

Diplomarbeit

**Klinische Implikationen von subklonalen *TP53*-
Mutationen bei Patientinnen und Patienten mit akuter
myeloischer Leukämie**

eingereicht von

Gabriel Pabst

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Innere Medizin,
Klinische Abteilung für Hämatologie**

unter der Anleitung von

**Univ.-Prof. Dr.med.univ. Heinz Sill und
Assoz.-Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Armin Zebisch**

Graz, 16.09.2019

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, 16.09.2019

Gabriel Pabst eh

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich von ganzen Herzen bei meinem Betreuer Professor Heinz Sill bedanken. Er hat mich in die Welt der Wissenschaft eingeführt und mich motiviert und bestärkt, eine Karriere in der Wissenschaft anzustreben. Indem er mich in seinem Labor mitarbeiten ließ, hat er mir die Möglichkeit gegeben, grundlegende Labortechniken in einer sehr unterstützenden und fördernden Arbeitsumgebung zu erlernen. Er fand immer Zeit für die Diskussion wichtiger Fragen und scheute keine Mühen, um das Projekt voranzubringen. Außerdem ermöglichte er mir, ihn zum jährlichen Meeting der amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie in San Diego zu begleiten und dort die Daten der Diplomarbeit zu präsentieren. Ich bin ihm für seine einzigartige Unterstützung außerordentlich dankbar.

Außerdem möchte ich mich bei Karin Lind bedanken. Sie ist eine motivierte, leidenschaftliche, gut organisierte und sehr erfahrene biomedizinische Analytikerin, welche vor Kurzem mit ihrem Doktorat angefangen hat. Es war mir eine große Freude mit ihr zu arbeiten und ich wünsche ihr alles Gute für ihre Doktorarbeit.

Weiterer Dank gilt Dr. Andreas Reinisch, welcher mir etliche Labortechniken beibrachte und bei verschiedensten Aspekten des Projektes mit seiner Expertise half. Auch möchte ich mich bei Professor Armin Zebisch und Professor Albert Wölfler für ihre Beiträge zum Projekt bedanken.

Großer Dank gilt auch meinen Eltern, welche mich immer emotional und finanziell unterstützten. Dies ermöglichte mir, mich voll auf das Studium zu konzentrieren, ohne mich um finanzielle Angelegenheiten zu sorgen.

Zuallerletzt möchte ich mich bei meiner Freundin Alina bedanken, welche immer für mich da war und mir half, eine gesunde Work-Life-Balance aufrechtzuerhalten.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	2
Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	9
Zusammenfassung	11
Abstract.....	13
Angaben von bereits erfolgten Veröffentlichungen	14
1 Einleitung	15
1.1 Definition und Pathogenese der AML	15
1.2 Diagnose der AML	15
1.3 2016 WHO Klassifikation der AML	16
1.4 Genomik der AML.....	18
1.5 Risikostratifizierung der AML.....	20
1.6 Therapie der AML	21
1.7 Kriterien des Therapieansprechens und Outcome-Parameter.....	23
1.8 <i>TP53</i> bei der AML	26
1.9 Hypothese und Ziel.....	28
2 Methoden.....	29
2.1 Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer	29
2.2 Details zu den analysierten Studien der AMLSG	29
2.3 Sequenzanalyse	30
2.4 Next Generation Sequencing	30
2.5 Statistische Auswertung.....	31
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Charakteristika von <i>TP53</i> -mutierten Subklonen in AML.....	33
3.1.1 Patientinnen- und Patientencharakteristika	33
3.1.2 Mutationen	35
3.1.3 Chromosomale Aberrationen	39
3.1.4 Kooperierende Mutationen.....	40
3.2 Einfluss von <i>TP53</i> -mutierten Subklonen auf das Überleben von Patientinnen und Patienten mit AML	41

3.2.1	Komplette Remission	41
3.2.2	Gesamtüberleben (OS)	42
3.2.3	Ereignis-freies Überleben (EFS)	44
3.2.4	Cox-Regressions-Analyse	46
3.3	Fallstudie mit longitudinaler Untersuchung der <i>TP53</i> -Mutationslast.....	47
4	Diskussion	49
5	Literaturverzeichnis	52
Anhang	59
	Forscherinnen und Forscher und Zentren der German-Austrian AML Study Group.....	59

Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
AMLSG	German-Austrian AML study group
ANC	absolute Neutrophilenzahl
APL	akute Promyelozytenleukämie
ATRA	all-trans Retinsäure
BM	Knochenmark
CI	Konfidenzintervall
CHIP	clonal hematopoiesis of indeterminate potential
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CR	komplette Remission
CR _i	CR mit unvollständiger hämatologischer Genesung
CR _{MRD}	CR ohne minimale Resterkrankung
EFS	Ereignis-freies Überleben
ELN	European LeukemiaNet
FAB	French-American-British
FLAG-IDA	Fludarabin, Cytarabin, G-CSF, Idarubicin
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
HLA	humanes Leukozytenantigen
HMA	Hypomethylierende Substanzen
HR	Hazard-Ratio
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSPCs	hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
ICE	Idarubicin, Cytarabin, Etoposid
IDAC	intermediäre Cytarabindosierung

IV	intravenös
LSK cells	lineage-, sca1+, c-kit+ Zellen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEC	Mitoxantron, Etoposid, Cytarabin
MFC	Multiparameter-Durchflusszytometrie
MLFS	morphologisch Leukämie-freier Zustand
NGS	next generation sequencing
OS	Gesamtüberleben
PB	peripheres Blut
PD	progrediente Erkrankung
PR	partielle Remission
RFS	Relaps-freies Überleben
sAML	sekundäre AML
SC	subkutan
tAML	Therapie-assoziierte AML
TRM	Therapie-assoziierte Mortalität
VAF	variant allele frequency
WBC	Leukozyten
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Verteilung der 108 <i>TP53</i> -Mutationen innerhalb des Genes.	Seite 35
Abbildung 2	Kooperierende Genmutationen in den 98 <i>TP53</i> -mutierten AMLs.	Seite 40
Abbildung 3	Patientinnen und Patienten mit AML, welche durch die Induktionstherapie eine komplette Remission erreichten, stratifiziert anhand des <i>TP53</i> -Status und der VAF.	Seite 41
Abbildung 4	Kaplan-Meier-Analyse vom OS der 1537 AML-Patientinnen und Patienten, stratifiziert anhand des <i>TP53</i> -Mutations-Status.	Seite 43
Abbildung 5	Kaplan-Meier-Analyse vom OS der 1537 AML-Patientinnen und Patienten, stratifiziert anhand der <i>TP53</i> -VAFs.	Seite 43
Abbildung 6	Kaplan-Meier-Analyse vom EFS der 1537 AML-Patientinnen und Patienten, stratifiziert anhand des <i>TP53</i> -Mutations-Status.	Seite 45
Abbildung 7	Kaplan-Meier-Analyse vom EFS der 1537 AML-Patientinnen und Patienten, stratifiziert anhand der <i>TP53</i> -VAFs.	Seite 45
Abbildung 8	Longitudinale Mutationsanalyse eines Patienten mit sAML, welche durch eine klonale und eine subklonale <i>TP53</i> -Mutation charakterisiert ist.	Seite 48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Diagnostisches Vorgehen bei Patientinnen und Patienten mit AML.	Seite 16
Tabelle 2	2016 WHO-Klassifikation der AML.	Seite 17
Tabelle 3	Funktionelle Kategorien von rekurrent mutierten Genen bei der AML.	Seite 19
Tabelle 4	2017 ELN-Risikostratifizierung basierend auf genetischen Veränderungen.	Seite 20
Tabelle 5	Ausgewählte konventionelle Therapieregime für Patientinnen und Patienten, welche fit für eine intensive Chemotherapie sind.	Seite 21
Tabelle 6	Ausgewählte konventionelle Therapieregime für Patientinnen und Patienten, welche nicht fit für eine intensive Chemotherapie sind.	Seite 22
Tabelle 7	Therapieregime zur Behandlung von relapsierten oder primär refraktären Patientinnen und Patienten mit AML.	Seite 23
Tabelle 8	ELN-Kriterien zur Beurteilung des Therapieansprechens.	Seite 24
Tabelle 9	Patientinnen- und Patientencharakteristika.	Seite 33
Tabelle 10	Details zu den detektierten <i>TP53</i> -Mutationen.	Seite 36
Tabelle 11	Chromosomale Aberrationen und kooperierende Genmutationen in den Patientinnen und Patienten mit <i>TP53</i> -Mutationen, je nach VAF der Mutationen (VAF; <20%;20%-40%; >40%).	Seite 39

Tabelle 12	3-Jahres-OS and medianes OS mit 95% Konfidenzintervall (95% CI) von der untersuchten Kohorte, stratifiziert anhand des <i>TP53</i> -Status und der VAFs.	Seite 42
Tabelle 13	3-Jahres-EFS und mediane EFS-Zeiten mit 95% Konfidenzintervallen der untersuchten AML-Kohorte, stratifiziert anhand des <i>TP53</i> -Status und der VAFs.	Seite 44
Tabelle 14	Univariate and multivariate Cox-Regressions-Analyse für OS.	Seite 46
Tabelle 15	Univariate and multivariate Cox-Regressions-Analyse für EFS.	Seite 47
Tabelle 16	Longitudinale Mutationsanalyse eines Patienten mit sAML mit einer klonalen und einer subklonalen <i>TP53</i> -Mutation.	Seite 48

Zusammenfassung

Einleitung

Die akute myeloische Leukämie mit „*TP53*-Mutationen, chromosomaler Aneuploidie oder *TP53*-Mutationen und chromosomaler Aneuploidie“ wurde kürzlich als abgrenzbare AML-Subgruppe beschrieben, welche mit einer äußerst schlechten Prognose assoziiert ist. Die Rolle von subklonalen *TP53*-Mutationen, definiert durch eine Allelfrequenz (VAF= Variant Allele Frequency) von <20%, wurde allerdings bisher noch nicht untersucht.

Methoden

In dieser Arbeit untersuchten wir den prognostischen Wert der VAF von *TP53*-Mutationen in einer Kohorte von 1537 Patientinnen und Patienten mit neu diagnostizierter AML, welche im Rahmen von drei klinischen Studien der Deutsch-Österreichischen AML Studiengruppe prospektiv behandelt wurden. Die Mutationsanalysen erfolgten durch zielgerichtetes „Next Generation Sequencing“ und die Patientinnen und Patienten wurden anhand der VAF der *TP53*-Mutationen in drei Gruppen mit VAFs von >40%, zwischen 20% und 40% und <20% kategorisiert.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 108 *TP53*-Mutationen in 98 Patientinnen und Patienten (6,4%) detektiert; unter diesen wiesen 61 Patientinnen und Patienten eine Mutation mit einer VAF über >40%, 19 eine VAF zwischen 20% und 40% und 18 Patientinnen und Patienten eine Mutation mit einer VAF unter 20% auf. Im Vergleich zu den Proben mit klonalen Mutationen, wiesen die Proben mit subklonalen Mutationen signifikant weniger komplexe Karyotypen und chromosomale Verluste auf. Das projektierte mediane OS (Overall Survival = Gesamtüberleben) für die gesamte Kohorte betrug 28,1 Monate (95% CI, 24.3-33.5) und es zeigten sich ausgeprägte Unterschiede zwischen *TP53*-Wildtyp Patientinnen und Patienten und *TP53*-mutierten Patientinnen und Patienten (33.6 Monate [95%CI, 28.4-45.0] versus 6.5 Monate [95%CI, 5.0-8.2]). Die *TP53*-VAF hatte dabei keinen signifikanten Einfluss auf das OS (*TP53* VAF >40%, 5.8 Monate; 20%-40%, 6.9 Monate; <20%, 6.9 Monate). In einer Cox-Regressionsanalyse, die die Variablen Alter, Leukozytenzahl, zytogenetische Risiko und AML-Typ berücksichtigte, blieb der negative Einfluss von *TP53*-Mutationen auf die Prognose signifikant, wobei Mutationen mit einer VAF <20% den größten Effekt zeigten (hazard ratio, 3.71; 95% CI, 2.11-6.51 für OS).

Konklusion

In dieser Arbeit zeigten wir, dass auch *TP53*-mutierte Subklone einen negativen Einfluss auf die Prognose von AML-Patientinnen und Patienten haben. Dies könnte Implikationen für Screening-Methoden für *TP53*-Mutationen und für die zukünftige Risikostratifikation bei AML haben.

Abstract

Introduction

Acute myeloid leukemias (AMLs) with “*TP53* mutations, chromosomal aneuploidy or both” have recently been described as a distinct AML subgroup exhibiting an exceedingly adverse prognosis. However, the role of subclonal *TP53* mutations defined by a variant allele frequency (VAF) <20% has not been addressed in AML yet.

Methods

In this study we evaluated the prognostic value of *TP53* VAFs in a cohort of 1537 patients with newly diagnosed AML, prospectively treated within 3 trials of the German-Austrian AML study group. Mutational analysis was performed by targeted deep sequencing and patients with *TP53* mutations were categorized by their VAF into 3 groups of patients with VAFs of >40%, 20%-40% and <20%.

Results

A total of 108 *TP53* mutations were found in 98 patients (6.4%); amongst those, 61 patients showed a VAF >40%, 19 a VAF between 20% and 40% and 18 a VAF <20%. Compared to AML specimens with clonal *TP53* mutations, those with subclonal ones showed significantly fewer complex karyotypes and chromosomal losses. The estimated median overall survival (OS) for the entire cohort was 28.1 months (95% CI, 24.3-33.5) but differed substantially between *TP53* wild-type and *TP53* mutated patients (33.6 months [95%CI, 28.4-45.0] versus 6.5 months [95%CI, 5.0-8.2]). OS rates were low in all *TP53* mutated subgroups (*TP53* VAF >40%, 5.8 months; 20%-40%, 6.9 months; <20%, 6.9 months). In Cox regression analyses adjusting for age, white blood cell count, cytogenetic risk and type of AML, the adverse prognostic effect of *TP53* mutations remained significant, with mutations with a VAF<20% showing the strongest effect (hazard ratio, 3.71; 95% CI, 2.11-6.51 for overall survival).

Conclusion

We here provide evidence that even *TP53* mutational subclones defined by VAF <20% are of negative prognostic impact. These findings may have implications for *TP53* screening methods and for future risk stratification in AML.

Angaben von bereits erfolgten Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Form eines Posters bei dem jährlichen Treffen der amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie in San Diego im Dezember 2018 präsentiert.

Pabst G, Prochazka KT, Pregartner G, Rücker FG, Heitzer E, Woelfler A, Zebisch A, Berghold A, Döhner K and Sill H. Impact of *TP53* Mutated Subclones in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2018; 132:1483.

Außerdem wurden Teile dieser Diplomarbeit als „Artikel“ in dem wissenschaftlichen Journal *Haematologica* (impact factor 7.5) publiziert:

Prochazka KT, Pregartner G, Rücker FG, Heitzer E, Pabst G, Wölfler A, Zebisch A, Berghold A, Döhner K, and Sill H. Clinical implications of subclonal *TP53* mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2019; 19 Mar;104(3):516-523. doi: 10.3324/haematol.2018.205013. Epub 2018 Oct 11

Der Artikel wurde mit einer “Creative Commons Licence“ (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>) publiziert. Demnach ist es erlaubt, Kopien des veröffentlichten Materials für den persönlichen und internen Gebrauch zu verwenden. Darüber hinaus weist *Haematologica* auf der Homepage explizit darauf hin, dass Teile der Publikation mit Zitierung für nicht kommerzielle Verwendung reproduziert werden können (<http://www.haematologica.org/information-for-authors>).

1 Einleitung

1.1 Definition und Pathogenese der AML

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine aggressive maligne Erkrankung des Blutsystems mit einer jährlichen alterskorrigierten Inzidenz von 3.5/100.000 Erwachsene, welche über einem Alter von 60 Jahren sogar auf 15-20 ansteigt (1). Sie trägt daher substantiell zur Morbidität und Mortalität der älteren Bevölkerung bei. Die Pathogenese der AML ist ein mehrstufiger Prozess, in welchem Mutagenese, epigenetische Dysregulation und das Auftreten von chromosomalen Aberrationen involviert sind. In diesem Prozess treten initiiierende Mutationen in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs) auf. Es entstehen präleukämische und leukämische Stammzellen, welche schlussendlich die Leukämie initiieren und perpetuieren. Diese frühen initiierenden Mutationen sind meistens in allen Leukämiezellen vorhanden und werden daher auch als klonale Mutationen bezeichnet. Im Gegensatz zu klonalen Mutationen, sind subklonale Mutationen nur in einem Teil der Leukämiezellen vorhanden und treten in der Regel als späte Ereignisse in der klonalen Evolution der AML auf. Fast jede AML ist durch eine Vielzahl an Subklonen unterschiedlicher Größe charakterisiert. Diese Subklone können unterschiedliche pathobiologische Eigenschaften und ein unterschiedliches Ansprechen auf antileukämische Therapien zeigen (2–8).

