Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Innere Medizin

Klinik für Innere Medizin III
Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin, Rheumatologie, Infektionskrankheiten

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. H. Döhner

Inzidenz und prognostische Bedeutung von *DNMT3A*- und *IDH1/2*-Mutationen bei der akuten myeloischen Leukämie im Rahmen der AMLSG 12-09 Studie

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

vorgelegt von

Julia Philipp

geb. in Stuttgart

2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Konstanze Döhner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Kratzer

Tag der Promotion 19.07.2018

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis I
II. Abkürzungsverzeichnis III
1. Einleitung 1
1.1. Die akute myeloische Leukämie 1
1.2. Diagnostik der AML 4
1.3. Klassifikation und Risikostratifizierung der AML 5
1.4. Prognostische und prädiktive Marker der AML 14
1.5. DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A 20
1.5.1. Funktion von DNMT3A 20
1.5.2. *DNMT3A*-Mutationen in der AML 24
1.6. Isocitratdehydrogenase 28
1.6.1. Funktion von IDH 28
1.6.2. *IDH*-Mutationen in der AML 30
1.7. Ziel der Studie 32
2. Material und Methoden 33
2.1. Material 33
2.1.1. Geräteverzeichnis 33
2.1.2. Reagenzienverzeichnis 36
2.1.3. Patientenkollektiv 39
2.1.4. Therapieschema der AMLSG 12-09 Studie 40
2.1.5. Materialgewinnung 42
2.2. Methoden 43
2.2.1. Methodenübersicht 43
2.2.2 DNA Extraktion 43
2.2.3. Polymerase chain reaction und Primer 44
2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese 49

2.2.5. Aufreinigung des PCR Produktes 50
2.2.6. Denaturating high-performance liquid chromatography 51
2.2.7. Cycle sequencing reaction 55
2.2.8. Aufreinigung des CSR-Produktes 57
2.2.9. Sequenzierung 58
2.2.10. Statistische Analyse 60
3. Ergebnisse 61
3.1. *DNMT3A* 61
3.2. *IDH1* 71
3.3. *IDH2* 79
3.4. Korrelation mit *IDH1* und *IDH2* Mutationen 87
4. Diskussion 94
5. Zusammenfassung 104
6. Literaturverzeichnis 106
7. Danksagungen 122
8. Lebenslauf 123

II. Abkürzungsverzeichnis

2HG	2-Hydroxyglutarat
95% CI	95% Konfidenzintervall
A	Adenin
A	Alanin
A^1	Allokation
ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
abnl	Abnormal
ACN	Acetonitril
ADD	ATRX-DNMT3A-DNMT3L-Domäne
Allo	Allogen
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMLSG	AML Study Group
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
AraC	Cytarabin
ARF	Alternative reading frame
ASXL1	Additional sex comb like 1
ATRA	All-*Trans* Retinoic Acid
Aza	Azacitidin
BCOR	BCL6 Corepressor
BCR	Breakpoint cluster region
bp	Basenpaar
C	Cystein
C	Cytosin
c^+	Cytoplasmic positive
CBF	Core-binding factor

CBFB-MYH11	Core binding factor beta-myosin heavy chain 11
CCD	Charge-Coupled-Device
CD	Cluster of differentiation
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CGI	CG-Inseln
CIR	Cumulative incidence of relapse, kumulative Rückfallrate
CN	Normaler Karyotyp
CpG	Cytosin phosphat Guanin
CR	Komplette Remission
Cri	Inkomplette Regeneration
CSF3R	Colony Stimulating Factor 3 Receptor
CSR	Cycle Sequencing Reaction
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DEK-NUP214	DEK oncogege-Nukleoporin 214kDa
del	Deletion
DHPLC	Denaturating high-performance liquid chromatography
DHXR	D. hansenii mit Xylosereduktase
dm	Double mutation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT3A	DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A
DNMT3B	DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3B
DNMT3L	DNA Methyltransferase 3 like Protein
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate

E	Glutaminsäure
EB	Elution buffer, Eluierpuffer
ED	Early death; früher Tod
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	Event-free survival; ereignisfreies Überleben
ELN	European LeukemiaNet
ET	Essentielle Thrombozytämie
Eto	Etoposid
ETV6	ETS Translocation Variant 6
EVI1+	Ecotropic Virus Integration Site 1 Protein Homolog
EZH2	Lysine N-Methyltransferase 6
F	Forward; vorwärts
FAB	French-American-British-Group
FISH	Fluorescent in situ hybridization
FLT3-ITD	FMS-like tyrosine kinase 3-Internal tandem duplication
FUS-ERG	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein P2- V-Ets Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Like
G	Glycin
G	Guanin
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktoren
GATA2	GATA binding Protein 2
H	Histidin
HiDAC	Hochdosistherapie mit Cytarabin
HL-60	Human promyelocytic leukemia cells
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – Antigen D Related
HOXA	Homeobox A9
HPLC	High performance liquid chromatography

HCT	Hematopoietic cell transplantation
I	Isoleucin
i	Isochromosom
Ida	Idarubicin
IDH	Isocitratdehydrogenase
idic	Isodizentrisches Chromosom
inv	Inversion
JM	Zytoplasmatisch juxtamembranäre Domäne
K	Lysin
KAT6A-CREBBP	Lysine Acetyltransferase 6A- CREB Binding Protein
KDM6A	Lysine (K)-specific demethylase 6A
KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
KM	Knochenmark
KMT2A	Lysine(K)-specific methyltransferase 2A
komb	In Kombination
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L	Leucin
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Methionin
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M5	Akute Monoblasten-Leukämie, Akute Monozyten-Leukämie
MAG	MAX Dimerization Protein 5
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1
Mg^{2+}	Magnesium Ionen
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid

$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
Minuszeichen (-)	Verlust
MLLT3-MLL	Mixed lineage leukemia translocated to 3-Mixed lineage leukemia
Mn^{2+}	Mangan Ionen
MPO	Myeloperoxydase
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MTase	Methyltranferasen
mut	Mutiert
n	Anzahl
NADPH/$NADP^+$	Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat
NES	Nukleäre Exportsequenz
NGS	Next-Generation Sequencing
NF1	Neurofibromin 1
NOS	Not otherwise specified
NPM1	Nucleophosmin 1
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NSD1	Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1
NTC	No template control
NuLS	Nukleolare Lokalisationssequenz
NUP98-NSD1	Nucleoporin 98kDa-Nuclear receptor binding SET domain protein 1
NUP98	Nucleoporin 98
OS	Overall survival; Gesamtüberleben
p	Kurzer Arm des Chromosoms
P	*P*-Wert
P	Prolin

PB	Binding buffer, Bindepuffer
PB	Peripheres Blut
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells; mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	Wash buffer, Waschpuffer
PHD	Plant-Homeo-Domäne
PHF6	PHD finger 6
PICALM	Clathrin assembled lymphoid myeloid leukemia gene
Pluszeichen (+)	Zusatz
PML-RARA	Promyelocytic leukemia-Retinoic acid receptor alpha
pos	Positiv
PR	Partielle Remission
PTD	Partielle Tandemduplikationen
PTP	Phosphotyrosine Phosphatase
PV	Polyzythämia vera
PWWP	Prolin-Tryptophan-Prolin-Domäne
Q	Glutamin
q	Langer Arm des Chromosoms
R	Arginin
R	Reverse; rückwärts
RAD21	RAD21 Cohesin Complex Component
RBM15-MKL1	Putative RNA-binding protein 15-Megacaryoblastic leukemia translocation 1
RD	Refractory disease; Refraktäre Erkrankung
RFS	Relapse-free survival; rezidivfreies Überleben
RNA	Ribonukleinsäure

RUNX1-RUNX1T1	Runt-related transcription factor1-Runt-related transcription factor 1 translocate to 1
S	Serin
SRSF2	Serine and arginine rich splicing factor 2
s-AML	Sekundäre myeloische Leukämie
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SF3B1	Splicing Factor 3b Subunit 1
sm	Single mutation
STAG2	Stromal Antigen 2
T	Threonin
T	Thymin
t	Translokation
t-AML	Therapie-induzierte akute myeloische Leukämie
TAM	Transient abnormal myelopoiesis
TEA	TRIS-Acetat-EDTA
TEAA	Triethylammoniumacetat
TET2	Tet oncogene family member 2
TKD	Tyrosinkinase Domäne
TMD	Transmembranäre Domäne
TP53	Tumor protein 53
TRD	Target recognition domain
U2AF1	U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1
UCSC	University of California Santa Cruz
W	Tryptophan
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp
WT1	Wilms tumor 1

Y	Tyrosin
ZF	Zinkfinger
ZRSR2	Zinc Finger CCCH-Type, RNA binding motif and Serine/Arginine Rich 2
αKG	α-Ketogluterat

1. Einleitung

1.1. Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) stellt eine maligne, klonale Erkrankung des hämatopoetischen Systems dar (Fröhling, Scholl et al. 2005, Döhner, Weisdorf et al. 2015, Bullinger, Döhner et al. 2017). In ihrer genetischen Heterogenität zeigen sich neben gestörten Selbsterneuerungsmechanismen auch Veränderungen in der Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Progenitorzellen. Dadurch kommt es zur unkontrollierten Vermehrung von funktionsbeeinträchtigten myeloischen Vorstufen (Fröhling, Scholl et al. 2005, Döhner, Weisdorf et al. 2015, Bullinger, Döhner et al. 2017). Die daraus resultierende Akkumulation leukämischer Blasten im Knochenmark (KM) führt zu einer Verdrängung der regulären Blutbildung. Infolgedessen entsteht eine Knochenmarkinsuffizienz mit Ausbildung einer Anämie, Granulo- und Thrombozytopenie (Löwenberg, Downing et al. 1999). Klinisch äußert sich die AML daher auf mannigfaltige Weise. Neben Müdigkeit und Minderung der körperlichen Leistungsfähigkeit, welche auf die Anämie zurückzuführen sind, sind auch Infektanfälligkeit aufgrund der Leukopenie oder petechiale Einblutungen bei Thrombopenie charakteristisch. Die AML kann sowohl mit als auch ohne Vorliegen einer Leukozytose und dem damit verbundenen klinischen Erscheinungsbild, wie zerebrovaskuläre Dysfunktionen, einhergehen (Kasper, Fauci et al. 2015). Die Infiltration von Organen durch eine hämatogene Ausschwemmung der Blasten ist ebenfalls möglich.

Die AML stellt mit rund 80% den größten Anteil der akuten Leukämien im Erwachsenenalter dar (Laubach, Rao 2008).

In den USA zeigen sich rund 4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr (altersübergreifend, beide Geschlechter). 33% der Patienten mit neu diagnostizierter AML haben ein medianes Lebensalter von 75 Jahre oder älter. Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung beträgt 67 Jahre. Männer (5,0 / 100.000) sind häufiger von Neuerkrankungen der AML betroffen als Frauen (3,4 / 100.000) (Howlader, Noone et al. 2016).
Die Entstehung der AML ist multifaktoriell determiniert und bisher nicht endgültig geklärt. Genotoxische Substanzen sowie ionisierende Strahlung stellen

prädisponierende Faktoren zur Ausbildung einer AML dar (Paustenbach, Bass et al. 1993, Godley, Larson 2008).

Des Weiteren ist nach Chemo- bzw. Strahlentherapie die Inzidenz an akuten myeloischen Leukämien ebenfalls erhöht. Insbesondere auf Alkylantien- sowie Topoisomerase-II-Inhibitoren basierende Therapieschemata scheinen mit distinkten genetischen Veränderungen vergesellschaftet zu sein (Pedersen-Bjergaard, Andersen et al. 2007). Solche therapie-induzierten Leukämien (engl. therapy related AML, t-AML) haben, besonders im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren wie Organdysfunktionen, Knochenmarkschäden oder chronischer Immunsuppression, im Vergleich zur *de novo* AML einen negativ prädiktiven Wert (Smith, Le Beau et al. 2003).

In der Vorgeschichte von AML-Patienten kommen häufig andere hämatopoetische Erkrankungen vor. Sie gelten als Risikofaktoren zur sekundären Ausbildung einer AML (sekundäre AML, s-AML). Hierzu zählen sowohl das myelodysplastische Syndrom (MDS) (Greenberg, Attar et al. 2013) als auch die myeloproliferativen Erkrankungen wie essentielle Thrombozythämie (ET), Myelofibrose (MF) oder Polyzythämia vera (PV) (Chomienne, Rain et al. 2004, Löwenberg 2001). Die s-AML präsentiert sich im Vergleich zur *de novo* AML vor allem durch einen aggressiveren und chemotherapieresistenteren Verlauf (Figueroa, Skrabanek et al. 2009, Estey, Döhner 2006). Darüberhinaus gibt es seltene angeborene Erkrankungen wie z.B. die Fanconi Anämie die für die Entwicklung einer AML prädisponieren (Savage, Dufour 2017). In diesem Zusammenhang ist derzeit auch die Untersuchung sog. familiärer AML Gegenstand wissenschaftlicher Studien. Hierbei geht man von der Existenz von Keimbahnmutationen aus, die für die Entwickling einer AML eine bedeutende Rolle spielen (Tawana, Wang et al. 2015).

Steigendes Lebensalter stellt einen wichtigen und unabhängigen Prognosefaktor zur Beurteilung des Gesamtüberlebens in der AML dar (Appelbaum, Gundacker et al. 2006, Döhner, Estey et al. 2010, Löwenberg, Pabst et al. 2017, Döhner, Weisdorf et al. 2015). Ergänzend sollten auch Komorbiditäten der Patienten berücksichtigt werden, da diese mit einer Verschlechterung der Prognose einhergehen können (Sorror, Maris et al. 2005). Erhöhte Serumwerte für Laktatdehydrogenase (LDH) sowie Splenomegalie und Leukozytose können ebenfalls als prognostisch ungünstige Parameter herangezogen werden (Döhner, Estey et al. 2010). Zur

optimalen Therapieevaluation sollte daher die Bewertung aller patientenbezogener Parameter mit äußerster Sorgfalt erfolgen (Döhner, Estey et al. 2010).

Als wohl wichtigster Prognoseparameter der AML gilt heutzutage der Nachweis chromosomaler und genetischer Aberrationen. Bei rund 55% der AML-Patienten liegt vor Therapiebeginn ein abnormaler Karyotyp vor (Mrozek, Heerema et al. 2004). Das zytogenetische Profil der Patienten ist ein wichtiger Wegweiser, sowohl für die Prognoseeinschätzung als auch für die Erstellung risikoadaptierter Therapienschemata (Grimwade, Hills 2009). So profitieren beispielsweise Patienten mit t(8;21)(q22;q22)/*RUNX1-RUNX1T1 (Runt-related transcription factor1-Runt-related transcription factor 1 translocate to 1*) oder inv(16)(p13q22)/t(16; 16)(p13;q22)/*CBFB-MYH11 (Core binding factor beta-myosin heavy chain 11*) von einer intensiven Chemotherapie mit Cytarabin und haben somit eine relativ gute Prognose. Eine sehr schlechte Prognose hingegen besitzen Patienten mit abnormalem 3q (abn(3q)), inv(3)/t(3;3), Deletion von 5q (del(5q)), t(6;9), t(6;11), Monosomien der Chromosome 5 und/oder 7 (-5/-7) sowie Patienten mit komplexem Karyotypen (>3 nicht zusammenhängende Anomalitäten des Karyoptypen) (Grimwade, Hills 2009, Byrd, Mrozek et al. 2002). Hier sollte eine allogene Stammzelltransplantation bevorzugt oder experimentelle Therapiensätze in Erwägung gezogen werden (Grimwade, Hills 2009).

In Verbindung mit molekulargenetischen Informationen bieten die ELN Empfehlungen (European LeukemiaNet) ein erweitertes System zur Risikostratifizierung der AML. Dabei werden neben zytogenetischer Aberrationen auch genetische Veränderungen wie *FLT3*-ITD (*FMS-like tyrosine kinase 3-Internal tandem duplication*), *NPM1- (Nucleophosmin 1)*, biallelische *CEBPA- (CCAAT/enhancer-binding protein alpha)*, *RUNX1-*, *TP53-* (*Tumor protein 53*) und *ASXL1*-Mutationen (*Additional sex comb like 1*) mitberücksichtigt. Diese Aberrationen sind mit der Prognose der AML Patienten assoziiert und und können somit für die risikoadaptierte Therapie herangezogen werden (Döhner, Estey et al. 2017).

1.2. Diagnostik der AML

Für die adäquate Therapie einer AML ist die Klassifikation mit anschließender Risikostratifizierung wegweisend. Dies macht die morphologische sowie genetische Analyse der Patientenproben unumgänglich, um eine möglichst exakte Einordnung des vorliegenden Krankheitsbildes zu erreichen.

Nachdem durch Auftreten einer charakteristischen Klinik der Verdacht einer akuten Leukämie gestellt wurde, erfolgt zunächst die Gewinnung von Patientenmaterial. Hierzu eignet sich sowohl peripheres Blut (PB) als auch durch Aspirationsbiopsie gewonnenes KM.

Die Färbung des aus dem Aspirat angefertigten Ausstrichs erfolgt mittels May-Grünwald-Giemsa- oder Wright-Giemsa-Färbung. In der mikroskopischen Auswertung zeigt sich ein von monomorphen Blasten dominiertes Bild (Döhner, Estey et al. 2010). Bei der Differentialzählung wird ein Blastenanteil von ≥20% verlangt, um die Diagnose einer AML stellen zu können. Ausnahmen bilden hier die akute myeloische Leukämien mit den chromosomalen Aberrationen t(15;17) *PML-RARA* (*Promyelocytic leukemia-Retinoic acid receptor alpha*), t(8,21) *RUNX1-RUNX1T1*, inv(16) *CBFB-MYH11* (*Core binding factor beta-myosin heavy chain 11*) oder t(16;16) *CBFB-MYH11* (Cheson, Bennett et al. 2003). Auch beim Vorliegen eines myeloischen Sarkoms können morphologische Charakteristika einer AML fehlen (Swerdllow, Campo et al. 2008).

Die Immunphänotypisierung erlaubt die Zuordnung zu den jeweiligen Zelllinien. Dabei werden membranständige Oberflächenmoleküle wie beispielsweise für:

1) Vorläuferzellen: CD34 (cluster of differentiation), CD117, CD33, CD13, HLA-DR (Human Leukocyte Antigen – Antigen D Related)
2) Granulozyten: CD65 und MPO (Myeloperoxidase)
3) Monozyten: CD14, CD36, CD64
4) Megakaryozyten: CD41 (Glycoprotein IIb/IIIa), CD61 (Glycoprotein IIIa)
5) Erythrozyten: CD235a (Glycophorin A), CD36

mittels Durchflusszytometrie herangezogen (Döhner, Estey et al. 2017). Alternativ kann die Zelllinienzugehörigkeit auch zytochemisch durch spezifische Färbungen (MPO, Sudan black B, non specific esterase) bestimmt werden (Döhner, Estey et al. 2017).

Über die Hälfte der neu diagnostizierten AML-Fälle beim Erwachsenen gehen mit numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen einher (Mrozek, Heerema et al. 2004). Daher ist die zytogenetische Analyse mittels herkömmlicher Karyotypisierung oder FISH (fluorescent in situ hybridisation) ein wesentlicher Bestandteil der AML-Diagnostik. Die wichtigsten Aberrationen gehen in die WHO-Klassifikation (World Health Organization) mit ein (Arber, Orazi et al. 2016). Die molekulargenetische Analyse hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Sie stellt einen elementaren Bestandteil der Therapie- und Prognosebestimmung dar. So wurden bereits einige Mutationen wie *NPM1* in die WHO-Klassifikation aufgenommen (Vardiman, Thiele et al. 2009). Gegenwertig steht Next-Generation Sequencing (NGS) zur Detektion von Genmutationen und Genfusionen im Fokus.

1.3. Klassifikation und Risikostratifizierung der AML

Aufgrund der Weiterentwicklung von Technologien sowie der Heterogenität der Erkrankung gibt es heute verschiedene Ansätze zur Klassifikation und nachfolgenden Risikostratifizierung der AML. Hierfür wird die AML anhand morphologischer, klinischer, immunphänotypischer und zyto- sowie molekulargenetischer Kategorien untersucht.

Das erste Klassifikationssystem beschrieb 1976 Bennet et al. (Bennett, Catovsky et al. 1976) in der FAB (French-American-British-Group). Im Rahmen dessen wurde anhand morphologischer Gesichtspunkte eine Aufteilung in 8 Subgruppen (M0-M7) geschaffen (Tabelle 1). Eine zytogenetische und immunologische Erweiterung in weitere Subgruppen folgte später (Löwenberg, Downing et al. 1999).

Tabelle 1. FAB-Klassifikation der AML
Die Zuordnung des M0-Subtypen zur myeloischen Reihe erfolgt nur durch immunozytologische Marker (CD13, CD33, CD65) (Tabelle nach Herold 2017)

Abkürzungen: AML, akute myeloische Leukämie; CD, cluster of differentiation; Esterase, α-Naphthylacetatesterasereaktion; FAB, French-American-British-Group; POX, Myeloperoxidasereaktion.

AML-Subtypen	Zytochemie positiv für
M0	—
M1	POX
M2	POX
M3	POX
M4	POX + Esterase
M5	Esterase
M6	—
M7	—

1999 erfolgte durch Berücksichtigung zytogenetischer Aspekte eine weitere Verfeinerung der Kategorisierung der AML in der WHO-Klassifikation über rein morphologische Aspekte hinaus (Harris, Jaffe et al. 1999). In der überarbeiteten Fassung von 2008 wurden erstmals die molekulare Marker *NPM1* und *CEBPA* als mögliche provisorische Entitäten berücksichtigt (Swerdllow, Campo et al. 2008).

2016 wurde die WHO-Klassifikation aufgrund neuer Erkenntnisse aktualisiert und stellt weiterhin den Goldstandard in der Klassifikation der AML dar (Arber, Orazi et al. 2016) (Tabelle 2).

In der ersten Subgruppe sind rekurrente genetische Veränderungen aufgeführt. 2016 wurden die AML mit *NPM1*-Mutationen bzw. biallelischen *CEBPA*-Mutationen als eigenständige Entitäten aufgenommen (Arber, Orazi et al. 2016). Patienten mit *BCR-ABL1* (*Breakpoint cluster region - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) sowie Patienten mit *RUNX1*-Mutation wurden in der Fassung von 2016 ebenfalls als neue provisorische Entitäten aufgelistet (Arber, Orazi et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die AML mit *RUNX1*-Mutation eine schlechtere Prognose als andere AML-Typen besitzt (Arber, Orazi et al. 2016). Aufgrund der prognostischen Relevanz wird ferner im internationalen Konsens empfohlen ebenfalls auf *FLT3*-Mutationen (*FMS-like tyrosine kinase 3*) zu untersuchen, auch wenn diese in der WHO-Klassifikation bis dato keine eigenständige Erwähnung finden (Döhner, Estey et al. 2017), jedoch in den aktuellen Empfehlungen des ELN aufgenommen wurden.

Eine AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen liegt definitionsgemäß dann vor, wenn sich in der Patientenvorgeschichte ein MDS bzw. ein MDS/MPS (myelodysplastisches Syndrom/myeloproliferatives Syndrom) nachweisen lässt, sich Myelodysplasie-assoziierte zytogenetische Veränderungen zeigen oder wenigstens 50% der Zellen in mindestens zwei hämatopoetischen Zelllinien dysplastisch sind.

Patienten, die nach stattgehabter zytotoxischer Therapie eine myeloide Neoplasie entwickeln, werden in der Kategorie der t-MNs (therapieassoziierte myeloide Neoplasien) zusammengefasst. Nichts desto trotz sollten diese Leukämien zur Therapie- und Prognosestratifizierung ebenfalls auf genetische Abweichungen hin untersucht werden (Arber, Orazi et al. 2016).

Für Assoziationen der AML mit Down Syndrom wurde 2008 eine eigenständige Subgruppe erschaffen (Vardiman, Thiele et al. 2009).

Patienten mit myeloidem Sarkom werden nach ihrem klinischen Erscheinungsbild eingeteilt. Dabei kann es sich um jeden Subtyp der AML handeln (*de novo*, AML Rezidiv, Progression von MDS, MPN, MDS/MPN) (Yilmaz, Saydam et al. 2013).

In die Kategorie der nicht weiter spezifizierten AML (engl. not otherwise specified, NOS) fallen 25-30% aller AML-Patienten (Vardiman, Thiele et al. 2009). Es handelt sich dabei um Patienten mit einem Myeloblastenanteil >20%, die weder die Kriterien für eine AML mit MDS-assoziierten Veränderungen oder rekurrenten genetischen Veränderungen erfüllen (Arber, Orazi et al. 2016). Die weitere Einteilung der NOS ist angelehnt an die French-American-British-Group.

Tabelle 2. Einteilung der akuten myeloischen Leukämien nach aktueller WHO-Klassifikation

Abkürzungen: AML, akute myeloische Leukämie; APL, akute Promyelozyten Leukämie; BCR-ABL1, Breakpoint cluster region-c-abl oncogene; CBFB-MYH11, Core binding factor beta-myosin heavy chain 11; CEBPA, CCAAT/enhancer-binding protein alpha; DEK-NUP214, DEK oncogege-Nukleoporin 214kDa; del, Deletion; GATA2, GATA binding Protein 2; i, Isomchromosom; idic, Isodizentrisches Chromosom; inv, Inversion; Minuszeichen (-), Verlust; MLLT3-KMT2A, Mixed lineage leukemia translocated to 3-Lysine(K)-specific methyltransferase 2A; MECOM, MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1; NPM1, Nucleophosmin 1; p, kurzer Arm des Chromosoms; PICALM-PML-RARA, Promyelocytic leukemia-Retinoic acid receptor alpha; q, langer Arm des Chromosoms; RBM15-MKL1, putative RNA-binding protein 15-Megacaryoblastic leukemia translocation 1; RUNX1, Runt-related transcription factor1; RUNX1-RUNX1T1, Runt-related transcription factor1-Runt-related transcription factor 1 translocate to 1; t, Translokation; TAM, transient abnormal myelopoiesis; WHO, World Health Organization.

WHO-Klassifikation der AML
AML mit rekurrenten genetischen Veränderungen
AML mit t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*

Fortsetzung auf Seite 8

Fortsetzung Tabelle 2. Einteilung der akuten myeloischen Leukämien nach aktueller WHO-Klassifikation
APL mit *PML-RARA*
AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*
AML mit t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*
AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*
provisorische Entität: AML mit BCR-ABL1
AML mit mutiertem *NPM1*
AML mit biallelischen Mutationen von *CEBPA*
provisorische Entität: AML mit mutiertem RUNX1
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen
Zytogenetische Veränderungen:
Komplexer Karyotyp
Unbalancierte Veränderungen
-7/del(7q)
del(5q)/t(5Q)
i(17q)/t(17p)
-13/del(13q)
del(11q)
del(12p)/t(12p)
idic(X)(q13)
Balancierte Veränderungen
t(11;16)(q23.3;p13.3)
t(3;21)(q26.2;q22.1)
t(1;3)(p36.3;q21.2)
t(2;11)(p21;q23.3)
t(5;12)(q32;p13.2)
t(5;7)(q32;q11.2)
t(5;17)(q32;p13.2)
t(5;10)(q32;q21.2)
t(3;5)(q25.3;q35.1)
Therapieassoziierte myeloide Neoplasien
AML, nicht weiter spezifiziert
AML mit minimaler Differenzierung
AML ohne Ausreifung
AML mit Ausreifung
Akute myelomonozytäre Leukämie
Akute monoblastische/monozytische Leukämie
Rein erythrozytäre Leukämie
Akute megakaryoblastische Leukämie
Akute basophile Leukämie
Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloides Sarkom
Myeloische Proliferation bei Down Syndrom
vorrübergehend abnorme Myelopoese (TAM)
Myeloische Leukämie assoziiert mit Down Syndrom

Zur besseren Bewertung und Vergleich von zytogenetischen und molekularen Markern mit klinischen Daten wurde von einer Expertengruppe des ELN ein einheitliches System zur Risikostratifizierung entwickelt (Döhner, Estey et al. 2017). Die Einteilung der AML (ausschließlich der akuten Promyelozyten Leukämie, für welche separate Empfehlungen gelten) (Sanz, Grimwade et al. 2009) erfolgt dabei nach ELN Empfehlungen von 2017 in drei Subgruppen auf Basis der genetischen Diagnostik, welche von einer günstigen (Favorable), über eine intermediäre (Intermediate), bis hin zu einer ungünstigen (Adverse) Prognose reichen (Döhner et al 2017).

Einen Überblick zur ELN-Klassifikation bietet Tabelle 3. Mit einer schlechten Prognose geht neben den angegebenen genetischen Veränderungen vor allem das Vorliegen eines komplexen Karyotyps einher. Hierzu werden Varianten gezählt, die zwar mindestens drei chromosomale Aberrationen besitzen, aber dabei keine der nach WHO klassifizierten rekurrenten Translokationen aufweisen. Komplexe Karyotypen treten bei 10-20% der AML-Patienten auf.

Tabelle 3. ELN Klassifikation, standardisierte Korrelation von zytogenetischen und molekularen Markern der AML mit klinischen Daten (Tabelle nach Döhner et al. 2017)

Abkürzungen: abnl, abnormal; AML, akute myeloische Leukämie; ASXL1, Additional sex comb like 1; BCR-ABL1, , Breakpoint cluster region-c-abl oncogene; CBFB-MYH11, Core binding factor beta-myosin heavy chain 11; CEBPA, CCAAT/enhancer-binding protein alpha; DEK-NUP214, DEK oncogege-Nukleoporin 214kDa; ELN, European LeukemiaNet; FLT3-ITD, FMS-like tyrosine kinase 3-Internal tandem duplications; GATA2, GATA binding Protein 2; inv, Inversion; KMT2A, -Lysine(K)-specific methyltransferase 2A; MECOM, MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1; Minuszeichen (-), Verlust; MLLT3, Mixed lineage leukemia translocated to 3; mut, mutiert; NPM1, Nucleophosmin 1; p, kurzer Arm des Chromosoms; q, langer Arm des Chromosoms; RUNX1, Runt-related transcription factor 1; t, Translokation; TP53, Tumor protein 53; wt, Wildtyp.

Risiko	**zytogenetische und molekulare Merkmale**
günstig	t(18;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
	inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
	NPM1^{mut} ohne *FLT3*-ITD oder mit *FLT3*-ITD^{low}
	Biallelisch *CEBPA*^{mut}
intermediär	*NPM1*^{mut} und *FLT3*-ITD^{high}
	NPM1^{wt} ohne *FLT3*-ITD oder *NPM1*^{wt} mit *FLT3*-ITD^{low}
	t(9;11)(p21.3,q23.3); *MLLT3-KMT2A*
	zytogenetische Aberrationen welche nicht als günstig oder ungünstig klassifiziert werden können
ungünstig	t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
	t(v;11)(v;q23.3); *KMT2A* reorganisiert
	t(9;22)(q34.1;q26.2); *BCR-ABL1*
	inv(3)(q21.3,q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*
	-5 oder del(5q); -7; abnl(17p)
	Komplexer Karyotyp, monosomaler Karyotyp
	NPM1^{wt} und *FLT3*-ITD^{high}
	RUNX1^{mut} oder *ASXL1*^{mut} oder *TP53*^{mut}

Strukturelle Variationen in Chromosomen sind als diagnostische und prognostische Marker bei der Bewertung der AML gut etabliert. Patienten mit normalem Karyotypen (CN) und intermediärem Risikoprofil nach ELN stellen mit rund 50% das größte Patientenkollektiv dar (Döhner, Estey et al. 2017). Es ist jedoch auffällig, dass sich diese Gruppe in Hinblick auf Prognose und klinisches Verhalten äußerst variabel zeigt. Hier zeigte sich in den letzten Jahren die zunehmende Bedeutung der Genmutationen. Dennoch ist das genaue Zusammenspiel der genetischen Veränderungen bei der Leukämogenese noch nicht abschließend geklärt (Papaemmanuil, Gerstung et al. 2016). Um ein besseres Verständnis der Biologie des Tumors zu schaffen, wurde 2013 eine Studie veröffentlicht, in der 200 Patientengenome mit *de novo* AML mittels *Whole-Genome-Sequencing* und *Whole-Exome-Sequencing* untersucht wurden. Dabei wurden in 199 von 200 Fällen Mutationen nachgewiesen. Die Genome der AML-Patienten wiesen mit durchschnittlich 13 Mutationen pro Patient deutlich weniger Mutationen auf als die meisten anderen Tumorerkrankungen. Davon waren ca. 5 Mutationen in Genen

lokalisiert, die in der AML häufig mutiert sind. Unterteilt wurden die Mutationen in folgende Gruppen (Cancer Genome Atlas Research Network 2013) (Tabelle 4):

Fusionen der Transkriptionsfaktoren (18% der Fälle), *NPM1*-Mutationen (27% der Fälle), Tumorsuppressoren (16% der Fälle), DNA-Methylierung (Desoxyribonukleinsäure) (44% der Fälle), Wachstumsfaktorsignalübertragung (59% der Fälle), Transkriptionsfaktoren (30% der Fälle), Chromatinmodifikatoren (22% der Fälle), Cohesin (13% der Fälle), Spliceosom (14% der Fälle) (Cancer Genome Atlas Research Network 2013).

FLT3, *KIT* (*V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral*) oder *RAS* sind Gene, welche wichtige Rollen in Wachstumsfaktorsignalkaskaden einnehmen. Mutationen in diesen Genen waren in 59% der Patienten zu finden. Zur Gruppe der Regulatoren der DNA-Methylierung zählen *DNMT3A* (*DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A*), *IDH1* (I*socitratdehydrogenase*), *IDH2* sowie *TET2* (*Tet oncogene family member 2*). In ihrer Funktion können sie Tumorsuppressorgene beeinflussen. Mutationen der Transkriptionsfaktoren *RUNX1* und *CEBPA* führen zu Veränderungen der Differenzierung. Genfusionen, wie *PML/RARA* (Promyelocytic leukemia-Retinoic acid receptor alpha), machen sich durch veränderte Transkriptionsfaktoraktivitäten bemerkbar. Mutationen in *TP53*, *WT1* (*Wilms tumor 1*) oder *PHF6* (*PHD finger 6*) resultieren in einem Verlust ihrer Funktion als Tumorsupressorgene. Apoptoseeinleitung sowie Arrest des Zellzyklus zur DNA-Reperatur sind gestört, was unkontrolliertes Wachstum von Tumorzellen zur Folge hat. Genen wie *SRSF2* (*Serine and arginine rich splicing factor 2*), *SF3B1* (*Splicing Factor 3b Subunit 1), U2AF1* (*U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1*) und *ZRSR2* (*Zinc Finger CCCH-Type, RNA binding motif and Serine/Arginine Rich 2*) zählen zu den Spliceosome-Komplex-Genen. Mutationen in diesen Genen haben eine deregulierte RNA-Prozessierung zur Folge. Beeinträchtigungen der Chromosomentrennung und transkriptionelle Regulation entstehen durch Mutationen in Cohesin-Genen wie *STAG2* (*Stromal Antigen 2*) und *RAD21* (*RAD21 Cohesin Complex Component*). Eine gestörte Chromationmodifikation entsteht durch veränderte Histonmethylierung, bedingt durch Mutationen in *ASXL1* und *EZH2* (*Lysine N-Methyltransferase 6*) (Cancer Genome Atlas Research Network 2013, Döhner, Weisdorf et al. 2015).

Bei der Auswertung zeigte sich außerdem, dass sich manche dieser Mutationen synergistisch verhalten und somit die Tumorentstehung beschleunigen können. Andere Mutationen wiederum scheinen sich gegenseitig auszuschließen, wie beispielsweise *IDH*-Mutationen bzw. Veränderungen an Genen von Transkriptionfaktoren. Dies impliziert, dass beide Gruppen eine ähnliche Bedeutung in der Leukämogenese einnehmen. Eine häufige Konstellation war das gleichzeitige Vorliegen von *DNMT3A*-, *FLT3*- sowie *NPM1*-Mutationen bei Patienten mit intermediärem Risikoprofil. Es könnte sich hierbei um eine neue Subgruppe der AML handeln (Cancer Genome Atlas Research Network 2013).

Tabelle 4. Funktionelle Einteilung der Genmutationen nach Cancer Genome Atlas Research Network 2013

Abkürzungen: ASXL1, Additional sex comb like 1; CBFB-MYH11, Core binding factor beta-myosin heavy chain 11; CBPA, CCAAT/enhancer-binding protein alpha; DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; DNMT3B, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3B, DNMT1, DNA methyltransferase 1; EZH2, Lysine N-Methyltransferase 6; FLT3, Fms-related tyrosine kinase; IDH1, Isocitratdehydrogenase1; IDH2 Isocitratdehydrogenase 2; KDM6A, Lysine (K)-specific demethylase 6A; KIT, V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog; KRAS, V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; MLL, Mixed lineage leukemia; MLL-PTD, Mixed lineage leukemia-Partial tandem duplication; NPM1, Nucleophosmin 1; NRAS, Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog; NUP98-NSD1, nucleoporin 98kDa-Nuclear receptor binding SET domain protein 1; PHF6, PHD finger 6; PICALM-MLLT10, Clathrin assemlbledlymphoid myeloidleukemia gene -Mixed lineage leukemia translocated to 10; PICALM-PML-RARA, Promyelocytic leukemia-Retinoic acid receptor alpha; PTP, Phosphotyrosine Phosphatase; RUNX1 , Runt-related transcription factor 1; RUNX1-RUNX1T1, Runt-related transcription factor1-Runt-related transcription factor 1 translocate to 1; TET1, Tetmethylcytosinedioxygenase; TET2, Tetmethylcytosinedioxygenase 2; TP53, Tumor protein 53; WT1, Wilms tumor 1.

Cancer Genome Atlas Research Network	
Transkriptionsfaktorfusionen	*PICALM-PML-RARA*
	CBFB-MYH11
	RUNX1-RUNX1T1
	PICALM-MLLT10
NPM1-Mutationen	*NPM1*
Tumorsuppressoren	*TP53*
	WT1
	PHF6
DNA-Methylierung	*DNMT3A; DNMT3B; DNMT1*
	TET1; TET2
	IDH1; IDH2
Wachstumsfaktorsignalübertragung	*FLT3*
	KIT
	KRAS/NRAS
	PTPs
Transkriptionsfaktoren	*RUNX1*
	CEBPA
Chromatinmodifikatoren	*MLL*-X Fusionen
	MLL-PTD
	NUP98-NSD1
	ASXL1
	EZH2
	KDM6A
Cohesin	Cohesin
Spliceosom	Spliceosom

Einen weiteren Ansatz zur Klassifizierung der AML bietet die Arbeit von Papaemmanuil et al. 2016. Hierbei wurden insgesamt 11 Subgruppen beschrieben, von denen neben den gängigen Klassen folgende Drei neu definiert wurden: Chromatin–Spliceosom (18% der Fälle), *TP53*–Aneuploidie (13% der Fälle), und als provisorische Entität R172-*IDH2*-Mutationen (in 1% der Fälle). Überlappungen der

einzelnen genetischen Untergruppen treten hier nur sporadisch auf. Mit diesem Ansatz können nahezu 80% der AML-Patienten kategorisiert werden (Papaemmanuil, Gerstung et al. 2016).

