diagnosis. Of these, 59 patients (57%; AML, $n=40$; MDS, $n=19$) showed *WT1* overexpression in PB (for definition see below) at diagnosis and thus were included in this retrospective analysis (Supplemental Figure S1). Patient demographic and transplantation-related characteristics are presented in Table 1. All patients with AML and MDS exhibited some adverse disease characteristics, such as poor-risk cytogenetics or molecular alterations, primary refractory or relapsed disease, or International Prognostic Scoring System status intermediate-II or high. The majority of patients (81%) underwent transplantation with an unrelated donor after standard dose (59%) or reduced-intensity conditioning (41%).

In addition to *WT1* expression, the patients included in this analysis were also screened at diagnosis for disease-specific cytogenetic and/or molecular aberrations applicable for MRD monitoring by cytogenetic as well as PCR- and NGS-based technologies as part of routine care. Furthermore, chimerism analysis was also performed by default. In cases of a sex-mismatched donor-recipient combination, XY-fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses complemented MRD assessment after allo-HSCT. *WT1* expression levels were regularly monitored after allo-HSCT as part of routine care at our center and were correlated with the patient's clinical course and the results from other assessment methods to directly or indirectly detect MRD. Data were locked for this retrospective analysis on July 1, 2017.

Sample Assessment

BM aspiration for response evaluation, including disease-specific MRD assessment, was routinely scheduled at days +28, +60, +100, +200, and +365 after allo-HSCT. In cases with any deviation from a typical clinical course indicating an imminent relapse, such as an unexplained change in PB count, BM evaluation was performed earlier at the discretion of the treating physician. Routine measurement of *WT1* expression in PB was scheduled monthly during the first year, then every 1 to 3 months thereafter, and at any time in the event of suspected relapse.

Table 1

Patient Demographic and Clinical Characteristics

Characteristic	Value
Number of patients	59
Age, yr, median (range)	56 (25–71)
Sex, n (%)	
Male	30 (51)
Female	29 (49)
WHO AML, n (%)	40 (68)
With recurrent genetic abnormalities	16 (27)
MDS-related changes	18 (31)
Therapy-related	0 (0)
Not otherwise specified	6 (10)
WHO MDS and MDS/MPN overlap	19 (32)
RCMD	6 (10)
RAEB I	4 (7)
RAEB II	12 (20)
MDS/MPN unclassifiable	2 (3)
Karyotype, n (%)	
Normal	23 (39)
Abnormal	36 (61)
Complex	12 (20)
Molecular/genetic risk [24]	
Favorable	3 (5)
Intermediate	15 (25)
Adverse	22 (37)
International Prognostic Scoring System [25]	
Low	2 (3)
Intermediate I	3 (5)
Intermediate II	7 (12)
High	7 (12)

MPN indicates myeloproliferative neoplasia; PBSC, peripheral blood stem cells; RAEB, refractory anemia with excess blasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; WHO, World Health Organization.

Quantitative Assessment of Peripheral Blood Cell *WT1* Expression

Quantitative assessment of *WT1* mRNA expression in PB mononuclear cells was performed using the Ipsogen *WT1* ProfilQuant Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. This ELN-certified, plasmid-based qRT-PCR assay is commercially available worldwide and offers a validated cutoff level of 50 *WT1* copies/ 10^4 abetaloproteinemia (ABL) copies to discriminate between normal expression and overexpression of *WT1* mRNA [17]. Mononuclear cells were freshly isolated from PB samples by density gradient centrifugation using Lymphoprep (Axis-Shield Density Gradient Media, Oslo, Norway) and subsequently subjected to RNA extraction using the QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen). RNA concentrations were determined using a NanoPhotometer (Implen, Munich, Germany), and at least 1 μ g of RNA was used for the qRT-PCR analyses. RNA samples were stored frozen until in-batch analysis, which was performed twice weekly as part of the routine workup.

Chimerism Analyses

Short-tandem repeat (STR)-based chimerism analyses of PB and/or BM mononuclear cells were performed by STR-PCR using the Mentytype Chimera Kit (Biotype Diagnostic, Dresden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Cytogenetics and XY-FISH

Conventional metaphase cytogenetic and FISH analyses were performed at the Department of Human Genetics according to standardized protocols (Supplemental Table S1).

qRT-PCR and NGS-Based Detection of Disease Specific Markers

Patients with at least 1 mutation identified before transplantation were quantitatively monitored after allo-HSCT for the individual mutations using either mutation-specific qRT-PCR or the Nextera XT DNA Kit (Illumina, San Diego, CA), a quantitative NGS assay with a sensitivity of <1%.

Definitions and Response Criteria

Hematologic relapse was defined as $\geq 5\%$ BM blasts, detection of blasts in PB, and/or any extramedullary disease. Molecular relapse was defined as presence of known mutations in at least 1% of reads, reoccurrence of disease-specific cytogenetic aberrations, a decrease in donor chimerism to <95%, evidence of a mixed XY-FISH of $\geq 4\%$ residual recipient cells, or an increase in PB

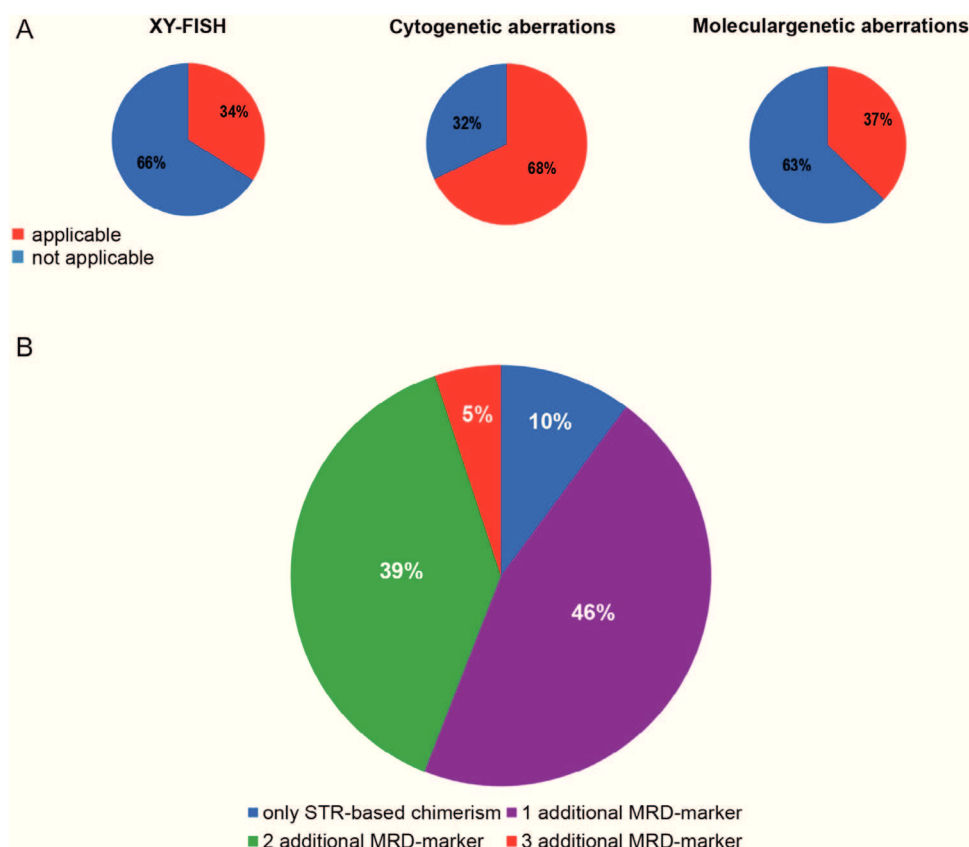


Figure 1. Distribution and applicability of different methods for MRD monitoring. The pie charts depict the distribution and applicability of different methods to directly or indirectly monitor MRD in 59 patients included in this analysis.

WT1 levels above the cutoff of 50 copies per 10^4 *ABL* copies, in the absence of any criteria defining hematologic relapse.

RESULTS

Distribution of Different MRD Methods

In a first step, we assessed the availability of common methods of detecting MRD in a representative group of patients with AML and MDS undergoing allo-HSCT. While STR-based chimerism measurement was applicable in all 59 patients, XY-FISH analysis could be performed in 20 patients (34%) with a sex-mismatched donor-recipient constellation. Furthermore, in 40 patients (68%), cytogenetic and/or lesion-specific FISH analyses were accessible, whereas 22 patients (37%) exhibited a molecular alteration that could be investigated by either NGS or qRT-PCR (Figure 1A and Supplemental Table S2). Consequently, 6 patients (10%) could be monitored only by STR-based chimerism, whereas MRD could be monitored using 1 additional method in 27 patients (46%), using 2 additional methods in 23 patients (39%), and using 3 additional methods in 3 patients (5%) (Figure 1B).

Monitoring PB *WT1* mRNA Expression after Allo-HSCT and Comparison with Other Methods of MRD Detection

Due to the inclusion criteria of this analysis, *WT1* was overexpressed in all patients with a median expression level of 1632.9 *WT1* copies/ 10^4 *ABL* copies (range, 55.2 to 22,580.6 *WT1* copies/ 10^4 *ABL* copies) at diagnosis. The median PB *WT1* expression level was significantly lower in patients achieving complete remission (CR) before allo-HSCT compared with patients undergoing allo-HSCT with active disease (7.9 versus 1033.6 *WT1* copies/ 10^4 *ABL* copies; $P = .0105$). This indicates a

clear correlation between disease status and *WT1* expression level before allo-HSCT. At a median follow-up of 13 months (range, 5 to 40 months) after allo-HSCT, *WT1* mRNA expression was measured in 472 samples, corresponding to a median of 8 samples per patient (range, 2 to 19 samples per patient).