1.2 Diagnose der AML

Die meisten Symptome von Patientinnen und Patienten mit AML sind Ausdruck der Akkumulation von malignen, undifferenzierten myeloischen Zellen im Knochenmark und peripheren Blut, welche die physiologische Hämatopoese unterdrücken. Häufig präsentieren sich Patientinnen und Patienten mit Zeichen einer Knochenmarkinsuffizienz, wie einer Anämie, welche Müdigkeit, Blässe und Atemnot verursachen kann, und einer Thrombozytopenie, welche zu Blutungen und der Entstehung von Petechien führen kann (9).

2017 hat eine internationale Kommission, im Namen des „European LeukemiaNet“ (ELN), Empfehlungen für die Diagnose und das Management der AML publiziert (10). Um die Diagnose einer AML stellen zu können, muss der Blastenanteil im Knochenmark oder im Blut $\geq 20\%$ betragen. Dabei wird empfohlen, mindestens 200 Leukozyten am Blutaussstrich und 500 kernhaltige Zellen am Knochenmarksaussstrich zu zählen (10).

Außerdem ist es für die Diagnose notwendig, den myeloischen Ursprung der Zellen nachzuweisen. Dies kann durch Testen auf die Myeloperoxidase-Aktivität oder durch Immunphänotypisierung geschehen (9). Tabelle 1 zeigt eine Liste mit von der ELN empfohlenen Tests und Prozeduren für das diagnostische Vorgehen bei Patientinnen und Patienten mit AML (10).

Tabelle 1: Diagnostisches Vorgehen bei Patientinnen und Patienten mit AML. Modifiziert entnommen aus (10).

Tests für die Diagnosestellung

Blutbild und Differenzialblutbild
Knochenmarkbiospie
Immunphänotypisierung
Genetische Analysen
Zytogenetik
Screening für Genmutationen in <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i> , <i>RUNX1</i> , <i>FLT3</i> , <i>TP53</i> , <i>ASXL1</i>
Screening für Genumlagerungen: <i>PML-RARA</i> , <i>CBFB-MYH11</i> , <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>BCR-ABL1</i>

1.3 2016 WHO Klassifikation der AML

Ursprünglich wurde die AML mit dem French-American-British (FAB)-System klassifiziert, welches 1976 vorgeschlagen wurde. Zytochemische Färbungen und Morphologie wurden verwendet um die Erkrankung anhand des Ausmaßes an myeloischer und monozytärer Differenzierung einzuteilen (11). 1999 publizierte die WHO eine Klassifikation für hämatologische Malignome. Diese definierte verschiedene AML-Subgruppen, basierend auf einer Kombination von Morphologie, Immunphänotyp, zytogenetischen Eigenschaften und klinischen Eigenschaften (12). Seitdem hat es etliche Revisionen der initialen Klassifikation gegeben, die letzte im Jahr 2016. In der Revision von 2016 wurden erstmals Genmutationen in *CEBPA*, *NPM1* and *RUNX1* als klassendefinierende Eigenschaften inkorporiert (siehe Tabelle 2) (13).

Tabelle 2: 2016 WHO-Klassifikation der AML. Modifiziert entnommen aus (13).

Subgruppe	Spezifikation
Akute myeloische Leukämie mit rekurrenten genetischen Aberrationen	AML mit t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	APL mit t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>
	AML mit t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i>
	AML mit t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
	AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
	Provisorische Entität: AML mit <i>BCR-ABL1</i>
	AML mit mutiertem <i>NPM1</i>
	AML mit biallelischen Mutationen in <i>CEBPA</i>
Provisorische Entität: AML mit mutiertem <i>RUNX1</i>	
Akute myeloische Leukämie mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien	
Akute myeloische Leukämie, nicht spezifiziert	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung
	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung
	Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung
	Akute myelomonozytäre Leukämie
	Akute monoblastische/monozytäre Leukämie
	Rein erythroide Leukämie
	Erythroleukämie, erythroid/myeloisch
	Akute megakaryoblastische Leukämie
	Akute basophile Leukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose (syn.: akute Myelofibrose; akute Myelosklerose)
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Proliferationen mit Down-Syndrom assoziiert	Myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom
	Transiente abnormale Myelopoese (syn.: transiente myeloproliferative Erkrankung)

Subgruppe	Spezifikation
Akute Leukämie mit unklarer Linienzugehörigkeit	Akute undifferenzierte Leukämie
	Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und mit t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und mit t(v;11q23); <i>MLL</i> umgelagert/ <i>KMT2A</i>
	Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, B/myeloisch
	Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, T/myeloisch

1.4 Genomik der AML

Wie auch bei vielen anderen Tumorentitäten, sind die genetischen Veränderungen, die bei der AML vorkommen, gut charakterisiert. Die Identifizierung von Genmutationen und Genumlagerungen in einzelnen Patientinnen und Patienten ist von großem klinischem Interesse, weil die Risikostratifizierung von Patientinnen und Patienten mit AML größtenteils auf genetischen Veränderungen basiert. Die Risikostratifizierung wiederum determiniert das therapeutische Vorgehen (siehe Kapitel 1.6.) (10,14).

Im Vergleich mit anderen humanen Malignomen ist die Anzahl an kodierenden Mutationen bei der AML sehr gering (15). Nach einer großen Sequenzierstudie, welche von dem “The Cancer Genome Atlas Research Network” durchgeführt wurde und 200 AML-Genome analysierte, sind pro Patientin und Patient mit AML 13 kodierende Mutationen detektierbar. Nur fünf dieser Mutationen treten in Genen auf, welche rekurrent bei der AML mutiert sind. In der Studie wurden 23 rekurrent mutierte Gene identifiziert, welche in neun Kategorien, gelistet in Tabelle 3, eingeteilt werden können (16).

Tabelle 3: Funktionelle Kategorien von rekurrent mutierten Genen bei der AML. Modifiziert entnommen aus (14).

Funktionelle Kategorie	Ausgewählte Gene	Inzidenz in TCGA-Kohorte (%)
Signaltransduktion- beeinflussende Gene	Kinasen (z.B. <i>FLT3</i> , <i>KIT</i>), Phosphatasen (z.B. <i>PTPN11</i>), oder <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i>	59
DNA-Methylierung-assozierte Gene	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i>	44
Myeloische TF-Genefusionen oder -mutationen	TF-Fusionen [t(8;21), inv(16)/t(16;16)] TF-Mutationen (<i>RUNX1</i> , <i>CEBPA</i>)	18 22
Chromatin-modifizierende Gene	Mutationen (z.B. <i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i>) oder <i>KMT2A</i> - <i>Fusionen</i>	30
Nucleophosmin (NPM1) -Gen	<i>NPM1</i>	27
Tumorsuppressor-Gene	<i>TP53</i> , <i>WT1</i> , <i>PHF6</i>	16
Spliceosomkomplex-Gene	<i>SRSF2</i> , <i>SF3B1</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i>	14
Cohesinkomplex-Gene	<i>STAG2</i> , <i>RAD21</i>	13

Anmerkung: TF, Transkriptionsfaktor.

Manche dieser rekurrenten Mutationen treten häufiger gemeinsam auf, als man es von Zufallsereignissen erwarten würde. Dies wird im Englischen als „mutational co-occurrence“ bezeichnet. Die wichtigsten „co-occurrences“ finden sich bei Mutationen der Gene *FLT3*, *DNMT3A* und *NPM1*. Das Gegenteil von „mutational co-occurrence“ ist die „mutational exclusivity“. Zum Beispiel kommen Mutationen in *FLT3* äußerst selten zusammen mit Mutationen in Genen der *RAS*-Familie vor (16).

Gilliland and *Griffin* haben ein „double hit“ Modell der Leukämogenese beschrieben, in welchem Mutationen aus zwei Klassen notwendig für die maligne Transformation sind. Die erste Klasse inkludiert Mutationen, welche eine erhöhte Proliferation und einen Überlebensvorteil durch Aktivierung von Signalwegen vermitteln. Vertreter dieser Klasse sind Mutationen in *FLT3*, *KIT* und *NRAS*. Die zweite Klasse beinhaltet z.B. Mutationen in *RUNX1*, *CEBPA* und *RARA*, welche zu einem Differenzierungsblock führen (17).

Zusätzlich zu Genmutationen spielen auch eine Vielzahl von genetischen Umlagerungen eine Schlüsselrolle in der Leukämogenese. Eine sehr häufig detektierte Translokation ist t(15;17)(q22;q21), welche zu dem Fusionsprotein *PML-RARA* führt. *PML-RARA* ist charakteristisch für die akute Promyelozytenleukämie. Ein weiteres prominentes Beispiel für rekurrente Genumlagerungen bei Leukämien ist die Translokation t(9;22)(q34.1;q11.2), die die Fusion der Gene *ABL* and *BCR* verursacht (13).

1.5 Risikostratifizierung der AML

Genetische Veränderungen bei der AML sind ohne Zweifel von großer prognostischer Relevanz (2,14,18,19). Zytogenetische Analysen und ein Screening nach Mutationen in *NPM1*, *FLT3* und *CEBPA* wurden bereits 2010 in die ELN-Empfehlungen inkludiert (20). Tabelle 4 zeigt die 2017 ELN Risikostratifizierung, in welche Mutationen in *TP53*, *RUNX1* und *ASXL1* der Kategorie „ungünstig/Hoch-Risiko“ hinzugefügt wurden. Die ELN-Risikostratifizierung ist von immenser klinischer Bedeutung, da Patientinnen und Patienten unterschiedlicher Risikogruppen unterschiedliche Therapieregime erhalten sollten (10).

Tabelle 4: 2017 ELN-Risikostratifizierung basierend auf genetischen Veränderungen. Modifiziert entnommen aus (10).

Risikokategorie	Genetische Veränderungen
Günstig	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> ; mutiertes <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD^{low}</i> ; Biallelisch mutiertes <i>CEBPA</i>
Intermediär	Mutiertes <i>NPM1</i> und <i>FLT3-ITD^{high}</i> Wild-typ <i>NPM1 ohne FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD^{low}</i> (ohne Hoch-Risiko Veränderung) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> , zytogenetische Veränderung, welche nicht als günstig oder ungünstig gilt
Ungünstig	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> umgelagert t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EV11)</i> , -5 oder del(5q); -7; -17/abn(17p), Komplexer Karyotyp, monosomaler Karyotyp, Wild-type <i>NPM1</i> und <i>FLT3-ITD^{high}</i> , mutiertes <i>RUNX1</i> , mutiertes <i>ASXL1</i> , mutiertes <i>TP53</i>

1.6 Therapie der AML

Patientinnen und Patienten mit AML erhalten in der Regel eine Induktionstherapie, gefolgt von einer Konsolidierungstherapie. Ziel der Induktionstherapie ist es, die Blasten im Knochenmark zu eradizieren, um damit folglich eine normale Hämatopoese wiederherzustellen (10,21). Die Induktionstherapie bei Patientinnen und Patienten mit AML hat sich in den letzten 40 Jahren nur wenig verändert (21). Die Standard-Induktionstherapie besteht aus sieben Tagen mit kontinuierlichen Cytarabin-Infusionen und drei Tagen, an welchen intravenös ein Anthrazyclin verabreicht wird („7+3“). Dies führt bei jüngeren Erwachsenen in 60% bis 80% zu einer kompletten Remission, wohingegen nur 40% bis 60% der Patientinnen und Patienten mit einem Alter von ≥ 60 Jahre eine komplette Remission erreichen (20,22,23). 14 und 28 Tage nach dem Therapiebeginn sollte eine Knochenmarksbiopsie durchgeführt werden, um das Therapieansprechen zu beurteilen (10).

Um potentielle Reste der Erkrankung zu eliminieren und damit die Wahrscheinlichkeit für eine anhaltende Remission zu erhöhen, sollte der Induktionstherapie eine Konsolidierungstherapie folgen (9). Nach den ELN-Empfehlungen hängt die Art der Konsolidierungstherapie von dem Alter und der Risikogruppe der Patientinnen und Patienten ab (10). Weitere Details zu konventionellen Therapieregimen für Patientinnen und Patienten, welche fit für eine intensive Chemotherapie sind, sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Ausgewählte konventionelle Therapieregime für Patientinnen und Patienten, welche fit für eine intensive Chemotherapie sind. Modifiziert entnommen aus (10).

Ausgewählte konventionelle Therapieregime	
Induktionstherapie (altersunabhängig)	“7+3”: 3 d eines IV Anthracyclins: Daunorubicin 60 mg/m ² ; Idarubicin 12 mg/m ² ; oder Mitoxantrone 12 mg/m ² , und 7 d kontinuierliche Cytarabin-Infusionen (100-200 mg/m ²)
Konsolidierungstherapie	
Jüngere Patientinnen und Patienten (18-65y)	
<ul style="list-style-type: none"> Niedrig-Risiko Genetik 	2-4 Zyklen von IDAC (1000-1500 mg/m ² IV über 3 h q12h, d1-3; oder 1000-1500 mg/m ² IV über 3 h d1-5 oder 6)
<ul style="list-style-type: none"> Intermediär-Risiko Genetik 	Allogene HCT

	2-4 Zyklen von IDAC (1000-1500 mg/m ² IV über 3 h q12h, d1-3; oder 1000-1500 mg/m ² IV über 3 h d1-5 oder 6)
	Hochdosistherapie und autologe HCT
• Hoch-Risiko Genetik	Allogene HCT
Ältere Patientinnen und Patienten (>65y)	
• Niedrig-Risiko Genetik	2-3 Zyklen von IDAC (500-1000 mg/m ² IV über 3 h q12h, d1-3; oder 500-1000 mg/m ² IV über 3 h d1-5 oder 6)
• Intermediär/Hoch-Risiko Genetik	Ziehe allogene HCT für Patientinnen und Patienten mit niedrigem HCT-Komorbiditätsindex in Betracht

Anmerkung: d, Tage; y, Jahre; q, alle; IV, intravenös; IDAC, intermediäre Dosis AraC; HCT, hämatopoetische Zelltransplantation.

Patientinnen und Patienten mit hohem Risiko für Therapie-assoziierte Mortalität sind nicht fit für eine intensive Chemotherapie. Die Therapie für diese Patientinnen und Patienten ist nicht-kurativ und limitiert auf „best supportive care“, Niedrigdosistherapie (engl.: low-intensity treatment) und Therapien im Rahmen von klinischen Studien. Ausgewählte konventionelle Therapieregime für Patientinnen und Patienten, welche nicht fit für eine intensive Chemotherapie sind, sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Zu der low-intensity-Therapie zählt die Anwendung von hypomethylierenden Substanzen (Azacitidin und Decitabin) und low dose-Cytarabin (10).

Tabelle 6: Ausgewählte konventionelle Therapieregime für Patientinnen und Patienten, welche nicht fit für eine intensive Chemotherapie sind. Modifiziert entnommen aus (10).

Ausgewählte konventionelle Therapieregime	
Azacitidin	75 mg/m ² , SC, d1-7, q4 wk, bis Progression
Decitabin	20 mg/m ² , IV, d1-5, q4 wk, bis Progression
Low-dose Cytarabin	Low-dose Cytarabin (20 mg q12h, SC, d1-10, q4 wk; bis Progression); nicht empfohlen für Patientinnen und Patienten mit Hoch-Risiko Genetik
Best supportive care	Hydroxyurea; für Patientinnen und Patienten, welche gar keine antileukämische Therapie tolerieren

Anmerkung: SC, subkutan; d, Tage; q, alle; wk, Wochen; IV, intravenös.

Es gibt keinen Therapiestandard zur Behandlung von relapsierten beziehungsweise primär refraktären Patientinnen und Patienten. Tabelle 7 zeigt häufig verwendete Therapieregime für Patientinnen und Patienten, welche auf den ersten Zyklus der Induktionstherapie nicht ansprechen oder einen Relaps erlitten.

Tabelle 7: Therapieregime zur Behandlung von relapsierten oder primär refraktären Patientinnen und Patienten mit AML. Modifiziert entnommen aus (10).

