

Artikelen

Analyse en toepasbaarheid van de nucleofosminemutaties bij acute myeloïde leukemie

F.A.J.T.M van den BERGH¹, Ö. BINGÖL¹, J. SLOMP¹, M.R. de GROOT² en A. HEIJS-OUDE GROENEGER¹

Acute myeloïde leukemie (AML) is een heterogeen ziektebeeld waarbij in de WHO-classificatie een belangrijke rol is weggelegd voor zowel morfologie, immunofenotypering als detectie van chromosomale afwijkingen. Bij 40-50% van alle adulte 'de novo' AML-patiënten zijn met klassieke cytogenetische technieken abnormaliteiten afwezig en is nadere subtypering van deze intermediaire risicogroep niet goed mogelijk. Dankzij het ontdekken van mutaties in het nucleofosminegen (*NPM1*) lijkt nadere classificatie mogelijk waardoor beter inzicht wordt verkregen in prognose en behandelstrategie. De praktische uitvoerbaarheid van realtime- kwantitatieve-PCR (RT-PCR) van de mutaties *NPM1* A en B werd door ons getest aan de hand van een in de literatuur beschreven methode bij 49 in onze kliniek onderzochte volwassen AML- patiënten.

De mutaties *NPM1*-A en -B werden gevonden bij 12 volwassen patiënten met 'de novo' AML (24%), vaak bij een niet afwijkend karyotype (41%) en in combinatie met mutaties in het *fms*-like tyrosinekinase-3-gen ('internal tandem repeats', *FLT3*-ITD- en D538-mutaties).

Toepassing van RT-PCR op RNA, geïsoleerd uit perifere bloed of beenmerg, leidt tot snelle en betrouwbare bepaling van de beide *NPM*-mutaties bij AML-patiënten. Dit is van belang voor diagnostiek en prognose met name bij AML-patiënten met een normaal karyotype. Tevens behoort kwantificering van de *NPM*-mutatie, en daarmee bepaling van de tumorrestactiviteit, tot de mogelijkheden.

Trefwoorden: AML; Nucleofosmine; *NPM*; *NPM1*; realtime-polymerasekettingreactie

Afdelingen Laboratorium¹ en Interne Geneeskunde², Medisch Spectrum Twente, Enschede

Correspondentie: dr. F.A.J.T.M van den Bergh, Laboratorium Medisch Spectrum Twente, Postbus 50.000, 7500 KA Enschede
E-mail: F.vandenbergh@ mst.nl

Afkortingen: MRD: minimal residual disease; RT-PCR: realtime-kwantitatieve-polymerasekettingreactie; *NPM1*: nucleofosmine-1; FAB: French-American-British Classification

Acute myeloïde leukemie (AML) is de meest voorkomende vorm van leukemie bij volwassenen waarbij tenminste 20% van de totale kernhoudende cellen myeloïde blasten zijn. Onbehandeld kent AML een snel, vaak fataal, verloop zodat spoedige diagnostiek en behandeling van cruciaal belang zijn. Bij de in 1976 opgestelde FAB-classificatie (M0 t/m M7) werd AML ingedeeld op basis van de aantallen myeloblasten, morfologische kenmerken van uitrijping, en de positiviteit van speciale celkleuringen (1). De FAB-classificatie blijkt echter niet altijd in staat klinisch beloop en overleving juist te voorspellen. Bij de nieuwe WHO-classificatie (2) is de indeling, naast immunofenotypering, in belangrijke mate gebaseerd op de aanwezigheid van specifieke cytogenetische en moleculaire afwijkingen. Een groot aantal AML-patiënten kent specifieke cytogenetische afwijkingen zoals de translocaties inv (16), t (16;16), t (8;21), en t (15;17) die alle een goede prognose vertonen in tegenstelling tot bijvoorbeeld de translocaties t (9;22) en 11q23 die ongunstig zijn. Voor een overzicht, zie (3). Echter, met conventionele karyotypering zijn geen chromosomale abnormaliteiten detecteerbaar in 40-50% van alle gevallen (4). Mede dankzij de microarray-analyse van grote groepen AML-patiënten (5, 6) is men er op basis van genexpressiepatronen in geslaagd het heterogene ziektebeeld AML verder uit te splitsen en nieuwe mutaties op te sporen die van invloed zijn op de prognose en behandeling. Zo kennen mutaties in bijvoorbeeld de transcriptiefactor CCAAT/enhancer-binding protein- α (CEBPA) (7, 8) een gunstig beloop. Andere, nieuwere markers zoals de interne tandemduplicatie (ITD) van het 'fms-like tyrosinekinasegen' (*FLT3*) (9), de partiële tandemduplicatie (PTD) van het 'mixed lineage leukemiegen' *MLL* (10), en toegenomen expressie van de transcriptiefactor EVI1 (11) en WT-1 (12) hebben daarentegen een slechtere prognose.

Recent zijn nieuwe mutaties ontdekt op exon-12 van het nucleofosminegen (*NPM1*) (4, 13-16). Deze *NPM1*-mutaties blijken de meest specifieke en meest voorkomende genetische afwijkingen te vormen in volwassen en jonge AML-patiënten met een normaal karyotype (13, 17). De incidentie bij volwassenen bedraagt 35% van de gevallen bij 'de novo' AML (4) terwijl deze bij 5-10% van de kinderen met AML aantoonbaar is (13).

