

Das Monitoring Minimaler Resterkrankung bei Patienten mit akuter myeloischer  
Leukämie und Myelodysplastischem Syndrom nach allogener  
Blutstammzelltransplantation mit reduzierter Konditionierung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Max Christian Georg Hubmann

geboren am 26. September 1980 in Nürnberg

angefertigt an:

Universität Leipzig, Selbstständige Abteilung für Hämatologie, Internistische  
Onkologie und Hämostaseologie

Betreuer:

Professor Dr. med. Dr. hc. Dietger Niederwieser

Privatdozent Dr. med. Thoralf Lange

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.07.2012

## Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. <u>Bibliographische Beschreibung</u>	2
2. <u>Einführung in die Thematik</u>	3
2.1 Pathogenese, Epidemiologie und Klinik der akuten myeloischen Leukämie und der Myelodysplastischen Syndrome	3
2.2 Klassifikation und Risikostratifizierung	4
2.3 Diagnostik	5
2.4 Die allogene Stammzelltransplantation in der Therapie der AML	5
2.5 Die allogene Stammzelltransplantation in der Therapie des MDS	6
2.6 Die allogene Stammzelltransplantation	6
2.7 Die allogene Stammzelltransplantation mit reduzierter Konditionierung	7
2.8 MRD Monitoring nach allogener Stammzelltransplantation	8
2.9 Das Wilms Tumor Gen 1 als molekularer MRD Marker	9
2.10 Die Rationale für das Dissertationsthema	10
3. <u>Publikationsmanuskript</u>	15
4. <u>Zusammenfassung der Arbeit</u>	24
5. <u>Anlagen</u>	
5.1 MRD Verläufe von 15 rezidierten Patienten nach HCT mit RIC	29
5.2 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	31
5.3 Lebenslauf	32
5.4 Publikationen	34
5.5 Abstracts der Kongressbeiträge dieser Dissertation	36
5.6 Danksagung	41

## 1. Bibliographische Beschreibung

Hubmann, Max Christian Georg

### Das Monitoring Minimaler Resterkrankung bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und Myelodysplastischem Syndrom nach allogener Blutstammzelltransplantation mit reduzierter Konditionierung

Universität Leipzig, Dissertation  
41 S., 64 Lit. , 2 Abb., 3 Tab., 6 Anlagen

Referat:

Im Rahmen dieser Dissertation wurde retrospektiv die Minimale Resterkrankung von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und Myelodysplastischen Syndrom nach allogener Stammzelltransplantation mit minimaler Konditionierung untersucht. Hierfür wurden vier unterschiedliche Methoden zur Detektion der Minimalen Resterkrankung analysiert. Nach Etablierung einer quantitativen Real-Time PCR für das Wilms Tumor Gen 1 (WT1) im peripheren Blut wurden diese Ergebnisse mit bereits routinemäßig erhobenen Daten des Chimärismus im Gesamtknochenmark und in CD34<sup>+</sup> Zellen sowie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) krankheitsspezifischer chromosomaler Aberrationen von insgesamt 88 Patienten verglichen und statistisch ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpressionanalysen des WT1 sowie die Chimärismusanalysen ein Rezidiv im Gegensatz zu den FISH Analysen vier Wochen im Voraus detektieren können. In Receiver Operating Curve Analysen wurden eine WT1 Expression von  $> 24$  WT1/10.000 ABL1 Kopien und der Abfall des CD34<sup>+</sup> Spenderchimärismus von  $\geq 5\%$  als diagnostisch stärkste Methoden identifiziert. In uni- und multivariaten Analysen von insgesamt 20 Parametern wurden die beiden Methoden als unabhängige Variablen für ein frühes Rezidiv, progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben bestätigt. Kombiniert man beide Methoden, so kann bei jeweiligem negativen Testergebnis ein Rezidiv innerhalb der nächsten vier Wochen nahezu ausgeschlossen werden.

## **2. Einführung in die Thematik**

Die akute myeloische Leukämie (AML) und das Myelodysplastische Syndrom (MDS) sind Erkrankungen primitiver hämatopoetischer Zellen. Durch genetische Veränderungen entsteht der leukämische Zellklon, der durch eine starke klonale Proliferation und eingeschränkte Differenzierung gekennzeichnet ist. In der Folge häufen sich undifferenzierte und / oder dysplastische Zellen im Knochenmark an (1, 2).

### **2.1 Pathogenese, Epidemiologie und Klinik der akuten myeloischen Leukämie und der Myelodysplastischen Syndrome**

Zum aktuellen Zeitpunkt geht man von einem mehrstufigen Prozess der Entstehung eines leukämischen Zellklons aus. Mindestens zwei genetische Veränderungen sind notwendig, die sowohl die Proliferation (Klasse I Mutation) als auch die Differenzierung (Klasse II Mutation) der hämatopoetischen Stammzellen beeinflussen. Nur wenn beide Veränderungen vorliegen, entsteht im Mausmodell eine klinisch fassbare Erkrankung (3).

Als Auslöser dieser genetischen Veränderungen sind ionisierende Strahlung, Benzole und die Gabe von Zytostatika bekannt. Diese finden sich jedoch nur in wenigen Fällen in der Anamnese der Patienten.

Die Inzidenz der MDS liegt bei 3,4 /100 000. Dabei handelt es sich um eine Erkrankung des höheren Alters. So steigt die Inzidenz bei  $\geq 65$  Jährigen auf 162/100 000 an (4, 5). Die AML ist mit einer Inzidenz von ca. 3/100 000 eine seltene Erkrankung (6). Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt etwa bei 65 Jahren.

Die klinische Symptomatik der Patienten mit AML und MDS wird maßgeblich durch die Unterdrückung der einzelnen Zellreihen (Erythropoese, Megakaryopoese, Granulopoese) bestimmt. Meist berichten die Patienten über ein allgemeines Krankheitsgefühl, Schwäche, Infektanfälligkeit und Blutungszeichen bei Bagatelltraumata. Eine B-Symptomatik (Fieber, ausgeprägter Nachtschweiß und ein ungewollter 10%iger Gewichtsverlust innerhalb der letzten 6 Monate) kann ebenfalls auftreten. Bei der AML zeigen die Patienten meistens eine kurze, d. h. nur wenige

Wochen zurückreichende Anamnese. MDS-Patienten zeigen weniger akute Symptome des Defektes der betroffenen hämatopoetischen Zellreihe und/ oder der beginnenden Akkumulation von leukämischen Blasten. Steigt bei diesen Patienten der Blastenanteil auf  $\geq 20\%$  an, spricht man von dem Übergang in eine sekundäre AML.

## 2.2 Klassifikation und Risikostratifizierung

Die Klassifikationen beider Erkrankungen folgte zum einen historisch der French - American - British Klassifikation (FAB) (7, 8) und aktuell der WHO Classification 2008 (2). Die FAB Klassifikation teilte die AML und das MDS auf der Basis von Zytomorphologie und Zytochemie in verschiedene Subgruppen ein. In der WHO Klassifikation von 2008 fließen zusätzlich noch zyto- und molekulargenetische Faktoren ein.

In der Risikostratifizierung der AML sind neben den individuellen Risikofaktoren eines Patienten (Alter, Vorerkrankungen, etc.) noch zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen von Bedeutung. Zytogenetisch wird in eine günstige, intermediäre und ungünstige Subgruppe unterteilt (9). Insbesondere bei einem normalen Karyotyp zeigen sich molekulargenetische Veränderungen als prognostisch relevant. Man kann anhand des Mutationsstatus einzelner Gene (s.u.) eine Einteilung in prognostisch günstige und ungünstige Leukämien vornehmen (10, 11).

Für das MDS haben sich zwei Scoringsysteme etabliert. Dies ist zum einen das International Prognostic Scoring System (IPSS) und zum anderen das WHO adapted Prognostic Scoring System (WPSS) (12). Im IPSS Score lassen sich durch die Anzahl der Zytopenien, der Blastenanteil im Knochenmark und Veränderungen des Karyotyps die Wahrscheinlichkeiten für den Übergang in eine AML und für das Gesamtüberleben kalkulieren (13). Beim WPSS fließen im Gegensatz zum IPSS nicht die Anzahl der Zytopenien sondern die Transfusionsbedürftigkeit in die Prognoseberechnung mit ein.

### 2.3 Diagnostik

Als Standarddiagnostik wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt vom European Leukemia Net neben der Zytomorphologie, die Zytogenetik und die Immunphänotypisierung gesehen. Bei Verdacht auf AML oder MDS besteht die initiale Diagnostik in der zytomorphologischen und zytochemischen Untersuchung von Knochenmark- und Blutaussstrichen, gefolgt von einer Immunphänotypisierung. Damit wird die Diagnose gestellt. Zur weiteren Subklassifizierung bzw. prognostischen Einteilung folgen zytogenetische und optional molekulargenetische Untersuchungen.

Anhand der zytogenetischen Untersuchungen lassen sich prognostisch günstige (beispielsweise eine Translokation 15;17 bei AML oder eine Deletion 5q- bei MDS) und prognostisch ungünstige chromosomale Aberrationen nachweisen. Mit Hilfe der Molekulargenetik, die außerhalb von klinischen Studien nur bei Erkrankungen mit normalen Karyotyp empfohlen wird, können bei der AML prognostisch günstige Veränderungen wie z. B. CEBPa oder Nucleophosmin 1 (NPM1) Mutationen oder aber prognostisch ungünstige Veränderungen, wie z. B. FMS-like Tyrosin Kinase 3 (FLT3) Mutation oder mixed lineage leukemia rearrangements nachgewiesen werden. Weiterführende Diagnostik, wie Genexpressionanalysen und MRD Diagnostik sollte im Rahmen von klinischen Studien erfolgen (11).

### 2.4 Die allogene Stammzelltransplantation in der Therapie der AML

Die AML führt in der Regel unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tode. Die Therapie einer AML wird prinzipiell in eine Induktionstherapie und eine Postremissionstherapie/Konsolidierungstherapie unterteilt.

Je nach Allgemeinzustand (Karnofsky-Index oder ECOG Status) und Komorbiditäten des Patienten wird entschieden, ob eine intensive Induktionstherapie mit dem Ziel einer kompletten Remission (CR) möglich ist. Eine CR ist dann erreicht, wenn im peripheren Blut keine und im Knochenmark weniger als 5% blastäre Zellen, keine extramedullären Manifestationen der AML, mehr als 1000 neutrophile Granulozyten/ $\mu\text{l}$  bzw. mehr als 100.000 Thrombozyten/ $\mu\text{l}$  im peripheren Blut vorliegen (14).

Nach einer Induktionstherapie kommen als Postremissionstherapie zwei Therapieoptionen in Frage – eine alleinige konsolidierende Chemotherapie oder eine

allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen (HCT), der ggf. eine Konsolidierungstherapie vorangehen kann. Bei Patienten > 60 Jahre besteht eine hohe Rezidivrate unter konsolidierender Chemotherapie während in einer Phase 2 Studie ein progressionsfreies Überleben von 44% und ein Gesamtüberleben von 48% 2 Jahre nach Stammzelltransplantation erreicht wurde (15). Zur endgültigen Klärung der optimalen Konsolidierungstherapie bei älteren Patienten mit AML in 1. CR wird derzeit eine europäische Studie durchgeführt, die nach einer Konsolidierungstherapie zwischen einer Stammzelltransplantation und einer weiteren Konsolidierung randomisiert. Die Indikation zu einer allogenen HCT in 1. CR bei jüngeren Patienten wird nach dem zytogenetischen Risikoprofil gestellt. Eine Knochenmarkinsuffizienz nach einer Induktionstherapie, eine refraktäre bzw. rezidierte Erkrankung oder ein ungünstiges molekulargenetisches Risikoprofil stellen weitere mögliche Indikationen dar.

## 2.5 Die allogene Stammzelltransplantation in der Therapie des MDS

Die Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation in der Therapie des MDS orientiert sich an den Risikostratifizierungen, nach dem IPSS oder WPSS Score (12, 13). Danach lassen sich im Wesentlichen zwei Risikogruppen unterscheiden, die Niedrigrisiko-MDS (Low risk und Int-1) und die Hochrisiko-MDS (Int-2 und High risk). Prinzipiell ist die allogene HCT die einzige kurative Option für MDS Patienten. Wegen der hohen Transformationsrate in eine akute Leukämie und einem eingeschränkten Gesamtüberleben sollte bei Hochrisiko-MDS-Patienten immer eine HCT angestrebt werden. Bei niedrigem Risiko müssen unter Beachtung von Alter, Komorbiditäten und zusätzlichen Risikofaktoren Patienten selektioniert werden, die von einer allogene HCT profitieren (16).

## 2.6 Die allogene Stammzelltransplantation

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation stellt ein potentiell kuratives Therapiekonzept für Patienten mit AML und MDS dar. Einer HCT geht eine Konditionierungstherapie voran, welche im Allgemeinen als Maßnahme für eine

Akzeptanz des Transplantats im Empfängerorganismus erforderlich ist. Direkt im Anschluss an die Konditionierungstherapie erfolgt die Stammzellgabe. Knochenmark, durch G-CSF stimulierte periphere Blutstammzellen oder Nabelschnurblut sind die möglichen Stammzellquellen. Neben potentiellen Familienspendern kann auch nach HLA kompatiblen Fremd Spendern in internationalen Spenderregistern gesucht werden.

In Abhängigkeit der verschiedenen Therapieregime erhält der Patient im Zusammenhang mit Transplantation eine immunsuppressive Therapie. Diese wird nach erfolgreichem Anwachsen der Stammzellen (Engraftment) und abhängig von anderen Faktoren wie beispielsweise das Auftreten von einer Graft-versus-Host-Erkrankung sukzessive ausgeschlichen.

Bis vor einigen Jahren wurde die Ansicht vertreten, dass die Heilung der malignen Grunderkrankung durch die myeloablative Konditionierungstherapie zustande kommt. Erst die Beobachtung, dass T-Zell-Gaben ein Rezidiv der Erkrankung erfolgreich bekämpfen können und dass Rezidive häufiger nach T-Zell-depletierten Transplantationen auftreten, hat zur Beschreibung des „graft-versus-leukemia“ Effekt (GvL) geführt (17). So ist neben der Konditionierungstherapie der GvL-Effekt nach HCT ein sehr wichtiger Mechanismus zur Heilung von malignen hämatologischen Erkrankungen.