1.4. Prognostische und prädiktive Marker der AML

Der Fokus aktueller Forschungen liegt auf der Etablierung neuer prädiktiver Marker, welche die Rationale für die Anwendung neuer zielgerichteter Therapien darstellen. In den vergangenen Jahren wurde deutlich, dass veränderte epigenetische Mechanismen ebenfalls eine zentrale Rolle in der Leukämogenese einnehmen (Gallipoli, Giotopoulos et al. 2015). Ein weiteres Ziel ist es, neben innovativen und zielgerichteten Therapieoptionen, insbesondere die Klassifikation der AML-Patienten zu präzisieren. Bei den aktuell für die Prognose und Diagnose signifikanten Mutationen handelt es sich im Wesentlichen um folgende: *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* biallelisch, *RUNX1*, *TP53* und ASXL1. Diese sind in den ELN Empfehlungen berücksichtigt. Unterschiedliche Daten zur Prognose existieren für Mutationen in den Genen *DNMT3A* sowie *IDH1* und -*2*. Diese Veränderungen sind Gegenstand aktueller Forschung und sollen im Folgenden genauer erörtert werden:

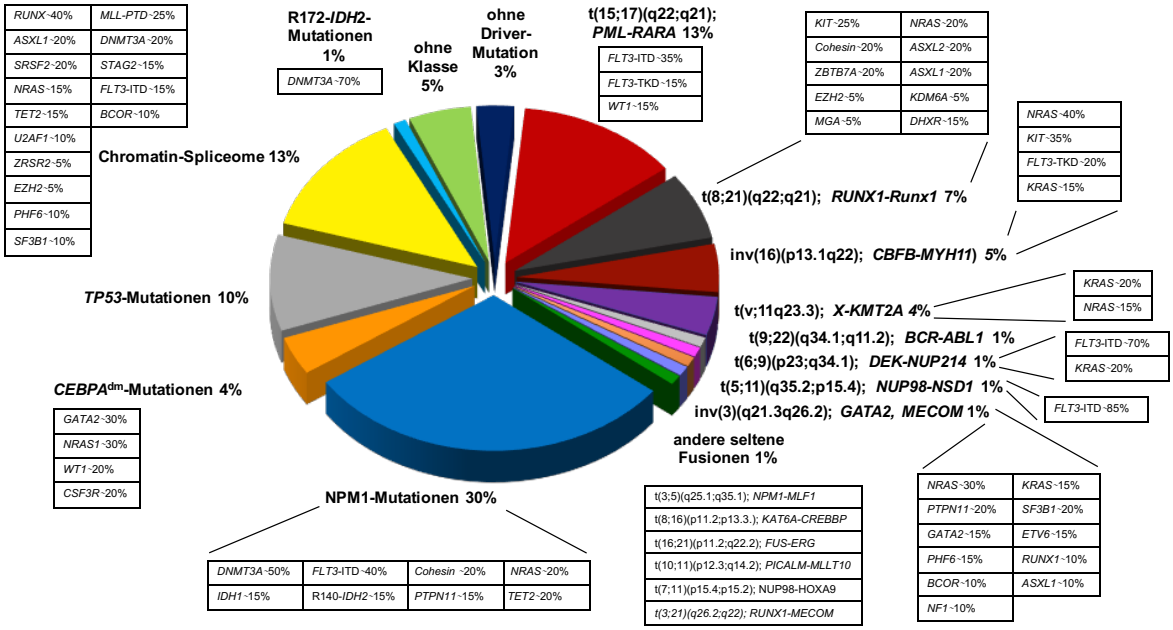

Abbildung 1. Schematische Darstellung der molekularen Subgruppen der AML mit assoziierten Genmutationen beim Erwachsenen

Die Definition der Subgruppen erfolgte nach Papaemmanuil et al. 2016. Jeder Subgruppe ist ein Teilstück des Diagramms zugeordnet. Häufig auftretende Ko-Mutationen sind in den jeweiligen Tabellen aufgeführt (Abbildung nach Döhner, Estey et al. 2016).

Abkürzungen: AML, akute myeloische Leukämie; ASXL, Additional sex comb like; BCOR, BCL6 Corepressor; BCR-ABL1, , Breakpoint cluster region-c-abl oncogene; CBFB-MYH11, Core binding factor beta-myosin heavy chain 11; CEBPA, CCAAT/enhancer-binding protein alpha; CSF3R, Colony Stimulating Factor 3 Receptor; DEK-NUP214, DEK oncogege-Nukleoporin 214kDa; DHXR, D. hansenii mit Xylosereduktase; dm, double mutation; DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; ETV6, ETS Translocation Variant 6; EZH2, Lysine N-Methyltransferase 6; FLT3-ITD, FMS-like tyrosine kinase 3-Internal tandem duplications;FLT3-TKD, FMS-like tyrosine kinase 3-Tyrosinkinasedomäne; FUS-ERG, Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein P2- V-Ets Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Like; GATA2, GATA binding Protein;HOXA, Homeobox A9; IDH2 Isocitratdehydrogenase 2;inv, Inversion; KAT6A-CREBBP, Lysine Acetyltransferase 6A- CREB Binding Protein; KDM6A, Lysine (K)-specific demethylase 6A; KIT, V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog; MAG, MAX Dimerization Protein 5; MECOM, MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1; MLL-PTD, Mixed lineage leukemia-Partial tandem duplication; NF1, Neurofibromin 1; NPM1, Nucleophosmin 1; NRAS, Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog; NSD1, Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1; NUP98, Nucleoporin 98; p, kurzer Arm des Chromosoms; PHF6, PHD Finger Protein 6; PICALM, Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein; PML-RARA, Promyelocytic leukemia-Retinoic acid receptor alpha; PTP, Phosphotyrosine Phosphatase; q, langer Arm des Chromosoms; R, Arginin; RUNX1 , Runt-related transcription factor 1; SF3B1, Splicing Factor 3b Subunit 1; SRSF2, Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2; STAG2, Stromal Antigen 2; t, Translokation; TET2, Tetmethylcytosinedioxygenase; TP53, Tumor protein 53; U2AF1, U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1; WT1, Wilms tumor 1; X-KMT2A, KMT2A, -Lysine(K)-specific methyltransferase 2A; ZBTB7A, Zinc Finger And BTB Domain Containing 7A; ZRSR2, Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2.

- *NPM1:* Mit 25-35% bilden Patienten mit Mutationen im *NPM1*-Gen die größte Gruppe des AML-Patientenkollektivs (Bullinger, Döhner et al. 2017). Unter CN-AML-Patienten finden sich *NPM1*-Mutationen sogar bei 45-64% (Marcucci, Haferlach et al. 2011). *NPM1* liegt auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q35) und kodiert für das Nucleophosmin1 Protein. Das Phosphatprotein ist in seiner Funktion vielfältig und weist sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Eigenschaften auf (Falini, Mecucci et al. 2005). So ist es beispielsweise als nukleäres Chaperonprotein tätig (Grisendi, Mecucci et al. 2006), hemmt die Aggregation von Proteinen im Nukleolus (Borer, Lehner et al. 1989) oder ist an der Regulation der Tumorsuppressoren p53 und ARF (alternative reading frame) beteiligt (Grisendi, Mecucci et al. 2006, Colombo, Marine et al. 2002, Colombo, Bonetti et al. 2005, Lindström, Zhang 2006). NPM1 besitzt eine Pendelfunktion, um sich zwischen Zellkern und Zytoplasma bewegen zu können. Seine Hauptlokalisation liegt jedoch im Nukleolus (Cordell, Pulford et al. 1999), was durch die nukleolare Lokalisationssequenz (NuLS) am C-terminalen Ende mit Tryptophan an der Aminosäurensequenzstelle 288 und 290 gewährleistet wird (Grisendi, Mecucci et al. 2006, Lindström, Zhang 2006). Die sich auf Exon 12 des *NPM1*-Gens befindende Mutation resultiert in einer Veränderung der Aminosäuresequenz des C-terminalen Proteins. Es entsteht eine nukleäre Exportsequenz (NES) welche zum shift und zur Akkumulation des Nucleophosmins im Zytoplasma führt (Bolli, Nicoletti et al. 2007, Falini, Nicoletti et al. 2007a, Falini, Nicoletti et al. 2007b). Diese Mutationen werden als *NPM1c*$^{+}$ (*NPM1* cytoplasmic positive) gekennzeichnet. *NPM1*-Mutationen weisen Assoziationen mit dem weiblichen Geschlecht, erhöhten LDH-Serum-Werten, einem erhöhten Blastenanteil im KM sowie geringe bis fehlende Expression von CD34- und hohe Expression von CD-33-Antigenen auf (Döhner, Gaidzik 2011). Es zeigte sich, dass *NPM1*-Mutationen oft in Kombination mit weiteren Mutationen auftreten, beispielsweise mit *DNMT3A*- (ca. 50%), *FLT3*-ITD (ca. 40%) *IDH1*^{mut} und R140-*IDH2*^{mut} (je ca. 15%) (Bullinger, Döhner et al. 2017, Döhner, Gaidzik 2011). Die prognostische Signifikanz von *NPM1*-Mutationen spiegelt sich inzwischen sowohl in der Klassifikation der WHO als auch in den Empfehlungen der ELN wieder (Döhner, Estey et al. 2016, Arber, Orazi et al. 2016). Junge erwachsene AML-Patienten mit *NPM1*^{mut} (mut, mutiert) ohne *FLT3* oder mit *FLT3*-ITD^{low} (allelic ratio <0.5) kann eine günstige Prognose zugesprochen werden (Döhner, Estey et al. 2016, Döhner, Schlenk et al. 2005). Patienten *NPM1*^{mut} mit

FLT3-ITD^{high} (allelic ratio ≥0.5) haben hingegen eine schlechte Prognose mit kürzerem Gesamtüberleben und höheren Rückfallraten (Schlenk, Kayser et al. 2014). Junge erwachsene Patienten mit *NPM1*^{mut} ohne *FLT3* oder mit *FLT3*-ITD^{low} profitieren nicht von einer allogenen HCT (Hematopoietic cell transplantation) in erster kompletter Remission (CR) (Schlenk, Döhner et al. 2008, Bullinger, Döhner et al. 2017). Ältere Patienten profitieren von einer intensiven Chemotherapie (Schlenk, Döhner et al. 2008, Bullinger, Döhner et al. 2017). Einer Kombinationstherapie mit ATRA (All-*Trans* Retinoic Acid) verbessert die Prognose für jüngere AML-Patienten (Schlenk et al. 2011).

- *FLT3*: FLT3 gehört zu den Klasse-III-Tyrosinkinase-Rezeptoren und wird durch das *FLT3*-Gen auf der Chromosomenbande 13q12 kodiert (Abu-Duhier, Goodeve et al. 2001). Der Aufbau ist mehrteilig und beinhaltet eine transmembranäre (TMD), zytoplasmatisch juxtamembranäre (JM) sowie eine Tyrosinkinase Domäne (TKD) (Matthews, Jordan et al. 1991). Nach extrazellulärer Ligandenbindung erfolgt die Dimerisierung des FLT3-Rezeptors mit anschließender Autophosphorylierung der TKD (Stirewalt, Kopecky et al. 2001, Griffith, Black et al. 2004). Die dadurch in Gang gesetzte intrazelluläre Signalkaskade reguliert Apoptose, Differenzierung und Proliferation von unreifen hämatologischen Progenitorzellen (Turner, Lin et al. 1996). AML-Patienten weisen in 20% der Fälle *FLT3*-ITD der zytoplasmatisch juxtamembranäre Domäne mit unterschiedlichen Längen und Insertionslokalisationen auf; in der CN-AML sind es 24-38% (Döhner, Döhner 2008, Mrozek, Marcucci et al. 2007, Schlenk, Döhner et al. 2008, Bullinger, Döhner et al. 2017). Des Weiteren finden sich bei 7-8% der Patienten auch Punktmutationen im Bereich des Aktivierungs-Loops der TKD (Marcucci, Haferlach et al. 2011, Döhner, Döhner 2008, Bullinger, Döhner et. al 2017). Beide Mutationen führen aufgrund der fehlenden Autoinhibition zur liganden-unabhängigen Dimerisierung des *FLT3*-Proteins und zur konstitutiven Aktivierung (Döhner, Paschka et al. 2015). Es zeigte sich zudem eine zunehmende Prävalenz der *FLT3*-ITD mit steigendem Alter (Stirewalt, Kopecky et al. 2001, Bullinger, Döhner et al. 2017) sowie erhöhter Leukozytenzahl (Gilliland, Griffin 2002). *FLT3*-ITD sind mit *NPM1*^{mut} sowie t(15;17) und t(6;9) assoziiert (Bullinger, Döhner et al. 2017). Die prognostische Bedeutung von *FLT3*-ITD hängt sowohl von den Komutationen wie z. B. *NPM1* als auch von der Insertionslokalisation und der Menge des mutierten Allels (allelic ratio) ab. Patienten mit *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{high} (allelic ratio ≥ 0.5) oder Insertionen der ITD im

β-Faltblatt der TKD-Domäne haben eine ungünstige Prognose (Schlenk, Kayser et al. 2014). Welche prognostische Relevanz die *FLT3*-TKD besitzen, ist jedoch noch unklar (Mrozek, Marcucci et al. 2007, Bullinger, Döhner et al. 2017). Patienten mit *FLT3*-ITD^{high} profitieren von einer allogenen HCT (Schlenk, Kayser et al. 2014). Tyrosinkinaseinibitoren wie Midostaurin scheinen für jüngere Patienten mit *FLT3*-ITD in Kombination mit einer intensiven Chemotherapie einen Überlebensvorteil zu liefern (Stone, Fischer et al. 2012, Bullinger, Döhner et al. 2017). Die Bedeutung von FLT3-Inhibitoren als molekulare Therapieoptionen wurde klinisch geprüft (Fathi, Levis 2011). Die Zulassung von Midostaurin in den USA erfolgte April 2017 durch die FDA (Levis 2017) und im Oktober 2017 in Europa durch die EMA (Gungorduk et. al 2017).

- *CEBPA:* Mutationen des Gens *CEBPA* sind bei ca. 1-5% aller (Bullinger, Döhner et. al 2017) bzw. 10-18% der CN-AML-Patienten zu finden (Marcucci, Haferlach et al. 2011). *CEBPA* liegt auf Chromosom 19q13.1 und kodiert für den Transkriptionsfaktor C/EBPα, welcher als Proliferationsinhibitor und Tumorsuppressor in myelomonozytären Zellen agiert. *CEBPA* spielt vor allem bei der Differenzierung der Granulozyten eine wichtige Rolle (Pabst, Mueller et al. 2001). Die Mutationen lassen sich je nach Lokalisation in zwei Gruppen aufteilen. Durch in-frame Mutationen sowie Insertionen oder Deletionen am C-Terminus zwischen DNA-Bindungs- und Leucin-Zipper-Domäne werden sowohl die Dimerisations- als auch die DNA-Bindungsaktivität gestört (Pabst, Eyholzer et al. 2009). N-terminal gelegene nonsense Mutationen führen durch vorzeitige Transkriptionsterminierung zur Bildung funktionsloser C/EBPα-Proteine (Frohling, Schlenk et al. 2004, Pabst, Mueller 2007). In 2/3 der Fälle finden sich biallelische Mutationen (engl. double mutation, dm). Dabei handelt es sich zu 90% um heterozygote Mutationen mit C-terminaler Mutation auf dem einen Allel und N-terminaler Mutation auf dem anderen Allel (Marcucci, Haferlach et al. 2011, Schlenk, Döhner et al. 2008, Frohling, Schlenk et al. 2004). Prognostische Signifikanz besitzen lediglich *CEBPA*^{dm}, sodass diese als eigenständige Entität in der WHO-Klassifikation von 2008 aufgenommen wurden (Swerdllow, Campo et al. 2008). *CEBPA*^{dm} gehen mit einer geringeren Thrombozytenzahl (Taskesen, Bullinger et al. 2011) und jüngerem Alter einher (Taskesen, Bullinger et al. 2011, Bullinger, Döhner et al. 2017) und sind vor allem mit *GATA2* (*GATA binding Protein 2*), *NRAS* (*Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*) und *WT1* assoziiert.

Komutationen mit schlechter Prognose wie *FLT3* liegen hingegen seltener vor (Papaemmanuil, Gerstung et al. 2016). *CEBPA*^{dm} gehen mit einer günstigen Prognose einher (Bullinger, Döhner et al. 2017). Dabei zeigte sich eine höhere CR-Rate sowie ein längeres OS (overall survival; Gesamtüberleben) (Fröhling, Schlenk et al. 2004, Schlenk, Döhner et al. 2008). Es zeigte sich, dass Patienten beim Vorliegen einer *CEPBA*^{dm} von einer allogenen bzw. autologen HCT hinsichtlich des RFS (relapse-free survival; rezidivfreies Überleben) profitieren, nicht jedoch hinsichtlich des OS (Schlenk, Taskesen et al. 2013). Des Weiteren scheinen N-terminale *CEBPA* Keimbahnmutationen in der Ätiologie der familiären AML einen prädisponierenden Faktor darzustellen. Zur Ausbildung einer Leukämie kommt es jedoch erst nach somatisch erworbener Mutation des zweiten Allels am C-terminalen Ende (Corbacioglu, Fröhling et al. 2007).

- *RUNX1*: *RUNX1* beeinflusst die Regulation von Wachstumsfaktoren, Oberflächenrezeptoren, Signalmolekülen sowie Transkriptionsfaktoren (Schnittger, Dicker et al. 2011). Das insgesamt 10 Exons umfassende Gen liegt auf der chromosomalen Bande 21q22. Die Angaben zum Auftreten von *RUNX1*^{mut} liegen bei ca. 6-33%, in Abhängigkeit der Kohorte (Gaidzik, Teleanu et al. 2016, Gaidzik, Bullinger et al. 2011, Schnittger, Dicker et al. 2011). *RUNX1*^{mut} zeigen sich häufiger bei Patienten >60 Jahren sowie beim männlichen Geschlecht und s-AML-Patienten (Bullinger, Döhner et al. 2017). Mutationen treten gehäuft bei intermediate-risk AML, Trisomie 13 und 21 sowie in Verbindung mit *SRFS2 (serine and arginine rich splicing factor 2), KMT2A*-PTD (partielle Tandemduplikationen), *ASXL1*^{mut} und R140-*IDH2*^{mut} auf (Gaidzik, Bullinger et al. 2011, Schnittger, Dicker et al. 2011, Bullinger, Döhner et al. 2017). Eine negative Korrelation bezüglich der Inzidenz besteht hingegen bei *NPM1*^{mut} und *CEBPA*^{mut} (Schnittger, Dicker et al. 2011). Patienten mit *RUNX1*^{mut} weisen eine ungünstige Prognose auf (Gaidzik, Teleanu et al. 2016, Schnittger, Dicker et al. 2011) was besonders für Patienten mit *RUNX1*^{mut}/*ASXL1*^{mut} und *RUNX1*^{mut}/*SRFS2*^{mut} gilt (Bullinger, Döhner et al. 2017, Gaidzik, Teleanu et al. 2016). Seit 2016 werden *RUNX1*^{mut} als provisorische Entität in der WHO-Klassifikation berücksichtigt (Arber, Orazi et al. 2016).

- *ASXL1*: Das *ASXL1*-Gen liegt auf der chromosomalen Bande 20q11 (Fisher, Berger et al. 2003) und ist in ca. 5-18% der AML-Patienten zu finden (Bullinger, Döhner et al. 2017). Die Häufigkeit des Auftretens von *ASXL1*^{mut} nimmt mit

steigendem Alter zu. Mutationen im *ASXL1*-Gen sind häufig beim männlichen Geschlecht sowie bei s-AML-Patienten zu finden (Paschka, Schlenk et al. 2015). *ASXL1*^{mut} sind in rund 20% assoziiert mit der Chromatin–Spliceosom-Klasse sowie mit t(8;21) und inv(3)t(3;3). Komutationen mit *RUNX1* und R140-*IDH2*^{mut} liegen in 20% bzw. 13% der Fälle vor (Paschka, Schlenk et al.2015, Bullinger, Döhner et al. 2017). Eine negative Korrelation besteht hingegen mit *NPM1*^{mut}*, DNMT3A*^{mut} und *FLT3*-ITD (Paschka, Schlenk et al. 2015). *ASXL1*^{mut} sind mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Besonders gilt dies für Patienten mit *ASXL1*^{mut}/*RUNX1*^{mut} bzw. *ASXL1*^{mut}/*SRFS2*^{mut}, die eine sehr ungünstige Prognose aufweisen (Döhner, Paschka et al. 2015).

- *TP53*: *TP53* befindet sich auf der chromsomalen Bande 17p13.1 und kodiert als Tumorsuppressorgen für das Tumorprotein p53. Es ist unter anderem maßgeblich an der Regulation von Genexpressionen, Zellzyklusarrest und DNA-Reparaturmechanismen beteiligt. *TP53*^{mut} sind ursächlich für eine Vielzahl an Krebserkrankungen sowie für das Li-Fraumeni-Syndrom (Schoch, Kern et al. 2005). Die Inzidenz der *TP53*^{mut} nimmt mit dem Alter der Patienten zu und ist signifkant mit dem Vorliegen einer sekundären AML und einem komplexen Karyotyp assoziiert. Beim Vorliegen eines komplexen Karyotyps finden sich *TP53*^{mut} in 56-78% der Fälle. Darüber hinaus treten *TP53*^{mut} häufig mit −5/del(5q), −7/del(7q), abn(17p) oder einem monosomalen Karyotypen auf. *TP53*^{mut} gehen mit einer sehr schlechten Prognose einher, vor allem in Kombination mit einem komplexen Karyotypen (Bullinger, Döhner et al. 2017, Döhner, Weisdorf et al. 2015).

1.5. *DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A*

1.5.1. Funktion von DNMT3A

Das *DNMT3A*-Gen ist auf der chromosomalen Bande 2q23 lokalisiert. Es besteht aus 26 Exons und 25 Introns und seine Proteine beinhalten 853 Aminosäuren (Xie, Wang et al. 1999). DNMT3A gehört mit DNMT3B (DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3B) und DNMT1 zu der Familie der humanen DNA-Methyltranferasen (DNA MTase). Ein verwandtes Protein, aber ohne katalytische Aktivität, stellt DNMT3L (DNA Methyltransferase 3 like Protein) dar. Der Aufbau der MTasen beinhaltet eine kleinere am C-Terminus gelegene katalytische Domäne und eine sich N-terminal befindende Domäne mit regulatorischer Funktion (Cheng

1995). Die katalytische Region ist aus einem großen und einem kleinen Bereich aufgebaut. Der große Bereich besteht aus 7 β-Strängen und 6 α Helices, welche in der Sekundärstruktur in α/β/α-Konfiguration angeordnet sind. Die kleine Domäne besteht aus 3 β-Strängen und zwei α-Helices (Jia, Jurkowska et al. 2007a). Diese enthält auch das katalytische Zentrum des Enzyms mit 10 Sequenzen, von denen I, IV, VI, VIII, IX und X hoch konserviert sind (Posfai, Bhagwat et al. 1989). Zwischen den Motiven VIII und IX liegt die für die spezifische DNA-Bindung verantwortliche, unkonservierte target recognition domain (TRD) (Cheng 1995).
Der größere N-terminale Teil des *DNMT3A*-Gens enthält die ATRX-DNMT3A-DNMT3L-Domäne (ADD), auch bekannt als Plant-Homeo-Domäne (PHD). Es handelt sich hierbei um eine konservierte und cytosinreiche Region des Gens. Bei ADD ist ein C2-C2-Zinkfinger wesentlich an der Protein-Proteininteraktion beteiligt (Burgers, Fuks et al. 2002).

Durch Interaktionen von ADD mit unmodifiziertem Histon H3 lässt sich des Weiteren darauf schließen, dass Modifikationen von Histonen die DNA-Methylierung mitbestimmen (Xu, Mao et al. 2010). Ein weiterer Bestandteil der regulatorischen Region des *DNMT3A*-Gens ist die Prolin-Tryptophan-Prolin-Domäne (PWWP). Diese tetrapeptidische Region ist am schwächsten konserviert und wichtig für die Bindung an Chromatin (Stec, Nagl et al. 2000).

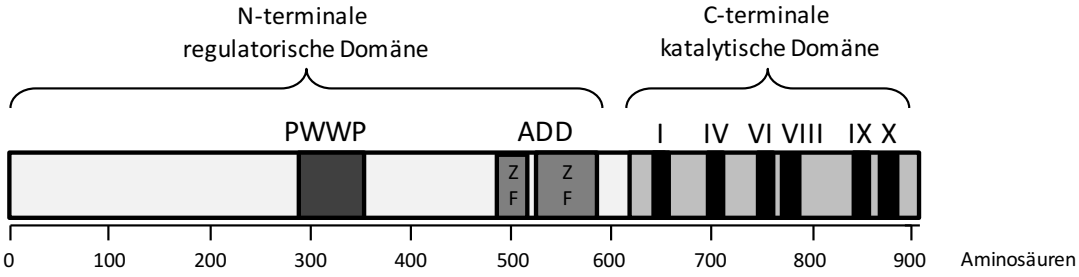

Abbildung 2. Graphische Darstellung des DNMT3A Proteins

Konservierte DNA-(cytosin-5)-Metyltransferase Motive (I,IV,VI,VIII,IX,X) sind benannt. Aminosäuren 1-912, UniProtKB - Q9Y6K1; Ensembl Genome Browser: Protein ID ENSP00000264709 (Abbildung nach Jurkowska et al. 2011).
Abkürzungen: ADD, ATRX-DNMT3A-DNMT3L-Domäne; DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; PWWP, Prolin-Tryptophan-Prolin-Domäne; ZF, Zinkfinger.

DNMT3A und DNMT3B finden sich ubiquitär exprimiert, aber überwiegend in embryonalen Keimzellen. Sie sind mit zunehmendem Differenzierungsgrad der Zellen weniger exprimiert (Jurkowska, Jurkowski et al. 2011). Auch wenn ihnen regulatorische Eigenschaften durch Methylierung zugewiesen werden, betrachtet man sie dennoch als *de novo* MTasen (Hermann, Gowher et al. 2004).

DNMT3A liegt als Heterotetramer vor und besteht aus zwei zentral gelegenen DNMT3A und zwei randständigen DNMT3L Molekülen (Cheng, Blumenthal 2008). DNMT3A2 stellt eine Isoform des DNMT3A dar. Sie ist durch alternative Promotoren kürzer als *DNMT3A*, da N-terminal die erste Aminosäure fehlt. Die Aktivität der beiden MTasen ist ähnlich. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem Verteilungsmuster, da DNMT3A2 fast ausschließlich in Keim- und Embryonalzellen vorkommen (Chen, Ueda et al. 2002).

Die Transkriptionsaktivität vieler Gene wird durch verschiedenste epigenetische Vorgänge beeinflusst. Hierzu gehört unter anderem die DNA-Methylierung. Die Methylierung von DNA trägt durch Regulierung der Genexpression wesentlich zur Kontrolle verschiedener Zellfunktionen, wie Differenzierung, Proliferation und Transformierung bei (Turek-Plewa, Jagodzinski 2005). Die Methylierung erfolgt über DNA-MTase. Hierbei wird eine Methlygruppe auf die C5 Position des Cytosins transferiert (Jurkowska, Jurkowski et al. 2011). Als Ko-Faktor dient hier S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) und wird posttransfer zu S-Adenosyl-Homocystein. 5-Methylcytosin hat keinen Einfluss auf die Watson-Crick-Bindungseigenschaften, sodass die Basenpaarbindung auch nach der Methylierung stabil bleibt (Xu, Mao et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass dies nahezu ausschließlich CG-Dinukleotide (C, Cytosin; G, Guanin) betrifft (Jurkowska, Jurkowski et al. 2011). Interessanterweise ergeben sich dabei gewebs- und zellspezifische Methylierungsmuster (Lister, Pelizzola et al. 2009). Das Methylierungsmuster wird von den sogenannten *de novo* MTasen determiniert. Bei jedem Replikationszyklus entsteht ein paternaler Stang mit der entsprechenden DNA-Methylierung und ein nicht-methylierter Tochterstrang. Zur Komplettierung der Methylierung des neu synthetisierten Strangs dient die Transferase DNMT1, welche für hemimethylierte Stränge spezifisch ist (Jurkowska, Jurkowski et al. 2011).

Abnormale DNA-Methylierungs-Muster werden in Verbindung mit der Pathogenese zahlreicher Krankheiten gesetzt – so auch mit der AML (Jurkowska, Jurkowski et al. 2011). Dabei sind 60-80% aller CG Paarungen methyliert, wobei lediglich 4% des im Genom auftretenden Cytosins methyliert ist (Lister, Pelizzola et al. 2009). Die Promotorregionen in nahezu allen Genen weisen einen erhöhten Anteil an CG auf. Diese werden als CG-Inseln (CGI; CpG, Cytosin phosphat Guanin) bezeichnet und machen rund 1% des gesamten Genoms aus (Saxonov, Berg et al. 2006). Die Methylierung der Promotorregion führt dabei zur Unterdrückung der Genaktivität und der Grad der Methylierung korreliert mit der Aktivität der Gentranskription (Attwood, Yung et al. 2002). Der Transkriptionsstart aktiver Gene erscheint zum Rest des Gens hypomethyliert. Da in Exonen eine hohe Methylierungsrate beobachtet werden konnte, geht man davon aus, dass DNA-Methylierungsvorgänge auch auf das Splicing von Transkripten Einfluss nehmen (Lister, Pelizzola et al. 2009).

Ein Funktionsverlust der *de novo* MTasen hat wesentlichen Einfluss auf Embryonal- sowie Stammzellen und führt zu einer aggressiven Blockade der Differenzierung (Challen, Sun et al. 2012). DNMT3A nimmt Einfluss auf die Differenzierung von Stammzellen durch Methylierung und Regulation des Splicings (Challen, Sun et al. 2012). Bei Fehlen von DNMT3A erfolgt jedoch kein Differenzierungsstimulus, wobei gleichzeitig Selbsterneuerung und Zellteilung unbeeinträchtigt bleiben. Im Rahmen des Funktionsverlusts von DNMT3A in Stammzellen konnten in verschiedenen Studien Signaturen sowohl von Hyper- als auch von Hypomethylierungen nachgewiesen werden (Challen, Sun et al. 2012, Ley, Ding et al. 2010). Andere Arbeiten zeigten dagegen deutlich erhöhte Hypomethylierungsraten (Yan, Xu et al. 2011). Dies führt zu der Annahme, dass mutierte MTasen zu komplexeren Dysregulationen führen und nicht nur zielgerichtet Ausfälle aufweisen. Ein alleiniger DNMT3A-Funktionsverlust zeigte im Mausmodell keinen AML-Phänotypen (Challen, Sun et al. 2012). Dies legt die Vermutung nahe, dass weitere Faktoren zur malignen Transformation beitragen müssen. Nichts desto trotz konnte gezeigt werden, dass Hypomethylierung von Protoonkogenen in Verbindung mit hypermethylierten CGIs wichtige Bestandteile der Karzinogenese sind (Cho, Yazici et al. 2010).

1.5.2. *DNMT3A*-Mutationen in der AML

Auch in der Leukämogenese spielen Mutationen in Genen die die Methylierung beeinflussen eine Rolle (Issa, Baylin et al. 1997). So beschrieben Ley et al. 2010 erstmals *DNMT3A*^{mut} innerhalb der AML (Ley, Ding et al. 2010). Die prognostische Bedeutung der *DNMT3A*^{mut} wurde seither in vielen verschiedenen Studien analysiert. Die Ergebnisse präsentierten sich dabei äußerst heterogen. *DNMT3A*^{mut} werden in ca. 15-33% der AML-Patienten gefunden (Bullinger, Döhner et al. 2017).

DNMT3A^{mut} zeigen sich gehäuft bei Patienten mit intermediärem zytogenetischen Risiko (ca. 33%) sowie bei Patienten mit CN-AML (ca. 37%) (Ley, Ding et al. 2010, Thol, Damm et al. 2011, Yan, Xu et al. 2011, Gaidzik, Schlenk et al. 2013). Bei Patienten mit günstiger Prognose sind hingegen keine *DNMT3A*^{mut} zu finden (Ley, Ding et al. 2010).

Bei den identifizierten Mutationen im *DNMT3A*-Gen handelt es sich in den meisten Fällen um heterozygote missense Mutationen. Frameshift-, nonsense-, oder splice-site Mutationen treten lediglich vereinzelt auf. In rund 2/3 der Fälle ist das auf Exon 23 gelegene Kodon R882 betroffen (Gaidzik, Bullinger et al. 2011, Marková, Michková et al. 2012, Thol, Damm et al. 2011, Ley, Ding et al. 2010, Yan, Xu et al. 2011). Es liegt in der Homodimerisation-Region der MTase Domäne und ist an der Dimerisation und DNA Bindung beteiligt (Jia, Jurkowska et al. 2007b). R882-*DNMT3A*^{mut} gehen mit einer reduzierten DNA Methylierungsaktivität einher (Yan, Xu et al. 2011, Yamashita, Yuan et al. 2010). Es wurden bis zu 6 verschiedene Mutationsvarianten von R882 gefunden. Am häufigsten finden sich p.R882H (R, Arginin; H, Histidin) und p.R882C (C, Cystein) Mutationen (Gaidzik, Schlenk et al. 2013). p.R882H und p.R882C entstehen durch Transition von C zu T, was durch Desaminierung von Methylcytosin von CpG entstanden sein könnte (Rideout, Coetzee et al. 1990). R882-*DNMT3A*^{mut} finden sich häufiger als non-R882-*DNMT3A*^{mut} bei CN-AML-Patienten. Im Vergleich zu R882-*DNMT3A*^{mut} zeigten sich non-R882-*DNMT3A*^{mut} häufiger bei Patienten mit ungünstigem Risikoprofil (Gaidzik, Schlenk et al. 2013).

DNMT3A^{mut} sind mit einem höheren Alter der Patienten assoziiert (Yan, Xu et al. 2011, Thol, Damm et al. 2011, Gaidzik, Schlenk et al. 2013). Vor allem das Patientenkollektiv bis 40 Jahre zeigt eine ansteigende Mutationshäufigkeit mit

anschließender Stabilisation (Gaidzik, Schlenk et al. 2013). Es konnte des Weiteren eine Assoziation zwischen dem Auftreten von *DNMT3A*^{mut} und dem weiblichen Geschlecht gezeigt werden (Gaidzik, Schlenk et al. 2013, Yan, Xu et al. 2011, Marková, Michková et al. 2012). Die Plättchenzahl (Thol, Damm et al. 2011, Ribeiro, Pratcorona et al. 2012) sowie LDH-Level (Gaidzik, Schlenk et al. 2013) sind bei Patienten mit *DNMT3A*^{mut} erhöht. *DNMT3A*^{mut} wiesen ebenfalls eine signifikante Assoziation mit erhöhten Leukozytenzahlen (Yan, Xu et al. 2011, Ley, Ding et al. 2010, Thol, Damm et al. 2011, Ribeiro, Pratcorona et al. 2012, Marcucci, Metzeler et al. 2012, Gaidzik, Schlenk et al. 2013) und Blasten im KM auf (Marcucci, Metzeler et al. 2012, Gaidzik, Schlenk et al. 2013). Die Anzahl der Leukozyten ist bei Patienten mit R882-*DNMT3A*^{mut} deutlich höher als bei Patienten mit non-*DNMT3A*- oder non-R882-*DNMT3A*^{mut} (Ley, Ding et al. 2010). Bei Patienten mit AML-M4 (Akute myelomonozytäre Leukämie) und -M5 (Akute Monoblasten-Leukämie, Akute Monozyten-Leukämie) nach FAB fanden sich gehäuft *DNMT3A*^{mut} (Ley, Ding et al. 2010, Yan, Xu et al. 2011). Bei Gaidzik et al. wiederum zeigten sich in Bezug auf die klinischen Charakteristika keine Unterschiede zwischen R882- und non-R882-*DNMT3A*^{mut} (Gaidzik, Schlenk et al. 2013).

DNMT3A^{mut} sind signifikant mit Mutationen in den Genen *FLT3*-, *IDH1*, *IDH2* und *NPM1* assoziiert (Gaidzik, Schlenk et al. 2013, Ley, Ding et al. 2010, Thol, Damm et al. 2011, Marcucci, Metzeler et al. 2012). So zeigten sich *FLT3*-ITD in 34%, *IDH*^{mut} in 29% und *NPM1*^{mut} in 64% der *DNMT3A*^{mut} Patienten (Gaidzik, Schlenk et al. 2013). *CEBPA*^{dm} waren hingegen seltener zu finden. Schlechtere Prognosen zeigten sich auch bei parallel auftretenden *FLT3*-ITD und *NPM1*^{mut} mit R882-*DNMT3A*^{mut}. Dieser Effekt war jedoch lediglich bei Patienten mit abnormaler Zytogenetik zu beobachten und galt nicht für CN-AML-Patienten (Gaidzik, Schlenk et al. 2013).

Im Hinblick auf den prognostischen Einfluss von *DNMT3A*^{mut} stellen sich die Daten in der Literatur unterschiedlich dar. Einige Studien zeigten keine signifikanten Einfluss von *DNMT3A*^{mut} auf das Erreichen einer CR (Marková, Michková et al. 2012, Marcucci, Metzeler et al. 2012, Thol, Damm et al. 2011), wohingegen andere Untersuchungen bei *DNMT3A*^{mut} eine höhere CR-Rate im Vergleich zu *DNMT3A*^{wt} (wt, Wildtyp) Patienten aufzeigten (Gaidzik, Schlenk et al. 2013, Ribeiro, Pratcorona et al. 2012). Der positive Einfluss auf die CR-Rate konnte sich nicht auf Subgruppen

wie CN-AML oder nach ELN definierten Patienten übertragen lassen (Gaidzik, Schlenk et al. 2013, Ribeiro, Pratcorona et al. 2012). Diese Beobachtung könnte der geringen Anzahl an *DNMT3A*^{mut} Patienten mit Zugehörigkeit in Hochrisikogruppen geschuldet sein, woraus sich letztlich kein direkter Einfluss von *DNMT3A*^{mut} auf die CR ergibt (Gaidzik, Schlenk et al. 2013). Für die CN-AML Subgruppe gingen *DNMT3A*^{mut} mit geringere CR-Raten einher (Thol, Damm et al. 2011).

DNMT3A^{mut} gingen in einigen Studien mit einem schlechteren OS einher. Dies gilt für die gesamte Kohorte wie auch für die CN-AML Subgruppe (Thol, Damm et al. 2011, Ley, Ding et al. 2010, Yan, Xu et al. 2011). Die schlechtere Prognose ist unabhängig sowohl vom R882-*DNMT3A*-Mutationsstatus (Thol, Damm et al. 2011, Ley, Ding et al. 2010) als auch von Alter, Ko-Mutationen mit *FLT3*, *NPM1* oder der Genlokalisation der Mutation (Ley, Ding et al. 2010). Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Studie zu R882-*DNMT3A*^{mut} und non-R882-*DNMT3A*^{mut} weder in Bezug auf die Gesamt- noch auf die CN-AML-Kohorte signifikante Auswirkungen auf das OS, das EFS (event-free survival; ereignisfreies Überleben) oder das RFS. Es zeigte sich lediglich ein geringer negativer Effekt auf das OS und EFS bei ELN-ungünstigen CN-AML-Patienten. Der negative prognostische Einfluss von *DNMT3A*^{mut} auf CN-AML-Patienten mit ungünstigem Risikoprofil scheint auf R882-*DNMT3A*^{mut} zurückführbar. Patienten mit R882-*DNMT3A*^{mut} zeigten ein vermindertes RFS, während non-R882-*DNMT3A*^{mut} einen positiven Einfluss auf das OS hatten. Diese Beobachtungen gelten für junge Patienten aus der Gesamt- sowie CN-AML-Kohorte (Gaidzik, Schlenk et al. 2013). Eine weitere Studie sah hingegen lediglich negative Effekte von non-R882-*DNMT3A*^{mut} auf junge und von R882-*DNMT3A*^{mut} auf ältere Patienten (Marcucci, Metzeler et al. 2012). Weder bei der gesamten Kohorte, noch bei CN-AML-Patienten konnte ein signifikanter Einfluss von *DNMT3A*^{mut} bei allogener HCT auf das RFS gefunden werden. Lediglich R882-*DNMT3A*^{mut} schienen einen negativen Einfluss auf das RFS zu nehmen (Gaidzik, Schlenk et al. 2013).