Patients with ongoing remission after allo-HSCT

At 1 month after undergoing allo-HSCT, 57 patients (97%) were in complete hematologic remission and accordingly showed a rapid decrease in PB *WT1* mRNA expression below the cutoff. Two patients (3%) had persistent hematologic disease with *WT1* expression persisting above the cutoff. Thirty-five patients (59%) remained in ongoing CR for a median of 13 months. Among these, only 1 patient (3%) had a transient *WT1* mRNA overexpression above the validated cutoff during remission (details in Supplemental Figure S2), whereas the other 34 patients (97%) continuously showed *WT1* mRNA expression levels below the cutoff (Figure 2A). In contrast, 3 patients (9%) showed a transient decrease in donor chimerism in PB and/or BM, and in 27% of patients applicable for XY-FISH analyses transient abnormalities were found while patients remained in ongoing hematologic CR. Furthermore, in 23% of patients with ongoing CR, conventional cytogenetics and/or disease-specific FISH analyses showed temporarily conspicuous results, whereas in 15% of patients with proven molecular alterations, these values were transiently detectable.

Patients with relapse after allo-HSCT

Twenty-four patients (41%) experienced hematologic ($n = 17$; 71%) or molecular ($n = 7$; 29%) relapse, at a median of 126 days (range, 28 to 938 days) after allo-HSCT; detailed

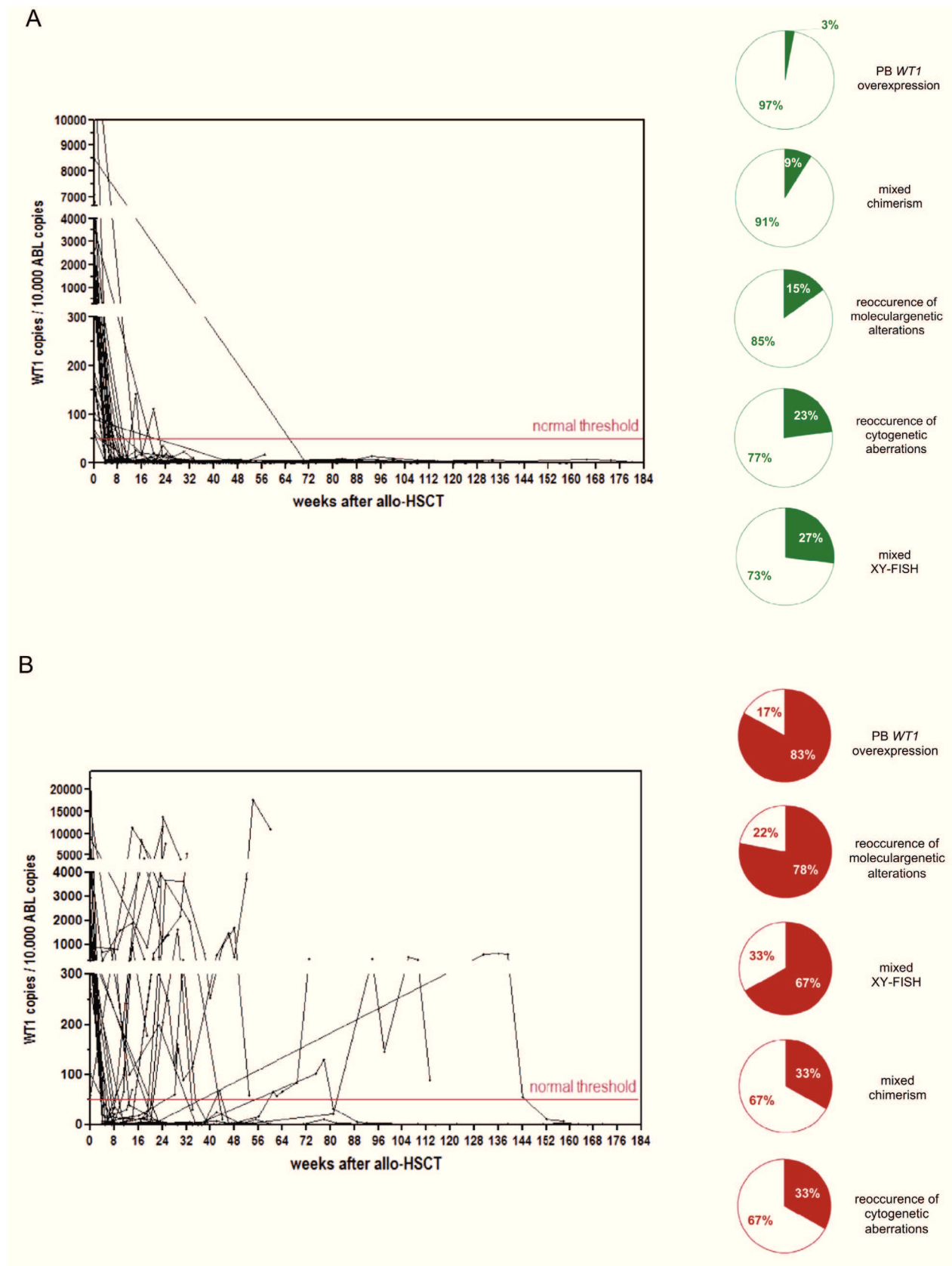


Figure 2. Longitudinal monitoring of *WT1* mRNA expression in the post-transplantation period. (A) Monitoring of *WT1* mRNA expression in peripheral blood of patients achieving long-term remission after allo-HSCT ($n = 35$). For each method of MRD monitoring, a pie chart shows the portion of patients with positive determinations despite sustained remission (false-positives indicated in green). (B) Monitoring of *WT1* mRNA expression in peripheral blood of patients with relapse after allo-HSCT ($n = 24$). For each method of MRD monitoring, a pie chart shows the portion of patients with positive determination of imminent relapse (true positives indicated in red). MRD positivity for each method was defined as described in the text.

relapse-related parameters are presented in [Supplementary Table S3](#). Twenty of the 24 relapsed patients (83%) had at least 1 *WT1* value above the cutoff level at/or before relapse. Only 4 patients (17%) with molecular relapse detected by cytogenetics and/or XY-FISH analyses ($n=2$), qRT-PCR for *NPM1* ($n=1$), and NGS ($n=1$) showed sustained *WT1* mRNA expression below the cutoff. To determine the interval between initial detection of *WT1* and relapse, we analyzed only those patients ($n=13$) who experienced hematologic relapse preceded by at least 1 *WT1* value above the threshold before relapse detection and who did not receive any preemptive intervention as a consequence of MRD detection. In these patients, the median time from first elevated *WT1* value to hematologic relapse was 6 weeks (range, 1 to 27 weeks). In contrast, before a definitive diagnosis of relapse, routine monitoring revealed a decrease in donor chimerism in only 8 patients (33%) and abnormal XY-FISH results in only 6 patients (67%). In addition, conventional cytogenetics or lesion-specific FISH analyses revealed known or new chromosomal aberrations in 6 patients (33%) only before definitive diagnosis of relapse. Furthermore, NGS or qRT-PCR could detect known molecular alterations in 7 patients (78%; UPN 6, 7, 8, 18, 19, 21, and 24) before diagnosis of relapse ([Figure 2B](#)). In 62% of patients who relapsed within the first year after allo-HSCT, an elevation of PB cell *WT1* mRNA expression level resulted in earlier BM biopsy and, consequently, earlier diagnosis of relapse. Taken together, these findings support the predictive and practical benefit of this marker in the clinical management of patients after allo-HSCT.

DISCUSSION

In this retrospective analysis covering 59 patients with myeloid malignancies and *WT1* mRNA overexpression at diagnosis, we comprehensively investigated the performance and clinical utility of serial *WT1* measurements compared with other established methods of directly or indirectly monitoring MRD after allo-HSCT. Our results indicate that PB *WT1* expression can serve as an MRD marker in the majority of patients with AML and MDS independent of their individual genotype. Along with this, we found in a real-life setting that an increase in *WT1* mRNA expression to above a validated cutoff level predicts imminent relapse earlier and more reliably than other methods generally used in routine clinical practice, even though the population reported here was highly selected for *WT1* overexpression due to the inclusion criteria of this retrospective analysis.

A first major advantage of *WT1* expression seems to be its broad applicability in the majority of patients with AML and MDS. *WT1* mRNA is reportedly overexpressed in approximately 90% of patients with AML [14,17,19] and 50% of the patients with MDS (unpublished data). In accordance with this, we observed *WT1* overexpression in 57% of the patients with AML and MDS undergoing allo-SCT at our institution, even though the frequency was somewhat lower compared with that of de novo AML due to the high number of patients with MDS-related AML in our cohort. In contrast, individual mutations of even the most frequently affected genes, such as *NPM1* and *FLT3* in AML [26] and *TET2* and *ASXL1* in MDS [10], are present only in subgroups of 20% to 35% of patients. Indeed, only 37% of the patients in our analysis exhibited at least 1 molecular alteration other than *WT1* that could be tracked by a mutation-specific technique. This implies that based on its greater informativeness, the use of *WT1* can facilitate MRD monitoring by a single marker and method in a large proportion of patients with AML and MDS.

