

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin, Rheumatologie und Infektionskrankheiten
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

IDH1 und *IDH2* Mutationen bei der akuten myeloischen Leukämie des jüngeren
Erwachsenen – Analysen zur Inzidenz und klinischen Bedeutung

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

vorgelegt von
Angelika Madar
geboren in Wien

2017

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

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Peter Paschka

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Holger Cario

Tag der Promotion: 17.05.2018

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	7
1.1 Klinik und Epidemiologie der AML	7
1.2 Ätiologie und Pathogenese der AML	7
1.3 Klassifikation und Diagnostik der AML	10
1.4 Zytogenetische Charakterisierung und Risikostratifizierung der AML	15
1.5 Prognostische Bedeutung molekulargenetischer Abberationen bei der AML	16
1.6 Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)	20
1.6.1 <i>IDH1</i> und <i>IDH2</i> Gene	20
1.6.2 Physiologische Funktion und Lokalisation der <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> und <i>IDH3</i> Enzyme....	21
1.6.3 Die Rolle von <i>IDH1</i> und <i>IDH2</i> Mutationen in der Tumorgenese	22
1.6.4 Klinische und prognostische Bedeutung der <i>IDH1</i> und <i>IDH2</i> Mutationen	25
1.7 Zielsetzung	27
2. Material und Methoden	28
2.1 Verwendete Geräte und Materialien	28
2.1.1 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	30
2.2 Materialgewinnung.....	30
2.3 Übersicht über das Vorgehen bei der <i>IDH 1</i> und <i>IDH 2</i> Mutationsanalyse	31
2.4 DNA Extraktion aus mononukleären Zellen.....	31
2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.5.1 Vorbereitung und Primer	33
2.5.2 PCR Ansatz.....	34
2.5.3 PCR Reaktionsprotokoll.....	34
2.6 Gelelektrophorese der DNA Produkte.....	36
2.7 Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC)	37
2.7.1 Funktionsweise und Messprinzip der DHLPC.....	38
2.7.2 Funktion der Puffer	39
2.7.3 Standards und Analysevorgang.....	40
2.7.4 Analysetemperaturen	40
2.7.5 Mutationsdetektion	41
2.7.6 Mutationsanalyse des Exon 4 des <i>IDH1</i> und <i>IDH2</i> Gens.....	41

2.8 PCR und Gelelektrophorese der Proben mit auffälligen DHPLC Profilen	42
2.8.1 Temperaturprofil der PCR	43
2.9 Aufreinigung der PCR-Produkte	44
2.10 Cycle Sequencing Reaction (CSR)	45
2.11 Aufreinigung der CSR-Produkte	46
2.12 Sequenzierung	47
2.13 Klonierung	48
2.13.1 Durchführung der Kolonie-PCR	50
2.14 Thermische Denaturierung	50
2.15 Vervollständigung der Klonierung	51
2.16 Patientenkohorte und Untersuchungsmaterial	51
2.17 Therapieablauf in der AMLSG 07-04 Studie	51
2.18 Statistische Auswertung	53
3. Ergebnisse	55
3.1 <i>IDH1</i> und <i>IDH2</i> Mutationstypen	55
3.2 Inzidenz der <i>IDH1</i> und <i>IDH2</i> Mutationen	57
3.3 Inzidenz von Polymorphismen	57
3.4 Klinische Charakteristika der Patienten	58
3.5 Verteilung der <i>IDH1</i> und <i>IDH2</i> Mutationen über die zytogenetisch definierten Risikogruppen	59
3.6 Molekulare Charakteristika der Patienten mit <i>IDH1</i> und/oder <i>IDH2</i> Mutation	60
3.7 Prognostische Relevanz der <i>IDH1</i> und <i>IDH2</i> Mutationen	63
3.7.1 Ansprechen auf die Induktionstherapie	63
3.7.2 Überlebensanalysen	64
4. Diskussion	68
4.1 Inzidenz von <i>IDH</i> und <i>IDH2</i> Mutationen bei der AML	68
4.2 Assoziation von <i>IDH1</i> und <i>IDH2</i> Mutationen mit klinischen Charakteristika, Zytogenetik und anderen molekularen Markern	72
4.3 Prognostische Bedeutung von <i>IDH1</i> und <i>IDH2</i> Mutationen	75
5. Zusammenfassung	83
6. Literaturverzeichnis	85
7. Anhang	108
8. Danksagung	112
9. Lebenslauf	113

II. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
2-HG	2-Hydroxyglutarat
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
A	Adenin
<i>ABL1</i>	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
AMLSG	Deutsch-Österreichische AML-Studiengruppe
<i>ASXL1</i>	<i>Additional sex combs like transcriptional regulator 1</i>
ATRA	All-trans Retinolsäure
bp	Basenpaar
<i>BCR</i>	<i>Breakpoint cluster region</i>
C	Cytosin
<i>CBFB</i>	<i>Core binding factor beta</i>
<i>CEBPA</i>	<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>
CN	Cytogenetically normal (zytogenetisch normal)
CR	Complete remission (komplette Remission)
CSR	Cycle sequencing reaction
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
<i>DEK</i>	<i>DEK oncogene</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	Destillata
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DFS	Disease free survival (krankheitsfreies Überleben)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat

DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
<i>DNMT3A</i>	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ED	Early death (früher Tod)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	Event free survival (ereignisfreies Überleben)
ELN	European Leukemia Net
et al.	Et alteri
<i>EVI1</i>	<i>Ecotropic Virus Intergration Site 1</i>
F	Forward Primer
FAB	French-American-British
<i>FLT3</i>	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
G	Guanin
g/dl	Gramm pro Deziliter
<i>GATA2</i>	<i>GATA binding protein 2</i>
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
HPLC	High pressure liquid chromatography (denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
<i>IDH1</i>	<i>Isocitrat-Dehydrogenase 1</i>
<i>IDH2</i>	<i>Isocitrat-Dehydrogenase 2</i>
inv	Inversion
ITD	interne Tandemduplikationen
k	Kilo
kDa	Kilodalton
<i>KIT</i>	<i>V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
KM	Knochenmark
<i>KMT2A</i>	<i>Lysine (K)-Specific Methyltransferase 2A</i>
l	Liter
mA	Milli-Ampere

<i>MECOM</i>	<i>MDS1 und EVI1 complex locus protein EVI1</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
<i>MDS1</i>	<i>Myelodysplastic syndrome 1</i>
<i>MKL1</i>	<i>Megakaryoblastic leukemia translocation 1</i>
<i>MLL</i>	<i>Mixed lineage leukemia</i>
<i>MLLT3</i>	<i>Mixed-lineage leukemia translocated to 3</i>
MPS	Myeloproloferatives Syndrom
MRD	minimal residual disease (minimale Resterkrankung)
<i>MYH11</i>	<i>Myosin heavy chain 11</i>
<i>NPM1</i>	<i>Nucleophosmin 1</i>
<i>NRAS</i>	<i>Neuroblastoma RAS viral onkogene homolog</i>
NTC	No template control
<i>NUP214</i>	<i>Nucleoporin 214kDa</i>
ORF	Open reading frame (offener Leserahmen)
OS	Overall survival (Gesamtüberleben)
PB	Peripheres Blut
PCR	Polymerase chain-reaction (Polymerasekettenreaktion)
<i>PML</i>	<i>Promyelocytic leukemia</i>
PTD	Partial tandem duplication
R	Reverse
<i>RARA</i>	<i>Retinoic acid receptor alpha</i>
<i>RAS</i>	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>RBM115</i>	<i>Putative RNA-binding protein 15</i>
R110	Rhodamin 110
R6G	Rhodamin 6G
RFS	Relapse free survival (rezidivfreies Überleben)
ROX	Rhodamin-X
<i>RPN1</i>	<i>Ribophorin 1</i>
<i>RUNX1</i>	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
<i>RUNX1T1</i>	<i>Runt-related transcription factor 1 translocated to 1</i>
rpm	Rounds per minute

s-AML	Sekundäre AML
SEER	The Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SNP	Single nucleotid polymorphysm (Einzelnukleotid Polymorphismus)
<i>SRSF2</i>	<i>Splicing factor, arginine/serine-rich 2</i>
T	Thymin
t	Translokation
t-AML	Therapieassoziierte AML
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TCGA	The Cancer Genome Atlas Research Network
TE	Tris-EDTA
<i>TET2</i>	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TKD	Tyrosinkinasedomäne
U/L	Units per Liter
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Watt
WHO	World-Health-Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp
<i>WT 1</i>	<i>Wilms tumor 1</i>
z.B.	Zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Klinik und Epidemiologie der AML

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) führt die Akkumulation von genetischen Veränderungen der hämatopoetischen Vorläuferzellen zur Störung der Mechanismen der Selbsterneuerung, Proliferation und der Differenzierung (Fröhling et al. 2005; Schlenk et al. 2008). Ohne Behandlung führt bei der AML die Akkumulation von unreifen Zellen (Blasten) der myeloischen Blutzellreihe im Knochenmark zu konsekutiver Verdrängung der normalen Hämatopoese (Löwenberg et al. 1999). Klinisch werden Patienten mit einer AML häufig durch unspezifische Symptome auffällig, welche die Folge einer hämatopoetischen Insuffizienz sind. Hierzu zählen Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie. Zu den klinischen anämiebedingten Symptomen gehören z.B. Fatigue, Abnahme der körperlichen Leistungsfähigkeit oder Belastungsdyspnoe. Als Folge von Neutropenie kann es zu lokalen und systemischen Infektionen kommen und beim Abfall der Thrombozyten steigt die Blutungsneigung. (Löwenberg et al. 1999). Des Weiteren können als Folge der Organinfiltration durch leukämische Blasten eine Hepatosplenomegalie oder Knochenschmerzen auftreten (Estey und Döhner 2006). Die AML ist die häufigste akute Leukämieform im Erwachsenenalter. Nach epidemiologischen Daten des National Cancer Institute (The Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program) liegt in den USA die Inzidenz der AML bei 3 bis 4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (<http://seer.cancer.gov>, 2016). Das mediane Alter bei der AML liegt bei 72 Jahren (Juliusson et al. 2009).

1.2 Ätiologie und Pathogenese der AML

Bekannte Faktoren, die die Entwicklung einer AML begünstigen, stellen eine Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung (Ichimaru et al. 1978) oder chronische Belastung mit Benzolen dar (Adamson und Seiber 1981). Auch nach der Anwendung von Zytostatika (Smith et al. 2003) kann es nach einer Latenzzeit von mehreren Jahren zur Entwicklung einer AML kommen. Einige angeborene Gendefekte, wie z.B. das Down-Syndrom (Robison und Neglia 1987), sind ebenfalls mit einer erhöhten Inzidenz für die Entwicklung einer AML assoziiert. Tritt die AML ohne vorangehende hämatologisch Erkrankung auf, so spricht man von einer *de novo* AML. Eine sekundäre AML (s-AML) entwickelt sich aus einer

vorangegangenen hämatologischen Erkrankung, z.B. einem myelodysplastischen Syndrom (MDS) (Greenberg et al. 2013) oder einem myeloproliferativen Syndrom (MPS) (Chomienne et al. 2004). Entsteht eine AML nach einer früheren genotoxischen Behandlung, z.B. nach einer Chemo- oder Strahlentherapie bezeichnet man diese Form der AML als therapieassoziierte AML (t-AML).