Bei Patienten in Remission sind die meisten leukämiespezifischen Mutationen nicht mehr nachweisbar. Die gilt nicht für *DNMT3A*^{mut}, die eine große Stabilität aufweisen (Shlush, Zandi et al. 2014, Kronke, Bullinger et al. 2013). Dies wird im Kontext der klonalen Hämatopoese beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff

„klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potenzial (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP) generiert, der solche prämalignen hämatopoetischen Stammzellen beschreibt, bei denen zwar somatische Mutationen wie *DNMT3A*^{mut} vorliegen, es jedoch zu keinen dysplastischen Veränderungen des KM oder Zytopenien kommt. Es fehlen ebenfalls weitere Mutationen (z.B. *NPM1*^{mut}*),* um eine Leukämie zu induzieren (Steensma, Bejar et al. 2015).

Die Rolle von *DNMT3A*^{mut} in Bezug auf veränderte Methylierungsmuster und Genexpressionen wird kontrovers diskutiert. *IDH1* und einige Gene der HOX-Familie (Homeobox) sind bei *DNMT3A*^{mut} Patienten hochreguliert. So konnten hypomethylierte CpGs in HOXB nachgewiesen werden (Yan, Xu et al. 2011). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass *DNMT3A*^{mut} zu Veränderungen der DNA Methylierung oder Histon-Bindung führen und dadurch die Genexpressionen verändern (Yan, Xu et al. 2011). Es wird aber auch postuliert, dass aufgrund nicht erhöhter Level von 5-Methylcytosin bei Vorliegen von *DNMT3A*^{mut}, dass globale Methylierungsmuster und Genexpressionen nicht signifikant verändert werden (Ley, Ding et al. 2010).

Zusammenfassend erscheint ein Zusammenhang zwischen *DNMT3A*^{mut} und der Entstehung bzw. der Unterhaltung der AML naheliegend. In diesem Kontext bieten sich Pyrimidinanaloga, welche DNA-Methyltransferasen inhibieren und dadurch Hypermethylierungen aufheben, als vielversprechende Therapieoption an (Dombret, Seymour et al. 2015). Im Rahmen aktueller Studien, wie der AMLSG 12-09 Studie, wurde die Bedeutung solcher Pyrimidinanaloga (Azacitidin, Decitabin) in der Therapie der AML mit Mutationen in Genen, die in der Methylierung eine Rolle spielen untersucht (Wouters, Delwel 2016). Besonders für Patienten, die für eine intensive Chemotherapie nicht geeignet sind, wird ein Vorteil dieser neuen Therapieoption diskutiert (Dombret, Seymour et al. 2015). Die Therapeutika finden gegenwärtig bereits in der Behandlung des MDS sowie ausgewählten AML-Fällen Anwendung (Wouters, Delwel 2016).

1.6. *Isocitratdehydrogenase*

1.6.1. Funktion von IDH

Die Familie der Isocitratdehydrogenasen besteht aus IDH1, IDH2 und IDH3. Das *IDH1*-Gen liegt auf der chromosomalen Bande 2q33.3 (Narahara, Kimura et al. 1985), das *IDH2*-Gen auf 15q26.1 und das *IDH3*-Gen auf 15q25.1 (Oh, Inazawa et al. 1996). Die durch die *IDH*-Gene kodierten Enzyme sind Teil des Citratzyklus und für die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α-Ketoglutarat (αKG) verantwortlich (Haselbeck, McAlister-Henn 1993). Zum Ablauf der Decarboxylasereaktion sind neben Mg^{2+} oder Mn^{2+} (Magnesium-, Mangan Ionen) auch $NADP^{+}$ (Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat), welches dabei zu NADPH reduziert wird, als Ko-Faktoren nötig. Die *IDH*-Enzyme liegen als asymmetrische Homodimere vor und bestehen aus einer großen, einer kleinen sowie einer „Schließ“-Domäne (engl. clasp domain). Der aktive Bereich setzt sich jeweils aus der kleinen und großen Domäne der einen Untereinheit sowie der kleinen Domäne der anderen Untereinheit zusammen und ist für Bindung von Ko-Faktoren und Substrat verantwortlich. Nach Bindung von Ko-Faktoren und Substrat erfolgt eine Konformationsänderung von der offenen in die geschlossene Form, in welcher der Komplex katalytisch aktiv ist (Xu, Zhao et al. 2004). IDH1 und IDH2 unterscheiden sich wesentlich in ihrer subzellulären Lokalisation (Yen, Bittinger et al. 2010). Während IDH1 vornehmlich in Zytosol und Peroxisomen vorkommt, befindet sich IDH2 in den Mitochondrien. Die sich in den Peroxisomen befindende Isoform ist, neben der Aufrechterhaltung der NADPH-Level, auch am Metabolismus verzweigter Fettsäuren maßgeblich beteiligt (Henke, Girzalsky et al. 1998). Eine Schutzfunktion von IDH1 und IDH2 vor oxidativem Stress wird diskutiert (Jo, Son et al. 2001). Die genaue Bedeutung von IDH1 und 2 im Kontext des zellulären Metabolismus bleibt im Rahmen von weiteren Studien noch zu definieren (Yen, Bittinger et al. 2010).

Die Häufung von Mutationen in *IDH*-Genen wurde erstmals bei Patienten mit kolorektalem Karzinom beobachtet (Sjoblom, Jones et al. 2006). Im weiteren Verlauf konnten in 70% der Fälle somatische IDH^{mut} in Grad 2 und 3 Astrozytomen, Glioblastomen und Oligodendrogliomen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu IDH^{wt} zeigten diese ein deutlich verbessertes Therapieansprechen. Es handelt sich dabei fast ausschließlich um $IDH1^{mut}$ des Kodons 132 und $IDH2^{mut}$ des Kodons 172 (Parsons, Jones et al. 2008, Yan, Parsons et al. 2009).

Die in vorangegangenen Studien beschriebenen Mutationen der *IDH*-Gene in Karzinomzellen traten meist heterozygot auf. Es wurden im Exon 4 wiederkehrende Alterationen am Kodon R132 in *IDH1* und äquivalent dazu am Kodon R172 in *IDH2* gefunden (Paschka, Schlenk et al. 2010, Abbas, Lugthart et al. 2010). R132, R100 und R109 sind Bestandteile der katalytischen Domäne von *IDH1*. R100 in *IDH1* entspricht dabei dem R140 in *IDH2* (Nekrutenko, Hillis et al. 1998). Sie sind maßgeblich an der Bindung von Isocitrat an den Enzymkomplex beteiligt. Daher wurde der Einfluss von Mutationen an diesen Stellen auf die enzymatische Aktivität diskutiert (Yan, Parsons et al. 2009). Weitere Studien konnten bestätigen, dass die Konversion von Isocitrat zu αKG durch IDH^{mut} maßgeblich beeinträchtigt wird (Yan, Parsons et al. 2009, Dang, White et al. 2009). Die durch Mutationen veränderten Enzyme scheinen jedoch nicht katalytisch inaktiv zu sein, sondern vielmehr eine neue, modifizierte enzymatische Aktivität zu entwickeln. Dabei zeigt sich im Vergleich zu IDH^{wt} die Affinität von IDH^{mut} zu Isocitrat verringert, jedoch gleichzeitig zu αKG und NADPH erhöht (Dang, White et al. 2009). Weiterhin konnten erhöhte Level von 2-Hydroxyglutarat (2HG) in IDH^{mut} Tumorzellen nachgewiesen werden. Das mutierte IDH-Enzym reduziert dabei unter Oxidation von NADPH αKG zu 2HG und stellt damit eine *gain-of-function* Mutation dar (Dang, White et al. 2009). Es konnte bereits gezeigt werden, dass 2HG inhibierend auf αKG-abhängige Dioxygenasen, wie beispielsweise Histon-Demethylasen oder Hydroxylasen der *TET*-Familie, wirkt und dadurch direkt Einfluss auf DNA-Methylierungsmuster nehmen kann (Xu, Yang et al. 2011). Insgesamt scheinen diese Prozesse unter anderem auf Proliferation, epigenetischen Status und Zellüberleben in Tumorzellen Einfluss zu nehmen (Yen, Bittinger et al. 2010). Wie genau IDH^{mut} und erhöhte 2HG-Level dabei die Leukämogenese begünstigen, ist jedoch weiterhin unklar (Paschka, Schlenk et al. 2010).

1.6.2. *IDH*-Mutationen in der AML

Mutationen im *IDH1*-Gen finde sich in ca. 7% der AML-Patienten (Abbas, Lugthart et al. 2010). Der Anteil der *IDH1*^{mut} ist dabei bei Patienten, die einen normalen Karyotyp aufweisen, besonders hoch. Unter den CN-AML-Patienten beträgt die Rate an *IDH1*^{mut} 11% (Green, Evans et al. 2010), 23% (Paschka, Schlenk et al. 2010), 25% (Abbas, Lugthart et al. 2010), bzw. 33% (Marcucci, Maharry et al. 2010). Neben *IDH1*^{mut} konnten aber auch *IDH2*^{mut} nachgewiesen werden. Die Rate an *IDH2*^{mut} liegt bei ca. 10% der Gesamtpopulation (Paschka, Schlenk et al. 2010, Abbas, Lugthart et al. 2010).

Nahezu alle, der sich im *IDH1*-Gen befindenden genetischen Alterationen betrafen dabei Kodon 132 (Paschka, Schlenk et al. 2010, Mardis, Ding et al. 2009, Green, Evans et al. 2010, Abbas, Lugthart et al. 2010). Am häufigsten handelte es sich bei den *IDH1* ^{mut} um die missense Mutationen p.R132H und p.R132C (Green, Evans et al. 2010, Abbas, Lugthart et al. 2010, Paschka, Schlenk et al. 2010). Weitere, rekurrent beobachtete Varianten waren p.R132G (G, Glycin), p.R132S (S, Serin) und p.R132L (L, Leucin) (Green, Evans et al. 2010, Abbas, Lugthart et al. 2010). Bezüglich des *IDH2*-Gens konnten missense Mutationen vorwiegend auf zwei verschiedenen Kodons gefunden werden. Es handelte sich dabei um p.R140G und p.R172L (Paschka, Schlenk et al. 2010, Marcucci, Maharry et al. 2010, Abbas, Lugthart et al. 2010). Patienten höheren Alters konnten mit *IDH2* ^{mut} in Verbindung gebracht werden (Paschka, Schlenk et al. 2010, Marcucci, Maharry et al. 2010). *IDH*^{mut} waren mit geringeren Leukozytenzahlen assoziiert (Paschka, Schlenk et al. 2010). Das gleichzeitige Vorliegen von Mutationen im *IDH1*- und *IDH2*-Gen konnte nur in Einzelfällen beobachtet werden (Abbas, Lugthart et al. 2010). *IDH*^{mut} treten häufig gemeinsam mit *NPM1*^{mut} auf (Paschka, Schlenk et al. 2010, Abbas, Lugthart et al. 2010, Schnittger, Haferlach et al. 2010, Green, Evans et al. 2010). Dagegen finden sich Ko-Mutationen mit *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD oder *CEBPA* eher selten bei Patienten mit *IDH*^{mut}. Vor allem in der Subgruppe *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wt} zeigte sich *IDH1* und *IDH2* in einem Großteil der Fälle mutiert (Paschka, Schlenk et al. 2010, Green, Evans et al. 2010).

IDH^{mut} scheinen beim Betrachten der Gesamtkohorte keinen bedeutenden Einfluss auf das RFS oder das OS zu nehmen (Paschka, Schlenk et al. 2010, Green, Evans et al. 2010, Mardis, Ding et al. 2009, Abbas, Lugthart et al. 2010). Allerdings konnte

ihre Bedeutung in Subgruppenanalysen genauer definiert werden. So präsentierte sich *IDH1*^{mut} als eigenständiger Faktor für die *FLT3* Kohorten. *IDH1*^{mut} Patienten ohne *FLT3*-ITD hatte dabei eine schlechtere Prognose in Bezug auf die CIR (kumulative Rückfallrate) und das OS wohingegen Patienten mit *FLT3*-ITD diesbezüglichen einen günstigeren Krankheitsverlauf aufwiesen (Green, Evans et al. 2010).

Bei Patienten mit R172-*IDH2*^{mut} liegen meist keine weiteren, prognostisch relevanten Mutationen vor (Marcucci, Maharry et al. 2010, Papaemmanuil, Gerstung et al. 2016). Daher werden R172-*IDH2*^{mut} als eine neue Subgruppe der CN-AML diskutiert, welche mit einer geringeren CR-Rate einhergeht (Marcucci, Maharry et al. 2010) und im Vergleich zu anderen *IDH*^{mut} zu größeren Abweichungen der metabolischen Aktivität führt (Papaemmanuil, Gerstung et al. 2016).

Betrachtet man die Gesamtkohorte so scheinen R140-*IDH2*^{mut} im Vergleich zum *IDH*^{wt} einen positiven Einfluss auf das OS und das RFS zu haben. Diese Assoziation ist besonders ausgeprägt in der Subgruppe der *NPM1*^{mut}*/FLT3*^{wt} (Green, Evans et al. 2011). Die prognostische Relevanz konnte jedoch nicht in allen Studien gezeigt werden (Marcucci, Maharry et al. 2010).

Der Einfluss von *IDH1*^{mut} bei CN-AML-Patienten mit *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wt} scheint mit einer schlechteren Prognose in Bezug auf das RFS sowie das OS einherzugehen (Paschka, Schlenk et al. 2010, Green, Evans et al. 2010). In manchen Studien zeigten sich ähnliche Ergebnissen lediglich bei junge Patienten (<60 Jahre) (Marcucci, Maharry et al. 2010). Wieder andere Studien zeigten gegenteilige Ergebnisse und konnten damit die oben genannten Verbindungen nicht bestätigen. Dagegen wurde bei Patienten mit *NPM1*^{wt}*/FLT3*^{wt} bei gleichzeitigem Vorliegen einer *IDH1*^{mut} eine schlechtere Prognose bezüglich des OS und des EFS beobachtet (Abbas, Lugthart et al. 2010). Des Weiteren konnten im Rahmen anderer Untersuchungen lediglich Patienten mit R132-*IDH1*^{mut}*/NPM1*^{wt} eine ungünstige Prognose zugeordnet werden (Mardis, Ding et al. 2009, Schnittger, Haferlach et al. 2010).

Zielgerichtete Therapien von Patienten mit *IDH*^{mut} werden derzeit in verschiedenen Studien getestet. Es handelt sich dabei um selektive Inhibitoren von mutierten IDH-Proteinen (Wang, Travins et al. 2013, Stein, Altman et al. 2014, DiNardo, de Botton

et al. 2015, Stein DiNardo et al. 2015). Als IDH2-Inhibitor ist seit August 2017 Idhifa (Enasidenib) für erwachsene AML-Patienten mit *IDH2*^{mut} im Rezidiv oder mit refraktärem Krankheitsverlauf zugelassen (Kim 2017). Auch die Bedeutung von BCL-2-Inhibitoren in der Therapie *IDH*^{mut} AML-Patienten wird diskutiert (Chan, Thomas et al. 2015). Zusätzlich bieten R132-*IDH1*^{mut}, durch Ausbildung von tumorspezifischen Neoantigenen, ein mögliches Ziel für die Entwicklung neuer Impfstrategien. Es soll dadurch eine mutationsabhängige T-Zell-Antwort induziert werden (Schumacher, Bunse et al. 2014).

1.7. Ziel der Studie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 241 erwachsene AML-Patienten untersucht, die im Rahmen der Therapiestudie AMLSG 12-09 behandelt wurden. Ziel war es, die Inzidenz von *DNMT3A*^{mut}, *IDH1*^{mut} *IDH2* ^{mut} zu bestimmen. Neben der quantitativen Auswertung der erhobenen Daten sollten diese sowohl im Kontext der klinischen Charakteristika als auch zytogenetischer und molekulargenetischer Veränderungen evaluiert werden. Darüber hinaus standen die klinischen Daten der Patienten zur Verfügung, so dass diese Mutationen auch im Hinblick auf das Erreichen einer Remission nach Doppelinduktionstherapie als auch auf die klinischen Endpunkte RFS, EFS und OS untersucht wurden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräteverzeichnis

Liste der verwendeten Gerätschaften

Gerät	Hersteller
0,2 ml MicroAmp Reaction Tube	Applied Biosystems, Foster City, USA
96 Well Platte	Applied Biosystems, Foster City, USA
Accu-jet	BRAND GmbH&Co KG, Wertheim
Auffangtubes, Microtubes 2,0 ml capeless	AXYGEN Inc., VWR Darmstadt
Biosphere® Filter Tips 10 µl	Saestedt, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 20 µl	Saestedt, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 100 µl	Saestedt, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 200 µl	Saestedt, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 1250 µl extra long	Saestedt, Nümbrecht
Blockthermostat	Liebisch, Bielefeld
Falcon BlueMax^{TM} 50 ml	Becton Dickinson S.A., Madrid Spain
Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems, Foster City, USA
GeneGenius Bio Imaging System	Syngene, Frederick, USA
Gelkammer	OWL Seperation Systems
HandyStep	BRAND GmbH&Co KG, Wertheim

Magnetrührer IKAMAG® REO	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipette Transferpipette	BRAND GmbH&Co KG, Wertheim
MicroAmp 8-Cap Strip	Applied Biosystems, Foster City, USA
Micro 8-Tubes Strip (0,2 ml)	Applied Biosystems, Foster City, USA
MicroAmp Optical 96-Well Platte	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mikrotitterplatte 96-Well	VWR, Darmstadt
Mikrowelle	Mouline, München
NanoDrop 1000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA
Pipette 0,1-2,5 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 2,0-20 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Präzisions Dispenser-Tips 0,5 ml	BRAND GmbH&Co KG, Wert
Präzisionswaage	Mettler Toledo, Gießen
Reaktionsgefäß 1,5 ml SafeSeal	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäß 2,0 ml SafeSeal	Sarstedt, Nürnberg
DNA Sequencer 3500 xL Dx Genetic Analyser	Applied Biosystems, Foster City, USA

Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Stabpipette Costar® STRIPETTE 50 ml	Sigma-Aldrick Chemie CmbH, Steinheim
Stromquelle Electrophoresis Powersupply EPS1001	Amersham Pharamacia Biotech, Freiburg
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe LABOPORT®	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Veriti® Thermal Cycler	Applied Biosystems, Foster City, USA
Vortex Genie 2™	Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System 3500HT	Transgenomic, USA
XS800i Zellzählgerät	Sysme Europe GmbH
Zentrifuge BIOFUGE fresco	Heraeus, Newport Pagnell, UK

2.1.2. Reagenzienverzeichnis

Liste der verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Natrium-Heparin	Braun, Melsungen
Ficoll Separating Solution	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 Waschmedium	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
PBS (10x)	Gibco-BRL, New York, USA
ALLPrep DNA/RNA Mini Kits	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Blue JuiceTM Loading Puffer 10x	InvitrogenTM, Karlsruhe, Deutschland
HPLC-Wasser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Aqua ad iniectabilia Braun 10 ml	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Desoxynucleosidtriphosphat Set	Roche Diagnostics, Mannheim
OCI Zellreiche	
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase mit Puffer II und MgCl2	Applied Biosystems, Foster City
Optimase Polymerase PLUS Pack	Transgenomic Bioconsumables, USA
Primer	Thermo Fischer Scientific, Ulm
TAE Puffer	Eigene Herstellung
Agarose	Roth, Karlsruhe

Ethanol 100%	RdH, Seelze
Orange Juice	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNA-Ladder 100 bp	InvitrogenTM, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Puffer A Wave optimized™	Transgenomic Bioconsumables, USA
Puffer B Wave optimized™	Transgenomic Bioconsumables, USA
Solution D Wave optimized™	Transgenomic Bioconsumables, USA
Syringe Wash Solution Wave optimized™	Transgenomic Bioconsumables, USA
WAVE® High Range Mutation Control Standard 180 µl	Transgenomic Bioconsumables, USA
WAVE® Low Range Mutation Control Standard 180 µl	Transgenomic Bioconsumables, USA
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick 96 PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Formamid, deionisiert	Amresco, Solon, USA
TBE10x Extended Range Puffer	Biorad, München, Deutschland
Big Dye Terminator v.1.1, v.3.1 5x Sequenzier Puffer (10µmol/l)	Applied Biosystems, Darmstadt
BigDye Terminator v.1.1, v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
DyeEx™ 96 Kit	Qiagen, Hilden
DyeEx™ 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
Genetic Analyzer Puffer (10x) mit EDTA	Applied Biosystems, Darmstadt

HPLC-Wasser: LiChrosolv-Wasser	Merck, Darmstadt
Kapillare: 310 bzw. 3130 XL Genetic Analyzer 47 cm x 10 µm Capillaries	Applied Biosystems, Darmstadt
POP-6: Performance Optimized Polymer 6%	Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.3. Patientenkollektiv

Für das Screening der Genmutationen von *DNMT3A*, *IDH1* und *IDH2* wurden im Rahmen der AMLSG 12-09 Studie (NCT01180322) in dieser Arbeit insgesamt 241 Patientenproben analysiert. Das Studienprotokoll von 2010 sah vor insgesamt 336 Patienten einzuschließen. Im Dezember 2012 waren 277 Patienten rekrutiert. Auswertbare Daten lagen insgesamt von 268 Patienten vor. Davon befanden sich in Arm A n=100, Arm B n=35, Arm C n=34 und in Arm D n=99 Patienten.

Die AMLSG 12-09 Studie war als randomisierte, vierarmige, offene, multizentrische Phase II Studie geplant. Die Patientenrekrutierung begann im Juni 2010 und endete 2012. Die Gesamtdauer der Studie inklusive der Nachbeobachtung betrug 6,5 Jahre und somit war das Studienende (last patient out) für Dezember 2016 vorgesehen.

Primäres Ziel der AMLSG 12-09 Studie war die Bewertung der Wirksamkeit der intensiven Induktionstherapie mit paralleler oder sequentieller Gabe von Azacitidin bei Erwachsenen mit AML zu untersuchen. Die Ziele dieser Arbeit waren sowohl die quantitative Auswertung von Mutationen als auch deren Korrelation mit klinischen Charakteristika, zytogenetischer und molekulargenetischer Veränderungen.

Zielgruppe der Untersuchungen waren AML-Patienten, die nicht im Rahmen genotyp-spezifischer Therapiekonzepte behandelt wurden, da keine zielgerichteten Therapien zur Verfügung stehen. Sie bilden ungefähr 1/3 des AML-Kollektivs. Zu dieser Gruppe gehört die AML mit Myelodysplasie-assoziierte Veränderungen durch MDS (myelodysplastisches Syndrom) und/oder multilineäre Dysplasien, die therapie-induzierte AML, AML mit rekurrenten genetischen Veränderungen (inv(3)/t(3;3), t(9;11), t(v;11q23), *CEBPA*^{dm}) und die nicht anderweitig klassifizierte AML ohne aktivierende *FLT3*^{mut}. Das Erfüllen dieser Kriterien wurde zytochemisch, morphologisch sowie durch immunologische Phänotypisierung bestätigt.

In die AMLSG 12-09 Studie wurden Patienten im Alter >18 Jahren eingeschlossen. Eine obere Altersgrenze wurde nicht festgelegt. Wesentliches Ausschlusskriterium waren folgende genetische Veränderungen:

t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1,* AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11,* AML mit t(15;17)(q22;q12); *PICALM-PML-RARA* (oder variante Translokationen mit anderen *RARA*-Genfusionen) oder mit

Mutationen des *NPM1*- bzw. *FLT3*-Gens (Klassifikation nach WHO Klassifikation 2016).

In den Zwischenergebnissen zeigten sich in den Armen B und C im Vergleich zu den beiden anderen Studienarmen eine deutlich geringere CR-Rate (A: 14/26 CR, B: 11/26 CR, C:10/26, D: 14/26 CR). Daraufhin wurden die Studienarme B und C zum 16.09.2011 geschlossen und die Studie als 2-armige Phase III Studie fortgesetzt.

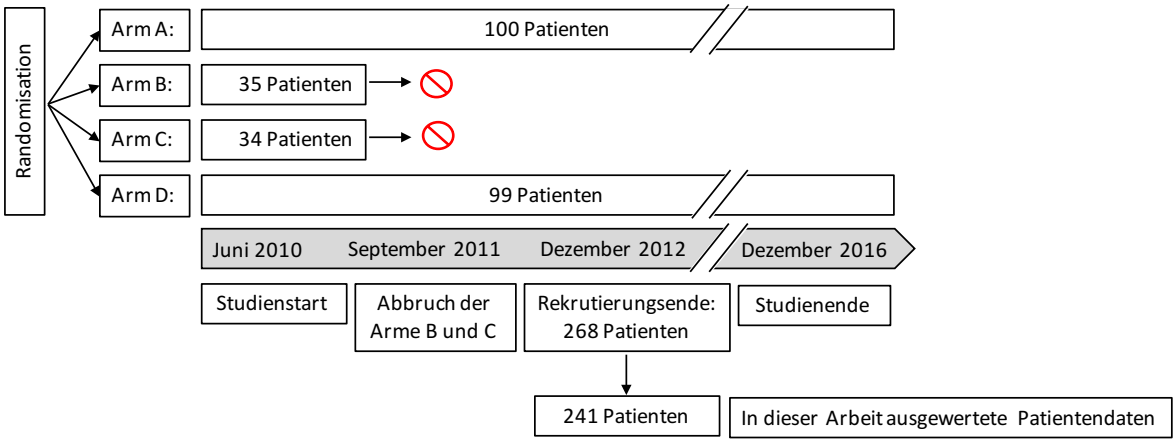

Abbildung 3. Schematische Übersicht der Patientenzahlen der AMLSG 12-09 Studie
Abkürzungen: AMLSG, AML Study Group.

2.1.4. Therapieschema der AMLSG 12-09 Studie

Um die Wirksamkeit der Erweiterung der Induktionstherapie mit Azacitidin bei der AML bei Erwachsenen zu untersuchen wurden die Patienten der Studie (AMLSG 12-09) auf 4 Studien-Arme (A, B, C, D) randomisiert aufgeteilt.

Der erste Induktionszyklus erfolgte in Arm A (Kontrollarm) durch die kontinuierliche Verabreichung von Cytarabin, eine Stoßtherapie von Idarubicin an Tag 1, 3 und 5 (bei Patienten >65 Jahre nur an Tag 1 und 3) und Etoposid an Tag 1, 2, 3 (bei Patienten >65 Jahre nur an Tag 1 und 3).

Arm B erhielt Azacitidin an Tag 1-5, Idarubicin an den Tagen 6, 8 und 10 (bei Patienten >65 Jahre nur an Tag 6 und 8) und Etoposid an Tag 6, 7 und 8 (bei Patienten >65 Jahre nur an Tag 6 und 8).

Die Induktionstherapie des C-Arms beinhaltete Azacitidin an Tag 1-5, Idarubicin an den Tagen 1, 3 und 5 (bei Patienten >65 Jahre nur an Tag 1 und 3) und Etoposid an Tag 1, 2 und 3 (bei Patienten >65 Jahre nur an Tag 1 und 3).

Bei Patienten des D-Arms erfolgte die Therapie mit Azacitidin an Tag 4-8, Idarubicin an den Tagen 1, 3 und 5 (bei Patienten >65 Jahre nur an Tag 1 und 3) und Etoposid an Tag 1, 2 und 3 (bei Patienten > 65Jahre nur an Tag 1 und 3).

Falls nach der ersten Induktionstherapie eine CR, eine CR mit inkompletter Regeneration der Hämatopoese (CRi) oder partielle Remission (PR) erreicht wurden, erfolgte der Beginn der zweiten Induktion (entsprechend des jeweiligen Studienarms) zwischen Tag 22 und 29 des 1. Induktionszyklus; die Idarubicin-Dosis wurde reduziert.

Erste Priorität der Konsolidierungstherapie war die allogene HCT mit HLA-identem Familien- oder Fremdspender. War diese Therapie nicht möglich, erfolgte eine Hochdosistherapie mit Cytarabin an Tag 1, 2 und 3. Begleitend dazu wurden Lenograstim zur hämatopoetischen Regeneration sowie topische Corticosteroide eingesetzt.

Arm B-D erhielten zur Erhaltungstherapie Azacitidin alle 4 Wochen über 2 Jahre. Patienten in Arm A, die die Standardtherapie erhielten, wurden unter Beobachtung gesetzt und bekamen keine weiteren Chemotherapeutika.

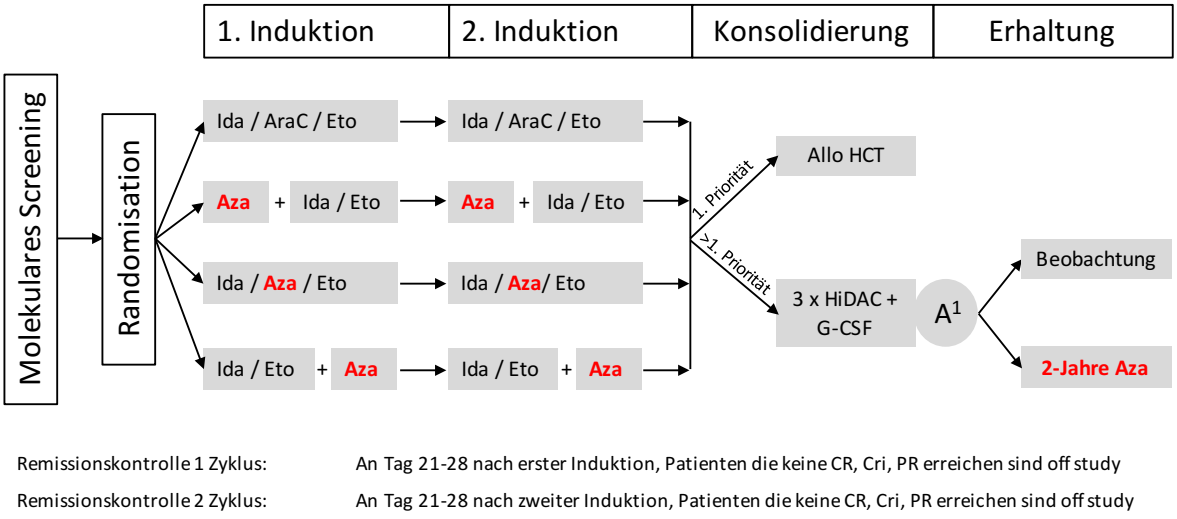

Abbildung 4. Schematische Darstellung des Behandlungsplans der AMLSG 12-09 Studie (nach dem Studienprotokoll der AMLSG 12-09 Studie)

Abkürzungen: A[1], Allokation je nach initialer Randomisation; AraC, Cytarabin; Allo, allogen; Aza, Azacitidin; CR, komplette Remission; Cri, inkomplette Regeneration; Eto, Etoposid; G-CSF, Granulozyten-Kolonie-stimmulierende Faktoren; HCT, Hematopoietic stem cell transplantation HiDAC, Hochdosistherapie mit Cytarabin; Ida, Idarubicin; PR, partielle Remission.

2.1.5. Materialgewinnung

Als Ausgangsmaterial der Mutationsanalyse dienten sowohl PB als auch KM. PB wurde mittels Venenpunktion und KM durch Punktion des Beckenkammes oder des Sternums gewonnen. Anschließend wurde das entnommene Material mit Heparin (Natrium-Heparin) im Verhältnis 1:10 versetzt. Zur Separation der mononukleären Zellen wurde eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Das verwendete Ficoll-Medium (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) weist eine größere Dichte als Monozyten und Lymphozyten, aber eine geringere Dichte als Granulozyten und Erythrozyten auf. Zunächst wurden 50 ml des Probenmaterials vorsichtig im Verhältnis 1:1 mit dem Ficoll-Medium (Biochrom KG, Berlin) geschichtet. Es war darauf zu achten, dass sich die Schichten nicht vermischten. KM wurde zuvor im Verhältnis 1:1 mit RPMI-Medium verdünnt. Das Zwei-Phasen-Gemisch wurde nun über 30 Minuten bei 2800 U/min, ohne Bremse, zentrifugiert. Zwischen Plasma und Ficoll befindet sich die Interphase. Diese enthält mononukleäre Zellen, welche nun vorsichtig steril abpipettiert werden konnten. Die Zellsuspension wurde daraufhin in zwei Waschschritten von Ficoll-Resten und Verunreinigungen befreit. Dazu wurde die Suspension mit PBS (phosphate buffered saline) auf 45 ml aufgefüllt, für 7 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend abgekippt. Das Pellet wurde daraufhin mit einem äquivalenten Volumen an RPMI-Medium (Biochrom KG, Berlin) resuspendiert. Abschließend konnte die Zellzahl (Zellzählgerät Sysmex XS800i) bestimmt und das Pellet bei -80°C archiviert werden.

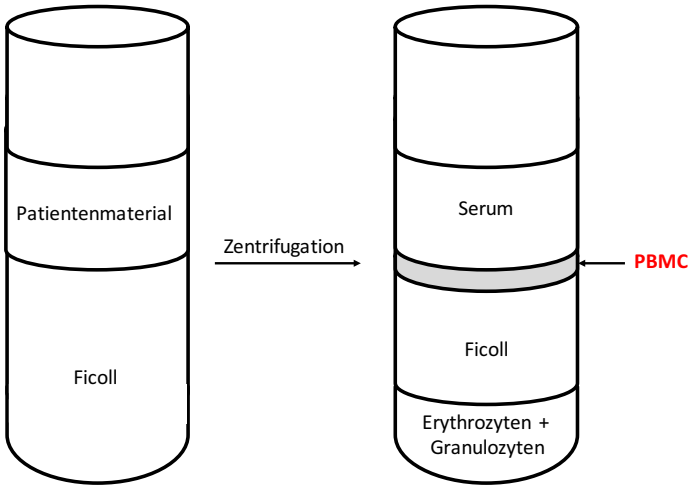

Abbildung 5. Schematische Darstellung des Prinzips der Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

Abkürzungen: PBMC, mononukleäre Zellen (engl. Peripheral blood mononuclear cells, PBMC).

2.2. Methoden

2.2.1. Methodenübersicht

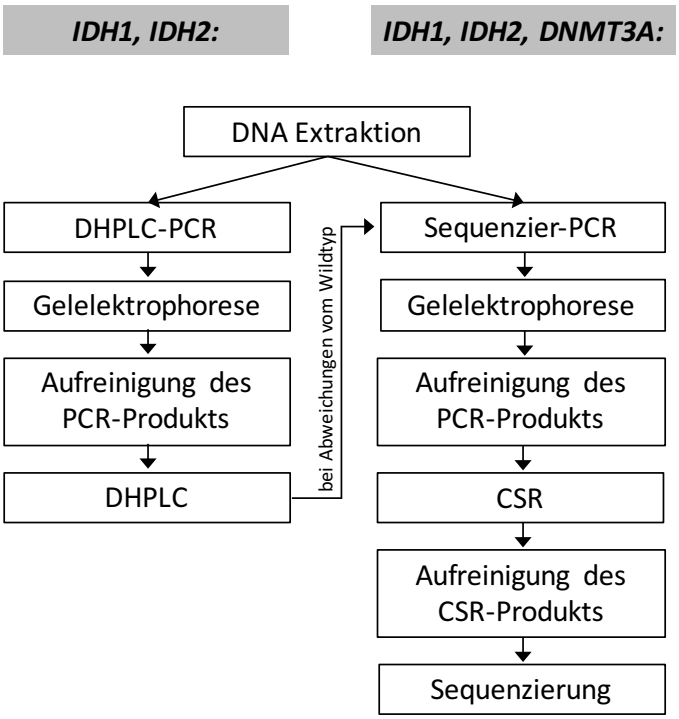

Abbildung 6. Methodenübersicht
Unterschiedliche Arbeitsabläufe für *DNMT3A* und *IDH1/2*. Für *IDH1* und *IDH2* erfolgte zunächst ein Screening mittels DHPLC. Die nähere Beschreibung der einzelnen Methoden folgt in den Kapiteln 2.2.2. – 2.2.9.

Abkürzungen: CSR, Cycle Sequencing Reaction; DHPLC, Denaturating high-performance liquid chromatography; DNMT3A, DNA, Desoxyribonukleinsäure; DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; IDH, Isocitratdehydrogenase; PCR, Polymerasekettenreaktion.

2.2.2. DNA Extraktion

Zur Analyse von *DNMT3A*, *IDH1* und *IDH2* sollte zunächst die DNA aus den mononukleären Zellen extrahiert werden. Dies erfolgte mit Hilfe des ALLPrep DNA/RNA Mini Kits (Qiagen, Hilden).

Tabelle 5. ALLPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)
Reagenzien
AllPrep DNA Mini Spin Columns
Collection Tubes (1,5 ml)
Collection Tubes (2 ml)
Puffer RLT Plus
Puffer AW1 (konzentriert)
Puffer AW2 (konzentriert)
Puffer EB

Im ersten Schritt erfolgte die Resuspendierung. Das Pellet wurde mit RTLplus-Puffer (350 µl bei < 0,5x10^7 Zellen/Tube; 600 µl bei ≥ 0,5x10^7- 1x10^7 Zellen/Tube) versetzt und unter vorsichtigem Auf- und Abpipettieren gelöst. Das homogenisierte Lysat wurde auf einen QIAshredder (Qiagen, Hilden) gegeben und bei 13000 U/min 3 Minuten lang zentrifugiert. Um RNA (Ribonukleinsäure) und DNA voneinander zu separieren, konnte nun das Eluat in die AllPrep DNA spin Säulen überführt und erneut bei 13000 U/min 3 Minuten lang zentrifugiert werden. Im Durchfluss befand sich die RNA während die DNA an der AllPrep DNA spin Membran haften blieb.

Es folgten zwei Waschschritte. Zunächst wurden 500 µl AW1-Puffer auf die Säule gegeben und bei 13000 U/min für 1 Minute zentrifugiert. Der Vorgang wurde mit 500 µl AW2-Puffer bei 13000 U/min für 2 Minute wiederholt. Der Durchfluss konnte verworfen werden und das Eluat erneut bei 13000 U/min für 1 Minute trocken zentrifugiert werden. Es wurde TE-Puffer (100 µl bei 1x10^7 Zellen/Tube; 90 µl bei 0,9x10^7 Zellen/Tube; 50 µl bei ≤0,5x10^7 Zellen/Tube) auf die Säule gegeben, um die DNA zu eluieren. Nach 3-minütiger Inkubationszeit wurde erneut bei 13000 U/min für 1 Minute zentrifugiert, die Säule verworfen und das DNA-Volumen in ein Safe-Tube Gefäß überführt.

Die Qualität der DNA wurde durch Auftragen von 2 µl DNA gemischt mit 2 µl BlueJuice-Ladepuffer (Invitrogen, Groningrn, Niederlande) und 8 µl RNase-freies Wasser (Qiagen, Hilden) auf einem 1% Agarose-Gel mit 1Kb-DNA-Leiter überprüft. Die Messung der DNA-Konzentration konnte mit einem NanoDrop-Spektrophotometer (λ=260 nm) ermittelt werden. Die Archivierung der extrahierten DNA erfolgte bei -20°C.

2.2.3. Polymerase chain reaction und Primer

Zur Analyse der einzelnen Exons von *DNMT3A*, *IDH1* und *IDH2* mussten die zu sequenzierenden DNA-Abschnitte zunächst in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt werden. Der zu amplifizierenden DNA wurden als MasterMix Primer, Polymerase, Desoxyribonukleosid-triphosphate (dNTPs), Magnesiumchlorid, Pufferlösung und Wasser hinzugefügt und anschließend stufenweise erhitzt. Hierbei erfolgte für jedes Exon eine gesonderte Amplifikations-Reaktion mit entsprechenden Primerpaaren und Temperaturprofilen (Tabellen 6-14).

