Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Innere Medizin III
Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin, Rheumatologie und Infektionskrankheiten
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. H. Döhner

DNMT3A Mutationen bei der akuten myeloischen Leukämie (AML): Kinetik der minimalen Resterkrankung

Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Universität Ulm

vorgelegt von
Anna Kaumanns
geboren in Neuss

2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Döhner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Barth
Tag der Promotion: 10.01.2019

Teile dieser Dissertation sind erschienen in:

Gaidzik VI, Weber D, Paschka P, Kaumanns A, Krieger S, Corbacioglu A, Krönke J, Kapp-Schwoerer S, Krämer D, Horst H, Schmidt-Wolf I, Held G, Kündgen A, Ringhoffer M, Götze K, Kindler T, Fiedler W, Wattad M, Schlenk RF, Bullinger L, Teleanu V, Schlegelberger B, Thol F, Heuser M, Ganser A, Döhner H, Döhner K: *DNMT3A* mutant transcript levels persist in remission and do not predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group (AMLSG). Leukemia. 2017 Jun 23. doi: 10.1038/leu.2017.200. [Epub ahead of print].

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
1 Einleitung 1
1.1 Die akute myeloische Leukämie (AML) 1
1.1.1 Definition 1
1.1.2 Epidemiologie 1
1.1.3 Ätiologie 1
1.1.4 Krankheitsbild 2
1.1.5 Diagnostik und Klassifikation 3
1.1.6 Prognosefaktoren 7
1.1.7 Therapie 11
1.2 Molekulare Marker der AML 14
1.2.1 *FLT3* 18
1.2.2 *NPM1* 19
1.2.3 *CEBPA* 20
1.2.4 *RUNX1 (AML1)* 21
1.2.5 *TET2* 22
1.2.6 *IDH1/2* 23
1.2.7 *ASXL1* 23
1.2.8 *DNMT3A* 24
1.3 Minimale Resterkrankung (MRD) 28
1.3.1 Bedeutung des Monitorings der MRD 28
1.3.2 MRD-Monitoring bei *NPM1*^{mut} 30
1.3.3 Einsatz von MRD-Monitoring bei *DNMT3A*^{mut} 32
1.4 Zielsetzung 33
2. Material und Methoden 35
2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien 35
2.1.1 Geräte 35
2.1.2 Verbrauchsmaterialien 37
2.1.3 Chemikalien 38
2.2 Studie und Patientenproben 40
2.2.1 Studie 40
2.2.2 Patientenproben 44
2.2.3 Vorgehen 45
2.3 Materialgewinnung und Probenaufbereitung 45
2.3.1 Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation 45
2.3.2 Isolierung von DNA und RNA 47
2.3.3 Primer und Sonden zum Nachweis und zur Quantifizierung von *DNMT3A*^{mut} 50

2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) 54
2.3.5 *Cycle Sequencing Reaction* (CSR) 57
2.3.6 Prinzip der Sanger Sequenzierung 59
2.3.7 cDNA-Synthese 59
2.4 Generierung der Plasmidverdünnungen für die Standardreihe 61
2.4.1 Generierung der PCR-Produkte 61
2.4.2 TOPO Klonierung 62
2.4.3 Transformierung und Kultivierung 63
2.4.4 Isolierung der Plasmid-DNA 64
2.4.5 Restriktionsverdau 64
2.4.6 CSR und Sequenzierung 65
2.4.7 Herstellung der Plasmidlösungen für die Standardkurven 66
2.5 Quantitative *real-time* PCR (RQ-PCR) 67
2.5.1 Prinzip der RQ-PCR 67
2.5.2 Durchführung der RQ-PCR 70
2.5.3 Auswertung der RQ-PCR 73
2.5.4 Kriterien der Auswertbarkeit 77
2.5.5 Sensitivität 79
2.5.6 Definitionen zur Beurteilung des klinischen Verlaufs 79
2.5.7 Statistische Analysen 80
3. Ergebnisse 82
3.1 Eigenschaften des untersuchten Partialkollektivs 82
3.2 Studiendaten 82
3.3 Assoziation mit klinischen und genetischen Charakteristika 84
3.4 Vergleich der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel zwischen Knochenmark und peripherem Blut 86
3.5 Korrelation mit den Überlebensdaten zum Diagnosezeitpunkt 88
3.6 Prognostischer Einfluss der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel 89
3.7 Exemplarische Verläufe von Patienten 97
4. Diskussion 102
4.1 *DNMT3A*^{mut} für das MRD-Monitoring: Vergleich der Methodik 103
4.2 Unterschied zwischen PB- und KM-Proben 105
4.3 Korrelation der Transkriptlevel zu den Therapiezeitpunkten 106
4.4 Präleukämische Mutationen und klonale Hämatopoese 107
4.5 Schlussfolgerung 111
5. Zusammenfassung 113
6. Literaturverzeichnis 115
Danksagung 140
Lebenslauf 141

Abkürzungsverzeichnis

11q23	Translokation auf Chromosom 11q23
AA	Amino acids
abn(3q)	Chromosomale Abnormität auf Chromosom 3q
abnl(17p)	Chromosomale Abnormitäten auf Chromosom 17p
ABL1	*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*
Abt	Abteilung
A-HAM	All-trans Retinsäure, Hochdosis-Cytarabin, Mitoxantron
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AML1	*Acute myeloid leukemia 1 protein*
AMLSG	German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group
AMV	Avian Myoblastosis Virus
APL	Akute Promyelozytenleukämie
Ara-C	Cytosin-Arabinosid (Cytarabin)
ARF	*Alternate reading frame*
ASXL1	*Additional sex comb-like 1*
ATRA	All-trans Retinsäure
BCR	*Breakpoint cluster region gene*
BHQ1	3‘-terminaler BlackHole™ Dark Quencher
Bp	Basenpaare
Bzw	Beziehungsweise
C	Hochdosis-Cytarabin
Ca	Circa
CBFA2	Core-binding factor subunit alpha-2
CBF(B)	Core-binding-factor (-beta)
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary deoxyribonukleinacid
CEBPA	*CCAAT/enhancer binding protein alpha*
CGH	Comparative genomic hybridization
CID	Kumulative Inzidenz von Todesfällen
CIR	Kumulative Inzidenz von Rezidiven
CK-AML	AML mit komplexem Karyotyp

C-KIT	*KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase*
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CNA	Copy numer alterations
CN-AML	AML mit normalem Karyotyp
CR	Komplette Remission
CSR	Cycle sequencing reaction
C_t	Cycle-threshold
D	Deutschland
ddPCR	Droplet digital PCR
ΔR_n	Normalisierte Farbstofffluoreszenz
DEK	DEK proto-oncogene
del(5q)	Deletion des langen Arms von Chromosom 5
del(7q)	Deletion des langen Arms von Chromosom 7
dest.	Destilliert
DFS	Erkrankungs-freies Überleben
DI	Doppelt Induktionstherapie
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT3A	*DNA Methyltransferase 3A*
DNMT	DNA Methytransferase
dNTPs	DesoxyNukleosidTriPhosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dT	DesoxyThymidin
EFS	Event-freies Überleben
ELN	European LeukemiaNet
EMA	European Medicines Agency
engl.	Englische Bedeutung
etc.	Et cetera
EVI1	Ecotropic viral integration site 1
EZH2	*Enhancer of zeste homolog 2*
FAB	French-American-British

FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FLT3	*FMS-like tyrosine kinase 3*
FUP	Follow-up
g	Gramm
GO	Gemtuzumab Ozogamicin
°C	Grad Celcius
GUS	*β-Glucuronidase*
Gy	Gray
HAM	Hochdosis-Cytarabin, Mitoxantron
Hb	Hämoglobin
HEX	Hexachloro-6-carboxy-fluorescein
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
H_2O	Chemische Abkürzung für Wasser
HSCs	Hematopoetic stem cells
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation
I	Italien
ICE	Idarubicin, Cytarabin, Etoposid
IDH1/2	*Isocitratdehydrogenase 1/2*
inv(16)	Inversion auf Chromosom 16
ITD	Interne Tandemduplikation
J	Jahre
JOE	2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein
Kb	Kilobasen
Kbp	Kilobasenpaare
KM	Knochenmark
KMT2A	*Lysine Methyltransferase 2A*
KO	Knockout
Konz.	Konzentration
KRAS	*KRAS proto-oncogene, GTPase*
LAIP	Leukemia-associated immunophenotypes

LDH	Laktatdehydrogenase
LB	Lysogeny broth
LNA	Locked nucleic acid
µl	Mikroliter
M	Molare Masse
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated protein-kinase
MDR1	Multidrug restistance 1
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MECOM (EVI1)	*MDS1 and EVI1 complex locus*
MFC	Multiparameter flow cytometry
MGB	Minor Groove Binder
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
Min	Minute
MKL1	Myocardin like 1
ml	Milliliter
MLL	*Mixed-lineage leukemia*
mM	Millimolar
MMLV	Moloney murine leukemia virus
Mon	Monat
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MRD	Minimale Resterkrankung
MTase	Methyltransferase
MUP214	Major urinary protein 214
MYH11	Myosin heavy polypeptide 11
n	Anzahl
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NGS	Next-generation sequencing
NPM1	*Nucleophosmin 1*
Nr	Nummer
NRAS	*NRAS proto-oncogene, GTPase*
NUP214	Nucleoporin 214kDa

NTC	No template control
OCI-AML3	Ontario Cancer Institute-AML3
o.g.	Oben genannten
OS	Gesamtüberleben
P	Probability
P19arf	*ARF tumor suppressor p19*
PB	Peripheres Blut
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PML	Promyelozytenleukämie
PML	*Promyelocytic leukemia protein*
pmol	Pikomol
POX	Myeloperoxidasereaktion
PR	Partielle Remission
Pro	Prolin
PWWP	Pro-Trp-Trp-Pro
®	Randomisierung
R	Reverse
R^2	Bestimmtheitsmaß
RARA	*Retinoid acid receptor alpha*
RAS	Rat sarcoma
RBM15	RNA binding motif protein 15
RFS	Rezidiv-freies Überleben
R_n	Normalisierte Farbstofffluoreszenz einer Probe
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPN1	Proteasome regulatory particle base subunit 1
RQ-PCR	Quantitative real-time PCR
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RUNX1(T1)	*Runt-related transcription factor 1 (translocated to chromosome 1)*

S	Schweiz
Sek	Sekunden
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOB	Super optimal broth
sog	Sogenannte
SOP	Standard operating procedure
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
t(8;21)	Translokation zwischen den Chromosomen 8 und 21
t(15;17)	Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 17
t(16;16)	Translokation auf Chromosom 16
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
TET	Tetrachloro-6-carboxy-fluorescein
TET1	*Tet methylcytosine dioxygenase 1*
TET2	*Tet methylcytosine dioxygenase 2*
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TP53	*Tumorprotein p53*
Trp	Tryptophan
TTP	Thymidintriphosphat
u	Und
u.a.	Unter anderem
UK	United Kingdom
U/l	Einheiten pro Liter
U/min	Umdrehungen pro Minute
UNG	Uracil-NGlycosylase
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
usw	Und so weiter
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
v.a.	Vor allem
vs	Versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
WT1	*Wilms tumor 1*

Qty	Quantity
z.B.	Zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie (AML)

1.1.1 Definition

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine komplexe klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle, die zur malignen Transformation und Dysregulation leukämischer Vorläuferzellen führt. Diese sog. Blasten verlieren dadurch die Fähigkeit zur weiteren Differenzierung, können ungehemmt proliferieren und wandern ins Blut oder andere Gewebe ein. Infolgedessen kommt es zu einem rapiden Anstieg der neoplastischen Zellen und zur kontinuierlichen Verdrängung der normalen Hämatopoese.

1.1.2 Epidemiologie

Im Gegensatz zur akuten lymphatischen Leukämie (ALL), welche die häufigste Leukämieform bei Kindern darstellt, ist die AML mit etwa 80% die am meisten diagnostizierte akute Leukämieform bei Erwachsenen. Pro Jahr liegt die Anzahl an Neuerkrankungen bei drei bis vier Fällen pro 100.000 Erwachsene. Die Häufigkeit nimmt mit dem Alter zu, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter ca. 67 Jahre (http://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html (13.09.2017) beträgt. In der westlichen Welt beträgt die Inzidenz 3.7 pro 100.000 Personen, wovon der größte Anteil der neu diagnostizierten AML mit 42.8% bei den über 65-Jährigen liegt. Dazu kommt, dass in den letzten Jahrzehnten die Inzidenz in den westlichen Ländern, aufgrund des stetig steigenden Lebensalters, zugenommen hat (Deschler et al. 2006; Juliusson et al. 2009).

Männer sind von der AML häufiger betroffen als Frauen (5.0 vs. 3.4 pro 100.000), wobei dieser Unterschied nur für Erwachsene gilt und nicht für Kinder. Des Weiteren ist die Inzidenz in der schwarzen Bevölkerung etwas geringer als in der weißen Bevölkerung (http://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html (13.09.2017). Allerdings weisen Afrikaner, Hispanoamerikaner und Afroamerikaner eine schlechtere Prognose auf als andere ethnische Gruppen (Sekeres et al. 2004).

1.1.3 Ätiologie

Die Entstehung einer AML ist trotz langjähriger Forschung bei weitem noch nicht verstanden. Dennoch kennt man bereits heute einige Auslöser, die die

Transformation maligner Zellen begünstigen oder sogar auslösen können. Zu den Risikofaktoren zählt ionisierende Strahlung, der die Menschen z.B. nach den Atombomben in Hiroshima oder den nuklearen Testgebieten in Kasachstan ausgeliefert waren (Estey et al. 2006). Auch eine Bestrahlungstherapie kann die Ursache einer AML sein. Eine Ganzkörperbestrahlung mit einem Gray führt bei einem Erwachsenen zur Verdoppelung des Leukämierisikos (Kayser et al. 2011; Herold Innere Medizin. 2017) und das Risiko an der Erkrankung zu versterben, ist deutlich erhöht (Muirhead et al. 2009). Des Weiteren kann es durch eine Strahlenexposition zu der Entstehung eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) kommen, welches mit dem erhöhten Risiko einer Transformation in eine AML assoziiert ist (Dan et. al. 2015). Auch die Exposition gegenüber Chemikalien wie Benzol, sowie gegenüber Rauchen, ist als Risikofaktor nachgewiesen. Zigarettenraucher zeigen im Vergleich zu nicht rauchenden Personen ein zweifach erhöhtes Risiko an einer AML zu erkranken (Speer et al. 2002).

Die Behandlung mit Zytostatika kann ebenfalls ursächlich für die Erkrankung an einer akuten Leukämie sein. Zu diesen gehören vor allem Alkylantien, Topoisomerase-II-Inhibitoren, Chloramphenicol und Phenylbutazon. Der Grund dafür besteht in der knochenmarkschädigenden Wirkung dieser Substanzen.

Im Gegensatz zu der hierzulande sehr seltenen humanen T-Zell-Leukämie, die durch die Viren HTLV-1 und -2, verursacht werden kann, ist diese Ursache bei der AML bislang nicht nachgewiesen worden. Die humane T-Zell-Leukämie tritt vorwiegend im japanischen Raum auf.

Des Weiteren spielen genetische Erkrankungen eine wichtige Rolle. Dazu zählen das Down-Syndrom (Trisomie 21), das Klinefelter-Syndrom (46-XXY), das Bloom-Syndrom und die Ataxia teleangiectasia. Auch aus bereits bestehenden Erkrankungen der Hämatopoese, wie den myelodysplastischen und myeloproliferativen Erkrankungen, einer aplastischen Anämie oder einer paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie, kann sich eine AML entwickeln (Herold Innere Medizin. 2017).

1.1.4 Krankheitsbild

Das Krankheitsbild der AML kann sich in sehr unterschiedlichen Ausprägungen darstellen. Bei wenigen Patienten wird die Krankheit zufällig bei einem

Routineblutbild diagnostiziert. Jedoch klagt etwa die Hälfte der Patienten zum Diagnosezeitpunkt seit ca. drei Monaten über unspezifische Symptome (Harrison's Principles of Internal Medicine. 18th Edition). Zu diesen zählen ausgeprägte Müdigkeit, Leistungsminderung und Schwäche, Nachtschweiß, sowie Appetit- und Gewichtsverlust. Dieses Erscheinungsbild ist Folge der Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Daraus resultiert eine Trias bestehend aus Granulozytopenie, Anämie und Thrombozytopenie. Die Leukozytenzahl kann wie bei allen anderen Leukämieformen normal, erniedrigt oder erhöht sein. In seltenen Fällen steigt die Leukozytenzahl auf über 100.000 /µl, wobei dann von einer Hyperleukozytose gesprochen wird. Diese kann sich zu einem bedrohlichen Leukostasesyndrom entwickeln, welches mit neurologischen, kardiologischen oder respiratorischen Beschwerden einhergeht. Des Weiteren können Mutationen in *NPM1* (*Nucleophosmin 1*) und *FLT3*-ITD (*FMS-like tyrosine kinase 3* - Interne Tandemduplikation) mit erhöhten Leukozytenwerten korrelieren (Su et al. 2013).
Ein weiteres häufig auftretendes Symptom ist Fieber, welchem meist Pilzinfektionen oder bakterielle Infektionen als Ursache zugrunde liegen. Dabei ist oft der Mund- und Rachenraum betroffen. Seltenere Infektionen sind die Pneumonie, Pyelonephritis oder Enterokolitis. Allerdings bleibt das Fieber in vielen Fällen unklarer Genese. Aufgrund der Thrombozytopenie kann es außerdem zu Blutungssymptomen in Form von Petechien, Zahnfleischblutungen oder Hämatomen kommen. Bei der akuten Promyelozytenleukämie (APL) insbesondere kann es auch zu Blutungen infolge einer disseminierten intravasalen Gerinnung und sekundärer Hyperfibrinolyse kommen. Weitere Symptome sind Lymphknotenschwellungen, Splenomegalie und Hepatomegalie, wobei letztere häufiger bei Kindern auftritt (Herold Innere Medizin. 2017). Seltene extramedulläre Manifestationen einer AML sind myeloide Sarkome, auch granulozytäre Sarkome oder Chlorome genannt, sowie die Leukaemia cutis (Bakst et al. 2011).

1.1.5 Diagnostik und Klassifikation

Die Verdachtsdiagnose einer AML ergibt sich aus den unspezifischen Symptomen des Patienten und dem daraufhin durchgeführten Differentialblutbild. Gesichert wird die Diagnose durch eine Untersuchung des Knochenmarks. Von entscheidender Bedeutung, hinsichtlich Therapie und Prognose, ist dabei die

exakte Bestimmung des vorliegenden AML-Subtyps. Um das optimale, für den Patienten passende Therapieschema zu bestimmen, hat sich in den letzten Jahren die Anwendung von komplexen molekulargenetischen, immunologischen und zytogenetischen Verfahren in der Diagnostik durchgesetzt und die älteren zytomorphologischen und histomorphologischen Verfahren etwas in den Hintergrund gedrängt, die jedoch weiterhin die Basis für die Diagnosefindung darstellen.

So erfolgt auch heutzutage zunächst die mikroskopische Untersuchung des Ausstriches von peripherem Blut (PB) und Knochenmark (KM), in dem der erhöhte Anteil an Blasten bereits optisch erfasst und die Blasten der myeloischen Reihe zugeordnet werden können. Um die Zellen der Granulopoese außerdem besser sichtbar zu machen, kann man sie mit Hilfe der Peroxidase-Reaktion (POX) anfärben. Des Weiteren erfolgt der Nachweis der charakteristischen, sich im Zytoplasma der unreifen Leukämiezellen befindlichen, sog. Auer-Stäbchen. Diese stellen ein eindeutiges Merkmal der APL dar, welche in der FAB-Klassifikation (French-American-British) der Gruppe M3 angehört (Tabelle 1). Die FAB-Klassifikation wurde 1976 eingeführt, um die AML anhand morphologischer und zytochemischer Merkmale in verschiedene Subtypen zu kategorisieren (Bennett et al. 1976; Bennett et al. 1985). Im Laufe der Zeit wurde dann jedoch deutlich, dass immunologische, zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen mehr und mehr an Bedeutung gewinnen und in diesem Zusammenhang auch nachgewiesen wurde, dass das Überleben des Patienten entscheidend von der Art der AML und damit von seinem Karyotyp abhängt (Tallman. 2015; Döhner et al. 2015; Bullinger et al. 2017). Daher wurden die FAB-Kriterien von der World Health Organisation (WHO) 2002 aufgenommen und mit den neuesten immunologischen und molekulargenetischen Erkenntnissen zur WHO-Klassifikation erweitert, welche nach einer erneut ergänzten Auflage von 2008 und 2016 das derzeit aktuellste Klassifikationsmodell für die AML darstellt (Arber et al. 2016). Dieses unterteilt die AML in vier Hauptgruppen (Tabelle 2). Den wichtigsten Unterschied zu der älteren FAB-Einteilung stellt der Blastenanteil im Blut dar. Nach der FAB-Klassifikation muss der Anteil an Blasten mindestens 30% betragen, wohingegen dieser von der WHO auf 20% gesenkt wurde.

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (nach Bennet et al. 1976 und 1985) mit Angabe der Häufigkeit in Prozent, Angabe über die Ausprägung der POX und der Esterase (von nicht [-] bis zu sehr stark [+++] ausgeprägt) sowie über die Zytogenetik der jeweiligen Klasse.

Abkürzungen: FAB = French-American-British; AML = Akute myeloische Leukämie; POX = Myeloperoxidase; inv(3q) = Inversion 3q; t(3;3) / (8;21) / (15/17) / (16/16) / (1;25) = Translokation (3;3) / (8;21) / (15/17) / (16/16) / (1;25); inv(16) = Inversion 16; 11q23 = Translokation 11q23; M2baso = Akute Basophilen-Leukämie; M4Eo = Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie; M3v = Akute Promyelozytenleukämie, mikrogranuläre Variante

Einteilung	Häufigkeit	POX	Esterase	Zytogenetik
M0: minimal differenzierte AML	3%	-	-	inv(3q), t(3;3) (1%)
M1: Myeloblastenleukämie	15%	+/-	-	
M2: Myeloblastenleukämie mit Ausreifung	25%	++	-	t(8;21) (40%)
Subtyp: M2baso	selten			
M3: Promyelozytenleukämie	10%	+++	-	t(15;17) (98%)
Subtyp: M3v: mikrogranuläre Variante				
M4: myelomonozytäre Leukämie	20%	+++	++	11q23 (20%)
Subtyp: M4Eo: mit Eosinophilie	5%			inv(16), t(16;16) (80%)
M5: Monozytenleukämie	10%	+/-	+++	11q23 (20%)
M6: Erythroleukämie	5%	+	-	
M7: Megakaryozytenleukämie	7%	-	-	t(1;25) (5%)

Numerische und strukturelle chromosomale Aberrationen werden mit der konventionellen Bänderungsmethode untersucht, unterstützt durch die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH). In dem aktuellen Update der WHO-Klassifikation 2016 wurden die zuvor sog. provisorischen Entitäten *NPM1* und *CEBPA* (*CCAAT/enhancer binding protein alpha*) mutierte AML als reguläre Gruppen mit einbezogen, wobei bei *CEBPA* ausschließlich die biallelischen Mutationen aufgenommen wurden, da nur bei diesen eine prognostische Relevanz gezeigt werden konnte (Wouters et al. 2009; Green et al. 2010). Des Weiteren wurden im Vergleich zur Klassifikation 2008 zwei neue provisorische Entitäten mit aufgenommen: AML mit *BCR-ABL1* (*Breakpoint Cluster Region - Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1*) und *RUNX1(T1)* (*runt-related transcription factor-1 (translocated to chromosome 1))* Mutationen (Arber et al. 2016).

Bei den Verfahren zur Immunophänotypisierung wird die Durchflusszytometrie (FACS) angewendet. Diese Untersuchung dient der Zuordnung von Blut- und KM-Zellen zu einer bestimmten Zelllinie, was mit Hilfe markierter monoklonaler

Antikörper erfolgt. Dies ermöglicht es, die Zellen einem bestimmten Antigenprofil anhand der CD (*cluster of differentiation*)-Nomenklatur zuzuordnen. Außerdem dient die FACS dazu, den Reifungsgrad der leukämischen Zellen zu ermitteln.

Tabelle 2: Dargestellt ist die WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (nach Arber et al. 2016) bestehend aus vier Gruppen mit den jeweiligen Subklassifikationen.

Abkürzungen: WHO = World Health Organisation; AML = Akute myeloische Leukämie; t(8;21) / (16;16) / (9;11) / (6;9) / (3;3) / (1;22) = Translokation (8;21) / (16;16) / (9;11) / (6;9) / (3;3) / (1;22); inv(16) / (9) = Inversion 16 / 9; *RUNX1(T1) = runt-related transcription factor-1 (translocated to chromosome 1); CBFB = Core binding factor beta*; *MYH11 = myosin heavy polypeptide 11*; *PML = Promyelocytic leukemia*; *RARA = Retinoic acid receptor alpha*; *MLL(T3) = Mixed lineage leukemia (translocated to chromosome 3)*; *KMT2A = Lysine (K)-Specific Methyltransferase 2A*; *DEK-MUP214 = DEK oncogene - major urinary protein 214*; *GATA2 = GATA Binding Protein 2*; *MECOM = MDS1 and EVI1 Complex Locus*; *RBM15-MKL1 = RNA Binding Motif Protein 15 – Megakaryoblastische Leukämie 1*; *BCR = Breakpoint Cluster Region*; *ABL1 = Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1*; *NPM1 = Nucleophosmin 1*; *CEBPA = CCAAT/enhancer binding protein alpha*

Gruppe 1	AML mit rekurrenten zytogenetischen Aberrationen - AML mit t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1* - AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11* - AML mit *PML-RARA* - AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A* - AML mit t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214* - AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM* - AML (megaloblastäre) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1* - *Provisorische Entität: AML mit BCR-ABL1* - AML mit mutiertem *NPM1* - AML mit mutiertem biallelischem *CEBPA* - *Provisorische Entität: AML mit mutiertem RUNX1*
Gruppe 2	AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen
Gruppe 3	Therapieassoziierte AML
Gruppe 4	Andere Formen der AML - AML mit wenig Differenzierung - AML ohne Ausreifung - AML mit Ausreifung - Akute myelomonozytäre Leukämie - Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie - Akute erythrozytäre Leukämie - Akute megakaryoblastäre Leukämie - Akute basophile Leukämie - Akute Panmyelose mit Myelofibrose

1.1.6 Prognosefaktoren

Von der AML, die vor 50 Jahren noch als unheilbar galt, können heutzutage 35 bis 40% der Erwachsenen bis 60 Jahre, aber lediglich fünf bis 15% der Personen über 60 Jahre geheilt werden (Döhner et al. 2010; Döhner et al. 2015). Dabei sind der Verlauf und der Ausgang dieser Erkrankung von ganz bestimmten Faktoren abhängig. Entscheidend ist v.a. das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose. Mit ansteigendem Alter wird die Prognose schlechter. Das liegt u.a. daran, dass viele der Patienten die Induktionstherapie, mit dem Ziel eine komplette Remission (CR) zu erreichen, nicht überleben bzw. eine refraktäre Erkrankung aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil der jüngeren Patienten (≤ 60 Jahre), die eine CR erreichen, bei 65 bis 75% liegt, wohingegen dieser Anteil bei den über 60-jährigen nur 40 bis 60% beträgt (Schlenk et al. 2013). Des Weiteren kommt es im Alter zu einer stärkeren und schnelleren Entwicklung von Toleranzen, z.B. vermittelt durch das *multidrug resistance 1* (*MDR1*) Gen. Dieses Gen codiert für eine unidirektionale Effluxpumpe, welche die Medikamente verstärkt aus den Zellen transportiert; diese wird im Alter vermehrt exprimiert. Somit verlieren die Zellen die Fähigkeit die Medikamente zu akkumulieren, deren Konzentration bleibt unter der Wirkschwelle und die Zellen bleiben vor der schädigenden Wirkung der Zytostatika geschützt (Paietta. 1997).
Weitere entscheidende Faktoren sind die Anzahl an Leukozyten (engl.: *white blood cells*), der Gesundheitszustand des Patienten und seine Komorbidität, ob bei diesem bereits ein MDS vorhanden war und ob bereits zuvor eine zytostatische Therapie erfolgt ist. Inkonsistente Ergebnisse in Bezug auf die Prognose gibt es allerdings bei den Symptomen der Splenomegalie und erhöhten LDH (Laktatdehydrogenase)-Werten (Döhner et al. 2010).
All die prognostisch ungünstigen Faktoren sind mit einer höheren Inzidenz im Alter assoziiert. In einer Studie wurden daher separat die Therapiemöglichkeiten für ältere AML-Patienten untersucht, bei denen die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Therapie zumeist schlechter sind, als bei jüngeren Patienten. Dennoch kam die Studie zu dem Schluss, dass man auch bei jedem älteren AML-Patienten individuell, z.B. in Abhängigkeit vom Genotyp entscheiden muss, welche Therapie die geeignetste darstellt und auch neue innovative Medikamente älteren Personen nicht vorenthalten werden sollten (Ossenkoppele et Löwenberg. 2015).

Den wichtigsten Faktor in Bezug auf die Prognose stellt der Karyotyp dar. Man unterteilt die Patienten in Gruppen mit günstigem, intermediärem und ungünstigem Risikoprofil (Tabelle 3), denen anhand von Studienergebnissen unterschiedliche Genotypen zugeordnet werden können (Döhner et al. 2010; Schlenk et al. 2013) und welche auch für die Risikostratifizierung nach dem *European LeukemiaNet* (ELN) verwendet werden (Döhner et al. 2017). Die weitaus größte und umfassendste Studie wurde dazu 2010 von Grimwade und Kollegen durchgeführt. In dieser wurde das Überleben von über 5800 AML-Patienten im Hinblick auf den prognostischen Einfluss des Karyotyps untersucht und mit klinischen Endpunkten korreliert. Hier konnte an einem großen Patientenkollektiv gezeigt werden, dass Patienten mit einer APL mit der t(15;17) *PML-RARA* (*Promyelocytic Leukemia Protein - Retinoid acid receptor alpha*) sowie Patienten mit sog. *core binding factor* (CBF) Leukämien mit t(8;21) *RUNX1-RUNX1T1* und inv(16) *CBFB-MYH11* (*core-binding-factor, beta-subunit - myosin-heavy-chain 11*) eine deutlich bessere Prognose haben als solche, die eine abn(3q), del(5q) tragen oder einen komplexen Karyotyp (drei oder mehr zytogenetische Abnormitäten) besitzen (CK-AML) (Grimwade et al. 2010).

Tabelle 3: Dargestellt sind verschiedene Karyotypen der AML, eingeteilt in die Risikoprofile günstig, intermediär und ungünstig, mit Angabe des prozentualen Anteils, sowie die Wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Karyotyps eine CR und ein EFS zu erreichen (nach Giles. 2002, Döhner et al. 2010)

Abkürzungen: AML = Akute myeloische Leukämie; CR = komplette Remission; EFS = event-free survival; t(8;21) = Translokation (8;21) *AML1-ETO*; t(15;17) = Translokation (15;17) *PML-RARA*; 11q23 = Translokation 11q23 *MLL*; inv(16) = Inversion 16 *CBFB-MYH11*; del(5) = Deletion (5); del(7) = Deletion (7); del(20q) = Deletion (20q)

Karyotyp	Anzahl (%)	CR(%)	EFS (%)
günstig			
t(8;21)	5-10	90	50-70
inv(16)	5-10	90	50-70
t(15;17)	5-10	80-90	70
intermediär			
normal	40-50	70-80	20-40
ungünstig			
del(5) und (7)	20-30	40	5-10
+8	10	60	10-20
11q23, del(20q), andere	10-20	60	10

Bei AML-Patienten mit komplexem Karyotyp wurden in etwa 70% der Fälle Mutationen im *TP53* (*Tumorprotein 53*) Gen nachgewiesen. Veränderungen im *TP53* waren dabei mit höherem Alter, einer niedrigeren CR-Rate, sowie einem niedrigeren EFS (Event-freiem Überleben), RFS (Rezidiv-freiem Überleben) und OS (Gesamtüberleben) verbunden. Damit ist *TP53* der wichtigste Prognosefaktor bei der CK-AML (Rücker et al. 2012). Aufgrund seines unabhängig negativen Einflusses, wurde *TP53* mit in die Hochrisikogruppe der aktuellen ELN-Klassifikation aufgenommen (Döhner et al. 2017). Neben *TP53* Mutationen gelten des Weiteren ein monosomaler Karyotyp, sowie eine Inversion (3) und eine Translokation (3;3) als ungünstige Prognosefaktoren (Schlenk et al. 2013). Der monosomale Karyotyp ist hierbei definiert über eine einzelne autosomale Monosomie, mit Ausnahme eines isolierten X- oder Y-Verlustes, in Assoziation mit mindestens einer weiteren strukturellen chromosomalen Aberration (Kayser et al. 2012). Im Gegensatz dazu werden Mutationen in *NPM1*, *CEBPA*, sowie die Genfusionen *RUNX1-RUNX1T1* (siehe 1.2) und *CBFB-MYH11* als günstig eingestuft. Allerdings wird der an sich prognostisch günstige Einfluss der *NPM1*^{mut} signifikant durch vorhandene Ko-Mutationen wie z.B. *FLT3*-ITD beeinflusst (Döhner et al. 2010; Döhner et al. 2015; Papaemmanuil et al. 2016). Wie bereits erwähnt stellt sich die Risikostratifizierung nach dem ELN ähnlich dar. Dabei erfolgt neben den prognostisch relevanten Subgruppen auch eine exakte Zuordnung der vielfältigen Genotypen bei der AML in die einzelnen Risikogruppen: „günstig“, „intermediär“ und „ungünstig“. Hierbei wurden die zuvor separierten Gruppen „intermediär I und II“ als eine Gruppe zusammengefasst (Tabelle 4).

Tabelle 4: Dargestellt ist die *European LeukemiaNet* Klassifikation, eingeteilt in die genetischen Risikogruppen günstig, intermediär und ungünstig, mit den jeweiligen korrespondierenden genetischen Anomalien (nach Döhner et al. 2017).

Abkürzungen: ELN = *European LeukemiaNet*; t(8;21)(q22;q22) = Translokation (8;21)(q22;q22) *AML1-ETO*; *RUNX1(T1) = runt-related transcription factor-1 (translocated to chromosome 1);* inv(16)(p13.1q22) = Inversion (16)(p13.1q22) *CBFB-MYH11*; t(16;16)(p13.1;q22) = Translokation (16;16)(p13.1;q22) ; *CBFB-MYH11 = Core-binding-factor, beta-subunit - myosin-heavy-chain 11*; *NPM1 = Nucleophosmin 1*; *CEBPA = CCAAT/enhancer binding protein alpha*; *FLT3*-ITD$^{low/high(c)}$ = *FMS-like tyrosine kinase 3* - Interne Tandemduplikation, mit niedriger (<0.5) oder hoher (≥0.5) allelischer Rate; t(9;11)(p21.3;q23.3) = Translokation (9;11)(p21.3;q23.3) *MLL-AF9*; MLL(T3) = Mixed-lineage leukemia (translocated to 3); inv(3)(q21.3;26.2) = Inversion (3)(q21.3;26.2); t(3;3)(q21.3;26.2) = Translokation (3;3)(q21.3;26.2); *GATA2 = GATA binding protein 2*; *MECOM (EVI1) = MDS1 And EVI1 Complex Locus*; t(9;22)(q34.1;q11.2) = Translokation (9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1* = Breakpoint cluster region gene - Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1; t(6;9)(p23;q34.1) = Translokation (6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214 = DEK oncogen - nucleoporin 214kDa*; t(v;11q23.3) = Translokation (v;11)(v;q23.3); *KMT2A = Lysinmethyltransferase 2A*; del(5q) = Deletion (5q) ; abnl(17p) = Abnormalitäten von Chromosom 17p; 5/7/17 = minus Chromosom 5/7/17; *ASXL1 = Additional sex comb-like 1*; *TP53 = Tumorprotein P53*

ELN genetische Risikogruppe	Genetische Anomalien
Günstig	t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1* ; inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11* *NPM1* mutiert ohne *FLT3*-ITD oder mit *FLT3*-ITD$^{low(c)}$ *CEBPA* mutiert (biallelisch)
Intermediär	*NPM1* mutiert und *FLT3*-ITD$^{high(c)}$ Wildtyp *NPM1* ohne *FLT3*-ITD oder mit *FLT3*-ITD$^{low(c)}$ t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-MLL* Zytogenetische Anomalien, die nicht als günstig oder ungünstig klassifiziert werden
Ungünstig	inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM(EVI1)* t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1* t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214* t(v;11q23.3); *KMT2A* rearrangiert 5 oder del(5q); 7; 17/abn(17p) Komplexer oder monosomaler Karyotyp Wildtyp *NPM1* und *FLT3*-ITD$^{high(c)}$ *RUNX1* mutiert, *ASXL1* mutiert oder *TP53*

1.1.7 Therapie

Das grundlegende Therapiekonzept bei der AML hat sich bis vor kurzem seit mehr als 30 Jahren kaum verändert (Döhner et al. 2010). Der Therapie liegen zwei Phasen zugrunde: die Induktions- und die Postremissionsphase (Konsolidierung). Das Ziel in der Induktionstherapie ist es, eine CR zu erreichen, wobei diese einer genauen Definition unterliegt. Die Anzahl an Neutrophilen im Blut muss ≥ 1000 Zellen/µl und diejenige an Thrombozyten ≥ 100.000 Zellen/µl betragen. Des Weiteren muss der Anteil an Blasten im Knochenmark auf < 5% gesunken sein und es dürfen keine Auer-Stäbchen mehr nachgewiesen werden.

Das Erreichen einer CR ist die Voraussetzung für eine vollständige Genesung und für eine Verbesserung der Prognose. In der Postremissionstherapie wird versucht die Remission zu erhalten. Nach drei Jahren Remission sinkt die Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu erleiden auf unter 10% ab (Estey et al. 2006; Döhner et al. 2015).

In den letzten Jahrzehnten hat sich eine Standardinduktionstherapie nach dem sog. „7+3-Schema“ durchgesetzt. Dabei handelt es sich um eine Kombinationstherapie aus Cytosin-Arabinosid (Ara-C), das über sieben Tage verabreicht wird und einem Anthracyclin, welches für drei Tage gegeben wird. Die Gabe der Anthracycline erfolgt meist an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Ara-C ist ein Zellzyklus-S-Phase-spezifischer Antimetabolit, der in die DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Synthese eingreift. Die Wirkung der Anthracycline erfolgt durch eine Hemmung der Topoisomerase II, was zu DNA-Strangbrüchen führt. Zu diesen zählen Doxorubicin, Daunorubicin, Mitoxantrone und Idarubicin.

Mit dieser Induktionstherapie beträgt die CR-Rate für jüngere Erwachsene (≤ 60 Jahre) 60 bis 85%, wohingegen sie sich bei den älteren Patienten mit 40 bis 60% deutlich niedriger liegt (Döhner et al. 2015). Ist bei einem Patienten die CR nach zwei Induktionszyklen immer noch nicht erreicht worden, so wird eine allogene Stammzelltransplantation (HSCT) empfohlen. Nach abgeschlossener Induktionstherapie erfolgt die Postremissionsphase, die stark altersabhängig ist. Ziel der Konsolidierungstherapie ist es, den durch die Induktion erreichten Remissionsstatus zu konsolidieren. In der Regel werden zwei bis vier Zyklen hochdosiertes Ara-C appliziert. Es konnte gezeigt werden, dass bei jüngeren Patienten (< 60 Jahre), höhere Dosen an Ara-C signifikant bessere Ergebnisse

erzielen, als niedrigere Dosen (Tallman. 2005; Schlenk. 2014). Auch bei älteren Patienten bis 80 Jahre konnte gezeigt werden, dass eine intensivierte Behandlung mit einer Standardchemotherapie signifikant bessere Überlebensraten erzielt, als wenn aufgrund des Alters und der Konstitution auf eine Chemotherapie verzichtet und lediglich eine palliative Therapie eingeleitet wird (Juliusson et al. 2009; Döhner et al. 2015).

In zwei großen Studien wurde des Weiteren die Wirksamkeit einer intensivierten Induktionstherapie getestet, in welchen die doppelte Dosis an Daunorubicin verabreicht wurde und eine signifikant bessere CR-Rate festgestellt werden konnte (Fernandez et al. 2009; Lee et al. 2011). Dieser Effekt wurde durch nachfolgende Analysen jedoch auf bestimmte Subgruppen beschränkt, wozu Patienten mit günstigem und intermediärem Risikoprofil zählten. Des Weiteren führten Patel und Kollegen eine Mutationsanalyse von mehr als der Hälfte der Patienten der E1900 Studie durch und untersuchten, ob der Mutationsstatus Einfluss auf die Wirksamkeit der intensivierten Chemotherapie zeigte. Interessanterweise zeigten *DNMT3A* (*DNA Methyltransferase 3A*) und *NPM1* Mutationen, sowie *KMT2A* (*Lysine Methyltransferase 2A*) Translokationen ein besseres Ansprechen auf die hochdosierte Therapie mit Daunorubicin (Patel et Levine. 2012).

Basierend auf solchen und vielen weiteren Forschungsergebnissen der letzten Jahre wird zunehmend ein genotypbasiertes Therapiekonzept der AML verfolgt, welches die bisher etablierten Therapiekonzepte mit neuen, zielgerichteten Therapien (engl.: *targeted therapy*) kombiniert. In verschiedenen Studien wurde bei Patienten mit einer Mutation im *FLT3* Gen die Wirksamkeit eines *FLT3*-Inhibitors aus der Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren geprüft. Hierbei ist insbesondere die RATIFY Studie hervorzuheben, die eine um ca. 23% geringere Mortalität bei Behandlung mit Midostaurin gegenüber einer Standardchemotherapie zeigte. Midostaurin weist dabei die Eigenschaft auf, sowohl bei Nachweis der *FLT3*-ITD, als auch bei mutiertem *FLT3*-TKD (*FMS-like tyrosine kinase 3* - Tyrosinkinasedomäne) eine Wirkung zu zeigen (Stone et al. 2015). Aufgrund der positiven Studienergebnisse wurde Midostaurin 2017 von der FDA (*Food and Drug Administration*) zur Therapie der *FLT3*-positiven AML in den USA zugelassen (American Association for Cancer Research. 2017); kürzlich

erfolgte auch die Zulassung von Midostaurin durch die EMA (*European Medicines Agency*) in Europa (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/PIP_decision/WC500224037.pdf).

Ein Nachfolgekonzept der RATIFY Studie stellt derzeit die AMLSG 16-10-Studie dar, in der die Tyrosinkinsaseinhibition durch Midostaurin in eine intensive Induktions- und Konsolidierungstherapie sowie eine frühe allogene HSCT integriert und mit einer einjährigen Erhaltungstherapie mit Midostaurin als Monotherapie kombiniert wird. Ein anderes Beispiel sind die CBF-Leukämien [t(8;21) oder inv(16)], welche im Rahmen der AMLSG 21-13 Studie zusätzlich den Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib erhalten. Bei Hochrisikopatienten oder solchen mit *FLT3* Mutationen wird nach dem Erreichen einer CR nach erfolgter Induktionstherapie eine HSCT empfohlen.

Andere neuere Therapiekonzepte werden bei der APL angewandt. Hier werden Patienten in Abhängigkeit des Risikoprofils mit einer Therapiekombination aus Arsentrioxid und All-trans Retinsäure (ATRA) behandelt (Lo-Coco et al. 2013; Lo-Coco et al. 2014).

Zunehmend werden auch Antikörper in der Behandlung der AML eingesetzt, wie z.B. der humanisierte monoklonale anti-CD33 Antikörper Gemtuzumab Ozogamicin (GO), der an das Toxin Calicheamicin gekoppelt ist und von 2000 bis 2010 zur Behandlung von Rezidiven älterer CD33-positiver AML-Patienten in den USA zugelassen war. Diese Zulassung wurde jedoch aufgrund der deutlich erhöhten Toxizität wieder zurückgezogen, weshalb GO momentan nur in Studien verwendet wird (Thol et Schlenk. 2014). Daher erfolgte eine ausgiebige Metaanalyse zur Wirksamkeit von GO. Es zeigte sich, dass lediglich Patienten mit günstigem Risikoprofil von GO profitierten, die Wirkung bei einem ungünstigen Risikoprofil jedoch ausblieb (Hills et al. 2014). Auf dieser Grundlage wurde die AMLSG 09-09 Studie entwickelt, in der die Wirksamkeit von ATRA mit und ohne GO bei Patienten mit einer AML und bestehender Mutation im *NPM1* Gen getestet werden sollte.

Die oben beschriebene Chemotherapie wird durch eine begleitende supportive Therapie ergänzt, wie z.B. Transfusionen von Blut- bzw. Gerinnungsprodukten. Es wird empfohlen, die Hämoglobinkonzentration über einer Konzentration von 8 g/dl zu halten, wobei darauf zu achten ist, dass die Konserven bestrahlt und CMV-

negativ (Cytomegalievirus) sind. Auch die Anzahl der Thrombozyten sollte während der gesamten Therapie auf einem Wert von über 10.000/µl gehalten werden und bei Patienten mit Fieber oder aktiven Blutungen am besten noch höher sein. Des Weiteren sollten eine antibiotische und antimykotische Prophylaxe verabreicht werden, um Infektionen während der Therapie zu vermeiden (Harrison's Principles of Internal Medicine. 18th Edition).

Als neue Therapeutika werden in den letzten Jahren zunehmend demethylierende Substanzen diskutiert, wie z.B. Azacitidin und Decitabine, welche beide in die DNA aufgenommen werden, die DNMTs einschließen und zur proteosomalen Degradation führen (Falini et al. 2015). Da die *DNMT3A*, *IDH1/2* (*Isocitratdehydrogenase 1/2*) und *TET2* (*Tet methylcytosine dioxygenase* 2) Mutationen alle in die DNA-Methylierung involviert sind, ging man von einer guten neuen Therapiemöglichkeit aus, von der man sich einen prognoseverbessernden Effekt erhoffte. Leider zeigten sich Studien zu diesen Medikamenten nicht eindeutig. In einer Arbeit mit älteren AML-Patienten konnte kein Effekt einer hypomethylierenden Therapie bei *IDH1/2* oder *DNMT3A* Mutationen nachgewiesen werden (DiNardo et al. 2014). Auf der anderen Seite konnten mehrere Studiengruppen einen signifikanten Einfluss auf das Überleben, sowohl mit 5-Azacytidin (Dombret et al. 2015) als auch mit Decitabine (Grishina et al. 2015; Kadia et al. 2015), bei älteren Patienten mit höheren Blastenzahlen, im Vergleich zur konventionellen Therapie nachweisen (Kadia et al. 2015).

Zusätzlich zu den zielgerichteten Therapien, steht bei *DNMT3A* Mutationen insbesondere auch die allogene HSCT in der Diskussion, eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Prognose zu spielen. Xu und Kollegen bestätigten in ihrer Studie *DNMT3A* ebenfalls als ungünstigen prognostischen Faktor bei der CN-AML und stellten des Weiteren einen signifikanten Einfluss der HSCT auf das 3-Jahres-OS sowie -DFS fest (Xu et al. 2015). Dies gilt es jedoch noch in weiteren Studien zu evaluieren.

1.2 Molekulare Marker der AML

Durch intensive Forschung im Bereich der molekularen Pathogenese der AML sowie die Anwendung neuer Technologien konnten in den letzten Jahren tiefgreifende Einblicke gewonnen werden, welche Einfluss auf die Prognose bzw.

Risikostratifizierung des Patienten haben und im weiteren Verlauf in die Therapie der Patienten translatiert werden können.

Die AML ist keine Erkrankung, deren Pathogenese auf der alleinigen Mutation eines einzelnen Genes beruht, sondern ihre Entstehung muss als multifaktoriell angesehen werden. Durch die Entdeckung bestimmter molekulargenetischer Faktoren und die Innovation neuer Medikamente kann bereits heute, wie z.B. bei Veränderungen im *FLT3* Gen mit Tyrosinkinaseinhibitoren, eine Therapie angewandt werden, die auf die jeweilige Pathogenese abzielt und versucht die bestmögliche Prognose für den Patienten zu gewährleisten. Die Multifaktorialität der AML erschwert die Erforschung von zielgerichteten Therapien erheblich, da eine Vielzahl an molekularen Veränderungen und anderen Faktoren berücksichtigt werden müssen.

Zunächst wurden die Mutationen in Klasse-I- und Klasse-II-Veränderungen eingeteilt. Klasse-I-Mutationen betreffen aktivierende Punktmutationen in Rezeptortyrosinkinasen, wie z.B. *FLT3* und *c-KIT* (*KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase*). Dies führt zu einem Wachstums- oder Überlebenssignal an die hämatopoetischen Vorläuferzellen. Bei Klasse-II-Mutationen handelt es sich um Veränderungen in hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren, die zu einer schädigenden Differenzierung und daraus resultierend zur Apoptose führen. Zusammen gesehen führen diese beiden Prozesse zu einer Proliferation und einem Überleben der Zellen, jedoch ohne Weiterentwicklung zu reifen Blutzellen (Gilliland. 2002).

Jedoch wurden in den letzten Jahren zunehmend Genmutationen entdeckt, die biologisch nicht diesen Klassen zugeordnet werden konnten. In einer großen Arbeit des Cancer Genome Atlas Research Network wurden 200 AML-Patienten untersucht, davon 50 Proben mit Hilfe des sehr aufwendigen *whole-genome sequencing* und 150 Proben mit dem *whole-exome sequencing*. Dabei zeigte sich, dass durchschnittlich 13 Mutationen pro AML-Genom vorliegen. Damit weist die AML deutlich weniger Mutationen als andere Krebsarten auf. Des Weiteren kam man bei der Analyse zu dem Schluss, dass eine neue Einteilung der Mutationsgruppen gemäß ihrer biologischen Funktion sinnvoll wäre. Die neue Klassifikation in neun Gruppen erfolgte folgendermaßen (Häufigkeit in der Studie): „*Transcription-factor fusions*“ (18%), *NPM1* (27%), „*Tumor-suppressor gene*“

(16%), „*DNA-Methylation-related genes*“ (44%), „*Signaling genes*“ (59%), „*Chromatin-modifying genes*“ (30%), „*Myeloid transcription-factor genes*“ (22%), „*Cohesin-complex genes*“ (13%), „*Spliceosome-complex genes*“ (14%). Die am häufigsten mutierten Gene waren in dieser Studie mit Abstand *FLT3* (28%), *NPM1* (27%) und *DNMT3A* (26%), sowie *IDH1/2* (20%), *NRAS/KRAS* (*NRAS proto-oncogene, GTPase/ KRAS proto-oncogene, GTPase*) (12%), *RUNX1* (10%) und *TET2* (8%) (Abbildung 1). 199 der 200 Proben trugen mindestens eine Mutation der neun Kategorien, die alle in der Diskussion stehen, an der Pathogenese der AML beteiligt zu sein.

Eine weitere wichtige Erkenntnis der Studie war der gegenseitige Ausschluss (engl.: *mutual exclusivity*) von einigen Mutationen wie *NPM1*, *DNMT3A* und *CEBPA* hinsichtlich Transkriptionsfaktorfusionen. Dies bedeutet, dass z.B. *NPM1* so gut wie nie zusammen mit *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1* oder auch *MYH11-CBFB* auftritt. Auf der anderen Seite kann zwischen bestimmten Mutationen auch eine sog. Ko-Inzidenz (engl.: *coincidence*) bestehen. Das heißt, bestimmte Mutationen, wie z.B. *DNMT3A* und *NPM1* oder *DNMT3A* und *IDH1*, treten häufig gemeinsam auf (The Cancer Genome Atlas Research Network. 2013).

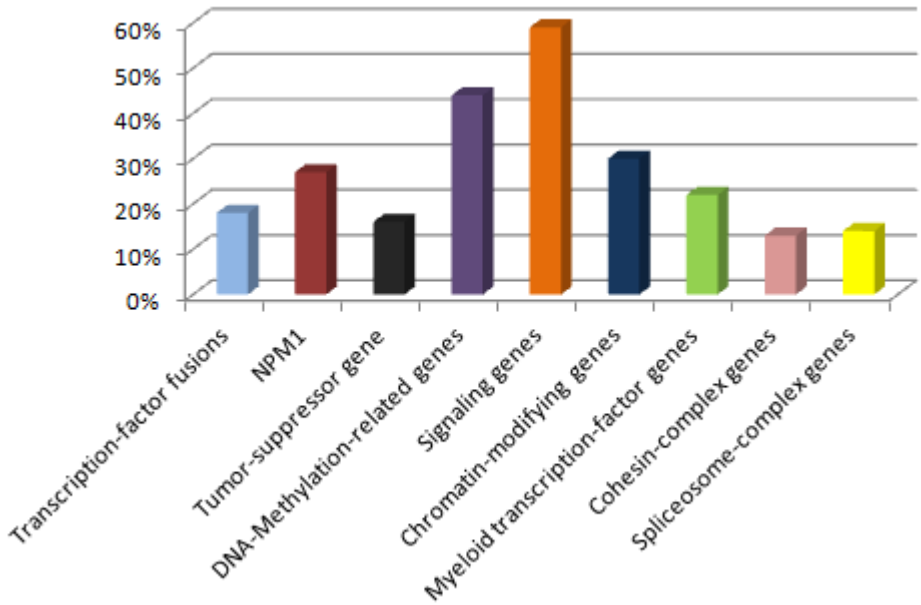

Abbildung 1: Abgebildet ist die Klassifikation des Cancer Genome Atlas Research Network 2013. Die neun dazugehörigen Mutationsgruppen sind auf der x-Achse mit der jeweiligen Prozentangaben auf der y-Achse dargestellt.

Abkürzungen: *NPM1* = *Nucleophosmin 1*; DNA = Desoxyribonukleinsäure

In der neuesten Studie zu dieser Thematik von Papaemmanuil und Kollegen wurde das Patientenkollektiv drei großer randomisierter Studien AML HD98A, AML HD98B und AMLSG 07-04, bestehend aus 1540 Patienten, auf genomische Subgruppen sowie die häufigsten Mutationen hin analysiert. Dabei fand man 5234 sog. *driver mutations* in 76 Genen bzw. Genregionen, wobei zwei oder mehr dieser Mutationen bei 86% der Patienten gefunden wurden. Bestimmte Muster von Ko-Mutationen führten dazu, dass die Kohorte in elf verschiedene Klassen mit je unterschiedlichen diagnostischen und prognostischen Kriterien eingeteilt wurde. Neben den bereits bekannten Subgruppen, konnte die Studie drei heterogene Genkategorien insbesondere hervorheben: AML mit Mutationen in Chromatin, RNA (Ribonukleinsäure)-spleißenden Regionen oder beidem (18%), AML mit *TP53*-Mutationen, chromosomaler Aneuploidie oder beides (13%) und AML mit *IDH2*^{R172} Mutationen (1%). Patienten mit einem Chromatin-Spliceosom und *TP53*-Aneuploidie zeigten eine schlechte Prognose. Interessanterweise wurde die Prognose teilweise stark von bestehenden oder fehlenden Ko-Mutationen mitbestimmt. Dies zeigte sich besonders bei der *NPM1*-mutierten AML, die sich auch in dieser Studie mit 27% als häufigste Subgruppe präsentierte. Des Weiteren konnte auch diese Studie bestätigen, dass Mutationen in *DNMT3A*, *ASXL1* (*Additional sex comb-like 1*) *IDH1/2* und *TET2* zu den am frühesten erworbenen Mutationen zählen. Sie wurden typischerweise im Gründerklon gefunden und kamen nur selten isoliert vor. Mutationen im Tyrosinkinase-RAS (*rat sarcoma*)-Signalweg dagegen entstanden erst später im Verlauf und kamen dabei meist mehrfach bei dem gleichen Patienten vor. Auch *NPM1* gehörte zu den eher spät entstehenden Mutationen und trat fast immer in Ko-Existenz mit anderen Mutationen auf. Die Ursache hierfür bleibt noch immer unklar (Papaemmanuil et al. 2016).

Eine einzelne Mutation ist also für die Entstehung der AML nicht ausreichend. Bei entsprechenden Mausmodellen, die eine Deletion bestimmter AML-assoziierter Gene erhielten, traten zwar hämotopoetische Veränderungen auf, jedoch reichten diese nicht aus, um eine Leukämie zu induzieren (Challen et al. 2012).

1.2.1 *FLT3*

Das *FLT3* Gen ist ein Protein-codierendes Gen, welches zur Familie der Klasse-III-Rezeptortyrosinkinasen gehört. Der Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Domäne, die aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Teilen aufgebaut ist, einer juxtamembranären Domäne und einer zytoplasmatischen Kinasedomäne, welche durch eine sog. *kinase-insert domain* in zwei Abschnitte unterteilt ist. Aktiviert wird der Rezeptor durch Bindung des entsprechenden Liganden an die extrazelluläre Domäne, wodurch es zu einer Dimerisierung in der Plasmamembran kommt, welche wiederum eine Autophosphorylierung des Rezeptors zur Folge hat. Daraus resultierend kommt es zur Aktivierung zahlreicher zytoplasmatischer Effektormoleküle, die an Signaltransduktionen im Bereich von Apoptose, Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen im KM beteiligt sind. Hierzu zählen die RAS-, MAPK- (*mitogen-activated protein-kinase*) und STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*)-Signalwege (Mizuki et al. 2000). Bei erwachsenen AML-Patienten ist diese Mutation bei ca. 31% der Fälle zu finden (Schlenk et al. 2008) und zeigt einen negativen prognostischen Effekt bei Patienten mit günstigem (Beitinjaneh et al. 2010; Allen et al. 2013; Paschka et al. 2013) und intermediärem Risikoprofil (Fröhling et al. 2002; Thiede et al. 2002; Gale et al. 2008).

Kayser und Kollegen publizierten 2009, dass die ITD-Länge signifikant mit der Lokalisation der ITD innerhalb des *FLT3* Genes korreliert (Kayser et al. 2009). Weitergehende Forschungen führten zu der Erkenntnis, dass eine zunehmende ITD-Größe sowie Insertionsstellen in der TKD1 mit niedrigeren CR-Raten assoziiert sind. Des Weiteren stellte eine hohe *FLT3*-ITD Mutations-/Wildtyp *allelic ratio* einen prädiktiven Faktor für den günstigen Effekt einer allogenen HSCT dar (Schlenk et al. 2014). Bei Patienten ≥ 60 Jahre mit einer CN-AML stellt *FLT3*-ITD einen unabhängigen Prognosefaktor dar (Whitman et al. 2010), wohingegen insgesamt nur ein eindeutiger prognostischer Effekt für ITD, jedoch nicht generell für konstitutiv aktivierte Tyrosinkinasen festgestellt werden konnte (Whitman et al. 2008; Allen et al. 2013).

In der aktuellen ELN-Klassifikation kann *FLT3* in Abhängigkeit der a*llelic ratio* der ITD jeder Risikogruppe angehören. So konnte für Patienten mit *NPM1* Mutationen und geringer *allelic ratio* von *FLT3*-ITD (< 0.5) (*FLT3*-ITD^{low}) eine ähnlich günstige

Prognose aufgezeigt werden wie für *NPM1* Mutationen ohne *FLT3*-ITD; diese Patienten werden damit in die Risikogruppe „günstig“ eingestuft. Auf der anderen Seite zählen Wildtyp-*NPM1* und *FLT3*-ITD mit einer hohen *allelic ratio* (≥ 0.5) (*FLT3*-ITD^{high}) zur Risikogruppe „ungünstig“ (Döhner et al. 2016).
Insgesamt stellt *FLT3* einen interessanten Marker für die zielgerichtete Therapie bei der AML dar, wobei sich entsprechende Tyrosinkinaseinhibitoren, wie z.B. Midostaurin, Quirzartinib oder Crenolanib aktuell noch in der klinischen Testung befinden (Döhner H. et Döhner K. 2008; Döhner et Paschka. 2014; Kayser et al. 2014; Stone et al. 2015; Hassanein et al. 2016) (s. 1.1.7).

1.2.2 *NPM1*

NPM1 codiert für ein Phosphoprotein, welches eine Shuttlefunktion zwischen Nukleus und Zytoplasma einnimmt. Es ist mit seiner Funktion in viele Prozesse involviert, u.a. der Ribosomenbiosynthese, der Zentromerduplikation während der Mitose, der Zellproliferation und der Regulierung der Tumorsuppressorgene *p53* und *p19Arf* (*ARF tumor suppressor p19*) (Ye. 2005). *NPM1* wurde zusammen mit *CEBPA*, wie bereits oben beschrieben, 2008 als provisorische Entität in der WHO-Klassifikation der AML aufgeführt. In dem aktuellen Update der WHO-Klassifikation wurde die „AML mit *NPM1* Mutation“ nun als eigenständige Kategorie aufgenommen (Arber et al. 2016).
NPM1 Mutationen sind heterozygot. Abgesehen von wenigen Ausnahmen, bei denen die Mutation in Exon 11 (Albiero et al. 2007) und Exon 9 (Mariano et al. 2006) liegen, sind die Mutationen in Exon 12 des *NPM1* Gens auf Chromosom 5 lokalisiert. Diese Entdeckung wurde erstmalig von Falini und Kollegen im Jahr 2005 beschrieben. Dabei fanden sie heraus, dass es sehr viele verschiedene Mutationstypen gibt (Falini et al. 2005). Der Typ A stellt dabei die häufigste Mutation dar, die durch die Insertion eines Tetranukleotids charakterisiert ist (Mrózek et al. 2007).
NPM1 bildet die häufigste Mutation bei der AML. Sie tritt bei ca. 25 bis 35% aller erwachsenen AML-Patienten und bei ca. 46 bis 64% der CN-AML-Fälle auf (Falini et al. 2005; Döhner H. et Döhner K. 2008). 36 bis 50% der *NPM1*-mutierten Patienten tragen zusätzlich noch eine *FLT3*-ITD. Eine *NPM1* Mutation stellt bei Patienten mit CN-AML einen günstigen Prognosefaktor dar, wobei dies von den

bestehenden Ko-Mutationen abhängig ist (Döhner et al. 2005; Gale et al. 2008; Schlenk et al. 2008). Beispielsweise besteht eine gute Prognose bei *NPM1*^{mut} mit gleichzeitig vorhandener *CEBPA*^{mut} oder bei fehlender *FLT3*-ITD (Schlenk et al. 2008; Döhner et al. 2010).

Aufgrund ihrer hohen Inzidenz und der homogenen Mutationsstruktur bietet die *NPM1* Mutation ideale Voraussetzungen als Marker für das Messen der minimalen Resterkrankung (MRD) und wird bereits seit einigen Jahren in bestimmten Laboren zum Therapiemonitoring eingesetzt (siehe 1.3.2).

1.2.3 *CEBPA*

CEBPA codiert für einen Transkriptionsfaktor mit enthaltener Leucin-Zipper-Domäne am C-Terminus. Im Organismus moduliert *CEBPA* die Expression von Zellzyklus-regulierenden Genen, wobei die verschiedenen Subtypen unterschiedliche Funktionen einnehmen, wie z.B. das CCAAT/enhancer Bindeprotein α, das an der Differenzierung bestimmter Blutzellen beteiligt ist. Mutationen in diesem Protein-codierenden Gen können zur Ausbildung einer AML führen (Wouters et al. 2007).

Es wurden zwei unterschiedliche Arten von *CEBPA* Mutationen beschrieben. Dabei kann es sich zum einen um *Nonsense*-Mutationen an der N-terminalen Region des Moleküls handeln und zum anderen existieren *In-Frame*-Mutationen in der C-terminalen Leucinzipperdomäne. Interessanterweise treten N- und C-terminale Mutationen häufig gemeinsam auf (Döhner H. et Döhner K. 2008). Diese Mutationen werden bei einzelner heterozygoter Mutation als *CEBPA*$^{single\text{-}mut(sm)}$ und bei Auftreten von zwei Mutationen bzw. von einer homozygoten Mutation als *CEBPA*$^{double\text{-}mut(dm)}$ bezeichnet (Wouters et al. 2009).

In einer großen Studie von Taskesen und Kollegen 2011 wurden *CEBPA* Mutationen in ca. 13% von 1182 Fällen bei CN-AML detektiert. Davon trugen 60% *CEBPA*^{dm} und 40% *CEBPA*^{sm}, wobei die einzelnen Mutationen zum großen Teil in der N-terminalen Domäne auftraten. *CEBPA*^{dm} erwies sich als unabhängiger günstiger Prognosefaktor auf das OS, wohingegen die ebenfalls günstige Prognose von *CEBPA*^{sm} auf die gleichzeitig bestehenden *NPM1* und/oder *FLT3*-ITD Mutationen zurückzuführen war (Taskesen et al. 2011). Vor diesem Hintergrund wurde diese provisorische Entität nun ebenfalls als eigenständige

Kategorie in der aktuellen WHO-Klassifikation aufgenommen, nämlich die „AML mit biallelischer *CEBPA* Mutation“ (Arber et al. 2016).

1.2.4 *RUNX1 (AML1)*

Das *RUNX1* Gen codiert für das gleichnamige Protein, das auch als acute myeloid leukemia 1 protein (AML1) oder als core-binding factor subunit alpha-2 (CBFA2) bezeichnet wird. Es handelt sich um einen heterodimären Transkriptionsfaktor, bestehend aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit, der an Transkriptionsvorgängen und damit an der Entwicklung einer normalen Hämatopoese beteiligt ist (Dicker et al. 2007; Yohe. 2015).

In Studien konnte gezeigt werden, dass *RUNX1* Mutationen mit einer undifferenzierten Morphologie (FAB M0) sowie mit spezifischen chromosomalen Aberrationen, wie z.B. Trisomie 21 und 13 einhergehen (Taketani et al. 2003; Dicker et al. 2007). In der Studie von Dicker und Kollegen 2007 fand man in einer Kohorte, die ausschließlich aus AML M0-Patienten bestand, die *RUNX1* Mutationen in 46% und bei jenen mit einer Trisomie 13 sogar in 100%.

In einer Studie von Gaidzik und Kollegen 2011 wurden die *RUNX1* Mutationen in einer Kohorte von 945 Patienten mit einer Häufigkeit von nur 5,6% gefunden, wobei der größte Teil davon (7,2%) bei AML-Patienten mit intermediärem Risikoprofil vorkam, sowie bei Patienten mit nichtkomplexen Karyotyp mit einer Trisomie 8 (14%). Die Frequenz bei einem hohen Risikoprofil lag lediglich bei 4,6% und bei Patienten mit CBF-AML und mit APL wurde die Mutation gar nicht gefunden. *RUNX1* Mutationen gingen mit einem niedrigeren OS, EFS und RFS einher, wobei bei Patienten mit einer CN-AML nur eine Korrelation mit einem niedrigeren EFS gefunden werden konnte. Bei jenen Patienten, die eine HSCT erhielten, war das RFS jedoch deutlich besser als bei denjenigen ohne allogene HSCT (Gaidzik et al. 2011).

In der aktuellsten Studie konnten die Erkenntnisse bezüglich der klinischen und genetischen Eigenschaften der *RUNX1* Mutationen deutlich erweitert werden. *RUNX1*^{mut} traten signifikant häufiger mit gleichzeitigen Veränderungen in *ASXL1*, *IDH2*, *KMT2A*, *EZH2* (*Enhancer of zeste homolog* 2) und anderen Mutationen auf. Des Weiteren zeigte sich eine Assoziation mit höherem Alter, männlichem Geschlecht und sekundärer AML, entstehend aus einem MDS. Patienten mit

RUNX1 Mutationen wiesen wie in vorherigen Studien ein niedriges EFS, RFS und OS auf (Gaidzik et al. 2016). Aufgrund der distinkten genetischen und klinischen Eigenschaften der AML mit *RUNX1* Mutation wurden diese 2016 als neue provisorische Entität in die aktuelle WHO-Klassifikation für Fälle mit *de novo* AML aufgenommen (Arber et al. 2016). Ebenso wurde *RUNX1* neu in die aktuellen ELN Empfehlungen mit aufgenommen und der Risikogruppe „ungünstig“ hinzugefügt (Döhner et al. 2016).

1.2.5 *TET2*

Das *TET2* Gen kann bei verschiedenen myeloischen Erkrankungen in veränderter Form vorgefunden werden (Delhommeau et al. 2009). *TET2* Mutationen konnten bisher in unterschiedlichen Studien in ca. 7 bis 23% der *de novo* AML-Patienten entdeckt werden (Abdel-Wahab et al. 2009; Nibourel et al. 2010; Metzeler et al. 2011). Bisher war die Bedeutung der Genfamilie *TET* lediglich für *TET1* (*Tet methylcytosine dioxygenase* 1) bekannt, das als Translokationspartner bei *MLL* (*mixed-lineage leukemia*) -rearrangierter-AML und selten auch bei der akuten lymphoblastischen Leukämie zu finden ist (Burmeister et al. 2009). Bei *TET1* geht man davon aus, dass es eine wichtige Rolle in der DNA-Methylierung spielt und damit in der epigenetischen Regulierung (Tahiliani et al. 2009). *TET2* dagegen ist am Chromatinremodeling beteiligt (Langemeijer et al. 2009). Eine wichtige Erkenntnis ist, dass sich aktivierende Mutationen von *IDH1/2* und Mutationen im *TET2* nahezu ausschließen (Figueroa et al. 2010). Auch Gaidzik und Kollegen konnten diese sog. *mutual exclusiveness* von $TET2^{mut}$ und IDH^{mut} in ihrer Studie 2012 mit 783 jüngeren AML-Patienten belegen (Gaidzik et al. 2012). In Bezug auf den prognostischen Wert von *TET2* Mutationen wurden variable Ergebnisse publiziert: es wurde ein negativer Effekt bei CN-AML-Patienten mit günstigem Risikoprofil, jedoch nicht bei anderen Subgruppen gefunden (Metzeler et al. 2011), sowie ein negativer prognostischer Effekt bei Patienten mit intermediärem zytogenetischen Risiko gezeigt (Chou et al. 2011). Im Gegensatz dazu konnten Gaidzik und Kollegen 2012 keinen prognostischen Einfluss von $TET2^{mut}$ feststellen.

1.2.6 *IDH1/2*

Die Familie der Isocitratdehydrogenasen (IDH) umfasst Enzyme, die die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat in α-Ketoglutarat katalysieren, indem es NAD (Nicotinamidadenindinukleotid) oder NADP (Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat) als Cofaktor nutzt (Haselbeck et al. 1993). Das erste Mal wurden *IDH1* Mutationen in Lebermetastasen eines Patienten mit kolorektalem Karzinom entdeckt (Sjöblom et al. 2006). Wiederkehrende Mutationen fand man später in Glioblastomen (Parsons et al. 2008). Dagegen zeigten sich *IDH2* Mutationen in einer geringeren Frequenz in astrozytischen Gliomen und Oligodendrogliomen ohne *IDH1* Mutationen (Yan et al. 2009; Hartmann et al. 2009).

Mittels *next-generation sequencing* (NGS) wurden vor wenigen Jahren erstmalig *IDH1* Mutationen zu 16% in einer Kohorte von Patienten mit CN-AML detektiert (Mardis et al. 2009). In einer weiteren Studie konnten *IDH* Mutationen in ca. 8 bis 16% gefunden werden (Paschka et al. 2010). Bezüglich des prognostischen Einflusses zeigten sich sowohl bei der *IDH2*^{R172} als auch bei der *IDH2*^{R140} Mutation distinkte Muster von Ko-Mutationen. Insbesondere die *IDH2*^{R172} unterscheidet sich von anderen *IDH* Mutationen und ist mit Genexpressions- und DNA-Methylierungsmustern assoziiert, die zu schwerwiegenden Beeinträchtigungen im Stoffwechsel führen (Marcucci et al. 2010; Ravandi et al. 2012; Papaemmanuil et al. 2016).

IDH Mutationen gehen mit einem geringeren RFS und OS bei der CN-AML einher, v.a. bei gleichzeitig bestehender *NPM1*^{mut} ohne *FLT3*-ITD (Paschka et al. 2010). Des Weiteren konnte eine schlechtere Prognose bei Patienten mit vorhandenen *IDH2*^{R140} und *DNMT3A* Mutationen gefunden werden (Papaemmanueil et al. 2016).

1.2.7 *ASXL1*

Das *ASXL1* Gen gehört zu einer Gruppe von Genen, die für Proteine des Chromatinremodelings codieren. Eine C-terminale Homeodomäne zeigt eine regulierende Wirkung auf Stammzellen (Takahashi. 2013). Des Weiteren nehmen die Proteine eine Funktion bei der Histon- und DNA-Methylierung ein (Wang et al. 2008).

Verschiedene Studien haben gezeigt, das *ASXL1* an verschiedenen malignen Erkrankungen beteiligt ist, u.a. zu ca. 10% beim MDS (Myelodysplastisches Syndrom) (Gelsi-Boyer et al. 2009), zu 10% bei MPN (Myeloproliferative Neoplasie) (Abdel-Wahab et al. 2010) und zu 40% bei CMML (Chronische myelomonozytäre Leukämie) Fällen (Gelsi-Boyer et al. 2009). In einer Studie mit *de novo* AML-Patienten wurden *ASXL1* Mutationen in ca. 11% der Fälle gefunden, wovon ca. 9% einen normalen Karyotyp aufwiesen. Patienten mit einer *ASXL1*^{mut} wiesen ein kürzeres OS auf, jedoch stellte diese Mutation keinen unabhängig nachteiligen Risikofaktor dar (Chou et al. 2010). In der aktuellsten Studie von Paschka und Kollegen zeigte sich bei Patienten mit *ASXL1* Mutationen eine niedrigere Remissionsrate, ein geringeres EFS als auch ein geringeres OS. Insbesondere, wenn gleichzeitig eine *RUNX1* Mutation vorhanden war, bestand ein deutlich erhöhtes Risiko für das Ereignis Tod im Vergleich mit dem Wildtyp. Die Frequenz von *ASXL1*^{mut} lag in dieser Studie bei ca. 6% (Paschka et al. 2015).

1.2.8 *DNMT3A*

Das *DNMT3A* Gen codiert für die DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3 Alpha. Wie der Name bereits andeutet, ist dieses Enzym für DNA-Methylierung zuständig, und zwar für die *de novo* Methylierung von CpG-Dinukleotiden (Ley et al. 2010). Diese haben durch Aktivierung und Inaktivierung Einfluss auf die Embryonalentwicklung, die genomische Prägung, sowie die X-chromosomale Inaktivierung (Okano et al. 1999). Das Protein befindet sich im Zytoplasma und im Nukleus, wo es entwicklungsabhängig exprimiert wird. Durch Mutationen resultieren verschiedenste Transkriptvarianten, die alle für andere Isoformen codieren.

DNMT3A wurde zum ersten Mal 1998 in einer Studie von Okano und Kollegen charakterisiert (Okano et al. 1998). Das codierende Gen ist auf Chromosom 2p23 lokalisiert und gehört zusammen mit *DNMT3B* und *DNMT1* zur Familie der DNA-Methyltransferasen (Xu et al. 2010). Es besteht aus drei wesentlichen Elementen, den sog. konservierten Domänen. Am N-Terminus trägt es die PWWP-Domäne (Abfolge der Aminosäuren Pro [Prolin]-Trp [Tryptophan]-Trp-Pro), die für das *targeting* des Enzyms an die Nukleinsäuren zuständig ist. Daneben trägt es die Cystein-reiche PHD Zinkfingerdomäne, die mit dem Histon H3 interagiert und des

Weiteren befindet sich am C-Terminus die hochkonservierte katalytische Domäne, welche die MTase-Aktivität inne hat (Jurkowska et al. 2011). Die Methyltransferasen *DNMT3A* und *DNMT3B* katalysieren die Methylierung von Cytosin in 5-Methylcytosin und übertragen hierdurch diese Methylgruppen auf unmodifizierte DNA (Shah et al. 2011).

Mehr als zwei Drittel der *DNMT3A* Mutationen befinden sich im Codon R882 (Arginin) von Exon 23 der MTase-Domäne und hiervon stellen sich alle Mutationen heterozygot dar (Ley et al. 2010; Thol et al. 2011; Renneville et al. 2012; Marková et al. 2012). *DNMT3A*^{mut}-R882 führt zu einer direkten Hemmung der *DNMT3A* Funktionen (Yan et al. 2011). *DNMT3A*^{mut}-R882H insbesondere hemmt direkt die enzymatische Aktivität von *DNMT3A* (Yamashita et al. 2010) und stört die Tetramerisation, sodass es zur Unterbrechung von verschiedenen CpG-Motiven kommt (Holz-Schietinger et al. 2012). Sowohl *DNMT3A*^{mut}-R882C als auch *DNMT3A*^{mut}-R882H werden durch C-zu-T-Wechsel in einem CpG-Dinukleotid verursacht, wobei dies bei *DNMT3A*^{mut}-R882C auf dem codierenden und bei *DNMT3A*^{mut}-R882H auf dem nicht-codierenden Strang stattfindet (Rideout et al. 1990).

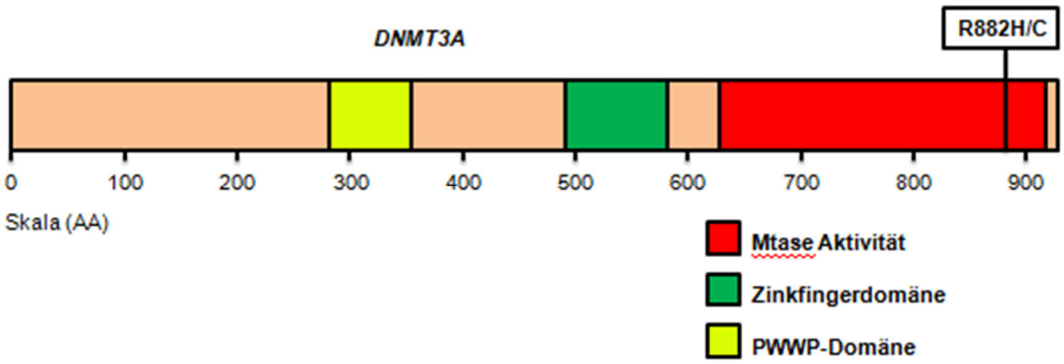

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur von *DNMT3A* mit den drei Domänen der Mtase Aktivität, der Zinkfingerdomäne und der PWWP-Domäne, sowie der Lokalisation von R882H und C.

Abkürzungen: *DNMT3A* = *DNA Methyltransferase 3 Alpha*; AA = amino acids; MTase = Methyltransferase; PWWP = Abfolge der Aminosäuren Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin

DNMT3A Mutationen wurden mit einer Häufigkeit von ca. 21% bei AML-Patienten (Ley et al. 2010; Gaidzik et al. 2013) und ca. 34% der Patienten mit einer CN-AML gefunden (Marcucci et al. 2012; Gaidzik et al. 2013). Insgesamt tritt *DNMT3A*^{mut}

vermehrt bei gleichzeitigem Vorliegen von *NPM1*^{mut}, *FLT3*-ITD und *IDH1/2* auf, wohingegen es signifikant weniger bei *CEBPA*^{dm} zu finden ist (Ley et al. 2010; Thol et al. 2011; Ribeiro et al. 2012; Marcucci et al. 2012; Gaidzik et al. 2013). Patienten mit *DNMT3A*^{mut}-R882 gehen außerdem häufiger mit gleichzeitig bestehenden *NPM1*^{mut} und *FLT3*-ITD einher, als Non-R882-*DNMT3A*^{mut}. Wie in vorherigen Studien (Ley et al. 2010; Thol et al. 2011; Hou et al. 2012) konnten Gaidzik und Kollegen in ihrer Studie belegen, dass *DNMT3A*^{mut} stark mit intermediären zytogenetischen Risikogruppen, wie insbesondere der CN-AML, assoziiert sind. Hinsichtlich der CN-AML zeigte sich bei *DNMT3A*^{mut}-R882 eine weitaus stärkere Assoziation als bei Non-R882-*DNMT3A*^{mut} (84% vs. 66%) (Gaidzik et al. 2013).

Der prognostische Einfluss von *DNMT3A*^{mut} präsentierte sich zunächst kontrovers, da eine Reihe von Studiengruppen zunächst einen negativen prognostischen Einfluss von *DNMT3A*^{mut} nachweisen konnten (Ley et al. 2010; Thol et al. 2011; Marucci et al. 2012; Ribeiro et al. 2012). Auf der anderen Seite standen dem gegenüber Studienergebnisse, welche diesen negativen Effekt auf das EFS, das RFS und das OS nicht zeigten (Nomdedéu et al. 2012; Gaidzik et al. 2013). Eine Ausnahme stellten CN-AML-Patienten mit ungünstigem molekularen Risikoprofil dar (*CEBPA*^{wt} in Kombination mit *NPM1*^{wt} und/oder *FLT3*-ITD), bei denen in einer großen Studie an 1770 AML-Patienten durch Gaidzik und Kollegen ein negativer prognostischer Effekt festgestellt werden konnte (Gaidzik et al. 2013).

In Bezug auf die klinischen Eigenschaften konnte gezeigt werden, dass *DNMT3A*^{mut} mit einem höheren Alter der Patienten, mit weiblichen Geschlecht, mit erhöhten Leukozyten, erhöhten Thrombozytenzahlen, sowie mit einem vermehrten Blastengehalt im KM einhergehen (Hou et al. 2012; Ribeiro et al. 2012; Marcucci et al. 2012). Aufgrund der Tatsache, dass *NPM1*^{mut} und *FLT3*-ITD generell mit erhöhten Leukozyten einhergehen, und *DNMT3A*^{mut} in der Studie von Gaidzik und Kollegen zum Großteil mit diesen Mutationen einherging, führten sie dies auf die kooperierenden Mutationen zurück und wiesen *DNMT3A*^{mut} lediglich als unabhängigen Faktor für erhöhte Thrombozytenwerte aus (Gaidzik et al. 2013).

In Bezug auf die Leukämogenese wird *DNMT3A*^{mut} als Gründermutation diskutiert, da es bereits bei Diagnose bzw. zu einem sehr frühen Zeitpunkt in phänotypisch normalen hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) als präleukämisches Ereignis

gefunden wurde. Diese präleukämischen HSCs verhalten sich zunächst klinisch unauffällig; durch weitere Akkumulation von Mutationen kommt es jedoch schließlich zur Entstehung maligner Zellen und zum Ausbruch der Erkrankung bzw. des Rezidivs. Außerdem sind diese Zellen dazu in der Lage Behandlungen zu überleben und bis in die Remission hinein zu persistieren. (Jan et al. 2012; Corces-Zimmermann et al. 2014; Shlush et al. 2014).

Um die pathogenetische Bedeutung von *DNMT3A*^{mut} besser zu verstehen, wurden wiederholt Versuche mit *DNMT3A-knockout* (KO) HSCs durchgeführt, bei denen es zunächst nicht zur Entwicklung einer Leukämie kam (Challen et al. 2012). In einer neueren Studie erfolgte die Testung an Mäusen allerdings über einen längeren Zeitraum und wurde über mehrere Generationen fortgeführt. Die Mäuse, die *DNMT3A*-KO HSCs transplantiert bekommen hatten, entwickelten nach durchschnittlich sechs Monaten verschiedenste hämatologische Erkrankungen, sowohl der myeloischen als auch der lymphatischen Reihe. Einige der von den Mäusen akkumulierten Mutationen, wie z.B. *NOTCH1* und *KRAS*, zeigten sich simultan zu den Mutationen, die auch bei AML-Patienten mit *DNMT3A*^{mut} gefunden werden. Somit konnte für *DNMT3A*-KO HSCs eine Prädisposition zu maligner Entwicklung nachgewiesen werden (Mayle et al. 2015).

In einer weiteren Studie untersuchten Shlush und Kollegen *DNMT3A*^{mut} auf humaner Stammzellebene. Sie separierten nicht-leukämische Stammzellen von AML-Patienten und analysierten die Allelfrequenzen der Mutationen. *DNMT3A*^{mut} wurde dabei als eine der frühesten Mutationen in HSCs entdeckt und konnten zusätzlich in fast allen Progenitorzellen in variablen Frequenzen nachgewiesen werden. Sie bekräftigten damit die Theorie, dass die Entstehung der AML durch eine *DNMT3A* Mutation einer hämatopoetischen Stammzelle bedingt ist, die zur Entwicklung eines Stammzellpools mit vielen klonalen Vorläuferzellen und die zusätzliche Akquisition von weiteren Mutationen zur endgültigen Initiierung der AML führt (Shlush et al. 2014).

Diese Theorie unterstützend, untersuchten zwei große Studien die Prävalenz von mutierten Genen in der Allgemeinbevölkerung. *DNMT3A* stellte sowohl in der Studie von Jaiswal und Kollegen (403 Mutationen bei 17.182 Personen), als auch in jener von Genovese und Kollegen (190 Mutationen bei 12.380 Personen), das am häufigsten mutierte Gen dar, und zwar bei Gesunden, bei denen keine

hämatologische Erkrankung vorlag. Bei ca. 10% der über 65-jährigen konnten somatische Mutationen in diesem Gen gefunden werden, im Gegensatz zu den unter 50-jährigen, bei denen Mutationen nur in 1% detektiert wurden (Jaiswal et al. 2014; Genovese et al. 2014). Die am häufigsten mutierten Gene, *DNMT3A*, *ASXL1* und *TET2*, wurden auch schon zuvor als wichtige Gene diskutiert, an der Pathogenese der AML beteiligt zu sein (Shih et al. 2012). Diese Studien veranschaulichen somit des Weiteren gut den Prozess der klonalen Hämatopoese, bei der die Anzahl an Mutationen progredient mit dem Alter zunimmt.

Zur Evaluation der klonalen Evolution wurde der Mutationsverlauf bei AML-Patienten in einer großen Studie von Krönke und Kollegen 2013 analysiert. Hierfür wurden mikroarray-basiert *copy numer alterations* (CNA) detektiert sowie umfassende Mutationsanalysen an 53 zusammengehörigen Knochenmark- und Blutproben zum Diagnosezeitpunkt und im Rezidiv durchgeführt. *DNMT3A*^{mut} wies dabei mit 97% die höchste Stabilität auf und fand sich, sowohl bei Diagnose als auch im Rezidiv, bei fünf von fünf Patienten, die *NPM1*^{mut} im Rezidiv verloren hatten. Dabei konnten für *DNMT3A*^{mut} immer die gleichen Nukleotidveränderungen gefunden werden, was die These von *DNMT3A*^{mut} als Gründerklon unterstützt. Nur bei einem Patienten war ein Verlust von *DNMT3A*^{mut} im Rezidiv zu verzeichnen. Dies weist darauf hin, dass die sequentielle Entstehung der Mutationen nicht fest determiniert ist (Krönke et al. 2013).

1.3 Minimale Resterkrankung (MRD)

1.3.1 Bedeutung des Monitorings der MRD

In den letzten Jahren hat die Messung der MRD zunehmend an Bedeutung gewonnen, um die Effektivität einer Therapie quantifizieren und um nach der Behandlungsphase das Risiko eines Rezidivs vorhersagen und eventuell eine präemptive Therapie einleiten zu können (Freeman et al. 2008; Döhner et al. 2010; Paietta. 2012; Grimwade et al. 2014; Ivey et al. 2016). Denn trotz einer hohen Rate an kompletten Remissionen, welche über eine Blastenzahl von unter 5% im Knochenmark definiert sind, erleiden mehr als 50% der Patienten nach Abschluss der Therapie ein Rezidiv. Dies ist u.a. damit begründet, dass bei diesen Patienten noch Restleukämiezellen vorhanden sind. Die MRD lässt sich mit

verschiedenen sensitiven und spezifischen Methoden wie der PCR (Polymerasekettenreaktion), RQ-PCR (quantitative *real-time* PCR), ddPCR (*droplet digital* PCR) oder auch MFC (*multiparameter flow cytometry*) bestimmen. Die MFC hat sich v.a. bei der Beseitigung maligner Zellen zu einem frühen Zeitpunkt und nach der Konsolidierungstherapie als nützlich herausgestellt, wohingegen am Ende der Behandlung zum Kontrollpunkt (engl.: *latter checkpoint*) die RQ-PCR die stärkste prognostische Aussagekraft hat. Dennoch sind beide Verfahren gut zur Erfassung eines Rückfalles geeignet (Kern et al. 2008; Araki et al. 2016).

Bei Durchführung der RQ-PCR werden die mRNA-Expressionslevel von z.B. AML-spezifischen Genen bzw. Translokationen gemessen und in Bezug zu einem Referenzgen gesetzt. Dabei werden bei der MRD drei verschiedene Aspekte gemessen und bewertet: 1.) die Transkriptrate zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, 2.) die Reduktion der Transkripte und 3.) die frühe Erkennung von wieder auftretenden bzw. ansteigenden Transkripten (Kern et al. 2008). Auch bei den Zielgenen, die durch die MRD erfasst werden, gibt es drei unterschiedliche Arten. Hierzu gehören Fusionsgene, Genmutationen, die durch mutationsspezifische Primer erfasst werden können, sowie eine veränderte Expression von Genen.

Insgesamt ist die MRD-Messung bei der AML im Vergleich zu der *BCR-ABL1* Messung bei der chronisch myeloischen Leukämie erst im Anfangsstadium und derzeit noch auf wenige Subtypen beschränkt. Hierzu zählt z.B. die APL mit t(15;17)(q22;q12) *PML-RARA* (Haferlach et al. 2015). Außerdem liegen Studienergebnisse für die CBF-Leukämien mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22) *CBFB-MYH11* (Corbacioglu et al. 2010), t(8;21)(q22;q22) *RUNX1-RUNX1T1* oder der t(9;11)(p22;q23) *MLL-AF9* vor (Jourdan et al. 2013). Bei t(8;21)-positiver AML konnten erst kürzlich veröffentlichte Daten eine signifikant bessere Prognose bei Erreichen einer MRD-Negativität zeigen (Agrawal et al. 2016). Ebenso bei der APL, bei der das MRD-Monitoring durch frühe Interventionen bei molekularem Rezidiv sehr gute Therapieerfolge erzielen konnte (Esteve et al. 2007; Grimwade et al. 2009; Sanz et al. 2009).

In einer Studie von Jourdan und Kollegen konnte gezeigt werden, dass die MRD einen prognostisch entscheidenden Faktor für das Auftreten von Rezidiven

darstellt. Die Messung wurde hierbei für *RUNX1-RUNX1T1* und *CBFB-MYH11* mittels RQ-PCR durchgeführt. Überraschenderweise wies die intensivierte Chemotherapie gegenüber der Standardinduktionstherapie, trotz eines stärkeren MRD-Abfalls, keinen Vorteil im Hinblick auf das RFS auf. Entscheidend für eine signifikante Verbesserung von CIR (Kumulative Inzidenz von Rezidiven) und RFS war einzig eine MRD-Reduktion um drei Log-Stufen (Jourdan et al. 2013). Ähnliche Ergebnisse konnten bereits zuvor in zwei weiteren Studien zu dieser Thematik erzielt werden (Corbacioglu et al. 2010; Yin et al. 2012).

Neben den Fusionsgenen werden aber auch Genmutationen als Zielgene für die RQ-PCR genutzt. Dieser Fortschritt bietet die Möglichkeit in 75% der AML-Fälle eine MRD-Analyse durchzuführen (Kern et al. 2008). Hierbei spielen insbesondere Mutationen eine Rolle, welche zu einem großen Prozentsatz bei Patienten in derselben Form vorliegen; dies gilt für die Mutationen im *NPM1* Gen, welche sich für diese Methodik sehr gut eignen (Krönke et al. 2011), aber auch beispielhaft für die *DNMT3A* Mutation mit ihrem *hot spot* im Kodon R882. Für die MRD-Messung eher ungünstig ist die *FLT3*-ITD, die mit einer Frequenz von ca. 30% zwar häufig vorkommt (Schlenk et al. 2008), jedoch bei jedem Patienten in individueller Variante vorliegt und somit nur sehr aufwendig analysiert werden kann (Thol et al. 2012). Außerdem gehen ca. 20% der *FLT3*-ITD im Verlauf verloren und sind damit im Rezidiv nicht mehr nachweisbar (Schnittger et al. 2002; Cloos et al. 2006). Die Messung von *FLT3*-ITD als MRD-Marker könnte mit Hilfe der Technik des NGS ermöglicht werden. Durch das NGS kann in einem einzelnen Vorgang die Insertionsseite und -länge, die Anzahl der Klone und der allelische Anteil der *FLT3* Insertionen bestimmt werden. Damit kann das MRD-Monitoring auch für Patienten mit *FLT3*-ITD individuell angepasst an den jeweiligen Genotyp durchgeführt und dessen Sensitivität deutlich erhöht werden. Insbesondere für die Verlaufskontrolle unter *FLT3*-Inhibitor-Therapie ist dieses Verfahren interessant (Thol et al. 2012; Bibault et al. 2015).

1.3.2 MRD-Monitoring bei *NPM1^{mut}*

Die *NPM1* Mutation wurde 2005 als neuer genetischer Marker entdeckt und bildet mit durchschnittlich 25 bis 35% die häufigste Mutation bei der AML (Falini et al. 2005; Döhner H. et Döhner K. 2008). Aufgrund ihrer hohen Inzidenz als auch ihres

homogenen Mutationsmusters stellt diese Mutation, wie bereits erwähnt, eine sehr gute Zielstruktur für die MRD-Messung dar. In mehreren Studien wurde *NPM1*^{mut} in der Anwendung RNA- oder DNA-basierter RQ-PCR Assays untersucht und erfolgreich erprobt. Schnittger und Kollegen konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass *NPM1*-basierte MRD-Messungen sehr gut dazu geeignet sind das Therapieansprechen, die Persistenz von hohen Transkriptleveln sowie das Auftreten von Rezidiven frühzeitig zu detektieren. Das MRD-Monitoring stellte in ihrer Studie den Parameter mit der höchsten prognostischen Relevanz dar (Schnittger et al. 2009).

Auch in einer Studie von Krönke und Kollegen an 245 jüngeren AML-Patienten präsentierten sich die *NPM1*^{mut} Transkriptlevel bei der MRD als hoch signifikanter prognostischer Faktor, und zwar sowohl für das OS und die Remissionsdauer nach zwei Induktionszyklen, als auch für den Zeitpunkt nach Beendigung der Therapie. Dazu konnten sie durch Festlegung eines Grenzwertes (engl.: *cut-off*) von über 200 *NPM1*^{mut}/10^4 *ABL1*-Kopien einen Schwellenwert zur Detektion eines Rezidivs bestimmen, wobei jedoch die kontinuierliche Kontrolle der MRD im Follow-up (FUP) unerlässlich war (Krönke et al. 2011).

In einer weiteren aktuelleren Studie wurde der MRD-Status von 346 *NPM1*-mutierten Patienten, welche alle intensiv behandelt worden waren, untersucht. Bei 15% dieser Patienten persistierten die *NPM1* Transkriptlevel nach dem zweiten Chemotherapiezyklus und waren mit einem erhöhten Rezidivrisiko nach drei Jahren assoziiert. Der MRD-Status war auch in dieser Studie ein wesentlicher prognostischer Faktor in Bezug auf das Überleben. Bei 69 von 70 Patienten waren *NPM1* Mutationen im Rezidiv nachweisbar. Gleichzeitig wurden die Proben auf Ko-Mutationen untersucht, wobei v.a. *FLT3*-ITD und *DNMT3A* einen prognostischen Einfluss zeigten. Patienten mit einem Hochrisikotyp (*FLT3*-ITD^{mut} und/oder *DNMT3A*^{mut}), die nach dem zweiten Chemotherapiezyklus negative Ergebnisse in der RQ-PCR zeigten, hatten dabei eine günstige Prognose. Des Weiteren unterstützten die Ergebnisse der Studie die Beobachtung, dass präleukämische Ereignisse mit einer hohen Frequenz bei Patienten mit *NPM1*^{mut}-AML vertreten sind, insbesondere *DNMT3A* und *IDH* Mutationen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die verwendeten Chemotherapien effektiv den mutierten *NPM1*-Klon eradizieren konnten, sich jedoch koexistierende *DNMT3A*

Mutationen, v.a. R882H, resistent gegenüber diesen zeigten und nur durch eine HSCT eliminiert wurden (Ivey et al. 2016). Bei *NPM1*^{mut} kam es in mehreren Studien, wie bereits beschrieben, bei ca. 10% der Fälle zu einem Verlust der Mutation im Rezidiv (Papadaki et al. 2009; Krönke et al. 2011; Krönke et al. 2013).

1.3.3 Einsatz von MRD-Monitoring bei *DNMT3A*^{mut}

DNMT3A^{mut} wird bei der AML als Gründermutation diskutiert, da es sowohl bei Diagnose bzw. zu einem sehr frühen Zeitpunkt (präleukämisches Ereignis) als auch im Rezidiv der AML-Patienten nachgewiesen wurde und damit eine ausgesprochene Stabilität aufzuweisen scheint (Krönke et al. 2013). Diese Stabilität bietet eine sehr gute Voraussetzung als Zielgen für das MRD-Monitoring und macht es zu einem interessanten Marker für weitergehende Forschungen. Bislang sind nur wenige Daten vorhanden, die *DNMT3A*^{mut} im Rahmen eines möglichen MRD-Monitorings untersucht haben. Zwei Studiengruppen führten in kleinen Kohorten von 25 bzw. 31 AML-Patienten MRD-Analysen mittels NGS durch, um potentiell geeignete MRD-Marker zu detektieren. In der Studie von Debarri und Kollegen, in dessen Kohorte *NPM1* Mutationen vorlagen, konnte durch die Kinetik von *IDH1/2*^{mut} in 100% der Fälle ein Rezidiv detektiert werden. Dagegen korrelierten *DNMT3A* Mutationen nicht mit dem Krankheitsstatus, da der präleukämische Klon in 40% der Patienten, die sich in CR befanden, persistierte. Nach Induktionstherapie lag diese sog. *variant allele frequency* zwischen 5 und 45% und nahm während des FUP noch weiter zu (Debarri et al. 2015). Auch in der zweiten Studie stellte sich *DNMT3A* nicht als generell geeigneter MRD-Marker dar. Nur bei jenen Patienten, die die Mutation während der Therapie verloren hatten, konnte das MRD-Monitoring im FUP angewandt werden (Jeziskova et al. 2015).

Eine größere, kürzlich erschienene Studie untersuchte *DNMT3A*, gemeinsam mit *IDH1* und *IDH2*, mittels *droplet digital PCR* (ddPCR). Hierbei handelt es sich um eine neue Methode, bei der die DNA-Moleküle nach Vereinzelung mittels PCR amplifiziert werden. Diese Methode könnte möglicherweise der RQ-PCR im Hinblick auf Sensitivität, Kosten und Effektivität überlegen sein. Mit einer Ausnahme waren diese Mutationen bei allen AML-Patienten, die einen Rückfall erlitten und *DNMT3A*^{mut} und/oder *IDH1/2*^{mut} trugen, auch im Rezidiv und trotz

durchgeführter HSCT, noch vorhanden. Hier konnte ebenfalls beobachtet werden, dass *DNMT3A* Mutationen früher als *IDH* Mutationen in der Leukämogenese auftreten. Des Weiteren konnte man die Mutationen nicht nur in leukämischen Blasten finden, sondern bei etwa 89% der Fälle waren diese auch in Progenitorzellen vorhanden. Zusätzlich wurden regelmäßig ddPCR für *DNMT3A* und *IDH1/2* im FUP durchgeführt und mit der standardmäßigen RQ-PCR für *NPM1* und *WT1* (*wilms tumor 1*) verglichen. Es resultierten vergleichbare Ergebnisse und die ddPCR zeigte sich als verlässliche Methode *DNMT3A*^{mut} und *IDH1/2*^{mut} Transkriptlevel im FUP und Rezidiv messen zu können. Insgesamt sprach sich diese Studie für das Monitoring von *DNMT3A* und *IDH1/2* nach HSCT aus, insbesondere um unerwünschte residuelle HSCs mit präleukämischen Klonen zu detektieren (Brambati et al. 2016).

Bisherige Studien konnten bislang also kein eindeutiges Ergebnis zur Eignung von *DNMT3A*^{mut} als MRD-Marker zeigen, lieferten jedoch Hinweise darauf, dass diese Mutation ein präleukämisches Ereignis darstellt und auch bei Patienten in CR persistieren kann.

1.4 Zielsetzung

Durch den Einsatz innovativer Technologien wird das Verständnis für die Pathomechanismen der akuten myeloischen Leukämie immer besser. In den letzten Jahren konnte mit Hilfe dieser neuen Technologien v.a. die außerordentlich große biologische Heterogenität der Erkrankung aufgezeigt werden, welche sich auch in der klinischen Erscheinung der Krankheit widerspiegelt. Dennoch sind viele molekulare Pathomechanismen ungeklärt. Hierbei hat die Prognoseverbesserung der Patienten höchste Priorität, wobei es insbesondere von großer Bedeutung ist, Rezidive bereits zu einem möglichst frühen Zeitpunkt zu detektieren. Ein effektives Verfahren hierfür, stellt die Messung minimaler Resterkrankung während und nach der Therapie dar. Damit kann die Therapie individuell an das Risiko der Patienten angepasst und bei auffälligen Werten, die auf einen Rückfall hindeuten, direkt mit einer präemptiven Therapie begonnen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob sich *DNMT3A*^{mut} als molekularer Marker für das Monitoring minimaler Resterkrankung von Patienten mit AML

eignet und dieses MRD-Monitoring eine prognostische Bedeutung aufweist. Hierzu wurden 617 KM- und PB-Proben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten während und nach Therapie von 58 AML-Patienten gewonnen wurden mittels quantitativer PCR untersucht und die Ergebnisse mit klinischen Daten korreliert, wobei der Fokus auf der Korrelation der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel mit dem klinischen Verlauf der Patienten liegen sollte. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen einen potentiellen neuen molekularen MRD-Marker zu charakterisieren und zu etablieren. Des Weiteren sollen die longitudinalen Messungen der Patientenproben dazu dienen, neue Erkenntnisse hinsichtlich der *DNMT3A*^{mut} als präleukämisches Ereignis zu gewinnen und dadurch weitere Einblicke in die Pathogenese der AML zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien

Folgende Geräte, Materialien und Chemikalien wurden benutzt und von den entsprechenden Unternehmen bezogen.

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI-PRISM 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Beschriftungsgerät 2730VP	Brother, Bad Vilbel
Einkanalpipetten Gilson (P10, P20, P100, P200, P1000) VWR (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) Eppendorf reference, Eppendorf research, Eppendorf research plus (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Gilson Inc., USA VWR International, Darmstadt, D Eppendorf, Hamburg, D
Eismaschine AF100	Scotsman, Mailand, I
Elektrophorese B2/A2 Easy C OWL Separation Systems	OWL Separation Systems Inc., Portsmouth, NH, USA
Gefrierschrank GS 3702-G	Liebherr, Bulle, S
Geldokumentationssystem Gene Genius	Syngene, Cambridge, USA
Kühl-/Gefrierkombination CUN3923-2 Premium CUP 3553	Liebherr, Bulle, S
Kühlschrank KS9827	Severin, Sundern, D
Kühlzentrifuge Biofuge Fresco Multifuge 4KR	Heraeus, Hanau, D
Magnetrührer MR 3002 S 8	Heidolph, Schwabach, D

Mikrowelle HF24M241	Siemens, D
Mini Zentrifuge PCV-2400	Grant Instruments, Cambridge, UK
Nanodrop ND1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Power Supply EC3000-90 EPS 600, EPS1001, EPS301 Phero-stab.300	E-C apparatus, Waltham, USA Amersham (GE Healthcare), Amersham, UK Biotec Fischer, Reiskirchen, D
Real-time-PCR QuantStudio 12K Flex	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Sequenzierer 3500Dx	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Thermoblock 2099-DA	Liebisch, Bielefeld, D
Thermocycler GeneAmp 2720	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Thermomixer comfort, 5437	Eppendorf, Hamburg, D
Tiefkühl-Gewebe-Schrank TGS 4000 Typ 400681	Liebherr, Bulle, S
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr, Bulle, S
Tiefkühlschrank -80°C	Heraeus, Hanau, D
Tischzentrifuge Galaxy-Mini Grantbio PCV-2400 Combi-Spin FVL-2400N	VWR International, Darmstadt, D Grant Instruments, Cambridge, UK BIOSAN, Warren, USA
Vakuumpumpe PM20119-840.3	KNF, Freiburg, D

Vortexer	Heidolph Type REAX 1 MS1 Minishaker Reax 2000 VWR International	Heidolph, Schwabach, D IKA Labortechnik, Staufen, D Heidolph, Schwabach, D VWR International, Darmstadt, D
Waage NewClassic MF-Modell S603S/M01		Mettler Toledo, Greifensee, S
Zentrifuge 5424 + Rotor F-45-18-11		Eppendorf, Hamburg, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	**Hersteller**
Biosphere Filter Tip 2,5 µl,10 µl, 20 µl, 200 µl, farblos 20 µl, 100 µl, gelb 1250 µl, extra long	SARSTEDT, Nümbrecht, D
Capillary Array 16×50 cm	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Eppis 0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL	Eppendorf, Hamburg, D
Etiketten Cryo-Babies	VWR International, Darmstadt, D
Handschuhe Unt., Nitril, pf, unst. Gr. S,M,L	Ansell GmbH
Kimtech fusselfreie Labortücher	Kimberly-Clark Professional, Koblenz-Rheinhafen, D
Kryo-Box, beschichtet	Ratiolab, Dreieich, D
Markierungspunkte 8mm	HERMA, Filderstadt, D

MicroAmp 8-Cap Strip 8-Tube Strip Clear Adhesive Films Fast optical 96-WellReaction Plate 0.1 ml Optical 96-Well Reaction Tube with Cap, 0.2 ml	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Optical Adhesive Covers Starter Kit (TaqMan)	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Pipettenspitze farblose, 20 µl, lose gelb, 200 µl, lose	SARSTEDT, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäß 1,5 ml, SafeSeal 2,0 ml, SafeSeal	SARSTEDT, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße, 5 ml, natur	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Septa Cathode Buffer Container (3500Dx) Septa for 3500DX/3500xL Dx Genetic Analyzers, 96 Well	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Stabpipetten, serologisch 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	CORNING, Corning, USA
Thermowell Platten Modell P, 96 Well, „Costar“	CORNING, Corning, USA
Vernichtungsbeutel	Ratiolab, Dreieich, D

2.1.3 Chemikalien

Material	Hersteller
0,5 M EDTA pH 8.0	Ambion Inc., Foster City, USA
1 M Tris pH 8.0	Ambion Inc., Foster City, USA
10× BlueJuice Loading Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
1× TAE-Puffer	Eigene Herstellung

3500xLDx Genetic Analyzer Capillary Array, 50 cm	Applied Biosystems, Darmstadt, D
ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Agarose for Routine, 500 g	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
AllPrep DNA/RNA Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden, D
Ampli-Taq-Gold Polymerase 12-Pack	Life Technologies, Carlsbad, USA
Anode Buffer Container for 3500 Dx/3500xL Dx	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen, D
Big Dye Terminator 5× Sequenzierpuffer v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Cathode Buffer Container for 3500 Dx/3500xL Dx	Applied Biosystems, Darmstadt, D
DEPC Treated Water	Invitrogen, Carlsbad, USA
Desoxynucleoside Triphosphate (dNTP) Set PCR Grade	Roche, Basel, S
DyeEx 2.0 Spin Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
DyeEx 96 Kit (24)	Qiagen, Hilden, D
EcoRI und Digestion buffer	Roche, Basel, S
Entsalztes H_20	Aus Wasserhahn, 2403
Ethanol absolut puriss p.a.	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethidiumbromidlösung 1 % 10 mg/mL	Roth, Karlsruhe, D
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, Darmstadt, D
HPLC-Wasser	VWR International, Darmstadt, D
ISO-SEPTOL 70 % 500 ML 1Fla	Universität Ulm-Klinikum Apotheke
Kanamycin 500x	Roche, Basel, S
Ladepuffer Orange G	Eigene Herstellung
Natriumacetat 3M, pH 5,5	Ambion, Foster City, USA
Negativkontrolle: Zelllinie HL60	Eigene Herstellung

POP-7TM (960) Polymer for 3500 Dx/3500xL	Applied Biosystems, Darmstadt, D
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
QIAquick 96 Purification Kit (24) 96 Purification Kit (24) Platten PCR Purification Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
QIAshredder (250)	Qiagen, Hilden, D
Quanti Tect Rev. Transcription Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
Random Hexamers	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Rnase-Free Dnase Set	Qiagen, Hilden, D
S.O.C. Medium (2x Typtone, 0,5 % Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glukose)	Invitrogen Carlsbad, USA
SuperaseIn (Rnase Inhibitor) (2500 U)	Ambion Inc., Foster City, USA
TaqMan PCR Core Reagent Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, D
TOPO TA Cloning® Kit fpr Sequencing (Chemokompetente One-Shot® TOP10 Escherichia coli)	Invitrogen, Carlsbad, USA
TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
TrackIt 100bp Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
TRIS Ultrapure MB Grade Molecular biology Grade	USB Corporation, Cleveland, USA AppliChem, Darmstadt, D
TRIzol Reagenz, 100 ml	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.2 Studie und Patientenproben

2.2.1 Studie

Die Patientenproben, welche für diese Arbeit verwendet wurden, stammen aus der AMLSG 09-09 Studie (n=58). Die AMLSG beinhaltet ca. 50 bis 60 Zentren in Deutschland und Österreich und ist unter der Leitung von Prof. Dr. H. Döhner sowie von Prof. Ganser (Medizinische Hochschule Hannover, Abt. Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation). Die Referenzlabore der Studie befinden sich dementsprechend in Ulm (Leitung Prof. Dr. K. Döhner)

und Hannover (Leitung Prof. Dr. A. Ganser). Leiter der klinischen Prüfung der AMLSG 09-09 Studie ist in Deutschland Prof. Dr. H. Döhner von der Universität Ulm, der außerdem die Position des Studienleiters inne hat und in Österreich ist Prof. Dr. D. Nachbauer der Universität Innsbruck Leiter der klinischen Prüfung.
Um ein möglichst großes Patientenkollektiv für die MRD-Analysen zu erhalten und die statistische Aussagekraft zu erhöhen, wurden zusätzlich noch MRD-Daten von Patienten aus der AML HD98A- (n=14; NCT00146120) und der AMLSG 07-04- (n=87; NCT00893399) Studie mit einbezogen. Diese Analysen wurden im Rahmen anderer Projekte durchgeführt.

Tabelle 5: Anzahl der Patientenproben aus den drei Studien AMLSG 07-04, AML HD98A und AMLSG 09-09 sowie die absolute Gesamtanzahl an Patientenproben.
Abkürzungen: AML = Akute myeloische Leukämie; AMLSG = German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group

Studie	AMLSG 07-04	AML HD98A	AMLSG 09-09	Gesamt
Anzahl	87	14	58	159

Bei der AMLSG 09-09 (NCT00893399) handelt es sich um eine Phase III Studie zur Chemotherapie mit All-trans Retinsäure (ATRA) mit oder ohne Gemtuzumab Ozogamizin (GO) bei Patienten mit AML und Mutation im *NPM1* Gen. Die AMLSG 09-09 ist eine randomisierte, zweiarmige, offene und multizentrische Studie, in die Patienten ≥ 18 Jahre mit neu diagnostizierter AML und vorliegender *NPM1* Mutation aufgenommen wurden. Das Screening für diese Mutation erfolgte im AMLSG Referenzlabor der Universität Ulm sowie an der Medizinischen Hochschule Hannover. In Abbildung 3 ist das Therapieschema der AMLSG 09-09-Studie dargestellt. Dabei umfasste die Dauer der Behandlung jedes Patienten ca. sechs Monate und die Gesamtdauer der klinischen Prüfung fünfeinhalb bis sechs Jahre.
In den Induktionszyklen I und II erhalten die Patienten GO in Kombination mit ICE (Idarubicin, Cytarabin, Etoposid), sowie ATRA und Pegfilgrastim. In der Kontrollgruppe erfolgte keine Gabe von GO. Während der Konsolidierungstherapie I wurde zunächst GO verabreicht, gefolgt von ATRA und einer hohen Dosis Cytarabin. In der Kontrollgruppe wurde nur ATRA und Cytarabin gegeben. In Konsolidierung II und III erfolgte in beiden Gruppen die Gabe von ATRA und

Hochdosis-Cytarabin (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00893399?term=amlsg+09-09&rank=1 (13.09.2017). Das primäre Ziel der Studie stellt die Bewertung der Wirksamkeit der Chemotherapie plus ATRA mit oder ohne GO im Hinblick auf das EFS nach Induktions- und Konsolidierungstherapie bei erwachsenen Patienten mit neu diagnostizierter AML und Mutation in *NPM1* dar. Als sekundäres Ziel wurde die Bewertung der Wirksamkeit basierend auf der CR, dem OS, der CIR und der CID festgelegt.

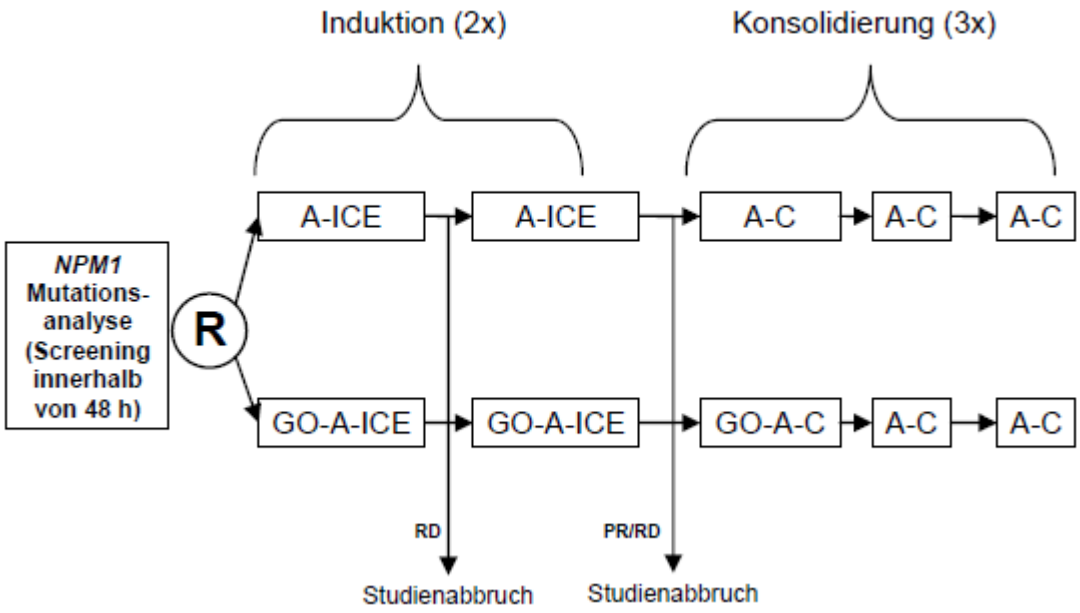

Abbildung 3: Therapieschema der AMLSG 09-09 Studie. Initial erfolgt die Randomisierung in zwei Studienarme, bei dem zum einen die Kontrollgruppe mit zwei Induktionszyklen A-ICE und im Anschluss mit drei Konsolidierungszyklen A-C behandelt wird und bei dem zum anderen die Interventionsgruppe zusätzlich in den Induktionszyklen sowie im ersten Konsolidierungszyklus mit GO behandelt wird. Bei refraktären Patienten oder Patienten mit partieller Remission, wurde in beiden Gruppen entweder nach dem ersten oder zweiten Induktionszyklus die Studie abgebrochen.

Abkürzungen: *NPM1* = Nucleophosmin 1; ® = Randomisierung; A = All-trans Retinsäure; ICE = Idarubicin, Cytarabin, Etoposid; C = Hochdosis-Cytarabin; GO = Gemtuzumab Ozogamizin; RD = refraktär (kein Therapieansprechen); PR = partielle Remission (partielles Therapieansprechen)

Bei der AMLSG 07-04-Studie (NCT00151242) handelt es sich um eine vierarmige, randomisierte Phase-II/III-Studie mit ATRA und deren Kombination bei der Induktions- und Konsolidierungstherapie, sowie Pegfilgrastim in der Konsolidierungstherapie bei jüngeren Patienten mit neu diagnostizierter AML. Es wurden Patienten im Alter von 18 bis 60 Jahren aufgenommen.

In Induktionsphase I bekamen die Patienten Cytarabin an Tag 1 bis 7, Idarubicin an Tag 1, 3 und 5, Etoposid an Tag 1 bis 3, ATRA von Tag 9 bis 21 und randomisiert ATRA von Tag 6 bis 8. Im zweiten Induktionszyklus erfolgte die Gabe der Chemotherapeutika bis auf Idarubicin gleich, welches nur an Tag 1 und 3 gegeben wurde. In der Konsolidierungsphase wurden die Medikamente ebenfalls unterschiedlich gegeben. In der einen Kohorte erfolgte die Gabe von Cytarabin an Tag 1, 3 und 5, ATRA wurde randomisiert von Tag 6 bis 21 gegeben und Pegfilgrastim einmalig an Tag 10. In der anderen Kohorte gab man Cytarabin an Tag 1 bis 3, ATRA wieder randomisiert, jedoch von Tag 4 bis 21 und Pegfilgrastim einmalig an Tag 8.

Es erfolgte eine Risikostratifikation anhand des Ansprechens nach Induktionstherapie und des zytogenetischen Befundes. Als primäre Untersuchungsparameter dienten die CR-Rate nach Induktionstherapie, sowie das RFS und das EFS (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00151242?term=amlsg+07-04&rank=1 (13.09.2017). Leiter der klinischen Prüfung war Prof. Dr. H. Döhner der Universitätsklinik Ulm.

Bei der AML HD98A (NCT00146120) handelt es sich um eine randomisierte Phase III Studie zur risikoadaptierten Therapie der AML des Erwachsenenalters im Rahmen von 16 bis 60 Jahren. Als Parameter wurde das RFS in einer Zeitspanne von zwei Jahren bestimmt. Anhand des zytogenetischen Befundes wurden die Patienten in Risikogruppen eingeteilt, entsprechend niedrigem, mittlerem oder hohem Risikoprofil. Die Behandlung bestand in der ersten Induktionstherapie aus ICE, die bei Ansprechen von einem zweiten Zyklus ICE ergänzt wurde. Bei refraktären Patienten folgte nach der ersten Behandlung ein Zyklus mit A-HAM (All-trans Retinsäure, Hochdosis-Cytarabin, Mitoxantron) und es wurde intensiv nach potentiellen Stammzellspendern gesucht. Denjenigen Patienten, die in eine CR gekommen waren, wurde eine erste Konsolidierungstherapie mit HAM verabreicht. Die zweite Konsolidierung war dann abhängig vom Risikoprofil. Bei den Patienten mit hohem Risiko sollte eine HSCT von einer verwandten oder auch nicht verwandten Person stattfinden. Bestand ein intermediäres Risiko, so sollte die Transplantation möglichst von einem HLA-identen Familienmitglied erfolgen. Konnte hierfür kein entsprechender Spender gefunden werden, so wurden die Patienten randomisiert in jene, die eine autologe

HSCT bekamen und solche, die einem zweiten Zyklus HAM unterzogen wurden. Bei niedrigem Risiko wurde direkt ein zweiter Zyklus HAM verabreicht (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00146120?term=aml+hd98a&rank=1 (13.09.2017). Leiter der klinischen Prüfung war Prof. Dr. H. Döhner der Universitätsklinik Ulm.

Zur Beurteilung der Überlebenszeit wurden die gängigen Kriterien des EFS, RFS und OS verwendet (Döhner et al. 2010). Das OS galt für alle Patienten einer Studie und wurde als die Zeitspanne zwischen Studieneintritt und Tod jeglicher Ursache gemessen. War zum Zeitpunkt des letzten FUP der Überlebensstatus des Patienten unklar, so wurde der Patient zensiert und dies an dem Tag, an dem der Patient zuletzt bewiesenermaßen am Leben war.

Das RFS war nur für die Patienten definiert, die eine CR erreicht hatten. Der Zeitraum galt ab dem Erreichen der Remission bis zum Auftreten eines Rezidivs oder einem Tod jeglicher Ursache. Für alle Patienten einer Studie galt wiederum das EFS. Dies war definiert als der Zeitraum zwischen Studieneintritt und Wirkungsverlust der Induktionstherapie, einem Rezidiv nach CR oder einem Tod jeglicher Ursache. Die RD wiederum war ausschließlich gültig für Patienten, die eine CR erreicht hatten und galt von dem Tag an, an dem die Remission erreicht wurde bis zum Auftreten eines Rezidivs. Ein ebenfalls gebräuchlicher Messwert war die CIR. Diese galt ebenso nur für Patienten, die eine CR erreicht hatten und wurde zwischen der erreichten Remission und dem Rezidiv gemessen.

Bei allen genannten Ereignissen galt für diejenigen Patienten, bei denen der letzte Status unbekannt war, der aktuellste Status des FUP, welcher als Zensurdatum bezeichnet wurde (http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/therapie/responsekriterien/allgemein (13.09.2017).

2.2.2 Patientenproben

Die Patienten wurden an 54 sich in Deutschland und Österreich befindlichen Prüfzentren aufgenommen und untersucht. Dabei wurde Knochenmark durch Punktion des Beckenkamms und/oder peripheres Blut (PB) durch eine Venenpunktion gewonnen. Die verwendeten Proben wurden vor Therapiebeginn entnommen und an die zentralen Referenzlabore der AMLSG versendet, wo sie weiterverarbeitet wurden. Im Verlauf der Therapie erfolgten weitere, mehrmalige Probenentnahmen nach Induktions- und Konsolidierungstherapie, sowie im FUP

und auch im Fall eines Rezidivs. Von den insgesamt 159 Patienten, die in die Analysen eingingen, wurden insgesamt 1331 Proben von unterschiedlichen Zeitpunkten während und nach Abschluss der Therapie untersucht. Für alle drei Studien, sowie für die Verwendung der Patientenproben, lag ein positives Ethikvotum vor (AMLSG 09-09: Geschäfts-Nr. 223/09; AMLSG 07-04: Antrag-Nr. 108/2004; AML HD98A: Antrag-Nr. 181/99).

2.2.3 Vorgehen

Die in der hier vorliegenden Arbeit analysierten Proben stammten aus der AMLSG 09-09 Studie (n=58). Alle Patienten dieser Studie trugen *NPM1*^{mut}. Im ersten Schritt wurden die Exone des *DNMT3A* Gens aller Proben auf Mutationen untersucht; dabei lag der Fokus insbesondere auf den Zielmutationen *DNMT3A*^{mut}-R882H und *DNMT3A*^{mut}-R882C. Von diesem Kollektiv mit 243 Patienten konnten 28 Patienten mit einer R882C- und 44 Patienten mit einer R882H-Mutation identifiziert werden. Davon wurden schließlich diejenigen in die Untersuchung aufgenommen, von denen mindestens zwei FUP-Proben vorhanden waren (n=58). Damit lagen von der AMLSG 09-09 Studie 617 Patientenproben vor.
Um eine statistisch fundierte Analyse durchführen zu können, wurden zusätzlich die MRD-Verläufe aus Proben der AMLSG 07-04 und der AML HD98A mit einbezogen und dann aus dem Gesamtkollektiv die statistische Auswertung durchgeführt. Die Proben aus diesen beiden Studien wurden im Rahmen anderer Projekte analysiert.
Einen Überblick über den schematischen Ablauf aller erfolgten Prozesse, stellt Abbildung 4 dar.

2.3 Materialgewinnung und Probenaufbereitung

2.3.1 Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation dient der Gewinnung mononukleärer Zellen aus PB- und KM-Proben von Patienten. Sie stellt die Grundlage für sämtliche molekulargenetische Techniken dar, die auf das Vorliegen reiner Zellen angewiesen sind. Das Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Dichte von Zellen. Kern des Verfahrens ist Ficoll, wobei es sich um ein Saccharose-Epichlorhydrin-

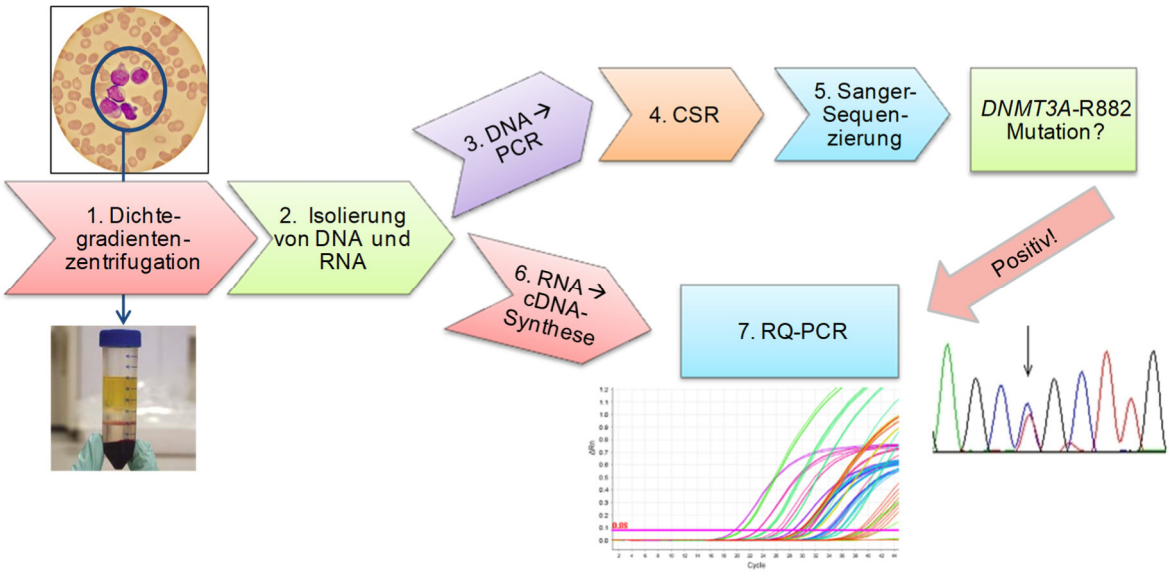

Abbildung 4: *Flow sheet* zur schematischen Darstellung der durchgeführten Prozesse. Als erstes wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen aus PB- und KM-Proben gewonnen und aus diesen DNA und RNA isoliert. Aus der DNA konnten schließlich über die verschiedenen Prozesse der PCR, CSR und Sanger-Sequenzierung *DNMT3A*-R882 Mutationen identifiziert werden. Aus der RNA wurde die cDNA synthetisiert, welche nun für die Quantifizierung der Mutationen anhand der RQ-PCR eingesetzt werden konnte.

Abkürzungen: KM = Knochenmark; PB = Peripheres Blut; DNA = Desoxyribonukleinsäure; RNA = Ribonukleinsäure ; PCR = Polymerasekettenreaktion; CSR = *cycle sequencing reaction*; cDNA = *complementary deoxyribonukleinacid*; *DNMT3A = DNA Methyl-Transferase 3 Alpha*; RQ-PCR = quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion

Copoloymer handelt, das eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten aufweist, jedoch eine geringere als jene von Erythozyten und Granulozyten. Das Probenmaterial lag in einem 50 ml Falcon vor. Die Verdünnung von KM-Proben erfolgte immer in einem Verhältnis von 1:1 mit RPMI-Medium. Entsprechend der Probenmenge wurde Ficoll ebenfalls im Verhältnis 1:1 in ein 50 ml Falcon pipettiert. Nun wurde das Probenmaterial vorsichtig mit einer Pipette auf Ficoll überschichtet, wobei sich die beiden Schichten nicht vermischen durften. Daraufhin erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen pro Minute (U/min), wonach mit einer sterilen Pasteurpipette die sog. Interphase, d.h. die mononukleären Zellen, die nun als weißer Ring sichtbar waren, abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon überführt wurden. Die anderen Zellarten, wie Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und tote Zellen waren durch die Zentrifugation auf den Grund des Röhrchens gewandert. Im Anschluss erfolgte die

Reinigung der Zellen. Diese wurde in zwei Waschschritten durchgeführt, wobei die Zellsuspension zunächst mit einer definierten Menge an 1xPBS aufgefüllt und anschließend für je 7 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet mit einem äquivalenten Volumen an RPMI-Medium resuspendiert und daraufhin das exakte Volumen und die abschließende Zellzahl bestimmt. Die isolierten Zellpellets wurden im Anschluss entweder zur Konservierung in -80°C Freezern aufbewahrt oder zur weiteren Diagnostik in das entsprechende Labor weitergeleitet.

2.3.2 Isolierung von DNA und RNA

Für die Isolierung der DNA und der RNA wurde das Allprep DNA/RNA Mini Kit verwendet, welches eine gleichzeitige, standardisierte Extraktion und Aufreinigung von genomischer DNA und Gesamt-RNA aus einer einzelnen Probe in einem einzigen Vorgang ermöglicht. Die gewonnenen DNA-Fragmente können für PCRs, Southern Blots, Matrix-CGH (*comparative genomic hybridization*), SNP-Analysen (*single nucleotide polymorphism*) und Genotypisierungen verwendet werden, da sie die dafür notwendige Größe von durchschnittlich 15 bis 30 kb besitzen. Auch die aufgereinigte und stabilisierte RNA kann vielseitig verwendet werden, nämlich für PCR, RQ-PCR, Microarrays, Northern Blots oder Sequenzierungen. Die Fragmente sind hierbei größer als 200 Nukleotide.

Der Prozess wurde mit der Lyse der Zellpellets begonnen, welche mit 600 µl (bei ≥ $0{,}5x10^7$ – $1x10^7$ Zellen / Tube) bzw. 350 µl (bei < $0{,}5x10^7$ Zellen / Tube) RLTplus-Puffer durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette erreicht wurde. Dies musste sehr gründlich durchgeführt werden, damit alle Zellen im Pellet lysiert wurden. Dieses homogenisierte Lysat wurde im Anschluss auf einen QIAshredder pipettiert und in einem Collection-Tube bei 13.000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde der gewonnene Durchfluss in die Allprep DNA spin Säule überführt und für 1 Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert. Durch diesen Vorgang wurde die DNA von der RNA isoliert. Letztere befand sich nun im Eluat und die DNA in der Membran der Säule. Im weiteren Verlauf wurde die empfindlichere RNA als erstes weiterverarbeitet.

Dafür wurde zum gewonnenen Durchfluss 600 µl (bei ≥ 0,5 - $1x10^7$ Zellen / Tube) bzw. 350 µl (bei < $0{,}5x10^7$ Zellen / Tube) 70%iges Ethanol hinzugegeben und

gründlich gemischt. Diese Lösung wurde dann in zwei Schritten auf die RNeasy Säule überführt und für je 1 Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert. Auf die RNeasy Säule wurde nun 350 µl RW1-Puffer pipettiert und dieses wiederum für 1 Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der daraus gewonnene Durchfluss wurde verworfen, auf die sich nun in der Membran befindliche RNA 80 µl DNase-Mix (Aliquots hergestellt aus RNase-Free DNase Set und RDD-Puffer) pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde erneut 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy Säule gegeben, diese für 1 Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und anschließend 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben. Daraufhin wurde erneut für 1 Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und ein zweites Mal 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 13.000 U/min wurde erneut das Eluat verworfen und noch ein letztes Mal für 1 Minute bei 13.000 U/min trockenzentrifugiert. Die RNeasy Säulen wurden nun in nummerierte und beschriftete Collection-Tubes überführt und daraufhin mit 40 µl (bei ≥ 0,5 - $1x10^7$ Zellen / Tube) bzw. 30 µl (bei < $0,5x10^7$ Zellen / Tube) RNase-freiem Wasser versetzt. Die Tubes wurden für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, für 1 Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert und schließlich das Eluat in 2,0 ml SafeSeal-Tubes überführt, welche sich auf einem Kühlblock befanden. Zum RNA-Eluat wurde zum Schluss noch 1,5 µl (bei < $0,5x10^7$ Zellen / Tube) bzw. 2 µl (bei ≥ 0,5 - $1x10^7$ Zellen / Tube) SUPERase Inhibitor hinzugegeben und dieses Gemisch kurz gevortext.

Nach Extraktion der RNA wurde im Anschluss die Extraktion der DNA weiter durchgeführt. Auf die vorbereiteten Allprep DNA Säulen wurde 500 µl AW1-Puffer pipettiert, diese für 1 Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, wiederum 500 µl AW2-Puffer aufpipettiert, die Tubes erneut für 2 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert und nochmals 1 Minute trockenzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Allprep DNA Säulen in sterile Elutions-Tubes überführt und je nach Ausgangszellzahl eine entsprechende Menge TE-Puffer auf die Mitte der Säulenmembran pipettiert. Bei $1x10^7$ Zellen / Tube 100 µl TE-Puffer, bei $0,9x10^7$ Zellen / Tube 90 µl und bei allen ≤ $0,5x10^7$ Zellen / Tube 50 µl TE-Puffer. Diese Lösung wurde für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 Minute bei 13.000 U/min

zentrifugiert. Die sich nun im Durchfluss befindliche DNA wurde in 1,5 ml Safe-Seal-Tubes überführt. Zur Kontrolle der DNA- und RNA-Extraktion wurde im Anschluss immer eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden von der gewonnenen DNA und RNA je 2 µl in zuvor vorbereitete 1,5 ml-Tubes mit je 2 µl 10x BlueJuice Loading Buffer und je 8 µl RNase-freiem Wasser überführt und homogen vermischt.

Zur Elektrophorese wurde ein vorbereitetes 1%iges Agarosegel verwendet, welches zuvor aus 1,2 g Agarose und 120 ml 1xTAE-Puffer hergestellt worden war. Der 1xTAE-Puffer wurde aus 100 ml 50xTAE-Puffer und 5 Liter entsalztem Wasser angesetzt. Die Gelelektrophoresekammer wurde mit 1xTAE-Puffer gefüllt und über ein Netzgerät an 400 mA angeschlossen. In das Gel wurden nun die insgesamt 12 µl der RNA- und DNA-Aliquots pipettiert und flankierend dazu 4 µl eines 1Kb-DNA-Ladders aufgetragen, welcher in der Interpretation der Gelelektrophorese als Größenmarker diente. Daraufhin lief das Gel im Power Supply EPS 600 bei 100 V für 40 Minuten.

Es wurde Agarose zur Herstellung der Gele verwendet, da diese im Vergleich zu anderen Gelen relativ großporig ist und sich damit besonders gut zur Trennung von DNA und hochmolekularen Proteinen eignet. Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Ionenbeweglichkeit, welche dazu genutzt wird, um Moleküle im elektrischen Feld aufzutrennen. Kleinere, negativ geladene Teilchen (Anionen) wandern am schnellsten in Richtung der positiv geladenen Anode und positiv geladenen Teilchen (Kationen) in Richtung der negativ geladenen Kathode. Durch dieses Prinzip wurden auch die DNA-Proben in der vorliegenden Arbeit aufgetrennt. In der Zwischenzeit erfolgte die spektrophotometrische Messung am NanoDrop zur Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration. Am Nanodrop 1000 ND wurde die Konzentration der Nukleinsäuren über die optische Dichte λ=260 nm (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum von RNA und DNA, gemessen. Dabei entsprach eine OD_{260} von eins bei der RNA einer Konzentration von 40 µg/ml und bei der DNA einer Konzentration von 50 µg/ml.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 20 bis 30 Minuten in ein Ethidiumbromidbad eingelegt. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um einen interkalierenden Farbstoff, der die Nukleinsäurebanden unter UV-Licht sichtbar

macht. Auf dem DNA-Agarose-Bild war nun die Gesamtheit der DNA der im Pellet vorhandenen Zellen sichtbar, sowie die Auftrennung des TrackIt™ 1 Kb DNA Ladders. Qualitativ gute DNA war dabei als eine dicke Bande zu erkennen, wohingegen degradierte DNA als eine Art Schweif mit mehreren, schwächeren Banden sichtbar wurde. Auf dem RNA-Agarose-Bild war lediglich die rRNA zu erkennen, welche den größten RNA-Anteil in humanen Zellen ausmacht. Sichtbar waren zwei Banden, von denen die eine etwas stärker (28S RNA) und die andere etwas schwächer (18S RNA) dargestellt wurde. Bis zur weiteren Verarbeitung konnte die DNA nun entweder im Kühlschrank zwischengelagert oder bei -20°C eingefroren werden. Die RNA musste zügig weiterverarbeitet oder bei -80°C tiefgefroren werden.

2.3.3 Primer und Sonden zum Nachweis und zur Quantifizierung von *DNMT3A*^{mut}

2.3.3.1 Primer

Als Primer werden Oligonukleotide bezeichnet, die bei der *in vitro* Amplifikation von DNA, wie bei der PCR, der DNA-Sequenzierung und bei der reversen Transkription benötigt werden. Bei diesen Methoden werden DNA-replizierende Enzyme, die sog. DNA-Polymerasen verwendet, die für ihre erste Verbindungsreaktion eine Hydroxygruppe (3‘-OH) als Startpunkt brauchen und die über Wasserstoffbrückenbindungen komplementär an DNA oder RNA gebunden werden. Dadurch entsteht immer ein freies 3‘-OH-Ende, welches von der DNA-Polymerase oder reversen Transkriptase in 5‘ → 3‘-Richtung verlängert werden kann. Die Primersequenz war in dieser Arbeit für jedes Exon individuell vorgegeben. Davon ausgehend wurden die verwendeten Primer von der Firma Eurofins mwg/operon synthetisiert und als sog. Stocklösungen im Labor mit einer Konzentration von 100 pmol/µl gelöst und hieraus wiederum Gebrauchslösungen von 10 pmol/µl hergestellt.
In folgenden Tabellen sind alle verwendeten Primer aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Primer für die PCR mit Angabe der Basenabfolge für die Exons.

Abkürzungen: PCR = Polymerasekettenreaktion; T = Thymin; G = Guanin; A = Adenin; C = Cytosin

Exon	Sequenz Forward-Primer (5' - 3')
Exon 2	5'-TGA AGG GAG CCT GCC TCG GTT T-3'
Exon 3	5'-CCC CAG ACA GGC CTG GAA TGC TA-3'
Exon 4	5'-TCA GAG CGG TCA ATG ATC CAA AAC A-3'
Exon 5	5'-AGC CAC TCC AGT AAT TCT GCC GA-3'
Exon 6	5'-GTG CCT CCT TGG TGG GTC CGT-3'
Exon 7	5'-TTT CAC GGC AAG GCA GCT GGT TG-3'
Exon 8	5'-GAT CAG GGT GGC AGG GCC TCG T-3'
Exon 9	5'-GCC AGT TGC AAG GCA TGG GGT G-3'
Exon 10	5'-TTG CCT GTG CCA CCC TCA CTA CTC-3'
Exon 11/12	5'-ACC CCA CTG TAA GGA GGG TGG G-3'
Exon 13	5'-GGA GAG GCC CTT CGG TGG TAC T-3'
Exon 14	5'-GGT GTG GAG CCT CCC TTC GTC-3'
Exon 15/16	5'-TCC AGG TAG CAC ACC TTG GCC T-3'
Exon 17	5'-TAG GAC TTG GGC CTA CAG CTG AC-3'
Exon 18	5'-TGC AGC TAG GGT CGT GAG CCT G-3'
Exon 19	5'-CCC GAT GAC CCT GTC TTC CCG T-3'
Exon 20	5'-CAG CAT GCC GGC GCT GTT TCA T-3'
Exon 21	5'-GTG AAC TAG TGG CTG CTG GGG GAG-3'
Exon 22	5'-GCA TGA CCA GTG TTG GCT GGT GA-3'
Exon 23	5'-CCG GGT CCT GCT GTG TGG TTA-3'

Exon	Sequenz Reverse-Primer (5' - 3')
Exon 2	5'-AGC ACT GAG TGA TGC GGT CAT G-3'
Exon 3	5'-GTC CCT GCA GGA CAT ACA TCA CTG-3'
Exon 4	5'-AGG CCA TAG CCT TGG CAA GCA-3'
Exon 5	5'-ACT CGC CAC CCG TGT CCT TCT-3'
Exon 6	5'-GGG TTA GCC TGA AGG GGA AAC TGA G-3'
Exon 7	5'-AGA GGA GAG CAG GAC GGG AGG AG-3'
Exon 8	5'-CAC CAC AGG CAG AGT AGG GGT GA-3'
Exon 9	5'-TGC ATA CGG GCG AGC GAG GTG-3'
Exon 10	5'-CCT TGG CAG CCC TCC CTA AGC A-3'
Exon 11/12	5'-TAC TCT GCC CCA TGC CAC ACT A-3'
Exon 13	5'-TAC ATG CCC AGA AGC GGT GGA C-3'
Exon 14	5'-GAG GCC AAG GTG TGC TAC CTG GA-3'
Exon 15/16	5'-TTT TGC CAG AGT TGC CCA CAC A-3'
Exon 17	5'-ATG AAA GGA GGC AAG GGC TGC CT-3'
Exon 18	5'-CGG GAA TAG CTG TCC CAG GGC AG-3'
Exon 19	5'-TTC CCA AAC AGG CCC CTT GCA-3'
Exon 20	5'-CCA CTA TGG GTC ATC CCA CCT GCA-3'
Exon 21	5'-CGC TCC ACC TCA TCC TGC CCT TCC-3'
Exon 22	5'-TGG GAA AGG CAG AGG ACC CCC G-3'
Exon 23	5'-GGT GCT GAT ACT TCT CTC CAT CCT-3'

Tabelle 7: Verwendete Primer für die CSR mit Angabe der Basenabfolge für die jeweiligen *Forward*- und *Reverse*-Exons.

Abkürzungen: CSR = *cycle sequencing reaction; DNMT3A* = *DNA Methyl-Transferase 3 Alpha*; Ex = Exon; F = Forward; R = Reverse; A = Adenin; C = Cytosin; T = Thymin; G = Guanin

Primer	Sequenz (5' - 3')
DNMT3A Ex11/12F	5'-ACC CCA CTG TAA GGA GGG TGG G-3'
DNMT3A Ex13R	5'-TAC ATG CCC AGA AGC GGT GGA C-3'
DNMT3A Ex14R	5'-GAG GCC AAG GTG TGC TAC CTG GA-3'
DNMT3A Ex15/16R	5'-TTT TGC CAG AGT TGC CCA CAC A-3'
DNMT3A Ex17F	5'-TAG GAC TTG GGC CTA CAG CTG AC-3'
DNMT3A Ex18F	5'-TGC AGC TAG GGT CGT GAG CCT G-3'
DNMT3A Ex19R	5'-TTC CCA AAC AGG CCC CTT GCA-3'
DNMT3A Ex20R	5'-CCA CTA TGG GTC ATC CCA CCT GCA-3'
DNMT3A Ex21F	5'-GTG AAC TAG TGG CTG CTG GGG GAG-3'
DNMT3A Ex22R	5'-TGG GAA AGG CAG AGG ACC CCC G-3'
DNMT3A Ex23 6F:	5'-CCA CTA TAC TGA CGT CTC CAA CAT G-3'
DNMT3A Ex23 6R:	5'-GAC CGG CCC AGC AGT CT-3'

2.3.3.2 LNA-Primer

Des Weiteren wurden für die quantitative *real-time* PCR sog. LNA-Primer verwendet. Bei LNA handelt es sich um ein modifiziertes RNA-Nukleotid, bei dem eine zusätzliche Verbindung zwischen dem 2'-Sauerstoff und dem 4'-Kohlenstoff besteht. Dadurch wird das Nukleotid in seiner 3'-Endo-Form fixiert und wird somit unflexibler und stabiler. Wird die LNA nun in einen Primer integriert, erhöht sich seine Schmelztemperatur und er hybridisiert stärker an die komplementäre Sequenz. Dadurch wurden in unserer Arbeit die Amplifikationen der *DNMT3A* Wildtypsequenz signifikant verringert und die Spezifität der RQ-PCR erhöht.

Tabelle 8: Verwendete LNA-Primer für die RQ-PCR mit Angabe der Basenabfolge.

Abkürzungen: RQ-PCR = Quantitative *real-time* PCR; LNA = locked nucleic acid; A = Adenin; C = Cytosin; T = Thymin; G = Guanin; InvdT = Inversion desoxythymidin

Primer	Sequenz (5' - 3')
LNA H:	5'-GAG CCG CTT GG/3InvdT/
LNA C:	5'-GAG CCG CTT GG/3InvdT/

2.3.3.3 Sonden

Gensonden sind kurze, einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle, deren Sequenz bekannt ist und die dazu genutzt werden, bestimmte Gene oder Gensequenzen in einem Genom aufzuspüren. Sie binden an ihre komplementäre Sequenz (Hybridisierung). Die Stärke der Bindung hängt dabei von der Übereinstimmung mit der DNA-Sequenz ab und damit von der Anzahl an hybridisierten Basen. Um das gesuchte Gen bzw. die gesuchte Sequenz zu detektieren, werden die Sonden mit Markermolekülen versehen. Dabei kann es sich zum einen um Radioisotope wie ^{32}P oder ^{35}S handeln oder aber auch um Fluoreszenzfarbstoffe.
Eine TaqMan PCR-Sonde besitzt folgende Charakteristika:

- Fluoreszierender 5‘-Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat)
- 3‘-Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat)
- 3‘-OH-blockierendes Phosphat

Der fluoreszierende Reporterfarbstoff ist kovalent an das 5‘-Ende der Sonde geknüpft. Meist wird dabei FAM (6-Carboxy-Fluorescein) verwendet, allerdings gibt es eine Reihe weiterer Reporterfarbstoffe, wie z.B. TET (Tetrachloro-6-carboxy-fluorescein), JOE (2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein) oder HEX (Hexachloro-6-carboxy-fluorescein). Dem verwendeten Reporterfarbstoff steht jeweils ein Quencher-Farbstoff gegenüber. Dafür wurde früher standardmäßig TAMRA eingesetzt, welches jedoch in den letzten Jahren immer mehr durch BHQ1 (3‘-terminaler BlackHole™ Dark Quencher) abgelöst wurde. Die Dark Quencher weisen gegenüber TAMRA den Vorteil auf, dass sie keine zusätzliche Fluoreszenz freisetzen, die die Messung stören könnten.
Die neueste Generation der Sonden sind sog. MGB-Sonden (*Minor Groove Binder*), die durch ein Molekül modifiziert sind, welches sich in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA einlagert. Dadurch entstehen kürzere Sonden mit einer höheren Spezifität, so dass Alleldiskriminierungen und Punktmutationsnachweise leichter durchgeführt werden können. Der Quencher wird schließlich über ein Linker-Arm-modifiziertes Nukleotid (LAN) an das 3‘-Ende der Sonde geknüpft. Am Ende wird die Sonde noch chemisch phosphoryliert, um eine Extension des 3‘-Endes im Verlauf der PCR zu verhindern.

Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden für *DNMT3A* waren mit dem Reporter FAM (Anregung bei 488 nm, Emission bei 518 nm) und dem Quencher BHQ1 markiert. Bei *ABL1* war die Sonde mit dem Farbstoff HEX (Anregung bei 488 nm, Emission bei 556 nm) markiert.

Tabelle 9: Verwendete Sonden für die RQ-PCR mit Angabe der Basenabfolge.
Abkürzungen: RQ-PCR = Quantitative *real-time* PCR; *DNMT3A* = *DNA Methyl-Transferase 3 Alpha*; A = Adenin; C = Cytosin; T = Thymin; G = Guanin, *ABL1* = *Abelson murine leukemia virus oncogene 1*

Sonden	Sequenz (5' - 3')
DNMT3A C Sonde:	5'-CTG CTT GGC GAG GCA-3'
DNMT3A H Sonde:	5'-CCA CTT GGC GAG GCA-3'
ABL1 Sonde:	5'-CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T-3'

2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um ein *in vitro* Verfahren zur Amplifizierung von DNA, welches heutzutage zu den Standardverfahren in jedem molekulargenetischen Labor gehört. Anwendung findet die PCR beim genetischen Fingerabdruck, bei Vaterschaftstests, der Erkennung von Erbkrankheiten, der Klonierung von Genen oder der Analyse alter, fossiler DNA.

Verwendet wird die PCR um kurze, genau definierte Teile eines DNA-Stranges zu vervielfältigen. Dabei kann es sich um ein ganzes Gen, den Teil eines Genes oder auch um einen nicht-codierenden Abschnitt der DNA handeln. Bei einer Standard-PCR können bis zu 3000 Basenpaare (3 kbp) lange DNA-Fragmente erfasst werden. Unter optimalen Bedingungen jedoch und bei bestimmten fortgeschrittenen Verfahren, können auch Fragmente von 20 bis 40 kbp amplifiziert werden. Bei dem Enzym, das für diese Reaktion essenziell ist, handelt es sich um die DNA-Polymerase. Des Weiteren werden Puffer, Desoxynukleosid-triphosphate und jeweils zwei Primer benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Durchführung der PCR mit der Herstellung des Mastermixes begonnen.

Für den Mastermix wurden zunächst MgCl, dNTPs, die Primer F und R und Puffer für 10 bis 15 Minuten auf einem Heizblock aufgetaut. Erst kurz vor Beginn der Mastermixherstellung, wurde dann die reverse Transkriptase (RT), nämlich die AmpliTaqGold aus dem Freezer genommen und auf einem Kühlblock zwischengelagert. Für eine Applied-96-Well-Platte wurde der Mastermix in 100-

facher Menge hergestellt. Jedes Reagenz, bis auf das Enzym, wurde vor Entnahme mit der Pipette gut gevortext. In Abhängigkeit der Anzahl an Wells, wurden nun die entsprechenden Mengen an MgCl, dNTPs, Primer und Puffer in ein 5 ml-Tube pipettiert und mit der Pipette nochmals durchmischt. Am Ende wurde dann die RT hinzugegeben und vorsichtig mit der Pipette gemischt.
Nach Fertigstellung des Mastermixes wurde dieser nun mit der DNA angesetzt. Die DNA wurde zur Zwischenlagerung im Kühlschrank aufbewahrt, da sie deutlich stabilere Eigenschaften aufweist, als RNA. Mit dem Handistep wurden je 48 µl des zuvor gevortexten Mastermixes in die entsprechenden Wells einer Applied-96-Well-Platte pipettiert. Daraufhin musste jede einzelne DNA-Probe gevortext und je 1 µl DNA in jedes Well gefüllt werden. Nur wenn die DNA-Konzentration der Probe unter 70 ng/µl lag, so wurden 2 µl der Probe genommen.
Nachdem die sorgfältig mit Deckeln verschlossene Platte gevortext worden war, musste sie noch herunterzentrifugiert werden. Dafür wurden sowohl die Beschleunigungs-, als auch die Abbremsungszahl der Zentrifuge auf neun eingestellt und diese direkt nach Erreichen von 1000 U/min wieder zum Erliegen gebracht. Anschließend wurde die Platte in den Thermocycler gestellt und bei dem Programm „*DNMT3A* mit 50 µl“ gestartet (Tabelle 10).

Tabelle 10: Dargestellt ist das Pipettierschema für die *DNMT3A*^{mut}-PCR mit den entsprechenden Reagenzien mit Mengenangabe in µl und die Angabe über die PCR-Zyklen mit der jeweiligen Temperatur in °C und der Zeit in min und sec.

Abkürzungen: PCR = Polymerasekettenreaktion; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in der *DNA Methyltransferase 3 Alpha*; dest. = destilliert; $MgCl_2$ = Magnesiumchlorid; dNTPs = DesoxyNukleosidTriPhosphat; F = Forward; R = Reverse; min = Minute; sek = Sekunden; µl = Mikroliter; °C = Grad Celcius; ∞ = unendlich

Reagenz	***DNMT3A*^{mut} (100x)**
Aqua dest.	3470 µl
Puffer	500 µl
$MgCl_2$	360 µl
dNTPs	40 µl
Primer F	200 µl
Primer R	200 µl
AmpliTaq Gold	30 µl

Temperatur	**Zeit**	
94°C	5 min	
94°C	30 sec	30 Zyklen
61°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
10°C	∞	

Um zu kontrollieren, ob die PCR ordnungsgemäß abgelaufen war, wurde im Anschluss eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden je 4 µl Orange G (3x) als Markerfarbstoff in die gewünschte Anzahl an Kammern einer 96-Well-Platte pipettiert, abhängig davon wie viele Proben untersucht werden sollten. Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurden flankierend noch zwei *Ladder* (100 kb) pipettiert, bevor je 7 µl der DNA-Proben in die Kammern hinzugegeben wurden.
Des Weiteren war immer eine Kammer für die NTC-Probe (*no template control*) reserviert. Dabei handelte es sich um eine Probe, die nur den Mastermix für die PCR, jedoch kein DNA-Material enthielt. Hiermit wurde kontrolliert, ob die Reagenzien kontaminiert waren bzw. ob bei der Herstellung des Mastermixes eine Kontamination mit Fremdmaterial stattgefunden hatte. War bei der folgenden Gelelektrophorese eine Bande in dem Well der NTC-Probe zu sehen, so konnte davon ausgegangen werden, dass der Mastermix mit fremden Genmaterial kontaminiert und somit auch alle anderen Proben mit der richtigen DNA durch die Verunreinigung nicht mehr aussagekräftig waren.
Das vorbereitete Gemisch aus Markerfarbstoff und DNA, sowie die *Ladder* und die NTC-Probe wurden nun in das vorbereitete Gel pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde für 40 Minuten bei 160 V durchgeführt. Hiernach erfolgte eine 20- bis 30-minütige Inkubation in einem Ethidiumbromidbad, woraufhin das Gel fotografiert und interpretiert wurde.
Anhand des Bildes konnte man nun feststellen, ob die PCR erfolgreich abgelaufen war oder nicht. Nach Färbung mit Ethidiumbromid waren die DNA-Proben als sog. Banden im Elektrophoresebild sichtbar. Je nach Molekülmasse war die DNA unterschiedlich weit gewandert, wobei die Strecke in der Einheit von Kilobasen (kb) mit Hilfe des *Ladders* abgeschätzt werden konnte. Für jedes Exon ergab sich somit immer ein spezifisches Bandenmuster. War die PCR ordnungsgemäß abgelaufen, so konnte mit der PCR-Aufreinigung fortgefahren werden.
In der Vorbereitung hierfür, wurde der benötigte PM-Puffer in ein dafür vorgesehenes Behältnis gefüllt. Daraufhin wurden die Deckel der DNA-Proben Reihe für Reihe geöffnet und je 200 µl Puffer in zwei Schritten zu der DNA in die Wells pipettiert, wobei darauf zu achten war, nicht die Oberfläche mit der Pipettenspitze zu berühren. Im Anschluss wurde der Inhalt in drei Schritten in eine QIAquick-Platte pipettiert, welche zuvor in den Einsatz der Vakuumpumpe gesetzt

wurde. Das Vakuum wurde angelegt bis alles durchgetropft war. Daraufhin wurden mit der Multipette 750 µl PE-Puffer in jedes Well pipettiert und das Vakuum danach erneut für 10 Minuten angelegt. Nach Ende konnte die Platte auf Tüchern ausgeklopft werden bis sie ganz trocken war.
Final wurde mit dem Handistep 50 µl EB-Puffer in jedes Well pipettiert und schließlich die Platte mit einer VWR-Platte als Untersatz bei Programm 4 (3800 U/min für 6 Minuten bei Beschleunigung/Abbremsung 9/9) abzentrifugiert. In der VWR-Platte war nun das aufgereinigte PCR-Produkt enthalten.

2.3.5 *Cycle Sequencing Reaction* (CSR)

Im Anschluss an die PCR erfolgte die CSR. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, das der PCR vom Prinzip her ähnlich ist, jedoch zwei wesentliche Unterschiede aufweist. Erstens wird bei der CSR nur ein Primer verwendet, sodass die Amplifikation nur an einem Strang stattfindet. Zweitens werden Didesoxynukleotidtriphosphate eingesetzt, welche durch Einbau in den Strang die Vervielfältigung basenspezifisch stoppen. Dadurch wird weniger DNA-Template als Ausgangsmaterial benötigt.
Zunächst musste wie bei der PCR ein Mastermix hergestellt werden, wofür der BigDye® Terminator v1.1 auf Eis und mit Alufolie abgedeckt, aufgetaut werden musste. Daraufhin wurden Aqua dest. und der für ein gewünschtes Exon spezifische Primer in einem 2,0 ml Tube gemischt, schließlich der Puffer und der BigDye dazupipettiert und das Gemisch bei 1000 U/min mit einer Beschleunigung und Abbremsung von neun herunterzentrifugiert. Anschließend wurde mit der Bearbeitung des aufgereinigten PCR-Produktes fortgefahren. Mit dem Handistep wurden je 14 µl Mastermix in jedes Well einer Applied-Platte auf Eis pipettiert. Daraufhin wurde die PCR-Platte geöffnet und je 1 µl des Produktes in das entsprechende Well der Applied-Platte pipettiert. Nachdem nun die Platte verschlossen, gevortext und bei 1000 U/min mit einer Beschleunigung und Abbremsung von neun herunterzentrifugiert worden war, konnte sie mit dem *DNMT3A*-spezifischen CSR-Programm in den Thermocycler gestellt werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Dargestellt ist das Pipettierschema der *DNMT3A*^{mut}-CSR mit den entsprechenden Reagenzien mit Mengenangabe in µl und die Angabe der CSR-Zyklen mit der jeweiligen Temperatur in °C und der Zeit in min und sec.

Abkürzungen: CSR = *cycle sequencing reaction*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in der *DNA Methyl-Transferase 3 Alpha*; dest. = destilliert; min = Minute; sek = Sekunden; µl = Mikroliter; °C = Grad Celsius; ∞ = unendlich

Reagenz	*DNMT3A*^{mut} (100x)
Aqua dest.	1000 µl
Big Dye 3.1	200 µl
Sequenzier-Puffer	100 µl
Primer	100 µl

Temperatur	Zeit	
96°C	2 min	
95°C	15 sec	} 40 Zyklen
55°C	1 min	
60°C	3 min	
4°C	10 min	
4°C	∞	

Nach Ende musste die Platte mit Alufolie abgedeckt in den Kühlschrank gestellt oder direkt weiterverarbeitet werden. Um die DNA später einwandfrei sequenzieren zu können, war es erforderlich, auch das CSR-Produkt aufzureinigen. Hierfür benötigte man eine DyeEx-Platte 96, die nach Abziehen der Schutzfolien auf einer Unterstellplatte platziert wurde. Dieselbe Konstruktion wurde als TARA-Ausgleichsplatte mit Aqua dest. auf das gleiche Gewicht eingestellt, sodass die beiden Platten austariert in die Zentrifuge gestellt und bei Programm 3 (undulierende Geschwindigkeit für 15 Minuten bei Beschleunigung/ Abbremsung 7/5) zentrifugiert wurden. In der Zwischenzeit füllte man jedes Well einer VWR-Platte mit je 5 µl Formamid, welches später der Konservierung des CSR-Produktes diente. Nach Abschluss der Zentrifugation wurde die DyeEx-Platte auf die VWR-Platte gestellt. Mit der 8-Kanal-Pipette wurde das CSR-Produkt vollständig aufgezogen und in die Mitte der Membran der DyeEx-Platte pipettiert. Daraufhin wurde die DyeEx- mit der VWR-Platte als Untersatz und einem entsprechendem Gegengewicht, erneut auf Programm 3 für 15 Minuten, zentrifugiert. Daraufhin konnte die DyeEx-Platte verworfen und die VWR-Platte mit einer Folie abgedeckt werden, da sich in dieser nun das aufgereinigte CSR-Produkt befand.

Bis zur Sequenzierung wurde die Platte im -20°C Freezer zwischengelagert. Sollte die Platte sequenziert werden, musste sie für 2 Minuten bei 95°C in einem Thermocycler erhitzt und danach für 1 Minute auf Eis gestellt werden.

2.3.6 Prinzip der Sanger Sequenzierung

Zur Durchführung der Sequenzierung wurde in der vorliegenden Arbeit der 3500XL Dx Genetic Analyzer verwendet. Das Messprinzip beruht auf der Technik der Kapillarelektrophorese, d.h. der Wanderung gelöster, ionischer Verbindungen in einem elektrischen Feld. In der Kapillarelektrophorese ist die Kapillare mit einem polymeren Gel gefüllt, welches mit Quarzglas-Kapillaren als Trennsäulen versehen ist. Die Probeninjektion erfolgt über eine sog. elektrokinetische Injektion. Dabei wird die Wanderung der Teilchen über Anlegung einer Hochspannung erreicht. Die Detektion erfolgt mit einem Fluoreszenzdetektor. Dazu wird die markierte DNA in der Kapillare elektrophoretisch nach der Länge aufgetrennt und passiert dabei das Detektionsfenster, wo die Fluoreszenzstoffe durch einen Festkörper-Dioden Laser angeregt, Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren. Das spektrographisch separierte Licht wird mit einer CCD-Kamera aufgenommen und als elektrisches Signal gespeichert. Diese Daten werden mit der Analysesoftware zu vierfarbigen Elektropherogrammen verrechnet. Aus den gemessenen Daten kann im Folgenden eine Software-gestützte Auswertung erfolgen.

Manuell erfolgte schließlich die Auswertung der Sequenzen auf Mutationen. Als Referenz wurden dabei die Sequenzen der Gendatenbank „*ensembl.org*“ genommen. Die Mutationen wurden in einer Excel-Tabelle zu jedem Patienten zugeordnet notiert und die Patienten mit *DNMT3A*^{mut}-R882H bzw. -R882C im nächsten Schritt der MRD-Analyse zugeführt.

2.3.7 cDNA-Synthese

Als cDNA (*complementary deoxyribonukleinacid*) bezeichnet man die komplementäre, einzelsträngige DNA, die aus mRNA mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase synthetisiert wird. Sie dient als ideale Vorlage für das molekulare Arbeiten, da sie nur aus Exonen besteht. Dementsprechend wird die cDNA als Ausgangsmaterial für die PCR oder die Herstellung von cDNA-Banken benutzt. Für solche Prozesse wäre mRNA als Template zu instabil.

Für den Reaktionsansatz zur Herstellung einer bestimmten Menge an cDNA benötigt man eine definierte Menge an RNA, sowie dNTPs, Puffer, die RT, eventuell eine RNase H zur Degradation der RNA und kurze Oligonukleotide. Des

Weiteren fügt man Hexamere mit zufälliger Basenabfolge, sog. Random Hexamere, und Oligo-dTs in verschiedenen Mischungsverhältnissen hinzu, die dazu dienen, die cDNA-Synthese zu beschleunigen und damit die Reaktion so effektiv wie möglich zu gestalten. Wie man dabei vorgeht, hängt davon ab, wofür die cDNA und in welcher Form sie später benötigt wird. Setzt man nur Oligo-dTs ein, so erhält man cDNA mit langen Polyadenylierungssequenzen; werden dagegen nur Random Hexamere verwendet, so ist es möglich auch RNA mit fehlender (t-RNA, r-RNA) oder sehr kurzer Poly-A-Sequenz umzuschreiben. Die reversen Transkriptasen sind multifaktorielle Enzyme mit drei unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten: einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, einer Hybrid-abhängigen Exoribonuklease (RNase H) und einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase. Sie werden zumeist aus Retroviren gewonnen, wobei am häufigsten das *Avian Myoblastosis Virus* (AMV) oder das *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV) verwendet werden und nur selten das HI-Virus.

Für die Herstellung der cDNA wurden zunächst die benötigten Reagenzien aus dem -20°C Freezer geholt und vorbereitet. Dazu zählen die Random Hexamere, der RT-Puffer, der gDNA-Wipeout-Buffer und die RT. Bis auf die RT, welche auf Eis aufgetaut werden muss, wurden die anderen Materialien bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach musste die vorbereitete, gepräpte RNA aus dem -80°C Freezer geholt und die Proben sofort wieder auf Eis gestellt werden, sodass ein vorsichtiges Auftauen gegeben war.

Nun wurden so viele 0,2 ml Tubes nummeriert, wie benötigt wurden (max. 12) und diese auf Eis gestellt. Daraufhin wurde der gDNA Wipeout Buffer gevortext und davon je 2 µl in jedes Tube pipettiert. Im Anschluss wurde dann, die für jede RNA-Probe zuvor berechnete Menge an RNase freiem H_2O, in das jeweilige Tube pipettiert. Diese Menge war von der Konzentration der RNA-Probe abhängig, da beim Vorgang der RNA-Extraktion die RNA-Konzentration immer von der Qualität des Zellpellets abhängig war, welches verwendet wurde. Dementsprechend musste im Anschluss auch die Menge an RNA an die gegebene Konzentration angepasst werden. Diese wurde dann ebenfalls in die 0,2 ml Tubes pipettiert, wobei darauf zu achten war, dass RNA nicht gevortext, sondern nur angeschnipst werden darf. Daraufhin wurde der Mastermix aus Quantiscript RT Buffer, Random Hexameren und Quantiscipt RT im 1,5 ml Tube hergestellt, wobei zuvor alle

Reagenzien sorgfältig gevortext werden mussten, mit Ausnahme der RT. Die verwendete Menge war dabei abhängig von der Anzahl an RNA-Proben, die in cDNA umgeschrieben werden sollten. Nun wurden die Tubes mit dem zuvor vorbereiteten RNA-Buffer-Wasser-Gemisch angeschnipst und kurz anzentrifugiert und dann für 2 Minuten in den Thermocycler bei dem Programm „*qt cDNA*“ (20 µl) gestellt. Nach den 2 Minuten wurde das Programm pausiert und in dieser Zeit je 6 µl Mastermix in jedes Tube pipettiert. Anschließend wurden die Tubes erneut angeschnipst und herunterzentrifugiert und daraufhin wieder in den Thermocycler gestellt und das Programm wurde fortgesetzt. In dieser Zeit mussten die RNA-Proben wieder zurück in den -80°C Freezer gebracht, 1,5 ml Tubes mit grünen cDNA-Klebern versehen und mit der entsprechenden Probennummer beschriftet werden. Nach Beendigung des Cyclerprogrammes konnte nun die fertige cDNA auf Eis in die vorbereiteten Tubes überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren werden.

2.4 Generierung der Plasmidverdünnungen für die Standardreihe

2.4.1 Generierung der PCR-Produkte

Um die Ergebnisse der RQ-PCR auswerten zu können, wurden Referenzwerte mit bekannter Ausgangskonzentration benötigt. In dieser Arbeit wurden für die Quantifizierung Verdünnungsreihen (10^6 bis 10^2 Kopien/µl) aus Plasmiden verwendet. Bei Plasmiden handelt es sich um kleine, ringförmige DNA-Elemente, die in einem Bakterium zusätzlich zur normalen DNA existieren. Sie enthalten verschiedenste Gene, die z.B. für Antibiotikaresistenzen codieren. Dadurch erhält das Bakterium einen Selektionsvorteil und hat eine größere Überlebenschance.
In dieser Arbeit sollten die Plasmide zum einen für die Mutationen *DNMT3A*^{mut}-R882H und -R882C und zum anderen für das Haushaltsgen *ABL1* codieren. Die erforderlichen 60 bp langen DNA-Abschnitte aus Exon 23 des Zielgenes, die in die Plasmide integriert wurden, stammten für die *DNMT3A*^{mut}-R882H aus Patientenmaterial, welches mittels Sequenzierung identifiziert wurde. Die *DNMT3A*^{mut}-R882C war im DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) erworben worden und stammte aus der Zelllinie OCI-AML3. Für *ABL1* wurden dieselben Plasmide verwendet, die im AML-Labor in Ulm auch für die MRD-Diagnostik von *NPM1*^{mut} verwendet werden (aus eigener Herstellung).

Um die passenden Plasmide zu erhalten, mussten zunächst die mutierten Genabschnitte mit Hilfe einer PCR amplifiziert werden, dann wurde die Spezifität der PCR-Produkte durch eine Gelelektrophorese überprüft und diese im Anschluss kloniert. Daraufhin erfolgten Transformierung, Kultivierung und Isolierung der generierten PCR-Produkte, sodass am Ende die isolierte Plasmid-DNA vorlag. Als Ausgangsprodukt wurde dementsprechend ausreichend Material der gewünschten DNA benötigt. Dies wurde mit Hilfe einer PCR, wie bereits in 2.3.4 beschrieben, erreicht. Für die PCR wurden im Reaktionsansatz DNA-Material, 10XPCR Buffer, dNTPs, Primer, Taq Polymerase und Aqua dest. benötigt. Danach wurde die PCR-Reaktion gestartet und man erhielt ein Produkt, welches nun im weiteren Schritt für die Klonierung verwendet werden konnte (Tabelle 12).

Tabelle 12: Dargestellt sind die Reagenzien für die PCR der Plasmide mit Mengenangabe in µl und die Reaktionsbedingungen mit der jeweiligen Temperatur in °C und der Zeit in min und sec.

Abkürzungen: PCR = Polymerasekettenreaktion; dest. = destilliert; MgCl2 = Magnesiumchlorid; mM = Millimolar; dNTPs = desoxyNukleosidTriPhosphat ; F = Forward; R = Reverse; µl = Mikroliter; min = Minuten; sec = Sekunden; °C = Grad Celsius; ∞ = unendlich

Reagenz	Menge
Aqua dest.	33,7 µl
10x PCR Buffer	5 µl
$MgCl_2$	3,6 µl
25mM dNTPs	0,4 µl
Primer F	2 µl
Primer R	2 µl
AmpliTaq Gold	0,3 µl

Temperatur	Zeit	
94°C	5 min	
94°C	30 sec	30 Zyklen
60°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
10°C	∞	

2.4.2 TOPO Klonierung

Als Klonierung wird die Vermehrung eines bestimmten DNA-Fragmentes mit Hilfe eines Vektors bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit geschah dies mit dem TOPO® TA Cloning® Kit der Firma Invitrogen.

Als Plasmid-Vektor wurde hierfür pCR™ 4-TOPO® verwendet, der neben einer Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz, auch für das LacZα-ccdB-Fusionsgen codiert. Bei Ligation an ein PCR-Produkt wird die Expression des LacZα-ccdB-Gens unterbrochen, welches letal für das Bakterium ist. Daher überlebten nur die

Zellen, die einen Vektor mit integrierter DNA aufgenommen hatten (Tabelle 13). Der TOPO-Vektor war kovalent an die Topoisomerase I aus dem Vacciniavirus gekoppelt, die die Verbindung des DNA-Materials mit dem Vektor bewirkte und damit eine Ligase unnötig machte. Das entstandene Produkt wurde nun für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin auf Eis zwischengelagert.

Tabelle 13: Reagenzien für die Klonierungsreaktion von PCR-Produkt und Vektor mit Mengenangabe in µl.

Abkürzungen: PCR = Polymerasekettenreaktion; dest. = destilliert; M = Mol; NaCl = Natriumchlorid; $MgCl_2$ = Magnesiumchlorid; TOPO = Topoisomerase; µl = Mikroliter

Reagenz	Menge
PCR-Produkt	2 µl
Aqua dest.	2 µl
Salzlösung: 1,2 M NaCl, 0,06 M $MgCl_2$	1 µl
TOPO Vektor	1 µl

2.4.3 Transformierung und Kultivierung

Transformation bedeutet die Aufnahme eines Vektors durch eine Empfängerzelle, die in den meisten Fällen ein Bakterium darstellt. Als Empfängerzellen für die Transformierung wurden in dieser Arbeit chemokompetente One-Shot® TOP 10 Escherichia coli von der Firma Invitrogen verwendet.

Die Bakterien mussten zunächst langsam auf Eis aufgetaut und daraufhin mit 2 µl der Klonierungsreaktionslösung vermischt werden. Nach 30 Minuten wurde das Gemisch für 30 Sekunden bei 42°C inkubiert, um die im Ligationsansatz enthaltenen Plasmid-Vektoren in die Bakterienzellen zu integrieren. Dieser sog. Hitzeschock bewirkt eine kurzzeitige Permeabilitätssteigerung der Bakterienmembran und ermöglicht somit die Aufnahme in die Zelle. Hiernach musste das Tube sofort wieder auf Eis gestellt werden. Daraufhin wurden 250 µl SOC-Medium hinzugegeben und das Tube im Schüttel-Brutschrank bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurden je 50 µl und 100 µl des Produktes auf Agarplatten mit LB-Medium (enthält Ampicillin) oder SOB-Medium (enthält Kanamycin) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank wiederum inkubiert. Dadurch konnte erreicht werden, dass auf der Platte nur diejenigen E. coli wuchsen, die den pCR™ 4-TOPO® Vektor mit den entsprechenden

Resistenzgenen enthielten. Nach einem Tag wurde schließlich je eine der so selektionierten Kolonien entnommen und jeweils in ein separates Reaktionsgefäß mit LB- oder SOB-Medium gegeben. Diese wurden erneut für eine Nacht bei 37°C kultiviert.

2.4.4 Isolierung der Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen aus jeder Kultur isoliert. Dafür wurden die Tubes zunächst für 10 Minuten bei 1.200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet, das Bakterien-Pellet mit 250 µl P1-Puffer (enthält Rnase A) resuspendiert und in ein 1,5 ml Tube überführt. Dazu wurden 250 µl P2-Puffer zur Lyse hinzugefügt und das Tube vorsichtig vier bis sechs Mal invertiert. Im Anschluss erfolgte die Beimengung von 350 µl N3-Puffer zur Neutralisation, woraufhin sich das Gemisch trüb färbte. Das Tube wurde nun für 10 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert, wodurch sich ein weißes Pellet bildete. Der Überstand, der bei diesem Vorgang entstand, wurde nun auf eine QIAprep Spin Säule pipettiert und erneut für 60 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 500 µl PB-Puffer auf die Membran pipettiert, wiederum zentrifugiert und der ganze Vorgang nochmals mit 750 µl PE-Puffer wiederholt. Danach wurden 30 µl EB-Puffer direkt in die Membranmitte pipettiert, um die Plasmide von der Säulenmembran zu lösen und schließlich konnten nach einer Minute Wartezeit die Plasmide durch eine Zentrifugation von 60 Sekunden gelöst werden.
Die Konzentration der Plasmide konnte nun photometrisch durch den Nanodrop gemessen werden.

2.4.5 Restriktionsverdau

Beim Plasmidverdau wird die Plasmid-DNA mit Hilfe des Restriktionsenzyms EcoRI aus dem Vektor geschnitten. Restriktionsenzyme schneiden DNA an einer bestimmten Sequenz des Doppelstranges, sodass die Trennung immer an einer definierten Stelle erfolgt. Bei EcoRI lautet die Erkennungssequenz 5‘-GAATTC-3‘, wobei die Trennung immer zwischen dem Guanin und dem Adenin erfolgt, sodass ein 5‘-Überhang mit vier Basen entsteht. Es entstehen also zwei unterschiedlich lange einzelsträngige DNA-Stränge. Die DNA-Fragmente stellten bei erfolgreicher

Klonierung somit die Zielsequenz dar, wobei die Klonierung durch eine Gelelektrophorese in einem 2%igen Gel nochmals qualitativ überprüft wurde. Der Restriktionsverdau erfolgte je nach photometrisch ermittelter Konzentration der Plasmide für eine Stunde bei 37°C (Tabelle 14).
Die Gelelektrophorese wurde wie in 2.3.4 beschrieben, mit dem Farbstoff Orange Juice, durchgeführt. Es wurde weiterhin ein 100 bp Ladder verwendet, da das Zielgen eine Größe von 60 bp aufwies.

Tabelle 14: Benötigte Reagenzien für den Restriktionsverdau mit Mengenangabe in µl.
Abkürzungen: EcoRI = Escherichia coli RI ; U = Units; dest. = destilliert; µg = Mikrogramm; µl = Mikroliter

Reagenz	Menge
Plasmidvolumen für 1 µg Plasmide	konzentrationsabhängig
Buffer H	1 µl
EcoRI (10U/µl)	1 µl
Aqua dest.	konzentrationsabhängig

2.4.6 CSR und Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob die DNA nach den gesamten Reaktionsvorgängen in gleicher Qualität vorlag wie zu Beginn und um eventuelle Mutationen auszuschließen, wurde sie mit Hilfe der Sanger-Kettenabbruch-Methode sequenziert. Dazu wurde zunächst die CSR und im Anschluss die Sequenzierung, wie bereits in 2.3.5 und 2.3.6 beschrieben, durchgeführt. Für die CSR wurde dabei das Big Dye Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems verwendet und die Sequenzierung erfolgte mit dem 3500 Dx Genetic Analyzer derselben Firma. Die verwendeten Reagenzien und der Ablauf der CSR sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Reagenzien für die CSR mit Mengenangabe in µl und die Reaktionsbedingungen mit der jeweiligen Temperatur in °C und der Zeit in min und sec.

Abkürzungen: CSR = *cycle sequencing reaction*; dest. = destilliert; F = Forward; pmol = Pikomol; sec = Sekunden; min = Minuten; µl = Mikroliter; °C = Grad Celcius; ∞ = unendlich

Reagenz	Menge
Probe	1 µl
Aqua dest.	9,3 µl
Big Dye	2,0 µl
5x Sequencing Puffer	1,7 µl
M13F (10pmol/µl)	1 µl

Temperatur	Zeit	
96°C	45 sec	
96°C	15 sec	35 Zyklen
55°C	10 sec	
60°C	4 min	
4°C	∞	

2.4.7 Herstellung der Plasmidlösungen für die Standardkurven

Für die Erstellung der Standardkurve wurde nun jeweils ein Klon ausgewählt, der die richtige Sequenz des entsprechenden Genes aufwies. Von diesem Klon wurde das Volumen bestimmt, in dem genau 0,4 x 10^9 Kopien enthalten waren.

Dafür wurde als erstes die Gesamtgröße des Plasmides ermittelt. Dies war insofern möglich, als dass die Größen vom Vektor (3956 bp) und vom Insert (60 bp), bekannt waren. Somit ergab sich eine Plasmidgröße von 4016 bp. Um die DNA in Mol umzurechnen, wurde der Faktor von 660 g/Mol für ein Basenpaar genommen. Damit ergab sich ein Molekulargewicht von:

$$M_{Plasmid} = 4016 \text{ bp} \times 660 \text{ g/Mol} = 2{,}65 \times 10^6 \text{ g/Mol}$$

Daraufhin erfolgte die Berechnung der Stoffmenge, in die die gemessene Konzentration der DNA (µg/µl) am Nanodrop mit einbezogen wurde:

$$1 \text{ Mol}/2{,}65 \times 10^6 \text{ g/Mol} \times (\text{Gemessene Konz. der DNA}) = X \text{ Mol}$$

Anschließend erfolgte die Berechnung der Kopienzahl (Y) in der gemessenen Konzentration:

$$6{,}022 \times 10^{23} \text{ Teilchen}/1 \text{ Mol} \times X \text{ Mol} = Y \text{ Teilchen}$$

Im Anschluss wurde jenes Volumen bestimmt, in dem 10^{12} Teilchen gelöst waren:

$$1 \text{ µl}/ Y \text{ Teilchen} \times 10^{12} \text{ Teilchen} = x \text{ µl}$$

Um nun ein Teilvolumen mit 0,4 x 10^9 Kopien/µl zu erhalten, wurden 0,4 x x µl im Verhältnis 1:1000 mit Aqua dest. verdünnt. Aus dieser Gebrauchslösung konnte

durch eine weitere Verdünnung von 1:100 Aliquots mit einer 0,4 x 10^7-Verdünnung hergestellt werden, die für die Erstellung der Standardreihe benutzt wurden.

2.5 Quantitative *real-time* PCR (RQ-PCR)

2.5.1 Prinzip der RQ-PCR

Bei der RQ-PCR handelt es sich um eine Amplifizierungsmethode für Genmaterial, die neben der herkömmlichen PCR eine Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt dabei durch Fluoreszenzmessungen, die während der PCR in Echtzeit ablaufen.

Dadurch hat man die Besonderheit, dass neben einem speziellen Primerpaar zusätzlich eine fluoreszierende Sonde eingesetzt wird. Erfolgt die Anregung der Sonde bei einer speziellen Wellenlänge, so wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) unterdrückt, denn das vom Reporter emittierte Licht wird vom Quencher absorbiert.

Während der RQ-PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase auf die Sonde und baut sie mit Hilfe ihrer 5‘-3‘-Exonukleaseaktivität ab. Dabei wird der FRET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, sodass es zu einer räumlichen Trennung zwischen den beiden Substanzen kommt und das Fluoreszenzemissionsspektrum des Reporters in dieser Zeit gemessen werden kann. Mit steigender Menge an PCR-Produkt wächst die Fluoreszenzintensität der Reportermoleküle im Reaktionsgefäß mit jedem PCR-Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist streng sequenzspezifisch, da nicht 100%ig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden, noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aktiviert wird. Die gemessene Fluoreszenz wird auf der y-Achse gegen die Zyklenzahl auf der x-Achse aufgetragen. In den ersten Zyklen ändern sich die Fluoreszenzwerte nur unwesentlich. Zu diesem Zeitpunkt wird die Basislinie, Software-gesteuert, definiert. Aus der Standardabweichung der Fluoreszenz zwischen Zyklus drei und 15 multipliziert mit dem Faktor zehn, wird ein Fluoreszenzwert errechnet, der zur Grundfluoreszenz der Proben addiert wird. Daraus ergibt sich der Schwellenwert (engl.: *threshold*). Hierbei handelt es sich um das Fluoreszenzsignal, das eine signifikante Zunahme gegenüber der

Basislinie zeigt. Er liegt ca. eine Zehnerpotenz oberhalb der Hintergrundaktivität. Aus dem Quotienten der Emissionsintensität des Reporter-Farbstoffes und der Emissionsintensität von ROX ergibt sich Rn. Den ΔR_n-Wert erhält man schließlich, indem die Hintergrundaktivität von dem R_n-Wert jedes Zyklus subtrahiert wird (Livak et Schmittgen. 2001). Der Schnittpunkt zwischen Amplifikationsgraph und Schwellenwert wird als *cycle-threshold* (C_t) bezeichnet. Damit wird ein Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert markiert. Wenn man davon ausgeht, dass die PCR zu 100% effizient abläuft, so kommt es nicht nur zum exponentiellen Anstieg der DNA-Menge, sondern auch zur exponentiellen Zunahme der Fluoreszenzsignalstärke. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenzsignalstärke erstmalig über den Wert der Hintergrundfluoreszenz ansteigt, wird als sog. C_t-Wert im Schwellenwertzyklus angegeben (Abbildung 5). Dieser verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus an eingesetzter DNA. Das bedeutet ein niedriger C_t-Wert entspricht einer hohen cDNA-Menge bzw. RNA-Startmenge.

Der exponentielle Anstieg beruht auf der geringen Templatemenge zu Beginn der Reaktion und einer Sättigung in der späten Phase, welche auf Produkthemmung, den Verbrauch von Nukleotiden und Primern, sowie auf einen Aktivitätsverlust der Polymerase aufgrund der hohen Temperaturen zurückzuführen ist. Zur Normierung der PCR wird eine endogene Kontrolle mit einem Haushaltsgen durchgeführt.

Das Zielgen, welches in dieser Arbeit mit der RQ-PCR untersucht werden sollte, war *DNMT3A*. Als Haushaltsgen wurde in diesem Fall *ABL1* (*Abelson murine leukemia virus oncogene 1*) eingesetzt (Beillard et al. 2003).

Bei einem Haushaltsgen oder Referenzgen handelt es sich um ein Gen, dessen Expression für die Funktionalität der meisten humanen Zellen entscheidend ist und in allen Zelltypen etwa gleichstark exprimiert wird. Der durchschnittliche C_t-Wert des Haushaltsgens erlaubt eine Aussage bezüglich der Qualität des Probenmaterials. Bei *ABL1* handelt es sich um ein in verschiedenen Körperzellen vorkommendes Protein aus der Familie der Tyrosinkinasen. Es ist an Zellmigration und -adhäsion, Zelldifferenzierung, sowie an Apoptosevorgängen beteiligt und ist außerdem ein wichtiger Faktor für die Signaltransduktion über den T-Zell-Rezeptor.

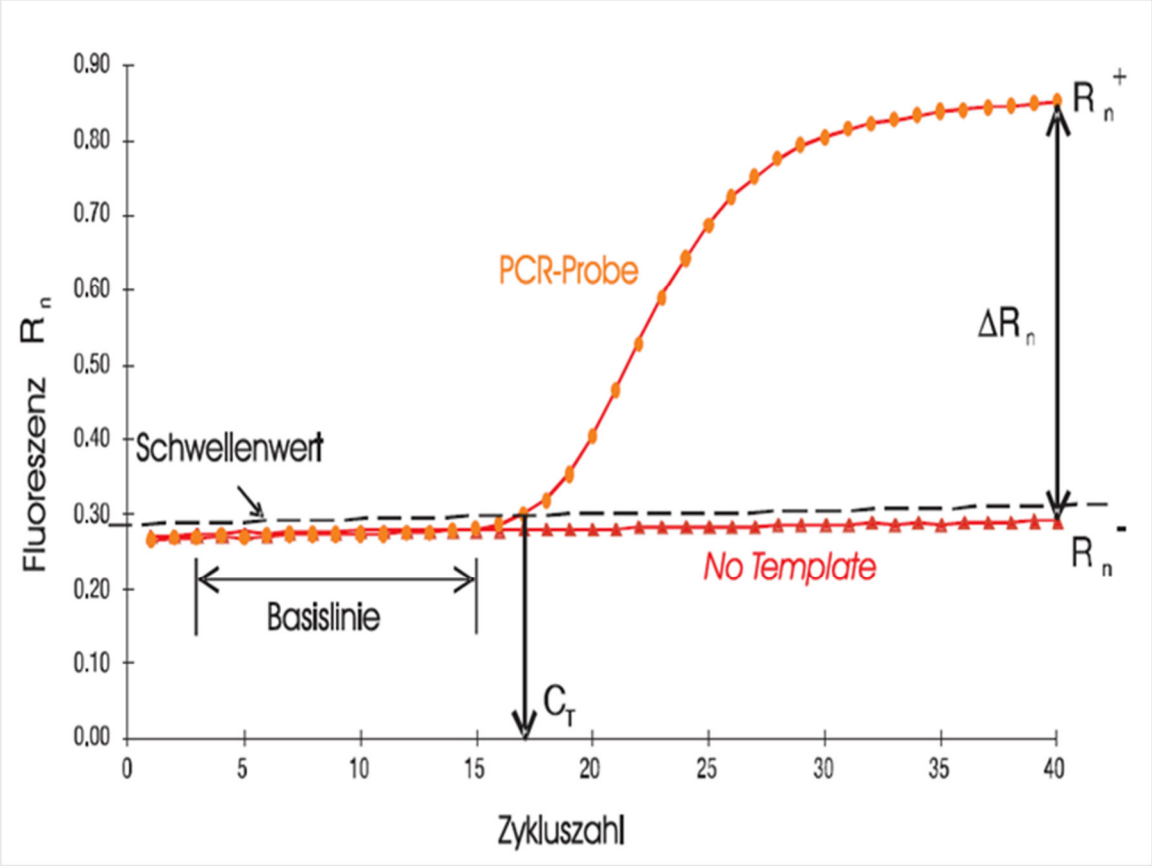

Abbildung 5: Darstellung einer Amplifikationsgrafik (nach Arbeitsanweisung (SOP) SDS 7900 HT Fast Real-Time PCR System). Die Basislinie ist zwischen Zyklus drei und 15 definiert und dient mit der Berechnung des Schwellenwertes. Der Punkt, an dem der Amplifikationsgraph den Schwellenwert schneidet, wird als C_t-Wert bezeichnet. ΔR_n erhält man durch die Subtraktion der Hintergrundaktivität von dem R_n-Wert jedes Zyklus. Die *No Template*-Kurve stammt von den NTC-Proben, in denen kein Material nachgewiesen werden darf.

Abkürzungen: SOP = standard operating procedure; PCR = Polymerasekettenreaktion; ΔR_n = baselinekorrigierte, normalisierte Fluoreszenz; $R_n^{+/-}$ = normalisierte Fluoreszenz einer positiven/negativen Probe; C_t = Cycle-threshold; NTC = *no template control*

Um auszuschließen, dass eine Kontamination mit fremder DNA, cDNA oder fremden PCR-Amplifikaten erfolgt war, wurden bei jedem PCR-Lauf zwei Proben mit reinem Mastermix anstelle des Templates amplifiziert. Diese Proben werden, wie bei der Gelelektrophorese als Kontrolle der PCR, als NTC bezeichnet. Um Kontaminationen mit Material aus vorangegangenen PCRs zu verhindern, enthält der TaqMan Mastermix in den dNTPs, neben ATP, GTP und CTP, UTP anstelle von TTP und das Enzym AmpErase UNG (Uracil-NGlycosylase). Dieses baut vor der anschließenden PCR, in einem zweiminütigen Verdau, doppelsträngige DNA,

die UTP enthält, ab. Damit konnten eventuelle Kreuzkontaminationen eliminiert werden. Des Weiteren enthält der TaqMan Mastermix den Referenzfarbstoff ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin), mit dem Pipettierungenauigkeiten vor der PCR erkannt und über die Software ausgeglichen werden.

Die untersuchten Proben können nur dann mittels endogener Kontrolle normalisiert werden, wenn die Effizienz beider Amplifikationsreaktionen gleich ist, d.h. wenn die Steigung vergleichbar ist. Die Amplifikationseffizienz entspricht also der Steigung der Standardkurve. Sie dient dazu ein möglichst ähnliches Verhältnis beider Gene zu erreichen und soll so verhindern, dass bei unterschiedlicher Amplifikationseffizienz das Verhältnis beider Gene in einer Probe zu ungenau wird. Daher werden Standardkurven als Verdünnungsreihen für das Ziel- und das Haushaltsgen erstellt und daraus die Amplifikationseffizienz berechnet. Die Effizienz lag für *DNMT3A* zwischen 80 und 110% und für *ABL1* zwischen 85 und 110%. Für die Quantifizierung wird eine Standardkurve aus mindestens fünf Verdünnungsstufen benötigt.

Für deren Erstellung dient ein Standardprobenmaterial, welches auch als Kalibrator bezeichnet wird und wobei es sich um verschiedenste DNA- oder RNA-Produkte handeln kann, solange die Zielsequenz enthalten ist (https://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman (14.09.2017). Beispielsweise können Plasmide, welche die spezielle Sequenz als Insert enthalten, Zelllinien oder positive Patientenproben verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Plasmide benutzt (siehe 2.4).

2.5.2 Durchführung der RQ-PCR

Die RQ-PCR wurde bei jeder Patientenprobe für *DNMT3A*^{mut}-R882H bzw. *DNMT3A*^{mut}-R882C, als auch für das Haushaltsgen *ABL1* durchgeführt. Des Weiteren wurde sowohl die Patienten-cDNA für *DNMT3A*^{mut}, als auch für *ABL1*, und für die *DNMT3A*- und *ABL1*-Standardreihe in Tripletts pipettiert. Die Durchführung des MRD-Monitorings begann mit der bereits zuvor beschriebenen cDNA-Synthese. Des Weiteren mussten die beiden Verdünnungsreihen, sowohl für das Zielgen, als auch für das Haushaltsgen hergestellt werden. Dafür wurden je 90 µl Wasser in fünf Tubes jeweils für *DNMT3A*^{mut}-R882C- und -R882H, sowie für *ABL1* pipettiert. Im Plasmidraum erfolgte nun die Herstellung der

Verdünnungsreihen mit den zuvor aufgetauten Aliquots, die je 0,4 x 10^7 Kopien/µl an *DNMT3A*^{mut}- R882C bzw. *DNMT3A*^{mut}- R882H und *ABL1* Plasmiden enthielten. Diese durften aufgrund des zu erwartenden Qualitätsverlustes nicht zu oft auf- und abgetaut werden. Von dem Plasmid wurden immer je 10 µl entnommen und aus dem 10^7-Tube in das 10^6-Tube pipettiert, dieses mit der Pipette durch schnelles Auf- und Abziehen gründlich durchgemischt und gevortext. Das heißt es wurde eine serielle Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:10 hergestellt. Mit einer neuen Pipettenspitze wurde im nächsten Schritt genauso verfahren, bis als letztes 10 µl aus dem 10^3-Tube entnommen und in das 10^2-Tube pipettiert wurde. Nun hatte man drei Verdünnungsreihen in absteigender Konzentration von 10^6 bis 10^2 jeweils für *DNMT3A*^{mut}- R882C und -R882H und für *ABL1*.

Im nächsten Schritt musste nun der Mastermix hergestellt werden. Dafür wurde der *ABL1*-Oligo-Mix, der die Primer und die Sonde für das Haushaltsgen enthielt, im Ständer mit Alufolie abgedeckt, sowie der F- und R-Primer, der 10xTaqMan Puffer, $MgCl_2$, dNTPs und der LNA-Primer auf dem Thermoblock, aufgetaut. Das Enzym AmpliTaq wurde im Kühlblock aufgetaut und die AmpErase, sowie die Sonden C und H bei Raumtemperatur. Aus diesen Reagenzien konnte nun der Mastermix hergestellt werden (Tabelle 16). Anschließend wurde eine Fast 96-Well Reaction Plate 0.1 ml nach einem bestimmten Muster eingeteilt (Abbildung 6).

Von dem fertiggestellten Mastermix wurden daraufhin je 22,6 µl jeweils für *DNMT3A*^{mut}- R882C bzw. -R882H in die obere Hälfte der Platte und für *ABL1* in den unteren Teil pipettiert. Danach wurden je 2,5 µl Patientenprobe in Form der umgeschriebenen cDNA in je drei Wells pipettiert; auch wieder für *DNMT3A*^{mut}- R882C und -R882H sowie für *ABL1*. Im Plasmidraum wurden anschließend je 2,5 µl der gevortexten Verdünnungen in die restlichen Wells der Platte pipettiert. Abgedeckt mit einer Adhäsionsfolie wurde die Platte nun herunter zentrifugiert und bei dem Programm QuantStudio™ im TaqMan gestartet (Tabelle 17).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Pat. 1			Pat. 2			Pat. 3			Pat. 4		
B	Pat. 5			Pat. 6			Pat. 7			Pat. 8		
C	Pat. 9			Pat. 10					NTC	10^2		
D	10^3			10^4			10^5			10^6		
E	Pat. 1			Pat. 2			Pat. 3			Pat. 4		
F	Pat. 5			Pat. 6			Pat. 7			Pat. 8		
G	Pat. 9			Pat. 10					NTC	10^2		
H	10^3			10^4			10^5			10^6		

Abbildung 6: Einteilung einer Fast 96-Well Reaction Plate 0.1ml mit der Kapazität für 10 Patientenproben. Hierfür wurden Verdünnungsreihen aus der cDNA jeweils für *DNMT3A*^{mut}-R882C- und -R882H, sowie für *ABL1* in den Konzentrationen von 10^6 bis 10^2 hergestellt und in Tripletts in die Fast 96-Well Reaction Plate zusammen mit dem entsprechenden Mastermix pipettiert. In die Slots C9 und G9 wurde nur Mastermix als NTC-Probe pipettiert. Im Anschluss konnte die Platte bei dem Programm QuantStudio™ im TaqMan gestartet werden.

Abkürzungen: Pat = Patient; NTC = *no template control*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyl-Transferase 3 Alpha*; ml = Milliliter

Tabelle 16: Pipettierschema für den Mastermix jeweils für *DNMT3A*^{mut}- R882C (Tab. 16.1) sowie für -R882H (Tab. 16.2) und *ABL1* für die Durchführung der RQ-PCR mit Angabe der jeweiligen Reagenzien mit Mengenangabe in µl.

Abkürzungen: RQ-PCR = quantitative *real-time* PCR; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyl-Transferase 3 Alpha*; *ABL1 = abelson murine leukemia virus oncogene 1*; H_2O = chemische Abkürzung für Wasser; $MgCl_2$ = Magnesiumchlorid; dNTPs = desoxyNukleosidTriPhosphat; F = Forward; R = Reverse; LNA = locked nucleid acid; µl = Mikroliter; mM = Millimolar; pmol = Pikomol

Tab. 16.1: Mastermix für *DNMT3A*^{mut}-R882C und *ABL1*

Reagenz	***DNMT3A*^{mut} -R882C (100x)**
H_2O	1300 µl
10x TaqMan Buffer A	250 µl
$MgCl_2$ 25mM (final 2,5 mM)	250 µl
dNTPs 25 mM	50 µl
F´-Primer (10 pmol/µl)	125 µl
R´-Primer (10 pmol/µl)	125 µl
Probe R882C (6 pmol/µl)	50 µl
LNA-Primer (10 pmol/µl)	50 µl
Amli Taq Gold	25 µl
AmpErase UNG	25 µl

Reagenz	***ABL*1 (100x)**
H_2O	1400 µl
10x TaqMan Buffer A	250 µl
$MgCl_2$ 25 mM	400 µl
dNTPs 25 mM	50 µl
Oligo-Mix (*ABL1*-Gen)	100 µl
Amli Taq Gold	25 µl
AmpErase UNG	25 µl

Tab. 16.2: Mastermix für *DNMT3A*^{mut}-R882H und *ABL1*

Reagenz	***DNMT3A*^{mut} -R882H (100x)**
H_2O	1290 µl
10x TaqMan Buffer A	250 µl
$MgCl_2$ 25 mM (final 2,5 mM)	250 µl
dNTPs 25 mM	50 µl
F´-Primer (10 pmol/µl)	125 µl
R´-Primer (10 pmol/µl)	125 µl
Probe R882H (6 pmol/µl)	50 µl
LNA-Primer (10 pmol/µl)	60 µl
Amli Taq Gold	25 µl
AmpErase UNG	25 µl

Reagenz	***ABL1* (100x)**
H_2O	1400 µl
10x TaqMan Buffer A	250 µl
$MgCl_2$ 25 mM	400 µl
dNTPs 25 mM	50 µl
Oligo-Mix (*ABL1*-Gen)	100 µl
Amli Taq Gold	25 µl
AmpErase UNG	25 µl

Tabelle 17: Reaktionsbedingungen für die RQ-PCR mit der jeweiligen Temperatur in °C und der Zeit in min und sec.

Abkürzungen: RQ-PCR = quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion; min = Minuten; sec = Sekunden; °C = Grad Celcius

Temperatur	**Zeit**	
50°C	2 min	
95°C	10 min	
95°C	15 sec	} 45 Zyklen
62°C	30 sec	

2.5.3 Auswertung der RQ-PCR

Um die RQ-PCR auswerten zu können, ist eine Quantifizierung der Ergebnisse notwendig. Dafür werden Referenzwerte mit bekannter Ausgangskonzentration benötigt. In dieser Arbeit erfolgte dies mit Hilfe einer fünfstufigen Verdünnungsreihe (10^2 bis 10^6 Kopien/µl) aus Plasmiden, die als entsprechende Zielsequenz *DNMT3A*^{mut}-R882C und -R882H trugen. Neben dem Zielgen erfolgte bei allen Proben die Messung der Expression eines zweiten fremden Genes, bei dem es sich um das Haushaltsgen *ABL1* handelte. Die Zielsequenz wird dabei in ihrer Expression relativ zu der Sequenz des Haushaltsgenes bestimmt.

Wie bereits in 2.5.1 beschrieben, dient der C_t-Wert als Maß für die Quantifizierung der cDNA-Startmenge. Läuft die PCR mit einer Effizienz von 100% ab, so verdoppeln sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und korrespondierend

dazu das Fluoreszenzsignal. Ein um eine Einheit (Zehnerpotenz) geringerer C_t-Wert entspricht der doppelten Menge an eingesetzter cDNA.

In der Darstellung der Ergebnisse in der verwendeten Software des QuantStudio™ 12K Flex System werden die resultierenden C_t-Werte der Verdünnungsreihe gegen die logarithmierten Werte der bekannten Ausgangskonzentration aufgetragen, wodurch man durch lineare Regression eine Standardkurve erhält, an der eine sog. absolute Quantifizierung der Transkriptlevel der Proben anhand deren C_t-Werte erfolgen kann. Ebenso wie für die Zielsequenz, erfolgte eine absolute Quantifizierung für *ABL1*, wofür zuvor ebenfalls eine fünfstufige Verdünnungsreihe aus Plasmiden herstellt wurde.

Im Anschluss erfolgt die Normalisierung oder auch die sog. relative Quantifizierung, um die Expression von *DNMT3A*^{mut} genau erfassen und mittels des Referenzgenes *ABL1* normalisieren zu können. Eine Normalisierung bietet den Vorteil, dass die Varianzen in den Expressionsergebnissen, die z.B. durch Fehler bei der reversen Transkription entstehen, reduziert werden. Hierfür wurden für jedes Probentriplett die durchschnittlichen Transkriptlevel der Zielsequenz durch die durchschnittlichen Transkriptlevel des Haushaltsgenes dividiert und dieser Quotient im Anschluss mit dem Faktor 10^4 multipliziert (genaue Rechnung siehe 2.5.4). Resultierend erhält man einheitslose Werte, die eine Interpretation der Expression des Zielgenes in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration zulassen.

Diese Auswertung ist jedoch nur dann möglich, wenn die Steigungen der Standardkurven von Ziel- und Haushaltsgen, d.h. deren Amplifikationseffizienzen, nahezu identisch sind (Abbildung 8). Die eingesetzte Menge an Plasmiden wird dabei in einer logarithmierten Funktion gegen die Zyklenzahl (C_t) dargestellt. Das heißt, es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem C_t-Wert und dem Logarithmus der eingesetzten Menge an DNA, sodass bei bekannter Ausgangsmenge an der Standardkurve für jede Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden kann.

Diese Auswertung ist jedoch nur dann möglich, wenn die Steigungen der Standardkurven von Ziel- und Haushaltsgen, d.h. deren Amplifikationseffizienzen, nahezu identisch sind (Abbildung 8). Die eingesetzte Menge an Plasmiden wird dabei in einer logarithmierten Funktion gegen die Zyklenzahl (C_t) dargestellt. Das

heißt, es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem C_t-Wert und dem Logarithmus der eingesetzten Menge an DNA, sodass bei bekannter Ausgangsmenge an der Standardkurve für jede Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden kann.

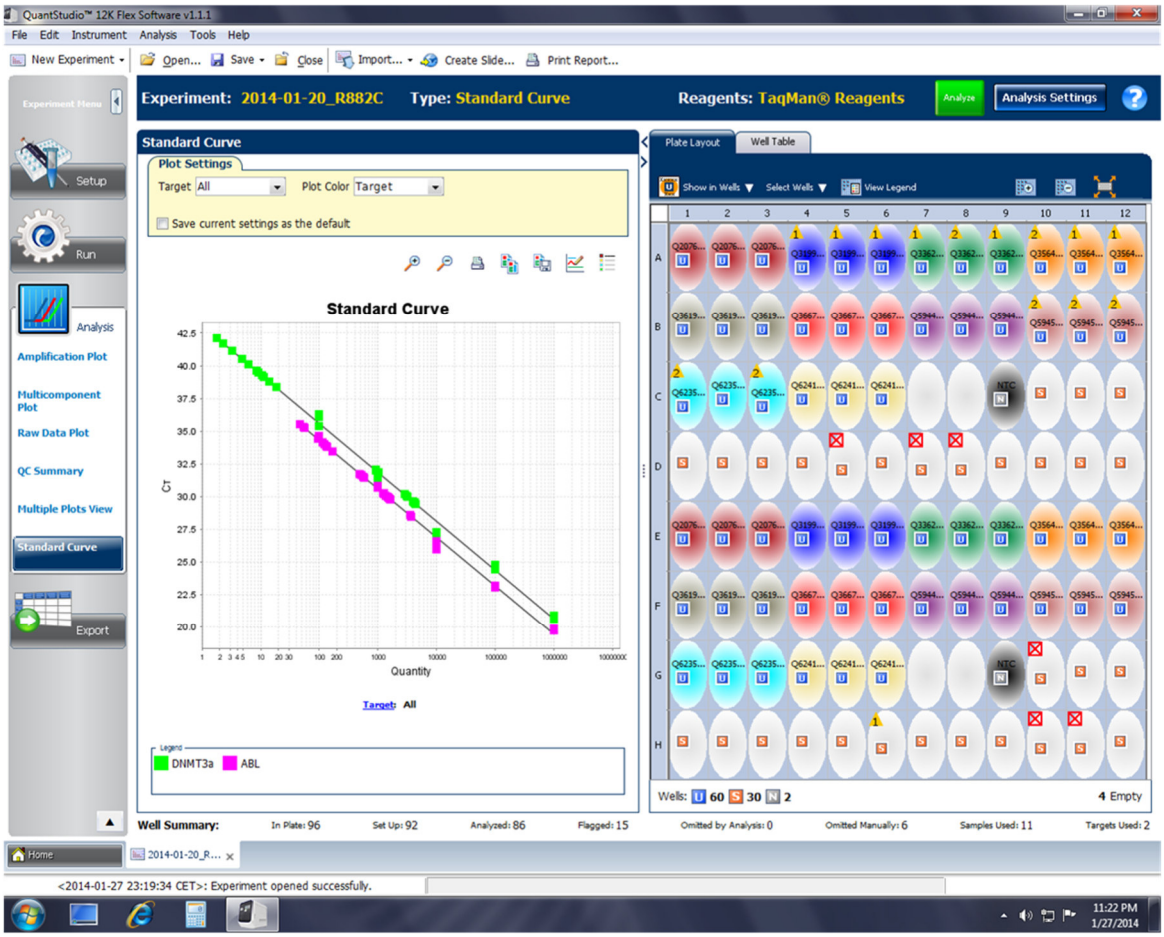

Abbildung 7: Dargestellt sind zwei Standardreihen von *DNMT3A*^{mut} (grün) und *ABL1* (pink) im Amplifikation Plot der QuantStudio™ 12K Flex System Software auf der linken Seite. Auf der rechten Seite sind die RQ-PCR-Platten für *DNMT3A*^{mut} in der oberen Bildhälfte und für *ABL1* in der unteren Bildhälfte abgebildet. Die jeweils zu dritt identisch eingefärbten Slots präsentieren eine Patientenprobe, welche im Triplett pipettiert wurde. Der einzelne graue Slot präsentiert die NTC-Probe. In den ungefärbten Slots wurde die Plasmidverdünnungsreihe jeweils für *DNMT3A*^{mut} und *ABL1* nach dem Schema von Abbildung 6 hineinpipettiert.

Abkürzungen: *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyl-Transferase 3 Alpha*; *ABL1* = *abelson murine leukemia virus oncogene 1*; RQ-PCR = Quantitative *real-time* PCR; NTC = *no template control*

Das Bestimmtheitsmaß R^2 musste bei allen Mutationstypen ≥ 0,990 betragen, genauso wie auch beim Haushaltsgen. Wurde dieser Wert unterschritten, so

konnten kleine Korrekturen vorgenommen werden. Dabei durften bis zu drei Ausreißer entfernt und der Lauf neu analysiert werden, wobei immer nur ein Ausreißer pro Triplett entfernt werden durfte und in Ausnahmefällen zwei. Lag der Wert danach immer noch < 0,990, dann musste der Lauf mit einer neuen Standardverdünnung wiederholt werden.

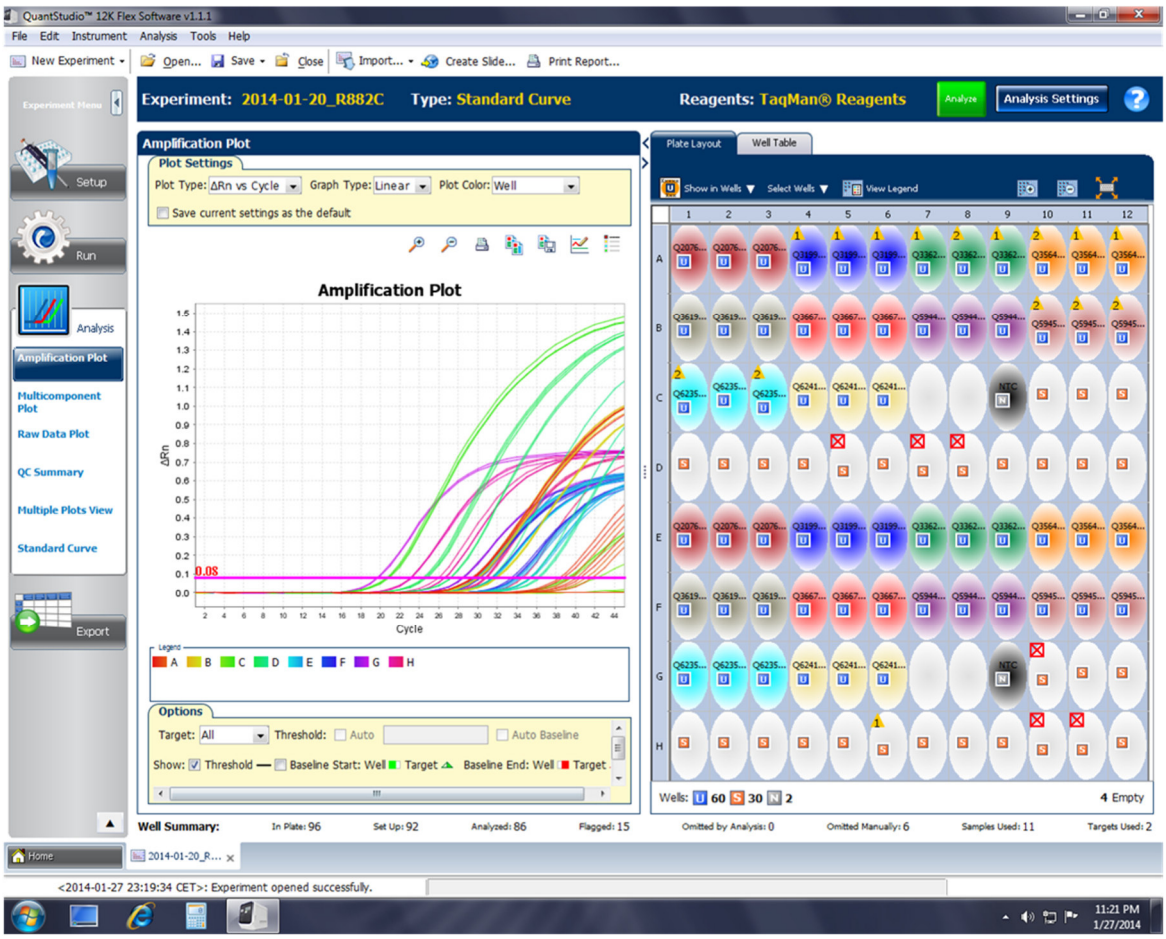

Abbildung 8: Darstellung eines *Amplification Plots* mit der dazugehörigen Well-Einteilung im QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System mit Hilfe der QuantStudio™ 12K Flex System Software. Auf der rechten Seite sind wie in Abbildung 7 die RQ-PCR-Platten für *DNMT3A*^{mut} in der oberen Bildhälfte und für *ABL1* in der unteren Bildhälfte abgebildet. Die jeweils zu dritt identisch eingefärbten Slots präsentieren eine Patientenprobe, welche im Triplett pipettiert wurde. Der einzelne graue Slot präsentiert die NTC-Probe. In den ungefärbten Slots wurde die Plasmidverdünnungsreihe jeweils für *DNMT3A*^{mut} und *ABL1* nach dem Schema von Abbildung 6 hineinpipettiert. Auf der linken Seite sind die Amplifikationsgraphiken für die jeweiligen Probentripletts aus den Slots der rechten Seite in den entsprechenden Farben dargestellt.

Abkürzungen: *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyl-Transferase 3 Alpha*; *ABL1* = *abelson murine leukemia virus oncogene 1*; RQ-PCR = Quantitative *real-time* PCR; NTC = *no template control*

2.5.4 Kriterien der Auswertbarkeit

Folgende Kriterien wurden zur Auswertung der RQ-PCR-Ergebnisse herangezogen:

- Zwei C_t-Werte im Triplett mussten positiv sein, damit die Probe ausgewertet werden durfte. Dies galt für *DNMT3A*^{mut}-R882H/C und auch für *ABL1*.
- War nur ein C_t-Wert im Triplett positiv, so musste die Probe im Triplikat wiederholt werden.
- Bei der *DNMT3A*^{mut}-R882H/C- und auch der *ABL1*-Standardkurve durften je drei ausreißende Werte (z.B. aufgrund von Pipettierfehlern) entfernt werden.
- Der Unterschied zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen von *DNMT3A*^{mut}-R882H/C und *ABL1* musste kleiner als drei C_t-Werte sein.
- Bei einer Zyklenanzahl von *ABL1* ≥ 34 Zyklen wurde die Probe nicht in die Auswertung mit einbezogen.
- Der Korrelationskoeffizient R^2 musste ≥ 0,990 liegen.
- Der Schwellenwert wurde auf 0,08 eingestellt.
- In den NTC-Proben durfte kein Genmaterial enthalten sein, ansonsten musste die komplette RQ-PCR wiederholt werden.

Bei R^2 handelt es sich um das Bestimmtheitsmaß bzw. den Korrelationskoeffizienten, der in der Statistik dazu dient, die Varianz einer abhängigen Variablen mit Hilfe anderer Parameter (unabhängige Variablen) zu erklären. Der Wert kann zwischen null und eins liegen, wobei es sich um eine schlechte Modellanpassung handelt, wenn der Wert nahe null liegt und um eine gute, wenn der Wert etwa eins beträgt (https://www.inwt-statistics.de/blog-artikel-lesen /Bestimmtheitsmass_R2-Teil2.html (14.09.2017). Bei der RQ-PCR ist darüber die Präzision der Messpunkte definiert, inwieweit diese um die Regressionsgerade gestreut liegen. R^2 steht somit als Maß für die Pipettiergenauigkeit und die Qualität der Plasmide.

Die Berechnung und Auswertung der exportierten Ergebnisse erfolgte schließlich im Programm Excel. Hier musste nun noch die Normierung der Messwerte erfolgen. Die Proben wurden dadurch normiert, indem die berechnete Kopienzahl des Zielgenes durch die Kopienzahl des Referenzgenes geteilt wurde. Sie musste

sowohl für die Zielsequenz, als auch für die endogene Kontrolle, also das Haushaltsgen, durchgeführt werden (https://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman (14.09.2017).

Schließlich konnte dann die relative Expression zweier Proben durch den Quotienten aus normiertem Zielgen und normiertem Haushaltsgen bestimmt werden.

Die Berechnung der gemessenen Kopienzahl für *DNMT3A*^{mut}-R882H/C bzw. *ABL1* wurde wie folgt durchgeführt.

1.) Berechnung der Durchschnittsmenge der 3 *DNMT3A*^{mut}-R882H/C (Qty Mean) Messungen einer jeden Probe

$$(\text{Qty Mean}_1 + \text{Qty Mean}_2 + \text{Qty Mean}_3) / 3 = Ø \text{ Qty-Wert}$$

2.) Die Durchschnittsmenge der 3 *DNMT3A*^{mut}-R882H/C (Qty Mean) Messungen einer jeden Probe wird durch die Durchschnittsmege der 3 *ABL1* – Messungen (Qty Mean) der Probe geteilt. Das Ergebnis wird mit dem Faktor 10^4 multipliziert.

$$[\text{Kopienzahl } (\textit{DNMT3A}^{mut}\text{-R882H/C} / \text{Kopienzahl } (\textit{ABL1})] \times 10^4$$

Anhand der Standardkurve konnte die Kopienzahl folgendermaßen ermittelt werden:

1.) Berechnung der Kopienzahl für *DNMT3A*^{mut}-R882H/C bzw. *ABL1* für jede Probe aus dem Triplett

$$\text{Kopienzahl} = 10^{[(\text{y-Intercept} - \text{Ct}) / \text{Slope}]}$$

2.) Aus den Kopienzahlen im Triplett wird der durchschnittliche Kopienzahlenwert berechnet (der Absolutwert für *DNMT3A*^{mut}-R882H/C oder *ABL1*)

$$(\text{Kopienzahl}_1 + \text{Kopienzahl}_2 + \text{Kopienzahl}_3) / 3) = Ø \text{ Kopienzahl}$$

3.) Endgültige/normalisierte Kopienzahl

$$[\text{Kopienzahl}(\textit{DNMT3A}^{mut}) / \text{Kopienzahl } (\textit{ABL})] \times 10^4$$

Die abschließende statistische Auswertung und studienübergreifende Analyse der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Daniela Weber in der Studienzentrale Ulm.

2.5.5 Sensitivität

Um die Sensitivität für die MRD-Messungen von *DNMT3A*^{mut}-R882H/C und *ABL1* am QuantStudio zu ermitteln, wurden ebenso Verdünnungsreihen verwendet, wie auch im standardisierten Ablauf der RQ-PCR. Der Unterschied lag jedoch darin, dass für diese Verdünnungsreihen nicht nur Plasmide verwendet wurden, sondern auch Patientenproben.

Die *DNMT3A*^{mut}-R882C kam von der Zelllinie OCI-AML3, die vom Labor im DSMZ erworben wurde, wohingegen *DNMT3A*^{mut}-R882H einer Patientenprobe entstammte. Um eine möglichst hohe Anzahl an Mutationen in den jeweiligen Proben zu erreichen, wurden für *DNMT3A*^{mut}-R882H mehrere Proben der RQ-PCR unterzogen und diejenige ausgewählt, die den niedrigsten C_t-Wert aufwies, also den höchsten Anteil an Mutationen trug. Damit hatte man zwei nahezu ideale Proben, die zur Bestimmung der Sensitivität herangezogen werden konnten.

Dafür wurde die cDNA beider Mutationen, nicht wie bei der Plasmidherstellung mit Wasser verdünnt, sondern es wurde die Zelllinie HL60 zur Generierung einer Verdünnungsreihe verwendet. Bei der HL60 handelt es sich um eine Zelllinie, die eine Vielzahl an Mutationen trägt, jedoch für *DNMT3A* den Wildtyp codiert. Die cDNA wurde nun also immer weiter im Verhältnis 1:10, 1:100 etc. verdünnt, sodass man Proben mit Konzentrationen von 10^{-1}, 10^{-2} usw. erhielt. Diese Verdünnungsreihen wurden schließlich im QuantStudio gemessen; es zeigte sich eine Sensitivität von 10^{-4}.

2.5.6 Definitionen zur Beurteilung des klinischen Verlaufs

Zur Beurteilung der Überlebenszeit wurden die gängigen Kriterien des EFS, RFS und OS verwendet (Döhner et al. 2010). Das OS galt für alle Patienten einer Studie und wurde als die Zeitspanne zwischen Studieneintritt und Tod jeglicher Ursache gemessen. War zum Zeitpunkt des letzten FUP der Überlebensstatus des Patienten unklar, so wurde der Patient zensiert und dies an dem Tag, an dem der Patient zuletzt bewiesenermaßen am Leben war.

Das RFS war nur für die Patienten definiert, die eine CR erreicht hatten. Der Zeitraum galt ab dem Erreichen der Remission bis zum Auftreten eines Rezidivs oder einem Tod jeglicher Ursache. Für alle Patienten einer Studie galt wiederum das EFS. Dies war definiert als der Zeitraum zwischen Studieneintritt und

Wirkungsverlust der Induktionstherapie, einem Rezidiv nach CR oder einem Tod jeglicher Ursache. Die RD wiederum war ausschließlich gültig für Patienten, die eine CR erreicht hatten und galt von dem Tag an, an dem die Remission erreicht wurde bis zum Auftreten eines Rezidivs. Ein ebenfalls gebräuchlicher Messwert war die CIR. Diese galt ebenso nur für Patienten, die eine CR erreicht hatten und wurde zwischen der erreichten Remission und dem Rezidiv gemessen. Bei allen genannten Ereignissen galt für diejenigen Patienten, bei denen der letzte Status unbekannt war, der aktuellste Status des FUP, welcher als Zensurdatum bezeichnet wurde (http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/therapie/responsekriterien/allgemein (13.09.2017).

Die folgenden Definitionen für den klinischen Verlauf beruhen auf den Empfehlungen des *European LeukemiaNet* (ELN) (Döhner et al. 2010). Eine CR lag vor, wenn weniger als 5% Blasten im KM und keine Blasten mit Auerstäbchen vorhanden waren. Es durfte keine extramedulläre Erkrankung, wie z.B. ein Plasmozytom, vorliegen.

Die absolute Neutrophilenzahl musste größer als 1.0×10^9/l und die absolute Thrombozytenzahl größer als 100×10^9/l sein. Das RFS war nur für Patienten, die eine CR bzw. eine komplette Remission mit inkompletter Regeneration erreicht haben, definiert. Es wurde vom Datum des Erlangens der Remission bis zum Datum des Rezidivs oder des Eintritts des Todes berechnet. Das OS war für alle Studienteilnehmer definiert; es wurde vom Datum des Eintritts in die Studie bis zum Datum des Todes berechnet.

2.5.7 Statistische Analysen

Der Schwerpunkt dieser experimentellen Arbeit lag in der Durchführung von quantitativen PCR-Analysen zur Bestimmung minimaler Resterkrankungen bei AML-Patienten mit *DNMT3A*^{mut}-R882. Die untersuchten Patientenproben und die korrespondierenden klinischen Daten wurden im Rahmen einer multizentrischen Studie (Leiter: Prof. Dr. med. H. Döhner) der AMLSG gewonnen. Die Dokumentation und die Pflege der Daten und die statistischen Auswertungen erfolgten in der AMLSG-Studienzentrale der Klinik für Innere Medizin III in Ulm. Aufgrund der Komplexität und der Größe der klinischen Datensätze erfolgten die statistischen Analysen durch eine Mitarbeiterin der Studienzentrale des

Universitätsklinikums Ulm, Frau Daniela Weber (*Master of Science in Medical Biometry/Biostatistics*).

Ich war im Rahmen der Promotionsarbeit kontinuierlich an der Diskussion zur Durchführung der statistischen Analysen und Interpretation der Daten und Ergebnisse beteiligt. Die Daten dieser Analysen stellen die Grundlage für die Prüfung der Möglichkeit von *DNMT3A* Mutationen als molekularen Marker zum Nachweis minimaler Resterkrankung sowie der Evaluation des MRD-Monitorings bei diesen Patienten dar.

3. Ergebnisse

3.1 Eigenschaften des untersuchten Partialkollektivs

Das Patientenkollektiv der AMLSG 09-09 Studie, welches ich eigenständig in meiner Arbeit untersucht habe, umfasste 243 Patienten. Diese Patienten wurden auf eine *DNMT3A*^{mut} hin sequenziert: 28 Patienten konnten mit einer *DNMT3A*^{mut}-R882C und 44 Patienten mit einer *DNMT3A*^{mut}-R882H im Exon 23 identifiziert werden. Von diesen konnten dann 58 Patienten in die statistische Analyse mit eingeschlossen werden, da wie bereits erwähnt mindestens zwei FUP-Proben notwendig waren.
Von diesen 58 Patienten standen insgesamt 617 Proben (KM: n=318; PB: n=299) zur Verfügung, welche seriell zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten in das Labor eingegangen waren und für die hier beschriebenen MRD-Analysen verwendet werden konnten.

3.2 Studiendaten

Wie bereits im Material- und Methodenteil beschrieben, wurden im Rahmen der drei Studien AMLSG 09-09, AMLSG 07-04 und AML HD98A 159 Patienten mit einem medianen Alter von 50 Jahren (Spannbreite von 22 bis 78 Jahren) untersucht. Von diesen Patienten standen insgesamt 1.331 Proben zur Verfügung, welche sich aus 615 KM- und 716 PB-Proben zusammensetzten. Diese Proben waren zu folgenden Zeitpunkten in das Labor eingegangen: Diagnose: n=301, unter Therapie: n=750, FUP: n=280. Zum Diagnosezeitpunkt lagen 114 KM- und 187 PB-Proben vor (Tabelle 18).
Von den Patienten (n=159) erhielten 37 eine allogene HSCT, drei eine autologe HSCT und 119 eine intensive Chemotherapie. Die Proben stammten aus einem Zeitraum von 8 Jahren, wobei die Anzahl ab 2,5 Jahren durch Ereignisse wie z.B. Tod bereits auf einstellige Zahlen zurückgegangen war.
Die Entnahme der Proben erfolgte zum Diagnosezeitpunkt, nach Induktion I und II, nach Konsolidierung I, II und III, nach Ende der gesamten Behandlung, sowie im 1. Jahr vierteljährlich, im 2. bis 4. Jahr halbjährlich, und schließlich im 5., 6., und 8. Jahr. In die statistische Analyse wurden für die Analyse der Kinetik der Transkriptlevel die therapierelevanten Zeitpunkte Diagnose, nach Induktion I und

II, nach Konsolidierung I und II und nach Ende der Behandlung (FUP) mit aufgenommen (Abbildung 9). Für die weiteren Endpunkte wie OS und Remissionsdauer wurden die Therapiezeitpunkte nach Doppelinduktionstherapie sowie nach Behandlungsende gewählt. Von einem Patienten mussten dabei mindestens drei Proben, inklusive vom Diagnosezeitpunkt, vorhanden sein, damit dieser in die Auswertung mit aufgenommen werden konnte.

Tabelle 18: Anzahl der Knochenmark- und peripheren Blutproben aus den Studien AMLSG 09-09, AMLSG 07-04 und AML HD98A zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten (Diagnose, Aplasie, Induktion I/II, Konsolidierung I/II/III, Behandlungsende) sowie im Follow-up.

Abkürzungen: n= Probenanzahl

Zeitpunkt	Knochenmark-proben (n)	Periphere Blutproben (n)
Diagnose	114	187
Aplasie	8	17
Induktion I	87	93
Induktion II	75	80
Konsolidierung I	58	65
Konsolidierung II	45	34
Konsolidierung III	36	38
Behandlungsende	63	51
7,5 Monate	28	24
1 Jahr	30	29
1,25 Jahre	18	19
1,5 Jahre	15	14
1,75 Jahre	10	10
2 Jahre	13	8
2,5 Jahre	8	13
3 Jahre	4	14
3,5 Jahre	0	2
4 Jahre	2	8
4,5 Jahre	1	4
5 Jahre	0	2
6 Jahre	0	2
8 Jahre	0	2

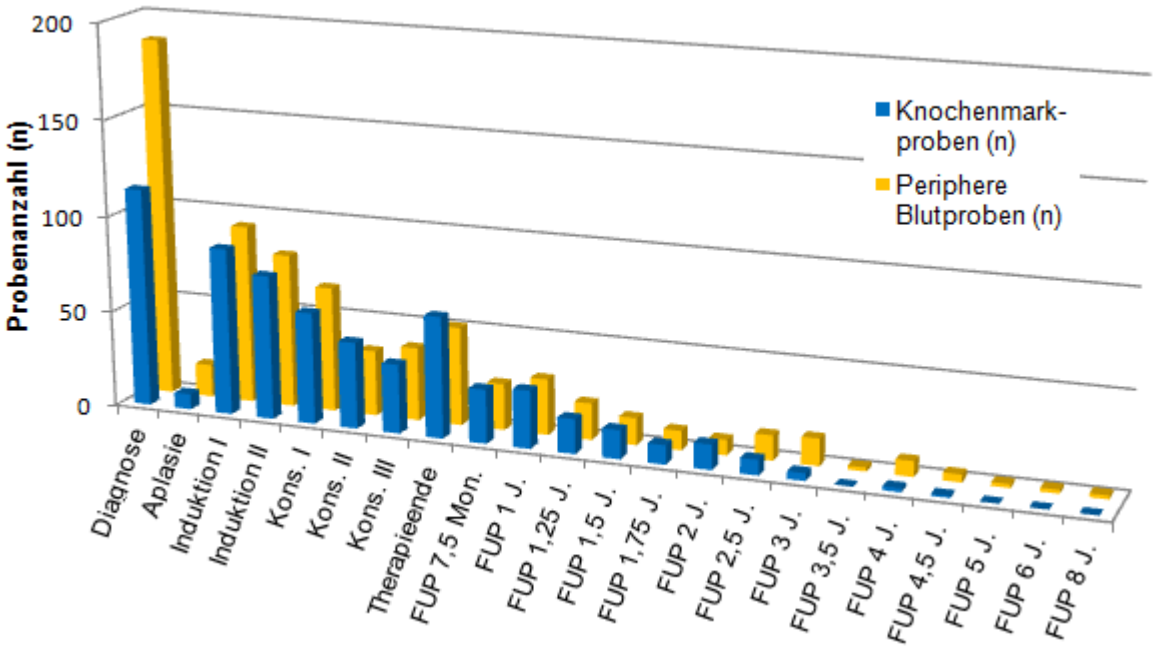

Abbildung 9: Dargestellt ist die Verteilung der Knochenmark- und peripheren Blutproben aus den Studien AMLSG 09-09, AMLSG 07-04 und AML HD98A zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten (Diagnose, Aplasie, Induktion I/II, Konsolidierung I/II/III, Therapieende) sowie im Follow-up. Die Knochenmarkproben sind in blau und die peripheren Blutproben in gelb dargestellt.

Abkürzungen: n = Probenanzahl; Kons. = Konsolidierungstherapie; FUP = Follow-up; Mon. = Monate; J. = Jahre

3.3 Assoziation mit klinischen und genetischen Charakteristika

Die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel wurden wie bereits beschrieben als *DNMT3A*^{mut} zu *ABL1* x 10^4 angegeben. Bei den KM-Proben (n=114) betrugen zum Diagnosezeitpunkt die medianen Transkriptlevel 12690 mit einer Spannbreite von 0 bis 54280. Die Transkriptlevel waren nicht mit den bekannten klinischen Charakteristika wie Alter (p=0.89), Leukozyten- (p=0.93) und Thrombozytenanzahl (p=0.14), LDH (p=0.35), den Blasten im KM (p=0.87) oder im PB (p=0.84) sowie dem Geschlecht assoziiert (Tabelle 19).

Bei der Korrelation mit dem Mutationsstatus zeigten sich 74 Patienten mit *FLT3*-ITD Wildtyp und 40 Patienten mit *FLT3*-ITD Positivität. In Bezug auf *FLT3*-TKD präsentierten sich 101 Patienten negativ und 11 Patienten mutiert. *NPM1*^{mut} waren 95 Patienten und 19 Patienten trugen den Wildtyp. Es zeigte sich keine

signifikante Korrelation der Transkriptlevel mit *NPM1* (p=0.41), *FLT3*-ITD (p=0.32) und -TKD (p=0.32) Mutationen (Tabelle 20).

Tabelle 19: Korrelation der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel mit klinischen Charakteristika anhand des p-Wertes.

Abkürzungen: LDH = Laktatdehydrogenase; p = engl. für *probability*; U/l = Einheiten pro Liter

Charakteristikum	p-Wert
Alter	0.89
Leukozyten	0.93
Thrombozyten	0.14
LDH (U/l)	0.35
Knochenmarkblasten	0.87
Periphere Blutblasten	0.84
Geschlecht männlich/weiblich	0.76

Tabelle 20: Dargestellt sind der Median und die Spannbreite der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel jeweils für *FLT3*-ITD (negativ/positiv), *FLT3*-TKD (Wildtyp/mutiert) und *NPM1* (Wildtyp/mutiert) sowie jeweils die Korrelation der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel für *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD und *NPM1* anhand des p-Wertes.

Abkürzungen: n = Probenanzahl; p = engl. für *probability*; *FLT3 = FMS-like tyrosine kinase 3*; ITD = Interne Tandemduplikation; TKD = Tyrosinkinasedomäne; *NPM1 = Nucleophosmin 1*

***FLT3*-ITD**	**Negativ** (n=74)	**Positiv** (n=40)
Median	13.498	11.427
Spannbreite	1.624-54.283	0-36.830
p-Wert	0.32	
***FLT3*-TKD**	**Wildtyp** (n=101)	**Mutiert** (n=11)
Median	12.595	15.352
Spannbreite	0-54.283	6.413-25.881
p-Wert	0.32	
NPM1	**Wildtyp** (n=19)	**Mutiert** (n=95)
Median	10.867	12.983
Spannbreite	1.395-54.284	0-31.397
p-Wert	0.41	

3.4 Vergleich der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel zwischen Knochenmark und peripherem Blut

Als nächstes wurden die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel aus dem KM und dem PB miteinander verglichen. Die Untersuchung wurde zum Diagnosezeitpunkt, nach Induktion I und II, nach Konsolidierung I und II sowie nach Ende der Therapie durchgeführt. Zum Diagnosezeitpunkt waren die Transkriptlevel im KM (Median 12694; Spannbreite 0-54283) und im PB (Median 11526; Spannbreite 0-80489) vergleichbar hoch und es bestand kein signifikanter Unterschied (p=0.81). Nach der ersten Induktionstherapie konnten wir sowohl im KM (Median 1310; Spannbreite 0-38872) als auch im PB (Median 507; Spannbreite 0-12953) eine Reduktion der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel um ca. eine Log-Stufe beobachten; der Unterschied zwischen KM und PB war signifikant (p=0.01, Abbildung 10). Nach Induktion II zeigten sich die Proben vergleichbar mit ähnlichem Median (KM=1110; PB=1284), allerdings war auch hier die Spannbreite wieder sehr groß (KM 0-26489; PB 0-22086; p=0.38). Nach der Konsolidierungstherapie I waren die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel im PB signifikant niedriger als im KM (KM 0-14617, Median 719; PB 0-17559, Median 1383; p=0.0003) (Abbildung 11).

Ähnlich stellte es sich nach Konsolidierung II dar. Auch hier waren die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel im PB signifikant niedriger als die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel im KM (PB 0-12895, Median 724; KM 0-20843, Median 927; p=0.01). Nach Beendigung der Therapie bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Transkriptleveln im PB und KM (Median PB: 1339; KM: 1924) (p=0.08) (Abbildung 12).

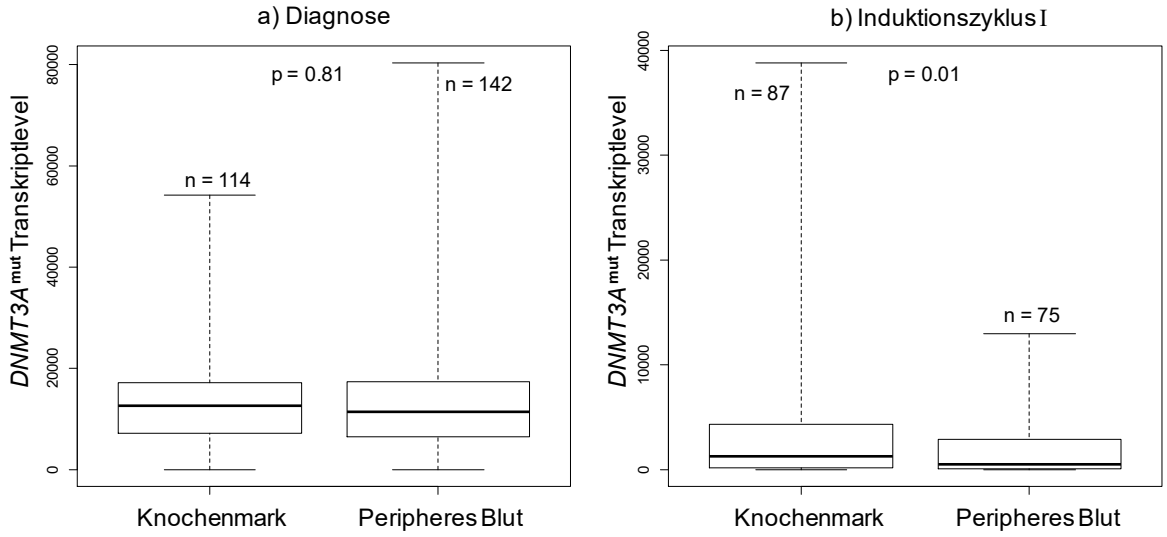

Abbildung 10: Vergleich der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel von Knochenmark und peripherem Blut zum Diagnosezeitpunkt (a) und nach Induktion I (b).

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; n = Probenanzahl

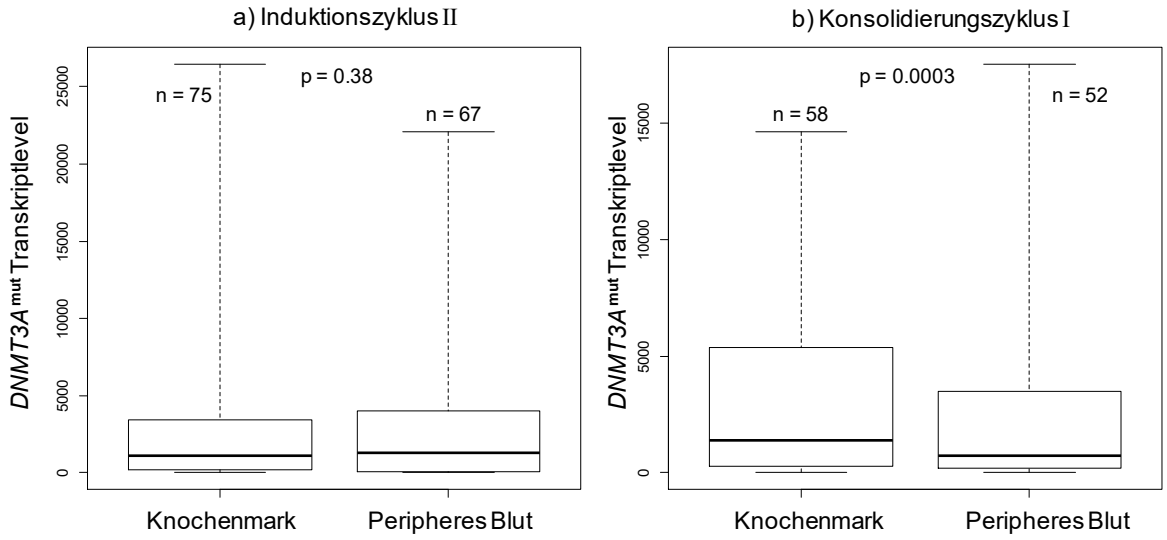

Abbildung 11: Vergleich der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel von Knochenmark und peripherem Blut nach Induktion II (a) und nach Konsolidierung I (b).

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; n = Probenanzahl

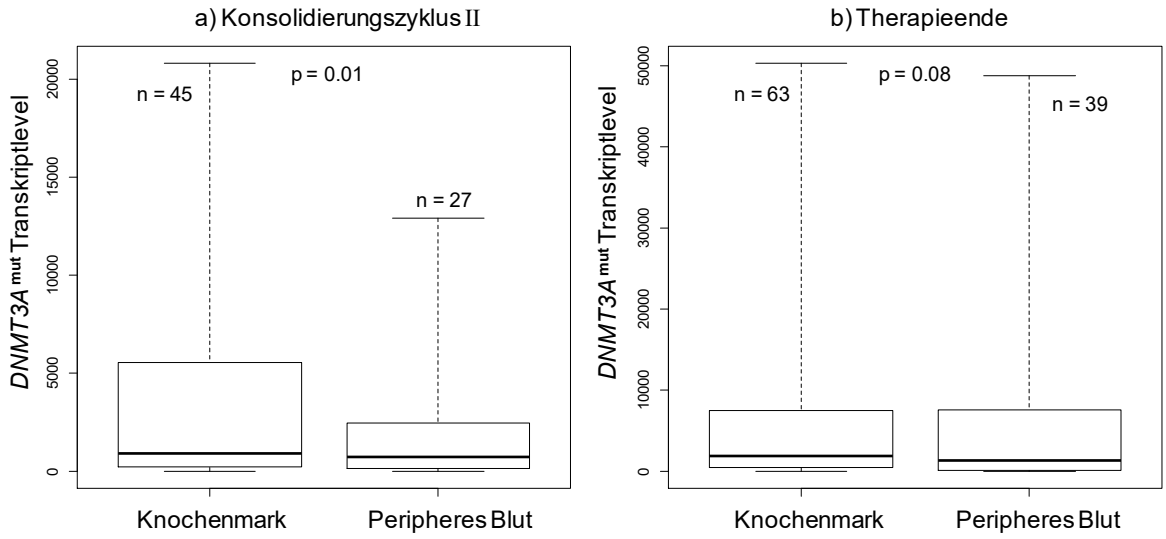

Abbildung 12: Vergleich der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel von Knochenmark und peripherem Blut nach Konsolidierung II (a) und nach Beendigung der Therapie (b).

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; n = Probenanzahl

3.5 Korrelation mit den Überlebensdaten zum Diagnosezeitpunkt

Des Weiteren wurden die Ergebnisse aus den MRD-Analysen mit den Überlebensdaten korreliert. Hierzu wurden zunächst die Transkriptlevel als Log10-transformierte kontinuierliche Variable zum Zeitpunkt Diagnose mit auftretenden Rezidiven, Ereignissen sowie mit dem Gesamtüberleben korreliert. Es bestand kein signifikanter Einfluss der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel auf die Endpunkte OS (HR=1.00, p=0.99), EFS (HR=1.05, p=0.80) und RFS (HR=1.11, p=0.64). Ebenso konnten wir keinen signifikanten Einfluss auf das Erreichen einer CR nach Doppelinduktion zeigen. Es gab keinen Unterschied in den medianen Transkriptleveln zwischen 102 Patienten in CR und 12 Patienten, die sich nicht in CR befanden (12694 [0 – 54284] vs. 11309 [1624 – 19156]).

3.6 Prognostischer Einfluss der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel

3.6.1 Prognostischer Einfluss der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel während der Therapie

Der prognostische Einfluss der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel im KM wurde mit Hilfe der Log10-transformierten kontinuierlichen Variablen, zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten untersucht. Dies wurde mittels Cox-Regressionsanalysen durchgeführt. Nach den jeweiligen Therapiezyklen wurden die medianen Transkriptlevel als Log10-transformierte Variable aus der Gesamtheit der Transkriptlevel von 87 Patienten nach Induktion I, 75 Patienten nach Induktion II, 58 Patienten nach Konsolidierung I, 45 Patienten nach Konsolidierung II sowie 63 Patienten nach Therapieende bestimmt und diese, sowohl mit auftretenden Rezidiven, als auch mit dem Ereignis Tod, korreliert. Hierfür wurden dann jeweils die Hazard Ratio und der p-Wert ermittelt. Zu keinem der Zeitpunkte war ein signifikanter Zusammenhang der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel mit dem Ereignis Rezidiv oder Tod festzustellen (Tabelle 21).

Tabelle 21: Darstellung des Medians sowie der Spannbreite der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten (Induktion I/II, Konsolidierung I/II, Therapieende) mit der jeweiligen Anzahl der Patienten. Weiterhin wird die Korrelation der genannten Therapiezeitpunkte mit den Ereignissen Rezidiv und Tod anhand der HR und des p-Wertes präsentiert.

Abkürzungen: *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; HR = Hazard ratio; p = engl. für *probability;* n = Patientenanzahl

Zeitpunkt	Median Spannbreite	Anzahl Patienten (n)	Rezidiv		Tod	
			HR	p	HR	p
Nach Induktion I	1310 0-38870	87	1.10	0.40	1.04	0.74
Nach Induktion II	1110 0-26490	75	1,02	0.85	1.03	0.85
Nach Konsolidierung I	1383 0-14620	58	1.06	0.74	1.04	0.84
Nach Konsolidierung II	926 0-20840	45	1.20	0.36	1.12	0.65
Nach Therapieende	1924 0-50410	63	1.08	0.64	1.00	0.99

Die weiteren Analysen beschränkten sich auf die zwei Therapiezeitpunkte nach Ende der Doppelinduktion, sowie nach Abschluss der Therapie. Insgesamt wendeten wir drei verschiedene statistische Analysemethoden an.

Als erstes wurde der prognostische Einfluss der *DNMT3A* Log10-Reduktion der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel auf das OS als auch auf die Remissionsdauer analysiert. Hierbei wurde der Quotient der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel zum Zeitpunkt nach Doppelinduktionstherapie bzw. nach Ende der Therapie im Vergleich zum Diagnosezeitpunkt bestimmt. Der Median des logarithmischen Quotienten wurde dazu als Grenze zur Unterscheidung zwischen höherer und niedrigerer Reduktion der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel definiert.

Im zweiten Schritt untersuchten wir den Einfluss der RQ-PCR-Positivität (definiert als positiv bei > 0 *DNMT3A*^{mut}/*ABL1* x 10^4) versus RQ-PCR-Negativität (definiert als negativ bei 0 *DNMT3A*^{mut}/*ABL1* x 10^4) wieder nach Ende der Induktionstherapie II, sowie nach Therapieende.

Als drittes und letztes erfolgte eine Analyse der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel aufgeteilt in vier gleich große Intervalle (Quartile) entsprechend der Verteilung nach den o.g. Zeitpunkten.

3.6.2 Prognostischer Einfluss der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel nach Doppelinduktion

Zunächst analysierten wir den Einfluss der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel nach Doppelinduktionstherapie mit Hilfe der Log10-Reduktion unabhängig davon, ob es sich um KM- oder PB-Proben handelte. Für beide Endpunkte war kein signifikanter Zusammenhang mit den *DNMT3A*^{mut} Transkriptleveln, in Bezug auf das OS und die Remissionsdauer, festzustellen (OS: p=0.87; Remissionsdauer: p=0.38) (Abbildung 13 und 14).

Im nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss der RQ-PCR-Positivität und der RQ-PCR-Negativität der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel aufgeteilt in KM-Proben sowie KM- und PB-Proben zusammengenommen. Auch hier konnte kein signifikanter Zusammenhang mit den Endpunkten OS (KM: p=0.89) und Remissionsdauer (KM: p=0.61) festgestellt werden (Abbildungen 14a und 15a). Allerdings zeigten sich nur sieben Patienten RQ-PCR negativ, während 68 Patienten RQ-PCR positiv waren.

Bei der Analyse der KM- und PB-Proben zusammengenommen, standen nun 88 Proben zur Verfügung; hiervon waren neun Patienten RQ-PCR negativ und 79 Patienten RQ-PCR positiv. Es zeigte sich weiterhin keine Korrelation mit dem OS (KM und PB: p=0.76) und der Remissionsdauer (KM und PB: p=0.83) (Abbildungen 15b und 16b).

Als drittes analysierten wir die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel aufgeteilt nach Quartilen. Nach Doppelinduktionstherapie war für die KM-Proben kein signifikanter Zusammenhang, sowohl für das OS (KM: p=0.24) als auch für die Remissionsdauer (KM: p=0.85) festzustellen. Bei der kumulativen Analyse der KM- und PB-Proben zusammen, zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf das OS (KM und PB: p=0.81) und die Remissionsdauer (KM und PB: p=0.34) (Abbildungen 17 und 18).

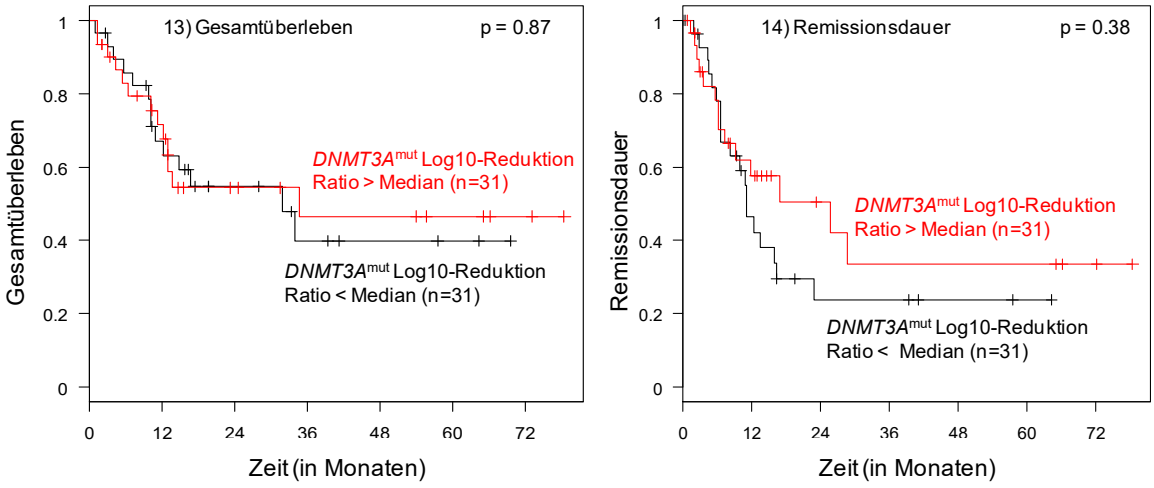

Abbildung 13 und 14: Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben (13) und zur Remissionsdauer (14) in Abhängigkeit der *DNMT3A*^{mut} Log10-Reduktion (Log10-Reduktion Ratio < Median vs. Log10-Reduktion Ratio > Median) nach Doppelinduktionstherapie. Die höhere Reduktion der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel ist schwarz, die niedrigere Reduktion der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel rot dargestellt.

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; n = Probenanzahl

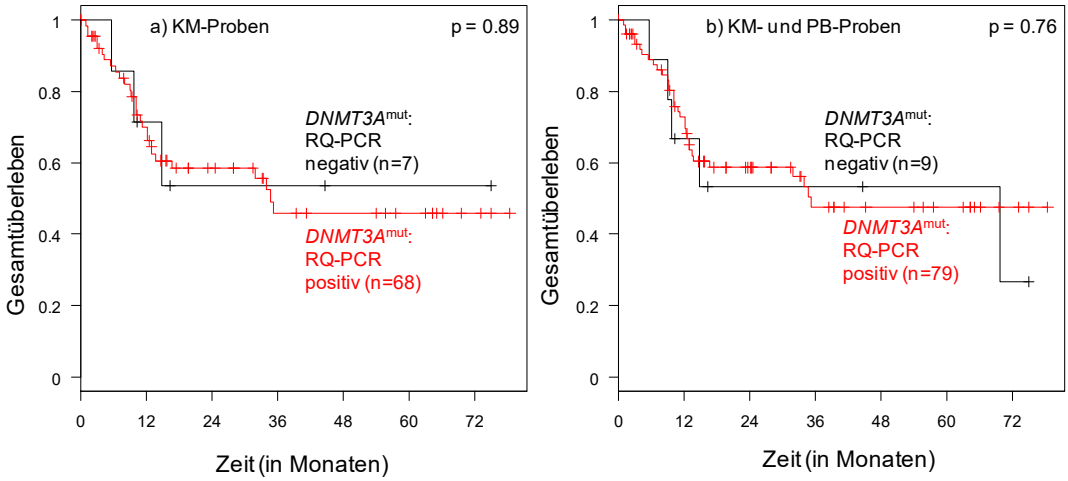

Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom RQ-PCR-Status der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel: prognostischer Einfluss nach Doppelinduktionstherapie auf das Gesamtüberleben für a) KM-Proben (RQ-PCR-negativ [schwarz]: n=7, RQ-PCR-positiv [rot]: n=68) und b) KM- und PB-Proben (RQ-PCR-negativ [schwarz]: n=9, RQ-PCR-positiv [rot]: n=79).

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; RQ-PCR = quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion; n = Probenanzahl; KM = Knochenmark; PB = peripheres Blut

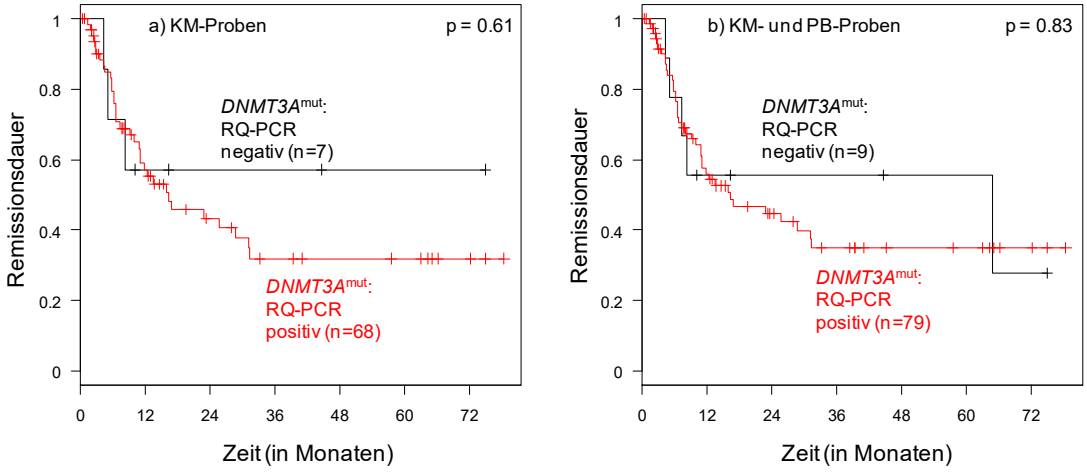

Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurven zur Remissionsdauer in Abhängigkeit vom RQ-PCR Status der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel: prognostischer Einfluss nach Doppelinduktionstherapie auf die Remissionsdauer für a) KM-Proben (RQ-PCR-negativ [schwarz]: n=7, RQ-PCR-positiv [rot]: n=68) und b) KM- und PB-Proben (RQ-PCR-negativ [schwarz]: n=9, RQ-PCR-positiv [rot]: n=79).

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; RQ-PCR = quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion; n = Probenanzahl; KM = Knochenmark; PB = peripheres Blut

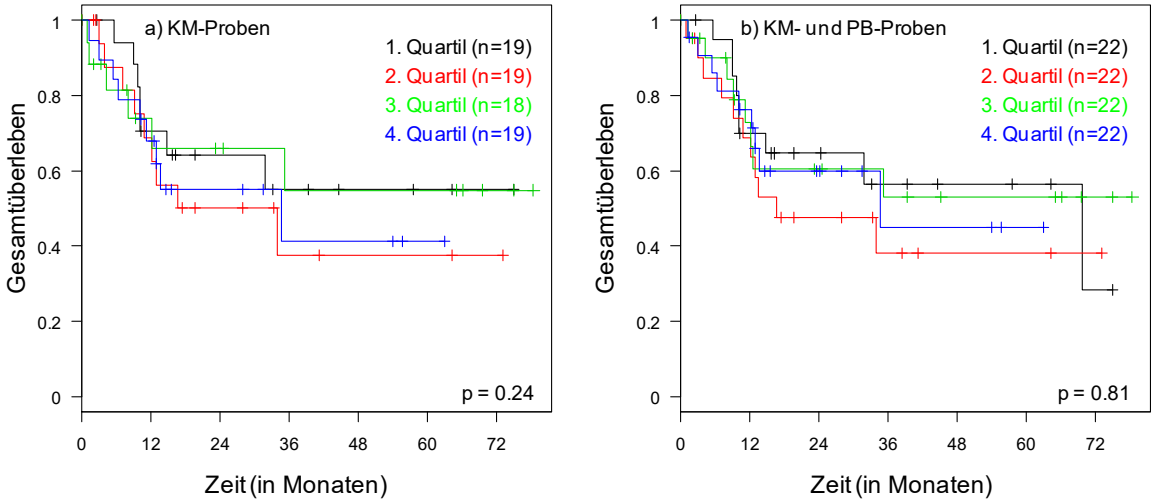

Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben entsprechend der Quartile der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel nach Doppelinduktion für a) KM-Proben (1., 2. und 4. Quartil: n=19, 3.Quartil: n=18) und b) KM- und PB-Proben (1.- 4.Quartil: n=22).

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; n = Probenanzahl; KM = Knochenmark; PB = peripheres Blut

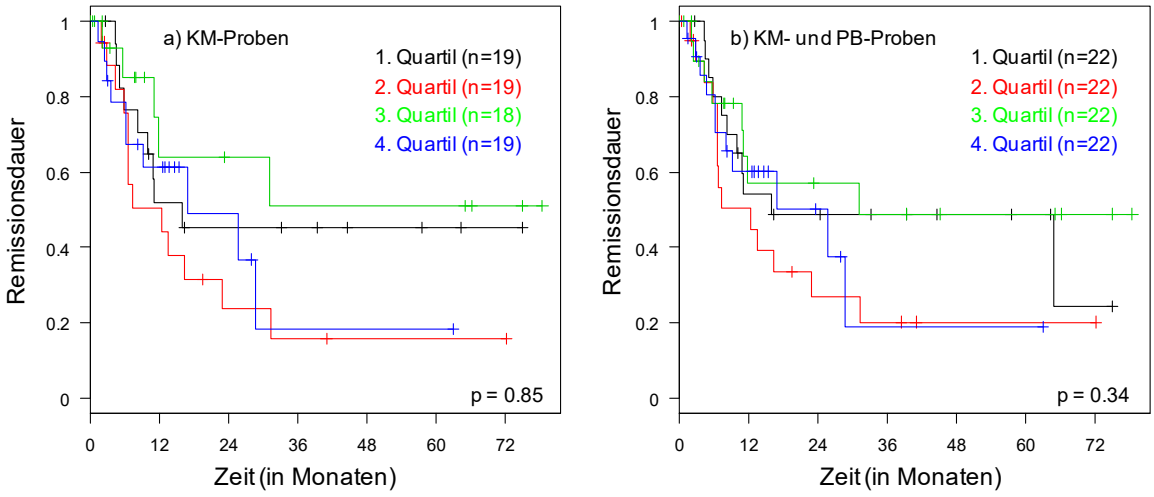

Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven zur Remissionsdauer entsprechend der Quartile der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel nach Doppelinduktion für a) KM-Proben (1., 2. und 4. Quartil: n=19, 3.Quartil: n=18) und b) KM- und PB-Proben (1.- 4.Quartil: n=22).

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; n = Probenanzahl; KM = Knochenmark; PB = peripheres Blut

3.6.3 Prognostischer Einfluss der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel nach Therapieende

Nach Therapieende wendeten wir die identischen Auswertealgorithmen an. Wir verwendeten die Log10-Reduktion der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel in Bezug auf den Median unabhängig davon, ob es sich um KM- oder PB-Proben handelte, sondern führten eine kumulative Analyse durch. Es zeigte sich weder eine Korrelation mit dem OS (p=0.67) noch mit der Remissionsdauer (p=0.57) (Abbildungen 19 und 20).

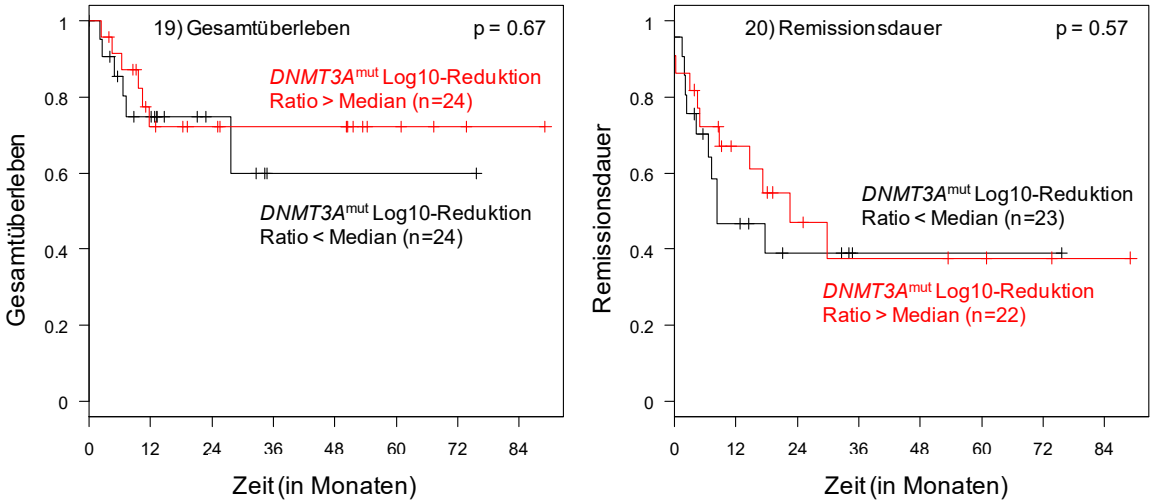

Abbildung 19 und 20: Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben (19) und zur Remissionsdauer (20) in Abhängigkeit der *DNMT3A*^{mut} Log10-Reduktion (Log10-Reduktion Ratio < Median vs. Log10-Reduktion Ratio > Median) nach Therapieende. Die höhere Reduktion der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel ist schwarz, die niedrigere Reduktion der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel rot dargestellt.

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; n = Probenanzahl

Als nächstes analysierten wir wiederum den Einfluss der RQ-PCR-Positivität bzw. RQ-PCR-Negativität. Dabei bestand bei der alleinigen Analyse der KM-Proben kein signifikanter Einfluss auf das OS (p=0.73). Interessanterweise waren nur vier von den 63 Proben RQ-PCR-negativ. Auch mit der Remissionsdauer (p=0.30) ergab sich keine signifikante Assoziation (Abbildungen 21a und 22a).

Bei Zusammennahme von KM- und PB-Proben ergab sich eine Anzahl von 75 Proben. Hierbei war kein signifikanter Zusammenhang mit dem OS (p=0.54) und

der Remissionsdauer (p=0.19) festzustellen (Abbildungen 21b und 22b). Von den nun 75 Proben waren weiterhin nur vier Proben RQ-PCR-negativ.

Als letztes wurden wiederum die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel aufgeteilt nach Quartilen analysiert. Im Hinblick auf das OS (p=0.38) als auch auf die Remissionsdauer (p=0.44) war bei den KM-Proben kein Einfluss der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel festzustellen (Abbildungen 22a und 23a). Führte man die Analyse gemeinsam mit den PB-Proben durch, zeigte sich sowohl beim OS (p=0.02) als auch bei der Remissionsdauer (p=0.01) ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Quartilen (Abbildungen 23b und 24b).

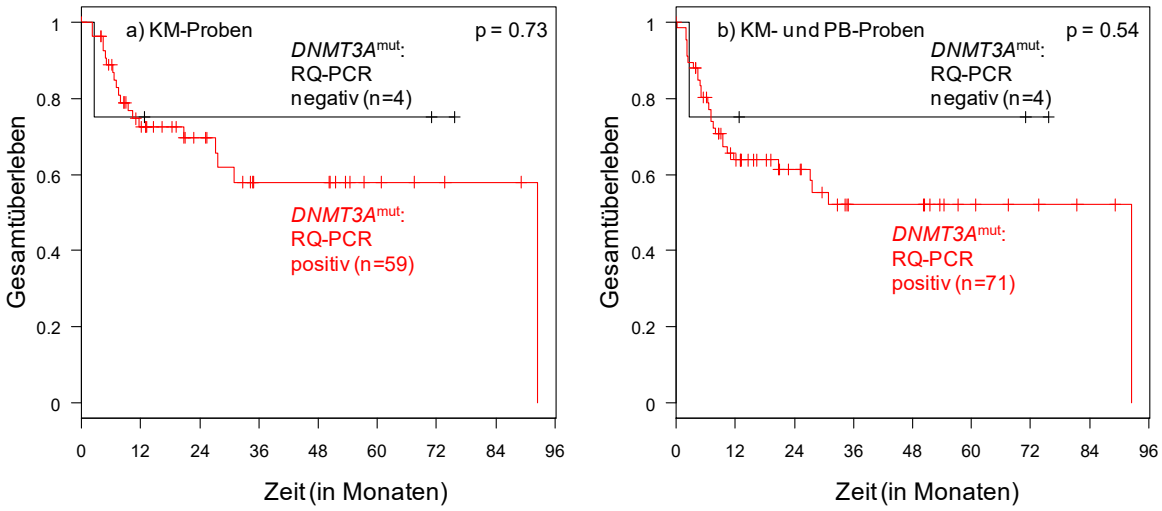

Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom RQ-PCR-Status der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel: prognostischer Einfluss nach Therapieende auf das Gesamtüberleben für a) KM-Proben (RQ-PCR-negativ [schwarz]: n=4, RQ-PCR-positiv [rot]: n=59) und b) KM- und PB-Proben (RQ-PCR-negativ [schwarz]: n=4, RQ-PCR-positiv [rot]: n=71).

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A;* RQ-PCR = quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion; n = Probenanzahl; KM = Knochenmark; PB = peripheres Blut

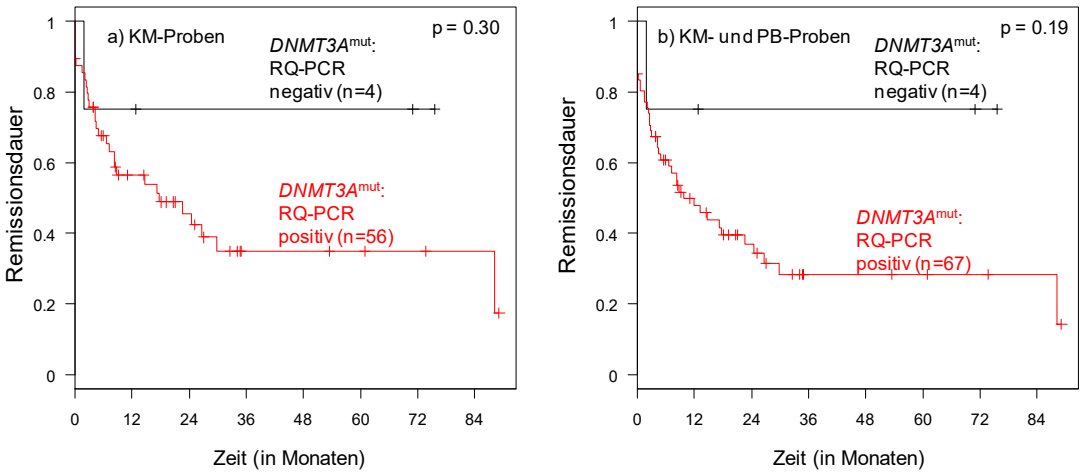

Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurven zur Remissionsdauer in Abhängigkeit vom RQ-PCR-Status der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel: prognostischer Einfluss nach Therapieende auf die Remissionsdauer für a) KM-Proben (RQ-PCR-negativ [schwarz]: n=4, RQ-PCR-positiv [rot]: n=56) und b) KM- und PB-Proben (RQ-PCR-negativ [schwarz]: n=4, RQ-PCR-positiv [rot]: n=67).

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A;* RQ-PCR = quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion; n = Probenanzahl; KM = Knochenmark; PB = peripheres Blut

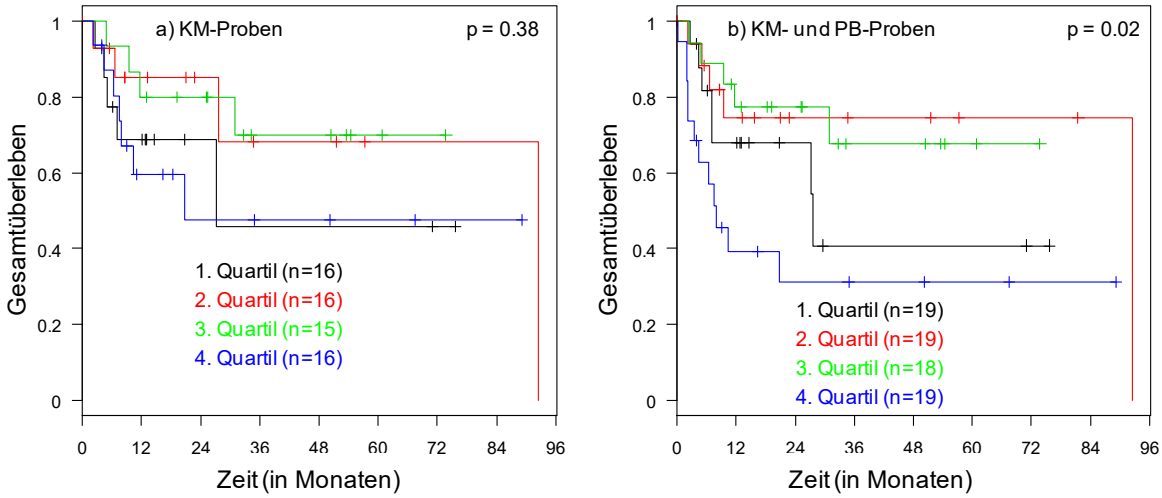

Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben entsprechend der Quartile der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel nach Beendigung der Therapie für a) KM-Proben (1., 2. und 4. Quartil: n=16, 3.Quartil: n=15) und b) KM- und PB-Proben (1., 2. und 4. Quartil: n=19, 3.Quartil: n=18).

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; n = Probenanzahl; KM = Knochenmark; PB = peripheres Blut

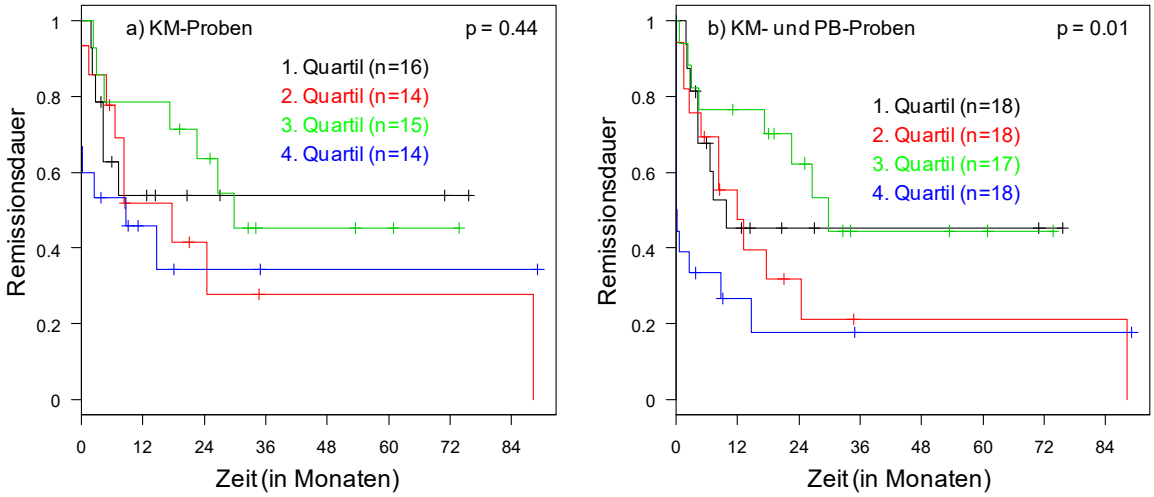

Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurven zur Remissionsdauer in Abhängigkeit von den Quartilen der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel nach Beendigung der Therapie für a) KM-Proben (1.Quartil: n=16, 2.Quartil: n=14, 3.Quartil: n=15, 4.Quartil: n=14) und b) KM- und PB-Proben rechts (1., 2. und 4. Quartil: n=18, n=18, 3.Quartil: n=17).

Abkürzungen: p = engl. für *probability*; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; n = Probenanzahl; KM = Knochenmark; PB = peripheres Blut

3.7 Exemplarische Verläufe von Patienten

Nach der Beschreibung der Ergebnisse im Hinblick auf ihre Korrelation mit den verschiedenen Therapiezeitpunkten und Überlebensendpunkten, sollen im Folgenden gezielt die Verläufe einzelner AML-Patienten mit *DNMT3A*^{mut} dargestellt werden. Es werden jeweils zwei Patienten mit und ohne Rezidiv präsentiert.

3.7.1 Patientenverläufe ohne Rezidiv

Zunächst werden die Verläufe zweier Patienten gezeigt, bei denen durch die Therapie zunächst eine CR erreicht werden konnte, sich diese jedoch in ihren *DNMT3A*^{mut} Transkriptleveln unterschiedlich darstellten.

Bei dem Patienten mit ID19 fielen die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel sowohl im KM als auch im PB nach Induktion I deutlich um zwei Log-Stufen ab. Jedoch konnten wir bereits unter der Therapie als auch im FUP nach ca. 18 Monaten einen erneuten Anstieg der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel um eine Log-Stufe beobachten.

Klinisch ergab sich im gesamten Verlauf kein Hinweis auf ein Rezidiv. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich vom Therapieende bis zu einem FUP von 31 Monaten, in welchem sich der Patient durchgehend in anhaltender CR befand (Abbildung 25).

Ähnlich stellte sich der Verlauf bei dem Patienten mit ID127 dar. Jedoch fielen bei diesem die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel im KM und PB nach Induktionstherapie nur unwesentlich und deutlich weniger als eine Log-Stufe ab, und persistierten im FUP auf einem ähnlichem Niveau. Auffällig präsentierte sich der Transkriptlevelverlauf der KM-Proben, der zum Zeitpunkt der Konsolidierungstherapie II bis über das Ausgangsniveau hin anstieg, jedoch wiederum deutlich unterhalb einer Log-Stufe lag. Hierbei zeigte er sich klinisch nicht von einem Rezidiv begleitet. Aufgrund von fehlenden Proben im FUP, konnte der Verlauf dieses Patienten nicht weiter verfolgt und beurteilt werden (Abbildung 26).

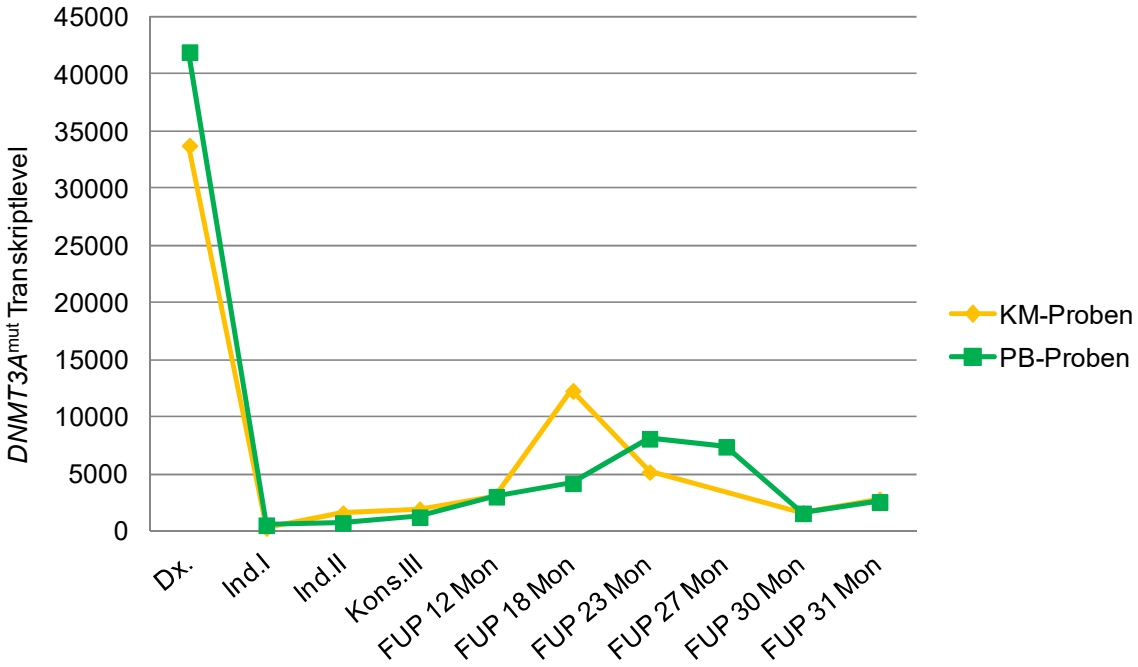

Abbildung 25: Darstellung des Verlaufes der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten (Diagnose, Induktion I/II, Konsolidierung III, Follow-up) bei einem Patienten ohne Rezidiv (ID19). Abgebildet sind die KM-Proben in gelb und die PB-Proben in grün.

Abkürzungen: KM = Knochenmark; PB = Peripheres Blut; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; Dx = Diagnose; Ind = Induktion; Kons = Konsolidierung; FUP = Follow-up; Mon = Monate

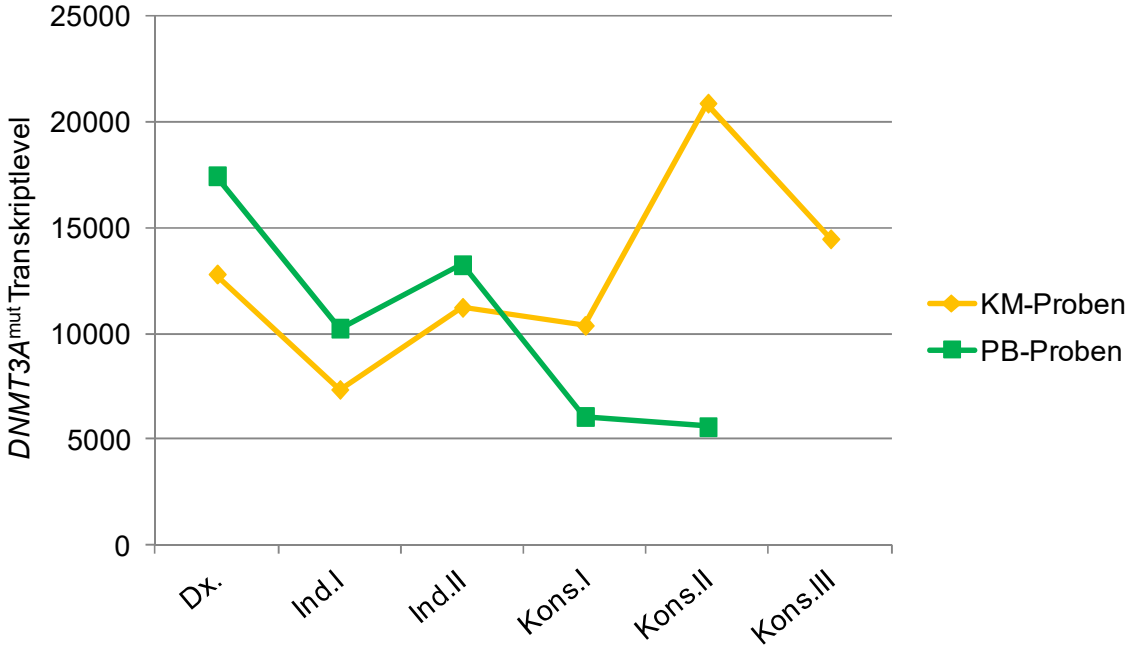

Abbildung 26: Darstellung des Verlaufes der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten (Diagnose, Induktion I/II, Konsolidierung I/II/III) bei einem Patienten ohne Rezidiv (ID127). Abgebildet sind die KM-Proben in gelb und die PB-Proben in grün.

Abkürzungen: KM = Knochenmark; PB = Peripheres Blut; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; Dx = Diagnose; Ind = Induktion; Kons = Konsolidierung

3.7.2 Patientenverläufe mit Rezidiv

Im Folgenden werden zwei Patienten mit Rezidiv und sehr unterschiedlichem Verlauf präsentiert. Beim ersten Patienten mit ID26 sanken die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel nach Induktion deutlich um zwei Log-Stufen ab und persistierten auf einem ähnlichen Niveau während der gesamten Therapie. Im FUP stiegen die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel wieder um ca. eineinhalb Log-Stufen an und erlangten im Rezidiv einen höheren Wert als zu Beginn der Therapie. Dies war sowohl für die KM- als auch für die PB-Proben zutreffend. Das FUP erstreckte sich über einen Zeitraum von 10 Monaten bis sich das Rezidiv ereignete (Abbildung 27).

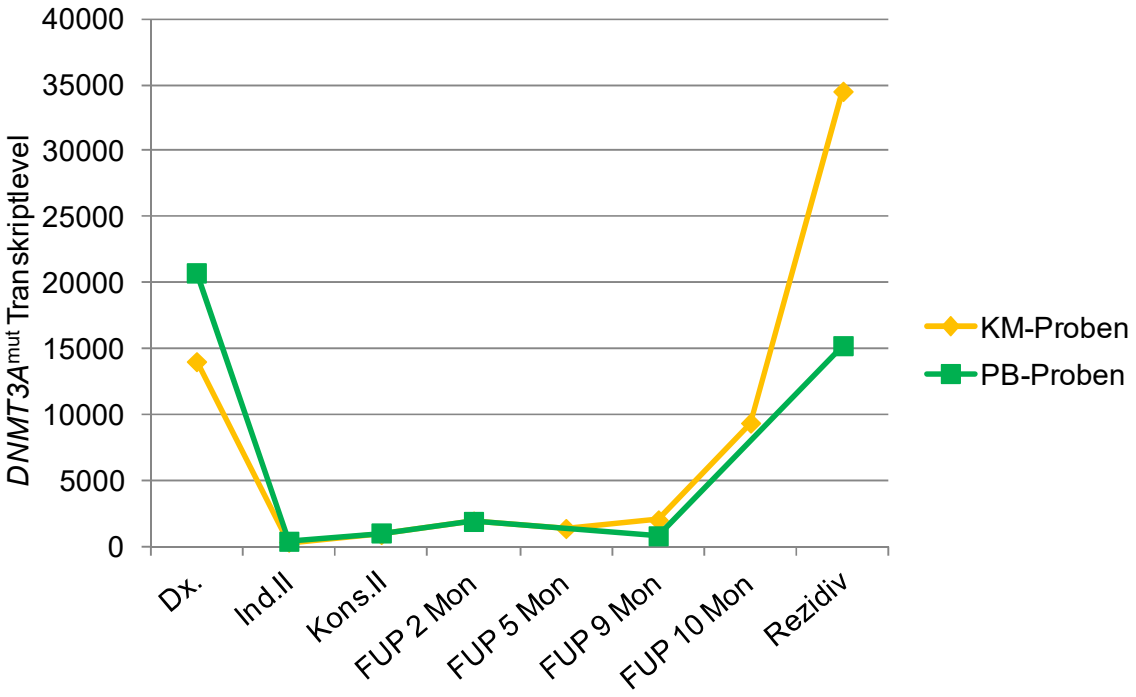

Abbildung 27: Darstellung des Verlaufes der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten (Diagnose, Induktion II, Konsolidierung II, Follow-up) sowie im Rezidiv bei einem Patienten (ID26). Abgebildet sind die KM-Proben in gelb und die PB-Proben in grün.

Abkürzungen: KM = Knochenmark; PB = Peripheres Blut; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; Dx = Diagnose; Ind = Induktion; Kons = Konsolidierung; FUP = Follow-up; Mon = Monate

Bei dem zweiten Rezidivpatienten (ID6073) sanken die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel nach Doppelinduktion ebenfalls stark um zwei Log-Stufen ab und blieben während der Therapie auf diesem niedrigen Niveau. Auch im FUP persistierte das niedrige *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevelniveau; im Rezidiv kam es dann zu einem Anstieg der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel um wiederum eine Log-Stufe. Bis zum Auftreten des Rezidivs vergingen fünf Monate. Bei diesem Patienten ließen sich die KM-Proben nicht zur Analyse verwerten, da keine Probe vom Diagnosezeitpunkt vorhanden war (Abbildung 28).

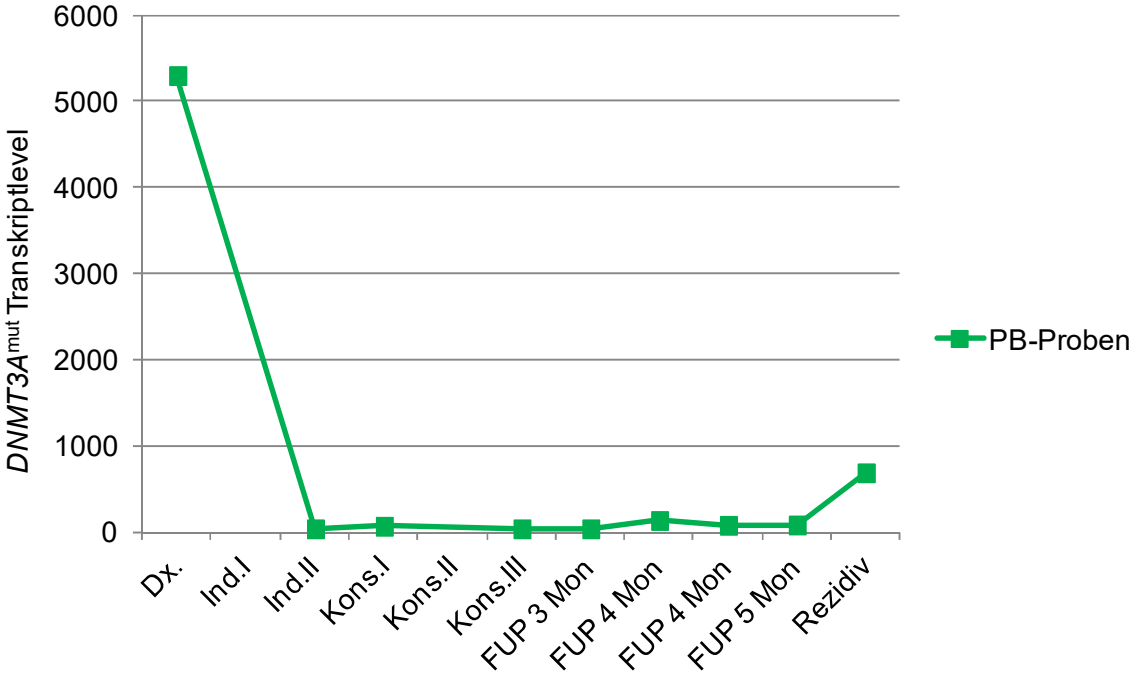

Abbildung 28: Darstellung des Verlaufes der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten (Diagnose, Induktion I/II, Konsolidierung I/II/III, Follow-up) sowie im Rezidiv bei einem Patienten (ID6073). Abgebildet sind die PB-Proben in grün.

Abkürzungen: PB = Peripheres Blut; *DNMT3A*^{mut} = Mutation in *DNA Methyltransferase 3A*; Dx = Diagnose; Ind = Induktion; Kons = Konsolidierung; FUP = Follow-up; Mon = Monate

4. Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die prognostische Wertigkeit von *DNMT3A*^{mut} als potenziell neuer Marker für das MRD-Monitoring bei Patienten mit AML anhand eines großen Patientenkollektives aus den Studien AMLSG 09-09, AMLSG 07-04 und AML HD98A evaluiert.

Die Messung der MRD bei AML-Patienten stellt eine sehr sensitive und spezifische Möglichkeit dar, anhand derer die Risikostratifizierung der Patienten verbessert werden kann. Das Ziel ist es, Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko oder einem beginnenden Rezidiv frühzeitig zu identifizieren und einer präemptiven Therapie zuzuführen. Für die MRD-Analysen ist es notwendig dem Patienten sowohl während, als auch nach der Therapie im Follow-up KM und/oder PB zu entnehmen.

Etabliert ist das MRD-Monitoring bisher hauptsächlich in Form der präemptiven Therapie für *PML-RARA* bei der APL (Grimwade et al. 2009; Haferlach et al. 2015) sowie bei weiteren Fusionstranskripten wie *RUNX1-RUNX1T1* und *CBFB-MYH11* bei den CBF-Leukämien (Corbacioglu et al. 2010). Die Studie von Jourdan und Kollegen randomisierte 198 CBF-AML-Patienten in Gruppen, die einerseits eine intensivierte und andererseits eine Standardinduktionstherapie erhielten. Zum Diagnosezeitpunkt wurden Risikofaktoren wie WBC, *KIT*, *FLT3*-ITD oder -TKD sowie *N/KRAS* bestimmt. Anschließend erfolgte während der Therapie ein kontinuierliches MRD-Monitoring von *RUNX1-RUNX1T1* oder *CBFB-MYH11* mittels RQ-PCR. Dabei stellte die MRD den einzigen prognostisch entscheidenden Faktor dar, wodurch verdeutlicht wird, welche Wertigkeit dieses Verfahren haben kann (Jourdan et al. 2013).

In den letzten Jahren konnten mehrere Arbeitsgruppen den prognostischen Stellenwert ebenfalls für das MRD-Monitoring der *NPM1*^{mut} zeigen (Schnittger et al. 2009; Krönke et al. 2011; Ivey et al. 2016). Die Schwierigkeit bezüglich des MRD-Monitorings bei der AML besteht jedoch eben in dieser Heterogenität der Erkrankung, die mit einer Vielzahl an Mutationen und Fusionstranskripten einhergeht; zudem wurden aufgrund der unterschiedlich verwendeten Assays verschiedene Schwellenwerte in den jeweiligen Studien definiert, sodass eine Übertragung dieser Schwellenwerte auf alle Patienten nicht möglich ist.

Eine weitere mögliche Zielstruktur, welche in das MRD-Monitoring bei AML-Patienten aufgenommen werden könnte, stellt *DNMT3A*^{mut} dar. Diese Mutation ist in ca. 21% aller AML-Patienten und ca. 34% der CN-AML-Fälle vorhanden (Gaidzik et al. 2013), wobei etwa zwei Drittel der Mutationen an dem sog. *hot spot* *DNMT3A*^{mut}-R882 liegen. Hinsichtlich der Prognose scheint *DNMT3A*^{mut} in den meisten Studien mit einer ungünstigen Prognose assoziiert zu sein (Ley et al. 2010; Thol et al. 2011; Renneville et al. 2012; Marková et al. 2012). Weitere Daten zeigten jedoch keine negativen Auswirkungen auf das Überleben mit Ausnahme von CN-AML-Patienten mit ungünstigem molekularen Risikoprofil gemäß ELN (Nomdedéu et al. 2012; Gaidzik et al. 2013). Vor diesem Hintergrund könnte *DNMT3A*^{mut} einen geeigneten MRD-Marker darstellen.

Zudem wird *DNMT3A*^{mut} als Gründermutation diskutiert, da es als präleukämisches Ereignis in HSCs bei AML-Patienten gefunden wurde. Diese präleukämischen HSCs wurden sowohl bei Diagnose als auch im Rezidiv detektiert und scheinen somit eine ausgesprochene Stabilität aufzuweisen (Jan et al. 2012; Krönke et al. 2013; Corces-Zimmermann et al. 2014; Shlush et al. 2014). Diese Stabilität könnte auf der anderen Seite einen kritischen Punkt im Hinblick auf ein mögliches MRD-Monitoring darstellen, der durch eine erste MRD-Studie unterstrichen wird, in der *DNMT3A*^{mut} in Remission persistierte, wohingegen alle anderen Ko-Mutationen unter der Therapie nicht mehr detektierbar waren (Pløen et al. 2014).

4.1 *DNMT3A*^{mut} für das MRD-Monitoring: Vergleich der Methodik

Aufgrund der hohen Mutationsinzidenz sowie des homogenen Mutationsmusters ergab sich die Fragestellung, ob *DNMT3A*^{mut} als molekularer Marker für das MRD-Monitoring geeignet ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Proben aus Patientenkollektiven dreier Studien AMLSG 09-09, AML HD98A und AMLSG 07-04 verwendet und insgesamt 159 Patienten im Hinblick auf das Monitoring von *DNMT3A*^{mut} untersucht und ausgewertet.

Unsere Assays zeigten für dieses Mutationsmuster entsprechend der Vorgaben für MRD-Monitoring eine Sensitivität von 10^{-4}. Im Vergleich dazu wurden in Studien zur Kinetik von *NPM1*^{mut} beim MRD-Monitoring etwas höhere Werte erreicht. Papadaki und Kollegen erzielten bei ihren Assays mit *NPM1* und *ABL1*

eine maximale Sensitivität von 10^{-5} (Papadaki et al. 2009). Bei Schnittger und Kollegen konnte ebenfalls eine Sensitivität bis zu 10^{-5}, in Abhängigkeit des individuellen Mutationslevels, der Probenqualität und der Spezifität des Assays, erreicht werden (Schnittger et al. 2009). Krönke und Kollegen erzielten in ihrer Studie für die *NPM1* Mutationstypen A, B und D eine Sensitivität von 10^{-6} (Krönke et al. 2011).

Für die MRD-Untersuchung wurde zunächst mRNA aus mononukleären KM/PB-Zellen isoliert, um im Anschluss cDNA für die MRD-Messung zu verwenden. Auch wir verwendeten in unseren Analysen die Methode der RQ-PCR mit RNA. Im Gegensatz zum MRD-Monitoring durch die MFC weist die RQ-PCR den Vorteil auf, dass die Verwendung eines Haushaltsgenes für den Expressionsvergleich zum einen sehr einfach ist und zum anderen für jeden Assay eine individuelle Sensitivität erlaubt (Kern et al. 2008). Dafür hat sich *ABL1* als besonders geeignet herausgestellt; es können jedoch auch *β2-Mikroglobulin* und *GUS* (*β-Glucuronidase*) verwendet werden (Weisser et al. 2004).

Vorteile der RQ-PCR sind die gute Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Laboren, die Möglichkeit durch die Analyse eines der o.g. Haushaltsgene gleichzeitig zur PCR-Kontrolle quantifizieren zu können und die relativ hohe Sensitivität, die erreicht werden kann (Grimwade et Freeman. 2014).

Neuere Methoden zur MRD-Messung stellen NGS-basierte Verfahren sowie die digitale PCR dar. NGS bietet die Möglichkeit, die komplexe Heterogenität der AML mit einer Analyse zu erfassen (Grimwade et Freeman. 2014). Erstmalig wurde das NGS bei 80 Patienten mit *FLT3*-ITD und *NPM1* Mutationen von Thol und Kollegen angewendet. Hinsichtlich der *FLT3*-ITD war es nun möglich in einer einzigen Messung die Allelrate von verschiedenen Klonen, sowie die Insertionsstelle, Insertionslänge und -sequenz zu bestimmen. Bei *NPM1*^{mut} zeigten sich die Transkriptlevel vom NGS und von der RQ-PCR in 95% der 38 analysierten Proben konkordant (Thol et al. 2012). Auch für *RUNX1* konnte in einer weiteren Studie die Eignung der NGS-Technik für die MRD bestätigt werden (Kohlmann et al. 2014). Des Weiteren zeigte eine andere Studie, die das MRD-Monitoring mittels NGS an 31 AML-Patienten mit *IDH1/2* oder *DNMT3A* Mutation testete, eine gute Eignung der *IDH1/2*^{mut} für die MRD.

Die ddPCR stellt eine neue vielversprechende Methode dar, die ebenfalls für das MRD-Monitoring verwendet werden kann. Wie bereits in 1.3.3 beschrieben, konnten Brambati und Kollegen zeigen, dass die ddPCR sich als verlässlich erwiesen hat, *DNMT3A*^{mut} und *IDH1/2*^{mut} Transkriptlevel im FUP und Rezidiv messen zu können (Brambati et al. 2016).

4.2 Unterschied zwischen PB- und KM-Proben

Als erstes verglichen wir in unserer Arbeit die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel zwischen KM und PB mit der Frage, ob beide Materialien die gleiche Aussagekraft hinsichtlich der MRD besitzen. In unseren Ergebnissen zeigten sich nach Induktion I, Konsolidierung I und II (p=0.01; p=0.0003; p=0.01) im Vergleich signifikant höhere *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel in den KM- als in den PB-Proben. Für das Fusionsgen *PML-RARA* wurden 140 zusammengehörige KM- und PB-Proben von 123 Patienten in einer Studie untersucht, wobei mittels RQ-PCR Patienten mit hohem Rezidivrisiko identifiziert wurden und man für KM- und PB-Proben vergleichbar hohe Sensitivitäten messen konnte (Gallagher et al. 2003). Für die CBF-Leukämien, nämlich inv(16) (Yin et al. 2012) und t(8;21) (Leroy et al. 2005; Yin et al. 2012) konnten bisher ebenfalls für KM- und PB-Proben vergleichbar hohe Sensitivitäten gemessen werden, wobei dies in der Studie von Yin und Kollegen nur für das FUP galt, wohingegen die KM-Proben dem PB während der Therapie überlegen waren. Sie sprachen sich daher dafür aus, das MRD-Monitoring mit KM- und PB-Proben durchzuführen, um das Risiko eines nicht detektierten Rezidivs zu minimieren.

Die Studie von Corbacioglu und Kollegen untersuchte die Eignung von *CBFB-MYH11*-positiver AML hinsichtlich der prognostischen Wertigkeit der MRD anhand 198 gepaarter KM- und PB-Proben von 53 Patienten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sich die KM-Proben während der Therapie sensitiver zeigten als die PB-Proben. Hingegen ergab sich während des FUP eine gleichwertige Sensitivität. Das heißt auch hier stellten PB-Proben zum Kontrollmonitoring eine gute Alternative zu den KM-Proben dar (Corbacioglu et al. 2010).

Zum ähnlichen Resultat kamen Krönke und Kollegen in ihrer Studie, in der sie den prognostischen Stellenwert der MRD-Diagnostik von *NPM1*^{mut} Patienten evaluierten. Sie verglichen die Transkriptlevel von 410 zusammengehörigen PB-

und KM-Proben von 245 Patienten. Während der Therapie zeigten sich 46% der negativen PB-Proben im KM positiv, wohingegen der Anteil an identischen Ergebnissen im FUP mit 88% deutlich anstieg (Krönke et al. 2011).

4.3 Korrelation der Transkriptlevel zu den Therapiezeitpunkten

Als nächstes untersuchten wir die Korrelation der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel zu den verschiedenen Zeitpunkten wie Diagnose, nach Doppelinduktion und nach Therapieende in Bezug auf die Endpunkte OS und Remissionsdauer; dies erfolgte durch Analyse der Log10-Reduktion, der RQ-PCR-Positivität bzw. RQ-PCR-Negativität und anhand von Quartilen. Zu keinem der genannten Zeitpunkte konnten wir eine signifikante Assoziation mit den klinischen Endpunkten ermitteln.
Interessanterweise war nur die Minderheit der KM- und PB-Proben nach Doppelinduktion (7/75 im KM, 9/88 in KM und PB) bzw. nach Therapieende (4/63 im KM, 4/75 in KM und PB) RQ-PCR-negativ. Dafür könnten verschiedene Ursachen verantwortlich sein. Zum einen könnten diese Patienten besser auf die Therapie angesprochen haben, dies möglicherweise in Abhängigkeit des individuellen Genotyps oder auch weil die immunologischen Voraussetzungen dieser Patienten entsprechend gegeben waren. Zum anderen könnte auch die Durchführung einer HSCT eine Rolle spielen, durch deren Intensität der maligne Klon eradiziert werden konnte.
In einer aktuelleren Arbeit von Brambati und Kollegen untersuchten diese den Stellenwert von *DNMT3A* und *IDH1/2* Mutationen bei AML-Patienten mittels ddPCR. Insgesamt wurden 89 Patienten untersucht, von denen 16 Patienten eine *DNMT3A*^{mut} und 18 eine *IDH*^{mut} trugen. 17 Patienten erhielten eine allogene HSCT. Interessanterweise waren in 13 von 14 Patienten mit Rezidiv nach allogener HSCT beide Mutationen nachweisbar, was die hohe Stabilität dieser Mutationen unterstreicht. Des Weiteren wurden Proben von 17 Patienten mittels ddPCR untersucht, welche longitudinal während des FUP gesammelt wurden. Neun der 17 Patienten erlitten ein Rezidiv; die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel konnten in 7 von 9 Patienten detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch das dazugehörige KM in morphologischer Remission (Brambati et al. 2016).
In einer Studie der französischen ALFA Gruppe untersuchten Debarri und Kollegen 31 AML-Patienten mit *NPM1*^{mut}, welche in 15 Patienten gleichzeitig eine

DNMT3A Mutation aufwiesen, mit Hilfe NGS. 18 Patienten trugen eine *IDH* Mutation. Die MRD-Level wurden zu folgenden Zeitpunkten evaluiert: nach Induktion, nach erster und zweiter Konsolidierungstherapie sowie im FUP. Zwischen den *NPM1*^{mut} und *IDH1/2*^{mut} sowie zwischen den *NPM1*^{mut} und *DNMT3A*^{mut} Transkriptleveln zeigte sich für beide eine hohe Korrelation ($p<0.0001$). Von den 15 *DNMT3A*^{mut} Patienten wurden in neun der Fälle konkordante MRD-Ergebnisse zwischen den *DNMT3A*^{mut} und den *NPM1*^{mut} Transkriptleveln gefunden. Acht dieser neun Patienten zeigten sich positiv für beide genannten Mutationen und rezidivierten, wohingegen ein Patient, der sich konstant in CR befand, negativ für beide Mutationen blieb. In den sechs diskonkordanten Fällen blieb *NPM1*^{mut} zumeist negativ, wohingegen *DNMT3A*^{mut} im FUP persistierte. Interessanterweise wurden bei drei dieser Patienten Zellsubpopulationen untersucht, wobei *DNMT3A*^{mut} nicht in Hautzellen und in CD^{3+}-T-Lymphozyten nachzuweisen war. Hingegen konnte es in den meisten Blutzellen detektiert werden (Debarri et al. 2015).

NPM1^{mut} wurde hinsichtlich des MRD-Status ebenfalls von der Studiengruppe um Ivey untersucht. Bei 15% von 346 Patienten, die positiv auf diese Mutation getestet wurden, persistierten die *NPM1*^{mut} Transkriptlevel nach dem zweiten Chemotherapiezyklus und zeigten im Verlauf ein erhöhtes Rezidivrisiko. Bei Patienten, die durch die Therapie MRD-negativ geworden waren, konnten Rezidive sehr gut durch steigende Transkriptlevel detektiert werden. In 69 von 70 Patienten konnten *NPM1* Mutationen im Rezidiv nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurden die Proben auf weitere Mutationen untersucht. Hierbei kam man zu der Erkenntnis, dass die verwendeten Chemotherapien wirkungsvoll den *NPM1* Klon eradizieren konnten, denn nur in 15% der Fälle persistierte *NPM1*^{mut} bis nach dem zweiten Chemotherapiezyklus. Dagegen zeigten sich koexistierende *DNMT3A* Mutationen, v.a. R882H, resistent gegenüber der Chemotherapie (24 von 24 Patienten) und ließen sich nur durch eine HSCT eliminieren (8 von 9 Patienten) (Ivey et al. 2016).

4.4 Präleukämische Mutationen und klonale Hämatopoese

Unsere Daten hinsichtlich der Persistenz von *DNMT3A*^{mut} in der Mehrheit der Patienten, insbesondere Patienten in klinischer Remission, zeigen sich

übereinstimmend mit den publizierten Studien. Eine Studie, die die These von *DNMT3A*^{mut} als präleukämisches Ereignis untersucht hat, stammt von Pløen und Kollegen. Sie sequenzierten das Genom von 298 AML-Patienten und fanden *DNMT3A*^{mut} in 15% der Fälle, mit und auch ohne *NPM1*, *FLT3* und *IDH1* Mutationen. Die Allelfrequenz wies dabei keine Korrelation zum klinischen Verlauf der Erkrankung auf. *DNMT3A*^{mut} wurde neben den leukämischen Blasten ebenfalls in einer geringeren Allelfrequenz in T- und B-Zellen derselben Patienten gefunden. *DNMT3A*^{mut} wies über den Verlauf zum einen wiederum eine deutliche Stabilität auf, indem es bei 12 von 13 Patienten auch im Rezidiv oder einem sekundären MDS vorhanden war und zum anderen persistierte es bei 14 Patienten in CR, die bis auf *DNMT3A*^{mut} alle anderen Ko-Mutationen verloren hatten. Das heißt, auch bei Patienten, die durch eine HSCT geheilt worden waren, konnte noch *DNMT3A*^{mut} nachgewiesen werden (Pløen et al. 2014).

Auf der einen Seite stellt somit die Stabilität von *DNMT3A*^{mut} eine ausgesprochen günstige Eigenschaft für die Anwendbarkeit als Marker für das MRD-Monitoring dar; auf der anderen Seite genügen diese Eigenschaften nicht, wenn die Transkriptlevel nicht ausreichend mit dem Krankheitsstatus korrelieren (Pløen et al. 2014).

Neben der Rolle, die *DNMT3A*^{mut} bei den präleukämischen Mutationen einnimmt, scheint es ebenfalls an der klonalen Hämatopoese mitbeteiligt zu sein. Nach der Theorie der klonalen Hypothese, liegt den verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen eine erworbene Mutation in den Stammzellen des Knochenmarks zugrunde. Dabei kann das Aktivitätslevel eines oder mehrerer Gene durch die Mutation so verändert werden, dass ein Subklon entsteht, der wiederum andere Klone im Blut verdrängen kann. Die klonale Hämatopoese ist im Alter ein normaler Prozess, der das Risiko für Leukämien und Lymphome erhöht und die zugrunde liegenden Mutationen damit als Ursache dieser Krankheitsentstehung diskutiert werden können.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Modelle zur Leukämogenese vorgestellt, wovon jedoch die meisten auf einem ähnlichen Prinzip beruhen. In der Studie von Jan und Kollegen untersuchte man sechs Patienten mit *de novo* AML umfassend mittels Exomsequenzierung und Einzelzellanalyse. In fünf der sechs Patienten konnte *FLT3*-ITD gefunden und als sekundäre Mutation identifiziert

werden. 32 von 51 Mutationen, die bei diesen fünf Patienten gefunden wurden, waren ebenfalls in residuellen HSCs vorhanden. Sieben von 13 Mutationen zeigten sich des Weiteren in den Stammzellen präsent, ohne dass gleichzeitig eine *FLT3*-ITD vorhanden war. Insgesamt wird hierbei ein Modell präsentiert, in dem Mutationen und/oder epigenetische Ereignisse in selbsterneuerbaren HSCs akkumulieren bis es aufgrund der Mutationen zur klonalen Vermehrung einer leukämischen Vorläuferzelle kommt (Jan et al. 2012).

In einer Folgestudie wurden die Ergebnisse dieser 6 Patienten mit 10 weiteren Patienten, die ebenfalls der Exomsequenzierung und Einzelzellanalyse unterzogen wurden, zusammengefasst und hieraus ein umfassenderes Modell zur Leukämogenese entwickelt. Hierbei geht man ebenfalls von der Akkumulation von Mutationen aus, wobei zunächst präleukämische Mutationen wie *DNMT3A*, *IDH1/2*, *ASXL1* und *CBFB-MYH11* existent sind und sekundär dann späte Mutationen, wie *NPM1*, *IDH1/2*, *DNMT3A*, *FLT3* oder *KRAS/NRAS*, entstehen. Die präleukämischen Mutationen betreffen sog. *landscaping* Gene, die z.B. für die DNA-Methylierung oder Histonmodifikation zuständig sind, wohingegen späte Mutationen eher in proliferativen Genen, wie z.B. für die Signalaktivierung, entstehen. Die Besonderheit der präleukämischen Mutationen stellt ihre Persistenz während der CR dar. Insbesondere Patienten mit einer hohen Last an präleukämischen hämatopoetischen HSCs zeigten diese ebenfalls während der Remission, sodass davon auszugehen ist, dass sich diese Zellen durch die Chemotherapie nicht beeinflussen lassen. Hinsichtlich der Ursache von Rezidiven besteht die Theorie, dass die Leukämie erneut aus eben diesen Zellen hervorgeht. Das MRD-Monitoring könnte in diesen Fällen eingesetzt werden um mit Hilfe neuer Therapien, die sich direkt gegen diese präleukämischen HSCs richten, das OS der AML zu verbessern (Corces-Zimmerman et al. 2014).

In einer weiteren Studie kamen Shlush und Kollegen zu dem Ergebnis, dass die Entstehung der AML durch eine *DNMT3A* Mutation einer hämatopoetischen Stammzelle bedingt ist, die zur Entwicklung eines Stammzellpools mit vielen klonalen Vorläuferzellen führt und die zusätzliche Akquisition von Mutationen wie *NPM1*^{mut} zur endgültigen Initiierung der AML führt. Sie separierten nichtleukämische Stammzellen und analysierten die Allelfrequenzen der Mutationen. *DNMT3A*^{mut} wurde dabei als eine der frühesten Mutationen in

präleukämischen HSCs entdeckt und auch *IDH*^{mut} konnte den frühen Ereignissen der Leukämogenese zugeordnet werden. Des Weiteren kamen sie zu der Erkenntnis, dass präleukämische HSCs einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen aufweisen und resistent gegenüber der Induktionschemotherapie zu sein scheinen. Bei manchen Patienten könnte diese Persistenz während der CR der Auslöser für ein Rezidiv sein (Shlush et al. 2014).

Darüber hinaus konnte in zwei weiteren nahezu zeitgleich veröffentlichten Studien die klonale Hämatopoese insbesondere für *DNMT3A*^{mut}, *TET2*^{mut} und *ASXL1*^{mut} gezeigt werden (Genovese et al. 2014; Jaiswal et al. 2014). In beiden Arbeiten wurde DNA aus peripheren Blutproben von gesunden Probanden aller Altersgruppen mittels *whole-exome sequencing* auf somatische Mutationen hin untersucht und der klinische Verlauf verfolgt. Neben der Tatsache, dass diese Mutationen als früheste Ereignisse der Leukämogenese diskutiert werden, stellten sie in diesen Studien mit ca. 10% die häufigsten Mutationen bei den über 65-jährigen dar, obwohl keine hämatologische Erkrankung bekannt war. Im Gegensatz dazu lag die Frequenz bei den unter 50-jährigen bei gerade einmal 1%. Bereits in einer anderen Studie konnte die Existenz von leukämieassoziierten Mutationen, wie z.B. in *DNMT3A*, *TET2* und *ASXL1*, bei 2% von gesunden Personen belegt werden, wobei dieser Anteil bei den über 70-jährigen auf 5 bis 6% anstieg (Xie et al. 2014). Die Gruppe um Jaiswal untersuchte die DNA von über 17.000 Personen auf 160 verschiedene Gene. Von diesen Genen waren am häufigsten die o.g. mutiert, wobei der Anteil der somatischen Mutationen mit steigendem Alter zunahm. Von den 60- bis 69-Jährigen wiesen 5,6%, bei den 70- bis 79-Jährigen 9,5%, bei den 80- bis 89-Jährigen 11,7% und bei den über 90-Jährigen 18,4% mindestens eine Mutation auf. Vor dem 40. Lebensjahr war höchst selten eine Mutation nachweisbar (Jaiswal et al. 2014). Zu sehr ähnlichen Ergebnissen kam die Studiengruppe um Genovese, die die klonale Hämatopoese ebenfalls als Risikofaktor für maligne hämatopoetische Erkrankungen sowie für eine erhöhte Mortalität herausstellten.

Inwiefern diese Ergebnisse Einfluss auf den klinischen Alltag haben werden, ist bislang noch ungewiss. Mit einem Anteil von 10% ist die klonale Hämatopoese bei einer bedeutsamen Anzahl der älteren Personen vorhanden und auch das Risiko,

einer Konversion der Klonalität in eine maligne Bluterkrankung, stellt sich mit 1% pro Jahr hoch dar (Genovese et al. 2014).

4.5 Schlussfolgerung

In der hier vorliegenden Arbeit über die Bedeutung des MRD-Monitorings von *DNMT3A* Mutationen bei Patienten mit AML konnten wir keinen signifikanten Einfluss der Transkriptlevel auf verschiedene klinische Endpunkte nach Doppelinduktion bzw. nach Ende der Therapie feststellen. Auch konnten wir keinen Einfluss der Transkriptlevel zu den o.g. Endpunkten nach Doppelinduktion oder nach Therapieende ermitteln. Die unterschiedlichen Analyseverfahren als Log10-transformierte Variable, dem RQ-PCR-Status, als auch die Untersuchung in Quartilen ergaben keine Korrelation.

Interessanterweise persistierten die *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel bei der Mehrheit der Patienten (n=71/75) und nur wenige Patienten wurden unter intensiver Therapie *DNMT3A*^{mut} negativ. Hinsichtlich der unterschiedlichen Effektivität zwischen Chemotherapie, allogener und autologer HSCT wurde bei der Analyse aufgrund der geringen Fallzahlen keine spezifische Auswertung vorgenommen. Die Persistenz der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel bei AML-Patienten in CR ist übereinstimmend mit anderen Publikationen (Krönke et al. 2013; Pløen et al. 2014; Jeziskova et al. 2015; Berenstein et al. 2015) und unterstützt das Konzept der klonalen Hämatopoese.

Eine mögliche Ursache der Persistenz wäre die Resistenzentwicklung von *DNMT3A*^{mut} gegenüber den standardmäßig eingesetzten Chemotherapeutika. Die Resistenz könnte auf der einen Seite von Beginn an bestehen (Xie et al. 2014; Genovese et al. 2014; Jaiswal et al. 2014) oder sie könnte sich auf der anderen Seite im Laufe der Leukämogenese bzw. im Therapieverlauf entwickeln. Im Zuge der Forschungen zur genotypbasierten Therapie der letzten Jahre wurden, wie bereits beschrieben, auch demethylierende Substanzen, wie Azacitidin und Decitabine, getestet (Dombret et al. 2015; Grishina et al. 2015; Kadia et al. 2015). Diese Studien lieferten bezüglich *DNMT3A*^{mut} leider keine eindeutigen Ergebnisse (DiNardo et al. 2014) und nur eine Studie konnte einen signifikanten Einfluss auf das Überleben älterer Patienten nachweisen (Kadia et al. 2015). Damit sollte ein

Ziel zukünftiger Studien in der weiteren Erforschung zielgerichteter Therapien liegen.

Diese Daten stehen in Einklang mit den kürzlichen Ergebnissen der klonalen Hämatopoese, wonach *DNMT3A*^{mut} neben *TET2*^{mut} und *ASXL1*^{mut} bei 10% der über 65-jährigen gesunden Allgemeinbevölkerung vorliegt (Genovese et al. 2014; Jaiswal et al. 2014).

Die Ergebnisse unserer Arbeit deuten schlussendlich darauf hin, dass *DNMT3A*^{mut} keinen geeigneten Marker zum Monitoring des klinischen Verlaufes darstellt. Allerdings zeigen die Ergebnisse anderer Studien, dass das *DNMT3A*^{mut} Monitoring bei Patienten, die die entsprechenden Voraussetzungen für eine allogene HSCT mitbringen und erhalten (Xu et al. 2015), als anschließende Therapie- und Verlaufskontrolle angewendet werden könnte. Durch die Stammzelltransplantation werden die leukämischen Klone eradiziert und im besten Fall eine physiologische Hämatopoese erreicht (Brambati et al. 2016). Auch in einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass sich R882H-Mutationen in *DNMT3A* nur durch eine HSCT eliminieren ließen. Eine Standardchemotherapie führte zwar zu einer effektiven Eradikation des *NPM1* Klons, *DNMT3A*^{mut} zeigte sich gegenüber dieser Therapie jedoch resistent (Ivey et al. 2016). Des Weiteren wurden *DNMT3A* Mutationen bei Patienten in Langzeitremission gefunden, darauf hindeutend, dass die Eradikation von *DNMT3A*^{mut} nicht zwangsläufig für die Heilung einer AML erforderlich ist (Pløen et al. 2014).

Weitere Untersuchungen von *DNMT3A*^{mut} und seinen Ko-Mutationen werden somit notwendig sein, um diesbezüglich zu einem endgültigen Ergebnis kommen zu können.

Ein Teil der Ergebnisse meiner Arbeit stellte die Grundlage für eine groß angelegte Studie zur Evaluation des MRD-Monitorings bei AML-Patienten mit *DNMT3A*-Mutation dar. In dieser groß angelegten Studie mit insgesamt 181 *DNMT3A*-mutierten Patienten konnten die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigt werden. Unter dem Titel „*DNMT3A mutant transcript levels persist in remission and do not predict outcome in patients with acute myeloid leukemia*“ wurde die Studie in der international renommierten Fachzeitschrift *Leukemia* publiziert, wobei ich Co-Autorin dieser Publikation bin.

5. Zusammenfassung

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine klonale heterogene hämatologische Erkrankung mit einer Vielzahl an genetischen Alterationen, deren genauer Pathomechanismus weiterhin geklärt werden muss. Am häufigsten finden sich die Mutationen in den Genen *NPM1*, *FLT3* und *DNMT3A*.

Das Erreichen einer kompletten Remission (CR) ist dabei eine Voraussetzung für die vollständige Genesung und bildet die Grundlage für eine gute Prognose. Daher ist es von großem Interesse diese Rückfälle frühzeitig diagnostizieren und therapieren zu können. Hierfür hat sich seit einigen Jahren die Messung der minimalen Resterkrankung (MRD) als sehr geeignet erwiesen. Häufig werden dabei die Transkriptlevel eines mutierten Gens in Relation zu einem Haushaltsgen bestimmt. Die Bedeutung der MRD konnte in verschiedenen Studien für die Fusionsgene *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11* sowie für *NPM1*^{mut} eindrucksvoll belegt werden; insbesondere im Hinblick auf die frühe Erkennung eines möglichen Rezidivs.

In dieser Arbeit sollte die MRD-Messung für *DNMT3A*^{mut} evaluiert werden. Das Patientenkollektiv stammte aus den Studien AMLSG 09-09, AMLSG 07-04 sowie AML HD98A. Bei dem untersuchten Material handelte es sich um DNA und RNA, die aus Blut- (PB) und Knochenmarkproben (KM) gewonnen wurden. Die DNA wurde auf mögliche *DNMT3A*^{mut} sequenziert und so Patienten mit einer R882C- oder R882H-Mutation identifiziert. Im Folgenden wurden mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR (RQ-PCR) die Transkriptlevel zu den verschiedenen Zeitpunkten wie Diagnose, während der Therapie (Induktion I/II, Konsolidierung I/II) sowie nach Therapieende und im FUP untersucht. Hier konnten wir keine signifikante Korrelation der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel zum Zeitpunkt Diagnose mit den klinischen Charakteristika nachweisen. Ebenso wurden die Transkriptlevel zu den verschiedenen Zeitpunkten mit klinischen Endpunkten wie dem Gesamtüberleben (OS) und der Remissionsdauer korreliert. Dabei erfolgte die Analyse des prognostischen Einflusses anhand mehrerer Methoden: der Log10-Reduktion, der Differenzierung zwischen RQ-Positivität und -Negativität sowie mittels Quartilanalyse.

Untersuchte man die Korrelation der *DNMT3A*^{mut} Transkriptlevel in Bezug auf die Aussagekraft der MRD zwischen KM- und PB-Proben so fanden sich signifikant höhere Transkriptlevel in den KM- als in den PB-Proben nach Induktion I (p=0.01), Konsolidierung I (p=0.0003) und II (p=0.01). Bei der statistischen Auswertung ergab sich allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Transkriptlevel zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten in Bezug auf die klinischen Endpunkte.

Unsere Daten legen nahe, dass die *DNMT3A* Mutation nicht als klassischer MRD-Marker zum Therapiemonitoring geeignet ist. Interessanterweise überwiegte in der Mehrzahl der Fälle die Persistenz von *DNMT3A*^{mut}, unabhängig vom klinischen Verlauf der Patienten. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Resultaten anderer Studien, in denen *DNMT3A*^{mut} ebenfalls bei den meisten Fällen in CR persistierte und unterstützen darüber hinaus das Konzept der klonalen Hämatopoese. Hierbei geht man von präleukämischen Mutationen, wie z.B. von *DNMT3A*, *IDH1/2* oder *ASXL1*, in hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) aus, die schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt vor Ausbruch der Leukämie entstehen können und/oder die sich resistent gegenüber intensivierten Chemotherapien zeigen und auch in der CR persistieren. Neben den präleukämischen Mutationen führt schließlich die sukzessive Akkumulation von späten Mutationen, wie z.B. in *NPM1*, zur Initiierung der leukämischen Erkrankung. Einzig eine Stammzelltransplantation (HSCT) konnte bisher eine vollständige Eradikation des Leukämieklones herbeiführen. Daher scheint nach aktueller Studienlage die effektivste Einsatzmöglichkeit von *DNMT3A*^{mut} in der MRD-Diagnostik in Form des Therapiemonitorings nach allogener HSCT zu liegen. Hierfür konnte in anderen Studien ein signifikanter Nutzen der Transkriptlevelmessungen in Bezug auf den RQ-PCR-Status gezeigt werden.

In Zusammenschau der vorliegenden Daten können wir *DNMT3A*^{mut} nicht als klassischen MRD-Marker in der Routinediagnostik empfehlen, da er in einem Großteil der Fälle persistierte. Möglicherweise könnten durch serielle Untersuchungen von *DNMT3A*^{mut} und der Ko-Mutationen zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten weitere Einblicke in die klonale Evolution der AML gewonnen und somit Therapieoptionen entwickelt werden, welche die präleukämischen HSCs eradizieren können.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, Malinge S, Yao J, Kilpivaara O, Bhat R, Huberman K, Thomas S, Dolgalev I, Heguy A, Paietta E, Le Beau, Michelle M, Beran M, Tallman MS, Ebert BL, Kantarjian HM, Stone RM, Gilliland DG, Crispino JD, Levine RL: Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. Blood 114: 144–147 (2009)

2. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, Heguy A, Bueso-Ramos C, Kantarjian H, Levine RL, Verstovsek S: Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. Cancer Res 70: 447–452 (2010)

3. Agrawal M, Corbacioglu A, Paschka P, Weber D, Gaidzik VI, Jahn N, Kündgen A, Kindler T, Wattad MA, Lübbert M, Fiedler W, Götze K, Ringhoffer M, Schleicher J, Lange E, Held G, Griesshammer M, Greil R, Kirchen H, Koller E, Thol F, Krauter J, Heuser M, Ganser A, Bullinger L, Schlenk RF, Döhner H, Döhner K: Minimal Residual Disease Monitoring in Acute Myeloid Leukemia (AML) with Translocation t(8;21)(q22;q22): Results of the AML Study Group (AMLSG). ASH 58th Annual Meeting & Exposition Abstract 1207 (05.12.2016)

4. Albiero E, Madeo D, Bolli N, Giaretta I, Di Bona E, Martelli MF, Nicoletti I, Rodeghiero F, Falini B: Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 NPM1 mutation. Leukemia 21: 1099–1103 (2007)

5. Allen C, Hills RK, Lamb K, Evans C, Tinsley S, Sellar R, O'Brien M, Yin JL, Burnett AK, Linch DC, Gale RE: The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of KIT, FLT3 and CBL mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia. Leukemia 27: 1891–1901 (2013)

6. American Association for Cancer Research: Midostaurin Gets FDA Nod for AML. Cancer Discov (2017)

7. Araki D, Wood BL, Othus M, Radich JP, Halpern AB, Zhou Y, Mielcarek M, Estey EH, Appelbaum FR, Walter RB: Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Time to Move Toward a Minimal

Residual Disease-Based Definition of Complete Remission? J Clin Oncol 34: 329–336 (2016)

8. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau, Michelle M, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW: The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood (2016)
9. Bakst RL, Tallman MS, Douer D, Yahalom J: How I treat extramedullary acute myeloid leukemia. Blood 118: 3785–3793 (2011)
10. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden, V H J, Bi W, Dee R, van der Schoot, E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen, J J M, Hokland P, Gabert J: Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. Leukemia 17: 2474–2486 (2003)
11. Beitinjaneh A, Jang S, Roukoz H, Majhail NS: Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: a systematic review. Leuk Res 34: 831–836 (2010)
12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. BR J. Haematol 33: 451–458 (1976)
13. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med 103: 620–625 (1985)
14. Berenstein R, Blau IW, Suckert N, Baldus C, Pezzutto A, Dörken B, Blau O: Quantitative detection of DNMT3A R882H mutation in acute myeloid leukemia. J Exp Clin Cancer Res: CR 34: 55 (2015)
15. Bibault J, Figeac M, Hélevaut N, Rodriguez C, Quief S, Sebda S, Renneville A, Nibourel O, Rousselot P, Gruson B, Dombret H, Castaigne S, Preudhomme C: Next-generation sequencing of FLT3 internal tandem duplications for minimal

residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. Oncotarget 6: 22812–22821 (2015)

16. Brambati C, Galbiati S, Xue E, Toffalori C, Crucitti L, Greco R, Sala E, Crippa A, Chiesa L, Soriani N, Mazzi B, Tresoldi C, Stanghellini, Maria Teresa Lupo, Peccatori J, Carrabba MG, Bernardi M, Ferrari M, Lampasona V, Ciceri F, Vago L: Droplet digital polymerase chain reaction for DNMT3A and IDH1/2 mutations to improve early detection of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Haematologica 101: e157-61 (2016)

17. Bullinger L, Döhner K, Döhner H: Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. JCO 35: 934–946 (2017)

18. Burmeister T, Meyer C, Schwartz S, Hofmann J, Molkentin M, Kowarz E, Schneider B, Raff T, Reinhardt R, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E, Marschalek R: The MLL recombinome of adult CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results from the GMALL study group. Blood 113: 4011–4015 (2009)

19. Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, Bock C, Vasanthakumar A, Gu H, Xi Y, Liang S, Lu Y, Darlington GJ, Meissner A, Issa JJ, Godley LA, Li W, Goodell MA: Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. Nat Genet 44: 23–31 (2012)

20. Chou W, Huang H, Hou H, Chen C, Tang J, Yao M, Tsay W, Ko B, Wu S, Huang S, Hsu S, Chen Y, Huang Y, Chang Y, Lee F, Liu M, Liu C, Tseng M, Huang C, Tien H: Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. Blood 116: 4086–4094 (2010)

21. Chou W, Chou S, Liu C, Chen C, Hou H, Kuo Y, Lee M, Ko B, Tang J, Yao M, Tsay W, Wu S, Huang S, Hsu S, Chen Y, Chang Y, Kuo Y, Kuo K, Lee F, Liu M, Liu C, Tseng M, Huang C, Tien H: TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. Blood 118: 3803–3810 (2011)

22. Cloos J, Goemans BF, Hess CJ, van Oostveen, J. W., Waisfisz Q, Corthals S, Lange D de, Boeckx N, Hahlen K, Reinhardt D, Creutzig U, Schuurhuis GJ,

Zwaan CM, Kaspers, G J L: Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. Leukemia 20: 1217–1220 (2006)

23. Corbacioglu A, Scholl C, Schlenk RF, Eiwen K, Du J, Bullinger L, Fröhling S, Reimer P, Rummel M, Derigs H, Nachbaur D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Döhner K: Prognostic impact of minimal residual disease in CBFB-MYH11-positive acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 28: 3724–3729 (2010)

24. Corces-Zimmerman MR, Hong W, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R: Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. PNAS 111: 2548–2553 (2014)

25. Dan C, Chi J, Wang L: Molecular mechanisms of the progression of myelodysplastic syndrome to secondary acute myeloid leukaemia and implication for therapy. Ann Intern Med 47: 209–217 (2015)

26. Debarri H, Lebon D, Roumier C, Cheok M, Marceau-Renaut A, Nibourel O, Geffroy S, Helevaut N, Rousselot P, Gruson B, Gardin C, Chretien M, Sebda S, Figeac M, Berthon C, Quesnel B, Boissel N, Castaigne S, Dombret H, Renneville A, Preudhomme C: IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association. Oncotarget 6: 42345–42353 (2015)

27. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic J, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguié F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA: Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med 360: 2289–2301 (2009)

28. Deschler B, Lübbert M: Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. Cancer 107: 2099–2107 (2006)

29. Dicker F, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S: Trisomy 13 is strongly associated with AML1/RUNX1 mutations and increased FLT3 expression in acute myeloid leukemia. Blood 110: 1308–1316 (2007)

30. DiNardo CD, Patel KP, Garcia-Manero G, Luthra R, Pierce S, Borthakur G, Jabbour E, Kadia T, Pemmaraju N, Konopleva M, Faderl S, Cortes J, Kantarjian HM, Ravandi F: Lack of association of IDH1, IDH2 and DNMT3A mutations with outcome in older patients with acute myeloid leukemia treated with hypomethylating agents. Leuk Lymphoma 55: 1925–1929 (2014)

31. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Lowenberg B, Bloomfield CD: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood 115: 453–474 (2010)

32. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD: Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 373: 1136–1152 (2015)

33. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien H, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD: Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood (2017)

34. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H: Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. Blood 106: 3740–3746 (2005)

35. Döhner K, Döhner H: Molecular characterization of acute myeloid leukemia. Haematologica 93: 976–982 (2008)

36. Döhner K, Paschka P: Intermediate-risk acute myeloid leukemia therapy: current and future. American Society of Hematology (2014)

37. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH, Kumar R, Cavenagh J, Schuh AC, Candoni A, Recher C, Sandhu I, Bernal del Castillo, T., Al-Ali HK, Martinelli G, Falantes J, Noppeney R, Stone RM, Minden

MD, McIntyre H, Songer S, Lucy LM, Beach CL, Dohner H: International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. Blood 126: 291–299 (2015)

38. Esteve J, Escoda L, Martín G, Rubio V, Díaz-Mediavilla J, González M, Rivas C, Alvarez C, González San Miguel, J D, Brunet S, Tomás JF, Tormo M, Sayas MJ, Sánchez Godoy P, Colomer D, Bolufer P, Sanz MA: Outcome of patients with acute promyelocytic leukemia failing to front-line treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy (PETHEMA protocols LPA96 and LPA99): benefit of an early intervention. Leukemia 21: 446–452 (2007)

39. Estey E, Döhner H: Acute myeloid leukaemia. Lancet 368: 1894–1907 (2006)

40. European Medicines Agency. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/PIP_decision/WC500224037.pdf. (14.09.2017)

41. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettirossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci P, Martelli MF: Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. N Engl J Med 352: 254–266 (2005)

42. Falini B, Sportoletti P, Brunetti L, Martelli MP: Perspectives for therapeutic targeting of gene mutations in acute myeloid leukaemia with normal cytogenetics. BR J Haematol 170: 305–322 (2015)

43. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, Racevskis J, Dewald GW, Ketterling RP, Bennett JM, Rowe JM, Lazarus HM, Tallman MS: Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 361: 1249–1259 (2009)

44. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, Tallman MS, Sun Z, Wolniak K, Peeters JK, Liu W, Choe SE, Fantin VR, Paietta E, Löwenberg B, Licht JD, Godley LA, Delwel R, Valk PJ, Thompson CB, Levine RL, Melnick A: Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2

Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. Cancer cell 18: 553–567 (2010)

45. Freeman SD, Jovanovic JV, Grimwade D: Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. Semin Oncol 35: 388–400 (2008)

46. Fröhling S, Schlenk RF, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K: Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. Blood 100: 4372–4380 (2002)

47. Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, Zimmermann AS, Röck J, Paschka P, Corbacioglu A, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Späth D, Kündgen A, Schmidt-Wolf, Ingo G H, Götze K, Nachbaur D, Pfreundschuh M, Horst HA, Döhner H, Döhner K: RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 29: 1364–1372 (2011)

48. Gaidzik VI, Paschka P, Späth D, Habdank M, Köhne C, Germing U, Lilienfeld-Toal M von, Held G, Horst H, Haase D, Bentz M, Götze K, Döhner H, Schlenk RF, Bullinger L, Döhner K: TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. J Clin Oncol 30: 1350–1357 (2012)

49. Gaidzik VI, Schlenk RF, Paschka P, Stölzle A, Späth D, Kuendgen A, Lilienfeld-Toal M von, Brugger W, Derigs HG, Kremers S, Greil R, Raghavachar A, Ringhoffer M, Salih HR, Wattad M, Kirchen HG, Runde V, Heil G, Petzer AL, Girschikofsky M, Heuser M, Kayser S, Goehring G, Teleanu M, Schlegelberger B, Ganser A, Krauter J, Bullinger L, Döhner H, Döhner K: Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG). Blood 121: 4769–4777 (2013)

50. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, Weber D, Paschka P, Hahn J, Wallrabenstein T, Kolbinger B, Köhne CH, Horst HA, Brossart P, Held G, Kündgen A, Ringhoffer M, Götze K, Rummel M, Gerstung M, Campbell P, Kraus JM, Kestler HA, Thol F, Heuser M, Schlegelberger B, Ganser A, Bullinger

L, Schlenk RF, Döhner K, Döhner H: RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. Leukemia 30: 2160-2168 (2016)

51. Gaidzik VI, Weber D, Paschka P, Kaumanns A, Krieger S, Corbacioglu A, Krönke J, Kapp-Schwoerer S, Krämer D, Horst H, Schmidt-Wolf I, Held G, Kündgen A, Ringhoffer M, Götze K, Kindler T, Fiedler W, Wattad M, Schlenk RF, Bullinger L, Teleanu V, Schlegelberger B, Thol F, Heuser M, Ganser A, Döhner H, Döhner K: DNMT3A mutant transcript levels persist in remission and do not predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. Leukemia 32: 30-37 (2018)

52. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC: The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. Blood 111: 2776–2784 (2008)

53. Gallagher RE, Yeap BY, Bi W, Livak KJ, Beaubier N, Rao S, Bloomfield CD, Appelbaum FR, Tallman MS, Slack JL, Willman CL: Quantitative real-time RT-PCR analysis of PML-RAR alpha mRNA in acute promyelocytic leukemia: assessment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. Blood 101: 2521–2528 (2003)

54. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci M, Vey N, Birnbaum D: Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. BR J Haematol 145: 788–800 (2009)

55. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M, Purcell SM, Svantesson O, Landén M, Höglund M, Lehmann S, Gabriel SB, Moran JL, Lander ES, Sullivan PF, Sklar P, Grönberg H, Hultman CM, McCarroll SA: Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. N Engl J Med 371: 2477–2487 (2014)

56. Giles FJ: Acute Myeloid Leukemia. Hematology 2002: 73–110 (2002)

57. Gilliland DG: Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. Semin Hematol 39: 6–11 (2002)

58. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE: Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. J Clin Oncol 28: 2739–2747 (2010)

59. Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK, Nugent EA, Patel Y, Flora R, Diverio D, Jones K, Aslett H, Batson E, Rennie K, Angell R, Clark RE, Solomon E, Lo-Coco F, Wheatley K, Burnett AK: Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. J Clin Oncol 27: 3650–3658 (2009)

60. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK: Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. Blood 116: 354–365 (2010)

61. Grimwade D, Freeman SD: Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? Blood 124: 3345–3355 (2014)

62. Grishina O, Schmoor C, Döhner K, Hackanson B, Lubrich B, May AM, Cieslik C, Müller MJ, Lübbert M: DECIDER: prospective randomized multicenter phase II trial of low-dose decitabine (DAC) administered alone or in combination with the histone deacetylase inhibitor valproic acid (VPA) and all-trans retinoic acid (ATRA) in patients >60 years with acute myeloid leukemia who are ineligible for induction chemotherapy. BMC Cancer 15: 103 (2015)

63. Haferlach T, Meggendorfer M, Schnittger S, Fasan A, Kern W, Haferlach C: Clinical Impact of Minimal Residual Disease (MRD) Monitoring in AML with PM-Rara, CBFB-MYH11, and RUNX1-RUNX1T1: A Study on 600 Patients. Blood 126: 228 (2015)

64. Harrison TR, Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J: Harrison's principles of internal medicine. McGraw-Hill, New York, S. 2057-2065 (2012)

65. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken, Judith W M, Wesseling P, Reifenberger G, Deimling A von: Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. Acta Neuropathol 118: 469–474 (2009)

66. Haselbeck RJ, McAlister-Henn L: Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. J Biol Chem 268: 12116–12122 (1993)

67. Hassanein M, Almahayni MH, Ahmed SO, Gaballa S, El Fakih R: FLT3 Inhibitors for Treating Acute Myeloid Leukemia. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 16: 543–549 (2016)

68. Herold G: Innere Medizin. Herold, Köln, S. 95-101 (2017)

69. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, Estey EH, Dombret H, Chevret S, Ifrah N, Cahn J, Récher C, Chilton L, Moorman AV, Burnett AK: Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. Lancet Oncol 15: 986–996 (2014)

70. Holz-Schietinger C, Matje DM, Reich NO: Mutations in DNA methyltransferase (DNMT3A) observed in acute myeloid leukemia patients disrupt processive methylation. J Biol Chem 287: 30941–30951 (2012)

71. Hou H, Kuo Y, Liu C, Chou W, Lee MC, Chen C, Lin L, Tseng M, Huang C, Chiang Y, Lee F, Liu M, Liu C, Tang J, Yao M, Huang S, Ko B, Hsu S, Wu S, Tsay W, Chen Y, Tien H: DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. Blood 119: 559–568 (2012)

72. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, Patel Y, Bhudia N, Farah H, Mason J, Wall K, Akiki S, Griffiths M, Solomon E, McCaughan F, Linch DC, Gale RE, Vyas P, Freeman SD, Russell N, Burnett AK, Grimwade D: Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. N Engl J Med 374: 422–433 (2016)

73. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burtt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL: Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. N Engl J Med 371: 2488–2498 (2014)

74. Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, Vyas P, Weissman IL, Quake SR, Majeti R: Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. Sci Transl Med 4: 149ra118 (2012)

75. Jeziskova I, Musilova M, Culen M, Foltankova V, Dvorakova D, Mayer J, Racil Z: Distribution of mutations in DNMT3A gene and the suitability of mutations in R882 codon for MRD monitoring in patients with AML. Int J Hematol (2015)

76. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, Blanchet O, Cayuela J, Recher C, Raffoux E, Delaunay J, Pigneux A, Bulabois C, Berthon C, Pautas C, Vey N, Lioure B, Thomas X, Luquet I, Terré C, Guardiola P, Béné MC, Preudhomme C, Ifrah N, Dombret H: Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. Blood 121: 2213–2223 (2013)

77. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard L, Stockelberg D, Tidefelt U, Wahlin A, Hoglund M: Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. Blood 113: 4179–4187 (2009)

78. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A: Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. Chembiochem 12: 206–222 (2011)

79. Kadia TM, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Minden M, Arthur C, Delaunay J, Ravandi F, Kantarjian H: Decitabine improves outcomes in older patients with acute myeloid leukemia and higher blast counts. Am J Hematol 90: E139-41 (2015)

80. Kapp-Schwoerer S, Krönke J, Corbacioglu A, Gaidzik VI, Paschka P, Eiwen K, Späth D, Göhring G, Schlegelberger B, Lübbert M, Kindler T, Wattad M, Germing U, Nachbaur D, Fiedler W, Thol F, Heuser M, Krauter J, Ganser A, Schlenk RF, Döhner, Hartmut and Döhner, Konstanze: Minimal Residual Disease (MRD) Monitoring in NPM1 Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML): Impact of Concurrent FLT3-ITD and DNMT3A Mutations on MRD Kinetics and Clinical Outcome. Blood 122: 2555 (2013)

81. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, Groner S, Späth D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Fischer T, Döhner K: Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. Blood 114: 2386–2392 (2009)

82. Kayser S, Döhner K, Krauter J, Köhne C, Horst HA, Held G, Lilienfeld-Toal M von, Wilhelm S, Kündgen A, Götze K, Rummel M, Nachbaur D, Schlegelberger B, Göhring G, Späth D, Morlok C, Zucknick M, Ganser A, Döhner H, Schlenk RF: The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. Blood 117: 2137–2145 (2011)

83. Kayser S, Zucknick M, Döhner K, Krauter J, Köhne C, Horst HA, Held G, Lilienfeld-Toal M von, Wilhelm S, Rummel M, Germing U, Götze K, Nachbaur D, Schlegelberger B, Göhring G, Späth D, Morlok C, Teleanu V, Ganser A, Döhner H, Schlenk RF: Monosomal karyotype in adult acute myeloid leukemia: prognostic impact and outcome after different treatment strategies. Blood 119: 551–558 (2012)

84. Kayser S, Levis MJ: FLT3 tyrosine kinase inhibitors in acute myeloid leukemia: clinical implications and limitations. Leuk Lymphoma 55: 243–255 (2014)

85. Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S: Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. Cancer 112: 4–16 (2008)

86. King-Underwood L, Renshaw J, Pritchard-Jones K: Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. Blood 87: 2171–2179 (1996)

87. Kohlmann A, Nadarajah N, Alpermann T, Grossmann V, Schindela S, Dicker F, Roller A, Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T: Monitoring of residual disease by next-generation deep-sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease. Leukemia 28: 129–137 (2013)

88. Kompetenznetz akute und chronische Leukämien. http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/therapie/responsekriterien/allgemein/.(13.09.2017)

89. Krönke J, Schlenk RF, Jensen K, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, Paschka P, Onken S, Eiwen K, Habdank M, Späth D, Lübbert M, Wattad M, Kindler T, Salih HR, Held G, Nachbaur D, Lilienfeld-Toal M von, Germing U, Haase D, Mergenthaler H, Krauter J, Ganser A, Göhring G, Schlegelberger B, Döhner H, Döhner K: Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. J Clin Oncol 29: 2709–2716 (2011)

90. Krönke J, Corbacioglu A, Gaidzik VI, Paschka P, Eiwen K, Späth D, Göhring G, Schlegelberger B, Lübbert M, Kindler T, Wattad M, Germing U, Nachbaur D, Fiedler W, Thol F, Heuser M, Krauter J, Ganser A, Schlenk RF, Döhner H, Döhner K: Minimal Residual Disease (MRD) Monitoring in NPM1 Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML): Impact of Concurrent FLT3-ITD and DNMT3A Mutations on MRD Kinetics and Clinical Outcome. Blood 122: 2555 (2013)

91. Langemeijer, Saskia M C, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, Stevens-Linders E, van Hoogen P, van Kessel, Ad Geurts, Raymakers, Reinier A P, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburgh E, Hagemeijer A, Vandenberghe P, Witte T de, van der Reijden, Bert A, Jansen JH: Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. Nat Genet 41: 838–842 (2009)

92. Lee J, Joo Y, Kim H, Bae SH, Kim MK, Zang DY, Lee J, Lee GW, Lee J, Park J, Kim D, Lee W, Ryoo HM, Hyun MS, Kim HJ, Min YJ, Jang Y, Lee K: A randomized trial comparing standard versus high-dose daunorubicin induction in patients with acute myeloid leukemia. Blood 118: 3832–3841 (2011)

93. Leroy H, Botton S de, Grardel-Duflos N, Darre S, Leleu X, Roumier C, Morschhauser F, Lai J, Bauters F, Fenaux P, Preudhomme C: Prognostic value of real-time quantitative PCR (RQ-PCR) in AML with t(8;21). Leukemia 19: 367–372 (2005)

94. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK: DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 363: 2424–2433 (2010)

95. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402–408 (2001)

96. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, Ferrara F, Fazi P, Cicconi L, Di Bona E, Specchia G, Sica S, Divona M, Levis A, Fiedler W, Cerqui E, Breccia M, Fioritoni G, Salih HR, Cazzola M, Melillo L, Carella AM, Brandts CH, Morra E, Lilienfeld-Toal M von, Hertenstein B, Wattad M, Lübbert M, Hänel M, Schmitz N, Link H, Kropp MG, Rambaldi A, La Nasa G, Luppi M, Ciceri F, Finizio O, Venditti A, Fabbiano F, Döhner K, Sauer M, Ganser A, Amadori S, Mandelli F, Döhner H, Ehninger G, Schlenk RF, Platzbecker U: Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. N Engl J Med 369: 111–121 (2013)

97. Lo-Coco F, Hasan SK: Understanding the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. Best practice & research. Clin Haematol 27: 3–9 (2014)

98. Marcucci G, Maharry K, Wu Y, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Whitman SP, Becker H, Schwind S, Metzeler KH, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD: IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets

within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol 28: 2348–2355 (2010)

99. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, Becker H, Maharry K, Mrózek K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Nicolet D, Whitman SP, Wu Y, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Moore JO, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD: Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 30: 742–750 (2012)

100. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipek C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ: Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. N Engl J Med 361: 1058–1066 (2009)

101. Mariano AR, Colombo E, Luzi L, Martinelli P, Volorio S, Bernard L, Meani N, Bergomas R, Alcalay M, Pelicci PG: Cytoplasmic localization of NPM in myeloid leukemias is dictated by gain-of-function mutations that create a functional nuclear export signal. Oncogene 25: 4376–4380 (2006)

102. Marková J, Michková P, Burčková K, Březinová J, Michalová K, Dohnalová A, Maaloufová JS, Soukup P, Vítek A, Cetkovský P, Schwarz J: Prognostic impact of DNMT3A mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. Eur J Haematol 88: 128–135 (2012)

103. Mayle A, Yang L, Rodriguez B, Zhou T, Chang E, Curry CV, Challen GA, Li W, Wheeler D, Rebel VI, Goodell MA: Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation. Blood 125: 629–638 (2015)

104. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Becker H, Curfman J, Holland KB, Schwind S, Whitman SP, Wu Y, Blum W, Powell BL,

Carter TH, Wetzler M, Moore JO, Kolitz JE, Baer MR, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD: TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study J Clin Oncol 29: 1373–1381 (2011)

105. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, Grüning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Büchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H: Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. Blood 96: 3907–3914 (2000)

106. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD: Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? Blood 109: 431–448 (2007)

107. Muirhead CR, O'Hagan JA, Haylock, R G E, Phillipson MA, Willcock T, Berridge, G L C, Zhang W: Mortality and cancer incidence following occupational radiation exposure: third analysis of the National Registry for Radiation Workers. Br. J. Cancer 100: 206–212 (2009)

108. National Cancer Institute. Bethesda. https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html. (14.09.2017)

109. Nibourel O, Kosmider O, Cheok M, Boissel N, Renneville A, Philippe N, Dombret H, Dreyfus F, Quesnel B, Geffroy S, Quentin S, Roche-Lestienne C, Cayuela J, Roumier C, Fenaux P, Vainchenker W, Bernard OA, Soulier J, Fontenay M, Preudhomme C: Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. Blood 116: 1132–1135 (2010)

110. Nomdedéu J, Hoyos M, Carricondo M, Esteve J, Bussaglia E, Estivill C, Ribera JM, Duarte R, Salamero O, Gallardo D, Pedro C, Aventin A, Brunet S, Sierra J: Adverse impact of IDH1 and IDH2 mutations in primary AML: experience of the Spanish CETLAM group. Leuk Res 36: 990–997 (2012)

111. Okano M, Xie S, Li E: Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. Nat Genet 19: 219–220 (1998)

112. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell 99: 247–257 (1999)

113. Ossenkoppele G, Löwenberg B: How I treat the older patient with acute myeloid leukemia. Blood 125: 767–774 (2015)

114. Paietta E: Classical multidrug resistance in acute myeloid leukaemia. Med. Oncol. 14: 53–60 (1997)

115. Paietta E: Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 35–42 (2012)

116. Papadaki C, Dufour A, Seibl M, Schneider S, Bohlander SK, Zellmeier E, Mellert G, Hiddemann W, Spiekermann K: Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. BR J Haematol 144: 517–523 (2009)

117. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, van Loo P, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O'Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF, Ganser A, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, Campbell PJ: Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 374: 2209–2221 (2016)

118. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie, Suely Kazue Nagahashi, Shinjo, Sueli Mieko Oba, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW: An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science (New York) 321: 1807–1812 (2008)

119. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Kronke J, Bullinger L, Spath D, Kayser S, Zucknick M, Gotze K, Horst H, Germing U, Dohner H, Dohner K:

IDH1 and IDH2 Mutations Are Frequent Genetic Alterations in Acute Myeloid Leukemia and Confer Adverse Prognosis in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation Without FLT3 Internal Tandem Duplication. J Clin Oncol 28: 3636–3643 (2010)

120. Paschka P, Du J, Schlenk RF, Gaidzik VI, Bullinger L, Corbacioglu A, Späth D, Kayser S, Schlegelberger B, Krauter J, Ganser A, Köhne C, Held G, Lilienfeld-Toal M von, Kirchen H, Rummel M, Götze K, Horst H, Ringhoffer M, Lübbert M, Wattad M, Salih HR, Kündgen A, Döhner H, Döhner K: Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AMLSG). Blood 121: 170–177 (2013)

121. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Herzig JK, Aulitzky T, Bullinger L, Spath D, Teleanu V, Kundgen A, Kohne C, Brossart P, Held G, Horst H, Ringhoffer M, Gotze K, Nachbaur D, Kindler T, Heuser M, Thol F, Ganser A, Dohner H, Dohner K: ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Haematologica 100: 324–330 (2015)

122. Patel JP, Levine RL: How do novel molecular genetic markers influence treatment decisions in acute myeloid leukemia? Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 28–34 (2012)

123. Peterlin P, Renneville A, Ben Abdelali R, Nibourel O, Thomas X, Pautas C, Botton S de, Raffoux E, Cayuela J, Boissel N, Terré C, Celli-Lebras K, Castaigne S, Preudhomme C, Gardin C, Dombret H: Impact of additional genetic alterations on the outcome of patients with NPM1-mutated cytogenetically normal acute myeloid leukemia. Haematologica 100: e196-9 (2015)

124. Pflieger, Verena. https://www.inwt-statistics.de/blog-artikel-lesen/Bestimmtheitsmass_R2-Teil2.html. (14.09.2017)

125. Pløen GG, Nederby L, Guldberg P, Hansen M, Ebbesen LH, Jensen UB, Hokland P, Aggerholm A: Persistence of DNMT3A mutations at long-term remission in adult patients with AML. BR J Haematol 167: 478–486 (2014)

126. Ravandi F, Patel K, Luthra R, Faderl S, Konopleva M, Kadia T, Brandt M, Pierce S, Kornblau S, Andreeff M, Wang X, Garcia-Manero G, Cortes J, Kantarjian H: Prognostic significance of alterations in IDH enzyme isoforms in patients with AML treated with high-dose cytarabine and idarubicin. Cancer 118: 2665–2673 (2012)

127. Renneville A, Boissel N, Nibourel O, Berthon C, Helevaut N, Gardin C, Cayuela J, Hayette S, Reman O, Contentin N, Bordessoule D, Pautas C, Botton S de, Revel Td, Terre C, Fenaux P, Thomas X, Castaigne S, Dombret H, Preudhomme C: Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association. Leukemia 26: 1247–1254 (2012)

128. Ribeiro, Ana Flávia Tibúrcio, Pratcorona M, Erpelinck-Verschueren C, Rockova V, Sanders M, Abbas S, Figueroa ME, Zeilemaker A, Melnick A, Löwenberg B, Valk, Peter J M, Delwel R: Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. Blood 119: 5824–5831 (2012)

129. Rideout, W M 3rd, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA: 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. Science 249: 1288–1290 (1990)

130. Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, Habdank M, Kugler C, Holzmann K, Gaidzik VI, Paschka P, Held G, Lilienfeld-Toal M von, Lubbert M, Frohling S, Zenz T, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Lichter P, Dohner K, Dohner H: TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. Blood 119: 2114–2121 (2012)

131. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, Naoe T, Lengfelder E, Büchner T, Döhner H, Burnett AK, Lo-Coco F: Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood 113: 1875–1891 (2009)

132. Schild TA. http://www.core-facility.uni-freiburg.de/qpcrddpcr/lc480obj/sdsman. (14.09.2017)

133. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H: Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. N Engl J Med 358: 1909–1918 (2008)

134. Schlenk RF, Döhner H: Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. Hematology 2013: 324–330 (2013)

135. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, Kobbe G, Casper J, Ringhoffer M, Held G, Brossart P, Lubbert M, Salih HR, Kindler T, Horst HA, Wulf G, Nachbaur D, Gotze K, Lamparter A, Paschka P, Gaidzik VI, Teleanu V, Späth D, Benner A, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Döhner K: Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. Blood 124: 3441–3449 (2014)

136. Schnittger S: Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. Blood 100: 59–66 (2002)

137. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Falini B, Haferlach C, Haferlach T: Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. Blood 114: 2220–2231 (2009)

138. Sekeres MA: Differences in prognostic factors and outcomes in African Americans and whites with acute myeloid leukemia. Blood 103: 4036–4042 (2004)

139. Shah MY, Licht JD: DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. Nat Genet 43: 289–290 (2011)

140. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL: The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. Nature reviews. Cancer 12: 599–612 (2012)

141. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, Kennedy JA, Schimmer AD, Schuh AC, Yee KW, McLeod JL, Doedens M, Medeiros, Jessie J. F., Marke R, Kim HJ, Lee K, McPherson JD, Hudson TJ, Pan-

Leukemia Gene Panel Consortium, The HALT, Brown, Andrew M. K., Trinh QM, Stein LD, Minden MD, Wang, Jean C. Y., Dick JE: Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. Nature 506: 328–333 (2014)

142. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson, James K V, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE: The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science (New York) 314: 268–274 (2006)

143. Speer SA, Semenza JC, Kurosaki T, Anton-Culver H: Risk factors for acute myeloid leukemia and multiple myeloma: a combination of GIS and case-control studies. J Environ Health 64: 9-16; quiz 35-6 (2002)

144. Stone RM, Mandrekar S, Sanford BL, Geyer S, Bloomfield CD, Döhner K, Thiede C, Marcucci G, Lo-Coco F, Klisovic R, Wei A, Sierra J, Sanz MA, Brandwein JM, Witte T de, Niederwieser D, Appelbaum FR, Medeiros BC, Tallman MS, Krauter J, Schlenk RF, Ganser A, Serve H, Ehninger G, Amadori S, Larson RA, Döhner H: The Multi-Kinase Inhibitor Midostaurin (M) Prolongs Survival Compared with Placebo (P) in Combination with Daunorubicin (D)/Cytarabine (C) Induction (ind), High-Dose C Consolidation (consol), and As Maintenance (maint) Therapy in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients (pts) Age 18-60 with FLT3 Mutations (muts): An International Prospective Randomized (rand) P-Controlled Double-Blind Trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]). Blood 126: 6 (2015)

145. Su L, Li W, Cui J, Tan Y, Yang Y, Liu X, Yu P, Hu R, Wang L, Gao S: Correlation of NPM1, FLT3-ITD mutations with leukocyte count and myeloblasts percentage in AML patients with normal karyotype. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 21: 571–575 (2013)

146. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A: Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science (New York) 324: 930–935 (2009)

147. Takahashi S: Epigenetic aberrations in myeloid malignancies (Review). Int J Mol Med (2013)

148. Taketani T, Taki T, Takita J, Tsuchida M, Hanada R, Hongo T, Kaneko T, Manabe A, Ida K, Hayashi Y: AML1/RUNX1 mutations are infrequent, but related to AML-M0, acquired trisomy 21, and leukemic transformation in pediatric hematologic malignancies. Genes Chromosomes Cancer 38: 1–7 (2003)

149. Tallman MS: New Strategies for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia Including Antibodies and Other Novel Agents. Hematology 2005: 143–150 (2005)

150. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck, Claudia A J, Wouters BJ, van der Poel-van de Luytgaarde, Sonja C, Damm F, Krauter J, Ganser A, Schlenk RF, Löwenberg B, Delwel R, Döhner H, Valk, Peter J M, Döhner K: Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. Blood 117: 2469–2475 (2011)

151. The Cancer Genome Atlas Research Network: Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 368: 2059–2074 (2013)

152. Thiede C: Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood 99: 4326–4335 (2002)

153. Thol F, Damm F, Ludeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, Yun H, Gohring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, Lubbert M, Kanz L, Fiedler W, Kirchner H, Heil G, Krauter J, Ganser A, Heuser M: Incidence and Prognostic Influence of DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol 29: 2889–2896 (2011)

154. Thol F, Kölking B, Damm F, Reinhardt K, Klusmann J, Reinhardt D, Neuhoff N von, Brugman MH, Schlegelberger B, Suerbaum S, Krauter J, Ganser A, Heuser M: Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring

in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations. Genes Chromosomes Cancer 51: 689–695 (2012)

155. Thol F, Schlenk RF: Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia revisited. Expert Opin. Biol. Ther. 14: 1185–1195 (2014)

156. U.S. National Institutes of Health. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00146120?term=aml+hd98a&rank=1. (14.09.2017)

157. U.S. National Institutes of Health. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00151242?term=amlsg+07-04&rank=1. (14.09.2017)

158. U.S. National Institutes of Health. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00893399?term=amlsg+09-09&rank=1. (14.09.2017)

159. Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F, Li E, Chen T: The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. Nat Genet 41: 125–129 (2008)

160. Weisser M, Haferlach T, Schoch C, Hiddemann W, Schnittger S: The use of housekeeping genes for real-time PCR-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloid leukemia. Leukemia 18: 1551–1553 (2004)

161. Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Racke F, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD: FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. Blood 111: 1552–1559 (2008)

162. Whitman SP, Maharry K, Radmacher MD, Becker H, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Wu Y, Schwind S, Metzeler KH, Wen J, Baer MR, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Moore JO, Stone RM, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD: FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. Blood 116: 3622–3626 (2010)

163. Wouters BJ, Jorda MA, Keeshan K, Louwers I, Erpelinck-Verschueren, C. A. J., Tielemans D, Langerak AW, He Y, Yashiro-Ohtani Y, Zhang P, Hetherington CJ, Verhaak, R. G. W., Valk, P. J. M., Lowenberg B, Tenen DG, Pear WS, Delwel R: Distinct gene expression profiles of acute myeloid/T-lymphoid leukemia with silenced CEBPA and mutations in NOTCH1. Blood 110: 3706–3714 (2007)

164. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren, Claudia A J, van Putten, Wim L J, Valk, Peter J M, Delwel R: Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. Blood 113: 3088–3091 (2009)

165. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, DiPersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L: Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. Nat Med 20: 1472–1478 (2014)

166. Xu F, Mao C, Ding Y, Rui C, Wu L, Shi A, Zhang H, Zhang L, Xu Z: Molecular and Enzymatic Profiles of Mammalian DNA Methyltransferases: Structures and Targets for Drugs. Curr Med Chem 17: 4052–4071 (2010)

167. Xu Y, Sun Y, Shen H, Ding L, Yang Z, Qiu H, Sun A, Chen S, Wu D: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation could improve survival of cytogenetically normal adult acute myeloid leukemia patients with DNMT3A mutations. Am J Hematol 90: 992–997 (2015)

168. Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H: Array-based genomic resequencing of human leukemia. Oncogene 29: 3723–3731 (2010)

169. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD: IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N Engl J Med 360: 765–773 (2009)

170. Yan X, Xu J, Gu Z, Pan C, Lu G, Shen Y, Shi J, Zhu Y, Tang L, Zhang X, Liang W, Mi J, Song H, Li K, Chen Z, Chen S: Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. Nat Genet 43: 309–315 (2011)

171. Ye K: Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. Cancer Biol Ther 4: 918–923 (2005)

172. Yin, John A Liu, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK: Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. Blood 120: 2826–2835 (2012)

173. Yohe S: Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Med 4: 460–478 (2015)

174. Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff, Y J M, Scholten WJ, Snel AN, Veldhuizen D, Cloos J, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ: Peripheral blood minimal residual disease may replace bone marrow minimal residual disease as an immunophenotypic biomarker for impending relapse in acute myeloid leukemia. Leukemia 30: 708–715 (2015)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir geholfen und mich bei der Erstellung der Arbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Frau Prof. Dr. med. Konstanze Döhner für die Bereitstellung des Themas sowie die allzeit vorhandene konstruktive Unterstützung.
PD Dr. med. Verena Gaidzik danke ich für die durchgehend gute Betreuung, ihre vielseitigen Ideen zur Dissertation und ihre Geduld während dem Korrekturlesen.

Heidi Schmidt, Marianne Habdank und dem gesamten Team aus dem AML-Labor in Ulm möchte ich für die Einarbeitung, die Hilfe und stets vorhandene Unterstützung während meiner Forschungsarbeit danken.

Frau Daniela Weber danke ich für die statistische Analyse der Daten.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meinen Freunden, die mich stets hingebungsvoll in der Verwirklichung meiner Ziele unterstützen. Ohne sie wäre ich niemals dahin gekommen, wo ich heute stehe und wäre nicht zu dem geworden, was ich bin. Zu jedem Zeitpunkt hatten sie ein offenes Ohr für meine Anliegen und Probleme und halfen mir aus allen erdenklichen Krisen.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.