Veränderungen im Genom spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer AML. Die Identifikation molekulargenetischer Aberrationen hat zu besserem Verständnis der Pathogenese der AML beigetragen und leitet die Entwicklung neuartiger, zielgerichteter Therapieansätze. Ein weiterer wichtiger Aspekt in diesem Kontext ist nicht nur die Entdeckung neuer Gene mit potentieller Relevanz für die Leukämogenese, sondern auch ob und wie diese molekulare Läsionen miteinander interagieren. Im Rahmen des Krebs-Genom-Atlas-Forschungsnetzwerkes (TCGA; The Cancer Genome Atlas Research Network) wurden in einer 2013 im New England Journal of Medicine veröffentlichten Arbeit 200 Patienten mit *de novo* AML mittels Genom-Sequenzierung oder Exom-Sequenzierung („next generation sequencing technology“) auf genetische Veränderungen untersucht. Die genetischen Alterationen wurden anhand ihrer biologischen Funktion und deren Rolle in der Leukämogenese in neun verschiedene Kategorien unterteilt. Bei 59% der Patienten fanden sich Mutationen in Genen, die in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen. Zu diesen gehören u.a. Gene wie *FLT3* (*Fms-related tyrosine kinase 3*), *KIT* (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) oder *NRAS* (*Neuroblastoma RAS viral onkogene homolog*). Bei 44% der Patienten fanden sich Mutationen in DNA-methylierenden Genen, welche in der epigenetischen Regulation involviert sind. Hierzu gehören *DNMT3A* (*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A*), *IDH1* (*Isocitrate dehydrogenase 1*) und *IDH2* (*Isocitrate dehydrogenase 2*), *KMT2A* (*Lysine (K)-Specific Methyltransferase 2A*) oder *TET2* (*Tet methylcytosine dioxygenase 2*). Bei 30% fanden sich Mutationen in Chromatin modifizierenden Genen, z.B. *ASXL1* (*Additional sex combs like transcriptional regulator 1*) oder *MLL-PTD* (*Mixed lineage leukemia-partial tandem duplication*). Des Weiteren waren myeloische Transkriptionsfaktor Gene, die für die Regulation der Differenzierung wichtig sind, in 22% der Patienten mutiert. Hierzu gehören z.B. *RUNX1* (*Runt-related transcription factor 1*) oder *CEBPA* (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*). In 27% der Patienten fanden sich Mutationen im Gen, welches für

NPM1 (*Nucleophosmin 1*) kodiert. Schließlich spielen auch Genfusionen wie *PML-RARA* (*PML-Retinoic acid receptor alpha*) eine Rolle. Auch Tumorsuppressorgene, sowie Gene, die für den Kohesinkomplex, der bei der Mitose und Meiose eine Bedeutung spielt, oder Gene, die für Proteine des Spliceosom Komplexes codieren, sind Bestandteil der neun Kategorien. Anhand der Einteilung der genetischen Veränderungen in neun Kategorien, konnten Muster erstellt werden, die zeigten, welche der genetischen Veränderungen miteinander korrelieren und welche eher nicht zusammen vorkommen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Mutationen wie *DNMT3A*, *NPM1*, *CEBPA*, *IDH1/2* und *RUNX1* sehr selten gemeinsam mit Genfusionen der Transkriptionsfaktoren auftreten. Im Gegensatz dazu wurden Gene gefunden, die häufig gemeinsam auftreten; hierzu zählen *NPM1*, *FLT3* und *DNMT3A*.

In einer von Papaemmanuil und Kollegen 2016 im New England Journal of Medicine veröffentlichten Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass bei der Entstehung einer AML erworbene genetische Mutationen, sogenannte „Driver Mutationen“, in den Zellen des Knochenmarks eine entscheidende Rolle spielen (Papaemmanuil et al. 2016). Es wurden Proben von 1540 AML-Patienten (18-84 Jahre) aus drei klinischen Untersuchungen der Deutsch-Österreichischen AML-Studiengruppe auf solche Mutationen untersucht. Insgesamt wurden über 5200 „Driver-Mutationen“ identifiziert. Die Resultate der Studie erlauben eine Klassifikation der AML-Fälle in 11 Subgruppen anhand der gefundenen Mutationsmuster: die bereits in der WHO-Klassifikation aufgeführten Entitäten *inv(16)*, *t(15;17)*, *t(8;21)*, *inv(3)*, *t(6;9)* sowie *MLL* Fusionsgene repräsentierten mit < 5% jeweils eine eigene, kleine Subgruppe. *NPM1* und biallelische *CEBPA* Mutationen stellten sich ebenfalls als eigene Subgruppen dar, wobei *NPM1* mit 27% die größte Subgruppe darstellte und hiervon 73% der Patienten eine zusätzliche Mutation in DNA-Methylierenden Genen wie *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* R140 oder *TET2* aufwiesen. Bei 18% der Patienten fanden sich Mutationen in Chromatin-modifizierenden Genen (z.B. *ASXL1*) oder Genen, die für Proteine des Spliceosom Komplexes codieren (z.B. *SRSF2* (*Splicing factor, arginine/serine-rich 2*)), oder in beiden Genen. Bei 13% kamen *TP53* Mutationen oder chromosomale Aneuploidien, oder beides, vor. Mutationen in *IDH2* 172 konnten bei 1% der Patienten nachgewiesen werden und stellten eine eigene Subgruppe dar. Im Gegensatz zu *IDH2* R140 Mutationen, welche häufig zusammen mit *NPM1* Mutationen vorkommen, konnte gezeigt werden, dass *IDH2* R172 kaum mit anderen, für die Prognostik

bedeutsamen, Mutationen assoziiert sind (Papaemmanuil et al. 2016). Diese Kategorisierung der mutierten Gene und die Erstellung von Mustern, die zeigen, welche Gene miteinander korrelieren, und welche sich gegenseitig ausschließen, stellt eine wichtige Grundlage für die weitere Forschung der Pathogenese der AML dar.

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Studien, welche 2014 ebenfalls im New England Journal of Medicine veröffentlicht wurden, konnte gezeigt werden, dass einige der oben genannten Mutationen auch bei Patienten ohne eine bekannte hämatologische Erkrankung nachgewiesen werden können. Es zeigte sich, dass für Personen mit nachgewiesenen Mutationen wie *DNMT3A*, *TET2* und *ASXL1*, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer hämatologischen Erkrankung besteht. Mit zunehmendem Alter häuften sich die nachgewiesenen Mutationen. Bei Personen unter 40 Jahren konnten nur wenige Mutationen nachgewiesen werden, bei Personen über 70 Jahre in mehr als 10% (Genovese et al. 2014; Jaiswal et al. 2014).

In einer Studie von Chou et al. konnte gezeigt werden, dass *IDH1/2* Mutationen auch in Patienten, die in kompletter Remission waren, nachgewiesen werden konnten (Chou et al. 2012). Dies konnte auch für AML Patienten mit *DNMT3A* Mutation nachgewiesen werden (Debarri et al. 2015). Dies deutet darauf hin, dass in einer hämatopoetischen Stammzelle *IDH1/2* bzw. *DNMT3A* Mutationen wahrscheinlich frühe Ereignisse in der Leukämogenese darstellen, während z.B. Mutationen in *TP53* oder *RAS* (*Rat sarcoma viral oncogene homolog*) Genen später im Prozess der Leukämogenese auftreten (Papaemmanuil et al. 2016).

Für die Entstehung einer AML ist somit sowohl eine gesteigerte Zellproliferation, als auch eine Blockade der Zelldifferenzierung von Bedeutung. Beiden Eigenschaften liegen Veränderungen in unterschiedlichen Genen zu Grunde. Man geht davon aus, dass gleichzeitig Veränderungen in verschiedenen Genen zusammenwirken müssen, damit sich das Vollbild einer AML entwickeln kann (Gilliland et al. 2004; Kelly und Gilliland 2002).

1.3 Klassifikation und Diagnostik der AML

Die Einteilung der AML erfolgte zunächst nach der French-American-British (FAB)-Klassifikation, die neun Subtypen von M0 bis M7 beinhaltet (s. Tabelle 1) und auf morphologischer und zytochemischer Einteilung basierte (Bennett et al. 1976; Bennett et al. 1985). Gegenwärtig erfolgt die Einteilung nach dem Klassifikationssystem der World-

Health-Organization (WHO) (s. Tabelle 2), die zusätzlich zur Morphologie auch zytogenetische und molekulare Anomalien sowie den Immunphänotyp mit einbezieht (Arber et al. 2016; Swerdlow et al. 2008; Vardiman et al. 2002; Vardiman et al. 2009). Für die Diagnosesicherung wird, nachdem der klinische Verdacht auf eine akute Leukämie geäußert wurde, zunächst ein Differentialblutbild untersucht. Hier können sich quantitative Veränderungen in den drei Zellreihen (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten) finden. Für die Diagnose einer AML ist grundsätzlich der Nachweis von mehr als 20% Blasten im Blut oder Knochenmark notwendig. Unabhängig davon kann die Diagnose einer AML auch dann gestellt werden, wenn im Rahmen der zyto- bzw. molekulargenetischen Analytik eine definierte Aberration gemäß WHO-Klassifikation (s. Tabelle 2) nachgewiesen werden kann (Arber et al. 2016; Döhner et al. 2010; Vardiman et al. 2009). Zu diesen Veränderungen gehören z.B. t(15;17) (*PML-RARA*), t(8;21) (*RUNX1-RUNX1T1*) und inv(16)/t(16;16) (*CBFB-MYH11*). In der aktuellen WHO-Klassifikation von 2016 wurden *NPM1*- und biallelische *CEBPA* Mutationen als eigene Entitäten aufgenommen (Arber et al. 2016). Molekulargenetische Veränderungen gewinnen im klinischen Management der AML zunehmend an Bedeutung, da sie in einigen Fällen als prognostische und prädiktive Marker oder auch als Zielstrukturen für spezifische therapeutische Ansätze genutzt werden können (Marcucci et al. 2011).

Tabelle 1. FAB Klassifikation der AML (Bennett et al; Annals of Internal Medicine 1985)

FAB Subtyp	Bezeichnung
M0	AML mit minimaler Differenzierung
M1	AML ohne Ausreifung
M2	AML mit Ausreifung
M3	Akute Promyelozytenleukämie (APL)
M4Eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit atypischen Eosinophilen
M5	Akute Monozyten-Leukämie
M6	Akute Erythroleukämie
M7	Akute megakaryoblasten-Leukämie

Abkürzungen: AML: Akute myeloische Leukämie; FAB: French-American-British Cooperative Group

Tabelle 2. WHO-Klassifikation der AML (Arber et al; 2016)

Kategorie	AML Entität	Diagnose
AML mit rekurrenten zytogenetischen Abnormalitäten	- AML mit (8;21)(q22;q22); <i>RUNX1/RUNX1T1</i> - AML mit inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB/MYH11</i> - akute Promyelozyten-Leukämie: t(15;17)(q22;q12); <i>PML/RARA</i> und Varianten - AML mit t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i> oder anderen 11q23 (<i>MLL</i>) Abnormalitäten - AML mit t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> - AML mit inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i> - AML (megakaryoblastär)	unabhängig von der Blastenzahl im Blut oder Knochenmark alle weiteren folgenden AML-Subtypen: ≥20% Blasten im Blut oder Knochenmark

	mit t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
	- provisorische Entitäten: – AML mit mutiertem <i>BCR-ABL1</i> – AML mit mutiertem <i>RUNX1</i> - AML mit mutiertem <i>NPM1</i> - AML mit mutiertem biallelischem <i>CEBPA</i>