Another mandatory characteristic of a credible MRD marker after allo-HSCT is its stability throughout the course of disease. Some markers, such as mutated *FLT3*, appear to be unstable as consequence of clonal evolution, which also hampers their applicability for reliable disease surveillance [11,12,27]. In our analysis, 20 out of 24 patients (83%) who experienced relapse showed *WT1* overexpression before or at the time of relapse. Only 4 patients (17%) with molecular relapse had sustained *WT1* mRNA expression below the cutoff before pending relapse that was predicted by another MRD marker. This finding indicates not only that *WT1* expression is relatively stable during the disease course and correlates with disease activity, but also that *WT1* expression analysis provides a high sensitivity, which is one of the most important prerequisites for MRD markers in clinical routine besides broad applicability and stability. In comparison with *WT1* expression analysis, STR-based chimerism analyses (sensitivity of 33%; $P=.0094$) and cytogenetics (conventional metaphase and FISH analyses; sensitivity of 33%; $P=.0094$, McNemar test) were significantly inferior with regard to sensitivity. Furthermore, the sensitivity of *WT1* expression analysis was at least comparable with that of XY-FISH (sensitivity, 67%; P , not significant, McNemar test) and mutation-specific assays (NGS or qRT-PCR; sensitivity, 78%; P , not significant, McNemar test). In this context, it is noteworthy that this sensitivity of *WT1* can be achieved by analyzing PB, whereas BM is required for chimerism and molecular analyses. Indeed, the use of PB *WT1* expression allows repeated measurements at short intervals while still ensuring patient comfort. In addition, during post-transplantation follow-up, *WT1* expression remained below the defined threshold at all time points tested in 34 of the 35 nonrelapsed patients, indicating a specificity of 97%. Compared with the specificity of STR-based chimerism analysis (91%), XY-FISH (73%), cytogenetics (77%) and mutation-specific assays (85%), there seems to be a trend in favor of *WT1*, although this did not reach statistical significance (McNemar test). This likely is related to the low number of nonrelapsed patients accessible by the respective method (chimerism, $n=35$; XY-FISH, $n=11$; cytogenetics, $n=22$; mutation-specific assays, $n=13$) and requires validation in a larger cohort of patients.

Our results regarding *WT1* are in excellent agreement with data from Lange et al. [28], who reported a sensitivity of 79% and a specificity of 89% for prediction of hematologic relapse within 28 days. Consequently, *WT1* expression had, together with chimerism analysis in sorted CD34⁺ cells, the highest diagnostic power for relapse prediction in their study, whereas limited sensitivities of 53% for unsorted donor chimerism and 40% for disease-specific FISH analyses were within the range observed in our analysis [28]. In line with this, several other research groups also have demonstrated the superiority of *WT1* monitoring for relapse detection based on its high sensitivity and specificity compared with other methods, such as flow cytometry and unsorted donor chimerism [29]. Nonetheless, as a relevant disadvantage, it must be mentioned that for some analyses, BM was the primary sample source, whereas in others, PB samples were investigated, lacking a broad comparability with each other [28,30–32]. Another relevant drawback of these studies is the fact that they were performed using in-house methods without reproducible cutoff levels. In contrast, as a particular strength of our analysis, we used a commercially available assay that has been certified by the ELN. This standardized assay has a validated cutoff level to distinguish between normal *WT1* expression and *WT1* overexpression, thereby enabling reproducible and comparable investigations across different laboratories [17]. This is a unique feature not

only in comparison with previous studies on *WT1* in the post-transplantation setting, but also with regard to other methods of identifying residual leukemic cells, such as multiparameter flow cytometry, for which standardized assays mostly do not exist. Using this standardized assay facilitates the measurement of *WT1* in PB with a comparable or even greater sensitivity and specificity than in BM. Achieving similar results with other methods of MRD detection would require harvesting of BM (chimerism, FISH, cytogenetic, and mutation-specific assays) and/or time- and resource-consuming positive selection of the cells of interest (CD34⁺ cells). Thus, analysis of *WT1* expression in PB allows regular disease surveillance while maintaining high patient comfort and represents a cost- and time-efficient approach in clinical routine.

Given that the success of therapeutic interventions for relapse is correlated mainly with disease burden, the major goal of all MRD methods is to detect impending relapse before frank hematologic relapse occurs. The median interval in those 13 patients who suffered from hematologic relapse preceded by at least 1 *WT1* value above the threshold before relapse detection was 6 weeks, suggesting a suitable time window for early therapeutic intervention. However, taking into account the retrospective character of our analysis and the limited number of patients, this needs to be corroborated in a prospective analysis.

In summary, the results of this retrospective analysis show that longitudinal monitoring of *WT1* expression levels in PB allows sensitive and specific detection of MRD after allo-HSCT. With the advantage of an ELN-certified standardized assay it is a readily accessible, resource-effective method with high patient comfort that is applicable for a large proportion of patients with myeloid malignancies regardless of individual molecular phenotype. Given the intrinsic limitations of a retrospective analysis of a heterogeneous patient population from a single institution, confirmation in a prospective study is needed to definitively rank *WT1* expression in comparison to other methods used for early detection of impending relapse.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the staff of the Transplantation Unit of the Department of Hematology, Oncology, and Clinical Immunology for the excellent patient care.

Financial disclosure: A Rotorgene PCR cyclor was provided free of charge by Qiagen for routine use in this study. No other financial or logistic support was provided by the company for this retrospective analysis.

Conflict of interest statement: There are no conflicts of interest to report.

Authorship statement: Study conception and design: T.S. and G.K. Collection and assembly of data: C.R., T.S., G.K., S.P., B.H., B.B., A.D., K.N., M.K., and S.G. Data analysis and interpretation: C.R., T.S., G.K., R.H., and U.G. Manuscript writing: C.R., T.S., G.K. Final approval of the manuscript: all authors.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found online at [doi:10.1016/j.bbmt.2018.05.011](https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.05.011).

REFERENCES

- Pavletic SZ, Kumar S, Mohty M, 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*. 2010;16(7):871–890.
- Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: a systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA*. 2009;301(22):2349–2361.
- Barrett AJ, Battitwalla M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol*. 2010;3(4):429–441.
- Schmid C, Labopin M, Nagler A, et al. Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2012;119(6):1599–1606.
- Schroeder T, Rachlis E, Bug G, 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*. 2015;21(4):653–660.
- Kröger N, Bacher U, Bader P, 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 Disease-Specific Methods and Strategies for Monitoring Relapse following Allogeneic Stem Cell Transplantation. Part I: methods, acute leukemias, and myelodysplastic syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(9):1187–1211.
- Bacher U, Zander AR, Haferlach T, Schnittger S, Fehse B, Kröger N. Minimal residual disease diagnostics in myeloid malignancies in the post transplant period. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(3):145–157.
- Bacher U, Talano JA, Bishop MR. Monitoring and prevention of relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation for myeloid malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(1 Suppl):S62–S73.
- Hourigan CS, Karp JE. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(8):460–471.
- Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28(2):241–247.
- Schnittger S, Schoch C, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. FLT3 length mutations as marker for follow-up studies in acute myeloid leukaemia. *Acta Haematol*. 2004;112(1–2):68–78.
- Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. 2006;20(6):1103–1108.
- Craddock C, Tauro S, Moss P, Grimwade D. Biology and management of relapsed acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2005;129(1):18–34.
- Cilloni D, Saglio G. *WT1* as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol*. 2004;112(1–2):79–84.
- Kern W, Haferlach T, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2008;112(1):4–16.
- Østergaard M, Olesen LH, 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*. 2004;125(5):590–600.
- Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, 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*. 2009;27(31):5195–5201.
- Malagola M, Skert C, Borlenghi E, et al. Postremission sequential monitoring of minimal residual disease by *WT1* Q-PCR and multiparametric flow cytometry assessment predicts relapse and may help to address risk-adapted therapy in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Med*. 2016;5(2):265–274.
- Weisser M, Kern W, Rauhut S, et al. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of *WT1* gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005;19(8):1416–1423.
- Cilloni D, Messa F, Arruga F, et al. Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of *WT1* transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica*. 2008;93(6):921–924.
- Inoue K, Ogawa H, Yamagami T, et al. Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring *WT1* (Wilms' tumor gene) expression levels. *Blood*. 1996;88(6):2267–2278.
- Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, 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*. 2003;101(5):1698–1704.
- Ogawa H, Ikegame K, Kawakami M, Tamaki H. *WT1* gene transcript assay for relapse in acute leukemia after transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(9):1747–1753.
- Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424–447.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079–2088.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209–2221.

27. Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):934–946.
28. Lange T, Hubmann M, Burkhardt R, 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. *Leukemia*. 2011;25(3):498–505.
29. Kwon M, Martínez-Laperche C, Infante M, et al. Evaluation of minimal residual disease by real-time quantitative PCR of Wilms' tumor 1 expression in patients with acute myelogenous leukemia after allogeneic stem cell transplantation: correlation with flow cytometry and chimerism. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(8):1235–1242.
30. Scheffold C, Kroeger M, Zuehlendorf M, et al. Prediction of relapse of acute myeloid leukemia in allogeneic transplant recipients by marrow CD34⁺ donor cell chimerism analysis. *Leukemia*. 2004;18(12):2048–2050.
31. Mattsson J, Uzunel M, Tammik L, Aschan J, Ringdén O. Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2001;15(12):1976–1985.
32. Bornhäuser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, et al. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34⁺ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2009;94(11):1613–1617.