Zunächst wurden die DNA-Doppelstränge denaturiert. Dies erlaubte die Anlagerung (engl. annealing) des speziell auf das jeweilige Exon zugeschnittenen Primerpaares an die DNA. Die Primer wurden so gewählt, dass der Intron-Exon-Übergang miterfasst wurde und somit etwaige Mutationen im Bereich des Exonanfangs mit erkannt werden konnten. Entsprechend der beiden nun vorhandenen Einzelstränge wurden pro Exon jeweils ein Primer mit der Leserichtung vorwärts (engl. forward) und rückwärts (engl. reverse) benötigt. Eine Polymerase erlaubte daraufhin die Elongation des komplementären DNA-Strangs mittels dNTPs. Dieser Vorgang erfolgt repetitiv und ermöglich eine exponentielle Vervielfältigung der DNA.

Zur Kontrolle der PCR erfolgte zu jedem erstellten MasterMix eine no template control (NTC). Hierdurch konnten in der Gelkontrolle Verunreinigungen des MasterMixes durch Fremd-DNA ausgeschlossen werden. Das Mitamplifizieren eines Wildtyps diente als Kontrolle, ob das zu untersuchenden Gen erfolgreich vervielfältigt wurde. Für diese Positivkontrolle wurden die humanen AML-Zelllinien OCI-AML3 für *IDH1* bzw. *IDH2* und HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells) für *DNMT3A* verwendet.

Da für *IDH1* und *IDH2* zunächst ein Screening auf Mutationen mittels denaturating high-performance liquid chromatography (DHPLC) stattfinden sollte, waren bei diesen beiden Genen zwei PCRs notwendig (Abb. 6). Zunächst erfolgte eine DHPLC-PCR mit Optimase™ (Transgenomic Bioconsumables, USA), welche als proof-reading Polymerase mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität das Ergebnis der DHPLC durch die geringe Anzahl an Fehleinbauten verbesserte. Es folgte eine Sequenzier-PCR der sich in der DHPLC auffällig gezeigten Patienten-Proben. Zur Analyse der *DNMT3A* erfolgte einde sofortige Sequenzier-PCR. Bei den PCRs zur Sequenzierung von *DNMT3A*, *IDH1* und *IDH2* konnte auf die DNA-Polymerase AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems, Foster City, USA) zurückgegriffen werden.

Primer

Tabelle 6. Primersequenzen der Primerpaare, die zur Amplifizierung und Sequenzierung von *DNMT3A*, *IDH1* und *IDH2* benutzt wurden

Abkürzungen: A, Adenin; C, Cytosin; DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; G, Guanin; IDH, Isocitratdehydrogenase; T, Thymin.

IDH1	**Vorwärts Primer**	**Rückwärts Primer**
Exon 4	CCATTTGTCTGAAAAACTTTGCT	TCACATTATTGCCAACATGACTT
IDH2	**Vorwärts Primer**	**Rückwärts Primer**
Exon4	GCTGCAGTGGGACCACTATT	TGTGGCCTTGTACTGCAGAG
DNMT3A	**Vorwärts Primer**	**Rückwärts Primer**
Exon 11/12	ACCCCACTGTAAGGAGGGTGGG	TACTCTGCCCCATGCCACACTA
Exon 13	GGAGAGGCCCTTCGGTGGTACT	TACATGCCCAGAAGCGGTGGAC
Exon 14	GGTGTGGAGCCTCCCTTCGTC	GAGGCCAAGGTGTGCTACCTGGA
Exon 15/16	TCCAGGTAGCACACCTTGGCCT	TTTTGCCAGAGTTGCCCACACA
Exon 17	TAGGACTTGGGCCTACAGCTGAC	ATGAAAGGAGGCAAGGGCTGCCT
Exon 18	TGCAGCTAGGGTCGTGAGCCTG	CGGGAATAGCTGTCCCAGGGCAG
Exon 19	CCCGATGACCCTGTCTTCCCGT	TTCCCAAACAGGCCCCTTGCA
Exon 20	CAGCATGCCGGCGCTGTTTCAT	CCACTATGGGTCATCCCACCTGCA
Exon 21	GTGAACTAGTGGCTGCTGGGGGAG	CGCTCCACCTCATCCTGCCCTTCC
Exon 22	GCATGACCAGTGTTGGCTGGTGA	TGGGAAAGGCAGAGGACCCCCG
Exon 23	CCGGGTCCTGCTGTGTGGTTA	CCGGGTCCTGCTGTGTGGTTA

Die verwendeten Primer (Thermo Fischer Scientific, Ulm) mussten zunächst aus dem Primer-Stock [100 pmol/µl] mit Aqua destillata im Verhältnis 1:9 auf eine Konzentration von 10 pmol/µl verdünnt werden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Insgesamt ergab sich bei 2 µl DNA pro Patient und 48 µl MasterMix ein gesamt PCR-Produkt von 50 µl. Durch Pipettieren auf Eis wurde die Kühlkette bis zur Amplifikation beibehalten.

Tabelle 7. MasterMix DHPLC-PCR *IDH1*, *IDH2*

Abkürzungen: DHPLC, Denaturating high-performance liquid chromatography; F, vorwärts; IDH, Isocitratdehydrogenase; Mg^{2+}, Magnesium Ionen; $MgSO_4$, Magnesiumsulfat; PCR, Polymerasekettenreaktion; R, rückwärts.

Reagenzien	Volumen [µl]
Aqua destillata	34,5
10x PCR Puffer (ohne Mg^{2+})	5
$MgSO_4$	3,6
dNTP (Mix 2,5 mM)	0,4
F-Primer (10 pmol/µl)	2
R-Primer (10 pmol/µl)	2
Optimase Polymerase	0,5

Tabelle 8. MasterMix Sequenzier-PCR *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*

Abkürzungen: DNMT3A, DNA, Desoxyribonukleinsäure; DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; F, vorwärts; IDH, Isocitratdehydrogenase; Mg^{2+}, Magnesium Ionen; $MgCl_2$, Magnesiumchlorid; PCR, Polymerasekettenreaktion; R, rückwärts.

Reagenzien	Volumen [µl]
Aqua	34,7
10x PCR Puffer (ohne Mg^{2+})	5
$MgCl_2$ (25mM)	3,6
dNTP (Mix 2,5 mM)	0,4
F-Primer (10 pmol/µl)	2
R-Primer (10 pmol/µl)	2
Ampli Taq	0,3
Genomische DNA	2

PCR-Bedingungen

Die jeweilige PCR wurde in Thermocyclern von Applied Biosystems (Gene Amp PCR System 2700; Veriti®) durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren in Abhängigkeit der weiteren Analyse (zur Sequenzierung oder zur DHPLC), der Gene (*IDH1, IDH2* oder *DNMT3A*) und der einzelnen Exons von *DNMT3A* (Exons 15-17 oder Exons 11-14 und 17-23) optimiert.

Tabelle 9. PCR-Bedingung DHPLC-PCR *IDH1* Exon 4

Abkürzungen: DHPLC, Denaturating high-performance liquid chromatography; IDH, Isocitratdehydrogenase; PCR, Polymerasekettenreaktion.

	Temperatur	**Zeit**	
1. Initiale Denaturierung	95°C	5 Minuten	
2. Denaturierung	95°C	30 Sekunden	
3. Annealing	54°C	30 Sekunden	2.-4. x 32 Zyklen
4. Elongation	72°C	40 Sekunden	
5. Syntheseschritte	72°C	7 Minute	
6. Ende	4°C	∞	

Tabelle 10. PCR-Bedingung DHPLC-PCR *IDH2* Exon 4

Abkürzungen: DHPLC, Denaturating high-performance liquid chromatography; IDH, Isocitratdehydrogenase; PCR, Polymerasekettenreaktion.

	Temperatur	**Zeit**	
1. Initiale Denaturierung	95°C	5 Minuten	
2. Denaturierung	95°C	30 Sekunden	
3. Annealing	58,3°C	30 Sekunden	2.-4. x 32 Zyklen
4. Elongation	72°C	30 Sekunden	
5. Syntheseschritte	72°C	7 Minute	
6. Ende	4°C	∞	

Tabelle 11. PCR-Bedingung Sequenzier-PCR *IDH1* Exon 4

Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; PCR, Polymerasekettenreaktion.

	Temperatur	Zeit	
1. Initiale Denaturierung	95°C	11 Minuten	
2. Denaturierung	95°C	30 Sekunden	
3. Annealing	54°C	30 Sekunden	2.-4. x 34 Zyklen
4. Elongation	72°C	40 Sekunden	
5. Syntheseschritte	72°C	7 Minute	
6. Ende	4°C	∞	

Tabelle 12. PCR-Bedingung Sequenzier-PCR *IDH2* Exon 4

Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; PCR, Polymerasekettenreaktion.

	Temperatur	Zeit	
1. Initiale Denaturierung	95°C	5 Minuten	
2. Denaturierung	95°C	30 Sekunden	
3. Annealing	58,3°C	30 Sekunden	2.-4. x 34 Zyklen
4. Elongation	72°C	30 Sekunden	
5. Syntheseschritte	72°C	7 Minute	
6. Ende	4°C	∞	

Tabelle 13. PCR-Bedingung Sequenzier-PCR *DNMT3A* Exon 11-14 und Exon 18-23

Abkürzungen: DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; PCR, Polymerasekettenreaktion.

	Temperatur	Zeit	
1. Initiale Denaturierung	94°C	5 Minuten	
2. Denaturierung	94°C	30 Sekunden	
3. Annealing	61°C	30 Sekunden	2.-4. x 30 Zyklen
4. Elongation	72°C	1 Minute	
5. Syntheseschritte	72°C	10 Minute	
6. Ende	10°C	∞	

Tabelle 14. PCR-Bedingung Sequenzier-PCR *DNMT3A* Exon 15-17

Abkürzungen: DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; PCR, Polymerasekettenreaktion.

	Temperatur	Zeit	
1. Initiale Denaturierung	94°C	5 Minuten	
2. Denaturierung	94°C	30 Sekunden	
3. Annealing	62°C	30 Sekunden	2.-4. x 30 Zyklen
4. Elongation	72°C	1 Minute	
5. Syntheseschritte	72°C	10 Minute	
6. Ende	10°C	∞	

2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation erfolgte im Anschluss an jede PCR die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts.

Es kam ein 2%iges Agarosegel zur Anwendung. Hierzu wurden 3 g Agarose zu 150 ml TAE Puffer (0,04 mol/l Tris-Acetat, 0,001 mol/l EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), pH 8,0) hinzugegeben und anschließend bei 900 Watt für 3,5 Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Zur Optimierung der Konsistenz wurde das Gel auf einer Heizplatte durch permanentes Rühren mittels eines Magnetrührers bei 1000 U/min für 15 Minuten weiter vermengt und leicht abgekühlt.

Nun konnte das Gel in den zuvor mit Alkohol desinfizierten Schlitten mit eingesetzten Kämmen, unter Vermeidung von Blasenbildung, vorsichtig eingegossen werden.

Nach Abkühlung der Gelmatrix bei Raumtemperatur und Entfernung der Kammeinsätze konnte das Gel in eine mit TEA-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA) gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt werden. Es wurden neben der obligaten Positivkontrolle und der NTC im Schnitt ca. 5% der PCR-Produkte repräsentativ elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden zunächst jeweils 5 µl 6x Orange Juice Gel Ladepuffer in eine Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend 5 µl des PCR-Produktes hinzugegeben. Danach konnten die Proben einzeln in jeweils eine Tasche des Agarosegels pipettiert werden. Zur Einordnung der Fragmentgröße wurde eine 100 bp (Basenpaar) Leiter ebenfalls einpipettiert und mit aufgetrennt.

Die elektrophoretische Analyse erfolgte bei einer angelegten Spannung von 120 V und 500 mA Stromstärke über 45 min.

Nachfolgend wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad (0,5 mg/l) für ca. 30 Minuten eingefärbt. Nach Abspülen überschüssiger Ethidiumbromidreste mit Wasser, konnte bei erfolgreicher PCR die amplifizierten DNA-Fragmente im Transluminator-System (Gene Genius, Syngene, USA) als Banden sichtbar gemacht und fotodokumentiert werden. Dies gelingt durch Interkalation des Ethidiumbromids in der doppelsträngigen DNA, welche dann durch UV-Licht detektierbar ist.

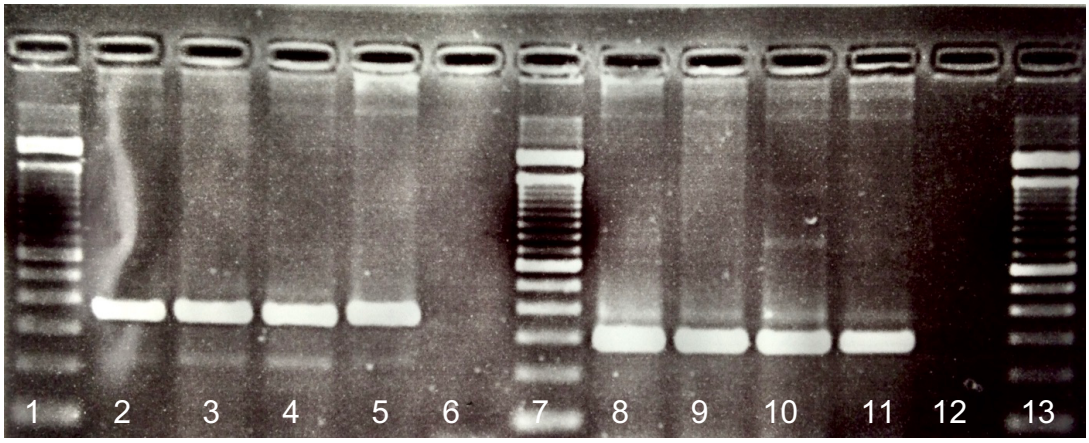

Abbildung 7. Fotodokumentation des PCR-Produkts von *IDH1* und *IDH2* nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese

Von links nach rechts: 100 bp lange DNA-Leiter (1), 3-mal PCR Produkt von *IDH1* (2,3,4), PCR-Produkt der Zellreihe OCI-AML3 (5), NTC (6), 100 bp DNA-Leiter (7), 3-mal PCR Produkt von *IDH2* (8,9,10), PCR-Produkt der Zellreihe OCI-AML3 (11), NTC (12), 100 bp DNA-Leiter (13).

Abkürzungen: bp, Basenpaare; DNA, Desoxyribonukleinsäure; IDH, Isocitratdehydrogenase; NTC, no template control; PCR, Polymerasekettenreaktion.

2.2.5. Aufreinigung des PCR Produktes

Zur Aufreinigung des PCR-Produkts wurde nach jeder einzelnen PCR das QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen) für einzelne Proben bzw. das QIAquick 96 PCR Purification Kit (Fa. Qiagen) für ganze Platten verwendet. Es diente dazu Enzyme, Pufferreste, Salze sowie ungebundene Nukleotide auszuwaschen und somit ein reines Template für die nachfolgende Cycle Sequencing Reaction oder die DHPLC zu generieren.

Tabelle 15. Inhalt des QIAquick PCR Purification Kits (Fa. Qiagen)
Abkürzungen: EB, eluting Puffer; PB, binding Puffer; PCR, Polymerasekettenreaktion; PE, wash Puffer.

Inhalt
Auffang-Tubes 2 ml
QIAquick Spin Säulen
Puffer PB
Puffer PE
Puffer EB

Tabelle 16. Inhalt des QIAquick 96 PCR Purification Kits (Fa. Qiagen)
Abkürzungen: EB, eluting Puffer; PB, binding Puffer; PCR, Polymerasekettenreaktion; PE, wash Puffer.

Inhalt
Auffang-Platte, 96
QIAquick Platte, 96
Puffer PB
Puffer PE
Puffer EB

Im ersten Schritt der Aufreinigung einzelner Tubes wurden 200 µl Bindungspuffer mit den 50 µl PCR-Produkt auf- und abpipettiert und das Gemisch anschließend auf die Gelmatrix der Spin Columns gegeben. Die Säule wurde dann bei 13000 U/min für 60 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss konnte verworfen werden. Im nächsten Schritt wurden 700 µl des Waschpuffers auf die Silikatgel-Membran pipettiert und wiederum bei 13000 U/min 60 Sekunden lang zentrifugiert. Es folgte eine weitere 1-minütige Trockenzentrifugation bei 13000 U/l. Erneut wurde der Durchfluss verworfen und zur Gewinnung des reinen PCR-Produkts die Säule in das Auffangbehältnis gestellt. 50 µl des ethanolhaltigen EB Puffers (elution buffer) konnten im Weiteren auf die Gelmatrix gegeben und nach 1 Minute Inkubationszeit bei 13000 U/min für 60 Sekunden abzentrifugiert werden. Das Eluat wurde nun bis zur CSR (Cycle Sequencing Reaction) oder DHPLC bei -20°C gelagert werden.

Zum Aufreinigen ganzer Platten wurden mit dem QIAquick 96 PCR Purification Kit gearbeitet. Hierbei wurden im ersten Schritt jeweils 200 µl Bindungspuffer auf das PCR-Produkt und anschließend auf die QIAquick 96 PCR Purification Platte gegeben. Ein an die Platte angeschlossenes Vakuum entfernte die Flüssigkeiten. Danach wurden jeweils 750 µl Waschpuffer pro Tasche pipettiert und erneut ein Vakuum für 10 Minuten angelegt. Nach gründlichem Ausklopfen der QIAquick 96 Platten auf absorbierenden Papiertüchern wurde diese auf eine VWR Platte gesetzt und mit je 50 µl EB Puffer eluiert. Die Platten konnten nun für 6 Minuten bei 3800 U/min abzentrifugiert und das Eluat bei –20°C gelagert werden.

2.2.6. Denaturating high-performance liquid chromatography

Die Möglichkeit große Mengen an DNA schnell und sensitiv auf Mutationen zu untersuchen bietet die DHPLC. Sie wurde das erste Mal 1995 beschrieben und basiert auf den unterschiedlichen physikalischen Wechselwirkungen von Homo- und Heteroduplex-DNA-Fragmenten (Oefner, Underhill 1995).

Die stationäre Phase des Hochdruckflüssigkeits-Chromatographen besteht aus einem unpolaren Poly(styrene-divinylbenzol)-Copolymer. Um nun das zuvor in einer PCR amplifizierte Genmaterial auf Mutationen zu untersuchen, wird das Amplifikat der Säule hinzugegeben. Da die polare DNA nicht an der unpolaren Chromatographiesäule bindet, wird Triethylammoniumacetat (TEAA) beigefügt, welches aufgrund seiner bipolaren Eigenschaften als Bindeglied zwischen

stationärer und mobiler Phase fungiert. Als Gegenspieler steht bei der DHPLC Acetonitril (ACN) zur Verfügung, welches die DNA-Bindung von der stationären Phase löst. Zunächst sorgt Puffer A mit einer hohen Konzentration an TEAA [0,1 M] bei einem geringen Anteil an ACN (0,025%) für eine gute Bindung der DNA-Fragmente an die Chromatographiesäule. Im Verlauf kommt es mit Verwendung des Puffers B zu einem Anstieg des ACN-Anteils (25%) und damit zum Ablösen der DNA.

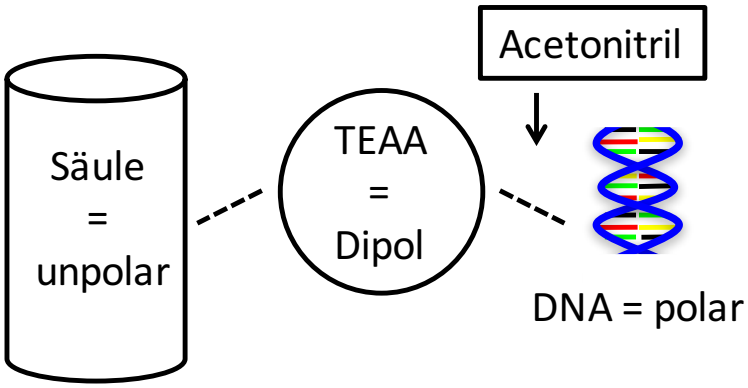

Abbildung 8. Schematische Darstellung des Prinzips der Denaturating high-performance liquid chromatography (DHPLC)

Abkürzungen: DNA, Desoxyribonukleinsäure; DHPLC, Denaturating high-performance liquid chromatography; TEAA, Triethylammonium acetat.

Bei ansteigender Temperatur erfolgt die Denaturierung der beiden DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen. Diese lagern sich im anschließenden Abkühlungsprozess erneut zu Doppelhelices zusammen. Bei Vorliegen einer heterozygoten Mutation werden sich dabei Basenpaarungen außerhalb des Watson-Crick-Systems finden (GT, CT, GA, CA). Diese Heteroduplices sind aufgrund der ungünstigeren Bindungseigenschaften thermolabiler. Sie denaturieren bei gleicher Temperatur schneller als Homoduplices und lösen sich damit früher von der stationären Säule. AC-Paarungen lösen sich wiederum nochmals früher als GT-Paarungen.

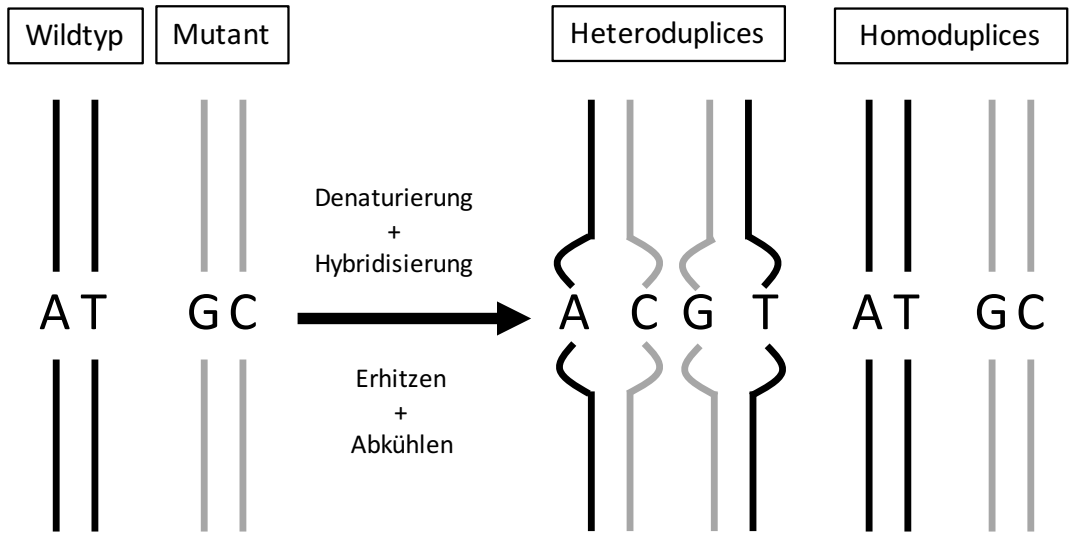

Abbildung 9. Schema der Duplices-Bildung bei der Denaturating high-performance liquid chromatography (DHPLC)

Durch die Mitanalyse eines Wildtyps (Verhältnis 1:1) können sich auch bei homozygoten Mutationen Heteroduplices bilden (Abbildung nach Schollen et al. 2005).

Abkürzungen: A, Adenin; C, Cytosin; DHPLC, Denaturating high-performance liquid chromatography; G, Guanin; T, Thymin.

Entscheidend bei der DHPLC ist das Temperaturprofil, welches zielspezifisch für jedes Gen anhand eines Schmelzprofils erstellt werden muss. Die besten Ergebnisse werden normalerweise bei einer partiellen Denaturierung von 30-40% erreicht (Schmitt, Robinson et al. 2000).

Die von der Chromatographiesäule gelösten DNA-Fragmente lassen sich anschließend detektieren. Hierzu dient das Wave® Analyse-System von Transgenomic. Es erstellt mit Hilfe von UV-Licht ein Absorptions-Zeit-Chromatogramm. Beim Vorliegen einer heterozygoten Mutation zeigt sich das schnellere Ablösen der Heteroduplices von der Säule durch ein zum Heterozygoten-Peak zeitlich vorverlagerten Peak. Ein Wildtyp präsentiert sich durch das Vorliegen eines einzigen Peaks. Unter idealen Voraussetzungen würde man bei einer heterozygoten Mutation 4 Peaks der verschiedenen Neupaarungen erwarten. Aufgrund der kurzen Retentionszeit werden jedoch lediglich 2 erfasst. Homozygote Mutationen werden bei der DHPLC nicht erfasst. Zum Detektieren homozygoter Mutationen muss der Analyse eine 1:1 Mischung der DNA mit dem Wildtypen vorliegen, da diese ansonsten nicht erfasst würden. Bei jeder DHPLC-Analyse wurde aus diesem Grund aus der entsprechenden PCR-Reihe auch der Wildtyp (Zelllinie OCI-AML3) sowie ein Leerwert mit aufgetrennt. Hierdurch konnten

Kontaminationen ausgeschlossen und die Analyse der Chromatogramme erleichtert werden.

Sowohl *IDH1* als auch *IDH2* konnten mit der DHPLC mittels WAVE 3500HT DNA Fragment Analysis System (Transgenomic) untersucht und mit Hilfe der Navigator Software (Transgenomic) analysiert werden. Dazu wurden folgende Temperaturprofile verwendet:

IDH1: 58,9°C *IDH2*: 63,0°C timeshift 0,7

Diejenigen Patientenproben, bei denen sich im Chromatogramm der DHPLC-Analyse Abweichungen vom Wildtyp zeigten und somit eine Mutation vermutet wurde, konnten in einer Sequenzier-PCR auf die darauffolgende Sequenzierung vorbereitet werden.

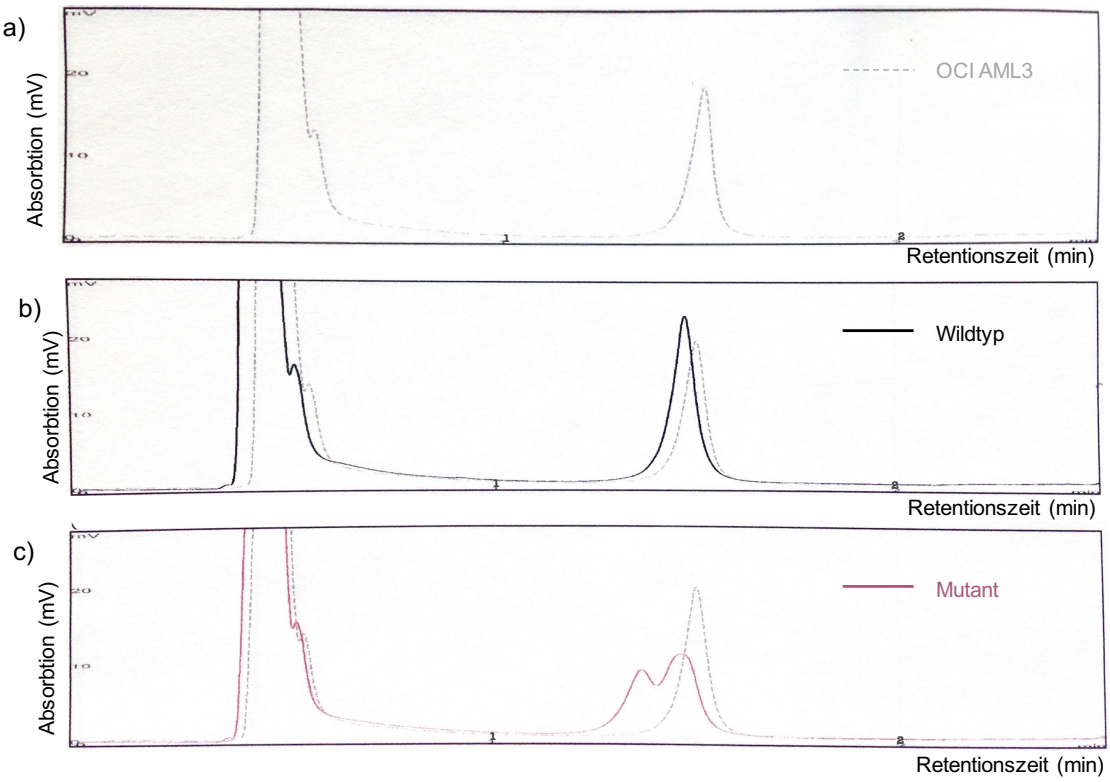

Abbildung 10. Denaturating high-performance liquid chromatography (DHPLC) Chromatogramm von IDH1

a) Wildtyp Zellline OCI-AML3, b) Homoduplexpeaks bei vorliegendem Wildtyp, c) Heteroduplexpeak bei vorliegender Mutation.

Abkürzungen: *DHPLC, Denaturating high-performance liquid chromatography; IDH, Isocitratdehydrogenase; min, Minuten; mV, Millivolt.*

2.2.7. Cycle sequencing reaction

Die CSR beruht auf einer Kettenabbruch-Synthese (Sanger, Nicklen et al. 1977) und erlaubt die spätere Auslesung der Basen-Sequenz des zu untersuchenden Genabschnittes. Die CSR erfolgte für alle *DNMT3A*- sowie für diejenigen *IDH1*- und IDH2-Proben, die zuvor in der DHPLC Abweichungen vom Wildtypen aufwiesen. Voraussetzung für die CSR waren eine erfolgreiche Sequenzier-PCR mit anschließender Aufreinigung des PCR-Produkts (Abb. 6).

Im Ansatz handelt es sich dabei um eine erweiterte PCR. Der wesentliche Unterschied zur PCR besteht darin, der Reaktion, neben den verwendeten dNTPs, noch Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs, Dye Terminatoren) hinzuzugeben. Durch das Fehlen der 3'OH-Gruppe (Hydroxyl-Gruppe) der ddNTPs kommt es konsekutiv zum Stopp der Elongation und damit zum Kettenabbruch. Die vier unterschiedlich fluoreszierend markierten ddNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) markieren die DNA-Fragmente unterschiedlicher Längen. Sie können später elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Bei der CSR kommt nur ein Primer pro Exon zum Einsatz; ob 5'→3' bzw. 3'→5' hängt vom zu sequenzierenden Genabschnitts ab (Tabelle 18).

Der Reagenzansatz wurde auf Eis pipettiert. Das fertige CSR-Produkt wurde bei 4°C im Kühlschrank und lichtgeschützt, in Aluminiumfolie verpackt, gelagert.

Insgesamt ergab sich bei 1 µl DNA pro Patient und 14 µl Reagenzansatz ein Gesamt-CSR-Produkt von 15 µl.

Tabelle 17. Reagenzansatz für die CSR von *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*

Abkürzungen: CSR, Cycle Sequencing Reaction; DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; IDH, Isocitratdehydrogenase; PCR, Polymerasekettenreaktion.

Reagenzien	Volumen [µl]
Aqua	10
BigDye 3.1	2
5x Seq. Puffer	1
Primer (10 pmol/µl)	1
PCR Produkt, aufgereinigt	1
Aqua	10

BigDye 3.1 (Applied Biosystem) beinhaltet die 4 farbkodierten BigDye Terminatoren (2'3'ddATP: grün; 2'3'ddTTP: schwarz; 2'3'ddCTP: rot; 2'3'ddGTP: blau),

unmarkierte dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), Tris/HCL Puffer (pH 9,0), Ampli Taq DNA Polymerase.

Tabelle 18. Primersequenzen der Primerpaare, die zur CSR von *DNMT3A*, *IDH1* und *IDH2* benutzt wurden

Abkürzungen: A, Adenin; C, Cytosin; DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; G, Guanin; IDH, Isocitratdehydrogenase; T, Thymin.

IDH1	**Vorwärts Primer**	**Rückwärts Primer**
Exon 4	CCATTTGTCTGAAAAACTTTGCT	-
IDH2	**Vorwärts Primer**	**Rückwärts Primer**
Exon4	GCTGCAGTGGGACCACTATT	TGTGGCCTTGTACTGCAGAG
DNMT3A	**Vorwärts Primer**	**Rückwärts Primer**
Exon 11/12	ACCCCACTGTAAGGAGGGTGGG	-
Exon 13	-	TACATGCCCAGAAGCGGTGGAC
Exon 14	-	GAGGCCAAGGTGTGCTACCTGGA
Exon 15/16	-	TTTTGCCAGAGTTGCCCACACA
Exon 17	TAGGACTTGGGCCTACAGCTGAC	-
Exon 18	TGCAGCTAGGGTCGTGAGCCTG	-
Exon 19	-	TTCCCAAACAGGCCCCTTGCA
Exon 20	-	CCACTATGGGTCATCCCACCTGCA
Exon 21	GTGAACTAGTGGCTGCTGGGGGAG	-
Exon 22	-	TGGGAAAGGCAGAGGACCCCCG
Exon 23	-	CCGGGTCCTGCTGTGTGGTTA

PCR-Bedingungen

Die CSR wurde in einem Thermocycler von Applied Biosystems durchgeführt.

Tabelle 19. PCR-Bedingung der CSR für *IDH1* und *IDH2*

Abkürzungen: CSR, Cycle Sequencing Reaction; IDH, Isocitratdehydrogenase.

	Temperatur	**Zeit**	
1. Initiale Denaturierung	96°C	2 Minuten	
2. Denaturierung	95°C	15 Sekunden	
3. Annealing	55°C	1 Minute	x 30 Zyklen
4. Elongation	60°C	3 Minuten	
5. Syntheseschritte	4°C	10 Minute	
6. Ende	4°C	∞	

Tabelle 20. PCR-Bedingung der CSR für *DNMT3A*

Abkürzungen: CSR, Cycle Sequencing Reaction; DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A.

	Temperatur	**Zeit**	
1. Initiale Denaturierung	96°C	2 Minuten	
2. Denaturierung	95°C	15 Sekunden	
3. Annealing	55°C	1 Minute	x 25 Zyklen
4. Elongation	60°C	3 Minuten	
5. Syntheseschritte	4°C	10 Minute	
6. Ende	4°C	∞	

2.2.8. Aufreinigung des CSR-Produktes

Die Aufreinigung des CSR-Produkts erfolgte entweder mit dem DyeEx 96 Kit (Fa. Qiagen) zum Aufreinigen ganzer Platten oder mit DyeEx 2.0 Spin Kit (Fa. Qiagen), falls es sich um einzelne Tubes handelte. Zur Generierung des reinen CSR-Produktes wurden bei beiden Verfahren die Dye-Terminatoren, Pufferreste und Salze entfernt.

Tabelle 21. Inhalt des DyeEx 96 Kits (Fa. Qiagen)

Inhalt
DyeEx 96 Platte
Auffang-Platte

Tabelle 22. Inhalt des DyeEx 2.0 Spin Kits (Fa. Qiagen)

Inhalt
DyeEx Spin Säulen
Auffang-Tubes

Zur Aufreinigung ganzer Platten wurden zunächst die DyeEx 96 Platten bei 2350 U/min für 6 Minuten 30 Sekunden zentrifugiert und die überschüssige Flüssigkeit verworfen. In eine VWR 96 Platte wurden je 5 µl Formamid pro Tasche vorgelegt. Anschließend konnte die trockenzentrifugierte Aufreinigungsplatte auf die Auffangplatte gesetzt und die CSR-Produkte auf die Säulen pipettiert werden. Im nächsten Schritt wurden die Platten bei 2350 U/min für 6 Minuten 30 Sekunden zentrifugiert. Das Eluat in der VWR Platte konnte nun bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert und die DyeEx 96 Platte verworfen werden.

Bei der Aufreinigung einzelner Tubes mussten zunächst die einzelnen DyeExSpin Columns des DyeEx 2.0 Spin Kits gevortext werden. Im nächsten Schritt wurde der Deckel zu einer Vierteldrehung geöffnet, der Verschluss des Tubes abgedreht und für 3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss konnte verworfen und der DyeExSpin Column auf ein neues Auffangtube gestellt werden. Nun wurde das CSR-Produkt auf die Gelmatrix pipettiert und erneut bei 3000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Das Eluat wurde nun bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

2.2.9. Sequenzierung

Die Analyse des aufgereinigten CSR-Produkts erfolgte computergestützt mit dem DNA Sequencer 3500 xL Dx Genetic Analyser (Applied Biosystems). Zunächst musste das CSR-Produkt bei 2 Minuten bei 95° auf einem Heizblock denaturiert werden, sodass später die DNA-Einzelstränge erfasst werden konnten. Durch die CSR entstanden DNA-Fragmente unterschiedlicher Längen, deren letzte Basen durch die BigDye-Terminatoren markiert wurden (2'3'ddATP: grün; 2'3'ddTTP: schwarz; 2'3'ddCTP: rot; 2'3'ddGTP: blau). Diese Oligonukleotide sollten nun ihrer Länge nach aufgetrennt werden, sodass sich die Fragmente in jeweils nur einer Base unterscheiden und so die genaue Basenabfolge eruiert werden konnte.

Tabelle 23. Material DNA Sequencer ABI PRISM 377 (Applied Biosystems)

Abkürzungen: EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; DNA, Desoxyribonukleinsäure; HPLC, high performance liquid chromatography.

Reagenzien	Hersteller
Genetic Analyzer Puffer (10x) mit EDTA	Applied Biosystems, Darmstadt
POP-6: Performance Optimized Polymer 6%	Applied Biosystems, Darmstadt
HPLC-Wasser: LiChrosolv-Wasser für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
Kapillare: 310 bzw. 3130 XL Genetic Analyzer 47 cm x 10 µm Kapillare	Applied Biosystems, Darmstadt

Die Reservoirs des Sequenzierers wurden sachgerecht mit Sequenzierpuffer in der Verdünnung 1:10 mit HPLC-Wasser (high performance liquid chromatography) sowie reinem HPLC-Wasser aufgefüllt. Die Geräte-Spritze sowie der Block wurden mit POP-6 aufgezogen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer polymergefüllten Glaskapillare bei 50°C für 20 Sekunden. Ein Argon-Laser regte die Fluoreszenzfarbstoffe der markierten Basen an, woraufhin das abgegebene Signal von der Charge-Coupled-Device-Kamera (CCD-Kamera) detektiert werden konnte.

Die Software Sequencing-Analysis (Applied Biosystems) wandelte die erfassten Daten in farbkodierte Graphiken um. Die Fluoreszenzpeaks entsprachen der Basenabfolge des zu untersuchenden DNA-Abschnitts.

Es erfolgte nun der manuelle Abgleich der gewonnenen Basensequenz mit der des Wildtyps. Die Referenzsequenzen stammten aus der UCSC (University of California Santa Cruz) Genome Bioinformatics Gen-Datenbank mit den Eingangsnummern *IDH1*: NM_005896.3; *IDH2*: NM_002168.3; *DNMT3A*: NM_022552.4.

Auftretende Mutationen und Polymorphismen wurden entsprechend benannt und dokumentiert.