**AML mit
myelodysplasieassoziierten
Veränderungen**

Therapieassoziierte AML

AML ohne weitere Spezifizierung	- mit minimaler Differenzierung - ohne Ausreifung - mit Ausreifung - akute myelomonozytäre Leukämie - akute monoblastische und monozytäre Leukämie - akute Erythroleukämie - akute Megakaryoblasten-Leukämie - akute Basophilen-Leukämie
--	---

	akute Panmyelosis mit Myelofibrose
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Proliferationen bei Down-Syndrom	- transient abnormale Myelopoese - myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom
Blastäre plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien	
Akute Leukämien ohne eindeutige Zuordnung zu einer Zellreihe	- akute undifferenzierte Leukämie - akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp mit t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> ^[L]_[SEP] - akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp mit t(v;11q23); <i>KMT2A</i> ^[L]_[SEP] reorganisiert ^[L]_[SEP] - akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, B/myeloisch, nicht weiter spezifiziert ^[L]_[SEP] - akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, T/myeloisch, nicht weiter spezifiziert ^[L]_[SEP]

Abkürzungen: AML: Akute myelösische Leukämie; t: Translokation; q: langer Arm eines Chromosoms; BCR-ABL1: Fusionsgen BCR (breakpoint cluster region) mit Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1; CFBF-MYH11: Fusionsgen Core-binding factor Beta Subunit mit beta-Myosin, heavy chain 11; CEBPA: CCAAT/enhancer-binding protein alpha; DEK-NUP214: Fusionsgen DEK mit oncogene-Nucleoporin 214kDa; GATA2: GATA binding protein 2; MECOM: MDS1 (Myelodysplastic syndrome 1) und EVI1 (Ecotropic Viral Integration Site 1) complex locus EVI1; MLLT3-KMT2A: Fusionsgen Mixed lineage leukemia translocated to 3 mit Lysine-Methyltransferase 2A; NPM1: Nucleophosmin 1; PML-RARA: Fusionsgen Promyelocytic leukemia mit Retinoic acid receptor alpha; RBM15-MKL1: Fusionsgen Putative RNA-binding protein 15 mit Megakaryoblastic leukemia translocation 1; RUNX1-RUNX1T1: Fusionsgen Runt-related transcription factor 1 mit Runt-related transcription factor 1, translocated to, 1; WHO, World Health Organization.

1.4 Zytogenetische Charakterisierung und Risikostratifizierung der AML

Die Heterogenität der AML zeigt sich u.a. in der Vielfalt der genetischen Alterationen. Klonale chromosomale Abberationen können in konventioneller zytogenetischer Analyse bei etwa 50 – 60% der AML-Patienten nachgewiesen werden und stellen einen der wichtigsten Prognosefaktoren über allen Altersgruppen dar (Bloomfield et al. 1998; Döhner 2007; Mrózek und Bloomfield 2006). Mit Hilfe der zytogenetischen Veränderungen gelingt es, sowohl jüngere als auch ältere AML-Patienten, in drei Gruppen mit unterschiedlicher Prognose zu stratifizieren (Estey und Döhner 2006; Grimwade et al. 1998; Mrózek und Bloomfield 2006). AML Patienten mit $t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1$ oder der $inv(16)/t(16;16)/CBFB/MYH11$ werden der prognostisch günstigen Gruppe zugerechnet, die sich durch eine relativ günstige Prognose in Hinsicht auf das Gesamtüberleben und das Erreichen einer kompletten Remission auszeichnet. Im Gegensatz dazu wurden bei Patienten mit komplexem Karyotyp, Monosomien bzw. Deletionen von Chromosom 5 und 7 (-5, del(5q) und -7) oder Veränderungen von 3q, sehr geringe Raten an kompletten Remissionen und Überlebenszeiten festgestellt (Byrd et al. 2002; Grimwade et al. 1998; Löwenberg et al. 1999; Slovak et al. 2000). In einer Studie, welche 2002 im Blood-Journal veröffentlicht wurde, wurden 1213 Patienten mit *de novo* AML, welche dieselbe Induktionstherapie erhalten haben, auf zytogenetische Abnormalitäten untersucht. Es zeigte sich, dass Patienten, die der prognostisch günstigeren Gruppe angehörten, ein Gesamtüberleben von 55% nach 5 Jahren hatten, in der Gruppe der ungünstigen Prognose waren es hingegen nur 5% (Byrd et al. 2002).

Etwa 40-45% der Patienten mit neu diagnostizierter AML zeigen einen normalen Karyotyp (cytogenetically normal - (CN)) auf und werden zur Gruppe der Patienten mit intermediärem Risiko gezählt (Fröhling et al. 2006; Mrózek et al. 2007). Besonders in dieser AML-Subgruppe wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Genmutationen identifiziert

und deren prognostische Bedeutung evaluiert (Döhner et al. 2010; Mrózek et al. 2012; Patel et al. 2012). Eine Expertengruppe des European Leukemia Net (ELN) schlug eine neue Einteilung für CN-AML Patienten, basierend auf *NPM1*-, *CEBPA*- und *FLT3*-Mutationen, vor. Nach dieser sollen CN-AML Patienten nach Analyse von kompletter Remission (CR), krankheitsfreiem Überleben (disease-free survival, DFS) und Gesamtüberleben (overall survival, OS) in 4 Gruppen eingeteilt werden: prognostisch günstig, intermediär I, intermediär II und ungünstig. Diese gilt jeweils für Patienten unter 60 Jahren sowie für Patienten über bzw. mit genau 60 Jahren (Mrózek et al. 2012). In Bezug auf die Krankheitsprognose der AML spielt jedoch auch das individuelle Risikoprofil eines Patienten (z.B. Alter, Allgemeinzustand, Begleitdiagnosen) sowie z.B. eine hohe Leukozytenzahl bei Erstdiagnose eine wichtige Rolle.

1.5 Prognostische Bedeutung molekulargenetischer Abberationen bei der AML

Inzwischen wurden zahlreiche Mutationen und Rearrangements von Genen beschrieben, die einen wichtigen Beitrag in der molekularen Diagnostik und Prognoseeinschätzung der AML spielen. Insbesondere für die große, klinisch heterogene AML-Subgruppe mit normalem Karyotyp ist dies von Bedeutung. Die drei molekularen Marker *NPM1*, *FLT3-ITD* und *CEBPA* zeigten hierbei in verschiedenen Studien prognostische Signifikanz und etablierten sich im Risikomanagement (Döhner 2007; Kühnl und Grimwade 2012; Schlenk und Döhner 2009).

FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) ist eine Typ III Rezeptortyrosinkinase, die auf hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert wird. Im *FLT3*-Gen sind zwei verschiedene Mutationstypen beschrieben: zum einen die häufiger vorkommende interne Tandemduplikation (ITD), zum anderen die Mutation der Tyrosinkinasedomäne (TKD) (Döhner 2007; Grimwade und Hills 2009; Kelly et al. 2002). Etwa 20%-27% aller AML Patienten und ein Drittel der AML Patienten mit normalem Karyotyp weisen eine interne Tandemduplikation des *FLT3* Gens auf (Estey und Döhner 2006; Fröhling et al. 2002). Die Punktmutationen in der Tyrosinkinasedomäne kommen hingegen nur in etwa bei 11%-14% der AML Patienten mit normalem Karyotyp vor (Fröhling et al. 2002; Thiede et al. 2002). Prognostisch gesehen ist eine *FLT3*-ITD Mutation für das Gesamtüberleben und die Remissionsdauer ein ungünstiger Faktor (Fröhling et al. 2002; Grimwade und Hills 2009; Thiede et al. 2002). Die prognostische Bedeutung einer *FLT3*-TKD Mutation wird kontrovers

diskutiert (Mead et al. 2007; Yanada et al. 2005), sie scheint vom Vorhandensein weiterer Mutationen abhängig zu sein (Bacher et al. 2008; Mead et al. 2007; Whitman et al. 2008). Die Ergebnisse einer internationalen RATIFY-Studie, die den FLT3-Inhibitor Midostaurin (PKC412) als Zusatz zu intensiver Chemotherapie und als einjährige Erhaltungstherapie bei der AML mit aktivierenden *FLT3* Mutationen prüfte, wurden auf dem letztjährigen Kongress der American Society of Hematology vorgestellt (Stone et al. 2015). Sehr eindrucksvoll konnte hier gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von Midostaurin das Überleben der Patienten unabhängig von einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation verbesserte (Stone et al. 2015). Die Ergebnisse dieser Studie werden voraussichtlich zu Zulassung von Midostaurin bei der AML führen und Midostaurin wird damit ein Paradigma für ein neuartiges zielgerichtetes Therapieprinzip bei der AML werden.

Am häufigsten sind Mutationen im *Nucleophosmin (NPM1)* Gen. Diese finden sich bei ca. 24%-35% aller AML-Fälle (Falini et al. 2005; Thiede et al. 2006) und bei 43%-62% der AML Patienten mit normalem Karyotyp (Döhner et al. 2005; Schlenk et al. 2008). *NPM1* ist ein Phosphoprotein, das zwischen Nukleus und Cytoplasma pendelt und für verschiedene zelluläre Vorgänge, beispielsweise Biogenese der Ribosomen oder Abwehr von zellulärem Stress, bedeutsam ist. Zudem ist es auch für die genomische Stabilität und die Regulation verschiedener Tumorsuppressorgene, wie z.B. *TP53*, verantwortlich (Grisendi et al. 2006). *NPM1* Mutationen sind häufig mit *FLT3* Mutationen assoziiert, in etwa 40% findet sich zusammen mit einer *NPM1* Mutation gleichzeitig auch eine *FLT3*-ITD Mutation (Döhner und Döhner 2008). Patienten mit *NPM1* ohne eine *FLT3*-ITD Mutation, d.h. diejenigen, die den Genotyp *NPM1*^{mutiert}/*FLT3*-ITD^{wildtyp} aufweisen, haben eine bessere Ansprechrate auf die Induktionstherapie und ein längeres rezidivfreies Überleben als Patienten mit allen anderen Genotypen (*NPM1*^{mutiert}/*FLT3*-ITD^{mutiert}, *NPM1*^{wildtyp}/*FLT3*-ITD^{mutiert}, *NPM1*^{wildtyp}/*FLT3*-ITD^{wildtyp}) (Döhner 2007; Döhner et al. 2005; Schlenk und Döhner 2009; Schnittger et al. 2005). Die *NPM1* Mutationen eignen sich als Marker zur Messung der sogenannten minimalen Resterkrankung (minimal residual disease, MRD). Mit Hilfe der MRD-Messung gelingt der Nachweis von residueller Leukämie last weit unterhalb der zytolo-morphologischen Nachweisgrenze (Buccisano et al. 2012; Hourigan und Karp 2013; Krönke et al. 2011). In der Studie von Krönke et al. konnte gezeigt werden, dass MRD-Monitoring anhand von *NPM1* Mutationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten es ermöglicht Patienten mit einem hohen bzw. geringen Rückfallrisiko zu identifizieren (Krönke et al.

2011). Hierdurch entsteht die Möglichkeit durch eine frühe, präemptive Intervention, beispielsweise eine allogene Stammzelltransplantation, eventuell ein hämatologisches Rezidiv der AML zu verhindern.