3. Diskussion

3.1 Frequenz der *WT1*-mRNA Überexpression und Anwendbarkeit als MRD-Marker im Vergleich zu anderen Methoden der MRD-Diagnostik in myeloischen Neoplasien

Bei 90% der Patienten mit AML und ca. 50% der Patienten mit MDS ist eine Überexpression von *WT1* auf mRNA Ebene nachweisbar (Cilloni and Saglio 2004; Cilloni et al. 2009; Weisser et al. 2005). Innerhalb der Gruppe unserer 104 Patienten, die zwischen 2012 und 2016 aufgrund einer AML oder eines MDS transplantiert worden waren, wiesen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 57% (59/104) eine *WT1*-mRNA Überexpression auf. Bei Patienten mit AML lag der Anteil bei 65% (40/61) im Vergleich zu 44% (19/43) bei denjenigen Patienten mit MDS. Der Anteil der Patienten mit AML und *WT1*-Überexpression war in der hier vorliegenden Arbeit etwas geringer als von anderen Gruppen beschrieben, was möglicherweise auf den relativ hohen Anteil von Patienten mit AML und MDS-typischen Veränderungen zurückzuführen ist (18/59, $\approx$ 31%). Andere bei Patienten mit MDS oder AML nachweisbare Mutationen wie beispielsweise TET2 und ASXL oder NPM1 und FLT3 finden sich bei 20 bis 35% der Patienten und stehen somit als Marker für minimale Resterkrankung nur für eine vergleichsweise kleine Gruppe von Patienten zur Verfügung (Haferlach et al. 2014; Papaemmanuil et al. 2016). Auch in der von uns untersuchten Gruppe hatten nur 37% der Patienten einen weiteren Marker, der mittels NGS- oder qRT-PCR quantifizierbar war. Dies zeigte, dass die Quantifizierung der *WT1*-mRNA Expression in einem relevanten Anteil der Patienten mit AML und MDS als Methode zum MRD-Monitoring nach allogener SZT einsetzbar ist.

3.2 Vergleich der Sensitivität und Spezifität verschiedener Methoden der MRD-Diagnostik im Hinblick auf den Nachweis eines Rezidivs

Einige Mutationen wie beispielsweise FLT3-ITD, -TKD, NRAS, KRAS, IDH1 oder IDH2 zeigen im Rahmen klonaler Evolution oftmals keine Stabilität während des Krankheitsverlaufes (Meggendorfer et al. 2014; Schnittger et al. 2012; Bullinger, Döhner, and Döhner 2017), sodass eine Anwendung dieser Mutationen als alleiniger MRD-Marker nicht empfohlen wird (Schuurhuis et al. 2018). Bei 20 der 24 Patienten, welche ein Rezidiv erlitten hatten (83%), fanden wir eine Überexpression von *WT1* auf mRNA-Ebene im peripheren Blut vor oder zum Zeitpunkt des Rezidivs. Nur bei vier der rezidierten Patienten (17%) blieb die *WT1*-mRNA Expression

unterhalb des cut-off von 50 *WT1*-Kopien/ 10^4 ABL-Kopien, wobei diese Patienten ein molekulares Rezidiv, welches durch einen anderen MRD-Marker angezeigt wurde, und kein hämatologisches Rezidiv erlitten hatten. Dies zeigt, dass die *WT1*-mRNA Überexpression als MRD-Marker zum einen im Rezidiv überwiegend stabil nachweisbar ist und zum anderen, dass eine Überexpression in peripherem Blut ein Rezidiv mit hoher Sensitivität nachweist. STR-basierte Chimärismusanalysen und zytogenetische Analysen erreichten jeweils eine Sensitivität von 33% und waren der *WT1*-mRNA Expression somit hinsichtlich Sensitivität signifikant unterlegen ($p=0.0094$). Molekulargenetische Analysen (NGS- oder qRT-PCR – basiert) bzw. XY-FISH Analysen aus dem Knochenmark erreichten in unseren Händen eine Sensitivität von 78% bzw. 67%. Ungeachtet der ähnlichen Sensitivität erfolgt die *WT1*-mRNA Expression aus dem Blut, was wiederholte Messungen in kurzen Zeitintervallen erlaubt, ohne den Patienten zu belasten. Von den 35 Patienten, welche in Remission geblieben sind, erreichte nur ein Patient an zwei Zeitpunkten ein *WT1*-mRNA Expressionsniveau, das oberhalb des cut-off von 50 *WT1*-Kopien/ 10^4 ABL-Kopien lag. Mit einer Spezifität von 97% liegt diese tendenziell höher im Vergleich zu der durch STR-basierte Chimärismusanalysen (91%), molekulargenetische Analysen (85%), zytogenetische Analysen (77%) oder XY-FISH Analysen (73%) erreichte Spezifität, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Sensitivitäten und Spezifitäten der einzelnen MRD-Methoden sind den Ergebnissen anderer Arbeiten sehr ähnlich. So beschrieben Lange et al. eine Sensitivität von 79% und eine Spezifität von 89%, was die Voraussage eines hämatologischen Rezidivs beim Nachweis einer *WT1*-mRNA Überexpression in peripherem Blut anbelangt (Lange et al. 2011). Neben der Analyse des Donorchimärismus in CD34-selektionierten Knochenmarkzellen hatte die Quantifizierung der *WT1*-mRNA Expression die größte prognostische Aussagekraft für ein drohendes hämatologisches Rezidiv, während der nicht-selektionierte Donorchimärismus und krankheitsspezifische FISH-Analysen mit 53% bzw. 40% deutlich geringere Sensitivitäten zeigten (Lange et al. 2011). Diese Resultate decken sich auch mit den Ergebnissen von Kwon et al., die eine Überlegenheit der *WT1*-mRNA Expression im Vergleich zur nicht-selektionierten Chimärismusanalyse und zur Flow-Zytometrie zeigen (Kwon et al. 2012). Das Fehlen standardisierter Methoden zur Messung der *WT1*-mRNA Expression sowie einer verbindlichen Definition eines cut-off Level zur Unterscheidung zwischen normaler und erhöhter *WT1*-mRNA Expression macht die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Arbeitsgruppen schwierig, zumal in einigen Arbeiten Knochenmark und in anderen Blut benutzt wurde (Kwon et al. 2012; Lange et al. 2011; Bornhäuser et al. 2009; Scheffold et al. 2004; Ogawa et al. 2004, 2003). Der von uns zur Quantifizierung der *WT1*-mRNA Expression genutzte Plasmid-basierte

qRT-PCR Assay wurde vom European LeukemiaNet unter neun evaluierten Assays als *best performing* Assay ausgewählt (Cilloni et al. 2009), unter anderem da die Primer die Exone 1 und 2 umfassen (Van Dijk et al. 2002). Letztere sind sehr viel seltener von Punktmutationen betroffen als die Exone 7 und 9, welche bei den meisten anderen Assays als Primer dienen und häufiger zu falsch negativen Befunden führen (Cilloni and Saglio 2004; Ogawa et al. 2003; Osborne et al. 2005, 1; Østergaard et al. 2004, 1). Außerdem ist der cut-off Level unseres Assay für Knochenmark und Blut validiert, was die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Laboren ermöglicht.

3.3 Zeitliches Intervall zwischen Detektion einer Überexpression von *WT1*-mRNA in peripherem Blut und Nachweis des hämatologischen Rezidivs

Der Erfolg einer Rezidivchemotherapie hängt im Wesentlichen von der Größe der „leukämischen Tumorlast“ zum Zeitpunkt des Beginns der Rezidivtherapie ab. Diese ist entsprechend niedriger, je früher das Rezidiv detektiert wird. Somit ist das Hauptziel der verschiedenen MRD-Methoden ein drohendes Rezidiv möglichst frühzeitig, idealerweise vor Eintritt des hämatologischen Rezidivs zu nachzuweisen. Mit Ausnahme von Lange et al. beziffern andere Autoren, welche die Rolle der *WT1*-mRNA Expression als MRD-Marker untersucht haben, den Zeitraum der im Median zwischen Nachweis der *WT1*-mRNA Überexpression und dem Rezidiv liegen, nicht. Lange et al. veranschlagen einen Zeitraum von 28 Tagen, binnen derer bei 89% der Patienten mit *WT1*-mRNA Überexpression in peripherem Blut ein hämatologisches Rezidiv eintritt (Lange et al. 2011). In unserer Gruppe erlitten von den 24 rezidierten Patienten 17 Patienten ein hämatologisches Rezidiv, wobei 13 dieser Patienten bereits im Median 6 Wochen zuvor eine erhöhte *WT1*-mRNA Expression in peripherem Blut zeigten. Dieses „gewonnene“ Zeitintervall erlaubt eine Optimierung der Rezidivtherapie beispielsweise durch frühzeitige Reduktion und forciertes Ausschleichen noch bestehender immunsuppressiver Therapie oder präemptive Infusion von Spenderlymphozyten.

