

**Diplomarbeit**

**Akute myeloische Leukämie - eine Real-World  
Beobachtung nach Einführung von Next-  
Generation Sequencing in die diagnostische  
Routine an der Klinischen Abteilung für  
Hämatologie des LKH Universitätsklinikums  
Graz**

eingereicht von

**Michael Waltersdorfer**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Innere Medizin LKH Graz**

**Klinische Abteilung für Hämatologie**

unter der Betreuung von

**Assoz.-Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Armin Zebisch**

und der Co-Betreuung von

**Dr.<sup>in</sup> Sayantane Dutta**

Graz, 19.01.2022

### *Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 19.01.2022*

*Michael Waltersdorfer eh*

## Danksagungen

Ich möchte mich bei meinem Betreuer Herrn Assoz.-Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Armin Zebisch für die Idee zur Arbeit, den eingesetzten Zeitaufwand und die Geduld bei aufgetretenen Fragen bedanken.

Mein Dank gilt Frau Univ.-Prof.<sup>in</sup> Dipl.-Ing.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> techn. Andrea Berghold, Frau Ass.-Prof.<sup>in</sup> Priv.-Doz.<sup>in</sup> MSc PhD. Sereina Herzog und Herrn Mag. Dr.rer.nat. Gerhard Bachmaier vom Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation der Medizinischen Universität Graz. Im Besonderen danke ich Herrn Mag. Dr.rer.nat. Gerhard Bachmaier für die technische Erstellung der RDA.

Weiters möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagungen .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	IV
Glossar und Abkürzungen .....	VI
Abbildungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	IX
Zusammenfassung .....	X
Abstract .....	XII
1. Einleitung – Akute myeloische Leukämie im Erwachsenenalter .....	1
1.1. Definition.....	1
1.2. Epidemiologie .....	1
1.3. Klinische Präsentation .....	1
1.4. Diagnostik der AML.....	3
1.5. WHO-Klassifikation der AML .....	5
1.6. Risikostratifizierung der AML.....	7
1.7. wichtige Differentialdiagnosen zur AML.....	9
1.8. Therapie der AML .....	10
1.9. Response Beurteilung der AML .....	13
1.10. Ätiologie und Pathogenese der AML .....	15
1.11. Molekulargenetische Untersuchungsmethoden .....	17
1.12. Genmutationen mit Bedeutung für die AML .....	19
2. Ziele der Arbeit .....	23
3. Material und Methoden .....	24
3.1. Ein- und Ausschlusskriterien .....	24
3.2. Datenerhebung.....	25
3.3. Datenschutz.....	26
3.4. Ethik .....	26
3.5. Zielgrößen .....	27
3.6. Statistische Auswertung .....	32
4. Ergebnisse.....	33
4.1. Patientencharakteristika .....	33
4.2. CR-Raten intensiver und nicht-intensiver Therapie .....	35

4.3.	Überlebenskurven .....	36
4.4.	Next-Generation Sequencing .....	47
5.	Diskussion .....	61
6.	Konklusion .....	68

# Glossar und Abkürzungen

AML	Akute myeloische Leukämie
AML-MRC	Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes
ANC	Absolute neutrophil count
BSC	Best supportive care
CBF-AML	Core-Binding-Factor-AML
CRi	Complete remission with incomplete hematologic recovery
e.g.	exempli gratia
FC/FACS	Flow Zytometrie/Fluorescence-activated Cell Sorting
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
GCSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IMI	Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation
ITD	Internal tandem duplication
KAGes	Steiermärkische Krankenanstaltengesellschaft m. b. H.
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEDOCS©	Medical Documentation and Communication System
MLFS	Morphologic leukemia-free
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
MRD	Minimal/Measurable residual disease
NGS	Next Generation Sequencing
PB	peripheres Blut
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Progressive disease
PR	Partial remission
RDA	Research, Documentation and Analysis
t-AML	Therapy-related acute myeloid leukemia
VAF	Variant allele frequency
WBC	White blood cell count

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CR-Raten intensiv vs nicht-intensiv .....	35
Abbildung 2: Überlebenskurve, OS der gesamten Kohorte .....	36
Abbildung 3: Überlebenskurven, OS therapiertes Patient*innen .....	38
Abbildung 4: Überlebenskurve, RFS intensiv therapiertes Patient*innen .....	39
Abbildung 5: Überlebenskurve, EFS intensiv therapiertes Patient*innen .....	40
Abbildung 6: Überlebenskurven, OS ≤65-Jähriger und >65-Jähriger intensiv therapiertes Patient*innen.....	41
Abbildung 7: Überlebenskurven, OS weiblicher und männlicher intensiv therapiertes Patient*innen .....	42
Abbildung 8: Überlebenskurven, OS de-novo und sekundär diagnostizierter intensiv therapiertes Patient*innen.....	44
Abbildung 9: Überlebenskurven, OS therapieassoziiertes und nicht- therapieassoziiertes intensiv therapiertes Patient*innen .....	45
Abbildung 10: Überlebenskurven, OS von intensiv therapierten und nach ELN 2017 risikostratifizierten Patient*innen .....	47
Abbildung 11: Diagramm 1, Häufigkeitsverteilung der Mutationen .....	48
Abbildung 12: Diagramm 2, Häufigkeitsverteilung Mutationen .....	49
Abbildung 13: Überlebenskurven, OS intensiv therapiertes Patient*innen mit und ohne TP53 Mutation .....	50
Abbildung 14: Überlebenskurven, OS intensiv therapiertes Patient*innen mit und ohne NPM1 Mutation .....	51
Abbildung 15: OS intensiv therapiertes Patient*innen mit NPM1 Mutation und günstiger Risikostratifizierung nach ELN 2017 vs NPM1 Wildtyp und NPM1 Mutation und intermediärer/ungünstiger Risikostratifizierung.....	53
Abbildung 16: Überlebenskurven, OS intensiv therapiertes Patient*innen mit und ohne biallelic CEBPA Mutation .....	54
Abbildung 17: Überlebenskurven, OS FLT3-ITD mit high allelic ratio ≥0,5 intensiv vs FLT3 Wildtyp/FLT3 Mutation ohne ITD/low allelic ratio <0,5 .....	55
Abbildung 18: Überlebenskurven, OS intensiv therapiertes Patient*innen mit und ohne ASXL1 Mutation.....	57

Abbildung 19: OS intensiv therapierter Patient*innen mit ASXL1 Mutation und ungünstiger Risikostratifizierung nach ELN 2017 vs ASXL1 Wildtyp und ASXL1 Mutation und günstiger/intermediärer Risikostratifizierung .....	58
Abbildung 20: Überlebenskurven, OS intensiv therapierter Patient*innen mit und ohne RUNX1 Mutation.....	59
Abbildung 21: OS intensiv therapierter Patient*innen mit RUNX1 Mutation und ungünstiger Stratifizierung nach ELN 2017 vs RUNX1 Wildtyp und RUNX1 Mutation und günstiger/intermediärer Stratifizierung .....	61

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: vollständige Auflistung der AML Subtypen der WHO-Klassifikation 2016 adaptiert nach (14).....	6
Tabelle 2: Auflistung der genetischen Risikoparameter adaptiert nach (18).....	8
Tabelle 3: Response Kriterien adaptiert nach (18) .....	13
Tabelle 4: Therapie der gesamten Kohorte .....	33
Tabelle 5: Charakteristika AML diagnostizierter Patient*innen, an welchen ein NGS durchgeführt wurde und welche mit intensiver Chemotherapie behandelt wurden	33

# Zusammenfassung

**Einleitung:** Die akute myeloische Leukämie ist eine aggressive maligne sich mit der Zeit genetisch evolutionär anpassende Neoplasie, welche durch die klonale Expansion fehlerhaft veränderter hämatopoetischer Stammzellen der myeloischen Abstammungsreihe entsteht. Obwohl die meisten AML-Patient\*innen nach intensiver Standardchemotherapie eine CR erreichen, zeichnen die darauffolgenden Rezidiv- und Survivaldaten ein ungünstigeres Bild der Erkrankung. Durch die 2017 veröffentlichte Risikostratifizierung des European Leukemia Net, können die neu gewonnen Erkenntnisse des seit einigen Jahren routinemäßig durchgeführten Next-Generation-Sequencing, in die klinische Praxis einfließen, indem jeder/jede Patient\*in entsprechend seinem/ihrem individuellen genetischen Profil in molekulare Subgruppen eingeteilt wird, welche, trotz starker genetischer Heterogenität innerhalb derselben, eine genauere Risiko-Prognose des Krankheitsverlaufs als vor der NGS-Ära, erlauben.

**Ziele:** Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine Qualitätssicherung anhand von, an der Abteilung für Hämatologie im Universitätsklinikum Graz erhobenen Daten zum Gesamtüberleben und zu Remissionsraten von ebendort behandelten Patient\*innen, durchzuführen und mit einer lokalen Vorstudie und internationalen Kohorten zu vergleichen.

**Material und Methoden:** Insgesamt wurden die Daten von 236 AML Patient\*innen der Klinischen Abteilung für Hämatologie am Universitätsklinikum Graz, bei welchen im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde, via eines computergestützten Patientendatenarchivs erhoben und retrospektiv statistisch analysiert. Im Besonderen wurde auf 138 Patient\*innen, die mit einer hochdosierten Polychemotherapie mit oder ohne darauffolgende Stammzelltransplantation behandelt wurden, genauer eingegangen.

**Ergebnisse:** Die untersuchten Daten ergaben, dass im Gegensatz zu 79% der intensiv therapierten Patient\*innen, nur 10% dieser Patient\*innen eine CR/CRi erreichten. Die 2-Jahresüberlebensdaten der gesamten Kohorte der 236 Patient\*innen betrug 32%, der intensiv therapierten Patient\*innen 48% und der

nicht-intensiv therapierten Patient\*innen 11%. Im Vergleich des 2 Jahresüberlebens der de-novo und der sekundär diagnostizierten Patient\*innen, ergibt sich mit 54% für de-novo und 25% für sekundär ein deutlicher Unterschied. Einem 2-Jahresüberleben von 68% der in der ELN 2017 als günstig stratifizierten Patient\*innen, stehen mit 49% der intermediär stratifizierten Patient\*innen und mit 38% der ungünstig stratifizierten Patient\*innen, klar schlechtere Werte gegenüber.

**Konklusion:** Im Vergleich zur Vorstudie aus dem Jahr 2008 ließ sich eine deutliche Verbesserung der Outcome Daten anhand unserer Kohorte feststellen. Trotz der Limitation durch die teilweise geringe Fallzahl konnte eine weitgehende Bestätigung internationaler Trends und der ELN-2017 im Sinne der Qualitätssicherung erzielt werden.

# Abstract

**Introduction:** Acute myeloid leukemia is an aggressive malignant and over time genetically evolutionarily adapting neoplasia that develops through clonal expansion of mutated hematopoietic stem cells of the myeloid lineage. Although most patients with AML reach CR after intense standard chemotherapy, the subsequent relapse- and survival data paints a more adverse picture of the disease. Through the publication of the risk-stratification by the European Leukemia Net in 2017, the findings gained by implementing Next-Generation-Sequencing in clinical practice, can be used appropriately.

**Aims:** The main target of this study was to conduct quality management with patient data about overall survival and remission rates, gathered at the Division of Hematology, Medical University of Graz and to compare this very data with a local pre-study and international cohorts. Furthermore, the influence of different parameters on the outcome was evaluated.

**Material and Methods:** Altogether the data of 236 AML patients of the Division of Hematology at the Medical University of Graz, on whom a NGS was performed as part of the diagnostic routine, was gathered, and statistically analyzed. The 138 patients that were treated with a high dose polychemotherapy with or without subsequent stem cell transplantation were particularly closely investigated.

**Results:** The evaluated data implied that on the contrary to 79% of the intensively treated patients, only 10% of these patients reached CR/CRi. The 2-year-survival of the entire cohort of 236 patients was 32%, of the intensively treated patients 48% and of the non-intensively treated patients 11%. In comparison of the 2-year-survival of de-novo diagnosed patients with 54% and secondary diagnosed patients with 25% a clear difference was seen. The 2-year-survival of 68% of the patients stratified as favourable according to ELN 2017 was much better than 49% of the patients stratified as intermediate and 38% of the patients stratified as adverse.

**Conclusion:** Compared to the pre-study from the year 2008 a distinct improvement of the outcome data by reference to our cohort could be determined. Despite the

limitation through a partly low sample size an extensive confirmation of the international trends and the ELN2017 in the sense of quality management could be achieved.

# **1. Einleitung – Akute myeloische Leukämie im Erwachsenenalter**

## **1.1. Definition**

Bei der akuten myeloischen Leukämie handelt es sich um eine aggressive maligne Neoplasie der hämatopoetischen Stammzellen der myeloischen Abstammungsreihe, welche einen charakteristischen Entstehungsmechanismus besitzt. Er beginnt mit der klonale Expansion einer einzelnen, fehlerhaft veränderten hämatopoetischen Stammzelle. Durch abnorme Differenzierung dieser Stammzellen entstehen unreife Vorläuferzellen, sogenannte Blasten, welche proliferieren und anschließend das Knochenmark, das Blut und andere Gewebe infiltrieren und sich ebendort ansammeln. Schlussendlich wird durch die Masse dieser funktionslosen Zellen die normale Hämatopoese verdrängt, wodurch es zur klinischen Präsentation der akuten Leukämie mit schweren Infektionen, Anämie und Blutungen kommt. (1, 2)

## **1.2. Epidemiologie**

Die AML ist die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter. In den USA beträgt, basierend auf Daten der Jahre 2014-2018, die altersangepasste Inzidenz 4,3/100000/Jahr und die Sterberate 2,8/100000/Jahr. Die Erkrankung kann alle Altersgruppen treffen, jedoch befindet sich die Mehrheit der Erkrankten im höheren Lebensalter. Das mittlere Erkrankungsalter bei Diagnosestellung beträgt 68 Lebensjahre. (1, 3)

## **1.3. Klinische Präsentation**

Patient\*innen, welche an einer AML erkranken, äußern unter verstärkter Müdigkeit zu leiden, welche die Alltagsfunktionalität beeinträchtigt. Zusätzlich können kognitive Beeinträchtigung, wie Schwierigkeit beim Erlernen neuer Informationen und Probleme mit der Koordination der Feinmotorik auftreten. Diese kognitiven Defizite entstehen durch die Leukämie selbst und nicht durch die Müdigkeit oder die Anämie. (4) Die Anämie ist verantwortlich für Symptome wie körperliche Schwäche und Blässe.

Aufgrund der Thrombozytopenie oder aufgrund von disseminierter intravaskulärer Koagulation kommt es zu Blutungen, welche sich in Form von Menorrhagie, gingivalen Blutungen, Epistaxis, Petechien oder Hämatomen zeigen können. (5)

Ein häufiger Grund für das initiale Aufsuchen eines Arztes im Vorfeld der Leukämie Diagnose sind auffallend häufige rezidivierende Infekte und verstärkte Infektanfälligkeit des/der Patienten\*in. Bei akuten Leukämien entsteht durch die starke Knochenmarksuppression ein hohes Risiko für begleitende Infektionen. Oft gehen diese mit erhöhter Temperatur einher. Fieber stellt daher auch nach der Diagnose einen Notfall dar, welcher, vor allem bei Neutropenie, umgehend und aggressiv mit Breitband-Antibiotika behandelt werden muss. Die Interpretation von Fieber bei akuten Leukämien wird dadurch kompliziert, dass erhöhte Temperatur bei einer Minderheit von Patient\*innen ohne nachweisbare Infektion vorkommen kann. Diese Fieberperioden klingen auch durch die Chemotherapie wieder ab. (6)

Die Leukaemia cutis, eine dermatologische Manifestation der AML, entsteht durch Infiltration von malignen leukämischen Zellen in alle Hautschichten und tritt vor allem bei rasch progredienter Leukämie auf. (7)

Scharfe oder dumpfe Knochenschmerzen treten bei Erwachsenen mit AML selten, bei Kindern häufiger auf und entstehen dadurch, dass das Knochenmark durch die extreme Ansammlung von abnormen Leukozyten expandiert. Meist sind die langen Knochen der Beine und Arme betroffen. (8)

Klinisch signifikante Lymphkotschwellungen treten nur in bis zu 30% der Patient\*innen auf. Eine Spleno- oder Hepatomegalie ist bei Erwachsenen noch seltener. (9)

Diagnostisch ergibt sich aus der klinischen Präsentation der AML das Problem, dass eine individuell unterschiedliche Schwelle entsteht, ab wann die Entscheidung getroffen wird einen Arzt aufzusuchen. Dies kann zu einer verzögerten Diagnosestellung und damit auch zu einem verzögertem Therapiebeginn führen. Auch wird dadurch die Unterscheidung zwischen einer de-novo AML und einer AML, welche mit einer vorangehenden hämatologischen Erkrankung wie MDS assoziiert wird, oft schwierig, wenn das MDS davor monate- oder jahrelang unentdeckt blieb.

## 1.4. Diagnostik der AML

Die Laboruntersuchungen des peripheren Blutes mit großem Blutbild, Differentialblutbild und Serum LDH stellen sowohl in der Erstdiagnostik als auch im kompletten weiteren Krankheitsverlauf einen essenziellen Wert zur Einschätzung des Gesundheitszustandes des/der Patienten/in dar.

Diagnosekriterien der AML:

Um eine AML diagnostizieren zu können muss der Anteil der myeloiden Blasten im KM oder im PB  $\geq 20\%$  betragen oder es muss eine spezifische abnorme Zytogenetik vorliegen. (10)

Um ersteres festzustellen werden folgende Untersuchungsmethoden angewandt:

- Morphologie bzw. Differenzierung der Blasten: In diesem Untersuchungsschritt geht es darum myeloische Blasten im untersuchten Material zu identifizieren. Trotz dessen, dass die AML als eine Neoplasie der myeloischen Blasten definiert ist, gibt es Subtypen der AML, welche Blasten aus Vorläuferzellen der anderen Zellreihen der myeloischen Reihe wie Monoblasten, Proerythroblasten, Megakaryoblasten aufweisen. (10)
- Zählen der Blasten: Um die Anzahl der zuvor identifizierten myeloischen Blasten festzustellen weisen die Methoden der Immunphänotypisierung (FACS und Immunhistochemie) die höchste Verlässlichkeit auf. Das manuelle Auszählen der Blasten spielt dabei eine untergeordnete Rolle. Aus dem Gesamtbild all dieser Untersuchungen ergibt sich schlussendlich die Diagnose.

Ein  $\geq 20\%$ iger Anteil an myeloiden Blasten im KMPB wird nicht für die Diagnose einer AML benötigt, wenn eine oder mehrere der folgenden zytogenetischen Mutationen feststellbar sind:  $t(8;21)(q22;q22.1)$ ,  $inv(16)(p13.1q22)$ ,  $t(15;17)(q24.1;q21.2)$ . (11)

Die Diagnostik des AML-Subtyps erfolgt nach der Diagnose der AML und dient der Klassifizierung, der Risikostratifizierung und somit auch der Auswahl der geeigneten Therapie. Für diesen diagnostischen Schritt werden folgende Untersuchungsmethoden angewandt:

Zytochemie: Die Zytochemie wurde initial für die FAB-Klassifikation verwendet und wurde Großteils ersetzt durch die Immunphänotypisierung. Seither dient sie in speziellen Fällen, wie beispielsweise zur Subklassifikation von „AML, NOS“ oder in Fällen von „AML with ambiguous lineage“, um die myeloide Abstammung der Zellen festzustellen. (10)

Immunphänotypisierung: Diese Untersuchung wird in allen Fällen einer akuten Leukämie verwendet, um die Herkunftslinie der Blasten zu identifizieren und kann auf zwei verschiedene Methoden ausgeführt werden.

- Die Flow Zytometrie (FACS) stellt die erste Wahl zur Immunphänotypisierung dar. Das Vorhandensein und die Expressionsstärke von sich an der Oberfläche von Zellen befindenden Antigenen, welche als CD (Cluster of differentiation) bezeichnet werden, stellen den Immunphänotyp einer Zelle dar, welcher sowohl Hinweise zur Herkunft der Zelllinie als auch zum Ausmaß der Reife der Zelle gibt. Leukämische Zellen weisen im Vergleich zu normalen Zellen spezielle Veränderungen in ihrem Immunphänotyp, wie Absenz, Unter- oder Überexpression von Antigenen oder Expression von Antigenen einer anderen Zelllinie, auf. (12)
- Zusätzlich wird als zweite Methode zur Immunphänotypisierung die Immunhistochemie eingesetzt. Der am häufigsten genutzte Blastenmarker bei AML ist CD34, welcher nur in wenigen Subtypen der AML negativ ausgeprägt ist. (10, 12)

Die Zytogenetik gliedert sich in zwei Teilbereiche:

- Eine Karyotypisierung bzw. Chromosomenanalyse untersucht die DNA der Zellen in der Metaphase der Mitose. Normale Zellen haben generell einen normalen Karyotyp (46,XX oder 46,XY), während leukämische Zellen eventuell numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen aufweisen können. Die Karyotypisierung stellt den Goldstandard der Zytogenetik der AML dar. Da bestimmte subtile Aberrationen wie  $inv(16)(p13.1q22)$  oder  $t(15;17)$  PML-RARA eventuell bei einer Karyotypisierung unentdeckt bleiben, wird trotzdem oft zusätzlich eine FISH durchgeführt, da durch das gezielte Anfärben diese

bestimmten Aberrationen zum Vorschein kommen können. Die Chromosomenanalyse untersucht im Gegensatz zur FISH unspezifisch alle Chromosomen. (12, 13)

- Die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung stellt eine gezielte und schnelle Methode zur Evaluierung der Zytogenetik dar und funktioniert durch eine Anfärbung von bestimmten Loci auf Chromosomen, auf denen man Aberrationen vermutet. Anschließend lassen sich im Fluoreszenzmikroskop die farblich markierten Stellen als Chromosomenaberrationen erkennen oder nicht. Eine FISH kann sowohl in der Interphase als auch in der Metaphase der Mitose ausgeführt werden. (12, 13)

Die Molekulargenetik bzw. die Mutationsanalyse wird im Kapitel „molekulargenetische Untersuchungsmethoden“ beschrieben.

## **1.5. WHO-Klassifikation der AML**

Die aktuelle WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2016 ist eine Überarbeitung der im Jahr 2008 publizierten Vorgängerversion. Die Erkrankung wird in folgende Subtypen klassifiziert:

- Die große Gruppe der „AML with recurrent genetic abnormalities“ beinhaltet zytogenetische und molekulargenetische Subgruppen, welche vor allem für die Risikostratifizierung von Bedeutung sind. (14, 15)
- Die „AML with myelodysplasia-related changes“ kommt in ca. 30 % der Fälle vor. Zu dieser Subgruppe zählen Patient\*innen mit sekundärer AML auf dem Boden einer vorbestehenden Myelodysplasie (MDS, MDS/MPN) und Patient\*innen mit de-novo AML und Dysplasien oder bestimmten, mit MDS in Zusammenhang stehenden zytogenetischen Veränderungen. Dadurch entsteht ein hoch aggressiver Subtyp mit einem schlechten medianen Overall Survival von gerade einmal 9-12 Monaten. (16)
- „Therapy-related myeloid neoplasms“ beinhaltet myeloide Neoplasien wie AML, welche nach einer Chemo- oder Strahlentherapie auftreten, welche aufgrund einer anderen nicht mit der AML zusammenhängenden vorhergehenden Erkrankung durchgeführt wurde. Die Anfälligkeit für eine solche Erkrankungsgenese kann durch Keimbahnmutationen vererbt werden, weshalb

eine genaue Familienanamnese durchgeführt werden sollte. Ungefähr 10 % der AML Patient\*innen werden als t-AML klassifiziert. (14, 15, 17)

- Die Gruppe der „AML, not otherwise specified“ (NOS) schließt Fälle mit ein, welche die Kriterien der anderen Kategorien nicht erfüllen. Es fallen immer weniger Fälle in diese Kategorie, da stetig neue Subtypen entdeckt werden. Die Subklassifizierung innerhalb dieser Gruppe ähnelt der, der WHO vorhergehenden French-American-British (FAB) Klassifikation, welche erstmals 1976 veröffentlicht wurde.
- Das Myeloide Sarkom entsteht durch die extramedulläre Proliferation von Blasten von einer oder mehrerer myeloider Zelllinien. Es kann überall im Körper, jedoch besonders in Haut, GI-Trakt, Lymphknoten und Knochen, auftreten. Sollte ein Myeloides Sarkom bereits vor Auffälligkeiten im Blut oder Knochenmark apparent werden, ist die Diagnose eines Myeloiden Sarkomes synonym zur Diagnose einer AML zu sehen.
- Die Subtypen der Gruppe der „Acute leukemias of ambiguous lineage“ zeigen keinen klaren Nachweis einer Differenzierung entlang einer einzelnen Zelllinie. Daher ist es nicht möglich sie einer zelllinien-orientierten Kategorie zuzuordnen. Dazu gehören akute Leukämien, welche keine zelllinien-spezifischen Antigene (AUL, acute undifferentiated leukemia) oder Blasten mit Antigenen, welche aus mehreren Zelllinien stammen (MPAL, mixed phenotype acute leukemia), aufweisen.

(14, 15)

Tabelle 1: vollständige Auflistung der AML Subtypen der WHO-Klassifikation 2016 adaptiert nach (14)

<b>AML with recurrent genetic abnormalities</b>
AML with t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1 -> CBF-AML
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11 -> CBF-AML
APL with PML-RARA
AML with t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A
AML with t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1

Provisional entity: AML with BCR-ABL1
AML with mutated NPM1
AML with biallelic mutations of CEBPA
Provisional entity: AML with mutated RUNX1
<b>AML with myelodysplasia-related changes</b>
<b>Therapy-related myeloid neoplasms</b>
<b>AML, not otherwise specified (NOS)</b>
AML with minimal differentiation
AML without maturation
AML with maturation
Acute myelomonocytic leukemia
Acute monoblastic/monocytic leukemia
Pure erythroid leukemia
Acute megakaryoblastic leukemia
Acute basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis
<b>Myeloid sarcoma</b>
<b>Myeloid proliferations related to Down syndrome</b>
Transient abnormal myelopoiesis
Myeloid leukemia associated with Down syndrome
<b>Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm</b>
<b>Acute leukemias of ambiguous lineage</b>
Acute undifferentiated leukemia
Mixed phenotype acute leukemia (MPAL) with t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
MPAL with t(v;11q23.3); KMT2A rearranged
MPAL, B/myeloid, NOS
MPAL, T/myeloid, NOS

## 1.6. Risikostratifizierung der AML

Die aktuelle Zuordnung der AML Patient\*innen zu prognostischen Gruppen wurde vom European Leukemia Net (ELN) in Jahr 2017 veröffentlicht. Das ELN-Risiko ergibt sich aus dem zyto- und molekulargenetischen Gesamtbild, welches aus dem Vorhandensein einer Mutation im Kontext der An- oder Abwesenheit weiterer

Mutationen entsteht. Die schlechteste Prognose weist die Kombination einer TP53 Mutation und eines komplexen Karyotyps, welcher durch drei oder mehr nicht miteinander zusammenhängende Chromosomenaberrationen mit bestimmten Ausnahmen definiert wird, auf.