Zu den weiteren prognostisch relevanten Markern zählen *CCAAT/enhancer binding protein (CEBPA)* Mutationen (Schlenk et al. 2008). *CEBPA* ist ein Transkriptionsfaktor mit einer Schlüsselrolle für die Zelllinien-Differenzierung von der multipotenten myeloischen Progenitorzelle zu reifen neutrophilen Granulozyten (Pabst et al. 2001a). *CEBPA* Mutationen kommen bei ca. 8%-19% der AML Patienten mit normalem Karyotyp vor (Fröhling et al. 2004; Pabst et al. 2001b; Schlenk et al. 2008). *CEBPA* Mutationen kommen als in frame-shift Mutationen am N-terminalen Ende, sowie als in-frame Mutationen am C-terminalen Ende des Gens vor. Durch Mutationen am N-terminalen Ende kommt es zu einem vorzeitigen Einbau eines Stopcodons, Mutationen am C-Terminus des Gens führen zu einer Beeinträchtigung der Homo- und Heterodimerisierung der DNA-Stränge. Etwa 70% der AML Patienten mit *CEBPA* Mutation zeigen bi-allelische Mutationen auf, wobei sich eine Mutation im Allel des N-Terminus und die andere auf dem Allel im C-Terminus findet (Pabst und Mueller 2007; Pabst et al. 2001b). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass *CEBPA*-Mutationen mit einer längeren Remissionsdauer- und Gesamtüberleben assoziiert sind (Fröhling et al. 2004; Mrózek et al. 2007; Schlenk et al. 2008). In aktuelleren Studien konnte gezeigt werden, dass dies für Patienten mit einer bi-allelischen *CEBPA* Mutation gilt, während Patienten mit einer mono-allelischen *CEBPA* Mutation keinen Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit *CEBPA* Wildtyp aufwiesen (Dufour et al. 2010; Green et al. 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass AML Patienten mit bi-allelischen *CEBPA* Mutationen, im Vergleich zu Patienten mit mono-allelischer *CEBPA* Mutation, seltener Mutationen in anderen Genen aufweisen. Mono-allelische *CEBPA* Mutationen waren im Vergleich zu *CEBPA* Wildtyp und bi-allelischen *CEBPA* Mutationen häufiger mit *NPM1* und *FLT3*-ITD assoziiert (Dufour et al. 2010; Taskesen et al. 2011). Aufgrund ihrer klinischen Bedeutung wurden *NPM1*- und bi-allelische *CEBPA*-Mutationen als eigene Entitäten in die aktuelle WHO-Klassifikation mit aufgenommen (Arber et al. 2016).

Neben den eben genannten häufigsten und aktuell klinisch relevanten Genmutationen bei der AML gibt es eine Reihe weiterer Genmutationen, deren prognostische Bedeutung Gegenstand der Forschung ist. Hierzu zählt *DNMT3A*, welches für das Enzym DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A kodiert und eine Rolle in der DNA Methylierung spielt. Die Inzidenz

von *DNMT3A* bei Patienten mit unselektierter *de novo* AML beträgt etwa 4-22% (Ley et al. 2010; Yan et al. 2011) und bei AML Patienten mit normalen Karyotyp 20%-35% (Marcucci et al. 2012; Thol et al. 2011). Es konnte eine Assoziation von *DNMT3A* mit *NPM1*, *FLT3-ITD* und *IDH1* gezeigt werden, zudem zeigte sich bei nachgewiesener *DNMT3A* Mutation eine schlechtere Prognose mit kürzerem Gesamtüberleben, insbesondere bei zusätzlich vorhandener *FLT3-ITD* Mutation (Ley et al. 2010; Thol et al. 2011). Des Weiteren wurden Mutationen im *Wilms Tumor Suppressor 1 (WT1)* Gen detektiert. *WT1* Mutationen kommen bei Patienten mit unselektierter AML und bei CN-AML Patienten zu etwa 11%-13% vor und können, abhängig vom zellulärem Milieu, sowohl als Tumorsuppressorgene, als auch als Onkogene fungieren (Gaidzik et al. 2009; King-Underwood und Pritchard-Jones 1998; Paschka et al. 2008; Yang et al. 2007). In der Studie von Paschka et al. konnte bei AML Patienten mit normalen Karyotyp und nachgewiesener *WT1* Mutation eine Assoziation mit kürzerem Gesamtüberleben gezeigt werden. Gaidzik et al. zeigten für AML Patienten mit normalen Karyotyp ein kürzeres Gesamtüberleben bei nachgewiesener *WT1* Mutation und zusätzlicher *FLT3-ITD* Mutation (Gaidzik et al. 2009; Paschka et al. 2008). Mutationen in *Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2)* finden sich bei ca. 8%-23% aller AML Patienten und zu 18%-23% bei CN-AML Patienten (Chou et al. 2011; Gaidzik et al. 2012). *TET2* kodiert für ein Enzym, welches als Dioxygenase fungiert und die Konversion von 5-Methylcytosin (5mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) katalysiert. Dies führt zu einer Demethylierung von DNA, womit *TET2* eine Rolle in der epigenetischen Expressionskontrolle zukommt. Die prognostische Relevanz von *TET2* wird kontrovers diskutiert. In einigen Studien waren *TET2* Mutationen mit einem geringeren Gesamtüberleben assoziiert (Chou et al. 2011; Patel et al. 2012), in anderen Studien konnte kein Zusammenhang zwischen *TET2* Mutationen und prognostischer Relevanz hergestellt werden (Gaidzik et al. 2012). *KIT (V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog)* Mutationen finden sich häufig bei Patienten mit AML und den chromosomalen Translokationen t(8;21), t(16;16) und der Inversion 16 (inv16) der Core Binding Gene (CBF). Die Inzidenz an *KIT* Mutationen bei Patienten mit CBF-AML liegt bei etwa 25% (Paschka 2008; Paschka et al. 2006). *KIT* kodiert für ein in der Zellmembran verschiedener Zellen vorkommendes Protein aus der Familie der Typ-III-Rezeptor-Tyrosinkinasen. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer *KIT* Mutation eine höhere Rezidivwahrscheinlichkeit haben als CBF-AML Patienten ohne eine *KIT* Mutation (Boissel et al. 2006; Park et al. 2011; Paschka et al.

2006; Schnittger et al. 2006). Des Weiteren wurden Mutationen im Gen *Additional sex combs like transcriptional regulator 1 (ASXL1)* bei AML Patienten detektiert. Die funktionelle Bedeutung von *ASXL1* ist noch nicht geklärt. Das *ASXL1* Protein soll als Bestandteil von DNA- und/oder Histon-modifizierender Komplexe an der Modulation von Chromatin beteiligt und somit in der epigenetischen Regulation involviert sein. Zudem soll *ASXL1* auch als ein ligandenabhängiger Co-Aktivator oder Co-Repressor des Retinolsäurerezeptors (RAR und RXR) die Transkription beeinflussen (Fisher et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass *ASXL1* Mutationen vor allem bei älteren AML Patienten auftreten; bei Patienten >60 Jahren beträgt die Inzidenz der *ASXL1* Mutationen 16%-25%, bei Patienten <60 Jahren etwa 4%-8% (Metzeler et al. 2011; Schnittger et al. 2013). Außerdem gibt es Daten, dass *ASXL1* Mutationen mit sekundärer AML assoziiert sind (Boulton et al. 2010). Über allen Altersgruppen waren *ASXL1* Mutationen mit einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie und Gesamtüberleben assoziiert (Metzeler et al. 2011; Patel et al. 2012; Schnittger et al. 2013).

Die Entdeckung von molekularen Markern hat zum Verständnis zur Pathogenese der Erkrankung beigetragen. Im Rahmen weiterer Studien, die bei AML Patienten durchgeführt wurden, konnten weitere Gene identifiziert werden, die in der Pathogenese der AML möglicherweise ebenfalls eine Rolle spielen. Zu diesen Genen zählen unter anderem *BCOR*, *BCORL1*, *PHF6*, *U2AF1*, *EZH2* und *SMC1A* (Network TCGA 2013). Ob es eine prognostische Relevanz dieser Mutationen gibt ist aktuell Gegenstand intensiver Forschung.

1.6 Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)

1.6.1 *IDH1* und *IDH2* Gene

Von den fünf *IDH* Genen im menschlichen Genom (Zhao et al. 2009) codiert das *IDH1* Gen für das NADP-abhängige IDH1 Enzym. Das *IDH1* Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 2 (2q33.3) lokalisiert (Narahara et al. 1985) und besitzt 10 Exons (<http://www.ensembl.org>, 2016).

Das *IDH2* Gen codiert für das NADP-abhängige IDH2 Enzym, ist auf dem Chromosom 15q26.1 lokalisiert (Oh et al. 1996) und besitzt 11 Exons (<http://www.ensembl.org>, 2016).

1.6.2 Physiologische Funktion und Lokalisation der IDH1, IDH2 und IDH3 Enzyme

Isocitrat-Dehydrogenasen (IDH) sind Enzymkomplexe, die die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat katalysieren, wobei α -Ketoglutarat entsteht. Als Cofaktor wird dabei Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) oder Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADP) zu NADH (IDH3) oder NADPH (IDH1, IDH2) reduziert (Haselbeck und McAlister-Henn 1993). Das IDH1 Enzym kommt sowohl im Cytoplasma als auch in den Peroxisomen vor (Geisbrecht und Gould 1999); das IDH2 Enzym kommt in den Mitochondrien vor (Haselbeck und McAlister-Henn 1993). IDH1 und IDH2 sind Homodimere und spielen eine wichtige Rolle in der Suppression von Apoptose und in der Abwehr von intrazellulärem oxidativen Stress. Im Organismus entstehen reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung oder auch im Rahmen von Entzündungsreaktionen. Durch die Produktion von NADPH wird reduziertes Glutathion regeneriert, folglich können durch die Glutathion-Reduktase und Peroxidase freie Radikale abgefangen werden und so die Auswirkungen von oxidativen Stress reduziert (Jo et al. 2001; Kim et al. 2007; Lee et al. 2004). Dies geschieht beispielsweise über die Reduktion von toxischem Wasserstoffperoxid durch die Glutathion-Reduktase:



Reduziertes NADPH, welches durch IDH1 und IDH2 produziert wird, spielt eine wichtige Rolle im Lipidmetabolismus und in der Cholesterinbiosynthese. So konnte an transgenen Mäusen durch Überexpression des zytosolischen IDH1 Enzyms gezeigt werden, dass diese an Übergewicht, Steatosis hepatis (Leberverfettung) und Hyperlipidämie leiden (Koh et al. 2004).

IDH3 ist ein Heterotetramer und NAD-abhängiges Enzym, das in den Mitochondrien vorkommt und eine wichtige Rolle in der Energiegewinnung im Citratcyklus spielt (Ceccarelli et al. 2002). Ob IDH3 auch eine Rolle in der Tumorgenese spielt, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. In der Studie von Krell et al. konnten bei Patienten mit Glioblastom keine IDH3 Mutationen nachgewiesen werden (Fu et al. 2010; Krell et al. 2011).

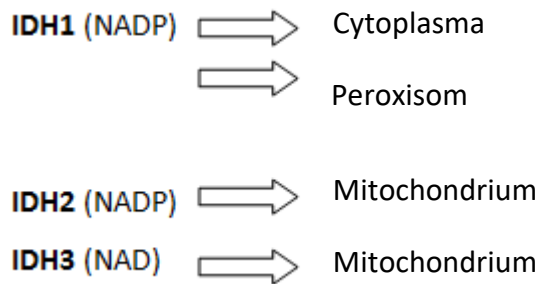


Abbildung 1. Übersicht über die Lokalisation der IDH1, IDH2 und IDH3 Proteine. Abkürzungen: IDH: Isocitratdehydrogenase, NAD(P): Nicotinamid-adenin-dinukleotid-(phosphat)

1.6.3 Die Rolle von *IDH1* und *IDH2* Mutationen in der Tumorgenese

Nach dem aktuellen Forschungsstand gibt es mehrere Theorien über die Rolle von *IDH1* und *IDH2* Mutationen in der Tumorgenese. Es ist anzumerken, dass die Pathogenese von *IDH1* und *IDH2* Mutationen bisher vor allem an Patienten mit Gehirntumoren, insbesondere mit Glioblastom, sowie an AML Patienten untersucht wird. An dieser Stelle werden zwei mögliche Hypothesen postuliert.