Die HCT nach myeloablativer Konditionierung wird aufgrund der höheren Toxizität und den damit verbundenen Nebenwirkungen überwiegend bei jüngeren Patienten (< 50 - 60 Jahren) durchgeführt. Für ältere Patienten bzw. Patienten, die sich aufgrund Komorbiditäten einer myeloablativen Konditionierung nicht unterziehen können, besteht die Möglichkeit einer HCT mit dosisreduzierter Konditionierung – reduced intensity conditioning (RIC) (15).

## 2.7 Die allogene Stammzelltransplantation mit reduzierter Konditionierung (RIC-HCT)

Im Gegensatz zur myeloablativen Konditionierung beruht der Therapieeffekt der RIC-HCT hauptsächlich auf immunologischen Wirkungen, dem GvL-Effekt. Durch eine Minderung der Toxizität in der Konditionierungstherapie konnte die therapiebedingte Sterblichkeit (Treatment related mortality) deutlich reduziert werden. Davon profitieren vor allem ältere Patienten (> 50 Jahre) (18). Für ältere Patienten oder



Patienten, die sich keiner konventionellen Konditionierungstherapie unterziehen können, stellt daher die RIC-HCT oftmals die einzige kurative Therapieoption dar.

Nach einer RIC-HCT besteht das Hauptproblem in einem Rezidiv der Grunderkrankung. In einer Analyse von 122 Patienten nach RIC-HCT betrug nach 2 Jahren die leukämieassoziierte Sterberate 33% für Patienten mit Fremdspender bzw. 47% für Patienten mit Familienspender (15).

Rezidive nach RIC-HCT treten relativ frühzeitig nach Transplantation auf. Die meisten Krankheitsrückfälle ereignen sich innerhalb der ersten sechs Monate nach Transplantation (19). Die Behandlung eines Rezidivs nach allogener HCT muss individuell angepasst werden. Sie beinhaltet u.a. den Einsatz von Spenderlymphozyten, Zytostatika oder die rasche Reduktion der Immunsuppression zur Förderung eines GvL Effekts. Entscheidend für den Erfolg der Rezidivtherapie sind die bestehende Tumorlast bei Rezidiv und die Dynamik der Erkrankung. Es ist daher von entscheidender Bedeutung, ein drohendes Rezidiv frühzeitig zu erkennen und behandeln zu können.

## 2.8 MRD Monitoring nach allogener HCT

Nach allogener HCT stehen für ein Monitoring der Minimalen Resterkrankung – minimal residual disease (MRD) zahlreiche Ansätze zur Verfügung. Neben der klassischen zytomorphologischen Beurteilung peripherer Blutausstriche und Knochenmarkausstriche werden zytogenetische, durchflusszytometrische, molekulargenetische Methoden und Chimärismusanalysen eingesetzt.

Bei etwa 50 % aller AML und MDS Patienten liegen chromosomale Veränderung im malignen Zellklon vor. Die meisten lassen sich mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) Technik nachweisen. Hierfür werden in der Regel ca. 200-300 Interphasen-Zellkerne ausgewertet. In Abhängigkeit der eingesetzten FISH Sonde liegt die Sensitivität dieser Methode bei 0,1 – 8% (20).

Bei AML Patienten lassen sich mittels Durchflusszytometrie leukämieassoziierte Immunphänotypen nachweisen. Die Sensitivität dieser Methode liegt bei 0,01 - 0,1% (21).

Eine indirekte MRD Methode nach allogener Stammzelltransplantation ist die

Chimärismusanalyse. Bei dieser Methode wird nach Transplantation entweder in der gesamten Zellpopulation oder in sortierten Zellsubpopulationen (z.B. CD3<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> Zellen) der Spenderanteil gemessen. Bei gleichgeschlechtlicher Transplantation wird mit einer Short-Tandem-repeats Polymerase Kettenreaktion (STR-PCR) oder quantitativen real-time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) der Spenderanteil bestimmt. Bei einer gegengeschlechtlichen Transplantation wird der prozentuale Spenderanteil mit FISH Sonden der Geschlechtschromosomen festgestellt. Die Sensitivität liegt je nach Untersuchungsmethode bei 0,0001 – 5 % (22).

Die AML ist eine molekulargenetisch heterogene Erkrankung. Im Gegensatz zur chronischen myeloischen Leukämie mit dem BCR-ABL Fusionstranskript gibt es keinen einheitlichen krankheitsspezifischen molekularen Marker. Lediglich in AML Subgruppen ist ein molekulares MRD monitoring mit spezifischen Markern möglich. Das Nucleophosmin 1 Gen (NPM1) ist in ca. 50% und die FMS-like Tyrosin Kinase 3 in 25 – 30% der Fälle mutiert. Die AML spezifischen Fusionsgene wie AML1-ETO, CBFb-MYH11 and PML-RARa treten nur selten auf.

Krankheitsunspezifische Marker, im speziellen überexprimierte Gene, wie beispielsweise das Wilms Tumor Gen 1 kommen bei bis zu 100% der Fälle vor.

Die Quantifizierung der molekularen Marker erfolgt über eine RT-PCR. Die molekulargenetischen Methoden mittels RT-PCR haben eine Sensitivität von 0,00001 – 0,001 (21).

### 2.9 Das Wilms Tumor Gen 1 als molekularer MRD Marker

Das WT1 Gen ist ein Tumorsuppressorgen und auf dem kurzen Arm des Chromosom 11 lokalisiert. Es wurde erstmalig in Zusammenhang mit dem Nephroblastom (Wilms Tumor) beschrieben. Es encodiert für einen Transkriptionsfaktor mit Zinkfingercharakteristika.

Die Funktion des Gens ist in der gesunden Hämatopoese sehr komplex und zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. Im Mausmodell konnten sowohl Einflüsse auf die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Apoptose gezeigt werden (23).

Bei Patienten mit AML und MDS zeigt das WT1 Gen eine Überexpression auf. Bei der AML ist es im Gegensatz zu den krankheitsspezifischen Markern, wie z.B. NPM1,

in nahezu allen Fällen (89% - 100%) (21) überexprimiert und daher für ein MRD Monitoring geeignet. In den bisher veröffentlichten Studien konnte gezeigt werden, dass die WT1 Genexpression nach konventioneller Chemotherapie, autologer HCT und allogener HCT (24) einen validen MRD Marker darstellt. Die Genexpression zeigt im Knochenmark (KM) und im peripheren Blut (PB) von gesunden Probanden bzw. von Patienten in kompletter Remission Unterschiede in der Höhe der Expression: So ist die Genexpression im KM bei gesunden Probanden stets positiv, allerdings mit niedrigen Expressionswerten, wohingegen die Genexpression im PB meist negativ oder ggf. mit sehr niedrigen Expressionswerten ausfällt. Im Gegensatz dazu bestehen bei der Erstdiagnose einer AML oder MDS in KM und PB keine Unterschiede in der Höhe der Genexpression. Die WT1 Expression ist daher ein verlässlicher MRD Marker für Patienten mit AML und MDS, weshalb das European Leukemia Net eine Empfehlung für die Durchführung dieser MRD Analyse publiziert hat (25).

## 2.10 Die Rationale für das Dissertationsthema

RIC-HCT ist eine vielversprechende Behandlungsoption für Patienten mit AML und MDS, die sich aufgrund eines fortgeschrittenen Alters bzw. wegen Kontraindikationen keiner HCT mit myeloablativer Konditionierung unterziehen können. Die Hauptkomplikation nach einer RIC-HCT ist das frühe Rezidiv der Erkrankung. Maßgeblich für den therapeutischen Erfolg einer Rezidivbehandlung ist die frühzeitige Detektion von MRD. Je geringer die Tumorlast, desto größer sind die therapeutischen Chancen, ein Rezidiv beispielsweise durch Reduktion der Immunsuppression erfolgreich zu behandeln. Im Rahmen dieser Promotion wurden verschiedenste MRD Methoden bezüglich der Prädiktion eines Rezidivs untersucht. Die FISH Diagnostik wurde mit Chimärismus Analysen und einem molekularen Marker verglichen. Neben dem Gesamtchimärismus wurde auch der nach CD34<sup>+</sup> Zellen sortierte Chimärismus analysiert, da dieser die sensitivsten Informationen über den Anteil von Spenderstammzellen im Knochenmark liefert. Als molekularer Marker wurde die Genexpression des WT1 Gen im PB gewählt. Das WT1 Gen ist bei Patienten mit AML und MDS in nahezu allen Fällen überexprimiert und daher im Gegensatz zu krankheitsspezifischen molekularen Markern bei nahezu allen

Patienten anwendbar. Als Materialquelle für die Genexpressionsanalysen wurde PB gewählt. Neben der geringen Invasivität der Materialgewinnung und der damit leichteren Verfügbarkeit liegt bei Analysen aus dem PB eine höhere Sensitivität vor, da bei gesunden Probanden keine bzw. nur eine sehr geringe Genexpression vorliegt.

Ziele dieser Arbeit waren:

- 1) die Etablierung einer quantitativen RT-PCR für das WT1 Gen als molekularer MRD Marker,
- 2) die Auswertung der Genexpression des WT1 Gen im PB von gesunden Probanden und von Patienten während der viermonatigen Evaluationsperiode,
- 3) die Auswertung der Chimärismusdaten und FISH Daten der Patienten während der viermonatigen Evaluationsperiode,
- 4) die Prädiktionsanalysen der verschiedenen Methoden für ein Rezidiv innerhalb der nächsten 28 Tage,
- 5) die Bestimmung von klinisch einsetzbaren cut-offs der einzelnen Methoden anhand Receiver Operating Curve Analysen,
- 6) die Kombination der verschiedenen Methoden zur Optimierung der Prädiktion bzw. Ausschluss eines Rezidivs innerhalb der nächsten 28 Tage,
- 7) die Prädiktionsanalysen der beiden bestgeeigneten MRD Methoden dieser Arbeit für ein Rezidiv innerhalb der nächsten 84 Tage,
- 8) eine univariate bzw. multivariate Analyse von transplantationsrelevanten Faktoren, Verlaufsparemtern und den beiden bestgeeigneten MRD Methoden dieser Arbeit hinsichtlich des Auftretens eines Rezidivs innerhalb der Evaluationsperiode von vier Monaten, des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens.

In dieser Promotionsarbeit wurden erstmalig verschiedene MRD Methoden an einer homogenen Studienpopulation nach allogener Stammzelltransplantation mit reduzierter Konditionierung untersucht, um ein drohendes Rezidiv frühzeitig erkennen bzw. ausschließen zu können.

## Literaturverzeichnis

1. Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic syndromes--coping with ineffective hematopoiesis. *N Engl J Med.* 2005 Feb 10;352(6):536-538.
2. Swerdlow SH, Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ed4).* Lyon: IARC Press; 2008.
3. Fialkow PJ, Janssen JW, Bartram CR. Clonal remissions in acute nonlymphocytic leukemia: evidence for a multistep pathogenesis of the malignancy. *Blood.* 1991 Apr 1;77(7):1415-1417.
4. Goldberg SL, Chen E, Corral M, Guo A, Mody-Patel N, Pecora AL, Laouri M. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *J Clin Oncol.* 2010 Jun 10;28(17):2847-2852.
5. Sekeres MA. The epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010 Apr;24(2):287-294.
6. Altekruse SF, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlander N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Cronin K, Chen HS, Feuer EJ, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007.* Bethesda: SEER Cancer Center; 2010.
7. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982 Jun;51(2):189-199.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1985 Oct;103(4):620-625.
9. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, Appelbaum FR. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood.* 2000 Dec 15;96(13):4075-4083.
10. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Spath D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Dohner H. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008 May 1;358(18):1909-1918.

11. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Lowenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010 Jan 21;115(3):453-474.
12. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S, Strupp C, Lazzarino M, Aul C, Cazzola M. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 10;25(23):3503-3510.
13. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997 Mar 15;89(6):2079-2088.
14. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH, Schiffer CA, Doehner H, Tallman MS, Lister TA, Lo-Coco F, Willemze R, Biondi A, Hiddemann W, Larson RA, Lowenberg B, Sanz MA, Head DR, Ohno R, Bloomfield CD. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003 Dec 15;21(24):4642-4649.
15. Hegenbart U, Niederwieser D, Sandmaier BM, Maris MB, Shizuru JA, Greinix H, Cordonnier C, Rio B, Gratwohl A, Lange T, Al-Ali H, Storer B, Maloney D, McSweeney P, Chauncey T, Agura E, Bruno B, Maziarz RT, Petersen F, Storb R. Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 20;24(3):444-453.
16. Greenberg PL. Current therapeutic approaches for patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2010 Jul;150(2):131-143.
17. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990 Feb 1;75(3):555-562.

18. Ringden O, Labopin M, Ehninger G, Niederwieser D, Olsson R, Basara N, Finke J, Schwerdtfeger R, Eder M, Bunjes D, Gorin NC, Mohty M, Rocha V. Reduced intensity conditioning compared with myeloablative conditioning using unrelated donor transplants in patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 20;27(27):4570-4577.
19. Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, Tischer J, Kolb HJ. Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 20;23(24):5675-5687.
20. Gozzetti A, Le Beau MM. Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol*. 2000 Oct;37(4):320-333.
21. Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005 Nov;56(2):283-309.
22. Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematol*. 2004;112(1-2):16-23.
23. Ariyaratana S, Loeb DM. The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis. *Expert Rev Mol Med*. 2007;9(14):1-17.
24. Hubmann M, Burkhardt R, Franke G, Cross M, Scholz M, Leiblein S, Thiery J, Niederwieser DW, Lange T. CD34+ Donor Chimerism and Wilms Tumor Gene 1 (WT1) Expression Provide an Early Indication of Relapse in Patients with Acute Leukemias and MDS after Hematopoietic Cell Transplantation (HCT) with Reduced-Intensity Conditioning. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2006 November 16, 2006;108(11):548-.
25. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, Gottardi E, Fava M, Schnittger S, Weiss T, Izzo B, Nomdedeu J, van der Heijden A, van der Reijden BA, Jansen JH, van der Velden VH, Ommen H, Preudhomme C, Saglio G, Grimwade D. 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 Nov 1;27(31):5195-5201.