3.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser retrospektiven Analyse zeigen, dass bei Patienten mit myeloischen Neoplasien durch serielle Messungen der *WT1*-mRNA Expression ein drohendes Rezidiv nach allo-SZT mit hoher Sensitivität und Spezifität und ohne Belastung des Patienten in peripherem Blut frühzeitig nachgewiesen werden kann. Dadurch wird ein möglichst frühzeitiger Beginn einer

Rezidivtherapie gewährleistet, was wiederum das Patientenoutcome in dieser Situation verbessert.

Literaturverzeichnis

Agrawal, Mridul, Andrea Corbacioglu, Peter Paschka, Daniela Weber, Verena I. Gaidzik, Nikolaus Jahn, Andrea Kündgen, et al. 2016. 'Minimal Residual Disease Monitoring in Acute Myeloid Leukemia (AML) with Translocation t(8;21)(Q22;Q22): Results of the AML Study Group (AMLWG)'. *Blood* 128 (22): 1207–1207.

Algar, E. M., M. T. Kenney, L. A. Simms, S. I. Smith, Y. Kida, and P. J. Smith. 1995. 'Homozygous Intragenic Deletion in the WT1 Gene in a Sporadic Wilms' Tumour Associated with High Levels of Expression of a Truncated Transcript'. *Human Mutation* 5 (3): 221–27. <https://doi.org/10.1002/humu.1380050306>.

Arber, D. A., A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola, and J. W. Vardiman. 2016. 'The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia'. *Blood* 127 (20): 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.

Bacher, Ulrike, Julie-An Talano, and Michael R. Bishop. 2012. 'Monitoring and Prevention of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Myeloid Malignancies'. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 18 (1): S62–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.10.028>.

Bader, P., D. Niethammer, A. Willasch, H. Kreyenberg, and T. Klingebiel. 2005. 'How and When Should We Monitor Chimerism after Allogeneic Stem Cell Transplantation?' *Bone Marrow Transplantation* 35 (2): 107–19. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704715>.

Balsat, Marie, Aline Renneville, Xavier Thomas, Stéphane de Botton, Denis Caillot, Alice Marceau, Emilie Lemasle, et al. 2017. 'Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (2): 185–93. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.1875>.

Barragán, Eva, José Cervera, Pascual Bolufer, Sandra Ballester, Guillermo Martín, Pascual Fernández, Rosa Collado, María José Sayas, and Miguel Angel Sanz. 2004. 'Prognostic Implications of Wilms' Tumor Gene (WT1) Expression in Patients with de Novo Acute Myeloid Leukemia'. *Haematologica* 89 (8): 926–33.

Barrett, A John, and Minoo Battiwalla. 2010. 'Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation'. *Expert Review of Hematology* 3 (4): 429–41. <https://doi.org/10.1586/ehm.10.32>.

Bejar, Rafael. 2015. 'Myelodysplastic Syndromes Diagnosis: What Is the Role of Molecular Testing?' *Current Hematologic Malignancy Reports* 10 (3): 282–91. <https://doi.org/10.1007/s11899-015-0270-5>.

Bejar, Rafael, Kristen Stevenson, Omar Abdel-Wahab, Naomi Galili, Björn Nilsson, Guillermo Garcia-Manero, Hagop Kantarjian, et al. 2011. 'Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes'. *New England Journal of Medicine* 364 (26): 2496–2506. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1013343>.

Bejar, Rafael, Kristen E. Stevenson, Bennett A. Caughey, Omar Abdel-Wahab, David P. Steensma, Naomi Galili, Azra Raza, et al. 2012. 'Validation of a Prognostic Model and the Impact of Mutations in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes'. *Journal of Clinical*

Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology 30 (27): 3376–82. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.7379>.

Benton, Christopher B., and Farhad Ravandi. 2017. 'A Mind Map for Managing Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia'. *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O* 15 (11): 859–67.

Bornhäuser, Martin, Uta Oelschlaegel, Uwe Platzbecker, Gesine Bug, Karin Lutterbeck, Michael G. Kiehl, Johannes Schetelig, et al. 2009. 'Monitoring of Donor Chimerism in Sorted CD34+ Peripheral Blood Cells Allows the Sensitive Detection of Imminent Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation'. *Haematologica* 94 (11): 1613–17. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.007765>.

Buccisano, Francesco, Luca Maurillo, Alessandra Spagnoli, Maria Ilaria Del Principe, Daniela Fraboni, Paola Panetta, Tiziana Ottone, et al. 2010. 'Cytogenetic and Molecular Diagnostic Characterization Combined to Postconsolidation Minimal Residual Disease Assessment by Flow Cytometry Improves Risk Stratification in Adult Acute Myeloid Leukemia'. *Blood* 116 (13): 2295–2303. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-258178>.

Bullinger, Lars, Konstanze Döhner, and Hartmut Döhner. 2017. 'Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (9): 934–46. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.2208>.

Call, K. M., T. Glaser, C. Y. Ito, A. J. Buckler, J. Pelletier, D. A. Haber, E. A. Rose, A. Kral, H. Yeger, and W. H. Lewis. 1990. 'Isolation and Characterization of a Zinc Finger Polypeptide Gene at the Human Chromosome 11 Wilms' Tumor Locus'. *Cell* 60 (3): 509–20.

Cazzola, Mario, and Luca Malcovati. 2005. 'Myelodysplastic Syndromes--Coping with Ineffective Hematopoiesis'. *The New England Journal of Medicine* 352 (6): 536–38. <https://doi.org/10.1056/NEJMp048266>.

Chen, Xueyan, Hu Xie, Brent L. Wood, Roland B. Walter, John M. Pagel, Pamela S. Becker, Vicky K. Sandhu, Janis L. Abkowitz, Frederick R. Appelbaum, and Elihu H. Estey. 2015. 'Relation of Clinical Response and Minimal Residual Disease and Their Prognostic Impact on Outcome in Acute Myeloid Leukemia'. *Journal of Clinical Oncology* 33 (11): 1258–64. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3518>.

Cilloni, Daniela, Francesca Messa, Francesca Arruga, Ilaria Defilippi, Enrico Gottardi, Milena Fava, Sonia Carturan, et al. 2008. 'Early Prediction of Treatment Outcome in Acute Myeloid Leukemia by Measurement of WT1 Transcript Levels in Peripheral Blood Samples Collected after Chemotherapy'. *Haematologica* 93 (6): 921–24. <https://doi.org/10.3324/haematol.12165>.

Cilloni, Daniela, Aline Renneville, Fabienne Hermitte, Robert K. Hills, Sarah Daly, Jelena V. Jovanovic, Enrico Gottardi, et al. 2009. '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'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (31): 5195–5201. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.4865>.

Cilloni, Daniela, and Giuseppe Saglio. 2004. 'WT1 as a Universal Marker for Minimal Residual Disease Detection and Quantification in Myeloid Leukemias and in Myelodysplastic Syndrome'.

Acta Haematologica 112 (1–2): 79–84. <https://doi.org/10.1159/000077562>.

Corces-Zimmerman, M. Ryan, Wan-Jen Hong, Irving L. Weissman, Bruno C. Medeiros, and Ravindra Majeti. 2014. 'Preleukemic Mutations in Human Acute Myeloid Leukemia Affect Epigenetic Regulators and Persist in Remission'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (7): 2548–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324297111>.

Dickhut, Andreas, Rainer Schwerdtfeger, Larissa Kuklick, Markus Ritter, Christian Thiede, Andreas Neubauer, and Cornelia Brendel. 2005. 'Mesenchymal Stem Cells Obtained after Bone Marrow Transplantation or Peripheral Blood Stem Cell Transplantation Originate from Host Tissue'. *Annals of Hematology* 84 (11): 722–27. <https://doi.org/10.1007/s00277-005-1067-8>.

Dickinson, Anne M., Jean Norden, Shuang Li, Ilona Hromadnikova, Christoph Schmid, Helga Schmetzer, and Hans Jochem-Kolb. 2017. 'Graft-versus-Leukemia Effect Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukemia'. *Frontiers in Immunology* 8 (June). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00496>.

Döhner, Hartmut, Elihu Estey, David Grimwade, Sergio Amadori, Frederick R. Appelbaum, Thomas Büchner, Hervé Dombret, et al. 2017. 'Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel'. *Blood* 129 (4): 424–47. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>.

Foran, James M., and Jamile M. Shammo. 2012. 'Clinical Presentation, Diagnosis, and Prognosis of Myelodysplastic Syndromes'. *The American Journal of Medicine* 125 (7 Suppl): S6-13. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2012.04.015>.

Freeman, Sylvie D., Paul Virgo, Steve Couzens, David Grimwade, Nigel Russell, Robert K. Hills, and Alan K. Burnett. 2013. 'Prognostic Relevance of Treatment Response Measured by Flow Cytometric Residual Disease Detection in Older Patients with Acute Myeloid Leukemia'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (32): 4123–31. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.1753>.

Gaidzik, Verena Ingeborg, Richard Friedrich Schlenk, Simone Moschny, Annegret Becker, Lars Bullinger, Andrea Corbacioglu, Jürgen Krauter, et al. 2009. 'Prognostic Impact of WT1 Mutations in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Study of the German-Austrian AML Study Group'. *Blood* 113 (19): 4505–11. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-183392>.