Naast een normaal karyotype is *NPM1* sterk geassocieerd met *FLT3*-ITD mutaties (15). Nucleofosmine is een in de celkern gelokaliseerd fosfoproteïne dat betrokken is bij verschillende cellulaire processen zoals de duplicatie van centromeren, de biogenese van ribosomen en de regulatie van de tumorsuppressor p53. Zij faciliteert het transport van pre-ribosomale eiwitpartikels naar het cytoplasma en heeft daardoor een belangrijke rol in de biogenese van ribosomen. *NPM1*-mutaties leiden tot veranderingen in het carboxyterminale einde van de nucleofosmine-eiwitketen waardoor het niet langer in de kern kan binden en cytoplasmatisch gelokaliseerd wordt. Transport van ribosomale eiwitten over het kernmembraan wordt hierdoor niet langer gefaciliteerd (18-20). Circa 40 verschillende mutaties zijn inmiddels bekend (14, 21-23). Mutatie A, een TCTG-tetranucleotideduplicatie op positie 956 is verantwoordelijk voor 75% van alle *NPM1*-mutaties bij volwassenen. Mutatie B, een insertie van een CATG op positie 959, voor nog eens 15% van alle *NPM1*-mutaties. De aanwezigheid van *NPM1*-mutaties is geassocieerd met een betere respons op inductie-therapie en heeft mogelijk een gunstige invloed op de langetermijnoverleving van *FLT3*-negatieve patiënten (15, 24). De aanwezigheid van de *NPM1*-mutatie heeft dus mogelijk grote invloed op de therapiekeuze voor deze groep AML-patiënten, en de ontwikkeling van gerichte vormen van therapie die rechtstreeks ingrijpen op door NPM-gereguleerde processen (14, 13, 25). Het bepalen van de tumorrestactiviteit (minimal residual disease, MRD) is een belangrijke parameter in de follow-up van de behandeling. Is de gevoeligheid van detecteerbare restactiviteit m.b.v. microscopische morfologie 1-5% ($5:10^{-2}$) en met flowcytometrische technieken ca. 0, 5% ($5:10^{-3}$), zo valt op DNA- en RNA-niveau een gevoeligheid van $1:10^{-4}$ tot $1:10^{-6}$ te bereiken. Mutatiedetectie van genetische afwijkingen met behulp van kwantitatieve PCR is op dit moment mogelijk bij ongeveer 50% van alle AML-patiënten (3), waarbij het verloop van de ziekte tot op een niveau van 1 maligne cel op ca. 100.000 gezonde cellen gevolgd kan worden. Kwantitatieve PCR van de *NPM1*-mutaties, die juist optreden bij AML-patiënten waarbij vaak geen andere cytogenetische afwijkingen detecteerbaar zijn, kan het percentage patiënten met genetische afwijkingen in belangrijke mate verhogen en daarmee het inzicht in prognose en behandelstrategie. Onlangs is door Gorello et al. (26) een snelle kwantitatieve realtime-RT-PCR-assay ontwikkeld waarmee detectie van een aantal *NPM1*-mutaties gemakkelijk uitvoerbaar is. Omdat wij binnen HOVON-verband een uitgebreid pakket voeren voor de diagnostiek en monitoring van hematologische maligniteiten, hebben wij gekeken naar de praktische toepasbaarheid van deze assay op onze eigen patiëntenpopulatie.

Materialen en methoden

Patiënten en celmateriaal

49 patiënten met de diagnose acute myeloïde leukemie (AML) met een gemiddelde leeftijd van 58 jaar (range 19-81 jaar) werden gediagnostiseerd volgens de WHO-criteria, gebaseerd op cytologisch onder-

zoek van bloed en beenmerg, immunofenotypering, cytogenetica en medische voorgeschiedenis. Tevens werd translocatieanalyse uitgevoerd op de translocaties BCR-ABL, AML1-ETO, PML-RAR, en CBFB-MYH11 na RNA-isolatie uit bloed en beenmerg volgens de geldende richtlijnen van het landelijk netwerk Moleculaire Diagnostiek bij Hematologische Maligniteiten (www.modhem.nl). In 48 gevallen werd ook de *FLT3*-'internal tandem duplication' (*FLT3*-ITD) en de D538-puntmutatie bepaald. Uiterlijk binnen 1 uur na afname werd RNA geïsoleerd.

Celkweek

Gebruik werd gemaakt van de OC-AML3 cellijn (DSMZ cellijnbank, Duitsland) positief voor de *NPM1* mutatie A, en de controlecellijn HL60 (DSMZ, idem). De cellijn HL-60 werd opgekweekt volgens standaardprotocol in RPMI⁺-medium bestaande uit RPMI1640 (zonder glutamine), 10% v/v FCS, 2% Pen/Strep, 1% v/v Ultraglutamine I en 0,4 µg Fungizone per ml medium. De OC-AML3-celijn werd opgekweekt in Alfa-MEM⁺-medium bestaande uit 20% v/v FCS, 2% v/v Pen/Strep, 1% v/v Ultraglutamine en 0,4 µg Fungizone per ml medium. Voor en na invriezen werd steeds gecontroleerd op mycoplasmacontaminatie d.m.v. DNA-analyse. RNA afkomstig van perifeer bloed en beenmerg van AML-patiënten, gekweekte cellen van de positieve controle OC-AML3 (mutatie A) en negatieve controle HL-60 werden geïsoleerd met behulp van de QIAamp®RNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Duitsland) volgens bijgeleverd protocol.

De kwaliteit van de RNA-isolatie uitgevoerd op bloed, beenmerg en isolaten van celkweeken werd gecontroleerd door middel van 1%-agarosegelelektroforese. Hierbij werd gekeken naar de aanwezigheid en intactheid van 18S en 28S ribosomale banden na aankleur- ing met ethidiumbromide.

Realtime-kwantitatieve-PCR

Bij de realtime-kwantitatieve-PCR is gebruik gemaakt van een gemeenschappelijke forward primer en probe voor zowel mutatie A als B en een mutatiespecifieke reverse primer. Primers en probes (Applied Biosystems) staan beschreven in figuur 1: de forward primer ligt in exon 11 (*NPM-F*), de probe (*NPM*- probe 5'-FAM-3'-MGB) ligt in het exon11/exon 12 gebied en de reverse primers (*NPM* mut A-R en *NPM* mut B-R) liggen in exon 12. De cDNA-synthese is uitgevoerd op 1 µg RNA. De realtime-kwantitatieve-PCR-reactiemix bestaat uit 12,5 µl TaqMan Universal Master Mix with uracil-N-glycosylase (UNG, Applied Biosystems), 300 nM primers, 200 nM probe en 5 µl cDNA (1/16 deel van de cDNA-reactie), in totaal 25 µl. De PCR wordt uitgevoerd en geanalyseerd op de ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System. PCR-condities zijn 2 min 50 °C (UNG-enzymactivatie), 10 min 95 °C (UNG-enzyminactivatie en AmpliTaq Polymerase-activatie), gevolgd door 45 cycli van 15 s 95 °C en 1 min 60 °C. Er werd een fixed threshold gebruikt van 0,05. Na uitvoering van de reverse transcriptasereactie werd de kwaliteit en kwantiteit van het cDNA beoordeeld door RT-kwantificering van het porfobilinogendeaminase (PBGD) gen dat werd meegenomen als referentiegen

volgens de richtlijnen van de MODHEM (Werkgroep Moleculair Biologische Diagnostiek van Hematologische Maligniteiten, www.modhem.nl). Hiermee wordt tevens gecorrigeerd voor variaties in de efficiëntie van de cDNA-synthese en variaties in de cDNA-input die van invloed zijn op de hoeveelheid product na uitvoering van de RT-PCR.

Sequencing

Het sequencen vond plaats d.m.v. conventionele PCR met behulp van Fast start Taq polymerase (5 U/μl). Per PCR van 50 μl is gebruik gemaakt van 5 μl cDNA, 20 μM forward primer, 20 μM reverse primer en 2 mM dNTP's. Het PCR programma hierbij was: 2 minuten bij 95 °C, gevolgd door 40 cycli van 30 s bij 94 °C, 60 s bij 65 °C en vervolgens 60 s bij 72 °C; als laatste stap 10 min bij 72 °C. PCR-producten werden gescheiden en gevisualiseerd op 2%-agarosegel met ethidiumbromide. Hierna werden deze PCR-producten opgezuiverd met behulp van Exosap-IT (Amersham) en gekwantificeerd door op 2% agarosegel te runnen. Vervolgens vindt ketenterminatie plaats. Per reactie van 20 μl werd gebruik gemaakt van 1,2 μl amplificaat en 20 μM primer. Het programma voor de BigDye-reactie (BigDye Terminator Mix, Applied Biosystems) was: 25 cycli

van 10 s bij 96 °C, 5 s bij 50 °C en 90 s bij 60 °C. Hierna werden de samples met behulp van ethanol geprecipiteerd en gescheiden m.b.v. capillaire elektroforese en fluorescentiedetectie op een ABI Prism 3100 Avant (Applied Biosystems).

Bepaling minimal-residual disease (MRD)

De hoeveelheid geamplificeerd product wordt d.m.v. de TaqMan software berekend uit de kalibratiecurves. Hierbij wordt de hoeveelheid restactiviteit berekend ten opzichte van de hoeveelheid uitgangsmateriaal waarbij gecorrigeerd wordt voor verschillen in PCR-efficiëntie en cDNA-inputvariëties via de Ct-waarden van het referentiegeng PBGD. Gemeten wordt in duplo, waarbij de verschillen tussen de duplo Ct-waarden maximaal 2 Ct-cycli mogen zijn. Gebruik wordt gemaakt van de $\Delta\Delta Ct$ -methode waarbij $\Delta\Delta Ct = ((C_{target} t_2 - C_{PBGD} t_2) - (C_{target} t_1 - C_{PBGD} t_1))$ waarbij t1 en t2 de tijdstippen zijn van diagnose respectievelijk de follow-up. De hoeveelheid restactiviteit volgt uit de formule: % restactiviteit = $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$.

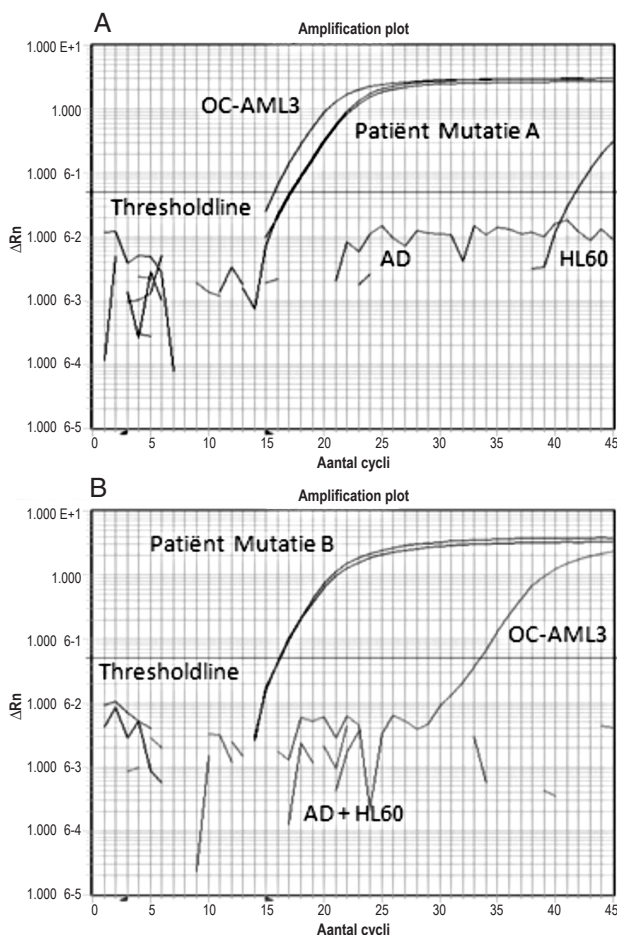
Alle overige niet genoemde translocatie- en mutatieanalyses zijn uitgevoerd conform de richtlijnen van het Moleculair Diagnostische Netwerk voor Hematologische Maligniteiten (www.modhem.nl).

Statistische methoden

De associatie tussen het voorkomen van de *FLT3*- en de *NPM1*-mutaties werd bepaald met behulp van de fisher-exacttest.

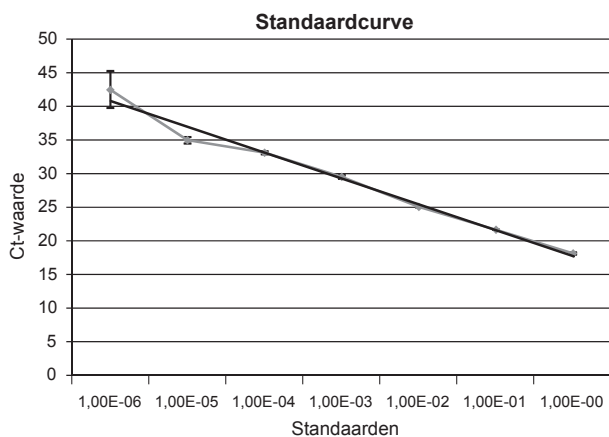
Resultaten

Doordat de RNA-isolatie steeds werd uitgevoerd binnen 1 uur na afname van het onderzoeksmateriaal werden in alle gevallen intacte en discrete banden gevonden voor 18S- en 28S-ribosomaal-RNA bij agarosegelelektroforese. De kwaliteit en opbrengst van het geamplificeerde cDNA werd beoordeeld aan de hand van het PBGD-referentiegeng. Een gemiddelde Ct-waarde van 25,5 cycles werd verkregen bij analyse van 62,5 ng cDNA bij 49 verschillende patiëntensamples onder gebruikmaking van 0,05 als vaste threshold waarde (figuur 1). Omdat afgebroken RNA tot lagere hoeveelheden uitgangsmateriaal en dus tot hogere C_t -waarden kan leiden, werd de individueel maximaal toelaatbare C_t -waarde van het referentiegeng op 27,5 cycles gesteld. Figuur 1AB toont de resultaten van het referentiegeng, de mutaties *NPM1*-A en *NPM1*-B, en de positieve controle voor mutatie A (cellijn OC-AML3). Voor mutatie B was geen commerciële cellijn verkrijgbaar. De standaardcurve werd verkregen door seriële verdunning van de positieve cellijn OC-AML3 (mutatie A) in negatieve controlecellen (HL60). Tussen 10^{-2} en 10^{-6} wordt een lineair verband gevonden tussen de log concentratie en de C_t -waarde met een helling van -3,6 en een intercept van 18,2 C_t -waarden ($R = 0,992$, figuur 2). Bij meting in drievoud is de reproduceerbaarheid uitgedrukt als variatiecoëfficiënt bij de laagste verdunning (1:1) 0,3% oplopend tot 6,4% voor de hoogste verdunning (1: 10^6). Dit impliceert dat de efficiëntie van de PCR-reactie ca. 1,9 bedraagt. Een verschil van 1 C_t -waarde correspondeert dientengevolge met een verschil van ongeveer 50% in de geschatte



Figuur 1. Realtime-kwantitatieve-polymerasekettingreactie (RT-PCR) van beenmerg van patiënten met 'de novo' AML van nucleofosmine-exon 12 met (a) *NPM1*-mutatie A, (b) *NPM1*-mutatie B. Afkortingen: AD: aqua dest.; OC-AML3: controlecellijn positief voor *NPM1*-mutatie A; HL60: controlecellijn negatief voor *NPM1*-mutaties. ΔRn : Logaritmische weergave van de genormaliseerde fluorescentie.

concentratie van de gemeten doelwaarde (target-gen). De hoge correlatiecoëfficiënt ($R > 0,99$) resulteert in nauwkeurige schatting van de *NPM1*-mutatie A indien deze in lage concentratie aanwezig is. Ofschoon de curve lineair loopt tot 10^{-6} en de maximale gevoeligheid bij duplometing 10^{-6} bedraagt, is het signaal bij deze lage concentratie (C_t -waarden 40 en hoger) minder reproduceerbaar. De detectiegrens is daarom gezet op 10^{-5} d.w.z. dat voor mutatie A één gemuteerde cel op 100.000 wildtypecellen nog nauwkeurig te kwantificeren is. Bij 49 patiënten met AML getest op mutatie A en B werden bij 12 van hen *NPM1*-mutaties gevonden: 11 met *NPM1*-mutatie A (92%) en 1 met *NPM1*-mutatie B (8%). Bij 3 van de 12 patiënten vond detectie plaats in perifeer bloed, in de overige 9 op beenmerg. Bij één patiënt werd zowel bloed als beenmerg geanalyseerd met C_t -waarden van resp. 16,71 en 15,77. Bij 46/49 patiënten werd volledige karyotypering uitgevoerd evenals analyse van de translocaties in de fusiegenen *BCR-ABL*, *PML-RAR α* , *CBFB-MYH11* en *AML-ETO*. Bij 9 van de 22 patiënten (41%) zonder dergelijke chromosomale afwijkingen zijn *NPM1*-mutaties aantoonbaar. Bij de 24 patiënten met chromosomale afwijkingen bleken slechts in 2 gevallen (8%) *NPM1*-mutaties aantoonbaar. In 48 van de 49 patiënten werden ook twee type mutaties in het tyrosinekinase-*FLT3*-gen, nl. de internal tandemduplicatie (*FLT3*-ITD) en de puntmutatie D835, geanalyseerd. In de door ons onderzochte groep patiënten lijkt een significante associatie te bestaan met het voorkomen van *FLT3*-mutaties. Van de *NPM1*-positieve patiënten ($n=12$) vertonen zes patiënten (50%) tevens een *FLT3*-mutatie, terwijl dit aantal in de *NPM1*-negatieve groep ($n=36$) slechts zeven bedraagt (19%, $p=0,061$). De patiënt met de *NPM1*-mutatie B (nr. 23 uit tabel 2) heeft een AML-M2 met twee verschillende populaties blasten en is, ondanks de aanwezigheid van de prognostisch ongunstige mutatie *FLT3*-ITD, al bijna 5 jaar in remissie. Door middel van sequencing werd op de positieve cellijn OC-AML3 (mutatie A) en op 3 patiënten met en zonder *NPM*-mutatie A en B mutatieana-



Figuur 2. Verdunningsreeks van de positieve cellijn OC-AML3 (*NPM1*-mutatie A) in negatieve controlecellen HL60. Tussen 10^{-2} en 10^{-6} wordt een lineair verband gevonden met hellingshoek $-3,6$, intercept 18,2 C_t -waarde en correlatiecoëfficiënt $R = 0,992$. De reproduceerbaarheid van de gemeten C_t -waarden is weergegeven als $\pm 2SD$ (balken). Bij $C_t \geq 40$ (verdunning 1: 10^6) wordt de meting onvoldoende reproduceerbaar.

lyse uitgevoerd van een genfragment ter grootte van 276 bp met daarin het gebied waarin de beide mutaties zijn gesitueerd. Ten gevolge van de gemengde populatie positieve en negatieve cellen wordt steeds een dubbel signaal verkregen. In het te verwachte mutatiegebied komt de basevolgorde niettemin overeen met een TCTG- tetranucleotideduplicatie op positie 956 (mutatie A, figuur 3b) en insertie van de nucleotide CATG op positie 959 (mutatie B, figuur 3c). De basevolgorde van de wildtypepatiënt (niet-gemuteerd *NPM*-gen, figuur 3a) correspondeert volledig met die uit de literatuur (www.ncbi.nlm.gov.com, genbank NM002520). Om te kijken of bepaling van de restactiviteit (MRD) mogelijk is bij het vervolgen van de behandeling, werd de hoeveelheid restactiviteit aan *NPM*-gemuteerde cellen gekwantificeerd. Van de 12 patiënten met een *NPM*-mutatie waren er zes van wie follow-up materiaal aanwezig was (tabel 2). Hierbij werd het uitgangsmateriaal ten tijde van diagnose op 100% gesteld. Bij alle 6 patiënten is een sterke daling waarneembaar. Bij 4 van de 6 patiënten is enkele maanden na inzetten van de behandeling geen restactiviteit meer meetbaar. Er is een duidelijke relatie met de morfologische remissie (tabel 2). Patiënt nr. 47 met aanwezige restactiviteit is aan de gevolgen van AML overleden. De overige 5 patiënten zijn klinisch tot op heden nog in complete remissie.

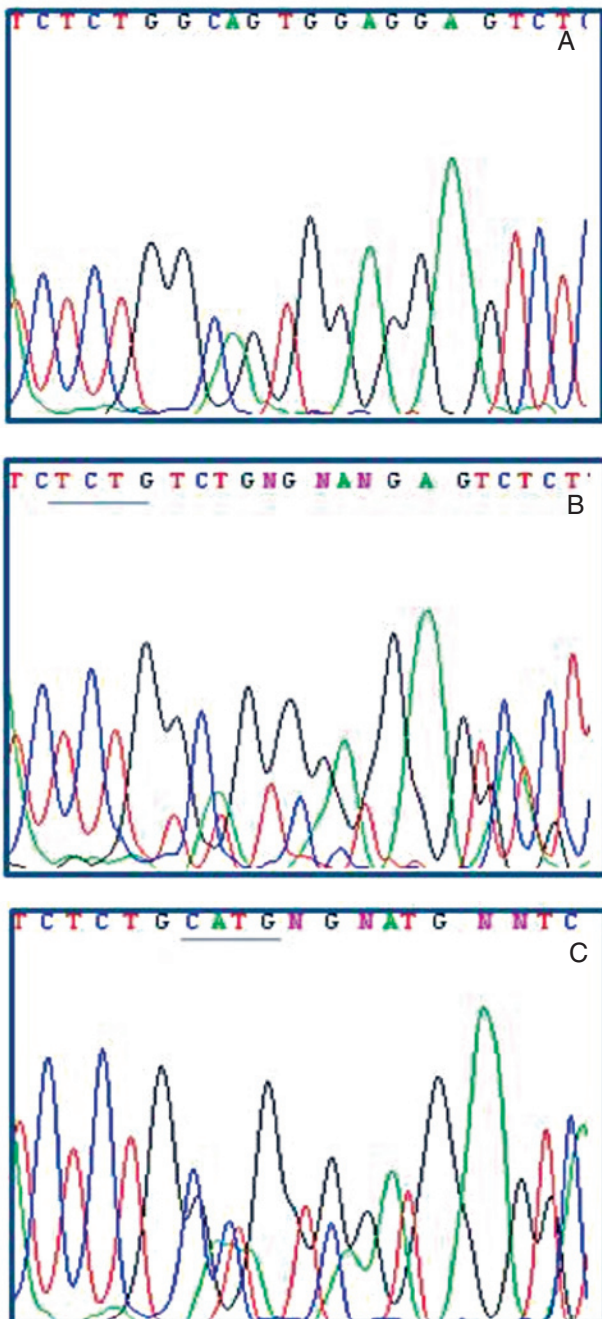
Discussie

AML is een heterogene groep ziektebeelden waarvan een nadere indeling in subgroepen van cruciaal belang is voor de prognose, het ziektebeloop en de keuze van de therapie. Ongeveer 40% van alle 'de novo' AML-patiënten vertonen bij de klassieke karyotypering geen cytogenetische afwijkingen. Mede daardoor zijn zij moeilijk te classificeren met betrekking tot risicoschatting en de keuze van therapie. Zij vallen in een intermediaire risicogroep. Volgens Gorello (26) blijken bij 60% van alle volwassenen AML-patiënten met normaal karyotype mutaties in exon 12 van het nucleofosmine (*NPM1*) gen voor te komen. De *NPM1*-mutatie blijkt samen te gaan met een betere respons op inductietherapie (15, 27). Door Gale et al. (27) en Verhaak et al. (15) werd tevens een reciproke relatie aangetoond tussen de aanwezigheid van de mutaties *FLT3*-ITD en *NPM1* met betrekking tot het risico op relapse en de overlevingsduur. De *FLT3*-ITD mutatie is geassocieerd met een slechte prognose. Voor de *FLT3*-D835-puntmutatie lijkt eenzelfde ongunstig effect te bestaan. Zowel de *FLT3* als *NPM1*-mutaties blijken significante, onafhankelijke risicomarkers te zijn met betrekking tot relapse en overlevingsduur (15,27). Hierdoor valt onderscheid te maken in 3 prognostische groepen: gunstig (*FLT3*/*NPM1*⁺), intermediaire (*FLT3*/*NPM1*⁻ of *FLT3*⁺/*NPM1*⁺) en ongunstig (*FLT3*⁺/*NPM1*⁻). Door bepaling van zowel de *FLT3*- als de *NPM1*-mutaties kan de huidige intermediaire risicocategorie dus worden opgesplitst in beter classificeerbare risicogroepen.

Door Gorello et al. (26) werd een realtime-kwantitatieve (RT)-PCR ontwikkeld voor de *NPM1*-mutaties A t/m H na isolatie uit DNA- respectievelijk RNA-materiaal van 'de novo' AML-patiënten.

Tabel 1. Primers en probes zoals gebruikt voor de CDNA-assay en sequencing van de nucleofosmine-*NPM1*-mutaties A resp. B volgens Gorello et al. (26). De reverse primer, gebruikt voor de sequencing, is zelf gekozen om een groter amplicon te genereren (276 bp). Afkortingen: FAM: 'fluorescent dye 6- carboxy-fluorescein', MGB: 'minor groove binder'.

Primer	Sequentie	Toepassing
<i>NPM1</i> -forward mutatie A en B	5'-GAAGAATTGCTTCCGGATGACT-3'	Sequencen, cDNA-assay
<i>NPM1</i> -reverse mutatie A	5'-CTTCCTCCACTGCCAGACAGA-3'	cDNA-assay
<i>NPM1</i> -reverse mutatie B	5'-TTCCTCCACTGCCATGCAG-3'	cDNA-assay
<i>NPM1</i> -probe	5'-FAM-ACCAAGAGGCTATTCAA-MGB-3'	cDNA-assay
<i>NPM1</i> -reverse	5'-AACCAAGCAAAGGGTGGAGTT -3'	Sequencen



Figuur 3. Basevolgorde van cDNA-fragment ter grootte van 276 bp in het mutatiegebied zoals geamplificeerd met de forward primer in exon 11 en de reverse primer van het *NPM1*-fragment zoals aangegeven in tabel 1. (A) ongemuteerde cellen (wildtype), (B) mutatie A (tetranucleotideduplicatie TCTG, onderstreept), (C) mutatie B (insertie van CATG, onderstreept).

In onze handen blijkt na isolatie van mRNA uit perifere bloed of beenmerg de RT-PCR op de *NPM1*-mutaties A en B zoals beschreven (26) snel en betrouwbaar mogelijk. Wij beperkten ons tot de analyse van de mutaties A en B die samen ca. 90% van alle *NPM1*-mutaties vertegenwoordigen. De aanwezigheid van beide mutaties kon met behulp van sequenzen bevestigd worden, ofschoon door de gemengde populaties afwijkende en normale cellen de interpretatie van de basenvolgorde bemoeilijkt werd.

De door ons gevonden aantallen mutaties *NPM1*-A en *NPM1*-B stemmen goed overeen met de in de literatuur gerapporteerde percentages van voorkomen (15, 25). Met 41% komt de mutatie met name voor in combinatie met een normaal karyotype. Het frequent voorkomen van deze mutaties bij normaal karyotype en zonder de aanwezigheid van andere cytogenetische afwijkingen, behoudens de *FLT3*-ITD mutatie, is primair van belang voor de prognose en dus voor de keuze van therapie. Het opvallende samengaan met de *FLT3*-mutatie, zoals beschreven in de literatuur (15, 27), is door ons minder significant bevonden ($p = 0,061$) wat mogelijk te wijten is aan het beperkte aantal onderzochte patiënten: 50% van de 12 *NPM1*-positieve patiënten is ook positief voor een *FLT3*-mutatie terwijl dat aantal in de *NPM1*-negatieve groep slechts 19% bedraagt.

Omdat één gemuteerde cel betrouwbaar en reproduceerbaar te detecteren is op minimaal 100.000 gezonde cellen, zou de kwantitatieve RT-PCR tevens een aangrijpingspunt kunnen zijn voor bepaling van de MRD. Bij 5/6 patiënten waarvan meerdere samples tijdens de behandelingsperiode beschikbaar waren, vinden wij na behandeling een drastische reductie in de aantallen maligne cellen, zowel in beenmerg als perifeer bloed. Alle 5 patiënten zijn klinisch nog steeds in volledige remissie. Eén patiënt vertoonde een nieuwe oploop van het % MRD en is inmiddels aan de gevolgen van de AML overleden. De sequentiële meting van *NPM1* in beenmerg kan worden gebruikt voor MRD-metingen. Het is echter niet bekend of bij AML, net als bij CML, het perifere bloed een goede afstemming is van het beenmerg bij het ziekteverloop; voorsnog moet daarom worden uitgegaan van beenmerg.

Een meer uitgebreide studie samen met verhoging van de detectiegevoeligheid tot 10^{-6} positieve cellen zal moeten uitwijzen wat het nut is van de *NPM1*-mutatieanalyse voor het monitoren van AML-patiënten waarbij geen andere chromosomale afwijkingen aantoonbaar zijn. Het therapeutisch algoritme bij kwantificering van de resterende t (9;22) -activiteit bij CML

Tabel 2. Tumorrestactiviteit (MRD) tijdens diagnose, na inductietherapie en follow-up van patiënten met *NPM1*-mutatie-A-positieve AML. Het betreft de relatieve afname waarbij de concentratie *NPM1*- positieve cellen tijdens de diagnose op 100% is gesteld. De gevoeligheid waarbij betrouwbaar nog tumoractiviteit meetbaar is, is op 10^{-5} gesteld. Afkortingen: BM: beenmerg, PB: perifere bloed, CR: complete remissie, PHSCt: perifere hematopoëtische stamceltransplantatie.

Pa-tiënt	Datum afname	Materiaal	Ct <i>NPM1</i> -mutatie	Ct <i>PBGD</i>	$\Delta\Delta Ct$	Follow-up-periode (maanden)	% restactiviteit t.o.v. diagnose	Immuunfenotypering	Morfologie
2	05-12-2007	BM	17,28	24,64	0	0	100	25% afwijkende cellen +25% erytroblasten	AML-M6 uit MDS
	27-02-2008	BM	34,53	25,93	15,96	2	0,0016	CR	CR
4	19-08-2005	PB	16,3	23,30	0	0	100	AML, 93 % blasten	94% blasten, AML-M1
	14-09-2005	BM	33,9	27,30	13,6	1	0,0081	-	geen goed BM
	08-11-2005	BM	45	24,60	27,4	3	0	-	CR
	04-07-2006	BM	45	25,90	26,1	11	0	-	CR
	20-02-2007	BM	45	24,50	27,5	18	0	-	CR, 1 jaar na PHSCt
	12-02-2008	BM	45	26,10	25,9	30	0	-	CR
18	20-02-2006	BM	16,75	24,31	0	0	100	AML, 75 % blasten	92 % blasten, AML-M1
	27-02-2008	BM	30	23,80	13,76	1	0,0072	-	17% blasten, matig celrijk BM
	15-03-2006	BM	45	26,83	25,73	2	0	-	CR
	23-05-2007	BM	45	24,36	28,2	16	0	-	CR
23	27-01-2004	BM	16,25	21,30	0	0	100	AML, 2 populaties 35% en 15%	82% blasten, AML-M2
	16-09-2004	BM	45	22,53	27,51	8	0	-	CR
	27-01-2005	BM	45	22,60	27,44	12	0	-	CR
	19-05-2005	BM	45	21,51	28,53	14	0	-	CR
	08-09-2005	BM	45	23,23	26,81	18	0	-	CR
	06-04-2006	BM	45	23,18	26,86	25	0	-	CR
30	13-06-2006	BM	18,59	25,86	0	0	100	AML, 80% blasten	68% blasten, AML-5b
	20-07-2006	BM	34,25	26,52	15,00	1	0,0031	-	CR
	12-09-2006	BM	35,73	26,16	16,84	3	0,0009	-	CR, wel matige kwaliteit BM
	23-11-2006	BM	45	25,22	27,05	5	0	2% regeneratieve B-cellen	2% blasten
47	19-03-2007	BM	15,77	23,07	0	0	100	AML	72% blasten, AML-M1, mogelijk uit MDS
	11-04-2007	BM	25,75	28,15	4,9	1	3,3493	-	Hypocellulair aspiraats met 7% blasten
	25-04-2007	BM	21,32	25,99	2,63	2	16,1544	-	4% blasten

is een goed voorbeeld van de potentie van een dergelijke strategie (28).

Samenvattend: analyse van de nucleofosmine-1-mutaties A en B is in de praktijk goed uitvoerbaar en lijkt een welkome aanvulling te vormen op de reeds bestaande AML-genotypering, zoals die in de HOVON-laboratoria gebezigd wordt. Nadere risicoclassificatie van met name die AML-patiënten die een normaal karyotype bezitten, wordt daardoor mogelijk.

Dankbetuiging

Het uitvoeren van de sequencing-reacties kon plaatsvinden dankzij de welwillende medewerking van het Streeklaboratorium voor de Microbiologie voor Twente-Achterhoek (hoofd: dr. R. Hendrix) te Enschede.

Referenties

1. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33: 451-8.
2. 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; 103: 620-5.
3. Jansen JH, van der Reijden BA. Moleculaire diagnostiek van myeloïde maligniteiten. *Ned Tijdschr Hematol* 2005; 2: 50-8.
4. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, et al.; GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005; 352: 254-66.

5. Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1617-28.
6. Bullinger L, Döhner K, Bair E, Fröhling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Döhner H, Pollack JR. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1605-16.
7. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, de Botton S, Thomas X, et al.; ALFA Group. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with 'de novo' acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 2002 15; 100: 2717-23.
8. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Meijer J, van Oosterhoud S, van Putten WL, Valk PJ, Berna Beverloo H, et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J* 2003; 4: 31-40.
9. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1911-8.
10. Marcucci G, Strout MP, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Detection of unique ALL1 (MLL) fusion transcripts in normal human bone marrow and blood: distinct origin of normal versus leukemic ALL1 fusion transcripts. *Cancer Res* 1998 15; 58: 790-3.
11. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, Valk PJ, van der Poel-van de Luytgaarde S, Hack R, Slater R, et al. High *EVII* expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 'de novo' AML patients. *Blood* 2003; 101: 837-45.
12. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, Kita K, et al. *WT1* as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994; 84: 3071-9.
13. Cazzaniga G, Dell'Oro MG, Mecucci C, Giarin E, Masetti R, Rossi V, Locatelli F, et al. Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 1419-22.
14. Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, Terre C, et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 3618-20.
15. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hugens W, Uitterlinden AG, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 2005; 106: 3747-54.
16. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, Mandelli F, et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 2007; 92: 519-32.
17. Nakagawa M, Kameoka Y, Suzuki R. Nucleophosmin in acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352: 1819-20.
18. Dumbar TS, Gentry GA, Olson MO. Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry* 1989; 28: 9495-501.
19. Cordell JL, Pulford KA, Bigerna B, Roncador G, Banham A, Colombo E, Pelicci PG, Mason DY, Falini B. Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells. *Blood* 1999; 93: 632-42.
20. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 1989; 56: 379-90.
21. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, Kadera Y, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106: 2854-61.
22. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, 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: 3740-6.
23. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 3733-9.
24. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling s, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1909-19.
25. Jansen JH. Nucleofosminmutaties komen zeer frequent voor bij acute myeloïde leukemie en correleren met een relatief gunstige prognose. *Ned Tijdschr Hematol* 2005; 2: 235.
26. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G, Roti G, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia* 2006; 20: 1103-8.
27. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. The impact of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111: 2776-84.
28. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, Apperley J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; 108: 1809-20.

Summary

Bergh FAJTM van den, Bingöl Ö, Slomp J, Groot MR de, Heijs-Oude Groeneger A. Analysis and feasibility of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2009; 34: 150-156.

Acute myeloid leukemia (AML) is a genetically heterogeneous disease with significant differences in clinical outcome due to a wide variety in genetic abnormalities. Classification according to the World Health Organisation (WHO) not only makes use of conventional morphological and cytochemical features but also of immunophenotyping, advanced cytogenetical- and molecular techniques. No chromosomal abnormalities are detectable by conventional karyotyping in 40 to 50 percent of AML patients. This poorly characterized subgroup is believed to have an intermediate risk. However, recently identified mutations enable further classification of this subgroup. Mutations in exon 12 of the nucleophosmin (*NPM1*) gene occur in about 40% of adult AML with normal karyotype. A sensitive and simple real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) is recently described and identifies several *NPM1*-mutations in blood and bone marrow of AML patients. The practical feasibility of this method was tested in 49 adults with AML. The high incidence of *NPM1* mutations A and B (25%) could be confirmed, is often associated with normal karyotype (41%) and in combination with mutations in the *fms*-like tyrosine kinase 3 gene (*FLT3*) (58%). It is concluded that the method described is easily adaptable and provides additional information with respect to diagnosis and prognosis, especially in AML adults with normal karyotype. Quantification of the *NPM* mutation also enables the possible detection of minimal residual disease.

Keywords: AML, nucleofosmine, NPM, NPM1, real-time polymerase chainreaction