Ausgewählte Therapieregime	
IDAC (mit oder ohne Anthrazyclin)	IDAC (1000-1500 mg/m ² IV über 3 h q12 h, d1-3 [500-1000 mg/m ² in Patientinnen und Patienten >60 y]; oder 1000-1500 mg/m ² IV über 3 h d1-5 oder 6 [500-1000 mg/m ² in Patientinnen und Patienten >60 y]); mit oder ohne Daunorubicin 45-60 mg/m ² , IV, d1-3; Idarubicin 8-10 mg/m ² , IV, d3-5, oder Mitoxantron 8-10 mg/m ² , IV, d1-3
FLAG-IDA	Fludarabin 30 mg/m ² IV, d2-6; Cytarabin 1500-2000 mg/m ² IV über 3 h, 4 h nach Fludarabin-Infusion, d2-6; Idarubicin 10 mg/m ² IV, d2-4; G-CSF 5 mg/kg, SC, d1-5; zusätzlich G-CSF bis WBC-Zahl >500/uL
MEC	Mitoxantron 8 mg/m ² , d1-5; Etoposid 100 mg/m ² , d1-5; Cytarabin 1000 mg/m ² , d1-5
Allogene HCT	Für Patientinnen und Patienten mit primär refraktärer Erkrankung, für Patientinnen und Patienten in der zweiten CR

Anmerkung: IDAC, intermediate dose AraC; IV, intravenös; h, Stunden; d, Tage; y, Jahre; FLAG IDA, Fludarabin, Cytarabin, G-CSF, Idarubicin; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; SC, subkutan; WBC, white blood cells = Leukozyten; MEC, Mitoxantron, Etoposid, Cytarabin; HCT, hematopoietic cell transplantation; CR, complete remission; HLA, human leucocyte antigen.

1.7 Kriterien des Therapieansprechens und Outcome-Parameter

Die ELN-Empfehlungen beinhalten auch Kriterien, um das Therapieansprechen zu beschreiben sowie Outcome-Parameter für klinische Studien, welche in dieser Arbeit für die Analysen verwendet wurden. Tabelle 8 fasst die Kriterien zur Beurteilung des Therapieansprechens zusammen.

Tabelle 8: ELN-Kriterien zur Beurteilung des Therapieansprechens. Modifiziert entnommen aus (10).

Kategorie	Definition
Therapieansprechen	
CR ohne minimale Resterkrankung (CR _{MRD} -)	Wenn vor Therapie untersucht, CR mit negativer RT-qPCR für einen genetischen Marker, oder CR mit negativer MFC
Komplette Remission (CR)	Knochenmarks-Blasten <5%; Fehlen von zirkulierenden Blasten und Blasten mit Auer-Stäbchen; Fehlen einer extramedullären Manifestation; ANC $\geq 1.0 \times 10^9/L$ (1000/ μ L); Thrombozytenzahl $\geq 100 \times 10^9/L$ (100 000/ μ L)
CR mit unvollständiger hämatologischer Genesung (CR _i)	Alle CR-Kriterien erfüllt, aber Neutropenie (<1.0 $\times 10^9/L$ [1000/ μ L]) oder Thrombopenie (<100 $\times 10^9/L$ [100 000/ μ L]) noch vorhanden
Morphologisch-Leukämie-freier Zustand (MLFS)	Knochenmarks-Blasten <5%; Fehlen von Blasten mit Auer-Stäbchen; Fehlen einer extramedullären Manifestation; hämatologische Genesung nicht notwendig
Partielle Remission (PR)	Alle hämatologischen Kriterien der CR erfüllt; Abfallen der Knochenmarks-Blasten auf 5% bis 25%; und Abfallen der Knochenmarks-Blasten um mindestens 50%
Therapieversagen	
Primär refraktäre Erkrankung	Keine CR oder CR _i nach 2 Zyklen der Induktionstherapie; ausgenommen sind Patientinnen und Patienten mit Tod in der Aplasie und mit Tod unklarer Ursache
Tod in der Aplasie	Tod tritt <7 d nach initialer Therapie und in zytopenem Zustand auf; mit aplastischem oder hypoplastischem Knochenmark, ohne Zeichen einer persistierenden Leukämie
Tod unklarer Ursache	Tod vor Vollendung der Therapie oder <7 d nach Vollendung der Therapie
Kriterien des Therapieansprechens für klinische Studien	
Stabile Erkrankung	Fehlen von CR _{MRD} -, CR, CR _i , PR, MLFS; und Kriterien für PD nicht erfüllt
Progrediente Erkrankung (PD)	Anstieg der Blasten im Knochenmark oder peripheren Blut: <ul style="list-style-type: none"> • >50% Anstieg des Blastenanteils im Knochenmark (Anstieg von mindestens 15% bei einem Blastenanteil von unter 30%; oder persistierende Knochenmarks-Blasten von >70% über mind. 3 mo; ohne Anstieg des ANC auf $>0.5 \times 10^9/L$ [500/μL], und/oder Thrombozytenzahl auf $>50 \times 10^9/L$ [50 000/μL]); oder • >50% Anstieg der Blasten im peripheren Blut (WBC x % blasts) auf $>25 \times 10^9/L$ (>25 000/μL); oder • neue extramedulläre Manifestation
Relaps	
Hämatologischer Relaps (nach CR _{MRD} , CR, CR _i)	Knochenmarks-Blasten $\geq 5\%$; oder Wiederauftreten von Blasten im Blut; oder Auftreten einer extramedullären Manifestation
Molekularer Relaps (after CR _{MRD} -)	Wenn vor Therapie untersucht, Wiederauftreten von MRD festgestellt durch RT-qPCR oder MFC

Anmerkung: RT-qPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; MFC, multiparameter flow cytometry = Multiparameter-Durchflusszytometrie; ANC, absolute neutrophil count = absolute Neutrophilenzahl; d, Tage; mo, Monate; WBC, white blood cells = Leukozyten.

Bezüglich der Outcome-Parameter wurden die folgenden Definitionen, wie sie auch von der ELN empfohlen werden, in dieser Arbeit verwendet:

- Gesamtüberleben (OS) ist die Zeit vom Eintritt in die Studie oder dem Diagnosezeitpunkt bis zum Tod aufgrund jeglicher Ursache (10).
- Relaps-freies Überleben (RFS) wird nur für Patientinnen und Patienten definiert, welche eine komplette Remission erreichen. Es bezeichnet die Zeit vom Erreichen der kompletten Remission bis zum Relaps oder Tod aufgrund jeglicher Ursache (10).
- Ereignis-freies Überleben (EFS) ist die Zeit vom Eintritt in die Studie oder dem Diagnosezeitpunkt bis zur primär refraktären Erkrankung oder bis zum Relaps oder Tod aufgrund jeglicher Ursache (10).

1.8 *TP53* bei der AML

Das Gen *TP53* ist am Chromosom 17p13.1 lokalisiert und codiert für das Protein p53. p53 weist eine Länge von 393 Aminosäuren auf und besitzt eine Proteinmasse von 53 kDa (24). p53 ist ein essentielles Protein, das eine Vielzahl an biologischen Prozessen in einer Zellkontext-spezifischen Art reguliert (25). Die wahrscheinlich am besten untersuchte Funktion von p53 ist seine Rolle in der Antwort auf Zellstress, wobei dabei Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose vermittelt werden können (25).

p53 wird in HSPCs exprimiert und moduliert Quieszenz und Selbsterneuerung, Funktionen welche unabdingbar für das lebenslange Erhalten eines Pools an hämatopoetischen Zellen sind (26–28). Durch Untersuchungen an gentechnisch veränderten Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte basale Expression von p53 die Stammzeleigenschaften von murinen LSK-Zellen (lineage-, *sca1*+, *c-kit*+ Zellen; hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen in der Maus) beeinträchtigt, was schlussendlich zu einer hämatopoetischen Insuffizienz führt (29,30). Im Gegensatz dazu sind Stammzellen von p53^{-/-}-Mäusen hochproliferativ und zeigen im Vergleich zu p53-Wild-Typ-Zellen eine gesteigerte Repopulationsfähigkeit. Diese Zellen neigen dazu, Mutationen zu akkumulieren und Mäuse mit konditionaler *Trp53*-Ablation in Zellen des Knochenmarks sind durch das frühe Auftreten von hämatologischen Malignomen charakterisiert (31–33).

Veränderungen von *TP53* und anderen Mitgliedern seines Signalweges kommen in über 50% aller humanen Krebserkrankungen vor (34,35). Der Beitrag von p53 zur Tumorentstehung könnte durch Verlust der Wild-Typ-Allele und/oder durch bestimmte mutierte Allele, welche zu neuen, zusätzlichen Funktionen von p53 führen, zustandekommen. (36). Keimbahnmutationen in *TP53* charakterisieren das Li-Fraumeni und das Li-Fraumeni-like Syndrom, welche autosomal-dominant vererbt werden und eine familiäre Krebsprädisposition vermitteln. Sowohl klinische als auch experimentelle Daten geben Hinweise darauf, dass p53-Veränderungen eine Neigung zu strahlungsinduzierter Onkogenese auslösen (33).

Bei der AML kommen somatisch erworbene *TP53*-Mutationen mit einer Häufigkeit von bis zu 15% vor und sind oft mit einem komplexen Karyotyp assoziiert (37,38). Es wurde bereits in etlichen Studien gezeigt, dass Veränderungen von p53 bei der AML mit einer äußerst schlechten Prognose assoziiert sind (37,39,40).

Von besonderer Bedeutung ist, dass Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Mutationen eine Therapieresistenz gegenüber intensiven Therapien, wie etwa hämatopoetischen Stammzelltransplantationen, zeigen und eine 3-Jahre-Gesamtüberlebensrate zwischen 0% und 15% haben (37,39,40). Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass die hypomethylierende Substanz Decitabin das Therapieansprechen von AML-Patientinnen und -Patienten mit *TP53*-Mutationen signifikant verbessert, was einen weiteren Schritt in Richtung personalisierter Medizin darstellt (41).

Mutationen in *TP53* charakterisieren nicht nur die tatsächliche Leukämie, sie wurden auch im peripheren Blut von ansonsten gesunden Erwachsenen detektiert. Dieser Zustand wird als „CHIP“ (clonal hematopoiesis of indeterminate potential) bezeichnet (42). Die Prävalenz von CHIP nimmt mit dem Alter stark zu und ist signifikant mit der Entstehung von hämatologischen Malignomen assoziiert (43,44). Es gibt Hinweise darauf, dass mutierte Blutzellen in Individuen mit CHIP und einem Primärtumor einer anderen Entität durch die konsekutive zytotoxische Therapie expandieren und anschließend Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien auslösen (45–49).

Bis jetzt ist die Rolle von subklonalen *TP53*-Mutationen bei Patientinnen und Patienten mit AML noch nicht ausreichend adressiert worden. Zwei kürzlich publizierte Arbeiten berichten präliminäre und widersprüchliche Ergebnisse von Patientinnen und Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS) und einigen wenigen Patientinnen und Patienten mit AML (50,51). *Sallman* et al. schlussfolgerten, dass ausschließlich *TP53*-Mutationen mit einer VAF (variant allele frequency, Allelfrequenz) von >40% zum Zeitpunkt der AML-Diagnose von prognostischer Relevanz sind. Dahingegen fanden *Goel* et al. heraus, dass nicht nur klonale, sondern auch subklonale Mutationen mit einer VAF unter 20% mit einer schlechten Prognose assoziiert waren (50,51). In diesen Kohorten machten die subklonalen Mutationen 30% bis 50% der *TP53*-Mutationen aus. Mit dem Hintergrund, dass *TP53*-Mutationen als Prognosefaktor in die Risikostratifizierung der ELN inkorporiert wurden, ist es von fundamentaler Wichtigkeit, die klinische und biologische Rolle von subklonalen *TP53*-Mutationen bei der AML aufzuklären.

1.9 Hypothese und Ziel

In den bisherigen Studien zu Patientinnen und Patienten mit AML, wurden die *TP53*-Mutationen lediglich als dichotome Variablen untersucht. Nachdem „next generation sequencing“-Technologien Einzug in die Klinik gefunden haben, können Subklone unterschiedlicher Größe nun mit einer sehr hohen Sensitivität detektiert werden.

Hier stellen wir die Hypothese auf, dass auch subklonale TP53-Mutationen, definiert durch eine VAF<20%, in Patientinnen und Patienten mit AML, Indikatoren für ein schlechtes Outcome sind.

Unser Ziel war es, die klinischen Charakteristika und die prognostische Relevanz von subklonalen *TP53*-Mutationen in einer großen Kohorte von Patientinnen und Patienten, welche in Studien der “German-Austrian AML Study Group” (AMLSG) therapiert wurden, zu untersuchen.

2 Methoden

Die Studie wurde von den Ethik-Kommissionen der Universität Ulm, Ulm, Deutschland und von der Medizinischen Universität Graz, Graz, Österreich genehmigt und gemäß den REMARK-Richtlinien (“REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies”) durchgeführt (52).

2.1 Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer

Insgesamt wurden die Daten von 1537 Patientinnen und Patienten mit AML, welche in drei prospektiven, klinischen Studien der AMLSG intensiv therapiert wurden, analysiert (53–55). Eine Liste mit den beteiligten Forscherinnen und Forschern und den Zentren der AMLSG befindet sich im Anhang der Diplomarbeit.

2.2 Details zu den analysierten Studien der AMLSG

In der Studie AML-HD98A erhielten 627 Patientinnen und Patienten im Alter von 18 bis 65 Jahren eine Induktionstherapie mit Idarubicin, Cytarabin und Etoposid (ICE). Hoch-Risiko-Patientinnen und -Patienten wurde eine allogene HSCT angeboten, intermediär-Risiko-Patientinnen und Patienten entweder eine HSCT oder intensive Chemotherapie und niedrig-Risiko-Patientinnen und Patienten erhielten eine intensive Chemotherapie. Das mediane Alter der 596 Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Wild-Typ-Status war 46.8 Jahre (Spanne, 18-65), das der 31 Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Mutationen war 57.3 Jahre (Spanne, 28-61). Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Mutationen machten 4.9% der Studienkohorte aus (2,8).

Die Studie AMLSG 07-04 hatte ein ähnliches Design wie die Studie AML-HD98A. Sie inkludierte 737 Patientinnen und Patienten im Alter von 18 bis 61 Jahren, welche randomisiert entweder ICE oder ICE/ATRA (all-trans-retinoic acid) erhielten. Das mediane Alter der 689 Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Wild-Typ-Status war 48.3 Jahre (Spanne, 18-61), das der 48 Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Mutationen war 54.1 Jahre (Spanne, 20-60). Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Mutationen machten 6.5% der Studienkohorte aus (2,8).

Die Studie AML-HD98B inkludierte 173 Patientinnen und Patienten im Alter von 58 bis 84 Jahren, welche randomisiert entweder ICE oder ICE/ATRA zur Induktion erhielten. Das mediane Alter der 154 Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Wild-Typ-Status war 65,9 Jahre (Spanne, 58-84), das der 19 Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Mutationen 66.8 Jahre (Spanne, 61-79). Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Mutationen machten 10.9% der Studienkohorte aus (8).

Zum Diagnosezeitpunkt wurden von allen Patientinnen und Patienten Knochenmarks- und Blutproben gesammelt. Durch eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die mononukleären Zellen angereichert. Alle Proben wurden zentral in der Biobank der Universität von Ulm, Ulm, Deutschland, gelagert (2,8).

2.3 Sequenzanalyse

Diagnostische AML-Proben von 1537 Patientinnen und Patienten wurden mit einer „targeted sequencing“-Methode untersucht, welche 111 Gene, die in der AML rekurrent mutiert sind, sequenziert (2,8). Die Sequenzdaten wurden im European Genome-Phenome Archive (www.ebi.ac.uk/ega, accession number EGAS00001000275) gespeichert und für die aktuelle Arbeit wieder abgerufen (8).

2.4 Next Generation Sequencing

Für das Sequenzieren der einzelnen Proben wurden diese durch einzigartige DNA-Barcodes mit einem Index versehen. Anschließend wurden äquimolare Mengen der Genbibliotheken (libraries) vorbereitet und an „RNA-baits“ (SureSelect, Agilent) hybridisiert. Zum Sequenzieren wurde die Illumina HiSeq-Plattform verwendet. Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Burrows-Wheeler Aligners mit dem humanen Genom (NCBI build 37) verglichen. Proben mit einer medianen „coverage“ von <50x und Gene mit einer medianen „coverage“ von <20x wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die mediane „coverage“ für *TP53* lag bei 157x. Basensubstitutionen wurden mit Hilfe von zwei bioinformatischen Methoden (<http://github.com/cancerit/CaVEMan> und <https://github.com/gerstung-lab/deepSNV>) identifiziert und mit der COSMIC Datenbank annotiert. Synonyme Varianten und Keimbahnpolymorphismen mit einer Populationsfrequenz von über 1% wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die VAF wurde berechnet durch die Division der Anzahl an mutierten „Reads“ durch die Anzahl an Referenz-Reads (2). Bei den Patientinnen und Patienten mit mehreren *TP53*-Mutationen wurde die Mutation mit der höchsten VAF in die Analyse inkludiert (8).