### **3. Publikationsmanuskript**

**Monitoring of WT1 Expression in PB and CD34<sup>+</sup> donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning**

veröffentlicht in:

**Leukemia 2011 Mar; 25 (3): 498 – 505**



## ORIGINAL ARTICLE

# Monitoring of WT1 expression in PB and CD34<sup>+</sup> donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning

T Lange<sup>1,5</sup>, M Hubmann<sup>1,5</sup>, R Burkhardt<sup>2</sup>, G-N Franke<sup>1</sup>, M Cross<sup>1</sup>, M Scholz<sup>3</sup>, S Leiblein<sup>1</sup>, HK Al-Ali<sup>1</sup>, J Edelmann<sup>4</sup>, J Thiery<sup>2</sup> and D Niederwieser<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology, Oncology and Hemostaseology, University of Leipzig, Leipzig, Germany; <sup>2</sup>Department of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University of Leipzig, Leipzig, Germany; <sup>3</sup>Institute for Medical Informatics, Statistics and Epidemiology, University of Leipzig, Leipzig, Germany and <sup>4</sup>Department for Forensic Medicine at the University of Leipzig, Leipzig, Germany

**Relapse of malignant disease remains the major complication in patients with acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndrome (MDS) after hematopoietic cell transplantation (HCT) with reduced-intensity conditioning (RIC). In this study, we investigated the predictive value of disease-specific markers (DSMs), donor chimerism (DC) analysis of unsorted (UDC) or CD34<sup>+</sup> sorted cells and Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression. Eighty-eight patients with AML or MDS were monitored after allogeneic HCT following 2 Gy total-body irradiation with ( $n=84$ ) or without ( $n=4$ ) fludarabine  $3 \times 30$  mg/m<sup>2</sup>, followed by cyclosporin A and mycophenolate mofetil. DSMs were determined by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and WT1 expression by real-time polymerase chain reaction. Chimerism analysis was performed on unsorted or CD34<sup>+</sup> sorted cells, by FISH or short tandem repeat polymerase chain reaction. Twenty-one (24%) patients relapsed within 4 months after HCT. UDC, CD34<sup>+</sup> DC and WT1 expression were each significant predictors of relapse with sensitivities ranging from 53 to 79% and specificities of 82–91%. Relapse within 28 days was excluded almost entirely on the basis of WT1 expression combined with CD34<sup>+</sup> DC kinetics. Monitoring of WT1 expression and CD34<sup>+</sup> DC predict relapse of AML and MDS after RIC-HCT.**

Leukemia advance online publication, 7 December 2010;  
doi:10.1038/leu.2010.283

**Keywords:** MRD; AML; WT1; chimerism; HCT; RIC

## Introduction

Reduced-intensity conditioning (RIC) hematopoietic stem cell transplantation (HCT) relies mainly on immunological effects for disease control and is a promising treatment for patients with acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) not eligible for conventional conditioning regimens because of age or contraindications. Although a variety of RIC protocols has been developed,<sup>1,2</sup> recurrence of the disease remains the major problem,<sup>3–5</sup> with relapse rates of 39% at 2 years in elderly patients conditioned with 2 Gy total body irradiation with or without fludarabine.<sup>6</sup> A number of strategies are available for the treatment of relapse, including reduction of immunosuppression,<sup>7</sup> chemotherapy or donor lymphocyte infusion.<sup>8</sup> The success of the treatment depends heavily on the

tumor load (molecular, cytogenetic or hematological relapse (HR)) and the kinetics of the disease.

As a consequence, the prediction of HR is an important factor in the management of AML patients following RIC-HCT. However, in contrast to Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia, in which quantification of BCR-ABL1 (Abelson gene) can be used to detect early relapse or even predict relapse,<sup>9</sup> no common genetic markers are available for AML. Only in subgroups of patients do specific mutations and fusion gene transcripts permit molecular monitoring of minimal residual disease (MRD).<sup>10–12</sup> Nucleophosmin 1 is mutated in only 48%<sup>13,14</sup> and FMS-like tyrosine kinase 3 in only 25–30% of patients with AML and the specific FMS-like tyrosine kinase 3 mutation can be unstable during follow-up.<sup>10,15,16</sup> Furthermore, the highly distinctive fusion genes such as *AML1-ETO*, *CBFβ-MYH11* and *PML-RARα* are rare.

In contrast, overexpression of the non-mutated Wilms' tumor gene 1 (WT1) is found in 89–100%<sup>10,17–20</sup> of patients with AML and MDS, making this marker an ideal tool for monitoring MRD. WT1 expression has already been shown to be a helpful marker in patients with AML after chemotherapy,<sup>19,21–23</sup> after autologous<sup>24</sup> and after conventional allogeneic HCT.<sup>25–27</sup>

In this analysis, the ability of different markers to predict relapse following allogeneic HCT with RIC was analyzed both alone and in combination. Peripheral blood (PB) cell WT1 expression levels quantified by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) were compared with the detection of disease-specific (DS) markers by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Finally, levels of donor chimerism in unsorted cells (UDC) and in sorted CD34<sup>+</sup> subpopulations were compared with the other parameters. The results clearly show that the combination of the CD34<sup>+</sup> donor chimerism kinetics in bone marrow (BM) and WT1 expression in PB provides a very strong indicator of relapse within 28 days of sampling and can be used as a tool to detect early relapse in patients after allogeneic HCT following RIC.

## Materials and methods

### Patients

Between July 1999 and July 2005, 88 consecutive patients with a median age of 61 (range 22–74) years with either AML ( $n=68$ ) or intermediate or high-risk MDS ( $n=20$ ) in complete remission 1 ( $n=41$ ), complete remission 2 ( $n=25$ ) or in a more advanced disease status ( $n=22$ ) were transplanted at the Department of Hematology and Oncology, University of Leipzig, Germany

Correspondence: Dr T Lange, Department of Hematology, Oncology and Hemostaseology, University of Leipzig, Johannisallee 32A, Leipzig 04103, Germany.

E-mail: langet@medizin.uni-leipzig.de

<sup>5</sup>These two authors contributed equally to this work.

Received 24 March 2010; revised 10 September 2010; accepted 29 September 2010

after written informed consent was obtained from all patients. Patient and transplant characteristics are summarized in Table 1. The conditioning regimen consisting of fludarabine 30 mg/kg body weight from day -4 to -2 ( $n=84$ ) combined with low-dose total body irradiation (200 cGy,  $n=87$  or 300 cGy,  $n=1$ ) at day 0 was followed by the infusion of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized PB stem cells from related ( $n=22$ ) or unrelated ( $n=66$ ) donors. All patients received cyclosporin A and mycophenolate mofetil.<sup>28</sup> Mycophenolate mofetil was stopped at day 27 following related HCT and tapered from days 40 to 96 following unrelated HCT. Cyclosporin A was reduced from day 84 or day 180 following related and unrelated HCT, respectively. Immunosuppression was prolonged in case of graft-versus-host disease grade  $\geq$ II or rapidly reduced in case of HR, defined as  $>5\%$  blasts in the BM by cytomorphology. Engraftment was documented by full donor T-cell chimerism. HRs diagnosed by cytomorphology occurred in 37 patients

(43%) after a median time of 122 (range 18–1456) days after HCT. Immunosuppression was tapered in two AML patients following a decrease in CD34<sup>+</sup> chimerism in the absence of elevated blasts. These two patients were excluded from the prediction analysis.

### Sampling of BM and PB

BM aspirations for cytomorphology, UDC, CD34<sup>+</sup> DC and, where possible, DS-FISH were performed at days 28, 56 and 84 after HCT or until relapse as a routine follow-up monitoring schedule. WT1 expression was assessed retrospectively from stored PB samples from the same time points.

### DC in unsorted and in CD34<sup>+</sup> BM cells

Chimerism analyses were performed by FISH- or PCR-based amplification of short tandem repeat sequences for sex-mismatched or -matched donor recipient pairs, respectively.<sup>29</sup> Briefly, 300 interphases were analyzed by X/Y FISH (SO CEP X/SG CEP Y; Vysis, Stuttgart, Germany) with a lab-specific sensitivity of one cell in a background of 299 cells. Short tandem repeat-PCR was performed on DNA of  $10^7$  total white cells with a similar sensitivity.

CD34<sup>+</sup> cells were sorted by fluorescence-activated cell sorting using the FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and the CD34PE8G12 antibody (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

### FISH of DS markers

FISH analyses were performed from BM cells in 38 patients with molecular markers according to standard protocols on a minimum of 200 interphases.<sup>30</sup> In detail, CEP 8 SO, LSI 5q EGR 1SO/D5S23 SG, LSI D7S522 SO/CEP 7SG, LSI MLL Dual Color, LSI CBF, inv<sup>16</sup> DualColor, LSI D20S108 SO, LSI D13S319 SO and LSI p53SO were used to detect abnormalities. The cutoffs for positivity, determined in the background of healthy individuals, range between 1 and 4.5%. All probes were purchased from ABBOTT (Wiesbaden, Germany).

### Quantitative assessment of WT1 expression in PB

Mononuclear cells were isolated from PB and stored at  $-196^\circ\text{C}$  until use. RNA was extracted from  $1 \times 10^7$  cells and reverse transcribed as described previously.<sup>31</sup> RT-PCR for WT1 was performed in duplicate and expressed as WT1/10.000 ABL1 transcripts.<sup>19</sup> Samples containing  $<0.5$  WT1 transcripts together with  $>5000$  ABL1 transcripts were scored as negative, whereas WT1-negative samples with  $<5000$  ABL1 transcripts were excluded. The assay consistently detected 10 WT1 plasmids in an aqueous dilution series and showed an interassay variation of 0.9 log for low WT1 transcripts (median 1.3,  $n=8$ ) and 0.4 log for high WT1 transcripts (median 26.4 WT1 per  $10^4$  ABL1,  $n=8$ ), respectively.

### WT1 expression in healthy volunteers

The expression levels of WT1 in PB cells of healthy volunteers ( $n=10$ ) were compared with the expression levels of patients with MDS ( $n=3$ ) or AML ( $n=10$ ). The WT1 expression levels in healthy individuals were significantly lower (median 0.7, range 0.01–3.1 WT1 per  $10^4$  ABL1) than that in patients with MDS (median 65.0, range 36.8–88.7 WT1 per  $10^4$  ABL1,  $P=0.007$ ) or in patients with AML (median 548.5, range 5.5–4649.1 WT1 per  $10^4$  ABL1,  $P<0.0001$ ) as shown in Figure 1a.

**Table 1** Patient and transplant characteristics ( $n=88$ )

Median age (range) years	61 (22–74)
Gender (male/female)	48/40
<b>Diseases</b>	
AML, $n$ (%)	68 (77.3)
MDS, $n$ (%)	20 (22.7)
<b>Disease risk assessment<sup>a</sup></b>	
Low	0
Intermediate, $n$ (%)	56 (63.6)
High, $n$ (%)	32 (36.4)
Normal karyotype, $n$ (%)	46 (52.3)
Follow-up, median (range) months	15.9 (1.3–119)
<b>Relapse rate<sup>b</sup></b>	
Overall, $n$ (%)	37 (43)
Until day +112 post-HCT, $n$ (%)	21 (24.4)
<b>Disease status at transplantation</b>	
CR1, $n$ (%)	41 (46.6)
CR2, $n$ (%)	25 (28.4)
$>CR2$ , $n$ (%)	22 (25.0)
<b>Conditioning regimen</b>	
2 Gy TBI+FLU, $n$ (%) <sup>c</sup>	84 (95.5)
2 Gy TBI, $n$ (%)	4 (4.5)
<b>Donor</b>	
MUD, $n$ (%)	66 (75.0)
MRD, $n$ (%)	22 (25.0)
HLA matched, $n$ (%) <sup>d</sup>	68 (77.3)
Immunosuppression, $n$ (%)	
CSA/MMF	88 (100)
aGvHD $\geq$ II until day 84, $n$ (%)	21 (23.9)

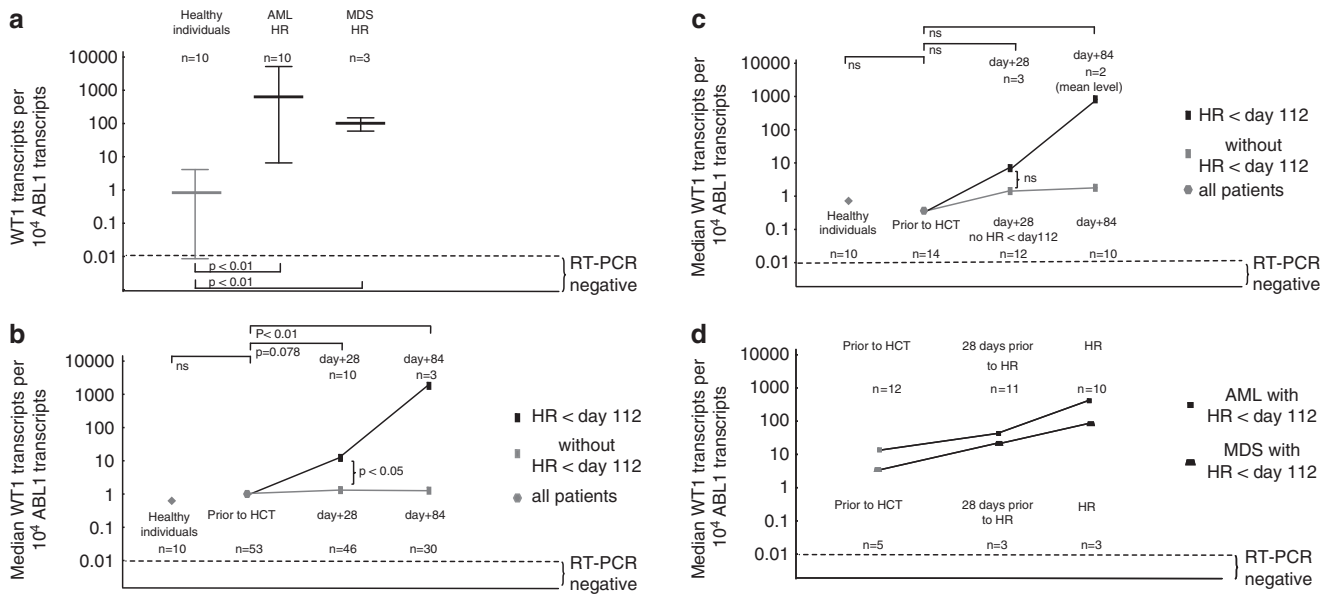
Abbreviations: aGvHD, acute graft-versus-host disease; AML, acute myeloid leukemia; CR, complete remission; CSA, cyclosporin A; HCT, hematopoietic stem cell transplantation; HLA, human leukocyte antigen; MDS, myelodysplastic syndrome; MMF, mycophenolate mofetil; MRD, match related donor; MUD, match unrelated donor; TBI+FLU, 2 Gy total body irradiation on day 0, fludarabine 30 mg/m<sup>2</sup> per day from days -4 to -2.