Germing, U., B. Hildebrandt, M. Pfeilstöcker, T. Nösslinger, P. Valent, C. Fonatsch, M. Lübbert, et al. 2005. 'Refinement of the International Prognostic Scoring System (IPSS) by Including LDH as an Additional Prognostic Variable to Improve Risk Assessment in Patients with Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS)'. *Leukemia* 19 (12): 2223–31. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403963>.

Germing, Ulrich, Carlo Aul, Charlotte M. Niemeyer, Rainer Haas, and John M. Bennett. 2008. 'Epidemiology, Classification and Prognosis of Adults and Children with Myelodysplastic Syndromes'. *Annals of Hematology* 87 (9): 691–99. <https://doi.org/10.1007/s00277-008-0499-3>.

Germing, Ulrich, and Andrea Kündgen. 2012. 'Prognostic Scoring Systems in MDS'. *Leukemia Research* 36 (12): 1463–69. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.08.005>.

Gerstung, Moritz, Andrea Pellagatti, Luca Malcovati, Aristoteles Giagounidis, Matteo G. Della

Porta, Martin Jädersten, Hamid Dolatshad, et al. 2015. 'Combining Gene Mutation with Gene Expression Data Improves Outcome Prediction in Myelodysplastic Syndromes'. *Nature Communications* 6 (January): 5901. <https://doi.org/10.1038/ncomms6901>.

Gessler, M., A. Poustka, W. Cavenee, R. L. Neve, S. H. Orkin, and G. A. Bruns. 1990. 'Homozygous Deletion in Wilms Tumours of a Zinc-Finger Gene Identified by Chromosome Jumping'. *Nature* 343 (6260): 774–78. <https://doi.org/10.1038/343774a0>.

Geyh, S., S. Oz, R.-P. Cadeddu, J. Fröbel, B. Brückner, A. Kündgen, R. Fenk, et al. 2013. 'Insufficient Stromal Support in MDS Results from Molecular and Functional Deficits of Mesenchymal Stromal Cells'. *Leukemia* 27 (9): 1841–51. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.193>.

Greenberg, P., C. Cox, M. M. LeBeau, P. Fenaux, P. Morel, G. Sanz, M. Sanz, et al. 1997. 'International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes'. *Blood* 89 (6): 2079–88.

Greenberg, Peter L., Heinz Tuechler, Julie Schanz, Guillermo Sanz, Guillermo Garcia-Manero, Francesc Solé, John M. Bennett, et al. 2012. 'Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes'. *Blood* 120 (12): 2454–65. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-420489>.

Grimwade, David, Jelena V. Jovanovic, Robert K. Hills, Elizabeth A. Nugent, Yashma Patel, Rajinder Flora, Daniela Diverio, et al. 2009. 'Prospective Minimal Residual Disease Monitoring to Predict Relapse of Acute Promyelocytic Leukemia and to Direct Pre-Emptive Arsenic Trioxide Therapy'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (22): 3650–58. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.1533>.

Grimwade, David, Paresh Vyas, and Sylvie Freeman. 2010. 'Assessment of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia'. *Current Opinion in Oncology* 22 (6): 656–63. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32833ed831>.

Gyurkocza, Boglarka, and Brenda M. Sandmaier. 2014. 'Conditioning Regimens for Hematopoietic Cell Transplantation: One Size Does Not Fit All'. *Blood* 124 (3): 344–53. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-514778>.

Haber, D. A., and A. J. Buckler. 1992. 'WT1: A Novel Tumor Suppressor Gene Inactivated in Wilms' Tumor'. *The New Biologist* 4 (2): 97–106.

Haferlach, T, Y Nagata, V Grossmann, Y Okuno, U Bacher, G Nagae, S Schnittger, et al. 2014. 'Landscape of Genetic Lesions in 944 Patients with Myelodysplastic Syndromes'. *Leukemia* 28 (2): 241–47. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.336>.

Hamblin, Terry. 1992. 'Clinical Features of MDS'. *Leukemia Research, The Myelodysplastic Syndrome*, 16 (1): 89–93. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(92\)90106-H](https://doi.org/10.1016/0145-2126(92)90106-H).

Hamid, Gamal Abdul. 2013. 'Acute Leukemia Clinical Presentation'. *Leukemia*. <https://doi.org/10.5772/53531>.

Hiwase, Devendra K., Deepak Singhal, Corinna Strupp, Rakchha Chhetri, Monika M. Kutyna, L. Amilia Wee, Peter B. Harrison, et al. n.d. 'Dynamic Assessment of RBC-Transfusion Dependency Improves the Prognostic Value of the Revised-IPSS in MDS Patients'. *American Journal of*

Hematology 92 (6): 508–14. <https://doi.org/10.1002/ajh.24704>.

Hou, Hsin-An, Tai-Chung Huang, Liang-In Lin, Chieh-Yu Liu, Chien-Yuan Chen, Wen-Chien Chou, Jih-Luh Tang, et al. 2010. 'WT1 Mutation in 470 Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia: Stability during Disease Evolution and Implication of Its Incorporation into a Survival Scoring System'. *Blood* 115 (25): 5222–31. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-259390>.

Hourigan, Christopher S., and Judith E. Karp. 2013. 'Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia'. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 10 (8): 460–71. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.100>.

Huff, Vicki. n.d. 'Wilms Tumor Genetics'. *American Journal of Medical Genetics* 79 (4): 260–67. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19981002\)79:4<260::AID-AJMG6>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19981002)79:4<260::AID-AJMG6>3.0.CO;2-Q).

Jaiswal, Siddhartha, Pierre Fontanillas, Jason Flannick, Alisa Manning, Peter V. Grauman, Brenton G. Mar, R. Coleman Lindsley, et al. 2014. 'Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes'. *New England Journal of Medicine* 371 (26): 2488–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408617>.

Jethava, Y. S., S. Sica, B. Savani, F. Socola, M. Jagasia, M. Mohty, A. Nagler, and A. Bacigalupo. 2017. 'Conditioning Regimens for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplants in Acute Myeloid Leukemia'. *Bone Marrow Transplantation* 52 (11): 1504–11. <https://doi.org/10.1038/bmt.2017.83>.

Juliusson, Gunnar, Petar Antunovic, Asa Derolf, Sören Lehmann, Lars Möllgård, Dick Stockelberg, Ulf Tidefelt, Anders Wahlin, and Martin Höglund. 2009. 'Age and Acute Myeloid Leukemia: Real World Data on Decision to Treat and Outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry'. *Blood* 113 (18): 4179–87. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-172007>.

Kennedy, James A., and Benjamin L. Ebert. 2017. 'Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome'. *Journal of Clinical Oncology* 35 (9): 968–74. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.0806>.

King-Underwood, L., and K. Pritchard-Jones. 1998. 'Wilms' Tumor (WT1) Gene Mutations Occur Mainly in Acute Myeloid Leukemia and May Confer Drug Resistance'. *Blood* 91 (8): 2961–68.

King-Underwood, L., J. Renshaw, and K. Pritchard-Jones. 1996. 'Mutations in the Wilms' Tumor Gene WT1 in Leukemias'. *Blood* 87 (6): 2171–79.

Kolb, Hans-Jochem. 2008. 'Graft-versus-Leukemia Effects of Transplantation and Donor Lymphocytes'. *Blood* 112 (12): 4371–83. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-077974>.

Kröger, Nicolaus. 2012. 'Allogeneic Stem Cell Transplantation for Elderly Patients with Myelodysplastic Syndrome'. *Blood* 119 (24): 5632–39. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-380162>.

Kröger, Nicolaus, Ulrike Bacher, Peter Bader, Sebastian Böttcher, Michael J. Borowitz, Peter Dreger, Issa Khouri, et al. 2010. 'NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Report from the Committee on Disease-Specific Methods and Strategies for Monitoring Relapse Following

Allogeneic Stem Cell Transplantation. Part I: Methods, Acute Leukemias, and Myelodysplastic Syndromes'. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 16 (9): 1187–1211. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.06.008>.

Kröger, Nicolaus, Koichi Miyamura, and Michael R. Bishop. 2011. 'Minimal Residual Disease Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation'. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 17 (1 Suppl): S94-100. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.10.031>.

Krönke, Jan, Richard F. Schlenk, Kai-Ole Jensen, Florian Tschürtz, Andrea Corbacioglu, Verena I. Gaidzik, Peter Paschka, et al. 2011. 'Monitoring of Minimal Residual Disease in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Study from the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (19): 2709–16. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.0371>.

Kuendgen, Andrea, Corinna Strupp, Manuel Aivado, Barbara Hildebrandt, Rainer Haas, Norbert Gattermann, and Ulrich Germing. 2006. 'Myelodysplastic Syndromes in Patients Younger Than Age 50'. *Journal of Clinical Oncology* 24 (34): 5358–65. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.5598>.

Kwon, Mi, Carolina Martínez-Laperche, María Infante, Fernando Carretero, Pascual Balsalobre, David Serrano, Jorge Gayoso, et al. 2012. 'Evaluation of Minimal Residual Disease by Real-Time Quantitative PCR of Wilms' Tumor 1 Expression in Patients with Acute Myelogenous Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Correlation with Flow Cytometry and Chimerism'. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 18 (8): 1235–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2012.01.012>.