Mehrere Knochenmarks- und Blutproben von einem Patienten mit AML mit einer klonalen und einer subklonalen *TP53*-Mutation aus der Leukämie-Biobank der Medizinischen Universität Graz, wurden, wie kürzlich beschrieben, vorbereitet und mittels der „ultradeep sequencing“-Methode Safe-SeqS analysiert (8,56).

Diese Methode basiert auf dem Markieren von einzelnen DNA-Molekülen mit molekularen Barcodes, was das Rückverfolgen von Sequenzier-Reads auf die ursprünglichen Template-Stränge ermöglicht. Dadurch können PCR-Fehler während des Vorbereitens der Library identifiziert werden, wodurch das Detektionslimit für Varianten auf eine VAF von $<0.1\%$ gesenkt wird. 10 ng DNA wurden mit 10 Zyklen durch die Phusion-Polymerase (Thermo Fisher) amplifiziert. Dafür wurden spezifische Primer für *TP53*, *KRAS* und *FLT3*, welche einen 12 Basen langen UID (unique identifier) enthalten, verwendet. Nach der Aufreinigung mit Ampure XP beads (Beckman Coulter) wurden Illumina-spezifische Adapter und Indices über eine zweite PCR mit 35 Zyklen angehängt. Die Qualitätskontrolle und die Quantifizierung der Libraries wurde mit einem Agilent Bioanalyzer DNA 7500 chip (Agilent Technologies) durchgeführt. Sequenziert wurde auf einer Illumina MiSeq-Plattform in einem 2x150bp paired-end Lauf. Die generierten Reads wurden gemäß ihrer UID in Read-Familien gruppiert. Die Konsensus-Sequenz der jeweiligen Read-Familie wurde dann mit dem humanen Referenzgenom (hg19) verglichen (Burrows-Wheeler transform and samtools). Die Alignments wurden mithilfe des „Integrative Genomes Viewer“ visualisiert, um die Varianten zu detektieren (8).

2.5 Statistische Auswertung

Die Studie wurde designt, um Unterschiede im Gesamtüberleben von Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Wild-Typ-Status und Patientinnen und Patienten mit subklonalen *TP53*-Mutationen zu untersuchen. Basierend auf den Daten von Papaemmanuil et al. (2) sollte eine absolute Reduktion des 3-Jahre-OS von 35% im Vergleich zu Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Wild-Typ-Status bei einer Stichprobengröße von 574 Patientinnen und Patienten detektierbar sein, wenn ein OS von 55% für Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Wild-Typ-Status und eine Häufigkeit von 5% für Patientinnen und Patienten mit subklonaler *TP53*-Mutation angenommen wird (8).

Die wichtigsten Outcome-Parameter, die untersucht wurden, waren das OS und das EFS. Wir bestimmten die medianen Überlebenszeiten und geschätzten 3-Jahres-Überlebensraten zusammen mit deren 95% Konfidenzintervallen (CIs). Die Überlebensraten der Patientinnen und Patienten wurden mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet und durch den Log-Rank-Test verglichen. Die Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Mutationen wurden anhand der VAF der *TP53*-Mutationen in drei Gruppen unterteilt ($>40\%$, $20\%-40\%$, $<20\%$).

Diese Einteilung in drei Gruppen, basierend auf der VAF der Mutationen, erfolgte aufgrund unterschiedlicher konkomitanter chromosomaler Aberrationen, wie im Ergebnisteil genauer erläutert wird. Außerdem erlaubte die Einteilung einen Vergleich mit bereits publizierten Berichten über den Einfluss von VAFs von *TP53*-Mutationen bei Patientinnen und Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (50,51).

Es wurden eine univariate und eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt, um relevante Prognosefaktoren zu identifizieren. Neben dem *TP53*-Status haben wir auch das Alter, die Leukozytenzahl, die zytogenetische Risikogruppe und den AML-Typ (de novo, sekundär, Therapie-assoziiert) untersucht. Die Hazard Ratios sind zusammen mit ihren 95% Konfidenzintervallen angegeben. Um Patientinnen- und Patientencharakteristika zwischen den unterschiedlichen VAF-basierten Gruppen zu vergleichen, wurden für kategoriale Parameter der Fisher's-Exact-Test und für kontinuierliche Parameter der Kruskal-Wallis- oder der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Zeigte der „Overall“-Test zwischen den drei VAF-basierten Gruppen statistisch signifikante Unterschiede, wurden post-hoc Tests durchgeführt. Weil Tests für multiple Gruppen ausgeführt wurden, verwendeten wir eine Bonferroni-Korrektur und definierten einen p-Wert von <0.017 als statistisch signifikant. Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Programms „R“ Version 3.4.4 (<https://www.r-project.org>) durchgeführt (8).

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika von *TP53*-mutierten Subklonen in AML

3.1.1 Patientinnen- und Patientencharakteristika

1537 Patientinnen und Patienten aus den drei klinischen Studien AMLSG HD98A, HD98B und 07-04 wurden in dieser Arbeit analysiert. Wie in Tabelle 9 dargestellt, hatten 1408 (91.6%) Patientinnen und Patienten eine *de novo* AML, 61 (4.0%) Patientinnen und Patienten eine sekundäre AML und 68 (4.4%) eine Therapie-assoziierte AML. Das mediane Follow-up aller Patientinnen und Patienten lag bei 25 Monaten (Spanne, 0 – 219.6)(8).

Das mediane Alter von *TP53*-mutierten Patientinnen und Patienten war 57.4 Jahre (Spanne, 20.0 – 78.8), was signifikant ($p < 0.001$) höher ist, als bei den Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Wild-Typ-Status (Median, 49.4; Spanne, 18.3 – 84.5). Zwischen den drei VAF-basierten Untergruppen war bezüglich des Alters jedoch kein Unterschied feststellbar. Der Anteil an männlichen Patienten war in der *TP53*-mutierten Gruppe höher als in der Wild-Typ-Gruppe (61.2% versus 52.7%). Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p= 0.116$). Unter den *TP53*-mutierten AMLs waren vermehrt Therapie-assoziierte AMLs zu finden. 12.2% der *TP53*-mutierten AMLs waren Therapie-assoziiert, wohingegen nur 3.9% der *TP53*-Wild-Typ AMLs Therapie-assoziiert waren (8).

Tabelle 9: Patientinnen- und Patientencharakteristika. Modifiziert entnommen aus (8).

	<i>TP53</i> Wild- Type (N=1439)	<i>TP53</i> -mutiert				
		<i>TP53</i> - mutiert (N=98)	p- Wert	VAF <20% (N=18)	VAF 20%-40% (N=19)	VAF >40% (N=61)
Geschlecht			0.116			
männlich	758 (52.7%)	60 (61.2%)		9 (50.0%)	14 (73.7%)	37 (60.7%)
weiblich	681 (47.3%)	38 (38.8%)		9 (50.0%)	5 (26.3%)	24 (39.3%)
Alter (Median, Jahre) [Spanne]	49.4 [18.3- 84.5]	57.4 [20.0- 78.8]	<0.001	58.1 [20.0- 73.3]	56.9 [28.4- 76.4]	56.9 [28.2- 78.8]
Typ der AML			0.002			
<i>de novo</i>	1326 (92.1%)	82 (83.7%)		18 (100%)	14 (73.7%)	50 (82.0%)
sekundär	57 (4.0%)	4 (4.1%)		0 (0.0%)	1 (5.3%)	3 (4.9%)
Therapie-assoziiert	56 (3.9%)	12 (12.2%)		0 (0.0%)	4 (21.1%)	8 (13.1%)

WBC (Median, 10⁹/l) [Spanne]	15.6 [0.2-532.7]	4.8 [0.5-145.4]	<0.001	3.0 [1.0-133.2]	3.3 [0.5-43.3]	7.7 [1.0-145.4]
PB-Blasten (Median, %) [Spanne]	38.0 [0.0-100.0]	19.0 [0.0-96.0]	0.001	5.0 [0.0-96.0]	11.0 [0.0-83.0]	31.0 [0.0-92.0]
BM-Blasten (Median, %) [Spanne]	76.0 [0.0-100.0]	60.0 [14.0-100.0]	0.002	46.0 [18.0-100.0]	60.0 [14.0-90.0]	69.0 [20.0-95.0]
Zytogenetisches Risiko			<0.001			
niedrig	202 (15.1%)	2 (2.4%)		0 (0.0%)	1 (6.2%)	1 (1.9%)
intermediär	930 (69.9%)	11 (13.1%)		6 (42.9%)	0 (0.0%)	5 (9.3%)
hoch	199 (15.0%)	71 (84.5%)		8 (57.1%)	15 (93.8%)	48 (88.9%)
ELN Risiko 2010			<0.001			
niedrig	421 (33.2%)	2 (2.4%)		1 (7.1%)	1 (6.2%)	0 (0.0%)
intermediär-1	402 (31.7%)	7 (8.3%)		4 (28.6%)	0 (0.0%)	3 (5.6%)
intermediär-2	258 (20.4%)	4 (4.8%)		1 (7.1%)	0 (0.0%)	3 (5.6%)
hoch	186 (14.7%)	71 (84.5%)		8 (57.1%)	15 (93.8%)	48 (88.9%)
Komplette Remission	1221 (84.9%)	47 (48.0%)	<0.001	10 (55.6%)	11 (57.9%)	26 (42.6%)
Konsolidationstherapie	998 (69.4%)	33 (33.7%)	<0.001	6 (33.3%)	8 (42.1%)	19 (31.1%)
Chemotherapie	578 (57.9%)	14 (42.4%)		3 (50.0%)	4 (50.0%)	7 (36.8%)
Autologe HSCT	87 (8.7%)	1 (3.0%)		0 (0.0%)	1 (12.5%)	0 (0.0%)
allogene HSCT	333 (33.4%)	18 (54.5%)		3 (50.0%)	3 (37.5%)	12 (63.2%)
Relaps	584 (47.8%)	32 (68.1%)	0.007	5 (50.0%)	9 (81.8%)	18 (69.2%)

Anmerkung: VAF, variant allele frequency; WBC, white blood cells = Leukozyten; PB, peripheres Blut; BM, Knochenmark; ELN, European Leukemia Net; HSCT, hämatopoetische Stammzelltransplantation

3.1.2 Mutationen

Insgesamt wurden 108 pathogene *TP53*-Mutationen (Tabelle 10) in 98 (6.4%) Patientinnen und Patienten gefunden. 7 Patientinnen und Patienten zeigten jeweils zwei *TP53*-Mutationen und eine Patientin zeigte sogar vier *TP53*-Mutationen (8). Von den 98 Patientinnen und Patienten trugen 61 (62.2%) Mutationen mit einer VAF von >40%, welche hier als klonale Mutationen bezeichnet werden. 19 (19.4%) der Patientinnen und Patienten trugen Mutationen mit einer VAF zwischen 20% und 40% und 18 (18.4) Patientinnen und Patienten trugen Mutationen mit einer VAF <20%, welche hier als subklonale Mutationen bezeichnet werden. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, handelt es sich bei fast allen Mutationen, aus allen drei Subgruppen, um Missens-Mutationen, welche in der DNA-Bindedomäne des Gens lokalisiert sind (8).

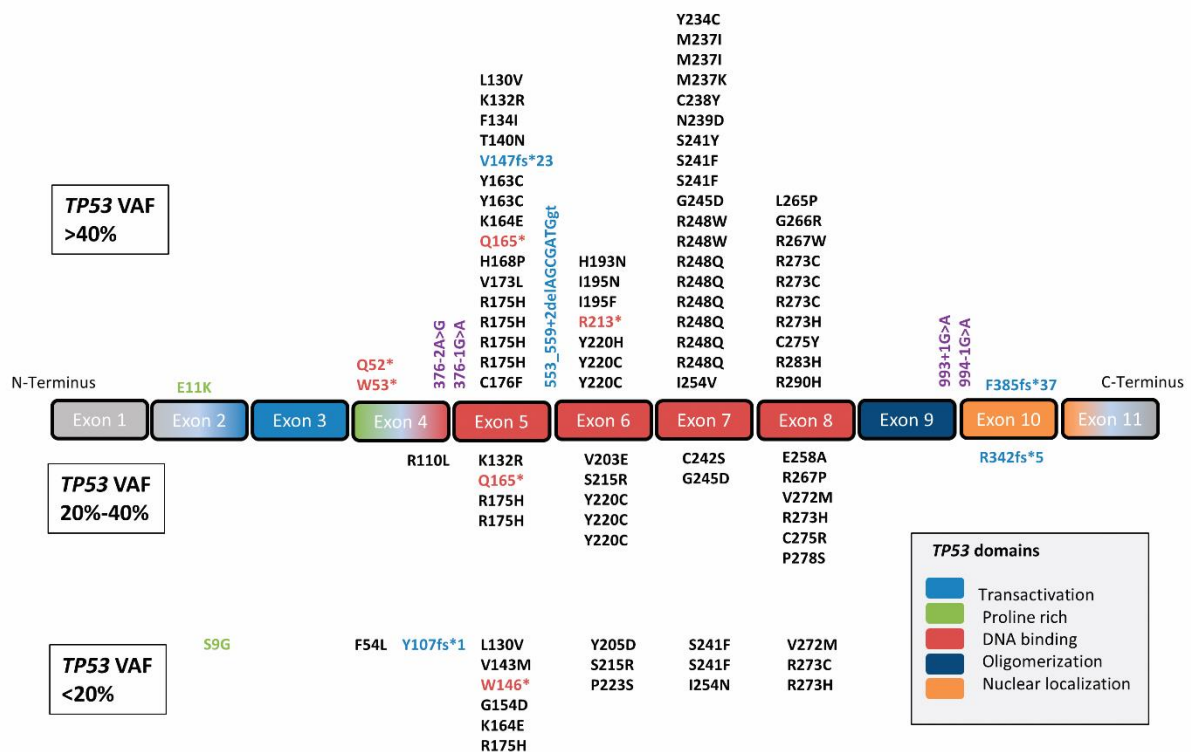


Abbildung 1: Verteilung der 108 *TP53*-Mutationen innerhalb des Gens. Missens-Mutationen sind in Schwarz, Nonsense-Mutationen in Rot, Insertionen/Deletionen in Blau und essenzielle Splice-Site-Mutationen in Violett gehalten. Entnommen aus (8).

Weder der Mutationstyp ($p=0.279$), noch der Locus der Mutationen ($p=0.687$) zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den drei *TP53*-mutierten Subgruppen. *TP53*-mutierte Patientinnen und Patienten zeigten eine signifikant niedrigere Leukozytenzahl und einen signifikant niedrigeren Blastenanteil im Blut und Knochenmark, als Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Wild-Typ-Status (Tabelle 9). Jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei *TP53*-mutierten Subgruppen (8).

Tabelle 10: Details zu detektierten *TP53*-Mutationen. Modifiziert entnommen aus (8).