<sup>a</sup>AML—high risk: -5/5q-, -7/7q-, abn(11q23), complex aberrant ( $\geq 3$ ) or primary induction failure; low risk: t(8;21), t(15;17), inv(16); intermediate: all others; MDS: IPSS score.

<sup>b</sup>Two patients with an earlier reduction of the immunosuppression were excluded.

<sup>c</sup>One patient was treated with 3 Gy instead of 2 Gy.

<sup>d</sup>HLA-A, -B, -C matched by low resolution and DRB, DQB by high-resolution DNA typing.



**Figure 1** WT1 transcript levels in PB of healthy individuals, AML and MDS patients. (a) WT1 transcript levels of healthy individuals compared with AML and MDS patients at HR. WT1 transcript levels of AML and MDS patients at hematological relapse were significantly higher than those of healthy individuals. (b) Median WT1 transcript level of AML patients in PB. Median WT1 transcript levels constantly increase in patients with relapse from before HCT to day 28 and day 84 after HCT. In contrast, patients without relapse showed median WT transcripts comparable with healthy individuals. The difference between the two groups is already significant by day 28 after HCT. (c) Median WT1 transcript levels of MDS patients in PB. Median WT1 transcript levels also constantly increased in patients with relapse from before HCT to day 28 and day 84 after HCT. In contrast, patients without relapse showed median WT transcripts comparable with those of healthy individuals. In contrast to AML, the difference between the two groups is not significant. (d) Median WT1 transcript level of AML and MDS patients before HR and at HR. In patients undergoing relapse, median WT1 transcript levels at hematological relapse and 28 days before hematological relapse were elevated in comparison to the levels before HCT. Abbreviation: NS, not significant.

### Prediction of relapse

As we were interested in predicting relapse early after RIC-HCT and during immunosuppression taper, the 4-month evaluation period was chosen as the most suitable to assess the predictability of imminent relapse (defined as occurring within 28 days between evaluations). Of the analyzed patients, 21 (24.4%) relapsed during this period, accounting for 56.7% of all relapses after a median follow-up of 15.9 (range 1.3–119) months after HCT. Six patients developed relapse before the first evaluation point at day +28 and 15 patients thereafter. All measurements were analyzed as absolute levels and as kinetics between two subsequent measurements (changes over the 28-day period between two evaluation points), with the exception of the FISH results, in which low sample numbers prevented kinetic assessment.

### Statistical analysis

Pearson's correlation was used to analyze correlation between WT1 values and BM blasts. Analyses of differences were calculated by the Mann-Whitney *U*-test or Student's *t*-test for unpaired data (e.g. comparison of patients with and without relapse) and with Wilcoxon's signed rank test or paired Student's *t*-test for paired data (e.g. comparison of subsequent measurements). To analyze the diagnostic power of the investigated techniques, receiver-operating characteristics (ROC) were used. By this technique, the percentage of true-positive findings (sensitivity) is plotted against the percentage of false-positive findings (1-specificity) for all possible cutoff values of a diagnostic variable. Random allocation would result in an area under the resulting curve of 0.5. Values greater than 0.5 indicate positive diagnostic value. For the prediction of relapse within the 4-month post-HCT evaluation period, absolute values and changes between two subsequent measurements (kinetics) of

WT1 expression, UDC and CD34<sup>+</sup> chimerism were analyzed. For diagnostic variables, we considered the highest differences between subsequent measurements before relapse or during the observed time period for patients without relapse. Alternatively, we considered the absolute values before relapse or the peak value of measurements for patients without relapse, respectively. With the help of the ROC curves, we selected suitable cutoff values of the diagnostic variables by maximizing the sum of sensitivity and specificity. Cutoffs were rounded for clinical use. Characteristics of these tests were determined by the analysis of corresponding 2 × 2 contingency tables of test-positive and -negative cases (with relapse) and controls (without relapse). As small numbers were expected in the contingency tables, we also calculated exact 95% confidence intervals for both sensitivity and specificity estimates. Likewise, we calculated conditional maximum-likelihood estimates for the odds ratios and corresponding exact confidence intervals and *P*-values (Fisher's exact test). These calculations were performed using the statistical software package 'R' (www.r-project.org).<sup>32</sup> All other analyses were performed by Excel 7.0 for Windows and SPSS 12.0 for Windows software package (SPSS, Chicago, IL, USA).

To investigate whether the identified markers are independent predictors, we used regression techniques to analyze the univariate and multivariate influence of additional baseline and follow-up risk factors (see Table 3 for a list of factors) on the end points: (1) 4-month relapse-free survival, (2) overall relapse-free survival and (3) overall survival. We used exact logistic regression for the end point 4-month relapse-free survival and Cox regression for the other end points. In case of univariate significance, the corresponding factors were multivariately analyzed using a forward model selection algorithm. Calculations were performed using 'R', except for the exact logistic regression for which LogXact-8 (Cytel Inc., Cambridge, MA, USA) was applied.

**Results**

*WT1 expression pattern before/after HCT and correlation with BM blasts*

We first determined whether WT1 transcripts measured in the PB (median 3.0 (range 0.01–4649.1) WT1 per 10<sup>4</sup> ABL1, n=260) correlated with BM blasts (median 3.5 (range 0–82)%, n=265). A strong correlation was observed in the paired 239 assessment points (r=0.707, P<0.0001, data not shown).

WT1 transcripts showed characteristic fluctuations in both AML and MDS patients. Immediately before HCT, with the majority of patients in complete remission, median WT1 transcripts were in the normal range of healthy volunteers (median 0.7 (range 0.01–3.1) WT1 per 10<sup>4</sup> ABL1, n=10 vs 1.5 (range 0.01–810.1), n=53, and 1.7 (range 0.01–2322.2), n=14 for AML and MDS, respectively (P=NS)) and clearly lower than that in AML or MDS patients with HR (Figures 1a–c). On day 28, WT1 expression in patients with an impending relapse increased to a median of 11.9 (range 0.01–589.9) in AML and median of 6.5 (range 4.2–15.2) WT1 per 10<sup>4</sup> ABL1 in MDS patients (Figures 1b and c). There was a clear difference in transcripts between patients subsequently relapsing and non-relapsing. This difference was significant for AML patients (P<0.05), but not for MDS patients (P=0.06). In contrast, the difference in WT1 transcript levels for patients with or without HR at day 84 showed borderline association for AML (P=0.058), but not for MDS (Figures 1b and c). Patients without relapse maintained WT1 transcript levels comparable with those of healthy individuals throughout follow-up (Figures 1b and c). In contrast, patients with relapse showed continuously increasing WT1 levels peaking at the time of relapse. Importantly, increases in WT1 transcripts were already detected 28 days before HR (Figure 1d). Subsequently, WT1 levels 28 days before relapse were included in the model to identify the most suitable technique to predict relapse.

*Unsorted donor chimerism*

Donor chimerism analyses were performed on unsorted cells from 86 patients. Of the samples, 19 (7.3%) were excluded because of relapse before sampling and 18 (7.0%) because of insufficient sample quality, leaving a total of 221 samples eligible for analysis. Patients with a relapse within 28 days of sampling (n=15) showed a significantly lower median UDC of 89 (range 35–100)% than those without relapse (median 98 (range 21.7–100)%, n=63, P=0.01). In contrast, UDC kinetics in all eight evaluable relapsed patients showed no decrease (median +0.4 (range –15.3 to +8)%) 28 days before relapse and were similar to the kinetics of the patients without relapse (median 0 (range –20 to +56.3)%, n=60, P=0.883). ROCs were then used to determine the best clinical cutoff with corresponding sensitivities and specificities for the prediction of relapse. Absolute UDC values ≤90% predict a relapse with a sensitivity of 53% and a specificity of 86% (Table 2), with seven of 15 patients (AML: nos. 41, 43, 45, 46, 47, 48; MDS: no. 51) having had UDC >90% before relapse. For a patient with UDC of ≤90%, the odds ratio for relapsing within the next 28 days was calculated to be 6.6 (Table 2). In contrast, UDC kinetics was a poor predictor of relapse with a low sensitivity (25%) and a specificity of 92%.

*Chimerism of CD34<sup>+</sup> sorted cells*

Eighty-six patients were monitored for CD34<sup>+</sup> sorted donor cell chimerism (CD34<sup>+</sup> DC). A total of 195 samples from

**Table 2** Significances of MRD techniques for predicting HR within 28 days

Technique	n	AUC (95% CI)	P-value <sup>a</sup>	Cutoff <sup>b</sup>	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	P-value <sup>c</sup>	Odds ratio (95% CI)
UDC	78	0.711 (0.545–0.877)	0.012	≤90% donor chimerism	8/15, 53% (27–79%)	54/63, 86% (75–93%)	0.003	6.6 (1.7–28)
UDC kinetics	68	0.483 (0.250–0.717)	NS (0.879)	> 10% decrease	2/8, 25% (3–65%)	55/60, 92% (81–97%)	NS (0.19)	3.6 (0.3–28.9)
CD34 <sup>+</sup> DC	75	0.800 (0.637–0.963)	0.001	≤90% donor chimerism	8/13, 62% (32–86%)	56/62, 90% (80–96%)	0.0001	14.0 (3.0–76)
CD34 <sup>+</sup> DC kinetics	65	0.895 (0.752–1.000)	0.001	≥5% decrease	5/7, 71% (29–96%)	53/58, 91% (81–97%)	0.0006	23.9 (3.0–311)
FISH	30	0.680 (0.380–0.980)	NS (0.211)	Above probe-specific cutoff	2/5, 40% (5–85%)	24/25, 96% (80–99%)	NS (0.064)	13.6 (0.6–972)
WT1 expression	78	0.855 (0.741–0.970)	<0.0001	≥24 WT1/10 <sup>4</sup> ABL1	11/14, 79% (49–95)	57/64, 89% (79–95%)	<0.0001	27.6 (5.6–193)
WT1 expression kinetics	72	0.699 (0.509–0.890)	0.03	≥1 Log.increase	7/12, 58% (28–85%)	49/60, 82% (70–90%)	0.008	6.0 (1.4–29.2)
WT1 expression or CD34 <sup>+</sup>	64	NA	NA	≥24 WT1/10 <sup>4</sup> ABL1 or ≥5% decrease	7/7, 100% (59–100%)	48/57, 84% (72–93%)	<0.0001	∞ (6.1–∞)
DC kinetics	64	NA	NA	≥24 WT1/10 <sup>4</sup> ABL1 and ≥5% decrease	4/7, 57% (18–90%)	56/57, 98% (91–99.96%)	0.0003	61.0 (4.5–3614)

Abbreviations: ABL1, Abelson gene; AUC, area under the curve; CD34<sup>+</sup> DC, CD34<sup>+</sup> donor chimerism; CI, confidence interval; FISH, disease-specific markers detected by fluorescence *in situ* hybridization; HR, hematological relapse; MFD, minimal residual disease; NA, not analyzed; NS, not significant; ROC, receiver operating curve; TDC, total donor chimerism; WT1, Wilms' tumor gene 1.

<sup>a</sup>χ<sup>2</sup>-test for ROCs.

<sup>b</sup>Cutoffs estimated by ROC analyses.

<sup>c</sup>χ<sup>2</sup> or Fisher's exact test for 2 × 2 contingency tables, and odds ratio.

86 patients were available for the prediction analysis, 63 samples (24.4%) being excluded because of previous relapse ( $n=26$ , 10.1%) or insufficient sample quality ( $n=37$ , 14.3%). In AML, but not in MDS, there was a clear prognostic association between impending HR and a low CD34<sup>+</sup> DC at day 28 ( $P<0.001$ ), 56 ( $P<0.01$ ) and 84 ( $P=0.014$ ) (data not shown). Furthermore, the median CD34<sup>+</sup> DC was found to be significantly lower in patients undergoing subsequent relapse within 28 days (median 73.3 (range 0–100)%,  $n=13$ ) compared with those without relapse (median 99.3 (range 28–100)%,  $n=62$ ,  $P=0.001$ ). Accordingly, an analysis of CD34<sup>+</sup> DC kinetics revealed a significant decrease (median –15 (range –76 to 0)%) in patients undergoing relapse within 28 days ( $n=7$ ) compared with those without relapse (median 0 (range –20 to +15.5)%,  $n=58$ ,  $P<0.0001$ ). The ROC analysis revealed an absolute value of  $\leq 90\%$  CD34<sup>+</sup> DC and  $\geq 5\%$  decrease in CD34<sup>+</sup> DC between two measurements to be the best clinical cutoff values with sensitivities of 62 and 71% and specificities of 90 and 91%, respectively (Table 2). Five of the 13 patients relapsing with 28 days of CD34<sup>+</sup> DC determination (AML: nos. 41, 44, 45, 47, 48) nonetheless had a high CD34<sup>+</sup> DC of  $>90\%$ , whereas only two of the seven patients for whom pre-relapse kinetic data were available (AML: nos. 45, 47) failed to show a decrease in CD34<sup>+</sup> chimerism  $\geq 5\%$  before relapse. An estimation of the odds ratios of relapsing within the next 28 days revealed CD34<sup>+</sup> DC reduction to yield a higher odds ratio (23.9) than did the CD34<sup>+</sup> DC absolute values (14.0; Table 2).

#### FISH of DS markers in BM

A total of 42 (48%) patients had karyotypic aberrations. Although FISH probes were available for 38 of these, 82 of the 152 samples were excluded for the prediction model owing to previous disease recurrence ( $n=13$ , 8.6%) or were unavailable owing to violations of the MRD monitoring protocol ( $n=69$ , 45.4%). Analysis performed on data from 30 patients, five of whom underwent relapse, revealed no significant increase above cutoff values 28 days preceding relapse. This is a reflection of the low sensitivity (40%) and high specificity (96%) of the technique (Table 2). FISH was therefore unable to predict relapse within 28 days in our study population and has been excluded from further analysis.

#### WT1 expression in PB

WT1 expression levels were determined in a total of 260 samples from 86 patients. Eighty-four samples were not available for the prediction model owing to previous relapse ( $n=16$ , 4.6%), MRD protocol violations ( $n=48$ , 14%) or insufficient sample quality ( $n=20$ , 5.8%).