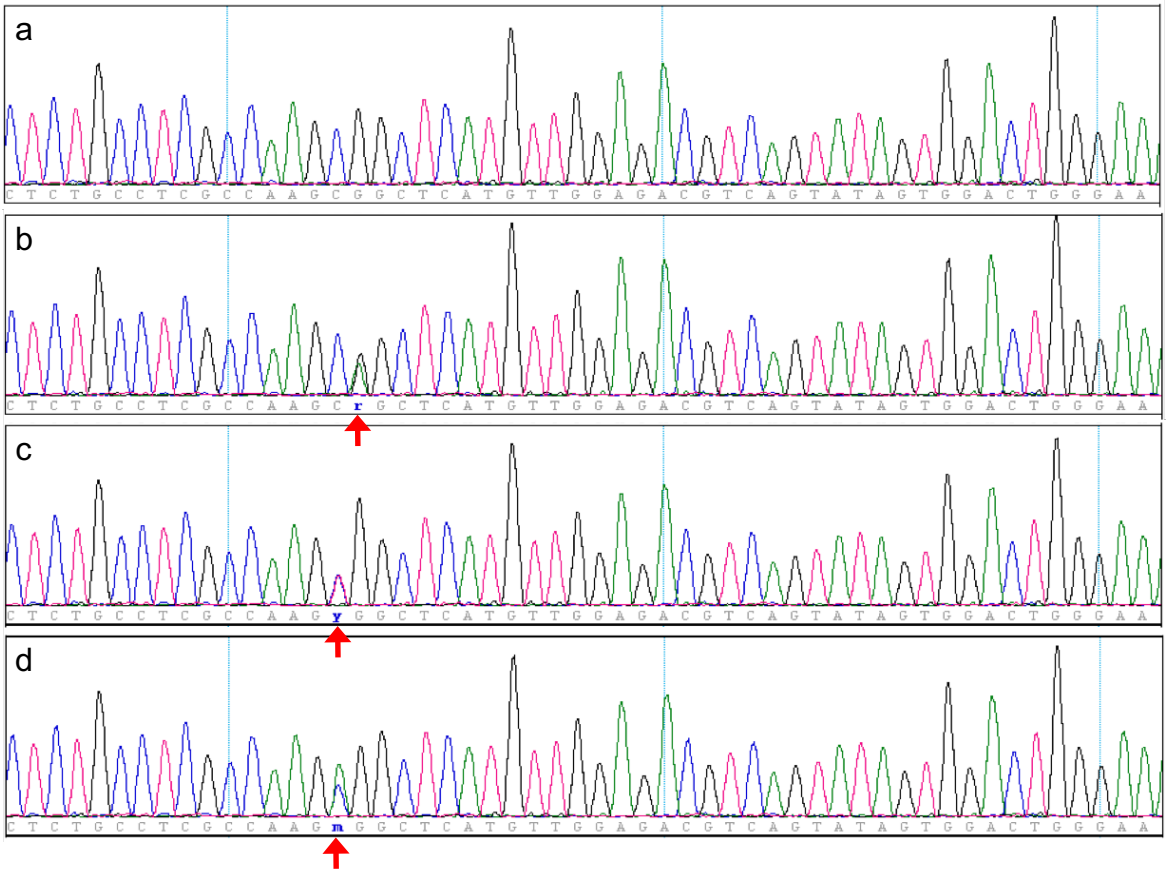

Abbildung 11. Basenspeziefisches Fluoreszensspektrum der Nukleotidsequenz von Exon 23 des *DNMT3A*-Gens mit reverser Basenabfolge.

a) *DNMT3A* Wildtyp. b) missense Mutation durch den Austausch der Base C gegen die Base T und damit einhergehend veränderter Proteinkodierung (c.C2644T; p.R882C). c) missense Mutation durch den Austausch der Base G gegen die Base A und damit einhergehend veränderter Proteinkodierung (c.G2645A; p.R882H). d) missense Mutation durch den Austausch der Base G gegen die Base C und damit einhergehend veränderter Proteinkodierung (c.G1628C; p.G543A). Basenaustausch durch rote Pfeile markiert. Patienten aus der AMLSG 12-09 Studie (NCT01180322).

Abkürzungen: DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A (DNMT3A); A, Adenin (grün); A, Alanin; C, Cytosin (blau); G, Guanin (schwarz); G, Guanin; T, Thymin (rot).

2.2.10. Statistische Analyse

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der experimentellen Durchführung der Analysen zur Detektion der Genmutationen *DNMT3A* sowie *IDH1* und *IDH2* im Rahmen der AMLSG 12-09 Studie. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde durch die Studienzentrale der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Ulm unter der Leitung von Herrn Dr. Frank Stegelmann durchgeführt. An der Planung der statistischen Analysen sowie der Auswertung und Interpreation der Daten war ich aktiv beteiligt. Die Definition von CR, RFS, und OS erfolgte anhand empfohlener Kriterien (Döhner, Estey et al. 2017). Die mediane Zeitspanne der Nachbeobachtung (mediane follow-up) zur Überlebensanalyse erfolgte nach der Methode nach Korn (Korn 1986). Patientencharakteristika wurden paarweise mittels Mann-Whitney-Test (Mann, Whitney 1947) oder Kruskal-Wallis-Test für stetige Variablen und für kategoriale Variablen mittels Fischer-Exakt-Test verglichen. Die univarianten Analysen von OS, EFS und RFS erfolgte nach der Kaplan-Meier-Methode (Kaplan, Meier 1958). Bei *P*-Werten kleiner 0,05 wurde statistische Signifikanz angegeben. Die Konfidenzintervalle der Überlebenskurven wurden anhand der Greenwoods formula zur Abschätzung des Standardfehlers berechnet. Mittels Cox-Regressionsanalyse wurden die prognostischen Variablen identifiziert (Therneau, Grambsch 2000).

3. Ergebnisse

3.1. *DNMT3A*

Inzidenzen und Lokalisation von *DNMT3A*-Mutationen

In dieser Arbeit konnten insgesamt 241 Patienten, die innerhalb der AMLSG 12-09 Studie behandelt wurden, auf Mutationen im *DNMT3A*-Gen untersucht werden.

Insgesamt zeigten sich in 43 der 241 Patienten *DNMT3A*^{mut} (17,8%). Es konnten in Summe 16 verschiedene Mutationen in 7 Exons identifiziert werden. Dabei handelte es sich ausschließlich um missense Mutationen (Tabelle 24). Lediglich bei einem Patienten konnten zwei Mutationen nachgewiesen werden.

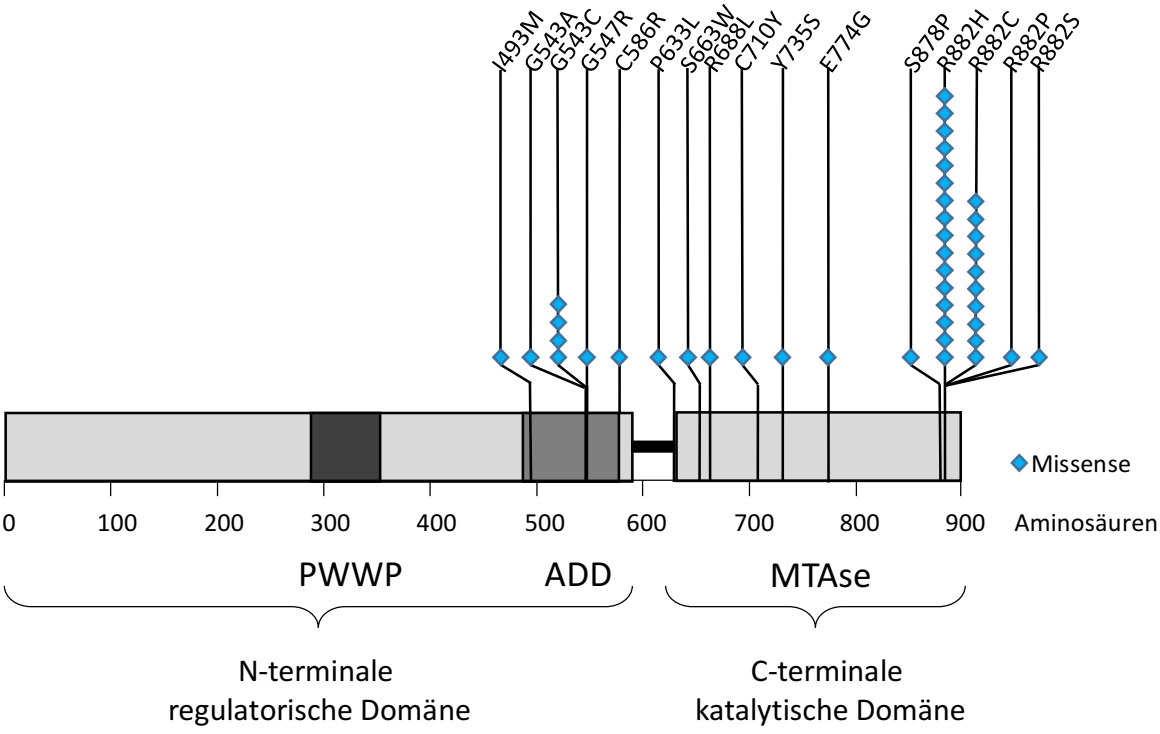

Abbildung 12. Verteilung der *DNMT3A*-Mutationen innerhalb der AMLSG 12-09 Studie

Jede *DNMT3A*-Mutation ist mit einer Raute gekennzeichnet. Aminosäuren 1-912, UniProtKB - Q9Y6K1; Ensembl Genome Browser: Protein ID ENSP00000264709 (Abbildung nach Ley et al. 2010).

Abkürzungen: A, Alanin; ADD, ATRX-DNMT3A-DNMT3L-Domäne; C, Cystein; E, Glutaminsäure; G, Glycin; H, Histidin; I, Isoleucin; M, Methionin; L, Leucin; MTase, MTase DNA-(cytosin-C^5)-Metyltransferase; P, Prolin; PWWP, Prolin-Tryptophan-Prolin-Domäne; R, Arginin; S, Serin; W, Tryptophan; Y, Tyrosin; ZF, Zinkfinger.

Bei 28 Patienten (11,6%) zeigten sich die meisten Mutationen an der Stelle des Kodons R882 in der MTAse-Domäne in Exon 23. R882-*DNMT3A*^{mut} machten damit 65% aller detektierten *DNMT3A*^{mut} aus. Es handelte sich dabei in absteigender Häufigkeit um c.G2645A; p.R882H (n=16; 6,6%), c.C2644T; p.R882C (n=10; 4,2%) und c.C2644A; p.R882S (n=1; 0,4%) (T, Threonin; A, Alanin). Des Weiteren wurde mit c.T2632C; p.S878P (P, Prolin) eine non-R882-*DNMT3A*^{mut} (n=1; 0,4%) in Exon 23 gefunden, sodass in diesem Exon 23 insgesamt 29 (12%) Mutationen detektiert werden konnten.

Mutationen in Exon 19 wurden bei zwei Patienten (n=2; 0,8%) nachgewiesen (n=1: c.A2204C; p.Y735S, n=1: c.A2321G; p.E774G) (E, Glutaminsäure; Y, Tyrosin). Ein Patient wies sowohl in Exon 15 (c.T1756C; p.C586R) als auch in Exon 16 (c.C1898T; p.P633L) Mutationen auf (jeweils n=1; 0,4%). In 1,3% der Fälle (n=3) fanden sich Mutationen in Exon 17 (n=1 c.C1988G; p.S663W, n=1 c.G2063; p.R688L, n=1 c.G2129A; p.C710Y) (W, Tryptophan). Exon 14 wies in insgesamt 2,5% des Patientenkollektivs (n=6) Veränderungen auf. Vier davon (1,7%) hatten die Mutation c.G1627T; p.G543C und jeweils ein Patient hatte die Mutation c.G1628C; p.G543A beziehungsweise c.T1640G; p.L547R. In Exon 13 fand sich mit c.C1479G; p.I493M (I, Isoleucin; M, Methionin) eine Mutation (0,4%).

Tabelle 24. *DNMT3A*-Mutationstypen

Die Bestimmung der Lokalisation der Mutationen erfolgte anhand der Referenzsequenzen mit der Eingangsnummer cDNA NM_175629 aus der Gen-Datenbank (UCSC Genome Bioinformatics). Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: A, Alanin; C, Cystein; DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; E, Glutaminsäure; G, Glycin; H, Histidin; I, Isoleucin; M, Methionin; L, Leucin; P, Prolin; R, Arginin; S, Serin; T, Threonin; UCSC, University of California Santa Cruz; W, Tryptophan; Y, Tyrosin.

Mutationstyp	Exon der Mutation
c.C1479G; p.I493M	13
c.G1628C; p.G543A	14
c.G1627T; p.G543C	14
c.G1627T; p.G543C	14
c.G1627T; p.G543C	14
c.G1627T; p.G543C	14
c.T1640G; p.L547R	14
c.T1756C; p.C586R	15
c.C1898T; p.P633L	16
c.C1988G; p.S663W	17
c.G2063T; p.R688L	17
c.G2129A; p.C710Y	17
c.A2204C; p.Y735S	19
c.A2321G; p.E774G	19
c.T2632C; p.S878P	23
c.C2644A; p.R882S	23
c.C2644T; p.R882C	23
c.C2644T; p.R882C	23
c.C2644T; p.R882C	23
c.C2644T; p.R882C	23
c.C2644T; p.R882C	23
c.C2644T; p.R882C	23
c.C2644T; p.R882C	23
c.C2644T; p.R882C	23
c.C2644T; p.R882C	23
c.C2644T; p.R882C	23
c.C2644T; p.R882C	23
c.C2644T; p.R882C	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645A; p.R882H	23
c.G2645C; p.R882P	23

Assoziation von *DNMT3A*^{mut} mit klinischen Charakteristika

Im Rahmen der AMLSG 12-09 Studie wurden folgende klinische Parameter wie Alter, Geschlecht, AML-Typ, Hämoglobinwert, Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, LDH-Wert, Blastenanteil im PB und im KM der Patienten erhoben. Diese konnten nun mit dem *DNMT3A*-Mutationsstatus in Korrelation gesetzt werden.

Es waren für 235 Patienten (98%) klinische Daten zur Auswertung verfügbar. *DNMT3A*^{mut} hatten signifikant niedrigere LDH-Level (*P*=0.05). Es bestand keine signifikante Assoziation zwischen *DNMT3A*^{wt} und *DNMT3A*^{mut} hinsichtlich Alter (*P*=0.61), Geschlecht (*P*=0.12), AML-Typ (*P*=0.56), Hämoglobinwert (*P*=0.81), Thrombozytenzahl (*P*=0.21), Leukozytenzahl (*P*=0.67) oder Blastenanteil im PB (*P*=0.47) oder im KM (*P*=0.74). Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25. Prätherapeutische klinische Charakteristika in Abhängigkeit vom *DNMT3A*-Mutationsstatus

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: [a]wilcox.; [b]Fischer; AML, akute myeloische Leukämie; DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; KM, Knochenmark; LDH, Laktatdehydrogenase; mut, mutiert; n, Anzahl der Patienten; P, P-Wert; PB, peripheres Blut; wt, Wildtyp.

	***DNMT3A*^{wt} (n = 195)**	***DNMT3A*^{mut} (n = 40)**	***P***
Alter			0.61[a]
Median	62.3	61.7	
Streubreite	18.6-82.6	25.5-78.1	
Geschlecht			0.12[b]
Männlich n (%)	106 (54.4)	16 (40)	
AML-Typ n (%)			0.56[b]
De novo	139 (71.3)	31 (77.5)	
Sekundäre	41 (21.0)	8 (20)	
Therapieinduziert	15 (7.7)	1 (2.5)	
Hämoglobin, g/dl			0.81[a]
Median	9.3	9.19	
Streubreite	5.2-13.8	6.6-13.1	
Thrombozytenzahl, x10^9/l			0.21[a]
Median	63	75	
Streubreite	3-956	8-1286	
Leukozytenzahl, x10^9/l			0.67[a]
Median	3.7	3.9	
Streubreite	0.3-214	0.8-93	
LDH, U/l			0.05[a]
Median	303	270.5	
Streubreite	71-2360	97-1012	
Blasten KM, %			0.47[a]
Median	55.5	67.5	
Streubreite	0-100	20-90	
Blasten PB, %			0.74[a]
Median	12.5	11	
Streubreite	0-97	0-95	

Assoziation von *DNMT3A*^{mut} mit molekularen Charakteristika

Zur Korrelation der Mutationen von *DNMT3A* mit anderen Mutationen standen die Mutationsdaten von *FLT3*-TKD, *RUNX1*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1* und *CEBPA* zur Verfügung.

Molekulargenetische Daten lagen bei 235 (98%) Patienten vor (Tabelle 26). Patienten mit Mutationen der Gene *NPM1* sowie *FLT3*-ITD sind laut Studienprotokoll ausgeschlossen, weshalb die Korrelation mit diesen Genen hier entfällt.

Es zeigte sich, dass *DNMT3A*^{mut} sowohl mit *RUNX1* (P=0.003), also auch mit *IDH1* (P<0.0001) und *IDH2* (P<0.0001) Mutationen signifikant häufiger assoziiert waren. *CEBPA*^{dm} korrelierten hingegen signifikant seltener mit *DNMT3A*^{mut} (P=0.04). In Bezug auf *FLT3*-TKD (P=1) und *ASXL1*^{mut} (P=0.62) war kein signifikanter Zusammenhang herzustellen.

Tabelle 26. Assoziation von *DNMT3A*^{mut} mit molekulargenetischen Veränderungen

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: ASXL1, Additional Sex Combs Like 1; CEBPA, CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha; DNMT3A, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A; IDH, Isocitratdehydrogenase; FLT3, FMS-like tyrosine kinase-3; mut, mutiert; n, Patientenanzahl; P, P-Wert nach Fischer; RUNX1, Runt-related transcription factor 1; TKD, Tyrosinkinasedomäne; wt, Wildtyp.

	***DNMT3A*^{wt} (n = 195)**	***DNMT3A*^{mut} (n = 40)**	***P***
Molekulargenetische Daten			
FLT3-TKD, n (%)			1
Wildtyp	194 (99.5)	40 (100)	
Mutiert	1 (0.5)	0	
Fehlend	0	0	
RUNX1, n (%)			0.003
Wildtyp	163 (84.0)	24 (61.6)	
Mutiert	31 (16.0)	15 (38.5)	
Fehlend	1	1	
IDH1, n (%)			<0.0001
Wildtyp	180 (93.8)	25 (65.8)	
Mutiert	12 (6.3)	13 (34.2)	
Fehlend	3	2	
IDH2, n (%)			<0.0001
Wildtyp	175 (90.7)	25 (4.1)	
Mutiert	18 (9.3)	14 (35.9)	
Fehlend	2	1	
ASXL1, n (%)			0.62
Wildtyp	148 (85.6)	31 (81.6)	
Mutiert	25 (14.5)	7 (18.4)	
Fehlend	22	2	
CEBPA, n (%)			0.04
Wildtyp	175 (89.7)	38 (95)	
Mutiert monoallelisch	3 (1.5)	2 (5)	
Mutiert biallelisch	17 (8.7)	0	
Fehlend	0	0	

Assoziation von *DNMT3A*^{mut} mit zytogenetischen Charakteristika

Im Weiteren wurde der Mutationsstatus von *DNMT3A* mit folgenden zytogenetischen Veränderungen korreliert: -7/7q, -9q, t(9;11), t(v;11q23), t(6;11), t(6;9), inv(3)/t(3;3), abnl(3q), komplexer und normaler Karyotyp.

Für *DNMT3A*^{mut} waren zytogenetische Daten bei 215 (89%) Patienten verfügbar. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Für keine der zytogenetischen Veränderungen konnte eine signifikante Korrelation mit *DNMT3*A^{mut} gezeigt werden.

Tabelle 27. Assoziation von *DNMT3A*^{mut} mit zytogenetischen Veränderungen

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: abnl, abnormal; DNMT3A, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A; inv, Inversion; Minuszeichen (-), Verlust; mut, mutiert; n, Patientenanzahl; p, kurzer Arm des Chromosoms; P, P-Wert nach Fischer; q, langer Arm des Chromosoms; t, Translokation; wt, Wildtyp.

	***DNMT3A*^{wt} (n = 195)**	***DNMT3A*^{mut} (n = 40)**	***P***
Zytogenetische Daten			
t(6;9), n (%)	0	0	-
inv(3)/t(3;3), n (%)	3 (1.7)	1 (2.5)	0.56
t(9;11), n (%)	5 (2.9)	0	0.59
t(6;11), n (%)	3 (1.7)	0	1
t(v;11q23), n (%)	2 (1.1)	0	1
-7/7q, n (%)	23 (13.1)	7 (17.5)	0.46
-9q, n (%)	7 (4)	0	0.35
abnl(3q), n (%)	2 (1.1)	1 (2.5)	0.46
komplexer Karyotyp, n (%)	6 (3.4)	2 (5)	0.64
normaler Karyotyp, n (%)	6 (3.4)	2 (5)	0.28
Fehlend	20	0	

Ansprechen auf Doppelinduktionstherapie

In univarianten Analysen sollte die prognostische Relevanz von *DNMT3*A^{mut} in Bezug auf die verschiedenen klinischen Endpunkte untersucht werden. Hierzu wurde der Remissionsstatus der Patienten nach Doppelinduktion analysiert und im Verhältnis zum jeweiligen Mutationsstatus gesetzt. Die Auswertung erfolgte jeweils nach den aktuellen ELN Empfehlungen (Döhner, Estey et al. 2017).

Zur vergleichenden Analyse von *DNMT3A*^{mut} und *DNMT3A*^{wt} bezüglich des Ansprechens auf die Doppelinduktionstherapie konnten klinische Daten von 235 (98%) Patienten herangezogen werden.

Patienten mit *DNMT3*A^{mut} wiesen eine höhere Rate an Frühtodesfällen auf (48% versus 33%). Die CR-Rate (komplette Remission) war bei den *DNMT3A*^{mut} Patienten im Vergleich zu Patienten mit *DNMT3A*^{wt} niedriger (48% gegen 60%).

Jedoch ließen sich keine signifikanten Korrelationen (*P*=0.26) für *DNMT3A*^{mut} in Bezug auf CR, RD oder ED (early death; früher Tod) aufzeigen (Tabelle 28).

Tabelle 28. Assoziation des Therapieansprechens nach Doppelinduktion in Abhängigkeit vom *DNMT3A*-Mutationsstatus

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: DNMT3A, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A; mut, mutiert; n, Anzahl der Patienten; P, P-Wert nach Fischer; wt, Wildtyp.

	***DNMT3A*^{wt} (n = 195)**	***DNMT3A*^{mut} (n = 40)**	***P***
			0.26
Komplette Remission, n (%)	117 (60)	19 (47.5)	
Refraktäre Erkrankung, n (%)	13 (6.7)	2 (5)	
Früher Tod, n (%)	65 (33.3)	19 (47.5)	

Überlebensanalysen

Als nächstes wurde der Einfluss der Genmutationen von *DNMT3A* auf das Überleben der AML-Patienten untersucht. Als klinische Endpunkte wurden das OS, das RFS sowie das EFS festgesetzt.

Für das OS und das EFS lagen Daten von bei 235 der Patienten (98%) vor. Für das RFS waren Daten von 174 Patienten (72%) verfügbar.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied von Patienten mit *DNMT3A*^{mut} und *DNMT3A*^{wt} im Hinblick auf das OS. Die Median-Werte betrugen 1,49 Jahre bei *DNMT3A*^{mut} im Vergleich zu 1,29 Jahre bei *DNMT3A*^{wt} (*P*=0.47). Auch für das RFS (1,00 gegen 0,97 Jahre; *P*=0.75) und das EFS (0,15 gegen 0,32 Jahre; *P*=0.18) konnte kein signifikanter Einfluss der *DNTM3A*^{mut} aufgezeigt werden (Tabelle 29-31).

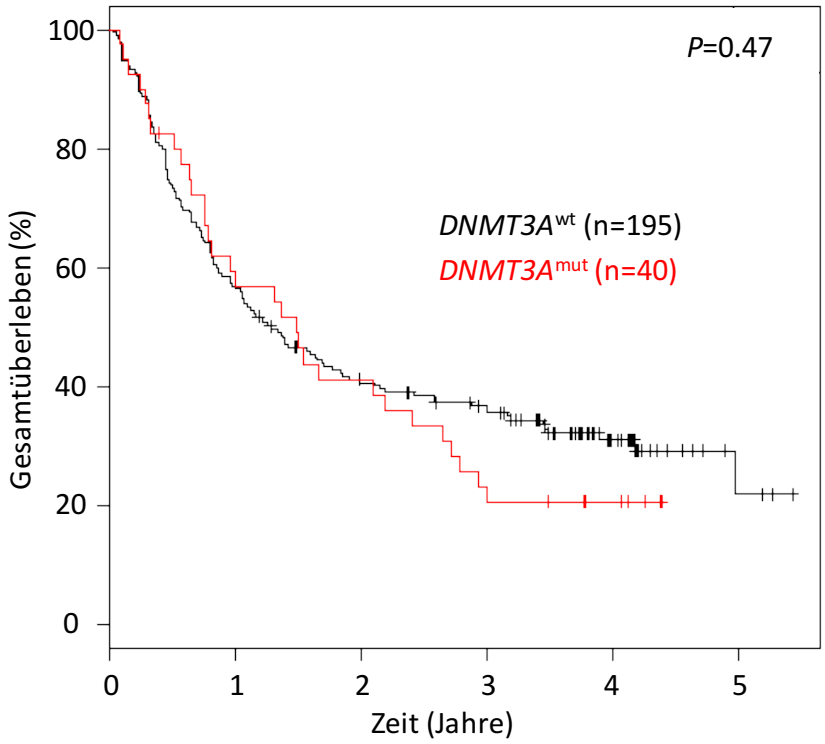

Abbildung 13. Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom *DNMT3A*-Mutationsstatus

Abkürzungen: DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

Tabelle 29. Univariable Analyse des Gesamtüberlebens von *DNMT3A*^{wt} versus *DNMT3A*^{mut}

Median in Jahren. Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: 95% CI, 95% Konfidenzintervall; DNMT3A, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

	Patientenanzahl	Ereignisse	Median	95% CI	*P*
					0.47
***DNMT3A*^{wt}**	195	132	1.29	1-1.84	
***DNMT3A*^{mut}**	40	31	1.49	0.81-2.66	

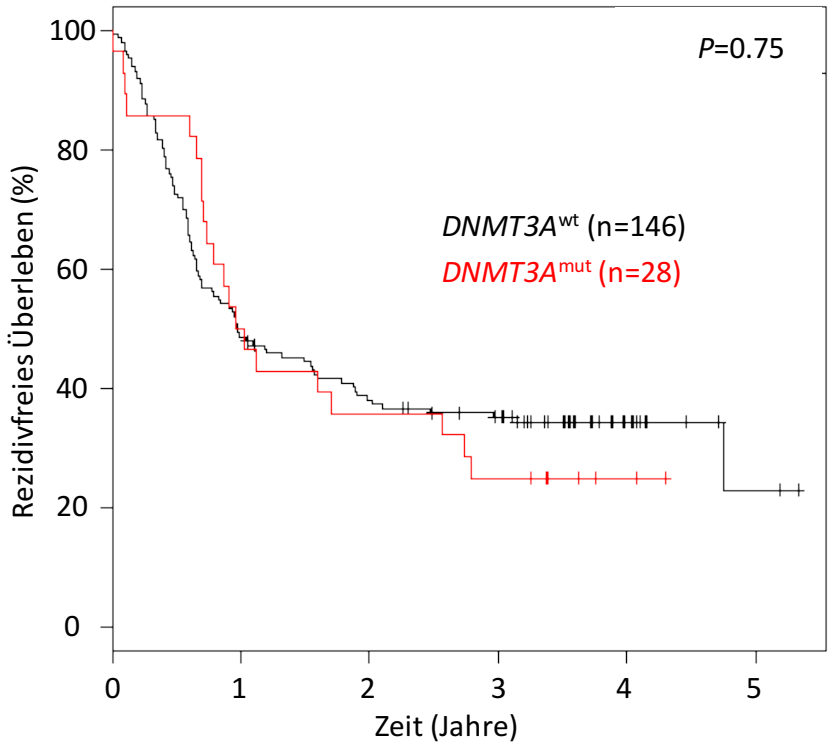

Abbildung 14. Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit vom *DNMT3A*-Mutationsstatus

Abkürzungen: DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

Tabelle 30. Univariable Analyse des rezidivfreien Überlebens von *DNMT3A*^{wt} versus *DNMT3A*^{mut}

Median in Jahren. Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: 95% CI, 95% Konfidenzintervall; DNMT3A, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3At; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

	Patientenanzahl	Ereignisse	Median	95% CI	*P*
					0.75
***DNMT3A*^{wt}**	146	96	0.97	0.69-1.78	
***DNMT3A*^{mut}**	28	21	1	0.74-2.79	

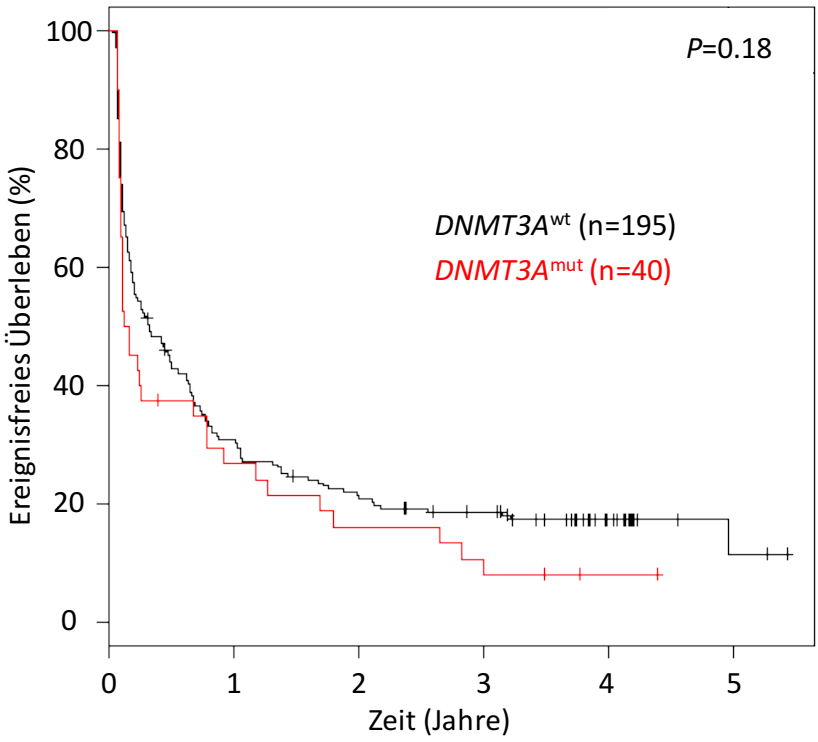

Abbildung 15. Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben in Abhängigkeit vom *DNMT3A*-Mutationsstatus

Abkürzungen: DNMT3A, DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

Tabelle 31. Univariable Analyse des ereignisfreien Überlebens von *DNMT3A*^{wt} versus *DNMT3A*^{mut}

Median in Jahren. Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: 95% CI, 95% Konfidenzintervall; DNMT3A, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A; EFS, Event-free Survival; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

	Patientenanzahl	Ereignisse	Median	95% CI	*P*
					0.18
***DNMT3A*^{wt}**	195	160	0.323	0.21-0.55	
***DNMT3A*^{mut}**	40	36	0.145	0.11-0.79	

3.2. *IDH1*

Inzidenzen und Lokalisation von *IDH1*-Mutationen

Es wurden insgesamt 240 Patientenproben auf *IDH1*^{mut} analysiert. Dabei konnte bei 52 Patienten Mutationen oder Polymorphismen im Exon 4 des *IDH1*-Gens detektiert werden (n=52; 21,67%). Dabei handelte es sich in 25 Fällen um *IDH1*^{mut} (n=25; 10,42%). Es konnten drei Mutationstypen unterschieden werden, bei denen es sich ausschließlich um missense Mutationen handelte (Tabelle 32). Dabei traten an der Position 132 verschiedene Substitutionen von Arginin auf, welche Teil der katalytischen Domäne von *IDH1* ist.

Mit insgesamt 23 Patienten war die am Häufigsten detektierte Mutation c.C394T; p.R132C (n=23; 9,6%). Jeweils ein Patient trug die Mutation c.G395A; p.R132H (n=1; 0,4%) und c.G395T; p.R132L (n=1; 0,4%).
Neben den 25 Mutationen konnten bei insgesamt 29 Patienten Polymorphismen im Exon 4 des *IDH1*-Gens festgestellt werden (n=29; 12,1%). Es traten 3 verschiedene Polymorphismen auf, wobei c.C315T; p.G106G bei 27 (n=27; 11,3%) und c.T366C; p.S122S bzw. c.G174A; p.K58K (K, Lysin) bei jeweils einem Patienten (n=1; 0,4%) zu finden waren.
Zwei Patienten wiesen sowohl einen Polymorphismus als auch eine Mutation auf. Dabei handelte es sich um c.C394T; p.R132C + c.C315T; p.G106G und c.C394T; p.R132C + c.G174A; p.K58K.
Bei keinem der 240 Patienten lag neben einer *IDH1*^{mut} eine zusätzliche Mutation in Exon 4 des *IDH2*-Gens vor.

Tabelle 32. *IDH1*-Mutationstypen

Die Bestimmung der Lokalisation der Mutationen erfolgte anhand der Referenzsequenzen mit der Eingangsnummer cDNA NM_005896.2 aus der Gen-Datenbank (UCSC Genome Bioinformatics). Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: A, Alanin; C, Cystein; G, Glycin; H, Histidin; IDH, Isocitratdehydrogenase; L, Leucin; R, Arginin; T, Threonin; UCSC, University of California Santa Cruz.

Mutationstyp	Polymorphismustyp
c.G395A; p.R132H	
c.G395T; p.R132L	
c.C394T; p.R132C	
c.C394T; p.R132C	
c.C394T; p.R132C

Assoziation von *IDH1*^{mut} mit klinischen Charakteristika

Für 231 Patienten (96%) lagen klinische Daten zu Auswertung vor. Die klinischen Charakteristika der *IDH1*^{mut} im Vergleich zum *IDH1*^{wt} zeigten keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf das Alter (*P*=0.24), das Geschlecht (*P*=0.83), den AML-Typ (*P*=0.76), den Hämoglobinwert (*P*=0.64), die Thrombozytenzahl (*P*=0.44), die Leukozytenzahl (*P*=0.13), den LDH-Wert (*P*=0.28), den Blastenanteil im PB (*P*=0.68) oder im KM (*P*=0.83). Ein Überblick über die Ergebnisse findet sich in Tabelle 33.

Tabelle 33. Prätherapeutische klinische Charakteristika in Abhängigkeit vom *IDH1*-Mutationsstatus

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen:[a]wilcox.;[b]Fischer; AML, akute myeloische Leukämie; IDH, Isocitratdehydrogenase; KM, Knochenmark; LDH, Laktatdehydrogenase; mut, mutiert; n, Anzahl der Patienten; P, P-Wert; PB, peripheres Blut; wt, Wildtyp.

	***IDH1*^{wt} (n = 206)**	***IDH1*^{mut} (n = 25)**	***P***
Alter			0.24[a]
Median	62.1	65.4	
Streubreite	18.6-82.6	25.5-76.2	
Geschlecht			0.83[b]
Männlich n (%)	105 (51.0)	12 (48)	
AML-Typ n (%)			0.76[b]
De novo	148 (71.8)	20 (80)	
Sekundäre	43 (20.9)	4 (16)	
Therapieinduziert	15 (7.3)	1 (4)	
Hämoglobin, g/dl			0.64[a]
Median	9.3	8.9	
Streubreite	5.2-13.8	6.9-12.7	
Thrombozytenzahl, x10^9/l			0.44[a]
Median	63	68	
Streubreite	3-286	20-270	
Leukozytenzahl, x10^9/l			0.13[a]
Median	3.8	2.9	
Streubreite	0.3-214	0.6-93	
LDH, U/l			0.28[a]
Median	298	264	
Streubreite	71-2360	178-978	
Blasten KM, %			0.68[a]
Median	60	64	
Streubreite	0-100	20-88	
Blasten PB, %			0.83 [a]
Median	11	16	
Streubreite	0-97	0-95	

Assoziation von *IDH1*^{mut} mit molekularen Charakteristika

Molekulargenetische Daten waren bei 231 Patienten (96%) verfügbar (Tabelle 34). *IDH1*^{mut} waren signifikant häufiger mit *DNMT3A*^{mut} (P<0.0001) assoziiert und invers mit *IDH2*^{mut} korreliert (P=0.03).

Für *CEBPA*^{dm} (P=0.36), *FLT3*-TKD (P=1), *ASXL1*^{mut} (P=0.23) und *RUNX1*^{mut} (P=0.28) lagen keine signifikanten Assoziationen mit *IDH1*^{mut} vor.

Tabelle 34. Assoziation von *IDH1*^{mut} mit molekulargenetischen Veränderungen

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: ASXL1, Additional Sex Combs Like 1; CEBPA, CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha; DNMT3A, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A; IDH, Isocitratdehydrogenase; FLT3, FMS-like tyrosine kinase-3; mut, mutiert; n, Patientenanzahl; P, P-Wert nach Fischer; RUNX1, Runt-related transcription factor 1; TKD, Tyrosinkinasedomäne; wt, Wildtyp.

	***IDH1*^{wt} (n = 206)**	***IDH1*^{mut} (n = 25)**	***P***
Molekulargenetische Daten			
FLT3-TKD, n (%)			1
Wildtyp	205 (99.5)	25 (100)	
Mutiert	1 (0.5)	0	
Fehlend	0	0	
RUNX1, n (%)			0.28
Wildtyp	168 (82)	18 (72)	
Mutiert	37 (18.1)	7 (28)	
Fehlend	1	0	
IDH2, n (%)			0.03
Wildtyp	174 (84.5)	25 (100)	
Mutiert	32 (15.5)	0	
Fehlend	0	0	
DNMT3A, n (%)			<0.0001
Wildtyp	180 (87.8)	12 (48)	
Mutiert	25 (12.2)	13 (52)	
Fehlend	1	0	
ASXL1, n (%)			0.23
Wildtyp	157 (86.3)	19 (76)	
Mutiert	25 (13.7)	6 (24)	
Fehlend	24	0	
CEBPA, n (%)			0.36
Wildtyp	184 (89.3)	25 (100)	
Mutiert monoallelisch	5 (2.4)	0	
Mutiert biallelisch	17 (8.3)	0	
Fehlend	0	0	

Assoziation von *IDH1*^{mut} mit zytogenetischen Charakteristika

Für Patienten mit *IDH1*^{mut} war zytogenetische Daten bei 211 Patienten (88%) verfügbar. Die Ergebnisse sind in Tabelle 35 zusammengefasst. Es konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen den zytogenetischen Veränderungen und *IDH1*^{mut} gezeigt werden.

Tabelle 35. Assoziation von *IDH1*^{mut} mit zytogenetischen Veränderungen

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: abnl, abnormal; IDH, Isocitratdehydrogenase; inv, Inversion; Minuszeichen (-), Verlust; mut, mutiert; n, Patientenanzahl; p, kurzer Arm des Chromosoms; P, P-Wert nach Fischer; q, langer Arm des Chromosoms; t, Translokation; wt, Wildtyp.

	***IDH1*^{wt} (n = 206)**	***IDH1*^{mut} (n = 25)**	***P***
Zytogenetische Daten			
t(6;9), n (%)	0	0	-
inv(3)/t(3;3), n (%)	3 (1.6)	68 (36.4)	7 (29.2)
t(9;11), n (%)	5 (2.7)	0	1
t(6;11), n (%)	3 (1.6)	0	1
t(v;11q23), n (%)	2 (1.1)	0	1
-7/7q, n (%)	26 (13.9)	4 (16.7)	0.76
-9q, n (%)	7 (3.7)	0	1
abnl(3q), n (%)	3 (1.6)	0	1
komplexer Karyotyp, n (%)	3 (1.6)	0	0.58
normaler Karyotyp, n (%)	68 (36.4)	7 (29.2)	0.65
Fehlend	19	1	

Ansprechen auf Doppelinduktionstherapie

Zur vergleichenden Analyse von *IDH1*^{mut} und *IDH1*^{wt} bezüglich des Ansprechens auf die Doppelinduktionstherapie konnten klinische Daten von 231 Patienten (96%) herangezogen werden.

Es ließen sich keine signifikanten Korrelationen (*P*=0.89) für *IDH1*^{mut} in Bezug auf CR, RD oder ED aufzeigen (Tabelle 36).

Tabelle 36. Assoziation des Therapieansprechens nach Doppelinduktion in Abhängigkeit vom *IDH1*-Mutationsstatus

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; n, Anzahl der Patienten; P, P-Wert nach Fischer; wt, Wildtyp.

