

Universitätsklinikum Ulm - Zentrum für Innere Medizin  
Klinik für Innere Medizin III  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

**Inzidenz und prognostische Bedeutung von  
*DNMT3A* Mutationen bei der akuten myeloischen  
Leukämie des älteren Patienten**

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

vorgelegt von  
Martin Philipp Ebner  
geb. in Heilbronn

2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Verena Gaidzik

2. Berichterstatter: PD Dr. Dr. med. Patrick C. Hermann

Tag der Promotion: 13.02.2020

---

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

III - V

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1.1	Akute myeloische Leukämie (AML)	1
1.1.2	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.3	Klinische Präsentation	2
1.1.4	Klassifikation der AML	3
1.1.5	Pathogenese	6
1.1.6	Prognosefaktoren	8
1.1.7	Therapie	11
<b>1.2</b>	<b>Molekulargenetik</b>	<b>16</b>
1.2.1	Molekulargenetische Analysen	16
1.2.2	<i>FMS-related-tyrosine-kinase-3 (FLT3)</i>	16
1.2.3	<i>Nucleophosmin (NPM1)</i>	17
1.2.4	<i>CCAA/enhancer-binding-protein <math>\alpha</math> (CEBPA)</i>	18
1.2.5	<i>IDH 1/2</i>	19
1.2.6	<i>ASXL1</i>	21
1.2.7	<i>RUNX1</i>	21
1.2.8	<i>TP53</i>	22
<b>1.3</b>	<b><i>DNMT3A</i></b>	<b>22</b>
1.3.1	Struktur von <i>DNMT3A</i>	23
1.3.2	DNA Methylierung	24
1.3.3	<i>DNMT3A</i> Mutationen bei hämatologischen malignen Erkrankungen ...	26
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>31</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialgewinnung und Aufbereitung</b>	<b>31</b>
2.1.1	Instrumente und Reagenzien	31
2.1.2	Patientenkohorte	37
2.1.3	AML HD98B	38
2.1.4	AMLSG 06-04	39
2.1.5	Zellisolation und Zellarchivierung	39
2.1.6	DNA Extraktion	40
<b>2.2</b>	<b>Polymerase Chain Reaction (PCR)</b>	<b>41</b>
2.2.1	PCR Protokoll:	42
<b>2.3</b>	<b>Agarose Gelelektrophorese</b>	<b>45</b>
<b>2.4</b>	<b>Aufreinigung der PCR Produkte</b>	<b>46</b>
<b>2.5</b>	<b>Cycle Sequencing Reaction (CSR)</b>	<b>47</b>

---

2.5.1	CSR Protokoll .....	47
2.6	Aufreinigung des CSR Produktes .....	49
2.7	DNA Sequenzierung .....	50
2.8	Statistische Analysen.....	51
3	ERGEBNISTEIL .....	52
3.1	Häufigkeit und Beschreibung der <i>DNMT3A</i> Mutationen .....	52
3.2	Assoziation der <i>DNMT3A<sup>mut</sup></i> mit klinischen Charakteristika .....	53
3.3	Assoziation der <i>DNMT3A<sup>mut</sup></i> mit genetischen Alterationen.....	55
3.4	Relevanz der <i>DNMT3A<sup>mut</sup></i> in Anbetracht der zytogenetischen Klassifikation .....	57
3.5	Einfluss der <i>DNMT3A<sup>mut</sup></i> auf das Therapieansprechen .....	59
3.6	Einfluss der <i>DNMT3A<sup>mut</sup></i> auf das Überleben .....	59
4	DISKUSSION .....	63
4.1	Methodik.....	63
4.2	Klinische Relevanz von <i>DNMT3A<sup>mut</sup></i> .....	64
4.3	Zytogenetische Assoziationen von <i>DNMT3A<sup>mut</sup></i> .....	65
4.4	Molekulargenetische Assoziation von <i>DNMT3A<sup>mut</sup></i> .....	65
4.5	Relevanz von <i>DNMT3A<sup>mut</sup></i> auf den Therapieverlauf von AML .....	67
4.6	Klonale Hämatopoese .....	68
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	69
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	71
7	LEBENS LAUF.....	94
8	DANKSAGUNG.....	95

---

## Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
AMLSG	Deutsch-Österreichische Studiengruppe Akute Myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozytenleukämie
ARCH	Age-related clonal hematopoiesis
AS	Aminosäure(n)
ASXL1	Additional Sex Combs-Like Protein 1
ATRA	All trans Retinsäure
BMI1	Polycomb complex Protein BMI1
bp	Basenpaar
bZIP	Leucin-Zipper-Domäne
CBF	Core Binding Faktoren
CBF AML	Core binding factor AML
CBFA2	Core-binding factor subunit-2
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein alpha
CHIP	Clonal hematopoiesis of indeterminate potential
CN-AML	AML mit zytogenetisch normalem Karyotyp
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CR	Komplette Remission
CSR	Cycle sequencing reaction
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DNMTs	Mammalian DNA methyltransferases
DNMT1	DNA (cytosine-5) methyltransferase 1
DNMT3A	DNA (cytosine-5) methyltransferase 3A
dNTP	DesoxyNukleotide
ddNTPs	Didesoxynukleotidtriphosphate
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ED	Early Death / vorzeitiges Ableben
EFS	Ereignisfreies Überleben
ELN	European LeukemiaNet

---

ESC	Embryonale Stammzellen
FAB	French-American-British AML Klassifikation
FDA	Food and Drug Administration
FLT3	FMS-Related Tyrosine Kinase 3
GO	Gemtuzumab Ozogamicin
GVL	Graft-versus-leukaemia Effekt
HSC	Haematopoietic stem cells – Blutbildende Stammzellen
HCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HLA	Humanes Leukozytenantigen
ICE	Idarubicin, Cytarabin, Etoposid
IDH	Isozitat Dehydrogenase
Inv	Inversion
ITD	Interne Tandemdublikation
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
MD	Myelodysplastisches Syndrom
MFC	Multiparameter-Durchflusszytometrie
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MLL	Mixed-Lineage Leukemia
MM	MasterMix
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
MRD	Minimal residual disease (=Minimale Resterkrankung)
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Mut	Mutiert
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NGS	Next Generation Sequencing
NLS	Nuclear localization signal
NOS	Nicht anderweitig Spezifiziert
NPM1	Nucleophosmin 1
NTC	No Template Controls
OS	Overall survival – Gesamtüberleben
P53	Tumor Protein P53

---

PB	Peripheres Blut
PR	Partielle Remission
PCR	Polymerase chain reaction
R2-HG	R2-Hydroxylglutarat
RFS	Relapse free survival – rezidivfreies Überleben
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RD	residual Disease, verbleibende Erkrankung
RT	Reverse Transkription
Rtemp	Raumtemperatur
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
s-AML	sekundäre AML
SNP	Single nucleotide polymorphism
SZT	Stammzelltransplantation
t-AML	Therapieassoziierte akute myeloische Leukämie
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TET2	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2
Taq	Thermophilus aquaticus
TRM	Treatment related mortality
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1.1 Akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine genetisch und klinisch heterogene klonale Erkrankung bei der unreife hämatopoetische Vorläuferzellen (Progenitorzellen) eine klonale Funktionsstörung aufweisen und die Fähigkeit zur normalen Differenzierung und Proliferation verlieren. Charakteristisch zeigt sich eine Zunahme von frühen myeloischen Vorstufen im Knochenmark (KM), was zu einer Insuffizienz der normalen Hämatopoese führt. [109] Konsekutiv resultieren daraus eine Granulozytopenie, eine Thrombozytopenie und eine Anämie; diese können mit oder ohne Leukozytose einhergehen. Hierdurch ergibt sich die typische klinische Symptomatik, wie beispielsweise eine erhöhte Infektionsanfälligkeit, eine verstärkte Blutungsneigung, Blutarmut oder allgemeine Schwäche. Die Expansion der leukämischen Vorläuferzellen aus dem KM, den sogenannten Blasten, kann zur Infiltration weiterer Organe führen. Die Heilungschancen hängen stark vom Alter des Patienten ab. Patienten bis 60 Jahre erreichen eine Fünf - Jahresüberlebensquote von 35 - 40%. Bei Patienten über 60 Jahre sinkt diese Quote auf 5 - 15%. [32] Neueste Erkenntnisse im Bereich der molekularen Pathogenese fördern die Entwicklung von zielgerichteten Therapien für Patienten aller Altersgruppen. Die Herausforderung besteht darin, die genetischen Varianten der AML einer entsprechenden zielgerichteten Therapie zuzuführen und damit das Überleben der Patienten zu verbessern. [38]

## 1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Die Häufigkeit der AML beträgt auf 100 000 Einwohner bezogen ca. 3,8 Erkrankungen pro Jahr. Die Inzidenz der Erkrankung ist mit höherem Alter zunehmend. In der Gruppe der über 65-jährigen Patienten steigt daher die Zahl der Erkrankungen auf ca. 17,9 Erkrankungen pro Jahr (wiederum bezogen auf 100 000 Einwohner). [42] Der Altersdurchschnitt der AML bewegt sich momentan zwischen 66 und 71 Jahren. [82] [146] Ein begünstigender Risikofaktor ist unter anderem die

Exposition gegenüber ionisierender Strahlung wie beispielsweise von atomarer Strahlung nach dem Atombombenabwurf in Hiroshima oder Nagasaki. Bei der Untersuchung von Patienten aus diesen betroffenen Gebieten war im Vergleich zum Zeitraum vor 1945 eine gehäufte Inzidenz an AML zu verzeichnen, einhergehend mit Veränderungen der Chromosomen 5 und 7. Begünstigende Risikofaktoren sind des Weiteren auch anhaltende Benzolexposition oder eine Zytostatikaexposition. [122] [170] Am häufigsten wird Benzol durch das Rauchen von Zigaretten aufgenommen. Rauchen erhöht die Wahrscheinlichkeit an einer AML zu erkranken um den Faktor 1,2-2,3. [83] Neben der *de novo* AML gibt es auch die Form der sekundären AML; dabei sind die sekundäre AML, welche auf dem Boden einer vorangegangenen hämatologischen Erkrankung, wie z.B. ein Myelodysplastisches Syndrom (MDS), entsteht und eine therapieassoziierte AML zu unterscheiden. Durch die Anwendung von Zytostatika in der Chemotherapie entwickeln 10 - 15% der Patienten eine AML. Dabei treten zwei Haupttypen von therapiebezogener AML (*t*-AML) auf: Der häufigste Typ tritt 5 – 10 Jahre nach dem Kontakt mit Alkylanzien auf und zeichnet sich durch Aberrationen an den Chromosomen 5 oder 7 aus. Der zweite Typ von therapiebezogener AML, welcher nach der Anwendung von Doxorubicin und Etoposid vorkommt, tritt ca. 1 - 5 Jahre nach der Behandlung auf. [153]

### 1.1.3 Klinische Präsentation

Das Beschwerdebild bei der AML ist unspezifisch. Patienten zeigen häufig starke Müdigkeit, haben eine verminderte Leistungsfähigkeit oder zeigen Blässe der Haut. Dies lässt sich auf die durch die AML ausgelöste Anämie zurückführen. Die ebenfalls auftretende Neutropenie verursacht - unter anderem - bakterielle Infektionen des Rachenraums und der Lunge. Die Thrombozytopenie erkennt man in der Regel auch an Petechien und Ekchymosen. Der Krankheitsverlauf ist überwiegend kurz und schwer. In 40% der Fälle beträgt die Dauer der Anamnese weniger als einen Monat. [86] Die häufigste Todesursache bei der AML ist das Versagen des KMs (*bone marrow failure*). Die AML Blasten reifen nicht mehr zu Erythrozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten oder Thrombozyten aus.

Durch die geringe Anzahl an Thrombozyten, der verminderten Zahl an Gerinnungsfaktoren und der gesteigerten Fibrinolyseaktivität weisen AML Patienten eine verstärkte Blutungsneigung auf. Dies kann sich zum Beispiel an mukokutanen Blutungen am Zahnfleisch zeigen.

#### **1.1.4 Klassifikation der AML**

Um die passende Therapie zu gewährleisten, ist eine sehr präzise Diagnosestellung und daraus resultierende Klassifikation und Risikostratifizierung von großer Bedeutung. Einteilungskriterien wie Zyto- und Histomorphologie werden zunehmend durch moderne zyto- und molekulargenetische Verfahren ergänzt oder ersetzt. [102] Von Bedeutung ist die Bestimmung des Blastenanteils im PB bzw. im KM und ihre Differenzierung in Bezug zur myeloischen Reihe. Bis Ende der 90er Jahre erfolgte die Einteilung der AML nach der *French-American-British*-Klassifikation (FAB), welche nach morphologischen Gesichtspunkten differenziert. [7] Danach werden durch mikroskopische Beurteilung der leukämischen Zellen die FAB Subtypen M1-M7 im histologischen Bild des KMs unterschieden (siehe Tabelle 1). Genetische Aberrationen und histo- / immunhistochemische Färbungen wurden im Verlauf weitere Faktoren der Charakterisierung.

**Tabelle 1: French-American-British (FAB) Klassifikation der AML** (modifiziert nach [102])

Kategorie	Morphologie	Häufigkeit (in %)
M0	Akute myeloblastische Leukämie mit minimaler Differenzierung	3
M1	Akute unreife Myeloblastenleukämie	15-20
M2	Akute reife Myeloblastenleukämie	25-30
M3	Akute Promyelozytenleukämie (APL)	5-10
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	20
M5a	Akute Monozyten - Leukämie ohne Ausreifung	5-10
M5b	Akute Monozyten – Leukämie mit Ausreifung	2-9
M6	Erythrozytenleukämie	3-5
M7	Akute megakaryozytäre Leukämie	3-12

Mittlerweile wird bei der AML zunehmend die umfangreichere Klassifikation der *World Health Organisation* (WHO), welche die Bedeutung der genetischen Veränderungen widerspiegelt angewendet. Zunächst erfolgte 1999 die WHO Klassifikation anhand zytogenetischer Alterationen. In der WHO Klassifikation von 2008 wurden erstmals die molekularen Marker *NPM1* und *CEBPA* als sogenannte provisorische Entitäten berücksichtigt. Diese wurden im aktuellen Update der WHO Klassifikation von 2016 nun als distinkte Entitäten mit aufgenommen. Des Weiteren wurde die AML mit *RUNX1*, sowie die AML mit *BCR-ABL1* als neue provisorische Entitäten inkludiert (siehe Tabelle 2). [31] [86] [30]

**Tabelle 2: Aktuelle WHO-Klassifikation der AML (2016) (modifiziert nach [4], [30] und [147])**

**Erläuterungen:** Für die Diagnose einer AML muss ein Knochenmarkblastengehalt von  $\geq 20\%$  vorliegen; Ausnahmen sind das Vorliegen der balancierten Translokationen t(15;17), t(8;21), inv(16) oder t(16;16) [4] Andere rekurrente chromosomale Translokationen mit Einbeziehung von **RARA** sollten ebenfalls berichtet werden: t(11;17)(q23;q12)/**ZBTB16-RARA**; t(11;17)(q13;q12); **NUMA1-RARA**; t(5;17)(q35;q12); **NPM1-RARA**; **STAT5B-RARA**.

<b>AML und verwandte Neoplasien</b>	
AML mit rekurrenten genetischen Veränderungen	AML mit t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	Akute promyeloische Leukämie mit <i>PML-RARA</i>
	AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
	AML mit t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3.;q26.2); <i>GATA2,MECOM</i>
	AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
	Provisorische Entität: AML mit mutiertem <i>BCR-ABL1</i>
	AML mit mutiertem <i>NPM1</i>
	AML mit bialellischem mutiertem <i>CEBPA</i>
Provisorische Entität: AML mit mutiertem <i>RUNX1</i>	
AML mit Myelodysplasie assoziierten Veränderungen <sup>3</sup>	
Therapieassoziierte myeloische Neoplasien <sup>4</sup>	
AML, NOS	AML mit minimaler Differenzierung
	AML ohne Ausreifung
	AML mit Ausreifung
	Akute myelomonozytäre Leukämie
	Akute monoblastische/monozytäre Leukämie
	Akute erythrozytäre Leukämie
	Akute megakaryoblastische Leukämie
	Akute Basophilenleukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloides Sarkom (Synonyme: extramedullärer myeloischer Tumor, granulozytisches Sarkom, Chlorom)	
Myeloische Proliferation assoziiert mit Down-Syndrom	Transiente abnormale Myelopoese (Synonym: transiente myeloproliferative Erkrankung)
	Myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom
Blastische plasmazytoide dendritische Zellneoplasien	
Akute Leukämien unklarer Linienzugehörigkeit	Akute undifferenzierte Leukämie
	Akute Leukämie, gemischter Phänotyp, mit t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> <sup>5</sup>
	Akute Leukämie, gemischter Phänotyp, mit t(v;11q23); MLL rearrangiert

Fortsetzung Tabelle 2 auf Seite 6

Fortsetzung Tabelle 2

	Akute Leukämie, gemischter Phänotyp, B/myeloid, NOS
	Akute Leukämie, gemischter Phänotyp, T/myeloid, NOS

### 1.1.5 Pathogenese

Vor etwa ein bis zwei Dekaden ging man noch davon aus, dass sich die AML Blasten aufgrund von zwei Klassen genetischer Veränderungen entwickeln. Dieser Vermutung wurde ein zwei Klassen Modell, basierend auf der Funktion der Mutation, zu Grunde gelegt: [45] Genetische Veränderungen der Klasse 1 beinhalten die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren der Zellen wie zum Beispiel RAS oder die Rezeptor-Tyrosinkinase *FLT3* und *c-KIT*, welche die Proliferation der Zelle zur Folge haben. Klasse 2 Veränderungen zeichnen sich durch eine Überexpression von *HOX* Genen oder Formationen von Fusionsgenen aus, welche die myeloische Differenzierung blockieren.[35] [172] Neuere Forschungsergebnisse haben jedoch gezeigt, dass zwei Klassen an Genmutationen nicht ausreichen, um die derzeit relevanten molekularen Marker und ihre Eigenschaften einzuordnen. Mitglieder des „*Cancer Genome Atlas Research*“-Netzwerks veröffentlichten kürzlich eine Aufteilung in neun funktionelle Kategorien basierend auf einer Studie mit 200 erwachsenen Patienten mit *de novo* AML, deren Genome mittels neuer Technologien (Sequenzieren des gesamten Genoms durch *hybridization capture* -basierte Methoden und *deep digital sequencing*) untersucht wurden. Folgende Gruppen konnten dabei identifiziert werden: 18% der Patienten hatten Mutationen in den Genen, die die *transcription-factor-fusion* kodieren, 27% im *NPM1* Gen, 16% in den *tumor-suppressor* Genen, 44% in den *DNA-methylations-related* Genen, 59% in den *signaling* Genen, 30% in den *chromatin-modifying* Genen, 22% in den *myeloid-transcription* Genen, 13% in den *cohesin-complex* Genen und 14% in den *spliceosome-complex* Genen. Nachfolgend untersuchten Papaemmanuil et al. 1540 AML Patienten mittels Sanger Sequenzierung. Insgesamt konnten 5234 „*driver*“-Mutationen in 76 Genen detektiert werden. 96% der Patienten hatten mindestens eine „*driver*“- Mutation und 86% der Patienten wiesen zwei oder mehr Mutationen

auf. Im Rahmen dieser Analyse konnte die Einteilung der AML auf 11 Klassen erweitert werden (Siehe Tabelle 3). [13] [131]

**Tabelle 3: Erweiterte Einteilung auf 11 Klassen** (nach Papaemmanuil [131])

Klassen	Patienten in %
inv(16)	≤5%
t(15;17)	≤5%
t(8;21)	≤5%
inv(3)	≤5%
t(6;9)	≤5%
<i>MLL</i> Fusionen	≤5%
<i>NPM1</i> mutierte AML	27%
<i>CEBPA</i> biallelische AML	5%
Chromatin <i>Spliceosome</i> Gruppe	18%
RNA splicing ( <i>SRSF2</i> , <i>SF3B1</i> , <i>U2AF1</i> , und <i>ZRSR2</i> Chromatin	
( <i>ASXL1</i> , <i>STAG2</i> , <i>BCOR</i> , <i>MLL-PTD</i> , <i>EZH2</i> , und <i>PHF6</i> )	
<i>TP53</i>	13%
<i>IDH2</i> <sup>R172</sup> Mutationen	1%

Die häufigsten mutierten Gene der jeweiligen AML Untergruppe aus der Studie von Papaemmanuil et al. sind in der folgenden Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Die am häufigsten mutierten Gene** (modifiziert nach Papaemmanuil [131])

<sup>1</sup>Für diese Untergruppe wird eine oder mehrere Driver Mutationen in mindestens einem der folgenden Gene benötigt: *RUNX1*, *ASXL1*, *BCOR*, *STAG2*, *EZH2*, *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2* oder *MLL-PTD*

Genomische Untergruppe	Die darin am häufigsten mutierten Gene
AML mit <i>NPM1</i> Mutation	<i>NPM1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>FLT3-ITD</i> , <i>NRAS</i>
	<i>TET2</i> , <i>PTPN11</i>
AML mit mutiertem Chromatin, RNA-splicing Genen oder beides <sup>1</sup>	<i>RUNX1</i> , <i>MLL-PTD</i> , <i>SRSF2</i> , <i>DNMT3A</i>
AML mit <i>TP53</i> Mutation, chromosomaler Aneuploidie, oder beides	Komplexer Karyotyp, -5/5q, -7/7q <i>TP53</i> , -17/17p, -12/12p, +8/8q
AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>	inv(16), <i>NRAS</i> , +8/8q, +22, <i>KIT</i> , <i>FLT3-ITD</i>
AML mit biallelischen <i>CEBPA</i> Mutationen	<i>CEBPA</i> <sup>biallelisch</sup> , <i>NRAS</i> , <i>WT1</i> , <i>GATA2</i>
AML mit t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>	t(15;17), <i>FLT3-ITD</i> , <i>WT1</i>
AML mit t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	t(8;21), <i>KIT</i> , -Y, -9q
AML mit <i>MLL</i> Genen; t(x;11)(x;q23)§	t(x;11q23), <i>NRAS</i>
AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3) (q21;q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MECOM (EVI1)</i>	inv(3), -7, <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>PTPN11</i> , <i>ETV6</i> , <i>PHF6</i> , <i>SF3B1</i>
AML mit <i>IDH2</i> <sup>R172</sup> Mutationen	<i>IDH2</i> <sup>R172</sup> , <i>DNMT3A</i> , +8/8q
ohne weitere klassifizierte Läsion	
AML mit t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>	t(6;9), <i>FLT3-ITD</i> , <i>KRAS</i>
AML mit Driver Mutation aber keiner klassifizierten Läsion	<i>FLT3-ITD</i> , <i>DNMT3A</i>
AML ohne entdeckte Driver-Mutationen	
AML in mindesten 2 Einteilungs gruppen	

### 1.1.6 Prognosefaktoren

Um die Prognose einer AML abschätzen zu können, müssen klinische, zyto- als auch molekulargenetische Faktoren, sowie das Alter des Patienten beachtet werden. Zu den ungünstigen Faktoren gehören ein höheres Alter, ein Befall des Zentralen Nervensystems (ZNS), eine erhöhte Komorbidität, eine erhöhte Anzahl von Leukozyten, eine therapieassoziierte AML und vorherige hämatologische Erkrankungen, beispielsweise das MD oder myeloproliferative Neoplasien (MPN). [102] [30] Die größte Bedeutung in Bezug auf die Prognose wird den zytogenetischen Risikofaktoren zugesprochen. [12] [38] Prognostisch können die zytogenetischen Variationen in drei Risikogruppen, günstig, intermediär und

ungünstig, unterteilt werden. [31] [101] Das internationale Expertengremium des *European LeukemiaNet* (ELN) hat die vorhandene Risikostratifizierung von 2010 aktuell (2017) überarbeitet und dem aktuellen Wissensstand angepasst und hierbei die molekularen Marker mit einbezogen (siehe Tabelle 5). [31] In der alten Einteilung gab es eine Unterteilung in intermediäres Risiko 1 und 2. Diese Unterteilung wurde verworfen, da sie mehr auf genetischen Gesichtspunkten statt auf prognostischen Gesichtspunkten basierte. [30] Eine günstige Prognose lässt sich bei einer *CEBPA*-Mutation und einer *NPM1* ohne *FLT3*-ITD (normaler Karyotyp) oder *NPM1* mit *FLT3*-ITD<sup>low</sup> (low steht für niedrige Allellast) Mutation stellen. Die Allellast ist in der ELN Klassifikation der entscheidende Faktor bei *FLT3*, sie unterscheidet zwischen günstig und ungünstig [147] Eine weitere günstige Aberration, die nicht in der Tabelle 5 berücksichtigt wurde und eine gute Prognose aufweist, ist die Akute Promyelozyten Leukämie (APL). APL weist unter allen AML Erkrankungen mit 80% Überlebensrate die beste Langzeitprognose auf. [99] Bei der APL ist die Zellreifung gestört. Dies wird durch eine transkriptionelle Unterdrückung der Differenzierungs-Blockade verursacht und lässt sich auf die t(15;17) *PML-RARA* zurückführen. [137] Ebenfalls in der Gruppe mit günstiger Prognose sind die Core Binding Faktor (CBF) Leukämien. Diese sind heterodimere Transkriptionsfaktoren. Zu den CBF-Leukämien werden folgende Translokationen gezählt: t(8;21)(q22;q22), *RUNX1-RUNX1T1*, inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22), *CBF-MYH11*. [97] Liegt jedoch beispielsweise eine t(8;21) in Verbindung mit einer *KIT* Mutation vor, wird von einer ungünstigen Prognose ausgegangen. [2] Ein intermediäres Risiko weisen Patienten mit zytogenetisch normalem Karyotyp auf. Der normale Karyotyp macht aktuell ca. 45% aller AML aus. [120] Ein ungünstiges Risiko weisen Patienten mit komplexem Karyotyp ( $\geq 3$  Aberrationen ohne Vorliegen AML assoziierter rekurrenter genetischer Veränderungen) auf. Bei ca. 75% der Patienten kommt es zu Rezidiven und nur 10% der Patienten weisen eine Remission über fünf Jahre hinaus auf. [31] Zur Kategorie der ungünstigen Prognosen gehören folgende Mutationen: *RUNX1*, *ASXL1* und *TP53*. *TP53*<sup>mut</sup> in Verbindung mit einem komplexen Karyotyp haben hierbei die schlechteste Prognose. [131] [30] Aktuelle Daten zeigen, dass die prognostische Bedeutung der Mutationen häufig von Ko-Mutationen oder dem Fehlen weiterer Ko-Mutationen abhängig ist. Die Mutation von *NPM1* kann dafür als Beispiel herangezogen werden. Eine *NPM1*<sup>mut</sup> hat nur dann eine günstige Prognose, wenn keine *FLT3*-ITD Veränderung oder eine *FLT3*-ITD<sup>low</sup> vorliegt. Ein

Beispiel für eine schlechte Prognose ist, wenn zusätzlich zu *NPM1* sowohl in *RUNX1* als auch in *ASXL1* eine Mutation vorliegt, diese Kombination tritt jedoch sehr selten auf. [131] [52] [139] [65] Ein weiterer wichtiger Faktor für die Prognose ist die Überprüfung einer minimalen Resterkrankung – *minimal residual disease* (MRD). Diese kann anhand verschiedener Verfahren festgestellt werden, zum Beispiel entweder mittels *Next Generation Sequencing*, digitaler PCR, Multiparameter Durchflusszytometrie (*multiparameter flow cytometry* - MFC) oder aber mittels *real-time quantitative* PCR (RT-qPCR). [58] [30] Eine Analyse mittels MFC kann in 90% aller Fälle eine aussagekräftige Prognose geben und ist daher zuverlässiger als eine Morphologie basierende Beurteilung bezüglich einer CR.[127] Momentan ist eine Analyse mittels MFC noch sehr aufwendig und komplex. Daher sollte eine Analyse nur von spezialisierten Laboren durchgeführt werden, bis die Verfahren weiter standardisiert sind. [30] Die MRD wird bei modernen Therapiekonzepten, näheres im Abschnitt „Therapie“, regelmäßig ermittelt, um das Therapieansprechen und die weitere Behandlungsweise zu bestimmen. [30]

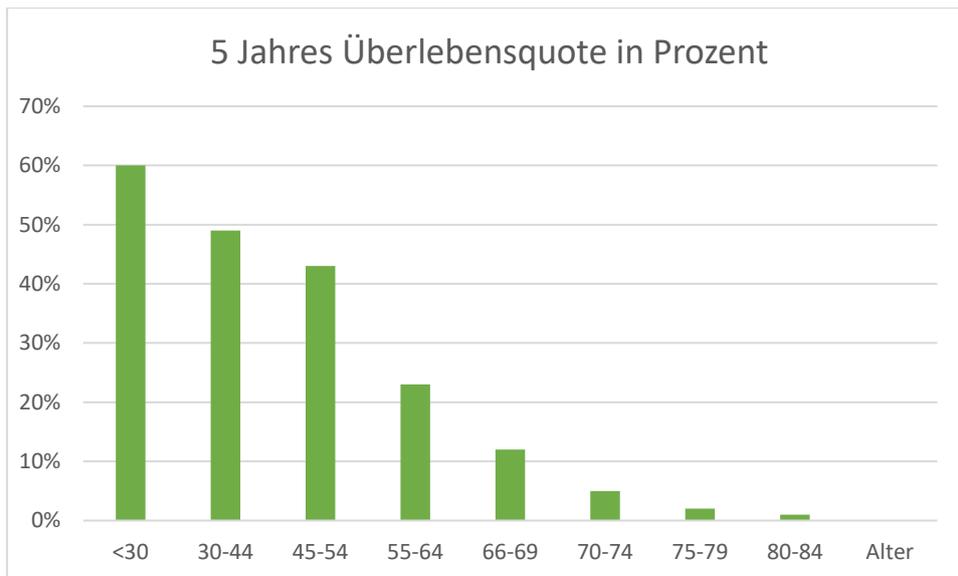
**Tabelle 5: Risikostratifizierung der AML bezüglich zyto- und molekulargenetischen Veränderungen<sup>1</sup>** (nach ELN [30] [147]) **Erläuterungen:** <sup>1</sup>low= low allelic ratio /niedrige Allellast, <sup>2</sup> high= high allelic ratio/ hohe Allellast, <sup>3</sup> Für die meisten dieser Veränderungen liegen zu kleine Fallzahlen vor, um belastbare Aussagen zur Prognose machen zu können. <sup>4</sup> ≥3 Veränderungen in der Abwesenheit der balancierten Veränderungen t(15;17), t(8;21), inv(16) oder t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) oder t(3;3). **ITD** Interne Tandemduplikation.

<b>Günstig</b>	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	Mutiertes <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp) oder mit <i>FLT3-ITD</i> <sup>low 1</sup>
	Biallelisch mutiertes <i>CEBPA</i> (normaler Karyotyp)
<b>Intermediär</b>	Mutiertes <i>NPM1</i> und <i>FLT3-ITD</i> <sup>high 2</sup> (normaler Karyotyp)
	Wildtyp- <i>NPM1</i> und <i>FLT3-ITD</i> <sup>low</sup> (normaler Karyotyp)
	Wildtyp- <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i>
	Zytogenetische Veränderungen nicht als günstig oder ungünstig klassifiziert <sup>3</sup>
<b>Ungünstig</b>	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;q23); <i>KMT2A</i> rearrangiert
	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>
	-5 oder del(5q); -7; abnl(17p); komplexer Karyotyp <sup>4</sup>
	Wildtyp <i>NPM1</i> und <i>FLT3-ITD</i> <sup>high 4</sup>
	Mutiertes <i>RUNX1</i>
	Mutiertes <i>ASXL1</i>
	Mutiertes <i>TP53</i>

### 1.1.7 Therapie

Die Behandlung einer AML besteht in der Regel aus einer Kombination von Anthrazyklinen wie Daunorubicin oder Idarubicin und Cytarabin. Seit über drei Jahrzehnten findet diese „klassische“ Kombination von Medikamenten Anwendung. Die Therapie gliedert sich in zwei Phasen: In der ersten Phase wird versucht, eine vollständige Remission (CR) zu erreichen. Die Induktionstherapie nach dem „7 + 3“ Schema hat sich als Standard etabliert. „7 + 3“ bedeutet, dass drei Tage intravenös Anthrazykline (z.B. Daunorubicin 60 mg/m<sup>2</sup>; Idarubicin 10 - 12 mg/m<sup>2</sup>) und sieben

Tage kontinuierlich Cytarabin (100 - 200 mg/m<sup>2</sup>) Infusionen gegeben werden. [33] Diese Therapie führt bei ca. 60 - 80% der Erwachsenen bis zum 60. Lebensjahr zu einer CR. Über das 60. Lebensjahr hinaus erfahren 40 - 60% der Patienten eine CR. [30] Von einer CR sprechen wir, wenn im KM ein Blastenanteil unter 5% ermittelt wird und keine zirkulierenden Blasten im PB gefunden werden können. Die Neutrophilenzahl muss über 1000 / $\mu$ l und die Thrombozytenzahl über 100 000 / $\mu$ l liegen. [30]. Die zweite Phase der Therapie zielt darauf ab, die erreichte Remission zu erhalten (Konsolidierung). Die Standardtherapie nach Erreichen der Remission für Patienten mit günstigem genetischem Risiko (siehe Tabelle 5) besteht aus 2 - 4 Zyklen Cytarabin in einer Dosierung von 1000 - 1500 mg/m<sup>2</sup>. Es wird in der Regel alle 12 Stunden für 3 Tage intravenös verabreicht. Patienten, die in die Gruppe mit intermediärem oder ungünstigem Risiko fallen, wird ergänzend oder alternativ eine allogene Stammzelltransplantation (SZT) empfohlen. [32] Bleibt ein Patient für 3 Jahre in Remission, liegt die Wahrscheinlichkeit eines Rückfalls unter 10%. [103] [157] [20] Bei der allogenen SZT wirken Spender- T- Lymphozyten gegen maligne Patientenzellen. Dies wird als *Graft-Versus-Leukemia* Effekt (GVL) bezeichnet. Die therapiebezogene Sterblichkeitsrate beträgt 10% - 25%. [157] [163] Mit zunehmendem Alter sinkt die Chance auf eine erfolgreiche Therapie der AML: Bei über 65-jährigen AML Patienten besteht aufgrund zunehmender Therapieresistenz sowie einer zunehmenden Anzahl an ungünstigen genetischen Aberrationen eine wesentlich schlechtere Prognose. [39]. Ein bedeutender Faktor bei älteren Patienten ist die therapiebedingte Mortalität (*treatment related mortality* – TRM). Die Anzahl an Patienten, welche durch therapiebedingte Einflüsse versterben, geht jedoch durch verbesserte Behandlungsmethoden und eine stetig ansteigende Allgemeinverfassung älterer Patienten zurück. [30] Abbildung 1 zeigt die 5 - Jahres Überlebensquote nach Juliusson et al. [82]



**Abbildung 1:** 5 Jahres Überlebensquote (Daten für Excelgrafik entnommen aus Juliusson et al. [82])

**Erläuterungen:** y- Achse prozentualer Anteil an Patienten, x- Achse Alter der Patienten.

Neue Therapieansätze werden durch die persistierende ungünstige Prognose der Erkrankung, aber auch durch das höhere mediane Erkrankungsalter und damit einhergehenden Komorbiditäten erforderlich. Eine stärkere Orientierung an der molekularen Pathogenese ist aktuell wesentlicher Teil der Forschung, um Patienten zielgerichtet zu therapieren. Mögliche Zielstrukturen, auch *targets* genannt sind z.B. mutierte oder deregulierte molekulare Zielstrukturen, aber eine Inhibition der zellzyklusaktivierter Proteine oder auch der Einsatz von Myelopoese assoziierter Antikörper. [147] Ein Therapieentscheidung gründet auf einer zeitnahen molekularen Diagnostik. Dies wird beispielsweise von der AMLSG innerhalb von 48 Stunden, mit einer konsekutiven Therapieempfehlung, möglichst im Rahmen einer klinischen Studie entsprechend dem Genotyp der AML, durchgeführt. Eine Übersicht der diagnostischen Maßnahmen ist in Tabelle 6 festgehalten.

**Tabelle 6: Diagnostische Maßnahmen** (nach Döhner et al. [30])

1 Ergebnisse der zytogenetischen Analyse sollten innerhalb der ersten 5 - 7 Tage vorliegen, es werden mind. 20 Knochenmarksmetaphasen benötigt, um den normalen Karyotyp zu bestimmen. 2 Ergebnisse des Mutationsscreenings sollten für *NPM1* und *FLT3* innerhalb von 48 - 72 Stunden vorliegen, für weitere Gene innerhalb des ersten Behandlungszykluses. 3 Falls schnell Ergebnisse zwecks Therapieweg vorliegen müssen. 4 Inkl. ethnische Herkunft, vorangegangene Vergiftungen oder Verstrahlungen, so umfangreich wie möglich. 5 ermöglicht die Diagnose über myeloide Neoplasien in der Vergangenheit

<b>Tabelle 6</b>	diagnostisches Vorgehen bei AML
<b>Tests um die Diagnose zu ermöglichen</b>	vollständige Erfassung der Blutmenge Knochenmarkspunktion Knochenmarks-Stanzbiopsie Immunphänotypisierung
<b>Genetische Analysen</b>	Zytogenetische Bestimmung <sup>1</sup> Mutationsscreening in folgenden Genen <sup>2</sup> : <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i> , <i>RUNX1</i> , <i>FLT3</i> , <i>TP53</i> , <i>ASXL1</i> Screening nach folgenden Genveränderungen <sup>3</sup> : <i>PML-RARA</i> , <i>CBFB-MYH11</i> , <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>BCR-ABL1</i> , sonstige Fusionsgene
<b>Weitere Tests</b>	Demographische und medizinische Vorgeschichte <sup>4</sup> Detaillierte Familiengeschichte Hämatologische Vorgeschichte <sup>5</sup> Körperliche Fitness (ECOG/WHO Punkte) Analyse von Komorbiditäten Biochemische Analysen, Koagulationstest Urinprobe Im gebärfähigen Alter Schwangerschaftstest Wenn Patientenwunsch, Sperma Cryopreservation Beurteilung, ob allogene HCT möglich, inklusive HLA Bestimmung, Hepatitis A, B, C Test HIV1 Überprüfung Thorax Röntgen, Elektrokardiogramm Lumbal Punktion Biobanking
<b>Beurteilung des Ansprechverhaltens mittels RT-PCR oder MFC</b>	RT-PCR, um Mutationen zu ermitteln MFC, um MRD zu überprüfen

Eine Reihe von erfolgversprechenden therapeutischen Substanzen wurde in jüngster Zeit zugelassen oder wiederzugelassen. In den USA und in Europa wurde Midostaurin zugelassen, welches im Abschnitt *FLT3* näher behandelt wird. Enasidenib, ein *IDH2*-Inhibitor ist momentan nur in den USA zugelassen. Auf diese Substanz wird im Kapitel *IDH1/2* eingegangen. Gemtuzumab-Ozogamicin (GO), welches 2010 vom Markt genommen wurde, hat im Jahr 2018 eine Wiedenzulassung durch die amerikanische FDA (*Food and Drug Administration*) erhalten. [192] GO ist ein Konjugat aus CD33-Antikörper und Zytotoxin

Calicheamicin. [138] In Studien konnte gezeigt werden, dass die Hinzunahme von GO zu einer Chemotherapie, die Rezidivrate reduziert und das rezidivfreie Überleben (RFS) signifikant verlängert und dies über alle AML-Subgruppen hinweg. Die Wirkung ist nach aktueller Studienlage nicht altersabhängig und auch nicht mit krankheits- oder patientenspezifischen Charakteristika assoziiert. Den positivsten Effekt weist die nach ELN günstigste Risikogruppe auf. In der intermediären Risikogruppe ist noch ein leicht positiver Effekt bei der Einnahme von GO zu verzeichnen, während Patienten mit Hochrisiko-Zytogenetik nicht von GO profitieren. [192] [100] Ein weiteres vielversprechendes Medikament ist CPX-351. Es beinhaltet Cytarabin und Daunorubicin in einer liposomalen Formulierung im Verhältnis 5:1. [111] Verglichen mit der konventionellen „7 + 3“ Chemotherapie konnte bei *de novo* AML keine erhöhte OS festgestellt werden, jedoch eine gesteigerte CR Rate und ein verbessertes OS bei Patienten mit sekundärer AML. [90] Nach einer weiteren Studie welche diese Ergebnisse unterstützen, wurde CPX-351 von der FDA im August 2017 und von der *European Medicines Agency* (EMA) 2018 zur Behandlung von *t*-AML und AML-MRC zugelassen. [25] [175] Bei Patienten mit niedrig proliferativer AML, welche sich durch einen Anteil von KM-Blasten < 30% auszeichnet, konnten mit hypomethylierenden Substanzen wie Azacitidin oder Decitabine positive Ergebnisse in der palliativen Therapie erzielt werden. [41] Die beiden Wirkstoffe verringern die abberante Methylierung von Cytosinresten in der DNA. Die Nebenwirkungen wie Hautirritationen, Infektionen und Abszesse an der Injektionsstelle sind bedeutend geringer im Vergleich zu den Nebenwirkungen einer Induktionstherapie. Eine Therapie mit Azacitidin oder Decitabine kann ambulant durchgeführt werden. [41] Noch immer werden ein Drittel aller älteren Patienten palliativ ohne aktive Therapie betreut, da Komorbiditäten und eine höhere Anzahl an Genmutationen mit ungünstiger Prognose die Therapie erschweren. [113] Momentan befindet sich Venetoclax in der Erprobungsphase, von diesem Wirkstoff erhofft man sich, bei Patienten die nicht für eine Induktionstherapie in Frage kommen, höhere CR Raten. [175]

## 1.2 Molekulargenetik

### 1.2.1 Molekulargenetische Analysen

Grundlage für die neuen Therapieformen ist das Verständnis der Pathogenese. Molekulare Marker kommen neben ihrer Funktion als Prognosefaktoren auch als potentielle Angriffspunkte für zielgerichtete Tumorthapien in Frage. Zu den relevanten molekularen Veränderungen gehören unter anderem Mutationen in den Genen *FLT3*, *NPM1*, *TP53*, *CEBPA*, *IDH*, *DNMT3A* und *RUNX1*. [119]

### 1.2.2 *FMS-related-tyrosine-kinase-3 (FLT3)*

Das *FMS-related tyrosine kinase 3 (FLT3)* Gen ist auf dem Chromosom 13q12 lokalisiert und gehört in die Gruppe der Klasse III Rezeptortyrosinkinasen. Es besteht aus einer Tyrosinkinasedomäne, fünf extrazellulären Domänen, einer transmembranären Domäne und einer juxtamembranären Domäne. [55] Mutationen im *FLT3* Gen werden bei ca. 30% aller Erwachsenen mit neu diagnostizierter AML festgestellt. [156] Davon haben Dreiviertel aller Patienten eine interne Tandemduplikation (*FLT3-ITD*), dies verursacht die Duplikation von mehreren Aminosäuren, die in der juxtamembranären Region lokalisiert sind. ITD Translokationen werden in Verbindung mit einer hohen Allellast (*high allelic ratio*) mit einer schlechten Prognose und einer hohen Rezidivrate in Verbindung gebracht. [156] Etwa 8% aller Patienten, bei welchen eine AML diagnostiziert wird, haben *FLT3* Punktmutationen in der Tyrosine-Kinase-Domäne (TKD Mutationen). Der Effekt von *FLT3*-TKD ist im Gegensatz zu *FLT3*-ITD hinsichtlich der Prognose jedoch bisher nicht eindeutig. [180] Eine ligandenunabhängige Dimerisierung sowie eine Autophosphorylierung und Aktivierung des Proteins wird durch den Verlust der autoinhibitorischen Funktion in der juxtamembranären Domäne bei beiden Mutationstypen ausgelöst. Dies führt zu einer Beeinträchtigung der Zelldifferenzierung. [156] Die prognostische Relevanz der *FLT3*-ITD wurde durch etliche Studien belegt. Diese haben gezeigt, dass *FLT3*-ITD mit einer erhöhten Laktatdehydrogenase (LDH) und eine erhöhte Leukozytenzahl assoziiert sind. [179]

[8] Bei der AML mit *FLT3*-ITD hängt das Therapieansprechen und der Verlauf der Erkrankung hauptsächlich von der ITD Allellast ab. Wie schon im Kapitel „1.1.6. - Prognosefaktoren“ beschrieben, haben Patienten mit *NPM1*<sup>mut</sup> und *FLT3*-ITD<sup>low</sup> eine ähnliche Prognose wie Patienten mit *NPM1*<sup>mut</sup>, die keine *FLT3* Mutation aufweisen. Sie sind der Gruppe mit günstiger Prognose zugeteilt. [10] Patienten mit *FLT3*-ITD<sup>high</sup> in Verbindung mit Wildtyp *NPM1* werden in die Gruppe mit ungünstiger Prognose eingeteilt. [30] Die *FLT3*-Mutation bietet einen aussichtsreichen pharmakologischen Angriffspunkt. [72] Die erste Generation an *FLT3* Inhibitoren zeigte bei Patienten mit einer refraktären oder rezidierten AML eine Verringerung von Blasten im PB und im KM, waren jedoch in Hinblick auf ihre Inhibitoren relativ unspezifisch. [155] Die Folgegeneration - beispielsweise Quizartinib und Gilteritinib - führten zu einer Verbesserung der Ansprechrate bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung. [156] Midostaurin führte in einer von Stone et al. durchgeführten Studie zu einer Verbesserung des Ansprechverhaltens in Verbindung mit einer Chemotherapie. Bei Patienten zwischen 18 und 59 Jahren, welche alle eine AML mit *FLT3*-ITD aufwiesen, konnte eine CR Rate von 59% und in der Placebo Kontrollgruppe eine CR Rate von 54% erreicht werden. Der Einsatz von Midostaurin bewirkte, dass das OS der mit Midostaurin behandelten Gruppe nach vier Jahren deutlich besser (63,7%) als das Gesamtüberleben der Gruppe mit Placebo (55,7%) war. [156]

### 1.2.3 Nucleophosmin (*NPM1*)

Nucleophosmin ist überwiegend im Zellkern lokalisiert und für den Transfer von ribosomalen Proteinen durch die Zellmembran zuständig. Daher wird es auch als Shuttleprotein bezeichnet. [37] *NPM1* reguliert anteilig den *ARF-p53* Tumorsuppressor – Signalweg. *NPM1*<sup>mut</sup> gehören mit 25% - 35% zu den häufigsten Mutationen bei AML Patienten. [40] [32] Die Veränderung am Gen selbst wird überwiegend durch Mutationen ausgelöst, nur in seltenen Fällen durch Translokationen. Durch Veränderungen am C-Terminus und einem erhöhten Exportverhalten kommt es zu einer Verlagerung von Nucleophosmin ins Zytoplasma. Dies führt zu einer Beeinträchtigung des *TP53*-Tumorsuppressor -

Signalwegs. [173] [182] Eine funktionelle Abhängigkeit der Marker *NPM1* und *FLT3* ist naheliegend, da die *NPM1*<sup>mut</sup> und *FLT3*-ITD häufig zusammen auftreten. [40] Eine Mutation von *NPM1* ohne *FLT3*-ITD oder *FLT3*-ITD<sup>low</sup> wird prognostisch aufgrund der CR Raten und der höheren OS Rate als günstiger Faktor angesehen, auch wenn die Patienten älter als 60 Jahre alt sind. [34] [30] [114] 40% aller *NPM1*<sup>mut</sup> Patienten weisen eine *FLT3*-ITD auf, 10 - 15% eine *FLT3*-TKD und 25% eine *IDH*<sup>mut</sup>. [134] [117] Von Bedeutung ist - wie bei *FLT3* Mutationen - das Auftreten von Ko-Mutationen (siehe Tabelle 4). Darüber hinaus eignet sich *NPM1* als molekularer Marker zur Bestimmung der MRD. Krönke et al. untersuchte diese Erkenntnis der MRD um auf das Rezidiv-Risiko zu schließen. Er stellte fest, dass nach den ersten zwei Induktionszyklen sowie nach durchlaufener Therapie, das weitere Auftreten von *NPM1*<sup>mut</sup> Transkripte ein signifikanter Prognosefaktor in Bezug auf CR und OS darstellt und damit in die Therapieentscheidung mit eingebunden werden sollte. [89] Schnittger et al. untersuchte den Zusammenhang von *NPM1*<sup>mut</sup> und der MRD ebenfalls und stellte eine Korrelation von *NPM1*<sup>mut</sup> und der MRD fest. Ein Screening der Patientenkohorte nach 120 Tagen, zeigte einen signifikanten Einfluss von *NPM1*<sup>mut</sup> MRD auf das EFS. Auch diese Studie zeigt, dass das MRD Screening ein bedeutender prognostischer Faktor für das Therapieansprechen und Rezidiv-Risiko darstellt. [148] Ivey et al. konnte nach der Konsolidierungstherapie noch bei 15% der Patienten *NPM1*<sup>mut</sup> Transkripte nachweisen. Festgestellt wurde innerhalb der ersten drei Jahre ein erhöhtes Rückfall-Risiko (82%) im Vergleich zu Patienten ohne *NPM1*<sup>mut</sup> Transkripte (30%). Es konnte eine Korrelation zwischen einer steigenden Anzahl an *NPM1*<sup>mut</sup> Transkripten und dem erneuten Auftreten einer AML festgestellt werden. Daher kann eine Bestimmung der MRD ein entscheidender Faktor sein. [76]

#### **1.2.4 CCAA/enhancer-binding-protein $\alpha$ (CEBPA)**

Das *CEBPA* Gen ist auf der chromosomalen Bande 19q13.11 lokalisiert. *CEBPA* wird bei der Granulozytopoese stark exprimiert und ist in den myelomonozytären Zellen ein Transkriptionsfaktor mit Bedeutung für die Granulozytendifferenzierung. In einem Tierversuch war die Bildung von Granulozyten bei Knock-out-Mäusen

gestört, andere hämatopoetische Zelllinien blieben jedoch unverändert. [165] Die festgestellten Veränderungen betreffen entweder das C- oder das N-terminale Ende des Proteins. [91] Je nachdem, welches Ende des Proteins betroffen ist, ergeben sich verschiedene Veränderungen: Bei der C-terminalen Mutation wird das DNA-Bindungspotential und das Dimerisationspotential der Leucin-Zipper-Domäne (bZIP) reduziert. Hingegen entsteht bei der N-terminalen Mutation eine Überexpression der dominant-negativen-Isoform oder ein verkürztes Protein. In beiden Fällen ist die Funktion des Proteins erheblich eingeschränkt. [107] *CEBPA* reguliert des Weiteren die Stammzellenaktivität in der Leukämieentstehung. [194] Ist *CEBPA* defekt oder fehlend, exprimieren hämatopoetische Stammzellen verstärkt *BMI1*. *BMI1*, ein sog. Polycomb-Gen weist in den hämatopoetischen und leukämischen Stammzellen eine Selbsterhaltungsfunktion auf. [92] *CEBPA*-Mutationen (*CEBPA*<sup>mut</sup>) treten bei AML-Patienten in 5% - 14% der Fälle auf und werden mit den FAB-Subtypen M1, M2 und M4 assoziiert. [91] In der aktuellen WHO Klassifikation sind biallelische *CEBPA* Mutationen in der Gruppe- „AML mit rekurrenten genetischen Veränderungen“ - zu finden. Biallelische Mutationen von *CEBPA* treten in nur 4 - 5% der AML Fälle auf und werden in den aktuellen ELN Empfehlungen in der Gruppe mit günstiger Prognose assoziiert. [10] [30] Monoallelische Mutationen von *CEBPA* treten häufig in Verbindung mit Ko-Mutationen wie *NPM1*<sup>mut</sup> oder *FLT3*-ITD auf. Bisher konnte jedoch kein prognostischer Unterschied zwischen monoallelisch mutiertem *CEBPA* und Wildtyp *CEBPA* festgestellt werden. Ein Vorteil im OS konnte jedoch bei Vorhandensein einer *NPM1*<sup>mut</sup> in einer Studie von Dufour et al. festgestellt werden. [36]

### **1.2.5 IDH 1/2**

IDH (Isocitrat Dehydrogenase) sind Enzyme und Enzymkomplexe, die für die Entstehung von  $\alpha$ -Ketoglutarat durch oxidative Abspaltung von Kohlenstoff von Isocitrat katalysieren. Dies ist ein Teil des Citratzyklus und kommt im Stoffwechsel aller Lebewesen vor. Für die AML hat sich das Gen *IDH1* und *IDH2* von Bedeutung herausgestellt. Darüber hinaus gibt es noch die Gene *IDH3A*, *IDH3B* und *IDH3G*. *IDH1* stellt das zytoplasmatische IDH dar und *IDH2* das mitochondriale IDH. [27]

Somatische Mutationen in einem der beiden Gene verursachen die Bildung von R2-Hydroxyglutarat (R2HG). R2HG ist ein Onkometabolit und hemmt verschiedene  $\alpha$ -Ketoglutarat abhängige Dioxygenasen. [187] Dies führt zu bedeutenden epigenetischen Veränderung in den blutbildenden Zellen, welche direkt die Zelldifferenzierung beeinträchtigen. [123]  $IDH1^{mut}$  und  $IDH2^{mut}$  gehören zu den häufigsten Veränderungen der AML. Erstmals wurden Mutationen dieser zwei Gene allerdings bei sekundären Glioblastomen beschrieben. [43] [133] Bisher konnten in  $IDH3$  keine krebsrelevanten Mutationen gefunden werden. Erklärt wird dies damit, dass  $IDH3$  ähnliche Funktionen erfüllt wie  $IDH1$  und  $IDH2$ .  $IDH3$  hat genetisch und strukturell jedoch nichts mit den Enzymen von  $IDH1$  und  $IDH2$  gemein. [123] Mutationen von  $IDH1$  treten gehäuft am Codon 132 ( $IDH1^{R132}$ ) auf und ersetzen Arginin durch Histidin oder Cystein. Bei  $IDH2$  sind zwei Hotspots vorhanden, einer am Codon 140 ( $IDH2^{R140}$ ) und ein weiterer am Codon 172 ( $IDH2^{R172}$ ). Bei beiden findet ebenfalls ein Austausch von Arginin statt. [123] Bei ca. 20% aller Patienten mit AML werden  $IDH1/2$  Mutationen ( $IDH1/2^{mut}$ ) gefunden.  $IDH1^{mut}$  ( $IDH1^{R132}$ ) kommen bei ca. 6 - 16% der Patienten vor und  $IDH2^{mut}$  ( $IDH2^{R140}$  und  $IDH2^{R172}$ ) bei ca. 8 - 19% der Patienten [108] [13] [134] Bei Patienten mit isolierter Trisomie 8 oder AML mit Deletion(5q) konnte ebenfalls eine Häufung von  $IDH^{mut}$  festgestellt werden.[132] [105]  $IDH1^{R132}$  und  $IDH2^{R140}$  sind häufig mit Ko-Mutationen von  $MLL$  und  $NPM1$  zu finden, bei letzterem allerdings nur, wenn kein  $FLT3$ -ITD vorhanden ist. Im Gegensatz zu  $IDH1^{R132}$  und  $IDH2^{R140}$  wurde bisher bei  $IDH2^{R172}$  keine Verbindung zu anderen Mutationen gefunden. Dies liegt vermutlich daran, dass  $IDH2^{R172}$  eine eigene Entität mit unterschiedlicher Genexpression und unterschiedlichem Methylierungsprofil ist. Hierzu passend auch die Daten von Papaemannuil et al. [131] [108] Prognostisch zeigen Studien bezüglich  $IDH$  Mutationen unterschiedliche Ergebnisse. Von Relevanz ist das Auftreten von Ko-Mutationen.  $NPM1^{mut}$  wirkt sich positiv auf die Überlebensrate aus.  $IDH1^{mut}$  und  $IDH2^{mut}$  haben laut Kosmider et al. einen negativen Einfluss auf die Prognose bei MDS und MPN. Es wird vermutet, dass eine Mutation der beiden Gene in Verbindung mit MDS oder MPN zu AML führen kann. [88] Eine Vielzahl von Studien belegt, dass  $IDH1^{R132}$  und  $IDH2^{R140}$  in der Evolution einer AML sehr früh auftreten und in selbsterneuernden prä-leukämischen blutbildenden Stammzellen zu finden sind. Diese prä-leukämischen blutbildenden Stammzellen sind Vorgänger der Leukämiezellen. Diese Zellen überstehen die Standard - Induktionstherapie und

fungieren als Reservoir während der klinischen Remission. Dies führt dazu, dass sich die AML erneut bilden kann. Diese Erkenntnisse haben zur Entwicklung von Enzym - Inhibitoren für das mutierte *IDH* geführt.[22] [24] Diese Inhibitoren - wie beispielsweise Ivosidenib für *IHD1* oder Enasidenib für *IHD2*, welches in den USA seit August 2017 zugelassen ist - führen zu einer relevanten Reduktion von R2-HG. [123]

### 1.2.6 *ASXL1*

*ASXL1* steht für *Additional sex comb-like 1*. Dieses Gen ist auf der chromosomalen Bande 20q11.21 lokalisiert. Mutationen führen zum Funktionsverlust des Gens und treten bei ca. 5 - 11% aller AML Fälle auf. [116] Die genaue Funktion von *ASXL1* ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass das Gen in der epigenetischen Regulation (DNA Modifikation und/oder Histon Regulierungen) eine bedeutende Rolle spielt. [48] *ASXL1<sup>mut</sup>* treten bei Patienten über 60 Jahre fünf Mal häufiger auf (ca. 16%) als bei jüngeren Patienten. [116] *ASXL1<sup>mut</sup>* tritt in der AML vor allem mit genetischen Alterationen wie *RUNX1-RUNX1T1*, *NPM1*, *FLT3* ohne ITD und mutiertem *CEBPA* auf. *ASXL1<sup>mut</sup>* hat eine ungünstige Prognose in Bezug auf eine CR und das OS, so wurde diese Mutation auch als ungünstiger prognostischer Faktor in die aktuellen Empfehlungen des ELN mit aufgenommen (siehe Tabelle 5). [3] [30]

### 1.2.7 *RUNX1*

*RUNX1* - Runt-related transcription factor 1, auch AML1 oder core-binding factor subunit-2 (CBFA2) genannt, ist ein Protein, welches vom *RUNX1* Gen gebildet wird. [5] Es spielt eine bedeutende Rolle in der Blutbildung und befindet sich auf dem Chromosom 21q22.12. Es besteht aus 12 Exons und teilt sich in die Runt Domäne (RHD) Exon 2, 3 und 4 und die Transaktivierungsdomäne (TAD) Exon 6. [164] Das *RUNX1* Gen ist in verschiedenen chromosomale Translokationen involviert. Gaidzik

et al. untersuchte die Häufigkeit, die genetische Beschaffenheit und den prognostischen Einfluss von *RUNX1*. 10% der untersuchten Patienten wiesen eine Mutation des Gens auf. Die Mutationen traten meistens mit Co-Mutationen in den Genen *ASXL1*, *IDH2*, *KMT2A*, *EZH2*, *SRSF2*, sowie *SF3B1* auf. [104]. Studien belegen bei *RUNX1*<sup>mut</sup> eine Resistenz gegenüber der Standard - Induktionstherapie sowohl bei älteren als auch bei jüngeren Patienten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *RUNX1*<sup>mut</sup> Patienten häufiger mit einem schlechteren Ansprechen auf die Induktionstherapie als auch mit einem schlechteren Überleben assoziiert sind. So wurde auch die Entität der AML mit *RUNX1*<sup>mut</sup> aufgrund ihrer distinkten genetischen und klinischen Eigenschaften als neue provisorische Entität in die aktuelle WHO Klassifikation mit aufgenommen; sie gilt bei den aktuellen Empfehlungen des ELN ebenfalls als ungünstiger prognostischer Faktor. [50]

### **1.2.8 TP53**

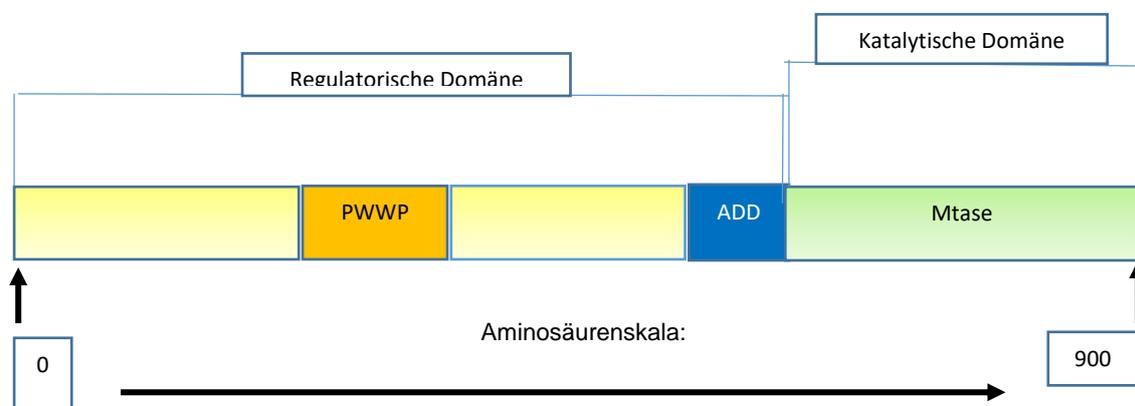
Das *TP53 - tumour suppressor 53* Gen befindet sich auf dem Chromosom 17p23.1 und besteht aus 11 Exons. *TP53* hat als Tumorsuppressor die Aufgabe, Zellen, welche Schäden an der DNA aufweisen, zu reparieren oder den Zelltod herbeizuführen.[166] *TP53*<sup>mut</sup> treten bei ca. 50% aller Tumore des Menschen auf. [121] Bei der AML treten *TP53*<sup>mut</sup> in ca. 5 - 10% der Fälle auf und sind häufig bei älteren Patienten zu finden. *TP53*<sup>mut</sup> werden mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht. In der ELN Risikostratifizierung ist diese Mutation in der Kategorie mit ungünstiger Prognose zu finden. Die Fünf-Jahres Überlebensrate liegt laut einer Studie von Terada et al. bei ca. 12% [166]

### **1.3 DNMT3A**

DNMT3A (DNA (cytosin 5) methyltransferase 3 alpha) ist für die *de novo* Methylierung der DNA zuständig. Es ist ein Enzym, welches zur Gruppe der DNA-Methyltransferasen gehört und wird von dem *DNMT3A* Gen auf der chromosomalen Bande 2p23 kodiert. Die sogenannten *Mammalian DNA Methyltransferases*

(DNMTs) (MTase) katalysieren die Übertragung einer Methylgruppe auf Nucleobasen. Zu der Familie der DNA Methyltransferasen gehört neben DNMT3 auch DNMT1. Von DNMT3 gibt es drei Untergruppen: DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L. DNMT1 wird hauptsächlich die Erneuerung/Erhaltung von vorhandenen Methylierungen nach einer Zellteilung zugesprochen. [93] Auf die Varianten von DNMT3 wird in den kommenden Abschnitten eingegangen.

### 1.3.1 Struktur von *DNMT3A*



**Abbildung 2:** Aufbau *DNMT3A* (schematische Darstellung nach Yang [189])  
**Erläuterung:** *DNMT3A* DNA Methyltransferases3 A; **MTase:** (DNA) Methyltransferase; **PWWP:** Pro-Trp-Trp-Pro Domäne; **ADD:** ATRX-DNTMT3-DNMT3L Domäne.

*DNMT3A* ist ein 130 kDa Protein, welches 23 Exons auf dem Chromosom 2p23 kodiert. [142] Es tritt bei allen Säugetieren auf. Das humane Protein ist zu 98% mit dem Protein der Maus homolog.[185] Die zwei wichtigsten Spleißisoformen sind *DNMT3A1*(lang) und *DNMT3A2* (kurz). *DNMT3A2* fehlen die ersten 6 Exons der Amino-terminalen Domäne und wird ausschließlich in embryonalen Stammzellen (ESCs), Hoden, Ovarien, Milz und Thymus exprimiert. [18] [160] *DNMT3A1* tritt vielfältiger auf und wird von zwei verschiedenen Promoter - Regionen transkribiert. [176] [188] Der Grund für die Existenz von verschiedenen Isoformen ist derzeit nicht bekannt. Die relevantesten Domänen der Proteine sind zum einen die Pro-Trp-Trp-Pro (PWWP) Domäne, die ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) Domäne und zum anderen die katalytische Methyltransferase Domäne. Bisher fand kein detailliertes Studium von ADD und PWWP statt: Dennoch ist bekannt, dass die beiden Domänen mit Proteinen, die für die transkriptionale Unterdrückung verantwortlich sind, in

Wechselwirkung treten und der N-Terminus vermutlich für DNA Bindung verantwortlich ist.[159] [29] [46] [129] [195] Die ADD Domäne blockiert dazuhin noch die katalytische DNMT3A Domäne. Dies geschieht durch eine Autoinhibition, ausgelöst durch Lysin 4 und Histon H3 (H3K4me0), welche DNMT3A und H3 Chromatine verbinden. [60] Die katalytische Domäne von DNMT3A ist stark konserviert. Sie ist sogar in der DNA - Methyltransferase von Prokaryoten anzutreffen. Dies deutet darauf hin, dass DNMT3A aus regulatorischen Domänen stammt. [186] Nach Durchführung einer Röntgenkristallographie konnte festgestellt werden, dass das Protein der Maus vermutlich als Heterotetramer fungiert. Der katalytische Kern besteht unter anderem aus sieben Strängen Beta – Faltblatt. Es kann zwischen dem Methyl-Spender und DNA Bindungsfunktionen unterschieden werden. [81] Bei gemeinsamem Vorliegen von DNMT3A und DNMT3L steigt die Enzym - Aktivität bedeutend. [181] [70] DNMT3B tritt normal mit DNMT3A auf und zeigt sich in verschiedenen Isoformen mit verschiedenen Aktivitäten. [17] [128] Manche der DNMT3B beeinflussten Aktivitäten haben vermutlich ebenfalls Auswirkung auf DNMT3A – besonders Zellen, die kein DNMT3L aufweisen.[56]

### 1.3.2 DNA Methylierung

Die DNA Methylierung ist eine epigenetische Modifikation, welche für Wachstum, Imprinting (genomische Prägung), die Regulierung von Stammzellen, X-Chromosomen-Inaktivierung und bei Dysregulation für verschiedene Krankheiten von Bedeutung ist.[9] Bei der DNA Methylierung wird eine Methylgruppe (CH<sup>3</sup>) an die C5 Position des Pyrimidinrings bei Cytosinen in Form von 5-Methylcytosin (5mC), meistens in Zusammenhang mit einem CpG – Dinukleotid, angefügt.[66] Obwohl 60% - 80% der CpGs methyliert sind, sind Cluster, welche CpG Inseln genannt werden und in genregulierten Regionen vorkommen, eher nicht methyliert. Generell wird eine hohe Methylierungsaktivität mit der Inaktivierung einer Genexpression in Verbindung gebracht. [191] Verstärkt ist die Methylierung bei sich wiederholenden Vorgängen anzutreffen und verringert möglicherweise deren genetische Aktivität. In der Krebsforschung beobachtet man abnorme DNA Methylierung schon seit zwei Jahrzehnten - ursprünglich mit dem alleinigen Schwerpunkt auf der Hypermethylierung von Promotoren und der konsequenten

Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. [53] [176] Eine allgemeine Hypomethylierung wurde ebenfalls untersucht. Man vermutete eine Verbindung von Hypomethylierung und der Instabilität von Genen. [149] Bei verschiedenen Krebsarten weisen Regionen in der Nähe der CpG Inseln mit einer geringeren Methylierungsdichte starke Variationen von Hypo- und Hypermethylierung auf. [63] Der Mechanismus, welcher (Fehl-) Methylierungen auslöst und die daraus resultierende pathologische Bedeutung, ist bis heute nicht eindeutig erforscht. DNA Methylierung wird durch eine Reihe von DNA Methyltransferase Enzymen gesteuert. Zu diesen gehören DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. [126] DNMT3-like (DNMT3L) fehlt eine katalytische Domäne und fungiert daher als zusätzliches Protein zu DNMT3A in der embryonalen Entwicklung und der genomischen Prägung. [181] [84] In Studien wurde klar, dass DNMT3A spezifische Abschnitte eines Gens methyliert, wenn der gleiche Abschnitt auch von DNMT3B methyliert wird, was auf einen gewissen Grad von Entbehrlichkeit hindeutet. [17] [64] [21] Darüber hinaus methyliert DNMT3A Freie-DNA und Linker-DNA effizienter als an das Nukleosom gebundene DNA. [141] [162] Teile der Gen-deaktivierenden Aktivitäten von DNMT3A sind durch bestimmte Proteine an Chromatinmodifikationen gekoppelt. DNMT3A interagiert mit H3K4me0, was ein Zeichen für die Transkription von inaktiven Genen ist. [129] [60] DNMT3A tritt auch mit Histon-Modifikationen in Wechselwirkung, welche für die Genunterdrückung zuständig sind, beispielsweise die Histon N-Methyltransferasen SUV39H1, SETDB1 und G9A/ EHMT2, welche mit der H3K9 Methylierung in Verbindung gebracht werden. Der Histon N-Methyltransferase Enhancer/ Transkriptionsverstärker EZH2 wird bei der DNA Methylierung vom EZH2 Zielpromoter benötigt und agiert wiederherum mit DNMT3A, DNMT3B und DNMT1. [190] [177] [47] DNMT1 dient hauptsächlich dazu, schon vorhandene DNA Methylierungsmuster aufrecht zu erhalten. [14] DNMT3A und DNMT3B dagegen sind für Neu - Methylierungen (*de novo*) verantwortlich. [126] Bei DNMT2 handelt es sich laut bisherigem Wissenstand um eine RNA Methyltransferase. [158] Von Relevanz bei DNMT1 sind Methylcytosin Dioxygenase Proteine (TET1, TET2, TET3). Diese Proteine werden von 5mC zu 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) umgeschrieben. [161] 5hmC wird daher nicht direkt durch DNMT1 verursacht, aber es deutet viel auf eine passive Demethylierung während der Zellteilung hin und dadurch auch auf einen Mechanismus zur DNA Methylierung. [135] [74] In

blutbildenden Stammzellen (HSCs) reguliert DNMT3A die Methylierung an den Rändern von großen Regionen der Hypomethylierung, welche „*DNA-methylation canyons*“ genannt werden. [80] Obwohl noch keine Konsensus-Sequenz bekannt ist, die DNMT3A methyliert, [115] zeigen Studien, dass DNMT3A bevorzugt Sequenzen strangweise methyliert, welche reich an Thymin, Cytosin und Adenin sind und in der Nähe von CpG-Inseln liegen. [181] [95] [62] [57]

### 1.3.3 *DNMT3A* Mutationen bei hämatologischen malignen Erkrankungen

Bei Leukämien wurden bereits in allen funktionellen Domänen des *DNMT3A* Gens Mutationen festgestellt. Mutationen von R878 in der katalytischen DNMT3A Domäne von Mäusen (vergleichbar mit R882 im menschlichen Protein) lösen zum Beispiel eine verringerte DNA Bindung aus. [57] Die Bedeutung von einzelnen Mutationen in solchen Genabschnitten kann aufgrund der Funktion in der vorliegenden Domäne in manchen Fällen abgeschätzt werden. Dennoch sind die meisten Mutationen in Bezug auf ihre Funktion noch nicht erforscht und klassifiziert. [189] Welche Domänen - innerhalb von *DNMT3A* - Mutationen aufweisen, hängt stark von den diagnostizierten Erkrankungen ab. Bei der AML sind im Schnitt 60% - 70% der Mutationen in der Methyltransferase Domäne R882 zu finden, bei MDS ca. 40%, bei MPN, CMML und T-ALL Lymphom ca. 15%, also weitaus seltener als dies bei der AML der Fall ist. [49] [6] [143] Im Schnitt liegt die Mutationsrate von *DNMT3A* je nach Altersgruppe bei ca. 20%. [93] [13] [136] Gemeinsam haben die genannten Erkrankungen, dass die Mutationen heterozygot sind. Bei T-lymphozytischen Erkrankungen ist die *DNMT3A*<sup>mut</sup> gleichmäßiger auf die verschiedenen Domänen verteilt. Bei dem peripheren T- Zell Lymphom (PTCL) und bei der lymphatischen T-Zell Leukämie, tritt *DNMT3A*<sup>mut</sup> ebenfalls in der Domäne für Methyltransferase auf, davon 20% in der R882 Domäne. [125] [130] [145] Das häufige Auftreten von Veränderungen an R882 macht diesen Abschnitt für weitere Untersuchungen interessant. Studien zeigen, dass R882 Mutationen ein hypomorphes Protein hervorbringen. [69] [68] Dieses Protein wirkt sich dominant auf die Methyltransferase aus. Es verhindert die Methyltransferase des noch

vorhandenen Wildtyp *DNMT3A* (*DNMT3A<sup>wt</sup>*). [87] [144] Im heterozygoten Stadium bleiben ca. 20% der Funktionen von *DNMT3A<sup>wt</sup>* erhalten, entweder in Form von homodimeren Wechselwirkungen von *DNMT3A<sup>wt</sup>* oder durch andere Protein-Wechselwirkungen, die noch nicht bekannt sind. [69] Findet eine heterozygote Mutation an anderen Stellen von *DNMT3A* statt, vermindert sich die Funktion des Wildtyp Proteins nur um 50% und ist dementsprechend nicht in der Lage, eine Erkrankung zu fördern. Daher ist die Häufigkeit einer weiteren Mutation bei *non* R822 Mutationen höher, allerdings ist die eigentliche Aktivität von *DNMT3A* noch nicht vollständig erforscht. Ebenso ist die Vorherrschaft von R822 Mutationen bei myeloischen Erkrankungen und die Prädominanz von biallelischen Mutationen bei lymphatischen Erkrankungen bisher noch nicht vollständig erforscht. [189] Im Gegensatz zu Mäusen haben menschliche HSCs mit *DNMT3A<sup>mut</sup>* einen Vorteil bei der Zellerneuerung. Dies kann zur Verbreitung von *DNMT3A<sup>mut</sup>* beigetragen und dadurch eine leukämische Prädisposition verursachen. In zwei Studien wurde gezeigt, dass menschliche HSCs in CR *DNMT3A<sup>mut</sup>* aufweisen können, ohne dass sonstige bei Leukämie auftretende Mutationen vorhanden sind. [152] [24] Menschliche *DNMT3A<sup>mut</sup>* HSCs scheinen zumindest bei Xenotransplantationen einen deutlichen Vorteil gegenüber Wildtyp HSCs zu haben. Das zeigt, dass menschliche HSCs *DNMT3A<sup>mut</sup>* aufweisen und trotzdem verschiedene Zelllinien hervorbringen können, die in einem vorleukämischen Stadium existieren, noch bevor weitere Mutationen hinzukommen, welche dann zu Leukämie führen. Diesen Vorgang bezeichnet man als klonale Hämatopoese. Dadurch das HSCs über einen sehr langen Zeitraum *in vivo* identisch bleiben, deutet diese Erkenntnis darauf hin, dass *DNMT3A<sup>mut</sup>* HSCs Jahre oder Monate vor Ausbruch der Krankheit auftauchen. Ausführliche Analysen zur klonalen Hämatopoese nach Sequenzierung des Genoms von 42000 Personen ohne hämatologische Veränderungen in drei Studien unterstreichen diese Theorie. [184] [54] [77] Die Hämatopoese / Blutbildung bzw. die peripheren blutbildenden Zellen stammen mit zunehmendem Alter aus immer weniger HSCs ab - bei einer 70 - jährigen Person zu 5% - 10% aus einer einzigen blutbildenden Stammzelle. Bei Personen, die diese Genom Varianz aufzeigen, wurden weitere Mutationen gefunden, die mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht werden. Die meisten der Mutationsträger haben dennoch keine hämatologischen Krankheiten entwickelt. Von Bedeutung scheint hier, die Häufung der verschiedenen Mutationen in einem Genom. [77] Diese Veränderung

im Laufe der Lebenszeit zeigt den Verdrängungswettbewerb im KM. Die Stammzelle mit einer vorteilhaften Mutation kann langfristig andere Stammzellen dominieren und je nach Mutation auch einen Verlust der *DNMT3A* Funktion auslösen. Diese Erkenntnisse untermauern die Theorie der prä-leukämischen Stammzellen, welche häufig *DNMT3A*<sup>mut</sup> aufweisen. Eine Leukämie selbst wird durch diese Mutationen vermutlich nicht ausgelöst, doch bedeuten diese genetischen Alterationen sehr wahrscheinlich eine Prädisposition. [16] [112] [15] In bisherigen Studien wurde belegt, dass *DNMT3A*<sup>mut</sup> zu ca. 15 - 25% bei AML Patienten auftreten. Hier wurde in 60 - 70% der Fälle eine Arginin-Histamin Substitution am Codon 882 festgestellt, welche den Verlust der Methylierungsaktivität zur Folge hat. [51] Hinsichtlich der prognostischen Wertigkeit von *DNMT3A*<sup>mut</sup> gibt es unterschiedliche Studien. Von Bedeutung scheint in diesem Zusammenhang auch die Lokalisation der Mutation zu sein. In einer Studie, welche 1770 Patienten jüngeren Alters umfasste, wurden *DNMT3A*<sup>mut</sup> in ca. 20,9% der AML Patienten gefunden. *DNMT3A*<sup>mut</sup> war mit höherem Alter ( $p < 0,01$ ), einer erhöhten Zahl an Leukozyten ( $p < 0,01$ ), *NPM1*<sup>mut</sup> ( $p < 0,01$ ), *FLT3*-ITD ( $p < 0,01$ ) und *IDH1*<sup>mut</sup> / *IDH2*<sup>mut</sup> ( $p < 0,01$ ) sowie mit CN-AML ( $p < 0,01$ ), assoziiert. Ältere Patienten mit nur einer Mutation im Exon 23 an Codon 882 hatten ein besseres OS als jüngere Patienten mit Mutationen in einem anderen Exon / Codon. [106] In der genannten Studie konnte jedoch kein Einfluss auf das Gesamtüberleben festgestellt werden. Unterscheidet man jedoch zwischen *DNMT3A*<sup>mut</sup>-R882 und *DNMT3A*<sup>mut</sup>-non R882, ergibt *DNMT3A*<sup>mut</sup>-R882 eine schlechtere Prognose im Vergleich zu *DNMT3A*<sup>mut</sup>-non R882. [49] Außer in der AML wurden *DNMT3A*<sup>mut</sup> mittlerweile in einer Vielzahl von hämatologischen Neoplasien in unterschiedlicher Häufigkeit beschrieben (siehe Tabelle 8). Auch in *DNMT1* und *DNMT3B* wurde eine geringe Anzahl von Mutationen festgestellt. Die enorme Häufigkeit von *DNMT3A* Mutationen bei einer Vielzahl von Krankheiten zeigt, wie wichtig dieses Gen in der Pathogenese, aber möglicherweise auch in der Krankheitsprävention sein könnte. [13] [73]

**Tabelle 7: Häufigkeit von Dysplasien** (modifiziert nach Yang [189])

Die unterschiedlichen Häufungen innerhalb von AML hängt mit von der Anzahl der Patienten ab und davon ob das gesamte Gen *DNMT3A* untersucht wurde oder nur die bekannten „Hotspots“. **AITL**: Angioimmunoblastisches T-Zellen-Lymphom, **ALL**: akute lymphatische Leukämie, **AML**: akute myeloische Leukämie, **CML**: chronische myeloische Leukämie, **CMML**: chronische myelomonozytäre Leukämie, **CN AML**: zytogenetisch normale AML, **ET**: *essential thrombocytosis*, **ETP**: *Early T-cell Precursor*, **JMML**: juvenile myelomonozytäre Leukämie. **MDS**: Myelodysplastisches Syndrom, **MPAL**: *Mixed-phenotype acute leukemia*. **MPN**: Myeloproliferativen Neoplasien. **PMF**: Primäre Myelofibrose, **PTCL**: Periphere T-Zell-Lymphome, **PCTL-NOS**: Periphere T-Zell-Lymphome nicht näher spezifiziert, **PV**: *Polycythaemia vera*/ Polyzythämie, **sAML**, sekundär AML, **T-ALL**: T Zellen ALL, **tAML**: therapie bezogene AML, **tMDS**, Therapie bezogenes MDS

Häufigkeit von	Patientenanteil in	(%)	Quellen
<b>AML</b>	<i>de novo</i> AML	62/281 (22.1)	[93]
	CN AML	44/120 (36.7)	
	<i>de novo</i> AML	70/500 (14)	[26]
	CN AML	51/223 (22.9)	
	<60 Jahre CN AML	64/181 (35.5)	[106]
	≥60 Jahre CN AML	77/234 (33.3)	
	sAML	13/37 (35) (10/27 (37) durch MDS; 3/10 (33) durch MPN	[44]
	tAML	10/59 (17)	
	pädiatrische AML	3/140 (2.1)	[67]
<b>MDS</b>	adulte <i>de novo</i> MDS	127/944 (13.5)	[61]
	pädiatrische MDS, tMDS	0/44	[150]
<b>MPN</b>	MPN (ganze Kohorte)	10/155 (9)	[154]
	PMF	1/16 (6)	
	PV	2/30(7)	
	ET	0/30 (0)	
	Blastenkrise MPN	5/35 (14)	
	systemische Mastozytose	3/26 (12)	[169]
	CML	0/79	[96]
<b>CMML und JMML</b>	CMML	5/227 (2)	[75]
	CMML-1	1/48 (2)	[79],[85]
	CMML-2	1/16 (6.3)	
	sAML aus CMML	6/23 (26)	
	JMML	1/113 (0.8)	[183]
<b>T Zell Leukämie und T Zell Lymphom</b>	T-Zell Lymphom	11/96 (11)	[26]
	PTCL	21/79 (26.6)	[145]
	PTCL-NOS	9/33 (27.3)	
	AITL	12/46 (26.1)	
	Adult T-ALL (ganze Kohorte)	16/83 (18)	[59]
	Frühe T-Zell Leukämie	10/38 (26.3)	
	Kortikale T-ALL	5/39 (12.8)	
	Adult ETP ALL	11/68 (16)	[124]
	pädiatrische T-ALL	0/91	
	pädiatrische ETP ALL	0/12	[193]

Fortsetzung Tabelle 7 auf Seite 30

Fortsetzung Tabelle 7

MPAL	adulte T-Zellen und myeloische MPAL	10/18 (55.6)	[23]
	Paediatric mixed lineage leukaemia	0/20	[73]

## 1.4 Zielsetzung

Durch die Untersuchung von 750 älteren Patienten bezüglich des Vorliegens einer Genmutation in *DNMT3A* soll diese Studie zur Verbesserung der molekularen Charakterisierung der AML des älteren Patienten beitragen. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist, die Inzidenz von *DNMT3A* Mutationen in einer homogenen und intensiv behandelten Patientenkohorte zu bestimmen und ihre Assoziation mit klinischen Charakteristika sowie zyto- und molekulargenetischen Veränderungen zu untersuchen. Darüber hinaus wurde die prognostische Wertigkeit dieser Mutation bei älteren Patienten analysiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialgewinnung und Aufbereitung

#### 2.1.1 Instrumente und Reagenzien

Mikrotiterplatten U-Form	ANICIN S.R.L.
Handschuhe, Unt, Nitril, Pf, unst. Gr.M	Ansell GMBH
MicroAmp 8-Tube Strip	Applied Biosystems
MicroAmp Clear Adhesive Films	Applied Biosystems
96 Well Plate Septa	Applied Biosystems
Micro Amp Optical 96-well	Applied Biosystems
Capillary Array 16x50cm	Applied Biosystems
Septa Cathode Buffer Container (3500Dx)	Applied Biosystems
5mL Microtube, natural (250/PK)	Argos Techn.
BD-TIPS Sterile 0,5 ML Bio-Cert 1 * 100ST	Brand
BD-Tips, Brand, Volumen: 2,5 ml, Typ: steril 1 * 100 ST	Brand
Alufolie extra breit/extra stark (Normale Haushaltsfolie)	CATBUY
Aluminium Klebefolie Costar	CORNING
Orig. Videoprinterpapier K 65 HM/KP 65 H (Mitsubishi)	DIAGRAMM-HALBACH
Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5mL	Eppendorf
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5mL	Eppendorf
Eppendorf Reaktionsgefäße 2,0mL	Eppendorf
Combitips 12,5 ml Standard	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 5 ml, natur	Fisher Scientific
Markierungspunkte 8 mm, leuchtrot	HERMA, Vario
Markierungspunkte 8 mm, leuchtorange	HERMA, Vario
Mülleimer 30L (Sondermüllbehälter)	INFA LENTJES
gr.blaue Rolle (Papier)Kimwipes 7301 33x38cm 2lagig	Kimberly Clark
Kleenex God 7102 Lite 100	Kimberly Clark
Kimtech fusselfreie Labortücher	Kimberly Clark
Autoklavier-Klebeband mit Indikator	Medipha, Geislingen
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	QIAGEN
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore (1024)	QIAGEN
Kryo-Box (aus Karton, beschichtet) 136*136*50	Ratiolab
Kryo-Box, beschichtet 136x136x50 (blau)	Ratiolab

Kryo-Box, beschichtet 136x136x50 (gelb)	Ratiolab
Kryo-Box, beschichtet 136x136x50 (grün)	Ratiolab
Kryo-Box, beschichtet 136x136x50 (rot)	Ratiolab
Kryo-Box, beschichtet 136x136x50 (weiß)	Ratiolab
ratiolab® Rastereinsätze für Kryo-Boxen, Raster 10 x 10	Ratiolab
Rastereinsatz für Kryo-Box	Ratiolab
Rastereinsatz Kryo-Box 133x133 mm 14x14 Stück	Ratiolab
Rastereinsatz Kryo-Box 133x133 mm 10 x10 Stück	Ratiolab
Vernichtungsbeutel	Ratiolab
Roti®-Tape-Markierbänder, Länge 12,7 m, Kern-Ø 2,54 cm	ROTH CARL
Rotilabo Reaktionsgefäße 5 ml, farblose	ROTH CARL
Aufbewahrungsbox 81 Plätzig, Pink 1ST	ROTH CARL
Aufbewahrungsbox 81 Plätzig, Orange 1ST	ROTH CARL
Rotilabo®-Eisbehälter, rund, 4 l Inhalt etwa 4 l. Höhe 200 mm	ROTH CARL
Rotilabo®-Eisbehälter, rund, 2,5 l Inhalt etwa 2,5 l. Höhe 130 mm	ROTH CARL
Biosphere Tip 2,5µL farblos	SARSTEDT
Biosphere Filter Tip 10 µl, farblos	SARSTEDT
Biosphere Filter Tip 20µL farblos	SARSTEDT
Biosphere Filter Tip 20 µl, gelb	SARSTEDT
Biosphere Filter Tip 100 µl, gelb	SARSTEDT
Biosphere Filter Tip 200 µl farblos	SARSTEDT
Biosphere Filter Tips, 1250 µl, extra long	SARSTEDT
Pipettenspitze gelb, 200 µl, zu 500 im Beutel, lose	SARSTEDT
Pipettenspitze farblose, 20 µl, 1.000 Stück, lose	SARSTEDT
SafeSeal Gefäß 0,5ml	SARSTEDT
Reaktionsgefäß 1,5ml, SafeSeal	SARSTEDT
Reaktionsgefäß 2,0ml SafeSeal	SARSTEDT
Plastiksack gelb 90 l	VFW AG
Pasteur Pipette 7 ml (Einmalpipette)	VWR
Küvetten, Halbmikro, PS	VWR
Zentrifugenröhrchen, mit Stehrand, 50 ml (Falcon)	VWR
Lab-Marker (schwarz)	VWR
Lab-Marker extra fein (schwarz)	VWR
Marker II für Kulturgefäße (schwarz)	VWR
Spritzflaschen 500mL PE-LD	VWR

Alufolie 600mmx100m (dicke Industriefolie)	VWR
Druckluft- Entstaubespray 200mL	VWR
Pipettenständer acryl für 5 Pipetten	VWR
Etiketten Cryo-Babies	VWR
Reaktionsgefäßgestelle 5ST Stellplätze 96	VWR
Erlenmeyerkolben Weithals 500mL	VWR
PCR-Cooler,0,2mL (Starter-Set)	VWR
Reaktionsgefäßgestelle 96-Platz, Sortiert	VWR
PCR-Platte 96-well mit Halbrand, transparent, 1*100 ST	VWR
Gestell für 5 ml Tubes	VWR
Einmal-Wägeschalen	VWR
Einmal-Wägeschalen (klein)	VWR
Einmal-Wägeschalen (mittel)	VWR
Parafilm M 10cmx38m	VWR

#### 2.1.1.1 Hilfsmittel

Applikator für Optical Films	Applied Biosystems
IsoTherm Kühlakku mit Isolierbox	Eppendorf
IsoTherm Kühlakku	Eppendorf
Kanülenentsorgungsbox, 4 L	Schwarz GmbH
Drucker HP Laserjet 1300	HP
Elektrophoresekammern mit Schlitten, Schiene, Kabeln und Kämmen	OWLSeparation System
Rotilabo-Eisbehälter, rund, 4 l, Höhe 200 mm	ROTH CARL
Rotilabo-Eisbehälter, rund, 2,5 l, Höhe 130 mm	ROTH CARL
Rotilabo-Kombi Racks 4 in 1, längliche Form	ROTH CARL
Erlenmeyerkolben Weithals, 500 ml	VWR
Gestell für 5 ml Tubes	VWR
Röhrchengestell für 50 ml Falcons	VWR
Magnetührstäbchen	VWR
Mini-Cooler	VWR
Metallwannen für Ethidiumbromidlösung	VWR
Reaktionsgefäß-Ständer 0,2 ml	VWR
Reaktionsgefäß-Ständer 1,5 ml	VWR
Metallständer für 0,2 ml Tubes	VWR
Metallständer für 2,0 ml Tubes	VWR

Metallständer für 1,5 ml Tubes

VWR

### 2.1.1.2 Reagenzien

Supersasin (Rnase Inhibitor) (2500U)

Ambion

Natriumacetat 3M, pH 5,5

Ambion

0,5 M EDTA pH 8.0

Ambion

1 M Tris pH 8.0

Ambion

3500xLDx Genetic Analyzer Capillary Array, 50 cm

Biosystems

POP-7TM (384) Polymer for 3500 Dx/3500xL

Applied

POP-7TM (960) Polymer for 3500 Dx/3500xL

Biosystems

Anode Buffer Container for 3500 Dx/3500xL Dx

Applied

Cathode Buffer Container for 3500 Dx/3500xL Dx

Biosystems

Conditioning Reagent for 3500 Dx/3500xL Dx

Applied

3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzer Sequencing Standard, BigDye ® Terminator v3.1

Install

Biosystems

Hi-DiTM Formamide (5ml) for 3500Dx/3500xL Dx

Applied

DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)

Biosystems

POP 7, 3130, 7,0mL

Applied

POP 7, 3130, 3,5mL

Biosystems

GeneScan 500Rox Size Standard

Applied

GeneScan 1200 LIZ Size Standard

Biosystems

GeneScan 600 LIZ Size Standard

Applied

GeneScan 1000 Rox Size Standard

Biosystems

Hi-Di Formamide

Applied

10x Buffer with EDTA

Biosystems

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

Applied

BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit

Biosystems

Big Dye Terminator 5x Sequenzierpuffer

Applied

Biosystems

5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems
Multi-Capillary DS-30 (Dye Set D) Matrix Std Kit	Applied Biosystems
Big Dye Terminator v3.1 Matrix Std Kit 3130/3100	Applied Biosystems
Big Dye Terminator v1.1 Matrix Std Kit 3130/3100	Applied Biosystems
Ampli-Taq-Gold Polymerase 12-Pack	Applied Biosystems
Random Hexamers	Applied Biosystems
GeneAmp dNTP blend 100mM	Applied Biosystems
Taq Man RNase P Fast 96Well Instrument Verification Plate	Applied Biosystems
7900HT System FAST 96-Well Spectral Calibration Kit	Applied Biosystems
Taq Man FAST Reagents Starter Kit 50 Reaktionen	Applied Biosystems
Sequence Detection Systems 384-Well Spectral Calibrationkit	Applied Biosystems
TaqMan 1000Rxn Gold Buffer A Pack	Applied Biosystems
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems
TaqMan Universal PCR Master Mix, 10-Pack (10x5mL)	Applied Biosystems
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
TaqMan PCR Core Reagent Kit	Applied Biosystems
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems
7900HT TaqMan® Low Density Array Instrument Verification RNase P Kit	Applied Biosystems
GeneScan Installation Kit DS-33	Applied Biosystems
Big Dye Terminator v1.1/ Sequencing Standard Kit	Applied Biosystems
TaqMan Reagents Starter Kit, 50 Reactions	Applied Biosystems
ISO-SEPTOL 70% 500ML 1 FLA	Apotheke
PBS Dulbecco	Biochrom AG
Aqua ad iniectabilia Braun	Braun
Lifosan Soft	Braun
Natriumacetat 3 Mol	Cambrex
Ampuwa für Spülzwecke (6x 1000ml)	Fresenius

RedSafe "Nucleic Acid Staining Solution (20,000x)"	Intron Biotechnology
0,5M EDTA, pH 8.0, 4x 100 ml	Invitrogen/Gibco
TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
TrackIt 100bp Ladder	Invitrogen
UltraPure™ DEPC-Treated Water (4x100ml)	Invitrogen
Platinum Taq Polymerase	Invitrogen
Discoverase dHPLC DNA Polymerase	Invitrogen
DNAzol Reagenz 100 ml	Invitrogen
TRizol Reagenz, 100 ml	Invitrogen
Glycogen, 100 µl, 20 µg/µl	Invitrogen
NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen Molecular Bioproducts
Rnase Away, 475 ml Sprayflasche	Promega
Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor	Promega
AllPrep DNA/RNA Mini Kit (50)	Qiagen
QIAshredder (250)	Qiagen
Allprep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen
QIAquick 96 PCR Purification Kit (4)	Qiagen
QIAquick 96 PCR Purification Kit (24)	Qiagen
QIAquick 96 PCR Purification Kit (24) Platten	Qiagen
QIAxcel DNA High Resoulution Kit (1200)	Qiagen
QIAxcel Wash Buffer 40ml, separat	Qiagen
QIAxcel Seperation Buffer 40ml, separat	Qiagen
Qx DNA Size Marker 50-800bp (50 µl)	Qiagen
Qx Aligment Marker 15bp/3kb	Qiagen
Qx Intensity Calibration Marker	Qiagen
Qx Nitrogen Cylinder (6)	Qiagen
HotStarTaq DNA Polymerase 1000 units	Qiagen
HotStarTaq Plus DNA Polymerase 1000 units	Qiagen
Rnase-Free Dnase Set	Qiagen
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen
QIAprep Spin Mini Prep (250)	Qiagen
QIAprep Spin Mini Prep (50)	Qiagen
EndoFree Plasmid Maxi Kit (10)	Qiagen

Reagent Bottles, 30 ml (6)	Qiagen
RPE-Puffer (aus AllPrep-Kit)	Qiagen
Desoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade	Invitrogen
Ethidiumbromidlösung 1%; 10mg/mL;	Roth
DMSO (100 ml)	Sigma Aldrich
2-Mercaptoethanol, 100ml	Sigma Aldrich
Agarose Typ I, 250g	Sigma Aldrich
Agarose for Routine, 500g	Sigma Aldrich
Proteinase K, 100 mg	Sigma Aldrich
Ethanol absolut puriss p.a.	VWR
1x TAE Puffer	Eigene Herstellung
Ladepuffer Orange G	Eigene Herstellung

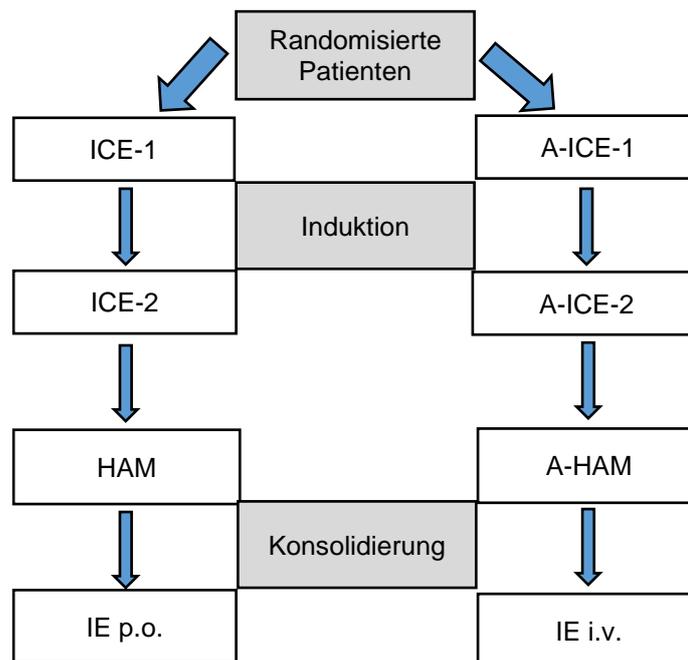
### 2.1.2 Patientenkohorte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden KM- und/oder PB-Proben von 750 Patienten aus den prospektiven multizentrischen Phase III Studien AML HD98B (n= 307 Patienten) und AMLSG 06-04 (n= 443 Patienten) der Deutsch-Österreichischen AML Studiengruppe (AMLSG) verwendet. Bei Diagnosestellung und Studieneinschluss wurde von jedem Patienten KM und/oder PB gewonnen und von den teilnehmenden Zentren an die zentralen Referenzlabore der AMLSG Ulm und Hannover (Leitung Prof. Dr. Ganser) gesendet, welche eine Extraktion der leukämischen Zellen durchführten und aus diesen Zellen dann die DNA isolierten. Je nach Verfügbarkeit wurde präferentiell eine DNA-Probe aus KM verwendet. War KM nicht vorhanden, wurde die Analyse mit DNA aus PB durchgeführt. Die Bestimmung der Karyotypen fand zentral im AMLSG Labor für zytogenetische und molekulargenetische Diagnostik nach den Richtlinien des Internationalen Systems für zytogenetische Nomenklatur (ISCN) statt. Eine schriftliche Einverständniserklärung aller Patienten gemäß der Helsinki-Deklaration nach Aufklärung über den Charakter der Studien lag vor. Diese galt für die Aufbewahrung der Proben und deren weiteren Verwendung sowie für die Behandlung. Die Studien waren durch die zuständige Ethikkommission genehmigt worden und bei ClinicalTrials.gov registriert. Das

Material wurde nach Entnahme im Verhältnis 1:10 (Natrium – Heparin) heparinisiert. Die Patienten dieser Arbeit waren zwischen 58 und 85 Jahre alt.

### 2.1.3 AML HD98B

Bei AML HD98B handelt es sich um eine Studie von 310 Probanden mit abgeschlossener Rekrutierungsphase. Zur Anwendung kam eine randomisierte Doppelinduktion mit ICE (Idarubicin, Cytarabin und Etoposid) versus ICE + ATRA (*all-trans*-Retinsäure/Tretinoin). Die klinische Prüfung fand unter der Leitung von Prof. Dr. H. Döhner, Universitätsklinikum Ulm statt. Therapieschema siehe Abbildung 3.

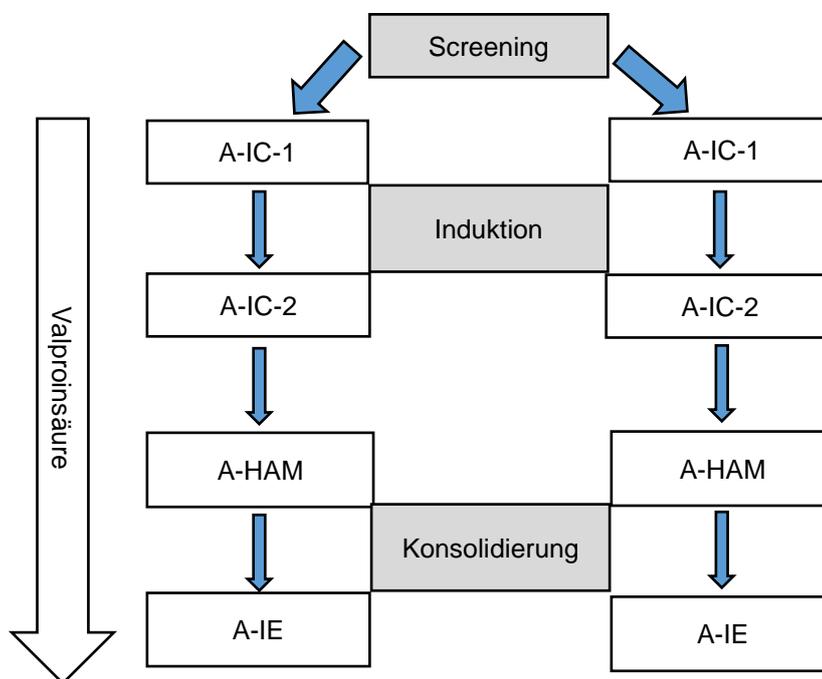


**Abbildung 3:** Therapieschema AML HD98B

**Erläuterungen:** **ICE:** Idarubicin, Cytarabin und Etoposid, **A-ICE:** *all-trans*-Retinsäure/ Tretinoin + Idarubicin, Cytarabin und Etoposid, **HAM:** HAM Schema – Cytarabin, Mitoxantron, **IE:** Idarubicin, Etoposid, **p.o.:** orale Gabe, **i.v.:** intravenöse Gabe.

### 2.1.4 AMLSG 06-04

Bei der AMLSG 06-04 handelt es sich um eine Studie mit 450 Probanden mit ebenfalls abgeschlossener Rekrutierungsphase. Es handelte sich um eine Phase III Studie über die Wirksamkeit von Valproinsäure in Kombination mit All-trans-Retinol, Standard-Induktions- und Konsolidierungstherapie bei älteren Patienten mit neu diagnostizierter AML. (siehe Abbildung 4) Die klinische Prüfung dieser Studie fand unter der Leitung von Prof. Dr. R. F. Schlenk, Universitätsklinikum Ulm statt.



**Abbildung 4:** Therapieschema AMLSG 06-04

**Erläuterungen:** IC: Idarubicin, Cytarabin, **A-IC:** *all-trans*-Retinsäure/ Tretinoin + Idarubicin, Cytarabin **HAM:** HAM Schema – Cytarabin, Mitoxantron, **IE:** Idarubicin, Etoposid.

### 2.1.5 Zellisolation und Zellarchivierung

Um aus dem oben genannten Material die gewünschten mononukleären Zellen zu erhalten, wurde das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation nach Ficoll angewandt. Die KM und/ oder PB Proben wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:3 mit RPMI 1640 Kulturmedium verdünnt, anschließend auf ein Ficoll Medium (*ficoll seperating*) im Verhältnis 1:2 geschichtet und dann bei 2800 U/min für 20 Minuten zentrifugiert.

Durch diesen Vorgang gelangt die mononukleäre Zellfraktion aufgrund der unterschiedlichen Dichtegradienten zwischen Plasma und Ficollschicht und kann von dort mit einer sterilen Pipette entnommen werden. Blutzellen mit höherer Dichte sowie tote Zellen gelangten durch die Zentrifugation auf den Boden des Gefäßes. Nach zweimaligem Waschen mit 50 ml RPMI 1640 Medium (Zentrifugation bei 1200 U/min für 10 Minuten bei Raumtemperatur) wurde die Zellzahl mittels Zellcounter bestimmt. Die Waschvorgänge dienen dazu, Verunreinigungen sowie eventuelle Ficollreste zu entfernen. Die mononukleäre Zellfraktion wurde im Anschluss als Zellpellet zu einer Größe von je  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Folgende Arbeitsschritte waren Bestandteil der experimentellen Arbeit: Aus mononukleären Zellen der gewonnenen Proben wurde die DNA extrahiert und mittels Polymerase - Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Auswertung einer Gelelektrophorese gibt Auskunft über die Qualität des PCR Produkts. Bei Verunreinigung oder negativem Ergebnis musste die PCR wiederholt werden. Bei erfolgreicher Gelkontrolle konnten die PCR Produkte aufgereinigt und eine *Cycle Sequencing Reaction* (CSR) durchgeführt werden. Nach einer letzten Aufreinigung wurde das Produkt mittels Kapillarelektrophorese sequenziert.

### 2.1.6 DNA Extraktion

Allprep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland
Qia Shredder	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland
Allprep Mini Spin Clumns	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland
QIAquick Collection Tubes 1,5ml und 2ml	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland
RLT Plus Puffer	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland
AW1 Puffer (Konzentrat)	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland
AW2 Puffer (Konzentrat)	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland
EB Puffer	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland

Das AllPrep DNA/RNA Mini Kit von Qiagen wurde zur DNA Extraktion verwendet. Das noch gefrorene Zellpellet wurde mit 600 µl RLT Plus-Puffer gelöst und gemischt. Es kommt aus zwei Gründen zur Denaturierung: Zum einen ist Guanidiniumthiocyanat Bestandteil des RLT Plus Puffers. Dies ist ein chaotropes, also strukturbrechendes Salz und zerstört so Wasserstoffbrückenbindungen, indem

es diese teilweise aufbricht. Zum anderen reduziert das  $\beta$ -Mercaptoethanol Disulfidbrücken zu freien Thiolen, so dass es gemeinsam mit dem Guanidiniumthiocyanat eine denaturierende und reduzierende Wirkung auf Proteine hat. Das entstandene Lysat wurde auf eine QIAshredder Säule pipettiert und bei 4 °C für 3 Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert. Dadurch blieben Zelltrümmer zurück und das Lysat wurde gereinigt. Das entstandene Homogenat wurde auf eine AllPrep DNA Spin Column (Säule) pipettiert und eine weitere Minute bei 13000 U/min zentrifugiert. Dieser Vorgang diente der Bindung der DNA in der Säule. Die Säulen wurden daraufhin in ein neues Sammel tube gestellt, mit 500  $\mu$ l AW1-Puffer gewaschen und für eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Der AW1-Waschpuffer wirkte chaotrop, so dass erneut Proteine denaturiert und während der Zentrifugation ausgewaschen wurden. Nachfolgend wurde 500  $\mu$ l AW2-Puffer aufgetragen, zwei Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert und dann der Durchfluss verworfen. Dies hat den Zweck noch verbliebene Salze auszuspülen. Die folgende Trockenzentrifugation von einer Minute mit neuem Auffanggefäß bei 13000 U/min diente dazu, Reste der Pufferlösung zu entfernen. 100  $\mu$ l EB Puffer wurden danach zur Eluation der DNA auf die Säulenmembran gegeben. Nach einer Minute Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Säulen mit 13000 U/min für eine Minute abzentrifugiert. Zur visuellen Kontrolle wurde eine Gelelektrophorese und eine Messung per Nanodrop durchgeführt. Bei letzterem wurde die DNA Konzentration gemessen und mit destilliertem Wasser auf 20 ng/ $\mu$ l verdünnt und anschließend zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren. Näheres zum Ablauf der Gelelektrophorese unter 2.3 Agarose Gelelektrophorese.

## 2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Ampli-Taq-Gold Polymerase 12-Pack	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
10mM dNTPs	Invitrogen, Life Technologies GMBH, Darmstadt, Deutschland
Nukleases-freies Wasser	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Centrifuge Minispin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermocycler Gene Amp 2400/2700/2720	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Eine Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation von DNA *in vitro*. Bei der vorliegenden Arbeit wurde die kodierende Gensequenz von *DNMT3A* (Exon 11 - 23) in der jeweiligen Patienten-DNA durch die PCR vervielfältigt.

### 2.2.1 PCR Protokoll:

Mastermix für eine Probe

Mastermix	$\mu\text{l}$
Anzahl -->	1x
A.D.	34,7
Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub>	3,6
dNTP's	0,4
Primer F	2,0
Primer R	2,0
AmpliTaq	0,3
50 ng/ $\mu\text{l}$ DNA	1

#### 2.2.1.1 Ablauf einer PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein zyklischer Prozess, bei dem drei Schritte immer wieder ablaufen, bis die Reaktion zum Erliegen kommt. **1.** Schmelzen der doppelsträngigen DNA (Denaturierung) Die Kopiervorlage (*Template*) für die PCR ist in den meisten Fällen eine doppelsträngige DNA. Bei hohen Temperaturen von üblicherweise 92 °C schmilzt der DNA-Doppelstrang innerhalb von 30 Sekunden in zwei einzelne, komplementäre DNA-Stränge. Dieser Schritt dauerte 30 Sekunden bei 94 °C. **2.** Binden kurzer Oligonukleotide an die einzelsträngige DNA (Primer-Annealing). Ein Primer besteht aus einem einzelsträngigen DNA-Fragment. Dieser Primer findet auf der ebenfalls einzelsträngigen DNA seinen Gegenpart, eine zu diesem Primer komplementäre Sequenz an, welche er bindet. Die Temperatur für die Durchführung dieses Schrittes hängt von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer ab und wird für jedes Experiment genau berechnet. Wurde die Temperatur zu hoch gewählt, kann der Primer nicht mehr binden. Wurde sie zu niedrig eingestellt, bindet der Primer auch an anderen Stellen an die DNA. Übliche Bedingungen sind beispielsweise 50 - 60 °C für 30 Sekunden. In dieser Arbeit

wurden 61 °C für 30 Sekunden gehalten. **3.** Verlängerung des Primers durch das Enzym DNA-Polymerase (Primer-Extension). Die DNA-Polymerase ist ein Enzym, welches einzelsträngige DNA wieder zu einem Doppelstrang ergänzt. Dafür wird allerdings ein kurzes Stück Doppelstrang benötigt, wie es im vorherigen Schritt durch die Bindung des Primers an die DNA entstanden ist. Die DNA-Polymerase erkennt das freie 3'-Ende des Primers und fügt ein Nucleotid nach dem anderen an, bis der DNA-Doppelstrang wieder vollständig ist. Dieser Schritt erfolgt beim Temperaturoptimum der Polymerase, d.h. im Fall einer hitzestabilen Polymerase bei einer Temperatur von ca. 72 °C für 60 Sekunden. Das Ergebnis dieser drei Schritte einer PCR sind zwei DNA-Moleküle, die beide wieder zum Doppelstrang ergänzt worden sind. Nach Abschluss dieses letzten Schrittes beginnt der Zyklus von vorne - beide Doppelstränge werden zu nun vier Einzelsträngen aufgeschmolzen und erneut zu vier Doppelsträngen ergänzt. Der Zyklus wurde insgesamt 30 Mal wiederholt.

#### PCR Zyklus:

30 Zyklen		
1.	94°C	30 sec
2.	61°C	30 sec
3.	72°C	1 min

#### 2.2.1.2 Primer

Die kodierende Sequenz des *DNMT3A*-Gens kann in 11 Exons aufgeteilt werden, so dass insgesamt acht PCR-Reaktionen, jeweils mit dem entsprechenden Primerpaar (bestehend aus einem Vorwärtsprimer und einem Rückwärtsprimer) durchgeführt wurden. Die Vorwärtsprimer lasen in der 5'3' Richtung den DNA-Strang und wurden mit einem „F“ für *forward* abgekürzt. Die Rückwärtsprimer lasen dagegen in 3'5' Richtung und wurden mit „R“ für *reverse* gekennzeichnet. Da alle verwendeten Primer einen M13-*tag* haben, war es bei der folgenden Sequenzierung (siehe Abschnitt 2.5. CSR) möglich, alle Exons mit dem M13-Primer zu sequenzieren.

Es kamen folgende Primer zum Einsatz:

Exon 11/12	ACCCCACTGTAAGGAGGGTGGG	TACTCTGCCCCATGCCACACTA
Exon 13	GGAGAGGCCCTTCGGTGGTACT	TACATGCCCAGAAGCGGTGGAC
Exon 14	GGTGTGGAGCCTCCCTTCGTC	GAGGCCAAGGTGTGCTACCTGGA
Exon 15/16	TCCAGGTAGCACACCTTGGCCT	TTTTGCCAGAGTTGCCACACA
Exon 17	TAGGACTTGGGCCTACAGCTGAC	ATGAAAGGAGGCAAGGGCTGCCT
Exon 18	TGCAGCTAGGGTCGTGAGCCTG	CGGGAATAGCTGTCCCAGGGCAG
Exon 19	CCCGATGACCCTGTCTTCCCGT	TTCCCAAACAGGCCCTTGCA
Exon 20	CAGCATGCCGGCGCTGTTTCAT	CCACTATGGGTCATCCCACCTGCA
Exon 21	GTGAACTAGTGGCTGCTGGGGGAG	CGCTCCACCTCATCTGCCCTTCC
Exon 22	GCATGACCAGTGTGGCTGGTGA	TGGGAAAGGCAGAGGACCCCG
Exon 23	CCGGGTCCTGCTGTGTGGTGA	GGTGCTGATACTTCTCTCCATCCT

Der Primer, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), die Ampli-taq-Gold DNA Polymerase (5 U/μl) und der 10x-Puffer (500 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3) wurden von der Firma Applied Biosystems geliefert, die Nukleotide von der Firma Invitrogen, Life Technologies GmbH. Bei jedem hergestellten Mastermix wurde ein Ansatz ohne Zugabe von DNA als Negativkontrolle hergestellt. Dies wird als NTC - *No Template Control* - bezeichnet. Hergestellt werden die Reaktionsansätze auf Eis, um eine Degradation der DNA und der Taq – Polymerase zu verhindern. Um eine Kontamination des erstellten Produkts auszuschließen, wurde im Anschluss eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Mastermix für eine Probe

A.d.	34,7 μl
Puffer	5 μl
MgCl	3,6 μl
dNTPs	0,4 μl
Primer F	2 μl
Primer R	2 μl
AmpliTaq Gold	0,3 μl
	<b>48 + 2 μl DNA (50ng/μl)</b>

## 2.3 Agarose Gelelektrophorese

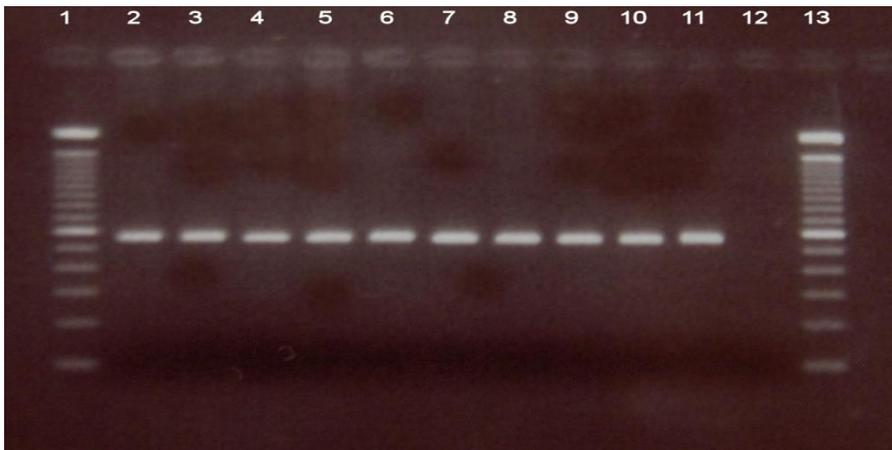
Reagenzien	
SeaKem LE Agarose	Lonza, Rockland, ME USA
DNA Ladder (100bp)	TrackIT Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Ethidium Bromid 0,025%	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Ladepuffer	Orange G Ladepuffer: 1-Phenylazo-2-naphthol-6,8-disulfonsäuredinatriumsalz, 7-Hydroxy-8-phenylazo-1,3-naphthalindisulfonsäuredinatriumsalz.

Puffer und Lösungen	
Agarose Gel, 2%	2g Agarose in 100 ml 1x TAE Puffer
50x TAE Stock Lösung	2 M Tris-Acetate und 50 mM EDTA
1x TAE (Elektrophoresepuffer)	100 ml 50xTAE Stocklösung – 0,04mol/l Tris Acetat, 0,001 mol/l EDTA, pH8,0

Geräte	
Elektrophorese-Gelkammer	Maxi VG, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Stromquelle	Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
UV Licht /Videokamera	G-Box, Syngene, Cambridge, UK

Die Produktkontrolle bestand aus der Durchführung einer Gelelektrophorese. Hierzu war im Vorfeld ein zweiprozentiges Agarosegel vorbereitet worden. Das zweiprozentige Agarosegel setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 2 g Agarose (Sigma Agarose Type I, low EEO) 100 ml TAE-Puffer, welcher aus Tris-Acetate, EDTA und Essigsäure besteht. Hierzu wurden 100 ml TAE-Puffer mit 2 g Agarose in einen Erlenmeyerkolben gegeben, durch Schwenken vermischt und in der Mikrowelle für ca. eine Minute aufgekocht. Zur Vermeidung der Aushärtung des Gels während der Abkühlung wurde das Gel für ca. 10 Minuten auf ein Magnetrührgerät gestellt. Daraufhin wurde das Gel in die mit Stanzkämme vorbereitete Gelform gleichmäßig gegossen und dort bis zur vollständigen Aushärtung für ca. 30 Minuten belassen. Im Anschluss daran wurden die Kämme entfernt und das ausgehärtete Gel in eine Elektrophoresekammer, welche vorab mit einem Wasserbad aus Ethidiumbromid und demineralisiertem Wasser gefüllt wurde, gelegt. Es wurden anschließend 10 µl des PCR Produkts zwecks Überprüfung und Visualisierung in die Kammern des Gels pipettiert. Dadurch können Kontaminationen erkannt bzw. ausgeschlossen werden. Die einzelnen

Segmente wurden mit 10 µl 100bp DNA-Ladder als Kontrolllauf und 10 µl PCR Produkt mit 2 µl Orange G Ladepuffer befüllt. Die Elektrophorese wurde bei 120 mA für ca. 40 Minuten in einer mit 1x TAE Puffer befüllten Elektrophoresekammer durchgeführt. Danach wurde das Gel für 25 Minuten zur Einfärbung in Ethidiumbromidlösung (200 µl 1%-Ethidiumbromid-Lösung in 4 l destilliertem Wasser) eingelegt. Zur Dokumentation wurden die DNA Banden mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. (Siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Agarose-Gel Darstellung

**Erläuterung:** Am linken (1) und rechten (13) Rand findet man die Banden der 100 bp DNA- Ladder. Die Banden 2-11 zeigen ein positives, nicht verunreinigtes Ergebnis. Bande 12 zeigt die Negativ-Kontrolle.

## 2.4 Aufreinigung der PCR Produkte

QIAquick 96 PCR Purification Kit	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland
QIAquick Spin Clumns	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland
QIAquick Collection Tubes	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland
Puffer PE Konzentrat	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland
Puffer PM	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland
Puffer EB	Qiagen GmbH,Hilden , Deutschland

Aufgereinigt wurden nur Produkte, die in der Gelelektrophorese eine korrekte Negativ- und Positiv-Kontrolle gezeigt haben und eine Bande in der erwarteten Fragmentlänge aufwiesen. Um die DNA zuerst an die Säulen zu binden und später wieder eluieren zu können, wurden zur Aufreinigung durch das Verwenden

verschiedener Puffer jeweils die benötigten Salzkonzentrationen und pH-Werte erreicht. Zum Einsatz kam der QIAquick 96 PCR Purification Kit. Im Kit enthalten sind QIAquick Spin Columns, QIAquick Collection Tubes, Puffer PE-Konzentrat, Puffer PM sowie Puffer EB. Im ersten Schritt wurden 200 µl PM Puffer auf das PCR Produkt gegeben und zusammen auf die 96er Filterplatte pipettiert. Die Filterplatte wurde mit einer Auffangschale in eine Vakuumschale (QIAVac base – im Kit enthalten) gesetzt und ein Vakuum von -400 bis -600 mbar angelegt, bis die Flüssigkeit vollständig filtriert war. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde mit der Auffangschale vollständig entsorgt. Die beschriebene Filtrierung erfolgte über eine Silikatgelmembran in der QIA Säule. Im zweiten Schritt wurde eine neue Auffangschale in die Vakuumschale gesetzt und die 96er Filterplatte wieder darauf platziert. Anschließend wurden 750 µl PE Puffer in jedes Kompartiment pipettiert und das Vakuum für 10 Minuten angelegt. Dadurch wurden ungebundene Nukleotide, Enzyme, Salze und Primerreste aus dem PCR Produkt entfernt. Auch hier wurde die aufgefangene Flüssigkeit verworfen. Im dritten Schritt wurde die Filterplatte einmal bei 3800 U/min für 6 Minuten trocken zentrifugiert. Im vierten Schritt wurde eine neue Säulenplatte verwendet und 50 µl EB Puffer in die Kompartiments eluiert und zuletzt die Platte bei 3800 U/min für 6 Minuten abzentrifugiert.

## 2.5 Cycle Sequencing Reaction (CSR)

Reagenzien	
Aqua dest	Braun, Melsungen, Deutschland
5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

### 2.5.1 CSR Protokoll

Mastermix	1x
Aqua dest	10,00
Big Dye	2,00
5x Seq. Buffer	1,00
Primer	1,00

14 µl Mastermix + 1 µl aufgereinigtes PCR Produkt

Primer	Primersequenz
DNMT3A_2F	TGAAGGGAGCCTGCCTCGGTTT
DNMT3A_3R	GTCCCTGCAGGACATACATCACTG
DNMT3A_4R	AGGCCATAGCCTTGGCAAGCA
DNMT3A_5R	ACTCGCCACCCGTGTCCTTCT
DNMT3A_6R	GGGTTAGCCTGAAGGGGAAACTGAG
DNMT3A_7F	TTTCACGGCAAGGCAGCTGGTTG
DNMT3A_8R	CACCACAGGCAGAGTAGGGGTGA
DNMT3A_9R	TGCATACGGGCGAGCGAGGTG
DNMT3A_10F	TTGCCTGTGCCACCCTCACTACTC
DNMT3A_11/12F	ACCCCACTGTAAGGAGGGTGGG
DNMT3A_13R	TACATGCCCCAGAAGCGGTGGAC
DNMT3A_14R	GAGGCCAAGGTGTGCTACCTGGA
DNMT3A_15/16R	TTTTGCCAGAGTTGCCACACA
DNMT3A_17F	TAGGACTTGGGCCTACAGCTGAC
DNMT3A_18F	TGCAGCTAGGGTTCGTGAGCCTG
DNMT3A_19R	TTCCCAAACAGGCCCTTGCA
DNMT3A_20R	CCACTATGGGTCATCCCACCTGCA
DNMT3A_21F	GTGAACTAGTGGCTGCTGGGGGAG
DNMT3A_22R	TGGGAAAGGCAGAGGACCCCG
DNMT3A_23R	GGTGCTGATACTTCTCTCCATCCT

Für eine Sequenzierung der zu untersuchenden *DNMT3A* Exons musste im Folgenden eine CSR (*Cycle Sequencing Reaction*) durchgeführt werden. Ausgangsmaterial sind die aufgereinigten PCR-Produkte. Die CSR ist eine lineare PCR-Amplifikation mit nur einem Primer. Bei der CSR werden nach dem Zufallsprinzip fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (DdNTPs) durch die Polymerase in die entstehenden DNA-Fragmente eingebaut. Die DdNTPs besitzen eine Kettenabbruchfunktion und jeder Einbau eines DdNTP anstatt eines dNTP führt zum Stopp der Synthese: Ergebnis sind viele DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Längen. Die Detektion der verschiedenen Fragmente mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Kettenabbruchnukleotiden geschieht durch elektrophoretische Auftrennung und computergestützte Analyse. Die CSR wurde mit Hilfe eines ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 durchgeführt. Bei der CSR wird im Gegensatz zur PCR entweder der „*forward*“ (Primer F) oder der „*reverse*“ Primer (Primer R) eingesetzt. Das Gesamtvolumen der Reaktion von 14 µl beinhaltet 1 µl aufgereinigtes PCR Produkt, 1 µl Primer (10pmol), 2 µl BigDye BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, 1 µl 5x Sequencing Buffer, 10 µl Nuklease-freies Wasser. Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt:

Aktivierung bei 96°C für zwei Minuten, dann 95°C für 15 Minuten (Denaturierung) und danach 30 Zyklen mit 60 Sekunden bei 55°C (Annealing) und 3 Minuten bei 60°C (Elongation), abschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt und auf eine neue VWR 96 Platte, welche auf Eis gelagert war, pipettiert. Im Anschluss wurde das entstandene CSR-Produkt bis zur Aufreinigung und Sequenzierung in Alufolie verpackt, um eine Schädigung durch UV-Strahlung zu vermeiden und im Kühlschrank gelagert.

#### Zyklen CSR:

25 Zyklen	96°C	2 min
	95°C	15 sec
	55°C	1 min
	60°C	3 min
	4°C	10 min
	4°C	∞

## 2.6 Aufreinigung des CSR Produktes

Reagenzien	
DyeEx 96 Kit (24)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
VWR 96 Platte	VWR Int., Darmstadt, Deutschland
Hi-DiTM Formamide (5ml tube)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Für die Aufreinigung des CSR-Produkts wurde der DyeEX 96 Kit (24) von Qiagen gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Prinzip der Gelchromatographie. Überschüssige ddNTPs, welche beim Sequenzieren störend wirken würden, wurden in diesem Arbeitsschritt aus dem CSR-Produkt entfernt. Als vorbereitenden Arbeitsschritt musste die Dye Ex 96 Säulenplatte nach Abziehen der unteren Folie auf einen Flüssigkeitsauffangbehälter gesetzt werden und bei 2350 U/min 6,5 Minuten lang abzentrifugiert werden. Die Zentrifuge wurde hierfür bei der Beschleunigung auf den Wert 7 und bei der Bremskraft auf den Wert 5 gestellt. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde dann verworfen. Danach wurde unter die Dye Ex Säulenplatte eine VWR Platte gestellt, welche zuvor mit 5 µl Formamid je Kompartiment und dann 15 µl PCR Produkt befüllt

wurden. Säulen, die nicht mit PCR Produkt befüllt werden sollten, wurden lediglich mit 15 µl Formamid befüllt, um die Funktion des Sequenzierers aufrechtzuerhalten. Daraufhin wurde das CSR-Produkt mit einer Achtfach - Multipipette auf die nach der Zentrifugation festen Gelmatrices der DyeEX 96 Plate pipettiert. Anschließend wurde die Dye Ex 96 Säulenplatte mit der untergestellten VWR Platte bei 2350 U/min 6,5 Minuten abzentrifugiert. Das erhaltene Eluat wurde in 0,5 ml Tubes pipettiert.

## 2.7 DNA Sequenzierung

Geräte und Software	
3500 xl Dx Genetex Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
DNASTAR Lasergene SeqMan	DNASTAR Inc., Madison WI, USA

Die Sequenzierung selbst erfolgte computergestützt. Es wurde ein 3500 xl Dx Genetic Analyzer verwendet. Die bei der CSR in verschiedener Größe amplifizierte DNA-Fragmente wurden durch Kapillarelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt. Die Kapillaren waren mit einem polymeren Gel gefüllt. Als Trennsäulen dienten Quarzglas-Kapillaren. Durch elektrokinetische Injektion wurden die aufgereinigten CSR Produkte in die Kapillaren eingebracht. Die Detektion erfolgte durch einen Fluoreszenzdetektor direkt in der Kapillare. Die jeweils fluoreszenzmarkierten DNA-Proben wurden ihrer Länge nach durch Elektrophorese aufgetrennt und passierten bei diesem Vorgang das Detektionsfenster. Dieses wurde in den Polyamidfilm der Kapillare gebrannt bzw. geätzt. Der Sequenziervorgang basierte auf der laserinduzierten Emission der fluoreszierenden DNA-Einzelstränge. Als Lasermedium wurde ein Argon-Ionen-Laser verwendet, der die Farbstoffmoleküle der markierten ddNTPs zur Emission von Fluoreszenz-Signalen stimulierte, sobald diese das Detektionsfenster erreicht hatten. Diese wurden aus allen (bis zu 96) Kapillaren auf einmal gesammelt und durch ein Spektrum separiert. Eine Charge-Coupled-Device-Kamera erkannte die Signale. Weiterhin wurden die ermittelten Rohdaten mit einem internen Längenstandard abgeglichen und mit Hilfe einer Sequenzanalyse-Software in eine lesbare, graphische Darstellung übersetzt. Die terminalen ddNTPs der DNA-Stränge hatten jeweils einen für sie eigenen

Fluoreszenzfarbstoff, so dass man die entstehenden Fluoreszenz-Peaks als Basenfolge des betreffenden Exons von *DNMT3A* zuordnen konnte. Nach abgeschlossenem Durchlauf konnten die Sequenzdaten abgerufen und mittels DNASTAR Lasergene SeqMan analysiert werden.

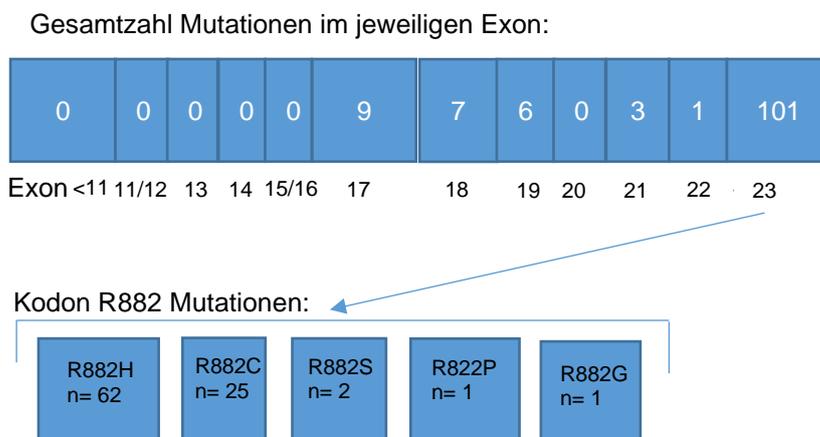
## 2.8 Statistische Analysen

Da der Schwerpunkt der Dissertation aus überwiegend experimentellen Arbeiten bestand, wurde die statistische Analyse der erhobenen Ergebnisse sowie die Korrelation mit klinischen bzw. genetischen Daten durch die Studienzentrale der AMLSG, welche in die Studienzentrale der Klinik für Innere Medizin III (Leitung PD Dr. F. Stegelmann) integriert ist, durchgeführt. Für diese Analysen wurde der Wilcoxon-Test sowie der Fisher-exakte-Test verwendet. Zur Darstellung der Überlebenszeiten wurden Kaplan-Meier Kurven verwendet. Gruppenunterschiede im Hinblick auf das Überleben wurden mittels des Log-rank Tests analysiert. Für alle Tests galt das Signifikanzniveau  $p < 0.05$

### 3 Ergebnisteil

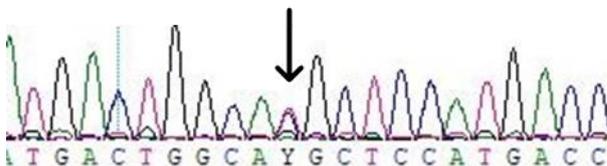
#### 3.1 Häufigkeit und Beschreibung der *DNMT3A* Mutationen

Ziel dieser experimentellen Dissertation war die Untersuchung von der *DNMT3A*<sup>mut</sup> bei älteren AML Patienten aus den Studien AML HD98B und AMLSG 06-04. In der Gesamtkohorte von 750 Patienten (AML HD98B, n= 307, AMLSG 06-04, n= 443) konnte bei 127 Patienten eine *DNMT3A*<sup>mut</sup> (16,7%) nachgewiesen werden. Hierunter waren 4 Deletionen in den Exons 18,19 und 21, welche zu einer Verschiebung des Leserahmens führten. Insgesamt wurden 101 Substitutionen im Exon 23 detektiert, davon waren 91 im Kodon R882 gelegen (siehe Abbildung 6). Zwei Patienten zeigten jeweils 2 Mutationen. 122 Mutationen waren „*missense*“ Mutationen und eine Mutation war eine „*nonsense*“ Mutation.



**Abbildung 6:** Anzahl der gesamten Mutationen je Exon des *DNMT3A* Gens

Beispiel Patient 57 aus der Studie AMLSG 06-04 in Exon 23 (Abbildung 7). Austausch des Nukleotides C durch das Nukleotid T an der Position 882

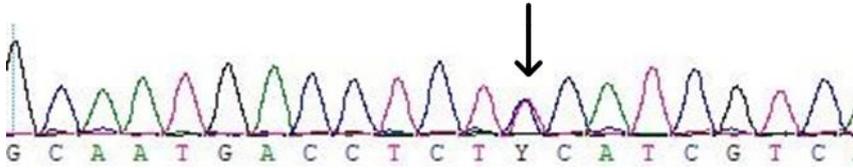


**Abbildung 7:** Basensequenz Patient 57

**Erläuterung:** Basen A= Adenin, T= Thymin, G= Guanin, C= Cytosin, Y= veränderte Base, Pfeil: Nukleotidaustausch

Der Nukleotidaustausch c. C2644T führt zu dem Aminosäureaustausch p. R882C.

Beispiel Patient 480 aus der Studie AMLSG 06-04 in Exon 18 (Abbildung 8). Austausch des Nukleotides C durch das Nukleotid T an der Position 714



**Abbildung 8:** Basensequenz Patient 480

**Erläuterung:** Basen A= Adenin, T= Thymin, G= Guanin, C= Cytosin, Y= veränderte Base, Pfeil: Nukleotidaustausch

Der Nukleotidaustausch c. C2141T führt zu dem Aminosäureaustausch p. S714F.

### 3.2 Assoziation der *DNMT3A*<sup>mut</sup> mit klinischen Charakteristika

Für die Assoziation der *DNMT3A*<sup>mut</sup> mit den klinischen Charakteristika waren von den Studienpatienten folgende Parameter bekannt (in Reihenfolge der Tabelle): Alter, Geschlecht, AML-Typ, Hämoglobinwert, Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, LDH-Wert, Blastenanteil im KM und Blastenanteil im PB. Eine Korrelation galt als signifikant, wenn der p-Wert < 0,05 war. Die Patienten mit *DNMT3A*<sup>mut</sup> waren signifikant mit einem höheren Alter (p= 0,04), sowie einer erhöhten Leukozytenzahl (p= 0,01) assoziiert. Nicht signifikante Parameter waren das Geschlecht (p= 0,37), der AML-Typ (p= 0,19), der Hämoglobinwert (p= 0,12), eine erhöhte Thrombozytenzahl (p= 0,12), ein erhöhter LDH-Wert (p= 0,22), Blasten im KM (p= 0,19) und Blasten im PB (p= 0,07). Für die Auswertung konnten 750 Patienten der 760 sequenzierten Patienten herangezogen werden (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8: Assoziation der klinischen Charakteristika mit dem Mutationsstatus von *DNMT3A*.**

Erläuterungen: AML: akute myeloische Leukämie, LDH: Laktatdehydrogenase

Alle Patienten, n= 750	<i>DNMT3A</i>		p-Wert
	Wildtyp n= 628 (%)	Mutiert n= 122 (%)	
Alter in Jahren			<b>0,04</b>
Median	68,1	67,1	
Altersspannweite	58,4-84,5	60,6-79,4	
Geschlecht,			<b>0,37</b>
männlich	357 (57)	64 (52)	
weiblich	271 (43)	58 (48)	
AML-Typ			<b>0,19</b>
<i>de novo</i>	16 (3)	3 (2)	
s-AML	78 (12)	8 (7)	
t-AML	50 (8)	6 (5)	
Hämoglobinwert, g/dL			<b>0,12</b>
Median	9,3	9,1	
Spannweite	3,8-14,5	5,4-14,1	
nicht vorhanden	18	5	
Thrombozytenzahl x10 <sup>9</sup> /L			<b>0,12</b>
Median	54	63	
Spannweite	2-672	11-418	
nicht vorhanden	18	4	
Leukozytenzahl x10 <sup>9</sup> /L			<b>0,01</b>
Median	8,7	20,2	
Spannweite	0,1-439,5	0,5-293,1	
nicht vorhanden	18	4	
LDH-Wert U/l			<b>0,22</b>
Median	365	372	
Spannweite	40-6623	83-2970	
nicht vorhanden	31	5	
Blasten im Knochenmark			<b>0,19</b>
Median	70	75	
Spannweite	0-100	0-100	
nicht vorhanden	74	16	
Blasten im peripheren Blut			<b>0,07</b>
Median	30	38,5	
Spannweite	0-100	0-100	
nicht vorhanden	73	10	

### 3.3 Assoziation der *DNMT3A*<sup>mut</sup> mit genetischen Alterationen

Im Folgenden wurden die Patienten aus beiden Studien hinsichtlich ihrer möglichen Assoziation mit anderen genetischen Alterationen untersucht. *DNMT3A*<sup>mut</sup> waren signifikant mit Mutationen in *NPM1* (p= 0,01), *IDH1* (p= 0,02), *IDH2* (p= 0,01) und *FLT3-ITD* (p= 0,01) assoziiert. Es gab eine inverse Korrelation von Mutationen in *CEBPA* mit *DNMT3A*<sup>mut</sup> (p= 0,03) Mit *FLT3-TKD* (p= 1,00) und *ASXL1* (p= 0,51) konnte keine signifikante Assoziation mit *DNMT3A*<sup>mut</sup> gezeigt werden. (Siehe Tabelle 09)

**Tabelle 9: Assoziation der molekulargenetischen Alterationen mit dem Mutationsstatus von DNMT3A.** Erläuterungen: Prozentualer Anteil(gerundet) der Patienten in Klammern in Bezug auf den Mutationsstatus von DNMT3A. **FLT3-ITD:** *FMS-like tyrosine kinase 3* interne Tandem-Duplikation; **FLT3-TKD:** *FMS-like tyrosine kinase 3* Tyrosinkinase-Domäne; **NPM1:** *Nucleophosmin 1*; **IDH1:** *Isocitrate Dehydrogenase 1*; **IDH2:** *Isocitrate Dehydrogenase 2*; **ASXL1:** *Additional Sex Combs-Like Protein 1*; **CEBPA:** *CCAAT/enhancer binding protein alpha*; **wt:** Wildtyp; **mut:** mutiert

Alle Patienten, n= 750	DNMT3A		p-Wert
	Wildtyp n= 628 (%)	Mutiert n= 122 (%)	
<b>FLT3-ITD</b>			<b>0,01</b>
wt:	530 (86)	89 (73)	
mut:	88 (14)	33 (27)	
keine Daten:	10	0	
<b>FLT3- TKD</b>			<b>1</b>
wt:	569 (95)	115 (95)	
mut:	32 (5)	6 (5)	
keine Daten:	27	1	
<b>NPM1</b>			<b>0,01</b>
wt:	472 (77)	75 (62)	
mut:	141 (23)	46 (38)	
keine Daten:	15	1	
<b>IDH1</b>			<b>0,02</b>
wt:	570 (94)	75 (62)	
mut:	37 (6)	15 (13)	
keine Daten:	21	3	
<b>IDH2</b>			<b>0,01</b>
wt:	528 (87)	90 (76)	
mut:	79 (13)	29 (24)	
keine Daten:	21	3	
<b>ASXL1</b>			<b>0,51</b>
wt	539 (89)	108 (92)	
mut	67 (11)	10 (8)	
keine Daten	22	4	
<b>CEBPA</b>			<b>0,03</b>
wt:	552 (95)	105 (91)	
mut:	28	11	
keine Daten:	48	6	

### 3.4 Relevanz der *DNMT3A*<sup>mut</sup> in Anbetracht der zytogenetischen Klassifikation

Als nächstes wurde die Bedeutung der zytogenetischen Veränderungen in Korrelation zu *DNMT3A*<sup>mut</sup> untersucht (Tabelle 10) Hierfür wurden die Patienten den zytogenetischen Kategorien - günstig, intermediär und ungünstig zugeordnet. Zwei Drittel der Patienten gehörten zur Gruppe mit intermediärem zytogenetischen Risiko. Die Gruppierung nach zytogenetischem Risiko war signifikant ( $p= 0,1$ ). Des Weiteren wurden die rekurrenten Alterationen t(9;11), t11q23var, t(6;9), inv(3) / t(3;3) und Trisomie 8 in Bezug auf ihre Assoziation mit *DNMT3A*<sup>mut</sup> untersucht. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation *DNMT3A*<sup>mut</sup> mit diesen genetischen Alterationen, aber *DNTM3A*<sup>mut</sup> waren signifikant mit dem normalen Karyotyp ( $p= 0,01$ ) assoziiert und invers mit dem komplexen Karyotyp ( $p= 0,01$ ) korreliert.

**Tabelle 10: Assoziation der zytogenetischen Alterationen mit dem Mutationsstatus von DNMT3A.**

Alle Patienten, n= 750	DNMT3A		p-Wert
	Wildtyp n= 628 (%)	Mutiert n= 122 (%)	
<b>Zytopogenetisches Risiko (%)</b>			<b>0,01</b>
ungünstig	148 (26)	13 (12)	
intermediär	372 (67)	94 (87)	
günstig	39 (7)	1 (1)	
keine Daten	69	14	
<b>t(9;11) (%)</b>			<b>0,61</b>
t(9;11) positiv	7 (1)	0	
t(9;11) negativ	552 (98)	108 (100)	
keine Daten	69	14	
<b>t(11q)(23)var (%)</b>			<b>1</b>
t(11q)(23) positiv	4 (1)	0	
t(11)(q23) negativ	555 (99)	108 (100)	
keine Daten	69	14	
<b>t(6;9) (%)</b>			<b>1</b>
t(6;9) positiv	2 (1)	0	
t(6;9) negativ	557 (89)	108 (88)	
keine Daten	69	14	
<b>inv(3) / t(3;3) (%)</b>			<b>1</b>
inv(3) / t(3;3) positiv	9 (2)	1 (1)	
inv(3) / t(3;3) negativ	550 (98)	107 (99)	
keine Daten	69	14	
<b>Normaler Karyotyp. (%)</b>			<b>&lt;0,01</b>
vorhanden	252 (45)	77 (71)	
nicht vorhanden	307 (55)	31 (29)	
keine Daten	69	14	
<b>Trisomie 8 (%)</b>			<b>0,15</b>
Trisomie 8 positiv	57 (10)	6 (6)	
Trisomie 8 negativ	502 (90)	102 (94)	

Fortsetzung Tabelle 10 auf Seite 59

## Fortsetzung Tabelle 10

keine Daten	69	14	
<b>Komplexer Karyotyp. (%)</b>			<b>0,01</b>
vorhanden	108 (19)	9 (8)	
nicht vorhanden	451 (81)	99 (92)	
keine Daten	69	14	

### 3.5 Einfluss der *DNMT3A*<sup>mut</sup> auf das Therapieansprechen

Um die Relevanz von *DNMT3A*<sup>mut</sup> in Bezug auf das Therapieansprechen einzuschätzen, wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Remissionsstadien (CR, partielle Remission (PR), früher Tod) im Hinblick auf ihre Assoziation mit *DNMT3A*<sup>mut</sup> analysiert. Der jeweilige Status wurde nach dem zweiten Induktionszyklus, auch Doppelinduktion genannt, erhoben. Es konnte kein Zusammenhang zwischen *DNMT3A*<sup>mut</sup> und dem Erreichen einer CR, PR oder dem frühzeitigen Tod festgestellt werden (p= 0,98).

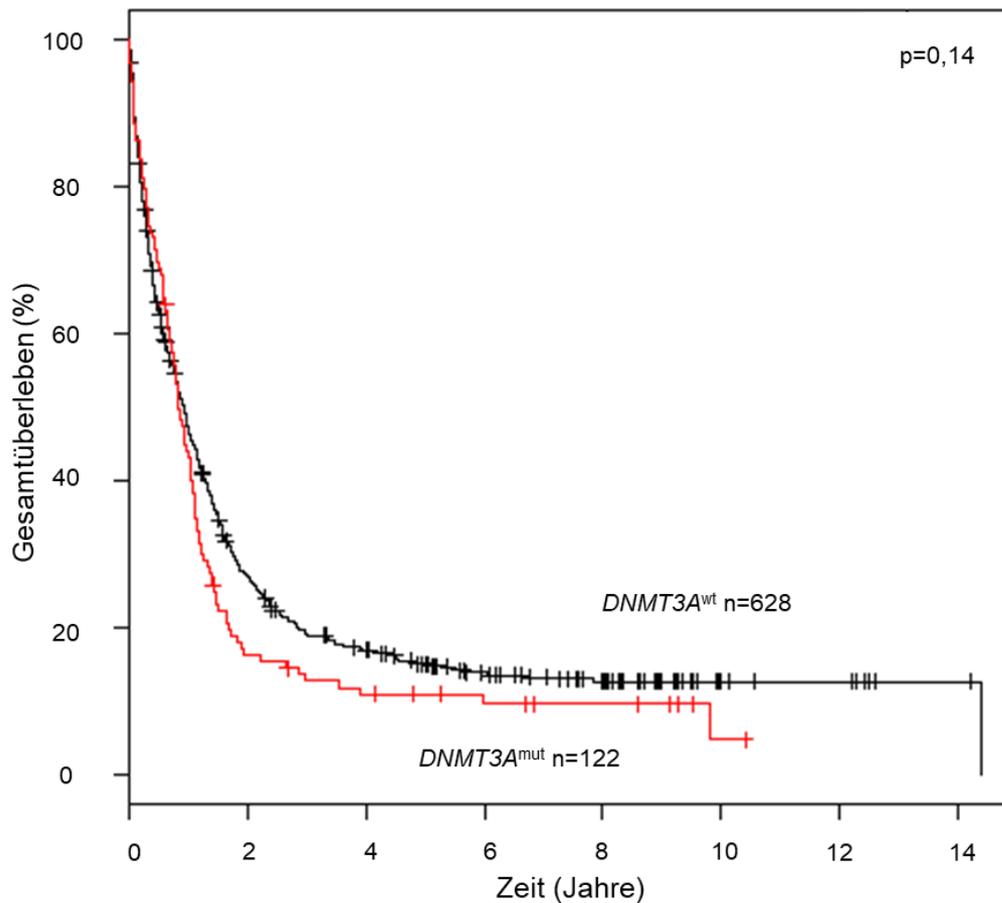
**Tabelle 11: Korrelation der *DNMT3A*<sup>mut</sup> mit dem Therapieansprechen.**

Alle Patienten, n= 750	<i>DNMT3A</i>		p-Wert
	Wildtyp n= 628 (%)	Mutiert n= 122 (%)	
<b>Remission (%)</b>			<b>0,98</b>
komplette Remission	295 (49)	58 (49)	
partielle Remission	245 (40)	49 (41)	
früher Tod	66 (11)	12 (10)	
keine Daten	22	3	

### 3.6 Einfluss der *DNMT3A*<sup>mut</sup> auf das Überleben

In dem folgenden Abschnitt wurde die Bedeutung der *DNMT3A*<sup>mut</sup> in Bezug auf den klinischen Verlauf untersucht. Verglichen wurde in univariabler Analyse die Gruppe

der Patienten mit *DNMT3A*<sup>mut</sup> (n= 122) versus die Gruppe der Patienten mit *DNMT3A*<sup>wt</sup> (n= 628). Untersucht wurden die klinischen Endpunkte OS, RFS und EFS. *DNMT3A*<sup>mut</sup> hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Gesamtüberleben der Patienten aus den Studien AML HD98B und AMLSG 06-04 entsprechend des *DNMT3A* Mutationsstatus.

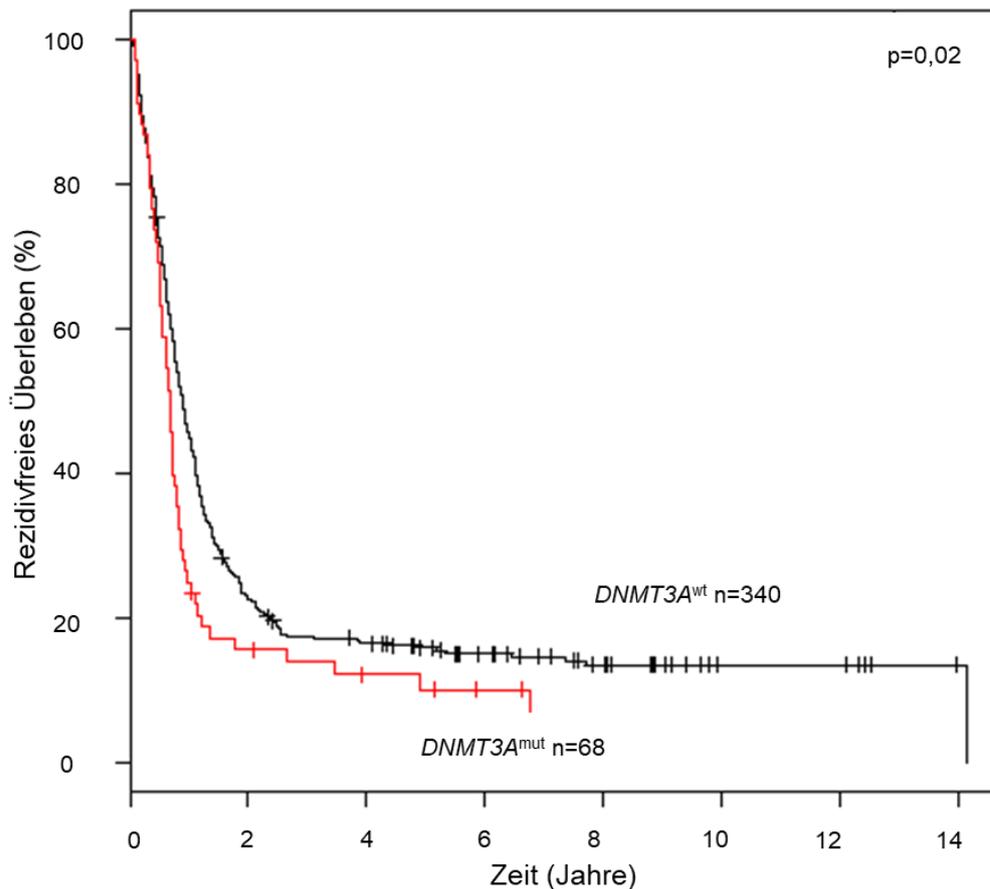
**Erläuterungen:** wt= Patienten mit *DNMT3A* Wildtyp, mut= Patienten mit *DNMT3A* Mutation

Folgende Auswertung konnte gemacht werden (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Korrelation des Gesamtüberlebens mit *DNMT3A*<sup>mut</sup>**

Alle Patienten, n= 750	<i>DNMT3A</i>		p-Wert
	Wildtyp n= 628	Mutiert n= 122	
Ereignisse	529	109	<b>0.14</b>
Median	0.92	0.85	

Patienten mit *DNMT3A*<sup>mut</sup> zeigten in univariabler Analyse ein signifikant schlechteres RFS im Vergleich zu den Patienten mit *DNMT3A*<sup>wt</sup> ( $p=0,02$ ) (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Rezidivfreies Überleben der Patienten aus den Studien AML HD98B und AMLSG 06-04 entsprechend des *DNMT3A* Mutationsstatus.

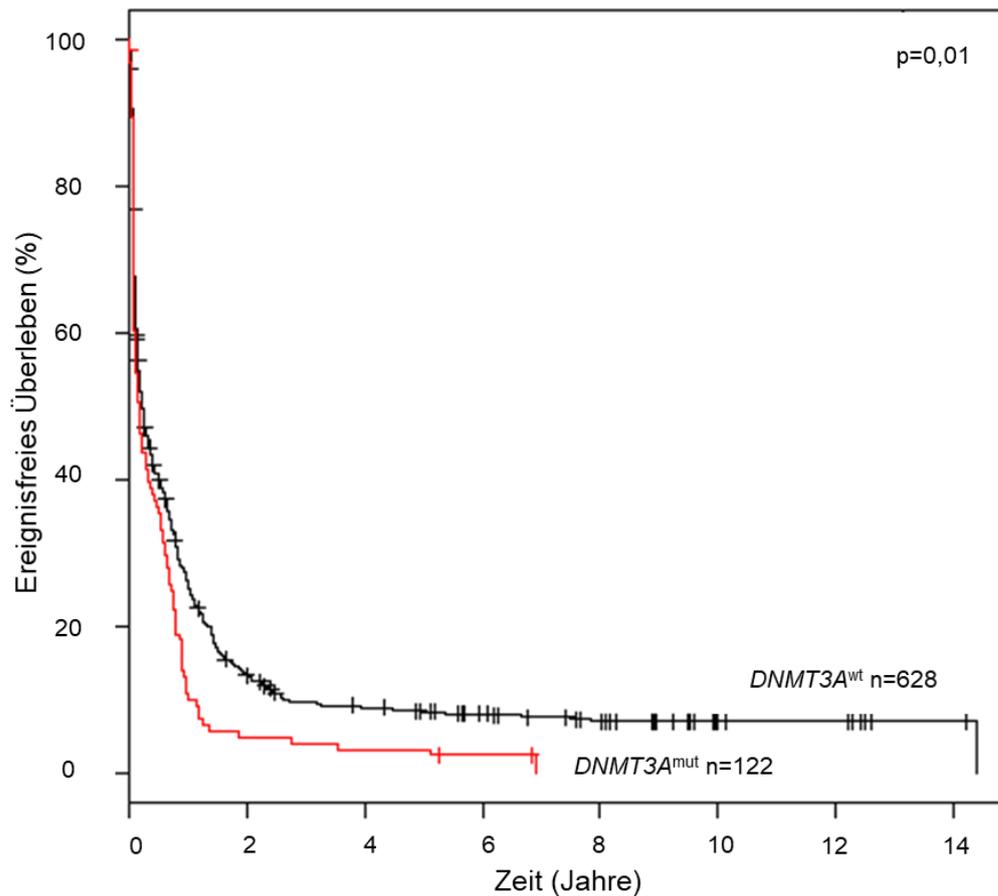
**Erläuterungen:** wt= Patienten mit *DNMT3A* Wildtyp, mut= Patienten mit *DNMT3A* Mutation

Folgende Auswertung konnte gemacht werden (siehe Tabelle 13).

**Tabelle 13: Korrelation mit rezidivfreiem Überleben.**

Alle Patienten, n= 480	<i>DNMT3A</i>		p-Wert
	Wildtyp n= 340	Mutiert n= 68	
Ereignisse	290	61	<b>0.02</b>
Median	0.884	0.672	

Auch in Bezug auf das EFS zeigte sich univariabel eine signifikante Bedeutung der *DNMT3A*<sup>mut</sup>: Patienten mit *DNMT3A*<sup>mut</sup> hatten ein schlechteres EFS im Vergleich zu Patienten mit *DNMT3A*<sup>wt</sup> ( $p=0,01$ ) (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Ereignisfreies Überleben der Patienten aus den Studien AML HD98B und AMLSG 06-04 entsprechend des *DNMT3A* Mutationsstatus.

**Erläuterungen:** wt= Patienten mit *DNMT3A* Wildtyp, mut= Patienten mit *DNMT3A* Mutation

Folgende Auswertungen konnten gemacht werden (siehe Tabelle 14).

**Tabelle 14: Korrelation mit ereignisfreiem Überleben**

Alle Patienten, n= 750	<i>DNMT3A</i>		p-Wert
	Wildtyp n= 628	Mutiert n= 122	
Ereignisse	569	119	<b>0.01</b>
Median	0.241	0.175	

## 4 Diskussion

Mittels PCR und konventioneller Sanger Sequenzierung wurden in dieser Arbeit 750 intensiv behandelte AML Patienten hinsichtlich Mutationen im Gen *DNMT3A* untersucht. Es wurden insgesamt 122 Mutationen (16%) festgestellt. Die Mutationen waren in verschiedenen kodierenden Regionen des *DNMT3A* Gens verteilt. Als Mutations-Hotspot konnte das Exon 23 ausgemacht werden. Nach der Bestimmung der Inzidenz an *DNMT3A*<sup>mut</sup> in dieser Kohorte wurden im Weiteren mögliche Korrelationen dieser Mutationen mit klinischen und genetischen Charakteristika untersucht. Klinisch waren *DNMT3A*<sup>mut</sup> mit dem Alter und einer erhöhten Leukozytenzahl assoziiert. Eine Assoziation von Geschlecht, AML-Typ, Hämoglobinwert, Thrombozytenzahl, LDH-Wert, Blastenanteil im KM oder im PB konnte nicht beobachtet werden. Des Weiteren konnten signifikante Korrelationen zwischen *DNMT3A*<sup>mut</sup> und Mutationen in *NPM1*, *IDH1*, *IDH2*, und *FLT3-ITD* beschrieben werden. Für das Gesamtüberleben konnte, im Gegensatz zum ereignisfreien und rezidivfreien Überleben, kein signifikanter Einfluss von *DNMT3A*<sup>mut</sup> gezeigt werden.

### 4.1 Methodik

Als „*First-Generation Sequencing*“ wird die Sequenziermethode nach Sanger bezeichnet, welche hier zur Anwendung kam. Diese Methode führte zu vielen bedeutenden Erkenntnissen. insbesondere bei der Erforschung der Pathogenese von Tumorerkrankungen. Im Weiteren wurde die Methode des „*Next Generation Sequencing*“ (NGS) entwickelt, mit der erstmals das menschlichen Genoms durch das „*Human Genome Project*“ entschlüsselt wurde. [71] [118] Im direkten Vergleich von NGS mit der Methode nach Sanger gibt es für beide Methoden Vor- und Nachteile. Vorteile des NGS ist die hohe Sensitivität, jedoch sind hier entsprechende Soft- und Hardware Voraussetzung, um die enormen Datenmengen zu verarbeiten und zu speichern. Ist das Ziel, nur ein Gen mit einer überschaubaren Anzahl an Exons zu untersuchen, so ist die Methode der Sanger Sequenzierung eine gute Alternative. [178]

## 4.2 Klinische Relevanz von *DNMT3A*<sup>mut</sup>

In der hier vorliegenden Arbeit wurden *DNMT3A*<sup>mut</sup> mit einer Inzidenz von 16% detektiert. Dies ist ähnlich zu der Studie von Gaidzik et al. (20%), wobei in deren Studie jüngere AML-Patienten im Alter von 18 - 60 Jahren untersucht wurden. [49] In einer Studie von Thol et al. wurden 498 Patienten im Alter von 30 bis 60 Jahre untersucht, davon hatten 18% eine *DNMT3A*<sup>mut</sup>. [167] Eine Metaanalyse von Shivarov welche 4500 Patienten umfasste, unterstützt diese Daten mit einer kumulativen Inzidenz der *DNMT3A*<sup>mut</sup> von 14 - 34%. [151]. Die Altersspanne in der hier vorliegenden Studie betrug 58 - 84 Jahre mit einem Altersmedian der *DNMT3A*<sup>mut</sup> von 67 Jahren und der *DNMT3A*<sup>wt</sup> von 68 Jahren. Die Altersspanne in der Metaanalyse von Shivarov betrug 18 - 84 Jahre, bei Gaidzik et al. betrug diese 18-60 Jahre. Ley et al. diagnostizierten bei 281 Patienten *DNMT3A*<sup>mut</sup> bei 22% der Patienten. Die Altersspanne in dessen Studie lag zwischen 22 und 82 Jahren. [93] Auch Ribeiro et al. konnte in seiner Untersuchung von 415 Patienten bei 96 Patienten *DNMT3A*<sup>mut</sup> feststellen, was eine Inzidenz von 23,1% ergibt. Die Altersspanne der Studie von Ribeiro et al. betrug 15 - 60 Jahre [140] Über alle Studien hinweg zeigt sich eine Korrelation von *DNMT3A*<sup>mut</sup> mit zunehmendem Alter der Patienten ( $p= 0,04$ ). [151] Das Geschlecht der Patienten war in der hier durchgeführten Studie in Verbindung mit *DNMT3A*<sup>mut</sup> nicht signifikant ( $p= 0,4$ ). Insgesamt waren 421 Patienten männlichen und 329 Patienten weiblichen Geschlechts. In der Studie von Gaidzik et al. war das Verhältnis Mann zu Frau (907 zu 863) und die entsprechenden Mutationsverteilung (160 zu 210) ähnlich. Die unterschiedlichen AML Typen spielten in beiden Studien keine Rolle ( $p= 0,2$ ). Ein Zusammenhang von *DNMT3A*<sup>mut</sup> und einer erhöhten Leukozytenzahl tritt in beiden Studien auf ( $p= 0,01$ ). Während in der hier vorliegenden Arbeit *DNMT3A*<sup>mut</sup> mit den klinischen Parametern wie LDH-Wert, Thrombozytenzahl, Blastenanteil im KM und PB nicht signifikant assoziiert waren, wurde in der Studie von Gaidzik et al. eine signifikante Korrelation mit diesen Variablen beschrieben. [49] Dieser Unterschied ist vermutlich ebenfalls auf die unterschiedliche Altersspanne zurück zu führen. In der Studie von Thol et al. und Ribeiro et al. wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen *DNMT3A*<sup>mut</sup> und einem höheren Alter sowie einer erhöhten Leukozytenzahl beschrieben. [167] [140]

### 4.3 Zytogenetische Assoziationen von *DNMT3A*<sup>mut</sup>

In der hier durchgeführten Studie ist eine Korrelation von *DNMT3A*<sup>mut</sup> und dem zytogenetischen Risiko ersichtlich. Ein Großteil der *DNMT3A*<sup>mut</sup> Patienten hatten ein intermediäres Risiko (87%). Dies ist übereinstimmend mit den Studien von Gaidzik et al. (89%), Thol et al. (94%) und Ley et al. (90%). In allen Studien lag die Anzahl von Patienten mit günstigem zytogenetischem Risiko im einstelligen Prozentbereich. Ley et al. konnte keinen Patienten mit günstigem zytogenetischem Risiko und *DNMT3A*<sup>mut</sup> diagnostizieren. [93] Des Weiteren finden sich Patienten mit *DNMT3A*<sup>mut</sup> auch selten in der zytogenetisch ungünstigen Gruppe wie in dieser Studie mit 12% , passend hierzu auch die Ergebnisse der Studien von Gaidzik et al. (10%), Thol et al. (5%), Ley et al. (6%) und Ribeiro et al. (6%). [49] [167] [93] [140] Eine inverse Assoziation zwischen komplexem Karyotyp und *DNMT3A*<sup>mut</sup> und eine signifikante Assoziation zwischen normalen Karyotyp und *DNMT3A*<sup>mut</sup> konnte auch in dieser Studie belegt werden. Dies deckt sich auch mit den Erkenntnissen der Studien von Gaidzik et al. und Ribeiro et al. [49] [140] Trisomie 8 sowie t(6;9) waren nicht mit *DNMT3A*<sup>mut</sup> assoziiert. Zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen die Studien bei der Gruppe der Patienten mit inv(3) / t(3/3). Dies könnte ebenfalls durch die unterschiedlichen Altersspannen zustande kommen. In der hier durchgeführten Studie ergibt sich keine signifikante Assoziation von inv(3) / t(3/3) mit *DNMT3A*<sup>mut</sup>, während bei Gaidzik et al. diese beschrieben wurde. [49]

### 4.4 Molekulargenetische Assoziation von *DNMT3A*<sup>mut</sup>

Da *DNMT3A* der Methylierung von DNA dient und Mutationen des protein-methylierenden Gens *DNMT3A* gehäuft vor allem im Exon 23 am Codon 882 auftreten, wird in Verbindung mit anderen Mutationen ein Einfluss auf die Entstehung der AML in Erwägung gezogen. In vorherige Studien wurde festgestellt, dass eine Deaktivierung des Gens die Unterdrückung unerwünschter Zelldifferenzierungen abschaltet, was zur Folge hat, dass selbst erneuernde Zellen überhandnehmen und sich unkontrolliert vermehren. [16] *DNMT3A*<sup>mut</sup> allein scheint laut dieser Studie keinen starken Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf der

AML zu haben, Ley et al. sehen hingegen einen Zusammenhang. [94] Differierende Patientenkohorten hinsichtlich zytologischer Risikogruppen und Alter könnten für die unterschiedlichen Ergebnisse ursächlich sein. *DNMT3A<sup>mut</sup>* tritt mit verschiedenen anderen Mutationen auf, wie beispielsweise *NPM1<sup>mut</sup>*, aber auch *FLT3-ITD* oder *IDH1/2<sup>mut</sup>*. Eine signifikante Korrelation mit *DNMT3A<sup>mut</sup>* konnte auch in den anderen publizierten Studien beschrieben werden. [49] [140] [151] [167] Diese Korrelation könnte auch die erhöhte Leukozytenzahl erklären, da *NPM1<sup>mut</sup>* und insbesondere *FLT3-ITD* mit eben dieser in Verbindung gebracht werden. Mutationen des *NPM1* Gens kommen laut aktuellen Studien bei ca. 35% der *de novo* AML Patienten und in noch höherer Zahl bei CN-AML Patienten vor. [40] Mutiert *NPM1*, kommt es durch eine zytoplasmatische Verlagerung zum Funktionsverlust des Gens. Durch den Verlust der Funktion von NPM1 als Bindungspartner und Transport Protein und dessen hohem Aufkommen bei AML, lässt sich vermuten, dass dies ein frühes Ereignis in der Leukämogenese sein kann. [173] Der Zusammenhang von *DNMT3A<sup>mut</sup>* und *NPM1<sup>mut</sup>* deckt sich auch mit den Ergebnissen der Studie von Yang et al. [189] Diese beschreibt ebenfalls eine Korrelation zwischen *DNMT3A<sup>mut</sup>* und *NPM1<sup>mut</sup>* sowie Mutationen von *FLT3* (*FLT3-ITD*). Interessant ist, dass in der pädiatrischen AML *DNMT3A<sup>mut</sup>* nur zu 2,1% auftritt. [67] Die Autoren schließen daraus, dass sich im Kindesalter vorhandene Mutationen über das Zellwachstum im Verlauf der Lebensjahre potenzieren und es unter anderem dadurch zu erhöhten Mutationsraten kommt. [189] Die Assoziation von *DNMT3A<sup>mut</sup>* mit *FLT3-ITD* wird in dieser Studie bei 27% aller *DNMT3A<sup>mut</sup>* beschrieben. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Studie der AMLSG mit jüngeren AML Patienten sowie anderen publizierten Studien. [49] [140] [168] [104] Das *FLT3*-Gen ist in die Gruppe der Klasse III Rezeptortyrosinkinasen eingeordnet und auf dem Chromosom 13q12 lokalisiert. Das Gen selbst ist für das Überleben und die Differenzierung einer Zelle von Bedeutung. ITD steht für interne Tandemduplikation, was eine Mutation des Gens darstellt und in der juxtamembranären Domäne vorkommt. Durch das häufige Auftreten bei ca. einem Drittel aller AML Patienten, wird der Mutation eine prognostische Bedeutung zugeschrieben. [110] Studien belegen, dass *FLT3-ITD* auf Grund des dadurch unkontrollierten Wachstums zu einer eher schlechten Prognose führt und eine gewisse Resistenz gegenüber einer normalen Chemotherapie aufweist. [19] Des Weiteren wurde *IDH1* und *IDH2* im Zusammenhang mit *DNMT3A<sup>mut</sup>* betrachtet. IDH

steht für Isocitrat Dehydrogenase. *IDH1* stellt das zytoplasmische IDH zur Verfügung und *IDH2* das mitochondrielle IDH. IDH sind Enzyme und Enzymkomplexe.[27] *IDH1* Mutationen sind heterozygot und haben einen fehlerhaften Aminosäureaustausch im Codon 132. [171] [98] In der durchgeführten Studie ist *DNMT3A<sup>mut</sup>* mit *IDH1<sup>mut</sup>* assoziiert ( $p= 0,02$ ). Sie tritt bei 13% aller *DNMT3A<sup>mut</sup>* Patienten auf. *IDH2<sup>mut</sup>* hat eine stärkere Assoziation ( $p= <0,01$ ). Sie tritt bei 24% aller *DNMT3A<sup>mut</sup>* Patienten auf. [174] Auch in der Studie von Gaidzik et al. wird eine Assoziation von Mutationen in *IDH1* und *IDH2* mit *DNMT3A<sup>mut</sup>* beschrieben. [49] Thol et al. konnten in Ihrer Studie dagegen nur eine Assoziation von *DNMT3A<sup>mut</sup>* und *IDH1<sup>R132</sup>* feststellen und bei *IDH2<sup>mut</sup>* konnte keine Korrelation mit *DNMT3A<sup>mut</sup>* festgestellt werden. [167] Dies beschrieb auch Ribeiro et al., *IDH1<sup>mut</sup>* war signifikant mit *DNMT3A<sup>mut</sup>* assoziiert, während *IDH2<sup>mut</sup>* nicht mit *DNMT3A<sup>mut</sup>* assoziiert war. [140]

#### 4.5 Relevanz von *DNMT3A<sup>mut</sup>* auf den Therapieverlauf von AML

In Bezug auf das chemotherapeutische Ansprechen wie CR, RD oder frühen Tod zeigten Patienten mit *DNMT3A<sup>mut</sup>* und Patienten mit *DNMT3A<sup>wt</sup>* keine wesentlichen Unterschiede ( $p= 0,9$ ). Die Studie von Gaidzik et al. mit jüngeren Patienten, weist hier abweichende Daten auf. Patienten mit *DNMT3A<sup>mut</sup>* waren mit einer höheren CR-Rate und einer geringeren Rate an RD assoziiert als Patienten ohne *DNMT3A<sup>mut</sup>*. [49] Thol et al. assoziiert *DNMT3A<sup>mut</sup>* hingegen mit einer negativen Prognose in Bezug auf die CR. [168] Analysiert wurde im Folgenden der Einfluss von *DNMT3A<sup>mut</sup>* auf das OS, das RFS und das EFS. *DNMT3A<sup>mut</sup>* hatte keinen signifikanten Einfluss auf das OS. Dies wurde auch in der vorangegangenen Studie von Gaidzik et al. mit jüngeren Patienten belegt. [49] Anders stellt sich die Situation beim EFS und RFS dar; hier zeigt sich eine signifikante Assoziation zwischen *DNMT3A<sup>mut</sup>* und dem EFS ( $p= 0,01$ ). Die Dauer mit *DNMT3A<sup>mut</sup>* betrug bis zum ersten Ereignis nur 7 Monate, während ohne Mutation es bis zum ersten Ereignis ca. 14 - 15 Monate dauerte. Auch das RFS zeigte sich bei Patienten mit *DNMT3A<sup>mut</sup>* schlechter als bei Patienten mit *DNMT3A<sup>wt</sup>* ( $p= 0,02$ ) und wies eine Dauer von ca. 8 Monaten bei *DNMT3A<sup>mut</sup>* und 14 Monate bei *DNMT3A<sup>wt</sup>* auf. Ley et al. konnte in

seiner Studie ebenfalls ein schlechteres EFS aber auch ein schlechteres OS bei Patienten mit *DNMT3A*<sup>mut</sup> beschreiben. [93] Ribeiro et al. stellte ebenfalls eine signifikante Verschlechterung der OS und des RFS in Abhängigkeit der *DNMT3A*<sup>mut</sup> fest. [140] La Rochelle untersuchte in seiner Studie über 457 Patienten *DNMT3A*<sup>mut</sup> im Zusammenhang mit der Anwendung von Idarubicin und Daunorubicin in der AML Therapie. In dieser Studie kommt man aufgrund der identischen Gesamtüberlebenszahl von *DNMT3A*<sup>mut</sup> und *DNMT3A*<sup>wt</sup> zu dem Schluss, dass *DNMT3A*<sup>mut</sup> nicht entscheidend für den Therapieerfolg der AML ist. [93] Ein Großteil der betrachteten Studien kommt zu einem signifikant schlechteren OS. [140] [151] [167] Dies steht im Kontrast zu der hier durchgeführten Studie und der Studie von Gaidzik et al. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, könnten differierende Patientenkohorten für die unterschiedlichen Ergebnisse von Relevanz sein.

#### 4.6 Klonale Hämatopoese

Die klonale Hämatopoese oder auch *clonal hematopoiesis of indeterminate potential* (CHIP) und *age-related clonal hematopoiesis* (ARCH) ist ein, mit zunehmendem Alter, häufiges auftretendes Ereignis. Hämatopoetische Stammzellen akquirieren im Verlauf eine zunehmende Anzahl an Mutationen. [78] ARCH definiert die klonale Hämatopoese welche durch jegliches klonales Ereignis auftritt und mit dem Alter assoziiert ist. CHIP bezeichnet die klonales Hämatopoese welche durch eine somatische Mutation in einem sogenannten „*driver*“ Gen wie beispielsweise *DNMT3A* verursacht wird. [11] Unter 50 Jahren tritt eine klonale Hämatopoese nur vereinzelt auf, bei Gesunden über 60 Jahre wird diese bereits zu 5 - 10% beschrieben und bei über 80 Jahren dann bis zu 20%. [54] [77] Die bei der klonalen Hämatopoese mit am häufigsten mutierten Gene sind *DNMT3A*, *TET2* und *ASXL1*. Vor diesem Hintergrund wird davon ausgegangen, dass Mutationen in diesen Genen nicht nur eine klonale Hämatopoese fördern, sondern maßgeblich für das Progressionsrisiko und nachfolgend die Entstehung einer AML beitragen können. [54] Unterstützend hierzu die kürzlich publizierten Daten von Abelson et al. und Desai et al., welche in ihren Studien z.B. bei dem Nachweis von *DNMT3A*<sup>mut</sup> ein signifikant erhöhtes Risiko für die Progression in eine AML beschreiben. [1] [28]

## 5 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) zählt zu den klonalen Erkrankungen hämatopoetischer Stammzellen und zeichnet sich durch eine große biologische und klinische Heterogenität aus. Weiterhin stellt diese Erkrankung eine große Herausforderung dar und dies gilt sowohl für die Diagnosestellung als auch die Therapie dieser Erkrankung. Aufgrund der fortlaufenden technologischen Verbesserungen und weiterer wissenschaftlicher Erkenntnisse im Bereich von Diagnostik, Therapie und Prognose konnten bei der AML bedeutende Fortschritte erzielt werden. Es wurden histomorphologische und zytologische Erkenntnisse durch zyto- und molekulargenetische Erkenntnisse ergänzt. Dadurch entstanden die verschiedenen WHO (Welt Gesundheits Organisation / World Health Organisation) Klassifikationen sowie die Risikostratifizierung des European *LeukemiaNet*, welche aufgrund dieses Fortschritts zuletzt 2016 bzw. 2017 angepasst wurden. Zielsetzung der hier vorliegenden Studie war die Inzidenz und Bedeutung von *DNMT3A<sup>mut</sup>* als prognostischen Marker bei der AML in einer Gruppe von homogen intensiv behandelten älteren AML Patienten zu untersuchen. *DNMT3A* ist für die *de novo* Methylierung von DNA (Desoxyribonukleinsäure) zuständig ist. Es wurden hier 750 Patienten aus den Studien AML HD98B und AMLSG 06-04 analysiert, deren Alter zwischen 58 und 85 Jahren lag. Die Analyse der Proben wurde mittels konventioneller PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und direkter Sanger Sequenzierung durchgeführt, um die Inzidenz von *DNMT3A<sup>mut</sup>* festzustellen. Im Weiteren wurden die erhaltenen Ergebnisse mit den biologischen und klinischen Charakteristika der Kohorte verglichen. Es wurde eine signifikante Korrelation von *DNMT3A<sup>mut</sup>* mit dem Alter und einer erhöhten Leukozytenzahl festgestellt. In Bezug auf die genetischen Alterationen war eine signifikante Korrelation von *DNMT3A<sup>mut</sup>* mit Mutationen in *NPM1*, *IDH1*, *IDH2*, *FLT3-ITD* zu beobachten. Mit *FLT3-TKD* und *ASXL1* konnte keine signifikante Assoziation gezeigt werden. *DNMT3A<sup>mut</sup>* hatte keinen Einfluss auf das Ansprechen der Induktionstherapie. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass *DNMT3A<sup>mut</sup>* keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben hatten. Jedoch sind *DNMT3A<sup>mut</sup>* mit einem signifikant schlechteren ereignisfreien und rezidivfreien Überleben assoziiert. In Zusammenschau gehören *DNMT3A<sup>mut</sup>* zu den rekurrenten Mutationen in der AML. Auch wenn für diese Mutationen in den meisten Studien keine wesentliche

prognostische Bedeutung beschrieben werden konnte, spielen diese im Kontext der klonalen Hämatopoese und dem Progressionsrisiko in eine AML eine wesentliche Rolle, welche weiter erforscht werden sollte.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Abelson, S., G. Collord, S. W. K. Ng, O. Weissbrod, N. Mendelson Cohen, E. Niemeyer, N. Barda, P. C. Zuzarte, L. Heisler, Y. Sundaravadanam, R. Luben, S. Hayat, T. T. Wang, Z. Zhao, I. Cirlan, T. J. Pugh, D. Soave, K. Ng, C. Latimer, C. Hardy, K. Raine, D. Jones, D. Hault, A. Britten, J. D. McPherson, M. Johansson, F. Mbabaali, J. Eagles, J. K. Miller, D. Pasternack, L. Timms, P. Krzyzanowski, P. Awadalla, R. Costa, E. Segal, S. V. Bratman, P. Beer, S. Behjati, I. Martincorena, J. C. Y. Wang, K. M. Bowles, J. R. Quiros, A. Karakatsani, C. La Vecchia, A. Trichopoulou, E. Salamanca-Fernandez, J. M. Huerta, A. Barricarte, R. C. Travis, R. Tumino, G. Masala, H. Boeing, S. Panico, R. Kaaks, A. Kramer, S. Sieri, E. Riboli, P. Vineis, M. Foll, J. McKay, S. Polidoro, N. Sala, K. T. Khaw, R. Vermeulen, P. J. Campbell, E. Papaemmanuil, M. D. Minden, A. Tanay, R. D. Balicer, N. J. Wareham, M. Gerstung, J. E. Dick, P. Brennan, G. S. Vassiliou and L. I. Shlush (2018). "Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals." Nature **559**: 400-404.
- [2] Allen, C., R. K. Hills, K. Lamb, C. Evans, S. Tinsley, R. Sellar, M. O'Brien, J. L. Yin, A. K. Burnett, D. C. Linch and R. E. Gale (2013). "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**: 1891-901.
- [3] Alpermann, T., C. Haferlach, C. Eder, N. Nadarajah, M. Meggendorfer, W. Kern, T. Haferlach and S. Schnittger (2015). "AML with gain of chromosome 8 as the sole chromosomal abnormality (+8sole) is associated with a specific molecular mutation pattern including ASXL1 mutations in 46.8% of the patients." Leuk Res **39**: 265-72.
- [4] Arber, D. A., A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola and J. W. Vardiman (2016). "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia." Blood **127**: 2391-405.
- [5] Avramopoulos, D., T. Cox, J. E. Blaschak, A. Chakravarti and S. E. Antonarakis (1992). "Linkage mapping of the AML1 gene on human chromosome 21 using a DNA polymorphism in the 3' untranslated region." Genomics **14**: 506-7.
- [6] Bejar, R., K. E. Stevenson, B. A. Caughey, O. Abdel-Wahab, D. P. Steensma, N. Galili, A. Raza, H. Kantarjian, R. L. Levine, D. Neuberg, G. Garcia-Manero and B. L. Ebert (2012). "Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes." J Clin Oncol **30**: 3376-82.
- [7] Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick and C. Sultan (1985). "Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group." Ann Intern Med **103**: 620-5.

- [8] Bienz, M., M. Ludwig, E. O. Leibundgut, B. U. Mueller, D. Ratschiller, M. Solenthaler, M. F. Fey and T. Pabst (2005). "Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype." Clin Cancer Res **11**: 1416-24.
- [9] Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**: 6-21.
- [10] Bullinger, L., K. Dohner and H. Dohner (2017). "Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways." J Clin Oncol **35**: 934-946.
- [11] Busque, L., M. Buscarlet, L. Mollica and R. L. Levine (2018). "Concise Review: Age-Related Clonal Hematopoiesis: Stem Cells Tempting the Devil." Stem Cells.
- [12] Byrd, J. C., K. Mrozek, R. K. Dodge, A. J. Carroll, C. G. Edwards, D. C. Arthur, M. J. Pettenati, S. R. Patil, K. W. Rao, M. S. Watson, P. R. Koduru, J. O. Moore, R. M. Stone, R. J. Mayer, E. J. Feldman, F. R. Davey, C. A. Schiffer, R. A. Larson, C. D. Bloomfield, Cancer and B. Leukemia Group (2002). "Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461)." Blood **100**: 4325-36.
- [13] Cancer Genome Atlas Research, N. (2013). "Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia." N Engl J Med **368**: 2059-74.
- [14] Cedar, H. and Y. Bergman (2011). "Epigenetics of haematopoietic cell development." Nat Rev Immunol **11**: 478-88.
- [15] Celik, H., C. Mallaney, A. Kothari, E. L. Ostrander, E. Eultgen, A. Martens, C. A. Miller, J. Hundal, J. M. Klco and G. A. Challen (2015). "Enforced differentiation of Dnmt3a-null bone marrow leads to failure with c-Kit mutations driving leukemic transformation." Blood **125**: 619-28.
- [16] Challen, G. A., D. Sun, M. Jeong, M. Luo, J. Jelinek, J. S. Berg, C. Bock, A. Vasanthakumar, H. Gu, Y. Xi, S. Liang, Y. Lu, G. J. Darlington, A. Meissner, J. P. Issa, L. A. Godley, W. Li and M. A. Goodell (2012). "Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation." Nat Genet **44**: 23-31.
- [17] Chen, T., Y. Ueda, J. E. Dodge, Z. Wang and E. Li (2003). "Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b." Mol Cell Biol **23**: 5594-605.

- [18] Chen, T., Y. Ueda, S. Xie and E. Li (2002). "A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation." J Biol Chem **277**: 38746-54.
- [19] Chen, Y., Y. Pan, Y. Guo, W. Zhao, W. T. Ho, J. Wang, M. Xu, F. C. Yang and Z. J. Zhao (2017). "Tyrosine kinase inhibitors targeting FLT3 in the treatment of acute myeloid leukemia." Stem Cell Investig **4**: 48.
- [20] Cheson, B. D., J. M. Bennett, K. J. Kopecky, T. Buchner, C. L. Willman, E. H. Estey, C. A. Schiffer, H. Doehner, M. S. Tallman, T. A. Lister, F. Lo-Coco, R. Willemze, A. Biondi, W. Hiddemann, R. A. Larson, B. Lowenberg, M. A. Sanz, D. R. Head, R. Ohno, C. D. Bloomfield, S. o. R. C. T. O. International Working Group for Diagnosis and L. Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid (2003). "Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia." J Clin Oncol **21**: 4642-9.
- [21] Choi, S. H., K. Heo, H. M. Byun, W. An, W. Lu and A. S. Yang (2011). "Identification of preferential target sites for human DNA methyltransferases." Nucleic Acids Res **39**: 104-18.
- [22] Chou, W. C., W. C. Lei, B. S. Ko, H. A. Hou, C. Y. Chen, J. L. Tang, M. Yao, W. Tsay, S. J. Wu, S. Y. Huang, S. C. Hsu, Y. C. Chen, Y. C. Chang, K. T. Kuo, F. Y. Lee, M. C. Liu, C. W. Liu, M. H. Tseng, C. F. Huang and H. F. Tien (2011). "The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia." Leukemia **25**: 246-53.
- [23] Colovic, M., N. Colovic, G. Jankovic, N. Kraguljac Kurtovic, A. Vidovic, V. Djordjevic and A. Bogdanovic (2012). "Mixed phenotype acute leukemia of T/myeloid type with a prominent cellular heterogeneity and unique karyotypic aberration 45,XY, dic(11;17)." Int J Lab Hematol **34**: 290-4.
- [24] Corces-Zimmerman, M. R., W. J. Hong, I. L. Weissman, B. C. Medeiros and R. Majeti (2014). "Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission." Proc Natl Acad Sci U S A **111**: 2548-53.
- [25] Cortes, J. E., S. L. Goldberg, E. J. Feldman, D. A. Rizzeri, D. E. Hogge, M. Larson, A. Pigneux, C. Recher, G. Schiller, K. Warzocha, H. Kantarjian, A. C. Louie and J. E. Kolitz (2015). "Phase II, multicenter, randomized trial of CPX-351 (cytarabine:daunorubicin) liposome injection versus intensive salvage therapy in adults with first relapse AML." Cancer **121**: 234-42.
- [26] Couronne, L., C. Bastard and O. A. Bernard (2012). "TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma." N Engl J Med **366**: 95-6.

- [27] DeBerardinis, R. J., A. Mancuso, E. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, S. Wehrli and C. B. Thompson (2007). "Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 19345-50.
- [28] Desai, P., N. Mencia-Trinchant, O. Savenkov, M. S. Simon, G. Cheang, S. Lee, M. Samuel, E. K. Ritchie, M. L. Guzman, K. V. Ballman, G. J. Roboz and D. C. Hassane (2018). "Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis." Nat Med **24**: 1015-1023.
- [29] Dhayalan, A., A. Rajavelu, P. Rathert, R. Tamas, R. Z. Jurkowska, S. Ragozin and A. Jeltsch (2010). "The Dnmt3a PWWP domain reads histone 3 lysine 36 trimethylation and guides DNA methylation." J Biol Chem **285**: 26114-20.
- [30] Dohner, H., E. Estey, D. Grimwade, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Buchner, H. Dombret, B. L. Ebert, P. Fenaux, R. A. Larson, R. L. Levine, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, H. F. Tien, A. H. Wei, B. Lowenberg and C. D. Bloomfield (2017). "Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel." Blood **129**: 424-447.
- [31] Dohner, H., E. H. Estey, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Buchner, A. K. Burnett, H. Dombret, P. Fenaux, D. Grimwade, R. A. Larson, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. A. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, B. Lowenberg, C. D. Bloomfield and L. European (2010). "Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet." Blood **115**: 453-74.
- [32] Dohner, H., D. J. Weisdorf and C. D. Bloomfield (2015). "Acute Myeloid Leukemia." N Engl J Med **373**: 1136-52.
- [33] Dohner, K., P. Paschka and H. Dohner (2015). "[Acute myeloid leukemia]." Internist (Berl) **56**: 354-63.
- [34] Dohner, K., R. F. Schlenk, M. Habdank, C. Scholl, F. G. Rucker, A. Corbacioglu, L. Bullinger, S. Frohling and H. Dohner (2005). "Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations." Blood **106**: 3740-6.
- [35] Downing, J. R. (2003). "The core-binding factor leukemias: lessons learned from murine models." Curr Opin Genet Dev **13**: 48-54.

- [36] Dufour, A., F. Schneider, E. Hoster, T. Benthaus, B. Ksienzyk, S. Schneider, P. M. Kakadia, M. C. Sauerland, W. E. Berdel, T. Buchner, B. Wormann, J. Braess, M. Subklewe, W. Hiddemann, S. K. Bohlander, K. Spiekermann and A. C. s. group (2012). "Monoallelic CEBPA mutations in normal karyotype acute myeloid leukemia: independent favorable prognostic factor within NPM1 mutated patients." Ann Hematol **91**: 1051-63.
- [37] Dumbar, T. S., G. A. Gentry and M. O. Olson (1989). "Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids." Biochemistry **28**: 9495-501.
- [38] Estey, E. and H. Dohner (2006). "Acute myeloid leukaemia." Lancet **368**: 1894-907.
- [39] Estey, E. H., P. F. Thall, J. E. Cortes, F. J. Giles, S. O'Brien, S. A. Pierce, X. Wang, H. M. Kantarjian and M. Beran (2001). "Comparison of idarubicin + ara-C-, fludarabine + ara-C-, and topotecan + ara-C-based regimens in treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, refractory anemia with excess blasts in transformation, or refractory anemia with excess blasts." Blood **98**: 3575-83.
- [40] Falini, B., C. Mecucci, E. Tiacci, M. Alcalay, R. Rosati, L. Pasqualucci, R. La Starza, D. Diverio, E. Colombo, A. Santucci, B. Bigerna, R. Pacini, A. Pucciarini, A. Liso, M. Vignetti, P. Fazi, N. Meani, V. Pettrossi, G. Saglio, F. Mandelli, F. Lo-Coco, P. G. Pelicci, M. F. Martelli and G. A. L. W. Party (2005). "Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype." N Engl J Med **352**: 254-66.
- [41] Fenaux, P., G. J. Mufti, E. Hellstrom-Lindberg, V. Santini, N. Gattermann, U. Germing, G. Sanz, A. F. List, S. Gore, J. F. Seymour, H. Dombret, J. Backstrom, L. Zimmerman, D. McKenzie, C. L. Beach and L. R. Silverman (2010). "Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia." J Clin Oncol **28**: 562-9.
- [42] Ferrara, F. and A. Pinto (2007). "Acute myeloid leukemia in the elderly: current therapeutic results and perspectives for clinical research." Rev Recent Clin Trials **2**: 33-41.
- [43] Frattini, V., V. Trifonov, J. M. Chan, A. Castano, M. Lia, F. Abate, S. T. Keir, A. X. Ji, P. Zoppoli, F. Niola, C. Danussi, I. Dolgalev, P. Porrati, S. Pellegatta, A. Heguy, G. Gupta, D. J. Pisapia, P. Canoll, J. N. Bruce, R. E. McLendon, H. Yan, K. Aldape, G. Finocchiaro, T. Mikkelsen, G. G. Prive, D. D. Bigner, A. Lasorella, R. Rabadan and A. Iavarone (2013). "The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma." Nat Genet **45**: 1141-9.
- [44] Fried, I., C. Bodner, M. M. Pichler, K. Lind, C. Beham-Schmid, F. Quehenberger, W. R. Sperr, W. Linkesch, H. Sill and A. Wolfler (2012).

"Frequency, onset and clinical impact of somatic DNMT3A mutations in therapy-related and secondary acute myeloid leukemia." Haematologica **97**: 246-50.

[45] Frohling, S., C. Scholl, D. G. Gilliland and R. L. Levine (2005). "Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications." J Clin Oncol **23**: 6285-95.

[46] Fuks, F., W. A. Burgers, N. Godin, M. Kasai and T. Kouzarides (2001). "Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription." EMBO J **20**: 2536-44.

[47] Fuks, F., P. J. Hurd, R. Deplus and T. Kouzarides (2003). "The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase." Nucleic Acids Res **31**: 2305-12.

[48] Gaidzik, V. I., P. Paschka, D. Spath, M. Habdank, C. H. Kohne, U. Germing, M. von Lilienfeld-Toal, G. Held, H. A. Horst, D. Haase, M. Bentz, K. Gotze, H. Dohner, R. F. Schlenk, L. Bullinger and K. Dohner (2012). "TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group." J Clin Oncol **30**: 1350-7.

[49] Gaidzik, V. I., R. F. Schlenk, P. Paschka, A. Stolze, D. Spath, A. Kuendgen, M. von Lilienfeld-Toal, W. Brugger, H. G. Derigs, S. Kremers, R. Greil, A. Raghavachar, M. Ringhoffer, H. R. Salih, M. Wattad, H. G. Kirchen, V. Runde, G. Heil, A. L. Petzer, M. Girschikofsky, M. Heuser, S. Kayser, G. Goehring, M. V. Teleanu, B. Schlegelberger, A. Ganser, J. Krauter, L. Bullinger, H. Dohner and K. Dohner (2013). "Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AML5G)." Blood **121**: 4769-77.

[50] Gaidzik, V. I., V. Teleanu, E. Papaemmanuil, D. Weber, P. Paschka, J. Hahn, T. Wallrabenstein, B. Kolbinger, C. H. Kohne, H. A. Horst, P. Brossart, G. Held, A. Kundgen, M. Ringhoffer, K. Gotze, M. Rummel, M. Gerstung, P. Campbell, J. M. Kraus, H. A. Kestler, F. Thol, M. Heuser, B. Schlegelberger, A. Ganser, L. Bullinger, R. F. Schlenk, K. Dohner and H. Dohner (2016). "RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features." Leukemia **30**: 2282.

[51] Gaidzik, V. I., D. Weber, P. Paschka, A. Kaumanns, S. Krieger, A. Corbacioglu, J. Kronke, S. Kapp-Schwoerer, D. Kramer, H. A. Horst, I. Schmidt-Wolf, G. Held, A. Kundgen, M. Ringhoffer, K. Gotze, T. Kindler, W. Fiedler, M. Wattad, R. F. Schlenk, L. Bullinger, V. Teleanu, B. Schlegelberger, F. Thol, M. Heuser, A. Ganser, H. Dohner, K. Dohner and G. German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study (2017). "DNMT3A mutant transcript levels persist in remission and do not predict outcome in patients with acute myeloid leukemia." Leukemia.

- [52] Gale, R. E., C. Green, C. Allen, A. J. Mead, A. K. Burnett, R. K. Hills, D. C. Linch and P. Medical Research Council Adult Leukaemia Working (2008). "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**: 2776-84.
- [53] Galm, O., J. G. Herman and S. B. Baylin (2006). "The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies." Blood Rev **20**: 1-13.
- [54] Genovese, G., A. K. Kahler, R. E. Handsaker, J. Lindberg, S. A. Rose, S. F. Bakhom, K. Chambert, E. Mick, B. M. Neale, M. Fromer, S. M. Purcell, O. Svantesson, M. Landen, M. Hoglund, S. Lehmann, S. B. Gabriel, J. L. Moran, E. S. Lander, P. F. Sullivan, P. Sklar, H. Gronberg, C. M. Hultman and S. A. McCarroll (2014). "Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence." N Engl J Med **371**: 2477-87.
- [55] Gilliland, D. G. (2002). "Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy." Semin Hematol **39**: 6-11.
- [56] Gordon, C. A., S. R. Hartono and F. Chedin (2013). "Inactive DNMT3B splice variants modulate de novo DNA methylation." PLoS One **8**: e69486.
- [57] Gowher, H., P. Loutchanwoot, O. Vorobjeva, V. Handa, R. Z. Jurkowska, T. P. Jurkowski and A. Jeltsch (2006). "Mutational analysis of the catalytic domain of the murine Dnmt3a DNA-(cytosine C5)-methyltransferase." J Mol Biol **357**: 928-41.
- [58] Grimwade, D. and S. D. Freeman (2014). "Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"?" Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2014**: 222-33.
- [59] Grossmann, V., C. Haferlach, S. Weissmann, A. Roller, S. Schindela, F. Poetzinger, K. Stadler, F. Bellos, W. Kern, T. Haferlach, S. Schnittger and A. Kohlmann (2013). "The molecular profile of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: mutations in RUNX1 and DNMT3A are associated with poor prognosis in T-ALL." Genes Chromosomes Cancer **52**: 410-22.
- [60] Guo, X., L. Wang, J. Li, Z. Ding, J. Xiao, X. Yin, S. He, P. Shi, L. Dong, G. Li, C. Tian, J. Wang, Y. Cong and Y. Xu (2015). "Structural insight into autoinhibition and histone H3-induced activation of DNMT3A." Nature **517**: 640-4.
- [61] Haferlach, T., Y. Nagata, V. Grossmann, Y. Okuno, U. Bacher, G. Nagae, S. Schnittger, M. Sanada, A. Kon, T. Alpermann, K. Yoshida, A. Roller, N. Nadarajah, Y. Shiraishi, Y. Shiozawa, K. Chiba, H. Tanaka, H. P. Koeffler, H. U. Klein, M. Dugas, H. Aburatani, A. Kohlmann, S. Miyano, C. Haferlach, W. Kern and S. Ogawa (2014). "Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes." Leukemia **28**: 241-7.

[62] Handa, V. and A. Jeltsch (2005). "Profound flanking sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome." J Mol Biol **348**: 1103-12.

[63] Hansen, K. D., W. Timp, H. C. Bravo, S. Sabunciyan, B. Langmead, O. G. McDonald, B. Wen, H. Wu, Y. Liu, D. Diep, E. Briem, K. Zhang, R. A. Irizarry and A. P. Feinberg (2011). "Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types." Nat Genet **43**: 768-75.

[64] Hattori, N., T. Abe, N. Hattori, M. Suzuki, T. Matsuyama, S. Yoshida, E. Li and K. Shiota (2004). "Preference of DNA methyltransferases for CpG islands in mouse embryonic stem cells." Genome Res **14**: 1733-40.

[65] Ho, A. D., J. Schetelig, T. Bochtler, M. Schaich, K. Schafer-Eckart, M. Hanel, W. Rosler, H. Einsele, M. Kaufmann, H. Serve, W. E. Berdel, M. Stelljes, J. Mayer, A. Reichle, C. D. Baldus, N. Schmitz, M. Kramer, C. Rollig, M. Bornhauser, C. Thiede, G. Ehninger and L. Study Alliance (2016). "Allogeneic Stem Cell Transplantation Improves Survival in Patients with Acute Myeloid Leukemia Characterized by a High Allelic Ratio of Mutant FLT3-ITD." Biol Blood Marrow Transplant **22**: 462-9.

[66] Holliday, R. and G. W. Grigg (1993). "DNA methylation and mutation." Mutat Res **285**: 61-7.

[67] Hollink, I. H., Q. Feng, A. A. Danen-van Oorschot, S. T. Arentsen-Peters, L. J. Verboon, P. Zhang, V. de Haas, D. Reinhardt, U. Creutzig, J. Trka, R. Pieters, M. M. van den Heuvel-Eibrink, J. Wang and C. M. Zwaan (2012). "Low frequency of DNMT3A mutations in pediatric AML, and the identification of the OCI-AML3 cell line as an in vitro model." Leukemia **26**: 371-3.

[68] Holz-Schietinger, C., D. M. Matje, M. F. Harrison and N. O. Reich (2011). "Oligomerization of DNMT3A controls the mechanism of de novo DNA methylation." J Biol Chem **286**: 41479-88.

[69] Holz-Schietinger, C., D. M. Matje and N. O. Reich (2012). "Mutations in DNA methyltransferase (DNMT3A) observed in acute myeloid leukemia patients disrupt processive methylation." J Biol Chem **287**: 30941-51.

[70] Holz-Schietinger, C. and N. O. Reich (2010). "The inherent processivity of the human de novo methyltransferase 3A (DNMT3A) is enhanced by DNMT3L." J Biol Chem **285**: 29091-100.

[71] Horsfield, J. A., S. H. Anagnostou, J. K. Hu, K. H. Cho, R. Geisler, G. Lieschke, K. E. Crosier and P. S. Crosier (2007). "Cohesin-dependent regulation of Runx genes." Development **134**: 2639-49.

[72] Hu, S., H. Niu, H. Inaba, S. Orwick, C. Rose, J. C. Panetta, S. Yang, S. Pounds, Y. Fan, C. Calabrese, J. E. Rehg, D. Campana, J. E. Rubnitz and S. D. Baker (2011). "Activity of the multikinase inhibitor sorafenib in combination with cytarabine in acute myeloid leukemia." J Natl Cancer Inst **103**: 893-905.

[73] Huether, R., L. Dong, X. Chen, G. Wu, M. Parker, L. Wei, J. Ma, M. N. Edmonson, E. K. Hedlund, M. C. Rusch, S. A. Shurtleff, H. L. Mulder, K. Boggs, B. Vadordaria, J. Cheng, D. Yergeau, G. Song, J. Becksfort, G. Lemmon, C. Weber, Z. Cai, J. Dang, M. Walsh, A. L. Gedman, Z. Faber, J. Easton, T. Gruber, R. W. Kriwacki, J. F. Partridge, L. Ding, R. K. Wilson, E. R. Mardis, C. G. Mullighan, R. J. Gilbertson, S. J. Baker, G. Zambetti, D. W. Ellison, J. Zhang and J. R. Downing (2014). "The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes." Nat Commun **5**: 3630.

[74] Inoue, A. and Y. Zhang (2011). "Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos." Science **334**: 194.

[75] Itzykson, R., O. Kosmider and P. Fenaux (2013). "Somatic mutations and epigenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes." Best Pract Res Clin Haematol **26**: 355-64.

[76] Ivey, A., R. K. Hills, M. A. Simpson, J. V. Jovanovic, A. Gilkes, A. Grech, Y. Patel, N. Bhudia, H. Farah, J. Mason, K. Wall, S. Akiki, M. Griffiths, E. Solomon, F. McCaughan, D. C. Linch, R. E. Gale, P. Vyas, S. D. Freeman, N. Russell, A. K. Burnett, D. Grimwade and U. K. N. C. R. I. A. W. Group (2016). "Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML." N Engl J Med **374**: 422-33.

[77] Jaiswal, S., P. Fontanillas, J. Flannick, A. Manning, P. V. Grauman, B. G. Mar, R. C. Lindsley, C. H. Mermel, N. Burt, A. Chavez, J. M. Higgins, V. Moltchanov, F. C. Kuo, M. J. Kluk, B. Henderson, L. Kinnunen, H. A. Koistinen, C. Ladenvall, G. Getz, A. Correa, B. F. Banahan, S. Gabriel, S. Kathiresan, H. M. Stringham, M. I. McCarthy, M. Boehnke, J. Tuomilehto, C. Haiman, L. Groop, G. Atzmon, J. G. Wilson, D. Neuberg, D. Altshuler and B. L. Ebert (2014). "Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes." N Engl J Med **371**: 2488-98.

[78] Jan, M., B. L. Ebert and S. Jaiswal (2017). "Clonal hematopoiesis." Semin Hematol **54**: 43-50.

[79] Jankowska, A. M., H. Makishima, R. V. Tiu, H. Szpurka, Y. Huang, F. Traina, V. Visconte, Y. Sugimoto, C. Prince, C. O'Keefe, E. D. Hsi, A. List, M. A. Sekeres, A. Rao, M. A. McDevitt and J. P. Maciejewski (2011). "Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A." Blood **118**: 3932-41.

[80] Jeong, M., D. Sun, M. Luo, Y. Huang, G. A. Challen, B. Rodriguez, X. Zhang, L. Chavez, H. Wang, R. Hannah, S. B. Kim, L. Yang, M. Ko, R. Chen, B. Gottgens,

J. S. Lee, P. Gunaratne, L. A. Godley, G. J. Darlington, A. Rao, W. Li and M. A. Goodell (2014). "Large conserved domains of low DNA methylation maintained by Dnmt3a." Nat Genet **46**: 17-23.

[81] Jia, D., R. Z. Jurkowska, X. Zhang, A. Jeltsch and X. Cheng (2007). "Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation." Nature **449**: 248-51.

[82] Juliusson, G., V. Lazarevic, A. S. Horstedt, O. Hagberg, M. Hoglund and G. Swedish Acute Leukemia Registry (2012). "Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed." Blood **119**: 3890-9.

[83] Kane, E. V., E. Roman, R. Cartwright, J. Parker and G. Morgan (1999). "Tobacco and the risk of acute leukaemia in adults." Br J Cancer **81**: 1228-33.

[84] Kaneda, M., M. Okano, K. Hata, T. Sado, N. Tsujimoto, E. Li and H. Sasaki (2004). "Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting." Nature **429**: 900-3.

[85] Kar, S. A., A. Jankowska, H. Makishima, V. Visconte, A. Jerez, Y. Sugimoto, H. Muramatsu, F. Traina, M. Afable, K. Guinta, R. V. Tiu, B. Przychodzen, H. Sakaguchi, S. Kojima, M. A. Sekeres, A. F. List, M. A. McDevitt and J. P. Maciejewski (2013). "Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia." Haematologica **98**: 107-13.

[86] Kern, W., A. Kohlmann, S. Schnittger, C. Schoch and T. Haferlach (2005). "Role of gene expression profiling for diagnosing acute leukemias." Rev Clin Exp Hematol **9**: E1.

[87] Kim, S. J., H. Zhao, S. Hardikar, A. K. Singh, M. A. Goodell and T. Chen (2013). "A DNMT3A mutation common in AML exhibits dominant-negative effects in murine ES cells." Blood **122**: 4086-9.

[88] Kosmider, O., V. Gelsi-Boyer, L. Slama, F. Dreyfus, O. Beyne-Rauzy, B. Quesnel, M. Hunault-Berger, B. Slama, N. Vey, C. Lacombe, E. Solary, D. Birnbaum, O. A. Bernard and M. Fontenay (2010). "Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms." Leukemia **24**: 1094-6.

[89] Kronke, J., R. F. Schlenk, K. O. Jensen, F. Tschurtz, A. Corbacioglu, V. I. Gaidzik, P. Paschka, S. Onken, K. Eiwen, M. Habdank, D. Spath, M. Lubbert, M. Wattad, T. Kindler, H. R. Salih, G. Held, D. Nachbaur, M. von Lilienfeld-Toal, U. Germing, D. Haase, H. G. Mergenthaler, J. Krauter, A. Ganser, G. Gohring, B. Schlegelberger, H. Dohner and K. Dohner (2011). "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**: 2709-16.

[90] Lancet, J. E., J. E. Cortes, D. E. Hogge, M. S. Tallman, T. J. Kovacs, L. E. Damon, R. Komrokji, S. R. Solomon, J. E. Kolitz, M. Cooper, A. M. Yeager, A. C. Louie and E. J. Feldman (2014). "Phase 2 trial of CPX-351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML." Blood **123**: 3239-46.

[91] Leroy, H., C. Roumier, P. Huyghe, V. Biggio, P. Fenaux and C. Preudhomme (2005). "CEBPA point mutations in hematological malignancies." Leukemia **19**: 329-34.

[92] Lessard, J. and G. Sauvageau (2003). "Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells." Nature **423**: 255-60.

[93] Ley, T. J., L. Ding, M. J. Walter, M. D. McLellan, T. Lamprecht, D. E. Larson, C. Kandoth, J. E. Payton, J. Baty, J. Welch, C. C. Harris, C. F. Lichti, R. R. Townsend, R. S. Fulton, D. J. Dooling, D. C. Koboldt, H. Schmidt, Q. Zhang, J. R. Osborne, L. Lin, M. O'Laughlin, J. F. McMichael, K. D. Delehaunty, S. D. McGrath, L. A. Fulton, V. J. Magrini, T. L. Vickery, J. Hundal, L. L. Cook, J. J. Conyers, G. W. Swift, J. P. Reed, P. A. Alldredge, T. Wylie, J. Walker, J. Kalicki, M. A. Watson, S. Heath, W. D. Shannon, N. Varghese, R. Nagarajan, P. Westervelt, M. H. Tomasson, D. C. Link, T. A. Graubert, J. F. DiPersio, E. R. Mardis and R. K. Wilson (2010). "DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia." N Engl J Med **363**: 2424-33.

[94] Ley, T. J., E. R. Mardis, L. Ding, B. Fulton, M. D. McLellan, K. Chen, D. Dooling, B. H. Dunford-Shore, S. McGrath, M. Hickenbotham, L. Cook, R. Abbott, D. E. Larson, D. C. Koboldt, C. Pohl, S. Smith, A. Hawkins, S. Abbott, D. Locke, L. W. Hillier, T. Miner, L. Fulton, V. Magrini, T. Wylie, J. Glasscock, J. Conyers, N. Sander, X. Shi, J. R. Osborne, P. Minx, D. Gordon, A. Chinwalla, Y. Zhao, R. E. Ries, J. E. Payton, P. Westervelt, M. H. Tomasson, M. Watson, J. Baty, J. Ivanovich, S. Heath, W. D. Shannon, R. Nagarajan, M. J. Walter, D. C. Link, T. A. Graubert, J. F. DiPersio and R. K. Wilson (2008). "DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome." Nature **456**: 66-72.

[95] Lin, I. G., L. Han, A. Taghva, L. E. O'Brien and C. L. Hsieh (2002). "Murine de novo methyltransferase Dnmt3a demonstrates strand asymmetry and site preference in the methylation of DNA in vitro." Mol Cell Biol **22**: 704-23.

[96] Lin, J., D. M. Yao, J. Qian, Q. Chen, W. Qian, Y. Li, J. Yang, C. Z. Wang, H. Y. Chai, Z. Qian, G. F. Xiao and W. R. Xu (2011). "Recurrent DNMT3A R882 mutations in Chinese patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome." PLoS One **6**: e26906.

[97] Liu, P., S. A. Tarle, A. Hajra, D. F. Claxton, P. Marlton, M. Freedman, M. J. Siciliano and F. S. Collins (1993). "Fusion between transcription factor CBF

beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia." Science **261**: 1041-4.

[98] Liu, X. and Z. Q. Ling (2015). "Role of isocitrate dehydrogenase 1/2 (IDH 1/2) gene mutations in human tumors." Histol Histopathol **30**: 1155-60.

[99] Lo-Coco, F., G. Avvisati, M. Vignetti, C. Thiede, S. M. Orlando, S. Iacobelli, F. Ferrara, P. Fazi, L. Cicconi, E. Di Bona, G. Specchia, S. Sica, M. Divona, A. Levis, W. Fiedler, E. Cerqui, M. Breccia, G. Fioritoni, H. R. Salih, M. Cazzola, L. Melillo, A. M. Carella, C. H. Brandts, E. Morra, M. von Lilienfeld-Toal, B. Hertenstein, M. Wattad, M. Lubbert, M. Hanel, N. Schmitz, H. Link, M. G. Kropp, A. Rambaldi, G. La Nasa, M. Luppi, F. Ciceri, O. Finizio, A. Venditti, F. Fabbiano, K. Dohner, M. Sauer, A. Ganser, S. Amadori, F. Mandelli, H. Dohner, G. Ehninger, R. F. Schlenk, U. Platzbecker, d. A. Gruppo Italiano Malattie Ematologiche, G. German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study and L. Study Alliance (2013). "Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia." N Engl J Med **369**: 111-21.

[100] Loke, J., J. N. Khan, J. S. Wilson, C. Craddock and K. Wheatley (2015). "Mylotarg has potent anti-leukaemic effect: a systematic review and meta-analysis of anti-CD33 antibody treatment in acute myeloid leukaemia." Ann Hematol **94**: 361-73.

[101] Lowenberg, B. (2004). "Strategies in the treatment of acute myeloid leukemia." Haematologica **89**: 1029-32.

[102] Lowenberg, B., J. R. Downing and A. Burnett (1999). "Acute myeloid leukemia." N Engl J Med **341**: 1051-62.

[103] Lowenberg, B., J. D. Griffin and M. S. Tallman (2003). "Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 82-101.

[104] Marcucci, G., T. Haferlach and H. Dohner (2011). "Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications." J Clin Oncol **29**: 475-86.

[105] Marcucci, G., K. Maharry, Y. Z. Wu, M. D. Radmacher, K. Mrozek, D. Margeson, K. B. Holland, S. P. Whitman, H. Becker, S. Schwind, K. H. Metzeler, B. L. Powell, T. H. Carter, J. E. Kolitz, M. Wetzler, A. J. Carroll, M. R. Baer, M. A. Caligiuri, R. A. Larson and C. D. Bloomfield (2010). "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**: 2348-55.

[106] Marcucci, G., K. H. Metzeler, S. Schwind, H. Becker, K. Maharry, K. Mrozek, M. D. Radmacher, J. Kohlschmidt, D. Nicolet, S. P. Whitman, Y. Z. Wu, B. L.

Powell, T. H. Carter, J. E. Kolitz, M. Wetzler, A. J. Carroll, M. R. Baer, J. O. Moore, M. A. Caligiuri, R. A. Larson and C. D. Bloomfield (2012). "Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia." J Clin Oncol **30**: 742-50.

[107] Marcucci, G., K. Mrozek and C. D. Bloomfield (2005). "Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics." Curr Opin Hematol **12**: 68-75.

[108] Mardis, E. R., L. Ding, D. J. Dooling, D. E. Larson, M. D. McLellan, K. Chen, D. C. Koboldt, R. S. Fulton, K. D. Delehaunty, S. D. McGrath, L. A. Fulton, D. P. Locke, V. J. Magrini, R. M. Abbott, T. L. Vickery, J. S. Reed, J. S. Robinson, T. Wylie, S. M. Smith, L. Carmichael, J. M. Eldred, C. C. Harris, J. Walker, J. B. Peck, F. Du, A. F. Dukes, G. E. Sanderson, A. M. Brummett, E. Clark, J. F. McMichael, R. J. Meyer, J. K. Schindler, C. S. Pohl, J. W. Wallis, X. Shi, L. Lin, H. Schmidt, Y. Tang, C. Haipek, M. E. Wiechert, J. V. Ivy, J. Kalicki, G. Elliott, R. E. Ries, J. E. Payton, P. Westervelt, M. H. Tomasson, M. A. Watson, J. Baty, S. Heath, W. D. Shannon, R. Nagarajan, D. C. Link, M. J. Walter, T. A. Graubert, J. F. DiPersio, R. K. Wilson and T. J. Ley (2009). "Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome." N Engl J Med **361**: 1058-66.

[109] Martelli, A. M., M. Nyakern, G. Tabellini, R. Bortul, P. L. Tazzari, C. Evangelisti and L. Cocco (2006). "Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia." Leukemia **20**: 911-28.

[110] Mattison, R. J., K. R. Ostler, F. L. Locke and L. A. Godley (2007). "Implications of FLT3 mutations in the therapy of acute myeloid leukemia." Rev Recent Clin Trials **2**: 135-41.

[111] Mayer, L. D., T. O. Harasym, P. G. Tardi, N. L. Harasym, C. R. Shew, S. A. Johnstone, E. C. Ramsay, M. B. Bally and A. S. Janoff (2006). "Ratiometric dosing of anticancer drug combinations: controlling drug ratios after systemic administration regulates therapeutic activity in tumor-bearing mice." Mol Cancer Ther **5**: 1854-63.

[112] Mayle, A., L. Yang, B. Rodriguez, T. Zhou, E. Chang, C. V. Curry, G. A. Challen, W. Li, D. Wheeler, V. I. Rebel and M. A. Goodell (2015). "Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation." Blood **125**: 629-38.

[113] Medeiros, B. C., S. Satram-Hoang, D. Hurst, K. Q. Hoang, F. Momin and C. Reyes (2015). "Big data analysis of treatment patterns and outcomes among elderly acute myeloid leukemia patients in the United States." Ann Hematol **94**: 1127-38.

- [114] Medinger, M. and J. R. Passweg (2017). "Acute myeloid leukaemia genomics." Br J Haematol **179**: 530-542.
- [115] Meissner, A., A. Gnirke, G. W. Bell, B. Ramsahoye, E. S. Lander and R. Jaenisch (2005). "Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis." Nucleic Acids Res **33**: 5868-77.
- [116] Metzeler, K. H., H. Becker, K. Maharry, M. D. Radmacher, J. Kohlschmidt, K. Mrozek, D. Nicolet, S. P. Whitman, Y. Z. Wu, S. Schwind, B. L. Powell, T. H. Carter, M. Wetzler, J. O. Moore, J. E. Kolitz, M. R. Baer, A. J. Carroll, R. A. Larson, M. A. Caligiuri, G. Marcucci and C. D. Bloomfield (2011). "ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category." Blood **118**: 6920-9.
- [117] Metzeler, K. H., A. Walker, S. Geyer, R. Garzon, R. B. Klisovic, C. D. Bloomfield, W. Blum and G. Marcucci (2012). "DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia." Leukemia **26**: 1106-7.
- [118] Meyerson, M., S. Gabriel and G. Getz (2010). "Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing." Nat Rev Genet **11**: 685-96.
- [119] Mrozek, K., H. Dohner and C. D. Bloomfield (2007). "Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances." Curr Opin Hematol **14**: 106-14.
- [120] Mrozek, K., G. Marcucci, P. Paschka, S. P. Whitman and C. D. Bloomfield (2007). "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**: 431-48.
- [121] Muller, P. A. and K. H. Vousden (2014). "Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities." Cancer Cell **25**: 304-17.
- [122] Nakanishi, M., K. Tanaka, T. Shintani, T. Takahashi and N. Kamada (1999). "Chromosomal instability in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome patients among atomic bomb survivors." J Radiat Res **40**: 159-67.
- [123] Nassereddine, S., C. J. Lap, F. Haroun and I. Tabbara (2017). "The role of mutant IDH1 and IDH2 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia." Ann Hematol **96**: 1983-1991.
- [124] Neumann, M., S. Heesch, C. Schlee, S. Schwartz, N. Gokbuget, D. Hoelzer, N. P. Konstandin, B. Ksienzyk, S. Vosberg, A. Graf, S. Krebs, H. Blum, T. Raff, M.

Bruggemann, W. K. Hofmann, J. Hecht, S. K. Bohlander, P. A. Greif and C. D. Baldus (2013). "Whole-exome sequencing in adult ETP-ALL reveals a high rate of DNMT3A mutations." Blood **121**: 4749-52.

[125] Odejide, O., O. Weigert, A. A. Lane, D. Toscano, M. A. Lunning, N. Kopp, S. Kim, D. van Bodegom, S. Bolla, J. H. Schatz, J. Teruya-Feldstein, E. Hochberg, A. Louissaint, D. Dorfman, K. Stevenson, S. J. Rodig, P. P. Piccaluga, E. Jacobsen, S. A. Pileri, N. L. Harris, S. Ferrero, G. Inghirami, S. M. Horwitz and D. M. Weinstock (2014). "A targeted mutational landscape of angioimmunoblastic T-cell lymphoma." Blood **123**: 1293-6.

[126] Okano, M., S. Xie and E. Li (1998). "Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases." Nat Genet **19**: 219-20.

[127] Ossenkoppele, G. J. and G. J. Schuurhuis (2014). "MRD in AML: it is time to change the definition of remission." Best Pract Res Clin Haematol **27**: 265-71.

[128] Ostler, K. R., E. M. Davis, S. L. Payne, B. B. Gosalia, J. Exposito-Cespedes, M. M. Le Beau and L. A. Godley (2007). "Cancer cells express aberrant DNMT3B transcripts encoding truncated proteins." Oncogene **26**: 5553-63.

[129] Otani, J., T. Nankumo, K. Arita, S. Inamoto, M. Ariyoshi and M. Shirakawa (2009). "Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain." EMBO Rep **10**: 1235-41.

[130] Palomero, T., L. Couronne, H. Khiabani, M. Y. Kim, A. Ambesi-Impiombato, A. Perez-Garcia, Z. Carpenter, F. Abate, M. Allegretta, J. E. Haydu, X. Jiang, I. S. Lossos, C. Nicolas, M. Balbin, C. Bastard, G. Bhagat, M. A. Piris, E. Campo, O. A. Bernard, R. Rabadan and A. A. Ferrando (2014). "Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas." Nat Genet **46**: 166-70.

[131] Papaemmanuil, E., M. Gerstung, L. Bullinger, V. I. Gaidzik, P. Paschka, N. D. Roberts, N. E. Potter, M. Heuser, F. Thol, N. Bolli, G. Gundem, P. Van Loo, I. Martincorena, P. Ganly, L. Mudie, S. McLaren, S. O'Meara, K. Raine, D. R. Jones, J. W. Teague, A. P. Butler, M. F. Greaves, A. Ganser, K. Dohner, R. F. Schlenk, H. Dohner and P. J. Campbell (2016). "Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia." N Engl J Med **374**: 2209-2221.

[132] Pardanani, A., M. M. Patnaik, T. L. Lasho, M. Mai, R. A. Knudson, C. Finke, R. P. Ketterling, R. F. McClure and A. Tefferi (2010). "Recurrent IDH mutations in high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia with isolated del(5q)." Leukemia **24**: 1370-2.

[133] Parsons, D. W., S. Jones, X. Zhang, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I. M. Siu, G. L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B. A. Rasheed, S.

Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D. A. Busam, H. Tekleab, L. A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D. R. Smith, R. L. Strausberg, S. K. Marie, S. M. Shinjo, H. Yan, G. J. Riggins, D. D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu and K. W. Kinzler (2008). "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme." Science **321**: 1807-12.

[134] Paschka, P., R. F. Schlenk, V. I. Gaidzik, M. Habdank, J. Kronke, L. Bullinger, D. Spath, S. Kayser, M. Zucknick, K. Gotze, H. A. Horst, U. Germing, H. Dohner and K. Dohner (2010). "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**: 3636-43.

[135] Pastor, W. A., U. J. Pape, Y. Huang, H. R. Henderson, R. Lister, M. Ko, E. M. McLoughlin, Y. Brudno, S. Mahapatra, P. Kapranov, M. Tahiliani, G. Q. Daley, X. S. Liu, J. R. Ecker, P. M. Milos, S. Agarwal and A. Rao (2011). "Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells." Nature **473**: 394-7.

[136] Patel, J. P., M. Gonen, M. E. Figueroa, H. Fernandez, Z. Sun, J. Racevskis, P. Van Vlierberghe, I. Dalgalev, S. Thomas, O. Aminova, K. Huberman, J. Cheng, A. Viale, N. D. Socci, A. Heguy, A. Cherry, G. Vance, R. R. Higgins, R. P. Ketterling, R. E. Gallagher, M. Litzow, M. R. van den Brink, H. M. Lazarus, J. M. Rowe, S. Luger, A. Ferrando, E. Paietta, M. S. Tallman, A. Melnick, O. Abdel-Wahab and R. L. Levine (2012). "Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia." N Engl J Med **366**: 1079-89.

[137] Pecorino, L. (2008). Molecular biology of cancer : mechanisms, targets, and therapeutics. Oxford ; New York, Oxford University Press.

[138] Petersdorf, S. H., K. J. Kopecky, M. Slovak, C. Willman, T. Nevill, J. Brandwein, R. A. Larson, H. P. Erba, P. J. Stiff, R. K. Stuart, R. B. Walter, M. S. Tallman, L. Stenke and F. R. Appelbaum (2013). "A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia." Blood **121**: 4854-60.

[139] Pratcorona, M., S. Brunet, J. Nomdedeu, J. M. Ribera, M. Tormo, R. Duarte, L. Escoda, R. Guardia, M. P. Queipo de Llano, O. Salamero, J. Bargay, C. Pedro, J. M. Marti, M. Torrebadell, M. Diaz-Beya, M. Camos, D. Colomer, M. Hoyos, J. Sierra, J. Esteve and M. Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas (2013). "Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy." Blood **121**: 2734-8.

[140] Ribeiro, A. F., M. Pratcorona, C. Erpelinck-Verschueren, V. Rockova, M. Sanders, S. Abbas, M. E. Figueroa, A. Zeilemaker, A. Melnick, B. Lowenberg, P. J. Valk and R. Delwel (2012). "Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia." Blood **119**: 5824-31.

- [141] Robertson, A. K., T. M. Geiman, U. T. Sankpal, G. L. Hager and K. D. Robertson (2004). "Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and Dnmt3a in vitro." Biochem Biophys Res Commun **322**: 110-8.
- [142] Robertson, K. D., E. Uzvolgyi, G. Liang, C. Talmadge, J. Sumegi, F. A. Gonzales and P. A. Jones (1999). "The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors." Nucleic Acids Res **27**: 2291-8.
- [143] Roller, A., V. Grossmann, U. Bacher, F. Poetzinger, S. Weissmann, N. Nadarajah, L. Boeck, W. Kern, C. Haferlach, S. Schnittger, T. Haferlach and A. Kohlmann (2013). "Landmark analysis of DNMT3A mutations in hematological malignancies." Leukemia **27**: 1573-8.
- [144] Russler-Germain, D. A., D. H. Spencer, M. A. Young, T. L. Lamprecht, C. A. Miller, R. Fulton, M. R. Meyer, P. Erdmann-Gilmore, R. R. Townsend, R. K. Wilson and T. J. Ley (2014). "The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers." Cancer Cell **25**: 442-54.
- [145] Sakata-Yanagimoto, M., T. Enami, K. Yoshida, Y. Shiraishi, R. Ishii, Y. Miyake, H. Muto, N. Tsuyama, A. Sato-Otsubo, Y. Okuno, S. Sakata, Y. Kamada, R. Nakamoto-Matsubara, N. B. Tran, K. Izutsu, Y. Sato, Y. Ohta, J. Furuta, S. Shimizu, T. Komeno, Y. Sato, T. Ito, M. Noguchi, E. Noguchi, M. Sanada, K. Chiba, H. Tanaka, K. Suzukawa, T. Nanmoku, Y. Hasegawa, O. Nureki, S. Miyano, N. Nakamura, K. Takeuchi, S. Ogawa and S. Chiba (2014). "Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma." Nat Genet **46**: 171-5.
- [146] Schlenk, R. F. and H. Dohner (2013). "Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2013**: 324-30.
- [147] Schlenk, R. F., K. Dohner and H. Dohner (2013). "[Acute myeloid leukemia. Genetic diagnostics and molecular therapy]." Internist (Berl) **54**: 171-8.
- [148] Schnittger, S., W. Kern, C. Tschulik, T. Weiss, F. Dicker, B. Falini, C. Haferlach and T. Haferlach (2009). "Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML." Blood **114**: 2220-31.
- [149] Schoofs, T. and C. Muller-Tidow (2011). "DNA methylation as a pathogenic event and as a therapeutic target in AML." Cancer Treat Rev **37 Suppl 1**: S13-8.

- [150] Shiba, N., T. Taki, M. J. Park, A. Shimada, M. Sotomatsu, S. Adachi, A. Tawa, K. Horibe, M. Tsuchida, R. Hanada, I. Tsukimoto, H. Arakawa and Y. Hayashi (2012). "DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia." Br J Haematol **156**: 413-4.
- [151] Shivarov, V., R. Gueorguieva, A. Stoimenov and R. Tiu (2013). "DNMT3A mutation is a poor prognosis biomarker in AML: results of a meta-analysis of 4500 AML patients." Leuk Res **37**: 1445-50.
- [152] Shlush, L. I., S. Zandi, A. Mitchell, W. C. Chen, J. M. Brandwein, V. Gupta, J. A. Kennedy, A. D. Schimmer, A. C. Schuh, K. W. Yee, J. L. McLeod, M. Doedens, J. J. Medeiros, R. Marke, H. J. Kim, K. Lee, J. D. McPherson, T. J. Hudson, H. P.-L. G. P. Consortium, A. M. Brown, F. Yousif, Q. M. Trinh, L. D. Stein, M. D. Minden, J. C. Wang and J. E. Dick (2014). "Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia." Nature **506**: 328-33.
- [153] Smith, M. A., R. P. McCaffrey and J. E. Karp (1996). "The secondary leukemias: challenges and research directions." J Natl Cancer Inst **88**: 407-18.
- [154] Stegelmann, F., L. Bullinger, R. F. Schlenk, P. Paschka, M. Griesshammer, C. Blerch, S. Kuhn, S. Schauer, H. Dohner and K. Dohner (2011). "DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms." Leukemia **25**: 1217-9.
- [155] Stone, R. M., D. J. DeAngelo, V. Klimek, I. Galinsky, E. Estey, S. D. Nimer, W. Grandin, D. Lebowitz, Y. Wang, P. Cohen, E. A. Fox, D. Neuberg, J. Clark, D. G. Gilliland and J. D. Griffin (2005). "Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412." Blood **105**: 54-60.
- [156] Stone, R. M., S. J. Mandrekar, B. L. Sanford, K. Laumann, S. Geyer, C. D. Bloomfield, C. Thiede, T. W. Prior, K. Dohner, G. Marcucci, F. Lo-Coco, R. B. Klisovic, A. Wei, J. Sierra, M. A. Sanz, J. M. Brandwein, T. de Witte, D. Niederwieser, F. R. Appelbaum, B. C. Medeiros, M. S. Tallman, J. Krauter, R. F. Schlenk, A. Ganser, H. Serve, G. Ehninger, S. Amadori, R. A. Larson and H. Dohner (2017). "Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation." N Engl J Med **377**: 454-464.
- [157] Stone, R. M., M. R. O'Donnell and M. A. Sekeres (2004). "Acute myeloid leukemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 98-117.
- [158] Subramaniam, D., R. Thombre, A. Dhar and S. Anant (2014). "DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy." Front Oncol **4**: 80.

- [159] Suetake, I., Y. Mishima, H. Kimura, Y. H. Lee, Y. Goto, H. Takeshima, T. Ikegami and S. Tajima (2011). "Characterization of DNA-binding activity in the N-terminal domain of the DNA methyltransferase Dnmt3a." Biochem J **437**: 141-8.
- [160] Tadokoro, Y., H. Ema, M. Okano, E. Li and H. Nakauchi (2007). "De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells." J Exp Med **204**: 715-22.
- [161] Tahiliani, M., K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind and A. Rao (2009). "Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1." Science **324**: 930-5.
- [162] Takeshima, H., I. Suetake, H. Shimahara, K. Ura, S. Tate and S. Tajima (2006). "Distinct DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b towards naked and nucleosomal DNA." J Biochem **139**: 503-15.
- [163] Tallman, M. S., D. G. Gilliland and J. M. Rowe (2005). "Drug therapy for acute myeloid leukemia." Blood **106**: 1154-63.
- [164] Tang, J. L., H. A. Hou, C. Y. Chen, C. Y. Liu, W. C. Chou, M. H. Tseng, C. F. Huang, F. Y. Lee, M. C. Liu, M. Yao, S. Y. Huang, B. S. Ko, S. C. Hsu, S. J. Wu, W. Tsay, Y. C. Chen, L. I. Lin and H. F. Tien (2009). "AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations." Blood **114**: 5352-61.
- [165] Tenen, D. G. (2003). "Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way." Nat Rev Cancer **3**: 89-101.
- [166] Terada, K., H. Yamaguchi, T. Ueki, K. Usuki, Y. Kobayashi, K. Tajika, S. Gomi, S. Kurosawa, K. Miyadera, T. Tokura, I. Omori, A. Marumo, Y. Fujiwara, S. Yui, T. Ryotokuji, Y. Osaki, K. Arai, T. Kitano, F. Kosaka, S. Wakita, H. Tamai, T. Fukuda and K. Inokuchi (2017). "Full-length mutation search of the TP53 gene in acute myeloid leukemia has increased significance as a prognostic factor." Ann Hematol.
- [167] Thol, F., F. Damm, A. Ludeking, C. Winschel, K. Wagner, M. Morgan, H. Yun, G. Gohring, B. Schlegelberger, D. Hoelzer, M. Lubbert, L. Kanz, W. Fiedler, H. Kirchner, G. Heil, J. Krauter, A. Ganser and M. Heuser (2011). "Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia." J Clin Oncol **29**: 2889-96.
- [168] Thol, F., M. Heuser, F. Damm, J. H. Klusmann, K. Reinhardt and D. Reinhardt (2011). "DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukemia." Haematologica **96**: 1238-40.

- [169] Traina, F., V. Visconte, A. M. Jankowska, H. Makishima, C. L. O'Keefe, P. Elson, Y. Han, F. H. Hsieh, M. A. Sekeres, R. S. Mali, M. Kalaycio, A. E. Lichtin, A. S. Advani, H. K. Duong, E. Copelan, R. Kapur, S. T. Olalla Saad, J. P. Maciejewski and R. V. Tiu (2012). "Single nucleotide polymorphism array lesions, TET2, DNMT3A, ASXL1 and CBL mutations are present in systemic mastocytosis." PLoS One **7**: e43090.
- [170] Travis, L. B., C. Y. Li, Z. N. Zhang, D. G. Li, S. N. Yin, W. H. Chow, G. L. Li, M. Dosemeci, W. Blot, J. F. Fraumeni, Jr. and et al. (1994). "Hematopoietic malignancies and related disorders among benzene-exposed workers in China." Leuk Lymphoma **14**: 91-102.
- [171] Turkalp, Z., J. Karamchandani and S. Das (2014). "IDH mutation in glioma: new insights and promises for the future." JAMA Neurol **71**: 1319-25.
- [172] Valk, P. J., D. T. Bowen, M. E. Frew, A. C. Goodeve, B. Lowenberg and J. T. Reilly (2004). "Second hit mutations in the RTK/RAS signaling pathway in acute myeloid leukemia with inv(16)." Haematologica **89**: 106.
- [173] Verhaak, R. G., C. S. Goudswaard, W. van Putten, M. A. Bijl, M. A. Sanders, W. Hagens, A. G. Uitterlinden, C. A. Erpelinck, R. Delwel, B. Lowenberg and P. J. Valk (2005). "Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance." Blood **106**: 3747-54.
- [174] Ward, P. S., J. Patel, D. R. Wise, O. Abdel-Wahab, B. D. Bennett, H. A. Collier, J. R. Cross, V. R. Fantin, C. V. Hedvat, A. E. Perl, J. D. Rabinowitz, M. Carroll, S. M. Su, K. A. Sharp, R. L. Levine and C. B. Thompson (2010). "The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate." Cancer Cell **17**: 225-34.
- [175] Wei, A. H. and I. S. Tiong (2017). "Midostaurin, enasidenib, CPX-351, gemtuzumab ozogamicin, and venetoclax bring new hope to AML." Blood **130**: 2469-2474.
- [176] Weisenberger, D. J., M. Velicescu, M. A. Preciado-Lopez, F. A. Gonzales, Y. C. Tsai, G. Liang and P. A. Jones (2002). "Identification and characterization of alternatively spliced variants of DNA methyltransferase 3a in mammalian cells." Gene **298**: 91-9.
- [177] Weissmann, F., I. Muyrers-Chen, T. Musch, D. Stach, M. Wiessler, R. Paro and F. Lyko (2003). "DNA hypermethylation in *Drosophila melanogaster* causes irregular chromosome condensation and dysregulation of epigenetic histone modifications." Mol Cell Biol **23**: 2577-86.

- [178] Westwood, J. D. (2002). Medicine meets virtual reality 02/10 : digital upgrades, applying Moore's law to health. Amsterdam ; Washington, D.C., IOS Press.
- [179] Whitman, S. P., K. J. Archer, L. Feng, C. Baldus, B. Becknell, B. D. Carlson, A. J. Carroll, K. Mrozek, J. W. Vardiman, S. L. George, J. E. Kolitz, R. A. Larson, C. D. Bloomfield and M. A. Caligiuri (2001). "Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study." Cancer Res **61**: 7233-9.
- [180] Whitman, S. P., A. S. Ruppert, M. D. Radmacher, K. Mrozek, P. Paschka, C. Langer, C. D. Baldus, J. Wen, F. Racke, B. L. Powell, J. E. Kolitz, R. A. Larson, M. A. Caligiuri, G. Marcucci and C. D. Bloomfield (2008). "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**: 1552-9.
- [181] Wienholz, B. L., M. S. Karetka, A. H. Moarefi, C. A. Gordon, P. A. Ginno and F. Chedin (2010). "DNMT3L modulates significant and distinct flanking sequence preference for DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B in vivo." PLoS Genet **6**: e1001106.
- [182] Wilson, C. S., G. S. Davidson, S. B. Martin, E. Andries, J. Potter, R. Harvey, K. Ar, Y. Xu, K. J. Kopecky, D. P. Ankerst, H. Gundacker, M. L. Slovak, M. Mosquera-Caro, I. M. Chen, D. L. Stirewalt, M. Murphy, F. A. Schultz, H. Kang, X. Wang, J. P. Radich, F. R. Appelbaum, S. R. Atlas, J. Godwin and C. L. Willman (2006). "Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction." Blood **108**: 685-96.
- [183] Wlodarski, M. W., J. Motter, T. A. Gorr, C. Olk-Batz, H. Hasle, M. Dworzak, C. M. Niemeyer and C. Flotho (2011). "Abnormal promoter DNA methylation in juvenile myelomonocytic leukemia is not caused by mutation in DNMT3A." Blood **118**: 4490-1.
- [184] Xie, M., C. Lu, J. Wang, M. D. McLellan, K. J. Johnson, M. C. Wendl, J. F. McMichael, H. K. Schmidt, V. Yellapantula, C. A. Miller, B. A. Ozenberger, J. S. Welch, D. C. Link, M. J. Walter, E. R. Mardis, J. F. Dpersio, F. Chen, R. K. Wilson, T. J. Ley and L. Ding (2014). "Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies." Nat Med **20**: 1472-8.
- [185] Xie, S., Z. Wang, M. Okano, M. Nogami, Y. Li, W. W. He, K. Okumura and E. Li (1999). "Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family." Gene **236**: 87-95.

- [186] Xu, F., C. Mao, Y. Ding, C. Rui, L. Wu, A. Shi, H. Zhang, L. Zhang and Z. Xu (2010). "Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs." Curr Med Chem **17**: 4052-71.
- [187] Xu, W., H. Yang, Y. Liu, Y. Yang, P. Wang, S. H. Kim, S. Ito, C. Yang, P. Wang, M. T. Xiao, L. X. Liu, W. Q. Jiang, J. Liu, J. Y. Zhang, B. Wang, S. Frye, Y. Zhang, Y. H. Xu, Q. Y. Lei, K. L. Guan, S. M. Zhao and Y. Xiong (2011). "Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases." Cancer Cell **19**: 17-30.
- [188] Yanagisawa, Y., E. Ito, Y. Yuasa and K. Maruyama (2002). "The human DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B have two types of promoters with different CpG contents." Biochim Biophys Acta **1577**: 457-65.
- [189] Yang, L., R. Rau and M. A. Goodell (2015). "DNMT3A in haematological malignancies." Nat Rev Cancer **15**: 152-65.
- [190] Yang, Y., R. Liu, R. Qiu, Y. Zheng, W. Huang, H. Hu, Q. Ji, H. He, Y. Shang, Y. Gong and Y. Wang (2015). "CRL4B promotes tumorigenesis by coordinating with SUV39H1/HP1/DNMT3A in DNA methylation-based epigenetic silencing." Oncogene **34**: 104-18.
- [191] You, J. S. and P. A. Jones (2012). "Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?" Cancer Cell **22**: 9-20.
- [192] Zhang, C. C., Z. Yan, B. Pascual, A. Jackson-Fisher, D. S. Huang, Q. Zong, M. Elliott, C. Fan, N. Huser, J. Lee, M. Sung and P. Sapra (2018). "Gemtuzumab Ozogamicin (GO) Inclusion to Induction Chemotherapy Eliminates Leukemic Initiating Cells and Significantly Improves Survival in Mouse Models of Acute Myeloid Leukemia." Neoplasia **20**: 1-11.
- [193] Zhang, J., L. Ding, L. Holmfeldt, G. Wu, S. L. Heatley, D. Payne-Turner, J. Easton, X. Chen, J. Wang, M. Rusch, C. Lu, S. C. Chen, L. Wei, J. R. Collins-Underwood, J. Ma, K. G. Roberts, S. B. Pounds, A. Ulyanov, J. Becksfort, P. Gupta, R. Huether, R. W. Kriwacki, M. Parker, D. J. McGoldrick, D. Zhao, D. Alford, S. Espy, K. C. Bobba, G. Song, D. Pei, C. Cheng, S. Roberts, M. I. Barbato, D. Campana, E. Coustan-Smith, S. A. Shurtleff, S. C. Raimondi, M. Kleppe, J. Cools, K. A. Shimano, M. L. Hermiston, S. Doulatov, K. Eppert, E. Laurenti, F. Notta, J. E. Dick, G. Basso, S. P. Hunger, M. L. Loh, M. Devidas, B. Wood, S. Winter, K. P. Dunsmore, R. S. Fulton, L. L. Fulton, X. Hong, C. C. Harris, D. J. Dooling, K. Ochoa, K. J. Johnson, J. C. Obenauer, W. E. Evans, C. H. Pui, C. W. Naeve, T. J. Ley, E. R. Mardis, R. K. Wilson, J. R. Downing and C. G. Mullighan (2012). "The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia." Nature **481**: 157-63.
- [194] Zhang, P., J. Iwasaki-Arai, H. Iwasaki, M. L. Fenyus, T. Dayaram, B. M. Owens, H. Shigematsu, E. Levantini, C. S. Huettner, J. A. Lekstrom-Himes, K.

Akashi and D. G. Tenen (2004). "Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha." Immunity **21**: 853-63.

[195] Zhang, Y., R. Jurkowska, S. Soeroes, A. Rajavelu, A. Dhayalan, I. Bock, P. Rathert, O. Brandt, R. Reinhardt, W. Fischle and A. Jeltsch (2010). "Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail." Nucleic Acids Res **38**: 4246-53.

## **7 Lebenslauf**

Aus Datenschutzgründen entfernt

## **8 Danksagung**

Aus Datenschutzgründen entfernt