Patient\*innenbezogene prognoserelevante Faktoren kommen in der ELN nicht vor. Diese beinhalten den Allgemeinzustand, die Komorbiditäten und das Lebensalter, wobei letzteres nicht als alleiniger Faktor für eine adäquate Therapieentscheidung herangezogen werden darf. (18)

Tabelle 2: Auflistung der genetischen Risikoparameter adaptiert nach (18)

Prognose	Genetische Abnormalität
Günstig	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1
	inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
	Mutated NPM1 without FLT3-ITD or with FLT3-ITD low allelic burden (<0,5)
	Biallelic mutated CEBPA
intermediär	Mutated NPM1 and FLT3-ITD high allelic burden (≥0,5)
	Wild-type NPM1 without FLT3-ITD or with FLT3-ITD low
	t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
	Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
ungünstig	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
	t(v;11q23.3); KMT2A rearranged
	t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
	inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EVI1)
	-5 or del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Complex karyotype, monosomal karyotype
	Wild-type NPM1 and FLT3-ITD high
	Mutated RUNX1
	Mutated ASXL1
	Mutated TP53

## 1.7. wichtige Differentialdiagnosen zur AML

Die Gemeinsamkeit der genannten Differentialdiagnosen ist das erhöhte Risiko der Transformation in eine AML.

MDS: Die myelodysplastischen Syndrome sind eine heterogene Gruppe von myeloiden Neoplasien, die sich hauptsächlich durch persistente periphere Zytopenie, morphologische Dysplasie in wenigstens 10% der Zellen einer oder mehrerer myeloider Zellreihen, dem Auftreten von MDS-typischen genetischen Aberrationen und schlussendlich Knochenmarkversagen, charakterisieren.

Das Risiko in eine AML zu transformieren beträgt 30%. (19)

MPN: Die myeloproliferativen Neoplasien gliedern sich unter anderem in folgende Krankheitsbilder auf:

- chronische myeloische Leukämie (CML): Für das Management der CML ist es notwendig, zu eruieren in welcher Phase sich die Erkrankung befindet. Meist liegt zum Zeitpunkt der Diagnose eine chronische Phase vor. Die Diagnosekriterien für die Akzelerationsphase beinhalten persistente/steigende Leukozyten  $> 10 \times 10^9/L$  im PB, persistente Splenomegalie, persistente therapieunabhängige Thrombozyten  $> 1000 \times 10^9/L$  oder  $< 100 \times 10^9/L$  im PB, Basophilie  $\geq 20\%$  im PB und 10-19% (WHO) oder 15-29% (ELN) Blastenanteil im PB und/oder im KM. Steigt der Anteil auf 20% bzw. 30% oder mehr, geht die CML in eine Blastenkrise über. Als bedeutender molekularer Marker der CML fungiert  $t(9;22)(q34;q11)$  mit der Bildung des Fusionsgens BCR-ABL auf dem sogenannten Philadelphia Chromosom. (14, 20)
- chronische Neutrophilenleukämie (CNL): Im PB befinden sich  $\geq 25 \times 10^9/L$  Leukozyten, wovon  $\geq 80\%$  segmentierte Neutrophile Granulozyten und nur  $< 10\%$  Neutrophile Vorläuferzellen sind. Im KM herrscht Hyperzellularität durch vermehrte Proliferation von normal ausgereiften Neutrophilen, während der Anteil der Myeloblasten nur  $< 5\%$  ausmacht.
- Polycythaemia vera (PV): Für die PV muss eine vermehrte Proliferation aller myeloischen Zelllinien im allgemein hyperzellulären KM, mit besonderem Anstieg des Hb  $> 16.5 \text{ g/dL}$  oder Hkt  $> 49\%$  zur Diagnose vorhanden sein.

- primäre Myelofibrose: Dabei handelt es sich um eine das KM ausfüllende aus Retikulin- und Kollagenfasern bestehende Fibrose, die sich zu einer Osteosklerose entwickeln kann und begleitet wird von einer verstärkten Proliferation und Atypie der Megakaryozyten im KM.
- essenzielle Thrombozythämie: Diese Erkrankung ist charakterisiert durch den massiven Anstieg der Thrombozyten  $\geq 450 \times 10^9/L$  im PB, während gleichzeitig im KM hauptsächlich eine vermehrte Proliferation der megakaryozytären Reihe erkennbar ist.

(14)

ALL im Erwachsenenalter: Die akute lymphatische Leukämie, welche je nach Zelllinie unterteilt wird in B-Zell- oder T-Zell-ALL, wird bei einem Lymphoblastenanteil von 20% oder mehr im KM diagnostiziert, auch wenn gleichzeitig eine extramedulläre Tumormasse des lymphatischen Gewebes besteht. Letzterer Fall würde als lymphoblastisches Lymphom bezeichnet werden. Ein Blastenanteil von unter 20% im KM ohne extramedulläre Tumormasse wird nur als ALL diagnostiziert, wenn bestimmte genetische, mit ALL assoziierte Aberrationen vorhanden sind. Ein im Kindesalter bedeutsamer molekulargenetischer Marker ist die Translokation  $t(12;21)(p13;q22)$  mit dem sich daraus bildenden Fusionsgen ETV6-RUNX1. (15)

## 1.8. Therapie der AML

Zuallererst erfolgt die Evaluierung, ob der/die Patient/in für eine intensive Induktions-Chemotherapie gesundheitlich geeignet ist. Wie bereits im Kapitel über die Risikostratifizierung erwähnt, werden dabei neben patient\*innenbezogenen Faktoren auch genetische Marker berücksichtigt. Ein erhöhtes Patient\*innenalter  $> 65$  Lebensjahren ist ein starker negativer Prognosefaktor. Über 50% der AML Patient\*innen fallen in diese Altersgruppe. Jedoch gibt es weitere prognostisch sogar wichtigere Parameter, wie physische Fitness, Komorbiditäten, Polypharmazie und den kognitiven Gesundheitszustand des/der Patienten/in. Eine Therapieentscheidung sollte nicht alleinig aufgrund des Patient\*innenalters getroffen werden. Für ausgewählte Patient\*innen dieser Altersgruppe kann eine intensive Therapie sogar das Überleben verbessern. (21, 22)

Induktionstherapie:

Die intensive Remissionsinduktion verfolgt das Ziel der kompletten Remission und der potenziellen Kuration. Seit über 40 Jahren wird als Standardinduktionstherapie Cytarabin (täglich 100-200mg/m<sup>2</sup> i.v. 7 Tage lang) in Kombination mit einem Anthrazyklin (e.g. Daunorubicin, Idarubicin 3 Tage) verwendet. Dieses sogenannte „7+3 Regime“ bewirkt CR-Raten von 60-70%, ein 2-Jahres-Overall Survival von ca. 50% in jüngeren Patient\*innen (<60 Lebensjahre) und eine CR von ca. 50% und ein 2-Jahres-OS von 20% bei ≥60-jährige Patient\*innen. Patient\*innen mit t-AML und MRC-AML erreichen CR in 24-51%. (1, 17, 23, 24)

Um diesen schlechten OS-Raten unter Standardtherapie beizukommen, versucht man in bestimmten AML-Subtypen 7+3 mit neueren Präparaten zu kombinieren. Exemplarisch ist Gemtuzumab Ozogamicin ein Anti-CD33 monoklonaler Antikörper, welcher folglich bei CD33-positiver CBF-AML oder CD33-positiver AML mit NPM1-Mutation zum Einsatz kommt. Die Zulassungsstudie ALFA-0701 zeigt signifikant geringere Rückfallraten durch das Erreichen einer dauerhafteren Remission. (25-27)

Aufgrund der oben genannten Remissionsdaten unter Standardinduktion bei t-AML und MRC-AML, wird bei dafür geeigneten Patient\*innen, CPX-351 angewandt. Dabei handelt es sich wie bei 7+3 um eine Kombination aus Cytarabin und Daunorubicin, welche jedoch in ein Liposom verpackt wurden. Dieses löst sich nach der Aufnahme in die Krebszelle auf und ermöglicht es den antineoplastischen Wirkstoffen somit, die DNA der Krebszelle anzugreifen. Die Zulassungsstudie CLTR0310-301 (NCT01696084) ergab ein verbessertes Overall Survival von CPX-351 im Vergleich zum 7+3 Regime in Patient\*innen der Altersgruppe zwischen 60-75 Lebensjahren mit sekundärer Hoch-Risiko AML. (17)

Die meisten AML-Patient\*innen, welche eine intensive Chemotherapie durchlaufen erreichen eine CR. (28)

Anschließend ist das Ziel der Postremissions- bzw. Konsolidierungstherapie die Festigung der CR und das Verhindern eines schnellen, ohne weitere Therapie mit

hoher Wahrscheinlichkeit auftretenden, Rezidivs. Diese erfolgt e.g. standardmäßig für Patient\*innen nach CR, bei welchen aufgrund von günstigen Risikofaktoren eine HSCT nicht empfohlen wird, mit intermediär dosiertem Cytarabin. Das Langzeitüberleben erreicht damit bei unter 60-jährigen einen Wert von ca. 50%. Über 60-Jährige und Patient\*innen mit ungünstigem genetischem Risiko profitieren davon, aufgrund der hohen Toxizität, nicht in gleichem Maße. (1)

Die allogene HSCT spielt insbesondere für eben genannte Patient\*innengruppe eine entscheidende Rolle zur Verhinderung von Rückfällen. Sie reduziert, unter anderem wegen des starken graft-versus-leukemia Effektes, im Vergleich zu alleiniger intensiver Chemotherapie nach der ersten CR das Rezidivrisiko um mehr als 60%. Es erfordert jedoch eine strenge Kosten-Nutzen-Analyse durch Gegenüberstellung von Rezidivrisiko in erster CR mit alleiniger Chemotherapie versus Rezidivrisiko nach allogener HSCT mit der damit einhergehenden begleitenden Mortalität. Welche Patient\*innen für eine HSCT passend sind, wird nach ELN-Kriterien (siehe Tabelle 2) entschieden. Bei günstiger Zytogenetik und gutem Ansprechen auf alleinige intensive Induktionstherapie nach MRD Kriterien besteht ein geringes Risiko ( $< 40\%$ ) in der ersten CR ein Rezidiv zu bekommen. Diesfalls wird keine HSCT routinemäßig vorgenommen. Besteht ein hohes Rezidivrisiko ( $\geq 40\%$ ), sollte anhand von Alter, Komorbiditäten und geeignetem Spender evaluiert werden, ob die durch die Transplantation bedingte Mortalität niedrig oder hoch ist, um eine Entscheidung treffen zu können. (28)

Durch den seit kurzem möglichen breiten Einsatz von NGS sind in den letzten Jahren eine große Anzahl an neuen Medikamenten zur zielgerichteten Therapie der AML, für die Induktion, Konsolidierung und Erhaltung, zugelassen worden. Diese Targeted-Therapy nutzt bestimmte Genmutationen, biologische Pfade oder Oberflächenantigene als Angriffsziel. Exemplarisch für diese neue Medikamentengruppe stehen die FLT3-Inhibitoren (FMS-like-Tyrosinkinase 3). Die zweite Generation (Quizartinib, Creolanib, Gilteritinib) ist selektiver und weist weniger Nebenwirkungen als die erste Generation (Sunitinib, Sorafenib, Lestaurtinib und Midostaurin) auf. Typ-1-Inhibitoren sind sowohl für FLT3-TKD als auch für FLT3-ITD Mutationen effektiv, während Typ-2-Inhibitoren nur FLT3-ITD

ansteuern. Beispielsweise wurden der Typ-1-Inhibitor Midostaurin für die Behandlung von neu diagnostizierter FLT3-mutierter AML in Kombinationstherapie mit 7+3 (NCT00651261) und der Typ-2-Inhibitor Gilteritinib für die Behandlung von Erwachsenen mit rezidivierender oder refraktärer FLT3-mutierter AML zugelassen (NCT02421939). (29-31)

Ein Drittel der AML-Patient\*innen sind 75 Jahre alt oder älter. Wie am Anfang des Kapitels über die Therapie der AML beschrieben, sollte die Therapieentscheidung nicht alleinig aufgrund des Patient\*innenalters getroffen werden. Sollte die individuelle Beurteilung des Patient\*innen negativ ausfallen, existieren weniger intensive Therapiemöglichkeiten wie niedrig dosiertes Cytarabin (2xtgl. 20mg s.c. für 10 Tage alle 4 Wochen) und hypomethylierende epigenetisch wirksame Medikamente wie Decitabin und Azacitidin. Derzeit stellt die Kombinationstherapie einer hypomethylierenden Substanz mit Venetoclax aufgrund verbesserter Outcomeparameter den Standard in der Therapie von, für intensive Chemotherapie ungeeignete, Patient\*innen dar. (1, 32, 33)

Die Rezidiv- bzw. Salvage-Therapie hat eine erneute zytologische Remission, als Brücke zur, für das Langzeitüberleben notwendigen HSCT, zum Ziel. Denn mit dieser existiert, trotz Rezidiv nach Chemotherapie, weiterhin eine kurative Therapiemöglichkeit für die Patient\*innen. Zur Salvage-Therapie gibt es keine Standardmedikamente, jedoch werden am häufigsten Hoch-Dosis Cytarabin, Anthracycline und Purin Analoga verwendet. (34)

## 1.9. Response Beurteilung der AML

Tabelle 3: Response Kriterien adaptiert nach (18)

CR ohne MRD (CR <sub>MRD-</sub> )	CR neg für unter MRD-Kriterien genannte Marker
CR (MRD <sup>+</sup> oder unbekannt)	KM Blastenteil <5%; Abwesenheit von: Blasten im PB, Blasten mit Auer-Stäbchen, extramedullärer Manifestation; ANC ≥ 1x10 <sup>9</sup> /L; Thrombozyten ≥ 100x10 <sup>9</sup> /L
CR (CRi) mit inkompletter hämatologischer Erholung	CR Kriterien außer residuale Neuropenie < 1x10 <sup>9</sup> /L oder Thrombopenie < 100x10 <sup>9</sup> /L

Morphologisch leukämiefreier Zustand (MLFS)	CR Kriterien außer, dass keine hämatologische Erholung (ANC, Thrombozyten) vonnöten ist; KM sollte nur nicht aplastisch sein (min. 10% Zellen)
Partielle Remission (PR)	hämatologische Kriterien für CR erfüllt; Abnahme des KM Blastenteils zu zwischen 5-25% und Abnahme zu vor der Therapie um min. 50%
<b>Versagen der Behandlung:</b>	
Primär refraktäre Erkrankung	Keine CR/Cri nach 2 Durchgängen von intensiver Induktion, ausgenommen Tod in der Aplasie/ durch unbestimmte Ursache
Tod in der Aplasie	Tod $\geq 7$ Tage nach dem Ende der initialen Therapie + Zytopenie; mit a-/hypoplastischem KM, welches innerhalb von 7 Tagen vor dem Tod auftrat
Tod durch unbestimmte Ursache	Tod vor dem Ende der Therapie oder $< 7$ Tage nach dem Ende; oder Tod $\geq 7$ Tage nach dem Ende der initialen Therapie ohne Blasten im PB und ohne vorhandene KM Untersuchung
<b>Response Kriterien welche nur für klinische Studien gelten:</b>	
Stabile Erkrankung	Keine CR <sub>MRD-</sub> , CR, CRi, PR, MLFS und die Kriterien der PD nicht erfüllt
Progressive Erkrankung (PD)	$> 50\%$ Zunahme in KM Blasten im Vergleich zum Ausgangswert; $> 50\%$ Zunahme in PB Blasten zu einem Wert von $> 25 \times 10^9/L$ ; neue extramedulläre Manifestation
<b>Rezidiv:</b>	
Hämatologisches Rezidiv nach CR <sub>MRD-</sub> , CR, CRi	KM Blasten $\geq 5\%$ oder Blasten im PB oder extramedulläre Manifestation
Molekulares Rezidiv nach CR <sub>MRD-</sub>	Wiederauftreten von MRD-Markern

Die CR ohne MRD (MRD- bedeutet keine MRD, im Gegensatz zu MRD+) ist eine in der ELN-Recommendation aus dem Jahr 2017 neu vorgeschlagene Response Kategorie, die auf dem MRD Status des Patient\*innen basiert. Die inzwischen

standardmäßig erhobene Minimal/Measurable Residual Disease (MRD) wurde in die Kriterien miteinbezogen, weil das Rezidivrisiko in CR<sub>MRD</sub>-geringer, als in CR/CRi mit nachweisbarer RD war. (18)

Eine frühe Ermittlung der MRD, auch bereits nach dem ersten Zyklus der Induktion, ermöglicht frühere Identifikation von schlechtem Therapieansprechen. MRD Monitoring kann, während der Remission, auf Induktions- und Konsolidationstherapien folgend oder jenseits von Konsolidation, um drohendes Rezidiv zu eruieren, erfolgen. Der beste Zeitpunkt allerdings, um die MRD zu bestimmen, bleibt einstweilen noch im Unklaren. Dafür werden Multiparameter Flow Cytometrie (MFC), Real-Time Quantitative PCR und in Zukunft möglicherweise auch Digital-PCR und NGS, angewandt.

Eine MRD wird, im Gegensatz zu ab einem Verhältnis von 1:20 Leukämiezellen zu Leukozyten bei Verwendung traditioneller Verfahren, bereits ab einem Verhältnis von 1:10<sup>6</sup> Leukämiezellen zu Leukozyten, feststellbar. Bereits weit unter der morphologischen Schwelle von 5% Blastenanteil ist somit ein drohendes Rezidiv erkennbar.

Als MRD-Marker werden bei der MFC Panel bestehend aus Markern wie CD33, CD34 verwendet, während auf der molekularen Ebene NPM1, die Fusionsgene RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MXH11, PML-RARA zur Anwendung gebracht werden. (18, 35)

## **1.10. Ätiologie und Pathogenese der AML**

Jeder/Jede Patient\*in wird anhand der ELN Risikostratifizierung entsprechend seinem individuellen genetischen Profil in klinisch bedeutsame molekulare Subgruppen eingeteilt. Die Patient\*innen innerhalb dieser Subgruppen unterscheiden sich jedoch wiederum genetisch sehr stark. Obwohl die Mehrheit der Patient\*innen durch die initiale Induktionstherapie eine CR erzielt, entsteht sehr häufig darauffolgend ein Rezidiv. Letztendlich ergibt sich daraus, dass nur einer von vier AML-Patient\*innen ab Diagnosezeitpunkt fünf Jahre oder länger überleben. (36, 37)

Klonale Evolution der AML:

Obige Schilderung deutet auf eine evolutionäre Anpassung, von therapieempfindlichen zu therapie-resistenten Krebszellen, hin. Die Krebszellen verändern mehrmals ihr genetisches Profil, um sich der neuen Umgebung, welche beispielsweise durch die Chemotherapie geschaffen wird, anzupassen, wodurch sie in der Lage sind, unter diesen neuen Umständen zu überleben und sich zu vermehren. Es wird davon ausgegangen, dass die AML aus hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen entsteht, die aufgrund von Mutationen eine gesteigerte Proliferation durchlaufen und ihre Fähigkeit zur Differenzierung verlieren. Zusätzlich bleibt die Eigenschaft einer Stammzelle sich uneingeschränkt selbst zu erneuern und klonal zu vermehren erhalten, wodurch der maligne Klon am Leben erhalten wird und sich stark vermehrt. Die daraus entstehenden unreifen funktionslosen Zellen sammeln sich im Knochenmark, im peripheren Blut und möglicherweise auch in extramedullären Geweben wie beispielsweise der Haut, an und unterdrücken in ersterem die normale Hämatopoese. (37)

Man unterscheidet lineare von sich verzweigender Evolution. Erstgenannte wird durch schrittweises Hinzukommen von einzelnen Mutationen charakterisiert. Der Klon besitzt sowohl die Mutation, die initial zur Leukämieentstehung geführt hat, als auch die zum Rezidiv führende Mutation.

Unter der, häufiger vorkommenden, sich verzweigenden Evolution, kommt es zur Auslöschung des zum Diagnosezeitpunkt vorhandenen dominanten Hauptklons durch Faktoren wie beispielsweise die Chemotherapie, gefolgt vom Auswachsen eines zum Rezidiv führenden Subklons, welcher die initiale leukämogene Mutation nicht mehr besitzt. (37, 38)

Blickt man tief genug, erweist sich jedes einzelne AML-(Epi)Genom als genauso individuell, wie der/die Patient\*in selbst. Jede AML-Evolution wird von der Diagnose bis zum Rezidiv von vielen verschiedenen Parametern beeinflusst.

Zusammenfassend ergibt sich ein Wechsel des Paradigmas AML-Patient\*innen in häufige genetische Subgruppen einzuteilen hin zur Behandlung jeder AML als genetisch individuelle Erkrankung, die sich mit der Zeit genetisch evolutionär anpasst. (36, 37)

## 1.11. Molekulargenetische Untersuchungsmethoden

Zur Mutationsanalyse wird für beide Verfahren Probematerial aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut des/der Patienten/in benötigt. (10)

Sanger Sequencing oder First-Generation Sequencing:

Die DNA-Synthese am Matrizenstrang startet am Primer, der von der DNA-Polymerase benötigt wird. Als freie Basen werden, neben Adenin, Thymin, Guanodin und Cytosin, auch eine geringe Menge dieser vier normalen Nukleotide in modifizierter Form verwendet. Diese Didesoxyribonukleotide entstehen, wenn jedes der vier normalen Nukleotide mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff, der die 3'-OH-Gruppe blockiert, versehen wird. Wird im Zuge der PCR zufällig eine modifizierte Base in den neuen DNA-Strang eingebaut, kann kein weiteres Nukleotid durch Esterbindung, aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe, hinzugefügt werden. Die DNA-Polymerase hält an. Statistisch wird die DNA-Synthese an allen Positionen, also nach jedem einzelnen Nukleotid, zumindest einmal abgebrochen. Mittels Gelelektrophorese werden alle sequenzierten DNA-Fragmente, welche von derselben Position auf dem Matrizenstrang ausgehen, aber aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe von jeweils einem Nukleotid Längenunterschied, aufgrund ihrer negativen Ladung durch ein elektrisches Feld ihrer Größe nach geordnet. Der Längenunterschied entsteht, weil die Sequenzierung an unterschiedlichen Positionen durch den Einbau einer modifizierten Base terminiert wurde. Da die Didesoxyribonukleotide der vier Nukleotide jeweils unterschiedlich farblich fluoreszierend markiert wurden, ergibt sich aus der längenbestimmten Aufreihung der Moleküle eine Farbabfolge. Da jede der Farben eine der vier Basen kennzeichnet, gibt der Farbcode Rückschluss auf die Nukleotidsequenz. Die durch Abgleich mit Referenzsequenzen festgestellten Unterschiede, ergeben die gesuchten genetischen Varianten im Erbgut des/der Patient\*in. (13, 39, 40)

Sanger-Sequencing ist sehr genau und verlässlich, aber auch langsam und teuer. 100 rund um die Uhr arbeitende Sanger-Sequenziermaschinen, würden circa 3,5 Jahre benötigen, um ein gesamtes menschliches Genom zu sequenzieren.

Denselben Auftrag erledigt eine NGS-Maschine für 1000 US \$ in ein wenig mehr als einem Tag. Um im großen Stil klinische DNA-Proben auf Mutationen untersuchen zu können benötigt man ökonomisch vertretbare Hochdurchsatzverfahren. (40)

Next-Generation Sequencing:

Der Begriff NGS fasst Verfahren zur Hochdurchsatzsequenzierung wie Sequenzieren mit Synthese, Sequenzieren mit Ligation, Ionen Semikonduktor Sequenzieren und andere Techniken zusammen. Das Panel an zu untersuchenden Genen wird je nach klinischer Fragestellung ausgewählt. Es können beispielsweise alle mit AML assoziierten Gene oder sogar das gesamte Exom, was der Summe aller kodierenden Abschnitte des Genoms entspricht, untersucht werden. Neben einigen Gemeinsamkeiten unterscheidet sich das NGS vom Vorgängerverfahren in folgenden Punkten:

Die am meisten genutzte NGS-Technik, ist die Sequenzierung durch Synthese: Statt wie bei Sanger nur wenige, sind beim NGS alle verwendeten Basen modifiziert. Dadurch heftet die DNA-Polymerase immer nur ein Nukleosid an den Matrizenstrang an und stoppt anschließend. Die Fluoreszenzsignale dieser Base werden von einer Chip-Kamera aufgenommen, der Farbstoff wird wieder entfernt, die 3'-OH-Gruppe wird wieder frei und das Nächste, zum Matrizenstrang komplementäre farbstoffmarkierte Nukleosid, wird eingebaut. Im Verlauf entstehen auf diese Weise Serien von Kameraaufnahmen, die einen Farbcode ergeben, aus welchem mittels Bioinformatik die gesuchte Nukleotidsequenz ersichtlich wird.

(13, 39, 40)

Neben diesen Einzelheiten in der Sequenzierung selbst, liegt der Hauptunterschied zwischen den beiden Verfahren darin, wie die sequenzierten DNA-Moleküle organisiert werden, damit ihre fluoreszierenden Signale interpretierbar sind. Nachdem die DNA-Probe isoliert, in kleine Fragmente unterteilt und denaturiert wurde, wird beim NGS jedes Fragment an einer eigenen Position auf einer Platte fixiert. Selbiges wird ebendort mittels PCR amplifiziert. Die daraus resultierenden Kopien eines Fragments bilden gemeinsam ein Cluster an derselben Position auf

der Platte. Somit entstehen viele Cluster aus identischen DNA-Fragmenten, welche gleichzeitig parallel nebeneinander auf der Platte sequenziert werden.