	***IDH1*^{wt} (n = 206)**	***IDH1*^{mut} (n = 25)**	***P***
			0.89
Komplette Remission, n (%)	118 (57.3)	16 (64)	
Refraktäre Erkrankung, n (%)	14 (6.8)	1 (4)	
Früher Tod, n (%)	74 (35.9)	8 (32)	

Überlebensanalysen

Für das OS und das EFS lagen Daten von 231 Patienten (96%) vor. Für das RFS waren Daten bei 171 Patienten (71%) verfügbar. Vergleicht man *IDH1*^{mut} mit *IDH1*^{wt} in Bezug auf das Überleben der Patienten zeigt sich kein signifikanter Unterschied für das OS. Die Median-Werte betrugen 1,66 Jahre bei *IDH1*^{mut} bzw. 1,30 Jahre bei *IDH1*^{wt} Patienten (*P*=0.64). Auch für das RFS (1,10 gegen 0,98 Jahre; *P*=0.34) bzw. das EFS (0,67 gegen 0,27 Jahre; *P*=0.70) konnten keine signifikanten Korrelationen abgeleitet werden (Tabelle 37-39).

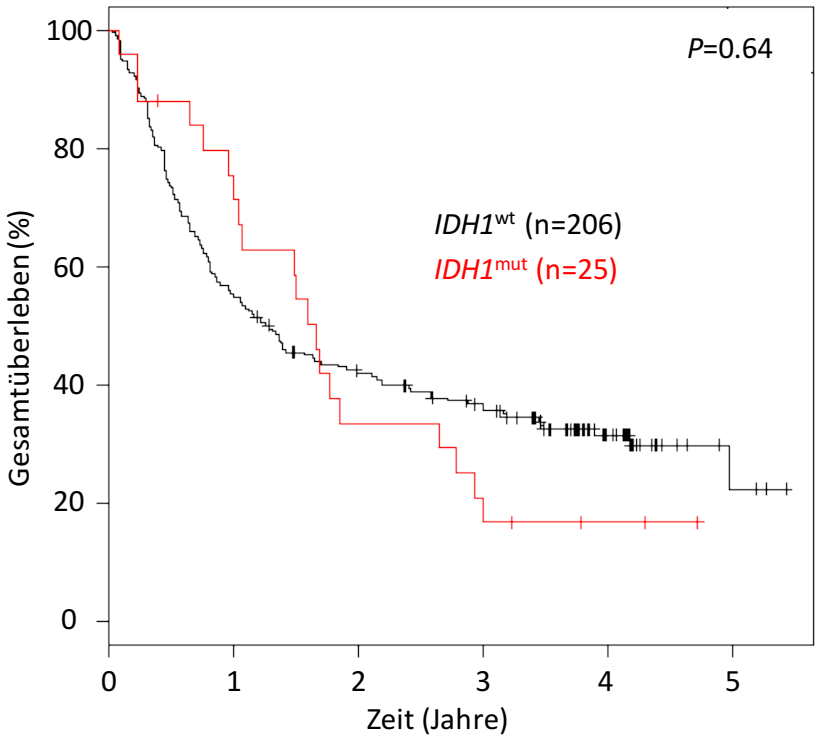

Abbildung 16. Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom *IDH1*-Mutationsstatus
Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

Tabelle 37. Univariable Analyse des Gesamtüberlebens von *IDH1*^{wt} versus *IDH1*^{mut}
Median in Jahren. Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: 95% CI, 95% Konfidenzintervall; IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

	Patientenanzahl	Ereignisse	Median	95% CI	*P*
					0.64
IDH1^{wt}	206	139	1.26	0.96-1.91	
IDH1^{mut}	25	20	1.66	1.07-2.93	

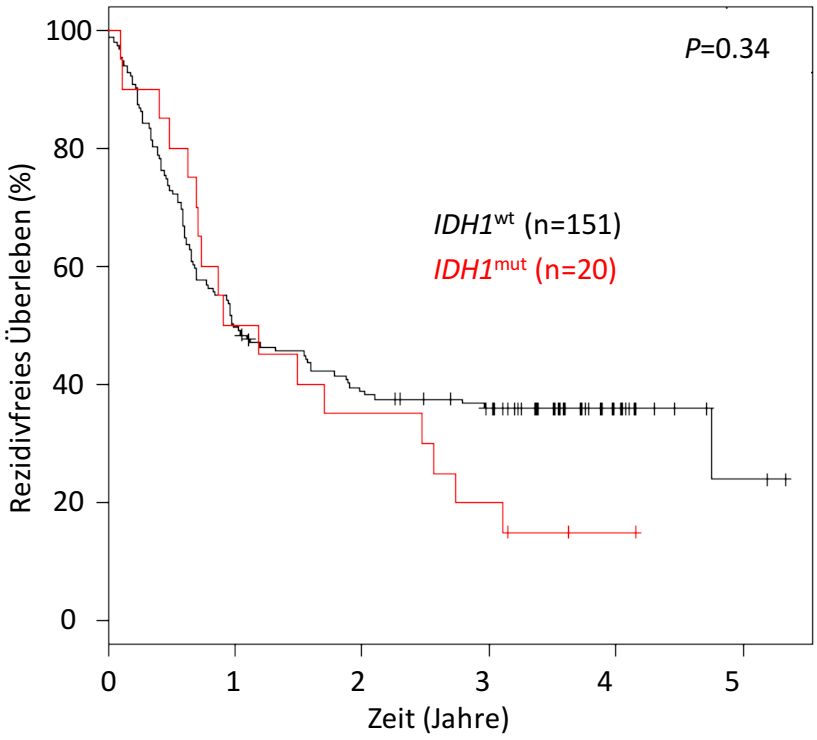

Abbildung 17. Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit vom *IDH1*-Mutationsstatus

Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

Tabelle 38. Univariable Analyse des rezidivfreien Überlebens von *IDH1*^{wt} versus *IDH1*^{mut}

Median in Jahren. Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: 95% CI, 95% Konfidenzintervall; IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

	Patientenanzahl	Ereignisse	Median	95% CI	*P*
					0.34
IDH1^{wt}	151	97	0.98	0.78-1.88	
IDH1^{mut}	20	17	1.05	0.71-2.74	

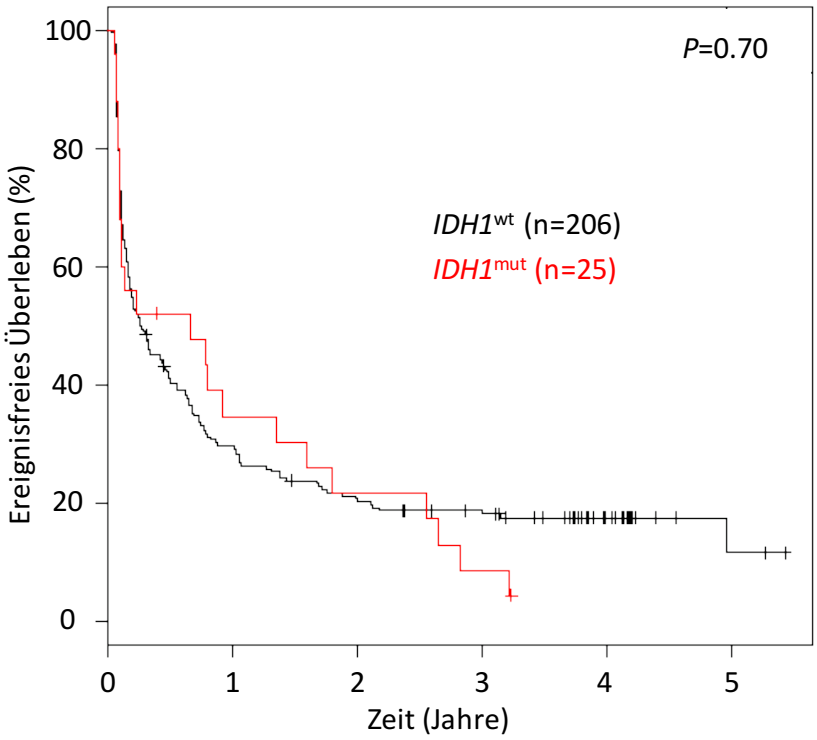

Abbildung 18. Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben in Abhängigkeit vom *IDH1*-Mutationsstatus

Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

Tabelle 39. Univariable Analyse für das ereignisfreie Überleben von *IDH1*^{wt} versus *IDH1*^{mut}

Median in Jahren. Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: 95% CI, 95% Konfidenzintervall; IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

	Patientenanzahl	Ereignisse	Median	95% CI	*P*
					0.70
IDH1^{wt}	206	169	0.27	0.19-0.46	
IDH1^{mut}	25	23	0.67	0.11-1.80	

3.3. *IDH2*

Inzidenzen und Lokalisation von *IDH2*-Mutationen

Insgesamt konnten bei 32 der 240 untersuchten Patienten (n=32; 13,3%) *IDH2*^{mut} im Exon 4 gefunden werden (Tabelle 40). Bei den drei verschiedenen Mutationstypen handelte es sich ausschließlich um missense Mutationen. Die am häufigsten detektierte Mutation war c.G419A; p.R140Q. Diese wurde in 19 Patienten festgestellt (n=19; 7,9%). Insgesamt 12 der untersuchten Patientenproben wiesen die Mutation c.G515A; p.R172K (n=12; 5,0%) auf. Ein Patient trug die Mutation c.C418T; p.R140W (n=1; 0,4%). Die Position 140 ist an der Bildung der katalytischen Domäne von *IDH2* beteiligt und war hier in 20 Fällen von einer Substitution des Arginins betroffen.

Kein Patient wies neben *IDH2*^{mut} zusätzliche *IDH1*^{mut} auf. Lediglich bei 7 Patienten mit *IDH2*^{mut} lag der Polymorphismus c.C315T; p.G106G im Exon 4 des *IDH1*-Gens vor (n=7; 2,9%). Vier Patienten trugen dabei die *IDH2*^{mut} c.G419A; p.R140Q und drei die Mutation c.G515A; p.R172K.

Tabelle 40. *IDH2*-Mutationstypen

Die Bestimmung der Lokalisation der Mutationen erfolgte anhand der Referenzsequenzen mit der Eingangsnummer cDNA NM_002168.2 aus der Gen-Datenbank (UCSC Genome Bioinformatics). Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: A, Alanin; C, Cystein; G, Glycin; IDH, Isocitratdehydrogenase; K, Lysin; L, Leucin; Q, Glutamin; R, Arginin; T, Threonin; UCSC, University of California Santa Cruz; W, Tryptophan.

Mutationstyp	Polymorphismustyp (*IDH1*)
c.C418T; p.R140W	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	
c.G419A; p.R140Q	c.C315T; p.G106G
c.G419A; p.R140Q	c.C315T; p.G106G
c.G419A; p.R140Q	c.C315T; p.G106G
c.G419A; p.R140Q	c.C315T; p.G106G
c.G515A; p.R172K	
c.G515A; p.R172K	
c.G515A; p.R172K	
c.G515A; p.R172K	
c.G515A; p.R172K	
c.G515A; p.R172K	
c.G515A; p.R172K	
c.G515A; p.R172K	
c.G515A; p.R172K	
c.G515A; p.R172K	c.C315T; p.G106G
c.G515A; p.R172K	c.C315T; p.G106G
c.G515A; p.R172K	c.C315T; p.G106G

Assoziation von *IDH2*^{mut} mit klinischen Charakteristika

Es lagen für 233 Patienten (97%) klinische Daten zu Auswertung vor. Die Korrelation des *IDH2*-Mutationsstatus im Hinblick auf die klinischen Charakteristika der Patienten zeigte keine signifikanten Unterschiede für das Geschlecht (*P*=0.70), den AML-Typ (*P*=0.95), die Thrombozytenzahl (*P*=0.24), den LDH-Wert (*P*=0.24), den Blastenanteil im PB (*P*=0.27) oder im KM (*P*=0.25). *IDH2*^{mut} waren jedoch signifikant mit einem höheren Alter (*P*=0.007) assoziiert. Die Korrelationen mit dem niedrigeren Hämoglobinwert (*P*=0.08) und der geringerer Leukozytenzahl (*P*=0.09) lagen im Trend (Tabelle 41).

Tabelle 41. Prätherapeutische klinische Charakteristika in Abhängigkeit vom *IDH2*-Mutationsstatus

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: [a]wilcox.; [b]Fischer; AML, akute myeloische Leukämie; IDH, Isocitratdehydrogenase; KM, Knochenmark; LDH, Laktatdehydrogenase; mut, mutiert; n, Anzahl der Patienten; P, P-Wert; PB, peripheres Blut; wt, Wildtyp.

	***IDH2*^{wt} (n = 201)**	***IDH2*^{mut} (n = 32)**	***P***
Alter			0.01[a]
Median	61.03	67.495	
Streubreite	18.62-82.6	37.65-78.63	
Geschlecht			0.70[b]
Männlich, n (%)	104 (51.7)	15 (46.9)	
AML-Typ			0.95[b]
De novo, n (%)	144 (71.6)	24 (75)	
Sekundäre	43 (21.4)	6 (18.8)	
Therapieinduziert	14 (7)	2 (6.3)	
Hämoglobin, g/dl			0.08[a]
Median	9.3	8.89	
Streubreite	5.19-13.8	6.3-13.1	
Thrombozytenzahl, x10^9/l			0.24[a]
Median	63	70.5	
Streubreite	3-1286	13-419	
Leukozytenzahl, x10^9/l			0.09[a]
Median	3.95	2.045	
Streubreite	0.3-214	0.6-92	
LDH, U/l			0.24[a]
Median	300.5	276	
Streubreite	71-2360	97-1077	
Blasten KM, %			0.27[a]
Median	56	69	
Streubreite	0-100	25-95	
Blasten PB, %			0.25[a]
Median	10.5	21	
Streubreite	0-97	0-94	

Assoziation von *IDH2*^{mut} mit molekularen Charakteristika

Molekulargenetische Daten waren bei 233 (97%) Patienten verfügbar (Tabelle 42). Es zeigten sich *IDH2*^{mut} mit *DNMT3A*^{mut} (*P*<0.0001) assoziiert. Signifikant seltener traten hingegen *IDH1*^{mut} (*P*=0.03) und *CEBPA*^{dm} (*P*=0.02) mit *IDH2*^{mut} auf.
Es zeigte sich keine Korrelation mit *FLT3*-TKD (*P*=1), *ASXL1*^{mut} (*P*=0.15) und *RUNX1*^{mut} (*P*=0.47) mit *IDH2*^{mut}.

Tabelle 42. Assoziation von *IDH2*^{mut} mit molekulargenetischen Veränderungen

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: ASXL1, Additional Sex Combs Like 1; CEBPA, CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha; DNMT3A, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A; IDH, Isocitratdehydrogenase; FLT3, FMS-like tyrosine kinase-3; mut, mutiert; n, Patientenanzahl; P, P-Wert nach Fischer; RUNX1, Runt-related transcription factor 1; TKD, Tyrosinkinasedomäne; wt, Wildtyp.

	***IDH2*^{wt} (n = 201)**	***IDH2*^{mut} (n = 32)**	***P***
Molekulargenetische Daten			
FLT3-TKD, n (%)			1
Wildtyp	200 (99.5)	32 (100)	
Mutiert	1 (0.5)	0	
Fehlend	0	0	
RUNX1, n (%)			0.47
Wildtyp	163 (81.5)	24 (75)	
Mutiert	37 (18.5)	8 (25)	
Fehlend	1	0	
IDH1, n (%)			0.03
Wildtyp	174 (87.4)	32 (100)	
Mutiert	25 (12.6)	0	
Fehlend	2	0	
DNMT3A, n (%)			<0.0001
Wildtyp	175 (87.5)	18 (56.3)	
Mutiert	25 (12.5)	14 (43.8)	
Fehlend	1	0	
ASXL1, n (%)			0.15
Wildtyp	157 (86.7)	21 (75)	
Mutiert	24 (13.3)	7 (25)	
Fehlend	20	4	
CEBPA, n (%)			0.02
Wildtyp	183 (91)	28 (87.5)	
Mutiert monoallelisch	2 (1)	3 (9.4)	
Mutiert biallelisch	16 (8)	1 (3.1)	
Fehlend	0	0	

Assoziation von *IDH2*^{mut} mit zytogenetischen Charakteristika

Für *IDH2*^{mut} waren zytogenetische Daten bei 213 (89%) Patienten verfügbar. Hier zeigten sich *IDH2*^{mut} im Trend mit abnl(3q) (*P*=0.06) assoziiert. Für die restlichen zytogenetischen Veränderungen konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 43 zusammengefasst.

Tabelle 43. Assoziation von *IDH2*^{mut} mit zytogenetischen Veränderungen

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: abnl, abnormal; IDH, Isocitratdehydrogenase; inv, Inversion; Minuszeichen (-), Verlust; mut, mutiert; n, Patientenanzahl; p, kurzer Arm des Chromosoms; P, P-Wert nach Fischer; q, langer Arm des Chromosoms; t, Translokation; wt, Wildtyp.

	***IDH2*^{wt} (n = 201)**	***IDH2*^{mut} (n = 32)**	***P***
zytogenetische Daten			
t(6;9), n (%)	0	0	-
inv(3)/t(3;3), n (%)	4 (2.2)	0	1
t(9;11), n (%)	5 (2.8)	0	1
t(6;11), n (%)	3 (1.7)	0	1
t(v;11q23), n (%)	5 (2.8)	0	1
-7/7q, n (%)	26 (14.4)	4 (12.5)	1
-9q, n (%)	7 (3.9)	0	0.60
abnl(3q), n (%)	1 (0.6)	2 (6.3)	0.06
komplexer Karyotyp, n (%)	7 (3.9)	1 (3.2)	1
normaler Karyotyp, n (%)	60 (33.2)	15 (46.9)	0.16
Fehlend	20	0	

Ansprechen auf Doppelinduktionstherapie

Zur vergleichenden Analyse von *IDH2*^{mut} und *IDH2*^{wt} bezüglich des Ansprechens auf die Doppelinduktionstherapie konnten klinische Daten von 233 (97%) Patienten herangezogen werden. Patienten mit *IDH2*^{mut} wiesen dabei im Vergleich zum *IDH2*^{wt} häufiger eine RD auf (44% versus 34%); die CR-Rate war bei den *IDH2*^{mut} Patienten niedriger als bei *IDH2*^{wt} Patienten (44% versus 60%).
Jedoch ließen sich keine signifikanten Korrelationen (*P*=0.11) für *IDH2*^{mut} in Bezug auf CR, RD oder ED aufzeigen (Tabelle 44).

Tabelle 44. Assoziation des Therapieansprechens nach Doppelinduktion in Abhängigkeit vom *IDH2*-Mutationsstatus

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; n, Anzahl der Patienten; P, P-Wert nach Fischer; wt, Wildtyp.

	***IDH2*^{wt} (n = 201)**	***IDH2*^{mut} (n = 32)**	***P***
			0.11
Komplette Remission, n (%)	121 (60.2)	14 (43.8)	
Refraktäre Erkrankung, n (%)	11 (5.5)	4 (12.5)	
Früher Tod, n (%)	69 (34.3)	14 (43.8)	

Überlebensanalysen

Für das OS und das EFS lagen Daten von 233 Patienten (97%) vor. Für das RFS waren Daten bei 172 Patienten (72%) verfügbar.

Bei Patienten mit *IDH2*^{mut} zeigte sich ein im Trend schlechteres EFS als bei Patienten mit *IDH2*^{wt} (*P*=0.06). Der Median-Wert für das EFS betrug bei Patienten mit *IDH2*^{mut} 0,12 Jahre gegenüber 0,34 Jahre für *IDH2*^{wt}. Weder für das OS (1,17 versus 1,39 Jahre; *P*=0.22) noch für das RFS (0,96 versus1,04 Jahre; *P*=0.93) konnte ein signifikanter Einfluss von *IDH2*^{mut} im Vergleich zu *IDH2*^{wt} gezeigt werden (Tabelle 45-47).

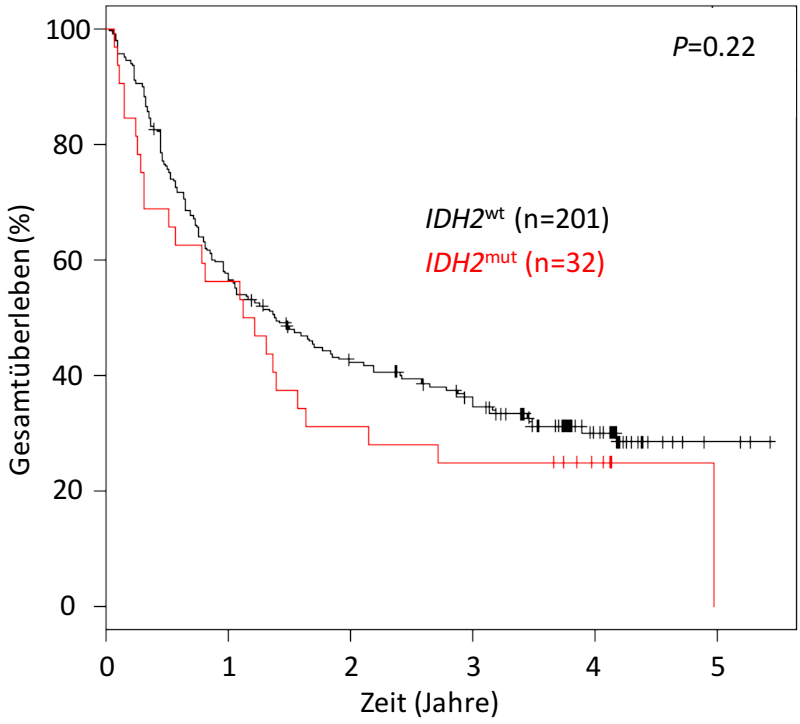

Abbildung 19. Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom *IDH2*-Mutationsstatus

Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

Tabelle 45. Univariable Analyse des Gesamtüberlebens von *IDH2*^{wt} versus *IDH2*^{mut}

Median in Jahren. Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: 95% CI, 95% Konfidenzintervall; IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

	Patientenanzahl	Ereignisse	Median	0.95% CI	*P*
					0.22
***IDH2*^{wt}**	201	136	1.39	1.04-2	
***IDH2*^{mut}**	32	25	1.17	0.58-2.16	

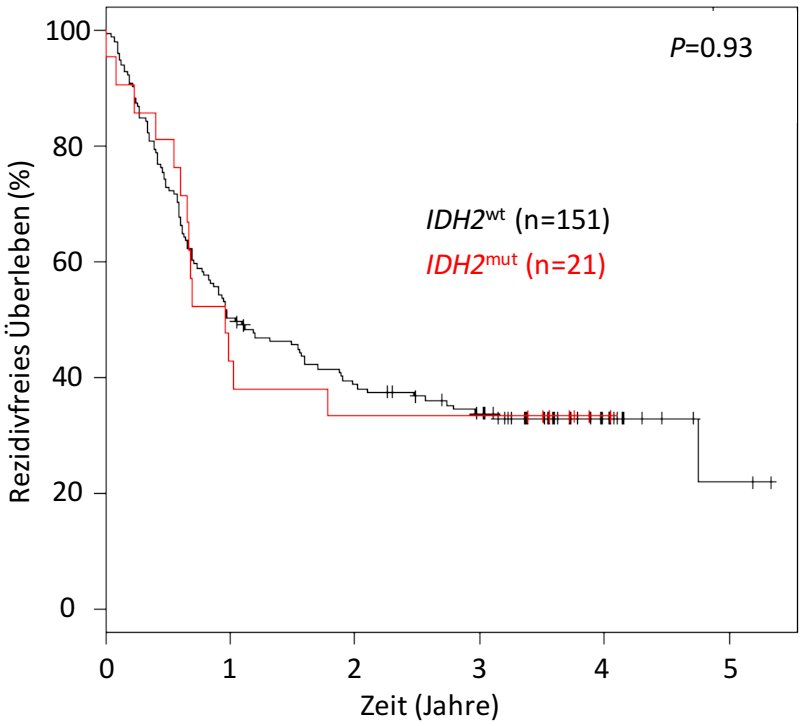

Abbildung 20. Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit vom *IDH2*-Mutationsstatus

Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

Tabelle 46. Univariable Analyse des rezidivfreien Überlebens von *IDH2*^{wt} versus *IDH2*^{mut}

Median in Jahren. Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: 95% CI, 95% Konfidenzintervall; IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

	Patientenanzahl	Ereignisse	Median	0.95UCL	*P*
					0.93
IDH2^{wt}	151	101	1.04	0.82-1.88	
IDH2^{mut}	21	14	0.96	0.65- /	

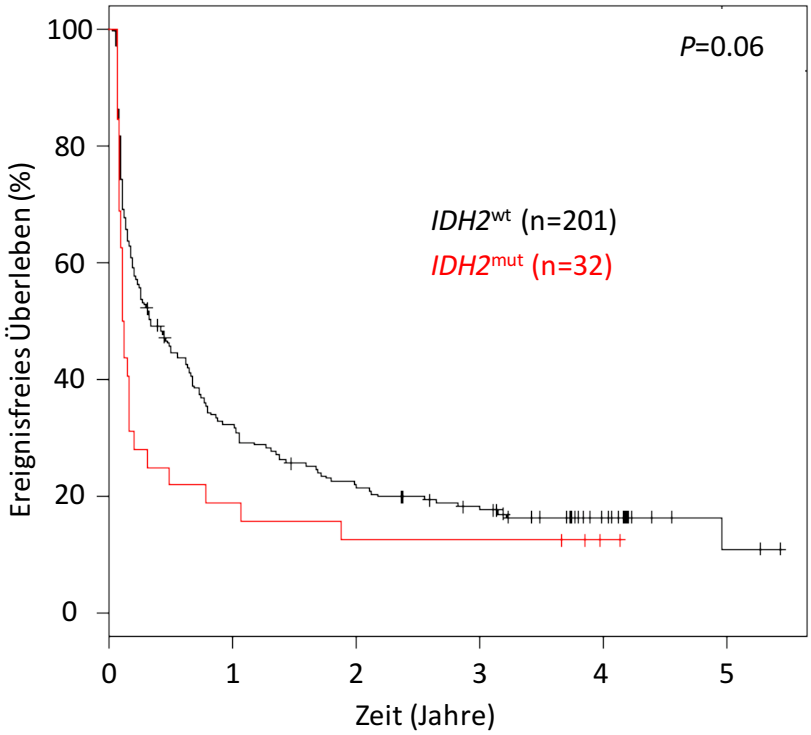

Abbildung 21. Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben in Abhängigkeit vom *IDH2*-Mutationsstatus

Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

Tabelle 47. Univariable Analyse des ereignisfreien Überlebens von *IDH2*^{wt} versus *IDH2*^{mut}

Median in Jahren. Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: 95% CI, 95% Konfidenzintervall; IDH, Isocitratdehydrogenase; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

	Patientenanzahl	Ereignisse	Median	95% CI	*P*
					0.06
***IDH2*^{wt}**	201	166	0.34	0.24-0.64	
***IDH2*^{mut}**	32	28	0.12	0.1-0.21	

3.4. Korrelation mit *IDH1* und *IDH2* Mutationen

Inzidenzen und Lokalisation von IDH_{komb}^{mut}

Es wurden insgesamt 240 Patientenproben auf *IDH1* und *IDH2* (IDH_{komb}^{mut}, in Kombination) analysiert. Zusammengenommen konnten 57 IDH_{komb}^{mut} (n=57; 23,9%) detektiert werden. Dabei zeigte sich in 32 Fällen das *IDH2*-Gen (n=32; 13,4%) und in 25 Fällen das *IDH1*-Gen (n=25; 10,5%) mutiert. Bei keinem der Patienten traten $IDH1^{mut}$ und $IDH2^{mut}$ simultan auf.

Assoziation von IDH_{komb}^{mut} mit klinischen Charakteristika

Für 231 Patienten (96%) lagen klinische Daten zu Auswertung vor. Sowohl für das Alter (P=0.005) als auch die Leukozytenzahl (P=0.02) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den IDH^{wt} und den IDH_{komb}^{mut} Patienten. Hier waren Patienten mit IDH_{komb}^{mut} signifikant älter und hatten signifikant niedrigere Leukozytenzahlen. Darüber hinaus hatten Patienten mit IDH_{komb}^{mut} tendenziell geringere LDH-Werte als Patienten mit IDH^{wt} (P=0.07). Keine signifikanten Unterschiede konnten für das Geschlecht (P=0.83), den AML-Typen (P=0.76), den Hämoglobinwert (P=0.64), die Thrombozytenzahl (P=0.44), den Blastenanteil im PB (P=0.68) oder im KM (P=0.83) gezeigt werden. In Tabelle 48 sind die Ergebnisse zur Assoziation von IDH_{komb}^{mut} mit klinischen Charakteristika zusammengefasst.

Tabelle 48. Prätherapeutische klinische Charakteristika in Abhängigkeit vom IDH_{komb}-Mutationsstatus

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: [a]wilcox.; [b]Fischer; AML, akute myeloische Leukämie; KM, Knochenmark; IDH, Isocitratdehydrogenase; komb, IDH1 und IDH2 in Kombination; LDH, Laktatdehydrogenase; mut, mutiert; n, Anzahl der Patienten; P, P-Wert; PB, peripheres Blut; wt, Wildtyp.

	IDH^{wt} (n = 206)	IDH_{komb}^{mut} (n = 25)	*P*
Alter			0.01[a]
Median	60.6	66.3	
Streubreite	18.6-82.6	25.5-78.6	
Geschlecht			0.45[b]
Männlich n (%)	93 (52.5)	26 (46.4)	
AML-Typ			0.78[b]
De novo	125 (70.6)	43 (76.8)	
Sekundäre	39 (22)	10 (17.9)	
Therapieinduziert	13 (7.3)	3 (5.4)	
Hämoglobin, g/dl			0.11[a]
Median	9.4	8.9	
Streubreite	5.2-13.8	6.3-13.1	
Thrombozytenzahl, x10^9/l			0.14[a]
Median	63	68.5	
Streubreite	3-1286	13-419	
Leukozytenzahl, x10^9/l			0.02[a]
Median	4.2	2.2	
Streubreite	0.3-214	0.6-93	
LDH, U/l			0.07[a]
Median	306.5	269	
Streubreite	71-2360	97-1077	
Blasten KM, %			0.31[a]
Median	55	66	
Streubreite	0-100	20-95	
Blasten PB, %			0.34[a]
Median	10	17.5	
Streubreite	0-97	0-95	

Assoziation von IDH_{komb}^{mut} mit molekularen Charakteristika

Molekulargenetische Daten waren bei 233 (97%) Patienten verfügbar (Tabelle 49). Beim Betrachten der IDH_{komb} waren diese signifikant häufiger mit Mutationen der Gene *DNMT3A* (*P*<0.0001), *ASXL1* (*P*=0.02), *IDH1* (*P*<0.0001) und *IDH2* (*P*<0.0001) assoziiert. $CEBPA^{dm}$ (*P*=0.04) traten in diesem Zusammenhang hingegen seltener auf. Weder für Mutationen der *FLT3*-TKD (*P*=1) noch des *RUNX1*-Gens (*P*=0.12) konnten signifikante Korrelationen nachgewiesen werden.

Tabelle 49. Assoziation von IDH_{komb}^{mut} mit molekulargenetischen Veränderungen

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: ASXL1, Additional Sex Combs Like 1; CEBPA, CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha; DNMT3A, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A; FLT3, FMS-like tyrosine kinase-3; IDH, Isocitratdehydrogenase; komb, IDH1 und IDH2 in Kombination; mut, mutiert; n, Patientenanzahl; P, P-Wert nach Fischer; RUNX1, Runt-related transcription factor 1; TKD, Tyrosinkinasedomäne; wt, Wildtyp.

	IDH^{wt} (n = 177)	IDH_{komb}^{mut} (n = 56)	*P*
Molekulargenetische Daten			
FLT3-TKD, n (%)			1
Wildtyp	176 (99.4)	56 (100)	
Mutiert	1 (0.6)	0	
Fehlend	0	0	
RUNX1, n (%)			0.12
Wildtyp	146 (83)	41 (73.2)	
Mutiert	30 (17.1)	15 (26.8)	
Fehlend	1	0	
IDH1, n (%)			<0.0001
Wildtyp	174 (99.4)	32 (57.1)	
Mutiert	1 (0.6)	24 (42.9)	
Fehlend	2	0	
IDH2, n (%)			<0.0001
Wildtyp	177 (100)	24 (42.9)	
Mutiert	0	32 (57.1)	
Fehlend	0	0	
DNMT3A, n (%)			<0.0001
Wildtyp	164 (93.2)	29 (51.8)	
Mutiert	12 (6.8)	27 (48.2)	
Fehlend	1	0	
ASXL1, n (%)			0.02
Wildtyp	139 (88.5)	39 (75)	
Mutiert	18 (11.5)	13 (25)	
Fehlend	20	4	
CEBPA, n (%)			0.04
Wildtyp	159 (89.8)	52 (92.9)	
Mutiert monoallelisch	2 (1.1)	3 (5.4)	
Mutiert biallelisch	16 (9)	1 (1.8)	
Fehlend	0	0	

Assoziation von IDH_{komb}^{mut} mit zytogenetischen Charakteristika

Für IDH_{komb}^{mut} waren zytogenetische Daten von 213 (89%) Patienten verfügbar. Die Ergebnisse sind in Tabelle 50 zusammengefasst. Es zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zwischen den zytogenetischen Veränderungen und IDH_{komb}^{mut}.

Tabelle 50. Assoziation von IDH_{komb}^{mut} mit zytogenetischen Veränderungen

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: abnl, abnormal; IDH, Isocitratdehydrogenase; inv, Inversion; Minuszeichen (-), Verlust; komb, IDH1 und IDH2 in Kombination; mut, mutiert; p, kurzer Arm des Chromosoms; P, P-Wert nach Fischer; q, langer Arm des Chromosoms; t, Translokation; wt, Wildtyp.

	***IDH*^{wt} (n = 177)**	***IDH*$_{komb}^{mut}$ (n = 56)**	***P***
Zytogenetische Daten			
t(6;9), n (%)	0	0	-
inv(3)/t(3;3), n (%)	3 (1.9)	1 (1.8)	1
t(9;11), n (%)	5 (3.2)	0	0.33
t(6;11), n (%)	3 (1.9)	0	0.57
t(v;11q23), n (%)	5 (3.2)	0	1
-7/7q, n (%)	22 (14)	8 (14.3)	1
-9q, n (%)	7 (4.5)	0	0.19
abnl(3q), n (%)	1 (0.6)	2 (3.6)	0.17
komplexer Karyotyp, n (%)	6 (3.8)	2 (3.6)	1
normaler Karyotyp, n (%)	53 (33.8)	22 (39.3)	0.52
Fehlend	20	0	

Ansprechen auf Doppelinduktionstherapie

Zur vergleichenden Analyse von IDH_{komb}^{mut} und IDH^{wt} bezüglich des Ansprechens auf die Doppelinduktionstherapie konnten klinische Daten von 231 Patienten (96%) herangezogen werden.

Es ließen sich keine signifikanten Korrelationen (P=0.53) für IDH_{komb}^{mut} in Bezug auf das Erreichen einer CR, RD oder ED aufzeigen (Tabelle 51).

Tabelle 51. Assoziation des Therapieansprechens nach Doppelinduktion in Abhängigkeit vom IDH_{komb}-Mutationsstatus

Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.
Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; komb, IDH1 und IDH2 in Kombination; mut, mutiert; n, Anzahl der Patienten; P, P-Wert nach Fischer; wt, Wildtyp.

	***IDH*^{wt} (n = 206)**	***IDH*$_{komb}^{mut}$ (n = 25)**	***P***
			0.53
Komplette Remission, n (%)	105 (59.3)	30 (53.6)	
Refraktäre Erkrankung, n (%)	10 (5.7)	5 (8.9)	
Früher Tod, n (%)	62 (35)	21 (37.5)	

Überlebensanalysen

Für das OS und das EFS lagen Daten von 233 der 240 Patienten (97%) vor. Für das RFS waren Daten bei 172 Patienten (72%) verfügbar.

Es konnte kein signifikanter Einfluss der IDH_{komb}^{mut} auf das OS gezeigt werden. Die mediane Überlebenszeit betrug beim IDH_{komb}^{mut} 1,40 Jahre gegenüber 1,29 Jahre bei Patienten mit IDH^{wt} (P=0.27). Ebenso erwiesen sich die Assoziationen des IDH_{komb}-Mutationsstatus mit dem RFS (0,96 gegen 1,04 Jahre; P=0.44) und dem ereignisfreien Überleben (0,15 gegen 0,33 Jahre; P=0.12) als nicht signifikant (Tabelle 52-54).