Lange, T., M. Hubmann, R. Burkhardt, G.-N. Franke, M. Cross, M. Scholz, S. Leiblein, et al. 2011. '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'. *Leukemia* 25 (3): 498–505. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.283>.

Lekakis, Lazaros, and Marcos de Lima. 2008. 'Reduced-Intensity Conditioning and Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia'. *Expert Review of Anticancer Therapy* 8 (5): 785–98. <https://doi.org/10.1586/14737140.8.5.785>.

Leone, Giuseppe, Livio Pagano, Dina Ben-Yehuda, and Maria Teresa Voso. 2007. 'Therapy-Related Leukemia and Myelodysplasia: Susceptibility and Incidence'. *Haematologica* 92 (10): 1389–98.

Lindsley, R.C., W. Saber, B.G. Mar, R. Redd, T. Wang, M.D. Haagenson, P.V. Grauman, et al. 2017. 'Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation'. *The New England Journal of Medicine* 376 (6): 536–47. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611604>.

Lowenthal, R. M., and K. A. Marsden. 1997. 'Myelodysplastic Syndromes.' *International Journal of Hematology* 65 (4): 319–38. [https://doi.org/10.1016/S0925-5710\(96\)00566-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5710(96)00566-X).

Malcovati, Luca, Eva Hellström-Lindberg, David Bowen, Lionel Adès, Jaroslav Cermak, Consuelo Del Cañizo, Matteo G. Della Porta, et al. 2013. 'Diagnosis and Treatment of Primary Myelodysplastic Syndromes in Adults: Recommendations from the European LeukemiaNet'.

Blood 122 (17): 2943–64. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-492884>.

Mattsson, J., M. Uzunel, L. Tammik, J. Aschan, and O. Ringdén. 2001. 'Leukemia Lineage-Specific Chimerism Analysis Is a Sensitive Predictor of Relapse in Patients with Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome after Allogeneic Stem Cell Transplantation'. *Leukemia* 15 (12): 1976–85.

Meggendorfer, Manja, Tamara Alpermann, Karolina Perglerová, Wolfgang Kern, Susanne Schnittger, Claudia Haferlach, and Torsten Haferlach. 2014. 'Genetic Patterns of Relapsed AML Differ Significantly from First Manifestation and Are Dependent on Cytogenetic Risk Groups at Diagnosis: Results in 175 Patients with Paired Samples'. *Blood* 124 (21): 1029–1029.

Neukirchen, Judith, Wilma M. Schoonen, Corinna Strupp, Norbert Gattermann, Carlo Aul, Rainer Haas, and Ulrich Germing. 2011. 'Incidence and Prevalence of Myelodysplastic Syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-Registry'. *Leukemia Research* 35 (12): 1591–96. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.06.001>.

Nimer, Stephen D. 2008. 'Myelodysplastic Syndromes'. *Blood* 111 (10): 4841–51. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-078139>.

Nomdedéu, J. F., M. Hoyos, M. Carricondo, E. Bussaglia, C. Estivill, J. Esteve, M. Tormo, et al. 2013. 'Bone Marrow WT1 Levels at Diagnosis, Post-Induction and Post-Intensification in Adult *de Novo* AML'. *Leukemia* 27 (11): 2157–64. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.111>.

Ogawa, Hiroyasu, Kazuhiro Ikegame, Manabu Kawakami, and Hiroya Tamaki. 2004. 'WT1 Gene Transcript Assay for Relapse in Acute Leukemia after Transplantation'. *Leukemia & Lymphoma* 45 (9): 1747–53. <https://doi.org/10.1080/10428190410001687503>.

Ogawa, Hiroyasu, Hiroya Tamaki, Kazuhiro Ikegame, Toshihiro Soma, Manabu Kawakami, Akihiro Tsuboi, Eui Ho Kim, et al. 2003. '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 (5): 1698–1704. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1831>.

Osborne, D., L. Frost, K. Tobal, and J. A. Liu Yin. 2005. 'Elevated Levels of WT1 Transcripts in Bone Marrow Harvests Are Associated with a High Relapse Risk in Patients Autografted for Acute Myeloid Leukaemia'. *Bone Marrow Transplantation* 36 (1): 67–70. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704992>.

Ossenkoppele, Gert J., and Gerrit Jan Schuurhuis. 2014. 'MRD in AML: It Is Time to Change the Definition of Remission'. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 27 (3): 265–71. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2014.10.008>.

Østergaard, Mette, Lene Hyldahl Olesen, Henrik Hasle, Eigil Kjeldsen, and Peter Hokland. 2004. 'WT1 Gene Expression: An Excellent Tool for Monitoring Minimal Residual Disease in 70% of Acute Myeloid Leukaemia Patients - Results from a Single-Centre Study'. *British Journal of Haematology* 125 (5): 590–600. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.04952.x>.

Papaemmanuil, Elli, Moritz Gerstung, Lars Bullinger, Verena I. Gaidzik, Peter Paschka, Nicola D. Roberts, Nicola E. Potter, et al. 2016. 'Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia'. *The New England Journal of Medicine* 374 (23): 2209–21.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192>.

Paschka, Peter, Guido Marcucci, Amy S. Ruppert, Susan P. Whitman, Krzysztof Mrózek, Kati Maharry, Christian Langer, et al. 2008. 'Wilms' Tumor 1 Gene Mutations Independently Predict Poor Outcome in Adults with Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (28): 4595–4602. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.2058>.

Platzbecker, U., M. Wermke, J. Radke, U. Oelschlaegel, F. Seltmann, A. Kiani, I.-M. Klut, et al. 2012. 'Azacitidine for Treatment of Imminent Relapse in MDS or AML Patients after Allogeneic HSCT: Results of the RELAZA Trial'. *Leukemia* 26 (3): 381–89. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.234>.

Platzbecker, Uwe, Giuseppe Avvisati, Laura Cicconi, Christian Thiede, Francesca Paoloni, Marco Vignetti, Felicetto Ferrara, et al. 2017. 'Improved Outcomes With Retinoic Acid and Arsenic Trioxide Compared With Retinoic Acid and Chemotherapy in Non-High-Risk Acute Promyelocytic Leukemia: Final Results of the Randomized Italian-German APL0406 Trial'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (6): 605–12. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.1982>.

Porcu, Pierluigi, Larry D. Cripe, Elizabeth W. Ng, Sumeet Bhatia, Constance M. Danielson, Attilio Orazi, and Leo J. McCarthy. 2000. 'Hyperleukocytic Leukemias and Leukostasis: A Review of Pathophysiology, Clinical Presentation and Management'. *Leukemia & Lymphoma* 39 (1–2): 1–18. <https://doi.org/10.3109/10428190009053534>.

Pritchard-Jones, K., and L. King-Underwood. 1997. 'The Wilms Tumour Gene WT1 in Leukaemia'. *Leukemia & Lymphoma* 27 (3–4): 207–20. <https://doi.org/10.3109/10428199709059677>.

Ravandi, Farhad, Jeffrey Jorgensen, Gautam Borthakur, Elias Jabbour, Tapan Kadia, Sherry Pierce, Mark Brandt, et al. 2017. 'Persistence of Minimal Residual Disease Assessed by Multiparameter Flow Cytometry Is Highly Prognostic in Younger Patients with Acute Myeloid Leukemia'. *Cancer* 123 (3): 426–35. <https://doi.org/10.1002/cncr.30361>.

Rieger, Kathrin, Olga Marinets, Thomas Fietz, Sixten Körper, Dagmar Sommer, Carola Mücke, Birgit Reufi, Wolfgang I. Blau, Eckhard Thiel, and Wolfgang U. Knauf. 2005. 'Mesenchymal Stem Cells Remain of Host Origin Even a Long Time after Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell or Bone Marrow Transplantation'. *Experimental Hematology* 33 (5): 605–11. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.02.004>.

Röllig, Christoph, Martin Bornhäuser, Christian Thiede, Franziska Taube, Michael Kramer, Brigitte Mohr, Walter Aulitzky, et al. 2011. 'Long-Term Prognosis of Acute Myeloid Leukemia According to the New Genetic Risk Classification of the European LeukemiaNet Recommendations: Evaluation of the Proposed Reporting System'. *Journal of Clinical Oncology* 29 (20): 2758–65. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.8500>.

Rosenfeld, C., M. A. Cheever, and A. Gaiger. 2003. 'WT1 in Acute Leukemia, Chronic Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome: Therapeutic Potential of WT1 Targeted Therapies'. *Leukemia* 17 (7): 1301–12. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402988>.

Ruteshouser, E. Cristy, Stephen M. Robinson, and Vicki Huff. n.d. 'Wilms Tumor Genetics:

Mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 Account for Only about One-Third of Tumors'. *Genes, Chromosomes and Cancer* 47 (6): 461–70. <https://doi.org/10.1002/gcc.20553>.

Savani, Bipin N., Myriam Labopin, Nicolaus Kröger, Jürgen Finke, Gerhard Ehninger, Dietger Niederwieser, Rainer Schwerdtfeger, et al. 2016. 'Expanding Transplant Options to Patients over 50 Years. Improved Outcome after Reduced Intensity Conditioning Mismatched-Unrelated Donor Transplantation for Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Report from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT'. *Haematologica* 101 (6): 773–80. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.138180>.