Die erste Hypothese zur Tumorgenese durch *IDH1* und *IDH2* Mutationen betrifft die Rolle von IDH im Zell-Metabolismus. Mutationen von Enzymen, die den Citratzyklus betreffen, weisen ähnliche Mechanismen auf, die zur Tumorgenese führen (Thompson 2009). Die Schlüsselrolle im Tumorwachstum kommt dabei dem Hypoxia-inducible-factor (HIF) zu, da dieser als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle im Glucose Metabolismus spielt und die VEGF (vascular endothelial growth factor) getriggerte Angiogenese fördert (Yan et al. 2009). Normalerweise sorgt die Prolylhydroxylase bei Vorhandensein von Sauerstoff für den Abbau von HIF-1L, wobei α -Ketoglutarat (α -KG) und Eisen als Cofaktoren verbraucht werden (Kaelin und Ratcliffe 2008). Nahezu alle bisher detektierten *IDH1* Mutationen resultieren in einem Austausch der Aminosäure Arginin in Position 132, wobei die Substitution mit Histidin am häufigsten ist (R132H) (Balss et al. 2008; Hartmann et al. 2009; Yan et al. 2009) und zu einer verminderten Aktivität (loss of function) des Enzyms führt (Yan et al. 2009; Zhao et al. 2009). Analog hierzu findet sich bei *IDH2* Mutationen häufig ein Austausch der Aminosäure Arginin in Position 172 oder in Position 140 (Ward et al. 2010; Yan et al. 2009; Zhao et al. 2009). Die aufgehobene Fähigkeit des Wildtyp Enzyms gilt auch für *IDH2* (R172) Mutationen (Yan et al. 2009). Dadurch kann weniger Isocitrat zu α -KG oxidativ decarboxyliert werden. Die Prolylhydroxylase kann folglich weniger α -KG verwenden, HIF-1L wird stabilisiert und aktiviert, wodurch die Tumorgenese gefördert wird

(Thompson 2009; Zhao et al. 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass *IDH1* (R132H) Mutationen, in einem dominant-negativen Verhalten, die Wildtyp Aktivität von *IDH1* in vitro inhibieren, in dem sie ein Heterodimer bilden und so nur noch 4% der Wildtyp Funktion ausführen (Zhao et al. 2009). Dies führte zur Annahme, dass *IDH1* und *IDH2* als Tumorsuppressorgene funktionieren können (Reitman et al. 2010; Zhao et al. 2009).

Als Grundlage der zweiten Hypothese zur Tumorgenese durch *IDH1* und *IDH2* Mutationen konnte gezeigt werden, dass *IDH1* R132 Mutationen nicht nur zu einem Verlust der normalen Enzymaktivität führen, sondern auch gleichzeitig ein Protein mit neomorpher Aktivität generieren, das nun die Reaktion von α -KG zu R(-)-2-Hydroxyglutarat (R-2-HG) katalysiert. (Dang et al. 2009). Diese neomorphe Enzymaktivität wird durch strukturelle Veränderungen im Enzym erklärt und konnte auch für weitere *IDH1* Mutationen im Codon 132 wie R132C (Cystein), R132L (Leucin) und R132S (Serin) nachgewiesen werden. In unmutierten IDH Enzymen bilden die Reste von *IDH1* R132, als auch von *IDH2* R172 und *IDH2* R140 Wasserstoffbrückenbindungen mit dem β -Carboxylrest von Isocitrat. Mutationen in diesen Resten favorisieren die Konversion von α -KG zu R-2-HG, wobei dieses Isocitrat strukturell ähnelt aber keine β -Carboxylgruppe enthält (Reitman et al. 2010; Ward et al. 2010). Die Oxidation von NADPH zu NADP⁺ läuft hingegen regelrecht ab. Die in vitro erhöhte Aktivität des Enzyms wurde bestätigt, in dem in allen untersuchten Gliomen, die die *IDH1* R132 Mutation trugen, statistisch signifikant erhöhte R-2-HG Level gefunden wurden (Dang et al. 2009). Auch in der Leukämogenese ist R-2-HG von Bedeutung, so konnten erhöhte R-2-HG Spiegel bei Patienten mit AML und *IDH1* bzw. *IDH2* Mutation nachgewiesen werden (Fathi et al. 2012; Gross et al. 2010; Janin et al. 2014; Losman et al. 2013; Ward et al. 2010). Aktuelle Studien zeigen, dass R-2-HG als kompetitiver Inhibitor von α -KG abhängigen Enzymen fungiert, und α -KG abhängige Dioxygenasen, wie Histon- und DNA-Demethylasen wie z.B. Enzyme der TET Familie, inhibiert (Figueroa et al. 2010a; Lu et al. 2012; Turcan et al. 2012; Xu et al. 2011). Folglich kommt es zu einer DNA- und Histon Hypermethylierung. Die α -KG abhängigen Dioxygenasen sind in der epigenetischen Kontrolle von Genexpression und Zelldifferenzierung involviert und spielen daher auch eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. So konnte für die Pathogenese der Glioblastome gezeigt werden, dass durch die Dominanz von R-2-HG die α -KG abhängige Prolylhydroxylase inhibiert wird und in Folge HIF-1L übermäßig aktiviert wird (Ichimura

2012). In einer Studie von Figueroa et al. wurde bei 344 AML Patienten eine genomweite Methylierungsanalyse durchgeführt und 16 methylierungsassoziierte Subtypen identifiziert, wobei fünf neue Subtypen mit spezifischer epigenetischer Signatur, ohne bisher bekannte genetische oder molekulare Merkmale, nachgewiesen wurden (Figueroa et al. 2010b). In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass zwei der bisher fünf unbekannten epigenetischen Subtypen die *IDH1* und *IDH2* Mutationen darstellen und diese Subtypen mit einer umfassenderen Promoter Hypermethylierung assoziiert sind als andere AML Subtypen. Somit konnten *IDH1* und *IDH2* Mutanten spezifische Hypermethylierungssignaturen zugewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass *IDH1* und *IDH2* Mutationen nicht gemeinsam mit *TET2* Mutationen vorkommen (Figueroa et al. 2010a). Wie schon erwähnt kodiert *TET2* für ein Enzym, welches als Dioxygenase fungiert und die Konversion von 5-Methylcytosin (5mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) katalysiert. Dies führt zu einer Hypermethylierung von DNA. Es ist anzunehmen, dass *TET2* Mutationen ähnliche epigenetische Effekte wie *IDH1* und *IDH2* Mutationen haben, da die *IDH1* und *IDH2* Mutanten die physiologische Funktion von *TET2* inhibieren. *IDH1*, *IDH2* und *TET2* Mutationen induzieren so jeweils eine Störung der Hämatopoese sowie eine vermehrte Expression zellulärer Stammzellmarker und haben daher wahrscheinlich einen leukämogenen Effekt (Figueroa et al. 2010a).

In einer weiteren Arbeit von Sasaki et al. führte die Expression von *IDH1* R132 Mutationen in knock-in Maus Modellen im hämatologischen Gewebe zu einem Nachweis von 10-fach höheren 2-HG Serum Spiegeln als in Wildtyp-Mäusen und zu einer Zunahme an frühen Vorläuferzellen, Anämie, Splenomegalie und extramedullärer Hämatopoese. Außerdem wiesen die Zellen der Mäuse mit den *IDH1* R132 Mutationen charakteristische epigenetische Eigenschaften mit übermäßig stark methylierten Histonen und veränderter DNA Methylierung auf und ähnelten somit menschlichen AML Zellen mit *IDH1* bzw. *IDH2* Mutationen (Sasaki et al. 2012). Die Mäuse mit *IDH1* R132 Mutation wiesen jedoch keinen leukämischen Phänotyp auf und zeigten ein ähnliches Gesamtüberleben wie die Wildtyp Mäuse, was darauf hinweist, dass eine *IDH1* bzw. *IDH2* Mutation alleine nicht ausreicht um eine AML zu induzieren.

1.6.4 Klinische und prognostische Bedeutung der *IDH1* und *IDH2* Mutationen

Mutationen im menschlichen *IDH1* Gen (p.R132C) wurden erstmals bei einem Patienten mit Colonkarzinom in einer Lebermetastase nachgewiesen (Sjöblom et al. 2006). Mutationen im Codon 132 von *IDH1* wurden in einer weiteren Studie bei 3% der Patienten mit Prostatakarzinom und bei 2% der Patienten mit reifzelliger B-Zellvorläufer lymphatischen Leukämie (B-ALL) nachgewiesen (Kang et al. 2009). In einer Studie von Parsons et al. konnte gezeigt werden, dass *IDH1* Mutationen im Codon R132 bei 12% von untersuchten Patienten mit Glioblastoma multiforme, dem häufigsten bösartigen Gehirntumor bei Erwachsenen, vorkommen (Parsons et al. 2008). Nachfolgende Studien konnten Mutationen ebenfalls im Codon R132 von *IDH1* bei der Mehrheit (>70%) von Astrozytomen II° und III° und bei Oligodendrogliomen, sowie in >70% sekundärer Glioblastome, die aus Progression von Vorstufen entstehen, identifizieren (Balss et al. 2008; Bleeker et al. 2009; Ichimura et al. 2009; Kang et al. 2009; Sanson et al. 2009; Watanabe et al. 2009; Yan et al. 2009). Darüber hinaus wurden bei diesen Gehirntumoren zu etwa 3% auch Mutationen im Codon R172 von *IDH2* gefunden; beide Mutationen traten nie gleichzeitig in einem Patienten auf (Hartmann et al. 2009; Yan et al. 2009). Im Rahmen einer multivariaten Analyse, in die Alter, Grad des Tumors, das genomische Profil und die Therapie mit einfließen, konnte gezeigt werden, dass die *IDH1* Mutation ein unabhängiger, prognostisch günstiger Marker bei Glioblastomen in Bezug auf das Gesamtüberleben ist (Sanson et al. 2009). So haben Patienten mit Glioblastoma multiforme mit *IDH1* oder *IDH2* Mutation ein mittleres Gesamtüberleben von 31 Monaten, was signifikant länger im Vergleich zu 15 Monaten von Patienten mit Wildtyp *IDH1* oder *IDH2* ist (Yan et al. 2009). Hier ist jedoch anzumerken, dass das Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastom auch vom Methylierungsstatus des DNA-Reparatur-Enzyms O⁶-Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) abhängig ist. Methylierung des MGMT Promotors führt bei 40% der Patienten zur verbesserten Ansprechrate einer Alkylantien Chemotherapie und somit zu einem verlängerten Gesamtüberleben (Esteller et al. 2000). Patienten mit *IDH1* Mutation und MGMT-Methylierung zeigten in einigen Studien ein signifikant längeres Gesamtüberleben (Molenaar et al. 2014; Wang et al. 2014). Nachdem lange Zeit keine *IDH* Mutationen in weiteren menschlichen Tumoren gefunden wurden (Bleeker et al. 2009; Kang et al. 2009), konnten nach Sequenzierung eines kompletten AML Genoms *IDH1* Mutationen bei Patienten mit AML nachgewiesen werden (Mardis et al. 2009). In dieser

Studie wurden *IDH1* Mutationen bei 15 (8%) von 187 Patienten mit unselektierter AML gefunden, wobei diese mit einem normalen Karyotyp assoziiert waren [13/80 (16%)]. Alle diese Mutationen waren im Codon 132 mutiert; Mutationen, die zur Substitution von Arginin mit Cystein führten (p.R132C) waren am häufigsten. *IDH2* Mutationen wurden in dieser Kohorte nicht gefunden (Mardis et al. 2009). Im Jahr 2010 wurde eine Studie mit einer großen Kohorte von 805 jüngeren Erwachsenen (<60 Jahre) AML Patienten veröffentlicht (Paschka et al. 2010). In dieser Studie wurden *IDH1* oder *IDH2* Mutationen bei 16% von Patienten mit unselektierter AML gefunden; *IDH1* in 7,6% und erstmals *IDH2* in 8,7%; bei zwei Patienten fand sich sowohl eine *IDH1*, als auch eine *IDH2* Mutation. Bei den *IDH1* Mutationen war R132H am häufigsten, bei *IDH2* R140Q (Glutamin).