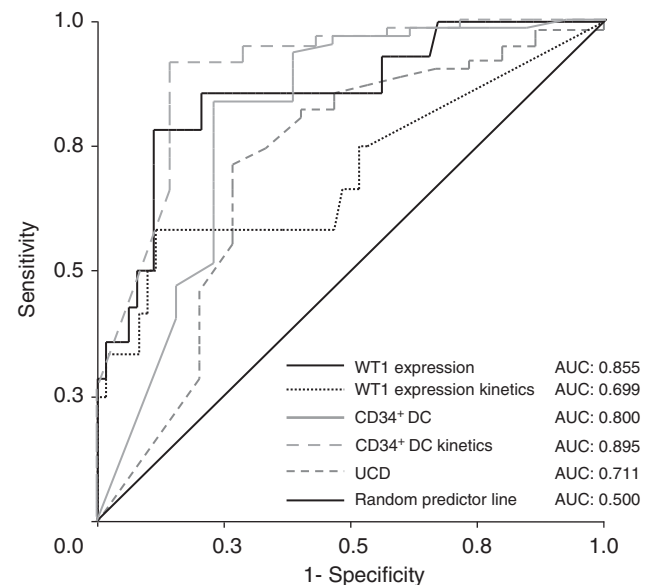
Data from 14 relapsed patients were available for the analysis of absolute WT1 transcript levels, revealing significantly higher (median 31.4 (range 3–1970.5) WT1 per  $10^4$  ABL1) WT1 transcript levels in samples taken 28 days before relapse compared with the rest (median 5.7 (range 0.01–192.5) WT1 per  $10^4$  ABL1,  $n=64$ ,  $P<0.0001$ ). Similarly, patients ( $n=12$ ) undergoing relapse within 28 days had a higher increase in WT1 transcript kinetics (median 1.1 (range 0–2.4) log) compared with patients without relapse (median 0.4 (range 0–1.6) log,  $n=60$ ,  $P=0.023$ ). ROC analysis identified transcript levels of  $\geq 24$  WT1 per  $10^4$  ABL1 and an increase of  $\geq 1$  log between sampling points as the most appropriate cutoffs for predicting relapse within 28 days with a sensitivity of 79 and 58% and a specificity of 89 and 82%, respectively (Table 2).

Only three of 14 patients (AML: nos. 40, 50; MDS: no. 42) relapsed within 28 days with WT1 per  $10^4$  ABL1 transcripts  $<24$ , whereas five of 12 patients (AML: nos. 40, 41, 49; MDS: nos. 42, 53) had no increase  $\geq 1$  log WT1 transcripts before relapse. The odds ratio of a relapse within 28 days of sampling for patients above the estimated cutoffs is 27.6 for the WT1 absolute values and 6.0 for the WT1 kinetics (Table 2).

#### Comparison of the prediction factors and combinations

Both the absolute levels and kinetics of WT1 expression, as well as CD34<sup>+</sup> DC and absolute UDC are each associated with relapse within 28 days of sampling. For each technique, the corresponding area under the ROC (area under the curve) corresponds to the diagnostic power to predict imminent relapse (Figure 2, Table 2). Thus, CD34<sup>+</sup> DC kinetics (area under the curve = 0.895) and WT1 transcripts (area under the curve = 0.855) were identified as the most powerful parameters in the ROC model, consistent with the highest odds ratios (Table 2) for predicting a relapse within 28 days. The combination of these parameters was then analyzed to further optimize sensitivity or specificity of prediction.

Sixty-four patients, including seven who developed relapse, were available to analyze the predictive power of combining WT1 expression (cutoff  $\geq 24$  WT1 per  $10^4$  ABL1 transcripts) and decrease in CD34<sup>+</sup> DC (cutoff  $\geq 5\%$  decrease). All seven patients with relapse were preceded by at least one positive indication, resulting in a sensitivity of prediction of 100%, with a specificity of 84%. On the other hand, double positives were extremely rare in those cases in which relapse did not occur within the next 28 days, corresponding to a specificity of 98% with a sensitivity of 57% (Table 2). It is therefore possible to exclude a relapse almost completely if WT1 transcripts are lower than  $\geq 24$  WT1 per  $10^4$  ABL1 and CD34<sup>+</sup> DC do not decrease  $\geq 5\%$ . Only one patient out of 34 failed these criteria, having WT1 levels of 192.5 WT1 per  $10^4$  ABL1 with a decrease of 18% in CD34<sup>+</sup> DC without developing subsequent relapse.



**Figure 2** ROC curves for techniques that predict relapse within 28 days. The ROC of WT1 expression (black bold line), WT1 expression decrease (black dotted line), CD34<sup>+</sup> DC (gray bold line), CD34<sup>+</sup> DC decrease (gray dashed line) and UDC (fine gray dashed line) are illustrated. All ROCs are statistically different from the random predictor line (thin black line).

**Table 3** Univariate and multivariate analysis (baseline factors are marked in gray)

Variable	Relapse by 4 months		PFS		OS	
	Univariate (P-value)	Multivariate (P-value)	Univariate (P-value)	Multivariate (P-value)	Univariate (P-value)	Multivariate (P-value)
Age (cont.)	0.15	ND	0.21	ND	0.26	ND
Gender (male/female)	0.53	ND	0.08	ND	0.25	ND
Disease risk assessment (low/intermediate/high) <sup>a</sup>	0.38	ND	0.72	ND	0.45	ND
Disease status at HCT (CR1/CR2/>CR2)	0.16	ND	0.39	ND	0.096	ND
Donor (MUD/ MRD)	0.13	ND	0.10	ND	0.18	ND
HLA matched (yes/no) <sup>b</sup>	0.84	ND	0.80	ND	<b>0.026</b>	<b>0.026</b> (with CD34 <sup>+</sup> ) <b>0.032</b> (with WT1)
Blasts in BM (cont.)	0.58	ND	0.56	ND	0.61	ND
Time diagnosis to HCT (cont.)	0.41	ND	0.28	ND	0.85	ND
WT1 expression ( $\geq 24$ / $< 24$ WT1/ $10^4$ ABL1)	<b>&lt; 0.001</b>	<b>ND</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>ND</b>	<b>0.003</b>	<b>0.028</b>
CD34 <sup>+</sup> DC kinetics ( $\geq 5\%$ decrease/ $< 5\%$ decrease)	<b>0.001</b>	<b>ND</b>	<b>0.001</b>	<b>ND</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.011</b>
aGvHD $\geq$ II until day 84 (yes/no)	1.00	ND	0.42	ND	0.41	ND
Platelets $< 100$ Gpt/l until day 112 (yes/no)	0.43	ND	0.67	ND	0.38	ND
WBC above ULN until day 112 (yes/no)	0.45	ND	0.94	ND	0.79	ND
Platelets $< 50$ Gpt/l until day 112 (yes/no)	0.69	ND	0.96	ND	0.054	ND
ANC $< 0.5$ Gpt/l until day 112 (yes/no)	0.83	ND	0.37	ND	0.46	ND
Increase of WBC $> 50\%$ until day 112 (yes/no)	1	ND	0.40	ND	<b>0.006</b>	Not in model (with CD34 <sup>+</sup> ) <b>0.032</b> (with WT1)
Decrease of WBC $> 50\%$ until day 112 (yes/no)	1	ND	0.54	ND	0.34	ND
Any change in WBC $> 50\%$ until day 112 (yes/no)	0.98	ND	0.36	ND	<b>0.01</b>	Not in model (with CD34 <sup>+</sup> ) Not in model (with WT1)
Decrease of platelets $> 50\%$ until day 112 (yes/no)	1.00	ND	0.70	ND	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.043</b> (with CD34 <sup>+</sup> ) <b>&lt; 0.001</b> (with WT1)
Decrease of ANC $> 50\%$ until day 112 (yes/no)	0.11	ND	0.13	ND	0.78	ND

Abbreviations: aGvHD, acute graft-versus-host disease; ANC, absolute neutrophil count; BM, bone marrow; cont., continuous variable; CR, complete remission; DC, donor chimerism; HCT, hematopoietic stem cell transplantation; HLA, human leukocyte antigen; MRD, match related donor; MUD, match unrelated donor; ND: not done; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; ULN, upper limit of normal; WBC, white blood cells; WT1, Wilms' tumor gene 1 expression. Bold numerals indicate significant values.

<sup>a</sup>AML—high risk:  $-5/5q-$ ,  $-7/7q-$ ,  $abn(11q23)$ , complex aberrant ( $\geq 3$ ) or primary induction failure; low risk:  $t(8;21)$ ,  $t(15;17)$ ,  $inv(16)$ ; intermediate: all others; MDS:IPSS score.

<sup>b</sup>HLA-A, -B, -C matched by low resolution and DRB, DQB by high-resolution DNA typing.

### Prediction of relapse within 3 months

Having shown that CD34<sup>+</sup> DC kinetics and WT transcripts provide a reliable prediction of relapse within 28 days, we tested their ability to predict relapse up to 84 days following sampling. Sixty-three patients were available for the analysis of WT1 transcripts alone. Only one of the five relapsing patients already had a WT1 expression level above the cutoff 84 days before relapse. Similarly, six relapsed patients were available for the CD34<sup>+</sup> analysis, and only one of these showed a CD34<sup>+</sup> DC decrease exceeding the cutoff 84 days before relapse. Neither WT1 transcript levels, CD34<sup>+</sup> DC kinetics nor the combination of both provide a reliable prediction of relapse within the following 84 days.

### Analysis of independent factors to predict relapse by 4 months after HCT, progression-free survival and overall survival

As CD34<sup>+</sup> DC kinetics and WT1 transcripts provide the best prediction of relapse within 28 days, other baseline and follow-up factors have been analyzed to identify independent prognostic factors for relapse by 4 months, progression-free survival and overall survival (Table 3). In univariate analysis, a CD34<sup>+</sup> DC decrease of  $\geq 5\%$  and WT transcripts of  $\geq 24$  WT1 per  $10^4$  ABL1 remained the only significant and independent parameters predictive for relapse by 4 months after HCT and progression-free survival. In contrast, a decrease of  $> 50\%$  in platelets, the use of an HLA-mismatched donor and a increase of white blood cells by more than 50% in the

model with WT1 were additional independent variables for overall survival.

### Discussion

In this analysis, we have investigated the prediction of HR in patients with AML and MDS following HCT, comparing techniques of unsorted and CD34<sup>+</sup> sorted donor chimerism in BM, DSM-FISH in BM and WT1 expression in PB. The overall aim of this analysis was to identify the most informative parameter or parameter combination upon which to base early intervention before HR occurs. UDC has the advantage of being independent of DS characteristics, and has been widely used to detect relapse after HCT.<sup>33</sup> We did indeed find that UDC  $\leq 90\%$  is associated with relapse within 28 days of sampling, and also that the sensitivity of this test was only 53%. A decrease in UDC  $> 10\%$  and also UDC values from PB (data not shown) had an even lower positive predictive value and was not associated with HR. In patients harboring an appropriate marker, DSM-FISH analysis showed a positive 40% ability to predict HR within 28 days. On this basis, we conclude that UDC and FISH are insufficient to predict HR in advance, consistent with observations of other groups.<sup>34,35</sup>

The majority of AML cells express the CD34 antigen, and we and others have reported an association between a low or decreasing CD34<sup>+</sup> DC and relapse after HCT with conventional conditioning,<sup>36</sup> 2 Gy total body irradiation,<sup>7</sup> other RIC regimens<sup>37</sup> or both RIC and conventional conditioning.<sup>33</sup>

We report here that an absolute level of  $\leq 90\%$  CD34<sup>+</sup> DC and a decrease of  $> 5\%$  in CD34<sup>+</sup> DC provide sensitive and specific predictions of relapse within 28 days. The sensitivities of  $\leq 90\%$  CD34<sup>+</sup> DC or  $> 5\%$  decrease in CD34<sup>+</sup> DC were 62 and 71%, respectively.

Taken together, these sensitivities are comparable with the 80% reported from a cutoff of  $\leq 80\%$  CD34<sup>+</sup> PB DC after a different conditioning regimen.<sup>33</sup> According to our ROC results, impending relapse is associated more strongly with the kinetic of CD34<sup>+</sup> DC reduction than with the absolute levels of CD34<sup>+</sup> DC, although both parameters provide a good indication of imminent relapse. Of note, we obtained this result in an AML and MDS patient cohort after a homogeneous 2 Gy total body irradiation-based conditioning and similar immunosuppression in the absence of information concerning the CD34 status at diagnosis. Interestingly, our results were not altered by exclusion of the CD34<sup>-</sup> AML patients and those for whom initial CD34 status was unknown (data not shown). Patients who developed a relapse in our study cohort had significantly higher WT1 expression levels in blood cells at day +28 than did those without an impending relapse. Combining absolute levels and increases in WT1 mRNA levels in PB provides an even stronger indicator for an imminent relapse. The best indication was derived from WT1 levels in excess of the cutoff of 24 WT1 per 10<sup>4</sup> ABL1 transcripts: a level which is almost 10-fold higher than the highest level of WT1 expression in our cohort of healthy volunteers. Specifically, if a patient had  $\geq 24$  WT1 per 10<sup>4</sup> ABL1 transcripts, the risk of developing HR within 4 weeks was 79%. Only three patients had no  $\geq 24$  WT1 per 10<sup>4</sup> ABL1 transcripts 4 weeks before HR. This may be explained in part by the recently recognized phenomenon of WT1 exon 7 mutations, which might have prevented sufficient primer binding and compromised the performance of the RT-PCR amplification.<sup>20,37,38</sup> WT1 expression above the cutoff corresponds to an odds ratio of impending relapse of 27.6. This is comparable with the predictive power of MRD levels determined via T-cell receptor and immunoglobulin gene rearrangement in standard risk acute lymphoblastic leukemia, in which an MRD level higher than 10<sup>-4</sup> by 16 weeks was associated with a relapse risk of 95% within 3 years.<sup>39</sup> When comparing our most informative parameters, the absolute levels of WT1 expression appear to be a better predictor of relapse than the WT1 kinetics, whereas the opposite was true for CD34<sup>+</sup> DC. This suggests that the parameters of gene expression level averaged over all cells on the one hand and frequency of a distinct cell population on the other may provide complementary information concerning impending relapse. Indeed, if both parameters (decrease of  $> 5\%$  in CD34<sup>+</sup> DC and a WT1 transcript level of  $> 24/10^4$  ABL1 transcripts) are taken into consideration, 100% of patients with relapse were identified with a specificity of 84%. Similarly, when both markers are below the cutoffs, relapse within 28 days can be excluded almost entirely (specificity 98%, sensitivity 57%). Unsurprisingly, neither of the parameters tested could provide an indication of relapse 84 days in advance. Although both CD34<sup>+</sup> DC kinetics and WT1 levels remained also the only two independent factors for relapse at 4 months and progression-free survival in a multivariate model, the use of a mismatched donor, a decrease in platelets by more than 50% and an increase in WBC by more than 50% in the model with WT1 only proved to be additional factors associated with a worse overall survival. This confirms the finding that a mismatched donor is an independent factor for non-relapse mortality in a very similar patient cohort using the same HCT technique.<sup>40</sup> The decrease in platelets and the increase of WBC

has not been previously identified, but should be included in future evaluations.