Studie	Pat. ID	VAF (%)	cDNA Austausch	AA Austausch	Konsequenz	Karyotyp
07-04	17	12.50	c.461G>A	p.G154D	Missens	47,XY,del(5)(q15q33),+8
07-04	30	23.28	c.773A>C	p.E258A	Missens	komplex
07-04	32	13.74	c.817C>T	p.R273C	Missens	46,XX
07-04	41	71.93	c.524G>A	p.R175H	Missens	komplex
07-04	76	45.69	c.869G>A	p.R290H	Missens	47,XX,+10[20]/48,XX,+10,+21[2]
07-04	110	62.66	c.658T>C	p.Y220H	Missens	komplex
07-04	129	58.93	c.488A>G	p.Y163C	Missens	komplex
07-04	133	96.33	c.713G>A	p.C238Y	Missens	komplex
07-04	139	8.70	c.427G>A	p.V143M	Missens	komplex
07-04	177	89.01	c.524G>A	p.R175H	Missens	komplex
07-04	197	88.02	c.743G>A	p.R248Q	Missens	komplex
07-04	198	30.77	c.659A>G	p.Y220C	Missens	komplex
07-04	204	44.36	c.1024C>T	p.R342*	Nonsens	komplex
07-04	204	46.25	c.796G>C	p.G266R	Missens	komplex
07-04	214	77.72	c.743G>A	p.R248Q	Missens	komplex
07-04	228	94.44	c.503A>C	p.H168P	Missens	komplex
07-04	241	87.94	c.994-1G>A	NA	Essenzielle Splice-Site	46,XY
07-04	246	46.36	c.799C>T	p.R267W	Missens	komplex
07-04	251	70.95	c.817C>T	p.R273C	Missens	komplex
07-04	302	86.52	c.824G>A	p.C275Y	Missens	komplex
07-04	421	5.78	c.826G>C	p.A276P	Missens	komplex
07-04	421	12.84	c.743G>A	p.R248Q	Missens	komplex
07-04	421	13.98	c.587G>A	p.R196Q	Missens	komplex
07-04	421	38.55	c.395A>G	p.K132R	Missens	komplex
07-04	439	9.96	c.613T>G	p.Y205D	Missens	keine Metaphasen
07-04	462	84,75	c.583A>T	p.I195F	Missens	komplex
07-04	475	37.62	c.659A>G	p.Y220C	Missens	46,XX,t(8;20;21)(q22;q13;q22)
07-04	578	71.64	c.524G>A	p.R175H	Missens	komplex
07-04	583	8.79	c.818G>A	p.R273H	Missens	46,XY
07-04	654	13.41	c.524G>A	p.R175H	Missens	46,XY
07-04	690	17.31	c.437G>A	p.W146*	Nonsens	keine Metaphasen
07-04	705	22.86	c.524G>A	p.R175H	Missens	komplex
07-04	705	20.55	c.673-1G>A	NA	Essenzielle Splice-Site	komplex
07-04	743	36.62	c.493C>T	p.Q165*	Nonsens	komplex
07-04	873	76.99	c.524G>A	p.R175H	Missens	keine Metaphasen
07-04	890	69.66	c.527G>T	p.C176F	Missens	komplex
07-04	909	4.66	c.667C>T	p.P223S	Missens	46,XY
07-04	911	26.96	c.832C>T	p.P278S	Missens	46,XY,t(11;17)(q23;q12)[9]/46,XY[7]
07-04	913	5.15	c.761T>A	p.I254N	Missens	Keine Daten
07-04	944	88.00	c.517G>T	p.V173L	Missens	komplex
07-04	954	47.22	c.742C>T	p.R248W	Missens	komplex
07-04	975	28.92	c.524G>A	p.R175H	Missens	keine Metaphasen
07-04	1015	83.79	c.743G>A	p.R248Q	Missens	komplex
07-04	1056	7.69	c.722C>T	p.S241F	Missens	komplex

Studie	Pat. ID	VAF (%)	cDNA Austausch	AA Austausch	Konsequenz	Karyotyp
07-04	1096	89.47	c.817C>T	p.R273C	Missens	komplex
07-04	1100	22.48	c.734G>A	p.G245D	Missens	komplex
07-04	1107	52.38	c.1154delT	p.F385fs*37	Deletion_Frameshift	46,XX,del(5)(q22q33),-7,+mar[20]
07-04	1120	12.24	c.388C>G	p.L130V	Missens	komplex
07-04	1135	33.15	c.659A>G	p.Y220C	Missens	komplex
07-04	1156	94.53	c.710T>A	p.M237K	Missens	komplex
07-04	1169	11.03	c.645T>G	p.S215R	Missens	komplex
07-04	1171	77.72	c.743G>A	p.R248Q	Missens	komplex
07-04	1216	49.47	c.584T>A	p.I195N	Missens	komplex
98A	28	54.37	c.400T>A	p.F134I	Missens	komplex
98A	69	67.95	c.701A>G	p.Y234C	Missens	komplex
98A	152	25.23	c.1022_1023insT	p.R342fs*5	Insertion_Frameshift	komplex
98A	213	94.06	c.743G>A	p.R248Q	Missens	komplex
98A	233	53.28	c.760A>G	p.I254V	Missens	keine Metaphasen
98A	266	58.82	c.490A>G	p.K164E	Missens	komplex
98A	296	44.19	c.419C>A	p.T140N	Missens	46,XY
98A	320	52.61	c.31G>A	p.E11K	Missens	Keine Daten
98A	409	14.85	c.814G>A	p.V272M	Missens	komplex
98A	434	33.85	c.823T>C	p.C275R	Missens	komplex
98A	477	37.85	c.818G>A	p.R273H	Missens	
98A	498	7.20	c.722C>T	p.S241F	Missens	keine Metaphasen
98A	536	96.77	c.488A>G	p.Y163C	Missens	komplex
98A	551	25.48	c.800G>C	p.R267P	Missens	komplex
98A	554	84.35	c.722C>T	p.S241F	Missens	komplex
98A	568	90.91	c.794T>C	p.L265P	Missens	komplex
98A	598	34.38	c.814G>A	p.V272M	Missens	keine Metaphasen
98A	624	73.65	c.711G>A	p.M237I	Missens	komplex
98A	630	96.97	c.159G>A	p.W53*	Nonsens	komplex
98A	661	71.74	c.439delG	p.V147fs*23	Deletion_Frameshift	komplex
98A	691	48.00	c.848G>A	p.R283H	Missens	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[10]/47,XY,+8,t(9;11)(p22;q23)[5]
98A	692	72.28	c.722C>T	p.S241F	Missens	komplex
98A	695	69.83	c.722C>A	p.S241Y	Missens	komplex
98A	739	89.19	c.376-1G>A	NA	Essenzielle Splice-Site	komplex
98A	799	64.37	c.742C>T	p.R248W	Missens	komplex
98A	839	79.38	c.711G>A	p.M237I	Missens	komplex
98A	840	91.49	c.493C>T	p.Q165*	Nonsens	keine Metaphasen
98A	870	31.78	c.608T>A	p.V203E	Missens	komplex
98A	919	16.94	c.160T>C	p.F54L	Missens	46,XX
98A	941	78.13	c.376-2A>G	NA	essenzielle Splice-Site	keine Metaphasen
98A	1076	76.67	c.395A>G	p.K132R	Missens	komplex
98B	35	28.98	c.725G>C	p.C242S	Missens	keine Metaphasen
98B	49	87.21	c.637C>T	p.R213*	Nonsens	komplex
98B	69	15.71	c.25A>G	p.S9G	Missens	47,XX,+11
98B	71	84.08	c.154C>T	p.Q52*	Nonsens	komplex

Studie	Pat. ID	VAF (%)	cDNA Austausch	AA Austausch	Konsequenz	Karyotyp
98B	87	69.93	c.577C>A	p.H193N	Missens	keine Metaphasen
98B	98	15.51	c.711G>A	p.M237I	Missens	komplex
98B	98	16.23	c.490A>G	p.K164E	Missens	komplex
98B	103	89.86	c.993+1G>A	NA	essenzielle Splice-Site	keine Metaphasen
98B	126	43.67	c.785G>T	p.G262V	Missens	46,XY
98B	126	47.57	c.553_559+2delAGC GATGgt	p.?	Deletion	46,XY
98B	199	26.99	c.645T>G	p.S215R	Missens	komplex
98B	199	19.44	c.560-1G>A	NA	essenzielle Splice-Site	komplex
98B	201	16.67	c.472delC	p.R158fs*12	Deletion_Frameshift	komplex
98B	201	18.97	c.320_321insA	p.Y107fs*1	Insertion_Frameshift	komplex
98B	220	57.03	c.715A>G	p.N239D	Missens	komplex
98B	226	81.20	c.818G>A	p.R273H	Missens	47,XX,del(5)(q13q33),+6[13]/46,XX,del(5)(q13q33)[5]
98B	275	34.88	c.329G>T	p.R110L	Missens	komplex
98B	292	64.20	c.659A>G	p.Y220C	Missens	46,XY,del(5)(q13q33)[10]/47,XY,+8[3]/46,XY[11]
98B	332	58.54	c.388C>G	p.L130V	Missens	komplex
98B	352	72.05	c.659A>G	p.Y220C	Missens	komplex
98B	352	7.69	c.438G>A	p.W146*	Nonsense	komplex
98B	358	76.00	c.817C>T	p.R273C	Missens	komplex
98B	408	77.17	c.743G>A	p.R248Q	Missens	komplex
98B	458	54.10	c.734G>A	p.G245D	Missens	komplex

Anmerkung: ID, Patientinnen- und Patientenidentifikationsnummer; VAF, variant allele frequency; AA, Aminosäure

3.1.3 Chromosomale Aberrationen

Es ist hinreichend belegt, dass *TP53*-Mutationen sowohl mit komplexen Karyotypen als auch mit Markerchromosomen, welche durch Chromothripsis entstehen, assoziiert sind (57,58). Wie in Tabelle 10 gezeigt, besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen komplexen Karyotypen und *TP53*-Mutationen mit VAFs >40% und zwischen 20% und 40%, jedoch nicht mit Mutationen mit VAFs von <20% (8). Bezüglich des Vorhandenseins von Markerchromosomen bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Wild-Typ-Status und Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Mutationen (2.9% versus 59.8%; $P < 0.001$). Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den drei *TP53*-mutierten Subgruppen. Weiters war in der Gruppe mit subklonalen *TP53*-Mutationen eine niedrigere Zahl an chromosomalen Verlusten feststellbar, als in der Gruppe mit klonalen Mutationen. (8)

Tabelle 11: Chromosomale Aberrationen und kooperierende Genmutationen in den Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Mutationen, je nach VAF der Mutationen (VAF; <20%;20%-40%; >40%). Modifiziert entnommen aus (8).

	VAF <20%	VAF 20%- 40%	VAF >40%	Overall p-Wert	Posthoc Tests		
					<20% vs. 20%- 40%	<20% vs. >40%	20%-40% vs. >40%
Komplexer Karyotyp	7 (50.0%)	14 (87.5%)	46 (85.2%)	0.019	0.046	0.009	1.000
Markerchromosom	4 (28.6%)	11 (73.3%)	34 (64.2%)	0.030	0.027	0.031	0.758
-5/5q-	7 (38.9%)	8 (42.1%)	31 (50.8%)	0.625			
-7/7q-	4 (22.2%)	6 (31.6%)	15 (24.6%)	0.799			
-17/17p-	1 (5.6%)	4 (21.1%)	16 (26.2%)	0.201			
Zahl an chr. Verlusten, Median [Spanne]	1.0 [0.0- 8.0]	4.0 [0.0- 13.0]	5.0 [0.0- 13.0]	0.028	0.056	0.008	0.806
Zahl an chr. Zugewinnen, Median [Spanne]	1.0 [0.0- 6.0]	4.5 [0.0- 9.0]	3.0 [0.0- 9.0]	0.050			
Zahl an kooperierenden Mutationen, Median [Spanne]	1.0 [0.0- 4.0]	0.0 [0.0- 3.0]	1.0 [0.0- 5.0]	0.255			

3.1.4 Kooperierende Mutationen

Die Anzahl an kooperierenden Mutationen war insgesamt mit 0 bis 5 Mutationen pro Probe bei den *TP53*-mutierten AMLs niedrig und es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei *TP53*-mutierten Subgruppen (*TP53* VAF >40%, 1.0 [0.0-5.0]; *TP53* VAF 20%-40%, 0.0 [0.0-3.0]; *TP53* VAF <20%, 1.0 [0.0-5.0]). Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, waren Mutationen in den Genen *DNMT3A* (14/98), *NRAS* (8/98), *FLT3* (7/98) und *PTPN11* (7/98) die häufigsten kooperierenden Mutationen (8).

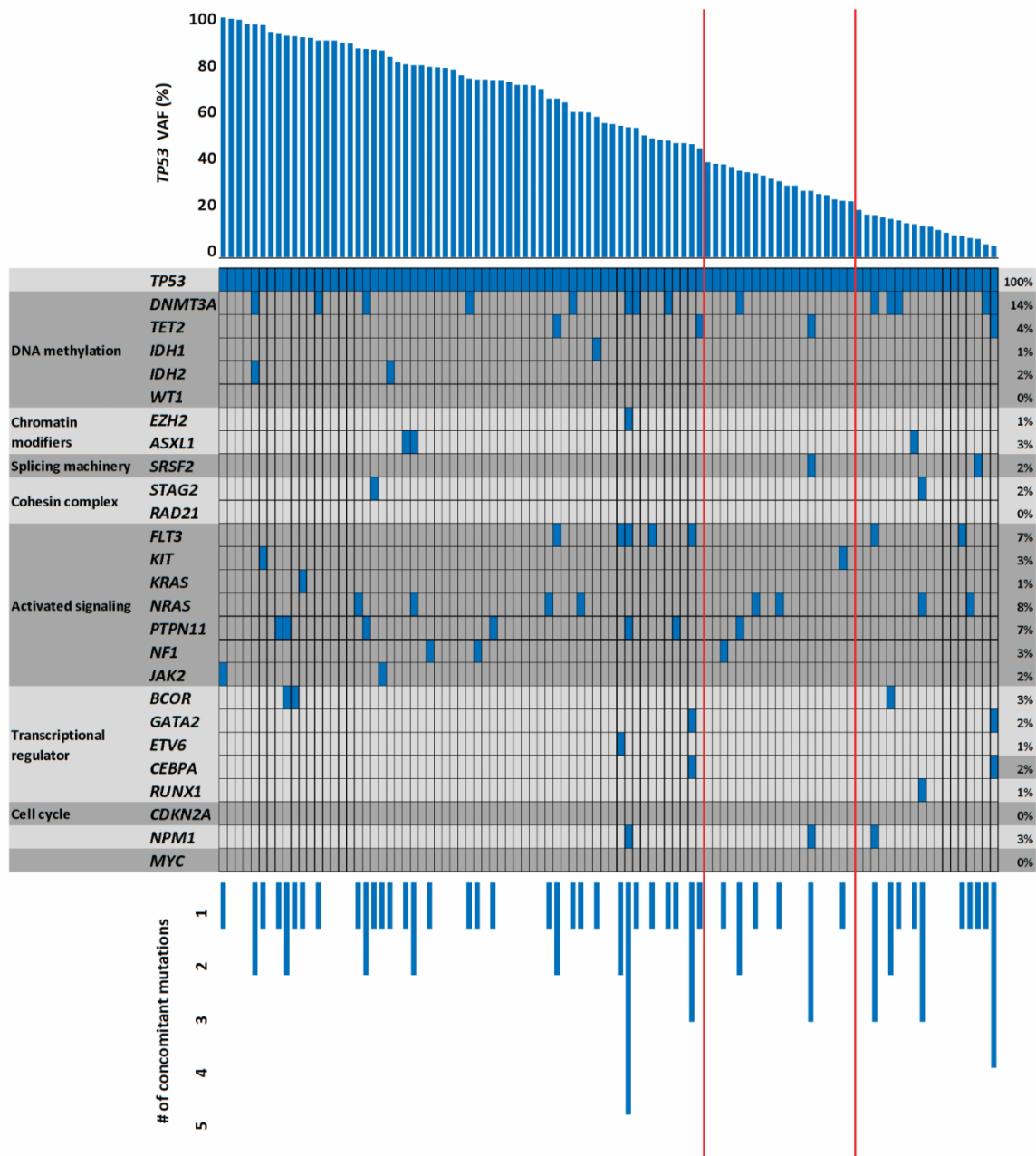


Abbildung 2: Kooperierende Genmutationen in den 98 *TP53*-mutierten AMLs. Bei den Proben mit mehreren *TP53*-Mutationen wurde nur die mit der höchsten VAF gelistet. Jede Spalte repräsentiert eine einzige Patientin/einen einzigen Patienten. Eine gefärbte Zelle repräsentiert eine Mutation in dem auf der linken Seite gelisteten Gen. Die vertikalen Linien trennen die *TP53*-Mutationen anhand ihrer VAF voneinander ab. #, Anzahl. Entnommen aus (8).

3.2 Einfluss von *TP53*-mutierten Subklonen auf das Überleben von Patientinnen und Patienten mit AML

3.2.1 Komplette Remission

Von den 1537 Patientinnen und Patienten führte die Induktionstherapie bei 1268 (82.5%) zu einer kompletten Remission. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, war die CR-Rate in der *TP53*-mutierten Kohorte signifikant niedriger als in der *TP53*-Wild-Typ-Kohorte (48.0% versus 84.9%, $P < 0.001$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei *TP53*-mutierten Subgruppen (*TP53* VAF >40%, 42.6%; 20%-40%, 57.9%; <20%, 55.6%; $P=0.424$) (8).

Die Relapsrate war in der *TP53*-mutierten Kohorte signifikant höher (68.1% versus 47.8% für *TP53*-Wild-Typ Patientinnen und Patienten, $P=0.007$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei *TP53*-mutierten Subgruppen (*TP53* VAF >40%, 69.2%; 20%-40%, 81.8%; <20%, 50.0%; $P=0.336$) (Tabelle 9).

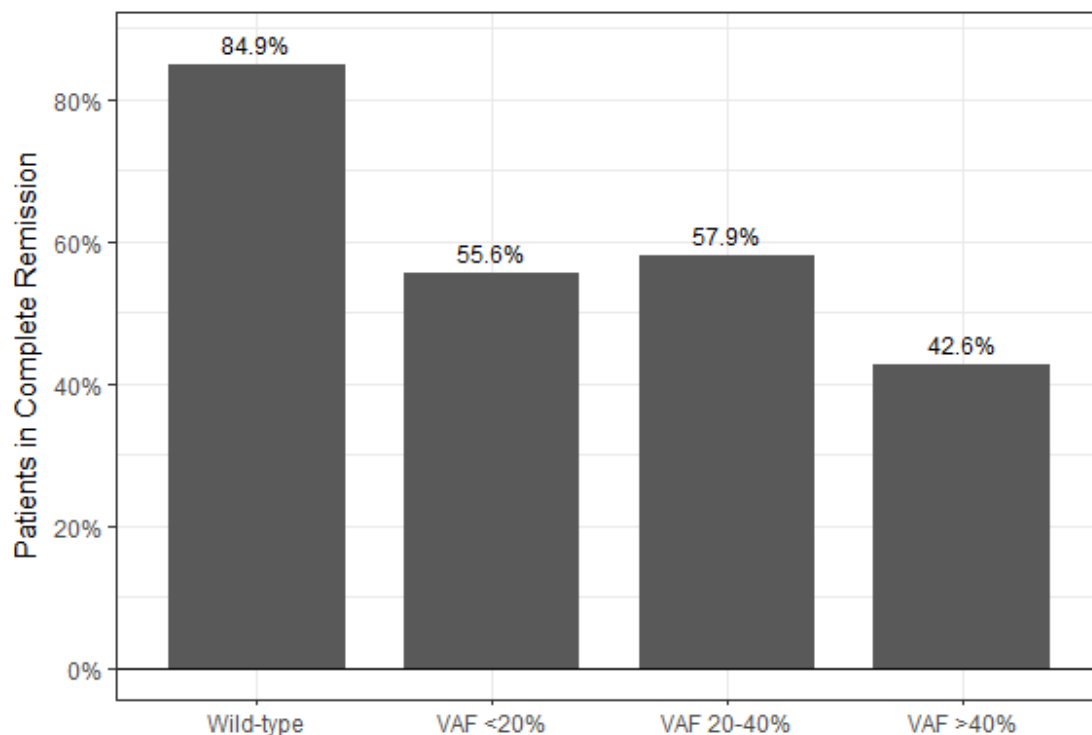


Abbildung 3: Patientinnen und Patienten mit AML, welche durch die Induktionstherapie eine komplette Remission erreichten, stratifiziert anhand des *TP53*-Status und der VAF. Entnommen aus (8).

3.2.2 Gesamtüberleben (OS)

Wie in der Tabelle 12 aufgelistet, betrug das mediane OS für die gesamte Kohorte 28.1 (95% CI, 24.3-33.5) Monate, wobei es einen signifikanten Unterschied zwischen Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Wild-Typ-Status und *TP53*-mutierten Patientinnen und Patienten gab (33.6 Monate [95%CI, 28.4-45.0] versus 6.5 Monate [95%CI, 5.0-8.2]). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei *TP53*-mutierten Subgruppen (*TP53* VAF >40%, 5.8 Monate; 20%-40%, 6.9 Monate; <20%, 6.9 Monate) (8).

Das geschätzte 3-Jahres-OS für die gesamte Kohorte lag bei 46.5% (95% CI, 44.0-49.1), wobei es einen signifikanten Unterschied zwischen Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Wild-Typ-Status und *TP53*-mutierten Patientinnen und Patienten gab (49.1% [95% CI, 46.5-51.8] versus 8.3% [95% CI, 4.3-16.2]). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei *TP53*-mutierten Subgruppen (*TP53* VAF >40%, 11.5%; 20%-40%, 5.3%; <20%, 0%). Abbildung 4 und Abbildung 5 zeigen die Kaplan-Meier-Kurven für das OS von *TP53*-Wild-Typ und *TP53*-mutierten Patientinnen und Patienten.

Tabelle 12: 3-Jahres-OS and medianes OS mit 95% Konfidenzintervall (95% CI) von der untersuchten Kohorte, stratifiziert anhand des *TP53*-Status und der VAFs. Modifiziert entnommen aus (8).

	3-Jahres-OS (%)		medianes OS (Monate)	
	Schätzung	95% CI	Schätzung	95% CI
<i>TP53</i>-Wild-Typ	49.1	46.5-51.8	33.6	28.4- 45.0
<i>TP53</i>-mutiert	8.3	4.3-16.2	6.5	5.0-8.2
VAF <20%	--	--	6.9	3.9-11.7
VAF 20%-40%	5.3	0.8-35.5	6.9	5.0-17.5
VAF >40%	11.5	5.7-23.0	5.8	3.9-9.1
Gesamt	46.5	44.0-49.1	28.1	24.3-33.5

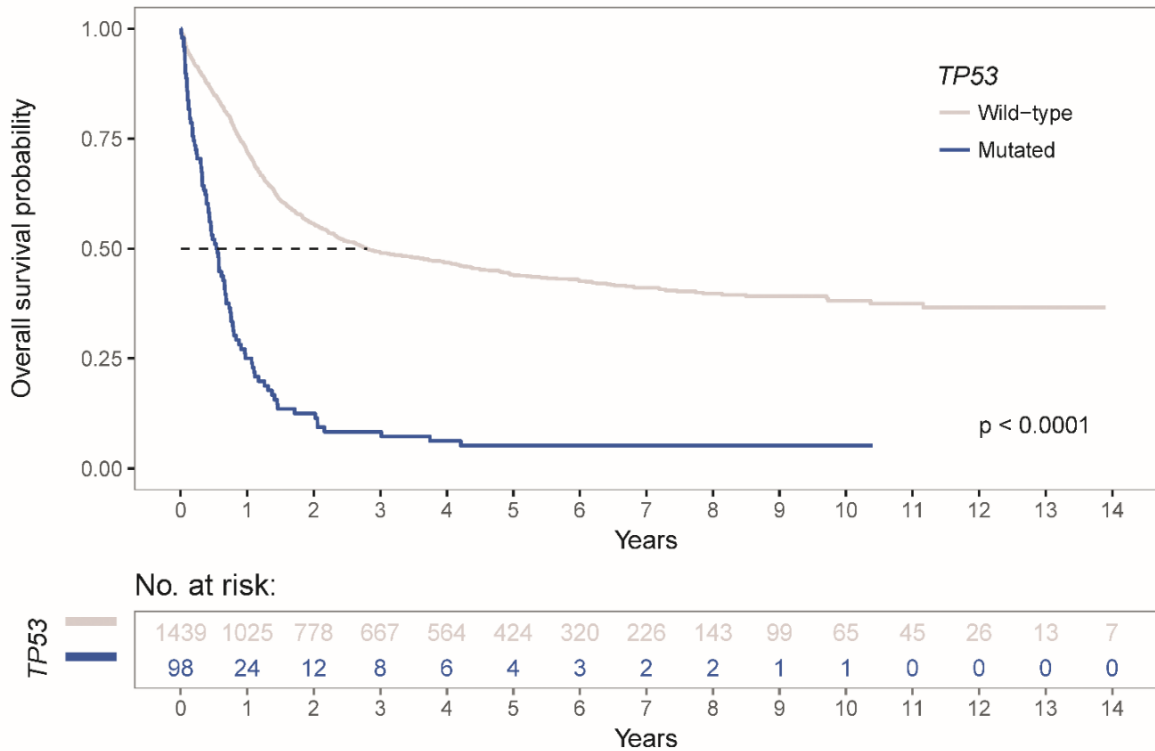


Abbildung 4: Kaplan-Meier-Analyse vom OS der 1537 AML-Patientinnen und Patienten, stratifiziert anhand des *TP53*-Mutations-Status. Entnommen aus (8).

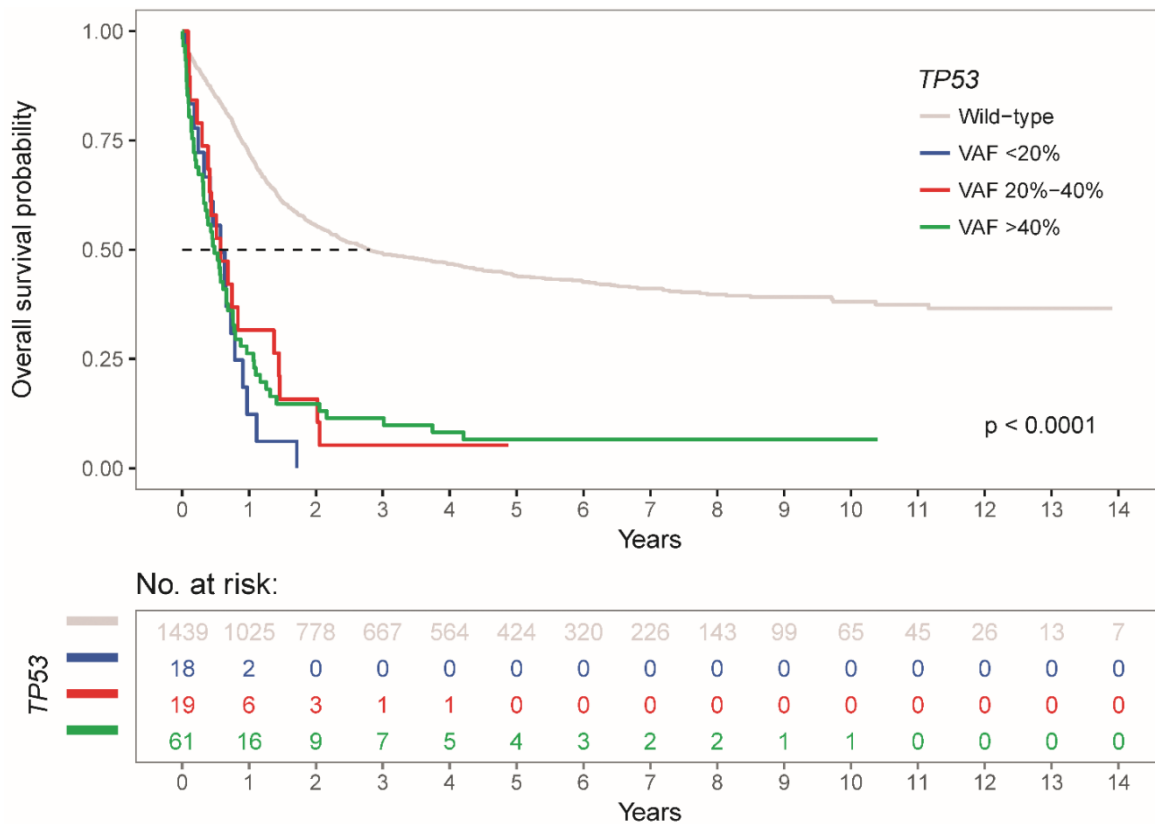


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Analyse vom OS der 1537 AML-Patientinnen und Patienten, stratifiziert anhand der *TP53*-VAFs. Entnommen aus (8)

3.2.3 Ereignis-freies Überleben (EFS)

Wie in Tabelle 12 nachzulesen, betrug das geschätzte mediane EFS für die gesamte Kohorte 15.0 Monate (95% CI, 13.6-16.5), wobei das EFS für die *TP53*-Wild-Typ-Patientinnen und Patienten 16.5 Monate (95% CI, 15.0-18.2) und für die *TP53*-mutierten Patientinnen und Patienten 5.7 Monate (95% CI, 4.3-7.4) betrug. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei *TP53*-mutierten Subgruppen (*TP53* VAF >40%, 5.2 Monate; 20%-40%, 6.9 Monate; <20%, 6.5 Monate).

Das geschätzte mediane 3-Jahres-EFS für die gesamte Kohorte betrug 36.3% (95% CI, 33.9-38.8), wobei das 3-Jahres-EFS für die *TP53*-Wild-Typ-Patientinnen und Patienten 38.3% (95% CI, 35.9-40.9) und für die *TP53*-mutierten Patientinnen und Patienten 6.3% (95% CI, 2.9-13.6) betrug. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei *TP53*-mutierten Subgruppen (*TP53* VAF >40%, 9.8%; 20%-40%, 0%; <20%, 0%). Abbildung 6 und Abbildung 7 zeigen die Kaplan-Meier-Kurven für das EFS von *TP53*-Wild-Typ und *TP53*-mutierten Patientinnen und Patienten.

Tabelle 13: 3-Jahres-EFS und mediane EFS-Zeiten mit 95% Konfidenzintervallen der untersuchten AML-Kohorte, stratifiziert anhand des *TP53*-Status und der VAFs. Modifiziert entnommen aus (8).

	3-Jahres-EFS (%)		medianes EFS (Monate)	
	Schätzung	95% CI	Schätzung	95% CI
<i>TP53</i> Wild-Typ	38.3	35.9-40.9	16.5	15.0-18.2
<i>TP53</i>-mutiert	6.3	2.9-13.6	5.7	4.3-7.4
VAF <20%	--	--	6.5	2.9-8.0
VAF 20%-40%	--	--	6.9	4.5-12.4
VAF >40%	9.8	4. -21.0	5.2	3.7-7.9
Gesamt	36.3	33.9-38.8	15.0	13.6-16.5

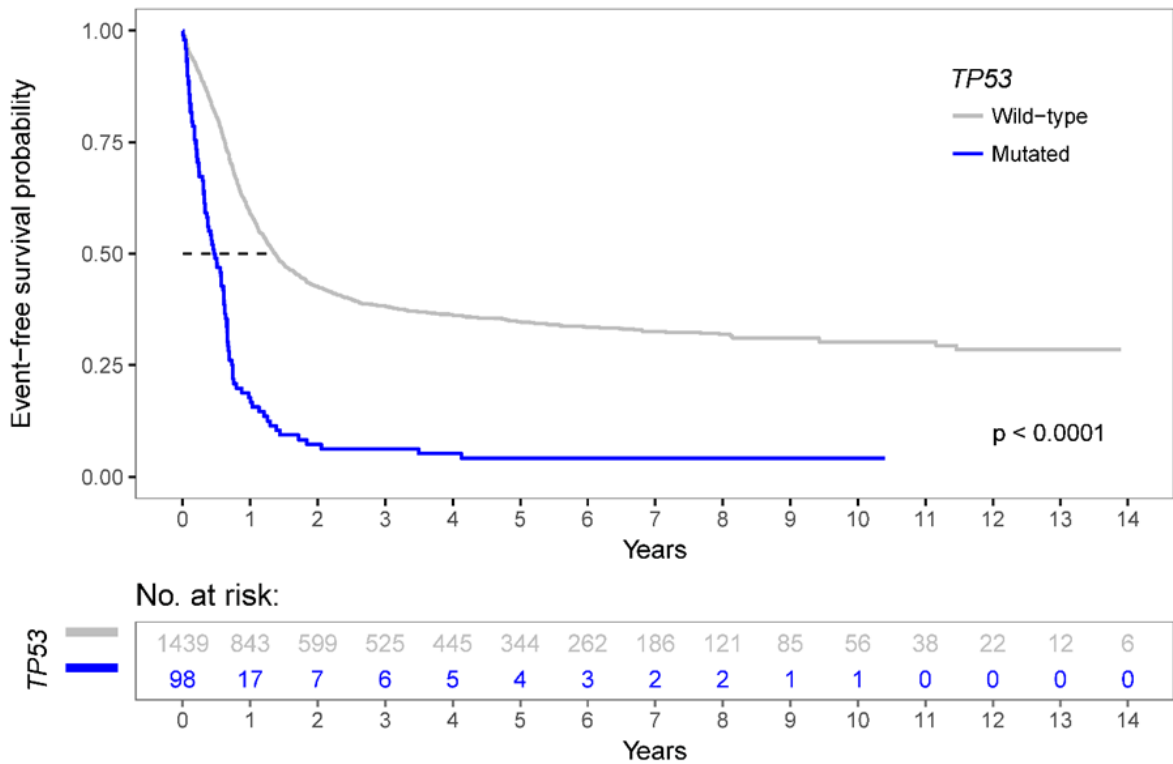


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Analyse vom EFS der 1537 AML-Patientinnen und Patienten, stratifiziert anhand des *TP53*-Mutations-Status. Entnommen aus (8).

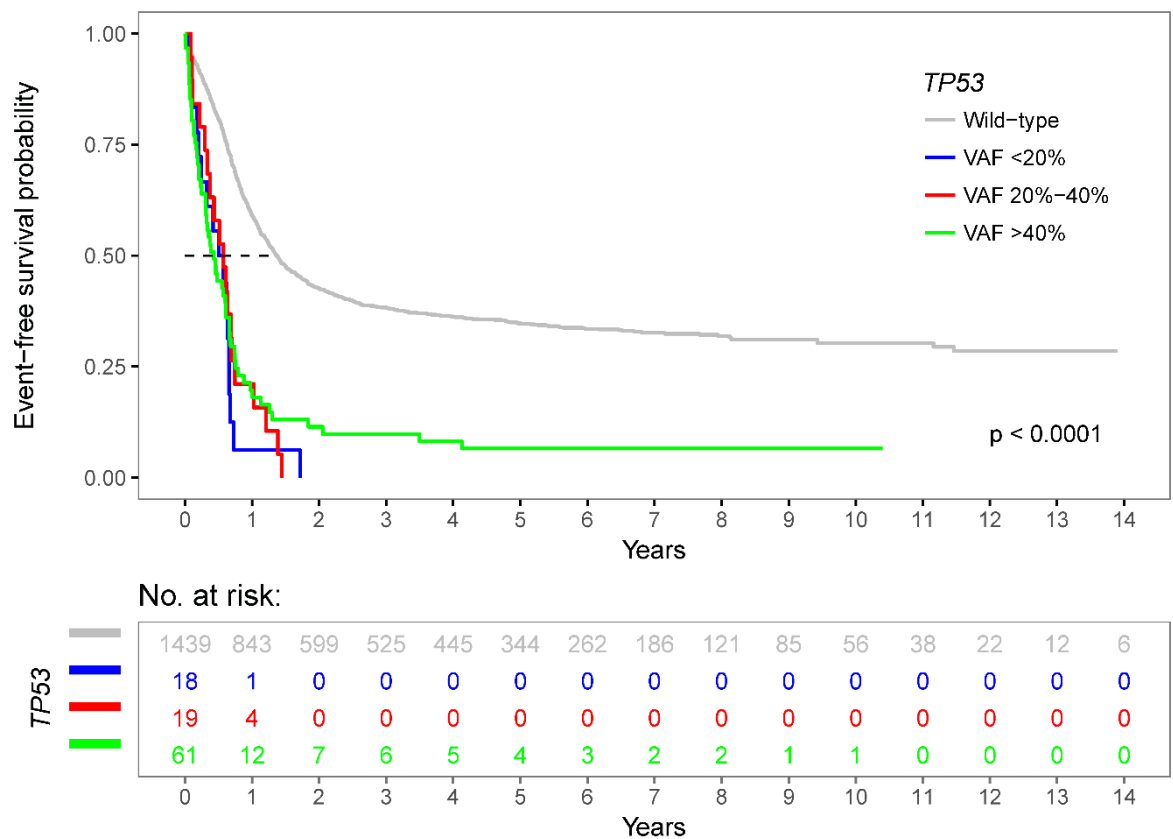


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Analyse vom EFS der 1537 AML-Patientinnen und Patienten, stratifiziert anhand der *TP53*-VAFs. Entnommen aus (8)

3.2.4 Cox-Regressions-Analyse

Tabelle 14 und Tabelle 15 zeigen das Ergebnis der Cox-Regressions-Analyse, mit welcher der Einfluss des *TP53*-Mutationsstatus auf das OS und EFS untersucht wurde. Die Modelle enthalten neben den verschiedenen VAF-basierten Subgruppen auch das Alter, die Leukozytenzahl, die zytogenetische Risikogruppe und den Typ der AML als Prädiktoren. Während in der univariaten Analyse alle Faktoren einen signifikanten Einfluss auf beide Outcome-Parameter zeigten, blieb der Einfluss des AML-Typs in der multivariaten Analyse für das EFS nicht signifikant.

Von besonderer Bedeutung ist, dass alle drei VAF-basierten Subgruppen, ein schlechteres OS und EFS als die *TP53*-Wild-Typ-Gruppe zeigten. Die HR (95% CI) für das OS war im Vergleich mit der *TP53*-Wild-Typ-Gruppe bei einer VAF >40% 2.03 (1.47-2.79), bei einer VAF von 20%-40% 1.78 (1.04-3.02) und bei einer VAFs von <20% bei 3.71 (2.11-6.51). Für das EFS war die HR bei 1.89 (1.38-2.59) für Patientinnen und Patienten mit einer *TP53*-VAF >40%, bei 2.27 (1.35-3.80) für die mit einer VAF von 20%-40% und bei 3.57 (2.04-6.26) für die mit einer VAF von <20% (8).

Tabelle 14: Univariate and multivariate Cox-Regressions-Analyse für OS. Modifiziert entnommen aus (8).

	Univariat			Multivariat		
	HR	95% CI	p-Wert	HR	95% CI	p-Wert
<i>TP53</i>			<0.001			<0.001
Wild-Typ	1			1		
VAF <20%	4.95	3.05 - 8.04		3.71	2.11 - 6.51	
VAF 20%-40%	3.44	2.16 - 5.50		1.78	1.04 - 3.02	
VAF >40%	3.73	2.84 - 4.88		2.03	1.47 - 2.79	
Alter	1.04	1.03 - 1.04	<0.001	1.03	1.03 - 1.04	<0.001
Leukozytenzahl (log)	1.08	1.04 - 1.13	<0.001	1.17	1.11 - 1.22	<0.001
Zytogenetisches Risiko			<0.001			<0.001
hoch	1			1		
intermediär	0.45	0.38 - 0.52		0.49	0.41 - 0.58	
niedrig	0.20	0.15 - 0.26		0.27	0.20 - 0.36	
Typ der AML			<0.001			0.019
<i>de novo</i>	1			1		
sekundär	1.74	1.30 - 2.33		1.53	1.13 - 2.07	
Therapie-assoziiert	1.43	1.07 - 1.92		1.21	0.88 - 1.66	

Anmerkung: HR, hazard ratio; CI, Konfidenzintervall; VAF, variant allele frequency.

Tabelle 15: Univariate and multivariate Cox-Regressions-Analyse für das EFS. Modifiziert entnommen aus (8).

	Univariat			Multivariat		
	HR	95% CI	p-Wert	HR	95% CI	p-Wert
TP53			<0.001			<0.001
Wild-Typ	1			1		
VAF <20%	4.18	2.58 - 6.77		3.57	2.04 - 6.26	
VAF 20%-40%	3.43	2.17 - 5.42		2.27	1.35 - 3.80	
VAF >40%	3.03	2.32 - 3.96		1.89	1.38 - 2.59	
Alter	1.03	1.02 - 1.03	<0.001	1.03	1.02 - 1.03	<0.001
Leukozytenzahl (log)	1.10	1.05 - 1.14	<0.001	1.17	1.12 - 1.22	<0.001
Zytogenetisches Risiko			<0.001			<0.001
hoch	1			1		
intermediär	0.50	0.43 - 0.58		0.53	0.45 - 0.63	
niedrig	0.28	0.22 - 0.36		0.36	0.28 - 0.47	
Type der AML			0.005			0.081
<i>de novo</i>	1			1		
sekundär	1.56	1.17 - 2.07		1.42	1.06 - 1.91	
Therapie-assoziiert	1.20	0.90 - 1.59		1.01	0.74 - 1.37	

Anmerkung: HR, hazard ratio; CI, Konfidenzintervall; VAF, variant allele frequency.

3.3 Fallstudie mit longitudinaler Untersuchung der *TP53*-Mutationslast

Bei einem Patienten mit sekundärer AML, welcher an der Medizinischen Universität Graz, Österreich, außerhalb einer klinischen Studie behandelt wurde, wurden serielle Untersuchungen an Knochenmarksproben durch eine Fehler-korrigierte „Ultradeep sequencing“-Methode durchgeführt (56). Der 68-jährige Mann präsentierte sich mit MDS, IPSS Risiko-Score „intermediär 2“. Innerhalb von zwei Monaten nach der Diagnose entwickelte er eine sAML und erhielt dann eine Induktionstherapie mit Daunorubicin und Cytarabin (3+7) und Ida-FLAG als Salvage-Regime. Trotzdem verstarb der Patient vier Monate nach der Diagnosestellung an der therapieresistenten Erkrankung. Die Analyse der diagnostischen Probe zeigte eine klonale *TP53*-Mutation (p.R273H) mit einer VAF von 42.3% und einer subklonalen *TP53*-Mutation (p.Q104X) mit einer VAF von 0.4%. Wie man in Abbildung 8 sieht, expandierten die *TP53*-mutierten Klone im Rahmen der Transformation zur sAML nur minimal. Im Zuge der Induktionstherapie expandierten diese allerdings beträchtlich (VAFs 64.2% und 18.6%) (8).

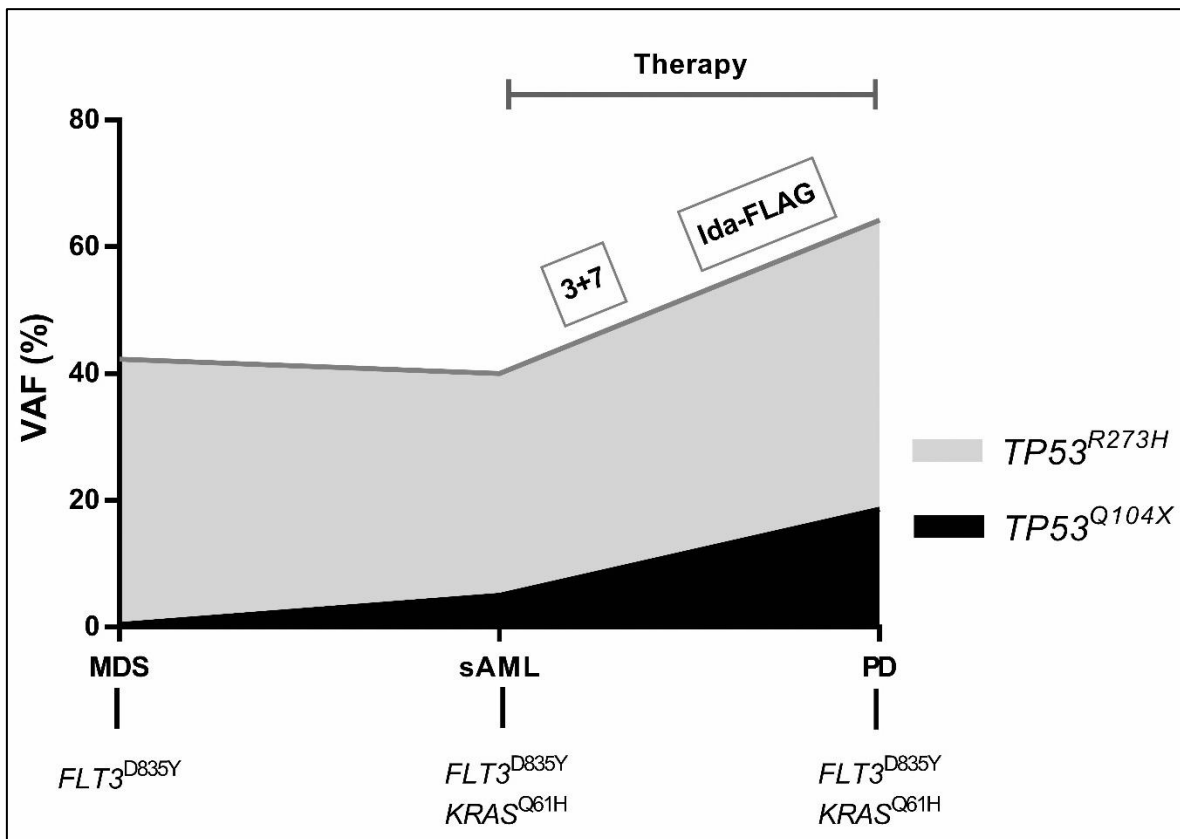


Abbildung 8: Longitudinale Mutationsanalyse eines Patienten mit sAML, welche durch eine klonale und eine subklonale *TP53*-Mutation charakterisiert ist. Abkürzungen: MDS, Myelodysplastisches Syndrom; PD, progrediente Erkrankung. Entnommen aus (8).

Tabelle 16: Longitudinale Mutationsanalyse eines Patienten mit sAML mit einer klonalen und einer subklonalen *TP53*-Mutation. Modifiziert entnommen aus (8).

Mutation	VAF		
	MDS	sAML	PD
<i>TP53</i> ^{R273H}	42.3%	40.4%	64.2%
<i>TP53</i> ^{Q104X}	0.4%	5.0%	18.6%
<i>FLT3</i> ^{D835Y}	19.4%	31.7%	16.7%
<i>KRAS</i> ^{Q61H}	0.0%	0.8%	25.7%

4 Diskussion

In dieser Studie haben wir eine große Kohorte von Patientinnen und Patienten mit AML bezüglich der biologischen und klinischen Charakteristika von subklonalen *TP53*-Mutationen analysiert. Es zeigte sich, dass diese einen substanziellen Anteil der *TP53*-Mutationen ausmachen. Ähnlich wie klonale *TP53*-Mutationen, sind auch subklonale *TP53*-Mutationen hauptsächlich Missens-Mutationen und sind mit einem äußerst schlechten Outcome assoziiert, welches an in den niedrigen CR-, OS- und EFS-Raten zu sehen ist (8).

Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für Patientinnen und Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) berichtet, bei welchen subklonale *TP53*-Mutationen mit einer medianen VAF von 2.1%, vergleichbare klinische Phänotypen und ein vergleichbar schlechtes Überleben wie klonale Mutationen vermittelten (59,60). Interessanterweise wurden für Patientinnen und Patienten mit MDS divergierende Daten publiziert. Sallman et al. analysierten zwei unabhängige Kohorten mit 219 und 150 Patientinnen und Patienten und teilten diese in die gleichen VAF-basierten Subgruppen ein, wie es in dieser Arbeit gemacht wurde (>40%, 20%-40%, <20%). Dabei fanden sie einen signifikanten Unterschied im OS zwischen Patientinnen und Patienten mit einer *TP53*-VAF von >40% und denen mit einer VAF <20%. Im Gegensatz dazu, fanden Goel et al., welche zwei Kohorten mit 81 und 1117 Patientinnen und Patienten untersuchten, keinen Einfluss der Höhe der *TP53*-VAF auf das Gesamtüberleben. Diese Diskrepanzen wurden unter anderem mit der kleinen Anzahl an *TP53*-mutierten Patientinnen und Patienten erklärt. Weiters könnte die klonale Expansion von Therapie-resistenten Klonen, bei früher therapeutischer Intervention, für diese Überlebensunterschiede relevant sein (8,61).

In unserer Studie von 1537 Patientinnen und Patienten mit überwiegend de novo AML, zeigten sich 98 Patientinnen und Patienten mit *TP53*-mutierten Klonen unterschiedlicher Größe. Wir erbringen Hinweise dafür, dass *TP53*-mutierte Subklone biologische Charakteristika, wie den Mutationstyp, den Locus der Mutation und die kooperierenden Mutationen, mit dominanten *TP53*-mutierten Klonen teilen. Außerdem zeigen wir, dass sogar *TP53*-Mutationen mit einer VAF <20% einen signifikanten negativen Einfluss auf die Prognose haben, was sich an den niedrigen CR-, OS- und EFS-Raten erkennen lässt (8).

Diese Ergebnisse könnten Implikationen für *TP53*-Screening-Methoden und für zukünftige Risikostratifizierungen bei der AML haben. Das klassische Sanger-Sequenzieren, mit einem Detektionslimit von ungefähr 20%, sollte durch viel sensitivere NGS-Anwendungen ersetzt werden. Weiters sollten, nach Bestätigung der Ergebnisse durch andere, subklonale Mutationen in zukünftige Klassifikationen der AML inkorporiert werden (8).

Der genaue Mechanismus, mit welchem mutiertes p53 die Resistenz gegenüber zytotoxischen Therapien vermittelt, ist bis jetzt noch nicht ausreichend verstanden. *TP53*-Mutationen betreffen präleukämische Stammzellen und in *in vitro* und *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass genotoxischer Stress zur Expansion von murinen HSPCs mit p53-Haploinsuffizienz oder einer heterozygoten *TP53*-Mutation führt (46,62,63). Dies passt zu der Fallstudie dieser Arbeit, in welcher sowohl eine klonale als auch eine subklonale *TP53*-Mutation nach einer Hochdosischemotherapie, nicht aber bei der Transformation von MDS zur sAML, substantiell expandierten (8). Ähnliche klinische Daten wurden für Patientinnen und Patienten mit Lymphomen und klonaler Hämatopoese mit *TP53*-Mutationen zum Zeitpunkt der Diagnose beschrieben. Diese Personen hatten ein erhöhtes Risiko für Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien, als Folge der Lymphom-spezifischen Chemo- und Radiotherapie (45,47–49)

In unserer Studie untersuchten wir *TP53*-mutierte Subklone mit VAFs von bis zu 4.66% (8). Allerdings wurden bereits NGS-Techniken entwickelt, welche mutierte Allele mit Frequenzen von bis zu 0.1% zuverlässig identifizieren können (64). In CLL wurde bereits demonstriert, dass auch diese kleinsten *TP53*-mutierten Klone einen negativen Einfluss auf die Prognose haben (59,60).

Ein weiteres diskussionswürdiges Thema betrifft die Untersuchung der VAF von Mutationen aus klinischen Proben. Die VAFs beziehen sich entweder auf die gesamten mononukleären Zellen oder werden korrigiert, sodass sie sich nur auf die neoplastischen Zellen beziehen. Prinzipiell muss dabei aber auch bedacht werden, dass Mutationen, welche in präleukämischen Zellen vorkommen, auch an reife Blutzellen weitergegeben werden und damit die VAF beeinflussen (5,62). Durch Analysen von aufgereinigten T-Lymphozyten von diagnostischen AML-Proben mit *TP53*-Mutationen, konnten wir zeigen, dass diese Mutationen in bis zu 20% der T-Lymphozyten vorkommen (62).

Die Proben dieser Studie stammten sowohl von Blut als auch von Knochenmark, weshalb sich die Frage bezüglich deren Vergleichbarkeit aufwirft. Diesbezüglich konnten aber Duncavage et al. kürzlich zeigen, dass sich die klonale Architektur der AML und des MDS im Knochenmark und im Blut zum Zeitpunkt der Diagnose und im Verlauf der Therapie gleicht (65).

In dieser Arbeit haben wir den prognostischen Einfluss von subklonalen *TP53*-Mutationen in Patientinnen und Patienten mit AML, welche eine Hochdosischemotherapie erhielten, dargelegt. Es wäre möglich, dass der gezeigte Einfluss nicht auf Patientinnen und Patienten mit *TP53*-Mutationen, welche mit hypomethylierenden Substanzen behandelt werden, übertragbar ist. Obwohl kein substanzieller positiver Einfluss auf das OS mit diesem Therapieschema gezeigt werden konnte, glichen sich zumindest die Ansprechraten von *TP53*-Wild-Typ und *TP53*-mutierten Patientinnen und Patienten. Daher wäre es notwendig, den Einfluss von subklonalen *TP53*-Mutationen in einer solchen Kohorte prospektiv zu untersuchen (8).

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass subklonale *TP53*-Mutationen bei AML einen Marker für eine schlechte Prognose darstellen, unabhängig von der VAF der Mutation. Weiters untermauern unsere Daten die Wichtigkeit von NGS-Technologien für die Risikostratifizierung von Patientinnen und Patienten mit AML. Zukünftige Projekte werden die klonale Architektur der Proben untersuchen und erarbeiten, ob *TP53*-mutierte Subklone Eigenschaften von leukämischen Stammzellen aufweisen, was ihre Persistenz trotz zytotoxischen Therapien erklären könnte (8).

5 Literaturverzeichnis

1. Dores M, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*. 2012;119(1):34–43.
2. 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.
3. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 2017;129(12):1577–86.
4. Hirsch P, Zhang Y, Tang R, Joulin V, Boutroux H, Pronier E, et al. Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nat Commun*. 2016;7(Article number: 12475).
5. Corces-Zimmerman R, Hong W-J, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *PNAS*. 2014;111(7):2548–53.
6. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014;506(7488):328–33.
7. Corces-Zimmerman MR, Majeti R. Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells: the importance of early mutations in leukemogenesis. *Leukemia*. 2014;28(12):2276–82.
8. Prochazka KT, Pregartner G, Rucker FG, Heitzer E, Pabst G, Wölfler A, et al. Clinical implications of subclonal *TP53* mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2018;104(3):516–23.
9. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. ‘Acute myeloid leukemia: A comprehensive review and 2016 update.’ *Blood Cancer J*. 2016;6(e441).
10. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Ebert BL, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424–48.

11. BLOOMFIELD CD, Brunning R. The Revised French-American-British Classification of Acute Myeloid Leukemia: Is New Better? *Ann Intern Med.* 1985;103(4):614–6.
12. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization Classification of Neoplasms of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Ann Oncol.* 1999;10(12):1419–32.
13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391–406.
14. Bullinger L, Döhner K, Dohner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol.* 2017;35(9):934–46.
15. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature.* 2014;505(7484):495–501.
16. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059–74.
17. Gilliland G, Griffin J. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 2002;100(5):1532–42.
18. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood.* 2015;127(1):29–42.
19. Metzeler, Klaus H., Herold Tobias, Rothenberg-Thurley Maja et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2016;128(5):686–98.
20. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115(3):453–74.
21. O’Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, Altman JK, Appelbaum FR, Arber DA, et al. Acute myeloid leukemia, version 3.2017: Clinical practice guidelines in oncology. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw.* 2017;15(7):926–57.

22. Döhner H, Weisdorf D, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *New Engl J Med*. 2015;373(12):1136–52.
23. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(1):53–62.
24. Brady CA, Attardi LD. P53 At a Glance. *J Cell Sci*. 2010;123(15):2527–32.
25. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*. 2017;170(6):1062–78.
26. Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Liu Y, Huang G, et al. p53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence. *Cell Stem Cell*. 2009;4(1):37–48.
27. Dumble M, Donehower LA, Moore L, Chambers SM, Goodell MA, Geiger H, et al. The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood*. 2007;109(4):1736–42.
28. Pant V, Quintás-Cardama A, Lozano G. The p53 pathway in hematopoiesis : lessons from mouse models , implications for humans. *Blood*. 2014;120(26):5118–27.
29. Wang Y V., Leblanc M, Fox N, Mao JH, Tinkum KL, Krummel K, et al. Fine-tuning p53 activity through C-terminal modification significantly contributes to HSC homeostasis and mouse radiosensitivity. *Genes Dev*. 2011;25(13):1426–38.
30. Liu D, Ou L, Clemenson GD, Chao C, Lutske ME, Zambetti GP, et al. Puma is required for p53-induced depletion of adult stem cells. *Nat Cell Biol*. 2010;12(10):993–8.
31. TeKippe M, Harrison DE, Chen J. Expansion of hematopoietic stem cell phenotype and activity in Trp53-null mice. *Exp Hematol*. 2003;31(6):521–7.
32. Zhao Z, Zuber J, Diaz-Flores E, Lintault L, Kogan SC, Shannon K, et al. P53 Loss Promotes Acute Myeloid Leukemia By Enabling Aberrant Self-Renewal. *Genes Dev*. 2010;24(13):1389–402.
33. Kemp C, Tom W, Balmain A. P53-Deficient Mice are Extremely Susceptible to Radiation-Induced Tumorigenesis. *Nat Genet*. 1994;8:66–9.
34. Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*. 2014;25(3):304–17.
35. Prokocimer M, Molchadsky A, Rotter V. Dysfunctional diversity of p53 proteins in

- adult acute myeloid leukemia: Projections on diagnostic workup and therapy. *Blood*. 2017;130(6):699–712.
36. Zebisch A, Lal R, Müller M, Lind K, Kashofer K, Girschikofsky M, et al. Acute myeloid leukemia with *TP53* germ line mutations. *Blood*. 2016;128(18):2270–2.
 37. Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, et al. *TP53* alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 2012;119(9):2114–21.
 38. Stengel A, Kern W, Haferlach T, Meggendorfer M, Fasan A, Haferlach C. The impact of *TP53* mutations and *TP53* deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: An analysis of 3307 cases. *Leukemia*. 2017;31(3):705–11.
 39. Middeke JM, Herold S, Rucker-Braun E, Berdel WE, Stelljes M, Kaufmann M, et al. *TP53* mutation in patients with high-risk acute myeloid leukaemia treated with allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2016;172(6):914–22.
 40. Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, Eder C, Roller A, Dicker F, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood*. 2012;120(15):2963–72.
 41. Welch JS, Petti AA, Miller CA, Fronick CC, O’Laughlin M, Fulton RS, et al. *TP53* and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2016;375(21):2023–36.
 42. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9–17.
 43. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman P V., Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488–98.
 44. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoun SF, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477–87.

45. Schulz E, Kashofer K, Heitzer E, Mhatre KN, Speicher MR, Hoefler G, et al. Preexisting *TP53* mutation in therapy-related acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2014;94(3):527–9.
46. Wong TN, Ramsingh G, Young AL, Miller CA, Touma W, Welch JS, et al. Role of *TP53* mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature.* 2015;518(7540):552–5.
47. Takahashi K, Wang F, Kantarjian H, Doss D, Khanna K, Thompson E, et al. Preleukaemic clonal haemopoiesis and risk of therapy-related myeloid neoplasms: a case-control study. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):100–11.
48. Gillis NK, Ball M, Zhang Q, Ma Z, Zhao YL, Yoder SJ, et al. Clonal haemopoiesis and therapy-related myeloid malignancies in elderly patients: a proof-of-concept, case-control study. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):112–21.
49. Gibson CJ, Lindsley RC, Tchekmedyian V, Mar BG, Shi J, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes after autologous stem-cell transplantation for lymphoma. *J Clin Oncol.* 2017;35(14):1598–605.
50. Sallman DA, Komrokji R, Vaupel C, Cluzeau T, Geyer SM, McGraw KL, et al. Impact of *TP53* mutation variant allele frequency on phenotype and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2016;30(3):666–73.
51. Goel S, Hall J, Pradhan K, Hirsch C, Przychodzen B, Shastri A, et al. High prevalence and allele burden-independent prognostic importance of p53 mutations in an inner-city MDS/AML cohort. *Leukemia.* 2016;30(8):1793–5.
52. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Breast Cancer Res Treat.* 2006;100(2):229–35.
53. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2008;358(18):1909–18.
54. Schlenk RF, Fröhling S, Hartmann F, Fischer JT, Glasmacher A, del Valle F, et al. Phase III study of all-trans retinoic acid in previously untreated patients 61 years or older with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2004;18(11):1798–803.

55. Schlenk RF, Döhner K, Mack S, Stoppel M, Király F, Götze K, et al. Prospective evaluation of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation from matched related and matched unrelated donors in younger adults with high-risk acute myeloid leukemia: German-Austrian trial AMLHD98A. *J Clin Oncol*. 2010;28(30):4642–8.
56. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *PNAS*. 2011;108(23):9530–5.
57. Rausch T, Jones DTW, Zapatka M, Stütz AM, Zichner T, Weischenfeldt J, et al. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with *TP53* mutations. *Cell*. 2012;148(1–2):59–71.
58. Bochtler T, Granzow M, Stölzel F, Kunz C, Mohr B, Kartal-Kaess M, et al. Marker chromosomes can arise from chromothripsis and predict adverse prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;129(10):1333–42.
59. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of *TP53* mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(4):877–85.
60. Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Famà R, et al. Clinical impact of small *TP53* mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(14):2139–47.
61. Sallman DA, Komrokji R, List A, Padron E. Reply to Goel et al. “*TP53* mutation allele-burden and disease outcome in MDS/AML.” *Leukemia*. 2017;31(3):767–8.
62. Lal R, Lind K, Ulz P, Aubell C, Kashofer K, Middeke JM, et al. Somatic *TP53* mutations characterize preleukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;129(18):2587–91.
63. Chen S, Gao R, Yao C, Kobayashi M, Liu SZ, Yoder MC, et al. Genotoxic stresses promote clonal expansion of hematopoietic stem cells expressing mutant p53. *Leukemia*. 2018;32(3):850–4.
64. Ståhlberg A, Krzyzanowski PM, Egyud M, Filges S, Stein L, Godfrey TE. Simple multiplexed PCR-based barcoding of DNA for ultrasensitive mutation detection by next-generation sequencing. *Nat Protoc*. 2017;12(4):664–82.

65. Duncavage EJ, Uy GL PA. Mutational landscape and response are conserved in peripheral blood of AML and MDS patients during decitabine therapy. *Blood*. 2017;129(10):1397–401.
66. Belickova M, Vesela J, Jonasova A, Pejsova B, Votavova H, Merkerova MD, et al. *TP53* mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2016;7(24):36266–79.

Anhang

Forscherinnen und Forscher und Zentren der German-Austrian AML Study Group

Karin T. **Mayer** M.D., Universitätsklinikum Bonn, Bonn Germany; Bernd **Hertenstein**, M.D., Klinikum Bremen Mitte, Bremen, Germany; Thomas **Schroeder**, M.D., Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; Mohammed **Wattad**, M.D., Kliniken Essen Süd, Ev. Krankenhaus Essen Werden GmbH, Essen, Germany; Swen **Wessendorf**, M.D., Klinikum Esslingen, Esslingen, Germany; Hans Gunter **Derigs**, M.D., Klinikum Frankfurt Höchst GmbH, Frankfurt, Germany; Michael **Lübbert**, M.D., Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, Germany; Alexander **Burchardt**, M.D., Universitätsklinikum Giessen, Giessen, Germany; Volker **Runde**, M.D., Wilhelm Anton Hospital, Goch, Germany; Gerald **Wulf** M.D., Universitätsklinikum Göttingen, Göttingen, Germany; Walter **Fiedler**, M.D., Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Hamburg, Germany; Hans **Salwender**, M.D., Asklepios Klinik Altona, Hamburg, Germany; Elisabeth **Lange**, M.D., Evangelisches Krankenhaus Hamm, Hamm, Germany; Andrea **Sendler**, M.D., Klinikum Hanau, Hanau, Germany; Arnold **Ganser**, M.D., Michael Heuser, M.D., Felicitas Thol M.D., Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany; Hartmut **Kirchner**, M.D., KRH Klinikum Siloah, Hannover, Germany; Uwe **Martens**, M.D., SLK Kliniken GmbH Heilbronn, Heilbronn, Germany; Jörg-Thomas **Bittenbring**, M.D., Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, Germany; David **Nachbaur**, M.D., Universitätsklinikum Innsbruck, Innsbruck, Austria; Mark **Ringhoffer**, M.D., Städtisches Klinikum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe, Germany; Heinz A. **Horst**, M.D., Universitätsklinikum Schleswig Holstein–Campus Kiel, Kiel, Germany; Stephan **Kremers**, M.D., Caritas Krankenhaus Lebach, Lebach, Germany; Andreas **Petzer**, M.D., Krankenhaus der Barmherzigen Schwestern Linz, Linz, Austria; Gerhard **Heil**, M.D., Klinikum Ludenscheid, Ludenscheid, Germany; Thomas **Kindler**, M.D., Universitätsklinikum Mainz, Mainz, Germany; Katharina **Götze**, M.D., Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, München, Germany; Sabine **Struve**, M.D., Klinikum Schwabing, München, Germany; Peter **Schmidt**, M.D., Städtisches Klinikum Neunkirchen, Neunkirchen, Germany; Ali Nuri **Hünerliturkoglu**, M.D., Lukaskrankenhaus GmbH Neuss, Neuss; Germany; Claus Henning **Köhne**, M.D., Klinikum Oldenburg, Oldenburg, Germany; Gregg Frost, M.D., Caritas Klinik St. Theresia, Saarbrücken, Germany; Richard **Greil**, M.D., Universitätsklinikum der Paracelsus Medizinischen Universität Salzburg, Salzburg,

Austria; Jochen **Greiner**, M.D., Diakonie Klinikum Stuttgart, Stuttgart, Germany; Heinz **Kirchen**, M.D., Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Trier, Germany; Hans Gernot **Biedermann**, M.D., Kreisklinik Trostberg, Trostberg, Germany; Helmut **Salih**, M.D., Universitätsklinikum Tübingen, Tübingen, Germany; Hartmut **Döhner**, M.D., Ulm, Ulm, Germany; Paul Graf La Rosée, M.D., Schwarzwald Baar Klinikum Villingen Schwenningen GmbH, Villingen Schwenningen, Germany; Elisabeth **Koller**, M.D., Hanuschkrankenhaus, Wien, Austria; Aruna **Raghavachar**, M.D., Helios Klinikum Wuppertal, Wuppertal, Germany.