Die prognostische Relevanz von *IDH1* und *IDH2* Mutationen in Patienten mit AML ist aktuell Gegenstand der Forschung und wird kontrovers diskutiert. *IDH1* Mutationen sind signifikant mit *NPM1* Mutationen assoziiert und erweisen sich für CN-AML Patienten als prognostisch ungünstig (komplette Remissionsrate, Gesamtüberleben), wenn diese zusätzlich den Genotyp *NPM1^{mutiert}/FLT3-ITD^{wildtyp}* aufweisen (Boissel et al. 2010; Ho et al. 2010; Marcucci et al. 2010; Paschka et al. 2010; Schnittger et al. 2010). In einer weiteren Studie war ein Polymorphismus (SNP rs11554137) im Exon 4 von *IDH1* mit schlechtem Outcome (Gesamtüberleben) für molekulare Hochrisiko CN-AML Patienten (*NPM1^{wildtyp}* oder *FLT3-ITD^{mutiert}*) assoziiert (Wagner et al. 2010). Interessanterweise ist die *IDH2* R172 Mutation kaum mit anderen, für die Prognostik bedeutsamen, Mutationen assoziiert und scheint eine schlechtere Prognose in Bezug auf das Erreichen einer kompletten Remission zu haben (Boissel et al. 2010; Green et al. 2011; Marcucci et al. 2010; Paschka et al. 2010). In einigen Studien konnte kein Zusammenhang zwischen dem *IDH1* bzw. *IDH2* Mutationsstatus und der prognostischen Signifikanz nachgewiesen werden (Chou et al. 2010a; Ho et al. 2010; Ravandi et al. 2012; Shen et al. 2011; Thol et al. 2010).

1.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine große Kohorte von AML Patienten (n=920), die im Rahmen einer multizentrischen Therapiestudie der deutsch-österreichischen AML Studiengruppe (AMLSG) intensiv behandelt wurden, retrospektiv auf Mutationen in den *IDH1* und *IDH2* Genen zu untersuchen. Das Ziel war die Inzidenz von *IDH1* und *IDH2* Mutationen klinisch gut charakterisierter jüngerer (18 bis 60 Jahre) AML Patienten zu bestimmen und die klinische Bedeutung der beiden Mutationen zu evaluieren.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und Materialien

Tabelle 3. In dieser Arbeit verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Accu-Jet® Pipettierhilfe	Brand GmbH, Wertheim
Beschriftungsgerät Brother P-Touch 2450DX	Brother International GmbH, Bad Vilbel
Blockthermostat	Liebisch Labortechnik, Bielefeld
Crushed Ice Maschine Scotsman AV100	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Elektrophoresekammer mit Schlitten, Schiene, Kabeln und Kämmen	Thermo Scientific OWL Separation Systems, Asheville, USA
Gene Genius Bio Imaging System mit Drucker	Syngene, Frederick, USA
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrfachdispenser, HandyStep®	Brand GmbH, Wertheim
Mehrkanalpipette, Transferpette®	Brand GmbH, Wertheim
Mikrowelle	Siemens AG, München
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR/CSR Geräte	Applied Biosystems, Foster City, USA
Veriti 96-Well Thermal Cycler	
2720 Thermal Cycler	
Pipette 0,1-2,5 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 2,0-20 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage MS603S	Mettler Toledo, Giessen
Sequenzierer 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Spannungsquelle EPS 600 und 1001	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg

Vortexer/Schüttler Heidolph Reax 1R	Heidolph, Schwabach
Wave® 3500HT System	Transgenomic, Glasgow, UK
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Galaxy Mini und MiniStar	VWR, Darmstadt
Zentrifuge Multifuge 4 KR	Heraeus, Newport Pagnell, UK

Tabelle 4. In dieser Arbeit verwendete Materialien

Materialien	Hersteller
Einmalspritzen Omnifix 1 ml	Braun, Melsungen
Erlenmeyer-Kolben	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main und VWR, Darmstadt
Falcon BlueMax™ Röhrchen 50 ml	Becton, Dickinson, Heidelberg
Kanüle 100 Sterican®	Braun, Melsungen
MicroAmp® 8-Tube und 8-Cap Strip	Applied Biosystems, Foster City, USA
MicroAmp® Optical 96-Well	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mikrotiterplatte 96-Well	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen Biosphere® mit Filter (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Präzisions Dispenser Tips 0,5 ml und 2,5 ml	Brand GmbH, Wertheim
Reaktionsgefäß Safe Seal 1,5 ml und 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß ohne Deckel 2,0 ml (Collection Tube)	Axygen, Union City, USA
Septen für 96-Well Platte	Applied Biosystems, Foster City, USA
Stabpipette, serologisch, 25 ml und 50 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Standzylinder	Brand GmbH, Wertheim

2.1.1 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Tabelle 5. Zusammensetzung des 1x TE-Puffers

Reagenzien	Volumen	Hersteller
1 M TRIS pH 8,0	500 µl	Ambion, Austin, USA
0,5 M EDTA pH 8,0	10 µl	Ambion, Austin, USA
DEPC Wasser	ad 50 ml	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 6. Zusammensetzung des 50x TAE-Puffers

Reagenzien	Volumen	Hersteller
Trizma Base (>99,9% Titration)	242 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aqua Delta Select	600 ml	AlleMan Pharma GmbH, Rimbach
Essigsäure 100%	57 ml	AppliChem, Darmstadt
EDTA-Puffer	100 ml	Applied Biosystems, Foster City, USA
Aqua Delta Select	ad 1000 ml	AlleMan Pharma GmbH, Rimbach

Tabelle 7. Zusammensetzung des 3x Laufpuffers OrangeG

Reagenzien	Volumen	Hersteller
OrangeG	0,2 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol	15 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aqua ad iniectabilia Braun	ad 100 ml	Braun, Melsungen

2.2 Materialgewinnung

Für die Analyse wurden mononukleäre Zellen verwendet. Die mononukleären Zellen wurden zuvor mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aus dem Knochenmark- oder peripheren Blut gewonnen und bei -80°C oder in Flüssigstickstoff gelagert.

2.3 Übersicht über das Vorgehen bei der *IDH 1* und *IDH 2* Mutationsanalyse

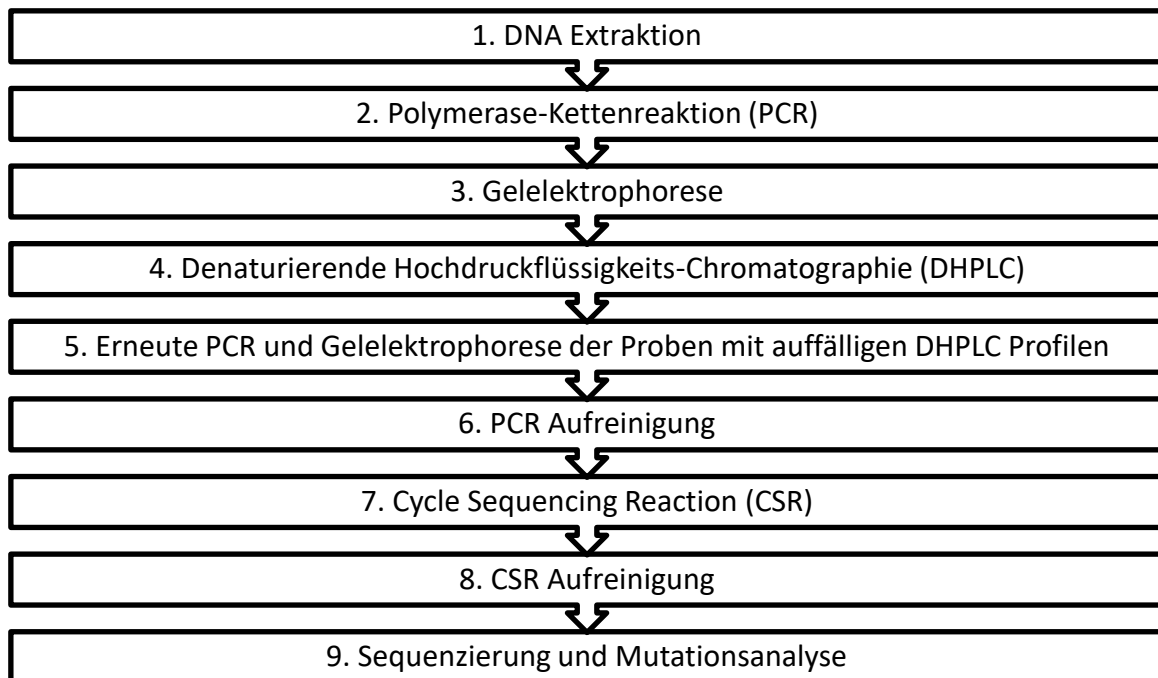


Abbildung 2. Übersicht über das Vorgehen der *IDH1* und *IDH2* Mutationsanalyse. Abkürzungen: CSR: cycle sequencing reaction, DHPLC: denaturierende Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie, DNA: Desoxyribonukleinsäure, PCR: Polymerase-Kettreaktion

2.4 DNA Extraktion aus mononukleären Zellen

Tabelle 8. Benötigte Reagenzien zur DNA-Isolierung

Reagenzien	Hersteller
10x Blue Juice Loading Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
ALL-Prep DNA/RNA Mini Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden
DEPC Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
QIAshredder (250)	Qiagen GmbH, Hilden
RNase-free DNase Set (50)	Qiagen GmbH, Hilden
SUPERase In (RNase Inhibitor)	Ambion, Austin, USA
TE-Puffer	Siehe Tabelle 5
TAE Puffer	Siehe Tabelle 6
TrackIt™ 1 kb DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
TRIzol® Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe

Die Lagerung der Reagenzien erfolgte bei Raumtemperatur, mit Ausnahme der ungelösten DNase, welche im Kühlschrank aufbewahrt wurde und des Suprase In, welcher bei -20°C aufbewahrt wurde.

Die DNA Isolierung der mononukleären Zellen aus dem Knochenmark bzw. Blut erfolgte mittels Allprep DNA/RNA Mini Kit der Firma QIAGEN. Die Durchführung erfolgte mit den mitgelieferten Reagenzien und anhand der Anleitung des Herstellers. Dabei wurden die bei -80°C aufbewahrten Zellpellets zunächst in einem denaturierenden Puffer, welcher DNasen und RNasen inaktiviert, lysiert und anschließend mit Hilfe einer Pipette homogenisiert. Das so entstandene Lysat wurde danach auf eine QIAGEN Allprep DNA spin Säule pipettiert, welche im Zusammenhang mit dem hohen Salzgehalt des Puffers, eine selektive und effiziente Bindung der genomischen DNA an die Säulenmembran gewährleistete (Allprep DNA/RNA Handbuch des Herstellers). Nach zwei Waschschritten und erneutem Abzentrifugieren wurde die DNA in TE-Puffer pH 7,0 eluiert. Die gewonnen DNA Fragmente haben eine durchschnittliche Größe von etwa 15-30 kb und können anschließend für weitere Analysen, wie die PCR, eingesetzt werden. Einige der Pellets wurden mit Hilfe des TRIzol® Reagenz der Firma Invitrogen bearbeitet. Dazu wurden ebenfalls die mitgelieferten Reagenzien verwendet und anhand der Anleitung des Herstellers verfahren. Dieses Verfahren der DNA Isolierung basiert auf der so genannten „single step“ Methode unter der Verwendung von saurem Guanidiniumthiocyanat, Phenol und Chloroform (Chomczynski und Sacchi 1987). Trizol enthält Guanidiniumthiocyanat, das die Zellen lysiert und RNasen inaktiviert. Zusätzlich enthält das Reagenz Phenol, in dem sich DNA und Proteine lösen. Durch die Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation erfolgte die Phasentrennung. Nun waren drei Phasen zu erkennen: Die obere wässrige Phase enthielt die RNA, die Interphase die DNA und die untere Chloroformphase Proteine. Als letzter Schritt wurde die DNA mit absolutem Ethanol gefällt und nach mehreren Waschschritten in TE-Puffer eluiert. Nach Fertigstellung der isolierten DNA-Lösung, wurde eine photometrische Konzentrationsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels NanoDrop ND-1000 durchgeführt. Hierfür wurde etwa 1 µl der DNA-Lösung auf die Messfläche des Spektralphotometers pipettiert und anschließend die Konzentration, sowie das Verhältnis der Absorption bei 260/280 nm gemessen. Dieses Verhältnis wurde als Maß für die Qualität der Probe herangezogen, wobei für genomische DNA ein Wert von etwa

1,8 als allgemein „rein“ angesehen wird (NanoDrop ND-1000 User Manual). Die DNA Lösung wurde für die weitere Verarbeitung bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Tabelle 9. Für die PCR notwendigen Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
10x PCR Puffer (ohne Mg ²⁺)	Transgenomic, Glasgow, UK
Aqua ad iniectabilia Braun	Braun, Melsungen
IDH1/2-F-Primer (10 pmol/μl)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IDH1/2-R-Primer (10 pmol/μl)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Desoxynucleoside Triphosphate Set	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MgSO ₄ PCR Puffer (25 mM)	Transgenomic, Glasgow, UK
Optimase Polymerase	Transgenomic, Glasgow, UK
Zelllinie OCI-AML3 (Wildtypkontrolle)	DSMZ GmbH, Braunschweig

2.5.1 Vorbereitung und Primer

Das Ausgangsmaterial für die PCR war die extrahierte genomische DNA der mononukleären Zellen des Knochenmarks oder des peripheren Blutes. Im ersten Schritt wurden die DNA-Proben auf eine Konzentration von 100 ng/μl verdünnt. Bei Proben, bei denen dies auf Grund geringer Ausgangskonzentration nicht möglich war, wurde entsprechend mehr DNA in die PCR eingesetzt. Für die Herstellung der dNTP-Stocklösung wurden je 25 μl von dATP-, dCTP-, dGTP- und dTTP-Lösung der Konzentration 25 mM vermengt und 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Um die richtige Primerkonzentration von 10 pmol/μl zu erhalten wurden 10 μl der 100 pikomolaren Stocklösung mit 90 μl Aqua dest. gemischt. Für das Design der Primer wurden die NCBI Referenzsequenzen NM_005896.2 (*IDH1*) oder NM_002168.2 (*IDH2*) verwendet. In vorangegangenen Mutationsanalysen hatte sich Exon 4 als Mutationscluster im *IDH1* und *IDH2* Gen erwiesen. (Marcucci et al. 2010; Yan et al. 2009). Deshalb wurde die Lokalisation der Primer so gewählt, dass Exon 4 komplett erfasst wurde. Die benötigten Primer wurden über die Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Als Primer wurden folgende verwendet:

IDH1f3: (5'-CCA TTT GTC TGA AAA ACT TTG CT-3')

IDH1r3: (5'-TCA CAT TAT TGC CAA CAT GAC TT-3')

IDH2f2: (5`-GCT GCA GTG GGA CCA CTA TT-3')

IDH2r1: (5`-TGT GGC CTT GTA CTG CAG AG-3')

Als Polymerase wurde die hitzestabile Optimase Polymerase verwendet. Diese ist laut des Herstellers mit dem später verwendeten Wave® (DHPLC; denaturing high performance liquid chromatography/denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie) kompatibel. Die Polymerase besitzt eine effiziente 3`→5` Exonukleaseaktivität, die für das Ausbessern fälschlicherweise synthetisierter Nukleotide verantwortlich ist (proof reading Aktivität). Eine hohe Fehlerrate würde im DHPLC-Chromatogramm zu einer Veränderung des Peak-Profiles führen.

2.5.2 PCR Ansatz

Tabelle 10. Reagenzien für den PCR Ansatz

Reagenzien	Volumen in µl
10x PCR Puffer (ohne Mg ²⁺)	5
Aqua ad iniectabilia Braun	30,9
DNA (100 ng/µl)	2
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 2,5 mM)	4
IDH1/2-F-Primer (10pmol/µl)	2
IDH1/2-R-Primer (10pmol/µl)	2
MgSO ₄ PCR Puffer (25 mM)	3,6
Optimase Polymerase	0,5
=50 µl	

Die beiden Puffer, Polymerase, dNTPs und Primer wurden bei -20°C gelagert, das destillierte Wasser bei Raumtemperatur.

2.5.3 PCR Reaktionsprotokoll

Zur Durchführung der PCR wurde pro Probe ein 48 µl fassender Mastermix aus dem oben genannten PCR Ansatz und je 2 µl DNA zusammen pipettiert. Des Weiteren wurde bei jeder Patientenanalyse die Zelllinie OCI-AML3 als Wildtypkontrolle, die später für das DHPLC benötigt wird, und eine Leerwertprobe, die keine DNA (non-template-control=NTC)

enthält und zum Ausschluss von Kontamination dient, mitgeführt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, um ein vorzeitiges Beginnen der Reaktion auszuschließen. Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Fragmente und beruht auf zyklischer Wiederholung von drei Schritten (Saiki et al. 1985). Als erstes wurde die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95°C in zwei Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Danach wurde schnell auf 54°C (IDH1) bzw. 58,3°C (IDH2) abgekühlt um eine Rückbildung der Doppelhelix zu verhindern. Die Temperatur wurde anschließend 30 Sekunden gehalten um die Anlagerung (Annealing) von synthetischen Oligonukleotiden (Primern) an das 3'-Ende des zu untersuchenden Genbereiches zu erlauben. Die genaue Temperatur wurde dabei mit Hilfe der frei verfügbaren Software Primer 3 Blast (NCBI) und durch die Länge und Sequenz des Primers bestimmt (54°C für IDH1 und 58,3°C für IDH2). Die Primer hybridisieren an eine DNA-Einzelstrang-Matrize an einer zu seiner Sequenz komplementären Stelle und dienen anschließend der DNA-Polymerase als Startpunkt zur Amplifikation der DNA. Als letzten Schritt kommt es zur sogenannten Elongation, wobei die DNA-Polymerase vom 3'-Ende aus die fehlenden Nukleotide synthetisiert. Die Temperatur für diesen Schritt beläuft sich auf 72°C. Die soeben genannten Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation wurden 32 mal im Thermocycler wiederholt, wobei die DNA-Stränge exponentiell amplifiziert wurden. Die amplifizierten DNA-Fragmente besitzen eine Größe von 360 bp (IDH1) und 293 bp (IDH2). Nach Vollendung aller durchlaufener Zyklen kühlt der Thermocycler auf 4°C ab und hält diese Temperatur bis zum Weiterverarbeiten des Reaktionsansatzes aufrecht.

IDH1:

1.	95°C	5 Minuten		Schritte 2-4: x32
2.	95°C	30 Sekunden		
3.	54°C	30 Sekunde		
4.	72°C	40 Sekunden		
5.	72°C	7 Minuten		
6.	4°C	∞		

IDH2:

1.	95°C	5 Minuten		Schritte 2-4: x32
2.	95°C	30 Sekunden		
3.	58,3°C	30 Sekunde		
4.	72°C	30 Sekunden		
5.	72°C	7 Minuten		
6.	4°C	∞		

2.6 Gelelektrophorese der DNA Produkte

Tabelle 11. Reagenzien für die durchgeführte Gelelektrophorese

Reagenzien	Hersteller
Agarose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromidlösung 1%; 10 mg/ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TrackIt™ 100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Orange G Loading Puffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Die Reagenzien wurden, bis auf Agarose, die bei Raumtemperatur gelagert wurde, im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Überprüfung einer erfolgreichen PCR-Reaktion erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Hierfür wurde ein 2%-iges Gel mittels Aufkochen von Agarose (z.B. 3 g) mit TAE Puffer (z.B. 150 ml) hergestellt. Danach wurden 5-10 µl vom jeweiligen PCR Produkt mit 5 µl des Ladepuffers OrangeG gemischt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Außerdem wurde die in der PCR mitgeführte Leerwertprobe, bestehend aus einem Reaktionsansatz ohne DNA, in die Geltaschen pipettiert. Um die Länge der PCR Produkte abschätzen zu können, wurde flankierend zu den DNA-Proben, ein standardisierter Marker (TrackIt™ 100 bp DNA Ladder) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte bei 120 V, 400 mA und 100 W über 40 Minuten. Dabei wanderte die DNA, auf Grund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen, von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode. Nach der erfolgten Elektrophorese wurde das Gel anschließend für etwa 30 Minuten in Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) gelegt. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren war es möglich die amplifizierten DNA Fragmente durch Anregung mit ultraviolettem Licht fluoreszieren zu lassen.

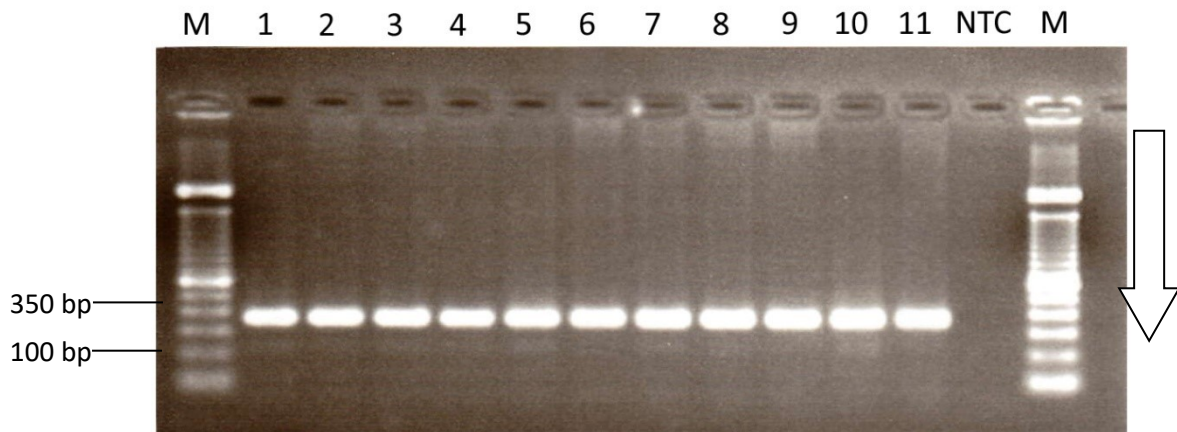


Abbildung 3. Beispiel für ein Gelbild mit amplifizierten DNA Fragmenten (IDH1). Flankierend zu den 11 Patientenproben (1-11) ist der 100bp Längenstandard dargestellt, wobei die Länge der einzelnen Fragmente jeweils ein Vielfaches von 100 beträgt. In diesem Gelbild wird ersichtlich, dass die Patientenproben etwa eine Länge von 360 bp haben. Die Leerwertprobe zeigt keine Bande, was daraus schließen lässt, dass es zu keiner Verunreinigung kam. Abkürzungen: 1-11: Anzahl der Patientenproben, M: Marker (TrackIt™ 100 bp DNA Ladder), NTC: Leerwertprobe (negative template control), Pfeil: Laufrichtung

2.7 Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC)

Tabelle 12. Reagenzien für die DHPLC

Reagenzien	Hersteller
Wave™ High Range Mutation Standard	Transgenomic, Glasgow, UK
Wave™ Low Range Mutation Standard	Transgenomic, Glasgow, UK
Wave™ Puffer A: 0,1 M TEAA in H ₂ O, pH 7	Transgenomic, Glasgow, UK
Wave™ Puffer B: 0,1 M TEAA in H ₂ O, 25% Acetonitril, pH 7	Transgenomic, Glasgow, UK
Wave™ Puffer D: 75% Acetonitril in H ₂ O	Transgenomic, Glasgow, UK
Wave™ Syringe Wash Solution (Injektionsspritzenwaschlösung): 4-5% Acetonitril in H ₂ O	Transgenomic, Glasgow, UK

Die Aufbewahrung der Reagenzien erfolgte bei Raumtemperatur, mit Ausnahme der Standards, welche bei -20°C aufbewahrt wurden.