On the basis of this study, we have adapted our MRD monitoring protocol for patients with AML and MDS after HCT with RIC: during the 6 months post-HCT period with the highest relapse incidence,<sup>3-5</sup> monthly monitoring of MRD by the detection of CD34<sup>+</sup> DC from aspirated BM together with the assessment of WT1 transcripts from PB can provide an accurate indication of impending relapse. The identification of impending relapse in this way provides a basis for optimizing treatment of relapse, either by tapering of immunosuppression over 3-4 weeks with the risk of severe graft-versus-host disease or by chemotherapeutic intervention,<sup>41</sup> in which the application of low toxicity agents such as sorafenib<sup>42</sup> and demethylating agents<sup>43</sup> may provide new treatment perspectives.

### Acknowledgements

We thank Janet Bogardt, Dagmar Crohn, Christa Döring, Christina Franke, Christine Günther, Evelyn Hennig, Ines Kovacs, Rainer Krahl, Christel Müller and Scarlet Musiol for their excellent assistance.

### References

- 1 Storb R. Can reduced-intensity allogeneic transplantation cure older adults with AML? *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; **20**: 85-90.
- 2 Niederwieser D, Lange T, Cross M, Basara N, Al-Ali H. Reduced intensity conditioning (RIC) haematopoietic cell transplants in elderly patients with AML. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; **19**: 825-838.
- 3 Tauro S, Craddock C, Peggs K, Begum G, Mahendra P, Cook G et al. Allogeneic stem-cell transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen has the capacity to produce durable remissions and long-term disease-free survival in patients with high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 9387-9393.
- 4 Hallemeier CL, Girgis MD, Blum WG, Brown RA, Khoury HJ, Devine SM et al. Long-term remissions in patients with myelodysplastic syndrome and secondary acute myelogenous leukemia undergoing allogeneic transplantation following a reduced intensity conditioning regimen of 550 cGy total body irradiation and cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; **12**: 749-757.
- 5 Schmid C, Schleuning M, Schwerdtfeger R, Hertenstein B, Mischak-Weissinger E, Bunjes D et al. Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2006; **108**: 1092-1099.
- 6 Hegenbart U, Niederwieser D, Sandmaier BM, Maris MB, Shizuru JA, Greinix H et al. Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 444-453.
- 7 Al-Ali HK, Nehring C, Krahl R, Becker C, Leiblein S, Edelmann J et al. Donor CD34+ cell chimerism at day 28 and chronic graft-versus-host disease (GvHD) but not high-risk cytogenetics influence outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) following reduced intensity conditioning (RIC) in patients with AML and MDS. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2006; **108**: 547.
- 8 Mielcarek M, Martin PJ, Maloney DG, Storb R, Sandmaier BM. Outcomes among patients with recurrent high-risk hematologic malignancy after nonmyeloablative versus myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2006; **108**: 262.
- 9 Lange T, Deininger M, Brand R, Hegenbart U, Al-Ali H, Krahl R et al. BCR-ABL transcripts are early predictors for hematological relapse in chronic myeloid leukemia after hematopoietic cell

- transplantation with reduced intensity conditioning. *Leukemia* 2004; **18**: 1468–1475.
- 10 Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; **56**: 283–309.
  - 11 Gozzetti A, Le Beau MM. Fluorescence *in situ* hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000; **37**: 320–333.
  - 12 Thiede C. Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am J Pharmacogenom* 2004; **4**: 177–187.
  - 13 Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005; **106**: 3740–3746.
  - 14 Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia* 2006; **20**: 1103–1108.
  - 15 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**: 68–78.
  - 16 Scholl S, Krause C, Loncarevic IF, Muller R, Kunert C, Wedding U et al. Specific detection of FLT3 point mutations by highly sensitive real-time polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia. *J Lab Clin Med* 2005; **145**: 295–304.
  - 17 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**: 79–84.
  - 18 Keilholz U, Menssen HD, Gaiger A, Menke A, Oji Y, Oka Y et al. Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia* 2005; **19**: 1318–1323.
  - 19 Ostergaard 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**: 590–600.
  - 20 Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV 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**: 5195–5201.
  - 21 Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T et al. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; **19**: 1416–1423.
  - 22 Lapillonne H, Renneville A, Auvergnon A, Flamant C, Blaise A, Perot C et al. High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 1507–1515.
  - 23 Cilloni D, Messa F, Arruga F, Defilippi I, Gottardi E, Fava M 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**: 921–924.
  - 24 Osborne D, Frost L, Tobal K, Liu Yin JA. 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 Transplant* 2005; **36**: 67–70.
  - 25 Ogawa H, Ikegame K, Kawakami M, Tamaki H. WT1 gene transcript assay for relapse in acute leukemia after transplantation. *Leuk Lymphoma* 2004; **45**: 1747–1753.
  - 26 Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsuboi A 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**: 1698–1704.
  - 27 Candoni A, Tiribelli M, Toffoletti E, Cilloni D, Chiarvesio A, Michelutti A et al. Quantitative assessment of WT1 gene expression after allogeneic stem cell transplantation is a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2009; **82**: 61–68.
  - 28 Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA, Petersdorf E, Hegenbart U, Sandmaier BM et al. Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and post-grafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases. *Blood* 2003; **101**: 1620–1629.
  - 29 Bryant E, Martin PJ. Documentation of engraftment and characterization of chimerism following hematopoietic cell transplantation. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ (eds). *Hematopoietic Cell Transplantation*, 2 edn. Boston, 1999, pp 197–206.
  - 30 Bumm T, Muller C, Al-Ali HK, Krohn K, Shepherd P, Schmidt E et al. Emergence of clonal cytogenetic abnormalities in Ph<sup>-</sup> cells in some CML patients in cytogenetic remission to imatinib but restoration of polyclonal hematopoiesis in the majority. *Blood* 2003; **101**: 1941–1949.
  - 31 Lange T, Niederwieser DW, Deininger MW. Residual disease in chronic myeloid leukemia after induction of molecular remission. *N Engl J Med* 2003; **349**: 1483–1484.
  - 32 Ihaka R, Gentleman R. R a language for data analysis and graphics. *J Comp Graph Stat* 1996; **5**: 299–314.
  - 33 Bornhauser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, Bug G, Lutterbeck K, Kiehl MG 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**: 1613–1617.
  - 34 Bacher U, Kern W, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T. Evaluation of complete disease remission in acute myeloid leukemia: a prospective study based on cytomorphology, interphase fluorescence *in situ* hybridization, and immunophenotyping during follow-up in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 2006; **106**: 839–847.
  - 35 Mancini M, Cedrone M, Diverio D, Emanuel B, Stul M, Vranckx H et al. Use of dual-color interphase FISH for the detection of inv(16) in acute myeloid leukemia at diagnosis, relapse and during follow-up: a study of 23 patients. *Leukemia* 2000; **14**: 364–368.
  - 36 Zeiser R, Spyridonidis A, Wasch R, Ihorst G, Grulich C, Bertz H et al. Evaluation of immunomodulatory treatment based on conventional and lineage-specific chimerism analysis in patients with myeloid malignancies after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leukemia* 2005; **19**: 814–821.
  - 37 Nyvold CG, Stentoft J, Braendstrup K, Melsvik D, Moestrup SK, Juhl-Christensen C et al. Wilms' tumor 1 mutation accumulated during therapy in acute myeloid leukemia: Biological and clinical implications. *Leukemia* 2006; **20**: 2051–2054.
  - 38 Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia (AML): A study of the German–Austrian AML Study Group (AMLSG). *Blood* 2009; **113**: 4505–4511.
  - 39 Bruggemann M, Raff T, Flohr T, Gokbuget N, Nakao M, Droese J et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; **107**: 1116–1123.
  - 40 Gyurkocza B, Storb R, Storer BE, Chauncey TR, Lange T, Shizuru JA et al. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 2859–2867.
  - 41 Bethge WA, Storer BE, Maris MB, Flowers ME, Maloney DG, Chauncey TR et al. Relapse or progression after hematopoietic cell transplantation using nonmyeloablative conditioning: effect of interventions on outcome. *Exp Hematol* 2003; **31**: 974–980.
  - 42 Metzelder S, Wang Y, Wollmer E, Wanzel M, Teichler S, Chaturvedi A et al. Compassionate use of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: sustained regression before and after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2009; **113**: 6567–6571.
  - 43 Cross M, Jaekel N, Krahl R, Junghans C, Maschmeyer G, Tran T et al. Low levels of global (LINE) and CDH13 methylation at diagnosis and rapid clearance of marrow blasts correlate with a better hematological response to azacitidine in patients with newly diagnosed and refractory/relapsed AML not eligible for or resistant to chemotherapy: a multi-centre phase I/II-study of the East German Haematology and Oncology Study Group (OSHO). *ASH Annual Meeting Abstracts* 2009; **114**: 2642.



#### **4. Zusammenfassung der Arbeit**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

Das Monitoring Minimaler Resterkrankung bei Patienten mit akuter myeloischer  
Leukämie und Myelodysplastischem Syndrom nach allogener  
Blutstammzelltransplantation mit reduzierter Konditionierung

eingereicht von:

Max Christian Georg Hubmann

geboren am 26. September 1980 in Nürnberg

angefertigt an:

Universität Leipzig, Selbstständige Abteilung für Hämatologie, Internistische  
Onkologie und Hämostaseologie

Betreuer:

Professor Dr. med. Dr. hc. Dietger Niederwieser

Privatdozent Dr. med. Thoralf Lange

Mai 2011

Die allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen mit reduzierter Konditionierung (RIC-HCT) ist eine vielversprechende Therapieoption für Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und Myelodysplastischem Syndrom (MDS), die sich aufgrund von Komorbiditäten oder fortgeschrittenen Alters keiner konventionellen myeloablativen Konditionierung unterziehen können. Im Vordergrund steht hierbei im Vergleich zur myeloablativen Konditionierung der immunologische Effekt – der Graft-versus-Leukämie Effekt.

Das größte Problem der RIC-HCT liegt in der hohen Rezidivrate. Nach Hegenbart et al. (15) haben 44% der Patienten nach zwei Jahren ein progressionsfreies Überleben. Das frühzeitige Erkennen eines drohenden Rezidivs mittels Bestimmung

von Minimaler Resterkrankung (MRD) ist ein wichtiges Instrument für eine individualisierte Therapie, beispielsweise durch Anpassung der Immunsuppression.

Ziele dieser Arbeit waren:

- 1) die Etablierung einer quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) für das Wilms Tumor 1 (WT1) Gen als molekularer MRD Marker,
- 2) die Auswertung der Genexpression des WT1 Gen von gesunden Probanden und von Patienten während der viermonatigen Evaluationsperiode,
- 3) die Auswertung von Chimärismusdaten und Daten der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) der Patienten während der viermonatigen Evaluationsperiode,
- 4) die Prädiktionsanalysen der verschiedenen Methoden für ein Rezidiv innerhalb der nächsten 28 Tage,
- 5) die Bestimmung von klinisch einsetzbaren cut-offs der einzelnen Methoden anhand von Receiver Operating Curves (ROC) Analysen,
- 6) die Kombination der verschiedenen Methoden zur Optimierung der Prädiktion bzw. Ausschluss eines Rezidivs innerhalb der nächsten 28 Tage,
- 7) die Prädiktionsanalysen der beiden bestgeeigneten MRD Methoden dieser Arbeit für ein Rezidiv innerhalb der nächsten 84 Tage,
- 8) eine univariate bzw. multivariate Analyse von transplantationsrelevanten Faktoren, Verlaufsparemtern und den beiden bestgeeigneten MRD Methoden dieser Arbeit hinsichtlich des Auftretens eines Rezidivs innerhalb der Evaluationsperiode von vier Monaten, des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens.

Die MRD wurde direkt vor RIC-HCT sowie an den Tagen +28, +56 und +84 nach Transplantation bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mittels Genexpressionsanalysen des WT1 im peripheren Blut, mittels Chimärismusanalysen im Knochenmark (KM) und mittels FISH von leukämiespezifischen chromosomalen Aberrationen im KM.

Die Genexpression des WT1 wurde retrospektiv durch eine RT-PCR analysiert, dabei in Stickstoff gelagerte Blutproben (mononukleäre Zellen) aufgetaut und aufgearbeitet, aus diesen die RNA extrahiert und in cDNA transkribiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Kopienzahl von WT1 mittels RT-PCR und die Normierung zu der Kopienzahl des Housekeepinggens ABL1.

Prospektiv wurden die Chimärismusanalysen aus unsortierten und CD34<sup>+</sup> Zellen erhoben. Die Sortierung der CD34<sup>+</sup> Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Bei gegengeschlechtlicher Transplantation wurde der prozentuale Anteil der Spenderkerne mit FISH Analysen der Geschlechtschromosomen bestimmt. Bei gleichgeschlechtlichem Transplantationssetting konnte mit einer Short-Tandem-Repeats Polymerasekettenreaktion (STR-PCR) der prozentuale Spenderanteil im Knochenmarkmark erhoben werden.

Die FISH Analysen von leukämiespezifischen chromosomalen Aberrationen erfolgten prospektiv beziehungsweise wurden in einzelnen Fällen nachbestimmt.

Die Studienkohorte bestand aus insgesamt 88 Patienten, 68 Patienten mit AML und 20 Patienten mit MDS. Das mediane Alter betrug 61 Jahre. Die Konditionierungstherapie bestand aus 30mg Fludarabin pro Kg Körpergewicht an den Tagen -4 bis -2 (n=84) und einer Ganzkörperbestrahlung mit 2 Gray (n=87) bzw. 3 Gy (n=1). Alle Patienten erhielten eine immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin A und Mycophenolat mofetil. Das Follow-up betrug im Median 15,9 Monate (1,3 bis 119 Monate).