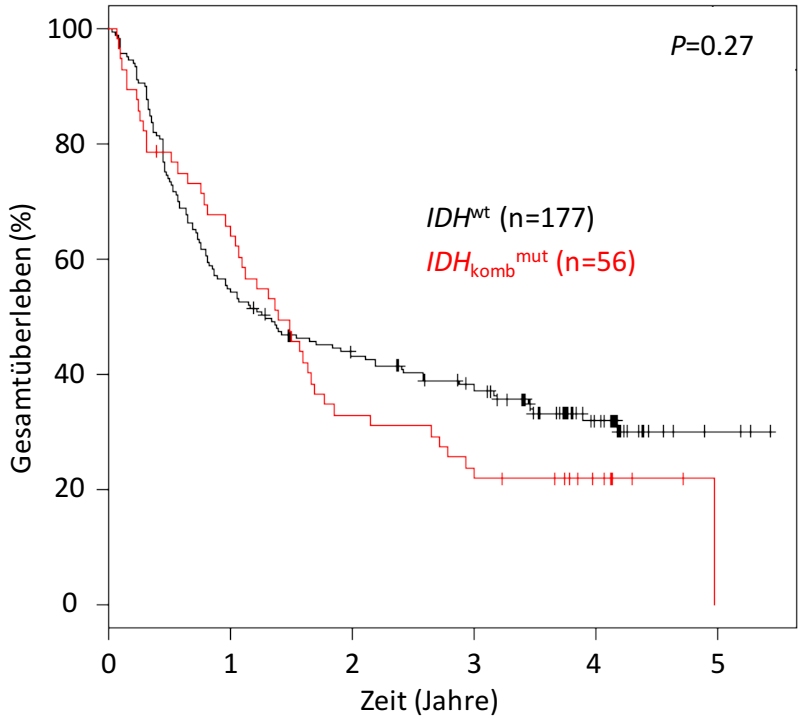

Abbildung 22. Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom IDH_{komb}-Mutationsstatus

Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; komb, IDH1 und IDH2 in Kombination; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

Tabelle 52. Univariable Analyse des Gesamtüberlebens von IDH^{wt} versus IDH_{komb}^{mut}

Median in Jahren. Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: 95% CI, 95% Konfidenzintervall; IDH, Isocitratdehydrogenase; komb, IDH1 und IDH2 in Kombination; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

	Patientenanzahl	Ereignisse	Median	95% CI	*P*
					0.27
***IDH*^{wt}**	177	117	1.29	0.89-2.2	
***IDH*$_{komb}^{mut}$**	56	44	1.4	1.07-1.77	

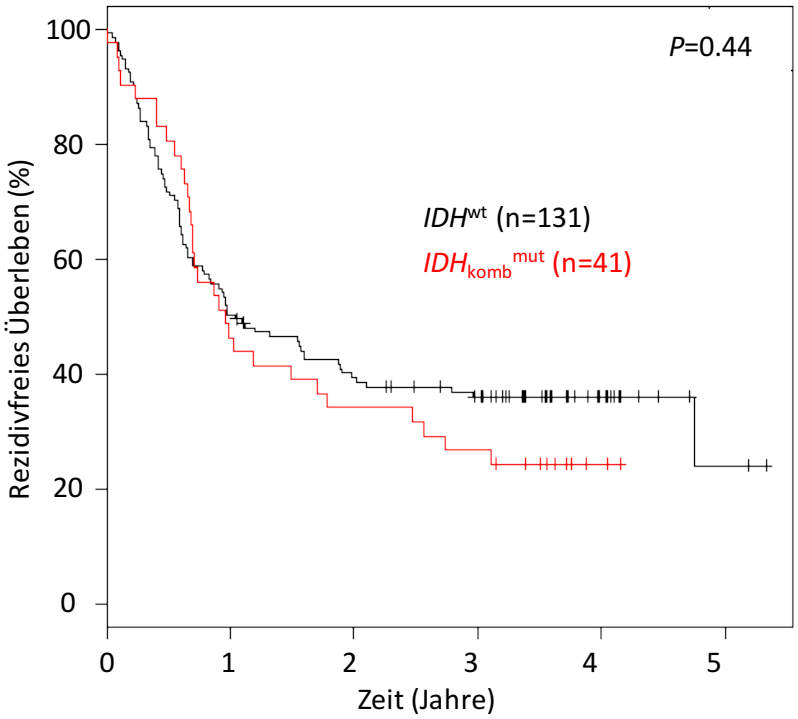

Abbildung 23. Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit vom IDH_{komb}-Mutationsstatus

Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; komb, IDH1 und IDH2 in Kombination; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

Tabelle 53. Univariable Analyse des rezidivfreien Überlebens von IDH^{wt} versus IDH_{komb}^{mut}

Median in Jahren. Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: 95% CI, 95% Konfidenzintervall; IDH, Isocitratdehydrogenase; komb, IDH1 und IDH2 in Kombination; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

	Patientenanzahl	Ereignisse	Median	95% CI	*P*
					0.44
***IDH*^{wt}**	131	84	1.04	0.78-1.9	
***IDH*$_{komb}^{mut}$**	41	31	0.96	0.7-2.47	

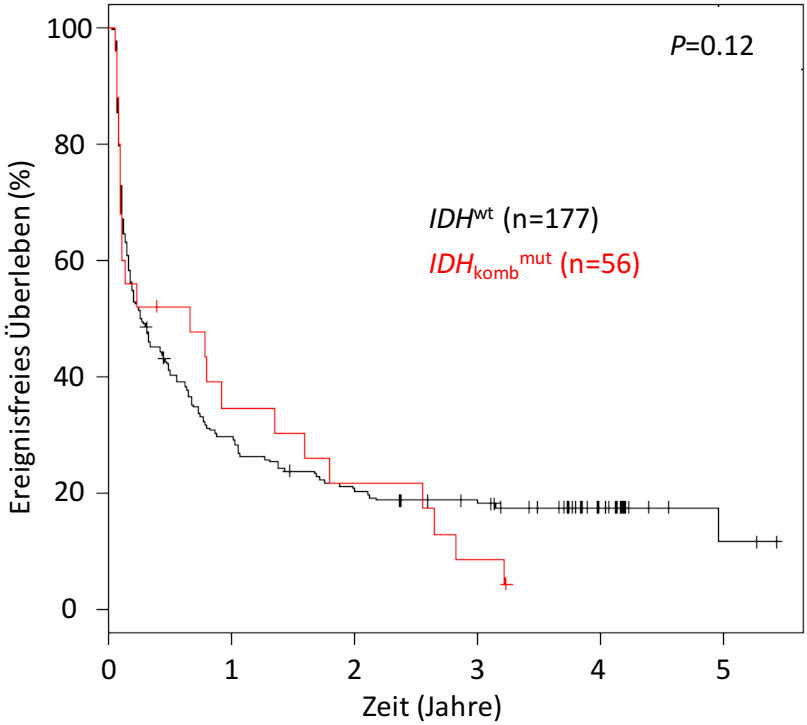

Abbildung 24. Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit vom IDH_{komb}-Mutationsstatus

Abkürzungen: IDH, Isocitratdehydrogenase; komb, IDH1 und IDH2 in Kombination; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

Tabelle 54. Univariable Analyse des ereignisfreien Überlebens von IDH^{wt} versus IDH_{komb}^{mut}

Median in Jahren. Die Daten stammen aus der AMLSG 12-09 Studie.

Abkürzungen: 95% CI, 95% Konfidenzintervall; IDH, Isocitratdehydrogenase; komb, IDH1 und IDH2 in Kombination; mut, mutiert; P, P-Wert; wt, Wildtyp.

	Patientenanzahl	Ereignisse	Median	95% CI	*P*
					0.12
***IDH*^{wt}**	177	144	0.33	0.24-0.62	
***IDH*$_{komb}^{mut}$**	56	50	0.15	0.11-0.67	

4. Diskussion

Das Primärziel dieser Arbeit war es, die Inzidenz von *DNMT3A*^{mut}, *IDH1*^{mut} und *IDH2*^{mut} in der Kohorte der im Rahmen der AMLSG 12-09 Studie behandelten Patienten zu bestimmen sowie die daraus resultierenden Ergebnisse im Kontext der klinischen Charakteristika und der Verlaufsdaten auf ihre prognostische Relevanz hin zu prüfen. Dazu wurden insgesamt 241 Patienten untersucht.

DNMT3A

Im Rahmen dieser Arbeit konnten *DNMT3A*^{mut} bei 17,8% (43/241) aller AML-Patienten diagnostiziert werden. Diese Inzidenz steht im Einklang mit vorhergehenden Publikationen: Die beschriebene *DNMT3A*^{mut}-Inzidenz in den publizierten Studien reichte von 17,8% (87/489) bei Thol et al. 2011 über 20,5% (23/112) bei Yan et al. 2011, 20,9% (384/1770) bei Gaidzik et al. 2011, 22,1% (62/281) bei Ley et al., bis hin zu 32,4% (142/415) bei Marcucci et al. 2012. Die geringen Unterschiede in den einzelnen Studien sind mit den Unterschieden in den untersuchten Patientenkohorten (z.B. Alter) zu erklären.

In der hier vorliegenden Arbeit handelte es sich bei den identifizierten *DNMT3A*^{mut} ausschließlich um missense Mutationen. Dies ist analog zu publizierten Studien, in denen nur vereinzelt nonsense-, splice-site oder frameshift-Mutationen durch Deletionen bzw. Insertionen gefunden wurden (Gaidzik, Bullinger et al. 2011, Marková, Michková et al. 2012, Thol, Damm et al. 2011, Ley, Ding et al. 2010, Yan, Xu et al. 2011).

In unserer Studie zeigte sich der Großteil (65%) der detektierten *DNMT3A*^{mut} an Position R882 in Exon 23. Dieses Ergebnis ist konsistent mit bisher veröffentlichten Publikationen, welche ebenfalls rund 2/3 der Mutationen im Kodon R882 sahen (Gaidzik, Bullinger et al. 2011, Marková, Michková et al. 2012, Thol, Damm et al. 2011, Ley, Ding et al. 2010, Yan, Xu et al. 2011).

Bei den von uns detektierten R882-*DNMT3A*^{mut} handelte es sich vor allem um die Substitution der Aminosäure Arginin durch Histidin p.R882H (16/28; 57,1%) beziehungsweise Cystein p.R882C (10/28; 35,7%). Auch diese Ergebnisse spiegeln sich in mehreren Publikationen wider. So sind p.R882H-Mutationen mit ca. 53%-73% und p.R882C-Mutationen mit ca. 19%- 40% beschrieben worden (Gaidzik, et al. 2013, Marková, Michková et al. 2012, Ley, Ding et al. 2010).

Die in unserer Arbeit detektierte Mutation c.C2644A; p.R882S (n=1) wurde ebenfalls in anderen Studien beschrieben (Marcucci, Metzeler et al. 2012). Weitere non-R882-*DNMT3A*^{mut} befanden sich vor allem in Exon 14 (6/28; 21,5%).

In unserer Studie waren *DNMT3A*^{mut} signifikant mit geringeren LDH-Werten assoziiert (*P*=0.05). Dieses Ergebnis konnte in der Studie von Gaidzik et al. nicht aufgezeigt werden. Hier waren die LDH-Level bei *DNMT3A*^{mut} Patienten erhöht (Gaidzik, Schlenk et al. 2013). Diese unterschiedliche Beobachtung wird durch die unterschiedlichen Patientenkohorten erklärt. In der Studie von Gaidzik et al. hatte ein großer Teil der Patienten eine AML mit normalem Karyotyp; ebenso waren hier Patienten mit *FLT3*-ITD und *NPM1* Mutation eingeschlossen, genetische Aberrationen die mit einer erhöhten Leukozytenzahl und einer erhöhten LDH assoziiert sind. In der Literatur zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen *DNMT3A*^{mut} und erhöhten Thrombozytenwerten (Thol, Damm et al. 2011, Ribeiro, Pratcorona et al. 2012). In unseren Untersuchungen konnten wir diesen Zusammenhang nicht nachweisen. Patienten unserer Studie, die *DNMT3A*^{mut} aufwiesen, zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Leukozytenzahl oder dem Blastenanteil im KM. Gegensätzlich dazu waren *DNMT3A*^{mut} in anderen Studien signifikant mit erhöhten Leukozytenzahlen (Yan, Xu et al. 2011, Ley, Ding et al. 2010, Thol, Damm et al. 2011, Ribeiro, Pratcorona et al. 2012, Marcucci, Metzeler et al. 2012, Gaidzik, Schlenk et al. 2013) sowie vermehrtem Blastenanteil im KM assoziiert (Marcucci, Metzeler et al. 2012, Gaidzik, Schlenk et al. 2013). Diese Diskrepanz ist wie bereits oben erwähnt durch den Ausschluss von Patienten mit proproliferativen Mutationen wie *NPM1*^{mut} sowie *FLT3*-ITD durch das Studienprotokoll zurückzuführen.

In publizierten Studien waren *DNMT3A*^{mut} mit einem höheren Lebensalter der Patienten assoziiert (Yan, Xu et al. 2011, Thol, Damm et al. 2011, Gaidzik, Schlenk et al. 2013). Ebenso konnten einige Arbeiten eine Verbindung zwischen dem Auftreten von *DNMT3A*^{mut} und dem weiblichen Geschlecht aufzeigen (Gaidzik, Schlenk et al. 2013, Yan, Xu et al. 2011, Marková, Michková et al. 2012). In unseren Analysen konnte keine signifikante Korrelation von *DNMT3A*-Mutationsstatus mit Alter und Geschlecht der Patienten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Arbeit von Marcucci et al. 2012, welche ebenfalls Zusammenhänge dieser Art nicht beobachten konnte.

Publizierte Daten zeigten signifikante Korrelationen zwischen *DNMT3A*^{mut} und Mutationen der Gene *FLT3* und *NPM1* (Gaidzik, Schlenk et al. 2013, Ley, Ding et al. 2010, Thol, Damm et al. 2011, Marcucci, Metzeler et al. 2012). Aufgrund des Studienprotokolls der AMLSG 12-09 Studie wurden Patienten mit *FLT3*^{mut} und *NPM1*^{mut} ausgeschlossen, weshalb die Korrelation mit diesen Genen hier entfällt. In dieser Arbeit waren *DNMT3A*^{mut} mit *IDH1*^{mut} (P<0.0001) und *IDH2*^{mut} (P<0.0001), sowie mit *RUNX1*^{mut} (P=0.003) signifikant häufiger assoziiert. In weiteren Veröffentlichungen wurden ähnliche Beobachtungen bezüglich der *IDH*^{mut}-Rate bei *DNMT3A*^{mut} Patienten beschrieben (Gaidzik, Schlenk et al. 2013, Ley, Ding et al. 2010, Thol, Damm et al. 2011, Marcucci, Metzeler et al. 2012). So zeigten sich u.a. *IDH*^{mut} in 28,7% der *DNMT3A*^{mut} Patienten (Gaidzik, Schlenk et al. 2013). *CEBPA*^{dm} waren hingegen seltener bei *DNMT3A*^{mut} Patienten zu finden (Marcucci, Metzeler et al. 2012, Gaidzik, Schlenk et al. 2013). Unsere Daten zeigten ebenfalls eine signifikant seltenere Korrelation zwischen *CEBPA*^{dm} und *DNMT3A*^{mut} (P=0.04).

Bei unserer Analyse des Remissionsstatus der Patienten nach Doppelinduktion in Abhängigkeit von *DNMT3A*^{mut} ließen sich keine signifikanten Unterschiede (P=0.26) im Hinblick auf CR, RD oder ED zwischen *DNMT3A*^{mut} und *DNMT3A*^{wt} feststellen. Vorhergehende Studien kamen bezüglich des Einflusses von *DNMT3A*^{mut} auf den Remissionsstatus zu unterschiedlichen Ergebnissen. So beschrieben Thol et al. 2011 eine geringere Wahrscheinlichkeit einer CR bei *DNMT3A*^{mut} in CN- und Hochrisiko AML-Patienten (*NPM1*^{wt}/*FLT3*^{wt} oder *NPM1*^{wt}/*FLT3*-ITD oder *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD) (Thol, Damm et al. 2011). Andere Untersuchungen konnten hingegen keine signifikante Korrelation zwischen *DNMT3A*^{mut} und dem Erreichen einer CR feststellen (Marková, Michková et al. 2012, Marcucci, Metzeler et al. 2012). Im Gegensatz dazu konnten Gaidzik et al. 2013 eine höhere Rate an CR bei *DNMT3A*^{mut} Patienten der Gesamtkohorte zeigen. Der positive Einfluss auf die CR konnte sich dort jedoch nicht auf Subgruppen wie CN-AML oder nach ELN definierten Patientenguppen übertragen lassen (Gaidzik, Schlenk et al. 2013, Ribeiro, Pratcorona et al. 2012). Diese Beobachtung könnte der geringen Anzahl an *DNMT3A*^{mut} Patienten mit hohem zytogenetischen Risiko geschuldet sein, woraus sich letztlich kein direkter Einfluss von *DNMT3A*^{mut} auf die CR ergibt (Gaidzik, Schlenk et al. 2013).

Bei der Korrelation mit dem klinischen Verlauf sahen Thol et al. 2011 insgesamt ein schlechteres OS bei *DNMT3A*^{mut} Patienten, aber keinen Einfluss auf das RFS. Dies galt sowohl für die gesamte Kohorte, als auch für die CN-AML Subgruppe. Das schlechtere OS (12,3 versus 41,1 Monate) konnten im Rahmen weiterer Studien bestätigt werden (Ley, Ding et al. 2010, Yan, Xu et al. 2011). Die Ergebnisse waren dabei unabhängig von Alter, Ko-Mutationen mit *FLT3*, *NPM1* bzw. der Lokalisation der Mutation (Ley, Ding et al. 2010). Auch Ribeiro et al. beschrieben 2012 ein deutlich schlechteres OS und RFS für *DNMT3A*^{mut} Patienten. Diese Studien wurden jedoch im Wesentlichen bei jüngeren AML-Patienten (< 60 Jahre) durchgeführt.
Die Auswertung unserer Daten zeigte unterdessen keinen signifikanten Unterschied für das OS, RFS und EFS. Im Einklang mit unseren Ergebnissen zeigten die Analysen von Gaidzik et al. 2013 weder für das EFS, das OS noch für das RFS signifikante Auswirkungen. Es zeigte sich lediglich ein geringer negativer Effekt auf das OS und EFS bei den ELN-ungünstigen CN-AML-Patienten. Der negative prognostische Einfluss von *DNMT3A*^{mut} auf CN-AML-Patienten mit ungünstigem Risikoprofil scheint dabei durch die R882-*DNMT3A*^{mut} Patienten bedingt zu sein. Patienten mit R882-*DNMT3A*^{mut} zeigten einen ungünstigen Verlauf in Bezug auf das RFS, während non-R882-*DNMT3A*^{mut} einen positiven Einfluss auf das OS nahmen. Wie bereits erwähnt gelten diese Beobachtungen für junge Patienten aus der Gesamt- sowie der CN-AML-Kohorte (Gaidzik, Schlenk et al. 2013). Auch Marccuci et al. 2012 konnten keinen Einfluss auf das OS bei ihrer Analyse von 415 CN-AML-Patienten feststellen. Es wurde lediglich ein negativer Effekt von non-R882-*DNMT3A*^{mut} auf junge sowie von R882-*DNMT3A*^{mut} auf ältere Patienten beschrieben (Marcucci, Metzeler et al. 2012). In Bezug auf die schlechte Prognose konnten jedoch weder bei Thol et al. 2011, noch bei Ley et al. 2010 Unterschiede zwischen R882-*DNMT3A*^{mut} und non-R882-*DNMT3A*^{mut} festgestellt werden (Thol, Damm et al. 2011, Ley, Ding et al. 2010).

IDH

In unserer Patientenkohorte wurden 23,9% (n=57) *IDH*$_{komb}$^{mut} identifziert; davon waren 10,5% (n=25) *IDH1*^{mut} und 13,4% (n=32) *IDH2*^{mut}.
In vorangegangenen Arbeiten fiel die Rate an IDH$_{komb}$^{mut} unterschiedlich aus und betrug 16% in der Gesamt- und 23% in der CN-AML- (Paschka, Schlenk et al.

2010), 17% (Abbas, Lugthart et al. 2010), beziehungsweise 33% in der CN-AML-Patientengruppe (Marcucci, Maharry et al. 2010). Bei Paschka et al. sah man 2010 IDH_{komb}^{mut} vor allem bei Patienten mit CN-AML. Schnittger et al. konnten 2010 dies auch für $IDH1^{mut}$ zeigen.

Bei der Sequenzierung des gesamten Genoms von 187 AML-Patienten durch Mardis et al. zeigten sich in 8% (15 /187) der Fälle $IDH1^{mut}$. Auch darauffolgende Studien zeigten mit 6%-14% (Paschka et al. 2010, Abbas et al. 2010, Green et al. 2010, Marccuci et al.) ähnliche Resultate bezüglich der Häufigkeit von $IDH1^{mut}$.

Bei den drei von uns detektierten Mutationstypen handelte es sich ausschließlich um missense Mutationen. Dabei wurde vor allem Arginin an der Position 132, welches als Teil der katalytischen Domäne von *IDH1* gilt, durch verschiedene Aminosäuren ersetzt. Auch bei vorherigen Studien betrafen nahezu alle genetischen Alterationen des *IDH1*-Gens den Bereich des Kodons 132 (Paschka, Schlenk et al. 2010, Mardis, Ding et al. 2009, Green, Evans et al. 2010, Abbas, Lugthart et al. 2010).

Mit insgesamt 23 Patienten beobachteten wir die Mutation c.C394T; p.R132C (n=23; 9,6%) am häufigsten. Diese Beobachtung deckt sich mit den bisher beschriebenen Daten. Die missense Mutation p.R132C war auch hier am häufigsten vertreten (Paschka, Schlenk et al. 2010, Mardis, Ding et al. 2009, Green, Evans et al. 2010, Abbas, Lugthart et al. 2010). Die Mutation p.R132H wurde ebenfalls häufig beobachtet (Green, Evans et al. 2010, Abbas, Lugthart et al. 2010, Paschka, Schlenk et al. 2010). In unserer Studie trug jedoch nur ein Patient die Mutation c.G395A; p.R132H (n=1; 0,4%).

Die von uns gezeigte Mutation c.G395T; p.R132L (n=1; 0,4%) ist neben p.R132G und p.R132S auch 2010 in den Arbeiten von Green et al. und Abbas et al. beschrieben worden.

Im Gegensatz zu Mardis et al. 2009 wurden in nachfolgenden Studien neben $IDH1^{mut}$ auch $IDH2^{mut}$ nachgewiesen. Die Rate an $IDH2^{mut}$ reichte dabei von 8,7% (Paschka, Schlenk et al. 2010), über 10% (Green et al. 2010) bzw. 11% (Abbas, Lugthart et al. 2010), bis hin zu 19% (Marccuci et al. 2010). Im Rahmen unserer Studie konnten bei insgesamt 32 Patienten (n=32; 13,3%) $IDH2^{mut}$ identifiziert werden. Darüber hinaus konnten wir drei verschiedene missense Mutationstypen auf den Kodons R140 und R172 detektieren. Die Position 140 ist an der Bildung der katalytischen Domäne von *IDH2* beteiligt. Auch Studien von Paschka et al. 2010,

Marcucci et al. 2010 und Abbas et al. 2010 fanden *IDH2*^{mut} vorwiegend im Bereich dieses Kodons. Es handelte sich dabei hauptsächlich um p.R140Q und p.R172K Mutationen (Paschka, Schlenk et al. 2010, Marcucci, Maharry et al. 2010, Abbas, Lugthart et al. 2010). Auch in unserer Studie waren die Mutationen c.G419A; p.R140Q (19/32; 59%) und c.G515A; p.R172K (12/32; 38%) die am häufigsten detektierten *IDH2*^{mut}. Ein weiterer Patient trug die Mutation c.C418T; p.R140W (n=1; 0,4%).

Das gleichzeitige Vorliegen von Mutationen im *IDH1*- und *IDH2*-Gen konnte in der Literatur bisher nur in Einzelfällen beobachtet werden (Abbas, Lugthart et al. 2010). Dies spiegelte sich auch in unseren Analysen wider, in welchen neben einer *IDH2*^{mut} keine zusätzliche Mutation in Exon 4 des *IDH1*-Gens vorlagen.

Die Auswertung unserer Daten zeigte eine Korrelation von $IDH_{komb}{}^{mut}$ mit einem höheren Lebensalter (*P*=0.005). Auch *IDH2*^{mut} separat betrachtet waren bei unseren Untersuchungen signifikant mit einem höheren Alter (*P*=0.007) assoziiert. Vorhergehende Studien sahen für $IDH_{komb}{}^{mut}$ Patienten vergleichbare Zusammenhänge, wobei sich der Altersunterschied 2010 bei Paschka et al. und Marccuci et al. nur für *IDH2*^{mut} bemerkbar machte. Abbas et al. 2010 sahen diesen Unterschied sowohl für *IDH1* als auch für *IDH2*.

Bei der Korrelation unserer Daten ergab sich ein signifikanter Zusammenhang von $IDH_{komb}{}^{mut}$ mit einer geringeren Leukozytenzahl (*P*=0.02). Bei Abbas et al. war diese Korrelation jedoch nicht signifikant. Marccuci et al. beobachteten 2010 darüber hinaus nur bei R172-*IDH2*^{mut} verringerten Leukozytenzahlen und einen geringeren Anteil an Blasten im PB. Der Blastenanteil im PB unterschied sich in unserer Studie nicht (*P*=0.68) vom *IDH*^{wt}. Auch Paschka et al. sahen 2010 diesen Unterschied nicht. Bei der Blastenzahl im KM zeigte sich bei Paschka et al. 2010 eine signifikante Korrelation mit *IDH1*^{mut}, nicht jedoch mit *IDH2*^{mut}.

Die Assoziation zwischen LDH-Leveln (*P*=0.07) und dem IDH_{komb}-Mutationsstatus war in unserer Studie im Trend signifikant. Keine signifikanten Unterschiede konnten wir für das Geschlecht (*P*=0.83), den AML-Typ (*P*=0.76), dem Hämoglobinwert (*P*=0.64) bzw. der Blastenzahl im KM (*P*=0.83) zeigen. Dies steht im Einklang mit der bisherigen Literatur.

Bei Marccuci et al. 2010, Paschka et al. 2010 und Abbas et al. 2010 wiesen die $IDH_{komb}{}^{mut}$ Patienten erhöhte Thrombozytenzahlen auf. Für die Thrombozytenzahl

der *IDH*$_{komb}^{mut}$ Patienten konnten wir in unseren Arbeiten keine signifikanten Einflüsse feststellen.

Betrachtet man die klinischen Charakteristika der mutierten Patienten für die zwei Isoformen getrennt voneinander, so ergaben sich in der Analyse unserer Daten keine signifikanten Unterschiede für *IDH1*^{mut} oder *IDH2*^{mut} in Bezug auf das Geschlecht, den AML-Typen, die Thrombozytenzahl, den LDH-Wert oder den Blastenanteil im PB bzw. KM. Green et al. zeigten hingegen 2010 eine signifikante Korrelation sowohl zwischen *IDH1*^{mut} als auch *IDH2*^{mut} und einem erhöhten Lebensalter der Patienten. Darüber hinaus zeigte sich 2010 bei Green et al. auch ein Zusammenhang zwischen *IDH1*^{mut} und dem weiblichen Geschlecht, was für *IDH2*^{mut} nicht beobachtet werden konnte. Darüber hinaus lagen unsere Korrelationen für die geringeren Hämoglobinwerte (P=0.08) bzw. Leukozytenzahlen (P=0.09) lediglich für *IDH2*^{mut} im Trend. Bei Paschka et al. 2010 konnte dieser Trend nicht beobachtet werden.

Vorhergehende Studien sahen bei *IDH*$_{komb}^{mut}$ gehäuft Ko-Mutationen mit *NPM1*^{mut} (Paschka, Schlenk et al. 2010, Abbas, Lugthart et al. 2010, Schnittger, Haferlach et al. 2010, Green, Evans et al. 2010). Aufgrund des Studienprotokolls der AMLSG 12-09 Studie wurden Patienten mit *NPM1*^{mut} ausgeschlossen, sodass diese Korrelationsüberprüfung hier entfällt. *IDH*$_{komb}^{mut}$ unseres Patientenkollektivs waren signifikant häufiger mit *DNMT3A*^{mut} und *ASXL1*^{mut} assoziiert. Auch bei der Analyse der einzelnen Isoformen ergaben sich sowohl für *IDH1*^{mut}, als auch für *IDH2*^{mut} signifikante Korrelationen mit *DNMT3A*^{mut} (je P<0.0001). Bei keinen der hier untersuchten Patienten konnte das gleichzeitige Vorliegen von *IDH1*^{mut} und *IDH2*^{mut} beobachtet werden. Dies stimmt mit den Daten von Paschka et al. 2010 und Abbas et al. 2010 überein, bei denen simultane Mutationen der beiden Isoformen nur vereinzelt auftraten. *CEBPA*^{dm} traten in unserer Arbeit signifikant seltener sowohl mit *IDH*$_{komb}^{mut}$ (P=0.04) als auch mit *IDH2*^{mut} auf. Mehrere Studien konnten hingegen keinen Zusammenhang zwischen *IDH1*^{mut} oder *IDH2*^{mut} und *CEBPA*^{mut} herstellen (Paschka et al. 2010, Green et al. 2010). Die negative Korrelation von *CEBPA*^{mut} und *IDH1*^{mut} lag bei Marccuci et al. 2010 im Trend. Paschka et al. 2010 konnten nachweisen, dass *IDH*$_{komb}^{mut}$ signifikant häufiger mit *FLT3*-TKD assoziiert waren. Andere Studiengruppen sahen diesen Zusammenhang wiederum nicht (Mardis et al. 2009, Abbas et al. 2010). Darüber hinaus sahen wir weder für *IDH1*^{mut} noch für

IDH2^{mut} signifikante Korrelationen mit Mutationen der Gene *ASXL1* (*P*=0.23/ *P*=0.15) und *RUNX1* (*P*=0.28/ *P*=0.47).

Aus der Auswertung unserer Daten ergaben sich weder für *IDH*$_{komb}$^{mut} noch für *IDH1*^{mut} getrennt betrachtet signifikante Korrelationen mit den zytogenetischen Veränderungen. *IDH2*^{mut} zeigten sich im Trend mit abnl(3q) (*P*=0.06) assoziiert.

Es ließen sich in dieser Arbeit keine signifikanten Einflüsse von *IDH*$_{komb}$^{mut} auf das Erreichen einer CR, RD oder ED ableiten. Zu den gleichen Erkenntnissen kamen wir bei der getrennten Analyse von *IDH1*^{mut} und *IDH2*^{mut}. Auch bei den Überlebensanalysen konnten wir keine signifikanten Korrelationen für *IDH*$_{komb}$^{mut} bzw. *IDH1*^{mut} feststellen.
Bezogen auf die gesamte Kohorte nahmen *IDH*$_{komb}$^{mut} im Vergleich zu *IDH*^{wt} auch 2010 bei Paschka et al. keinen signifikanten Einfluss auf die klinischen Endpunkte EFS, RFS oder OS. Bei CN-AML-Patienten mit *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wt} wurde ein negativer Einfluss von *IDH*$_{komb}$^{mut} auf den klinischen Verlauf beschrieben. Dieser Effekt ließ sich jedoch nicht auf die gesamte Subgruppe der CN-AML übertragen.
Mardis et al. beobachteten 2009 einen negativen Einfluss von *IDH1*^{mut} auf das Gesamtüberleben für CN-AML-Patienten mit *NPM1*^{wt} und unabhängig vom *FLT3*-Mutationsstatus. Jüngere (<60 Jahre) CN-AML-Patienten sowie CN-AML-Patienten mit *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wt} hatten bei Vorliegen einer *IDH1*^{mut} bei Marccuci et al. ein signifikant schlechteres RFS und ein im Trend schlechteres OS (Marccuci et al. 2010). Auch Green et. al sahen 2010 bezogen auf das RFS einen negativen Einfluss von *IDH1*^{mut} auf Patienten mit *FLT3*^{wt}. Sie konnten diesen Zusammenhang jedoch nicht für *IDH1*^{mut} als einen eigenständigen Faktor extrapolieren. Paschka et al. sahen wiederum für den klinischen Verlauf weder in der Gesamtkohorte noch in CN-AML-Subgruppe signifikante Einflüsse von *IDH1*^{mut}.
Vergleicht man *IDH2*^{mut} mit *IDH2*^{wt} Patienten in Bezug auf das EFS, so zeigte sich in unserer Arbeit ein Trend für ein schlechteres EFS bei *IDH2*^{mut} (*P*=0.06). Auf das OS (*P*=0.22) und das RFS (*P*=0.93) zeigte sich keine Einflussnahme von *IDH2*^{mut}. Marcucci et al. konnten 2010 für *IDH2*^{mut} keine signifikanten Einflüsse auf den klinischen Verlauf der CN-AML-Patienten beschreiben. Lediglich R172-*IDH2*^{mut} zeigten eine signifikant geringere CR (Marccuci et al. 2010). Green et al. konnten 2010 ebenfalls keinen signifikanten Einfluss von *IDH2*^{mut} auf den klinischen Verlauf

feststellen. Lediglich beim Miteinbeziehen des Mutationsstatus von *FLT3*-ITD zeigten sich Unterschiede für die Prognose bei Patienten mit *IDH2*^{mut}.

Da Patienten mit *FLT3*-ITD laut Protokoll in unserer Studie ausgeschlossen waren, war der Vergleich mit vorhergehenden Studien nicht möglich. Dies gilt sowohl für *IDH1*^{mut} und *IDH2*^{mut} als auch für *DNMT3A*^{mut}. Aussagen über die Signifikanz als prognostischen Marker der Mutationen schwankt zwischen den einzelnen Studien. Dies ist am ehesten den Unterschieden im Studiendesign sowie der Patientenauswahl geschuldet (Gallipoli, Giotopoulos et al. 2015).
Anhand der Analyse unserer Daten konnte Mutationen weder *DNMT3A*, noch *IDH1* oder *IDH2* als prognostische Marker identifiziert werden.

Die Ergebnisse unserer Analysen im Hinblick auf die Inzidenz von *DNMT3A, IDH1* und *IDH2* Mutationen zeigen vergleichbare Ergebnisse mit den publizierten Daten. Vergleichbar sind ebenfalls die Mutationstypen bzw. die Lokalisation der einzelnen Mutationen. Die prognostische Wertigkeit der drei Genmutationen zu untersuchen war in unserer Studie zum einen durch die relativ kleine Patientenzahl, aber auch durch die Patientenselektion unserer Studie eingschränkt. Die wesentlichen Unterschiede unserer Patientenkohorte zu den bislang in Studien publizierten Patientenkohorten liegen erstens im Alter der Patienten. In unserer Studie waren auch Patienten eingeschlossen, die älter als 60 Jahre waren und somit lagen hier zusätzliche klinische Risikofaktoren vor. Der Anteil an Patienten mit höheren Lebensalter spiegelt sich sehr gut an der signifikanten Assoziation der *IDH2* Mutationen mit dem Alter wieder, die altersabhängig zunehmen. Ein weiterer wichtiger Unterschied zu den publizierten Studien besteht darin, dass in unserer Patientenkohorte Patienten mit *NPM1* und/oder *FLT3*-ITD Mutation ausgeschlossen waren. Beide Genmutationen sind mit einem normalen Karyotyp assoziiert; hier sind insbesondere *NPM1* Mutationen mit einer günstigeren Prognose assoziiert. Somit zeichnet sich unserer Patientenkohorte durch ein ungünstiges Risikoprofil aus. Ein dritter Unterschied liegt in der Therapie. In der AMLSG 12-09 Studie wurde in der Erstlinienbehandlung die demetyhlierende Substanz Azacitidin eingesetzt. Aufgrund des Stopps der beiden Therapiearme B und C in unserer Studie und der damit relativ kleinen Anzahl an Patienten in den 4 Therapiearmen war eine Subgruppenanalyse, um mögliche Efffekte mit der demethylierenden Substanz

Azacitidn bei Patienten mit *DNMT3A, IDH1* und *IDH2* Mutationen zu evaluieren, nicht möglich. Nichts desto trotz sind die hier generierten Daten eine wichtige Basis für die Durchführung von Metaanalysen in denen die prädiktive Wertigkeit dieser 3 Genmuationen im Kontext mit einer demethylierenden Substanz geprüft werden kann.

Zusammenfassung

Die AML (akute myeloische Leukämie) präsentiert sich als eine äußert heterogene Erkrankung. Dies spiegelt sich bereits in ihrer Klassifikation wider, deren Grundlage sich mit den wissenschaftlichen Erkenntnissen der vergangenen Jahre entscheidend veränderte. Die Feststellung, dass sich die AML aus vielen verschiedenen genetischen Subgruppen zusammensetzt, bewirkte ein Umdenken von einer rein morphologischen Klassifikation hin zu einer Klassifikation anhand der zugrundeliegenden genetischen Veränderungen. Mutationen der Gene *DNMT3A (DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 3A)*, *IDH1 (Isocitratdehydrogenase*) und *IDH2* finden sich häufig bei AML-Patienten, vor allem mit normalem Karyotyp. Diese Gene fungieren als Regulatoren der DNA-Methylierung (Desoxyribonukleinsäure) und spielen somit eine wichtige Rolle in der epigenetischen Modifikation. Basierend darauf ist es von großem Interesse, die pathogenetische Rolle von *DNMT3A*-, *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen in der Leukämogenese herauszuarbeiten. Insbesondere sollen ihre prognostische und prädikative Wertigkeit sowie ihre Relevanz zur Bewertung des genetischen Risikoprofils untersucht werden. Ziel dieser Arbeit war es die Inzidenz von *DNMT3A*-, *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen von AML-Patienten, die in der Therapiestudie AMLSG (AML Study Group) 12-09 behandelt wurden, zu bestimmen sowie die daraus resultierenden Ergebnisse im Kontext der klinischen Charakteristika sowie zytogenetischer und molekulargenetischer Veränderungen zu evaluieren. Im Gegensatz zu den bislang publizierten Studien ist die AMLSG 12-09 Patientenpopulation durch das höhere Lebensalter und den höheren Anteil an genetisch ungünstigen Risikogruppen charakterisiert. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war es die klinischen Endpunkte Erreichen einer Remission, rezidivfreies Überleben, ereignisfreies Überleben und Gesamtüberleben nach Doppelinduktionstherapie mit der demethylierenden Substanz 5-Azacitidin bei Patienten, die nicht im Rahmen genotyp-spezifischer Therapiekonzepte behandelt wurden, zu untersuchen. Dazu wurden peripheres Blut oder Knochenmark von 241 Patienten mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) und Sequenzierung nach Sanger untersucht. Für die Gene *IDH1* und *IDH2* konnte zuvor mittels DHPLC (Denaturating high-performance liquid chromatography) ein Screening auf das Vorhandensein von Mutationen durchgeführt werden. Die Inzidenzen der Mutationen lagen für *DNMT3A* bei 17,8% und für *IDH1* und *IDH2* in Kombination

bei 23,9%. Beim Betrachten der beiden Gene getrennt voneinander waren 10,5% der Patienten *IDH1* und 13,4% der Patienten *IDH2* mutiert. Die univarianten Analysen der in dieser Arbeit generierten Daten zeigten, dass *DNMT3A*-, *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben, das ereignisfreie Überleben oder das rezidivfreie Überleben im Rahmen der AMLSG 12-09 Studie aufweisen. Ein wesentlicher Grund hierfür ist die relativ kleine Patientenkohorte sowie die Patientenselektion (höheres Alter, ungünstiges Risikoprofil). Gezeigt werden konnte in dieser Arbeit die altersabhängige Zunahme von *IDH2*-Mutationen. Dies könnte von therapeutischer Bedeutung insbesondere für ältere Patienten sein, da *IDH2* Inhibitoren derzeit in klinischer Prüfung sind und schon als Monotherapie eindrucksvolle Ergebnisse erreicht werden konnten. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten bilden zudem eine wesentliche Grundlage zur Evaluation von *DNMT3A*-, *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen als prädiktive Marker im Kontext mit einer Azacitidin Therapie innerhalb der AMLSG 12-09 Studie, aber auch im Rahmen von Metaanalysen. Somit bietet sie Sie die Möglichkeit auch in der Zukunft ein tieferes Verständnis der Bedeutung dieser Mutationen in myeloischen Neoplasien zu schaffen.

5. Literaturverzeichnis

1. ABBAS, S., LUGTHART, S., KAVELAARS, F.G., SCHELEN, A., KOENDERS, J.E., ZEILEMAKER, A., VAN PUTTEN, W.J., RIJNEVELD, A.W., LOWENBERG, B. and VALK, P.J., 2010. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. Blood, 116, 2122-2126.

2. ABU-DUHIER, F., GOODEVE, A., WILSON, G., CARE, R., PEAKE, I. and REILLY, J., 2001. Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. British journal of haematology, 113, 1076-1077.

3. APPELBAUM, F.R., GUNDACKER, H., HEAD, D.R., SLOVAK, M.L., WILLMAN, C.L., GODWIN, J.E., ANDERSON, J.E. and PETERSDORF, S.H., 2006. Age and acute myeloid leukemia. Blood, 107, 3481-3485.

4. ARBER, D.A., ORAZI, A., HASSERJIAN, R., THIELE, J., BOROWITZ, M.J., LE BEAU, M.M., BLOOMFIELD, C.D., CAZZOLA, M. and VARDIMAN, J.W., 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood, 127, 2391-2405.

5. ATTWOOD, J., YUNG, R. and RICHARDSON, B., 2002. DNA methylation and the regulation of gene transcription. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 59, 241-257.

6. BENNETT, J.M., CATOVSKY, D., DANIEL, M., FLANDRIN, G., GALTON, D., GRALNICK, H.R. and SULTAN, C., 1976. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. British journal of haematology, 33, 451-458.

7. BOLLI, N., NICOLETTI, I., DE MARCO, M.F., BIGERNA, B., PUCCIARINI, A., MANNUCCI, R., MARTELLI, M.P., LISO, A., MECUCCI, C., FABBIANO, F., MARTELLI, M.F., HENDERSON, B.R. and FALINI, B., 2007. Born to be exported: COOH-terminal nuclear export signals of different strength ensure cytoplasmic accumulation of nucleophosmin leukemic mutants. Cancer research, 67, 6230-6237.

8. BORER, R., LEHNER, C., EPPENBERGER, H. and NIGG, E., 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. Cell, 56, 379-390.

9. BULLINGER, L., DÖHNER, K. and DÖHNER, H., 2017. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. Journal of Clinical Oncology, 35, 934-946.

10. BURGERS, W.A., FUKS, F. and KOUZARIDES, T., 2002. DNA methyltransferases get connected to chromatin. TRENDS in Genetics, 18, 275-277.

11. CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2013. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. The New England journal of medicine, 368, 2059-2074.

12. CHALLEN, G.A., SUN, D., JEONG, M., LUO, M., JELINEK, J., BERG, J.S., BOCK, C., VASANTHAKUMAR, A., GU, H. and XI, Y., 2012. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. Nature genetics, 44, 23-31.

13. CHAN, S.M., THOMAS, D., CORCES-ZIMMERMAN, M.R., XAVY, S., RASTOGI, S., HONG, W., ZHAO, F., MEDEIROS, B.C., TYVOLL, D.A. and MAJETI, R., 2015. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia. Nature medicine, 21, 178-184.

14. CHEN, T., UEDA, Y., XIE, S. and LI, E., 2002. A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. The Journal of biological chemistry, 277, 38746-38754.

15. CHENG, X., 1995. Structure and function of DNA methyltransferases. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 24, 293-318.

16. CHENG, X. and BLUMENTHAL, R.M., 2008. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. Structure, 16, 341-350.

17. CHESON, B.D., BENNETT, J.M., KOPECKY, K.J., BUCHNER, T., WILLMAN, C.L., ESTEY, E.H., SCHIFFER, C.A., DOEHNER, H., TALLMAN, M.S., LISTER, T.A., LO-COCO, F., WILLEMZE, R., BIONDI, A., HIDDEMANN, W., LARSON, R.A., LOWENBERG, B., SANZ, M.A., HEAD, D.R., OHNO, R., BLOOMFIELD, C.D. and INTERNATIONAL WORKING GROUP FOR DIAGNOSIS, STANDARDIZATION OF RESPONSE CRITERIA, TREATMENT OUTCOMES, AND REPORTING STANDARDS FOR THERAPEUTIC TRIALS IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA, 2003. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 21, 4642-4649.

18. CHO, Y.H., YAZICI, H., WU, H.C., TERRY, M.B., GONZALEZ, K., QU, M., DALAY, N. and SANTELLA, R.M., 2010. Aberrant promoter hypermethylation and genomic hypomethylation in tumor, adjacent normal tissues and blood from breast cancer patients. Anticancer Research, 30, 2489-2496.

19. CHOMIENNE, C., RAIN, J.D. and BRIÈRE, J., 2004. Risk of leukemic transformation in PV and ET patients. Pathologie Biologie, 52, 289-293.

20. COLOMBO, E., MARINE, J., DANOVI, D., FALINI, B. and PELICCI, P.G., 2002. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. Nature cell biology, 4, 529-533.

21. COLOMBO, E., BONETTI, P., LAZZERINI DENCHI, E., MARTINELLI, P., ZAMPONI, R., MARINE, J.C., HELIN, K., FALINI, B. and PELICCI, P.G., 2005. Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. Molecular and cellular biology, 25, 8874-8886.

22. CORBACIOGLU, A., FROHLING, S., MENDLA, C., EIWEN, K., HABDANK, M., DOHNER, H., SCHLENK, R.F. and DOHNER, K., 2007. CEBPA Germline Mutation Screening in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia with Somatically Acquired CEBPA Mutations. ASH Annual Meeting Abstracts 2007, 363.

23. CORDELL, J.L., PULFORD, K.A., BIGERNA, B., RONCADOR, G., BANHAM, A., COLOMBO, E., PELICCI, P.G., MASON, D.Y. and FALINI, B., 1999. Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells. Blood, 93, 632-642.

24. DANG, L., WHITE, D.W., GROSS, S., BENNETT, B.D., BITTINGER, M.A., DRIGGERS, E.M., FANTIN, V.R., JANG, H.G., JIN, S. and KEENAN, M.C., 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature, 462, 739-744.

25. DES ROBERT KOCH-INSTITUTS, GEMEINSAME VERÖFFENTLICHUNG, 2012. der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.(Hrsg).

26. DINARDO, C., DE BOTTON, S., POLLYEA, D.A., STEIN, E.M., FATHI, A.T., ROBOZ, G.J., COLLINS, R., SWORDS, R.T., FLINN, I.W. and ALTMAN, J.K., 2015. Molecular profiling and relationship with clinical response in patients with IDH1 mutation-positive hematologic malignancies receiving AG-120, a first-in-class potent inhibitor of mutant IDH1, in addition to data from the completed dose escalation portion of the phase 1 study. Blood, 126, 1306-1306.

27. DÖHNER, H., WEISDORF, D.J. and BLOOMFIELD, C.D., 2015. Acute myeloid leukemia. New England Journal of Medicine, 373, 1136-1152.

28. DÖHNER, K., PASCHKA, P. and DÖHNER, H., 2015. Akute myeloische Leukämie. Der Internist, 56, 354-363.

29. DOHNER, H., ESTEY, E., GRIMWADE, D., AMADORI, S., APPELBAUM, F.R., BUCHNER, T., DOMBRET, H., EBERT, B.L., FENAUX, P., LARSON, R.A., LEVINE, R.L., LO-COCO, F., NAOE, T., NIEDERWIESER, D., OSSENKOPPELE, G.J., SANZ, M., SIERRA, J., TALLMAN, M.S., TIEN, H.F., WEI, A.H., LOWENBERG, B. and BLOOMFIELD, C.D., 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood, 129, 424-447.

30. DOHNER, H., ESTEY, E.H., AMADORI, S., APPELBAUM, F.R., BUCHNER, T., BURNETT, A.K., DOMBRET, H., FENAUX, P., GRIMWADE, D., LARSON, R.A., LO-COCO, F., NAOE, T., NIEDERWIESER, D., OSSENKOPPELE, G.J., SANZ, M.A., SIERRA, J., TALLMAN, M.S., LOWENBERG, B., BLOOMFIELD, C.D. and EUROPEAN LEUKEMIANET, 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood, 115, 453-474.

31. DOHNER, H. and GAIDZIK, V.I., 2011. Impact of genetic features on treatment decisions in AML. Hematology / the Education Program of the American

Society of Hematology.American Society of Hematology.Education Program, 2011, 36-42.

32. DOHNER, K. and DOHNER, H., 2008. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. Haematologica, 93, 976-982.

33. DOHNER, K., SCHLENK, R.F., HABDANK, M., SCHOLL, C., RUCKER, F.G., CORBACIOGLU, A., BULLINGER, L., FROHLING, S. and DOHNER, H., 2005. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. Blood, 106, 3740-3746.

34. DOMBRET, H., SEYMOUR, J.F., BUTRYM, A., WIERZBOWSKA, A., SELLESLAG, D., JANG, J.H., KUMAR, R., CAVENAGH, J., SCHUH, A.C., CANDONI, A., RECHER, C., SANDHU, I., BERNAL DEL CASTILLO, T., AL-ALI, H.K., MARTINELLI, G., FALANTES, J., NOPPENEY, R., STONE, R.M., MINDEN, M.D., MCINTYRE, H., SONGER, S., LUCY, L.M., BEACH, C.L. and DOHNER, H., 2015. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. Blood, 126, 291-299.

35. ESTEY, E. and DÖHNER, H., 2006. Acute myeloid leukaemia. The Lancet, 368, 1894-1907.

36. FALINI, B., MECUCCI, C., TIACCI, E., ALCALAY, M., ROSATI, R., PASQUALUCCI, L., LA STARZA, R., DIVERIO, D., COLOMBO, E. and SANTUCCI, A., 2005. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. New England Journal of Medicine, 352, 254-266.

37. FALINI, B., NICOLETTI, I., BOLLI, N., MARTELLI, M.P., LISO, A., GORELLO, P., MANDELLI, F., MECUCCI, C. and MARTELLI, M.F., 2007a. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. Haematologica, 92, 519-532.

38. FALINI, B., NICOLETTI, I., MARTELLI, M.F. and MECUCCI, C., 2007b. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. Blood, 109, 874-885.

39. FATHI, A. and LEVIS, M., 2011. FLT3 inhibitors: a story of the old and the new. Current opinion in hematology, 18, 71-76.

40. FIGUEROA, M.E., SKRABANEK, L., LI, Y., JIEMJIT, A., FANDY, T.E., PAIETTA, E., FERNANDEZ, H., TALLMAN, M.S., GREALLY, J.M., CARRAWAY, H., LICHT, J.D., GORE, S.D. and MELNICK, A., 2009. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. Blood, 114, 3448-3458.

41. FISHER, C.L., BERGER, J., RANDAZZO, F. and BROCK, H.W., 2003. A human homolog of Additionalsexcombs, ADDITIONALSEXCOMBS-LIKE1, maps to chromosome 20q11. Gene, 306, 115-126.

42. FROHLING, S., SCHLENK, R.F., STOLZE, I., BIHLMAYR, J., BENNER, A., KREITMEIER, S., TOBIS, K., DOHNER, H. and DOHNER, K., 2004. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 22, 624-633.

43. FROHLING, S., SCHOLL, C., GILLILAND, D.G. and LEVINE, R.L., 2005. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 23, 6285-6295.

44. GAIDZIK, V.I., SCHLENK, R.F., PASCHKA, P., KÖHNE, C., HELD, G. and HADBANK, M., 2010. TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): Results on 783 patients treated within the AML HD98A study of the AML study group (AMLSG), Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2010.

45. GAIDZIK, V., TELEANU, V., PAPAEMMANUIL, E., WEBER, D., PASCHKA, P., HAHN, J., WALLRABENSTEIN, T., KOLBINGER, B., KÖHNE, C. and HORST, H., 2016. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. Leukemia 30, 2160-2168.

46. GAIDZIK, V.I., BULLINGER, L., SCHLENK, R.F., ZIMMERMANN, A.S., ROCK, J., PASCHKA, P., CORBACIOGLU, A., KRAUTER, J., SCHLEGELBERGER, B., GANSER, A., SPATH, D., KUNDGEN, A., SCHMIDT-WOLF, I.G., GOTZE, K., NACHBAUR, D., PFREUNDSCHUH, M., HORST, H.A., DOHNER, H. and DOHNER, K., 2011. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 29, 1364-1372.

47. GAIDZIK, V.I., SCHLENK, R.F., PASCHKA, P., STOLZLE, A., SPATH, D., KUENDGEN, A., VON LILIENFELD-TOAL, M., BRUGGER, W., DERIGS, H.G., KREMERS, S., GREIL, R., RAGHAVACHAR, A., RINGHOFFER, M., SALIH, H.R., WATTAD, M., KIRCHEN, H.G., RUNDE, V., HEIL, G., PETZER, A.L., GIRSCHIKOFSKY, M., HEUSER, M., KAYSER, S., GOEHRING, G., TELEANU, M.V., SCHLEGELBERGER, B., GANSER, A., KRAUTER, J., BULLINGER, L., DOHNER, H. and DOHNER, K., 2013. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG). Blood, 121, 4769-4777.

48. GALLIPOLI, P., GIOTOPOULOS, G. and HUNTLY, B.J., 2015. Epigenetic regulators as promising therapeutic targets in acute myeloid leukemia. Therapeutic advances in hematology, 6, 103-119.

49. GILLILAND, D.G. and GRIFFIN, J.D., 2002. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood, 100, 1532-1542.

50. GODLEY, L.A. and LARSON, R.A., 2008. Therapy-related myeloid leukemia, Seminars in oncology 2008, Elsevier, 418-429.

51. GREEN, C.L., EVANS, C.M., HILLS, R.K., BURNETT, A.K., LINCH, D.C. and GALE, R.E., 2010. The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. Blood, 116, 2779-2782.

52. GREEN, C.L., EVANS, C.M., ZHAO, L., HILLS, R.K., BURNETT, A.K., LINCH, D.C. and GALE, R.E., 2011. The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. Blood, 118, 409-412.

53. GREENBERG, P.L., ATTAR, E., BENNETT, J.M., BLOOMFIELD, C.D., BORATE, U., DE CASTRO, C.M., DEEG, H.J., FRANKFURT, O., GAENSLER, K., GARCIA-MANERO, G., GORE, S.D., HEAD, D., KOMROKJI, R., MANESS, L.J., MILLENSON, M., O'DONNELL, M.R., SHAMI, P.J., STEIN, B.L., STONE, R.M., THOMPSON, J.E., WESTERVELT, P., WHEELER, B., SHEAD, D.A. and NAGANUMA, M., 2013. Myelodysplastic syndromes: clinical practice guidelines in oncology. Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN, 11, 838-874.

54. GRIFFITH, J., BLACK, J., FAERMAN, C., SWENSON, L., WYNN, M., LU, F., LIPPKE, J. and SAXENA, K., 2004. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. Molecular cell, 13, 169-178.

55. GRIMWADE, D. and HILLS, R.K., 2009. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology.American Society of Hematology.Education Program,* 385-395.

56. GRISENDI, S., MECUCCI, C., FALINI, B. and PANDOLFI, P.P., 2006. Nucleophosmin and cancer. Nature Reviews Cancer, 6, 493-505.

57. GUNGORDUK, Kemal, et al. PharmaNews. *Oncology Research and Treatment*, 2017, 40. Jg., Nr. 4, S. 231-232.

58. HARRIS, N.L., JAFFE, E.S., DIEBOLD, J., FLANDRIN, G., MULLER-HERMELINK, H.K., VARDIMAN, J., LISTER, T.A. and BLOOMFIELD, C.D., 1999. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 17, 3835-3849.

59. HASELBECK, R.J. and MCALISTER-HENN, L., 1993. Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. The Journal of biological chemistry, 268, 12116-12122.

60. HENKE, B., GIRZALSKY, W., BERTEAUX-LECELLIER, V. and ERDMANN, R., 1998. IDP3 encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids. The Journal of biological chemistry, 273, 3702-3711.

61. HERMANN, A., GOWHER, H. and JELTSCH, A., 2004. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 61, 2571-2587.

62. HEROLD, G., 2015. Innere Medizin-Ausgabe 2014. S.

63. HOWLADER N, NOONE AM, KRAPCHO M, MILLER D, BISHOP K, ALTEKRUSE SF, KOSARY CL, YU M, RUHL J, TATALOVICH Z, MARIOTTO A, LEWIS DR, CHEN HS, FEUER EJ, CRONIN KA (EDS). SEER CANCER STATISTICS REVIEW, 1975-2013, NATIONAL CANCER INSTITUTE. BETHESDA, MD, HTTP://SEER.CANCER.GOV/CSR/1975_2013/, BASED ON NOVEMBER 2015 SEER DATA SUBMISSION, POSTED TO THE SEER WEB SITE, APRIL 2016.

64. ISSA, J., BAYLIN, S.B. and HERMAN, J.G., 1997. DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. Leukemia, 11.

65. JIA, D., JURKOWSKA, R.Z., ZHANG, X., JELTSCH, A. and CHENG, X., 2007a. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. Nature, 449, 248-251.

66. JIA, D., JURKOWSKA, R.Z., ZHANG, X., JELTSCH, A. and CHENG, X., 2007b. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. Nature, 449, 248-251.

67. JO, S.H., SON, M.K., KOH, H.J., LEE, S.M., SONG, I.H., KIM, Y.O., LEE, Y.S., JEONG, K.S., KIM, W.B., PARK, J.W., SONG, B.J. and HUH, T.L., 2001. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase. The Journal of biological chemistry, 276, 16168-16176.

68. JURKOWSKA, R.Z., JURKOWSKI, T.P. and JELTSCH, A., 2011. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. Chembiochem, 12, 206-222.

69. KAPLAN, E.L. and MEIER, P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. Journal of the American statistical association, 53, 457-481.

70. KASPER, D., FAUCI, A., HAUSER, S., LONGO, D., JAMESON, J. and LOSCALZO, J., 2015. Harrison's principles of internal medicine, 19e. Mcgraw-hill.

71. KIM, E.S., 2017. Enasidenib: First Global Approval. *Drugs*, 1-7.

72. KORN, E.L., 1986. Censoring distributions as a measure of follow-up in survival analysis. Statistics in medicine, 5, 255-260.

73. KRONKE, J., BULLINGER, L., TELEANU, V., TSCHURTZ, F., GAIDZIK, V.I., KUHN, M.W., RUCKER, F.G., HOLZMANN, K., PASCHKA, P., KAPP-SCHWORER, S., SPATH, D., KINDLER, T., SCHITTENHELM, M., KRAUTER, J., GANSER, A., GOHRING, G., SCHLEGELBERGER, B., SCHLENK, R.F., DOHNER, H. and DOHNER, K., 2013. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. Blood, 122, 100-108.

74. LAUBACH, J. and RAO, A.V., 2008. Current and emerging strategies for the management of acute myeloid leukemia in the elderly. The oncologist, 13, 1097-1108.

75. LEVIS, M., 2017. Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. Blood, 129, 3403-3406.

76. LEY, T.J., DING, L., WALTER, M.J., MCLELLAN, M.D., LAMPRECHT, T., LARSON, D.E., KANDOTH, C., PAYTON, J.E., BATY, J. and WELCH, J., 2010. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. New England Journal of Medicine, 363, 2424-2433.

77. LINDSTRÖM, M.S. and ZHANG, Y., 2006. B23 and ARF. Cell biochemistry and biophysics, 46, 79-90.

78. LISTER, R., PELIZZOLA, M., DOWEN, R.H., HAWKINS, R.D., HON, G., TONTI-FILIPPINI, J., NERY, J.R., LEE, L., YE, Z. and NGO, Q., 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature, 462, 315-322.

79. LÖWENBERG, B., 2001. Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. Best Practice & Research Clinical Haematology, 14, 65-75.

80. LOWENBERG, B., DOWNING, J.R. and BURNETT, A., 1999. Acute myeloid leukemia. New England Journal of Medicine, 341, 1051-1062.

81. LOWENBERG, B., PABST, T., MAERTENS, J., VAN NORDEN, Y., BIEMOND, B.J., SCHOUTEN, H.C., SPERTINI, O., VELLENGA, E., GRAUX, C., HAVELANGE, V., DE GREEF, G.E., DE WEERDT, O., LEGDEUR, M.J., KUBALL, J., KOOY, M.V., GJERTSEN, B.T., JONGEN-LAVRENCIC, M., VAN DE LOOSDRECHT, A.A., VAN LAMMEREN-VENEMA, D., HODOSSY, B., BREEMS, D.A., CHALANDON, Y., PASSWEG, J., VALK, P.J., MANZ, M.G., OSSENKOPPELE, G.J. and DUTCH-BELGIAN HEMATO-ONCOLOGY COOPERATIVE GROUP (HOVON) AND SWISS GROUP FOR CLINICAL CANCER RESEARCH (SAKK), 2017. Therapeutic value of clofarabine in younger and middle-aged (18-65 years) adults with newly diagnosed AML. Blood, 129, 1636-1645.

82. MANN, H.B. and WHITNEY, D.R., 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. The annals of mathematical statistics, 50-60.

83. MARCUCCI, G., HAFERLACH, T. and DOHNER, H., 2011. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 29, 475-486.

84. MARCUCCI, G., MAHARRY, K., WU, Y.Z., RADMACHER, M.D., MROZEK, K., MARGESON, D., HOLLAND, K.B., WHITMAN, S.P., BECKER, H., SCHWIND, S., METZELER, K.H., POWELL, B.L., CARTER, T.H., KOLITZ, J.E., WETZLER, M., CARROLL, A.J., BAER, M.R., CALIGIURI, M.A., LARSON, R.A. and BLOOMFIELD, C.D., 2010. IDH1 and IDH2 gene

mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 28, 2348-2355.

85. MARCUCCI, G., METZELER, K.H., SCHWIND, S., BECKER, H., MAHARRY, K., MROZEK, K., RADMACHER, M.D., KOHLSCHMIDT, J., NICOLET, D., WHITMAN, S.P., WU, Y.Z., POWELL, B.L., CARTER, T.H., KOLITZ, J.E., WETZLER, M., CARROLL, A.J., BAER, M.R., MOORE, J.O., CALIGIURI, M.A., LARSON, R.A. and BLOOMFIELD, C.D., 2012. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 30, 742-750.

86. MARDIS, E.R., DING, L., DOOLING, D.J., LARSON, D.E., MCLELLAN, M.D., CHEN, K., KOBOLDT, D.C., FULTON, R.S., DELEHAUNTY, K.D. and MCGRATH, S.D., 2009. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. New England Journal of Medicine, 361, 1058-1066.

87. MARKOVÁ, J., MICHKOVÁ, P., BURČKOVÁ, K., BŘEZINOVÁ, J., MICHALOVÁ, K., DOHNALOVÁ, A., MAALOUFOVÁ, J.S., SOUKUP, P., VÍTEK, A. and CETKOVSKÝ, P., 2012. Prognostic impact of DNMT3A mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. European journal of haematology, 88, 128-135.

88. MATTHEWS, W., JORDAN, C.T., WIEGAND, G.W., PARDOLL, D. and LEMISCHKA, I.R., 1991. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. Cell, 65, 1143-1152.

89. MIZUNO, S., CHIJIWA, T., OKAMURA, T., AKASHI, K., FUKUMAKI, Y., NIHO, Y. and SASAKI, H., 2001. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. Blood, 97, 1172-1179.

90. MROZEK, K., HEEREMA, N.A. and BLOOMFIELD, C.D., 2004. Cytogenetics in acute leukemia. Blood reviews, 18, 115-136.

91. MROZEK, K., MARCUCCI, G., PASCHKA, P., WHITMAN, S.P. and BLOOMFIELD, C.D., 2007. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? Blood, 109, 431-448.

92. NARAHARA, K., KIMURA, S., KIKKAWA, K., TAKAHASHI, Y., WAKITA, Y., KASAI, R., NAGAI, S., NISHIBAYASHI, Y. and KIMOTO, H., 1985. Probable assignment of soluble isocitrate dehydrogenase (IDH1) to 2q33. 3. Human genetics, 71, 37-40.

93. NEKRUTENKO, A., HILLIS, D.M., PATTON, J.C., BRADLEY, R.D. and BAKER, R.J., 1998. Cytosolic isocitrate dehydrogenase in humans, mice, and

voles and phylogenetic analysis of the enzyme family. Molecular biology and evolution, 15, 1674-1684.

94. OEFNER, P.J. and UNDERHILL, P.A., 1995. Comparative DNA-sequencing by denaturing high-performance liquid-chromatography (DHPLC), American Journal of Human Genetics 1995, UNIV CHICAGO PRESS 5720 S WOODLAWN AVE, CHICAGO, IL 60637, 1547-1547.

95. OH, I., INAZAWA, J., KIM, Y., SONG, B.J. and HUH, T., 1996. Assignment of the Human Mitochondrial NADP -Specific Isocitrate Dehydrogenase (IDH2) Gene to 15q26. 1 byin SituHybridization. Genomics, 38, 104-106.

96. PABST, T., EYHOLZER, M., FOS, J. and MUELLER, B., 2009. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. British journal of cancer, 100, 1343-1346.

97. PABST, T. and MUELLER, B., 2007. Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML. Oncogene, 26, 6829-6837.

98. PABST, T., MUELLER, B.U., ZHANG, P., RADOMSKA, H.S., NARRAVULA, S., SCHNITTGER, S., BEHRE, G., HIDDEMANN, W. and TENEN, D.G., 2001. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-α (C/EBPα), in acute myeloid leukemia. Nature genetics, 27, 263-270.

99. PAPAEMMANUIL, E., GERSTUNG, M., BULLINGER, L., GAIDZIK, V.I., PASCHKA, P., ROBERTS, N.D., POTTER, N.E., HEUSER, M., THOL, F. and BOLLI, N., 2016. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. New England Journal of Medicine, 374, 2209-2221.

100. PARSONS, D.W., JONES, S., ZHANG, X., LIN, J.C., LEARY, R.J., ANGENENDT, P., MANKOO, P., CARTER, H., SIU, I.M., GALLIA, G.L., OLIVI, A., MCLENDON, R., RASHEED, B.A., KEIR, S., NIKOLSKAYA, T., NIKOLSKY, Y., BUSAM, D.A., TEKLEAB, H., DIAZ, L.A.,Jr, HARTIGAN, J., SMITH, D.R., STRAUSBERG, R.L., MARIE, S.K., SHINJO, S.M., YAN, H., RIGGINS, G.J., BIGNER, D.D., KARCHIN, R., PAPADOPOULOS, N., PARMIGIANI, G., VOGELSTEIN, B., VELCULESCU, V.E. and KINZLER, K.W., 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science (New York, N.Y.), 321, 1807-1812.

101. PASCHKA, P., SCHLENK, R.F., GAIDZIK, V.I., HABDANK, M., KRONKE, J., BULLINGER, L., SPATH, D., KAYSER, S., ZUCKNICK, M., GOTZE, K., HORST, H.A., GERMING, U., DOHNER, H. and DOHNER, K., 2010. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 28, 3636-3643.

102. PASCHKA, P., SCHLENK, R.F., GAIDZIK, V.I., HERZIG, J.K., AULITZKY, T., BULLINGER, L., SPATH, D., TELEANU, V., KUNDGEN, A., KOHNE, C.H., BROSSART, P., HELD, G., HORST, H.A., RINGHOFFER, M., GOTZE, K.,

NACHBAUR, D., KINDLER, T., HEUSER, M., THOL, F., GANSER, A., DOHNER, H. and DOHNER, K., 2015. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Haematologica, 100, 324-330.

103. PAUSTENBACH, D.J., BASS, R.D. and PRICE, P., 1993. Benzene toxicity and risk assessment, 1972-1992: implications for future regulation. Environmental health perspectives, 101 Suppl 6, 177-200.

104. PEDERSEN-BJERGAARD, J., ANDERSEN, M.T. and ANDERSEN, M.K., 2007. Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology.American Society of Hematology.Education Program, 392-397.

105. POSFAI, J., BHAGWAT, A.S., POSFAI, G. and ROBERTS, R.J., 1989. Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. Nucleic acids research, 17, 2421-2435.

106. RIBEIRO, A.F., PRATCORONA, M., ERPELINCK-VERSCHUEREN, C., ROCKOVA, V., SANDERS, M., ABBAS, S., FIGUEROA, M.E., ZEILEMAKER, A., MELNICK, A., LOWENBERG, B., VALK, P.J. and DELWEL, R., 2012. Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. Blood, 119, 5824-5831.

107. RIDEOUT, W.M.,3rd, COETZEE, G.A., OLUMI, A.F. and JONES, P.A., 1990. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. Science (New York, N.Y.), 249, 1288-1290.

108. SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 5463-5467.

109. SANZ, M.A., GRIMWADE, D., TALLMAN, M.S., LOWENBERG, B., FENAUX, P., ESTEY, E.H., NAOE, T., LENGFELDER, E., BUCHNER, T., DOHNER, H., BURNETT, A.K. and LO-COCO, F., 2009. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood, 113, 1875-1891.

110. SAVAGE, S.A. and DUFOUR, C., 2017. Classical inherited bone marrow failure syndromes with high risk for MDS and AML, *Seminars in Hematology* 2017, Elsevier.

111. SAXONOV, S., BERG, P. and BRUTLAG, D.L., 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 1412-1417.

112. SCHLENK, R., DÖHNER, K. and DÖHNER, H., 2013. Akute myeloische Leukämie. Der Internist, 54, 171-178.

113. SCHLENK, R.F., DÖHNER, K., KRAUTER, J., FRÖHLING, S., CORBACIOGLU, A., BULLINGER, L., HABDANK, M., SPÄTH, D., MORGAN, M. and BENNER, A., 2008. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. New England Journal of Medicine, 358, 1909-1918.

114. SCHLENK, R.F., DÖHNER, K., KRAUTER, J., GAIDZIK, V.I., PASCHKA, P., HEUSER, M., KINDLER, T., LÜBBERT, M., MARTIN, H. and SALIH, H.R., 2011. All-trans retinoic acid improves outcome in younger adult patients with nucleophosmin-1 mutated acute myeloid leukemia–results of the AMLSG 07-04 randomized treatment trial.

115. SCHLENK, R.F., KAYSER, S., BULLINGER, L., KOBBE, G., CASPER, J., RINGHOFFER, M., HELD, G., BROSSART, P., LUBBERT, M., SALIH, H.R., KINDLER, T., HORST, H.A., WULF, G., NACHBAUR, D., GOTZE, K., LAMPARTER, A., PASCHKA, P., GAIDZIK, V.I., TELEANU, V., SPATH, D., BENNER, A., KRAUTER, J., GANSER, A., DOHNER, H., DOHNER, K. and GERMAN-AUSTRIAN AML STUDY GROUP, 2014. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. Blood, 124, 3441-3449.

116. SCHLENK, R.F., TASKESEN, E., VAN NORDEN, Y., KRAUTER, J., GANSER, A., BULLINGER, L., GAIDZIK, V.I., PASCHKA, P., CORBACIOGLU, A., GOHRING, G., KUNDGEN, A., HELD, G., GOTZE, K., VELLENGA, E., KUBALL, J., SCHANZ, U., PASSWEG, J., PABST, T., MAERTENS, J., OSSENKOPPELE, G.J., DELWEL, R., DOHNER, H., CORNELISSEN, J.J., DOHNER, K. and LOWENBERG, B., 2013. The value of allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation in prognostically favorable acute myeloid leukemia with double mutant CEBPA. Blood, 122, 1576-1582.

117. SCHMITT, T., ROBINSON, M. and DOYLE, J., 2000. Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Insertion & Deletion Detection on the WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System.Transgenomic Inc.

118. SCHNITTGER, S., HAFERLACH, C., ULKE, U., TAMARA, T., KERN, W. and TORSTEN, T., 2010. IDH1 mutations are detected in 6.6% of all AML and are strongly associated with intermediate risk karyotype and unfavourable prognosis: A study of 1414 patients, HAEMATOLOGICA-THE HEMATOLOGY JOURNAL 2010, FERRATA STORTI FOUNDATION VIA GIUSEPPE BELLI 4, 27100 PAVIA, ITALY, 457-457.

119. SCHNITTGER, S., DICKER, F., KERN, W., WENDLAND, N., SUNDERMANN, J., ALPERMANN, T., HAFERLACH, C. and HAFERLACH, T., 2011. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. Blood, 117, 2348-2357.

120. SCHOCH, C., KERN, W., KOHLMANN, A., HIDDEMANN, W., SCHNITTGER, S. and HAFERLACH, T., 2005. Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes, Chromosomes and Cancer,* 43, 227-238.

121. SCHOLLEN, E., DEQUEKER, E., MCQUAID, S., VANKEIRSBILCK, B., MICHILS, G., HARVEY, J., VAN DEN AKKER, E., VAN SCHOOTEN, R., CLARK, Z. and SCHROOTEN, S., 2005. Diagnostic DHPLC Quality Assurance (DDQA): A collaborative approach to the generation of validated and standardized methods for DHPLC-based mutation screening in clinical genetics laboratories. *Human mutation,* 25, 583-592.

122. SCHUMACHER, T., BUNSE, L., PUSCH, S., SAHM, F., WIESTLER, B., QUANDT, J., MENN, O., OSSWALD, M., OEZEN, I. and OTT, M., 2014. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. Nature, 512, 324-327.

123. SHLUSH, L.I., ZANDI, S., MITCHELL, A., CHEN, W.C., BRANDWEIN, J.M., GUPTA, V., KENNEDY, J.A., SCHIMMER, A.D., SCHUH, A.C. and YEE, K.W., 2014. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. Nature, 506, 328-333.

124. SJOBLOM, T., JONES, S., WOOD, L.D., PARSONS, D.W., LIN, J., BARBER, T.D., MANDELKER, D., LEARY, R.J., PTAK, J., SILLIMAN, N., SZABO, S., BUCKHAULTS, P., FARRELL, C., MEEH, P., MARKOWITZ, S.D., WILLIS, J., DAWSON, D., WILLSON, J.K., GAZDAR, A.F., HARTIGAN, J., WU, L., LIU, C., PARMIGIANI, G., PARK, B.H., BACHMAN, K.E., PAPADOPOULOS, N., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K.W. and VELCULESCU, V.E., 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science (New York, N.Y.), 314, 268-274.

125. SMITH, S.M., LE BEAU, M.M., HUO, D., KARRISON, T., SOBECKS, R.M., ANASTASI, J., VARDIMAN, J.W., ROWLEY, J.D. and LARSON, R.A., 2003. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. Blood, 102, 43-52.

126. SORROR, M.L., MARIS, M.B., STORB, R., BARON, F., SANDMAIER, B.M., MALONEY, D.G. and STORER, B., 2005. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. Blood, 106, 2912-2919.

127. STEC, I., NAGL, S.B., VAN OMMEN, G.B. and DEN DUNNEN, J.T., 2000. The PWWP domain: a potential protein–protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation? FEBS letters, 473, 1-5.

128. STEENSMA, D.P., BEJAR, R., JAISWAL, S., LINDSLEY, R.C., SEKERES, M.A., HASSERJIAN, R.P. and EBERT, B.L., 2015. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. Blood, 126, 9-16.

129. STEIN, E.M., ALTMAN, J.K., COLLINS, R., DEANGELO, D.J., FATHI, A.T., FLINN, I., FRANKEL, A., LEVINE, R.L., MEDEIROS, B.C. and PATEL, M., 2014. AG-221, an oral, selective, first-in-class, potent inhibitor of the IDH2 mutant metabolic enzyme, induces durable remissions in a phase I study in patients with IDH2 mutation positive advanced hematologic malignancies. Blood, 124, 115-115.

130. STEIN, E.M., DINARDO, C., ALTMAN, J.K., COLLINS, R., DEANGELO, D.J., KANTARJIAN, H.M., SEKERES, M.A., FATHI, A.T., FLINN, I.W. and FRANKEL, A.E., 2015. Safety and efficacy of AG-221, a potent inhibitor of mutant IDH2 that promotes differentiation of myeloid cells in patients with advanced hematologic malignancies: results of a phase 1/2 trial. Blood, 126, 323-323.

131. STIREWALT, D.L., KOPECKY, K.J., MESHINCHI, S., APPELBAUM, F.R., SLOVAK, M.L., WILLMAN, C.L. and RADICH, J.P., 2001. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. Blood, 97, 3589-3595.

132. STONE, R.M., FISCHER, T., PAQUETTE, R., SCHILLER, G., SCHIFFER, C.A., EHNINGER, G., CORTES, J., KANTARJIAN, H.M., DEANGELO, D.J. and HUNTSMAN-LABED, A., 2012. Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia. Leukemia, 26, 2061-2068.

133. SWERDLLOW, S., CAMPO, E. and HARRIS, N.L., 2008. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. France: IARC Press, 2008.

134. TASKESEN, E., BULLINGER, L., CORBACIOGLU, A., SANDERS, M.A., ERPELINCK, C.A., WOUTERS, B.J., VAN DER POEL-VAN DE LUYTGAARDE,S.C., DAMM, F., KRAUTER, J., GANSER, A., SCHLENK, R.F., LOWENBERG, B., DELWEL, R., DOHNER, H., VALK, P.J. and DOHNER, K., 2011. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. Blood, 117, 2469-2475.

135. TAWANA, K., WANG, J., RENNEVILLE, A., BODOR, C., HILLS, R., LOVEDAY, C., SAVIC, A., VAN DELFT, F.W., TRELEAVEN, J., GEORGIADES, P., UGLOW, E., ASOU, N., UIKE, N., DEBELJAK, M., JAZBEC, J., ANCLIFF, P., GALE, R., THOMAS, X., MIALOU, V., DOHNER, K., BULLINGER, L., MUELLER, B., PABST, T., STELLJES, M., SCHLEGELBERGER, B., WOZNIAK, E., IQBAL, S., OKOSUN, J., ARAF, S., FRANK, A.K., LAURIDSEN, F.B., PORSE, B., NERLOV, C., OWEN, C., DOKAL, I., GRIBBEN, J., SMITH, M., PREUDHOMME, C., CHELALA, C., CAVENAGH, J. and FITZGIBBON, J., 2015. Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. *Blood,* 126, 1214-1223.

136. THERNEAU, T.M. and GRAMBSCH, P.M., 2000. Modeling survival data: extending the Cox model. Springer Science & Business Media.

137. THOL, F., DAMM, F., LUDEKING, A., WINSCHEL, C., WAGNER, K., MORGAN, M., YUN, H., GOHRING, G., SCHLEGELBERGER, B., HOELZER, D., LUBBERT, M., KANZ, L., FIEDLER, W., KIRCHNER, H., HEIL, G., KRAUTER, J., GANSER, A. and HEUSER, M., 2011. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 29, 2889-2896.

138. TUREK-PLEWA, J. and JAGODZINSKI, P., 2005. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. Cellular and Molecular Biology Letters, 10, 631.

139. TURNER, A.M., LIN, N.L., ISSARACHAI, S., LYMAN, S.D. and BROUDY, V.C., 1996. FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. Blood, 88, 3383-3390.

140. VARDIMAN, J.W., THIELE, J., ARBER, D.A., BRUNNING, R.D., BOROWITZ, M.J., PORWIT, A., HARRIS, N.L., LE BEAU, M.M., HELLSTROM-LINDBERG, E., TEFFERI, A. and BLOOMFIELD, C.D., 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood, 114, 937-951.

141. WANG, F., TRAVINS, J., DELABARRE, B., PENARD-LACRONIQUE, V., SCHALM, S., HANSEN, E., STRALEY, K., KERNYTSKY, A., LIU, W., GLISER, C., YANG, H., GROSS, S., ARTIN, E., SAADA, V., MYLONAS, E., QUIVORON, C., POPOVICI-MULLER, J., SAUNDERS, J.O., SALITURO, F.G., YAN, S., MURRAY, S., WEI, W., GAO, Y., DANG, L., DORSCH, M., AGRESTA, S., SCHENKEIN, D.P., BILLER, S.A., SU, S.M., DE BOTTON, S. and YEN, K.E., 2013. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. Science (New York, N.Y.), 340, 622-626.

142. WOUTERS, B.J. and DELWEL, R., 2016. Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia. Blood, 127, 42-52.

143. XIE, S., WANG, Z., OKANO, M., NOGAMI, M., LI, Y., HE, W., OKUMURA, K. and LI, E., 1999. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. Gene, 236, 87-95.

144. XU, W., YANG, H., LIU, Y., YANG, Y., WANG, P., KIM, S., ITO, S., YANG, C., WANG, P. and XIAO, M., 2011. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α-ketoglutarate-dependent dioxygenases. Cancer cell, 19, 17-30.

145. XU, F., MAO, C., DING, Y., RUI, C., WU, L., SHI, A., ZHANG, H., ZHANG, L. and XU, Z., 2010. Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs. Current medicinal chemistry, 17, 4052-4071.

146. XU, X., ZHAO, J., XU, Z., PENG, B., HUANG, Q., ARNOLD, E. and DING, J., 2004. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. The Journal of biological chemistry, 279, 33946-33957.

147. YAMASHITA, Y., YUAN, J., SUETAKE, I., SUZUKI, H., ISHIKAWA, Y., CHOI, Y., UENO, T., SODA, M., HAMADA, T. and HARUTA, H., 2010. Array-based genomic resequencing of human leukemia. Oncogene, 29, 3723-3731.

148. YAN, H., PARSONS, D.W., JIN, G., MCLENDON, R., RASHEED, B.A., YUAN, W., KOS, I., BATINIC-HABERLE, I., JONES, S. and RIGGINS, G.J., 2009.

IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. New England Journal of Medicine, 360, 765-773.

149. YAN, X., XU, J., GU, Z., PAN, C., LU, G., SHEN, Y., SHI, J., ZHU, Y., TANG, L. and ZHANG, X., 2011. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. Nature genetics, 43, 309-315.

150. YEN, K., BITTINGER, M., SU, S. and FANTIN, V., 2010. Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. Oncogene, 29, 6409-6417.

151. YILMAZ, A.F., SAYDAM, G., SAHIN, F. and BARAN, Y., 2013. Granulocytic sarcoma: a systematic review. American journal of blood research, 3, 265-270.

6. Danksagungen

Die Danksagungen wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

7. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.