Scheffold, C., M. Kroeger, M. Zuehlsdorf, J. Tchinda, G. Silling, G. Bisping, M. Stelljes, T. Buechner, W. E. Berdel, and J. Kienast. 2004. 'Prediction of Relapse of Acute Myeloid Leukemia in Allogeneic Transplant Recipients by Marrow CD34+ Donor Cell Chimerism Analysis'. *Leukemia* 18 (12): 2048–50. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403507>.

Schmid, Christoph, Myriam Labopin, Arnon Nagler, Dietger Niederwieser, Luca Castagna, Reza Tabrizi, Michael Stadler, et al. 2012. 'Treatment, Risk Factors, and Outcome of Adults with Relapsed AML after Reduced Intensity Conditioning for Allogeneic Stem Cell Transplantation'. *Blood* 119 (6): 1599–1606. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-375840>.

Schmid, Christoph, Liesbeth C. de Wreede, Anja van Biezen, Jürgen Finke, Gerhard Ehninger, Arnold Ganser, Liisa Volin, et al. 2018. 'Outcome after Relapse of Myelodysplastic Syndrome and Secondary Acute Myeloid Leukemia Following Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Retrospective Registry Analysis on 698 Patients by the Chronic Malignancies Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation'. *Haematologica* 103 (2): 237–45. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.168716>.

Schnittger, Susanne, Tamara Alpermann, Niroshan Nadarajah, Vera Grossmann, Christiane Eder, Alexander Kohlmann, Annette Fasan, et al. 2012. 'Comparison of Mutation Patterns Between Diagnosis and Relapse in 444 Patients with Acute Myeloid Leukemia Shows High Variability of Stability and Influence On Time to Relapse'. *Blood* 120 (21): 408–408.

Schroeder, T., A. Czibere, U. Platzbecker, G. Bug, L. Uharek, T. Luft, A. Giagounidis, et al. 2013. 'Azacitidine and Donor Lymphocyte Infusions as First Salvage Therapy for Relapse of AML or MDS after Allogeneic Stem Cell Transplantation'. *Leukemia* 27 (6): 1229–35. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.7>.

Schroeder, Thomas, Andrea Kuendgen, Sabine Kayser, Nicolaus Kröger, Friederike Bräulke, Uwe Platzbecker, Viola Klärner, et al. 2012. 'Therapy-Related Myeloid Neoplasms Following Treatment with Radioiodine'. *Haematologica* 97 (2): 206–12. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.049114>.

Schroeder, Thomas, Elena Rachlis, Gesine Bug, Matthias Stelljes, Stefan Klein, Nina Kristin Steckel, Dominik Wolf, et al. 2015. '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'. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 21 (4): 653–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.12.016>.

Schroeder, Thomas, Christina Rautenberg, William Krüger, Uwe Platzbecker, Gesine Bug, Juliane Steinmann, Stefan Klein, et al. 2018. 'Treatment of Relapsed AML and MDS after Allogeneic Stem Cell Transplantation with Decitabine and DLI-a Retrospective Multicenter Analysis on Behalf of the German Cooperative Transplant Study Group'. *Annals of Hematology* 97 (2): 335–42. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-3185-5>.

Schuurhuis, Gerrit J., Michael Heuser, Sylvie Freeman, Marie-Christine Béné, Francesco Buccisano, Jacqueline Cloos, David Grimwade, et al. 2018. 'Minimal/Measurable Residual Disease in AML: Consensus Document from ELN MRD Working Party'. *Blood*, January, blood-2017-09-801498. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-801498>.

Sengsayadeth, Salyka, Bipin N. Savani, Didier Blaise, Florent Malard, Arnon Nagler, and Mohamad Mohty. 2015. 'Reduced Intensity Conditioning Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Adult Acute Myeloid Leukemia in Complete Remission - a Review from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT'. *Haematologica* 100 (7): 859–69. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.123331>.

Shahab, Faseeh, and Fazli Raziq. 2014. 'Clinical Presentations of Acute Leukemia'. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP* 24 (7): 472–76. <https://doi.org/10.7104/JCPSP.472476>.

Shayegi, Nona, Michael Kramer, Martin Bornhäuser, Markus Schaich, Johannes Schetelig, Uwe Platzbecker, Christoph Röllig, et al. 2013. 'The Level of Residual Disease Based on Mutant NPM1 Is an Independent Prognostic Factor for Relapse and Survival in AML'. *Blood* 122 (1): 83–92. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-461749>.

Sill, H., W. Olipitz, A. Zebisch, E. Schulz, and A. Wölfler. 2011. 'Therapy-Related Myeloid Neoplasms: Pathobiology and Clinical Characteristics'. *British Journal of Pharmacology* 162 (4): 792–805. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01100.x>.

Steensma, David P. 2018. 'Myelodysplastic Syndromes Current Treatment Algorithm 2018'. *Blood Cancer Journal* 8 (5): 47. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0085-4>.

Steensma, David P., Rafael Bejar, Siddhartha Jaiswal, R. Coleman Lindsley, Mikkael A. Sekeres, Robert P. Hasserjian, and Benjamin L. Ebert. 2015. 'Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential and Its Distinction from Myelodysplastic Syndromes'. *Blood* 126 (1): 9–16. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-631747>.

Steensma, David P., and Ayalew Tefferi. 2003. 'The Myelodysplastic Syndrome(s): A Perspective and Review Highlighting Current Controversies'. *Leukemia Research* 27 (2): 95–120.

Summers, K., J. Stevens, I. Kakkas, M. Smith, L. L. Smith, F. Macdougall, J. Cavenagh, et al. 2007. 'Wilms' Tumour 1 Mutations Are Associated with FLT3-ITD and Failure of Standard Induction Chemotherapy in Patients with Normal Karyotype AML'. *Leukemia* 21 (3): 550–51; author reply 552. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404514>.

Tamaki, H., H. Ogawa, K. Ohyashiki, J. H. Ohyashiki, H. Iwama, K. Inoue, T. Soma, et al. 1999. 'The Wilms' Tumor Gene WT1 Is a Good Marker for Diagnosis of Disease Progression of Myelodysplastic Syndromes'. *Leukemia* 13 (3): 393–99.

Tefferi, Ayalew, and James W. Vardiman. 2009. 'Myelodysplastic Syndromes'. *The New England Journal of Medicine* 361 (19): 1872–85. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0902908>.

Terwijn, Monique, Wim L. J. van Putten, Angèle Kelder, Vincent H. J. van der Velden, Rik A. Brooimans, Thomas Pabst, Johan Maertens, et al. 2013. 'High Prognostic Impact of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia: Data from the HOVON/SAKK AML 42A Study'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (31): 3889–97. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.9628>.

Tsirigotis, P., M. Byrne, C. Schmid, F. Baron, F. Ciceri, J. Esteve, N. C. Gorin, et al. 2016. 'Relapse of AML after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Methods of Monitoring and Preventive Strategies. A Review from the ALWP of the EBMT'. *Bone Marrow Transplantation* 51 (11): 1431–38. <https://doi.org/10.1038/bmt.2016.167>.

Van Dijk, Jeroen P., Gertrudis H. J. N. Knops, Louis T. F. Van De Locht, Aswin L. Menke, Joop H. Jansen, Ewald J. B. M. Mensink, Reinier A. P. Raymakers, and Theo De Witte. 2002. 'Abnormal WT1 Expression in the CD34-Negative Compartment in Myelodysplastic Bone Marrow'. *British Journal of Haematology* 118 (4): 1027–33.

Virappane, Priya, Rosemary Gale, Robert Hills, Ioannis Kakkas, Karin Summers, Jane Stevens, Christopher Allen, et al. 2008. 'Mutation of the Wilms' Tumor 1 Gene Is a Poor Prognostic Factor Associated with Chemotherapy Resistance in Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia: The United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (33): 5429–35. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.0333>.

Weisser, M., W. Kern, S. Rauhut, C. Schoch, W. Hiddemann, T. Haferlach, and S. Schnittger. 2005. 'Prognostic Impact of RT-PCR-Based Quantification of WT1 Gene Expression during MRD Monitoring of Acute Myeloid Leukemia'. *Leukemia* 19 (8): 1416–23. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403809>.

Willekens, Christophe, Odile Blanchet, Aline Renneville, Pascale Cornillet-Lefebvre, Cécile Pautas, Romain Guieze, Norbert Ifrah, et al. 2016. 'Prospective Long-Term Minimal Residual Disease Monitoring Using RQ-PCR in RUNX1-RUNX1T1-Positive Acute Myeloid Leukemia: Results of the French CBF-2006 Trial'. *Haematologica* 101 (3): 328–35. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.131946>.

Xie, Mingchao, Charles Lu, Jiayin Wang, Michael D. McLellan, Kimberly J. Johnson, Michael C. Wendl, Joshua F. McMichael, et al. 2014. 'Age-Related Mutations Associated with Clonal Hematopoietic Expansion and Malignancies'. *Nature Medicine* 20 (12): 1472–78. <https://doi.org/10.1038/nm.3733>.

Yin, John A. Liu, Michelle A. O'Brien, Robert K. Hills, Sarah B. Daly, Keith Wheatley, and Alan K. Burnett. 2012. 'Minimal Residual Disease Monitoring by Quantitative RT-PCR in Core Binding Factor AML Allows Risk Stratification and Predicts Relapse: Results of the United Kingdom MRC AML-15 Trial'. *Blood* 120 (14): 2826–35. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-435669>.