Zur Vorhersage eines drohenden Rezidivs innerhalb der nächsten 28 Tage mittels der verschiedenen MRD Methoden wurde ein Zeitraum von 4 Monaten nach Transplantation als sinnvollster Analysezeitraum gewählt. In diesem Zeitraum entwickelten 21 Patienten ein Rezidiv. Mit der Ausnahme der FISH Analysen wurden für alle MRD Methoden sowohl die Absolutwerte als auch die Kinetik zwischen den einzelnen Messpunkten ausgewertet.

In den zunächst durchgeführten Korrelationsuntersuchungen zwischen der WT1 Expression im peripheren Blut und dem korrespondierenden prozentualen Anteil an blastären Zellen im Knochenmark konnte eine starke Korrelation gefunden werden ( $r=0,707$ ,  $p< 0,0001$ ). Die WT1 Genexpression aller Patienten vor Transplantation und der Patienten, die kein Rezidiv entwickelten, lag im Rahmen der Messwerte gesunder Probanden. Die Messwerte an Tag +28 nach Transplantation aller Patienten, die im weiteren Verlauf ein Rezidiv entwickelt haben, waren signifikant höher als jene der Patienten, die kein Rezidiv entwickelten. Die bereits 28 Tage vor einem Rezidiv gewonnenen Messwerte waren signifikant höher als die der Patienten ohne Rezidiv. Ebenso zeigten die Patienten mit einem Rezidiv einen signifikanten Anstieg im Median um 1,1 Log Stufen bereits 28 Tage vor einem Rezidiv. Mittels

ROC Analysen wurden cut-offs sowohl für die Absolutwerte als auch für die Veränderungen zwischen Messpunkten festgelegt. Mit diesen cut-offs ließ sich die Vorhersage eines Rezidivs innerhalb der nächsten 28 Tage mit einer Sensitivität von 79% bzw. 58% und einer Spezifität von 89% bzw. 82% errechnen (Absolutwerte bzw. Kinetik der WT1 Genexpression). Liegt der Messwert eines Patienten über den cut-offs, so beträgt die Wahrscheinlichkeit (Odds ratio), innerhalb der nächsten 28 Tage ein Rezidiv zu entwickeln, bei 27.6, bzw. bei 6.0 (Absolutwerte bzw. Kinetik).

Der Gesamtchimärismus war 28 Tage vor einem Rezidiv mit 89% signifikant niedriger als die Messwerte von Patienten ohne Rezidiv mit 100%. Die Kinetik vor einem Rezidiv war jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Die ROC ergab eine cut-off von 90% mit einer Sensitivität 53% und einer Spezifität von 86%. Die Odds ratio lag bei 6.6.

Der Chimärismus CD34<sup>+</sup> sortierter Zellen an Tag +28 hatte für Patienten mit einer AML eine prognostische Aussagekraft analog zu den WT1 Werten an Tag +28. Der CD34<sup>+</sup> Chimärismus von Patienten vor einem Rezidiv war signifikant niedriger als der von Patienten ohne Rezidiv (im Median 73% zu 100%). Ebenso zeigten die Bestimmungen von Patienten mit Rezidiv einen signifikanten Abfall im Median von 15% vor einem Rezidiv. Die ROC Analysen ergaben einen cut-off von 90% für die Absolutwerte bzw. einen Abfall von 5% für die Kinetik. Daraus resultierten Sensitivitäten von 62% bzw. 71% und Spezifitäten 90% bzw. 91% (Absolutwerte bzw. Kinetik). Die Bestimmungen der Odds ratios ergab 14.1 für die Absolutwerte und 23.9 für die Kinetik.

Die FISH Analysen leukämiespezifischer Aberrationen zeigten vor einem Rezidiv keinen signifikanten Anstieg über die FISH Sonden spezifischen cut-offs.

Die Absolutwerte der WT1 Expression, des CD 34<sup>+</sup> Chimärismus und des Gesamtchimärismus sowie die Kinetik der WT1 Expression und des CD34<sup>+</sup> Chimärismus 28 Tagen vor einem Rezidiv waren signifikant mit einem Rezidiv assoziiert. Die Fläche unter einer ROC (AUC) spiegelt die diagnostische Aussagekraft einer Methode wider, ein Rezidiv innerhalb der nächsten 28 Tagen vorherzusagen. Die Absolutwerte der WT1 Expression und die Kinetik des CD34<sup>+</sup> Chimärismus wiesen die größten AUC auf, was auch mit höchsten Odds ratios korrespondierte. Diese beiden Methoden wurden deshalb als die zwei bestgeeigneten Methoden identifiziert, ein innerhalb der nächsten 28 Tagen drohendes Rezidiv vorherzusagen. Die Kombinationen beider Methoden wurden

untersucht. Alle rezidierten Patienten (Sensitivität von 100%) hatten mindestens ein positives Testergebnis vor dem Rezidiv. Waren beide Methoden negativ, so ließ sich ein Rezidiv innerhalb der nächsten 28 Tage nahezu ausschließen (Spezifität von 98%).

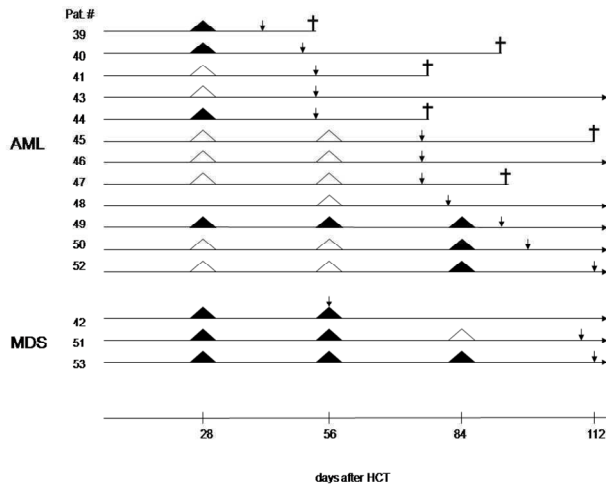
Weitere transplantationsrelevante Faktoren und Verlaufsp Parameter wurden univariat und im Falle eines signifikanten Ergebnisses multivariat mit den beiden bestgeeigneten Methoden hinsichtlich des Auftretens eines Rezidivs innerhalb der Evaluationsperiode von vier Monaten, des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens untersucht. Dabei blieben die Absolutwerte der WT1 Expression und die Kinetik des CD34<sup>+</sup> Chimärismus als einzige prädiktive Faktoren für das progressionsfreie Überleben und das Rezidivaufreten innerhalb der ersten vier Monate erhalten. Für das Gesamtüberleben erwiesen sich auch ein 50%-iger Abfall der Thrombozyten, ein 50%-iger Anstieg der Leukozyten und ein Stammzellspender mit HLA Mismatch als weitere prognostische Faktoren sowohl in der univariaten als auch in multivariaten Analyse.

Es konnte gezeigt werden, dass in einer homogenen Studienkohorte mittels MRD Diagnostik ein Rezidiv nach RIC-HCT innerhalb der nächsten 28 Tage vorhergesagt, bzw. nahezu ausgeschlossen werden kann. Sowohl der Nachweis einer leukämiespezifischen Aberration mittels FISH als auch der Gesamtchimärismus sind für eine zuverlässige Rezidivprädiktion nicht geeignet bzw. eher ungeeignet, eine Beobachtung, die sich mit den Aussagen der bereits veröffentlichten Literatur deckt. Die beiden besten Indikatoren für ein drohendes Rezidiv waren die Absolutwerte der WT1 Expression und die Kinetik des CD34<sup>+</sup> Chimärismus. Diese beiden unterschiedlichen Methoden liefern sich ergänzende Informationen über ein drohendes Rezidiv. An Hand dieser Promotion wurde die Routine MRD Diagnostik angepasst. Mit Hilfe der untersuchten MRD Methoden lassen sich drohende Rezidive frühzeitig erkennen und therapieren.

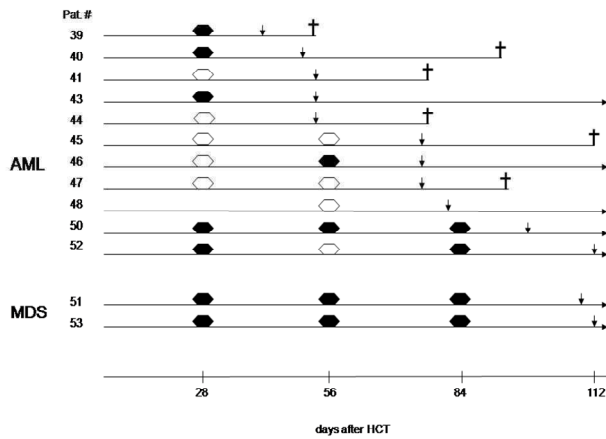
## 5. Anlagen

### 5.1 MRD Verläufe von 15 rezidierten Patienten nach HCT mit RIC

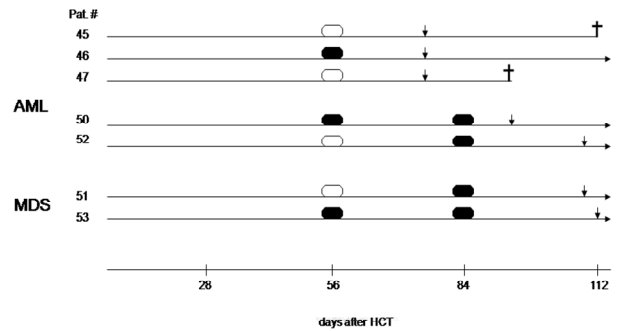
(A) Unsortierter Spenderchimärismus (n=15)



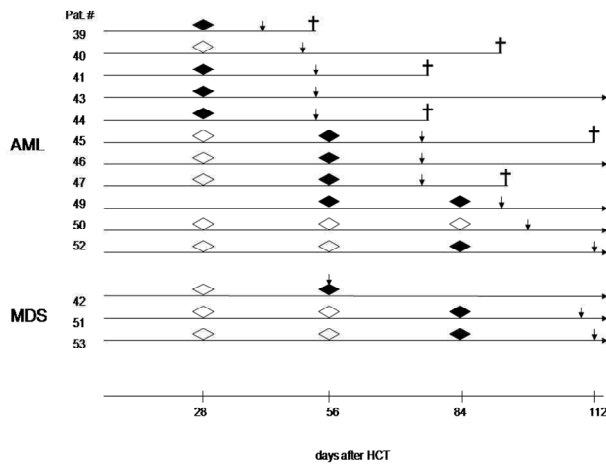
(B) CD34<sup>+</sup> sortierter Spenderchimärismus (n=13)



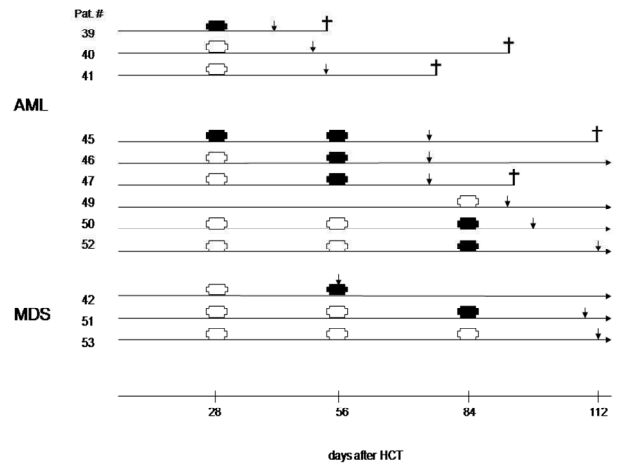
(C) CD34<sup>+</sup> sortierter Spenderchimärismus Kinetik (n=7)



(D) WT1 expression (n=14)



(E) WT1 Kinetik (n=12)



MRD Verläufe von 15 rezidierten Patienten. Pfeile ↓ symbolisieren ein Rezidiv und Kreuze † den Tod eines Patienten.

(A) Unsortierter Spenderchimärismus:

 = > 90% unsortierter Spenderchimärismus


 = ≤ 90% unsortierter Spenderchimärismus


(B) CD34<sup>+</sup> sortierter Spenderchimärismus:

 = > 90% CD34<sup>+</sup> sortierter Spenderchimärismus

 = ≤ 90% CD34<sup>+</sup> sortierter Spenderchimärismus

(C) CD34<sup>+</sup> sortierter Spenderchimärismus Kinetik:

 = < 5% Abfall des CD34<sup>+</sup> sortierter Spenderchimärismus

 = ≥ 5% Abfall des CD34<sup>+</sup> sortierter Spenderchimärismus

(D) WT1 expression:

 = < 24 WT1/ 10<sup>4</sup> ABL1

 = ≥ 24 WT1/ 10<sup>4</sup> ABL1

(E) WT1 expression Kinetik:

 = < 1 Log Anstieg der WT1 expression

 = ≥ 1 Log Anstieg der WT1 expression


## **5.2 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Datum

18.5.2011

Unterschrift



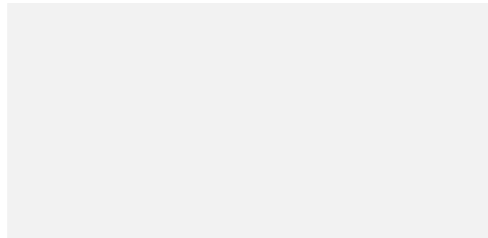


## **5.3 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name Max Christian Georg Hubmann

Anschrift



Mobil

E-Mail

Geburtsdatum 26.09.1980

Geburtsort Nürnberg

Familienstand Ledig

### **Beruflicher Werdegang**

Seit 2008

**Arzt in Weiterbildung für Hämatologie,  
Onkologie**

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität  
München, Medizinische Klinik III, Klinikum  
Großhadern

### **Hochschulstudium**

2001 – 2007

**Humanmedizin**

Universität Leipzig

Universität Bern

2007

Approbation als Arzt

2007

Ärztliche Prüfung

2003

Ärztliche Vorprüfung

## **Wehrdienst**

2000 – 2001

Gebirgsjägerbataillon 232/ 4.Kompanie  
Bischofswiesen/ Strub

## **Schulbildung**

1991– 2000

Hardenberg-Gymnasium Fürth

## **Auszeichnungen**

ASH (American Society of Hematology) Travel Award 2006

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Hubmann', with a long horizontal flourish extending to the right.

Max Hubmann

München, Mai 2011

## **5.4 Publikationen**

### Zeitschriftenbeiträge

Dietzfelbinger H, Abbrederis K, **Hubmann M**

Hepcidin- ein neu entdeckter Regulator des Eisenstoffwechsels.

