

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

Die Bedeutung der *DNMT3A* Mutationen bei AML Patienten zum Zeitpunkt der
Diagnosestellung und im Verlauf in Abhängigkeit von der Therapie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Behrenbeck

aus Ravensburg

Datum der Promotion: 18. September 2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Kurzzusammenfassung	X
Abstract	XII
1 Einleitung	1
1.1 Akute myeloische Leukämie	1
1.1.1 Pathophysiologie/ Pathogenese	1
1.1.2 Diagnosestellung	2
1.1.3 Klassifikation	5
a) Einteilung nach FAB	5
b) Einteilung nach WHO	5
1.1.4 Therapie	6
1.2 DNA Methyltransferase 3A (<i>DNMT3A</i>)	8
1.2.1 <i>DNMT3A</i> ^{mut}	9
1.2.2 Prognose von <i>DNMT3A</i> ^{mut} und Zielsetzung der Arbeit	10
2 Materialien und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.2 Methoden	16
2.2.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	16
2.2.2 DNA-Isolation	16
2.2.3 DNA-Konzentrationsmessung	17
2.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR (q-PCR)	17
2.2.5 High resolution melt (HRM)	18
2.2.6 Quantitative Bestimmung von <i>DNMT3A</i> ^{mut}	19
2.3 Erfassung der Patientendaten	19
2.4 Statistik	20
3 Ergebnisse	21
3.1 Vergleich von Patienten mit <i>DNMT3A</i> ^{R882mut} und <i>DNMT3A</i> ^{wt}	21
3.1.1 Häufigkeit und Verteilung von <i>DNMT3A</i> ^{R882mut}	22
3.1.2 Geschlecht	23

3.1.3	Alter bei ED	23
3.1.4	Zellzahl bei ED	23
3.1.5	FAB-Subtypen	24
3.1.6	AML Typ	24
3.1.7	Zytogenetik	25
3.1.8	CR	27
3.1.9	Rezidiv	27
3.1.10	Überleben	28
3.1.11	Auftreten von Ko-Mutationen	28
3.2	Analyse des Gesamtüberlebens	29
3.3	Quantitative <i>DNMT3A</i> ^{R882} -Mutationsanalyse	33
3.3.1	Bedeutung der <i>DNMT3A</i> ^{R882} -Mutationslast bei ED	35
3.3.2	Bedeutung der <i>DNMT3A</i> ^{R882} -Mutationslast bei CR _{st}	36
3.3.3	Bedeutung der <i>DNMT3A</i> ^{R882} -Mutationslast bei Patienten mit alloSCT	37
4	Diskussion	41
4.1	Hauptergebnisse	41
4.2	Limitationen	47
4.3	Ausblick	48
5	Literaturverzeichnis	49
6	Erklärung an Eides Statt	63
7	Ausführliche Anteilserklärung	64
8	Lebenslauf	65
9	Publikationsliste	66
10	Danksagung	67

Anmerkung:

Obwohl aus Gründen der Lesbarkeit im Text die männliche Form gewählt wurde, beziehen sich die Angaben auf Angehörige aller Geschlechter.

Abkürzungsverzeichnis

ABL	abelson murine leukemia virus Onkogen
abs.	absolut
alloSCT	allogene Stammzelltransplantation
ADD	<i>ATRX-DNMT3-DNMT3L</i>
AML	akute myeloische Leukämie
APL	akute Promyelozytenleukämie
<i>ASXL1</i>	additional sex combs like 1-Gen
ATO	Arsentrioxid
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
ATRA	All-Trans-Retinsäure
AW 1	Waschpuffer 1
AW 2	Waschpuffer 2
<i>BCR-ABL1</i>	BCR-ABL1 Onkogen, Philadelphia Chromosom
BAL	biphänotypische akute Leukämie
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
<i>c-KIT</i>	Tyrosinproteinkinase KIT, CD 117
ca.	circa
<i>CBF</i>	core binding factor
<i>CBFB-MYH11</i>	Fusionsgen (Inversion 16 (p13;q22), reziproke Translokation t(16;16)(p13;q22))
<i>CEBPA</i>	CCAAT-enhancer-binding protein α
CN-AML	zytogenetisch normale AML
CpG	Cytosin-Guanin Dinukleotid
CR	komplette Remission
CR _{St}	komplette Remission nach Standardtherapie
CR _{allo}	komplette Remission nach allogener Stammzelltransplantation
<i>DEK-NUP214</i>	Fusionsgen (DEK Gen (6p23) und NUP214 Gen (9q34))
del	Deletion
DFS	krankheitsfreies Überleben
DNA	Desoxyribonukleinsäure

<i>DNMT3A</i>	DNA Methyltransferase 3A-Gen
<i>DNMT3A</i> ^{mut}	<i>DNMT3A</i> Mutation
<i>DNMT3A</i> ^{non-R882mut}	<i>DNMT3A</i> Mutation exklusive Position R882
<i>DNMT3A</i> ^{R882mut}	<i>DNMT3A</i> Mutation Position R882, Synonym: <i>DNMT3A</i> -positiv
<i>DNMT3A</i> ^{R882Hmut}	<i>DNMT3A</i> Mutation Position R882H
<i>DNMT3A</i> ^{R882Cmut}	<i>DNMT3A</i> Mutation Position R882C
<i>DNMT3A</i> ^{wt}	DNA Methyltransferase 3A-Gen ohne Mutation, Synonym: <i>DNMT3A</i> -negativ, Wildtypkohorte
<i>DNMT3L</i>	DNA Methyltransferase 3-like
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EB	Elutionspuffer
ED	Erstdiagnose
ELN	European Leukemia Net
<i>et al.</i>	et alii
exkl.	exklusive
FAB	French-American-British-Klassifikation
FLAG-IDA	chemotherapeutisches Behandlungsschema aus Fludarabin, Cytarabin und Idarubicin
<i>FLT3</i> -ITD	Fms-related-Tyrosinkinase-3-Gen internal tandem duplication
<i>FLT3</i> -ITD ^{low}	allelic ratio von <i>FLT3</i> -ITD < 0,5
<i>FLT3</i> -ITD ^{high}	allelic ratio von <i>FLT3</i> -ITD > 0,5
<i>FLT3</i> -TKD	Fms-related-Tyrosinkinase-3-Gen tyrosine kinase domain
<i>GATA2</i>	GATA binding protein 2
ggf.	gegebenenfalls
GvHD	Graft-versus-Host-Disease, Transplantat-gegen-Wirt- Reaktion
Gy	Gray
HLA	human leukocyte antigen
HRM	high resolution melt
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IDAC	intermediär dosiertes Cytarabin
<i>IDH</i>	Isocitrate-Dehydrogenase-Gen

<i>IDH 1/2</i>	Isocitrate-Dehydrogenase-1-und-2-Gen
inv	Inversion
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
MAC	myeloablative conditioning
MDS	myelodysplastisches Syndrom
<i>MECOM</i>	MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1
min.	Minute
ml	Milliliter
<i>MLL</i>	Mixed-lincage-Leukemia-Gen, Synonym: <i>KMT2A</i>
<i>MLLT3-MLL</i>	Fusionsgen (t(9;11)(p22;q23)), Synonym: <i>MLLT3-KMT2A</i>
MPO	Myeloperoxidase
MRD	minimale Resterkrankung; HLA-matched related donor
MTase	Methyltransferase-Domäne
MUD	HLA-matched unrelated donor
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
MNCs	mononukleäre Zellen
n	Anzahl
nm	Nanometer
NMA	nonmyeloablative conditioning
NOS	nicht anderweitig kategorisierte AML
<i>NPM1</i>	Nucleophosmin-Gen
NSE	nicht-spezifische Esterase
NTC	no template control
OS	Gesamtüberleben
p	p-Arm des Chromosoms
p-Wert	Signifikanzwert
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
pB	peripheres Blut
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>PML</i>	Promyelozytenleukämie-Gen
<i>PML-RARA</i>	Promyelozytenleukämie-Retinsäure-Rezeptor Alpha-Gen

pmol	Pikomol
PR	partielle Remission
PWWP	Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin
q	q-Arm des Chromosoms
<i>RAS</i>	Rat-sarcoma Protoonkogen
<i>RBM15-MKL1</i>	Fusionsgen (<i>RBM15</i> Gen (1p13) und <i>MKL1</i> Gen (22q13))
RIC	reduced intensity conditioning
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>RUNX1</i>	Runt-related transcription factor 1
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	Fusionsgen (<i>RUNX1</i> Gen (21q22) und <i>RUNX1T1</i> Gen (8q22))
SAM	S-Adenosyl-Methionin
sek.	Sekunde
t	Translokation
TBI	Gesamtkörperbestrahlung
<i>TET2</i>	ten-eleven translocation 2-Gen
<i>TP53</i>	Tumorprotein p53
u. a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z. B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht von zytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchungen zur Diagnosesicherung der AML	3
2	Risikostratifizierte Prognosegruppen nach ELN	3
3	Kriterien des Therapieansprechens sowie klinische Endpunkte in der Verlaufsbeobachtung	4
4	WHO Klassifikation der AML von 2016	5
5	Überblick Therapieschemata bei Patienten mit AML	7
6	Chemikalien	13
7	Medien, Lösungen und Puffer	13
8	Enzyme	13
9	Kits	13
10	Oligonukleotide	14
11	Zelllinie	14
12	Geräte und Instrumente	14
13	Hilfs- und Verbrauchsmaterialien	15
14	Software	15
15	Literaturverwaltung und Datenbanken	15
16	Reaktionsgemisch q-PCR	18
17	Temperaturprofil q-PCR	18
18	Reaktionsgemisch HRM	19
19	Temperaturprofil HRM	19
20	Übersicht Ergebnisse Patientencharakteristika	21
21	Häufigkeit von <i>DNMT3A</i> -positiven und <i>DNMT3A</i> -negativen Patienten mit weiteren definierten Untergruppen	22
22	Häufigkeit von Ko-Mutationen bei <i>DNMT3A</i> -positiven und <i>DNMT3A</i> -negativen Patienten	28
23	Tabellarische Übersicht der paarweisen Vergleiche der Kohorten mit den jeweiligen Ko-Mutationen mit zugehörigem p-Wert des log-rank-Tests	30
24	Tabellarische Darstellung der paarweisen Vergleiche der jeweiligen Untergruppen mit zugehörigem p-Wert des log-rank-Tests	32

25	Zusammenfassende Darstellung der Signifikanzwerte der statistischen Analyse aller Patienten mit <i>DNMT3A</i> ^{R882mut}	37
26	Charakteristika der Patienten mit alloSCT	37
27	Zusammenfassende Darstellung der Signifikanzwerte der statistischen Analyse von Patienten mit <i>DNMT3A</i> ^{R882mut} nach alloSCT	40

Abbildungsverzeichnis

1	Häufigkeitsverteilung der AML Typen (de novo, sekundär) innerhalb der vier definierten Untergruppen	25
2	Häufigkeitsverteilung des unterschiedlichen Karyotyps (normal, aberrant) innerhalb der vier definierten Untergruppen	26
3	Häufigkeitsverteilung der zytogenetischen Risikogruppen (gut, intermediär, schlecht) innerhalb der vier definierten Untergruppen	27
4	Vergleich des Gesamtüberlebens von <i>DNMT3A</i> -positiven Patienten und Wildtypkohorte	29
5	Vergleich des Gesamtüberlebens von <i>DNMT3A</i> ^{R882mut} -Patienten mit der Kohorte <i>DNMT3A</i> ^{R882mut} / <i>NPM1</i> ^{mut} , <i>DNMT3A</i> ^{R882mut} / <i>FLT3</i> ^{mut} , <i>DNMT3A</i> ^{R882mut} / <i>NPM1</i> ^{mut} / <i>FLT3</i> ^{mut} sowie <i>NPM1</i> ^{mut} / <i>FLT3</i> ^{mut}	30
6	Vergleich des Gesamtüberlebens der zytogenetischen Risikogruppen	31
7	Vergleich des Gesamtüberlebens der vier definierten Untergruppen	32
8	Quantitative <i>DNMT3A</i> ^{R882H} -Mutationsanalyse bei 28 Patienten. Graphischer Überblick über die prozentuale Mutationslast im Krankheitsverlauf	33
9	Quantitative <i>DNMT3A</i> ^{R882C} -Mutationsanalyse bei 6 Patienten. Graphischer Überblick über die prozentuale Mutationslast im Krankheitsverlauf	34
10	Quantitative <i>DNMT3A</i> ^{R882} -Mutationsanalyse bei 5 Patienten mit Rezidiv nach Standardtherapie	34
11	Quantitative <i>DNMT3A</i> ^{R882} -Mutationsanalyse bei 11 Patienten mit Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation	35

Kurzzusammenfassung

Einleitung:

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist die häufigste leukämische Erkrankung des Erwachsenenalters. Genmutationen spielen in der Entwicklung und Krankheitsentstehung der AML eine wichtige Rolle. Bei AML findet sich häufig eine Mutation der DNA Methyltransferase 3 α (*DNMT3A*); überwiegend ist diese Mutation im Codon R882 (*DNMT3A*^{R882mut}) lokalisiert. Trotz vielfacher Untersuchungen ist der genaue Einfluss von Mutationen auf die Entwicklung der AML nicht vollständig bekannt. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf Mutationen wie *DNMT3A*, die bereits in präleukämischen Zellen auftreten. Das Ziel dieser Arbeit ist es, klinische und prognostische Merkmale von AML-Patienten in Bezug auf das Vorhandensein von *DNMT3A*^{R882mut} zu vergleichen. Die Quantifizierung der Mutationslast in klinischen Verlaufspuren wurde sowohl nach Standardtherapie als auch nach allogener Stammzelltransplantation (alloSCT) durchgeführt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Quantifizierung der Mutationslast von *DNMT3A*^{R882mut} für das Fortschreiten der Erkrankung von Bedeutung ist.

Methodik:

In die Analyse sind Proben von 444 AML-Patienten, die an der Charité Universitätsmedizin von 04/1999 bis 02/2016 behandelt wurden, eingegangen. Die mittlere Beobachtungsdauer betrug 495 Tage. Von 444 Patienten wiesen 52 *DNMT3A*^{R882mut} auf. Die Mutationslast in klinischen Verlaufspuren wurde mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (PCR) analysiert. Die statistischen Methoden wurden entsprechend Stichprobenverteilung ausgewählt und mit SPSS ausgewertet (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

Ergebnisse:

DNMT3A^{R882mut} war bei Erstdiagnose (ED) mit einer höheren Konzentration von Leukozyten und Blasten assoziiert und fand sich gehäuft bei Patienten mit normalem Karyotyp. Es zeigte sich eine Tendenz zu häufigerem Auftreten bei M4- und M5-Varianten der AML. *NPM1* und *FLT3-ITD*, die eine signifikante Auswirkung auf die Prognose von Krankheiten haben, ließen sich als häufige Ko-Mutationen feststellen.

Die Analyse der Mutationslast von *DNMT3A*^{R882mut} bei ED zeigte eine große Streuung (0,02–66,9 %). Die Mutationslast von *DNMT3A*^{R882mut} sank nach Therapie ab, war jedoch in allen Proben bei kompletter Remission (CR) nach Standardtherapie (CR_{St}) noch quantitativ nachweisbar. In CR nach alloSCT (CR_{allo}) war kein Nachweis der Mutation möglich. In Rezidivproben war bei allen Patienten, sowohl nach CR_{St} als auch nach CR_{allo}, ein Anstieg der Mutationslast zu verzeichnen; es gelang der Nachweis desselben Mutationsklons wie bei ED.

Schlussfolgerung:

Die *DNMT3A*-Mutation ist eine häufige genetische Veränderung bei AML-Patienten, die mit spezifischen klinischen und prognostischen Parametern assoziiert ist. Das Vorhandensein von Ko-Mutationen, insbesondere *NPM1* und *FLT3-ITD*, hat eine signifikante Auswirkung auf die Prognose von Patienten. Der quantitative Nachweis von *DNMT3A*^{R882mut} zu verschiedenen klinischen Zeitpunkten zeigte die Persistenz des mutierten Klons nach Standardtherapie und das Verschwinden von *DNMT3A*^{R882mut} nach alloSCT. Die alloSCT gilt als optimale Behandlungsoption zur Eradikation von *DNMT3A*^{R882mut} bei AML Patienten.

Abstract

Introduction:

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common leukemic disease of adulthood and genetic mutations play an important role in its development and progression. Commonly the epigenetic modifying gene DNA methyltransferase 3 α (*DNMT3A*) is mutated, especially in codon R882 (*DNMT3A*^{R882mut}). Despite the active investigations, the mutation's exact impact on development of AML is not completely known. The occurrence of mutation in pre-leukemic cells explains a particular attention to *DNMT3A*. This study's objective is to compare clinical and prognostic characteristics of AML patients in relation to presence of *DNMT3A*^{R882mut}. The quantification of the mutation burden in follow up samples was performed both after standard therapy and after allogeneic stem cell transplantation (alloSCT). In addition, it was investigated whether the quantification of the mutation burden of *DNMT3A*^{R882mut} is significant to the progression of disease.

Methods:

Samples of 444 AML patients treated in Charité Universitätsmedizin since 04/1999 until 02/2016 were analysed. The median observation period was 495 days. Of 444, 52 have *DNMT3A*^{R882mut}. Mutation burden in follow-up samples was evaluated by quantitative polymerase chain reaction (PCR). The statistical methods were selected according to sample distribution and evaluated with SPSS (significance level $p < 0.05$).

Results:

DNMT3A^{R882mut} was associated with a higher level of leukocytes and blasts at first diagnosis (ED) and was more frequently found in patients with normal karyotype. There was a tendency for increased occurrence in M4 and M5 variants of AML. *NPM1* and *FLT3*-ITD, which have a significant impact on disease prognosis, were found to be frequent co-mutations. Analysis of mutation burden of *DNMT3A*^{R882mut} at ED showed a large spread (0.02–66.9 %). The mutation burden decreased after therapy, but was quantitatively detectable in all samples at complete remission (CR) after standard therapy (CR_{st}). In CR after alloSCT (CR_{allo}) with complete donor chimerism mutation was not found.

In all relapse samples an increased mutation burden was detectable, both after standard therapy and after alloSCT. In relapse samples the equal mutant clone to ED was discovered.

Conclusion:

DNMT3A^{R882mut} is a common genetic aberration in AML and associates with specific clinical and prognostic data. The presence of co-mutations, especially *NPM1* and *FLT3-ITD*, has a significant effect on patients' prognosis. Quantitative detection of *DNMT3A*^{R882mut} at different time points of disease revealed the persistence of mutated clone after standard therapy and disappearance of *DNMT3A*^{R882mut} after alloSCT. It suggests that alloSCT is the optimal treatment option for the eradication of *DNMT3A*^{R882mut} in AML patients.

1. Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Die AML ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems, bei der es durch klonale Proliferation von myeloischen Vorläuferzellen zur Ausschwemmung unreifer und funktionsloser Blasten ins Blut kommt [1]. Diese Blasten zeigen häufig unterschiedliche Differenzierungsgrade [1]. Die unreifen Zellen verdrängen die gesunde Blutbildung im Knochenmark (KM), wodurch die AML klinisch mit Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie imponiert [1]. Bei Erwachsenen gilt die AML als die häufigste leukämische Erkrankung [2]. Die Inzidenz der Erkrankung beträgt ca. 3,5/ 100.000/ Jahr [3]. Dabei erkranken Männer etwas häufiger als Frauen [3]. Etwa 43 % der Patienten sind über 65 Jahre alt [4]. Die Exposition gegenüber bestimmten Noxen geht mit einer erhöhten Inzidenz für eine de novo AML einher [5]. Dazu zählen Chemikalien (v.a. Benzol), ionisierende Strahlung sowie zytotoxische Chemotherapeutika [5]. Im Gegensatz dazu entsteht die sogenannte sekundäre AML auf dem Boden einer bereits bestehenden myeloischen Neoplasie [6].

1.1.1 Pathophysiologie/ Pathogenese

Bei der Untersuchung hämatopoetischer Stammzellen (HSC) von gesunden Probanden sowie AML-Patienten zeigt sich ein breites Spektrum von zufälligen Hintergrundmutationen, welche im Alter auf eine Anzahl von bis zu 1000 akkumulieren können [7]. Diese Mutationen scheinen für die Entstehung der AML nicht bedeutend zu sein [7]. Die Pathogenese der AML beruht nach Kelly und Gilliland [8] auf einem Zusammenspiel von Klasse-I-Mutationen und Klasse-II-Mutationen. Dabei werden zwei genetische Defekte für das Entstehen der Erkrankung als notwendig erachtet („2-Hit-Hypothese“ nach Knudson [9]). Klasse-I-Mutationen führen zu einem Überlebensvorteil der hämatopoetischen Stammzelle, indem sie diese zur Selbsterneuerung befähigen [8]. Zu diesen Mutationen zählen die Rezeptortyrosinkinasen *FLT3-ITD*, *FLT-TKD* und *c-KIT* sowie das *RAS* Onkogen [8]. Klasse-II-Mutationen greifen durch Veränderung relevanter Transkriptionsfaktoren in den Differenzierungsvorgang der Zelle ein [10]. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem *NPM1*-, *CBF*-, *CEBPA*-, *MLL*- und *PML*-Mutationen [11].

In weiteren Studien zeigte sich, dass eine zusätzliche Gruppe von Treibermutationen in der Entstehung der AML von Bedeutung zu sein scheint [12, 13]. Es wird angenommen, dass diese Gruppe über epigenetische Regulation in frühen präleukämischen Stammzellen auf die Pathogenese der AML einwirkt [14, 15]. In diese Klasse von Mutationen fallen *IDH*-, *TET2*-, *ASXL1*- sowie *DNMT3A*-Mutationen [16, 17].

1.1.2 Diagnosestellung

Morphologie:

Für die Diagnosestellung der AML werden eine periphere Blutprobe (Blutbild und Differentialblutbild) sowie eine Knochenmarkaspiration des Patienten zytologisch und histologisch beurteilt [18]. Falls die Aspiration ohne Erfolg bleibt (*punctio sicca*), wird eine Stanzbiopsie des Beckenkamms durchgeführt [19]. Mit Ausnahme der zytogenetischen Aberrationen *t(15;17)*, *t(8;21)*, *inv(16)* sowie *t(16;16)* ist ein Blastenanteil > 20 % Bedingung für die Diagnosestellung der AML [20]. In die Blastenzählung fließen je nach morphologischem Subtyp Promyelozyten, Monoblasten, Promonozyten und Megakaryoblasten mit ein – Erythroblasten werden jedoch nur bei der Akuten Erythroleukämie mitgezählt (French-American-British (FAB)-Klassifikation M6, vgl. Tabelle 4) [19].

Die Zelllinienzugehörigkeit einer AML kann mithilfe von zytochemischen Verfahren (Myeloperoxidasefärbung (MPO), nicht-spezifische Esterasefärbung (NSE), Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)) und Durchflusszytometrie festgestellt werden [19]. Zeigen sich in der Untersuchung mehrere Blastenpopulationen mit unterschiedlicher Zelllinienzugehörigkeit, so spricht man von biphänotypischer akuter Leukämie (BAL) [19]. Die BAL wird nach Bene *et al.* [21] eingeteilt.

Zytogenetik und Molekulargenetik:

Die Untersuchung des Karyotyps bildet einen wichtigen Bestandteil der Diagnostik. Chromosomale Veränderungen finden sich bei ca. 50-60 % der erwachsenen Patienten mit AML [22, 23]. Sofern sich keine Veränderungen des Karyotyps zeigen, spricht man von zytogenetisch normaler AML (CN-AML) [11]. Ein monosomaler Karyotyp ist definiert als das Vorliegen einer Monosomie (exkl. Verlust von X oder Y) mit mindestens einer strukturellen Chromosomenaberration (exkl. *core-binding factor AML*) oder einer weiteren vorliegenden Monosomie [20].

Als komplex-aberranter Karyotyp gilt der Nachweis von ≥ 3 chromosomalen Veränderungen [24]. Ein Überblick über die zytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchungen zur Diagnosesicherung der AML findet sich in Tabelle 1 (modifiziert nach [20]).

Durch die dargestellten Untersuchungsmethoden ist es möglich geworden, verschiedene leukämische Entitäten, sogenannte Risikogruppen, zu kategorisieren (siehe Tabelle 2, modifiziert nach [20]). Diese bilden die Grundlage von risikostratifizierten Behandlungskonzepten bei Patienten mit AML [25].

Tabelle 1: Übersicht von zytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchungen zur Diagnosesicherung der AML [20]

Zytogenetischer Nachweis von Translokationen	<i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>CBFB-MYH11</i> , <i>KMT2A (MLL)</i> , <i>DEK-NUP214</i> , <i>GATA2</i> und <i>MECOM (EVI1)</i> oder Verlust von Chromosom 5q, 7q oder 17p
Molekulargenetischer Nachweis von Mutationen	<ul style="list-style-type: none"> - <i>NPM1</i> - <i>CEBPA</i> - <i>RUNX1</i> - <i>FLT3-ITD</i> - <i>FLT3-TKD</i> - <i>TP53</i> - <i>ASXL1</i>
Molekulargenetischer Nachweis von Genumlagerungen	<ul style="list-style-type: none"> - <i>PML-RARA</i> - <i>CBFB-MYH11</i> - <i>RUNX1-RUNX1T1</i> - <i>BCR-ABL1</i>

Tabelle 2: Risikostratifizierte Prognosegruppen nach European Leukemia Net (ELN) [20]

Prognosegruppe	Genetische Subgruppen
Günstig (Niedrigrisiko)	<ul style="list-style-type: none"> - t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> - inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> - <i>NPM1</i> Mutation ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD</i>^{low} - Biallelische <i>CEBPA</i> Mutation
Intermediär	<ul style="list-style-type: none"> - <i>NPM1</i> Mutation und <i>FLT3-ITD</i>^{high} - Wildtyp <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD</i>^{low} - t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> - zytogenetische Abnormalitäten, die weder als günstig noch als ungünstig gelten

Tabelle 2 (Fortsetzung): Risikostratifizierte Prognosegruppen nach ELN [20]

Ungünstig (Hochrisiko)	<ul style="list-style-type: none"> - t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> - t(v;11)(v;q23.3); <i>KMT2A</i>- Rearrangement - t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> - inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EVI1)</i> - 5 oder del(5q); -7; -17/abn(17p) - komplexer Karyotyp, monosomaler Karyotyp - Wildtyp <i>NPM1</i> und <i>FLT3-ITD</i>^{high} - <i>RUNX1</i> Mutation - <i>ASXL1</i> Mutation - <i>TP53</i> Mutation
----------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Die Kriterien für das Therapieansprechen sowie die klinischen Endpunkte in der Verlaufsbeobachtung sind in Tabelle 3 aufgeführt [20, 26, 27].

Tabelle 3: Kriterien des Therapieansprechens sowie klinische Endpunkte in der Verlaufsbeobachtung

komplette Remission	<ul style="list-style-type: none"> • Blasten im KM < 5 % • Abwesenheit von Auerstäbchen und extramedullären Manifestationen • Neutrophile ≥ 1000/ µl und Thrombozyten ≥ 100.000/ µl
partielle Remission (PR)	<ul style="list-style-type: none"> • Reduktion der Blasten im KM auf 5-25 % • Neutrophile ≥ 1000/ µl und Thrombozyten ≥ 100.000/ µl
Rezidiv aus CR	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg der Blasten im KM auf ≥ 5 % oder • Blasten im peripheren Blut ohne anderen Grund (z. B. Regeneration) oder • Neuauftretene extramedulläre AML-Manifestation
krankheitsfreies Überleben (DFS)	Zeitraum von Feststellung der CR bis zum Auftreten eines Rezidivs bzw. bis zum letzten ärztlichen Kontakt bzw. bis zum Tod
Gesamtüberleben (OS)	Zeitraum von Diagnosestellung bis zum letzten ärztlichen Kontakt bzw. bis zum Tod
minimale Resterkrankung (MRD)	Anzeichen für leukämische Zellen im KM (immunphänotypisch, molekular oder zytogenetisch), jedoch kein mikroskopischer Nachweis möglich

1.1.3 Klassifikation

a) Einteilung nach FAB

Die French-American-British-Klassifikation von 1976 basierte vor allem auf morphologischen und zytochemischen Eigenschaften der Blasten. Für die Diagnose der AML war der Nachweis von mindestens 30 % Blasten Voraussetzung [28]. Innerhalb der Klassifikation wurde die AML in acht verschiedene Subtypen (FAB M0–M7) unterteilt und in den folgenden Jahren weiter überarbeitet [29].

b) Einteilung nach WHO

In der 2001 veröffentlichten Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde die FAB Klassifikation um zytogenetische und molekulargenetische Charakteristika erweitert. Außerdem wurde der prozentuale Blastenanteil von 30 % auf 20 % gesenkt und ermöglichte somit eine Abgrenzung zum myelodysplastischen Syndrom (MDS) [18]. In den Jahren 2008 und 2016 wurde die WHO Klassifikation überarbeitet [30, 31]. In Tabelle 4 ist die aktuell gültige WHO Klassifikation, modifiziert nach Arber *et al.* [30], dargestellt. In der Subgruppe der nicht anderweitig kategorisierten AML (NOS) findet sich die FAB-Klassifikation wieder.

Tabelle 4: WHO Klassifikation der AML von 2016 [30]

AML mit rekurrenten genetischen Aberrationen
<ul style="list-style-type: none">- AML mit t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>- AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB--MYH11</i>- akute Promyelozytenleukämie mit <i>PML-RARA</i>- AML mit t(9;11)(p21.3;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i>- AML mit t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>- AML mit inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EVI1)</i>- AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>- AML mit <i>BCR-ABL1</i> (provisorische Entität)- AML mit <i>NPM1</i> Mutation- AML mit biallelischer <i>CEBPA</i> Mutation- AML mit <i>RUNX1</i> Mutation (provisorische Entität)
AML mit Myelodysplasie-verwandten Veränderungen
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasie

Tabelle 4 (Fortsetzung): WHO Klassifikation der AML von 2016 [30]

AML, nicht anderweitig kategorisiert <ul style="list-style-type: none">- AML minimal differenziert (FAB M0)- AML ohne Ausreifung (FAB M1)- AML mit Ausreifung (FAB M2)- AML myelomonozytär (FAB M4)- AML monoblastisch / monozytär (FAB M5)- Akute Erythroleukämie (FAB M6)- Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7)- Akute Basophilenleukämie- Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloisches Sarkom
Myeloische Proliferation bei Down-Syndrom <ul style="list-style-type: none">- Transient Abnormale Myelopoese (TAM)- Myeloische Leukämie mit Down-Syndrom assoziiert
Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien
Akute Leukämien unklarer Linienzugehörigkeit <ul style="list-style-type: none">- Akute undifferenzierte Leukämie- Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und t(9;22)(q34; q11.2), <i>BCR-ABL 1</i>- Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und t(v;11q23); <i>KMT2A</i>-Rearrangement- Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, B/ myeloisch, NOS- Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, T/ myeloisch, NOS

1.1.4 Therapie

Die Therapie der AML besteht aus der Induktionstherapie mit dem Ziel der CR sowie der anschließenden Postremissionstherapie zur Erhaltung der CR. Ausgenommen davon ist die Therapie der akuten Promyelozytenleukämie (APL), welche mithilfe von All-Trans-Retinsäure (ATRA), Arsentrioxid (ATO) und Anthrazyklin-basierter Chemotherapie hohe Remissionsraten erreicht [32]. Das Therapieschema der AML richtet sich sowohl nach dem Alter des Patienten als auch nach dem Vorliegen etwaiger Komorbiditäten [19]. Zusätzlich werden die Ergebnisse der zytogenetischen Untersuchung in die Wahl des Therapieregimes miteinbezogen, sodass sich das therapeutische Vorgehen – je nach Eignung des Patienten für intensive Chemotherapie – unterscheidet (siehe Tabelle 5, modifiziert nach [20]). Die Standard-induktionstherapie nach dem „7+3“-Schema besteht dabei aus einer dreitägigen Gabe des Anthrazyklins Daunorubicin und einer einwöchigen, kontinuierlichen Infusion von Cytarabin [33].

Im Rahmen weiterer Therapieprotokolle werden ebenfalls andere Anthrazykline, wie Mitoxantron oder Idarubicin, eingesetzt [32]. Das Nichtansprechen auf ein bis zwei dieser „7+3“-Therapiezyklen bezeichnet man als Therapierefraktärität [34]. Diese Patienten werden mit einer sogenannten Salvage-Chemotherapie behandelt [34]. Hierfür stehen verschiedene Therapieprotokolle mit hochdosiertem Cytarabin zur Verfügung (z. B. Behandlungsschema aus Fludarabin, Cytarabin und Idarubicin (FLAG-IDA) [35, 36].

Tabelle 5: Überblick Therapieschemata bei Patienten mit AML [20]

Patienten mit intensiver Therapiemöglichkeit			
		< 60-65 Jahre	> 60-65 Jahre
Induktion		Doppelinduktionstherapie (2 Zyklen „7+3“-Schema, bei Nachweis > 5 % Blasten an Tag 15 im KM: hochdosiertes Cytarabin	„7+3“ Schema, ggf. erneuter Zyklus bei Nachweis > 5 % Blasten an Tag 15 im KM
Konsolidierung	<i>gute Risikogruppe</i>	2–4 Zyklen IDAC	2–3 Zyklen IDAC
	<i>intermediäre Risikogruppe</i>	- HLA-idente alloSCT - 2–4 Zyklen IDAC - Hochdosistherapie mit anschließender autologer SCT	kein klar empfohlenes Therapieschema; Wahl je nach Risikoprofil und Allgemeinzustand des Patienten
	<i>schlechte Risikogruppe</i>	HLA-idente alloSCT	
Patienten ohne intensive Therapiemöglichkeit			
<ul style="list-style-type: none"> - Hypomethylierende Substanzen: <ul style="list-style-type: none"> • 5-Azacitidin • Decitabin - Niedrigdosiertes Cytarabin - Supportive Therapie/ „Best Supportive Care“ (für Patienten ohne Möglichkeit bzw. Wunsch zur antileukmischen Therapie; beinhaltet Therapie mit Hydroxyurea) 			

Die AML ist die häufigste Indikation für eine allogene Stammzelltransplantation [37]. Bei der Suche nach einem Spender spielt die Kompatibilität des humanen Leukozyten-Antigen-Systems (HLA-System) eine wichtige Rolle. Dabei wird ein Familienspender dem Fremdspender sowie ein HLA-kompatibler einem HLA-inkompatiblen Spender vorgezogen [38].

Mittlerweile werden vermehrt teilkompatible (z.B. haploidente) Transplantationen durchgeführt [39]. Mithilfe einer Konditionierungstherapie wird der Patient auf die Stammzelltransplantation vorbereitet. Das Immunsystem wird supprimiert, maligne Zellen aus dem Knochenmark eradiziert und somit die Grundlage geschaffen, damit die Stammzellen aus dem Transplantat im Knochenmark des Patienten anwachsen können [40]. Die Konditionierung kann nach dosis-intensivem (myeloablative conditioning, MAC), dosis-reduziertem (reduced intensity conditioning, RIC) sowie minimal-intensivem (nonmyeloablative conditioning, NMA) Schema durchgeführt werden [41]. Bei jüngeren, gesunden Patienten wird vor allem nach MAC-Schemata verfahren, für ältere Patienten bzw. jüngere Patienten mit vorliegenden Komorbiditäten kommen RIC-Schemata zur Anwendung [42]. Die Konditionierungstherapie basiert in allen Fällen auf kombinierten Chemotherapeutika (z.B. Cyclophosphamid, Fludarabin, Busulfan, Treosulfan, Thiopeta, u. a.) sowie ggf. einer Ganzkörperbestrahlung [43]. Je nach Regime wird zusätzlich der Antikörper Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) hinzugefügt [43].

1.2 DNA Methyltransferase 3A (*DNMT3A*)

DNA Methyltransferasen katalysieren die Umwandlung von Cytosin zu 5-Methylcytosin [44]. Beim Menschen gelten *DNMT1*, *DNMT3A* und *DNMT3B* als die wichtigsten methylierenden Enzyme [45]. *DNMT1* ist unerlässlich, um die bereits vorhandene Methylierung nach der Zellteilung aufrechtzuerhalten [45]. Dem gegenüber stehen *DNMT3A* und *DNMT3B*, welche unabhängig von der Zellteilung für die de novo Methylierung unabdingbar sind [44]. *DNMT3A* hat eine Masse von 130 Kilodalton (kDa) und wird von Exon 23 auf Chromosom 2p23.3 kodiert [46-48]. Dabei wird das Enzym als lange Isoform (*DNMT3A1*) sowie als kurze Isoform (*DNMT3A2*) exprimiert [49]. Für *DNMT3A2* zeigte sich eine Interaktion mit dem Bindungspartner *DNMT3L* (DNA Methyltransferase 3-like) [50].

DNMT3A besteht aus drei vielfach beschriebenen Proteindomänen. Der Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin (PWWP) Komplex sowie der *ATRX-DNMT3-DNMT3L* (ADD) Komplex gehören zur regulatorischen Domäne während die Methyltransferase-Domäne (MTase) zum katalytischen Teil des Proteins zählt [51]. Mithilfe der PWWP-Domäne bindet das Enzym an das perizentrische Heterochromatin, wobei PWWP mit einer Aminosäure Lysin des Histons 3 (H3K36me3) interagiert [52].

Die ADD-Domäne bindet ebenfalls an eine Aminosäure Lysin des Histons 3, jedoch an anderer Position (H3K4me0) [53]. Zusätzlich zur unmethylierten DNA bindet der Kofaktor S-Adenosyl-Methionin (SAM) an die Methyltransferase-Domäne [54]. Während der Methylierung wird eine Methylgruppe von SAM auf die C5-Position von Cytosin in Cytosin-Guanin-Dinukleotid-Inseln (CpG- Inseln) der DNA übertragen [54]. Die MTase-Domäne kann im Protein als Dimer oder Tetramer vorliegen [54]. Dabei können sowohl Homodimere aus *DNMT3A* als auch heterodimere *DNMT3A-DNMT3L*-Moleküle beteiligt sein [55]. Von der Struktur der Domäne wesentlich abhängig ist die Fähigkeit des Proteins zur Oligomerisierung und damit verbunden die Methylierungsfähigkeit des Enzyms [56].

1.2.1 *DNMT3A*^{mut}

Mutationen im DNA Methyltransferase 3A Gen (*DNMT3A*) finden sich bei ca. 17- 23 % aller Patienten mit AML [57-59]. Häufig liegen bei Patienten mit *DNMT3A*^{mut} weitere Mutationen vor. Der Großteil der Patienten mit *DNMT3A*^{mut} trägt ebenfalls eine *NPM1*^{mut} [25, 58, 60]. Weiterhin treten *FLT3-ITD*^{mut}, *IDH1*^{mut} und *IDH2*^{mut} bei *DNMT3A*^{mut} signifikant häufiger auf [58-61]. Bei den Patienten mit CN-AML liegt eine *DNMT3A*^{mut} in ca. 34 % der Fälle vor [57]. Bei AML mit den Translokationen t(15;17), t(8;21) oder inv(16) findet sich keine *DNMT3A*^{mut} [25, 57, 62, 63]. Am häufigsten ist die Position R882 in der katalytischen Domäne des Enzyms *DNMT3A* betroffen [57]. Es handelt sich meist um eine missense-Mutation bei der die Aminosäure Arginin durch die Aminosäure Histidin ersetzt wird [64]. Durch diese Punktmutation kommt es zu einer fehlerhaften DNA Methylierung [57, 64, 65]. Bei MDS und weiteren myeloproliferativen Erkrankungen können *DNMT3A*^{R882mut} ebenfalls nachgewiesen werden – jedoch in geringerem Ausmaß [66, 67]. Das Vorliegen einer *DNMT3A*^{R882mut} führt zu ca. 2,5- fach reduzierter Aktivität von *DNMT3A*^{wt} [64, 68]. Zugrunde liegt dabei eine fehlerhafte Tetramerisierung des Enzyms durch Bindung von *DNMT3A*^{R882mut} anstelle von *DNMT3A*^{wt} in dominant-negativer Art und Weise [61].

Die veränderte Methylierungsaktivität von *DNMT3A*^{mut} kann eine mögliche Ursache für die Leukämogenese darstellen, da sich in verschiedenen Studien eine daraus resultierende Hypomethylierung von CpG-Inseln zeigte [61, 68, 69]. In der aktuellen Arbeit von Spencer *et al.* [70] zeigten sich hypomethylierte CpG-Inseln als „initiiender Phänotyp“ bei vorliegender *DNMT3A*^{mut}.

Bei *DNMT3A*^{wt} waren Hypermethylierungen von CpG-Regionen nachweisbar, die sie als Konsequenz der voranschreitenden Erkrankung, nicht jedoch als ihren Auslöser interpretierten.

Diese Ergebnisse decken sich mit der allgemeinen Annahme, dass die Mutationen von *DNMT3A* im frühen Verlauf der AML entstehen [13, 15, 16, 71]. Die wichtige Rolle von *DNMT3A* für die normale Hämatopoese zeigte sich darüber hinaus in verschiedenen Arbeiten am Mausmodell: Bei Vorliegen von *DNMT3A*^{mut} konnte die Entstehung verschiedenster, hämatologischer Erkrankungen gezeigt werden [72, 73]. Der genaue Einfluss von *DNMT3A*^{mut}, bzw. die daraus resultierende veränderte Methylierung beteiligter Gene auf die Entstehung der AML ist allerdings bislang noch immer nicht eindeutig geklärt [70].

1.2.2 Prognose von *DNMT3A*^{mut} und Zielsetzung der Arbeit

In der Literatur wird ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer *DNMT3A*^{mut} und höheren Leukozytenwerten, höherem Alter bei ED und intermediärem zytogenetischen Risikotyp beschrieben [57, 58, 62, 74]. Außerdem findet sich für *DNMT3A*^{mut} eine signifikante Korrelation zu FAB M4/M5 Subtypen [57, 74]. Bezüglich des Einflusses von *DNMT3A*^{mut} auf den klinischen Verlauf der Patienten findet sich eine widersprüchliche Studienlage: In mehreren Arbeiten wird von einem negativen klinischen Verlauf nach Standardtherapie sowie verkürztem Gesamtüberleben der Patienten mit *DNMT3A*^{mut} berichtet [57, 63, 75-78]. Dem gegenüber stehen Veröffentlichungen, die keinen signifikanten Einfluss von *DNMT3A*^{mut} auf klinische Parameter zeigen konnten [25, 79].

Die klinische Bedeutung von *DNMT3A*^{mut} in unterschiedlichen Risikogruppen wurde vielfach untersucht. Dabei zeigte sich bei der Analyse von CN-AML-Patienten, dass diejenigen mit *DNMT3A*^{mut} und *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{high} ein signifikant kürzeres DFS und OS aufwiesen, jedoch für *DNMT3A*^{mut} und *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{low} kein signifikanter Effekt gezeigt werden konnte [78]. Loghavi *et al.* [80] definierten in ihrer Arbeit *DNMT3A*^{mut}/*FLT3*^{mut}/*NPM1*^{mut} als Indexgruppe und untersuchten den Effekt von *DNMT3A*^{mut} bei Patienten mit *NPM1*^{mut}. Es zeigte sich ein signifikant negativer Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten mit *NPM1*^{mut}, der dem negativen Effekt von *FLT3*-ITD^{mut} überlegen war [80]. Bei Papaemmanuil *et al.* [81] wies *FLT3*-ITD^{mut} in der Indexgruppe den am stärksten ausgeprägten negativen Effekt auf.

In aktuellen Veröffentlichungen sowie in der vorliegenden Arbeit wird der Fokus auf die häufige $DNMT3A^{R882mut}$ gelegt [46, 75, 82-84]. In einer Studie mit großen eingeschlossenen Patientenkohorten konstatieren Gaidzik *et al.* [62] ein signifikant schlechteres DFS bei Vorliegen von $DNMT3A^{R882mut}$ für die Gesamtkohorte und für CN-AML-Patienten. Patienten mit $DNMT3A^{non-R882mut}$ hatten ein signifikant längeres Gesamtüberleben [62].

Marcucci *et al.* [65] zeigten einen ungünstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben bei älteren Patienten (> 60 Jahre) mit $DNMT3A^{R882mut}$ und normalem Karyotyp; bei jüngeren Patienten beeinflusste $DNMT3A^{R882mut}$ den klinischen Verlauf nicht. Da für $DNMT3A^{R882mut}$ Persistenz in CR und im Rezidiv gezeigt wurde, stellt sich die Frage, ob die Mutationslast dieser stabilen Mutation als möglicher prognostischer Parameter dienen kann [13, 77, 84-86]. Die quantitative Analyse der Mutationslast von $DNMT3A^{R882mut}$ bei CN-AML Patienten zum Zeitpunkt der CR_{St} wurde bereits von Sun *et al.* [46] durchgeführt. Dabei zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Mutationslast auf DFS und OS. Ahn *et al.* [75] untersuchten, ob das Vorhandensein von $DNMT3A^{R882mut}$ zum Zeitpunkt der CR_{St} bei CN-AML-Patienten eine Aussage über den klinischen Verlauf nach alloSCT treffen kann. Es zeigte sich für Patienten mit $DNMT3A^{R882mut}$ ein signifikant kürzeres DFS und eine signifikant erhöhte Rezidivrate. Für Patienten mit $DNMT3A^{R882mut}$ und $FLT3-ITD^{mut}$ war ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben erkennbar [75]. In CR_{allo} konnte $DNMT3A^{R882mut}$ nicht mehr nachgewiesen werden [85]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine alloSCT bei Patienten mit $DNMT3A^{R882mut}$ den klinischen Verlauf verbessern kann. Xu *et al.* [87] bestätigten dies in einer Kohorte von CN-AML-Patienten.

Da sich diese Veröffentlichungen ausschließlich auf CN-AML-Patienten konzentrieren, wird in der folgenden Arbeit die Gesamtkohorte von Patienten mit $DNMT3A^{R882mut}$ untersucht. Hiermit sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- I. Zeigen sich im vorliegenden Patientenkollektiv Differenzen zwischen Patienten mit $DNMT3A^{R882mut}$ und der Wildtypkohorte ($DNMT3A^{wt}$) in Bezug auf das Alter bei ED, das Geschlecht, die FAB-Subtypen, den AML Typ, die Zytogenetik sowie deren Risikogruppen, das Erreichen einer CR, das Auftreten von Rezidiven oder die Todesart?

- II. Kann ein Unterschied im Gesamtüberleben zwischen Patienten der Wildtypkohorte (*DNMT3A*^{wt}) und Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} - bei Vorliegen verschiedener Ko-Mutationen oder zytogenetischer Risikogruppen - gezeigt werden?

- III. Hat die Höhe der *DNMT3A*^{R882}-Mutationslast in der quantitativen Analyse zu verschiedenen klinischen Zeitpunkten einen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten?

- IV. Beeinflusst die Höhe der *DNMT3A*^{R882}-Mutationslast in der quantitativen Analyse zu verschiedenen klinischen Zeitpunkten das Ansprechen der Patienten auf alloSCT?

2. Materialien und Methoden

Im folgenden Kapitel sind die verwendeten Materialien aufgelistet. Aus den Tabellen 6-14 gehen die Produktnamen und Hersteller hervor. Das in der vorliegenden Arbeit genutzte Programm zur Literaturverwaltung und die verwendete Datenbank finden sich in Tabelle 15.

2.1 Materialien

Tabelle 6: Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Ethanol abs.	Qiagen, Hilden
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Nuklease-freies Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RNAse-Free Water	Qiagen, Hilden

Tabelle 7: Medien, Lösungen und Puffer

Produkt	Hersteller
Cell Lysis Solution	Qiagen, Hilden
Ficoll-Paque-Plus	GE Healthcare BioScience, Uppsala
Lyse-Puffer	Qiagen, Hilden
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin

Tabelle 8: Enzyme

Produkt	Hersteller
Absolute qPCR Mix	Hoffmann-La Roche, Basel
HRM™ MasterMix	Qiagen, Hilden

Tabelle 9: Kits

Produkt	Hersteller
AllPrep DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Type-it HRM PCR Kit	Qiagen, Hilden

Beim Hersteller der Oligonukleotide (siehe Tabelle 10) handelt es sich um die Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH in Berlin (Eresburgstrasse 22-23, 12103 Berlin).

Tabelle 10: Oligonukleotide

Name	Sequenz	Molare Konzentration	Schmelzpunkt [°C]
ABL1 allele	5'-gCCCTTggAgTgAggCATCT	10 µM	60,3
ABL forward	5'-gTggAAAaggAgCTggggAAA	10 µM	61,0
ABL1 probe	5'-6FAM-CAAggCgTCCgTggggCTgTgAgTA--BBQ	10 µM	72,1
ASB allele	5'-CgTCTCCAACATgAgCCA	10 µM	55,0
ASB-Blocker	5'-CATgAgCCgCTTggCgAg-PH	20 µM	62,5
ASB forward	5'-CAgCggAgCgAAgAggTg	10 µM	59,8
ASB-probe	5'-6FAM-CTCCATgACCggCCCAgCAgTC-BBQ	10 µM	68,6
DNMT3A-hrmF	5'-CCCTTACACACACGCAAAATAC	10 µM	56,4
DNMT3A-hrmR	5'-CCCTCTCTGCCTTTTCTCC	10 µM	55,4
R882C-1	5'-CgTCTCCAACATgAgCTg	10 µM	52,4

Tabelle 11: Zelllinie

Produkt	Hersteller
K562 DNA High Molecular Weight	Fitchburg, Madison

Tabelle 12: Geräte und Instrumente

Gerät	Modell	Hersteller
Computer	Fujitsu ESPRIMO	Fujitsu, Tokyo
Kühl- und Gefrierschränke	KGV36X27/01	Bosch, Stuttgart
PCR-Geräte	Rotor Gene RG-3000	Corbett Research Pty Ltd, Sydney
Pipette	Eppendorf Reference 0,5–10 µl, 50–200 µl	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	IKA MS 1 shaker	Sigma Aldrich, St. Louis
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Vortexgerät	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc, Bohemia
Zentrifuge	Centrifuge 5810 Sprout Minizentrifuge Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf Eppendorf, Hamburg

Tabelle 13: Hilfs- und Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller
<i>Handschuhe</i>	Vasco Nitril white semi-long s	Braun, Melsungen
<i>Pipettenspitzen</i>	Biosphere® Filter Tips, Eppendorf® Reference® Pipette (0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg
<i>Reaktionsgefäße</i>	PCR Tubes, 0,2 ml, Strip tubes and caps (0,1 ml)	Qiagen, Hilden
<i>Tücher</i>	KIMTECH SCIENCE Precision Wipes	Kimberly-Clark, Surrey

Tabelle 14: Software

Produkt	Hersteller
IBM SPSS Statistics (Version 23)	SPSS, Chicago
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond
Microsoft Word	Microsoft, Redmond
NanoDrop 1000 (Version 3.7)	Thermo Fisher Scientific, Wilmington
Rotor Gene 6.1	Corbett Research Pty Ltd, Sydney

Tabelle 15: Literaturverwaltung und Datenbanken

Institut/ Konzern	Website
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Thomson Reuters EndNote	https://projectne.thomsonreuters.com/#/login?app=endnote

2.2 Methoden

In diesem Kapitel werden die durchgeführten Methoden in chronologischer Reihenfolge beschrieben.

2.2.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

In den Versuchen wurde Ficoll Paque Plus verwendet. Das KM wurde 1:1 mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gemischt und vorsichtig über das Separationsmedium im Falcon-Tube geschichtet. Anschließend wurde es bei Raumtemperatur 15 min. mit 2000 Umdrehungen pro min. (rpm) ohne Bremse zentrifugiert. Die Schicht aus mononukleären Zellen (MNC) wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgetragen und in ein neues Falcon-Tube gegeben. Das Röhrchen wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, anschließend 5 min. bei 2000 rpm mit Bremse zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Als Erstes wurde das Zellpellet mit 1 ml Lysepuffer gemischt und 5 min. auf Eis inkubiert bis sich die Erythrozyten lösten und die Lösung klar erschien.

Im Anschluss daran wurde erneut für 5 min. bei 2000 rpm mit Bremse zentrifugiert. Gegebenenfalls musste erneut der Überstand abgekippt und zentrifugiert werden. Je nach Größe des Zellpellets wurde es in 1–5 ml PBS resuspendiert und 10 µl für die Zellzählung verwendet.

2.2.2 DNA-Isolation

Für die DNA Isolation wurde das QIAmp DNA Mini-Kit von Qiagen verwendet. Das Zellpellet (maximal 5×10^6 Zellen) wurde gut gevortext, dann für 10 min. bei 56 °C inkubiert und bei voller Umdrehungszahl (14000 rpm) zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol abs. hinzugefügt, 15 sek. gevortext und die Probe herunterzentrifugiert. Das homogenisierte Lysat wurde auf eine DNA Säule aufgetragen und 1 min. bei 10000 rpm zentrifugiert. In der Folge wurde die DNA Säule in ein sauberes 2 ml-Tube gegeben, mit 500 µl Waschpuffer 1 (AW 1) versetzt und erneut 1 min. bei 10000 rpm zentrifugiert. Dann wurden 500 µl Waschpuffer 2 (AW 2) darauf gegeben und 2 min. bei voller Umdrehungszahl (14000 rpm) zentrifugiert.

Die Säule mit der gewaschenen DNA wurde in ein sauberes 1,5 ml-Tube überführt, 200 µl Elutionspuffer (EB) dazugegeben, 1 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min. bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Elutionsschritt konnte für eine größere DNA Ausbeute wiederholt werden. Die fertig isolierte DNA stand für die PCR bereit oder wurde bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.3 DNA-Konzentrationsmessung

Die Messung der DNA-Konzentration wurde am NanoDrop-Spectrophotometer ND-1000 durchgeführt und basiert auf dem Prinzip der Photometrie [88]. Als Referenzwert diente Ribonuklease (RNase)-freies Wasser. Es wurden 1,5 µl der isolierten, aufgetauten DNA auf die Messoberfläche aufgetragen und anschließend die Absorptionsmaxima der Probelösung bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Daraus wurde ein Quotient gebildet (Absorption bei 260 nm/ Absorption bei 280 nm), welcher bei reiner DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Zusätzlich wurde das Absorptionsspektrum zwischen 220 nm und 350 nm graphisch dargestellt, sodass Verunreinigungen durch Lösungsmittel oder Proteine detektiert werden konnten. Die DNA-Konzentration wurde in ng/ µl angegeben.

2.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR (q-PCR)

Die Echtzeit-PCR zur quantitativen Analyse wurde mithilfe des Absolute qPCR Mix durchgeführt. Mithilfe der PCR können spezifische DNA Sequenzen in vitro vervielfältigt werden. Dazu benötigt man zwei Primer (Oligonukleotide), die sich an das Ende der zu amplifizierenden Sequenz anlagern sowie eine thermoresistente DNA-Polymerase in einem Puffer (Mg^{2+} - Ionen als Kofaktor). Für die DNA Synthese werden alle vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) benötigt. Prinzipiell umfasst die PCR die folgenden Schritte: 1. Denaturierung der DNA Doppelstränge, 2. Anlagerung der Primer und 3. Exponentielle Verlängerung der Amplifikate. Dabei wird die Fluoreszenz in Nanometern gegen die Zykluszahl aufgetragen und ab einem bestimmten Schwellenwert (C_t = Cycle Threshold) detektiert. Die Zunahme der Fluoreszenz ist hierbei proportional zur Menge an neu synthetisierter DNA [89, 90]. In dieser Arbeit wurde ein bereits etabliertes Verfahren angewandt, welches sich vor allem durch einen mutationsspezifischen Primer sowie Blocker auszeichnet [85, 91].

Bei dem Blocker handelte es sich um ein komplementäres Oligonukleotid zur Wildtypsequenz. Durch diese Kombination sollte die Amplifikation der Wildtypallele unterbunden werden. Das Reaktionsgemisch für die durchgeführte q-PCR beinhaltete die in Tabelle 16 aufgeführten Reagenzien.

Tabelle 16: Reaktionsgemisch q-PCR

Komponente	Mastermix <i>DNMT3A</i>	Mastermix <i>ABL</i>
Nuklease-freies Wasser	7,0 µl	9,0 µl
qPCR Mix	12,5 µl	12,5 µl
Forward Primer (10 µM)	1,0 µl	1,0 µl
Allel-Spezifischer Primer (reverse) (10 µM)	1,0 µl	1,0 µl
Blockerreagenz (20 µM)	2,0 µl	-
Sonde (10 µM)	0,5 µl	0,5 µl
Total	24 µl	24 µl

Zum jeweiligen Reaktionsgemisch (vgl. Tabelle 16) wurden 1,0 µl der auf 30 ng/ µl eingestellten DNA Probe pipettiert, sodass sich ein Endvolumen von 25 µl ergab. In der vorliegenden Arbeit wurde *ABL* als Haushaltsgen genutzt. In der Literatur wird *ABL* als konstitutiv exprimiert und damit als gut vergleichbares Referenzgen beschrieben [92]. Jede Versuchsreihe wurde in zweifacher Ausführung sowie mit Negativkontrolle (no template control, NTC) und einer Wildtypkontrolle (DNA der Zelllinie K562) pipettiert, um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen. Die q-PCR erfolgte nach dem aufgeführten q-PCR-Protokoll (vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17: Temperaturprofil q-PCR

Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit [sek.]	Zyklusanzahl
<i>Reaktion</i>	95	600	45 Zyklen
<i>Denaturierung</i>	95	20	
<i>Elongation</i>	67	45	

2.2.5 High resolution melt (HRM)

Die Analyse wurde im Rotor Gene 600 Real-Time PCR Cyclyer von Qiagen, wie von Berenstein *et al.* beschrieben, durchgeführt (vgl. Tabelle 18 und 19) [85].

Die Versuchsreihe der *DNMT3A^{mut}* wurde mit Positivkontrolle, Negativkontrolle (Wildtypallele) sowie mit no template control (NTC) in zweifacher Ausführung pipettiert. Das Reaktionsgemisch des HRM ist in Tabelle 18 dargestellt, das dazugehörige Temperaturprofil findet sich in Tabelle 19.

Tabelle 18: Reaktionsgemisch HRM

Komponente	Volumen
HRM™ MasterMix	12,5 µl
Forward primer (10 pmol)	0,75 µl
Reverse primer (10 pmol)	0,75 µl
Wasser	10 µl
DNA (50 ng/ µl)	1 µl
Total	25 µl

Tabelle 19: Temperaturprofil HRM

Temperatur [°C]	Zeit [sek.]	Zyklusanzahl
95	300	1
95	15	45
62	30	
72	10	
Schmelzkurvenanalyse		
65-95	Anstieg: 0,05 °C/ Schritt	

2.2.6 Quantitative Bestimmung von *DNMT3A^{mut}*

Die C_t -Werte der Echtzeit q-PCR (Doppelbestimmungen) wurden gemittelt. Nach Berenstein *et al.* [85] wurde festgelegt, dass die 10^0 Verdünnung des Plasmids 50 % *DNMT3A^{mut}* entspricht. Die prozentuale Berechnung der Mutationslast erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{prozentualer Anteil (\%)} = 100 \times 2^{(Ct_{ABL} - Ct_{DNMT3A})} \quad (1)$$

2.3 Erfassung der Patientendaten

In der vorliegenden Arbeit wurden Knochenmarkproben und periphere Blutproben von Patienten retrospektiv untersucht. Die schriftliche Einwilligung der Patienten zur Entnahme und Untersuchung wurde eingeholt.

Außerdem lag eine Genehmigung der Ethikkommission für die Experimente vor. Die Patienten wurden am Campus Benjamin Franklin der Charité in der Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie (CC14) behandelt. Die Diagnose AML war im Zeitraum zwischen 01.04.1999 und 14.02.2016 nach WHO Kriterien (siehe 1.1.3 b) gestellt worden. Der Beobachtungszeitraum endete am 24.11.2016. Die mittlere Beobachtungsdauer lag bei 845 Tagen (Median 495 Tage, Spanne 3–5470 Tage). Untersucht wurden die Proben im molekulargenetischen Labor der Klinik. Bei den Experimenten und der Erstellung dieser Dissertation wurden die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ [93] eingehalten.

2.4 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm IBM SPSS Statistics (Version 23) genutzt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant betrachtet.

Zunächst wurden die jeweiligen Kohorten mithilfe des Shapiro-Wilk- sowie des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung überprüft. Ebenfalls zu Rate gezogen wurde die optische Kontrolle der Verteilung mithilfe des Histogramms und des Q-Q-Plots. Sofern das Kriterium der Normalverteilung gegeben war, wurde die zentrale Tendenz mithilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben untersucht. Anderenfalls kam der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Die zentrale Tendenz wurde bei mehrstufigen Variablen und normalverteilten Daten mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse bestimmt. Als verteilungsfreie Alternative wurde der Kruskal-Wallis-Test (H-Test) genutzt. Häufigkeiten und Zusammenhänge wurden mithilfe des Pearson-Chi-Quadrat-Tests analysiert. Bei normalverteilten und intervallskalierten Daten wurde der Zusammenhang mithilfe der Korrelationsanalyse untersucht. Das Gesamtüberleben wurde mithilfe der Kaplan-Meier-Methode [94] abgeschätzt. Die verschiedenen Gruppen konnten mittels log-rank-Test verglichen werden.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich von Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} und *DNMT3A*^{wt}

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse beschrieben, die sich im Vergleich der Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} und der Wildtypkohorte (*DNMT3A*^{wt}) zeigten. Dazu findet sich in Tabelle 20 eine Übersicht der Ergebnisse, auf die im Folgenden ausführlich eingegangen wird.

Tabelle 20: Übersicht Ergebnisse Patientencharakteristika

Parameter		<i>DNMT3A</i> ^{R882mut}	<i>DNMT3A</i> ^{wt}	Alle Patienten	
Geschlecht, n (%)	männlich	26 (50 %)	223 (57 %)	249 (56 %)	
	weiblich	26 (50 %)	169 (43 %)	195 (44 %)	
Alter bei ED in Jahren (Spanne)		60,7 (24–87)	58,7 (16–94)	58,9 (16–94)	
Zellzahl bei ED	Blasten KM in % (Spanne)	78,46 (5–95)	72,44 (20–99)	73,14 (5–99)	
	Leukozyten im peripheren Blut (pB)/ μ l (Spanne)	42,9 (0,6–350)	35,7 (0,2–400)	36,29 (0,2–400)	
FAB, n (%)	M0	1 (2 %)	26 (7 %)	27 (6 %)	
	M1	10 (19 %)	110 (28 %)	120 (27 %)	
	M2	11 (21 %)	69 (18 %)	80 (18 %)	
	M3	0 (0 %)	11 (3 %)	11 (2 %)	
	M4	14 (27 %)	94 (24 %)	108 (24 %)	
	M5	13 (25 %)	56 (14 %)	69 (16 %)	
	M6	1 (2 %)	17 (4 %)	18 (4 %)	
	M7	0 (0 %)	4 (1 %)	4 (1 %)	
		biphänotypisch	2 (4 %)	5 (1 %)	7 (2 %)
	AML Typ, n (%)	de novo	39 (75 %)	284 (72 %)	323 (73 %)
sekundär		13 (25 %)	108 (28 %)	121 (27 %)	
Zytogenetik, n (%)	normal	33 (63 %)	203 (52 %)	236 (53 %)	
	aberrant	19 (37 %)	189 (48 %)	208 (47 %)	
Risikogruppen nach ELN, n (%)	gut	10 (19 %)	62 (16 %)	72 (16 %)	
	intermediär	15 (29 %)	172 (44 %)	186 (42 %)	
	schlecht	27 (52 %)	158 (40 %)	186 (42 %)	

Tabelle 20 (Fortsetzung): Ergebnisse Patientencharakteristika

CR, n (%)		38 (73 %)	256 (65 %)	294 (66 %)
Rezidiv, n (%)		26 (50 %)	152 (39 %)	178 (40 %)
Todesursache, n (%)	gesamt	27 (52 %)	189 (48 %)	216 (49 %)
	Leukämie- assoziiert	17 (61 %)	81 (43 %)	98 (45 %)
	Therapie- assoziiert	11 (39 %)	108 (57 %)	119 (55 %)
Ko-Mutationen				
<i>NPM1</i>, n (%)		25 (48 %)	88 (22 %)	113 (25 %)
<i>FLT3</i>, n (%)	<i>FLT3</i> -ITD	21 (40 %)	82 (21 %)	103 (23 %)
	<i>FLT3</i> -TKD	2 (4 %)	25 (6 %)	27 (6 %)
<i>IDH</i>, n (%)	<i>IDH 1</i>	9 (17 %)	70 (18 %)	79 (18 %)
	<i>IDH 2</i>	4 (8 %)	26 (7 %)	30 (7 %)

3.1.1 Häufigkeit und Verteilung von *DNMT3A*^{R882mut}

Es zeigte sich bei 52 Patienten (12 %) der Gesamtkohorte eine Mutation im *DNMT3A*-Gen. Davon entfielen 44 (85 %) auf die *DNMT3A*^{R882Hmut} sowie 8 (15 %) auf die *DNMT3A*^{R882Cmut}. Insgesamt waren 13 Patienten *DNMT3A*-positiv ohne weiteres Vorliegen von Ko-Mutationen. Nach diesen Kriterien lassen sich vier Untergruppen definieren (vgl. Tabelle 21), die in der vorliegenden Arbeit zeitweise als Vergleichsgruppen genutzt werden.

Tabelle 21: Häufigkeit von *DNMT3A*-positiven und *DNMT3A*-negativen Patienten mit weiteren definierten Untergruppen; Anzahl der Patienten (n)

<i>DNMT3A</i> -positiv (52)		<i>DNMT3A</i> -negativ (392)	
Untergruppe 1: Ausschließlich <i>DNMT3A</i> - positiv (13)	Untergruppe 2: <i>DNMT3A</i> -positiv mit weiteren Mutationen (39)	Untergruppe 3: Wildtypkohorte ohne vorliegende Mutation (189)	Untergruppe 4: Wildtypkohorte mit mindestens einer vorliegenden Mutation (203)

3.1.2 Geschlecht

Von 444 untersuchten Patienten waren 195 weiblich und 249 männlich. Die *DNMT3A*^{R882mut} zeigte in der vorliegenden Arbeit keine Geschlechterpräferenz. In der *DNMT3A*-positiven Kohorte waren männliche und weibliche Patienten gleichverteilt, in der Wildtypkohorte waren 57 % der Patienten männlich. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,365$).

Beim Vergleich der vier Untergruppen konnte kein signifikantes Niveau festgestellt werden ($p=0,712$). Verglich man die Patienten, die ausschließlich eine *DNMT3A*^{R882mut} trugen, mit den zusammengeführten anderen drei Untergruppen zeigte sich die Geschlechterverteilung betreffend kein signifikanter Unterschied ($p=0,985$).

3.1.3 Alter bei ED

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren die Patienten im Durchschnitt 59 Jahre alt (Spanne: 16–94 Jahre). Bei den Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} betrug das mittlere Erkrankungsalter 61 Jahre. Die Patienten der Wildtypkohorte waren bei ED im Mittel 59 Jahre alt. Es zeigte sich kein signifikantes Niveau ($p=0,489$). Bei der Untersuchung auf statistische Zusammenhänge in den vier Untergruppen ergab sich mit $p=0,064$ kein signifikanter Wert.

3.1.4 Zellzahl bei ED

Leukozyten:

In der Kohorte mit *DNMT3A*^{R882mut} betrug die mittlere Leukozytenanzahl im peripheren Blut bei ED 43/ μl . Bei der Wildtypkohorte waren es 35/ μl ($p=0,043$).

Bei den paarweisen Vergleichen der Untergruppen der Kohorten ergaben sich signifikante Ergebnisse. Patienten der Wildtypkohorte mit mindestens einer Mutation hatten signifikant höhere Leukozytenwerte als Patienten der Wildtypkohorte ohne vorliegende Mutation ($p=0,001$). Weiterhin zeigte sich im Vergleich der Wildtypkohorte ohne Mutation mit den *DNMT3A*-positiven Patienten mit weiteren Mutationen ein signifikantes Niveau ($p=0,001$). Bei weiteren paarweisen Vergleichen innerhalb der Untergruppen konnten keine statistisch signifikanten Ergebnisse festgestellt werden.

Blasten:

Es zeigte sich eine Tendenz ($p=0,058$) zu erhöhtem Blastenanteil im Knochenmark der *DNMT3A*-positiven Kohorte verglichen mit der gesamten Wildtypkohorte (78 % vs. 72 %).

Beim Vergleich der Untergruppen der Kohorten traten signifikante Ergebnisse auf. Patienten der Wildtypkohorte mit mindestens einer Mutation hatten einen signifikant höheren Blastenanteil im Knochenmark als die Patienten der Wildtypkohorte ohne vorliegende Mutation ($p=0,001$). Verglich man die Wildtypkohorte ohne vorliegende Mutation mit den *DNMT3A*-positiven Patienten mit weiteren vorliegenden Mutationen zeigte sich ebenfalls ein signifikantes Niveau ($p=0,003$). *DNMT3A*-positive Patienten wiesen hierbei einen signifikant höheren Blastenanteil im Knochenmark auf.

3.1.5 FAB-Subtypen

Nach Unterteilung aller Patienten anhand der FAB Klassifikation zeigte sich folgende Verteilung: 6 % M0, 27 % M1, 18 % M2, 2 % M3, 24 % M4, 16 % M5, 4 % M6 und 1 % M7. Als biphänotypisch wurden sieben Patienten klassifiziert (2 %). Es zeigte sich für die *DNMT3A*-positive Kohorte mit $p=0,059$ eine Tendenz des gehäuftes Auftretens von M4 und M5. In der Wildtypkohorte war der FAB Subtyp M1 die häufigste Gruppierung, jedoch im Vergleich zur Kohorte mit Mutation ohne signifikanten Unterschied ($p=0,178$). Beim Vergleich der Untergruppen bezüglich der Verteilung der FAB-Subtypen ergab sich ein signifikantes Ergebnis. *DNMT3A*-positive Patienten mit weiteren Mutationen wiesen signifikant häufiger den FAB Subtyp M4 oder M5 auf ($p=0,047$).

3.1.6 AML Typ

Bei 324 Patienten handelte es sich um eine de novo AML. In der Gruppe der *DNMT3A*-positiven Patienten waren 77 % an einer de novo AML erkrankt, in der Wildtypkohorte 72 % der Patienten. Die Anzahl der Patienten mit einer sekundär erworbenen AML Erkrankung betrug in der *DNMT3A*-positiven Kohorte 23 % (vs. 28 %). Es zeigte sich ein signifikant häufigeres Auftreten von de novo AML in allen vier Untergruppen ($p=0,001$) (vgl. Abbildung 1).

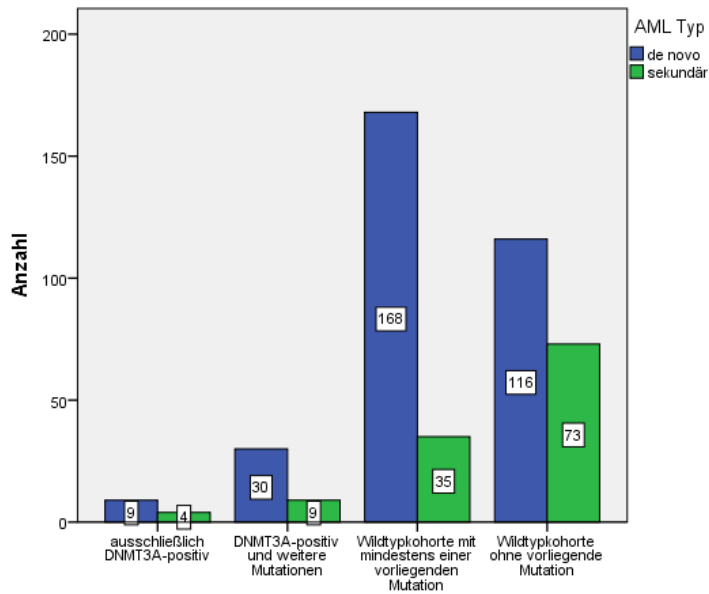


Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung der AML Typen (de novo, sekundär) innerhalb der vier definierten Untergruppen ($p=0,001$). x-Achse: Untergruppen 1–4, y-Achse: Anzahl der Patienten; ebenfalls in der jeweiligen Säule beziffert.

3.1.7 Zytogenetik

In den vier Untergruppen konnten signifikante Ergebnisse bezüglich des zugrundeliegenden Karyotyps der Patienten festgestellt werden ($p=0,001$). *DNMT3A*-positive Patienten mit weiteren Mutationen zeigten signifikant häufiger einen normalen Karyotyp. Ebenso war der normale Karyotyp in der Wildtypkohorte mit mindestens einer vorliegenden Mutation signifikant häufiger. In der Wildtypkohorte ohne Mutation war ein aberranter Karyotyp signifikant häufiger zu beobachten (vgl. Abbildung 2).

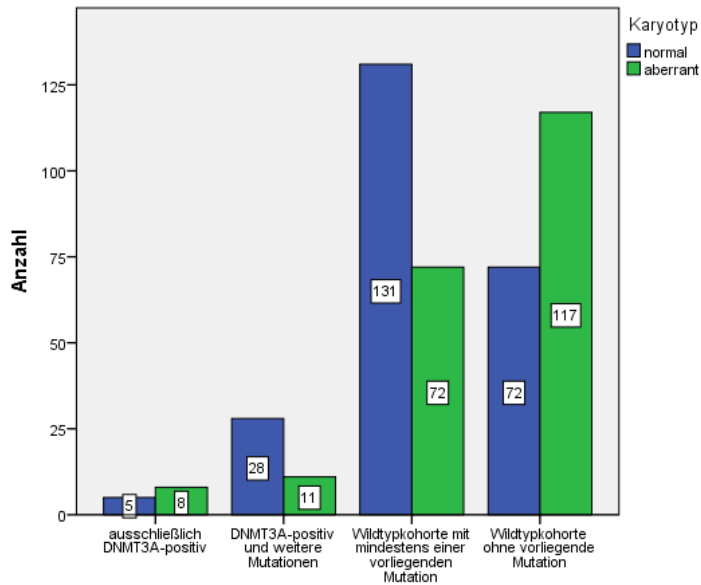


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung des unterschiedlichen Karyotyps (normal, aberrant) innerhalb der vier definierten Untergruppen ($p=0,001$). x-Achse: Untergruppen 1–4, y-Achse: Anzahl der Patienten; ebenfalls in der jeweiligen Säule beziffert.

Bei Untersuchung der Verteilung von zytogenetischen Risikogruppen in der *DNMT3A*-positiven sowie der Wildtypkohorte zeigte sich mit $p=0,058$ kein signifikantes Niveau. Die intermediäre Risikogruppe kam signifikant häufiger bei *DNMT3A*-negativen Patienten vor ($p=0,02$). Für die schlechte Risikogruppe ergab sich mit $p=0,063$ eine Tendenz des gehäuften Auftretens in der Kohorte mit *DNMT3A*^{R882mut}. Bei Aufteilung der beiden großen Kohorten in die vier definierten Untergruppen bestätigte der Chi-Quadrat-Test einen signifikanten Unterschied bzgl. der Häufigkeitsverteilung der zytogenetischen Risikogruppen ($p=0,001$) (vgl. Abbildung 3).

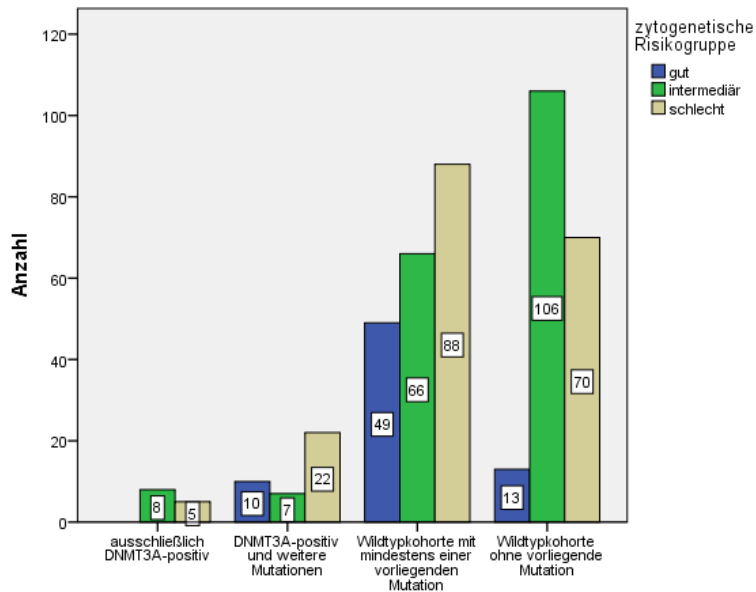


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung der zytogenetischen Risikogruppen (gut, intermediär, schlecht) innerhalb der vier definierten Untergruppen (p=0,001). x-Achse: Untergruppen 1–4, y-Achse: Anzahl der Patienten; ebenfalls in der jeweiligen Säule beziffert.

3.1.8 CR

In der *DNMT3A*-positiven Kohorte erreichten 73 % Patienten eine CR, in der Wildtypkohorte waren es 65 %. Es zeichnete sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Häufigkeit des Erreichens einer CR ab (p=0,536). In den vier definierten Untergruppen wurden häufiger komplette Remissionen beobachtet als partielle Remissionen bzw. resistente Formen der AML. Es wurde jedoch kein signifikantes Niveau erreicht (p=0,522).

3.1.9 Rezidiv

In der Patientengruppe mit *DNMT3A*^{R882mut} erlitten 50 % ein Rezidiv, in der *DNMT3A*-negativen Kohorte 39 % der Patienten (p=0,121). In den vier definierten Untergruppen zeigte sich kein signifikantes Ergebnis bezüglich der Rezidivhäufigkeit: Im Gegensatz zu den Untergruppen 1,3 und 4 trat bei den *DNMT3A*-positiven Patienten mit weiteren vorliegenden Mutationen häufiger ein Rezidiv auf (p=0,335).

3.1.10 Überleben

In der *DNMT3A*-positiven Kohorte starben 52 % der Patienten, in der *DNMT3A*-negativen Gruppe 48 % ($p=0,615$).

Die vier definierten Untergruppen unterschieden sich nicht signifikant bzgl. des Auftretens von Todesfällen innerhalb der Patientenkohorten ($p=0,389$). Beim Vergleich der *DNMT3A*-positiven Patienten und der Wildtypkohorte zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Todesursache ($p=0,071$). Man konnte eine Tendenz dahingehend erkennen, dass Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} häufiger eines leukämie-assoziierten Todes verstarben.

3.1.11 Auftreten von Ko-Mutationen

Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} wiesen signifikant häufiger eine zusätzliche *NPM1*^{mut} auf ($p<0,001$). Sowohl in der *DNMT3A*-negativen als auch in der *DNMT3A*-positiven Patientengruppe kam weiterhin in ca. 17 % der Fälle eine *IDH1*^{mut} vor ($p= 0,922$). Mit einer Häufigkeit von ca. 7 % in der Wildtypkohorte bzw. 8 % in der *DNMT3A*-positiven Kohorte lag darüber hinaus eine *IDH2*^{mut} vor ($p=0,775$). Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} hatten in 40 % der Fälle eine *FLT3*-ITD-Ko-Mutation. 60 % der *DNMT3A*-negativen Patienten trugen diese Mutation nicht ($p=0,002$). In der Untersuchung zwischen *DNMT3A*^{R882mut} und *DNMT3A*^{wt} zeigte sich kein Unterschied bzgl. des Auftretens von *FLT3*-TKD^{mut} ($p=0,473$). Das Auftreten von Ko-Mutationen bei *DNMT3A*-positiven und *DNMT3A*-negativen Patienten ist in Tabelle 22 dargestellt, wobei das Vorliegen von *FLT3*-ITD- und *FLT3*-TKD-Mutationen als „*FLT3*-positiv“ zusammengefasst wurde.

Tabelle 22: Häufigkeit von Ko-Mutationen bei *DNMT3A*-positiven und *DNMT3A*-negativen Patienten; Anzahl der Patienten (n)

<i>DNMT3A</i> -positiv (52)				<i>DNMT3A</i> -negativ (392)			
<i>NPM1</i> -positiv (25)		<i>NPM1</i> -negativ (27)		<i>NPM1</i> -positiv (88)		<i>NPM1</i> -negativ (304)	
<i>FLT3</i> -positiv (13)	<i>FLT3</i> -negativ (12)	<i>FLT3</i> -positiv (8)	<i>FLT3</i> -negativ (19)	<i>FLT3</i> -positiv (44)	<i>FLT3</i> -negativ (44)	<i>FLT3</i> -positiv (57)	<i>FLT3</i> -negativ (247)

3.2 Analyse des Gesamtüberlebens

Zwischen *DNMT3A*-positiven Patienten und der Wildtypkohorte ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens ($p=0,701$) (vgl. Abbildung 4).

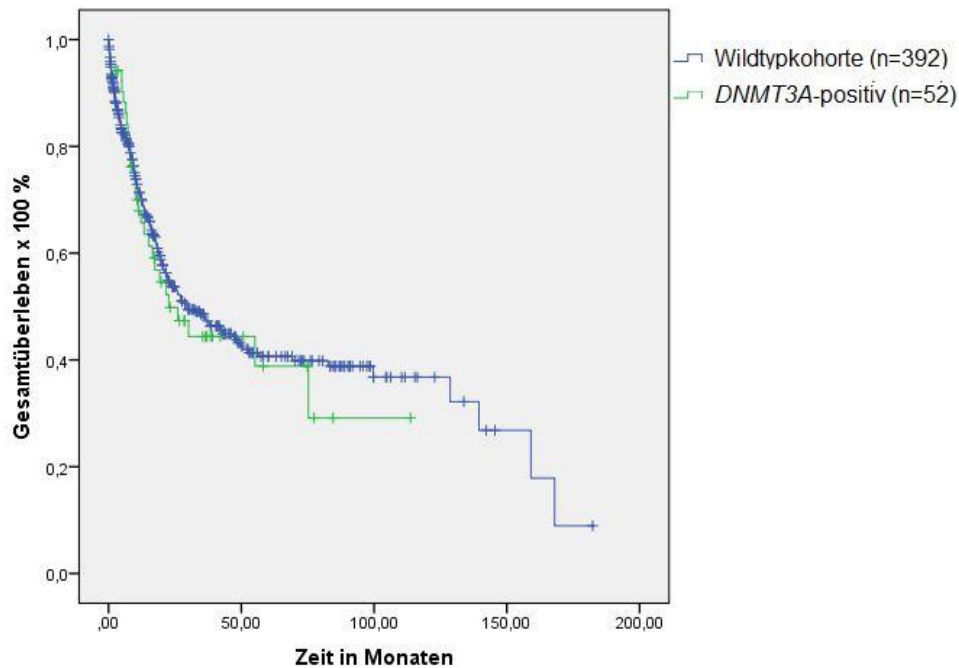


Abbildung 4: Vergleich des Gesamtüberlebens von *DNMT3A*-positiven Patienten und Wildtypkohorte; log rank: $p=0,701$. x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: Gesamtüberleben x 100 %.

Bei Unterteilung der gesamten Patientenkohorte anhand ihrer vorliegenden Mutationen ergab sich ein signifikant längeres Überleben für Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut}/*NPM1*^{mut} im Vergleich zur Kohorte mit *DNMT3A*^{R882mut}/*FLT3*^{mut} ($p=0,035$) (vgl. Abbildung 5 und Tabelle 23).

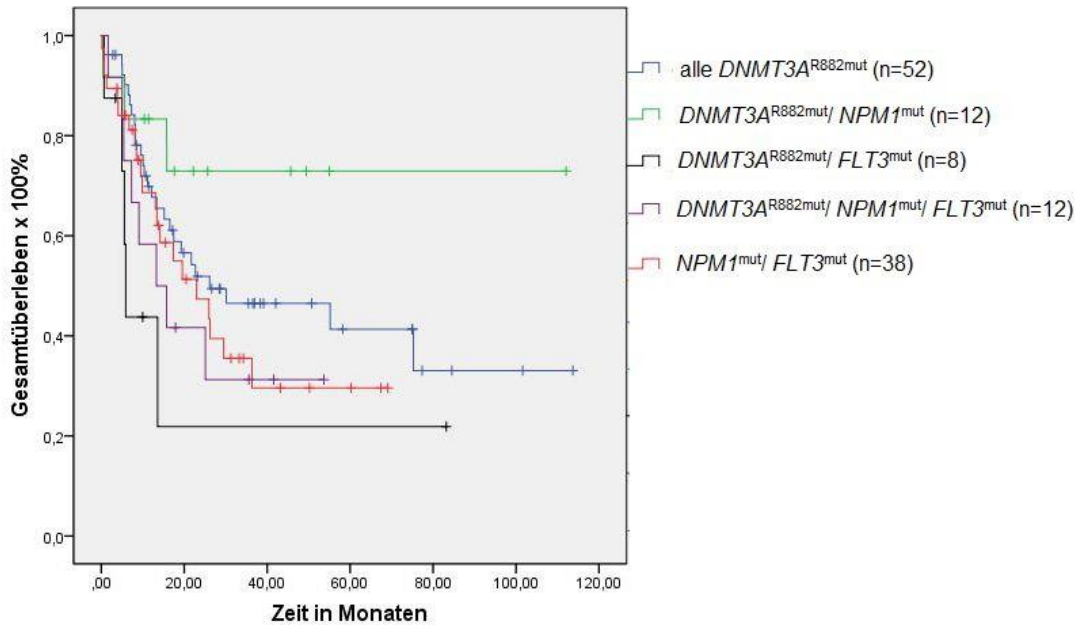


Abbildung 5: Vergleich des Gesamtüberlebens von $DNMT3A^{R882mut}$ -Patienten mit der Kohorte $DNMT3A^{R882mut}/NPM1^{mut}$, $DNMT3A^{R882mut}/FLT3^{mut}$, $DNMT3A^{R882mut}/NPM1^{mut}/FLT3^{mut}$ sowie $NPM1^{mut}/FLT3^{mut}$. x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: Gesamtüberleben x 100 %.

Die Ergebnisse des log-rank-Tests der verschiedenen Kohorten und der jeweiligen Ko-Mutationen können Tabelle 23 entnommen werden.

Tabelle 23: Tabellarische Übersicht der paarweisen Vergleiche der Kohorten mit den jeweiligen Ko-Mutationen mit zugehörigem p-Wert des log-rank-Tests

	$DNMT3A^{R882mut}$	$DNMT3A^{R882mut}/NPM1^{mut}$	$DNMT3A^{R882mut}/FLT3^{mut}$	$DNMT3A^{R882mut}/NPM1^{mut}/FLT3^{mut}$	$NPM1^{mut}/FLT3^{mut}$
$DNMT3A^{R882mut}$		0,202	0,075	0,243	0,343
$DNMT3A^{R882mut}/NPM1^{mut}$	0,202		0,035	0,078	0,095
$DNMT3A^{R882mut}/FLT3^{mut}$	0,075	0,035		0,446	0,229
$DNMT3A^{R882mut}/NPM1^{mut}/FLT3^{mut}$	0,243	0,078	0,446		0,674
$NPM1^{mut}/FLT3^{mut}$	0,343	0,095	0,229	0,674	

Bei der Analyse des Gesamtüberlebens der verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen ergab sich mit $p=0,001$ ein signifikantes Ergebnis. Die Patienten der guten Risikogruppe hatten ein signifikant längeres Gesamtüberleben als diejenigen in der intermediären sowie schlechten Gruppe. Die intermediäre Gruppe wies dabei ein längeres Gesamtüberleben auf als die Patienten der schlechten Risikogruppe (vgl. Abbildung 6).

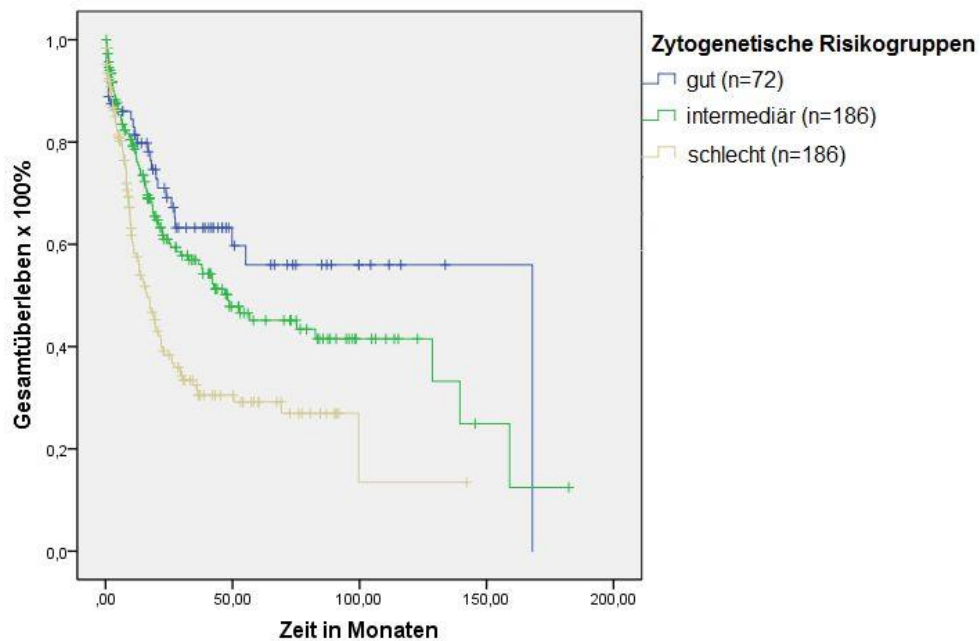


Abbildung 6: Vergleich des Gesamtüberlebens der zytogenetischen Risikogruppen; log rank: $p=0,001$. x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: Gesamtüberleben x 100 %.

Beim Vergleich der verschiedenen Untergruppen zeigte sich kein signifikantes Ergebnis bezüglich der Dauer des Gesamtüberlebens (vgl. Abbildung 7 und Tabelle 24).

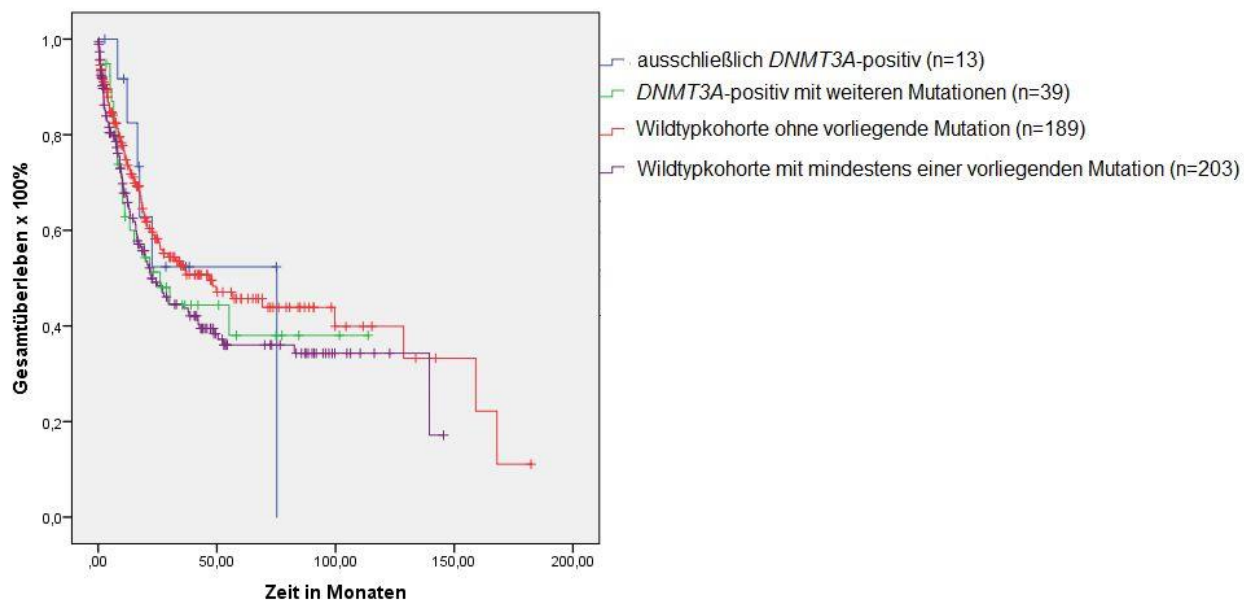


Abbildung 7: Vergleich des Gesamtüberlebens der vier definierten Untergruppen. x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: Gesamtüberleben x 100 %.

Die Ergebnisse des log-rank-Tests der verschiedenen Untergruppen im paarweisen Vergleich können Tabelle 24 entnommen werden.

Tabelle 24: Tabellarische Darstellung der paarweisen Vergleiche der jeweiligen Untergruppen mit zugehörigem p-Wert des log-rank-Tests

	Ausschließlich <i>DNMT3A</i> -positiv	<i>DNMT3A</i> -positiv und weitere Mutationen	Wildtypkohorte mit mindestens einer vorliegenden Mutation	Wildtypkohorte ohne vorliegende Mutation
Ausschließlich <i>DNMT3A</i> -positiv		0,583	0,979	0,481
<i>DNMT3A</i> -positiv und weitere Mutationen	0,583		0,438	0,782
Wildtypkohorte mit mindestens einer vorliegenden Mutation	0,979	0,438		0,064
Wildtypkohorte ohne vorliegende Mutation	0,481	0,782	0,064	

3.3 Quantitative *DNMT3A*^{R882}-Mutationsanalyse

Die *DNMT3A*^{R882mut} wurde zu verschiedenen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf analysiert. Dazu zählten die Erstdiagnose, das Erreichen von CR_{St} und der Zeitpunkt der CR_{allo}. Sofern die Patienten ein Rezidiv entwickelten, wurde diese Probe ebenfalls quantitativ analysiert. Dabei handelte es sich in 96 % der Fälle um Knochenmarkproben der Patienten. Bei 28 Patienten mit *DNMT3A*^{R882Hmut} wurden quantitative Mutationsanalysen durchgeführt (vgl. Abbildung 8). Die *DNMT3A*^{R882Cmut} konnte bei sechs Patienten beobachtet und im Krankheitsverlauf analysiert werden.

Zu den Zeitpunkten ED und CR_{St} zeigte sich, dass die Mutationslast prozentual bei fast allen Patienten absank, unabhängig davon ob *DNMT3A*^{R882Hmut} oder *DNMT3A*^{R882Cmut} vorlag. Zum klinischen Zeitpunkt der CR_{St} blieb die Mutation weiterhin quantitativ nachweisbar. Beim Vergleich der Proben in CR_{St} mit denen in CR_{allo} ließ sich erkennen, dass die Mutationslast sowohl von *DNMT3A*^{R882Hmut} (vgl. Abbildung 8) als auch von *DNMT3A*^{R882Cmut} (vgl. Abbildung 9) nach Transplantation auf den Wert Null absank und dadurch in der quantitativen Analyse nicht mehr nachzuweisen war.

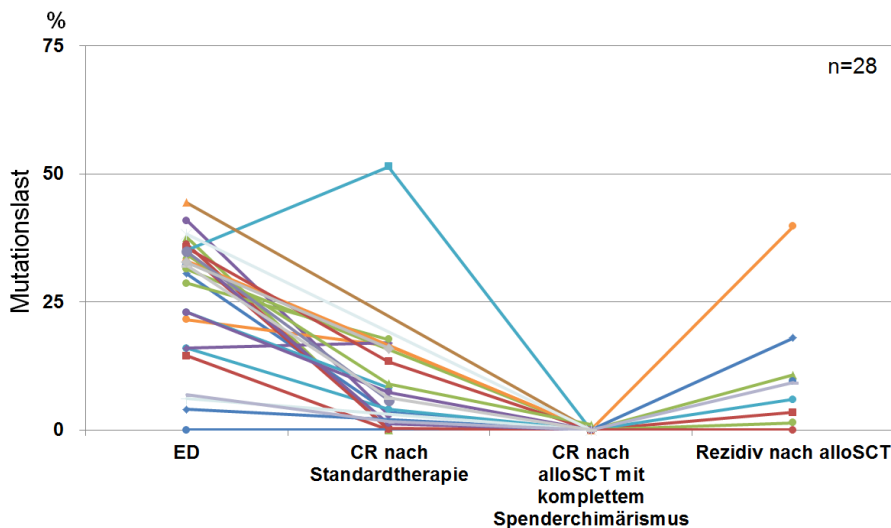


Abbildung 8: Quantitative *DNMT3A*^{R882H}-Mutationsanalyse bei 28 Patienten. Graphischer Überblick über die prozentuale Mutationslast im Krankheitsverlauf. Jeder farbige Graph beschreibt einen einzelnen Patienten. x-Achse: Zeitpunkt der Probenentnahme im Verlauf der Erkrankung, y-Achse: Prozentualer Anteil der *DNMT3A*^{R882H}-Mutationslast. Die Daten der Chimärismusanalyse entstammen dem molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin und wurden mir freundlicherweise von Frau Dr. med. Olga Blau überlassen.

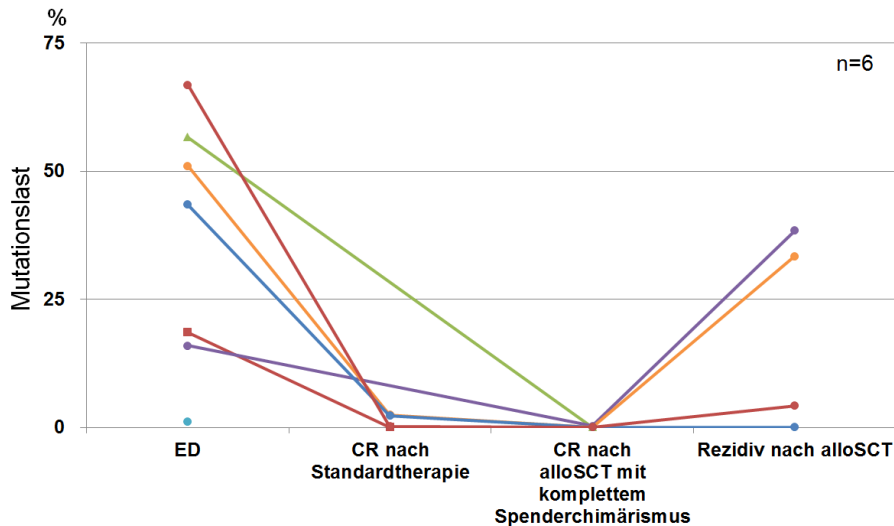


Abbildung 9: Quantitative $DNMT3A^{R882C}$ -Mutationsanalyse bei 6 Patienten. Graphischer Überblick über die prozentuale Mutationslast im Krankheitsverlauf. Jeder farbige Graph beschreibt einen einzelnen Patienten. x-Achse: Zeitpunkt der Probenentnahme im Verlauf der Erkrankung, y-Achse: Prozentualer Anteil der $DNMT3A^{R882C}$ -Mutationslast. Die Daten der Chimärismusanalyse entstammen dem molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin und wurden mir freundlicherweise von Frau Dr. med. Olga Blau überlassen.

Bei fünf analysierten Patienten, die nach Standardtherapie ein Rezidiv erlitten, zeigte sich in allen Fällen ein prozentualer Anstieg von $DNMT3A^{R882mut}$ in den untersuchten Knochenmarkspalten (vgl. Abbildung 10).

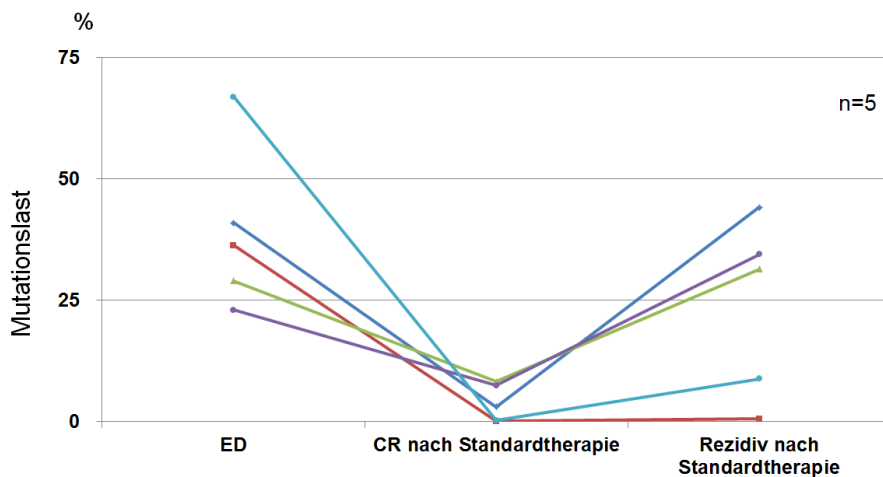


Abbildung 10: Quantitative $DNMT3A^{R882}$ -Mutationsanalyse bei 5 Patienten mit Rezidiv nach Standardtherapie. Graphischer Überblick über die prozentuale Mutationslast im Krankheitsverlauf. Jeder farbige Graph beschreibt einen einzelnen Patienten. x-Achse: Zeitpunkt der Probenentnahme im Verlauf der Erkrankung, y-Achse: Prozentualer Anteil der $DNMT3A^{R882}$ -Mutationslast. Die Daten der Chimärismusanalyse entstammen dem molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin und wurden mir freundlicherweise von Frau Dr. med. Olga Blau überlassen.

Bei 11 analysierten Patienten, die nach allogener Stammzelltransplantation ein Rezidiv erlitten, zeigte sich in allen Fällen ein prozentualer Anstieg von $DNMT3A^{R882mut}$ in den untersuchten Knochenmarkproben (vgl. Abbildung 11).

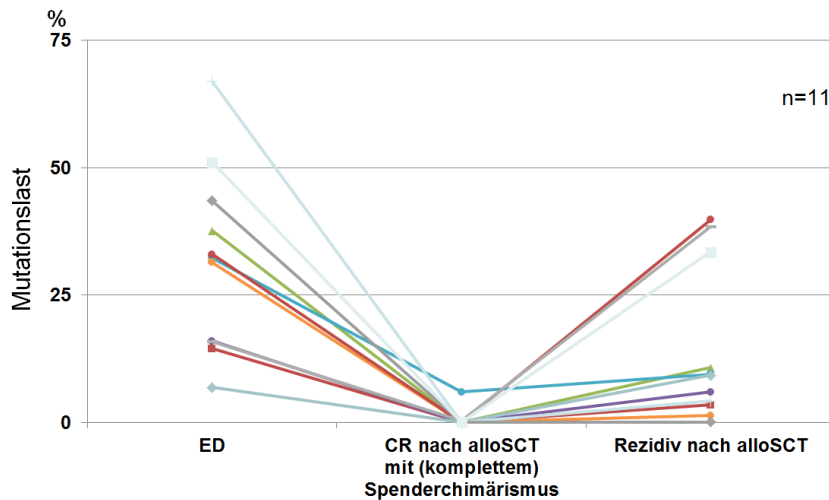


Abbildung 11: Quantitative $DNMT3A^{R882}$ -Mutationsanalyse bei 11 Patienten mit Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation. Graphischer Überblick über die prozentuale Mutationslast im Krankheitsverlauf. Jeder farbige Graph beschreibt einen einzelnen Patienten. x-Achse: Zeitpunkt der Probenentnahme im Verlauf der Erkrankung, y-Achse: Prozentualer Anteil der $DNMT3A^{R882}$ -Mutationslast. Die Daten der Chimärismusanalyse entstammen dem molekulargenetischen Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin und wurden mir freundlicherweise von Frau Dr. med. Olga Blau überlassen.

3.3.1 Bedeutung der $DNMT3A^{R882}$ -Mutationslast bei ED

Patienten, die im Verlauf der Erkrankung eine CR erreichen konnten, hatten zum Zeitpunkt der ED im Mittel 31 % Mutationslast. Circa 40 % Mutationslast wiesen die Patienten auf, die eine PR erreichten. Die geringste Mutationslast entfiel mit durchschnittlich 27 % auf die Patienten, die keine Remission erreichen konnten. Die Häufigkeitsverteilung erreichte jedoch kein signifikantes Niveau ($p=0,165$). Zwischen den Patienten, die ein Rezidiv erlitten und denjenigen ohne Rezidiv im Krankheitsverlauf konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Höhe der Mutationslast zum Zeitpunkt der ED gezeigt werden ($p=0,686$). Es konnte kein Zusammenhang zwischen Mutationslast bei ED und Auftreten eines Rezidivs nachgewiesen werden ($p=0,866$).

Der Mittelwert der Mutationslast unterschied sich nicht signifikant bei Gegenüberstellung der Patienten, die im Verlauf der Erkrankung starben und den Patienten ohne eingetretenen Todesfall ($p=0,322$). Zwischen dem Auftreten eines Todesfalls und der Mutationslast zum Zeitpunkt der ED konnte kein Zusammenhang aufgezeigt werden ($p=0,484$).

Anhand des Medians der Mutationslast bei ED ließ sich die Patientenkohorte in zwei Gruppen einteilen: Die Patienten, welche weniger als 34,73 % Mutationslast zum Zeitpunkt der ED aufwiesen und diejenigen mit mehr als 34,73 % Mutationslast. Bei der Untersuchung, in wie weit die Höhe der medianen Mutationslast bei ED einen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten hatte, konnte in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse kein signifikantes Niveau erreicht werden ($p=0,893$). Statistisch war keine Korrelation zwischen Mutationslast zum Zeitpunkt der ED und Gesamtüberleben der Patienten nachweisbar ($p=0,294$).

3.3.2 Bedeutung der *DNMT3A*^{R882}-Mutationslast bei CR_{St}

Die Höhe der Mutationslast zum Zeitpunkt der CR_{St} unterschied sich nicht signifikant zwischen den Patienten, die ein Rezidiv erlitten und denjenigen ohne Rezidiv im Krankheitsverlauf ($p=0,078$). Es ergab sich eine Tendenz dahingehend, dass Patienten mit Rezidiv durchschnittlich eine geringere Mutationslast zum Zeitpunkt der CR_{St} (6,5 % vs. 13,5 %) aufwiesen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Mutationslast zum Zeitpunkt der CR_{St} und dem Auftreten eines Rezidivs nachgewiesen werden ($p=0,439$). Bei Gegenüberstellung der Patienten, die im Verlauf der Erkrankung starben und den Patienten ohne eingetretenen Todesfall zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Mutationslast zum Zeitpunkt der CR_{St} ($p=0,03$). Patienten, die im Verlauf der Erkrankung verstarben, hatten im Stadium der CR_{St} eine geringere *DNMT3A*^{R882}-Mutationslast (2,3 % vs. 15,5 %). Es konnten jedoch keine Zusammenhänge zwischen Mutationslast zum Zeitpunkt der CR_{St} und dem Eintreten eines Todesfalls ($p=0,440$) sowie dem Gesamtüberleben ($p=0,924$) nachgewiesen werden. Anhand des Medians der Mutationslast bei CR_{St} ließ sich die Patientenkohorte in zwei Gruppen einteilen: Die Patienten, die zum Zeitpunkt der CR_{St} mehr als 3,23 % Mutationslast aufwiesen und diejenigen mit weniger als 3,23 %. Die Patienten mit weniger als 3,23 % Mutationslast bei CR_{St} hatten tendenziell ein kürzeres Gesamtüberleben ($p=0,09$).

Eine zusammenfassende Darstellung der unter Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 genannten Signifikanzwerte der Analyse von Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} findet sich in Tabelle 25.

Tabelle 25: Zusammenfassende Darstellung der Signifikanzwerte der statistischen Analyse aller Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut}. Erläuterungen im Text unter Kapitel 3.3.1 und Kapitel 3.3.2.

	Mutationslast bei ED	Mutationslast bei CR _{St}
Zentrale Tendenz:		
Rezidiv	0,686	0,078
Todesfall	0,322	0,03
Zusammenhang:		
Rezidiv	0,866	0,439
Todesfall	0,484	0,440
Gesamtüberleben	0,294	0,924
Überlebenszeitanalyse mit Median der Mutationslast:		
Gesamtüberleben	0,893	0,09

3.3.3 Bedeutung der *DNMT3A*^{R882}-Mutationslast bei Patienten mit alloSCT

Insgesamt wurden 28 *DNMT3A*^{R882}-positive Patienten mit therapeutischer alloSCT nachbeobachtet und die Daten statistisch ausgewertet (vgl. Tabelle 26).

Tabelle 26: Charakteristika der Patienten mit alloSCT

Parameter		Patienten, n=28
Geschlecht, n (%)	männlich	17 (61 %)
	weiblich	11 (39 %)
Alter bei alloSCT	Jahre im Median, Spanne	56 (24–71)
Nachbeobachtung	in Tagen	499,5
	Spanne	(21–3230)
Status bei alloSCT, n (%)	1. CR	18 (64 %)
	2. CR	5 (18 %)
	PR	2 (7 %)
	Rezidiv	3 (11 %)
Konditionierung, n (%)	MAC	10 (36 %)
	RIC	18 (64 %)
	Konventionell	8 (29 %)
	<i>Cyclophosphamid + TBI (12 Gy)</i>	5
	<i>Cyclophosphamid + TBI (12 Gy) + ATG</i>	3
	Low-dose TBI (2 Gy)	1 (4 %)

Tabelle 26 (Fortsetzung): Charakteristika der Patienten mit alloSCT

	Fludarabin-basiert	19 (68 %)
	<i>Fludarabin + Treosulfan</i>	5
	<i>Fludarabin + Busulfan + ATG</i>	6
	<i>Fludarabin + ATG + TBI (2 Gy)</i>	4
	<i>Fludarabin + Thiopeta + TBI (12 Gy)</i>	1
	<i>FLAMSA</i>	2
	<i>FLAMSA + Cyclophosphamid</i>	1
Zytogenetik bei ED, n (%)	normal	18 (64 %)
	aberrant	10 (36 %)
Risikogruppen, n (%)	gut	9 (32 %)
	intermediär	13 (46 %)
	schlecht	6 (21 %)
Spendertyp, n (%)	MRD	13 (46 %)
	MUD	15 (54 %)
HLA-Status, n (%)	ident	26 (93 %)
	mismatch	1 (4 %)
	haploident	1 (4 %)
Geschlechterverhältnis von Spender zu Empfänger, n (%)	weiblich zu männlich	10 (36 %)
	männlich zu weiblich	2 (7 %)
	andere	16 (57 %)
Zellen im Transplantat, Median (Spanne)	CD3+ (x 10 ⁸ pro kg Körpergewicht)	2,3 (0,2–5,9)
	CD34+ (x 10 ⁶ pro kg Körpergewicht)	5,45 (2,1–17,7)
GvHD, n (%)	akut	14 (50 %)
	chronisch	11 (39 %)
Rezidiv, n (%)		14 (50 %)
	erneute alloSCT nach Rezidiv	4 (14 %)
Tod, n (%)		15 (54 %)

Mutationslast zum Zeitpunkt der ED:

Der Mittelwert der Mutationslast zum Zeitpunkt der ED unterschied sich nicht signifikant zwischen der Patientengruppe mit und derjenigen ohne Rezidiv nach alloSCT ($p=0,793$). Zwischen der Höhe der Mutationslast bei ED und dem Auftreten eines Rezidivs ergab sich kein nachweislicher Zusammenhang ($p=0,463$). Die durchschnittliche Mutationslast bei ED zeigte keinen Unterschied zwischen den Patienten mit und denjenigen ohne eingetretenen Todesfall nach alloSCT ($p=0,3$).

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Mutationslast bei ED und dem Eintreten eines Todesfalls aufgedeckt werden ($p=0,356$). Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der Höhe der Mutationslast zum Zeitpunkt der ED und dem Überleben nach alloSCT ($p=0,863$). Anhand des Medians der Mutationslast bei ED ließen sich die Patienten mit alloSCT in zwei Gruppen einteilen: Die Patienten, die zum Zeitpunkt der ED mehr als 34,28 % Mutationslast aufwiesen und diejenigen mit weniger als 34,28 %. Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse zwischen den beiden Gruppen aufgedeckt werden ($p=0,036$). Die Patienten, die zum Zeitpunkt der ED mehr als 34,28 % Mutationslast aufwiesen, hatten ein signifikant längeres Gesamtüberleben nach alloSCT.

Mutationslast zum Zeitpunkt der CR_{St}:

Zwischen der Patientengruppe mit und derjenigen ohne Rezidiv nach alloSCT zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Mittelwert der Mutationslast bei CR_{St} ($p=0,043$). Patienten, die im Verlauf nach alloSCT ein Rezidiv erlitten, wiesen eine geringere Mutationslast im Stadium der CR_{St} auf. Zwischen der Höhe der Mutationslast bei CR_{St} und dem Auftreten eines Rezidivs ergab sich kein statistisch nachweisbarer Zusammenhang ($p=0,477$).

Die durchschnittliche Mutationslast bei CR_{St} unterschied sich nicht signifikant zwischen den Patienten mit und den Patienten ohne eingetretenen Todesfall nach alloSCT ($p=0,703$). Es zeigte sich kein statistisch nachweisbarer Zusammenhang zwischen der Höhe der Mutationslast bei CR_{St} und dem Eintreten eines Todesfalls ($p=0,575$). Es konnte keine Korrelation zwischen der Höhe der Mutationslast zum Zeitpunkt der CR_{St} und dem Überleben nach alloSCT hergestellt werden ($p=0,997$). Anhand des Medians der Mutationslast bei CR_{St} ließen sich die Patienten mit alloSCT in zwei Gruppen einteilen: Die Patienten, die zum Zeitpunkt der CR_{St} mehr als 2,97 % Mutationslast aufwiesen und diejenigen mit weniger als 2,97 %. In der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse der beiden Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,727$). Eine zusammenfassende Darstellung der unter Kapitel 3.3.3 genannten Signifikanzwerte der Analyse von Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} nach alloSCT findet sich in Tabelle 27.

Tabelle 27: Zusammenfassende Darstellung der Signifikanzwerte der statistischen Analyse von Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} nach alloSCT. Erläuterungen im Text unter Kapitel 3.3.3.

	Mutationslast bei ED	Mutationslast bei CR _{St}
Zentrale Tendenz:		
Rezidiv	0,793	0,043
Todesfall	0,300	0,703
Zusammenhang:		
Rezidiv	0,463	0,477
Todesfall	0,356	0,575
Gesamtüberleben	0,863	0,997
Überlebenszeitanalyse mit Median der Mutationslast:		
Gesamtüberleben	0,036	0,727

4. Diskussion

Die AML gilt als die häufigste leukämische Erkrankung im Erwachsenenalter [2]. In der Pathogenese der AML spielen verschiedene Mutationen eine wichtige Rolle [81]. Zu diesen Mutationen zählt *DNMT3A^{mut}*, welche die Methylierung verschiedener, pathophysiologisch beteiligter, Gene beeinflusst. Die genauen Mechanismen dabei sind bislang jedoch noch immer nicht eindeutig geklärt [70]. Als häufigste *DNMT3A^{mut}* gilt die Mutation an Codon R882, für die Persistenz in CR und im Rezidiv gezeigt werden konnte [13, 77, 84-86].

Daraus resultiert die Frage, in wieweit der Nachweis von *DNMT3A^{R882mut}* sowie die Bestimmung der *DNMT3A^{R882}*-Mutationslast als mögliche prognostische Parameter genutzt werden können. Das Ziel dieser Arbeit war die gegenüberstellende Untersuchung von Patienten mit *DNMT3A^{R882mut}* und *DNMT3A^{wt}* in Bezug auf klinische Parameter wie z. B. Gesamtüberleben bei vorliegenden Ko-Mutationen oder zytogenetischen Risikogruppen. Des Weiteren sollte die Bedeutung der *DNMT3A^{R882}*-Mutationslast bei ED und im Krankheitsverlauf quantitativ analysiert und deren Einfluss auf Gesamtüberleben und Ansprechen auf alloSCT retrospektiv untersucht werden.

4.1 Hauptergebnisse

Im Folgenden werden die eingangs formulierten Fragestellungen mithilfe der Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit beantwortet und in den Kontext aktueller Literatur eingeordnet.

I) **Patientenkollektiv *DNMT3A^{R882mut}* vs. *DNMT3A^{wt}***

In der vorliegenden Patientenkohorte tragen 12 % eine Mutation im *DNMT3A*-Gen. Dieser Wert liegt unter den bereits veröffentlichten Daten [62, 75, 84, 95-97]. Der Anteil an R882H Mutationen liegt mit 85 % etwas höher als aktuell publizierte Werte [74, 75, 95]. Wie bereits aus der Literatur bekannt, zeigt sich in der *DNMT3A*-positiven Gruppe ein signifikant gehäuftes Auftreten von *NPM1^{mut}* sowie *FLT3-ITD^{mut}* [60, 62, 84, 95, 98]. Patienten mit *DNMT3A^{R882mut}* sind durchschnittlich 61 Jahre alt und damit etwas älter als die Patienten der Wildtypkohorte. Die nachgewiesene Altersdifferenz in den beiden vorliegenden Kohorten scheint durch die unterschiedliche Gruppengröße nicht auszureichen um signifikante Werte zu erreichen.

In der Literatur ist beschrieben, dass *DNMT3A*^{R882mut} mit höherem Alter assoziiert ist [62, 74, 99]. Bei der Einordnung der Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass einige Studien ausschließlich Patienten unter 60 Lebensjahren eingeschlossen haben [62, 63, 78], wohingegen höheres Alter bei anderen Arbeiten kein Ausschlusskriterium war [65, 100]. Insgesamt erschwert dies die Festlegung auf ein medianes Alter der Patienten mit *DNMT3A*^{mut}. Die Selektierung der Patienten an universitären Kliniken muss dabei ebenfalls berücksichtigt werden. Ein Selektionseffekt entsteht durch die Patienten selbst sowie durch die jeweils zuweisenden Ärzte und beeinflusst somit das durchschnittliche Patientenalter.

In der vorliegenden Arbeit kann ein signifikanter Zusammenhang zwischen *DNMT3A*^{R882mut} und erhöhten Leukozytenwerten gezeigt werden [57, 84, 101]. Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} haben tendenziell prozentual erhöhte Blastenanteile im KM, was im Einklang mit bereits publizierter Literatur steht [62, 80, 99, 102].

Bei der Untersuchung der Zellzahl bei ED wurde die *DNMT3A*^{R882mut}-Kohorte nicht weiter anhand vorliegender Ko-Mutationen unterteilt und möglicherweise sind die erhöhten Leukozyten- und Blastenwerte der begleitenden *FLT3*^{mut} zuzuschreiben [103]. In unserer Untersuchung zeigen sich in der *DNMT3A*^{R882mut}-Kohorte vermehrt die FAB-Subtypen M4 und M5 ($p=0,059$), vielfach ist hierfür ein signifikanter Zusammenhang beschrieben [46, 80, 87, 104].

Das gehäufte Auftreten von de novo AML bei Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut}, wie in anderen Veröffentlichungen beschrieben, bildet sich auch in den hier durchgeführten Untersuchungen ab [95, 105].

In der vorliegenden Arbeit bestätigt sich der signifikante Zusammenhang zwischen *DNMT3A*^{R882mut} und normalem Karyotyp, jedoch zeigt sich für die Risikostratifizierung nach ELN ein Unterschied zu aktueller Literatur [62, 74, 84, 101]. Die Patienten der *DNMT3A*^{R882mut}-Kohorte sind in der vorliegenden Arbeit signifikant häufiger der schlechten Risikogruppe zugeordnet.

Die molekulargenetische Untersuchungsroutine hat sich seit Beginn der Probenasservation verändert, sodass möglicherweise einzelne Patienten falsch zu einer ELN Risikogruppe zugeordnet wurden. Innerhalb der molekulargenetischen Untersuchungen können ebenfalls Fehler unterlaufen sein, die sich grundlegend auf die vorliegende Arbeit ausgewirkt und somit die Ergebnisse der Untersuchung maßgeblich beeinflusst haben könnten.

Allgemein muss auf die schwierige Interpretation der Risikogruppeneinteilung nach ELN hingewiesen werden: Trotz Neuerungen im Jahr 2017 umfasst die mittlere Risikogruppe weiterhin eine sehr heterogene Patientengruppe (vgl. [20]).

Das Erreichen einer CR unterscheidet sich nicht signifikant zwischen der *DNMT3A*^{R882mut}-positiven Kohorte und der Wildtypkohorte (73 % vs. 65 %). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Ostronoff *et al.* [100] sowie Renneville *et al.* [101]. Im Gegensatz dazu wurde in anderen Arbeiten ein kontroverser signifikanter Einfluss der *DNMT3A*^{R882mut} auf die CR-Rate postuliert [62, 106, 107].

Für den Zusammenhang zwischen *DNMT3A*^{R882mut} und Rezidivhäufigkeit sowie dem Eintreten eines Todesfalls erreichte die vorliegende Arbeit kein signifikantes Niveau. Andere Autoren berichten hierbei über erhöhtes Auftreten von Rezidiven bei Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} [75, 76, 108] bzw. keinem nachweisbaren Einfluss der Mutation auf die Rezidivrate [74].

II) Gesamtüberleben *DNMT3A*^{R882mut} vs. *DNMT3A*^{wt}

Die Berechnung des Gesamtüberlebens ist anhand des Mutationsstatus, vorliegender Ko-Mutationen (*NPM1*^{mut} und *FLT3*^{mut}) sowie der Einteilung in zytogenetische Risikogruppen nach ELN durchgeführt worden. Es muss dabei berücksichtigt werden, dass das Fokussieren auf einzelne Ko-Mutationen immer andere Mutationen und deren Interaktionen in den Hintergrund rücken lässt und nachgewiesene Ergebnisse möglicherweise diesen Veränderungen zuzuschreiben wären. Weiterhin sind verschiedene Therapiemodalitäten und interindividuelle Risikofaktoren nicht explizit in die Auswertung und Unterteilung der Kohorte miteinbezogen worden, sodass diese ebenfalls die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken könnten.

Beim Vergleich von *DNMT3A*^{R882mut} und *DNMT3A*^{wt} zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens. In Zusammenschau mit aktueller Literatur kann somit weder ein geringeres Gesamtüberleben für *DNMT3A*^{R882mut}-Patienten [58, 82, 109] noch der fehlende Einfluss der Mutation [75, 79] bestätigt werden.

Bei der Gegenüberstellung von *DNMT3A*^{R882mut} mit unterschiedlichen Ko-Mutationen kann in der vorliegenden Arbeit ein verlängertes Überleben für Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut}/*NPM1*^{mut} gegenüber derer mit *DNMT3A*^{R882mut}/*FLT3*^{mut} gezeigt werden.

Allerdings ist für *NPM1*^{mut} eine eher gute Prognose und für Kombinationen mit *FLT3*^{mut} ein schlechterer Verlauf aus Veröffentlichungen bekannt, sodass bei diesem Ergebnis unklar bleibt, welche Mutation in dieser Analyse ausschlaggebend für den klinischen Verlauf der Patienten ist [25, 110]. Hierbei muss außerdem einschränkend auf die geringe Fallzahl getesteter Patienten hingewiesen werden. Für die Patienten, die ausschließlich eine *DNMT3A*^{R882mut} aufweisen, kann der in der Literatur beschriebene, negative Einfluss auf das Gesamtüberleben nicht festgestellt werden [58, 78, 109]. Beim Blick auf die nach zytogenetischen Risikomerkmale unterteilte Kohorte bildet sich ein stimmiges Bild dahingehend ab, dass die gute Prognosegruppe ein signifikant längeres Gesamtüberleben aufweist als die intermediäre Kohorte. Außerdem überleben die Patienten der intermediären Gruppe länger als die der schlechten Prognosegruppe [20, 58, 111].

III) Untersuchung des Gesamtüberlebens mithilfe quantitativer *DNMT3A*^{R882}-Mutationsanalyse

In der quantitativen Mutationsanalyse zeigt sich, dass die Mutationslast vom Zeitpunkt der ED bis zum Erreichen der CR_{St} prozentual bei fast allen Patienten absinkt. Bei einem Patienten ist es zu einem merklichen Anstieg der Mutationslast zwischen ED und CR_{St} gekommen (von 35 % auf 51 %). Es zeigt sich in den Analysen ebenfalls ein prozentualer Anstieg von *DNMT3A*^{R882mut} bei Patienten, die ein Rezidiv erlitten [86, 96, 112]. Diese Ergebnisse stellen die widersprüchlichen Meinungen bezüglich des Verlaufes der Mutationslast dar, die auch in der Literatur beschrieben sind [12, 83]. Jedoch ist die Vergleichbarkeit innerhalb der publizierten Studien durch verschiedene Kohortengrößen, (CN-) AML sowie die jeweils eingeschlossenen R882-Mutationstypen eingeschränkt.

Die *DNMT3A*^{R882}-Mutationsanalyse ist in der vorliegenden Arbeit zu den Zeitpunkten ED, CR_{St} und ggf. im Rezidiv durchgeführt und anschließend vor dem Hintergrund der klinischen Daten der Patienten ausgewertet worden.

Im Einklang mit publizierten Daten ist *DNMT3A*^{R882mut} zum Zeitpunkt der CR_{St} quantitativ nachweisbar [46, 84, 86, 96, 97]. Bis dato unbeschrieben ist die Nachweisbarkeit von *DNMT3A*^{R882mut} bei allen untersuchten Patienten der Kohorte in CR_{St}, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist.

In der 2014 durchgeführten Arbeit von Pløen *et al.* [84] wird postuliert, dass die Mutationslast von $DNMT3A^{R882mut}$ zum Zeitpunkt der CR_{St} nicht im Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf der Patienten stünde. In der vorliegenden Arbeit ergibt sich eine Tendenz dahingehend, dass Patienten mit geringerer $DNMT3A^{R882}$ -Mutationslast zum Zeitpunkt der CR_{St} sowohl häufiger ein Rezidiv im Krankheitsverlauf entwickelten als auch ein durchschnittlich verkürztes Gesamtüberleben zeigen. Patienten, die im Verlauf der Erkrankung verstarben, hatten ebenfalls geringere $DNMT3A^{R882}$ -Mutationslast im Stadium der CR_{St} . Die Ergebnisse unterscheiden sich möglicherweise deshalb zur Arbeit von Pløen *et al.* [84], da in der vorliegenden Gesamtkohorte die Patienten mit alloSCT im Krankheitsverlauf inbegriffen sind. Bei Pløen *et al.* [84] wurden ausschließlich Patienten mit Standardtherapie ausgewertet.

IV) Untersuchung des Ansprechens auf alloSCT mithilfe quantitativer $DNMT3A^{R882}$ -Mutationsanalyse

Zur Frage, inwiefern die Höhe der Mutationslast eine Aussage zum Ansprechen der Patienten auf alloSCT treffen kann, wurden die Patientenproben zu den Zeitpunkten ED und CR_{St} quantitativ analysiert und mithilfe der Transplantationsdaten ausgewertet. Dabei war $DNMT3A^{R882mut}$ in der vorliegenden Arbeit bei komplettem Spenderchimerismus nach alloSCT nicht mehr nachweisbar, wie aktuell auch bei Thol *et al.* [96] veröffentlicht.

Bei der Untersuchung von Patienten, die nach alloSCT ein Rezidiv entwickelten, konnte in allen Fällen derselbe $DNMT3A^{R882mut}$ -Klon wie bei ED und CR_{St} festgestellt werden. Dieses Ergebnis legt eine hohe Beständigkeit von $DNMT3A^{R882mut}$ nahe und bestätigt die Aussage mehrerer Autoren bezüglich der Stabilität von $DNMT3A^{R882mut}$ im Krankheitsverlauf von Patienten mit AML [12, 46, 96, 97]. Weiterhin zeigt sich in der vorliegenden Arbeit, dass Patienten mit Rezidiv nach alloSCT eine signifikant geringere Mutationslast im Stadium der CR_{St} aufweisen. Dieses Ergebnis könnte die oben beschriebene Tendenz dafür in der Gesamtkohorte erklären (vgl. 4.1 III).

Im Jahr 2015 beschrieben Hahn *et al.* [112] in einem Fallbericht, dass die Rezidivrate nach alloSCT nicht mit der Höhe der Mutationslast von $DNMT3A^{R882}$ bei CR_{St} zusammen zu hängen scheint. Sie wiesen einen prozentualen Anstieg der $DNMT3A^{R882mut}$ von ED zu CR_{St} nach und postulierten diesen als Zeichen für die Rückkehr des präleukämischen Klons.

Ein Jahr später untersuchten Ahn *et al.* [75] in einer größeren Kohorte (n=20) in wieweit das Vorhandensein von *DNMT3A*^{R882mut} bei CR_{St} eine Prognose über den klinischen Verlauf von CN-AML-Patienten nach alloSCT treffen kann. Sie stellten dabei fest, dass das Vorhandensein von *DNMT3A*^{R882mut} ein unabhängiger prognostischer Faktor für eine erhöhte Rezidivrate nach alloSCT zu sein scheint. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der vorliegenden Arbeit, wobei hier vor allem eine geringe Mutationslast zum Zeitpunkt der CR_{St} zu häufigeren Rezidiven nach alloSCT zu führen scheint. In Zusammenschau dieser Arbeiten stellt sich die Frage, ob tatsächlich die prozentuale Mutationslast oder aber eher das Vorhandensein von *DNMT3A*^{R882mut} generell - unabhängig vom prozentualen Anteil der betroffenen Zellen - eine Aussagekraft über den klinischen Verlauf der Patienten treffen kann.

Die signifikanten Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit lassen die Hypothese zu, dass die erkrankten Zellen zum Zeitpunkt der CR_{St} möglicherweise keine „vorherrschende“ Mutation aufweisen, sondern stattdessen eher eine Vielzahl an potentiell pathogenen Mutationen (u. a. *DNMT3A*^{R882mut}). Die jeweilige Mutation führt dann zu vermehrter Proliferation der Zellen und damit zu genetischer Instabilität. Dadurch wird das Auftreten eines Rezidivs begünstigt und die Prognose für den Patienten verschlechtert sich. Diese Hypothese wird in Bezug auf *DNMT3A*^{R882mut} dahingehend bestärkt, dass für die komplette Eradikation dieser Mutation bereits eine signifikant geringere Rezidivrate beschrieben ist [96].

Die erniedrigte Rezidivrate und die damit verbesserte Prognose für die Patienten unterstreicht die hohe Relevanz der alloSCT als therapeutische Option, da diese als Einzige die Möglichkeit bietet maligne Zellen vollständig zu entfernen.

Ahn *et al.* [75] untersuchten Patienten retrospektiv, nachdem sie in CR - unabhängig von vorliegenden Mutationen - transplantiert worden waren. Dabei zeigte sich, dass das erneute Auftreten von *DNMT3A*^{R882mut} bei Patienten nach Transplantation mit vermehrten Posttransplantations-Rezidiven korrelierte [75].

In der vorliegenden Arbeit kann die einleitend formulierte Fragestellung positiv beantwortet werden, da durch die quantitative Bestimmung der *DNMT3A*^{R882}-Mutationslast zum Zeitpunkt der CR_{St} das Auftreten eines Rezidivs nach alloSCT und somit das Ansprechen der Patienten auf alloSCT vorhergesagt werden konnte. Jedoch lassen sich einschränkende Limitationen für dieses Ergebnis formulieren (vgl. 4.2).

4.2 Limitationen

In der vorliegenden Arbeit entwickelten 10 von 18 analysierten Patienten mit *DNMT3A*^{R882mut} ein Rezidiv nach alloSCT. Von diesen zehn Patienten entfielen drei auf die *FLT3*-high-risk-Gruppe. Möglicherweise war das vermehrte Auftreten eines Rezidivs durch die schlechte Prognose von *FLT3*^{mut} begründet oder die Wirkung von *DNMT3A*^{R882mut} wurde durch das gleichzeitige Vorliegen von *FLT3*^{mut} verstärkt, wie es bei Ahn *et al.* [75] in ihrer Arbeit postuliert wurde. Weiterhin muss die geringe Größe der *DNMT3A*^{R882mut}-Kohorte kritisch betrachtet werden, da das Ergebnis durch einzelne Patienten und deren spezifische Krankheitsverläufe stärker beeinflusst werden kann. Vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl getesteter Patienten, ist in dieser Arbeit außerdem auf die weitere Unterteilung nach *FLT3*-ITD^{mut} sowie *FLT3*-TKD^{mut} verzichtet worden. Der Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren wird weiterhin durch die Aktualisierung der ELN Klassifikation von 2017 erschwert, da sich die Zuordnung zur intermediären Risikogruppe zu den publizierten Daten unterscheidet [62, 83]. Im Gegensatz zur Arbeit von Klco *et al.* [97] sind in der vorliegenden Wildtypkohorte Patienten mit APL nicht ausgeschlossen worden.

Durch die Entscheidung gleichermaßen Patienten mit normalem und aberrantem Karyotyp in die vorliegende Arbeit einzuschließen, wird die Einordnung der Ergebnisse in den Kontext bereits publizierter Daten erschwert. Bei der Gegenüberstellung zu Arbeiten mit größeren Patientenkohorten (z.B. Gaidzik *et al.* [62]) stellt die, in der vorliegenden Arbeit durchgeführte, Beschränkung der Analyse auf *DNMT3A*^{R882Hmut} und *DNMT3A*^{R882Cmut} ebenfalls ein Hindernis dar.

Im Vergleich mit bereits publizierten Arbeiten zeigt sich eine Inhomogenität bezüglich des Verfahrens der Probenentnahme. In der vorliegenden Arbeit wurden 96 % der quantitativ untersuchten Proben aus dem Knochenmark der Patienten entnommen, in der Literatur finden sich jedoch unterschiedlich hohe Anteile an peripheren Blutproben [62, 75, 84, 86].

Bezüglich der gewählten Analysemethoden lässt sich festhalten, dass die Sensitivität der q-PCR durch Signale der Wildtypallele herabgesetzt sein kann. Dem wurde durch die Nutzung eines mutationsspezifischen Primers und eines Blockers (vgl. Kapitel 2.2.4) so weit möglich entgegengewirkt. Die Spezifität der Methode wird durch „falsch-positive“ oder „falsch-negative“ Ergebnisse verringert.

Um diese Gefahr zu minimieren, ist in der vorliegenden Arbeit mit Positivkontrolle und Negativkontrollen (Wildtypallele und no-Template-Control) in zweifacher Ausführung gearbeitet worden. Um die Ergebnisse in verschiedenen Laboren gegenüberstellen zu können, müsste eine standardisierte q-PCR etabliert werden um somit die Vergleichbarkeit der Messwerte garantieren zu können.

4.3 Ausblick

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der Vergleich zwischen *DNMT3A*^{R882}-positiven Patienten und der Wildtypkohorte in dieser Arbeit bereits publizierte Ergebnisse bzgl. der untersuchten klinischen Parameter bestätigt. Die Analyse des Gesamtüberlebens der beiden Kohorten bei vorliegenden Ko-Mutationen sowie unterschiedlichen zytogenetischen Risikogruppen deckt sich ebenfalls mit publizierter Literatur [20, 58, 75, 95, 111].

Die Analyse der *DNMT3A*^{R882}-Mutationslast zu verschiedenen klinischen Zeitpunkten erbringt neue Ergebnisse und unterstreicht die Notwendigkeit der alloSCT als therapeutische Möglichkeit der vollständigen Eradikation von *DNMT3A*^{R882mut}. Inwiefern die Bestimmung der *DNMT3A*^{R882}-Mutationslast zum Zeitpunkt der CR_{St} zur Abschätzung des Rezidivrisikos nach alloSCT geeignet ist, lässt sich mit dieser Arbeit nicht endgültig beantworten. In diesem Zusammenhang stellt sich weiterhin die Frage, ob Patienten nach alloSCT routiniert molekulargenetisch untersucht werden sollten, um so etwaige Rezidive anhand von vorliegenden Mutationen frühzeitig erkennen und somit schnellstmöglich behandeln zu können.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen ähnlich gelagerter Studien ist vermutlich das generelle Vorliegen von *DNMT3A*^{R882mut} von größerer Bedeutung als die berechnete *DNMT3A*^{R882}-Mutationslast. Es scheint wahrscheinlich, dass weniger der nachweisbare Anteil der *DNMT3A*^{R882mut} als eher das komplexe Zusammenspiel mit anderen Mutationen eine Rolle im Krankheitsverlauf der Patienten mit AML spielt. Die sich in diesem Zusammenhang eröffnenden Fragestellungen bzgl. der komplexen Interaktion von Mutationen bei AML können eine Grundlage für weitere Untersuchungen bilden und somit attraktive Forschungsschwerpunkte schaffen.

5. Literaturverzeichnis

- 1 Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet* 2013;381:484-495.
- 2 Eriksson A, Lennartsson A, Lehmann S. Epigenetic aberrations in acute myeloid leukemia: Early key events during leukemogenesis. *Exp Hematol* 2015;43:609-624.
- 3 Kompetenznetz Leukämie (Zugriff am 12.03.2018 unter <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/aml/>)
- 4 Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer* 2006;107:2099-2107.
- 5 Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006;368:1894-1907.
- 6 Fried I, Bodner C, Pichler MM, Lind K, Beham-Schmid C, Quehenberger F, Sperr WR, Linkesch W, Sill H, Wölfler A. Frequency, onset and clinical impact of somatic dnmt3a mutations in therapy-related and secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2012;97:246-250.
- 7 Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, Wartman LD, Lamprecht TL, Liu F, Xia J, Kandoth C, Fulton RS, McLellan MD, Dooling DJ, Wallis JW, Chen K, Harris CC, Schmidt HK, Kalicki-Veizer JM, Lu C, Zhang Q, Lin L, O'Laughlin MD, McMichael JF, Delehaunty KD, Fulton LA, Magrini VJ, McGrath SD, Demeter RT, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie TN, Walker JR, Watson MA, Heath SE, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Payton JE, Baty JD, Kulkarni S, Klco JM, Tomasson MH, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Ding L, Mardis ER, Wilson RK. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 2012;150:264-278.
- 8 Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:179-198.
- 9 Knudson AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:820-823.
- 10 Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: Pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 2005;23:6285-6295.
- 11 Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H, Group G-AAMLS. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008;358:1909-1918.

- 12** Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:2548-2553.
- 13** Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, Kennedy JA, Schimmer AD, Schuh AC, Yee KW, McLeod JL, Doedens M, Medeiros JJ, Marke R, Kim HJ, Lee K, McPherson JD, Hudson TJ, Brown AM, Yousif F, Trinh QM, Stein LD, Minden MD, Wang JC, Dick JE, Consortium HP-LGP. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 2014;506:328-333.
- 14** Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer* 2012;12:599-612.
- 15** Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 2014;371:2488-2498.
- 16** Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoun SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M, Purcell SM, Svantesson O, Landén M, Höglund M, Lehmann S, Gabriel SB, Moran JL, Lander ES, Sullivan PF, Sklar P, Grönberg H, Hultman CM, McCarroll SA. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood dna sequence. *N Engl J Med* 2014;371:2477-2487.
- 17** Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol* 2017;35:934-946.
- 18** Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The world health organization (who) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-2302.
- 19** Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD, LeukemiaNet E. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the european leukemianet. *Blood* 2010;115:453-474.

- 20** Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of aml in adults: 2017 eln recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129:424-447.
- 21** Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European group for the immunological characterization of leukemias (egil). *Leukemia* 1995;9:1783-1786.
- 22** Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD, Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). 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* 2002;100:4325-4336.
- 23** Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: Are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007;109:431-448.
- 24** Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelderen-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, Mellink CH, Nieuwint A, Jotterand M, Hagemeyer A, Beverloo HB, Löwenberg B. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: A better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol* 2008;26:4791-4797.
- 25** Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci ND, Heguy A, Cherry A, Vance G, Higgins RR, Ketterling RP, Gallagher RE, Litzow M, van den Brink MR, Lazarus HM, Rowe JM, Luger S, Ferrando A, Paietta E, Tallman MS, Melnick A, Abdel-Wahab O, Levine RL. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012;366:1079-1089.
- 26** Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, Schiffer CA, Bennett JM, Bloomfield CD, Brunning R, Gale RP, Grever MR, Keating MJ. Report of the national cancer institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 1990;8:813-819.

- 27** Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009;131:16-26.
- 28** Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-american-british (fab) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33:451-458.
- 29** Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (aml-mo). *Br J Haematol* 1991;78:325-329.
- 30** Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the world health organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391-2405.
- 31** Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the world health organization (who) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood* 2009;114:937-951.
- 32** Büchner T, Hiddemann W, Berdel WE, Wörmann B, Schoch C, Fonatsch C, Löffler H, Haferlach T, Ludwig WD, Maschmeyer G, Staib P, Aul C, Gruneisen A, Lengfelder E, Frickhofen N, Kern W, Serve HL, Mesters RM, Sauerland MC, Heinecke A, Group GAC. 6-thioguanine, cytarabine, and daunorubicin (tad) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (ham) for induction, tad for consolidation, and either prolonged maintenance by reduced monthly tad or tad-ham-tad and one course of intensive consolidation by sequential ham in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia (aml): A randomized trial of the german aml cooperative group. *J Clin Oncol* 2003;21:4496-4504.
- 33** Yates J, Glidewell O, Wiernik P, Cooper MR, Steinberg D, Dosik H, Levy R, Hoagland C, Henry P, Gottlieb A, Cornell C, Berenberg J, Hutchison JL, Raich P, Nissen N, Ellison RR, Frelick R, James GW, Falkson G, Silver RT, Haurani F, Green M, Henderson E, Leone L, Holland JF. Cytosine arabinoside with daunorubicin or adriamycin for therapy of acute myelocytic leukemia: A calgb study. *Blood* 1982;60:454-462.
- 34** Bao Y, Zhao J, Li ZZ. Comparison of clinical remission and survival between clag and flag induction chemotherapy in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia: A prospective cohort study. *Clin Transl Oncol* 2017

- 35** Delia M, Pastore D, Carluccio P, Pasciolla C, Ricco A, Rossi AR, Casieri P, Mestice A, Albano F, Specchia G. Flag-ida regimen as bridge therapy to allotransplantation in refractory/relapsed acute myeloid leukemia patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2017;17:767-773.
- 36** Sung WJ, Kim DH, Sohn SK, Kim JG, Baek JH, Jeon SB, Moon JH, Ahn BM, Lee KB. Phase ii trial of amsacrine plus intermediate-dose ara-c (idac) with or without etoposide as salvage therapy for refractory or relapsed acute leukemia. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:612-616.
- 37** Passweg JR, Baldomero H, Gratwohl A, Bregni M, Cesaro S, Dreger P, de Witte T, Farge-Bancel D, Gaspar B, Marsh J, Mohty M, Peters C, Tichelli A, Velardi A, de Elvira CR, Falkenburg F, Sureda A, Madrigal A, European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). The ebmt activity survey: 1990-2010. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:906-923.
- 38** Eapen M, O'Donnell P, Brunstein CG, Wu J, Barowski K, Mendizabal A, Fuchs EJ. Mismatched related and unrelated donors for allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:1485-1492.
- 39** Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, Falkenburg JH, Farge-Bancel D, Gennery A, Kröger N, Lanza F, Nagler A, Sureda A, Mohty M, European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Hematopoietic sct in europe 2013: Recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant* 2015;50:476-482.
- 40** Vriesendorp HM. Aims of conditioning. *Exp Hematol* 2003;31:844-854.
- 41** Pingali SR, Champlin RE. Pushing the envelope-nonmyeloablative and reduced intensity preparative regimens for allogeneic hematopoietic transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2015;50:1157-1167.
- 42** Chen YB, Coughlin E, Kennedy KF, Alyea EP, Armand P, Attar EC, Ballen KK, Cutler C, Dey BR, Koreth J, McAfee SL, Spitzer TR, Antin JH, Soiffer RJ, Ho VT. Busulfan dose intensity and outcomes in reduced-intensity allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:981-987.

- 43** Martino R, de Wreede L, Fiocco M, van Biezen A, von dem Borne PA, Hamladji RM, Volin L, Bornhäuser M, Robin M, Rocha V, de Witte T, Kröger N, Mohty M, Acute Leukemia Working Party the subcommittee for Myelodysplastic Syndromes of the Chronic Malignancies Working Party of the European group for Blood Marrow Transplantation Group (EBMT). Comparison of conditioning regimens of various intensities for allogeneic hematopoietic sct using hla-identical sibling donors in aml and mds with <10% bm blasts: A report from ebmt. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:761-770.
- 44** Chen T, Tsujimoto N, Li E. The pwwp domain of dnmt3a and dnmt3b is required for directing dna methylation to the major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Mol Cell Biol* 2004;24:9048-9058.
- 45** Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. Dna methyltransferases dnmt3a and dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-257.
- 46** Sun Y, Shen H, Xu T, Yang Z, Qiu H, Sun A, Chen S, Wu D, Xu Y. Persistent dnmt3a mutation burden in dnmt3a mutated adult cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients in long-term remission. *Leuk Res* 2016;49:102-107.
- 47** Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian dna (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998;19:219-220.
- 48** Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. The human dna methyltransferases (dnmts) 1, 3a and 3b: Coordinate mrna expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 1999;27:2291-2298.
- 49** Chen T, Ueda Y, Xie S, Li E. A novel dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J Biol Chem* 2002;277:38746-38754.
- 50** Hata K, Okano M, Lei H, Li E. Dnmt3l cooperates with the dnmt3 family of de novo dna methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 2002;129:1983-1993.
- 51** Jeltsch A, Jurkowska RZ. Allosteric control of mammalian dna methyltransferases - a new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Res* 2016;44:8556-8575.

- 52** Dhayalan A, Rajavelu A, Rathert P, Tamas R, Jurkowska RZ, Ragozin S, Jeltsch A. The dnmt3a pwwp domain reads histone 3 lysine 36 trimethylation and guides dna methylation. *J Biol Chem* 2010;285:26114-26120.
- 53** Otani J, Nankumo T, Arita K, Inamoto S, Ariyoshi M, Shirakawa M. Structural basis for recognition of h3k4 methylation status by the dna methyltransferase 3a atrx-dnmt3-dnmt3l domain. *EMBO Rep* 2009;10:1235-1241.
- 54** Jurkowska RZ, Anspach N, Urbanke C, Jia D, Reinhardt R, Nellen W, Cheng X, Jeltsch A. Formation of nucleoprotein filaments by mammalian dna methyltransferase dnmt3a in complex with regulator dnmt3l. *Nucleic Acids Res* 2008;36:6656-6663.
- 55** Holz-Schietinger C, Matje DM, Harrison MF, Reich NO. Oligomerization of dnmt3a controls the mechanism of de novo dna methylation. *J Biol Chem* 2011;286:41479-41488.
- 56** Jurkowska RZ, Rajavelu A, Anspach N, Urbanke C, Jankevicius G, Ragozin S, Nellen W, Jeltsch A. Oligomerization and binding of the dnmt3a dna methyltransferase to parallel dna molecules: Heterochromatic localization and role of dnmt3l. *J Biol Chem* 2011;286:24200-24207.
- 57** Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandath C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. Dnmt3a mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;363:2424-2433.
- 58** Ryotokuji T, Yamaguchi H, Ueki T, Usuki K, Kurosawa S, Kobayashi Y, Kawata E, Tajika K, Gomi S, Kanda J, Kobayashi A, Omori I, Marumo A, Fujiwara Y, Yui S, Terada K, Fukunaga K, Hirakawa T, Arai K, Kitano T, Kosaka F, Tamai H, Nakayama K, Wakita S, Fukuda T, Inokuchi K. Clinical characteristics and prognosis of acute myeloid leukemia associated with dna-methylation regulatory gene mutations. *Haematologica* 2016;101:1074-1081.
- 59** Wang B, Liu Y, Hou G, Wang L, Lv N, Xu Y, Wang X, Xuan Z, Jing Y, Li H, Jin X, Deng A, Gao X, Dou L, Liang J, Chen C, Li Y, Yu L. Mutational spectrum and risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia patients based on next-generation sequencing. *Oncotarget* 2016;7:32065-32078.

- 60** Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Görlich D, Schneider S, Konstandin NP, Dufour A, Bräundl K, Ksienzyk B, Zellmeier E, Hartmann L, Greif PA, Fiegl M, Subklewe M, Bohlander SK, Krug U, Faldum A, Berdel WE, Wörmann B, Büchner T, Hiddemann W, Braess J, Spiekermann K, Group AS. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2016;128:686-698.
- 61** Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Miller CA, Fulton R, Meyer MR, Erdmann-Gilmore P, Townsend RR, Wilson RK, Ley TJ. The r882h dnmt3a mutation associated with aml dominantly inhibits wild-type dnmt3a by blocking its ability to form active tetramers. *Cancer Cell* 2014;25:442-454.
- 62** Gaidzik VI, Schlenk RF, Paschka P, Stölzle A, Späth D, Kuendgen A, von Lilienfeld-Toal M, Brügger W, Derigs HG, Kremers S, Greil R, Raghavachar A, Ringhoffer M, Salih HR, Wattad M, Kirchen HG, Runde V, Heil G, Petzer AL, Girschikofsky M, Heuser M, Kayser S, Goehring G, Teleanu MV, Schlegelberger B, Ganser A, Krauter J, Bullinger L, Döhner H, Döhner K. Clinical impact of dnmt3a mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: Results of the aml study group (amlsg). *Blood* 2013;121:4769-4777.
- 63** Ribeiro AF, Pratcorona M, Erpelinck-Verschueren C, Rockova V, Sanders M, Abbas S, Figueroa ME, Zeilemaker A, Melnick A, Löwenberg B, Valk PJ, Delwel R. Mutant dnmt3a: A marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012;119:5824-5831.
- 64** Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, Shi JY, Zhu YM, Tang L, Zhang XW, Liang WX, Mi JQ, Song HD, Li KQ, Chen Z, Chen SJ. Exome sequencing identifies somatic mutations of dna methyltransferase gene dnmt3a in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 2011;43:309-315.
- 65** Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, Becker H, Maharry K, Mrózek K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Nicolet D, Whitman SP, Wu YZ, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Moore JO, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. Age-related prognostic impact of different types of dnmt3a mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012;30:742-750.

- 66** Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, Fulton R, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, Kandoth C, Baty J, Westervelt P, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK, Ley TJ, Graubert TA. Recurrent dnmt3a mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2011;25:1153-1158.
- 67** Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF, Paschka P, Griesshammer M, Blersch C, Kuhn S, Schauer S, Döhner H, Döhner K. Dnmt3a mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011;25:1217-1219.
- 68** Holz-Schietinger C, Matje DM, Reich NO. Mutations in dna methyltransferase (dnmt3a) observed in acute myeloid leukemia patients disrupt processive methylation. *J Biol Chem* 2012;287:30941-30951.
- 69** Network CGAR. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368:2059-2074.
- 70** Spencer DH, Russler-Germain DA, Ketkar S, Helton NM, Lamprecht TL, Fulton RS, Fronick CC, O'Laughlin M, Heath SE, Shinawi M, Westervelt P, Payton JE, Wartman LD, Welch JS, Wilson RK, Walter MJ, Link DC, DiPersio JF, Ley TJ. CpG island hypermethylation mediated by dnmt3a is a consequence of aml progression. *Cell* 2017;168:801-816.e813.
- 71** Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, DiPersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med* 2014;20:1472-1478.
- 72** Celik H, Mallaney C, Kothari A, Ostrander EL, Eultgen E, Martens A, Miller CA, Hundal J, Klco JM, Challen GA. Enforced differentiation of dnmt3a-null bone marrow leads to failure with c-kit mutations driving leukemic transformation. *Blood* 2015;125:619-628.
- 73** Mayle A, Yang L, Rodriguez B, Zhou T, Chang E, Curry CV, Challen GA, Li W, Wheeler D, Rebel VI, Goodell MA. Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation. *Blood* 2015;125:629-638.
- 74** Ibrahim L, Mahfouz R, Elhelw L, Abdsalam EM, Soliman R. Prognostic significance of dnmt3a mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2015;54:84-89.

- 75** Ahn JS, Kim HJ, Kim YK, Lee SS, Jung SH, Yang DH, Lee JJ, Kim NY, Choi SH, Jung CW, Jang JH, Moon JH, Sohn SK, Won JH, Kim SH, Kim DD. Dnmt3a r882 mutation with flt3-itd positivity is an extremely poor prognostic factor in patients with normal-karyotype acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22:61-70.
- 76** Marková J, Michková P, Burčková K, Březinová J, Michalová K, Dohnalová A, Maaloufova JS, Soukup P, Vítek A, Cetkovský P, Schwarz J. Prognostic impact of dnmt3a mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2012;88:128-135.
- 77** Hou HA, Kuo YY, Liu CY, Chou WC, Lee MC, Chen CY, Lin LI, Tseng MH, Huang CF, Chiang YC, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tang JL, Yao M, Huang SY, Ko BS, Hsu SC, Wu SJ, Tsay W, Chen YC, Tien HF. Dnmt3a mutations in acute myeloid leukemia: Stability during disease evolution and clinical implications. *Blood* 2012;119:559-568.
- 78** Thol F, Damm F, Lüdeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, Yun H, Göhring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, Lübbert M, Kanz L, Fiedler W, Kirchner H, Heil G, Krauter J, Ganser A, Heuser M. Incidence and prognostic influence of dnmt3a mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29:2889-2896.
- 79** Park SH, Choi JC, Kim SY, Yi J, Oh SH, Kim IS, Kim HH, Chang CL, Lee EY, Song MK, Shin HJ, Chung JS. Incidence and prognostic impact of dnmt3a mutations in korean normal karyotype acute myeloid leukemia patients. *Biomed Res Int* 2015;2015:723682.
- 80** Loghavi S, Zuo Z, Ravandi F, Kantarjian HM, Bueso-Ramos C, Zhang L, Singh RR, Patel KP, Medeiros LJ, Stingo F, Routbort M, Cortes J, Luthra R, Khoury JD. Clinical features of de novo acute myeloid leukemia with concurrent dnmt3a, flt3 and npm1 mutations. *J Hematol Oncol* 2014;7:74.
- 81** Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, Van Loo P, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O'Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF, Ganser A, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, Campbell PJ. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2016;374:2209-2221.
- 82** Yuan XQ, Peng L, Zeng WJ, Jiang BY, Li GC, Chen XP. Dnmt3a r882 mutations predict a poor prognosis in aml: A meta-analysis from 4474 patients. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e3519.

- 83** Bhatnagar B, Eisfeld AK, Nicolet D, Mrózek K, Blachly JS, Orwick S, Lucas DM, Kohlschmidt J, Blum W, Kolitz JE, Stone RM, Bloomfield CD, Byrd JC. Persistence of dnmt3a r882 mutations during remission does not adversely affect outcomes of patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2016;175:226-236.
- 84** Pløen GG, Nederby L, Guldborg P, Hansen M, Ebbesen LH, Jensen UB, Hokland P, Aggerholm A. Persistence of dnmt3a mutations at long-term remission in adult patients with aml. *Br J Haematol* 2014;167:478-486.
- 85** Berenstein R, Blau IW, Suckert N, Baldus C, Pezzutto A, Dörken B, Blau O. Quantitative detection of dnmt3a r882h mutation in acute myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res* 2015;34:55.
- 86** Debarri H, Lebon D, Roumier C, Cheok M, Marceau-Renaut A, Nibourel O, Geffroy S, Helevaut N, Rousselot P, Gruson B, Gardin C, Chretien ML, Sebda S, Figeac M, Berthon C, Quesnel B, Boissel N, Castaigne S, Dombret H, Renneville A, Preudhomme C. Idh1/2 but not dnmt3a mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: A study by the acute leukemia french association. *Oncotarget* 2015;6:42345-42353.
- 87** Xu Y, Sun Y, Shen H, Ding L, Yang Z, Qiu H, Sun A, Chen S, Wu D. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation could improve survival of cytogenetically normal adult acute myeloid leukemia patients with dnmt3a mutations. *Am J Hematol* 2015;90:992-997.
- 88** Commoner B. On the interpretation of the absorption of ultraviolet light by cellular nucleic acids. *Science* 1949;110:31-40.
- 89** Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of dna in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
- 90** Schild DTA: "7700 sds workshop" - Einführung in die real-time taqman™ pcr-technologie. pp 188. (Zugriff am 12.03.2018 unter <https://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman>)
- 91** Morlan J, Baker J, Sinicropi D. Mutation detection by real-time pcr: A simple, robust and highly selective method. *PLoS One* 2009;4:e4584.
- 92** Weisser M, Haferlach T, Schoch C, Hiddemann W, Schnittger S. The use of housekeeping genes for real-time pcr-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004;18:1551-1553.

- 93** Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis (Zugriff am 12.03.2018 unter https://www.charite.de/fileadmin/user_upload/portal/charite/presse/publikationen/amtl-mitteilungsblatt/2014/AMB140610-130_.pdf)
- 94** Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 1958, 53, pp 457-481.
- 95** Tan M, Ng IKS, Chen Z, Ban K, Ng C, Chiu L, Seah E, Lin M, Tai BC, Yan B, Ng CH, Chng WJ. Clinical implications of dnmt3a mutations in a southeast asian cohort of acute myeloid leukaemia patients. *J Clin Pathol* 2017;70:669-676.
- 96** Thol F, Klesse S, Köhler L, Gabdoulline R, Kloos A, Liebich A, Wichmann M, Chaturvedi A, Fabisch J, Gaidzik VI, Paschka P, Bullinger L, Bug G, Serve H, Göhring G, Schlegelberger B, Lübbert M, Kirchner H, Wattad M, Kraemer D, Hertenstein B, Heil G, Fiedler W, Krauter J, Schlenk RF, Döhner K, Döhner H, Ganser A, Heuser M. Acute myeloid leukemia derived from lympho-myeloid clonal hematopoiesis. *Leukemia* 2017
- 97** Klco JM, Miller CA, Griffith M, Petti A, Spencer DH, Ketkar-Kulkarni S, Wartman LD, Christopher M, Lamprecht TL, Helton NM, Duncavage EJ, Payton JE, Baty J, Heath SE, Griffith OL, Shen D, Hundal J, Chang GS, Fulton R, O'Laughlin M, Fronick C, Magrini V, Demeter RT, Larson DE, Kulkarni S, Ozenberger BA, Welch JS, Walter MJ, Graubert TA, Westervelt P, Radich JP, Link DC, Mardis ER, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ. Association between mutation clearance after induction therapy and outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA* 2015;314:811-822.
- 98** Yang L, Rau R, Goodell MA. Dnmt3a in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer* 2015;15:152-165.
- 99** Tie R, Zhang T, Fu H, Wang L, Wang Y, He Y, Wang B, Zhu N, Fu S, Lai X, Shi J, Huang H. Association between dnmt3a mutations and prognosis of adults with de novo acute myeloid leukemia: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9:e93353.
- 100** Ostronoff F, Othus M, Ho PA, Kutny M, Geraghty DE, Petersdorf SH, Godwin JE, Willman CL, Radich JP, Appelbaum FR, Stirewalt DL, Meshinchi S. Mutations in the dnmt3a exon 23 independently predict poor outcome in older patients with acute myeloid leukemia: A swog report. *Leukemia* 2013;27:238-241.

- 101** Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K, Chen F, Asou N, Ohtake S, Miyawaki S, Miyazaki Y, Sakura T, Ozawa Y, Usui N, Kanamori H, Kiguchi T, Imai K, Uike N, Kimura F, Kitamura K, Nakaseko C, Onizuka M, Takeshita A, Ishida F, Suzushima H, Kato Y, Miwa H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Naoe T. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2014;28:1586-1595.
- 102** Döhner H, Gaidzik VI. Impact of genetic features on treatment decisions in aml. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:36-42.
- 103** Kuchenbauer F, Kern W, Schoch C, Kohlmann A, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. Detailed analysis of flt3 expression levels in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2005;90:1617-1625.
- 104** Shivarov V, Gueorguieva R, Stoimenov A, Tiu R. Dnmt3a mutation is a poor prognosis biomarker in aml: Results of a meta-analysis of 4500 aml patients. *Leuk Res* 2013;37:1445-1450.
- 105** Hirsch P, Zhang Y, Tang R, Joulin V, Boutroux H, Pronier E, Moatti H, Flandrin P, Marzac C, Bories D, Fava F, Mokrani H, Betems A, Lorre F, Favier R, Féger F, Mohty M, Douay L, Legrand O, Bilhou-Nabera C, Louache F, Delhommeau F. Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nat Commun* 2016;7:12475.
- 106** Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, Smith BD, Tefferi A, Johnson DE, Boyiadzis M. Dnmt3a and idh mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: Associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia* 2014;28:1774-1783.
- 107** Huang X, Ma D, Dong W, Li P, Lu T, He N, Tian T, Liu N, DU Y, Ji C. Gene expression profiling of the dnmt3a r882 mutation in acute leukemia. *Oncol Lett* 2013;6:268-274.
- 108** Shin SY, Lee ST, Kim HJ, Cho EH, Kim JW, Park S, Jung CW, Kim SH. Mutation profiling of 19 candidate genes in acute myeloid leukemia suggests significance of dnmt3a mutations. *Oncotarget* 2016 Aug 23;7(34):54825-54837.
- 109** Jung SH, Kim YJ, Yim SH, Kim HJ, Kwon YR, Hur EH, Goo BK, Choi YS, Lee SH, Chung YJ, Lee JH. Somatic mutations predict outcomes of hypomethylating therapy in patients with myelodysplastic syndrome. *Oncotarget* 2016 Aug 23;7(34):55264-55275.

- 110** Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, Testoni N, Rege-Cambrin G, Santucci A, Vignetti M, Fazi P, Martelli MP, Haferlach T, Falini B. Aml with mutated nrm1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood* 2009;114:3024-3032.
- 111** Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, Metzeler KH, Schwind S, Wu YZ, Kohlschmidt J, Pettenati MJ, Heerema NA, Block AW, Patil SR, Baer MR, Kollitz JE, Moore JO, Carroll AJ, Stone RM, Larson RA, Bloomfield CD. Prognostic significance of the european leukemianet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012;30:4515-4523.
- 112** Hahn CN, Ross DM, Feng J, Beligaswatte A, Hiwase DK, Parker WT, Ho M, Zawitkowski M, Ambler KL, Cheetham GD, Lee YK, Babic M, Butcher CM, Engler GA, Brown AL, D'Andrea RJ, Lewis ID, Schreiber AW, To LB, Scott HS. A tale of two siblings: Two cases of aml arising from a single pre-leukemic dnmt3a mutant clone. *Leukemia* 2015;29:2101-2104.

6. Erklärung an Eides Statt

„Ich, Franziska Behrenbeck, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung der *DNMT3A* Mutationen bei AML Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und im Verlauf in Abhängigkeit von der Therapie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (Uniform Requirements for Manuscripts des ICMJE) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Franziska Behrenbeck

7. Ausführliche Anteilserklärung

- Blau O, **Behrenbeck F**, Suckert N, Fransecky LR, Baldus CD, Arnold R, Pezzutto A, Dörken B, Blau IW. DNMT3A mutations in AML patients: Prognostic impact and comparative analysis of mutations burden in diagnostic samples, after standard therapy, and after allogeneic stem cell transplantation. Blood 2016;128:2891.

Beitrag im Einzelnen: Mutationsanalyse von Patientenproben, Beteiligung an Sammlung klinischer Daten für statistische Analyse

- **Behrenbeck F**, Blau IW, Berenstein R, Fransecky L, Baldus C, Arnold R, Pezzutto A, Dörken B, Blau O. Der Nachweis der DNMT3A Mutation bei AML Patienten nach allogener Stammzelltransplantation/ DNMT3A mutation in AML patients after allogeneic stem cell transplantation (Abstract DGHO 2016).

Beitrag im Einzelnen: Mutationsanalyse von Patientenproben, Beteiligung an Sammlung klinischer Daten, statistische Analyse

- Blau O, Kühnel A, **Behrenbeck F**, Suckert N, Blau IW. DNMT3A mutation is a distinct aberration in acute myeloid leukemia. Internal Medicine Review. 2016; Volume 2, Issue 9.

Beitrag im Einzelnen: Mitwirken an Erstellung der Rezension, Hilfe bei Literaturrevision

- Blau O, Martynkevich I, **Behrenbeck F**, Baldus CD, Motiko E, Voloshin S, Pezzutto A, Dörken B, Blau IW. Prognostic impact of distinct combinations of molecular mutations in aml patients. Results of two-center international cooperation study. Blood 2017;130:5111.

Beitrag im Einzelnen: Mutationsanalyse von Patientenproben, Beteiligung an Sammlung klinischer Daten in Kooperation mit russischen Kollegen (St. Petersburg)

Franziska Behrenbeck

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. Publikationsliste

- Blau O, Martynkevich I, **Behrenbeck F**, Baldus CD, Motiko E, Voloshin S, Pezzutto A, Dörken B, Blau IW. Prognostic impact of distinct combinations of molecular mutations in aml patients. Results of two-center international cooperation study. *Blood* 2017;130:5111.
- Berliner Aufruf für interprofessionelle Ausbildung und Kooperation in den Gesundheitsberufen. (Juni 2017)
https://www.ash-berlin.eu/fileadmin/Daten/News/2017/Berliner_Aufruf_-_interprofessionelle_Ausbildung_und_Kooperation.pdf (Zugriff am 17.04.2018)
- Blau O, **Behrenbeck F**, Suckert N, Fransecky LR, Baldus CD, Arnold R, Pezzutto A, Dörken B, Blau IW. Dnmt3a mutations in aml patients: Prognostic impact and comparative analysis of mutations burden in diagnostic samples, after standard therapy, and after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2016;128:2891.
- **Behrenbeck F**, Blau IW, Berenstein R, Fransecky L, Baldus C, Arnold R, Pezzutto A, Dörken B, Blau O. Der Nachweis der *DNMT3A* Mutation bei AML Patienten nach allogener Stammzelltransplantation/ *DNMT3A* mutation in AML patients after allogeneic stem cell transplantation. (Abstract und Vortrag DGHO 2016)
- Olga Blau, Aline Kühnel, **Franziska Behrenbeck**. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. DOI: 10.18103/imr.v2i9.172.
https://www.researchgate.net/publication/309380779_DNMT3A_mutations_in_a_cute_myeloid_leukemia (Zugriff am 17.04.2018)
- **Behrenbeck F**, Behrend R, Czakert J et al. INTER-M-E-P-P: Bericht aus studentischer Perspektive - Studierende partizipieren an interprofessionellem Projekt. *Heilberufe* (2016) 68:70.
- **Behrenbeck F**, Behrend R. Gemeinsam im Team für das Wohl der Patient_innen- Interprofessionalität im Studium der Gesundheitsberufe. *EHB Jahresbericht 2015*, Seite 46.
<http://www.eh-berlin.de/hochschule/hochschulleitung/bericht-des-rektorats.html> (Zugriff am 17.04.2018)

Franziska Behrenbeck

10. Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas, die Hilfestellung während der Bearbeitung im Labor und die stete Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation möchte ich meinen Doktoreltern Herrn Prof. Dr. med. Igor-Wolfgang Blau und Frau Dr. med. Olga Blau danken.

Des Weiteren möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Blau für das gute Arbeitsumfeld, die nette Atmosphäre sowie die allseitige Hilfsbereitschaft danken.

Hervorzuheben sind dabei Dipl.-Biol. Marlies Wächter und Aline Kühnel, auf deren Unterstützung ich im Labor immer zählen konnte.

Großer Dank gilt meinen Eltern und meinen Brüdern, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit immer bedingungslos unterstützt haben. Ferner danke ich allen meinen Freunden, die mir verständnisvoll und geduldig zur Seite standen.