(13, 39, 40)

## 1.12. Genmutationen mit Bedeutung für die AML

Der Mechanismus der klonalen Evolution zeigt die genetische Heterogenität innerhalb eines/einer einzelnen AML-Patienten\*in auf. Trotz der derzeitigen Beschreibung von mehr als 60 wiederholt in der AML mutierten Genen, befindet man sich noch weit davon weg die Genetik der AML im Detail zu kennen. Nicht nur einzelne Mutationen, sondern oft auch die Kombination unterschiedlicher Veränderungen sind dabei prognostisch wegweisend.

> 95% der AML-Patient\*innen tragen zumindest eine somatische Mutation und durchschnittlich drei Driver-Mutationen. Dieses genetische Profil der AML ist auffallend heterogen zwischen den Patient\*innen. Nur eine Handvoll an Mutationen finden sich in mehr als einem Viertel der Betroffenen, wie an den weiter unten aufgelisteten Häufigkeiten ersichtlich. Einige, der im Folgenden kurz beschriebenen Genmutationen, haben, als signifikante prognostische Marker, bereits in die ELN-Empfehlung zur Risikostratifizierung aus dem Jahr 2017 Einzug gefunden. (37, 41)

- *FLT3*: Häufigkeit: in 20-25% der erwachsenen AML Patient\*innen als ITD (internal tandem duplication), in 5-10% als D835 TKD (tyrosin kinase domain);  
Prognose: FLT3-ITD siehe Kapitel Risikostratifizierung Tabelle 2, D835 TKD ist prognostisch noch unklar
- *NPM1*: Häufigkeit: in ca. 30% der erwachsenen AML Patient\*innen, häufiger in AML mit normalem Karyotyp und bei jüngeren Patient\*innen;  
Prognose: siehe Kapitel Risikostratifizierung Tabelle 2;  
Diagnose: eigene Diagnoseklasse siehe Kapitel WHO-Klassifikation Tabelle 1
- *CEBPA*: Häufigkeit: in ca. 10% der erwachsenen AML Patient\*innen, häufiger in AML mit normalem Karyotyp und bei jüngeren Patient\*innen, familiäre Vererblichkeit durch Keimbahnmutationen wurde beschrieben;  
Prognose: in 4-5 % der AML Patient\*innen liegt Mutation auf beiden Allelen vor, dadurch günstige Überlebensprognose siehe Kapitel Risikostratifizierung

Tabelle 2, Sollte die Mutation jedoch nur auf einem Allel auftreten, dann gilt eine ähnliche Prognose wie bei Wild-Type CEBPA.

Diagnose: CEBPA-Mutation auf beiden Allelen mit eigener Diagnoseklasse siehe Kapitel WHO-Klassifikation Tabelle 1

- *RUNX1*: Häufigkeit: in 5-20% der erwachsenen AML Patient\*innen, sehr häufig bei mit Trisomie 21 assoziierter AML (das Gen liegt auf Chromosom 21), häufiger bei älteren Patient\*innen, familiäre Vererblichkeit durch Keimbahnmutationen wurde beschrieben;

Prognose: ungünstig, im Gegensatz zu verbesserter Prognose, wenn das Gen Teil einer Genfusion ist, wie beispielsweise in t(8;21), siehe Kapitel Risikostratifizierung Tabelle 2;

Diagnose: provisorische Diagnoseklasse siehe Kapitel WHO-Klassifikation Tabelle 1

- *TP53*: Häufigkeit: in 5-20% der erwachsenen AML Patient\*innen, häufiger bei älteren Patient\*innen, primär mit komplexem Karyotyp, monosomalem Karyotyp und sekundärer AML assoziiert;

Prognose: ungünstig, siehe Kapitel Risikostratifizierung Tabelle 2

- *KMT2A-PTD*: Häufigkeit: in 5-10% der erwachsenen AML Patient\*innen, in 20-30% bei CBF-AML;

Prognose: ungünstig, siehe Kapitel Risikostratifizierung Tabelle 2

- *KIT*: Häufigkeit: in ca. 10% der erwachsenen AML Patient\*innen, KIT Mutationen verschwinden meist beim Rezidiv durch die klonale Evolution der Leukämiezellen;

Prognose: ungünstig für KIT-Mutation in CBF-AML

- *IDH*: Häufigkeit: in 5-10% der erwachsenen AML Patient\*innen als IDH1, in 10-20% als IDH2, häufiger in AML mit normalem Karyotyp;

Prognose: widersprüchlich

- *RAS*: Häufigkeit: in ca. 25% der erwachsenen AML Patient\*innen;

- Prognose: widersprüchlich

(1, 41-43)

Somatische Mutationen, welche die klonale Expansion, ohne das gleichzeitige Vorhandensein von Zytopenien und einer dysplastischen Hämatopoese,

vorantreiben, werden als CHIP, Klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potenzial, bezeichnet. Sogar in Personen ohne diagnostizierte hämatologische Erkrankung findet man somatische Mutationen, welche selten vor dem 40. Lebensjahr vorkommen und mit dem Alter zunehmen. Meist finden sich Varianten in den Genen DNMT3A, TET2 und ASXL1, die zu den epigenetischen Mutationen zählen. (42)

epigenetische Mutationen:

Die epigenetische Regulation ermöglicht die Modulation von Transkription und Genexpression, ohne den genetischen Code zu verändern. Dies passiert in Form von DNA-Methylierung, welche Genexpression reduzieren soll, und post-transkriptionaler Modifikation von Histonen. Mutationen in Genen wie DNMT3A, TET2 und ASXL1 kommen oft in präleukämischen Stamm- oder Vorläuferzellen vor und sind in die frühe Entwicklung der Leukämie involviert. Diese Zellen, deren Fähigkeit es ist, sich in verschiedene Zelltypen in Richtung verschiedener Abstammungslinien auszudifferenzieren, könnten nach der Chemotherapie erhalten bleiben und für die klonale Expansion neuer Leukämiezellen während der Remission verantwortlich sein und damit ein Rezidiv bewirken. (1, 43)

- *ASXL1*: Häufigkeit: in 5-15% der erwachsenen AML Patient\*innen, häufiger bei älteren Patient\*innen, assoziiert mit sekundärer AML;  
Prognose: ungünstig, siehe Kapitel Risikostratifizierung Tabelle 2
- *DNMT3A*: Häufigkeit: in ca. 20% der erwachsenen AML Patient\*innen, häufiger in AML mit normalem Karyotyp und bei älteren Patient\*innen, präleukämische Mutation, welche im evolutionären Prozess der AML Entstehung früh auftritt und in der Remission persistiert;  
Prognose: widersprüchlich, jedoch ungünstig, wenn andere Mutationen, wie beispielsweise IDH2 begleitend auftreten
- *TET2*: Häufigkeit: in 5-20% der erwachsenen AML Patient\*innen, häufiger in AML mit normalem Karyotyp und bei älteren Patient\*innen, tritt wechselseitig oft mit IDH Mutationen gemeinsam auf;  
Prognose: widersprüchlich

(1, 41-43)

Keimbahnmutationen bei AML Patient\*innen:

Mutationen in den weiblichen und männlichen Keimzellen finden sich in allen Körperzellen des Menschen wieder, der sich daraus entwickelt. Konsekutiv können sie auch von dieser Person wieder innerhalb der Familie weitervererbt werden. Somatische Mutationen entstehen hingegen plötzlich und ohne erkennbaren Auslöser, finden sich nur in einer begrenzten Anzahl von Körperzellen wieder und werden folglich nicht innerhalb der Familie vererbt. Auf dem Weg der Keimbahnmutation existiert eine vererbare Prädisposition an AML zu erkranken. Meist tritt diese dann schon im frühen Lebensalter auf. (13)

- Ist ein Allel des CEBPA-Gens somatisch, das andere Allel durch eine Keimbahnmutation verändert, ergibt sich für den Patient\*innen eine stark penetrante Prädisposition zur AML. Sind jedoch beide Allele somatisch mutiert oder besteht neben einem Wild-Typ Allel, ein Allel mit einer Keimbahnmutation, resultiert das in einer besseren Prognose als mit einer einzigen somatischen CEBPA Mutation.
- Bei einer MRC-AML mit GATA2 Keimbahnmutation, überlappen mehrerer Syndrome, welche sich außer hämatologisch auch mit Immundefizienz, Hörverlust, Lymphödem, dermatologisch und pulmologisch manifestieren.
- Die AML mit TP53 Keimbahnmutation ist ein Teil des Li-Fraumeni Syndroms, welches ein lebenslanges autosomal dominantes Risiko für Malignome bei Frauen von 100% bzw. Männern von 70%, mit sich zieht. 3-6% der LFS Malignome sind Leukämien.
- Die Fanconi Anämie ist ein autosomal rezessives Syndrom mit Knochenmarkversagen, kleiner Körperstatur, anderen Anomalien und einer Prädisposition für Leukämie. Viele Patient\*innen haben keine offenkundigen Symptome, was die Frühdiagnostik erschwert.
- Eine Trisomie 21 ist im Vergleich zu Gleichaltrigen mit Disomie, mit einem 150-fach größerem Risiko an einer AML zu erkranken, vergesellschaftet.
- Die AML mit DDX41 Keimbahnmutation stellt mit dem späten durchschnittlichen Diagnosezeitalter von 62 Jahren eine Ausnahme unter den mit Keimbahnmutationen assoziierten Leukämien dar.

Die Herausforderung für klinisch tätige Ärzt\*innen besteht darin, zu unterscheiden, ob sich Mutationen als Keimbahnmutationen oder als somatische Mutationen darstellen.

(44, 45)

## **2. Ziele der Arbeit**

Die in der Einleitung durchgeführte ausführliche Beschreibung des Krankheitsbildes soll zeigen, welche starke Dynamik das Management der AML in den letzten Jahren erfahren hat und noch immer erfährt. Dass diese Dynamik dringend notwendig ist, zeigen die schlechten Überlebensdaten von an AML Erkrankten der letzten Jahrzehnte. NGS ermöglicht die routinemäßige rasche Analyse vieler Gene. Konsekutiv ergibt sich daraus eine Optimierung der Risikostratifizierung, wodurch wiederum die Therapieplanung verbessert wird. Zusätzlich wird dadurch unlängst auch die Auswahl von Patient\*innen ermöglicht, welche für eine Targeted Therapy geeignet sind.

Um dieser Entwicklung gerecht zu werden ist eine regelmäßige Qualitätssicherung in Form von randomisierten klinischen Studien und Real-World Datensätzen unabdinglich. Die Hauptfragestellung/das Hauptziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, diese Qualitätssicherung anhand von, an der Abteilung für Hämatologie im LKH Universitätsklinikum Graz erhobenen Daten zum Gesamtüberlebens und zu Remissionsraten von ebendort behandelten Patient\*innen, durchzuführen. Dafür werden diese Daten mit internationalen Kohorten verglichen. Die sich daraus ergebende Hypothese ist, dass die Outcome- und Survival-Daten der Grazer Patient\*innenkohorte dem internationalen Standard entsprechen.

Nebenfragestellungen:

- Unterscheiden sich Remissionsraten und Gesamtüberleben bei AML Patient\*innen seit Einführung von NGS in die klinische Routine von denselben Parametern vor der Einführung von NGS? Dies kann, anhand eines Vergleiches mit einem Datensatz der Abteilung für Hämatologie im LKH Universitätsklinikum Graz aus den Jahren 2002-2008, aus einer von A. Loindl unter Anleitung von Ao. Univ.-Prof. Dr. G. Jäger durchgeführten Diplomarbeit, überprüft werden.

Seitdem wurden im Grazer Zentrum keine entsprechenden Qualitätssicherungen mehr durchgeführt. Vor allem die Daten der NGS Ära liegen noch nicht vor und wurden bisher keiner Evaluierung unterzogen. Daten aus großen internationalen Registern weisen darauf hin, dass das Outcome zu Zeiten der NGS Ära besser als davor zu sein scheint. Dennoch sind einzelne Zentren dazu angehalten diese Daten auch zu überprüfen.

- Wie ist das Gesamtüberleben und die Remissionsraten bei intensiv behandelten und bei nicht-intensiv behandelten AML Patient\*innen seit Einführung von NGS in die klinische Routine?
- Bewertung der prognostischen Wertigkeit einzelner zum Diagnosezeitpunkt erhobener klinischer und NGS-molekulargenetischer Marker?
- Lassen sich neue potenziell Prognose-relevante Parameter identifizieren, die das Outcome beeinflussen?

Die Beantwortung der Haupt- und Nebenfragestellungen stellt eine wesentliche Qualitätskontrolle der Arbeit an der Abteilung für Hämatologie im LKH Universitätsklinikum Graz dar und dient damit der Behandlungsqualität an dieser Abteilung.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Ein- und Ausschlusskriterien**

Die retrospektive Studie umfasst 236 AML Patient\*innen der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz, bei welchen im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde. Im Besonderen wurde auf 138 Patient\*innen, die mit einer hochdosierten Polychemotherapie mit oder ohne darauffolgende Stammzelltransplantation behandelt wurden, genauer eingegangen. Alle Patient\*innen haben eine Einwilligung zur wissenschaftlichen Auswertung ihrer Daten unterschrieben und waren zum Studieneinschluss älter als 18 Jahre alt. Es lagen keine weiteren Ein- oder Ausschlusskriterien vor.

### **3.2. Datenerhebung**

Die Datenerhebung aller Basisdaten bezüglich der Diagnose, der klinischen und laboratorischen Parameter sowie die Therapie wurde über openMEDOCS® (Medical Documentation and Communication System) durchgeführt. Auch die, für die Studie notwendigen NGS Daten, konnten über openMEDOCS® erhoben werden. Die Eingabe und Dokumentation der Daten erfolgte in die RDA (Abkürzung für Research, Documentation & Analysis). Diese vom Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation betriebene Software wurde initial in Wien entwickelt und soll eine patient\*innennahe Zusatzdokumentation ermöglichen, die dezidiert nicht für die medizinische Betreuung notwendig ist. So wurde dabei ein besonderes Augenmerk auf die Auswertbarkeit der Daten gelegt. Weiters wurde die Exportierbarkeit in Excel und in Statistikprogramme optimiert.

Diesbezüglich wurde ein speziell für diese Datenerhebung programmiertes Unterprogramm der RDA verwendet, das die strukturierte Eingabe aller unten angeführten Haupt- und Nebenzielgrößen ermöglicht. Eine genauere Beschreibung der Eingabemasken erfolgt bei der Beschreibung der einzelnen Haupt- und Nebengrößen.

Um den Aufbau der RDA zu veranschaulichen, wird hier eine Übersichtsdarstellung der ersten Seite der RDA mit eingetragenen Fantasiewerten gezeigt:

The screenshot shows a software interface for data entry in a leukemia biobank. The main window is titled 'MedHäma - AML'. It features a navigation pane on the left with a tree view of folders like 'Patienten' and 'Dokumente'. The main area has tabs for 'Allg. Informationen', 'Klassifikation-Labor', and 'Genetik1-4'. The 'Allg. Informationen' tab is active, showing a form with the following fields and options:

- Dokumentdatum:** A dropdown menu.
- Fall:** A dropdown menu with the value 'kein Fall'.
- Eigentümer:** A dropdown menu with the value 'Med - Häma - Leukemia Biobank'.
- Aufenthalt:** A dropdown menu with the value 'Kein Aufenthalt'.
- Diagnosedatum:** A text input field.
- Alter:** A text input field followed by 'Jahre'.
- Geprüft?:** A checkbox and a 'Prüfer' field.
- Sekundäre AML:** Radio buttons for 'Ja' and 'Nein'.
- Welche sekundäre AML:** Radio buttons for 'MDS', 'CMML', 'MPN', 'CML', 'Andere', and 'Keine sekundäre AML'. A text box for 'Welche andere' is next to 'Keine sekundäre AML'.
- Therapie-assoziiert:** Radio buttons for 'Ja' and 'Nein'.
- Extramedulläre Manifestation:** Radio buttons for 'Ja' and 'Nein', with a 'Zusatz' text box.
- Risiko ELN 2017:** Radio buttons for 'Günstig', 'Intermediär', 'Ungünstig', and 'Nicht durchgeführt', with a 'Zusatz' text box.
- Zytogenetik:** Radio buttons for 'Durchgeführt', 'Nicht durchgeführt', and 'Kein Wachstum'.
- Karyotyp:** A text area containing '46,XY[17]'. Below it are 'Zurück' and 'Vor' buttons.
- FISH:** A checked checkbox. Below it is a list of results:
  - kein Hinweis auf Translokation 8/21 (AML1/ETO=RUNX1/RUNX1T1)
  - kein Hinweis auf Translokation 9/22 (BCR/ABL)
  - kein Hinweis auf Deletion 9p
  - kein Hinweis auf Translokation 6/9 (DEK/NUP214)
  - kein Hinweis auf Deletion 5q bzw. Monosomie 5

### 3.3. Datenschutz

Das RDA System ist wie openMEDOCS® nur über das Computersystem des LKH Universitätsklinikums zugänglich. Der Einstieg ist nur für am IMI speziell dafür lizenzierte und in dieser Studie gemeldete Benutzer möglich und ist passwortgeschützt. Der Export der Daten zur statistischen Auswertung erfolgte nur pseudonymisiert.

Auch der Windows Arbeitsplatz der KAGes (Steiermärkische Krankenanstaltengesellschaft m. b. H.) und das auf diesem installierte openMEDOCS® waren mit Zugriffsbeschränkungen ausgestattet.

### 3.4. Ethik

Bei der Behandlung durch die Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz bestand kein Einwand die Studie in der vorgelegten Form durchzuführen. (EK-Nummer: 30-464 ex 17/18)

### 3.5. Zielgrößen

- Hauptzielgrößen:
  - Remissionsstatus: Wurde eine CR/CRi erreicht? Bei mehrfacher CR/CRi wurde das chronologisch erstmals auftretende Remissionsdatum verwendet.
    - CR: Blasten im KM  $< 5\%$ ; Abwesenheit von zirkulierenden Blasten und Blasten mit Auer Stäbchen; Abwesenheit einer extramedullären Manifestation; ANC  $\geq 1 \times 10^9/L$ ; Thrombozytenzahl  $\geq 100 \times 10^9/L$  (18)
    - CRi: wurde gleichwertig wie CR behandelt; mit Ausnahme von ANC  $\geq 1 \times 10^9/L$  und Thrombozytenzahl  $\geq 100 \times 10^9/L$  werden alle CR Kriterien vorausgesetzt (18)
  - Gesamtüberleben (OS): Diagnosedatum bis Sterbedatum/Last-Follow up
  - Rezidiv-freies Überleben (RFS): Datum der CR/CRi bis Rezidiv/Sterbedatum/Last-Follow up
    - Hämatologisches Rezidiv: KM Blasten  $\geq 5\%$  oder Wiederauftreten von Blasten im peripheren Blut oder Entwicklung einer extramedullären Manifestation (18)
  - Event-freies Überleben (EFS): Diagnosedatum bis Event (Treatment failure, Rezidiv nach CR/CRi, Sterbedatum) oder Last-Follow up
    - Treatment failure/Primary refractory disease: Nach zwei Zyklen einer intensiven Induktionstherapie wurden weder eine CR noch ein anderer Response erreicht. (18)
  - Dauer anderer Response = Datum anderer Response bis Sterbedatum/Last-Follow up. Ein anderer Response wurde nur erhoben, falls keine CR/CRi erreicht wurde.
    - Das Hematological Improvement (HI) wurde folgend definiert:
      - Erythrozyten-Response: Mindestens acht Wochen anhaltende Hb-Zunahme von  $\geq 1,5$  g/dl, wenn vor der Therapie der Hb Wert  $< 11$  g/dl betrug.
      - Thrombozyten-Response: Mindestens acht Wochen anhaltende Thrombozyten-Zunahme von  $\geq 30 \times 10^9/L$  bei

Patienten, welche bei  $> 20 \times 10^9/L$  gestartet sind oder eine Zunahme von  $< 20 \times 10^9/L$  auf über  $20 \times 10^9/L$  und mindestens um 100%, wenn vor der Therapie der Thrombozyten Wert  $< 100 \times 10^9/L$  betrug.

- Neutrophilen-Response: Mindestens acht Wochen anhaltende Neutrophilen-Zunahme um  $0,5 \times 10^9/L$  und mindestens um 100%.

(46)

- MLFS: Blasten im KM  $< 5\%$ ; Abwesenheit von Blasten mit Auer Stäbchen; Abwesenheit von einer extramedullären Manifestation; keine hämatologische Erholung erforderlich (18)
- PR: alle hämatologischen Kriterien des CR; Abnahme der KM Blasten bis zwischen 5 und 25% und im Vergleich zum Wert vor der Therapie um mindestens 50% (18)

Zur besseren Anschaulichkeit soll hier auch das entsprechende Eingabeformular der RDA mit eingegebenen Fantasiewerten gezeigt werden, bei dem diese Hauptzielgrößen eingegeben werden können:

CR		Datum CR	<input type="text"/>
<input type="radio"/> CR, CRi <input checked="" type="radio"/> Nein			
Anderer Response			
<input type="radio"/> MLFS <input type="radio"/> PR <input type="radio"/> HI (für nicht intensive Therapie) <input checked="" type="radio"/> Nein		Datum Response	<input type="text"/>
Treatment failure			
<input type="radio"/> Primär refraktäre Erkrankung <input type="radio"/> Tod in der Aplasie <input type="radio"/> Tod wegen unklarer Ursache <input checked="" type="radio"/> Nein		Datum Failure	<input type="text"/>
Relaps nach CR		Datum Relaps	<input type="text"/>
<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input checked="" type="radio"/> Nicht zutreffend			
PD		Datum PD	<input type="text"/>
<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input checked="" type="radio"/> Nicht zutreffend			
Lebend		Last Follow-Up	<input type="text"/>
<input type="radio"/> Ja <input checked="" type="radio"/> Nein		Sterbedatum	<input type="text" value="15.02.2019"/>
OS	<input type="text" value="50"/> Tage		
RFS	<input type="text"/> Tage		
EFS	<input type="text" value="50"/> Tage		
Dauer anderer Response	<input type="text"/> Tage		

OS, RFS und EFS werden anhand der eingegebenen Zeitpunkte des CR/CRis, des Rezidivs oder eines Events automatisch durch die Datenbank berechnet.

○ Therapiebezogene Daten:

▪ Therapieregime:

- Hochdosis Induktionstherapien wurden unter „7+3“ zusammengefasst und beinhalten: DA (Daunorubicin + Cytarabin), IDA-FLAG (Idarubicin, Fludarabin, hochdosiertes Cytarabin, GCSF zur Rezidivtherapie), CLARA (Clofarabin + Cytarabin), IA (Idarubicin + Cytarabin), HAM (Hochdosis Cytarabin + Midostaurin), MIDAC (Mitoxantrone + Cytarabin). Auch verschiedenste Hochdosis-Studien wurden miteinbezogen.

Anschließend zeigt das entsprechende Eingabeformular der RDA beispielhaft, dass im Falle dieses/dieser fiktiven Patienten/in die Therapie mit 7+3 in Kombination mit Gemtuzumab Ozogamicin begonnen und anschließend mit

Cytarabin, wieder in Kombination mit Gemtuzumab Ozogamicin, konsolidiert wurde.

**Therapie und Outcome**

	Regimen1	Regimen2	Regimen3	Regimen kombiniert
1	7+3	Gemtuzumab Ozogamicin		7+3 / Gemtuzumab Ozogamicin
2	AraC Kons	Gemtuzumab Ozogamicin		AraC Kons / Gemtuzumab Ozogamicin
3				
4				
5				

- Nebenzielgrößen:

- Parameter, welche bei Diagnosestellung erfasst wurden:

- Diagnosedatum
    - Alter und Geschlecht der Patient\*Innen
    - ELN Risikostratifizierung 2017 siehe (18)
    - sekundäre AML
    - Therapie-assoziierte AML
    - Zytogenetik mit Karyotyp und FISH, Beispiel Screenshot RDA-Datenbank:

Zytogenetik

Durchgeführt  Nicht durchgeführt  Kein Wachstum

Karyotyp

46,XY[17]

FISH Ergebnis Zeilenumbruch mit <Shift><CR> oder <Alt><CR>

kein Hinweis auf Translokation 8/21 (AML1/ETO=RUNX1/RUNX1T1)  
kein Hinweis auf Translokation 9/22 (BCR/ABL)  
kein Hinweis auf Deletion 9p  
kein Hinweis auf Translokation 6/9 (DEK/NUP214)  
kein Hinweis auf Deletion 5q bzw. Monosomie 5

- molekulargenetische Mutationen zur Bestätigung der ELN Risikostratifizierung 2017, zum Diagnosezeitpunkt, vor Therapiebeginn erhoben: *TP53*, *NPM1*, biallelic *CEBPA*, *FLT3 ITD* with high allelic ratio ( $\geq 0,5$ ), *ASXL1*, *RUNX1*

weitere erhobene, aber nicht in der ELN berücksichtigte, Mutationen: *ANKRD26, BCOR, BRAF, CALR, CBL, CSF3R, CXCR4, DDX41, DNMT3A, ELANE, ETNK1, ETV6, EZH2, FLT3 ohne ITD, GATA2, HAX1, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MPL, NF1, NRAS, PHF6, PTPN11, SETBP1, SF3B1, SF3B2, SFRP1, SRP72, SRSF2, STAG2, STAG3, STAT5B, TET2, U2AF1, WT1, ZRSR2*

- Sequenzierungspanels: Untersuchung der häufigsten Mutationen bei AML beziehungsweise anderer neoplastischer myeloischer Erkrankungen mittels NGS:
  - AMLv2: Das AMLv2 Panel analysiert die gesamte kodierende Sequenz von *CEBPA, DNMT3A, GATA2, TET2* und *TP53* sowie Mutations-Hotspots in *ASXL1, BRAF, CBL, FLT3 (D835), IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, NPM1* (Tetraisinsertion), *NRAS, PTPN11, RUNX1* und *WT1*.
  - NM: Das Ion Torrent Ampliseq Panel für myeloide Neoplasien (MN) untersucht die gesamte kodierende Region von *CEBPA, BCOR, DDX41, DNMT3a, ETV6, GATA2, NF1, PHF6, SF3B2, SFRP1, SRP72, STAG2, TP53, ZRSR2* sowie Mutationshotspots in *NPM1, ASXL1, BRAF, CALR, CBL, CSF3R, ETNK1, EZH2, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MPL, NRAS, PTPN11, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, STAT3, TET2, U2AF1* und *WT1*.
  - MNP2019v2: Das Ion Torrent Ampliseq Panel für myeloische Neoplasien (MNP2019v2) untersucht die gesamte kodierende Region von *ANKRD26, BCOR, CEBPA, DDX41, DNMT3a, ELANE, ETV6, GATA2, HAX1, NF1, PHF6, SF3B2, SFRP1, SRP72, STAG2, TP53, ZRSR2* sowie Mutationshotspots in *NPM1, ASXL1, BRAF, CALR, CBL, CSF3R, CXCR4, ETNK1, EZH2, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MPL, NRAS, PTPN11, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, STAT3, STAT5B, TET2, U2AF1* und *WT1*.