MMW Fortschr Med. 2010 Apr 8;152 Suppl 1:7-11.

Dietzfelbinger H, **Hubmann M**

Geschwollener Lymphknoten. Infektion oder malignes Geschehen?

MMW Fortschr Med. 2010 Sep 9;152(36):27-28.

Ammatuna E, Esteve J, **Hubmann M**, Grimwade D, Sanz MA, Lo-Coco F et al.

Presenting features and treatment outcome of acute promyelocytic leukemia arising after multiple sclerosis.

Haematologica 2010 Dec 29. Epub ahead of print

Lange T\*, **Hubmann M\***, Niederwieser D 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 Mar; 25 (3): 498-505

### Kongressbeiträge

#### Vorträge

**Hubmann M**, Niederwieser D, Lange T et al.

CD34(+) donor chimerism and wilms tumor gene 1 (WT1) expression provide an early indication of relapse in patients with acute leukemias and MDS after hematopoietic cell transplantation (HCT) with reduced intensity conditioning.

ASH Orlando 2006: Blood 2006 Nov 16;108(11):165a-165a.

\*geteilte Erstautorenschaft

Lange T, **Hubmann M**, Niederwieser D et al.

Monitoring of WT1 expression in PB and CD34+donor chimerism of BM predict early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced intensity conditioning.

DGHO Berlin 2010: Onkologie 2010 Oct;33:28-28.

Ottone T, **Hubmann M**, Lo Coco F et al.

Comparative molecular analysis of therapy-related and de novo acute promyelocytic leukemia.

4<sup>th</sup> Int. Symposium on Secondary Leukemia and Leukemogenesis, Rom 2011

#### Posterpräsentationen

**Hubmann M**, Niederwieser D, Lange T et al.

Wilms tumour gene 1 expression and kinetics predict relapses in patients after stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning.

EBMT Hamburg 2006: Bone Marrow Transplantation; 2006 Mar;37:200.

Lange T, **Hubmann M**, Niederwieser D. et al.

Monitoring of WT1 Expression in Pb and Cd34+Donor Chimerism of Bm Predict Early Relapse in Aml and Mds Patients after Hematopoietic Cell Transplantation with Reduced Intensity Conditioning.

EHA Barcelona 2010:Hematol J. 2010 Jun;95:208-208.

**Hubmann M**, Hiddemann W, Spiekermann K et al.

Therapy-related acute myeloid leukemia after the treatment of multiple sclerosis with mitoxantrone: a case series of three patients including two patients with acute promyelocytic leukemia.

4<sup>th</sup> Int. Symposium on Secondary Leukemia and Leukemogenesis, Rom 2011

## **5.5 Abstracts der Kongressbeiträge dieser Dissertation**

### **5.5.1 European Bone Marrow Transplantation (EBMT) meeting 2006, Hamburg**

*Bone Marrow Transplantation; 2006 Mar, 37:200*

Wilms tumour gene 1 expression and kinetics predict relapses in patients after stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning

M. Hubmann, R. Burkhardt, C. Guenther, S. Leiblein, J. Thiery, D. Niederwieser, T. Lange (Leipzig, D)

Objectives: The majority of patients with acute leukaemia lack disease-specific molecular markers to monitor the graft-versus-leukaemia effect after stem cell transplantation (SCT) with reduced-intensity conditioning (RIC). WT1 is expressed on normal hematopoietic progenitors but has also been used as a panleukemic marker to monitor minimal residual disease (MRD) in patients with acute leukemia. We show that WT1 transcript kinetics within day +84 predict a relapse in patients after SCT with RIC.

Patients and Methods: 96 consecutive patients (median age 60.4, range 21.9-74.2 years) under-went allogeneic SCT for AML (n=69), ALL (n=7) or MDS (n=20) using related (n=24) or unrelated (n=72) donors following a TBI 2 Gy (n=95) or 3 Gy (n=1) and Fludarabin (n=90) conditioning regimen. Post-grafting immunosuppression consisted of mycophenolyte mofetil (MMF) and cyclosporin A in all patients. WT1 levels were analyzed in duplicates at baseline, and on days 28, 56, and 84 in a total of 322 peripheral blood (PB) samples and normalized by the control gene ABL. To ensure sufficient RNA quality, all negative samples with less than 5000 copies of the ABL gene were excluded.

Results: WT1/ABL expression levels in PB were significantly higher in patients (median 2.9, range 0 – 4649.1) compared to 10 healthy volunteers (median 0.7, range 0-3.1, p=0.018, Mann-Whitney-Test). Furthermore, there was a close correlation between the levels of WT1 in PB and bone marrow blasts (r=0,7; Pearson). 23 patients (24%) relapsed within the first six months after SCT. WT1 expression of these patients prior to relapse (median 8.3, range 0 - 1970.5) was significantly higher compared to patients without relapse (median 1.7, range 0 - 2322.3, p<0.01). In addition, patients with relapse beyond day 84 (n=8) showed a significant (p=0.013) increase in WT1 levels within 3 months (median 2.4, range –4.4 – 5.4log) compared to relapse-free patients (median 0, range -7.4 – 4.8log). WT1 expression one month prior to relapse (n= 16, median 28.9, range 2.6 - 1970.5) was

significantly higher compared to patients without relapse ( $p < 0.01$ ). We conclude that WT1 expression in PB is a reliable marker for disease monitoring in AML, ALL and MDS patients after SCT with RIC. The question whether WT1 quantification is superior for predicting relapse compared to FISH or chimerism is currently being evaluated. Nevertheless, WT1 expression is an additional tool for an individualized immunosuppressive therapy after SCT to avoid relapse.

### **5.5.2 American Society of Hematology (ASH) meeting 2006, Orlando**

*Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2006 Dec, 108: Abstract 548*

#### Oral Sessions

#### **CD34<sup>+</sup> Donor Chimerism and Wilms Tumor Gene 1 (WT1) Expression Provide an Early Indication of Relapse in Patients with Acute Leukemias and MDS after Hematopoietic Cell Transplantation (HCT) with Reduced-Intensity Conditioning.**

**Max Hubmann<sup>1,\*</sup>, Ralph Burkhardt<sup>2,\*</sup>, Georg Franke<sup>1,\*</sup>, Michael Cross<sup>1,\*</sup>, Markus Scholz<sup>3,\*</sup>, Sabine Leiblein<sup>1,\*</sup>, Joachim Thiery<sup>2,\*</sup>, Dietger W. Niederwieser<sup>1</sup> and Thoralf Lange<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup> Dep. of Hematology and Oncology, University of Leipzig, Leipzig, Germany; <sup>2</sup> Dep. of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University of Leipzig and <sup>3</sup> Inst. for Medical Informatic, Statistics and Epidemiology, University of Leipzig .

#### **Abstract**

HCT following reduced intensity conditioning (RIC) relies mainly on immunological effects for disease control. The early detection and quantification of minimal residual disease and the timely adjustment of immune suppression are therefore particularly important in this setting. Since appropriate disease-specific gene markers are available only in a minority of patients with acute leukemias or MDS, the potential of both donor chimerism and Wilms Tumor gene 1 (WT1) expression to provide quantification of MRD was investigated.

*Patients and Methods:* Ninety-five consecutive patients with AML (n=68), ALL (n=7) and intermediate/high-risk MDS (n=20) were analyzed. Patients were 60 (median; range 21–74) years old and in CR1 (n=45), CR2 (n=25), or more advanced disease status (n=25). Grafts were obtained either from related (n=24) or unrelated (n=71) donors. Conditioning regimens consisted of fludarabine 30mg/kg BW day -4 to -2 (n=90) and total body irradiation with 2 Gy at day 0 (n=95), and post-transplant immunosuppression employed cyclosporin A and mycophenolate mofetil. Total donor chimerism (TDC, n=93 patients, 236 samples), CD34<sup>+</sup> chimerism (n=89, 219 samples) and disease-specific molecular markers detected by FISH (DSM, n=39, 77

samples) were all determined prospectively from bone marrow (BM) samples at baseline and on days +28, +56 and +84 post-transplant. WT1 expression was analyzed retrospectively by RT-PCR from stored peripheral blood (PB) samples (n=95, 321) from the same time points.

*Results:* With a median follow-up of 11.7 (range 2–61) months, 34 (36%) patients relapsed (defined by BM blasts >5%). Since complete results from all techniques were available up to day 84, we analyzed the diagnostic power of all methods to predict hematological relapse one month in advance up until the fourth month after HCT (n=21 patients, 22%). First, we estimated the value of the three different prospective MRD techniques (DSM, TDC and CD34<sup>+</sup> chimerism) using Receiver Operating Curves (ROC). Relapse was predicted 1 month in advance by CD34<sup>+</sup> chimerism [p= 0.001, area under the curve (AUC) = 0.875], but not by TDC or DSM, (n=30). The cut-off value of 5% decrease in CD34<sup>+</sup> chimerism in a one month period achieved a sensitivity of 71% and specificity of 91%. In comparison, WT1 expression was similarly associated with a pending relapse (p< 0.0001, AUC = 0.861). The optimal cut-off value of 24 WT-1 copies per 10000 ABL copies was assessed by ROC and resulted in a sensitivity of 79% and specificity of 91%. In a logistic regression model, we estimated the ratios of the dds of relapsing within the next month. WT1 achieved a higher odds ratio (36/1) than CD34<sup>+</sup> chimerism (25/1). Combining both techniques yielded a specificity of 98% and an odds ratio of 72/1.

*Conclusion:* WT1 expression in PB and CD34<sup>+</sup> chimerism in BM are superior to full donor chimerism and disease-specific markers determined by FISH in predicting relapse in all patients with acute leukemia and MDS. Both markers are suitable to develop effective post-transplant treatment strategies to further decrease the relapse rate using immunological or cytotoxic approaches.

**5.5.3. European Haematology Association (EHA) meeting 2010, Barcelona und Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) Jahrestagung 2010, Berlin**

*Haematologica, 2010 Jun; 95: 208*

*Onkologie, 2010 Oct; 33:28*

**Monitoring of WT1 expression in PB and CD34+ donor chimerism of BM predict early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced intensity conditioning**

Lange, T.1; Hubmann, M.1; Burkhardt, R.2; Franke, G.1; Cross, M.1; Scholz, M.3; Leiblein, S.1; Al-Ali, K.-H.1; Edelmann, J.4; Thiery, J.2; Niederwieser, D.1

1Universitätsklinikum Leipzig, Hämatologie/Onkologie, Leipzig, Germany,

2Universitätsklinikum Leipzig, Klinische Chemie, Leipzig, Germany,

3Universitätsklinikum Leipzig, IMISE, Leipzig, Germany,

4Universitätsklinikum Leipzig, Rechtsmedizin, Leipzig, Germany

HCT following reduced intensity conditioning (RIC) relies mainly on immunological effects for disease control. The early detection of minimal residual disease and the timely adjustment of immune suppression are particularly important in this setting. Since appropriate disease-specific gene markers are not always available in patients with acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndrome (MDS), the potential of both donor chimerism and Wilms Tumor gene 1 (WT1) expression to provide quantification of MRD was investigated. 88 consecutive patients with AML (n=68) and intermediate/high-risk MDS (n=20) were analyzed. Conditioning regimens consisted of fludarabine 30mg/ kg BW day -4 to -2 (n=84) and total body irradiation with 2 Gy at day 0 (n=88).

Total donor chimerism (TDC, n=86 patients), CD34+- chimerism (n=86) and disease-specific molecular markers detected by FISH (DSM, n=38) were all determined prospectively from bone marrow (BM) samples at baseline and on days +28, +56 and +84 post-transplant. WT1 expression was analyzed retrospectively by RT-PCR from stored peripheral blood (PB) samples (n=86, 260) from the same time points. With a median follow-up of 12.3 (range 1.3-64.9) months, 32 (37.2%) patients relapsed (defined by BM blasts >5%). Since complete results from all techniques were available up to day 84, we analyzed the diagnostic power of all methods to predict hematological relapse one month in advance up until the fourth month after HCT (n=21 patients, 24%, 66% of all relapses). First, we estimated the value of the three different prospective MRD techniques (DSM, TDC and CD34+ chimerism). Relapse was predicted 1 month in advance by a decrease of CD34+-chimerism of  $\geq 5\%$  [p=0.001, area under the curve (AUC) = 0.895], but not by TDC or DSM. The cut-off value of 5% decrease in CD34+ chimerism in a one month period achieved a



sensitivity of 71% and specificity of 91%. In comparison, WT1 expression was similarly associated with a pending relapse ( $p < 0.0001$ , AUC = 0.855). The optimal cut-off value of 24 WT-1 copies per 10000 ABL copies was assessed by ROC and resulted in a sensitivity of 79% and specificity of 89%. In a logistic regression model, we estimated the ratios of the odds of relapsing within the next month. WT1 achieved a higher odds ratio (27.6/1) than CD34+ chimerism (23.9/1). WT1 expression in PB and CD34+ chimerism in BM are superior to full donor chimerism and disease-specific markers determined by FISH in predicting relapse.

## **5.6 Danksagung**

Ich danke Herrn Privatdozenten Dr. med. Thoralf Lange für die stetige Unterstützung, die exzellente Betreuung dieser Promotionsarbeit, die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche, die Möglichkeit als Student auf wissenschaftlich hochrangigen Konferenzen Daten zu präsentieren und für seine Bedachtsamkeit und seinen Weitblick, durch die diese Promotion erfolgreich vollendet werden konnte.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. hc. Dietger Niederwieser danke ich für die Betreuung dieser Promotion, die intensive und kritische Bearbeitung der Publikationsmanuskripte und die Möglichkeit, an seiner Klinik meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Herrn Dr. med. Ralph Burkhardt und Prof. Dr. med. Joachim Thiery danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die fruchtbaren Diskussionen während der Mittagsseminare der klinischen Chemie.

Für die gute Zusammenarbeit und die hervorragende statistische Beratung danke ich Herrn Dr. rer. nat. Markus Scholz.

Ich danke Herrn Dr. med. Hermann Dietzfelbinger für die Durchsicht dieser Arbeit und seinen fachkundigen Beistand in schwierigen Situationen.

Für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre danke ich allen Mitarbeitern des hämatologischen Labors und der klinischen Chemie, insbesondere Frau Kovacs und Frau Musiol.

Ich danke meinen Eltern für Ihre Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums.