

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Kinderheilkunde III

**Molekulargenetische Untersuchung zur Beurteilung von SAMHD1 im
Rahmen der Cytarabin Response bei der akuten myeloischen
Leukämie im Kindesalter**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Henrike Ursula Richter

aus
Wuppertal
2023

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/81782

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240402-112139-3



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0) genutzt werden.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. N. von Neuhoff
2. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. P. E. Johansson

Tag der mündlichen Prüfung: 1. März 2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	<i>Akute myeloische Leukämie im Kindesalter.....</i>	6
1.1.1	Definition und Klassifikation.....	6
1.1.2	Klinik und Diagnostik.....	8
1.1.3	Risikostratifizierung.....	10
1.1.4	Therapie.....	11
1.2	<i>Cytarabin.....</i>	16
1.2.1	Stoffwechsel und Wirkungsmechanismus.....	16
1.2.2	Resistenzen.....	18
1.3	<i>SAMHD1.....</i>	19
1.3.1	Struktur und Eigenschaften.....	19
1.3.2	Regulierung und Expression.....	20
1.3.3	Funktion.....	21
1.3.4	Mutationen.....	22
2	Fragestellungen.....	23
3	Proben, Material und Methoden.....	24
3.1	<i>Proben.....</i>	24
3.1.1	Zelllinien.....	24
3.1.2	Patientenproben.....	25
3.2	<i>Material.....</i>	25
3.2.1	Geräte.....	25
3.2.2	Verbrauchsmittel.....	25
3.2.3	Reagenzien.....	26
3.2.4	Primer.....	26
3.3	<i>Methoden.....</i>	27
3.3.1	Zellkultur.....	27
3.3.2	RNA-Extraktion.....	27
3.3.3	cDNA-Synthese.....	28
3.3.4	Digitale droplet PCR.....	29
3.4	<i>Statistische Auswertung.....</i>	31

4	Ergebnisse	32
4.1	<i>Patientenkollektiv</i>	32
4.2	<i>Expression von SAMHD1 in Zelllinien</i>	34
4.3	<i>Expression von SAMHD1 in Patientenproben</i>	38
4.3.1	Allgemeine Beschreibung der SAMHD1 Expression.....	38
4.3.2	SAMHD1 Expression im Zusammenhang zu einer Variablen	38
4.3.3	Interaktion von Variablen	50
5	Diskussion	55
5.1	<i>Kritische Auseinandersetzung und Schlussfolgerungen</i>	61
6	Zusammenfassung.....	64
6.1	<i>Deutsche Fassung</i>	64
6.2	<i>Englische Fassung</i>	65
7	Literaturverzeichnis.....	66
8	Anhang	74
8.1	<i>Abkürzungsverzeichnis.....</i>	74
8.2	<i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	76
8.3	<i>Tabellenverzeichnis.....</i>	78
9	Danksagung	79
10	Lebenslauf.....	80

1 Einleitung

Der Begriff Leukämie wurde 1845 von Rudolf Virchow erstmalig beschrieben. Übersetzt bedeutet er „weißes Blut“, beziehungsweise Weißblütigkeit. Bereits Virchow vermutete, dass der Ursprung der neuen Blutzellen und der Ursprung der Leukämie derselbe sein müsse (Virchow, 1862). Heute, über 175 Jahre später, ist bekannt, dass Rudolf Virchow mit seiner These weitgehend Recht hatte.

Im menschlichen Körper eines Erwachsenen befinden sich vier bis sechs Liter Blut (Sykora and Welte, 2006). Die zellulären Bestandteile leiten ihren Ursprung aus der hämatopoetischen pluripotenten Stammzelle im Knochenmark ab. Durch Differenzierung und Proliferation entstehen aus den Stammzellen zwei Zellreihen, die myeloische und die lymphatische Entwicklungsrichtung (Sykora and Welte, 2006). Die Hämatopoese ist ein störanfälliges System. Durch verschiedene Faktoren wie Noxen, ionisierende Strahlung, virale Infektionen oder chromosomale Translokationen kann es zu einer Transformation der pluripotenten Stammzellen zu malignen Zellen kommen (Hanahan and Weinberg, 2011). Maligne Zellen haben die gleichen Kennzeichen, die sogenannten „Hallmarks of Cancer“. Zu diesen gehören die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, die Unabhängigkeit von wachstumshemmenden Faktoren, das Umgehen der Apoptose, ein unbegrenztes replikatives Potential, die kontinuierliche Angiogenese und die Eigenschaft, in zellfremde Gewebe zu metastasieren (Hanahan and Weinberg, 2011). Durch die klonale Proliferation und Akkumulation der neoplastischen Zellen werden die physiologischen Knochenmark- und Blutbestandteile verdrängt und die Hämatopoese eingeschränkt (Aigner et al., 2016).

Die Leukämie ist die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter. Die häufigste Form der pädiatrischen Leukämie ist die akute lymphatische Leukämie (Creutzig et al., 2003). Mit einer Inzidenz von 7 auf 1.000.000 Einwohnern macht die akute myeloische Leukämie, kurz AML, 20% der Blutkrebserkrankungen im Kindesalter aus. Pro Jahr wird in Deutschland bei etwa 120 bis 150 Kindern eine AML diagnostiziert (Yiallourous and Creutzig, 2012). Als Ursache der Leukämie gelten genetische Ereignisse in einem Zellklon (Bonnet and Dick, 1997). Externe kanzerogene Faktoren spielen eine

untergeordnete Rolle bei der Leukämogenese. Selten tritt die AML in Zusammenhang mit einem angeborenem Syndrom wie Trisomie 21 oder einer Fanconi Anämie auf (Babushok et al., 2016). Die pädiatrischen Patienten werden in Deutschland anhand von Studienprotokollen der AML-BFM Studiengruppe therapiert (Creutzig and Reinhardt, 2022).

1.1 Akute myeloische Leukämie im Kindesalter

1.1.1 Definition und Klassifikation

Die World Health Organisation (WHO) definierte 2008 die akute myeloische Leukämie als Befall des Knochenmarks mit $\geq 20\%$ neoplastischen Blasten. Für die AML mit den Translokationen t(15;17), t(8;21) oder t(16;16) sowie für die Inversion inv(16) reicht alleine ihre gesicherte genetische Abnormität für die Diagnose aus. Gleiches gilt für das Vorliegen des Down-Syndroms (Vardiman et al., 2009). Da die akute myeloische Leukämie vor allem eine Erkrankung ist, die mit zunehmendem Alter auftritt, bezieht sich die WHO Klassifikation fast ausschließlich auf Studien mit Erwachsenen. Die meisten Abnormitäten treten ebenfalls im Kindesalter auf, jedoch variiert im Vergleich zu den Erwachsenen die Häufigkeitsverteilung der zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderung (Sandahl et al., 2015). Sandahl et al. publizierten 2015, dass die WHO-Klassifikation nur eingeschränkt auf die pädiatrische AML übertragbar sei. Nicht alle Kinder konnten den richtigen Klassifikationsgruppen zugeordnet werden. Zudem wurden weitere rezidivierende Aberrationen als eigenständige Entitäten bei der pädiatrischen AML erkannt und sollten in einer relevanten Klassifikation der pädiatrischen AML berücksichtigt werden. Die Abgrenzung des myelodysplastischen Syndroms von der akuten myeloischen Leukämie ist im Kindesalter nicht ausreichend definiert (Locatelli and Strahm, 2018). Trotz allem gewinnt die überarbeitete Ausgabe der WHO-Klassifikation, welche 2016 publiziert wurde, immer mehr an Bedeutung in der Einteilung der pädiatrischen AML. Anhand von sieben Untergruppen wird die akute myeloische Leukämie eingeteilt (Arber et al., 2016).

Tabelle 1.1: 2016 WHO-Klassifikation der AML (Arber et al., 2016)

AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Anomalien	<p>AML mit t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></p> <p>AML mit inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></p> <p>APL (Akute Promyelozytenleukämie) mit t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i></p> <p>AML mit t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A2</i></p> <p>AML mit t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i></p> <p>AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2</i>, <i>MECOM</i> AML (megakaryoblastär) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i></p> <p><i>Vorläufige Entität: AML mit BCR-ABL1</i></p> <p>AML mit mutiertem <i>NPM1</i></p> <p>AML mit biallel mutiertem <i>CEBPA</i></p> <p><i>Vorläufige Entität: AML mit mutiertem RUNX1</i></p>
Akute myeloische Leukämie mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	
Therapiebedingte myeloische Neoplasien	
Akute myeloische Leukämie ohne weitere Kategorie (not otherwise specified, NOS)	<p>AML mit minimaler Differenzierung (FAB M0)</p> <p>AML ohne Ausreifung (FAB M1)</p> <p>AML mit Ausreifung (FAB M2)</p> <p>Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4)</p> <p>Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie (FAB M5a, b)</p> <p>Reine Erythroleukämie (FAB M6)</p> <p>Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7)</p> <p>Akute Basophilenleukämie</p> <p>Akute Panmyelosis mit Myelofibrose</p>
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Proliferationen bei Morbus Down	<p>Transient abnormale Myelopoese (Syn.: Transientes myeloproliferatives Syndrom) myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom (ML-DS)</p>
Akute Leukämien mit unklarer Linienzugehörigkeit	<p>Akute undifferenzierte Leukämie</p> <p>Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp (MPAL) mit t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>⁴ MPAL mit (v;11q23.3); <i>KMT2A</i>-Rearrangement</p> <p>MPAL, B/myeloisch, NOS</p> <p>MPAL, T/myeloisch, NOS</p> <p><i>Vorläufige Entität: Natural killer (NK) Zell lymphoblastische Leukämie/Lymphom</i></p>

2022 wurde eine überarbeitete Version der WHO-Klassifikation veröffentlicht. In dieser Version wurde der Fokus auf die genetische Klassifizierung der AML gerichtet. Die rein morphologische Einteilung verlor demnach in der neuen Veröffentlichung an Bedeutung. Für einige genetische Anomalien wurde außerdem das Vorhandenseins von $\geq 20\%$ neoplastischen Blasten im Knochenmark als Definitionskriterium aufgehoben (Khoury et al., 2022). In dieser Arbeit wurde die WHO Klassifikation von 2016 vorrangig berücksichtigt.

Einleitung

Ein weiteres System, um die akute myeloische Leukämie einzuteilen ist die French-American-British Klassifikation (FAB-Klassifikation). 1976 wurde sie von Hämatopathologen aus Frankreich, den Vereinigten Staaten und Großbritannien erstellt. Sie bezieht sich, anders als die WHO-Klassifikation, nur auf die zytomorphologische Ausprägung der AML (Bennett et al., 1976). Ein Großteil der FAB-Klassifikation wurde in die Gruppe der akuten myeloischen Leukämie ohne weitere Kategorie (NOS) übernommen:

- FAB M0: Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung
- FAB M1: Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung
- FAB M2: Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung
- FAB M3: Akute Promyelozyten-Leukämie
- FAB M4: Akute myelomonozytäre Leukämie
- FAB M5a: Akute Monoblasten-Leukämie
- FAB M5b: Akute Monozyten-Leukämie
- FAB M6: Akute Erythroleukämie
- FAB M7: Akute Megakaryoblasten-Leukämie

In der ursprünglichen Fassung wurden zunächst die Typen M1-M6 beschrieben (Bennett et al., 1976). Einige Jahre später folgten die Typen M7 und M0 (Bennett et al., 1985, 1991). Die morphologische Einteilung der Leukämie hat in der Veröffentlichung der WHO lediglich einen untergeordneten Stellenwert (Khoury et al., 2022).

1.1.2 Klinik und Diagnostik

Die initialen Symptome der Patienten sind häufig Blässe, Müdigkeit, Abgeschlagenheit, petechiale Blutungen und Infektneigung. Ursache dafür ist vor allem die Verdrängung der physiologischen Blutbestandteile (v. Stackelberg et al., 2016). Bei fortgeschrittenen Leukämien oder hoher Blastenlast können auch Lymphknotenschwellungen, Hepatosplenomegalie oder Gingivahyperplasien auftreten. Das Blutbild der Patienten weist meist eine Anämie, eine Thrombozytopenie und eine Leukozytopenie auf (Creutzig et al., 2019).

Einleitung

Um eine akute myeloische Leukämie zu diagnostizieren, bedarf es einer morphologischen Untersuchung mit Zytochemie, einer Immunphänotypisierung, einer Karyotypisierung, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und spezifischer Molekulargenetik. Die Untersuchungen werden an Knochenmarkaspirationen durchgeführt. Sofern der Zustand des Patienten es nicht ermöglicht eine Knochenmarksbiopsie durchzuführen, können die ersten Tests an peripheren Blutproben durchgeführt werden. Zudem muss durch eine Lumbalpunktion ein Befall des zentralen Nervensystems (ZNS) ausgeschlossen werden. Falls mehr als $5 \times 10^6/l$ Leukozyten im Liquor vorhanden sind, gilt der Patient als ZNS-positiv und wird anhand eines ergänzenden Therapieschemas behandelt (Creutzig et al., 2012a).

Das Ziel der **morphologischen Untersuchung** ist, den Diagnoseverdacht zu verifizieren oder zu falsifizieren. Sobald eine akute Leukämie vorliegt, ist es darüber hinaus möglich, diese anhand der FAB-Klassifikation genauer zu definieren. Lediglich die AML M0 und die AML M7 müssen mittels Immunphänotypisierung bestätigt werden (Bennett et al., 1991). Das myelodysplastische Syndrom (MDS) lässt sich oftmals nicht eindeutig von der akuten myeloischen Leukämie abgrenzen. Das MDS zeichnet sich durch eine gestörte Hämatopoese mit Dysplasien aus. Aus dem MDS kann eine sekundäre AML resultieren (Arber et al., 2016). Die genaue Unterscheidung ist notwendig, da das MDS, anders als die AML, nur durch eine Stammzelltransplantation geheilt werden kann (Locatelli and Strahm, 2018). Während bei Erwachsenen der Grenzwert für die Bestätigung der AML bei $\geq 20\%$ Blasten im Knochenmark definiert ist (Vardiman et al., 2009), ist die Abgrenzung bei Kindern nicht eindeutig festgelegt. So wird auch ein Blastenanteil von bis zu 30% in MDS mit „excess of blasts“ in Transformation toleriert (Hasle et al., 2003; Locatelli and Strahm, 2018).

Werden leukämische Blasten im Knochenmark von Kindern mit Down-Syndrom identifiziert, kann man direkt von einer myeloischen Leukämie bei Down-Syndrom (ML-DS) sprechen, unabhängig von der prozentualen Blastenzahl. Dies gilt auch, wenn die genetischen Anomalitäten $t(15;17)$, $t(8;21)$, $inv(16)$, oder $t(16;16)$ festgestellt werden (Vardiman et al., 2009).

Einleitung

Um die akute myeloische Leukämie von der akuten lymphatischen Leukämie sicher unterscheiden zu können, wird die **Immunphänotypisierung** durchgeführt. Die Immunphänotypisierung ist ebenfalls notwendig, um die AML M0 und AML M7 zu identifizieren (Bennett et al., 1991). Die wichtigen Oberflächenmarker, um die AML zu diagnostizieren und einer Abstammungslinie zuzuordnen, sind CD34, CD117, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD64, CD65, i(intrazellulär)MPO, i-lysozyme, CD41, and CD61; and for MPAL: CD19, iCD79a, iCD22, CD10, und iCD3 (Bene et al., 1995; Vardiman et al., 2009). Darüber hinaus sind im Gegensatz zu der AML im Erwachsenenalter die Marker CD184 (CXCR4), CD2, CD7, CD19, CD56 CD11a, CD45 auch bei der pädiatrischen AML von diagnostischer und therapeutischer Relevanz (Dohner et al., 2017).

Um die Therapie optimal planen zu können, ist es wichtig, eine **Karyotypisierung** durchzuführen. Dafür verwendet man zytogenetische Methoden und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Anhand der Translokationen kann man prognostische Aussagen treffen. Mit diesen Informationen werden die Patienten einer Behandlungsgruppe (prognostisch günstig, intermediär, prognostisch ungünstig) zugeordnet. Die Fusionsgene RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11, PML-RARA und MLL-Rearrangements sollten bei der Diagnostik berücksichtigt werden (Creutzig et al., 2012a).

Neben der Zytogenetik spielt die **Molekulargenetik** eine entscheidende Rolle bei der Risikostratifizierung der Patienten. Es gibt Hypothesen, dass zwei Klassen von Mutationen gemeinsam auftreten müssen, um eine AML auszulösen. Typ I Mutationen sind Mutationen, die die Proliferation induzieren. Bei den Typ II Mutationen wird ein Reifungsstopp generiert (Gilliland, 2002). Da die Mutationen FLT3-ITD, WT1, C-KIT, CEBPA (Doppelmutation) und NPM1 eine hohe prognostische und therapeutische Relevanz haben, sollten diese routinemäßig mittels Real Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) untersucht werden (Creutzig et al., 2012a).

1.1.3 Risikostratifizierung

Aufgrund der zytogenetischen und molekulargenetischen Charakteristika werden die Patienten einer Risikogruppe zugeordnet. Die Risikostratifizierung bestimmt den

Einleitung

Therapieplan der Kinder. Unterschieden werden die Standardrisikogruppe, mit einer günstigen Prognose, die Intermediäre Risikogruppe und die Hochrisikogruppe, welche die ungünstige Prognose hat. Die Einteilung in die Gruppen geschieht anhand des AML BFM Protokolls 2012 (Creutzig and Reinhardt, 2022):

Zu der **Standardrisikogruppe (SR)** gehören Inv(16)(p13.1q22), t(16;16)(p13.1;q22), t(15;17)(q22;q21), t(8;21)(q22;q22), t(1;11)(q21;q23), normaler Karyotyp (CN-AML) mit NPM1-Mutationen und ein normaler Karyotyp mit CEBPA (Doppelmutation). Der Nachweis einer FLT3-ITD/TDK Fusion bei einer AML t(8;21) oder inv(16) führt zur Stratifizierung in die intermediäre Risikogruppe.

In der **Intermediären Risikogruppe (IR)** befinden sich alle Patienten einer de-novo AML, die weder zu der Standardrisiko- noch zu der Hochrisikogruppe zugeordnet werden können.

Die **Hochrisikogruppe (HR)** beinhaltet die Monosomie 7, eine 12p-Aberration, einen komplexen Karyotyp mit mehr als drei Aberrationen, mindestens einer strukturellen Aberration und keiner rekurrenten Translokation, die Translokationen t(3;3)(q21;q26.2), t(6;9)(p23;q34), t(7;12)(q36;p13), t(4;11)(q21;q23), t(5;11)(q35;p15.5), t(6;11)(q27;q23), t(10;11)(p12;q23), t(9;22)(q34;q11.2) und die Mutation WT1mut/FLT3-ITD.

In einer letzten Therapiegruppe werden alle Patienten zusammengefasst, deren genetische Anomalität besondere Anforderungen bedeutet oder welche anhand von abweichenden Therapieplänen behandelt werden müssen. Zu dieser Gruppe gehören die AML-FAB M6 und die AML mit isolierter Monosomie 7. Die AML FAB M7 und GATA1 Mutation wird anhand des ML-DS Therapieprotokolls behandelt.

1.1.4 Therapie

Um das Gesamtüberleben der an akuter myeloischer Leukämie erkrankten Kinder zu steigern, wurde 1978 die AML-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) Studiengruppe gegründet. Die entwickelten Therapieprotokolle wurden an das Therapieschema der ALL angelehnt. Durch optimierte nachfolgende Therapiestudien konnte die 5

Einleitung

Jahresüberlebensrate von 10% (vor Beginn der Studien) auf mittlerweile über 80% (Stand 2013) verbessert werden (Creutzig et al., 2013).

Die Studie, **AML-BFM 2012**, ist eine multizentrische Studie mit Kliniken aus Deutschland, Österreich, Schweiz, Slowakei und der Tschechischen Republik. Die in dieser Arbeit untersuchte Patientenkohorte wurde anhand des AML-BFM Studienprotokoll von 2012 behandelt. Die Hauptstudienziele sind die Verbesserung des ereignisfreien Überlebens von Kindern und Jugendlichen mit AML, die Verringerung der Therapietoxizität und die Verbesserung der Lebensqualität, ohne die Prognose zu verschlechtern (Creutzig and Reinhardt, 2022). Patienten, die die Ausschlusskriterien erfüllen, werden nicht anhand des Studienprotokolls therapiert, sondern erhalten eine alternative Therapie. Bei Kindern mit einer Leukämiezellzahl über 50.000/ μl oder einer erheblichen Organvergrößerung wird eine Vortherapie mit Cytarabin (40 mg/ m^2/d) durchgeführt. Die vollständige Referenzdiagnostik findet im AML-Referenzlabor des Uniklinikums Essen statt (Creutzig and Reinhardt, 2022).

Abbildung 1.1 zeigt das Therapieschema, das in dem Studienprotokoll der AML-BFM 2012 Studie festgelegt wurde. Die folgende Erklärung bezieht sich ausschließlich auf dieses Protokoll (Creutzig and Reinhardt, 2022).

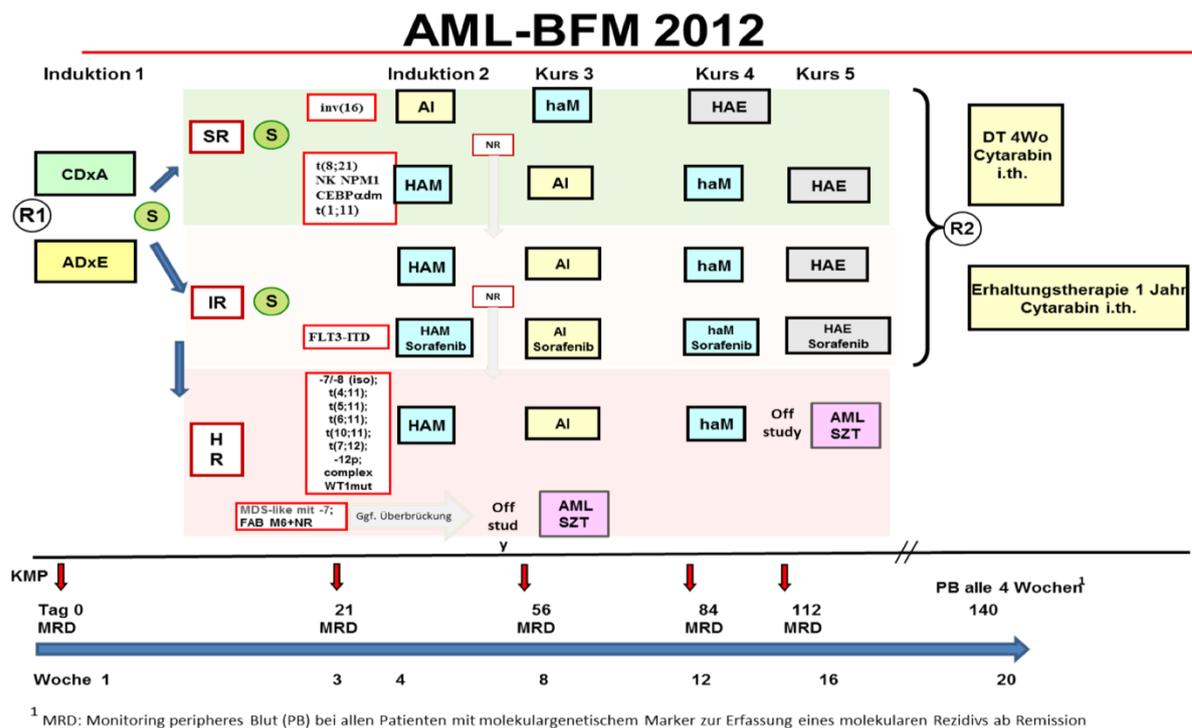


Abbildung 1.1: Behandlungsschema der AML-BFM Studie 2012 (Creutzig and Reinhardt, 2022), Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Alle Studienpatienten erhalten randomisiert die achttägige **1. Induktion** ADxE oder CDxA. Die ADxE-Induktion enthält Cytarabin, Daunorubicin und Etoposid. Im Gegensatz dazu beinhaltet die CDxA-Induktion zwar ebenfalls Cytarabin und Daunorubicin, dieses Mal jedoch kombiniert mit Clofarabin, einer Weiterentwicklung von Cytarabin. Alle Studienpatienten bekommen am ersten und am achten Tag der Induktion eine Lumbalpunktion, bei welcher sie jeweils Cytarabin, Methotrexat und Prednisolon intrathekal injiziert bekommen.

Anhand der ermittelten Tumorcharakteristika erfolgt die Risikostratifizierung und die Zuordnung in den jeweiligen Therapiearm, so dass an Tag 21 die **2. Induktion** beginnt. Die Standardrisikogruppe mit Ausnahme der Inv(16), die Intermediäre Risikogruppe mit Ausnahme der FLT3-ITD Mutation und die Hochrisikogruppe erhalten die HAM-Induktion. Zu diesem viertägigen Zyklus gehören Hochdosis-Cytarabin (HD-Cytarabin), Mitoxantron und eine intrathekale Cytarabingabe. Bei dem Nachweis einer FLT3-ITD Fusion erhalten die Patienten eine HAM-Induktion gepaart mit einer anschließenden zusätzlichen Sorafenibgabe für 14 Tage. Patienten mit einer Inv(16) erhalten eine AI-

Einleitung

Induktion, bestehend aus Cytarabin, Idarubicin und einer intrathekalen Gabe von Cytarabin, Methotrexat und Prednisolon.

Der **3. Kurs** beginnt vier Wochen nach der 1. Induktion. Die Studienteilnehmer, die zuvor eine HAM-Induktion erhalten haben, werden nun mit einer AI-Induktion therapiert. Die Intermediäre Risikopatientengruppe mit FLT3-ITD erhält zusätzlich zur AI-Induktion wieder anschließend für 14 Tage Sorafenib. Lediglich die Standardrisikopatientengruppe mit Inv(16) erhält bereits den Konsolidierungsblock haM. Zu diesem gehört HD-Cytarabin, Mitoxantron und eine einmalige intrathekale Cytarabingabe.

Im **4. Kurs** erhalten die Studienteilnehmenden, die die AI-Induktion erhalten haben, vier Wochen später den Konsolidierungsblock haM. FLT3-ITD Patienten erhalten zusätzlich erneut die Sorafenibgabe. Inv(16) Patienten erhalten drei bis vier Wochen nach haM den Re-Intensivierungsblock HAE, bestehend aus HD-Cytarabin, Etoposid und einer intrathekalen Cytarabingabe.

Für die Standardrisikogruppe, mit Ausnahme der Inv(16), und die Intermediäre Risikogruppe folgt drei bis vier Wochen nach dem Konsolidierungsblock haM der **5. Kurs**, der Re-Intensivierungsblock HAE. FLT3-ITD Patienten erhalten zusätzlich erneut die Sorafenibgabe. Alle Patienten, die den Re-Intensivierungsblock erhalten haben, werden erneut randomisiert und in die zwei Gruppen „Erhaltungstherapie lang“ und „Erhaltungstherapie kurz“ eingeteilt.

Die **kurze Erhaltungstherapie** wird vier Wochen nach Beendigung des Re-Intensivierungsblocks begonnen. Die Patienten erhalten für drei Tage HD-Cytarabin. Danach folgt vier Wochen täglich eine Thioguanin Gabe per os. Zusätzlich erhalten die Patienten in den ersten vier Tagen der vierten Woche eine subkutane Gabe von Cytarabin. In der fünften, der siebten und der neunten Woche der kurzen Erhaltungstherapie erfolgt zudem jeweils eine einmalige intrathekale Cytarabin, Methotrexat und Prednisolon Gabe.

Die Patienten, die der **langen Erhaltungstherapie** zugeordnet werden, nehmen für ein Jahr eine tägliche Thioguanin Gabe per os ein. Im Abstand von vier Wochen erhalten die

Einleitung

Kinder an vier aufeinanderfolgenden Tagen eine subkutane Cytarabindosis. In der ersten, der dritten, der fünften und der siebten Woche der langen Erhaltungstherapie erhalten die Studienpatienten zudem einmalig eine intrathekale Cytarabin, Methotrexat und Prednisolon Gabe.

Nach der initialen Knochenmarkaspiration folgen an den Tagen 21, 56, 84 und 112 erneute Knochenmarkaspirationen, um die Blastenzahl zu bestimmen. Im Abstand von vier Wochen wird zudem peripheres Blut entnommen und ebenfalls untersucht. Ziel der Untersuchungen ist es, die messbare (minimale) Resterkrankung (MRD) auszuschließen.

Die **komplette Remission (CR)** muss spätestens nach Ende der Intensivierung durch HAE erreicht sein. Es dürfen nur weniger als 5% Blasten im normozytären Knochenmark nachweisbar sein. Extramedullär und im ZNS dürfen keine Blasten zu finden sein. Im peripheren Blut müssen sich $>1.000/\mu\text{l}$ Granulozyten und $>80.000/\mu\text{l}$ Thrombozyten befinden. In **Remission mit partieller Regeneration (CRp)** sind Patienten, bei denen mehr als 5% Blasten im normozytären Knochenmark zu finden sind und bei denen im peripheren Blut $>1.000/\mu\text{l}$ Leukozyten, $>500/\mu\text{l}$ Granulozyten und $>50.000/\mu\text{l}$ Thrombozyten nachweisbar sind. Mindestens vier Wochen anhaltende CRp wird als CR gewertet. **Nonresponder (NR)** erreichen die CR-Kriterien bis Ende der Intensivierung mittels HAE nicht. Andere Kriterien, um als NR eingestuft zu werden, sind der Nachweis von $\geq 10\%$ Blasten nach der 2. Induktion, mindestens vier Wochen anhaltende Aplasie nach der 2. Induktion oder Verlassen des Therapieprotokolls nach der 2. Induktion. Eine Reinfiltration des Knochenmarks mit $\geq 5\%$ eindeutigen Blasten oder Blasteninfiltration an anderer Stelle nach vorhergegangener CRp oder CR für mindestens vier Wochen gilt als **Rezidiv**. Die kumulative Inzidenz für ein Nichtansprechen auf die Therapie beträgt aktuell 12.3% und die eines Rezidivs beträgt 25.1% (Rasche et al., 2018).

Eine **Allogene Stammzelltransplantation (alloSZT)** ist für manche Patienten unerlässlich. Nonresponder und Patienten, die der Hochrisikogruppe zugeordnet sind und eine ungünstige Prognose haben, erhalten nach dem 4. Kurs eine alloSZT (Reinhardt et al., 2012).

Einleitung

2020 wurde eine überarbeitete Version des Studienprotokolls herausgebracht. Unter anderem erhalten die Patienten zu Beginn ein neues Medikament, CPX-351, Vyxeos. Das Kombinationspräparat aus liposomalem Daunorubicin und Cytarabin soll die zytostatische Wirksamkeit verbessern und gleichzeitig organprotektiv wirken (Creutzig and Reinhardt, 2022). Die in dieser Arbeit untersuchten Studienteilnehmenden wurden nach dem AML BFM Protokoll 2012 therapiert.

1.2 Cytarabin

Seit 1978 ist das Zytostatikum Cytarabin (1- β -D-Arabinofuranosyl-Cytosin, Ara-C) die wichtigste Substanz in der Behandlung der pädiatrischen akuten myeloischen Leukämie in Deutschland Creutzig et al. (2005). Es handelt sich dabei um ein Strukturanalogon von Cytidin und Desoxycytidin. Der Unterschied zwischen Cytarabin und Cytidin ist in Abbildung 1.2 dargestellt und besteht in der 2'-OH Gruppe, die bei Cytarabin in die entgegengesetzte Richtung zeigt (Rechkoblit et al., 2019).

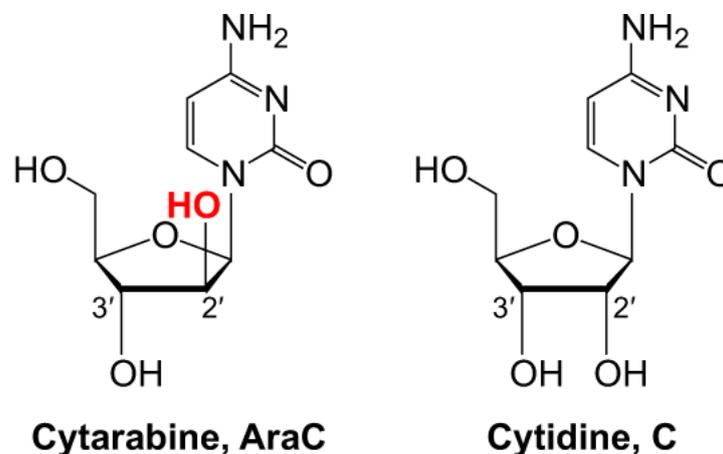


Abbildung 1.2: chemische Struktur von Cytarabin und Cytidin (Rechkoblit et al., 2019)

1.2.1 Stoffwechsel und Wirkungsmechanismus

Der Stoffwechselweg des Ara-Cs wird in Abbildung 1.3 dargestellt. Durch spezifische Nucleosid-Membrantransporter wird das intravenös gegebene Ara-C in die Zellen aufgenommen. Dabei unterscheidet man einen äquilibrierenden von einem konzentrativen Transport. Der human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) ist

Einleitung

ein Transporter, der einen äquilibrierenden Transport von Ara-C in die Zelle ermöglicht. In hoher Dosis gelangt das Zytostatikum durch erleichterte Diffusion in die Zellen (Cros et al., 2004). Den Hauptanteil des nach intrazellulär gerichteten Transports von Ara-C übernimmt jedoch der Carrier solute carrier family 29 member 1 (SLC29A1) (Wiley et al., 1982).

Intrazellulär erfolgt die dreifache Phosphorylierung des Ara-Cs, welche durch das Schrittmacher-Enzym Desoxycytidin-Kinase (DCK) aktiviert wird. DCK phosphoryliert Ara-C zu Ara-Cytidinmonophosphat (CMP). CMP wird durch die Nucleosid-Monophosphatkinase (NMPK) zu Ara-CDP, welches im weiteren Verlauf durch die Nucleosid-Diphosphatkinase (NDPK) zu Ara-Cytidintriphosphat (CTP) phosphoryliert wird (Boos, 1992; Cros et al., 2004).

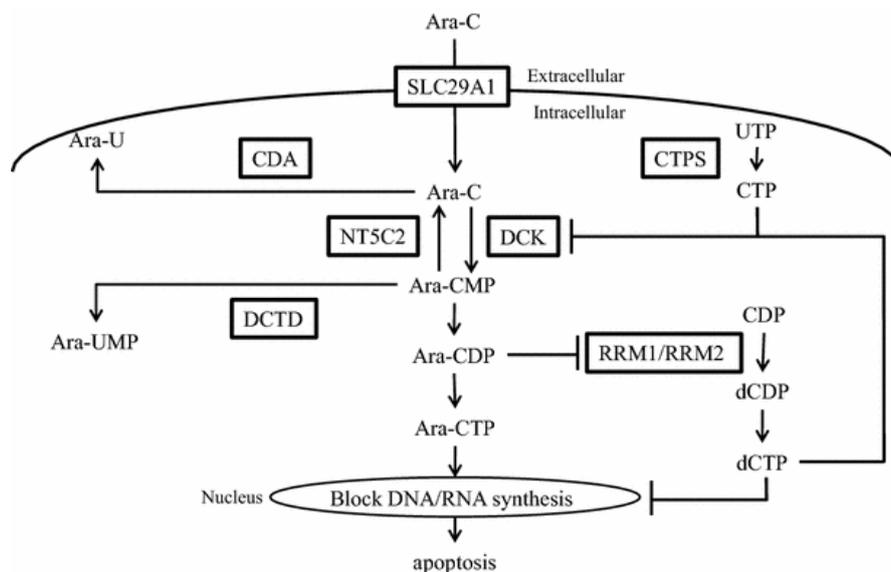


Abbildung 1.3: Stoffwechselweg von Cytarabin (Amaki et al., 2015)

Ara-CTP wirkt über zwei Mechanismen zytotoxisch. Zum einen wird die Desoxyribonukleinsäure (DNA) -Polymerase 3 inhibiert. In Studien wurde jedoch bewiesen, dass das Zytostatikum nur ein schwacher kompetitiver Inhibitor ist (Momparler, 1982). Die Hauptwirkung besteht in dem Abbruch der Replikation. Ara-CTP und sein Analogon CTP konkurrieren während der Replikation um den Einbau in den neu entstehenden DNA-Strang. Die Bindungsaffinität der beiden Substrate ist ähnlich (Momparler, 1982). Sobald Ara-CTP anstelle von CTP in den Strang eingebaut wird, kommt es zum Abbruch der DNA-Synthese.. Außerdem wird in hohen Cytarabindosen

Einleitung

die intranukleosomale DNA-Fragmentierung induziert und somit die Apoptose der Zelle eingeleitet (Gunji et al., 1991).

Die Aktivität von Cytarabin wird jedoch durch seine rasche Desaminierung durch Cytidin-Desaminase (CDA) zu einem biologisch inaktiven Metaboliten 1- β -D-Arabinofuranosyluracil (Uracil-Arabinosid, Ara-U) vermindert. Ara-CMP kann durch die 5'-Nukleotidase II (NT5C2) oder durch Desoxycytidylat-Desaminasen (DCTD) inaktiviert werden (Hamada et al., 2002).

1.2.2 Resistenzen

Eine Arzneimittelresistenz resultiert vor allem aus einer verminderten intrazellulären Ara-C Konzentration. Diese kann multiple Ursachen haben. Die intrazelluläre Konzentration von Ara-C korreliert mit dem Untergang der klonalen Blasten (Kufe et al., 1980).

In Studien, in denen ein hENT1 Transporter Mangel induziert wurde, konnte eine signifikante Resistenz der Zellen gegenüber Ara-C festgestellt werden (White et al., 1987). Ein Mangel an dem Schrittmacher-Enzym Desoxycytidin-Kinase führt ebenfalls zu einem geringeren Ansprechen auf das Zytostatikum, da Ara-C in der unphosphorylierten Form nicht in die Replikation eingreifen kann (Cros et al., 2004).

Als weitere Ursache wird der erhöhte intrazelluläre Abbau von Cytarabin durch die vermehrte Expression von Enzymen, wie zum Beispiel Cytidin-Deaminase oder 5'-Nukleotidase diskutiert (Cros et al., 2004).

Da Ara-CTP und CTP um den Einbau während der Replikation konkurrieren, führt ein erhöhter intrazellulärer Cytidinspiegel ebenfalls zu einer scheinbaren Arzneimittelresistenz (Momparler, 2013).

1.3 SAMHD1

1.3.1 Struktur und Eigenschaften

Das Sterile Alpha Motif and Histidine-Aspartic acid domain containing protein 1 (SAMHD1) ist eine Desoxynukleotid-Triphosphat (dNTP)-Hydrolase, die erst vor rund 20 Jahren in dendritischen Zellen entdeckt wurde (Li et al., 2000). Das Enzym katalysiert die Hydrolyse von dNTP in Nukleosid und anorganischem Triphosphat. SAMHD1 wird aus 626 Aminosäuren gebildet und besteht aus einem N-terminalen sterilen Alpha-Motiv (SAM) und einer Histidin-Asparaginsäure enthaltenden Domäne (HD) (Mauney and Hollis, 2018). SAM ist beteiligt an der Protein-Protein und an der Protein-DNA-Interaktion (Qiao and Bowie, 2005). Die HD-Domäne bildet mit seiner Hydrolaseaktivität das katalytische Zentrum des Enzyms und besteht aus einem Magnesium-Ion (Mg^{2+}) und vier Histidin- und Asparaginsäureresten (Aravind and Koonin, 1998).

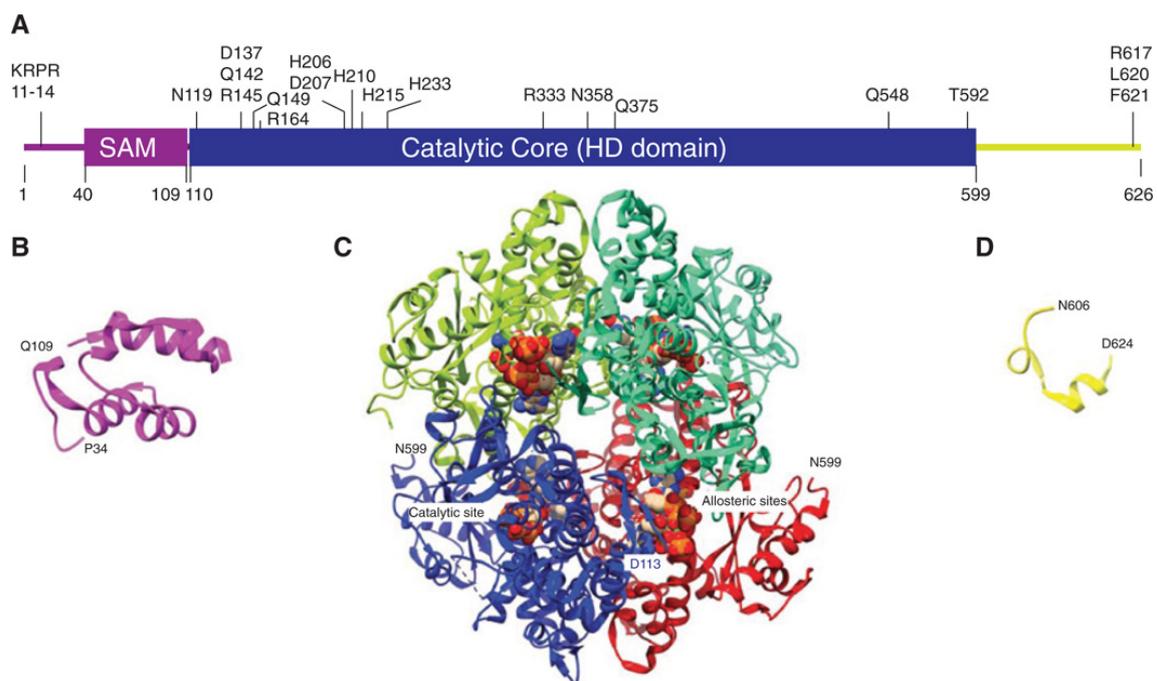


Abbildung 1.4: Struktur von SAMHD1: Tetramerisiertes SAMHD1 bestehend aus der SAM Einheit (violette) und der HD Domäne (blau)(Ahn, 2016)

Zur Aktivierung des Enzyms müssen SAMHD1-Monomere tetramerisiert werden. Die Monomere haben jeweils zwei discrete regulatory sites (RS1 und RS2). Bei einem niedrigen intrazellulären NTP-Spiegel ist SAMHD1 in einem Monomer-Dimer-

Einleitung

Gleichgewicht. Guanosintriphosphat (GTP) hat die größte Affinität zu der RS1 Bindungsstelle. Das Gleichgewicht verschiebt sich auf die Dimer-Konformation, wenn GTP an die RS1-Einheit bindet. Erhöht sich der intrazelluläre NTP-Spiegel, so wird auch die zweite Regulationsseite, RS2, besetzt. Die Affinität zu RS2 ist bei allen NTPs in etwa die Gleiche. Zwei SAMHD1-Dimere lagern sich zu einem katalytisch aktivem tetramerschen Holoenzym an, in welchem vier GTPs und vier weitere NTPs gebunden sind. Das Substrat, welches durch aktiviertes SAMHD1 abgebaut wird, dient gleichzeitig als Aktivierungsligand. So kann das Enzym kleinste interzelluläre Konzentrationsschwankungen erkennen und durch Hydrolyse die NTPs in einem physiologischen Rahmen halten (Mauney and Hollis, 2018).

Eine weitere Eigenschaft, die SAMHD1 zugeschrieben wird, ist die Bindung von Nucleinsäuren. Die größte Affinität hat das Enzym zu einzelsträngigen Nucleinsäurepolymeren (ssNAs), vor allem zu einzelsträngigen Ribonucleinsäurepolymeren (ssRNAs). Durch die Bindung eines Nucleinsäurepolymers an SAMHDs, verbleibt das Protein als katalytisch inaktives Monomer in der Zelle (Seamon et al., 2015). Ein umstrittener Befund ist die Exonukleaseaktivität, die SAMHD1 auf die ssRNA und ssDNA haben soll. Dieser Effekt konnte von einigen Arbeitsgruppen aber nicht nachgewiesen (Beloglazova et al., 2013).

2017 veröffentlichten Daddacha et al. erstmalig, dass SAMHD1 durch seine Fähigkeit Nucleinsäuren zu binden, eine Rolle bei DNA-Reparaturmechanismen spielen könnte (Daddacha et al., 2017).

1.3.2 Regulierung und Expression

SAMHD1 wird in nahezu allen Geweben und Zellen des menschlichen Körpers exprimiert. Eine hohe Konzentration des Proteins wird vor allem in myeloischen und lymphatischen Zellen nachgewiesen (Schmidt et al., 2015). In anderen Zellen, wie zum Beispiel Fibroblasten, ist das Expressionslevel von SAMHD1 abhängig von der Aktivität der Zelle. In ruhenden Zellen steigt die Konzentration an, während der NTP-Pool abnimmt. In Zellen, die mitotisch aktiv sind, sinkt der Konzentrationsspiegel (Franzolin et al., 2013). Diese Beobachtung lässt sich durch die posttranslationale Phosphorylierung

Einleitung

der Aminosäure Threonin 592 durch Cyclin A2-Cyclin-dependent kinases (CKD) 1/2 erklären. Während der S-Phase der Mitose wird so die Hydrolyse von NTPs durch SAMHD1 herunterreguliert (Yan et al., 2015).

Durch die Methylierung der Promotorregion des *SAMHD1*-Gens wird die Expression des Proteins heruntergefahren (de Silva et al., 2014). Die Hochregulation der Transkription und Translation wird durch die Anwesenheit von den Zytokinen Interleukin 12 und Interleukin 18, sowie durch Typ 1 Interferon (INF1) ausgelöst. Ein weiterer wichtiger regulatorischer Faktor ist Interferon regulatory factor 3 (IRF3). IRF3 wird durch intrazelluläre virale pathogene Strukturen aktiviert und bindet an den SAMHD1-Promotor. Die Bindung von IRF3 an eine Bindungsstelle des Promotors von SAMHD1 reicht aus, um die Expression zu steigern (Yang et al., 2016).

1.3.3 Funktion

Aufgrund der vorangegangenen Informationen über SAMHD1 und dessen Regulation lassen sich zwei Hauptfunktionen herausarbeiten. SAMHD1, in den meisten menschlichen Zellen vorkommend, ist durch seine Hydrolaseaktivität ein wichtiger Bestandteil des Nukleotidstoffwechsels. Durch die Integration der unzähligen transkriptionellen, translatorischen und post-translationalen Regulationsmechanismen wird die SAMHD1-Aktivität so kalibriert, dass sie den genauen Stoffwechselbedarf der spezifischen Zellzyklusphase erfüllt. Die präzise Aktivierung durch dNTPs ermöglicht eine genaue Regulierung des intrazellulären NTP-Pools (Mauney and Hollis, 2018). Es konnte belegt werden, dass das Protein einen Einfluss auf die Wachstumskinetik von Zelllinien haben kann (Bonifati et al., 2016).

Ursprünglich identifiziert wurde SAMHD1 in Zusammenhang mit seiner Funktion im angeborenen Immunsystem. Die Induktion der Hochregulierung des Proteins durch IRF3 gehört zu der frühen intrinsischen Immunantwort einer Zelle. In sich nicht teilenden hämatopoetischen Zellen liegt SAMHD1 im dephosphorylierten Zustand vor. Die Zellen, die diese Fähigkeit besitzen, können eine Infektion mit dem human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) begrenzen. HIV-2 besitzt das virulence accessory protein (vpx), welches dem HIV-Restriktionsfaktor SAMHD1 entgegenwirkt. Aufgrund

Einleitung

von vpx können sich mit Typ 2 HI Viren befallenen hämatopoetische Zellen uneingeschränkt transduzieren (Laguette et al., 2011). Die katalytische Hydrolasefunktion von SAMHD1 reduziert den NTP-Pool, der für die virale DNA-Polymerase oder reverse Transkriptase in HIV-1 essenziell ist, um die virale DNA zu replizieren und in das Genom der Wirtszelle einzubauen (Kim et al., 2012a; Lahouassa et al., 2012). SAMHD1 hat nicht nur einen Effekt auf die Infektionsabwehr von HIV, sondern auch auf anderen Retroviren. Unter anderem wurde die Restriktion des Herpes Simplex Virus 1 (HSV1) (Kim et al., 2013) und des Hepatitis B-Virus von SAMHD1 beeinflusst (Sommer et al., 2016).

1.3.4 Mutationen

Die Wichtigkeit von SAMHD1 für den Organismus wird deutlich, wenn das Protein durch Mutationen verändert wird oder ausfällt. Typ-I-Interferonopathie-Aicardi-Goutieres-Syndrom (AGS) ist eine genetisch bedingte Autoimmunerkrankung. Unter anderem Mutationen in dem Gen, das für *SAMHD1* kodiert, werden als Ursache gehandelt (Plander and Kalman, 2016). AGS weist viele Ähnlichkeiten zu dem systemischen Lupus erythematoses auf. Merkmale der Erkrankung sind unter anderem Enzephalopathie, Leukodystrophie, Verkalkungen der Basalganglien, psychomotorische Retardierung und Liquorlymphozytose (Ravenscroft et al., 2011). Die intrazelluläre Nukleinsäurekonzentration ist durch den mangelnden Abbau durch SAMHD1 chronisch erhöht. Dadurch wird der Befall durch Pathogene imitiert und das körpereigene Immunsystem induziert die Apoptose der Zellen.

Der unausgewogene NTPs-Pool, der aus einer SAMHD1 Mutation resultiert, kann zu einer genetischen Instabilität führen (Mathews, 2015). Neue Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen der Kanzerogenese verschiedener Krebsentitäten und SAMHD1-Mutationen. Vor allem in dem Genom der Blasten der chronisch lymphatischen Leukämie wurden vielzählige SAMHD1-Mutationen nachgewiesen (Clifford et al., 2014).

2 Fragestellungen

Cytarabin, ein Nukleosidanalogen, ist das Mittel der Wahl, um die akute myeloische Leukämie im Kindes- und Erwachsenenalter zu behandeln. Durch die Evaluation und Weiterentwicklung des AML-BFM Behandlungsprotokolls konnte die Überlebenswahrscheinlichkeit der an AML erkrankten Kinder deutlich verbessert werden. Trotzdem gibt es unter den behandelten Kindern 13% Nonresponder, die nicht auf die Therapie ansprechen (Rasche et al., 2018).

Es wurde bewiesen, dass SAMHD1 die Wirksamkeit von Zytostatika, welche als Nukleosidanalogen wirken, reduziert (Herold et al., 2017b). Schneider et al. postulierten 2017, dass SAMHD1 als Biomarker für das Ansprechen auf die Cytarabintherapie bei Erwachsenen mit AML fungieren kann (Schneider et al., 2017).

Ziel dieser Dissertation soll es sein, die Übertragbarkeit der bisher erlangten Informationen aus anderen Studien auf die pädiatrische akute myeloische Leukämie zu untersuchen. So ergeben sich insbesondere folgende Fragestellungen:

1. Wie stellt sich die SAMHD1 Expression in verschiedenen myeloischen und lymphatischen Zelllinien dar? Welche Gemeinsamkeiten lassen sich zwischen den AML-Zelllinien und den Patientenproben finden?
2. Gibt es Unterschiede in der SAMHD1 Expression zwischen den pädiatrischen Patienten? Können bestimmte Verteilungsmuster in der SAMHD1 Expression entdeckt werden? Besteht ein linearer Zusammenhang zwischen einer Variablen und der SAMHD1 Expression?
3. Beeinflussen die Variablen Geschlecht, Alter und Risikostratifizierung den Zusammenhang zwischen dem Therapieansprechen der Kinder und der SAMHD1 Expression?
4. Kann die SAMHD1 Expression als prognostischer Marker für das Therapieansprechen verwendet werden?

3 Proben, Material und Methoden

3.1 Proben

3.1.1 Zelllinien

THP1 ist eine Zelllinie aus dem peripheren Blut eines einjährigen AML-Patienten. 1980 wurde sie erstmals von Tsuchiya et al. isoliert und herangezüchtet. Der Wildtyp besitzt eine hohe Expression des Gens *SAMHD1* und wird somit als Positivkontrolle genutzt. Eine modifizierte Variante der Zelllinie, THP1 KO, in dem die Gensequenz für *SAMHD1* mittels der CRISP/Cas 9 -Methode herausgetrennt wurde, dient als Negativkontrolle.

Des Weiteren wurde HL60 als zusätzliche Negativkontrolle herangezüchtet und während der Versuche untersucht.

Außerdem wurden folgende Zelllinien auf die Expression von *SAMHD1* untersucht:

Tabelle 3.1: Zelllinien, die auf SAMHD1 untersucht werden

Zelllinie	Erkrankung	Ursprung	DSMZ Nummer
697	B-Zell-cALL	Knochenmark	ACC 42
RS4;11	B-Zell-ALL	Knochenmark	ACC 508
SEM	B-Zell-ALL	Peripheres Blut	ACC 546
BV-173	CML	Peripheres Blut	ACC 20
FKH-1	CML	Peripheres Blut	ACC 614
JURL-MK1	CML	Peripheres Blut	ACC 532
K-562	CML	Knochenmark	ACC 10
MOLM-1	CML	Knochenmark	ACC 720
NALM-1	CML	Peripheres Blut	ACC 131
Kasumi-3	AML, M0	Peripheres Blut	ACC 714
UOC-M1	AML, M1	Knochenmark	ACC 775
YNH-1	AML, M1	Peripheres Blut	ACC 692
HL-60 (Negativkontrolle)	AML, M2	Peripheres Blut	ACC 3
Kasumi-6	AML, M2	Peripheres Blut	ACC 686
SKNO-1	AML, M2	Knochenmark	ACC 690
AP-1060	AML, M3	Knochenmark	ACC 593
HT-93	AML, M3	Knochenmark	ACC 735

ML-2	AML, M4	Peripheres Blut	ACC 15
MOLM-13	AML, M5	Peripheres Blut	ACC 554
NOMO-1	AML, M5	Knochenmark	ACC 542
SKM-1	AML, M5	Peripheres Blut	ACC 547
THP-1	AML, M5	Peripheres Blut	ACC 15
THP-1 KO	AML, M5	Peripheres Blut	-
F-36P	AML, M6	Pleuraerguss	ACC 543
OCI-M2	AML, M6	Nicht bekannt	ACC 619
TF-1	AML, M6	Knochenmark	ACC 334
CMK	AML, M7	Peripheres Blut	ACC 392
M-07-e	AML, M7	Peripheres Blut	ACC 104

3.1.2 Patientenproben

Untersucht wurden initiale Knochenmarkspunktionsproben, die im Rahmen der Diagnostik in das pädiatrische AML-Referenzlabor der Universitätsklinik Essen aus ganz Deutschland im Zeitraum von April 2017 bis Dezember 2018 geschickt wurden. Eingeschlossen wurden alle Initialproben, die positiv für AML waren. Dabei wurde auf das RNA und cDNA-Archiv des Referenzlabors zurückgegriffen.

3.2 Material

3.2.1 Geräte

96-well-Plattenhalter, Inkubationsschrank, Kolbenhubpipetten (0,5-1000 µl), PCR-Thermocycler, Plattenzentrifuge, PXI PCR plate sealer, QX100 Droplet Digital PCR system, QX100 Generator, SensoQuest Labcycler, StepOne Plus, Tischzentrifuge, Vortexer, Zählkammer Neubauer

3.2.2 Verbrauchsmittel

Einmalhandschuhe, MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, 4311971), MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL (Applied Biosystems, 4346907), Pieceable Foil Heat Seat for PCR (BioRad, 1814040),

Pipettenspitzen mit Filter (0,5-1000 µl), Reaktionsgefäß (0,2-2ml), Suspensionsflaschen (250 ml)

3.2.3 Reagenzien

ddPCR™ 96-Well PCR Plates semiscirted (BioRad, 12001925), ddPCR™ Droplet Reader Oil (BioRad, 1863004), ddPCR™ Supermix for Probes no UTP (BioRad, 1863024), DEPC H2O steril filtered (Sigma, 1001358), DG8™ Cartidges (BioRad, 1864008), DG8™ Gaskets (BioRad, 1863009), Droplet Generation Oil for Probes (BioRad, 1863005), Ethanol absolute >99,8% (Merck, 32205-2.5l-M), DMSO (Sigma, D2650), MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I – Lysis Buffer Refill (Roche, 03246744001), PBS pH 7,4 (ThermoFisher, 10010023), Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) (ThermoFisher, 15140122), RNase-Free DNase Set (Qiagen, 79256), RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74106), RPMI 1640 (Fisher scientific, 11530586), SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher, 11754250), TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4324018), TaqMan™ Liquid Biopsy dPCR Assay (ThermoFisher, A44177), Trypan Blue Solution, 0,4% (ThermoFisher, 15250061)

3.2.4 Primer

SAMHD1:

Forward 3'-AGGCTGAAGATTTTATAGTGGATGTTATC-5',

Reverse 3'-CAGCTGCTCTGCAAATTTCTC-5',

Probe 3'-TGCTCTGTTGGGGGCAGTCTTACAATAG-Q-5'

3.3 Methoden

3.3.1 Zellkultur

Die Zelllinien THP1 und THP1 KO wurden von der aus Frankfurt stammenden Forschungsgruppe, geleitet von Prof. Dr. rer. nat. Jindrich Cinatl, bezogen. Das angesetzte Kulturmedium enthielt RPMI 1640, 10%iges fetales bovines Serum (FBS) und die Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von $0,5 - 1 \cdot 10^6$ Zellen/ml zusammen mit dem Kulturmedium in Suspensionsflaschen kultiviert. In dem Brutschrank herrschten 37°C mit einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO_2 Gehalt von 5%. Jeden dritten bis vierten Tag wurden die Zellen mittels Neubauerkammer gezählt und entsprechend der oben genannten Dichte gesplittet. Zur Zellzahlbestimmung wurde den Zellen im Medium die gleiche Menge an 0,5%iger Trypanblau-Lösung zugegeben. Tote Zellen konnten durch die Blaufärbung identifiziert werden. Nach drei Passagen wurden $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 10 ml DMSO pipettiert und bei -80°C gelagert.

Die übrigen Zelllinien wurden aus dem AML BFM Referenzlabor Essen bereits in cDNA-Form bezogen.

3.3.2 RNA-Extraktion

Aus mononukleären Zellen (MNCs) wurde Ribonukleinsäure (RNA) extrahiert. Hierzu kombiniert die RNeasy Technology die selektiven Bindungseigenschaften einer Silikat-Membran mit der Durchlässigkeit der Mikrospin Technology.

Die MNCs ($\leq 5 \cdot 10^6$ Zellen) wurden mit 500µl MagNA Pure Lysis versetzt, auf QIAshredder-Säule gegeben und für zwei Minuten bei 13.200 rounds per minute (rpm) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit demselben Volumen an 70% Ethanol vermischt, auf die RNeasy MiniSpin Säule gegeben und bei 10.000 rpm 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 350 µl RW1-Puffer wurde auf die Säule gegeben und erneut wurde für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Ein DNase-Verdau, bestehend aus 10 µl DNase Stammlösung und 70 µl RDD Buffer, wurde auf die RNeasy MiniSpin Säule gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Zu dem Verdau wurde nach der Inkubationszeit 350 µl RW1- Puffer in die Säule pipettiert und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und auf die Säule wurden 500 µl RPE-Puffer pipettiert. Anschließend

wurde der Durchfluss, nach erneutem Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 10.000 rpm, verworfen. Weitere 500 µl RPE-Puffer wurden auf die Säule gegeben und dieses Mal für drei Minuten bei maximaler Drehzahl (13.300 rpm) zentrifugiert. Das Collection Tube, inklusive des Durchflusses, wurde verworfen und die Säule wurde auf ein neues Collection Tube platziert. Zum Trocknen der RNA wurde diese erneut bei 10.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Das Collection Tube wurde ebenfalls verworfen und die Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Um die RNA zu eluieren wurden 40 µl RNA freies Wasser auf die Membran pipettiert und das Reaktionsgefäß samt Säule wurde für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die RNA-Konzentration und die Quotienten ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ sowie $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$) der Proben wurden in dem NanoDrop-Photometer gemessen.

3.3.3 cDNA-Synthese

Aus der gewonnenen RNA wurde anschließend complementary-DNA (cDNA) hergestellt. Es handelt sich hierbei um eine doppelsträngige Variante mit der genetischen Information der messenger-RNA (mRNA). Diese, in vivo nicht vorkommende, synthetische DNA wird für die Real-Time PCR (qPCR) benötigt.

Anhand der RNA-Konzentration in Nanogramm pro Mikroliter (ng/µl) wurde errechnet, mit wie viel destilliertem Wasser (ddH₂O) die Produkte auf insgesamt 19 µl aufgefüllt werden müssen, um eine RNA-Konzentration von 1 ng/µl zu erhalten.

$$\frac{1000[\text{ng}]}{c(\text{RNA}) \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]} = \text{RNA - Menge } [\mu\text{l}]$$

Anschließend wurde ein Superscript® VILO™-Mix hergestellt, indem man pro Probe 5,4 µl 5x VILO™ Reaction Mix und 2,7 µl 10x SuperScript® III Enzym Blend vermischt. 8,1 µl des Mixes wurde zu der RNA gegeben. Im Thermocycler wurde das RNA-Supermixgemisch zuerst für zehn Minuten auf 25°C erwärmt. Für die nächsten 60 Minuten wurde die Temperatur auf 42°C erhöht und abschließend wurden die Proben für

fünf Minuten auf 85°C erhitzt. Nachdem die Proben aus dem Thermocycler genommen wurden, wurde jeweils 48 µl ddH₂O hinzugegeben. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.3.4 Digitale droplet PCR

Mithilfe der digitalen droplet PCR (ddPCR) gelingt, im Gegensatz zur qPCR, eine absolute Quantifizierung der PCR-Produkte. Ein Mix aus cDNA, Enzymen und Primer wird mit Hilfe eines Generator Öls in viele Droplets aufgeteilt. Innerhalb dieser Droplets wird die cDNA amplifiziert und durch ein Fluoreszenzsignal detektiert. Abschließend wird die Relation der Droplets mit Fluoreszenzsignal und der Droplets ohne Fluoreszenzsignal ermittelt. Durch diese Methode ist es möglich, für jede Probe eine absolute Bestimmung der Gensequenz zu bestimmen.

Zunächst wurde ein Pipettierschema für eine 96-Wellplatte erstellt. Bei jeder Probe wurde für die untersuchten Gene, *SAMHD1* und *ABL*, eine Doppelbestimmung vorgenommen. Die cDNA-Proben wurden eins zu vier verdünnt. Aus dem Gemisch wurden 25 µl entnommen. Für die Gensequenzen wurden die 10x-Primermixe eingesetzt, die für die qPCR verwendet wurden. Für die SAMHD1 Bestimmung wurden 12,5 µl Supermix for Probes (No UTP), 10,5 µl DEPC H₂O und 2 µl des 10x SAMHD1-Primermixes vermischt. Der ABL-Mastermix wurde zu gleichen Anteilen aus den oben genannten Bestandteilen gemischt, jedoch wurde 2 µl des 10x ABL-Primermixes verwendet. 5 µl der verdünnten cDNA-Probe wurde zu 25 µl SAMHD1-Mastermix oder ABL-Mastermix gegeben. Aus dem Gemisch wurden 25 µl entnommen und anhand des Schemas auf die 96-Wellplatte pipettiert. Die Platte wurde luftdicht verschlossen und für eine Minute bei 15.000 rpm zentrifugiert.

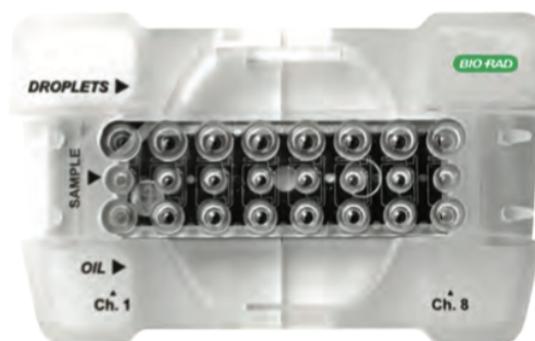


Abbildung 3.1: gefüllte DG8 Cartridge

In dem nächsten Schritt wurden die Droplets generiert. 25 µl des PCR-Reaktionsgemisches aus cDNA, Enzymen und Primern wurden in die Wells der mittleren Reihe eines DG8 Catridge (Abb.3.1) pipettiert. Insgesamt acht Reaktionsgemische konnten gleichzeitig generiert werden. In die unterste Reihe wurden in jedes der acht Wells 70 µl Droplet Generator Oil for Probes pipettiert.

Nachdem eine Verdichtung auf der Oberseite der Kartusche angebracht wurde, wurde diese in den QX100 Droplet Generator platziert. Der Generator erzeugt in ca. 2,5 Minuten für die acht Proben ca. 20.000 Tropfen pro Probe. Die Droplets wurden durch sanftes Pipettieren anschließend auf eine neue 96-Wellplatte übertragen. Sobald für alle Proben der ursprünglichen 96-Wellplatte Droplets generiert und diese auf die neue 96-Wellplatte übertragen wurden, wurde diese Platte durch den PXI PCR plate sealer mit einer Folie für vier Sekunden bei 180 °C verschlossen. Die abgedeckte Platte wurde nun in dem SensoQuest Labcycler platziert und unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

- 1 x 10 Minuten bei 95 °C
- 50 x 30 Sekunden bei 94 °C + 60 Sekunden bei 55 °C
- 1 x 10 Minuten bei 98 °C

Nach der Amplifikation wurde die Platte im QX100 Droplet Reader mithilfe der QuantaSoft Software ausgelesen. Die Daten der digitalen Tröpfchen-PCR können als 1-D-Diagramm dargestellt werden (siehe Abb. 2.2), wobei jedes Tröpfchen einer Probe auf dem Graphen der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Tröpfchenanzahl aufgetragen wird. In Abbildung 3.2 wurden alle positiven Proben oberhalb des Schwellenwerts blau dargestellt.

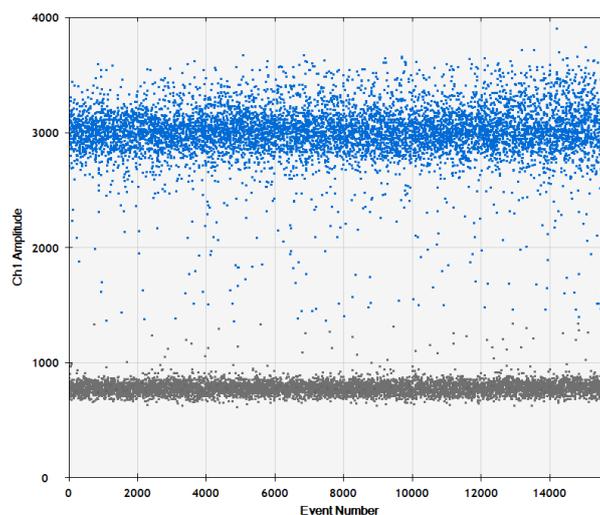


Abbildung 3.2: positive Droplets in blau dargestellt in QuantaSoft Software

3.4 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mittels des Tabellenkalkulationsprogramms Excel von Microsoft erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte durch die Programme R 4.1.1 und RStudio Desktop Version: 2021.09.0+351. Um stetige Variablen auszuwerten, wurden der Mittelwert, die Standardabweichung, der Median sowie die Minimal- und Maximalwerte errechnet. Eine Korrelation zwischen zwei oder mehreren Variablen wurde durch lineare Regression ermittelt. Zuvor wurden die Voraussetzungen einer linearen Regression geprüft.

Die erste Voraussetzung ist die Linearität der Daten. Geprüft wurde diese über ein Diagramm, bei dem die Residuen gegen die vorhergesagten Werte aufgetragen wurden. Die Gerade sollte annähernd horizontal bei $y = 0$ verlaufen.

Die Homoskedastizitätsannahme wurde durch den Breusch – Pagan – Test überprüft. Die Annahme, dass Heteroskedastizität vorliegt, musste getroffen werden, wenn der ermittelte P-Wert einen Wert $<0,05$ ergab. Um diese Heteroskedastizität zu bereinigen, wird der (quasi) T- Wald Test der geschätzten Koeffizienten angewandt.

Mittels Q-Q-Plot konnten die Residuen auf Normalverteilung getestet werden. Andere Methoden waren der Shapiro - Wilks - Test und der Kolmogorov – Smirnov – Test. Die Nullhypothese besagte, dass die Residuen normalverteilt seien. Nahm der P-Wert einen Wert größer $0,05$ an, so konnte die Nullhypothese verworfen werden und es konnte angenommen werden, dass die Residuen normalverteilt sind. Für den Fall, dass die Nullhypothese nicht verworfen werden konnte, mussten die Variablen transformiert werden.

In einem letzten Schritt wurden einflussreiche Werte, die die Regression stark beeinträchtigen, mittels Cook's Distance ermittelt. Als einflussreicher Wert gelten Werte, bei denen die Cook's Distance $4/(n - p - 1)$ überschreitet, wobei n die Anzahl an Beobachtungen angibt und p die Anzahl der Prädiktorvariablen wiedergibt. Die ermittelten einflussreichen Werte wurden für die Berechnung des Regressionsmodells entfernt.

Der P-Wert der Regression wurde mittels t-Test ermittelt. Als statistisch signifikant galten die Ergebnisse, die einen p-Wert von $p < 0,05$ annahmen. Die Regressionstabellen wurden nach APA-Standard erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

In die Untersuchungen wurden insgesamt 92 Studienteilnehmende eingeschlossen, von denen 54 männlich und 38 weiblich waren. Im Schnitt lag das Alter bei der Diagnosestellung bei $9,96 \pm 5,84$ Jahren. Die Spannweite lag zwischen 0 und 24 Jahren und der Median bei 10,5 Jahren. Die männlichen Patienten, die 58,7 % des Patientenkollektivs ausmachten, waren im Median bei Diagnosestellung 10 Jahre alt (0-24 Jahre). Bei den weiblichen Studienteilnehmerinnen lag das mediane Erkrankungsalter bei 11,5 Jahren (0-19 Jahre). Etwa 75% der Kinder waren bei Diagnosestellung unter 15 Jahre alt. Die Verteilung der morphologische Einteilung der AML bei den Patienten ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Die Risikostratifizierung der Studienteilnehmer ergab folgende Verteilung: Bei 29 Patienten (31,5%) ergab die Stratifizierung anhand der Mutationen ein Standardrisiko. Die Gruppe der Patienten mit einem intermediären Risiko umfasste 50 Kinder (54,3%). Bei 13 Patienten (14,1%) wurde ein hohes Risiko prognostiziert (siehe Tabelle 4.1). Anhand der Risikogruppen wurden die Patienten einem bestimmten Studienarm mit unterschiedlichem Therapieplan stratifiziert.

Tabelle 4.1: Patienten- und Tumorcharakteristika

Patientenkollektiv	n=92	%
Jungen	54	58,7
Mädchen	38	41,3
Alter bei Diagnose, Median (Min-Max)	10,5 (0-24)	
Jungen: Alter bei Diagnose, Median (Min-Max)	10 (0-24)	
Mädchen: Alter bei Diagnose, Median (Min-Max)	11,5 (0-19)	
FAB-Klassifikation	n=92	%
M0	1	1,1
M1	15	16,3

Ergebnisse

M2	19	20,7
M3	7	7,6
M4	21	22,8
M5	27	29,3
M6	0	0
M7	2	2,2
Risikostratifizierung	n=92	%
Standardrisiko	29	31,5
Intermediäres Risiko	50	54,3
Hochrisiko	13	14,1

Tabelle 4.2 beschreibt, in welchem Studienabschnitt die therapierten Patienten sich in Remission befanden. 66 von 92 Kindern (72,5%) erreichten die komplette Remission (CR). Innerhalb der 1. Induktion, von Tag 0 bis Tag 20 der Therapie, wurden bei allen Kindern weiterhin mehr als 5% Blasten im peripheren Blut oder im Knochenmark nachgewiesen. Im Zyklus der 2. Induktion, von Tag 21 bis Tag 55, konnte bei 25 Kindern (27,2%) eine komplette Remission (CR) erreicht werden. Ebenfalls bei 25 Kindern (27,2%) konnte die CR innerhalb des 3. Kurses, von Tag 56 bis Tag 83, erzielt werden. Kurs 4 begann 84 Tage nach Therapiestart und ging bis zum 111. Tag. Innerhalb dieses Kurses wurde bei elf Kindern (12%) eine CR erreicht. Fünf Kinder (5,4%) erreichten die CR nach noch über 112 Tagen nach Therapiestart im 5. Kurs und somit im Intensivierungsblock. Bei zwölf Kindern (13%) konnte keine CR erreicht werden und wiederum bei 14 Kindern (15,2%) lagen keine Remissionsdaten vor.

Bei neun der 92 (10%) untersuchten initialen Knochenmarkspunktionen war der Patient rezidiert. 22 Kinder (24%) wurden allogene transplantiert (KMT).

Tabelle 4.2: Anzahl der Tage bis Remission

Studienprotokoll	Tage	n = 92	%
1. Induktion	0 – 20 Tage	0	0
2. Induktion	21 – 55 Tage	25	27,2
3. Kurs	56 – 83 Tage	25	27,2

Ergebnisse

4. Kurs	84 – 111 Tage	11	12
5. Kurs	≥ 112 Tage	5	5,4
Keine Remission		12	13
Keine Angabe		14	15,2

4.2 Expression von SAMHD1 in Zelllinien

Die SAMHD1 Expression wurde in allen 28 Zelllinien nachgewiesen. Abbildung 4.1 zeigt den Mittelwert der Zelllinien in Abhängigkeit von dem Ursprung der Zelllinie. 17 Zelllinien wurden aus dem peripherem Blut von Patienten gewonnen. Der durchschnittliche SAMHD1 Wert betrug 533,68 Kopien/ μ l (Median: 166 Kopien/ μ l). Bei den neun Zelllinien, die aus dem Knochenmark stammten, lag der Mittelwert bei 439,27 Kopien/ μ l (Median: 196,5 Kopien/ μ l). Eine Zelllinie wurde aus Blasten eines punktierten Pleuraergusses gewonnen und wies 74 Kopien/ μ l auf. Bei der Zelllinie OCI-M2 ist der Ursprung unbekannt, weswegen sie in Abbildung 4.1 nicht dargestellt ist.

Es gab es keinen signifikanten Unterschied (ns) in der SAMHD1 Expressionen in Blasten aus dem peripherem Blut oder aus dem Knochenmark. Die Zelllinie F-36P, die aus einem Pleurapunktat stammt, wies eine geringere SAMHD1 Expression auf.

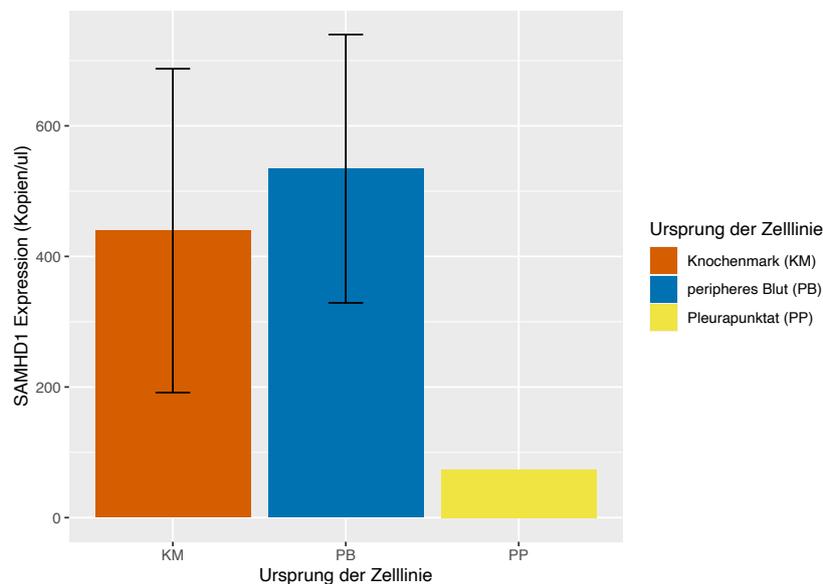


Abbildung 4.1: Mittelwert der SAMHD1 Expressionen für die unterschiedlichen Ursprünge der Zelllinien als Barplots dargestellt, nicht signifikant, n total= 27, KM n =9, PB n = 17, PP n = 1

Ergebnisse

Die Zelllinien wurden aus Blasten einer leukämischen Erkrankung isoliert und herangezüchtet. Von welcher Erkrankung die Blasten abstammten kann man Tabelle 3.1 und Abbildung 4.2 entnehmen. 17 Zelllinien basierten auf Krankheitsbildern einer akuten myeloischen Leukämie. Auffällig war, dass vor allem die Zelllinien THP-1, NOMO-1 und SKM-1 eine hohe SAMHD1 Expression aufwiesen. Bei den anderen Zelllinien befand sich die SAMHD1 Expression bei unter 1000 Kopien/ μ l. Bei den sieben Zelllinien, F-36P, UOC-M1, Kasumi-6, Kasumi-3, AP-1060, CMK und HT-93, betrug der SAMHD1 Wert weniger als 100 Kopien/ μ l. Die Spannweite der SAMHD1 Expressionen innerhalb der AML-Zelllinien war hoch und die Normalverteilung sehr inhomogen.

Der chronischen myeloischen Leukämie entstammten sechs Zelllinien, die jeweils weniger als 1000 Kopien/ μ l SAMHD1 aufwiesen. Die SAMHD1 Expression war in den CML-Zelllinien homogen verteilt.

Drei Zelllinien wurden aus Blasten einer akuten lymphatischen Leukämie gewonnen. SEM war in dieser Gruppe die einzige Zelllinie, bei der über 1000 Kopien/ μ l SAMHD1 exprimiert wurden. Die Zelllinie 697 exprimiert weniger als 10 SAMHD1-Kopien.

Die letzte, in Abbildung 4.2. dargestellte, Gruppe bildete die Negativproben. THP1 – ist eine durch CRISP/CAS9 modifizierte Zelllinie, bei der die DNA-Sequenz, die für SAMHD1 codiert, herausgetrennt wurde. Dennoch exprimiert die Zelllinie 704 Kopien/ μ l SAMHD1. Die zweite Negativkontrolle bildete die Zelllinie HL60 und entspricht einer AML der FAB-Klassifikation M2. Es ist bekannt, dass diese Zelllinie wenig SAMHD1 exprimiert (Schneider et al., 2017). In den Versuchen exprimiert die HL60 weniger als 10 Kopien/ μ l.

Ergebnisse

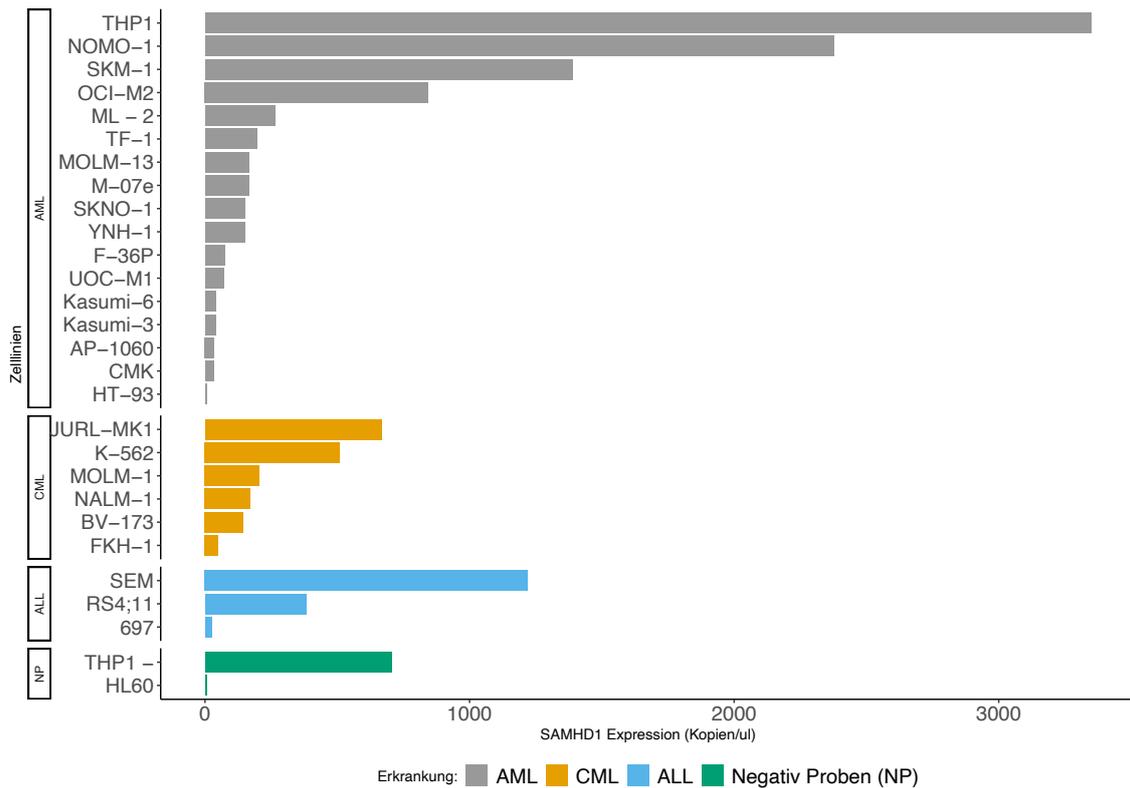


Abbildung 4.2: SAMHD1 Expressionen der verschiedenen Zelllinien als Balkendiagramm dargestellt, aufgeteilt nach den genannten Erkrankungen

In Abbildung 4.3 wurde die SAMHD1 Expression der unterschiedlichen Diagnosen (AML, CML, ALL) als Boxplotdiagramm dargestellt. Die Zelllinien der akuten myeloischen Leukämie hatten eine durchschnittliche SAMHD1 Expression von 579,77 Kopien/µl, einen Median von 151 Kopien/µl und eine Spannweite von 6 bis 3350,32 Kopien/µl. Für die Zelllinien der CML-Blasten entsprach der SAMHD1 Mittelwert 291,51 Kopien/µl, der Median 188,5 Kopien/µl, der minimale Wert 49,5 Kopien/µl und der maximale Wert 667,5 Kopien/µl. Die drei ALL-Zelllinien hatten eine durchschnittliche SAMHD1 Expression von 542,95 Kopien/µl und einen Median von 382,5 Kopien/µl. Die Spannweite betrug 1193,65 Kopien/µl (min: 26,35 Kopien/µl, max: 1220 Kopien/µl). Die durchschnittliche SAMHD1 Expression der AML-Zelllinien lag über der Expression der CML-Zelllinien. Die Beobachtung war in dieser Aufarbeitung mit einem p-Wert von $p=0,61$ nicht statistisch signifikant. Zwischen den SAMHD1 Expressionen der AML- und der ALL-Zelllinien gab es ebenfalls keinen statistisch

Ergebnisse

signifikanten Unterschied ($p=0,92$). Die Mittelwerte lagen sehr dicht beieinander, wobei der Mittelwert der AML-Zelllinien leicht über dem Mittelwert der ALL-Zelllinien lag.

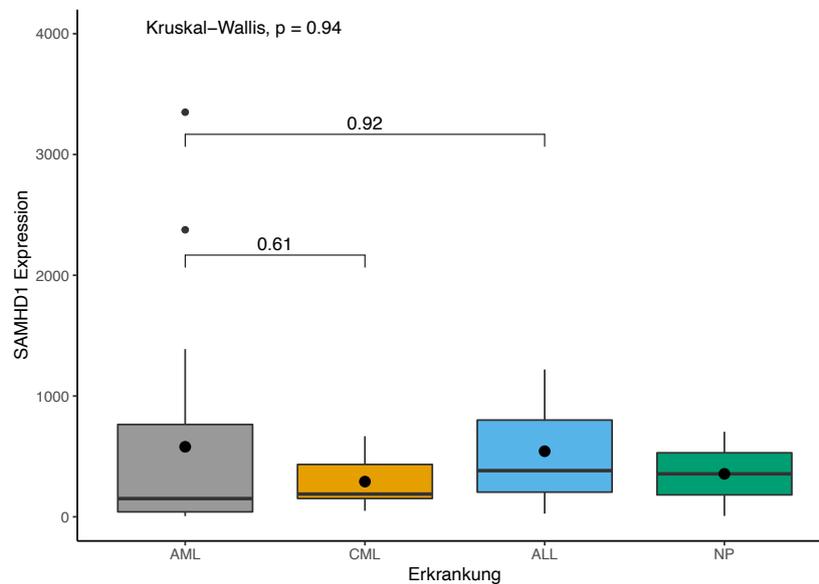


Abbildung 4.3: Boxplots der verschiedenen Erkrankungen mit den jeweiligen Mittelwerten (schwarzer Punkt), nicht signifikant, $n = 28$, AML $n = 17$, CML $n = 6$, ALL $n = 3$, NP $n = 2$

Für die AML-Zelllinie, mit der FAB-Klassifikation M0, betrug die SAMHD1 Expression 40,6 Kopien/ μ l. Bei den Untergruppen M2 (96 Kopien/ μ l), M3 (20,68 Kopien/ μ l) und M7 (99,62 Kopien/ μ l) wurde ebenfalls eine mittlere SAMHD1 Expression unter 100 Kopien/ μ l festgestellt. Mit 110,75 Kopien/ μ l lagen die SAMHD1 Expression der Zelllinien der FAB-Klassifikation M1 leicht oberhalb der eben genannten Untergruppen. Den nächsthöheren SAMHD1 Mittelwert bildeten die AML M6 Zelllinien mit 371,53 Kopien/ μ l, gefolgt von der AML M4 Zelllinie mit 764,5 Kopien/ μ l. Die durchschnittlich höchste SAMHD1 Expression wiesen die Zelllinien der FAB-Klassifikation M5 mit 1820,58 Kopien/ μ l auf.

4.3 Expression von SAMHD1 in Patientenproben

4.3.1 Allgemeine Beschreibung der SAMHD1 Expression

In allen Patientenproben konnte eine SAMHD1 Expression nachgewiesen werden. Der Mittelwert aller Messungen betrug 1246,72 Kopien/ μ l (Median: 773 Kopien/ μ l). Der kleinste gemessene SAMHD1-Wert (min) lag bei 2,5 Kopien/ μ l und der größte Wert (max) betrug 6080 Kopien/ μ l (Standardabweichung σ : 1270 Kopien/ μ l). Wie in Abbildung 4.4a zu sehen ist, handelte es sich um eine positiv schiefe Verteilung (skew: 1,45) mit einer positiven Kurtosis von 2,11. Bei etwa der Hälfte aller Patienten lag der SAMHD1-Wert unter 1000 Kopien/ μ l. 14 Patienten (15%) wiesen, mit 2516 Kopien/ μ l, einen SAMHD1-Wert von mehr als einer Standardabweichung von dem Mittelwert entfernt auf. Der Q-Q-Plot in Abbildung 4.4b beweist ebenfalls, dass es sich bei der Stichprobe nicht um eine Normalverteilung der SAMHD1-Werte handelte.

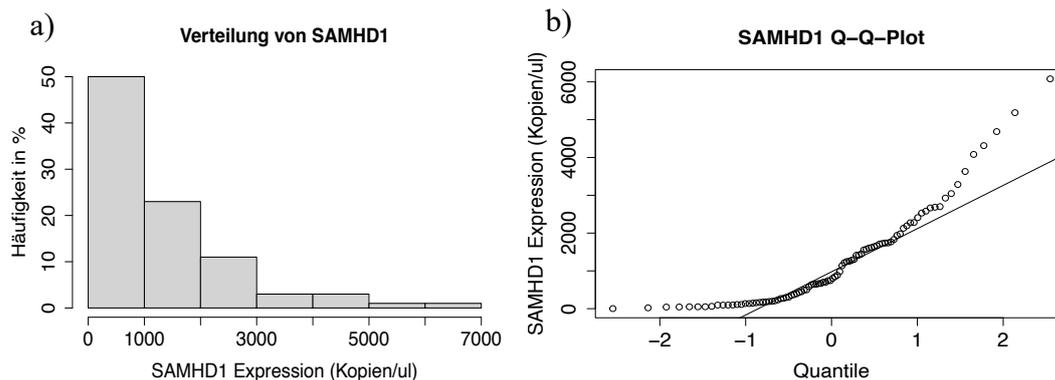


Abbildung 4.4: Verteilung der gemessenen SAMHD1-Werte in Kopien/ μ l in allen Patientenproben, $n=92$. a) Histogramm der SAMHD1-Expression, b) Q-Q-Plot der SAMHD1-Expressionen

4.3.2 SAMHD1 Expression im Zusammenhang zu einer Variablen

4.3.2.1 *Prozentualer Anteil an Blasten in den Proben*

Um den Einfluss des prozentualen Anteils der Blasten in den Knochenmarksproben auf die Höhe der SAMHD1 Expression zu untersuchen, wurde zuerst eine einfache lineare Regression durchgeführt. Die SAMHD1 Expression stellte die abhängige Variable (AV) dar und der Anteil der Blasten die unabhängige Variable (UV). Die oben beschriebenen Voraussetzungen zur Durchführung einer Regression wurden hinreichend erfüllt.

Tabelle 4.3: Regressionsanalyse zum Zusammenhang des Blastenanteils und der SAMHD1 Expression

	Regressions- koeffizient	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert
Konstante	659,2	319,7		0,000
Blasten	590,3	455,9	1,295	0,1989

Anmerkung. AV: SAMHD1 Expression, UV: prozentualer Blastenanteil in der Knochenmarksprobe n = 92, $aR^2 = 0.008$

Tabelle 4.3 zeigt, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Blastenanteil und der SAMHD1 Expression gibt, $p=0,1989$. Aus der Untersuchung resultiert, dass in den folgenden Beobachtungen und Rechnungen mit der gesamten SAMHD1 Expression gerechnet wurde und nicht der SAMHD1 Wert entsprechend des prozentualen Blastenanteils (Korrekturfaktor) verwendet wurde.

4.3.2.2 Geschlecht

Bei den weiblichen Patientinnen lag der SAMHD1 Mittelwert bei 977,14 Kopien/ μ l (Median: 657 Kopien/ μ l; σ : 940,97 Kopien/ μ l, min: 2,5 Kopien/ μ l, max: 3045 Kopien/ μ l) gemessen. Im Vergleich dazu lag SAMHD1 Mittelwert bei den männlichen Patienten bei 1436,42 Kopien/ μ l (Median: 1116,75 Kopien/ μ l, σ = 1435,54 Kopien/ μ l, min: 42,55 Kopien/ μ l, max: 6080 Kopien/ μ l) (s. Abb. 4.5).

Ergebnisse

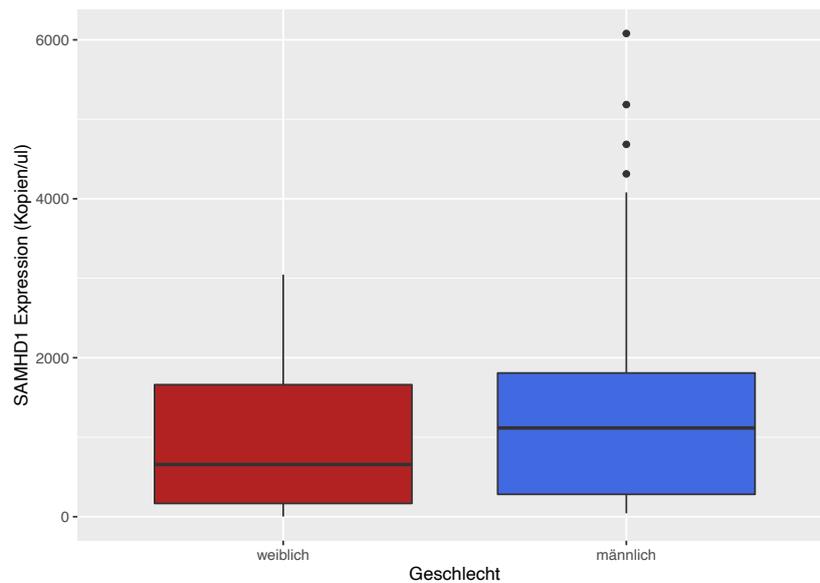


Abbildung 4.5: Boxplot der SAMHD1 Expressionen bei weiblichen und männlichen Patienten, rot = weiblich $n=38$, blau=männlich $n=54$, nicht signifikant

Der Zusammenhang zwischen dem Geschlecht, als unabhängige Variable, und der SAMHD1 Expression, als abhängige Variable, wurde mittels einfacher linearer Regression getestet. Eine annähernde Normalverteilung der Residuen wurde durch eine logarithmische Transformation der AV hergestellt. Ausreißende Werte, gemäß der Formel $4/(n - p - 1)$, wurden aus der Rechnung ausgeschlossen. Die Voraussetzungen einer Regression konnten nun als hinreichend erfüllt betrachtet werden.

Tabelle 4.4: Regressionsanalyse zum Zusammenhang des Geschlechts und der SAMHD1 Expression

	Regressions- koeffizient	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert
Konstante	6,123	0,229		0,000
Geschlecht	0,350	0,304	1,153	0,252

Anmerkung. AV: SAMHD1 Expression. UV: Geschlecht (0= weiblich, 1 = männlich)
 $n = 88$, $aR^2 = 0.003$

Wie in Tabelle 4.4 dargestellt, war das Modell nicht gegen den Zufall abgesichert (p-Wert = 0,252).

Ergebnisse

4.3.2.3 Alter

Ob das Alter der Patienten bei Diagnosestellung einen Zusammenhang zu der SAMHD1 Expression hatte, wurde durch eine einfache lineare Regression geprüft. Dabei handelte es sich bei dem Alter um die unabhängige Variable und bei der SAMHD1 Expression um die abhängige Variable. Die Werte, die die Cook's Distance von $4/(n - p - 1)$ überschritten, wurden entfernt. Es wurde eine logarithmische Transformation der AV durchgeführt, nachdem die Residuen annähernd normalverteilt waren. Somit wurden alle Voraussetzungen zur Durchführung einer Regressionsanalyse hinreichend erfüllt.

Tabelle 4.5: Regressionsanalyse zum Zusammenhang des Alters bei Diagnosestellung und der SAMHD1 Expression

	Regressions- koeffizient	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert
Konstante	6,992	0,296		0,000
Alter	- 0,66	0,025	- 2,606	0,011

Anmerkung. AV: SAMHD1 Expression. UV: Alter (in Jahren angegeben)
 $n = 88$ $aR^2 = 0,062$

Tabelle 4.5 beschreibt den linearen Zusammenhang zwischen dem Alter und der SAMHD1 Expression ($p=0,011$).

Die Regressionsgerade passend zu dem Regressionsmodell aus Tabelle 4.5 wurde in Abbildung 4.6 in das Diagramm eingefügt und zeigt ebenfalls die fallende Anzahl der SAMHD1-Kopien/ μ l mit steigendem Alter. Außerdem zeigt die Abbildung das 95% Konfidenzintervall.

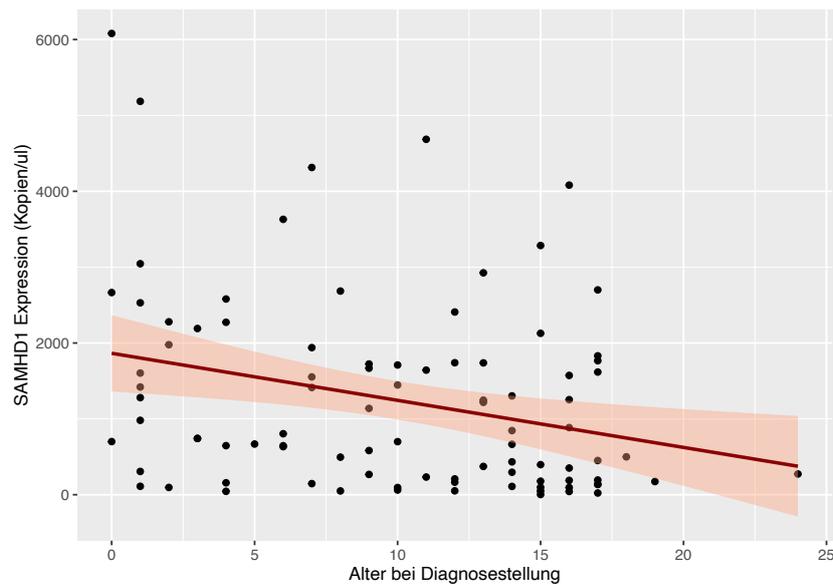


Abbildung 4.6: Punktdiagramm zur SAMHD1 Expression abhängig des Alters bei Diagnosestellung mit eingezeichneter Regressionsgeraden (rote Linie), sowie 95% - Konfidenzintervall (hellroter Balken), p -Wert=0,011

4.3.2.4 FAB-Klassifikation

Abbildung 4.7 stellt den Mittelwert der SAMHD1 Expressionen für die verschiedenen FAB-Klassifikationen dar. Patienten, mit den Diagnosen AML M5 (1825,113 Kopien/µl), M4 (1740,7 Kopien/µl) und M0 (1617 Kopien/µl), hatten im Schnitt eine höhere SAMHD1 Expression als Patienten, bei denen die morphologischen Klassifikationen M1 (537,16 Kopien/µl), M2 (791,07 Kopien/µl) und M3 (550,83 Kopien/µl) nachgewiesen wurden. Mit Abstand die geringsten SAMHD1 Expression zeigten Kinder, bei denen die Diagnose einer AML M7 (152,25 Kopien/µl) gestellt wurde. In der Subklassifikation M4 sind ebenfalls acht Kinder mit der Diagnose einer AML M4eo dargestellt.

Ergebnisse

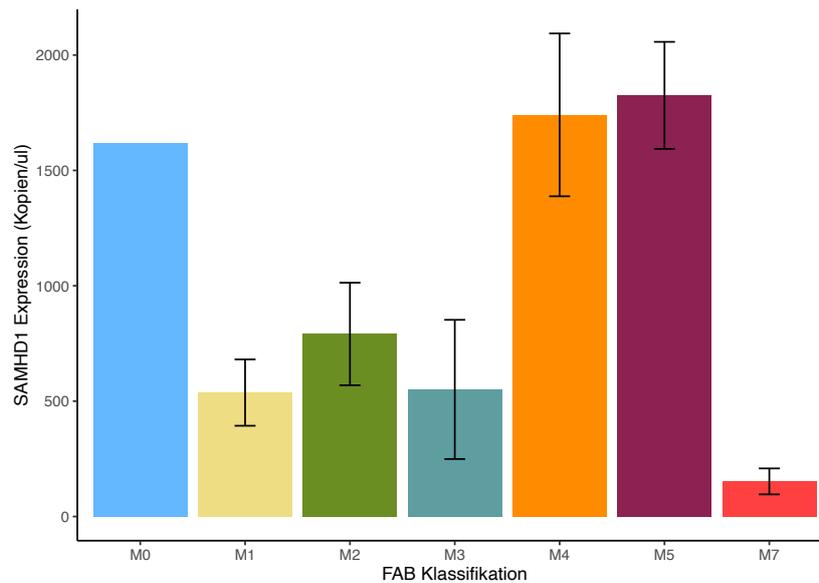


Abbildung 4.7: Barplot der SAMHD1 Mittelwerte für die verschiedenen FAB-Klassifikationen, M0 n=1, M1 n = 15, M2 n=19, M3 n=7, M4 n=21, M5 n=27, M7 n=2 total n = 92, nicht signifikant

Um die Aussagekraft der oben genannten Beobachtungen zu bewerten, wurde eine einfache lineare Regression mit der FAB-Klassifikation als UV und der SAMHD1 Expression als AV durchgeführt. Nach Ausschluss einflussreicher Werte, wurden alle Voraussetzungen vollständig erfüllt.

Tabelle 4.6: Regressionsanalyse zum Zusammenhang der FAB-Klassifikation und der SAMHD1 Expression

	Regressions- koeffizient	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert
Konstante	1617,0	1163,7		0,000
M1	- 1079,8	1201,9	- 0,898	0,371
M2	- 825,9	1194,0	- 0,692	0,491
M3	- 1066,2	1244,1	- 0,857	0,394
M4	123,7	1191,1	0,104	0,918
M5	208,1	1185,1	0,176	0,861
M7	- 1464,7	1425,3	- 1,028	0,307

Anmerkung. AV: SAMHD1 Expression, UV: FAB-Klassifikation n = 92
Gesamtmodell: p-Wert: 0,002, $aR^2 = 0,1599$

Ergebnisse

Das signifikante Gesamtmodell in Tabelle 4.6 belegt, dass die FAB-Klassifikationen keinen Einfluss auf die Höhe der SAMHD1 Expression haben.

Bei dem Vergleich der FAB-Klassifikationen zwischen den Patientenproben und den Zelllinien ist auffällig, dass die durchschnittlichen SAMHD1-Expressionen in den Patientengruppen in allen FAB-Gruppen über der SAMHD1 Expression der Zelllinien lagen. In den Klassifikationsgruppen M0, M1, M2 und M3 bestand ein großer Unterschied. Patienten mit der FAB-Klassifikation M4 wiesen etwa eine doppelt so hohe Anzahl an SAMHD1 Kopien/ μ l auf, wie die gemessene SAMHD1 Expression in der Zelllinie ML-2. Die SAMHD1 Expression der Patienten mit einer AML M5 und der Zelllinien einer AML M5 sind nahezu identisch. Innerhalb der FAB-Klassifikation M7 bestand nur ein geringer Unterschied zwischen den Patientenproben und den Zelllinien.

4.3.2.5 Risikostratifizierung

Die SAMHD1 Expression innerhalb der verschiedenen Risikogruppen wird in Abbildung 4.8 mittels Boxplot dargestellt.

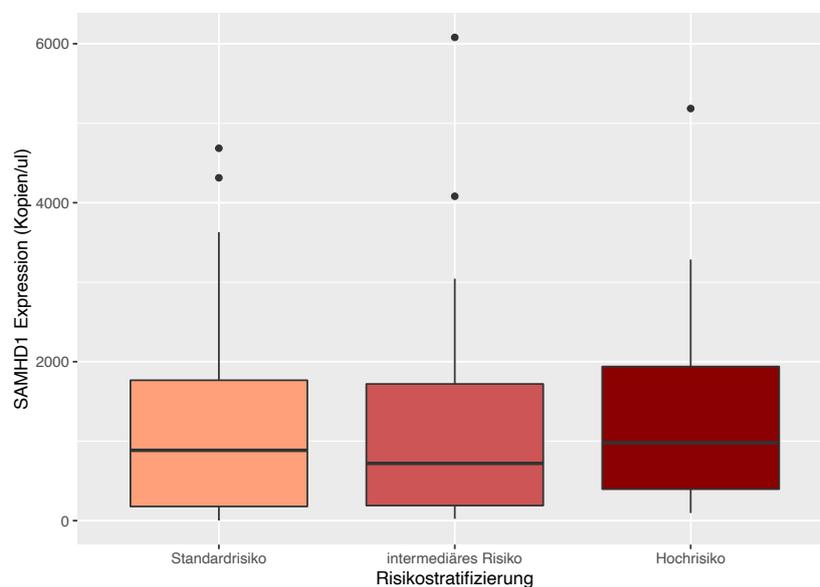


Abbildung 4.8: Boxplots der SAMHD1 Expressionen innerhalb der verschiedenen Risikostratifizierungen, SR $n=29$, IR $n=50$, HR $n=13$, n total=92, nicht signifikant

Ergebnisse

Der Mittelwert der Standardrisikogruppe (SR) (n=29) betrug 1275,54 Kopien/ μ l (Median: 885 Kopien/ μ l, σ :128,69 Kopien/ μ l, min: 2,5 Kopien/ μ l max: 4685 Kopien/ μ l). Für die intermediäre Risikogruppe (IR) (n=50) lag der Mittelwert bei 1160,42 Kopien/ μ l (Median: 720,5 Kopien/ μ l, σ : 78 Kopien/ μ l, min: 22,8 Kopien/ μ l, max: 6080 Kopien/ μ l). In der Hochrisikogruppe (HR) (n=13) befand sich der Mittelwert mit 1514,35 Kopien/ μ l leicht oberhalb der anderen Mittelwerte (Median: 980,5 Kopien/ μ l, σ : 476,1 Kopien/ μ l, min: 96 Kopien/ μ l, max: 5185 Kopien/ μ l).

Zur Prüfung des Zusammenhangs der Risikostratifizierung und der SAMHD1 Expression wurde eine einfache lineare Regression durchgeführt. In dem Modell wurde die Einteilung anhand der Risikogruppen als unabhängige Variable und die SAMHD1 Expression als abhängige Variable bestimmt. Ausreißende, einflussreiche Werte wurden entfernt. Die Residuen waren nach einer logarithmischen Datentransformation normalverteilt. Die für eine Regression erforderlichen Voraussetzungen wurden vollständig erfüllt.

Tabelle 4.7: Regressionsanalyse zum Zusammenhang der Risikostratifizierung und der SAMHD1 Expression

	Regressions- koeffizient	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert
Konstante	6,155	0,273		0,000
IR	0,171	0,340	0,502	0,617
HR	0,398	0,508	0,783	0,436

Anmerkung. AV: SAMHD1 Expression. UV: Risikostratifizierung (SR = Standardrisiko, IR = Intermediäres Risiko, HR = Hochrisiko)

n = 87, Gesamtmodell: p-Wert: 0,725, $aR^2 = -0,016$

Die Regressionsanalyse in Tabelle 4.7. ergibt ein Modell, welches nicht gegen die Nullhypothese abgesichert werden kann, $p=0,725$.

Ergebnisse

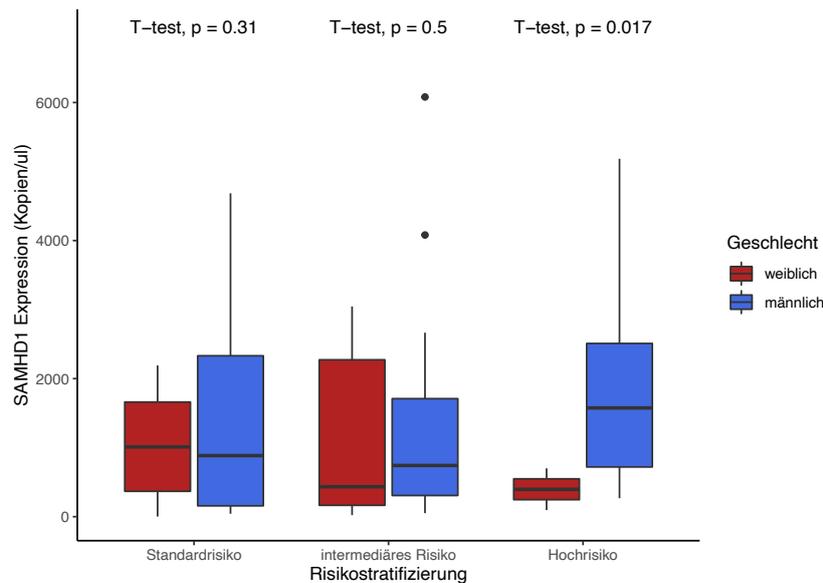


Abbildung 4.9: Boxplots der SAMHD1 Expression von weiblichen und männlichen Patienten innerhalb der verschiedenen Risikogruppen, SR n=29 nicht signifikant, IR n=50 nicht signifikant, HR=13 p=0,017

Betrachtet man in Abbildung 4.9 den SAMHD1 Wert abhängig von dem Geschlecht innerhalb der Risikogruppen, so fällt auf, dass die SAMHD1 Expression bei den Jungen in der intermediären Risikogruppe (IR) (Mittelwert: 1257,1 Kopien/μl, Median: 742 Kopien/μl) und in der Hochrisikogruppe (HR) (Mittelwert: 1849,35 Kopien/μl, Median: 1575,75 Kopien/μl) höher war, als bei den weiblichen Patientinnen in IR (Mittelwert: 1026,9 Kopien/μl, Median: 433,5 Kopien/μl) und in HR (Mittelwert: 397,67 Kopien/μl, Median: 396,5 Kopien/μl). Diese Beobachtung war zwar in der HR signifikant, $p = 0,017$, jedoch nicht in der IR, $p=0,5$. In der Standardrisikogruppe (SR) war der SAMHD1 Median bei weiblichen Patientinnen (1010,75 Kopien/μl) höher als bei den männlichen Patienten (885 Kopien/μl). Der Mittelwert lag allerdings bei den männlichen Patienten (1507,82 Kopien/μl) über dem, der weiblichen Patientinnen in der SR (1026,67 Kopien/μl). Auch diese Beobachtung war nicht statistisch signifikant, $p=0,31$.

4.3.2.6 Remission

In Abbildung 4.10 wurde die SAMHD1 Expression der Studienteilnehmenden, die die Remission nicht erreicht haben (n=12), neben der SAMHD1 Expression der Studienteilnehmenden, die die Remission erreicht haben (n=66), mittels Boxplot

Ergebnisse

dargestellt. Die Patienten, die die komplette Remission nicht erreicht hatten, hatten einen durchschnittlichen SAMHD1 Wert von 1896,92 Kopien/ μ l (Median von 1346,75 Kopien/ μ l, σ :1663,51 Kopien/ μ l). Im Vergleich dazu lag der Mittelwert der Patienten, die eine Remission erreicht haben, bei 1028,48 Kopien/ μ l (Median: 721 Kopien/ μ l, σ : 936,19 Kopien/ μ l).

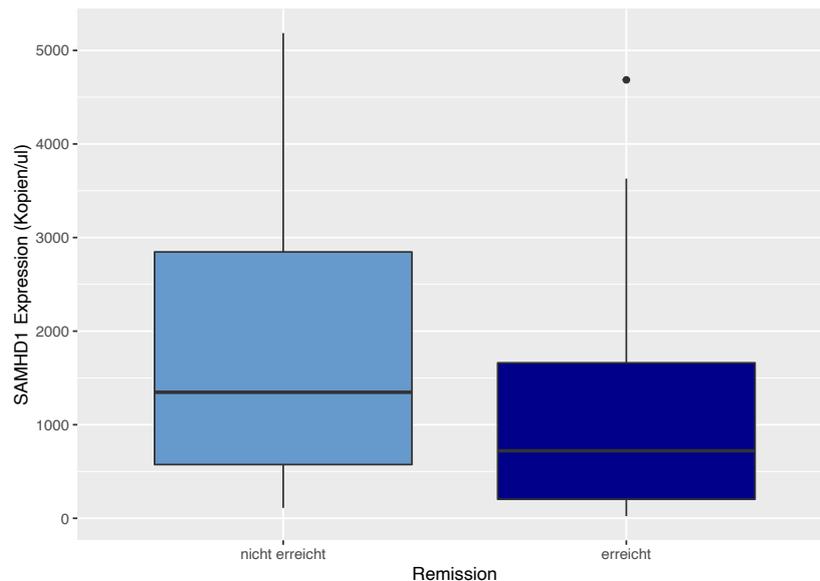


Abbildung 4.10: Boxplots der Patienten, die die Remission nicht erreicht haben ($n=12$) und der Patienten, die die Remission erreicht haben ($n=66$), $p=0,012$

Um den Zusammenhang zwischen der SAMHD1 Expression und dem Erreichen der Remission zu prüfen, wurde eine einfache lineare Regression durchgeführt. SAMHD1 stellte in der Rechnung die abhängige Variable dar und das Erreichen der Remission die unabhängige Variable. Die notwendigen Regressionsvoraussetzungen wurden erfüllt.

Tabelle 4.8: Regressionsanalyse zum Zusammenhang eines Remissionserfolges und der SAMHD1 Expression

	Regressions- koeffizient	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert
Konstante	1896,9	310,2		0,000
Remission	- 868,4	337,3	- 2.575	0,012

Anmerkung. AV: SAMHD1 Expression. UV: Remission innerhalb des Intensivierungsblocks erreicht. $n = 78$, $aR^2 = 0,068$

Ergebnisse

Wie Tabelle 4.8 zu entnehmen ist, resultierte ein signifikantes Modell, welches gegen die Nullhypothese abgesichert werden konnte ($p=0,012$).

Betrachtet man das Erreichen der Remission in Abhängigkeit zu dem Geschlecht in Abbildung 4.11, so fällt auf, dass männliche Patienten, die die Remission nicht erreichten, signifikant höhere SAMHD1-Werte aufwiesen (Mittelwert: 2655,38 Kopien/ μ l, Median: 2682,5 Kopien/ μ l) als weibliche Patientinnen, die die Remission nach dem letzten Intensivierungsblock nicht erreichten (Mittelwert: 380 Kopien/ μ l, Median: 302,5 Kopien/ μ l), $p = 0,0036$. Das Verhältnis innerhalb der Geschlechter in der Gruppe der Patienten, die die Remission erreicht haben, zeigte, dass die männlichen Patienten ebenfalls höhere SAMHD1 Expressionen (Mittelwert: 1171,65 Kopien/ μ l, Median: 885 Kopien/ μ l) aufwiesen, als die weiblichen Patientinnen (Mittelwert: 845, 82 Kopien/ μ l, Median: 646,8 Kopien/ μ l). Diese Beobachtung war allerdings nicht signifikant, $p=0,15$.

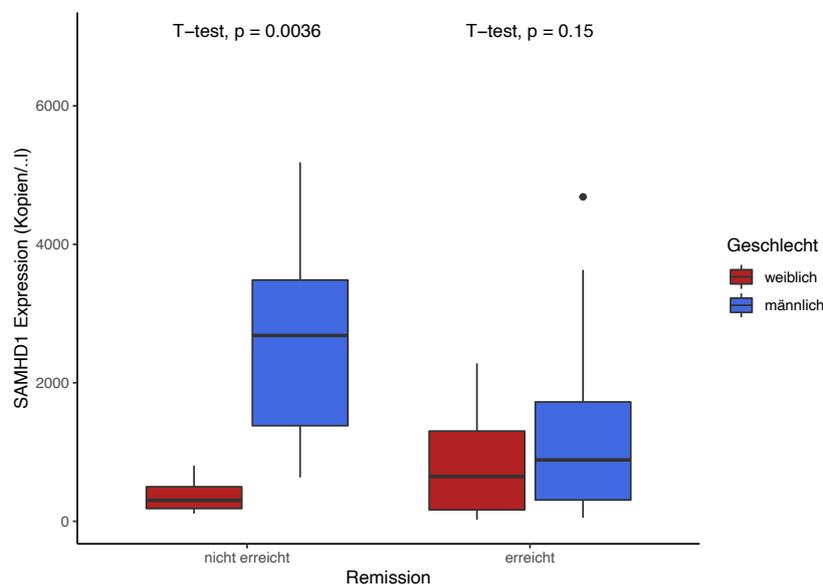


Abbildung 4.11: Boxplots der SAMHD1 Expression von weiblichen und männlichen Patienten, die die Remission nicht erreicht haben ($n = 13$, $p=0,0036$) und die Expression von weiblichen und männlichen Patienten, die die Remission erreicht haben ($n=66$, nicht signifikant)

Ergebnisse

Die Kinder, die die Remission erreichten, wurden in Abbildung 4.12 in Untergruppen eingeteilt, die angaben, in welchem Kurs des Chemotherapieprotokolls, sie die CR erreichten. Wie oben bereits beschrieben, war bei nicht Erreichen der Remission die SAMHD1 Expression höher als bei den anderen Vergleichsgruppen (Mittelwert: 1896,92 Kopien/ μ l, Median: 1346,75 Kopien/ μ l). Kinder, die innerhalb der Induktion die CR erreicht haben, hatten einen durchschnittlichen SAMHD1 Wert von 1218,84 Kopien/ μ l (Median 1217,5 Kopien/ μ l). Wurde die CR im 3. Kurs erreicht, so war der SAMHD1 Mittelwert 992,14 Kopien/ μ l (Median: 664,5 Median Kopien/ μ l). Bei Patienten, die die CR im 4. Kurs erreichten, betrug der SAMHD1 Mittelwert 777,35 Kopien/ μ l (Median: 699,5 Kopien/ μ l). Mehr als 112 Tage nach Erstdiagnose erreichten im letzten Kurs noch fünf Kinder die komplette Remission. Der durchschnittliche SAMHD1 Wert lag bei 810,87 Kopien/ μ l (Median: 582,5 Kopien/ μ l). Es fiel auf, dass die SAMHD1 Expression mit zunehmender Dauer bis zum Erreichen der Remission fiel.

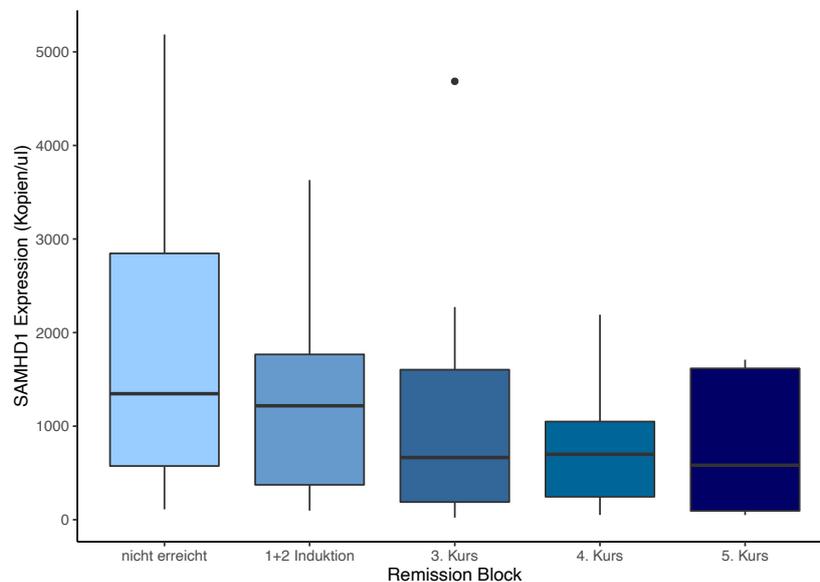


Abbildung 4.12: Boxplots der Patienten, die die Remission nicht erreicht haben ($n=12$) und der Patienten, die die Remission erreicht haben, unterteilt nach dem Kurs, in dem die Remission erreicht wurde, Induktion $n=25$, 3. Kurs $n=25$, 4. Kurs $n=11$, 5. Kurs $n=5$, nicht signifikant

Ergebnisse

Um den Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Remission und der Höhe der SAMHD1 Expression zu prüfen, wurde eine einfache lineare Regression durchgeführt. Die SAMHD1 Expression stellte in der Rechnung die abhängige Variable dar und der Block, in dem die Remission erreicht wurde, stellte die unabhängige Variable dar. Die Voraussetzungen zur Durchführung einer Regressionsanalyse wurden erfüllt.

Tabelle 4.9: Regressionsanalyse zum Zusammenhang des Remissionszeitpunkts und der SAMHD1 Expression

	Regressions- koeffizient	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert
Konstante	1218,8	189,2		0,000
3. Kurs	- 226,7	267,5	- 0,847	0,400
4. Kurs	- 441,5	342,2	- 1,290	0,202
5. Kurs	- 408,0	463,4	- 0,880	0,382

Anmerkung. AV: SAMHD1 Expression, UV: Remission innerhalb des jeweiligen Kurses des Chemotherapieprotokolls erreicht. $n = 66$, $p = 0,558$ $aR^2 = -0,0142$

Wie Tabelle 4.9 zu entnehmen ist, resultierte kein signifikantes Modell und konnte deswegen nicht gegen die Nullhypothese abgesichert werden ($\alpha=0,558$).

4.3.3 Interaktion von Variablen

4.3.3.1 *Geschlecht und Alter*

Ob das Geschlecht einen Einfluss auf den Zusammenhang zwischen dem Alter bei Diagnosestellung (UV) und die SAMHD1 (AV) hatte, wurde in einer Moderationsanalyse überprüft. Um die Voraussetzungen zur Regressionsanalyse zu erfüllen, wurden einflussreiche Werte, welche die Cook's Distance von $4/(n - p - 1)$ überschritten, entfernt. Zudem wurde die AV logarithmisch transformiert, sodass die Residuen anschließend annähernd normalverteilt waren. Die Voraussetzungen konnten als ausreichend erfüllt betrachtet werden.

Tabelle 4.10: Moderationsanalyse zum Einfluss des Geschlechts auf den Zusammenhang des Alters und der SAMHD1 Expression

	Regressions- koeffizient	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert
Konstante	6,683	0,467		0,000
Alter	-0,619	0,041	-1,500	0,137
Geschlecht	0,514	0,615	0,836	0,406
Alter x GE	- 0,004	0,053	-0,071	0,943

Anmerkung. AV: SAMHD1 Expression. GE = Geschlecht (weiblich=0, männlich=1), n = 88 Gesamtmodell: p-Wert: 0,048, $aR^2 = 0,057$

Es resultierte ein Gesamtmodell, das signifikant war, $p=0,048$, jedoch aussagte, dass das Geschlecht den Zusammenhang zwischen Alter bei Diagnosestellung und SAMHD1 Expression nicht beeinflusste, $p= 0,943$ (s. Tabelle 4.10).

4.3.3.2 Geschlecht und Remission

Der Einfluss des Geschlechts auf den Remissionserfolg im Zusammenhang mit der SAMHD1 Expression (AV) sollte in der folgenden Regression analysiert werden. Nachdem sechs Werte, die die oben definierte Cook's Distance überschritten haben, entfernt wurden, wurden alle Voraussetzungen hinreichend erfüllt.

Tabelle 4.11: Moderationsanalyse zum Einfluss des Geschlechts auf den Zusammenhang eines Remissionserfolges und der SAMHD1 Expression

	Regressions- koeffizient	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert
Konstante	380,0	399,7		0,000
Remission	465,8	426,3	1,093	0,278
Geschlecht	2503,3	610,5	4,100	0,0001
REM x GE	- 2275,1	642,3	-3,542	0,0007

Anmerkung. AV: SAMHD1 Expression. REM = Remission, GE = Geschlecht (0 = weiblich, 1= männlich), n = 72, Gesamtmodell: p-Wert: 0,0004, $aR^2 = 0,197$

Das Ergebnis in Tabelle 4.11 zeigt ein hochsignifikantes Gesamtmodell, $p=0,0004$.

Ergebnisse

Männliche Patienten, die die Remission nicht erreichten, hatten einen höheren SAMHD1 Wert, als männliche Patienten, die die Remission erreichten. Außerdem war der SAMHD1 Wert der männlichen Patienten, die die Remission nicht erreichten, höher als die SAMHD1 Expression der weiblichen Patientinnen, die die Remission nicht erreichten (siehe Abbildung 4.13).

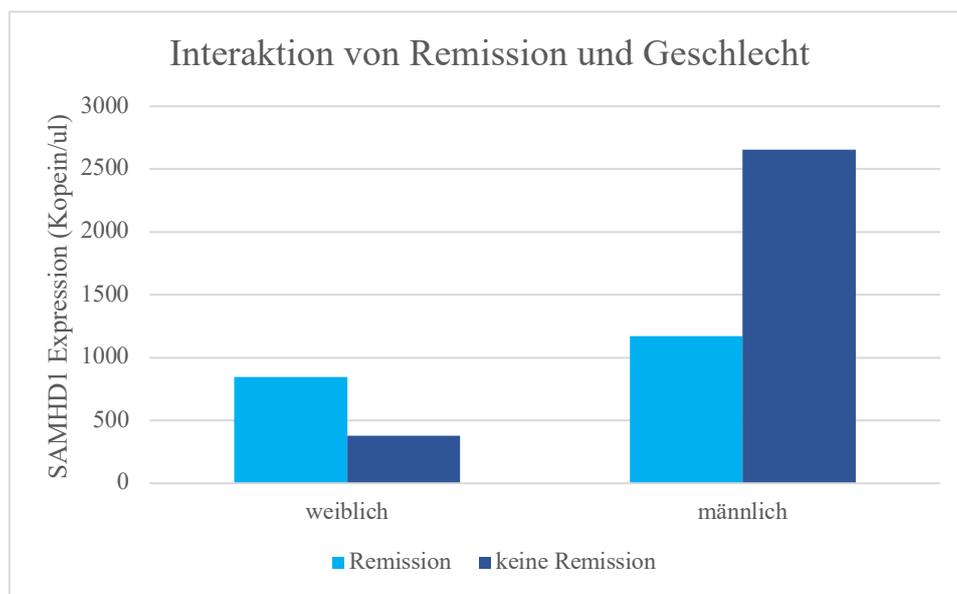


Abbildung 4.13: SAMHD1 Mittelwerte der weiblichen und männlichen Patienten beim Erreichen der Remission ($n=66$) und bei Nicht Erreichen der Remission ($n=12$), $p=0,0007$

4.3.3.3 Alter und Remission

Ob das Alter den Zusammenhang zwischen dem Erreichen der Remission und der SAMHD1 Expression hatte, wurde in folgender Analyse überprüft. In der Regression stellte die SAMHD1 Expression die abhängige Variable dar. Werte, die die Cook's Distance überschritten, wurden bei der Rechnung nicht berücksichtigt. Die Voraussetzungen der Regressionsanalyse wurden hinreichend erfüllt.

Tabelle 4.12: Moderationsanalyse zum Einfluss des Alters bei Diagnosestellung auf den Zusammenhang eines Remissionserfolges und der SAMHD1 Expression

	Regressions- koeffizient	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert
Konstante	549,1	624,0	0,880	0,382
Remission	731,2	657,9	1,112	0,270
Alter	110,4	68,8	1,605	0,113
REM x Alter	-140,4	71,1	-1,975	0,052

Anmerkung. AV: SAMHD1 Expression, REM = Remission, n=70, Gesamtmodell: p-Wert: 0,09947, $aR^2 = 0,049$

Es resultierte ein Gesamtmodell, welches nicht gegen die Nullhypothese abgesichert werden konnte, $p = 0,09947$ (s. Tabelle 4.12).

4.3.3.4 Risikostratifizierung und Remission

Die letzte Moderationsanalyse prüfte den Einfluss der Risikostratifizierung auf den Zusammenhang des Remissionserfolges und der SAMHD1 Expression (AV). Werte, deren Abweichung mehr als $4/(n - p - 1)$ der Cook's Distance überschritten, wurde aus der Rechnung ausgeschlossen. Nach den Anpassungen wurden alle Voraussetzungen einer Regressionsanalyse erfüllt.

Tabelle 4.13: Moderationsanalyse zum Einfluss der Risikostratifizierung auf den Zusammenhang eines Remissionserfolges und der SAMHD1 Expression

	Regressions- koeffizient	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert
Konstante	457,4	572,2	0,800	0,427
Remission	872,1	601,6	1,450	0,152
IR	1515,0	809,2	1,872	0,066
HR	2008,7	738,7	2,719	0,008
REM x IR	-2041,4	840,1	-2,430	0,018
REM x HR	-2370,7	830,3	-2,855	0,006

Anmerkung. AV: SAMHD1 Expression. REM = Remission, IR = Intermediäres Risiko, HR = Hochrisiko, n = 72, Gesamtmodell: p-Wert: 0,0045, $aR^2 = 0,164$

Ergebnisse

In Tabelle 4.13 ist ein signifikantes Modell ($p=0,0045$) zu sehen. Kinder, die in der IR oder der HR eingestuft wurden, wiesen bei Erreichen der Remission eine signifikant geringere SAMHD1 Expression aufwiesen als Kinder, die in die Standardgruppe fielen. Zudem fiel auf, dass Patienten in der IR und der HR bei nicht Erreichen der Remission einen signifikant höheren SAMHD1 Wert aufwiesen, als die Kinder in den jeweiligen Gruppen, die einen Remissionserfolg verzeichnen konnten (s. Abbildung 4.14).

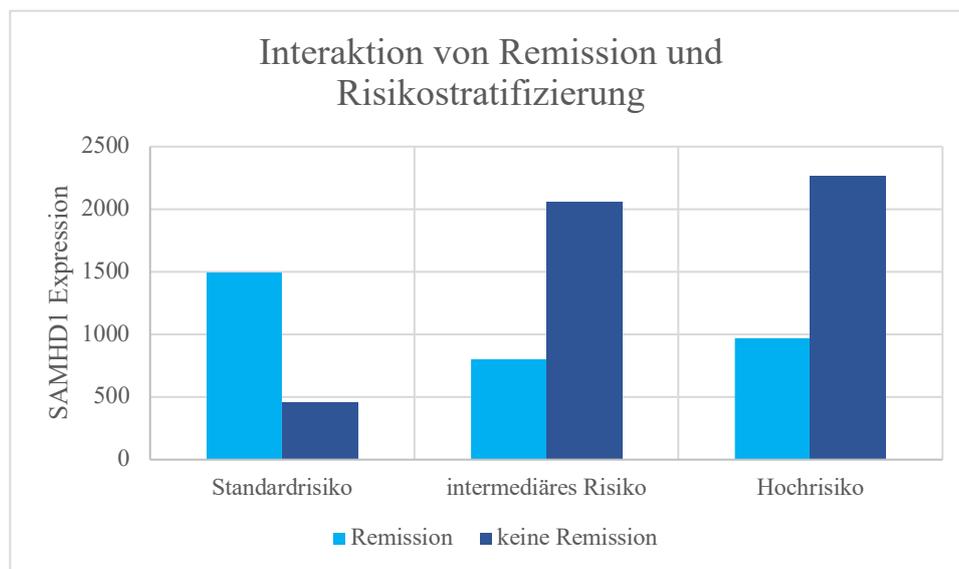


Abbildung 4.14: SAMHD1 Mittelwerte der Patienten, aufgeteilt nach Risikostratifizierung, in Abhängigkeit des Remissionserfolges SR $n=29$, IR $n=50$ $p=0,018$, HR $n=13$ $p=0,006$

5 Diskussion

Um die oben genannten Fragestellungen zu klären, wurde die SAMHD1 Expression in verschiedenen myeloischen und lymphatischen Zelllinien untersucht. Zusätzliche wurden 92 Patienten in die Analysen eingeschlossen. Da es sich um initiale Knochenmarkspunktionen von Patienten handelte, bei denen die Blasten nicht aus dem Knochenmark isoliert wurden, machte die Blastenzahl während der Versuche in über 80 initialen Knochenmarkspunktionen zwischen 50 und 90 % der Probe aus. Die Blastenzahl wurde initial morphologisch durch das AML-Referenzlabor bestimmt. Die durchgeführte Regressionsanalyse ($p=0,199$), die in Tabelle 4.3 dargestellt ist, und andere Studien bewiesen, dass der prozentuale Blastenanteil nicht mit der Höhe der SAMHD1 Expression korrelierte (Rassidakis et al., 2018). Aus dem Grund wurde kein Korrekturfaktor für die Analysen verwendet. Die Ergebnisse des eingesetzte statistische T-Test und der daraus resultierende p-Wert müssen jeweils kritisch betrachtet werden. Zwar kann der p-Wert bei der statistischen Abschätzung der Signifikanz helfen, jedoch sollte dieser nicht als Gütekriterium angenommen werden (Victor et al., 2010). Der p-Wert wurde demnach unter Vorbehalt verwendet.

In den Versuchen konnte in allen AML - Zelllinien und Patientenproben eine SAMHD1 Expression nachgewiesen werden. Im Vergleich zu anderen Zellen und Geweben des menschlichen Körpers ist die SAMHD1 Konzentration in hämatopoetischen kernhaltigen Zellen erhöht (Schmidt et al., 2015). Ein Grund dafür könnte die zellschützende Funktion des Enzyms sein, die bei der retroviralen Infektionsabwehr besonders bei hämatopoetischen Zellen notwendig ist (Kim et al., 2012b; Schmidt et al., 2015). Die untersuchten Blasten, die aus Knochenmarkaspiraten stammten und die Blasten, die aus peripherem Blut von Patienten isoliert wurden, unterschieden sich in der Höhe der SAMHD1 Expression nicht signifikant. Eine Zelllinie, die aus isolierten Blasten eines Pleurapunktats stammte, wies ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der SAMHD1 Expression auf.

Das Verteilungsmuster der SAMHD1 Expression in den Zelllinien, die aus Zellen von Patienten mit der Diagnose AML stammten, sowie der Patientenproben zeigten eine sehr heterogene SAMHD1 Expression. Die großen Unterschiede in der Ausprägung von

Diskussion

SAMHD1 könnten durch die heterogene Ausprägung der AML bedingt sein, die sich durch unterschiedliche morphologische und genetische Subgruppen auszeichnet. Ursächlich für die Erkrankung sind unter anderem zahlreiche Mutationen, Translokationen und Chromosomenaberrationen (Cancer Genome Atlas Research et al., 2013). Dieser Sachverhalt könnte die heterogene Expression zwischen den AML – Zelllinien erklären (Kodigepalli et al., 2018).

Betrachtet man die ALL-Zelllinien im Vergleich zu den AML-Zelllinien, so fällt auf, dass die ALL-Blasten im Durchschnitt eine geringere SAMHD1 Expression aufwiesen. Diese Beobachtung stellte allerdings lediglich einen Trend dar und war nicht statistisch signifikant ($p=0,92$). Rothenburger et al. beschrieben bereits 2020 eine statistisch signifikante geringere SAMHD1 Expression bei ALL-Blasten verglichen mit myeloischen Blasten. Diese Feststellung bezog sich allerdings vor allem auf die T-ALL. Die in diesen Versuchen untersuchten ALL-Zelllinien wurden aus B-Zell-Neoplasien isoliert, welche insgesamt eine höhere SAMHD1 Expression als die T-ALL aufweisen (Rothenburger et al., 2020). Dies könnte ein Grund sein, weshalb der Unterschied zwischen den SAMHD1 Expressionen der B-ALL- und den AML-Zelllinien in dieser Arbeit nur minimal ist.

Die untersuchten Zelllinien, die eine CML repräsentierten, zeigten ebenfalls durchschnittlich eine geringere SAMHD1 Expression als die AML-Zelllinien, was auf die geringere Zellaktivität der chronischen myeloischen Leukämie in der chronischen und in der akzelerierten Phase zurückzuführen sein könnte (Wu et al., 2007). Diese Beobachtung war in dieser Studie jedoch nicht signifikant ($p=0,61$).

Die Zelllinie THP1 KO wurde durch CRISP/Cas9 modifiziert, in dem die für *SAMHD1* codierenden Gensequenzen durch die Endonuklease Cas9 herausgeschnitten wurden. Demnach sollte in den Blasten keine SAMHD1 Expression in der ddPCR festgestellt werden. In den durchgeführten Versuchen, in denen immer sowohl THP1 als auch die modifizierte Variante THP1 KO untersucht wurden, zeigte sich in beiden Zelllinien stets eine vergleichbare SAMHD1 Expression. Zwar war die Expression der modifizierten Zelllinie um über 2500 Kopien/ μ l geringer als in der THP1-Zelllinie, jedoch war sie mit

Diskussion

durchschnittlich 704 Kopien/ μ l deutlich positiv. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte eine frühe Verunreinigung der THP1 KO-Kultur mit unmodifizierten THP1 Blasten sein. Das würde die geringeren, jedoch positiven ddPCR Ergebnisse für THP1 KO erklären.

Betrachtet man die AML-Zelllinien, so fällt auf, dass die SAMHD1-Expression innerhalb der FAB-Klassifikationsgruppen ebenfalls heterogen verteilt war. Während die meisten Untergruppen nur eine geringe SAMHD1 Expression zeigten, wiesen die Zelllinien der akuten Monozyten-Leukämie (M5) eine deutlich erhöhte Expression auf. Monozyten haben eine wichtige Rolle in der zellulären Immunreaktion. SAMHD1 ist als dNTP-Hydrolase ein wichtiges Enzym der antiviralen Infektabwehr und wird deshalb vermehrt in Monozyten exprimiert (Johansson et al., 2018). Diese Tatsache liefert eine Erklärung für die hohe SAMHD1 Expression in den Zelllinien der AML M5. Die Auswertung der SAMHD1 Expression der Patientenproben hinsichtlich der FAB-Klassifikationen stellt ein ähnlich heterogenes Bild dar. Während die Expressionen für die Untergruppen M4, M5 und M7 bei den Patientenproben und den Zelllinien annähernd ähnlich waren, unterschieden sie sich in den anderen Untergruppen enorm. In den Patientenproben bot die akute Monozyten-Leukämie (M5) ebenfalls im Durchschnitt die höchsten SAMHD1 Expressionen. Frühere Studien belegen, dass Patienten, bei denen eine M5 diagnostiziert wurde, ein schlechteres Therapieansprechen und damit ein schlechteres Gesamtüberleben aufweisen (Chang et al., 2000). Die hohe SAMHD1 Expression könnte einen Grund für das schlechtere Therapieansprechen darstellen. Die großen Unterschiede innerhalb der FAB-Klassifikationen, sowie zwischen den Patientenproben und den Zelllinien lassen sich auf die inhomogene Verteilung der SAMHD1 Expressionen zurückführen. Sie unterstreichen außerdem, dass die FAB-Klassifikationen keine generelle Auskunft über die Höhe der SAMHD1 Expression geben kann.

Bei der Auswertung der SAMHD1 Expression der Patientenproben hinsichtlich des Geschlechts, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern ($p=0,25$). Analysen der TARGET-Database (Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments) kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die SAMHD1 Expression bei männlichen und weiblichen pädiatrischen Patienten keine

Diskussion

Divergenz aufweist (McLaughlin et al., 2021). Somit hatte im Kindesalter das Geschlecht grundsätzlich keinen Einfluss auf die Ausprägung der SAMHD1 Expression. Im Gegensatz dazu hatte das zunehmende Alter der Patienten einen signifikanten Einfluss auf die Höhe der SAMHD1 Expression ($p=0,011$). So zeigten ältere Kinder durchschnittlich eine niedrigere SAMHD1 Expression. Die allgemeine Zellaktivität des Knochenmarks ist in der ersten Lebensdekade aufgrund des stetigen Wachstums der Kinder höher als in den späteren Lebensdekaden (Ogawa et al., 2000). Dazu passend war auch die SAMHD1 Expression in den ersten Lebensjahren höher. Die in dieser Arbeit durchgeführten Moderationsanalysen zeigten, dass das Geschlecht den Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsalter und der SAMHD1 Expression nicht signifikant beeinflusste ($p=0,943$).

Zu Beginn des Therapieprotokolls werden die Patienten anhand der Risikostratifizierung in verschiedene Therapiearme eingeschlossen. Die Zuordnung erfolgt primär anhand zytogenetischer Unterschiede in verschiedene Risikogruppen (Creutzig et al., 2001). Die SAMHD1 Expressionen der verschiedenen Risikogruppen unterschieden sich nicht signifikant ($p=0,725$). Die Zuteilung in eine Risikogruppe konnte also isoliert betrachtet keine generelle Auskunft über die Höhe der SAMHD1 Expression geben. In dieser Studie konnte allerdings festgestellt werden, dass männliche Patienten innerhalb der IR und der HR eine höhere SAMHD1 Expression aufwiesen.

Innerhalb der eingeschlossenen Patientenkohorte erreichten 12 Patienten (13%) die komplette Remission nicht. Seit 1987 wird das Therapieprotokoll der pädiatrischen AML kontinuierlich überarbeitet und verbessert. So verzeichnete sich ein Rückgang der Non-Responder von 16,3 % im Jahr 1987 auf 12,3% Non-Responder im Jahr 2010 (Rasche et al., 2018). Ein Basiselement der Therapie stellt das Nukleosidanalogen Cytarabin (Ara-C) dar. Ein gutes Therapieergebnis hängt wesentlich von einer hohen intrazellulären Ara-C beziehungsweise Ara-CTP Konzentration ab (Zittoun et al., 1987). Mit seiner Enzymaktivität kann SAMHD1 Ara-CTP hydrolisieren und somit als Zytostatikum inaktivieren (Mauney and Hollis, 2018; Schneider et al., 2017).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen ergaben signifikant ($p=0,012$) niedrigere SAMHD1 Expressionen bei den Kindern, die die CR erreichten. Bereits andere Arbeitsgruppen kamen zu dem Ergebnis, dass eine niedrige SAMHD1 Konzentration mit einem positiven Therapieansprechen (Rassidakis et al., 2018; Schneider et al., 2017) und einem besseren Gesamtüberleben (Herold et al., 2017b) korreliert. Interessanterweise sahen Herold et al. zwar eine Korrelation einer niedrigen SAMHD1 Expression mit dem Gesamtüberleben, jedoch nicht mit dem Therapieansprechen in Form des Erreichens der CR (Herold et al., 2017b). Die Tatsache, dass SAMHD1 die zytostatische Wirkung von Cytarabin hemmt, lässt vermuten, dass früheres Therapieansprechen mit einer sehr niedrigen SAMHD1 Expression korreliert. Die SAMHD1 Expressionen abhängig von dem Therapieblock, in dem die CR erreicht wurde, fallen jedoch in dieser Studie interessanterweise erst mit Zunahme der Therapiedauer. Diese Diskrepanz wurde ebenfalls von verschiedenen Studiengruppen festgestellt und diskutiert (Herold et al., 2017b; Rassidakis et al., 2018). Neben der Hydrolase-Aktivität von SAMHD1 wurde veröffentlicht, dass das Protein auch eine tumorsupprimierende Wirkung haben könnte (Wang et al., 2014). So ließe sich erklären, weshalb die SAMHD1 Konzentration der Kinder, die die CR früh erreichen zwar durch die Hydrolaseaktivität des Enzyms signifikant geringer war, als bei den Nonrespondern, jedoch ist im Vergleich zu den Kindern, die die CR später erreichen aufgrund der zusätzlich tumorsupprimierenden Wirkung erhöht sein kann.

Um den Zusammenhang der kompletten Remission und der Höhe der SAMHD1 Expression bei den Patienten genauer aufzuklären, wurden die Interaktionen zwischen verschiedenen Variablen und dem Erreichen der Remission untersucht. Grundsätzlich ist bekannt, dass das Therapieansprechen auf Cytarabin bei weiblichen Patienten besser ist als bei männlichen Patienten (Chang et al., 2000; Hossain and Xie, 2015). Die SAMHD1 Expression der Mädchen, die die CR erreichten, lag unterhalb der SAMHD1 Expression der männlichen Patienten. Es stellte sich zudem heraus, dass männliche Patienten, die auf die Therapie nicht ansprachen, im Schnitt eine signifikant ($p= 0,004$) höhere SAMHD1 Expression aufwiesen als weibliche Patientinnen, die die Remission nicht erreichten. Das männliche Geschlecht beeinflusst also den Zusammenhang zwischen der Remission und der SAMHD1 Expression signifikant ($p=0,0007$). Ein Grund, für die schlechtere

Diskussion

Prognose der männlichen Patienten und das schlechtere Therapieansprechen könnten biologische und hormonelle Unterschiede der Geschlechter sein (Hossain and Xie, 2015).

Die Regressionsanalyse dieser Arbeit ergab zwar eine fallende SAMHD1 Expression mit zunehmendem Patientenalter bei Diagnosestellung, jedoch hatte das Erkrankungsalter keinen deutlich signifikanten Einfluss ($p=0,052$) auf den Zusammenhang zwischen Remission und SAMHD1 Expression. Es fand sich eine Tendenz, dass Nonresponder mit zunehmendem Erkrankungsalter eine niedrigere SAMHD1 Expression aufwiesen. Säuglinge, die an einer akuten myeloischen Leukämie erkrankten, hatten häufig eine schlechtere Risikokonstellation und ein schlechteres Gesamtüberleben als andere Kinder (Chang et al., 2000). Sie weisen häufiger ungünstige zytogenetische Veränderungen auf (Pui et al., 2000) und haben häufiger extramedulläre Organbeteiligungen als andere Kinder (Creutzig et al., 2012b). Es bleibt also ungeklärt, ob das Alter den Zusammenhang zwischen der SAMHD1 Expression und der Remission tatsächlich beeinflusst oder ob es sich hier um eine zufällige Beobachtung handelte.

Die Risikostratifizierung nahm in den Analysen einen signifikanten Einfluss auf den Zusammenhang zwischen der Remission und der SAMHD1 Expression ($p=0,0045$). Nonresponder, die der Intermediären Risikogruppe zugeordnet wurden, wiesen eine signifikant höhere SAMHD1 Expression auf, als Patienten der IR, welche die Remission erreichten ($p=0,018$). Einen noch deutlicheren Unterschied stellten die Nonresponder der Hochrisikogruppe im Gegensatz zu den Kindern, die die Remission in der HR erreichten, dar. In der HR war die SAMHD1 Expression ebenfalls deutlich erhöht, wenn die CR nicht erreicht wurde ($p=0,006$). Diese Beobachtung unterstreicht die Vermutung, dass es sich bei SAMHD1 um ein Protein handelt, welches den Therapieerfolg vorhersagen kann und somit als zellulärer Biomarker fungiert (Schneider et al., 2017). Durch eine frühe Induktion mit HAM wurde das Gesamtüberleben bei Hochrisikopatienten deutlich verbessert (Creutzig et al., 2001). Es wäre möglich, dass die HR-Patienten unter anderem aufgrund der höheren SAMHD1 Expressionen erst von einer Hochdosis-Cytrabintherapie profitieren.

5.1 Kritische Auseinandersetzung und Schlussfolgerungen

Die digitale droplet PCR erwies sich in dieser Arbeit als präzise und zuverlässige Methode. Da es sich bei der ddPCR um eine absolute Quantifizierung handelt, bedurfte es keiner Referenzgene oder endogenen Kontrollen (Kuhlmann et al., 2021). Dieser wesentliche Faktor ist ein großer Vorteil gegenüber der standardmäßig genutzten Real-Time PCR, welche maßgeblich von Referenzgenen abhängig ist (Yang et al., 2014). Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit, der Wiederholbarkeit und der Sensitivität werden für beide Methoden keine signifikanten Unterschiede beschrieben (Arvia et al., 2017). Allerdings stellte die Benutzung der ddPCR einen erhöhten Zeitaufwand dar, welcher vermutlich im diagnostischen Alltag häufig nicht zufriedenstellend gewährleistet werden kann. Zudem sind die Kosten der ddPCR Methode gegenüber der RT-PCR erhöht (Yang et al., 2014).

Es handelt sich bei der akuten myeloischen Leukämie im Kindesalter mit einer Inzidenz von 7 auf 1.000.000 Einwohnern um eine seltene Neoplasie (Yiallourous and Creutzig, 2012). Aus dem Grund ist die Anzahl der eingeschlossenen Patienten in die Studie mit 92 Proben, im Vergleich zu Studien der adulten AML, geringer. Daraus resultiert, dass die Aussagekraft vieler statistischer Tests abnimmt und vor allem Fehler 1. Art, Nullhypothese wird fälschlicherweise zurückgewiesen, und Fehler 2. Art, Nullhypothese wird fälschlicherweise angenommen, entstehen (Döring and Bortz, 2016).

Des Weiteren handelte es sich bei den verwendeten Patientenproben um die unbehandelten initialen Patientenproben. Wie jedoch bereits diskutiert, korrelierte die Blastenzahl nicht mit der Höhe der SAMHD1 Expression. Die durchgeführten Analysen beruhten alle alleinig auf der molekulargenetischen Auswertung der SAMHD1 Expression. Es kann demnach keine genaue Aussage über die tatsächliche Aktivität des SAMHD1 Proteins vorgenommen werden. Zukünftige Studien könnten prüfen, ob die in dieser Arbeit erlangten Informationen sich ebenfalls auf Proteinebene reproduzieren ließen.

Diskussion

Trotz all der oben genannten Einschränkungen ließen sich durch diese Arbeit folgende Feststellungen vornehmen:

- Die Höhe der SAMHD1 Expression nahm mit zunehmendem Erkrankungsalter signifikant ($p=0,011$) ab.
- Männliche Patienten, die die Remission nicht erreichten, wiesen durchschnittlich eine erhöhte SAMHD1 Expression auf ($p=0,0004$).
- Nonresponder, die anhand der Risikostratifizierung in die Intermediäre Risikogruppe und in die Hochrisikogruppe eingeordnet wurden, wiesen eine erhöhte SAMHD1 Expression auf ($p=0,0045$).
- Bei der pädiatrischen akuten myeloischen Leukämie korrelierte die SAMHD1 Expression signifikant mit dem Therapieerfolg. Nonresponder verzeichneten gegenüber den Patienten, die die Remission erreichten, eine höhere SAMHD1 Expression ($p=0,012$).

Die Mehrzahl der aktuellen Studien zum Therapieansprechen befasst sich mit der adulten AML und ist nicht immer auf das pädiatrische Krankheitsbild zu übertragen (Chang et al., 2000). Die Feststellung der Übertragbarkeit der bereits gewonnenen Informationen über den Zusammenhang der SAMHD1 Expression und der Cytarabinresponse der adulten Form der AML, auf die pädiatrische AML, ist in dieser Arbeit erstmals erfolgt und kann von hoher klinischer Bedeutung für die pädiatrischen Patienten sein.

Aktuell wird untersucht, inwieweit die medikamentöse Hemmung von SAMHD1, während der Cytarabintherapie den Therapieerfolg beeinflussen und so das Gesamtüberleben verbessern kann (Herold et al., 2017a; Schneider et al., 2017). Ein möglicher Ansatz wäre die Verabreichung von vpx, einem Protein, welches in Typ 2 HI Viren vorkommt. Studien zeigten, dass die Hydrolaseaktivität von SAMHD1 im Beisein von vpx signifikant reduziert, war (Laguet et al., 2011) und so das Cytarabinansprechen

Diskussion

verbessert werden konnte (Herold et al., 2017a). Andere Arbeitsgruppen postulieren, gezielte SAMHD1 Inhibitoren als Kombinationstherapie bei allen AML-Patienten anzuwenden (Hollenbaugh et al., 2017). Diese neuen Ansätze in der AML-Therapie könnten auch den pädiatrischen Patienten helfen, die Anzahl des Therapieversagen zu minimieren und das Gesamtüberleben der Kinder mit akuter myeloischer Leukämie weiter zu verbessern.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Fassung

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 120-150 Kinder an einer akuten myeloischen Leukämie (AML) und erhalten daraufhin eine zytostatische Therapie, die von der AML-BFM-Studiengruppe erstellt wurde. Ein wichtiges Therapieelement ist Cytarabin, ein Cytidinanalogon, welches den Abbruch der Desoxyribonukleinsäure (DNA) - Synthese indiziert. Trotz stetiger Weiterentwicklung des Studienprotokolls erreichen 13% der Patienten die komplette Remission (CR) nicht und gelten demnach als Nonresponder (NR). Aktuelle Studien ergaben, dass das Enzym Sterile Alpha Motif and Histidine-Aspartic acid domain containing protein 1 (SAMHD1) die Cytarabinresponse verringern kann. Die Hydrolaseaktivität von SAMHD1 sorgt für die präzise Regulation des intrazellulären Nukleosidtriphosphat (NTP)-Pools und kann somit auch intrazelluläres Cytarabin abbauen. In dieser Arbeit wurde die SAMHD1 Expression in Zelllinien und in initialen Knochenmarkspunktionen von pädiatrischen Patienten mittels digitaler droplet Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR) untersucht. Es stellte sich heraus, dass die SAMHD1 Expression mit zunehmendem Alter abfiel ($p=0,011$). Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Therapieansprechen und der SAMHD1 Expression. Nonresponder verzeichneten gegenüber den Patienten, die die CR erreichten, eine höhere SAMHD1 Expression ($p=0,012$). Außerdem wurde bei männlichen NR und bei NR in der intermediären Risikogruppe und der Hochrisikogruppe ebenfalls eine erhöhte SAMHD1 Expression festgestellt ($p=0,0004$). Die Auswertungen zeigen also erstmalig einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Cytarabinresponse bei Kindern und der SAMHD1 Expression. Die neuen Erkenntnisse über den Zusammenhang des Remissionserfolgs und der SAMHD1 Expression in der pädiatrischen AML könnten helfen, die Therapie zu optimieren, in dem potenzielle Nonresponder früh identifiziert werden können und die Therapie entsprechend angepasst werden kann.

6.2 Englische Fassung

Every year, about 120-150 children in Germany develop acute myeloid leukemia (AML) and receive cytostatic therapy, which was established by the AML-BFM study group. An important therapeutic component is cytarabine, a cytidin analogue, that indicates the termination of deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis. Despite constant advancement of the study protocol, 13% of patients do not achieve complete remission (CR) and are consequently considered non-responders (NR). Recent studies revealed that the enzyme Sterile Alpha Motif and Histidine-Aspartic acid domain containing protein 1 (SAMHD1) can decrease cytarabine response. The hydrolase activity of SAMHD1 provides precise regulation of the intracellular nucleoside triphosphate (NTP) pool and thus can also decrease intracellular cytarabine. In this study, SAMHD1 expression in cell lines and in initial bone marrow aspirates from pediatric patients was examined by digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR). SAMHD1 expression decreased with increasing age ($p=0,011$). Furthermore, there was a significant correlation between treatment response and SAMHD1 expression. Nonresponders recorded higher SAMHD1 expression compared with patients who achieved CR ($p=0,012$). In addition, male NR and NR in the intermediate-risk group and high-risk group were also detected to have increased SAMHD1 expression ($p=0,0004$). Thus, the analysis shows for the first time a significant association between cytarabine response in children and SAMHD1 expression. The new data on the relationship between remission success and SAMHD1 expression in pediatric AML may help to optimize therapy by identifying potential nonresponders early and adjusting therapy accordingly.

7 Literaturverzeichnis

1. Ahn, J. (2016). Functional organization of human SAMHD1 and mechanisms of HIV-1 restriction. *Biol Chem* 397, 373-379.
2. Aigner, K.R., Stephens, F.O., Allen-Mersh, T., Hortobagyi, G., Khayat, D., Picksley, S.M., Sugarbaker, P., Taguchi, T., and Thompson, J.F. (2016). Leukämien und Lymphome. In *Onkologie Basiswissen*, K.R. Aigner, and F.O. Stephens, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 223-239.
3. Amaki, J., Onizuka, M., Ohmachi, K., Aoyama, Y., Hara, R., Ichiki, A., Kawai, H., Sato, A., Miyamoto, M., Toyosaki, M., Machida, S., Kojima, M., Shirasugi, Y., Kawada, H., Ogawa, Y., and Ando, K. (2015). Single nucleotide polymorphisms of cytarabine metabolic genes influence clinical outcome in acute myeloid leukemia patients receiving high-dose cytarabine therapy. *Int J Hematol* 101, 543-553.
4. Aravind, L., and Koonin, E.V. (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends in biochemical sciences* 23, 469-472.
5. Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391-2405.
6. Arvia, R., Sollai, M., Pierucci, F., Urso, C., Massi, D., and Zakrzewska, K. (2017). Droplet digital PCR (ddPCR) vs quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies. *Journal of Virological Methods* 246, 15-20.
7. Babushok, D.V., Bessler, M., and Olson, T.S. (2016). Genetic predisposition to myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in children and young adults. *Leukemia & lymphoma* 57, 520-536.
8. Beloglazova, N., Flick, R., Tchigvintsev, A., Brown, G., Popovic, A., Nocek, B., and Yakunin, A.F. (2013). Nuclease activity of the human SAMHD1 protein implicated in the Aicardi-Goutieres syndrome and HIV-1 restriction. *The Journal of biological chemistry* 288, 8101-8110.
9. Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., and van't Veer, M.B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9, 1783-1786.
10. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology* 33, 451-458.

11. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1985). Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of internal medicine* 103, 460-462.
12. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1991). Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *British journal of haematology* 78, 325-329.
13. Bonifati, S., Daly, M.B., St Gelais, C., Kim, S.H., Hollenbaugh, J.A., Shepard, C., Kennedy, E.M., Kim, D.H., Schinazi, R.F., Kim, B., and Wu, L. (2016). SAMHD1 controls cell cycle status, apoptosis and HIV-1 infection in monocytic THP-1 cells. *Virology* 495, 92-100.
14. Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3, 730-737.
15. Boos, J. (1992). [Is the pharmacokinetic profile of cytarabine clinically relevant?]. *Klinische Padiatrie* 204, 198-203.
16. Cancer Genome Atlas Research, N., Ley, T.J., Miller, C., Ding, L., Raphael, B.J., Mungall, A.J., Robertson, A.G., Hoadley, K., Triche, T.J., Jr., Laird, P.W., Baty, J.D., Fulton, L.L., Fulton, R., Heath, S.E., Kalicki-Veizer, J., Kandoth, C., Klco, J.M., Koboldt, D.C., Kanchi, K.-L., Kulkarni, S., Lamprecht, T.L., Larson, D.E., Lin, L., Lu, C., McLellan, M.D., McMichael, J.F., Payton, J., Schmidt, H., Spencer, D.H., Tomasson, M.H., Wallis, J.W., Wartman, L.D., Watson, M.A., Welch, J., Wendl, M.C., Ally, A., Balasundaram, M., Birol, I., Butterfield, Y., Chiu, R., Chu, A., Chuah, E., Chun, H.-J., Corbett, R., Dhalla, N., Guin, R., He, A., Hirst, C., Hirst, M., Holt, R.A., Jones, S., Karsan, A., Lee, D., Li, H.I., Marra, M.A., Mayo, M., Moore, R.A., Mungall, K., Parker, J., Pleasance, E., Plettner, P., Schein, J., Stoll, D., Swanson, L., Tam, A., Thiessen, N., Varhol, R., Wye, N., Zhao, Y., Gabriel, S., Getz, G., Sougnez, C., Zou, L., Leiserson, M.D.M., Vandin, F., Wu, H.-T., Applebaum, F., Baylin, S.B., Akbani, R., Broom, B.M., Chen, K., Motter, T.C., Nguyen, K., Weinstein, J.N., Zhang, N., Ferguson, M.L., Adams, C., Black, A., Bowen, J., Gastier-Foster, J., Grossman, T., Lichtenberg, T., Wise, L., Davidsen, T., Demchok, J.A., Shaw, K.R.M., Sheth, M., Sofia, H.J., Yang, L., Downing, J.R., and Eley, G. (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 368, 2059-2074.
17. Chang, M., Raimondi, S.C., Ravindranath, Y., Carroll, A.J., Camitta, B., Gresik, M.V., Steuber, C.P., and Weinstein, H. (2000). Prognostic factors in children and adolescents with acute myeloid leukemia (excluding children with Down syndrome and acute promyelocytic leukemia): univariate and recursive partitioning analysis of patients treated on Pediatric Oncology Group (POG) Study 8821. *Leukemia* 14, 1201-1207.
18. Clifford, R., Louis, T., Robbe, P., Ackroyd, S., Burns, A., Timbs, A.T., Wright Colopy, G., Dreau, H., Sigaux, F., Judde, J.G., Rotger, M., Telenti, A., Lin, Y.L., Pasero, P., Maelfait, J., Titsias, M., Cohen, D.R., Henderson, S.J., Ross, M.T., Bentley, D.,

Hillmen, P., Pettitt, A., Rehwinkel, J., Knight, S.J., Taylor, J.C., Crow, Y.J., Benkirane, M., and Schuh, A. (2014). SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage. *Blood* *123*, 1021-1031.

19. Creutzig, U., Henze, G., Bielack, S., Herold, R., Kaatsch, P., Klussmann, J.-H., Graf, N., Reinhardt, D., Schrappe, M., and Zimmermann, M. (2003). Krebserkrankungen bei Kindern. *Deutsches Ärzteblatt* *100*, A842.

20. Creutzig, U., and Reinhardt, D. (2022). Akute myeloische Leukämie. In *Kompodium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie* (Springer), pp. 1-15.

21. Creutzig, U., Ritter, J., Zimmermann, M., Reinhardt, D., Hermann, J., Berthold, F., Henze, G., Jürgens, H., Kabisch, H., Havers, W., Reiter, A., Kluba, U., Niggli, F., Gadner, H., and Group, f.t.A.M.L.B.-F.-M.S. (2001). Improved Treatment Results in High-Risk Pediatric Acute Myeloid Leukemia Patients After Intensification With High-Dose Cytarabine and Mitoxantrone: Results of Study Acute Myeloid Leukemia–Berlin-Frankfurt-Münster 93. *Journal of Clinical Oncology* *19*, 2705-2713.

22. Creutzig, U., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Gibson, B., Dworzak, M.N., Adachi, S., de Bont, E., Harbott, J., Hasle, H., Johnston, D., Kinoshita, A., Lehrnbecher, T., Leverger, G., Mejstrikova, E., Meshinchi, S., Pession, A., Raimondi, S.C., Sung, L., Stary, J., Zwaan, C.M., Kaspers, G.J., and Reinhardt, D. (2012a). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood* *120*, 3187-3205.

23. Creutzig, U., Zimmermann, M., Bourquin, J.P., Dworzak, M.N., Kremens, B., Lehrnbecher, T., von Neuhoff, C., Sander, A., von Stackelberg, A., Schmid, I., Stary, J., Steinbach, D., Vormoor, J., and Reinhardt, D. (2012b). Favorable outcome in infants with AML after intensive first- and second-line treatment: an AML-BFM study group report. *Leukemia* *26*, 654-661.

24. Creutzig, U., Zimmermann, M., Dworzak, M.N., Ritter, J., Schellong, G., and Reinhardt, D. (2013). Development of a curative treatment within the AML-BFM studies. *Klinische Padiatrie* *225 Suppl 1*, S79-86.

25. Creutzig, U., Zimmermann, M., Ritter, J., Reinhardt, D., Hermann, J., Henze, G., Jürgens, H., Kabisch, H., Reiter, A., Riehm, H., Gadner, H., Schellong, G., and for the, A.M.L.B.F.M.S.G. (2005). Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* *19*, 2030-2042.

26. Cros, E., Jordheim, L., Dumontet, C., and Galmarini, C.M. (2004). Problems related to resistance to cytarabine in acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma* *45*, 1123-1132.

27. Daddacha, W., Koyen, A.E., Bastien, A.J., Head, P.E., Dhere, V.R., Nabeta, G.N., Connolly, E.C., Werner, E., Madden, M.Z., Daly, M.B., Minten, E.V., Whelan, D.R., Schlafstein, A.J., Zhang, H., Anand, R., Doronio, C., Withers, A.E., Shepard, C., Sundaram, R.K., Deng, X., Dynan, W.S., Wang, Y., Bindra, R.S., Cejka, P., Rothenberg,

- E., Doetsch, P.W., Kim, B., and Yu, D.S. (2017). SAMHD1 Promotes DNA End Resection to Facilitate DNA Repair by Homologous Recombination. *Cell reports* 20, 1921-1935.
28. de Silva, S., Wang, F., Hake, T.S., Porcu, P., Wong, H.K., and Wu, L. (2014). Downregulation of SAMHD1 expression correlates with promoter DNA methylation in Sezary syndrome patients. *J Invest Dermatol* 134, 562-565.
29. Dohner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Buchner, T., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenaux, P., Larson, R.A., Levine, R.L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M.S., Tien, H.F., Wei, A.H., Lowenberg, B., and Bloomfield, C.D. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129, 424-447.
30. Döring, N., and Bortz, J. (2016). Stichprobenziehung. In *Forschungsmethoden und Evaluation in den Sozial- und Humanwissenschaften* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 291-319.
31. Franzolin, E., Pontarin, G., Rampazzo, C., Miazzi, C., Ferraro, P., Palumbo, E., Reichard, P., and Bianchi, V. (2013). The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 14272-14277.
32. Gilliland, D.G. (2002). Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Seminars in hematology* 39, 6-11.
33. Gunji, H., Kharbanda, S., and Kufe, D. (1991). Induction of internucleosomal DNA fragmentation in human myeloid leukemia cells by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer research* 51, 741-743.
34. Hamada, A., Kawaguchi, T., and Nakano, M. (2002). Clinical Pharmacokinetics of Cytarabine Formulations. *Clinical Pharmacokinetics* 41, 705-718.
35. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
36. Hasle, H., Niemeyer, C.M., Chessells, J.M., Baumann, I., Bennett, J.M., Kerndrup, G., and Head, D.R. (2003). A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia* 17, 277-282.
37. Herold, N., Rudd, S.G., Ljungblad, L., Sanjiv, K., Myrberg, I.H., Paulin, C.B.J., Heshmati, Y., Hagenkort, A., Kutzner, J., Page, B.D.G., Calderón-Montaña, J.M., Loseva, O., Jemth, A.-S., Bulli, L., Axelsson, H., Tesi, B., Valerie, N.C.K., Höglund, A., Bladh, J., Wiita, E., Sundin, M., Uhlin, M., Rassidakis, G., Heyman, M., Tamm, K.P., Warpman-Berglund, U., Walfridsson, J., Lehmann, S., Grandér, D., Lundbäck, T., Kogner, P., Henter, J.-I., Helleday, T., and Schaller, T. (2017a). Targeting SAMHD1 with

the Vpx protein to improve cytarabine therapy for hematological malignancies. *Nature medicine* 23, 256-263.

38. Herold, N., Rudd, S.G., Sanjiv, K., Kutzner, J., Bladh, J., Paulin, C.B.J., Helleday, T., Henter, J.I., and Schaller, T. (2017b). SAMHD1 protects cancer cells from various nucleoside-based antimetabolites. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 16, 1029-1038.

39. Hollenbaugh, J.A., Shelton, J., Tao, S., Amiralaie, S., Liu, P., Lu, X., Goetze, R.W., Zhou, L., Nettles, J.H., Schinazi, R.F., and Kim, B. (2017). Substrates and Inhibitors of SAMHD1. *PLoS One* 12, e0169052-e0169052.

40. Hossain, M.J., and Xie, L. (2015). Sex disparity in childhood and young adult acute myeloid leukemia (AML) survival: Evidence from US population data. *Cancer Epidemiol* 39, 892-900.

41. Johansson, P., Klein-Hitpass, L., Choidas, A., Habenberger, P., Mahboubi, B., Kim, B., Bergmann, A., Scholtysik, R., Brauser, M., Lollies, A., Siebert, R., Zenz, T., Dührsen, U., Küppers, R., and Dürig, J. (2018). SAMHD1 is recurrently mutated in T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood Cancer Journal* 8, 11.

42. Khoury, J.D., Solary, E., Abla, O., Akkari, Y., Alaggio, R., Apperley, J.F., Bejar, R., Berti, E., Busque, L., Chan, J.K.C., Chen, W., Chen, X., Chng, W.-J., Choi, J.K., Colmenero, I., Coupland, S.E., Cross, N.C.P., De Jong, D., Elghetany, M.T., Takahashi, E., Emile, J.-F., Ferry, J., Fogelstrand, L., Fontenay, M., Germing, U., Gujral, S., Haferlach, T., Harrison, C., Hodge, J.C., Hu, S., Jansen, J.H., Kanagal-Shamanna, R., Kantarjian, H.M., Kratz, C.P., Li, X.-Q., Lim, M.S., Loeb, K., Loghavi, S., Marcogliese, A., Meshinchi, S., Michaels, P., Naresh, K.N., Natkunam, Y., Nejati, R., Ott, G., Padron, E., Patel, K.P., Patkar, N., Picarsic, J., Platzbecker, U., Roberts, I., Schuh, A., Sewell, W., Siebert, R., Tembhare, P., Tyner, J., Verstovsek, S., Wang, W., Wood, B., Xiao, W., Yeung, C., and Hochhaus, A. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 36, 1703-1719.

43. Kim, B., Nguyen, L.A., Daddacha, W., and Hollenbaugh, J.A. (2012a). Tight interplay among SAMHD1 protein level, cellular dNTP levels, and HIV-1 proviral DNA synthesis kinetics in human primary monocyte-derived macrophages. *The Journal of biological chemistry* 287, 21570-21574.

44. Kim, B., Nguyen, L.A., Daddacha, W., and Hollenbaugh, J.A. (2012b). Tight Interplay among SAMHD1 Protein Level, Cellular dNTP Levels, and HIV-1 Proviral DNA Synthesis Kinetics in Human Primary Monocyte-derived Macrophages *. *Journal of Biological Chemistry* 287, 21570-21574.

45. Kim, E.T., White, T.E., Brandariz-Nunez, A., Diaz-Griffero, F., and Weitzman, M.D. (2013). SAMHD1 restricts herpes simplex virus 1 in macrophages by limiting DNA replication. *J Virol* 87, 12949-12956.

46. Kodigepalli, K.M., Bonifati, S., Tirumuru, N., and Wu, L. (2018). SAMHD1 modulates in vitro proliferation of acute myeloid leukemia-derived THP-1 cells through the PI3K-Akt-p27 axis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* *17*, 1124-1137.
47. Kufe, D.W., Major, P.P., Egan, E.M., and Beardsley, G.P. (1980). Correlation of cytotoxicity with incorporation of ara-C into DNA. *The Journal of biological chemistry* *255*, 8997-8900.
48. Kuhlmann, K., Cieselski, M., and Schumann, J. (2021). Relative versus absolute RNA quantification: a comparative analysis based on the example of endothelial expression of vasoactive receptors. *Biol Proced Online* *23*, 6.
49. Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Segéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* *474*, 654-657.
50. Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., Pancino, G., Priet, S., Canard, B., Laguette, N., Benkirane, M., Transy, C., Landau, N.R., Kim, B., and Margottin-Goguet, F. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol* *13*, 223-228.
51. Li, N., Zhang, W., and Cao, X. (2000). Identification of human homologue of mouse IFN-gamma induced protein from human dendritic cells. *Immunology letters* *74*, 221-224.
52. Locatelli, F., and Strahm, B. (2018). How I treat myelodysplastic syndromes of childhood. *Blood* *131*, 1406-1414.
53. Mathews, C.K. (2015). Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* *15*, 528-539.
54. Mauney, C.H., and Hollis, T. (2018). SAMHD1: Recurring roles in cell cycle, viral restriction, cancer, and innate immunity. *Autoimmunity* *51*, 96-110.
55. McLaughlin, K.-M., Cinatl, J., Wass, M.N., and Michaelis, M. (2021). Multifaceted roles of SAMHD1 in cancer. *bioRxiv*, 2021.2007.2003.451003.
56. Momparler, R.L. (1982). Biochemical pharmacology of cytosine arabinoside. *Medical and pediatric oncology* *10 Suppl 1*, 45-48.
57. Momparler, R.L. (2013). Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology & Oncology* *2*, 20.

58. Ogawa, T., Kitagawa, M., and Hirokawa, K. (2000). Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages. *Mechanisms of Ageing and Development* 117, 57-68.
59. Plander, M., and Kalman, B. (2016). Rare autoimmune disorders with Mendelian inheritance. *Autoimmunity* 49, 285-297.
60. Pui, C.H., Raimondi, S.C., Srivastava, D.K., Tong, X., Behm, F.G., Razzouk, B., Rubnitz, J.E., Sandlund, J.T., Evans, W.E., and Ribeiro, R. (2000). Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 14, 684-687.
61. Qiao, F., and Bowie, J.U. (2005). The many faces of SAM. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2005, re7.
62. Rasche, M., Zimmermann, M., Borschel, L., Bourquin, J.P., Dworzak, M., Klingebiel, T., Lehrnbecher, T., Creutzig, U., Klusmann, J.H., and Reinhardt, D. (2018). Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012. *Leukemia* 32, 2167-2177.
63. Rassidakis, G.Z., Herold, N., Myrberg, I.H., Tsesmetzis, N., Rudd, S.G., Henter, J.-I., Schaller, T., Ng, S.-B., Chng, W.J., Yan, B., Ng, C.H., Ravandi, F., Andreeff, M., Kantarjian, H.M., Medeiros, L.J., Xagoraris, I., and Khoury, J.D. (2018). Low-level expression of SAMHD1 in acute myeloid leukemia (AML) blasts correlates with improved outcome upon consolidation chemotherapy with high-dose cytarabine-based regimens. *Blood Cancer Journal* 8, 98.
64. Ravenscroft, J.C., Suri, M., Rice, G.I., Szykiewicz, M., and Crow, Y.J. (2011). Autosomal dominant inheritance of a heterozygous mutation in SAMHD1 causing familial chilblain lupus. *Am J Med Genet A* 155a, 235-237.
65. Rechkoblit, O., Johnson, R., Buku, A., Prakash, L., Prakash, S., and Aggarwal, A. (2019). Structural insights into mutagenicity of anticancer nucleoside analog cytarabine during replication by DNA polymerase η . *Scientific Reports* 9, 16400.
66. Reinhardt, D., Von Neuhoff, C., Sander, A., and Creutzig, U. (2012). [Genetic prognostic factors in childhood acute myeloid leukemia]. *Klinische Padiatrie* 224, 372-376.
67. Rothenburger, T., McLaughlin, K.-M., Herold, T., Schneider, C., Oellerich, T., Rothweiler, F., Feber, A., Fenton, T.R., Wass, M.N., Keppler, O.T., Michaelis, M., and Cinatl, J. (2020). SAMHD1 is a key regulator of the lineage-specific response of acute lymphoblastic leukaemias to nelarabine. *Communications Biology* 3, 324.
68. Sandahl, J.D., Kjeldsen, E., Abrahamsson, J., Ha, S.Y., Heldrup, J., Jahnukainen, K., Jonsson, O.G., Lausen, B., Palle, J., Zeller, B., Forestier, E., and Hasle, H. (2015). The applicability of the WHO classification in paediatric AML. A NOPHO-AML study. *British journal of haematology* 169, 859-867.

69. Schmidt, S., Schenkova, K., Adam, T., Erikson, E., Lehmann-Koch, J., Sertel, S., Verhasselt, B., Fackler, O.T., Lasitschka, F., and Keppler, O.T. (2015). SAMHD1's protein expression profile in humans. *J Leukoc Biol* 98, 5-14.
70. Schneider, C., Oellerich, T., Baldauf, H.M., Schwarz, S.M., Thomas, D., Flick, R., Bohnenberger, H., Kaderali, L., Stegmann, L., Cremer, A., Martin, M., Lohmeyer, J., Michaelis, M., Hornung, V., Schliemann, C., Berdel, W.E., Hartmann, W., Wardelmann, E., Comoglio, F., Hansmann, M.L., Yakunin, A.F., Geisslinger, G., Strobel, P., Ferreiros, N., Serve, H., Keppler, O.T., and Cinatl, J., Jr. (2017). SAMHD1 is a biomarker for cytarabine response and a therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Nature medicine* 23, 250-255.
71. Seamon, K.J., Sun, Z., Shlyakhtenko, L.S., Lyubchenko, Y.L., and Stivers, J.T. (2015). SAMHD1 is a single-stranded nucleic acid binding protein with no active site-associated nuclease activity. *Nucleic acids research* 43, 6486-6499.
72. Sommer, A.F., Riviere, L., Qu, B., Schott, K., Riess, M., Ni, Y., Shepard, C., Schnellbacher, E., Finkernagel, M., Himmelsbach, K., Welzel, K., Ketter, N., Donnerhak, C., Munk, C., Flory, E., Liese, J., Kim, B., Urban, S., and Konig, R. (2016). Restrictive influence of SAMHD1 on Hepatitis B Virus life cycle. *Sci Rep* 6, 26616.
73. Sykora, K.-W., and Welte, K. (2006). Physiologie der Hämatopoese. In *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, H. Gadner, G. Gaedicke, C. Niemeyer, and J. Ritter, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 5-15.
74. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer* 26, 171-176.
75. v. Stackelberg, A., Schrappe, M., Reinhardt, D., and Suttrop, M. (2016). Leukämien im Kindesalter. *Der Onkologe* 22, 923-932.
76. Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A., and Bloomfield, C.D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-951.
77. Victor, A., Elsässer, A., Hommel, G., and Blettner, M. (2010). Wie bewertet man die p-Wert Flut?-Hinweise zum Umgang mit dem multiplen Testen–Teil 10 der Serie zur Bewertung wissenschaftlicher Publikationen. *Deutsches Ärzteblatt-Arztliche Mitteilungen-Ausgabe B* 107, 50.
78. Virchow, R. (1862). *Gesammelte abhandlungen zur wissenschaftlichen medicin von Rudolf Virchow* (G. Grotosche Buchhandlung).

79. Wang, J.-l., Lu, F.-z., Shen, X.-Y., Wu, Y., and Zhao, L.-t. (2014). SAMHD1 is down regulated in lung cancer by methylation and inhibits tumor cell proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 455, 229-233.
80. White, J.C., Rathmell, J.P., and Capizzi, R.L. (1987). Membrane transport influences the rate of accumulation of cytosine arabinoside in human leukemia cells. *The Journal of clinical investigation* 79, 380-387.
81. Wiley, J.S., Jones, S.P., Sawyer, W.H., and Paterson, A.R.P. (1982). Cytosine Arabinoside Influx and Nucleoside Transport Sites in Acute Leukemia. *The Journal of clinical investigation* 69, 479-489.
82. Wu, M., Kwon, H.Y., Rattis, F., Blum, J., Zhao, C., Ashkenazi, R., Jackson, T.L., Gaiano, N., Oliver, T., and Reya, T. (2007). Imaging hematopoietic precursor division in real time. *Cell stem cell* 1, 541-554.
83. Yan, J., Hao, C., DeLucia, M., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Ahn, J., and Skowronski, J. (2015). CyclinA2-Cyclin-dependent Kinase Regulates SAMHD1 Protein Phosphohydrolase Domain. *The Journal of biological chemistry* 290, 13279-13292.
84. Yang, R., Paparini, A., Monis, P., and Ryan, U. (2014). Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of *Cryptosporidium* oocysts in faecal samples. *International Journal for Parasitology* 44, 1105-1113.
85. Yang, S., Zhan, Y., Zhou, Y., Jiang, Y., Zheng, X., Yu, L., Tong, W., Gao, F., Li, L., Huang, Q., Ma, Z., and Tong, G. (2016). Interferon regulatory factor 3 is a key regulation factor for inducing the expression of SAMHD1 in antiviral innate immunity. *Sci Rep* 6, 29665.
86. Yiallourous, M., and Creutzig, U. (2012). Akute myeloische Leukämie (AML)-Kurzinformation. *Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie Und Hämatologie*, 1-19.
87. Zittoun, R., Marie, J.P., Delanian, S., Suberville, A.M., and Thevenin, D. (1987). Prognostic value of in vitro uptake and retention of cytosine arabinoside in acute myelogenous leukemia. *Semin Oncol* 14, 269-275.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ADxE	1. Induktionskurs mit Cytarabin, Daunorubicin und Etoposid
AI	3. Kurs mit Cytarabin, Idarubicin und intrathekalen Gabe von Cytarabin, Methotexat, Prednisolon
AGS	Aicardi-Goutieres-Syndrom

Anhang

ALL	Akute lymphatische Leukämie
Allo-SZT	Allostammzelltransplantation
AML	Akute myeloische Leukämie
Ara-C	1- β -D-Arabinofuranosyl-Cytosin
Ara-U	1- β -D-Arabinofuranosyl-Uracil
AV	Abhängige Variable
CD	Cluster of Differentiation
CDA	Cytidin-Desaminase
CDxA	1. Induktionskurs mit Cytarabin, Daunorubicin und Clofarabin
CKD	A2-Cyclin-dependent kinases
CML	Chronische myeloische Leukämie
CR	Komplette Remission
CRISP/Cas 9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas 9
CRp	Partielle Remission
(d)CTP	(desoxy)Cytidintriphosphat
DCK	Desoxycytidin-Kinase
DCTD	Desoxycytidylat-Desaminasen
ddPCR	Digital droplet Polymerasekettenreaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FAB	French-American-British
FBS	fetales bovines Serum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GTP	Guanosintriphosphat
HAE	4. Kurs aus Hochdosis-Cytarabin, Etoposid und intrathekalen Cytarabingabe
haM	3. Kurs Hochdosis-Cytarabin, Mitoxantron und eine einmalige intrathekale Cytarabingabe
HAM	2. Induktionskurs aus Hochdosis-Cytarabin, Mitoxantron und intrathekalen Cytarabingabe
HD-Cytarabin	Hochdosis-Cytarabin
hENT1	human equilibrative nucleoside transporter 1
HIV 1/2	Humanes Immundefizitvirus 1/2
HR	Hochrisikogruppe
HSV1	Herpes simplex Virus 1

INF1	Typ 1 Interferon
IR	Intermediäre Risikogruppe
IRF3	Interferon regulatory factor 3
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mg ²⁺	Magnesium Ion
ML-DS	Myeloische Leukämie bei Down-Syndrom
MNC	mononukleäre Zellen
MRD	Minimale Resterkrankung
NDPK	Nukleosid-Diphosphatkinase
ng	Nanogramm
NMPK	Nukleosid-Monophosphatkinase
NOS	Not otherwise specified
NR	NonResponder
NT5C2	5'-Nukleotidase II
(d)NTP	(desoxy)Nukleosidtriphosphat
(q)PCR	(quantitative) Polymerasekettenreaktion
rpm	Rounds per minute
RR	Ribonukleotid-Reduktase-Holoenzym
RS1/RS2	discrete regulatory site 1 / discrete regulatory site 2
SAMHD1	Sterile Alpha Motif and Histidine-Aspartic acid domain containing protein 1
SR	Standardrisikogruppe
ssNA	einzelsträngigen Nukleinsäurepolymeren
UV	Unabhängige Variable
Vpx	virulence accessory protein
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Behandlungsschema der AML-BFM Studie 2012 (Creutzig and Reinhardt, 2022),

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis 13

Abbildung 1.2: chemische Struktur von Cytarabin und Cytidin (Rechkoblitz et al., 2019)..... 16

<i>Abbildung 1.3: Stoffwechselweg von Cytarabin (Amaki et al., 2015).....</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 1.4: Struktur von SAMHD1: Tetramenisieretes SAMDH1 bestehend aus der SAM Einheit (violette) und der HD Domaine (blau)(Ahn, 2016).....</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 3.1: gefüllte DG8 Cartridge.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 3.2: positive Droplets in blau dargestellt in QuantaSoft Software.....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 4.1: Mittelwert der SAMHD1 Expressionen für die unterschiedlichen Ursprünge der Zelllinien als Barplots dargestellt, nicht signifikant, n total= 27, KM n=9, PB n= 17, PP n= 1.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 4.2: SAMHD1 Expressionen der verschiedenen Zelllinien als Balkendiagramm dargestellt, aufgeteilt nach den genannten Erkrankungen.....</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 4.3: Boxplots der verschiedenen Erkrankungen mit den jeweiligen Mittelwerten (schwarzer Punkt), nicht signifikant, n= 28, AML n = 17, CML n =6, ALL n = 3, NP n = 2.....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 4.4: Verteilung der gemessenen SAMHD1-Werte in Kopien/μl in allen Patientenproben,n=92. a) Histogramm der SAMHD1-Expression, b) Q-Q-Plot der SAMHD1-Expressionen.....</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 4.5: Boxplot der SAMHD1 Expressionen bei weiblichen und männlichen Patienten, rot = weiblich n=38, blau=männlich n=54, nicht signifikant.....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 4.6: Punktdiagramm zur SAMHD1 Expression abhängig des Alters bei Diagnosestellung mit eingezeichneter Regressionsgeraden (rote Linie), sowie 95% -Konfidenzintervall (hellroter Balken), p-Wert=0,011.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 4.7: Barplot der SAMDH1 Mittelwerte für die verschiedenen FAB-Klassifikationen, M0 n=1, M1 n = 15, M2 n=19, M3 n=7, M4 n=21, M5 n=27, M7 n=2 total n = 92, nicht signifikant.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 4.8: Boxplots der SAMHD1 Expressionen innerhalb der verschiedenen Risikostratifizierungen, SR n=29, IR n=50, HR n=13, n total=92, nicht signifikant.....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 4.9: Boxplots der SAMHD1 Expression von weiblichen und männlichen Patienten innerhalb der verschiedenen Risikogruppen, SR n=29 nicht signifikant, IR n=50 nicht signifikant, HR=13 p=0,017.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 4.10: Boxplots der Patienten, die die Remission nicht erreicht haben (n=12) und der Patienten, die die Remission erreicht haben (n=66), p=0,012.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 4.11: Boxplots der SAMHD1 Expression von weiblichen und männlichen Patienten, die die Remission nicht erreicht haben (n = 13, p=0,0036) und die Expression von weiblichen und männlichen Patienten, die die Remission erreicht haben (n=66, nicht signifikant).....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 4.12: Boxplots der Patienten, die die Remission nicht erreicht haben (n=12) und der Patienten, die die Remission erreicht haben, unterteilt nach dem Kurs, in dem die Remission erreicht wurde, Induktion n=25, 3. Kurs n=25, 4. Kurs n=11, 5. Kurs n=5, nicht signifikant.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 4.13: SAMHD1 Mittelwerte der weiblichen und männlichen Patienten beim Erreichen der Remission (n= 66) und bei Nicht Erreichen der Remission(n=12), p=0,0007.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 4.14: SAMHD1 Mittelwerte der Patienten, aufgeteilt nach Risikostratifizierung, in Abhängigkeit des Remissionserfolges SR n=29, IR n=50 p=0,018, HR n=13 p=0,006.....</i>	<i>54</i>

8.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1.1: 2016 WHO-Klassifikation der AML (Arber et al., 2016)</i>	7
<i>Tabelle 3.1: Zelllinien, die auf SAMHD1 untersucht werden</i>	24
<i>Tabelle 4.1: Patienten- und Tumorcharakteristika</i>	32
<i>Tabelle 4.2: Anzahl der Tage bis Remission</i>	33
<i>Tabelle 4.3: Regressionsanalyse zum Zusammenhang des Blastenanteils und der SAMHD1 Expression</i> 39	
<i>Tabelle 4.4: Regressionsanalyse zum Zusammenhang des Geschlechts und der SAMHD1 Expression</i>	40
<i>Tabelle 4.5: Regressionsanalyse zum Zusammenhang des Alters bei Diagnosestellung und der SAMHD1 Expression</i>	41
<i>Tabelle 4.6: Regressionsanalyse zum Zusammenhang der FAB-Klassifikation und der SAMHD1 Expression</i>	43
<i>Tabelle 4.7: Regressionsanalyse zum Zusammenhang der Risikostratifizierung und der SAMHD1 Expression</i>	45
<i>Tabelle 4.8: Regressionsanalyse zum Zusammenhang eines Remissionserfolges und der SAMHD1 Expression</i>	47
<i>Tabelle 4.9: Regressionsanalyse zum Zusammenhang des Remissionszeitpunkts und der SAMHD1 Expression</i>	50
<i>Tabelle 4.10: Moderationsanalyse zum Einfluss des Geschlechts auf den Zusammenhang des Alters und der SAMHD1 Expression</i>	51
<i>Tabelle 4.11: Moderationsanalyse zum Einfluss des Geschlechts auf den Zusammenhang eines Remissionserfolges und der SAMHD1 Expression</i>	51
<i>Tabelle 4.12: Moderationsanalyse zum Einfluss des Alters bei Diagnosestellung auf den Zusammenhang eines Remissionserfolges und der SAMHD1 Expression</i>	53
<i>Tabelle 4.13: Moderationsanalyse zum Einfluss der Risikostratifizierung auf den Zusammenhang eines Remissionserfolges und der SAMHD1 Expression</i>	53

9 Danksagung

Das Ziel der Doktorarbeit war es, die Forschung bezüglich der Therapie der akuten myeloischen Leukämie weiter voranzubringen. Der Vater eines betroffenen Patienten kontaktierte das AML-Referenzlabor und wies auf das mehrfach zitierte Paper von Schneider et al. hin. Daraus entwickelte sich die in dieser Arbeit untersuchte Fragestellung. Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Nils von Neuhoff für die Möglichkeit der Umsetzung dieser Fragestellung, sowie die Zusammenarbeit während der experimentellen Phase und die Betreuung der gesamten Dissertation. Des Weiteren danke ich allen an dieser Arbeit beteiligten Mitarbeiter*innen der Klinik für Kinderheilkunde III, sowie den Mitarbeiter*innen des AML-Referenzlabors, für ihre Unterstützung während der experimentellen Phase.

Außerdem danke ich Frau Carolin Katzera für ihre Unterstützung bei statistischen Fragen. Ebenfalls danke ich Frau Doktor Petra Langhorst für die orthographische Korrektur und die hilfreichen Anmerkungen zur Formulierung komplexer Passagen. Ein großer Dank geht an meine beste Freundin Nina, meine Schwester Grit, sowie meinen Lebensgefährten Justin für ihr stets offenes Ohr und ihren guten Zuspruch während der Zeit der Dissertation.

Zuletzt möchte ich meinen wunderbaren Eltern danken, die mir stets in schwierigen Zeiten zur Seite standen, mich motivierten und bedingungslos unterstützten.

Lebenslauf

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online- Version aus Gründen des Datenschutzes nicht erhalten.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online- Version aus Gründen des Datenschutzes nicht erhalten.