- Wie im unten angeführten Screenshot des Eingabeformulars mit fiktiven Werten ersichtlich, wurden in die RDA unter den Rastern Genetik 1-4, sowohl die Mutationen als auch deren cDNA-Abschnitt, deren Aminosäuresequenz und der Mittelwert, der im molekularpathologischen Befund angegebenen dazugehörigen VAF, eingetragen. Diese stellt die relative Häufigkeit eines mutierten Allels in der Gesamtprobe dar. Eine VAF von 50% bedeutet entweder, dass 100% der Leukämiezellen die Mutation heterozygot tragen, oder dass 50% der Zellen homozygote Träger sind. Kamen mehrere verschiedene Mutationen eines Gens vor, wurde die Variante mit der höchsten VAF dokumentiert.

The screenshot shows the 'MedHäma - Leukemia Biobank' software interface. The 'Genetik3' tab is selected, displaying a list of genes and their mutation status. The 'mut-NPM1 cDNA' entry is highlighted, showing a VAF of 54%.

Gene	Mutation Status	cDNA Section	AA	Check	VAF (%)
KRAS	<input type="radio"/> Ja <input checked="" type="radio"/> Nein <input type="radio"/> Nicht durchgeführt	mut-KRAS cDNA	AA		
MPL	<input type="radio"/> Ja <input checked="" type="radio"/> Nein <input type="radio"/> Nicht durchgeführt	mut-MPL cDNA	AA		
NF1	<input type="radio"/> Ja <input checked="" type="radio"/> Nein <input type="radio"/> Nicht durchgeführt	mut-NF1 cDNA	AA		
NPM1	<input checked="" type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> Nicht durchgeführt	mut-NPM1 cDNA	AA	p.L287fs Passt	54
NRAS	<input type="radio"/> Ja <input checked="" type="radio"/> Nein <input type="radio"/> Nicht durchgeführt	mut-NRAS cDNA	AA		
PHF6	<input type="radio"/> Ja <input checked="" type="radio"/> Nein <input type="radio"/> Nicht durchgeführt	mut-PHF6 cDNA	AA		
PTPN11	<input type="radio"/> Ja <input checked="" type="radio"/> Nein <input type="radio"/> Nicht durchgeführt	mut-PTPN11 cDNA	AA		
RUNX1	<input type="radio"/> Ja <input checked="" type="radio"/> Nein <input type="radio"/> Nicht durchgeführt	mut-RUNX1 cDNA	AA		

### 3.6. Statistische Auswertung

Die Patient\*innendaten wurden in tabellarischer Form aus der RDA-Datenbank via Microsoft Excel in die Statistiksoftware IBM® SPSS® Statistics 27 übertragen. Mit diesem wurden anschließend sämtliche statistische Auswertung durchgeführt, wobei ein p-Wert von < 0,05 als signifikant gewertet wurde. Dabei wurden die CR-Raten durch den exakten Test nach Fisher verglichen. Des Weiteren wurden die empirisch ermittelten Überlebenszeiten von qualitativ skalierten Variablen in Form von Kaplan-Meier-Kurven grafisch dargestellt und mithilfe des Log-Rank Tests

verglichen. In den zu den Kurven gefertigten „patients at risk“ Tabellen wurden zum jeweiligen Zeitpunkt in jährlichem Abstand die Anzahl der zu diesem Zeitpunkt in der Studie verbliebenen Patient\*innen, d.h. ohne bis dahin verstorbenen oder zensierten Patienten. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die in Tagen erhobenen Überlebenszeiten in den Überlebenszeitanalysen in Jahre, indem die Tage durch 365,25 dividiert wurden, umgerechnet. Alle statistischen Tests wurden 2-seitig durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

Insgesamt wurde, seit Einführung des NGS im Rahmen der initialen Diagnostik, dieses bei 236 AML Patient\*innen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz durchgeführt. Davon wurden 138 Patient\*innen mit hochdosierter Polychemotherapie mit oder ohne darauffolgende Stammzelltransplantation behandelt. Auf diese Kohorte der intensiv behandelten Patient\*innen soll in weiterer Folge der Schwerpunkt dieser Arbeit gelegt werden.

### 4.1. Patientencharakteristika

Tabelle 4: Therapie der gesamten Kohorte

Gesamte Kohorte			236
Therapie	intensiv	7+3	127 (54%)
		Studie	11 (5%)
	nicht-intensiv		65 (28%)
	BSC		33 (14%)

Tabelle 5: Charakteristika AML diagnostizierter Patient\*innen, an welchen ein NGS durchgeführt wurde und welche mit intensiver Chemotherapie behandelt wurden

Intensive Therapie		138
Alter	≤ 65	89 (64%)
	> 65	49 (36%)
Geschlecht	weiblich	67 (49%)
	männlich	71 (51%)
De-novo AML		111 (80%)

Sekundäre AML		27 (20%)
Therapie assoziiert		18 (13%)
ELN	günstig	34 (24%)
	intermediär	37 (27%)
	ungünstig	67 (49%)
TP53		23 (17%)
NPM1	gesamt	35 (25%)
	ELN günstig	21 (15%)
biallelic CEBPA		5 (4%)
FLT3	gesamt	46 (33%)
	ITD mit high allelic ratio $\geq 0,5$	10 (7%)
ASXL1	gesamt	12 (9%)
	ELN ungünstig	8 (6%)
RUNX1	gesamt	23 (17%)
	ELN ungünstig	21 (15%)

## 4.2. CR-Raten intensiver und nicht-intensiver Therapie

Das folgende Diagramm zeigt den Vergleich der prozentualen Häufigkeiten des Erreichens einer CR/CRi nach intensiver und nach nicht-intensiver Therapie der AML. Von den 138 intensiv therapierten Patient\*innen erreichten 109 eine CR/CRi, wodurch sich eine Rate von 78,99% ergibt. In der Gruppe der 65 nicht-intensiv therapierten Patient\*innen erreichen gerade einmal 6 eine CR/CRi. Die sich daraus ergebende Rate beträgt 9,52%. Der große Unterschied der CR-Raten der beiden Gruppen erweist sich als statistisch signifikant mit einem p-Wert von  $<0,001$  (Fishers exakter Test).

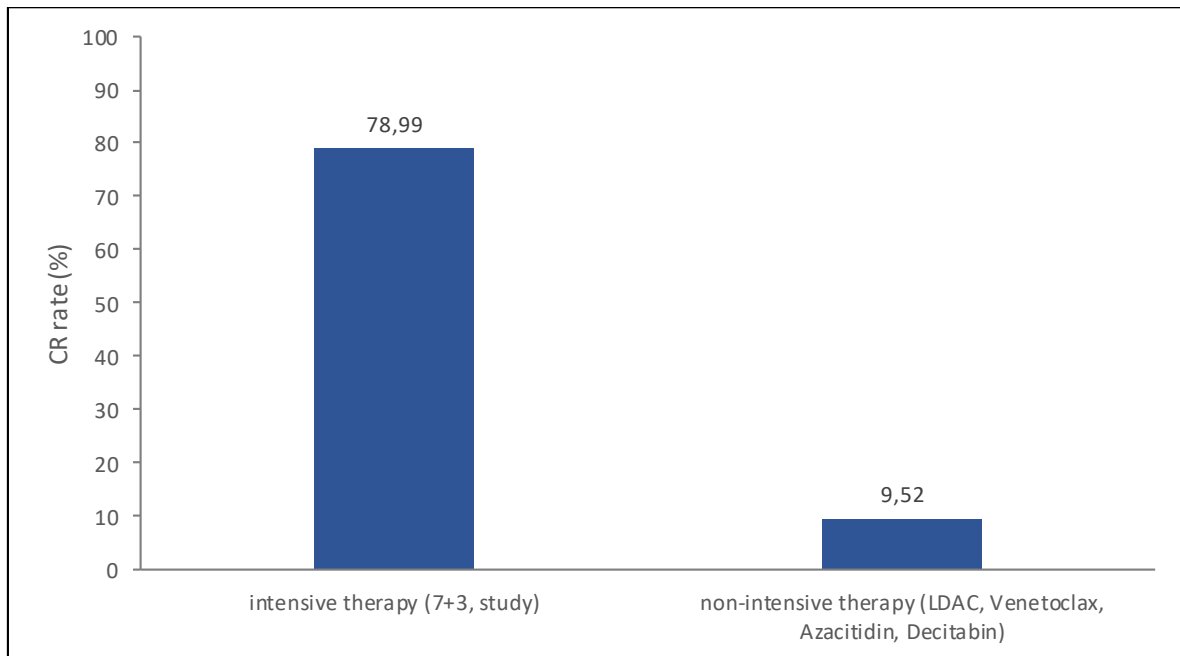


Abbildung 1: CR-Raten intensiv vs nicht-intensiv

### 4.3. Überlebenskurven

#### 4.3.1. OS der gesamten Kohorte

Die folgende Kaplan-Meier-Kurve zeigt den zeitlichen Verlauf der Wahrscheinlichkeit des OS der 236 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde. Dazu zählen intensiv, nicht-intensiv und nur mit BSC therapierte Patient\*innen. 164 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 72 wurden zensiert gewertet. Die mediane Überlebenszeit dieser gesamten Kohorte beträgt 0,78 Jahre ( $\approx$  285 Tage) (95%CI 0,56-0,99). Es zeigt sich eine 2-Jahres-Überlebensrate von 32,39% und eine 5-Jahres-Überlebensrate von gerade einmal 16,81%.

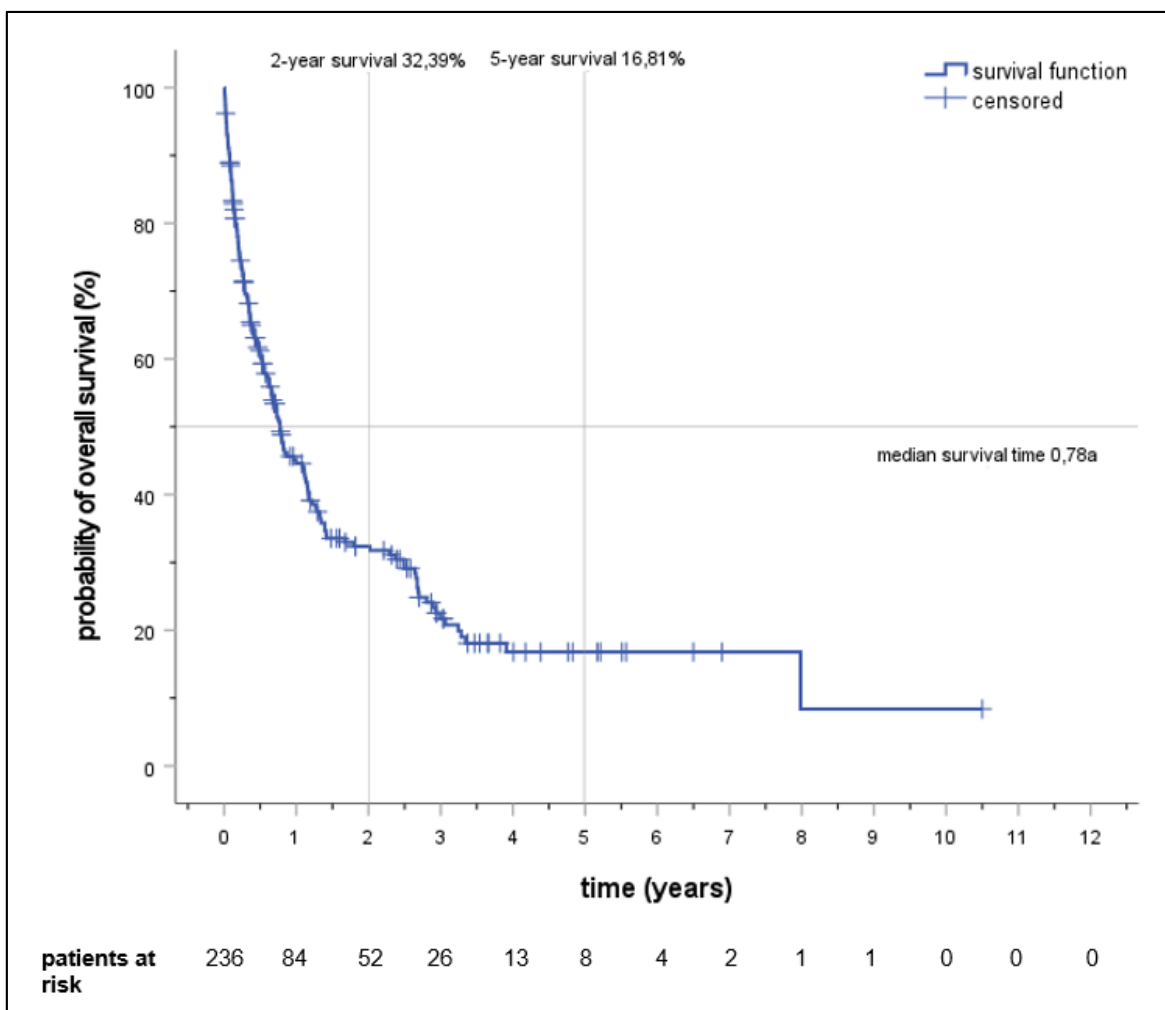


Abbildung 2: Überlebenskurve, OS der gesamten Kohorte

#### **4.3.2. OS der verschiedenen Therapiegruppen**

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen den zeitlichen Verlauf der Wahrscheinlichkeit des OS der 236 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer Therapie unterzogen wurden. Dazu zählen 138 intensiv, 65 nicht-intensiv und 33 nur mit BSC therapierte Patient\*innen. 164 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 72 wurden zensiert gewertet. Beträgt die mediane Überlebenszeit der intensiv therapierten Patient\*innen noch 1,68 Jahre (95%CI 0,64-2,71), reduziert sich diese bei den nicht-intensiv therapierten Patient\*innen auf 0,46 Jahre ( $\approx$  168 Tage) (95%CI 0,29-0,63) und bei den nur mit BSC therapierten Patient\*innen auf 0,1 Jahre ( $\approx$  37 Tage) (95%CI 0,07-0,12). Auch in den Überlebensraten setzt sich dieser Trend fort. Nach zwei Jahren leben nach intensiver Therapie 48,2%, nach nicht-intensiver Therapie 10,83% und nach BSC kein/keine Patient\*in mehr bzw. wurden die Patient\*innen als zensiert nicht weiter beobachtet. Nach fünf Jahren leben nur mehr 28,37% der intensiv therapierten Patient\*innen, während in den anderen beiden Gruppen bereits alle Patient\*innen verstorben oder als zensiert nicht weiter beobachtet worden sind. Diese in den Kurven grafisch dargestellten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Therapiegruppen sind mit einem p-Wert von  $<0,001$  signifikant (Log Rank).

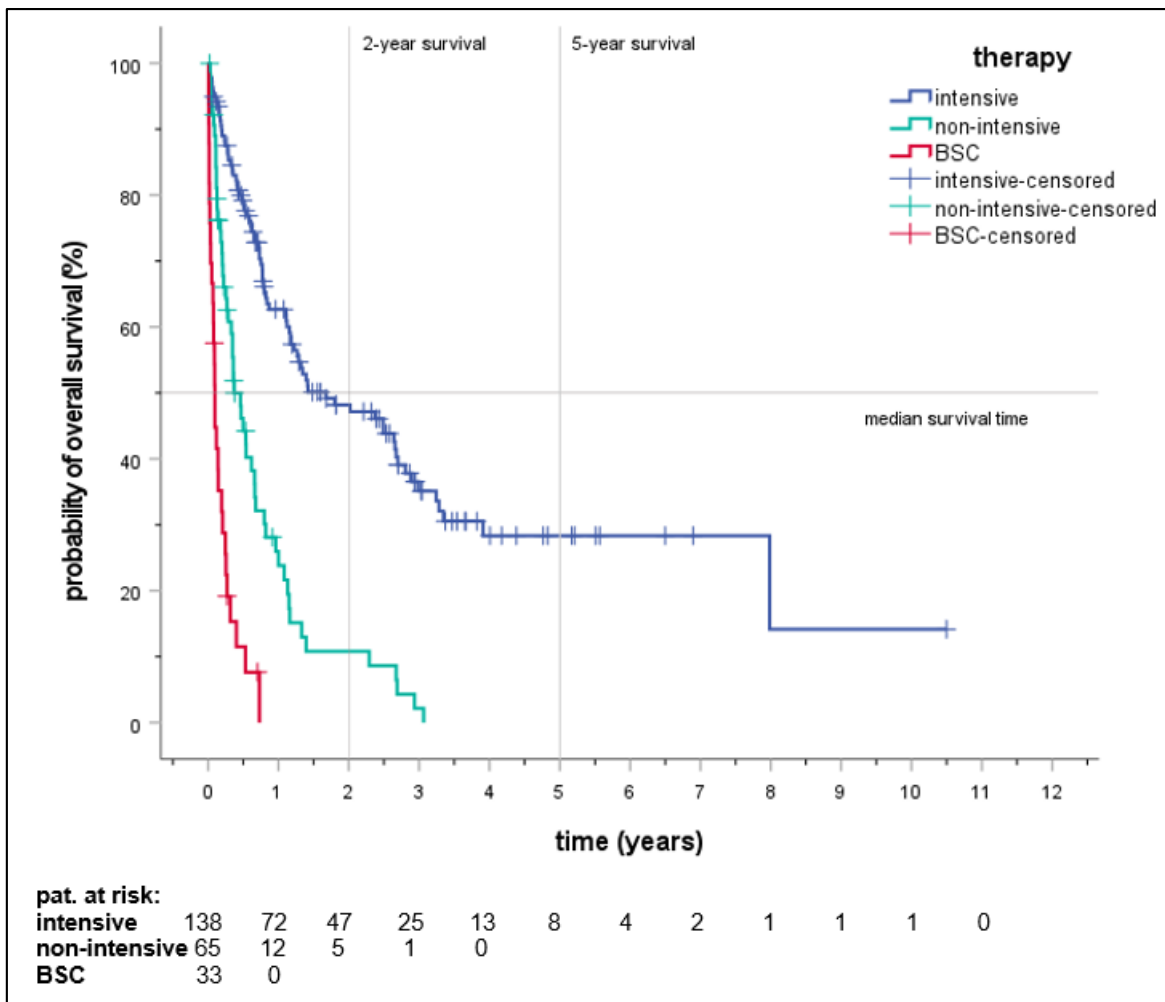


Abbildung 3: Überlebenskurven, OS therapierter Patient\*innen

In weiterer Folge wurde der etwaige Einfluss ausgewählter zum Diagnosezeitpunkt erhobener Parameter auf das OS untersucht. Die zu diesem Zweck erstellten Überlebenszeitanalysen wurden ausschließlich an der Kohorte der intensiv therapierten Patient\*innen durchgeführt.

#### 4.3.3. RFS intensiv therapierter Patient\*innen

Die unten angeführte Kaplan-Meier-Kurve zeigt den zeitlichen Verlauf der Wahrscheinlichkeit des RFS von 109 der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden. Wie im Kapitel 4.2. ersichtlich, erreichten 29 der 138 intensiv therapierten Patienten keine CR/CRi, weshalb sie auch kein RFS aufweisen konnten. 66 der anfangs genannten Patient\*innen erlitten ein

Rezidiv und waren während des Beobachtungszeitraumes noch am Leben oder verstarben nachweislich. 43 Patient\*innen wurden zensiert gewertet, was bedeutet, dass sie in dieser Zeitspanne am Leben waren und kein Rezidiv aufwiesen. Die mediane rezidivfreie Überlebenszeit dieser Kohorte beträgt 1,08 Jahre (95%CI 0,71-1,46).

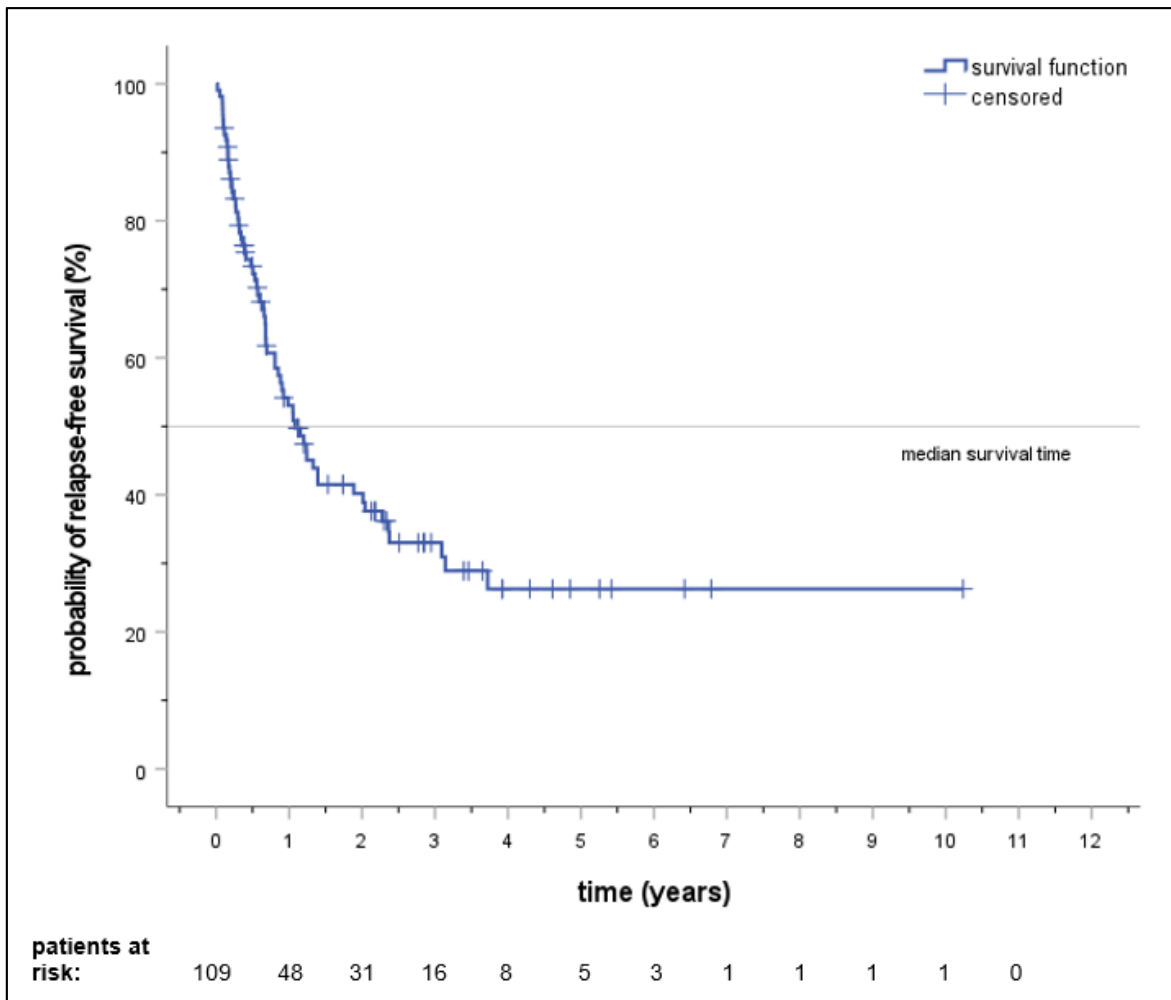


Abbildung 4: Überlebenskurve, RFS intensiv therapierter Patient\*innen

#### 4.3.4. EFS intensiv therapierter Patient\*innen

Die folgende Kaplan-Meier-Kurve zeigt den zeitlichen Verlauf der Wahrscheinlichkeit des EFS der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden. 91 dieser Patient\*innen wiesen im Untersuchungszeitraum ein „event“ auf, d.h. sie verstarben nachweislich oder sie waren am Leben, erlitten jedoch ein Rezidiv oder ein „treatment failure“. 47

Patient\*innen wurden zensiert (lebend und kein treatment failure oder Rezidiv) gewertet. Die mediane eventfreie Überlebenszeit dieser Kohorte beträgt 1,02 Jahre (95%CI 0,8-1,24).

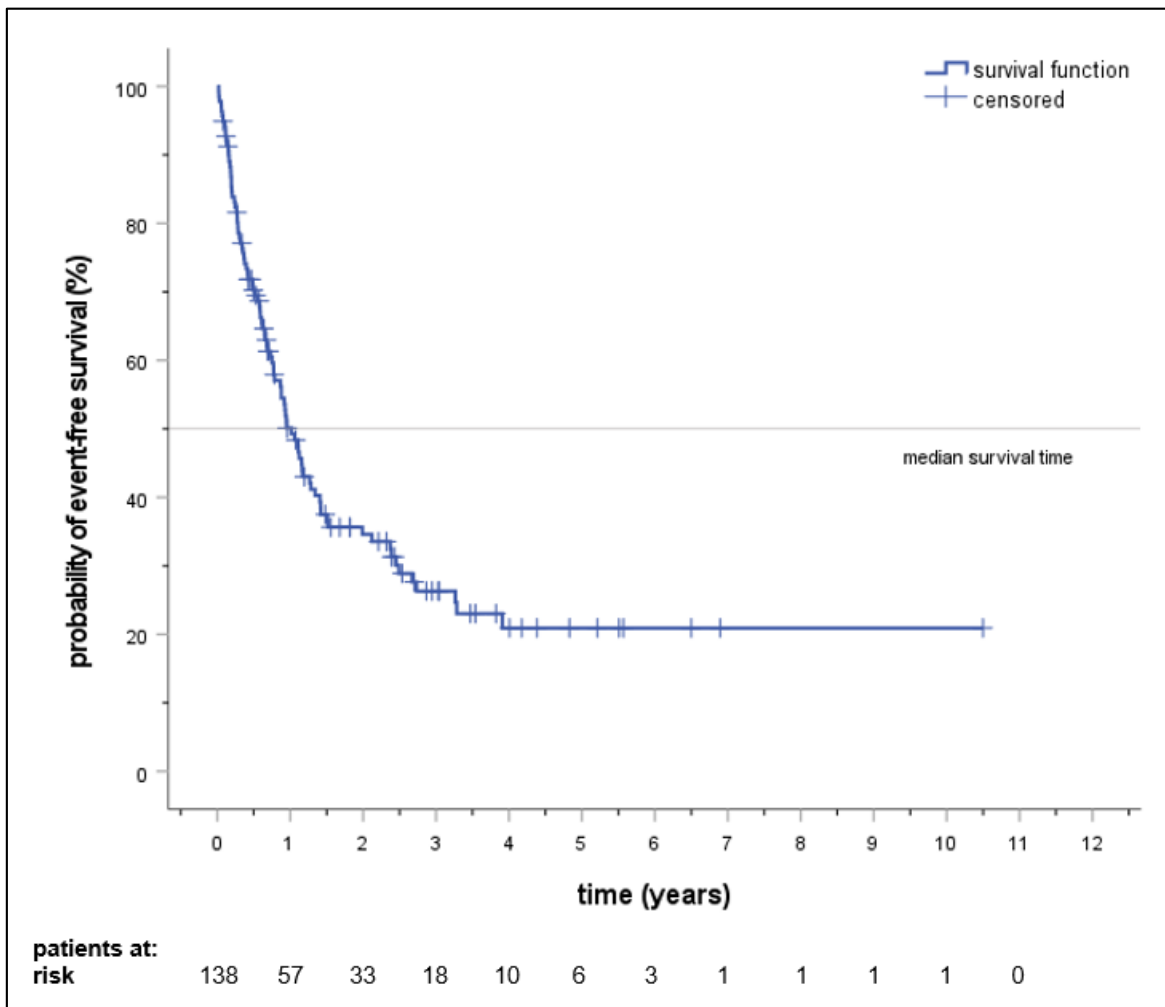


Abbildung 5: Überlebenskurve, EFS intensiv therapierter Patient\*innen

#### 4.3.5. OS $\leq 65$ -Jähriger und $>65$ -Jähriger intensiv therapierter Patient\*innen

Die folgenden Überlebenskurven zeigen den zeitlichen Verlauf der Wahrscheinlichkeit des OS der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden. 89 der Patient\*innen waren  $\leq 65$  und 49  $>65$  Jahre alt. 80 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 58 wurden zensiert gewertet. Die medianen Überlebenszeiten betragen bei den  $\leq 65$ -Jährigen 2,49 Jahre (95%CI 1,09-3,89) und bei den  $>65$ -Jährigen 1,27 Jahre (95%CI 0,91-1,62). Nach zwei

Beobachtungsjahren lebten noch 53,14% der ≤65-Jährigen und 39,98% der >65-Jährigen, nach fünf Jahren noch 34,14% und 19,22%. Diese in den Kurven grafisch dargestellten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Altersgruppen sind mit einem p-Wert von 0,053 knapp nicht signifikant (Log Rank).

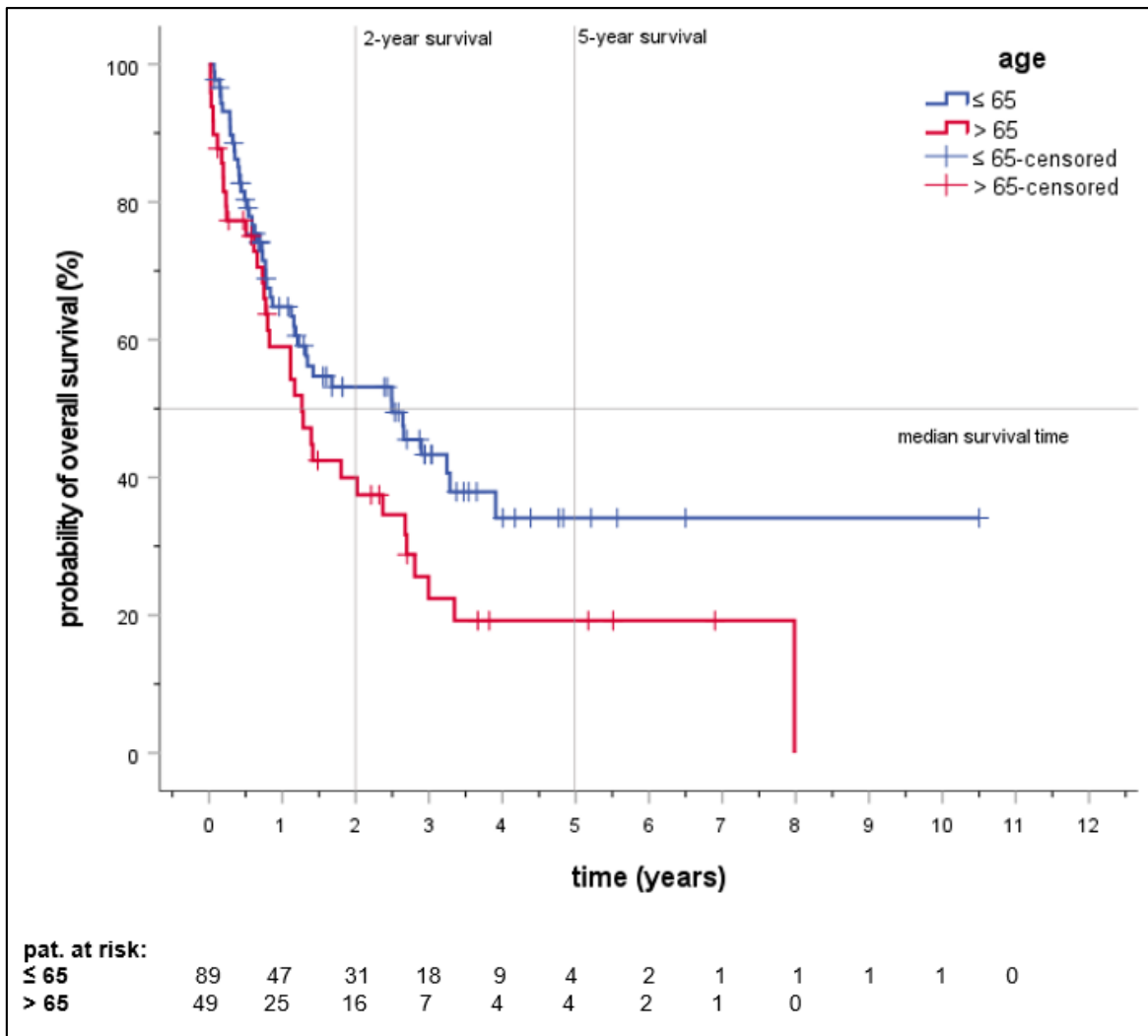


Abbildung 6: Überlebenskurven, OS ≤65-Jähriger und >65-Jähriger intensiv therapierter Patient\*innen

#### 4.3.6. OS weiblicher und männlicher intensiv therapierter Patient\*innen

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen den zeitlichen Verlauf der Wahrscheinlichkeit des OS der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden. Davon waren 67 dem weiblichen und 71 dem männlichen Geschlecht zugehörig. 80 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im

Untersuchungszeitraum, 58 wurden zensiert gewertet. Während die Frauen eine mediane Überlebenszeit von 2,49 Jahren (95%CI 1,13-3,85) aufwiesen, betrug diese bei Männern 1,29 Jahre (95%CI 0,98-1,59). Nach zwei Beobachtungsjahren lebten noch 52,9% der Frauen und 43,65% der Männer, nach fünf Jahren noch 32,41% und 24,02%. Diese in den Kurven grafisch dargestellten leichten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Geschlechter sind mit einem p-Wert von 0,099 nicht signifikant (Log Rank).

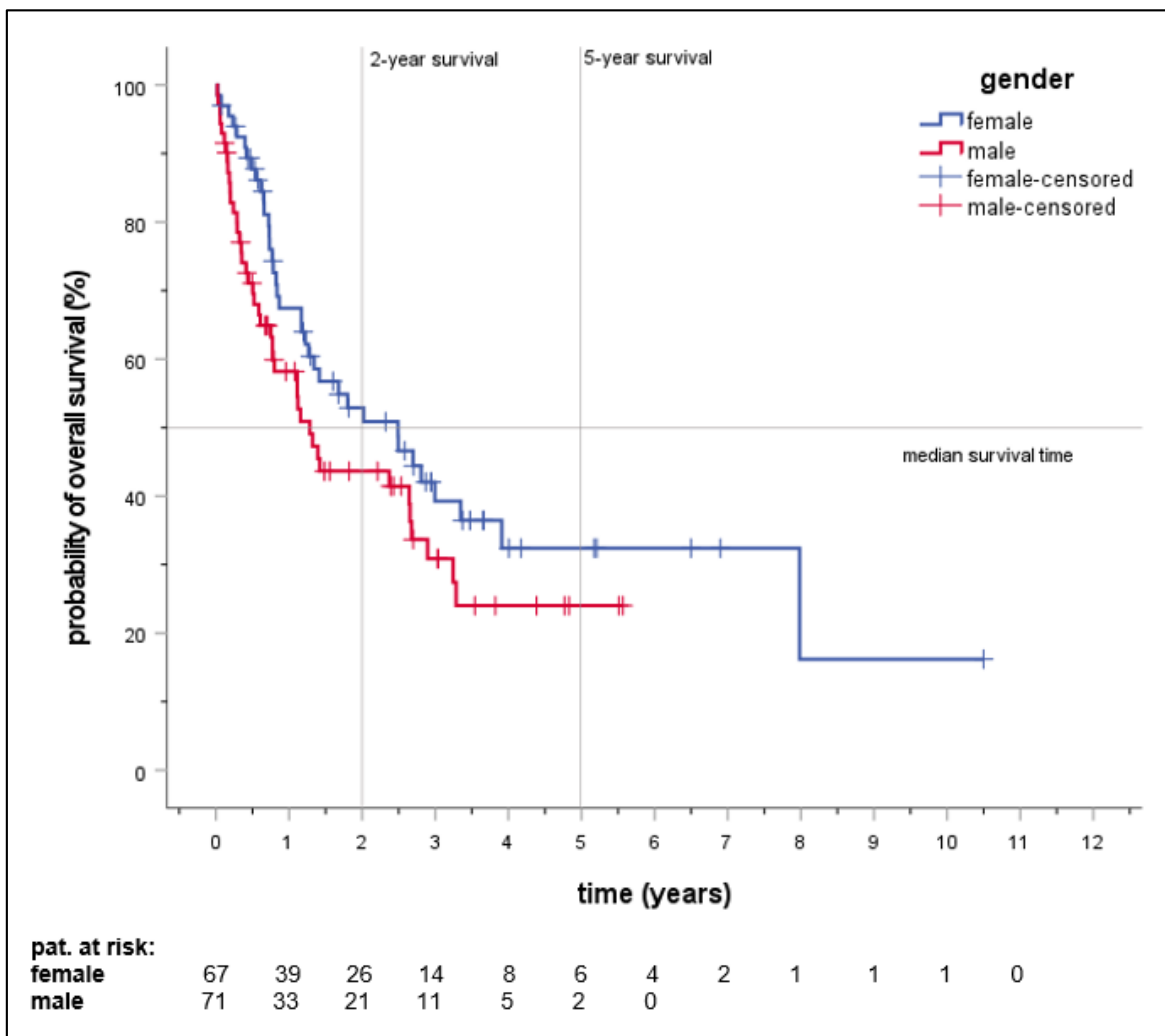


Abbildung 7: Überlebenskurven, OS weiblicher und männlicher intensiv therapierter Patient\*innen

#### **4.3.7. OS de-novo und sekundär diagnostizierter intensiv therapierter Patient\*innen**

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen den zeitlichen Verlauf der Wahrscheinlichkeit des OS der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden. Davon wurden 111 de-novo und 27 sekundär auf dem Boden einer vorbestehenden einschlägigen Erkrankung diagnostiziert. 80 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 58 wurden zensiert gewertet. Während die neu-diagnostizierten Patient\*innen eine mediane Überlebenszeit von 2,49 Jahren (95%CI 1,43-3,56) aufwiesen, betrug diese bei sekundärer AML 0,78 Jahre ( $\approx$  285 Tage) (95%CI 0,7-0,85). Nach zwei Beobachtungsjahren lebten noch 53,68% der neu-diagnostizierten und 24,75% der sekundär-diagnostizierten Patient\*innen, nach fünf Jahren noch 33,56% und 12,38%. Diese in den Kurven grafisch dargestellten Unterschiede der Überlebensdauer dieser beiden Gruppen sind mit einem p-Wert von 0,006 signifikant (Log Rank).

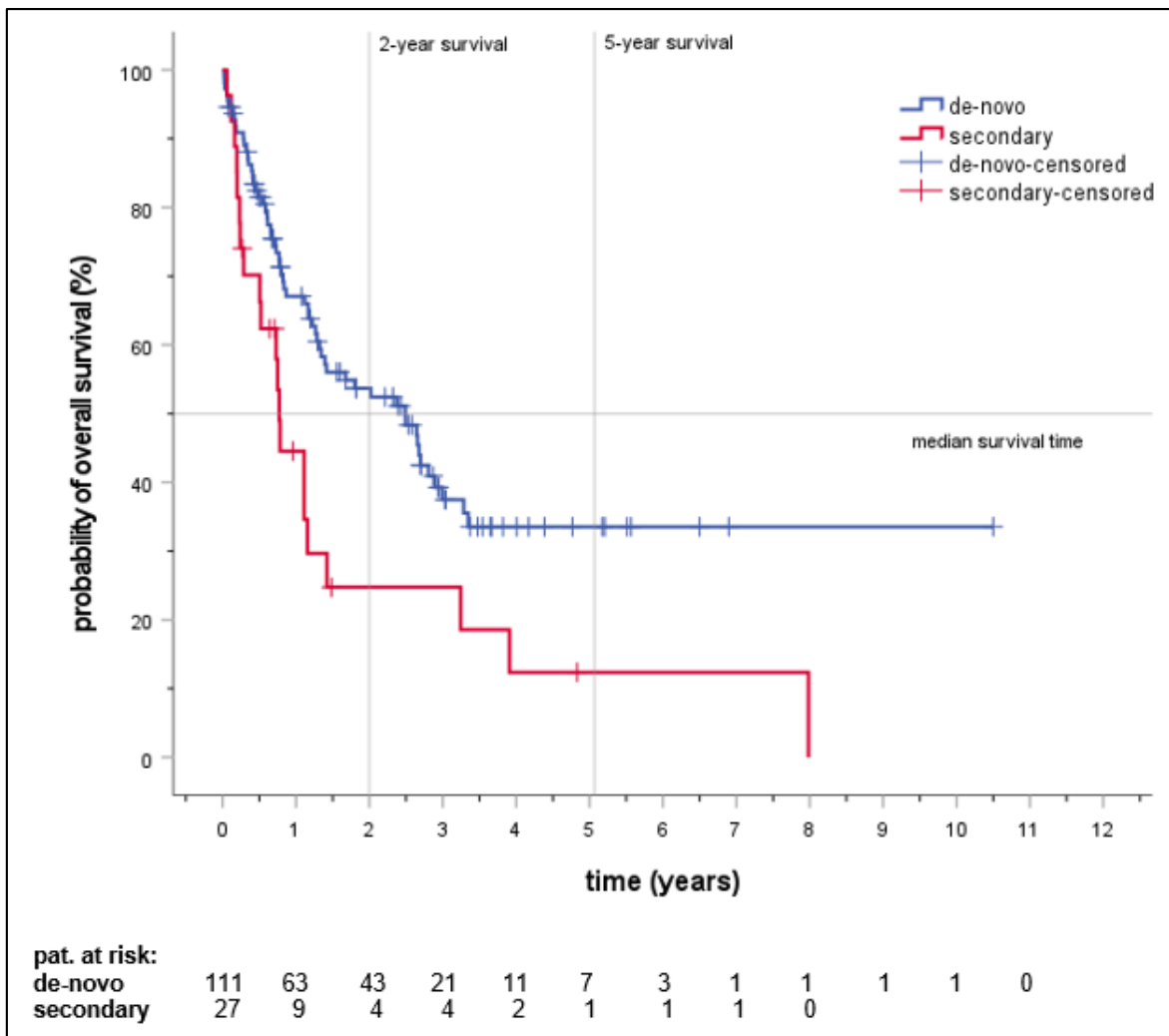


Abbildung 8: Überlebenskurven, OS de-novo und sekundär diagnostizierter intensiv therapierter Patient\*innen

#### 4.3.8. OS therapieassoziierter und nicht-therapieassoziierter intensiv therapierter Patient\*innen

Die folgenden Kaplan-Meier-Kurven zeigen den zeitlichen Verlauf der Wahrscheinlichkeit des OS der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden. Davon wiesen 120 eine nicht-therapieassoziierte und 18 eine therapieassoziierte Genese auf. 80 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 58 wurden zensiert gewertet. Die mediane Überlebenszeit der nicht-therapieassoziierten Patient\*innen betrug 1,42 Jahre (95%CI 0,39-2,45), die der therapieassoziierten Patient\*innen 3 Jahre (95%CI 0-6,17). Nach zwei Beobachtungsjahren lebten noch

47,48% der nicht-therapieassoziierten und 53,33% der therapieassoziierten Patient\*innen, nach fünf Jahren noch 26,8% und 35,56%. Diese in den Kurven grafisch dargestellten leichten Unterschiede der Überlebensdauer der beiden Gruppen sind mit einem p-Wert von 0,331 nicht signifikant (Log Rank).

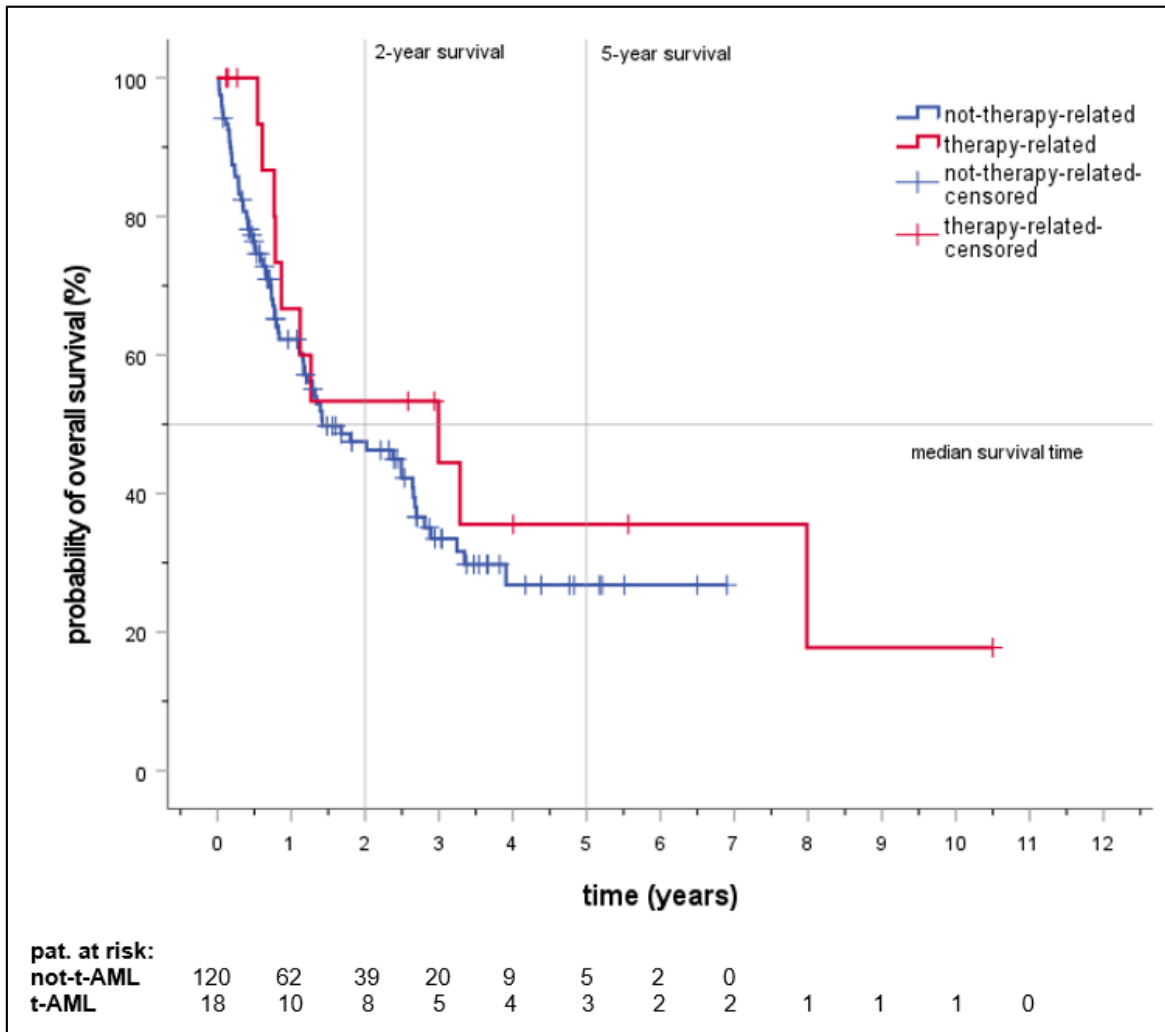


Abbildung 9: Überlebenskurven, OS therapieassoziiierter und nicht-therapieassoziiierter intensiv therapierter Patient\*innen

#### 4.3.9. OS von intensiv therapierten und nach ELN 2017 risikostratifizierten Patient\*innen

Die folgenden Kaplan-Meier-Kurven zeigen den zeitlichen Verlauf der Wahrscheinlichkeit des OS der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden. Davon wurden 35 als günstig, 37 als

intermediär und 66 als ungünstig nach ELN 2017 risikostratifiziert. 80 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 58 wurden zensiert gewertet. Während der Median der Überlebenszeit von der Gruppe der günstig stratifizierten Patient\*innen nicht erreicht wird, fällt er bei den intermediär Stratifizierten auf 1,8 Jahre (95%CI 0,77-2,83) und bei den ungünstig Stratifizierten auf 1,11 Jahre (95%CI 0,66-1,57) ab. Auch in den Überlebensraten setzt sich dieser Trend fort. Nach zwei Jahren leben günstig Risikostratifizierte mit 67,7%iger, intermediär Risikostratifizierte mit 48,75%iger und ungünstig Risikostratifizierte mit 38,12%iger Wahrscheinlichkeit. Nach fünf Beobachtungsjahren sind noch 57,28% der günstig Stratifizierten am Leben, während in der Gruppe der intermediär Stratifizierten alle Patient\*innen verstorben oder als zensiert nicht weiter beobachtet worden sind und in der Gruppe der ungünstig Stratifizierten mit 20,87% deutlich schlechtere Raten bestehen. Diese in den Kurven grafisch dargestellten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Risikogruppen sind mit einem p-Wert von 0,014 signifikant (Log Rank).

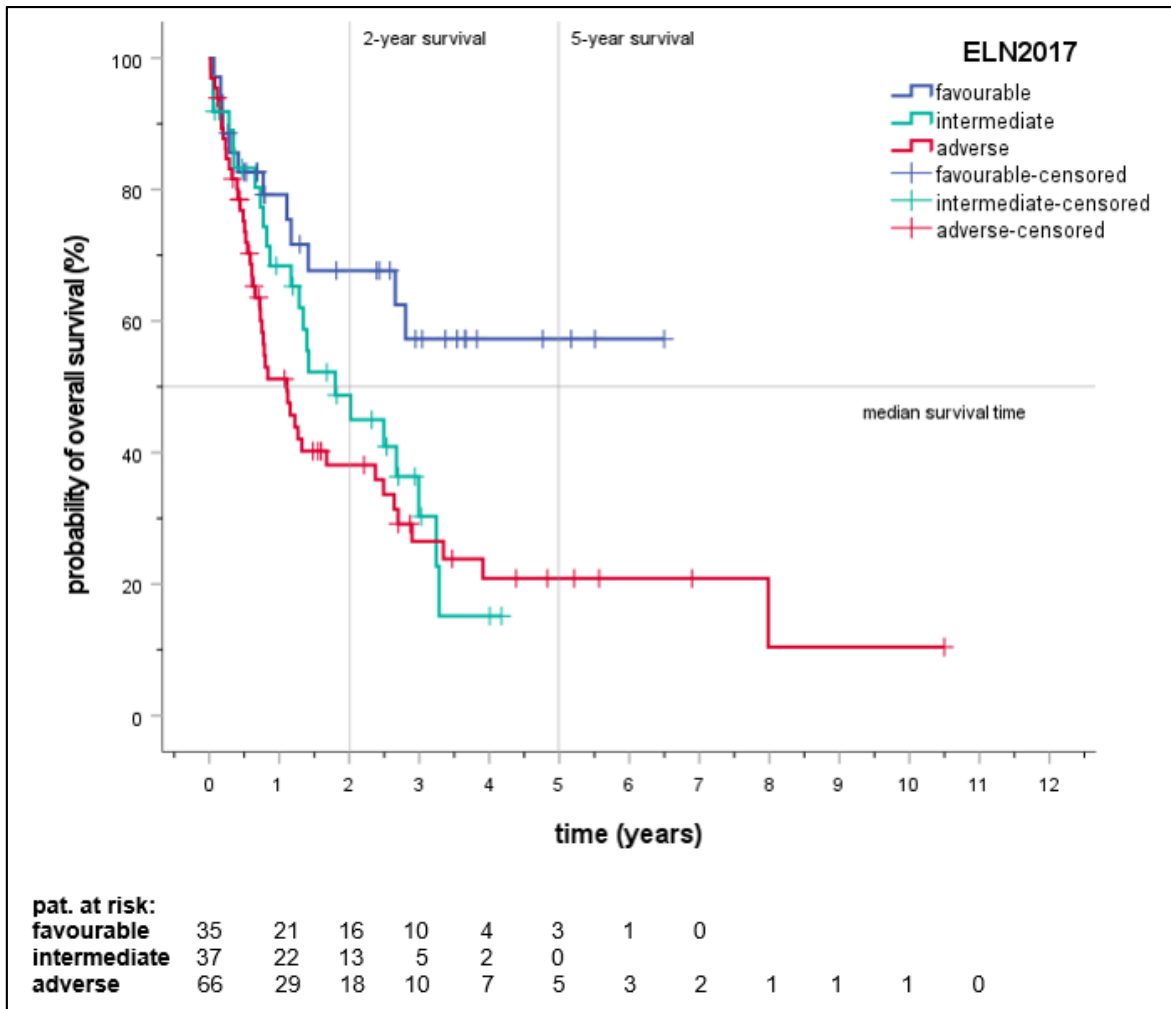


Abbildung 10: Überlebenskurven, OS von intensiv therapierten und nach ELN 2017 risikostratifizierten Patient\*innen

## 4.4. Next-Generation Sequencing

### 4.4.1. Häufigkeitsverteilung der Mutationen

Die untenstehenden Darstellungen dienen der Veranschaulichung der Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher untersuchter Mutationen welche bei den 138 AML-Patient\*innen, bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden, gefunden wurden. Insgesamt werden 49 verschiedene Mutationen gezeigt, wovon 40 in der untersuchten Kohorte auftraten. Die Mutationen BRAF, CALR, CXCR4, ELANE, EZH2, MPL, SFRP1, STAT3 und STAT5B wurden erhoben, waren jedoch bei keiner Testperson positiv. Zu den 45 durch NGS detektierten Mutationen wurden zusätzlich high ratio ( $\geq 0,5$ ) FLT3-ITDs und drei zytogenetische in der ELN 2017

berücksichtigte Mutationen,  $inv(16)/t(16;16)$ ,  $inv(3)/t(3;3)$ ,  $t(8;21)$ , in der Häufigkeitsverteilung angeführt.

Die Integration der ELN 2017 in die Darstellungen soll veranschaulichen, in welche Risikogruppe, Patienten, bei denen eine bestimmte Mutation entdeckt wurde, eingeteilt wurden. Beispielhaft lässt sich anhand des Balkens der TP53 Mutation einfach erkennen, dass alle diese Mutation aufweisenden Patienten, unabhängig von sonstigen genetischen Faktoren, korrekt laut ELN zur adverse risk group gezählt wurden.

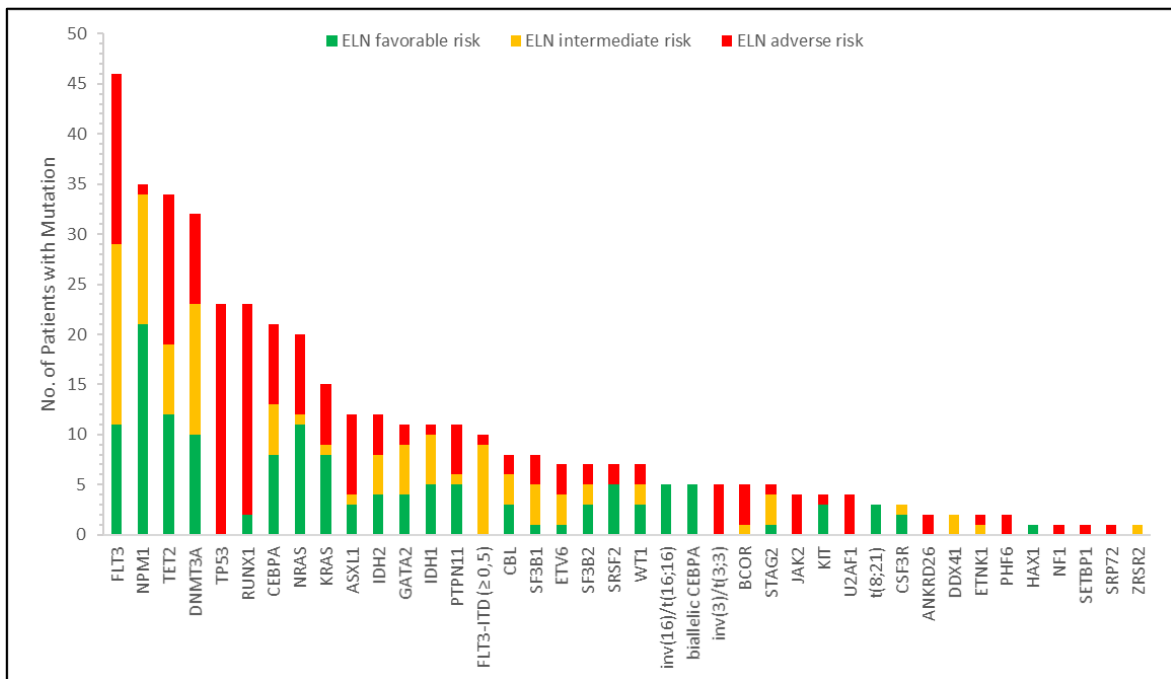


Abbildung 11: Diagramm 1, Häufigkeitsverteilung der Mutationen

In der zweiten Darstellung zur Häufigkeitsverteilung der untersuchten Mutationen lassen sich die individuellen Mutationsprofile der einzelnen Patienten ausgenommen von bestimmten nicht dargestellten zytogenetischen Mutationen nachvollziehen. Ein Kästchen auf der horizontalen Achse steht für einen Patienten, wobei Informationen, welche möglicherweise auf Individuen rückschließen lassen könnten, aus Datenschutzgründen entfernt wurden.

Dadurch lässt sich nachvollziehen, dass meist nicht einzelne Mutationen, sondern deren Kombinationen die Einteilung in eine Risikogruppe nach ELN 2017 bedingen. Zusätzlich wurden sowohl die Häufigkeiten der Mutationen von oben nach unten absteigend als auch die Mutationslast der Patienten von links nach rechts abnehmend dargestellt.

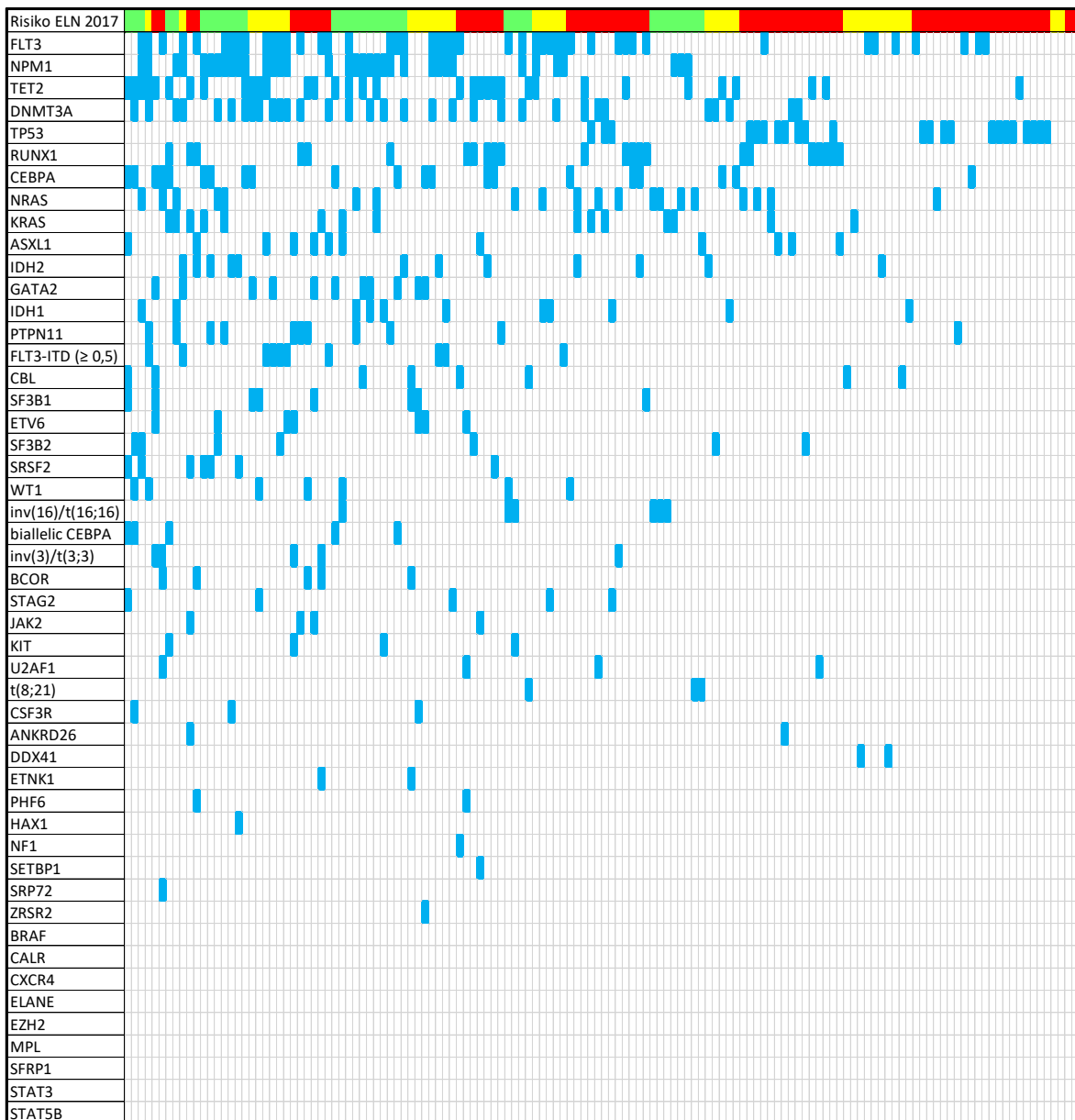
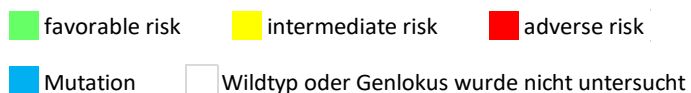


Abbildung 12: Diagramm 2, Häufigkeitsverteilung Mutationen



#### 4.4.2. OS intensiv therapierter Patient\*innen mit und ohne TP53 Mutation

Die folgenden Kaplan-Meier-Kurven zeigen den zeitlichen Verlauf der Wahrscheinlichkeit des OS der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden. Davon wiesen 23 eine TP53 Mutation und 115 einen TP53 Wildtyp auf. 80 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im

Untersuchungszeitraum, 58 wurden zensiert gewertet. Während Patient\*innen mit TP53 Wildtyp eine mediane Überlebenszeit von 2,02 Jahren (95%CI 0,88-3,16) aufwiesen, währte diese bei Patient\*innen mit einer TP53 Mutation nur 0,84 Jahre ( $\approx$  307 Tage) (95%CI 0,35-1,32). Nach zwei Beobachtungsjahren lebten noch 51,06% der Personen ohne und 32,57% der Personen mit TP53 Mutation, nach fünf Jahren noch 29,28% und 24,43%. Diese in den Kurven grafisch dargestellten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Genetik sind mit einem p-Wert von 0,108 nicht signifikant (Log Rank).

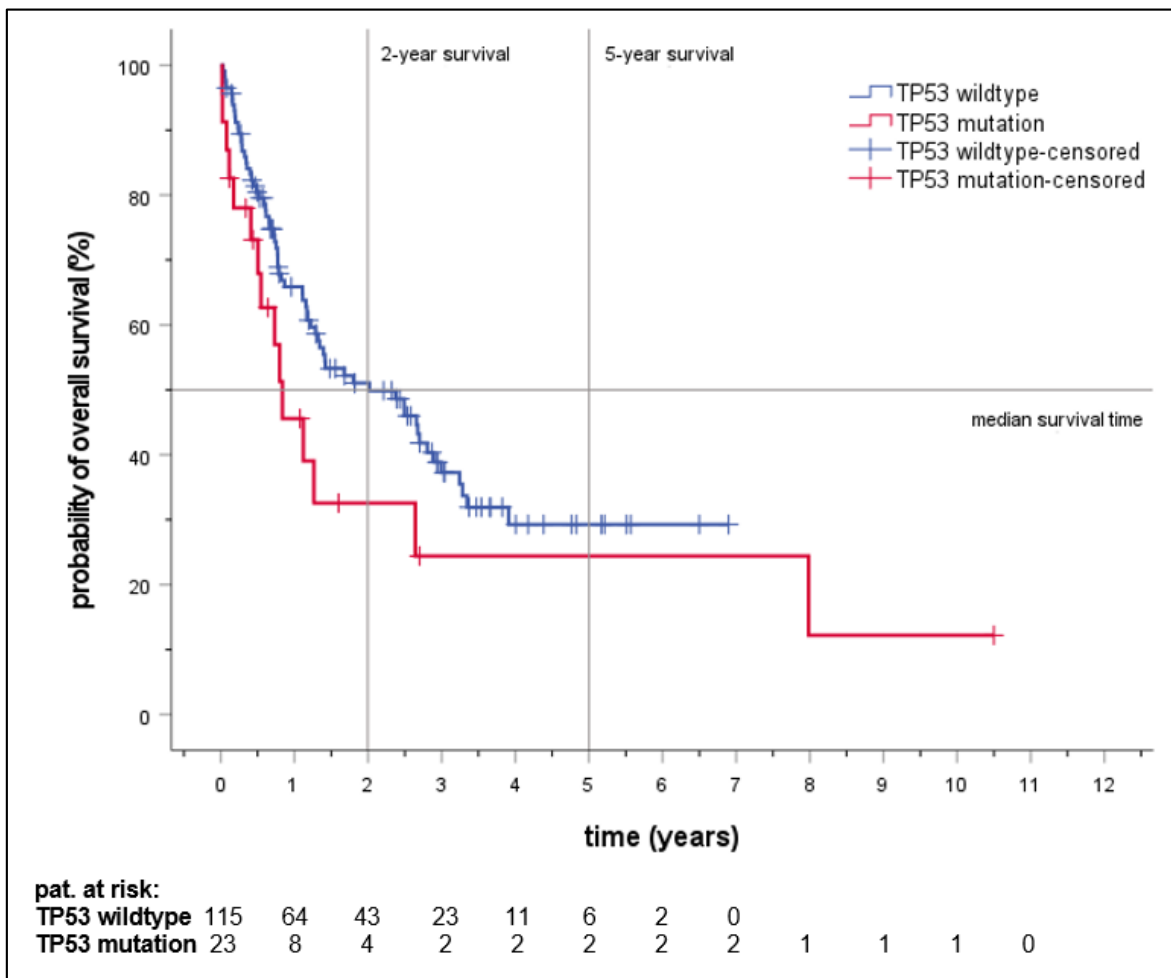


Abbildung 13: Überlebenskurven, OS intensiv therapierter Patient\*innen mit und ohne TP53 Mutation

#### 4.4.3. OS intensiv therapierter Patient\*innen mit und ohne NPM1 Mutation

Die Kaplan-Meier-Kurven stellen die Wahrscheinlichkeit des OS von 132 der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden dar. Bei

den fehlenden 6 Patienten wurde dieser Mutation nicht untersucht. Von den untersuchten Patient\*innen wiesen 35 eine NPM1 Mutation und 97 den Wildtyp auf. 77 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 55 wurden zensiert gewertet. Die mediane Überlebenszeit betrug ohne Mutation 2,37 (95%CI 1,21-3,53) und mit Mutation 1,17 Jahre (95%CI 0,54-1,8). Nach zwei Beobachtungsjahren lebten noch 52,48% der Personen ohne und 36,1% der Personen mit TP53 Mutation, nach fünf Jahren noch 27,59% und 30,08%. Diese in den Kurven grafisch dargestellten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Genetik sind mit einem p-Wert von 0,265 nicht signifikant (Log Rank).

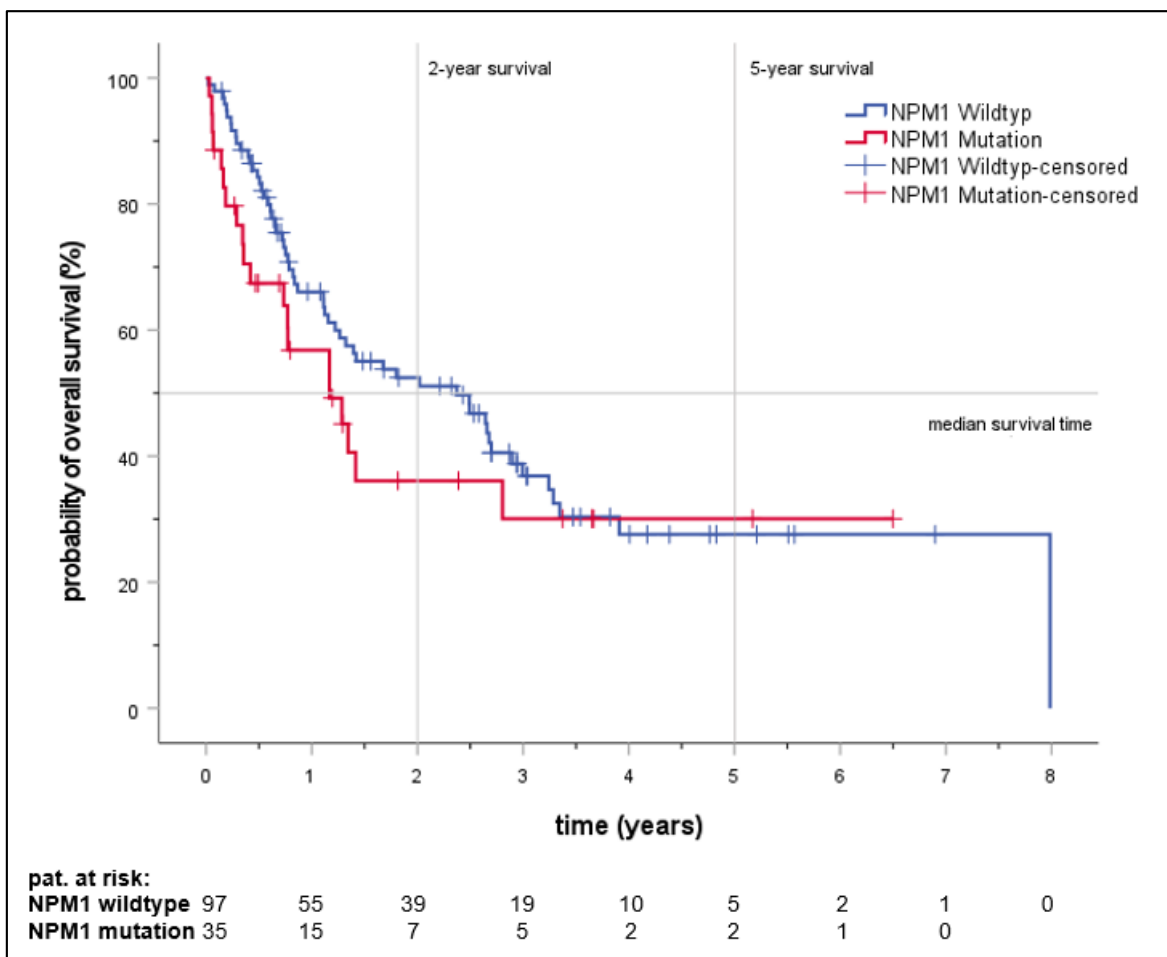


Abbildung 14: Überlebenskurven, OS intensiv therapierter Patient\*innen mit und ohne NPM1 Mutation

#### **4.4.4. OS intensiv therapierter Patient\*innen mit NPM1 Mutation ohne FLT3-ITD/mit FLT3-ITD mit low allelic ratio <0,5 versus Rest der intensiv therapierten Kohorte**

Die Kaplan-Meier-Kurven stellen die Wahrscheinlichkeit des OS von 132 der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden dar. Bei den fehlenden 6 Patienten wurde dieser Mutation nicht untersucht. Von den untersuchten Patient\*innen wiesen 21 eine NPM1 Mutation ohne FLT3-ITD/mit FLT3-ITD mit low allelic ratio <0,5 (= Gruppe1) auf. Die übrigen 111 Patient\*innen wurden zum Rest der intensiv therapierten Kohorte gezählt (= Gruppe2). 77 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 55 wurden zensiert gewertet. Die mediane Überlebenszeit betrug in Gruppe1 2,81 und in Gruppe2 1,42 Jahre (95%CI 0,42-2,42). Nach zwei Beobachtungsjahren lebten noch 56,41% der Gruppe1 und 47,12% der Gruppe2, nach fünf Jahren noch 47,01% und 24,77%. Diese in den Kurven grafisch dargestellten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Genetik sind mit einem p-Wert von 0,305 nicht signifikant (Log Rank).

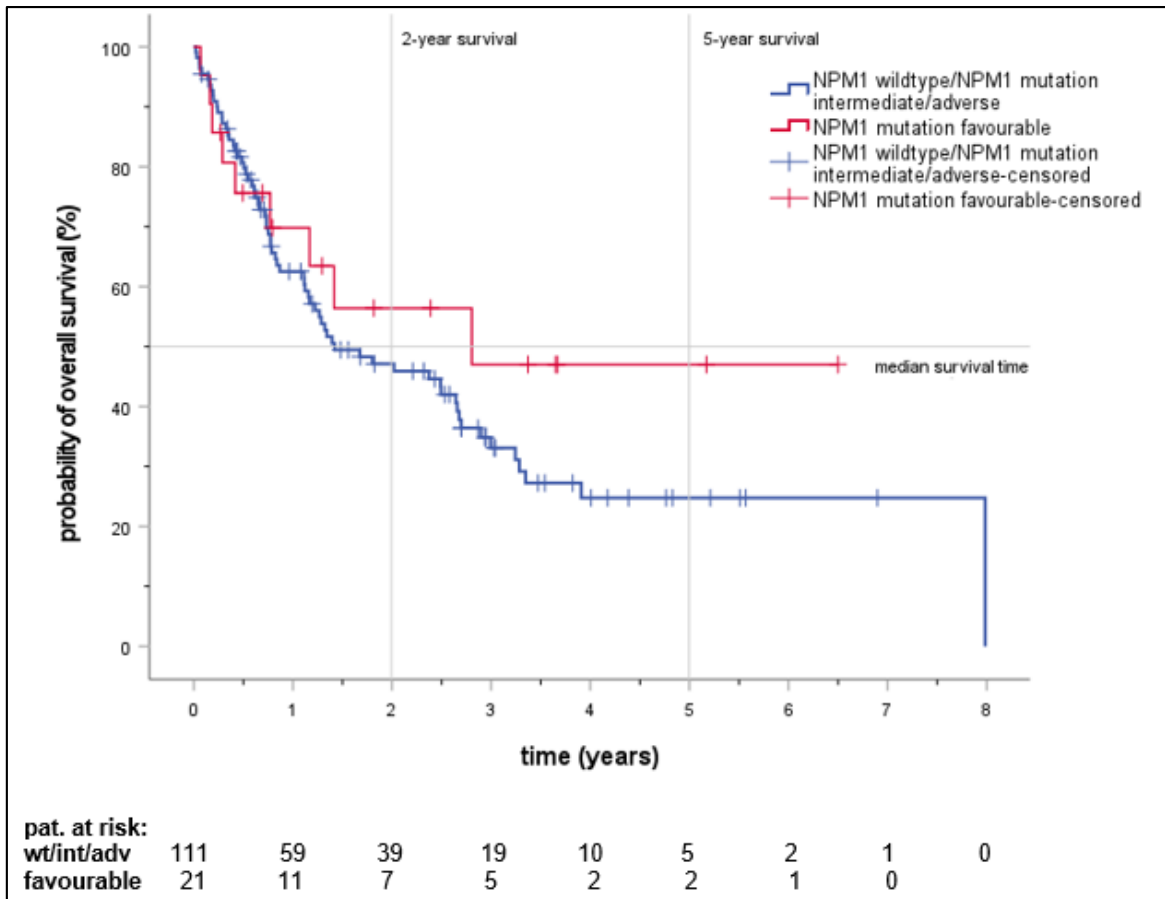


Abbildung 15: OS intensiv therapierter Patient\*innen mit NPM1 Mutation ohne FLT3-ITD/mit FLT3-ITD mit low allelic ratio <0,5 versus Rest der intensiv therapierten Kohorte

#### 4.4.5. OS intensiv therapierter Patient\*innen mit und ohne biallelic CEBPA Mutation

Die Kaplan-Meier-Kurven stellen die Wahrscheinlichkeit des OS von 132 der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden, dar. Bei den fehlenden 6 Patienten wurde dieser Mutation nicht untersucht. Von den untersuchten Patient\*innen wiesen 127 entweder einen CEBPA Wildtyp oder eine monoallelic CEBPA Mutation und nur 5 eine biallelic CEBPA Mutation auf.

77 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 55 wurden zensiert gewertet. Während Patient\*innen mit CEBPA Wildtyp/monoallelic CEBPA eine mediane Überlebenszeit von 1,68 Jahren (95%CI 0,6-2,76) aufwiesen, wird der Median bei Patient\*innen mit einer biallelic CEBPA nicht erreicht. Nach zwei Beobachtungsjahren lebten noch 48,22% der Personen ohne und 53,33% der

Personen mit einer CEBPA Mutation auf beiden Allelen, nach fünf Jahren noch 27,24% der wildtyp/monoallelic Gruppe. Bei der biallelic Gruppe gibt es keinen so lange dauernden Beobachtungszeitraum. Diese in den Kurven grafisch dargestellten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Genetik sind mit einem p-Wert von 0,589 nicht signifikant (Log Rank).

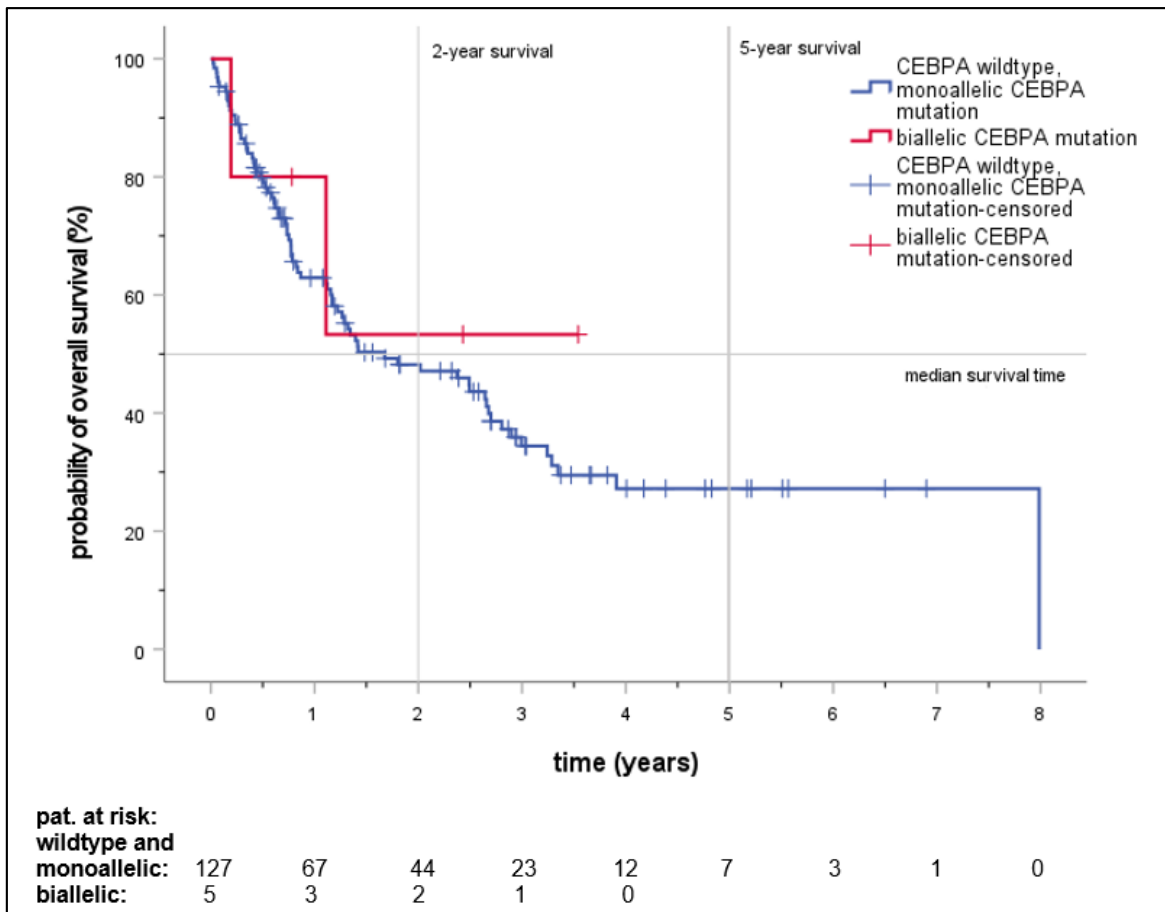


Abbildung 16: Überlebenskurven, OS intensiv therapierter Patient\*innen mit und ohne biallelic CEBPA Mutation

#### 4.4.6. OS FLT3-ITD mit high allelic ratio $\geq 0,5$ intensiv vs FLT3 Wildtyp/FLT3 Mutation ohne ITD/low allelic ratio $< 0,5$

Die folgenden Kaplan-Meier-Kurven stellen die Wahrscheinlichkeit des OS von 133 der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden dar. Bei den fehlenden 5 Patienten wurde dieser Mutation nicht untersucht. Von den untersuchten Patient\*innen wiesen 123 entweder einen FLT3 Wildtyp oder eine FLT3 Mutation ohne ITD oder eine ITD mit einem low allelic ratio von  $< 0,5$  und

nur 10 eine FLT3-ITD mit einem high allelic ratio von  $\geq 0,5$ , auf. 78 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 55 wurden zensiert gewertet. Während Patient\*innen ohne eine high allelic ratio FLT3-ITD eine mediane Überlebenszeit von 2,37 Jahren (95%CI 1,32-3,43) aufwiesen, währte diese bei Patient\*innen mit ebendieser Mutation nur 0,36 Jahre ( $\approx 132$  Tage) (95%CI 0-0,89). Nach zwei Beobachtungsjahren wurden noch 51,14% der Personen ohne und keine Person mit einer FLT3-ITD mit high allelic ratio  $\geq 0,5$  beobachtet oder als lebend dokumentiert. Nach fünf Jahren lebten noch 29,44% der ersteren Gruppe, während die Personen der Gruppe mit dem high allelic ratio bereits alle verstorben oder als zensiert nicht weiter beobachtet worden sind. Diese in den Kurven grafisch dargestellten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Genetik sind mit einem p-Wert von  $<0,001$  signifikant (Log Rank).

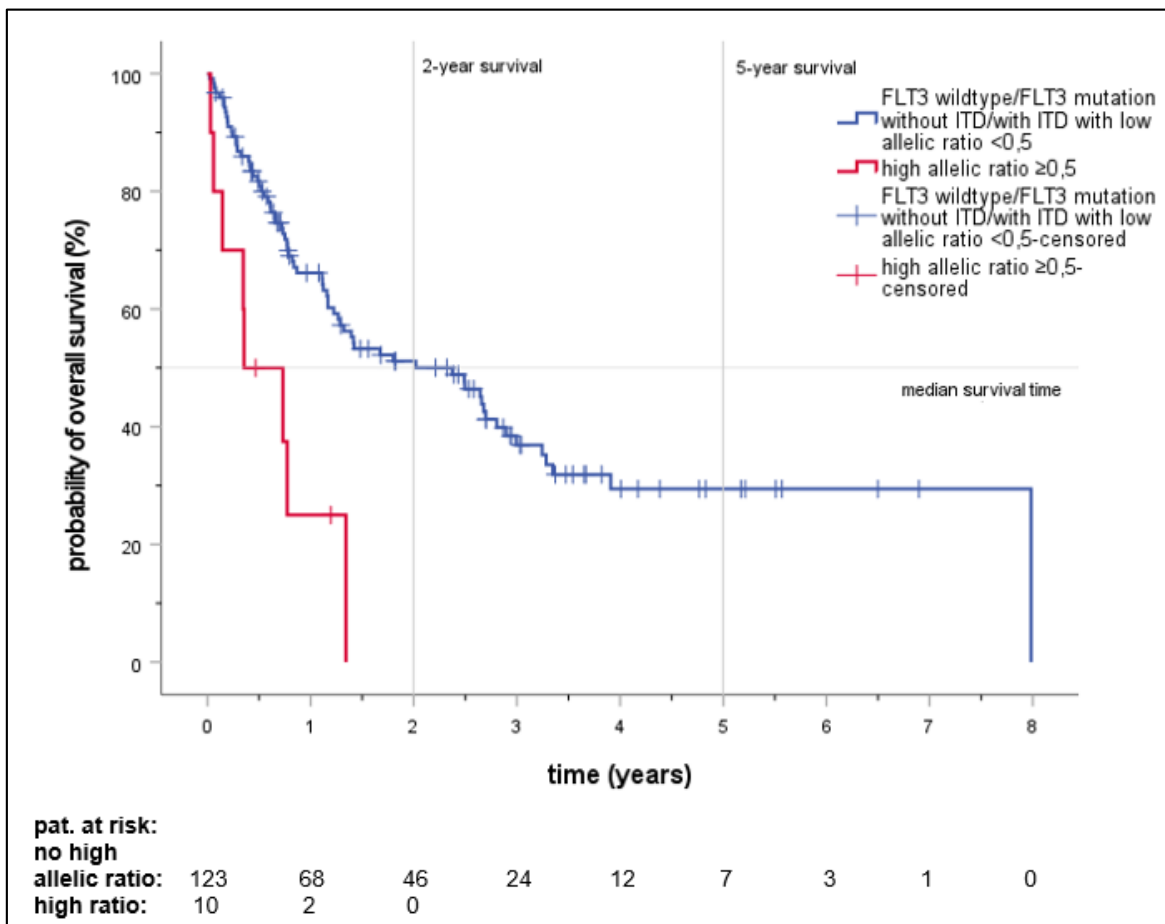


Abbildung 17: Überlebenskurven, OS FLT3-ITD mit high allelic ratio  $\geq 0,5$  intensiv vs FLT3 Wildtyp/FLT3 Mutation ohne ITD/low allelic ratio  $<0,5$

#### **4.4.7. OS intensiv therapierter Patient\*innen mit und ohne ASXL1 Mutation**

Die Kaplan-Meier-Kurven stellen die Wahrscheinlichkeit des OS von 132 der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden dar. Bei den fehlenden 6 Patienten wurde dieser Mutation nicht untersucht. Von den untersuchten Patient\*innen wiesen 120 einen ASXL1 Wildtyp und nur 12 eine ASXL1 Mutation auf. 77 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 55 wurden zensiert gewertet. Während Patient\*innen mit ASXL1 Wildtyp eine mediane Überlebenszeit von 1,68 Jahren (95%CI 0,67-2,68) aufwiesen, währte diese bei Patient\*innen mit einer ASXL1 Mutation 1,11 Jahre (95%CI 0-3,01). Nach zwei Beobachtungsjahren lebten noch 48,88% der Personen ohne und 46,3% der Personen mit ASXL1 Mutation, nach fünf Jahren noch 27,65% und 30,86%. Diese in den Kurven grafisch dargestellten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Genetik sind mit einem p-Wert von 0,901 nicht signifikant (Log Rank).

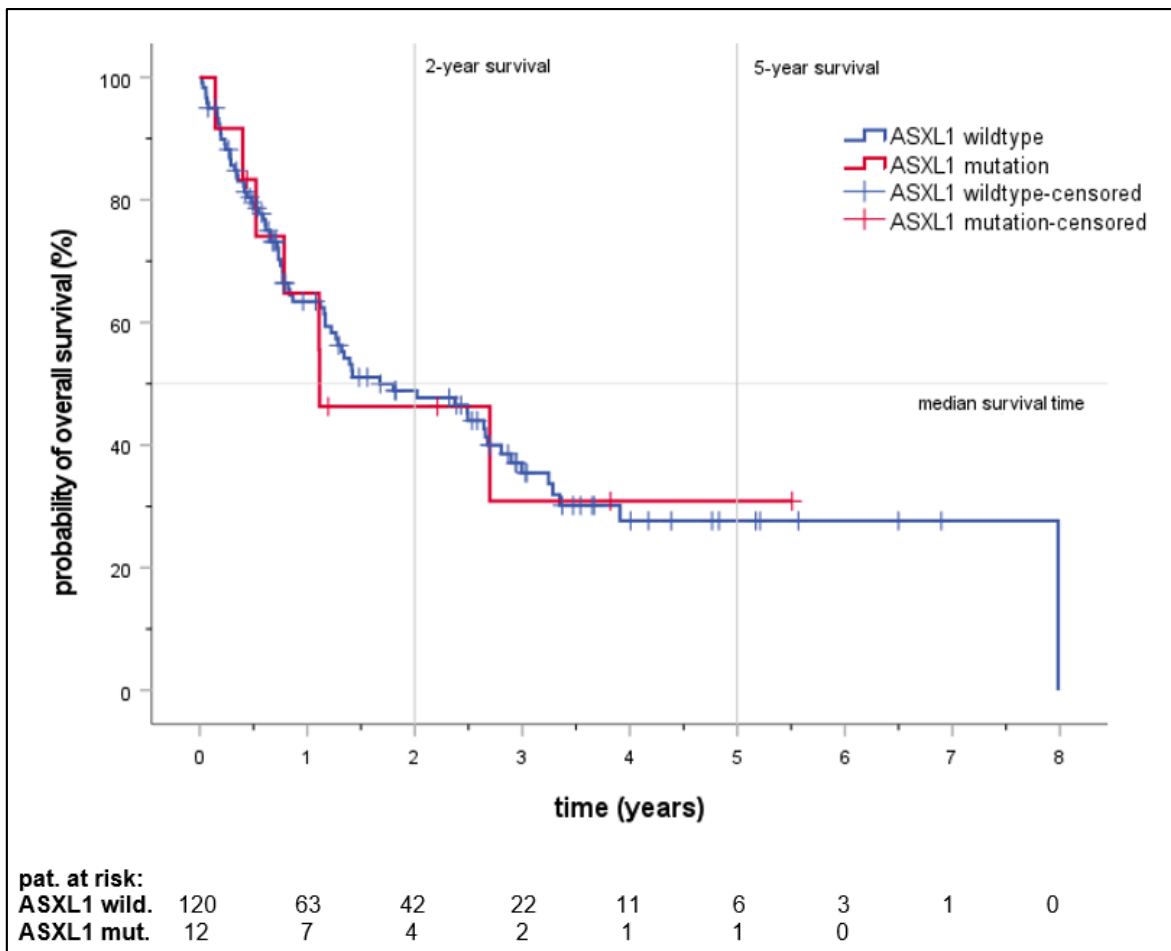


Abbildung 18: Überlebenskurven, OS intensiv therapierter Patient\*innen mit und ohne ASXL1 Mutation

#### 4.4.8. OS intensiv therapierter Patient\*innen mit ASXL1 Mutation und ungünstiger Risikostratifizierung nach ELN 2017 vs ASXL1 Wildtyp und ASXL1 Mutation und günstiger/intermediärer Risikostratifizierung

Die Kaplan-Meier-Kurven stellen die Wahrscheinlichkeit des OS von 132 der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden dar. Bei den fehlenden 6 Patienten wurde dieser Mutation nicht untersucht. Von den untersuchten Patient\*innen wiesen 8 eine ASXL1 Mutation mit einer ungünstigen Risikostratifizierung (= Gruppe1) und 124 den Wildtyp oder eine ASXL1 Mutation mit günstiger/intermediärer Risikostratifizierung (= Gruppe2) auf. 77 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 55 wurden zensiert gewertet. Die mediane Überlebenszeit betrug in Gruppe1 0,79 Jahre

(95%CI 0,14-1,43) und in Gruppe2 1,8 Jahre (95%CI 0,78-2,82). Nach zwei Beobachtungsjahren lebten noch 30% der Gruppe1 und 49,63% der Gruppe2. Nach fünf Jahren sind in Gruppe1 bereits alle Patient\*innen verstorben oder als zensiert nicht weiter beobachtet worden, während in Gruppe2 29,3% noch am Leben sind. Diese in den Kurven grafisch dargestellten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Genetik sind mit einem p-Wert von 0,116 nicht signifikant (Log Rank).

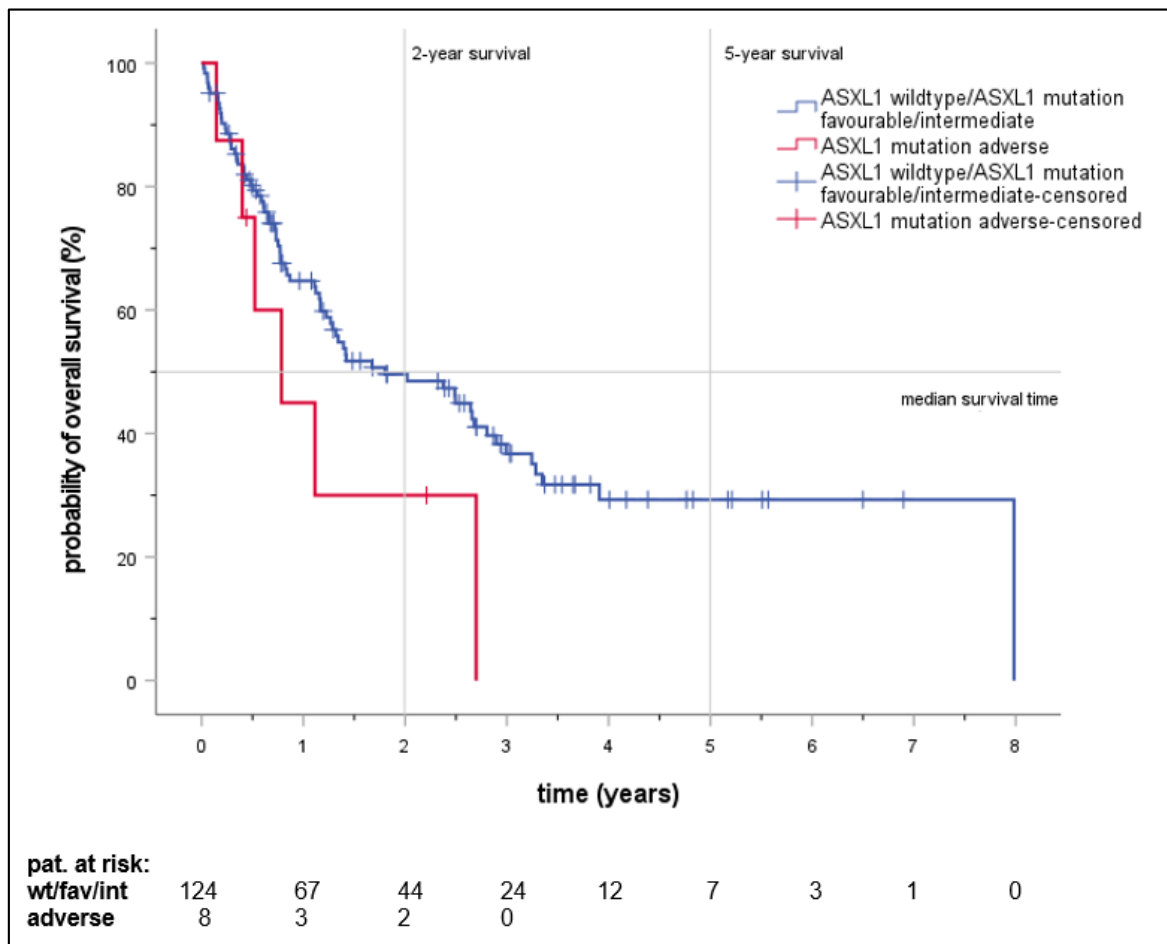


Abbildung 19: OS intensiv therapierter Patient\*innen mit ASXL1 Mutation und ungünstiger Risikostratifizierung nach ELN 2017 vs ASXL1 Wildtyp und ASXL1 Mutation und günstiger/intermediärer Risikostratifizierung

#### 4.4.9. OS intensiv therapierter Patient\*innen mit und ohne RUNX1 Mutation

Die nachfolgenden Kaplan-Meier-Kurven stellen die Wahrscheinlichkeit des OS von 132 der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden dar. Bei den fehlenden 6 Patienten wurde dieser Mutation nicht

untersucht. Von den untersuchten Patient\*innen wiesen 109 einen RUNX1 Wildtyp und nur 23 eine RUNX1 Mutation auf. 77 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 55 wurden zensiert gewertet. Während Patient\*innen mit RUNX1 Wildtyp eine mediane Überlebenszeit von 1,42 Jahren (95%CI 0,3-2,54) aufwiesen, währte diese bei Patient\*innen mit einer RUNX1 Mutation 1,68 Jahre (95%CI 0-3,58). Nach zwei Beobachtungsjahren lebten noch 48,73% der Personen ohne und 46,93% der Personen mit RUNX1 Mutation, nach fünf Jahren noch 28,55% und 24,13%. Diese in den Kurven grafisch dargestellten leichten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Genetik sind mit einem p-Wert von 0,795 nicht signifikant (Log Rank).

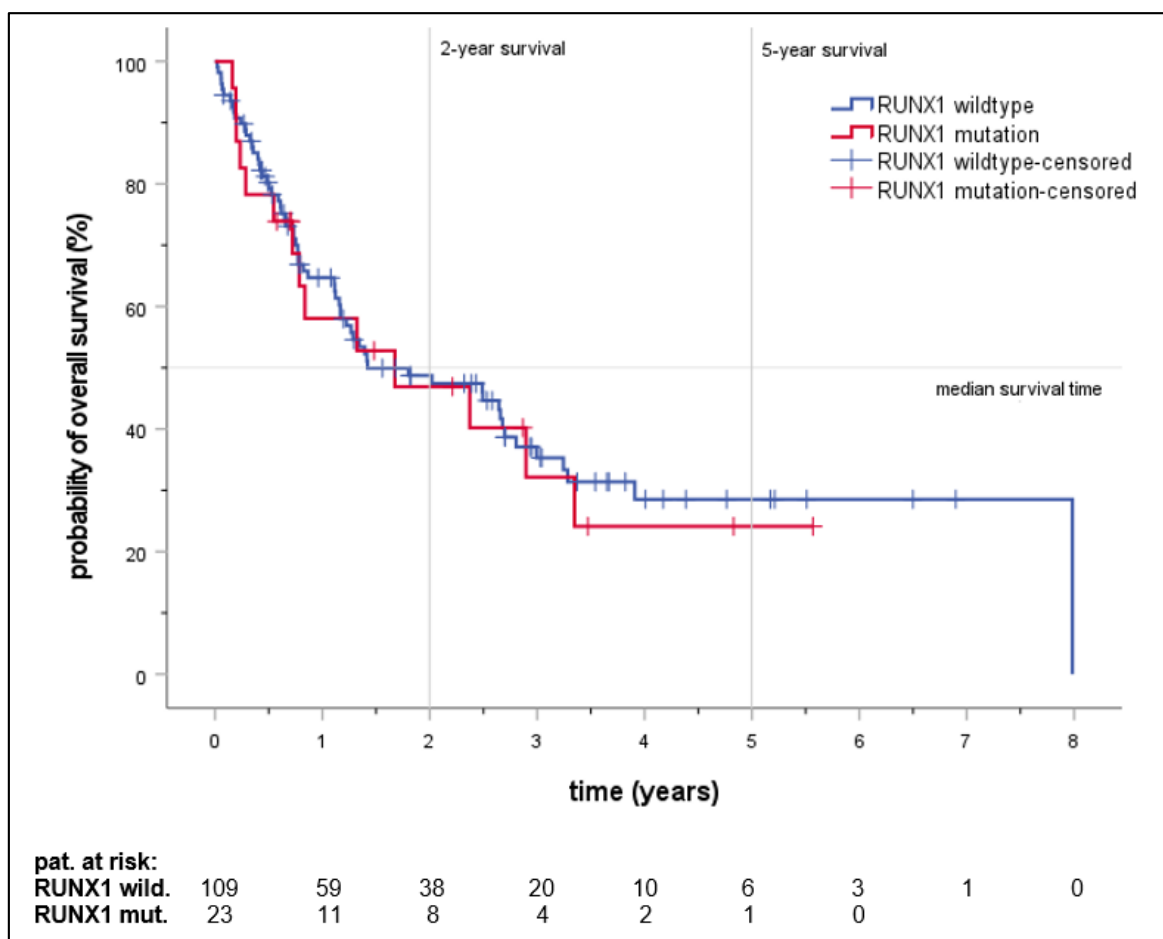


Abbildung 20: Überlebenskurven, OS intensiv therapierter Patient\*innen mit und ohne RUNX1 Mutation

#### **4.4.10. OS intensiv therapierter Patient\*innen mit RUNX1 Mutation und ungünstiger Risikostratifizierung nach ELN 2017 vs RUNX1 Wildtyp und RUNX1 Mutation und günstiger/intermediärer Stratifizierung**

Die Kaplan-Meier-Kurven stellen die Wahrscheinlichkeit des OS von 132 der 138 AML-Patient\*innen bei denen an der Klinischen Abteilung für Hämatologie am LKH Universitätsklinikum Graz im Rahmen der initialen Diagnostik ein NGS durchgeführt wurde und welche einer intensiven Polychemotherapie unterzogen wurden dar. Bei den fehlenden 6 Patienten wurde dieser Mutation nicht untersucht. Von den untersuchten Patient\*innen wiesen 21 eine RUNX1 Mutation mit einer ungünstigen Risikostratifizierung (= Gruppe1) und 111 den Wildtyp oder eine RUNX1 Mutation mit günstiger/intermediärer Risikostratifizierung (= Gruppe2) auf. 77 dieser Patient\*innen verstarben nachweislich im Untersuchungszeitraum, 55 wurden zensiert gewertet. Die mediane Überlebenszeit betrug in Gruppe1 1,68 Jahre (95%CI 0-3,57) und in Gruppe2 1,42 Jahre (95%CI 0,3-2,54). Nach zwei Beobachtungsjahren lebten noch 48,37% der Gruppe1 und 48,45% der Gruppe2, nach fünf Jahren noch 24,88% und 28,38%. Diese in den Kurven grafisch dargestellten Unterschiede der Überlebensdauer der unterschiedlichen Genetik sind mit einem p-Wert von 0,936 nicht signifikant (Log Rank).

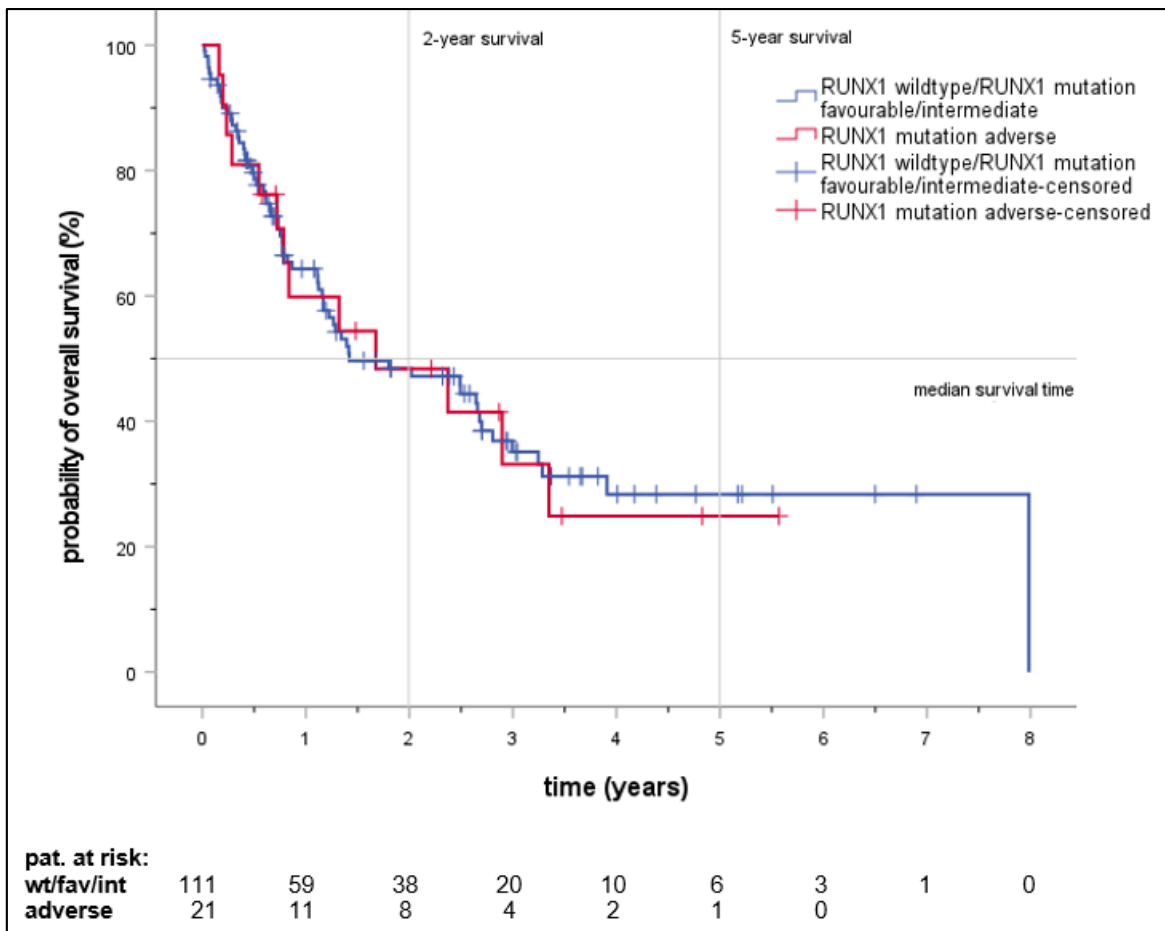


Abbildung 21: OS intensiv therapierter Patient\*innen mit RUNX1 Mutation und ungünstiger Stratifizierung nach ELN 2017 vs RUNX1 Wildtyp und RUNX1 Mutation und günstiger/intermediärer Stratifizierung

## 5. Diskussion

Die im vorherigen Kapitel berechneten Daten sollen nun interpretiert und diskutiert werden. Ob sich die Remissionsraten und das Gesamtüberleben bei AML Patient\*innen seit Einführung von NGS in die klinische Routine von denselben Parametern in der prä-Ära unterscheiden, soll durch Vergleich mit dem Datensatz aus den Jahren 2002-2008, aus einer von A. Loindl unter Anleitung von Ao. Univ.-Prof. Dr. G. Jäger durchgeführten Diplomarbeit, überprüft werden. In ebendieser Studie wurden 186 Patient\*innen, bei ausgeglichenem Geschlechterverhältnis (89 Frauen, 97 Männer), untersucht, von denen 178 mit einer intensiven Chemotherapie behandelt wurden. Zum Vergleich werden in der vorliegenden Arbeit die Daten von 138 intensiv behandelten Patient\*innen, mit ähnlich ausgeglichenem Geschlechterverhältnis (67 Frauen, 71 Männer), herangezogen. Da keine Originaldaten der Vorstudie vorlagen, konnten die Ergebnisse zwar in Bezug

gesetzt und diskutiert, ein direkter statistischer Vergleich jedoch nicht durchgeführt werden. (47)

Der Unterschied der CR-Raten intensiv versus nicht-intensiv therapierter Patient\*innen unserer Kohorte ist klar signifikant und bestätigt warum die intensive Polychemotherapie bei AML Patienten seit Jahrzehnten die Methode der ersten Wahl darstellt. Jedoch bedeutet die wesentlich niedrigere CR-Rate der nicht-intensiv therapierten Patient\*innen nicht, dass diese Therapiemethoden unwirksam sind, stellen sie doch für diejenigen für eine Polychemotherapie ungeeigneten Patienten eine wichtige Behandlungsalternative dar, welche immerhin in 9,52% der Fälle unserer Kohorte eine CR bewirkt hat.

Der CR-Rate von 66,85% bei 119 von 178 intensiv therapierten Patient\*innen der Kohorte von Loindl, steht in der vorliegenden Arbeit mit 78,99% bei 109 von 138 intensiv therapierten Patient\*innen eine klare Steigerung entgegen. Da zur Zeit der älteren Kohorte kaum nicht-intensive Therapiealternativen zur intensiven Therapie vorhanden waren, erklärt sich diese Verbesserung der CR-Raten womöglich aus der besseren, ELN bzw. Genetik gesteuerten, Selektion der Patient\*innen welche für eine intensive Chemotherapie infrage kommen. Diese Annahme wird durch die sehr geringe CR-Rate der in der vorliegenden Studie untersuchten nicht-intensiv therapierten Patient\*innen von 9,52% (6 von 63) unterstützt. (47)

Zusätzlich stehen mittlerweile „Targeted Therapies“ nach NGS Profil zur Verfügung, die es zum Zeitpunkt der älteren Arbeit noch nicht gab. Auch das kann zur Verbesserung des Überlebens beigetragen haben.

Im internationalen Vergleich mit Begna et al. (2004-2017) findet sich eine CR/CRi-Rate von 77% und mit Ihlow et al. (2000-2018) eine CR/CRi-Rate von 81%. (48, 49) Dies entspricht auch unseren Daten.

Der medianen Überlebenszeit unserer gesamten Kohorte von 236 Patient\*innen mit 0,78 Jahre ( $\approx$  285 Tage) stehen im internationalen Vergleich mit Begna et al. 1,25 Jahre (2011-2017) gegenüber. Dieser Unterschied könnte sich durch den höheren Anteil an ungünstig stratifizierten Patient\*innen in unserer Kohorte mit 48%, verglichen mit 38% in Begna et al., ergeben. (48)

Stimmt das 2-Jahresüberleben der gesamten Kohorte der 236 Patient\*innen von 32,39% mit dem 2-Jahresüberleben der Seer Datenbank (2000-2017) von 35,3% noch einigermaßen überein, zeigt sich beim 5-Jahresüberleben ein deutlicher Unterschied. Die Seer Datenbank zeigt ein 5-Jahresüberleben von 27,6% der im Zeitraum zwischen 2000-2017 in verschiedenen Standorten in den USA erhobenen Patient\*innen an. Unsere gesamte Kohorte weist hingegen nur ein 5-Jahresüberleben von 16,81% auf. Betrachtet man nur die intensiv therapierten Patient\*innen unserer Kohorte erhöht sich der Wert auf 28,37%. (3)

Diese deutliche Diskrepanz im Vergleich der 5-Jahresüberlebenswerte lässt sich möglicherweise durch die eingeschränkte Validität ebendieses Wertes in unserer Kohorte aufgrund der zu diesem Beobachtungszeitpunkt verbliebenen geringen Patient\*innenzahl erklären.

Alle zu vergleichenden Überlebenskurven der Vorgängerkohorte wurden anhand der Daten der gesamten Kohorte von 186 AML-Patient\*innen berechnet. Da diese jedoch mehrheitlich, 178 Patient\*innen um genau zu sein, intensiv therapiert wurden, wird über die 8 Patient\*innen bei denen eine intensive Therapie nicht möglich war, welche aber unweigerlich im Vergleich berücksichtigt werden müssen, aufgrund der geringen Anzahl hinweggesehen.

Der medianen Überlebenszeit von 0,95 Jahren und dem 5-Jahres-Überleben von 21,4% der Vorgängerkohorte stehen in der aktuellen Kohorte eine mediane Überlebenszeit von 1,68 Jahren und ein 5-Jahres-Überleben intensiv therapierter Patient\*innen von 28,37% gegenüber. Die wiederum deutliche Verbesserung beider Parameter scheint vermutlich denselben bereits im Vergleich der CR-Raten erläuterten Grund zu haben, welcher sich anhand der von der aktuellen Kohorte vorliegenden Überlebensdaten der nicht-intensiv therapierten Patient\*innen (0,46 Jahre ( $\approx$  168 Tage)), der nur mit BSC therapierten Patient\*innen (0,1 Jahre ( $\approx$  37 Tage)) und des Nicht-Erreichens der 5-Jahres-Überlebensmarke der beiden Gruppen, zu bestätigen scheint. (47)

Die signifikant bessere mediane Überlebenszeit der nicht-intensiv Therapierten im Vergleich zu den nur mit BSC Therapierten zeigt, dass jede Form der Therapie besser als keine (nur BSC) ist.

Zur Nebenfragestellung in welchem Verhältnis das Gesamtüberleben und die CR-Raten bei intensiv behandelten im Gegensatz zu nicht-intensiv bzw. nur mit BSC behandelten AML Patient\*innen seit Einführung von NGS in die klinische Routine stehen, veranschaulichen die Kaplan-Meier Kurven in Abbildung 3, mit den oben genannten Überlebensdaten, die deutliche Überlegenheit der intensiven Polychemotherapie. Die Gegenüberstellung der CR-Raten in Abbildung 1 bestätigt dies mit 78,99% (intensiv) zu 9,52% (nicht-intensiv).

Der Vergleich mit Begna et al. (2004-2017) wies mit medianen Überlebenszeiten von 1,83 Jahren (intensiv), 0,75 Jahren ( $\approx$  274 Tage) (nicht-intensiv) und 0,17 Jahren ( $\approx$  62 Tage) (BSC) ähnliche Werte wie unsere Kohorte auf. (48)

Die intensiv therapierte Kohorte von Ihlow et al. (2000-2018) zeigte mit einer medianen Überlebenszeit von 2,38 Jahren und einem 5-Jahresüberleben von 35% deutlich bessere Daten. (49)

Aufgrund ähnlicher CR-Raten lassen sich diese unterschiedlichen Überlebensdaten möglicherweise durch die unterschiedliche allo-HSCT-Rate von 68% bei Ihlow et al. und 46% in unsere Kohorte erklären. Mögliche für das Outcome relevante Altersunterschiede in den Kohorten lassen sich aufgrund der fehlenden Daten in der Vergleichskohorte nicht evaluieren. (49)

Die medianen Überlebenszeiten der Kurven des RFS mit 1,08 Jahren und des EFS mit 1,02 Jahren der intensiv therapierten Patient\*innen unserer Kohorte sind weitgehend vergleichbar mit denen der intensiv therapierten Kohorte von Ihlow et al. (2000-2018) mit einer medianen Überlebenszeit des RFS und EFS von 1,16 Jahren. (49)

In den Kaplan-Meier Kurven der Altersgruppen  $\leq 65$  und  $> 65$  Jahre der Vorgängerkohorte wurde eine mediane Überlebenszeit von 1,15 Jahren ( $\leq 65$ ) und 0,42 Jahren ( $> 65$ ) gezeigt. Weiters ein 5-Jahres-Überleben von 25,1% ( $\leq 65$ ) und 11,9% ( $> 65$ ) bei einer Anzahl von 130  $\leq 65$ - und 56  $> 65$ -Jährigen.

In den Kurven der NGS-Kohorte, in der 89 der Patient\*innen  $\leq 65$  und 49  $> 65$  alt waren, sieht man mediane Überlebenszeiten von 2,49 Jahren ( $\leq 65$ ), 1,27 Jahren ( $> 65$ ) und Überlebenswahrscheinlichkeiten von 34,14% ( $\leq 65$ ) und 19,22% ( $> 65$ )

nach 5 Beobachtungsjahren. Auch in diesem Vergleich ist die Verbesserung der Überlebensdaten der NGS-Ära zur Prä-NGS-Ära klar erkennbar.

Zusätzlich ist noch erwähnenswert, dass das Verhältnis der jüngeren zu älteren Patient\*innen mit einer Ratio von 130/56 zu 89/49 sich ein wenig in Richtung der älteren Gruppe verschoben hat und die, wie bereits von Loindl beschriebene erwartungsgemäß ungünstigere Prognose älterer Patient\*innen, weiterhin klar besteht. (47)

Auch die Daten von Kantarjian et al. (2010-2017) lassen sich mit einem 5-Jahresüberleben von 55% (<60) und 17% (≥60) mit den unsrigen Daten vergleichen. (50)

In der Analyse des Effektes des Geschlechtes der Patient\*innen auf das Outcome wurde nur eine geringe nicht signifikante Abweichung (siehe Abbildung 8) gefunden. Diese lässt sich beispielsweise auch in der SEER Datenbank mit einem 5-Jahresüberleben von 28,9% (Frauen) und 26,5% (Männer) nachweisen. (3)

Den Überlebenskurven der de-novo und sekundär diagnostizierten intensiv therapierten Patient\*innen der Vorgängerkohorte ist eine mediane Überlebenszeit von 1,4 Jahren (de-novo), 0,58 Jahren (sekundär) und ein 5-Jahres-Überleben 30,8% (de-novo), 10,6% (sekundär) abzulesen, wobei 100 Patient\*innen de-novo und 86 Patient\*innen sekundär diagnostiziert wurden. (47)

Im Vergleich dazu zeigen die Daten der vorliegenden aktuellen Kohorte, von der 111 Personen de-novo und 27 sekundär diagnostiziert wurden, eine mediane Überlebenszeit von 2,49 Jahren (de-novo), 0,78 Jahre (sekundär) und ein 5-Jahres-Überleben von 33,56% (de-novo) und 12,38% (sekundär). Wie in den bisherigen Vergleichen wird eine Verbesserung der Survival-Daten ersichtlich.

Zusätzlich wird die bekanntermaßen deutlich bessere Überlebenswahrscheinlichkeit von de-novo diagnostizierter AML im Vergleich zu sekundär diagnostizierter AML als signifikant bestätigt (Abbildung 9). Dies stimmt auch mit Daten aus internationalen Kohorten überein. (23, 48)

Bei der Analyse des OS von therapieassoziiertem und nicht-therapieassoziierten Patient\*innen, konnte das in der Literatur beschriebenen schlechtere Überleben bei

ersterer Gruppe nicht bestätigt werden, was an der geringen Fallzahl der therapieassoziierten Gruppe liegen könnte. Auch die Altersabhängigkeit des prognostischen Wertes dieses Faktors könnte dabei eine Rolle spielen. Bei älteren Patient\*innen scheint die Zuordnung zur Gruppe der Therapieassoziierten keinen zusätzlichen prognostischen Wert zu beinhalten. (23)

Durch die Gegenüberstellung der Überlebenswahrscheinlichkeiten der drei lt. ELN 2017 definierten Gruppen der Risikostratifizierung, konnte die Bedeutung ebendieser bestätigt werden (Abbildung 11). Wie erwartet weisen die als günstig stratifizierte Patient\*innen unserer Kohorte deutlich signifikant bessere Outcome Daten als die anderen beiden Gruppen auf. Diese Daten stimmen auch weitgehend mit der Kohorte von Begna et al. (2004-2017) überein. In derselben Kohorte wurden 4% günstig, 58% intermediate und 38% ungünstig stratifizierte Patient\*innen erhoben, wohingegen in unserer Kohorte (2012-2021) 25% günstig, 27% intermediate und 48% ungünstig stratifizierte Patient\*innen untersucht wurden. Die Differenz ergibt sich wahrscheinlich aus dem unterschiedlichen Betrachtungszeitraum und der damit einhergehenden dynamischen Veränderung der ELN Risikostratifizierung. Zusätzlich ist hier zu erwähnen, dass in unserer Kohorte bei längerem Beobachtungszeitraum eine Überschneidung der Überlebenskurven der Intermediären- und Hoch-Risikogruppe auftrat. Dies kann vorrangig durch die kleine Fallzahl nach längerer Beobachtung erklärt werden. Tatsächlich unterscheidet sich das mediane Überleben der beiden Gruppen, mit 1,8 Jahren (intermediär) und 1,11 Jahren (ungünstig), deutlich. (48)

Die beiden Abbildungen (12, 13) zur Häufigkeitsverteilung der im Next-Generation Sequencing untersuchten Mutationen unserer Kohorte, sollen das genetische Profil der bei uns behandelten Patient\*innen veranschaulichen. Vergleicht man dieses grob mit Papaemmanuil et al. sieht man, dass FLT3 und NPM1 an der Spitze der Häufigkeitsverteilungen stehen, dass TP53, inv(3), RUNX1 lt. ELN korrekterweise weitgehend prognostisch ungünstig gezählt wurden und dass auch sonst die relativen Häufigkeiten der Mutationen mehrheitlich zumindest in den Abbildungen übereinstimmen. (51)

Zusätzlich lässt sich in der zweiten Abbildung unserer Kohorte nachvollziehen, dass meist nicht einzelne Mutationen, sondern deren Kombinationen die Einteilung in eine Risikogruppe nach ELN 2017 bedingen.

Zur Fragestellung des unmittelbaren Einflusses von durch NGS erhobenen und in der ELN 2017 publizierten Mutationen auf das Gesamtüberleben unserer Kohorte wurden einige wichtige Mutationen ausgewählt und diesbezüglich analysiert.

Nicht signifikant, jedoch dem Trend in der internationalen Literatur entsprechend, ergab der Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeiten von Patient\*innen mit und ohne TP53 Mutation, schlechtere Werte für die erstere Gruppe. Die fehlende Signifikanz kann dabei durch die kleine Fallzahl in der mutierten Gruppe bedingt sein. (18)

Die Überlebensanalyse der Patient\*innen mit und ohne NPM1 Mutation (Abbildung 15) zeigte ein nicht-signifikantes und nicht der fachlichen Logik entsprechendes Ergebnis, welches auf einen statistischen Fehler zurückzuführen war. Dieser lag darin, dass nur Patient\*innen mit NPM1 Mutation und günstiger Risikostratifizierung nach ELN 2017 dem Rest gegenübergestellt gehört hätten, weil die NPM1 Mutation lt. ELN immer in Kombination mit FLT3-ITD betrachtet werden muss. Als dies schließlich in Abbildung 16 richtiggestellt wurde, ergab sich zwar ein nicht signifikantes, jedoch tendenziös mit der internationalen Literatur übereinstimmendes Ergebnis. (18)

In der ELN 2017 wird die biallelic CEBPA Mutation als prognostisch günstig gewertet, aber aufgrund der geringen Fallzahl ist, trotz durchgeführter Überlebenszeitanalyse (Abbildung 17) diesbezüglich weder eine bestätigende noch eine nicht-bestätigende Aussage in unserer Kohorte möglich. (18)

Eine signifikante Bestätigung der ELN 2017 konnte mit der Gegenüberstellung der Überlebenswahrscheinlichkeiten der Patient\*innen mit FLT3-ITD mit high allelic ratio  $\geq 0,5$  gegen den Rest der Kohorte erzielt werden, indem gezeigt werden konnte,

dass Patient\*innen mit einer high allelic ratio FLT3-ITD ein signifikant schlechteres Outcome aufweisen. (18)

Die Überlebensanalyse der Patient\*innen mit und ohne ASXL1 Mutation (Abbildung 19) zeigte ein nicht-signifikantes und nicht der fachlichen Logik entsprechendes Ergebnis, welches auf einen statistischen Fehler zurückzuführen war. Dieser lag darin, dass nur Patient\*innen mit ASXL1 Mutation und ungünstiger Risikostratifizierung nach ELN 2017 dem Rest der Kohorte gegenübergestellt gehört hätten, weil die ASXL1 Mutation lt. ELN nur dann als ungünstig eingestuft wird, falls gleichzeitig kein prognostisch günstiger Subtyp vorliegt. Als dies in Abbildung 20 richtiggestellt wurde, ergab sich zwar ein nicht signifikantes, jedoch im Trend mit der internationalen Literatur übereinstimmendes Ergebnis.

Die in gleicher Art durchgeführte Überlebenszeitanalyse mit Patient\*innen mit RUNX1 Mutation erbrachte auch nach Korrektur desselben statistischen Fehlers wie im vorherigen Absatz, möglicherweise aufgrund zu geringer Patientenzahl weder Signifikanz noch eine Übereinstimmung mit der Literatur, sodass in diesem Fall in unserer Kohorte keine Aussage möglich ist. (18)

## **6. Konklusion**

Abschließend scheint sich die Hypothese zu bestätigen, dass sich sowohl im Vergleich der CR-Raten der intensiv therapierten Patient\*innen, als auch in der Gegenüberstellung der Überlebenskurven, das Outcome seit Einführung des NGS in die klinische Routine der Abteilung für Hämatologie des Universitätsklinikum Graz deutlich verbessert hat. Trotz der Limitation durch die teilweise geringe Fallzahl konnte eine weitgehende Bestätigung der internationalen Trends und der ELN 2017 im Sinne der Qualitätssicherung erzielt werden. Die Hypothese, dass die Outcome- und Survival-Daten der Grazer Patient\*innenkohorte dem internationalen Standard entsprechen, ließ sich im Wesentlichen verifizieren.

Im Ausblick auf die Zukunft ist mit einer weiteren Verbesserung der genetischen Untersuchungsmethoden, darauf aufbauender neuer Therapieansätze und konsekutiv der Überlebensdaten zu rechnen. Dies könnte in einem entsprechenden Zeitabstand zur vorliegenden Studie, wiederum vergleichend in Form einer

Qualitätssicherung anhand eines Real-World Datensatzes retrospektiv überprüft werden.

## References

1. Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*. 2018;392(10147):593-606.
2. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-52.
3. SEER Cancer Stat Facts: Acute Myeloid Leukemia. National Cancer Institute. Bethesda, MD [Internet]. []. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>.
4. Meyers CA, Albitar M, Estey E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2005;104(4):788-93.
5. Nebgen DR, Rhodes HE, Hartman C, Munsell MF, Lu KH. Abnormal Uterine Bleeding as the Presenting Symptom of Hematologic Cancer. *Obstetrics & Gynecology*. 2016;128(2).
6. Cohen A, Ehteshami-Afshar S, Tsang D, Valda-Toro P, Lee S, Avery C, et al. TEMPERATURE INSTABILITY IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA. *Chest*. 2020;158(4, Supplement):A709.
7. Büchner. Spezifische und unspezifische Hautmanifestationen bei Leukämien. *Praxis*. 2002;91(24):1071-7.
8. Sakata H, Nakao A, Matsuda K, Yoshie N, Yamada T, Osako T, et al. Acute leukemia presenting as bone pain with normal white blood cell count. *Acute medicine & surgery*. 2014;1(4):249.
9. Gerd Herold und Mitarbeiter: Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs für die ärztliche Prüfung und ICD 10-Schlüssel. ; 2020.

10. Narayanan D, Weinberg OK. How I investigate acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2020;42(1):3-15.
11. Tallman MS, Wang ES, Altman JK, Appelbaum FR, Vijaya RB, Bixby D, et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network J Natl Compr Canc Netw*. 2019;17(6):721-49.
12. Haferlach T, Schmidts I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2020;188(1):36-48.
13. Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E et al. *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 9th ed. Stuttgart: Thieme; 2017.
14. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
15. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
16. Koenig KL, Sahasrabudhe KD, Sigmund AM, Bhatnagar B. AML with Myelodysplasia-Related Changes: Development, Challenges, and Treatment Advances. *Genes*. 2020;11(8):845.
17. Krauss AC, Gao X, Li L, Manning ML, Patel P, Fu W, et al. FDA Approval Summary: (Daunorubicin and Cytarabine) Liposome for Injection for the Treatment of Adults with High-Risk Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2019;25(9):2685-90.
18. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.

19. Valent P, Orazi A, Steensma DP, Ebert BL, Haase D, Malcovati L, et al. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget*. 2017;8(43):73483-500.
20. Flis S, Chojnacki T. Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities. *Drug design, development and therapy*. 2019;13:825-43.
21. Medeiros BC, Satram-Hoang S, Hurst D, Hoang KQ, Momin F, Reyes C. Big data analysis of treatment patterns and outcomes among elderly acute myeloid leukemia patients in the United States. *Ann Hematol*. 2015;94(7):1127-38.
22. Klepin HD. Elderly acute myeloid leukemia: assessing risk. *Current hematologic malignancy reports*. 2015;10(2):118-25.
23. Hulegårdh E, Nilsson C, Lazarevic V, Garelius H, Antunovic P, Rangert Derolf Å, et al. Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: A report from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Am J Hematol*. 2015;90(3):208-14.
24. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, et al. Anthracycline Dose Intensification in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2009;361(13):1249-59.
25. Lambert J, Pautas C, Terré C, Raffoux E, Turlure P, Caillot D, et al. Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial. *Haematologica*. 2019;104(1):113-9.
26. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *The Lancet Oncology*. 2014;15(9):986-96.
27. Kapp-Schworer S, Weber D, Corbacioglu A, Gaidzik VI, Paschka P, Krönke J, et al. Impact of gemtuzumab ozogamicin on MRD and relapse risk in patients with

NPM1-mutated AML: results from the AMLSG 09-09 trial. *Blood*. 2020;136(26):3041-50.

28. Loke J, Buka R, Craddock C. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Who, When, and How? *Frontiers in Immunology*. 2021;12:1182.

29. Tzogani K, Yu Y, Meulendijks D, Herberts C, Hennik P, Verheijen R, et al. European Medicines Agency review of midostaurin (Rydapt) for the treatment of adult patients with acute myeloid leukaemia and systemic mastocytosis. *ESMO open*. 2019;4(6):e000606.

30. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(5):454-64.

31. Hou H, Tien H. Genomic landscape in acute myeloid leukemia and its implications in risk classification and targeted therapies. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):81.

32. Klepin HD, Rao AV, Pardee TS. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older adults. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(24):2541-52.

33. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2020;383(7):617-29.

34. Thol F, Ganser A. Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Current treatment options in oncology*. 2020;21(8):66.

35. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131(12):1275-91.

36. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin

KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.

37. Vosberg S, Greif PA. Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(12):839-49.

38. Jan M, Majeti R. Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene*. 2013;32(2):135-40.

39. Nordheim A, Knippers R, et al. *Molekulare Genetik*, 11. unveränderte Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2018.

40. Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Current genetic medicine reports*. 2015;3(4):158-65.

41. DiNardo CD, Cortes JE. Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematology.American Society of Hematology.Education Program*. 2016;2016(1):348-55.

42. Medinger M, Passweg JR. Acute myeloid leukaemia genomics. *Br J Haematol*. 2017;179(4):530-42.

43. Lagunas-Rangel F, Chávez-Valencia V, Gómez-Guijosa MÁ, Cortes-Penagos C. Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*. 2017;11(4):328-39.

44. Weinberg OK, Kuo F, Calvo KR. Germline Predisposition to Hematolymphoid Neoplasia. *Am J Clin Pathol*. 2019;152(3):258-76.

45. Porter CC. Germ line mutations associated with leukemias. *Hematology.American Society of Hematology.Education Program*. 2016;2016(1):302-8.

46. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, et al. Clinical application and proposal for modification of the International

Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*. 2006;108(2):419-25.

47. Loindl AS, Jäger G. AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE – REMISSIONEN UND ÜBERLEBEN DES GESAMTPATIENTENKOLLEKTIVS DER KLINISCHEN ABTEILUNG FÜR HÄMATOLOGIE DES LKH GRAZ [dissertation]. Medizinischen Universität Graz; 2009.

48. Begna KH, Ali W, Gangat N, Elliott MA, Al-Kali A, Litzow MR, et al. Mayo Clinic experience with 1123 adults with acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal*. 2021;11(3):46.

49. Ihlow J, Gross S, Busack L, Flörcken A, Jesse J, Schwarz M, et al. Acute myeloid leukemia: negative prognostic impact of early blast persistence can be in part overcome by a later remission prior to post-induction therapy. *haematol*. 2021.

50. Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, Daver N, Borthakur G, Jabbour E, et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer Journal*. 2021;11(2):41.

51. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-21.