2.7.1 Funktionsweise und Messprinzip der DHLPC

Bei der DHLPC (denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie) handelt es sich um ein Verfahren, mit dem DNA-Sequenzvarianten detektiert werden können (Frueh und Noyer-Weidner 2003; Jongbloed et al. 2005; Oefner und Underhill 1995). Dabei lassen sich Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), sowie kleinere Insertionen und Deletionen detektieren (Xiao und Oefner 2001). Das Verfahren eignet sich als Screeningmethode, da es im Gegensatz zur direkten Sequenzierung von DNA, wegen des hohen Probendurchsatzes sowohl kostengünstiger, als auch zeitsparender ist (Wagner et al. 1999). Da jedoch nur Sequenzvarianten detektiert werden können und anschließend unklar bleibt, ob das Ergebnis ein Polymorphismus oder eine echte Mutation zeigt, ist im Anschluss eine Sequenzierung der positiv detektierten Proben notwendig.

Das verwendete Modell (Wave™3500HT System der Firma Transgenomic) besteht aus einem Autosampler mit zwei 96-well-Platten, Pumpe, Interface, Ofen, Chromatographie-Säule, UV-Detektor und einem Fragment- Kollektor.

Beim Messprinzip der DHLPC macht man sich das unterschiedliche Schmelzverhalten von Homo- und Heteroduplex- DNA-Fragmenten aus dem PCR-Produkt zunutze. In der zuvor durchgeführten PCR kam es durch Erhitzen der DNA-Fragmente zur Denaturierung der Amplikons. Durch anschließendes Abkühlen haben sich die Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen zusammengelagert. Bestand dabei eine Abweichung der Basenabfolge, wie es bei Vorliegen einer Mutation der Fall ist, dann bildeten sich neben Homoduplices mit komplementären Basenpaaren, auch thermoinstabile Heteroduplices mit einer Basenpaarung außerhalb des Watson-Crick Models aus (Aboul-ela et al. 1985). Die entstandenen Heteroduplices mit ihren Basen-Mismatches können auf Grund ihrer veränderten physikalischen Eigenschaften mit Hilfe einer hochauflösenden Polymermatrix von den Homoduplices getrennt werden.

Das Prinzip dieser Fragmentauftrennung von Nukleinsäuren beruht auf der Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie (Oefner und Underhill 1995). Dabei werden die DNA-Fragmente aus dem PCR-Produkt durch die Injektionsnadel im Gerät injiziert und unter hohem Druck über die Säule geleitet. Die Chromatographie-Säule, beschichtet mit einer hydrophoben Matrix aus alkylierten Polystyren-Divinylbenzol Partikeln, bildet dabei die stationäre Phase (Huber et al. 1993). Die mobile Phase besteht aus mehreren Puffern, wobei Triethylammoniumacetat (TEAA) die wichtigste Funktion zukommt, da dieses

Reagenz als Dipol funktioniert. Die amphiphile TEAA Lösung bindet auf der einen Seite, *via* der positiv geladenen Ammoniumgruppen, an die gelöste, polare DNA, da diese negativ geladene Phosphatgruppen enthält. Auf der anderen Seite kommt es mit Hilfe der hydrophoben Alkylgruppen zur Interaktion mit der unipolaren Säule. Auf diese Weise funktioniert TEAA als Verbindungsstück zwischen DNA und Säule (Frueh und Noyer-Weidner 2003). Um die, über TEAA gebundenen, DNA-Fragmente wieder von der Säulenmatrix zu lösen, enthalten die Puffer zusätzlich Acetonitril. Dieses Reagenz konkurriert mit TEAA um die Bindungsstelle an der Säulenmatrix, wobei durch ansteigende Konzentration von Acetonitril der TEAA-DNA Komplex aus seiner hydrophoben Interaktion mit der Säulenmatrix verdrängt wird und so die DNA von der Säule eluiert wird.

2.7.2 Funktion der Puffer

Für den Betrieb des WAVE® Systems wurden vier (s. Tabelle 12) Pufferlösungen benutzt. Während der DHPLC-Analyse bildeten Puffer A und Puffer B gemeinsam die mobile Phase, in der die zu untersuchenden DNA Fragmente gelöst wurden. Innerhalb eines Laufes wurden die Pufferverhältnisse mit Hilfe einer Pumpe mit Ventilsystem verändert. Zu Beginn erfolgte eine 5%ige Erhöhung des Puffers B. Nun war die Bindung der DNA-Fragmente über TEAA an die Chromatographie-Säule möglich. Danach folgte eine kontinuierliche Konzentrationserhöhung des Puffers B, was wegen des dadurch steigenden Acetonitril-Anteils zur schrittweisen Elution der gebundenen DNA-Fragmente von der Säule führte. Anschließend erfolgte eine Reinigung der stationären Phase mit 100% Puffer B, um eventuelle Probenreste von der Säule zu waschen. Als letzten Schritt wurde die Säulenmatrix mit der ursprünglichen Pufferkonzentration equilibriert. Zur Vermeidung von Kontamination der Injektionsspritze, wurde diese nach jedem Analysevorgang mit der Wave™ Syringe Wash Solution gespült. Puffer D kam bei speziellen Reinigungsvorgängen, wie dem „extended hot wash“, alle 100 Injektionen zum Einsatz und sorgte dafür, dass eventuelle Probenrückstände in der Chromatographiesäule entfernt wurden. Etwa alle 1000 Injektionen erfolgte derselbe Waschschrift, jedoch bei in umgekehrter Richtung eingebauter Chromatographiesäule („reverse hotwash“).

2.7.3 Standards und Analysevorgang

Vor jedem Analysevorgang wurde das DHPLC-Gerät gemäß der Anleitung gespült. Danach wurden jeweils zwei Mutationsstandards bei jeweils zwei unterschiedlichen Schmelztemperaturen detektiert („high melting standard“ bei 70°C und „low melting standard“ bei 56°C). Diese dienten der Überprüfung der regelrechten Funktion des DHPLC-Gerätes. Waren alle ermittelten Werte der Standards innerhalb der Norm, wurden die PCR-Reaktionsgefäße mit 10 µl PCR Produkt pro Probe in den Autosampler des Wave-Systems gestellt und der Run gestartet. Die Injektion erfolgte mit 6-7 µl pro Probe. Die Analyse einer Probe, von der Injektion bis zum Chromatogramm, dauerte etwa drei Minuten. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mittels Navigator™ Software Version 2.2.0 der Firma Transgenomic.

2.7.4 Analysetemperaturen

Das eingesetzte DHPLC-Gerät kann, bei targetspezifischen Temperaturprofilen der Säule, Nukleinsäuren unter nicht denaturierenden, partiell denaturierenden und komplett denaturierenden Zustand analysieren. Für das Mutationsscreening in dieser Arbeit wurde das partiell-denaturierende Verfahren bei 58,9°C (*IDH1*) und 63,0°C (*IDH2*) angewendet, wobei es bei dieser Temperatur zur teilweisen Auftrennung (ca. 70%) der komplementären DNA Stränge kommt, d.h. diese teilweise einzelsträngig vorliegen. Die Schmelztemperatur ist hierbei abhängig von der Größe und Sequenz des DNA-Fragmentes. Zur Detektion von Sequenzvarianten mittels DHPLC ist, wie schon erwähnt, die Unterscheidung von Hetero- und Homoduplices in einem PCR Produkt von Bedeutung. Voraussetzung dafür ist, dass die Analyse unter partiell denaturierenden Bedingungen stattfindet, um Heteroduplices auf Grund ihrer Sequenz von Homoduplices mit gleicher Länge zu trennen. Auf Grund der nicht-homologen Basenpaarung haben Heteroduplices einen geringeren Schmelzpunkt, denaturieren also bei niedrigeren Temperaturen als vergleichbare Homoduplices. Bei Temperaturen knapp unter diesem Schmelzpunkt ist die Denaturierung der Heteroduplices also schon weiter fortgeschritten als die der Homoduplices. Die ideale Temperatur zur partiellen Denaturierung und folglich Separierung von Hetero- und Homoduplices liegt zwischen 52°C und 75°C (Frueh und Noyer-Weidner 2003)

2.7.5 Mutationsdetektion

Bei einer für das jeweilige Fragment optimalen Analysetemperatur eluieren die thermolabileren Heteroduplices vor den Homoduplices. Die abgewaschenen DNA-Fragmente werden mit Hilfe eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 260 nm erfasst und anschließend mit Hilfe der Navigator™ Software in einem Absorptions-Zeit-Chromatogramm dargestellt. Im Idealfall sollten bei heterozygoten Anlageträgern im Chromatogramm vier Peaks erkennbar sein: zwei Heteroduplex-Peaks und zwei Homoduplex-Peaks. Meist sind jedoch nur insgesamt zwei Peaks sichtbar, da der Unterschied der Retentionszeit so gering ist, dass die jeweiligen zwei Hetero- und zwei Homoduplices quasi zur selben Zeit eluieren und somit nicht von der Säule erfasst werden können (Xiao und Oefner 2001). Zeigt das Chromatogramm nun bei heterozygoten Anlageträgern zwei Peaks, so entspricht der erste Peak den Heteroduplices. Da diese auf Grund ihrer herabgesetzten Helizität weniger Ionenpaarungen mit der soliden Phase eingehen können, erscheinen sie zeitlich vor dem zweiten Peak, bestehend aus den Homoduplices.

Bei homozygoten Anlageträgern werden keine Heteroduplices gebildet, sodass ein homogener Peak im Chromatogramm resultiert. Durch Zugabe von amplifizierter WT-DNA in gleichen Teilen und wiederholtem Erhitzen mit anschließendem langsamen Abkühlen bildet sich jedoch wieder ein Heteroduplex und die Mutation lässt sich darstellen (Schmitt et al. 2000).

2.7.6 Mutationsanalyse des Exon 4 des *IDH1* und *IDH2* Gens

Da alle bisher bekannten *IDH1* und *IDH2* Mutationen heterozygot sind (Ward et al. 2010), erhielt man, nach der Analyse der jeweiligen PCR-Produkte, Heteroduplices, welche als solche auf dem Wave™ 3500HT System direkt detektiert werden können.

In den Abbildungen 4 - 6 werden die typischen Elutionsprofile für den Wildtyp, sowie beispielhaft für eine Sequenzvariation im *IDH1* und *IDH2* Gen dieser Analyse angegeben. Hierbei wurde die Absorption (mV, entlang der Ordinate) in Abhängigkeit der Retentionszeit (min, entlang der Abszisse) aufgetragen.

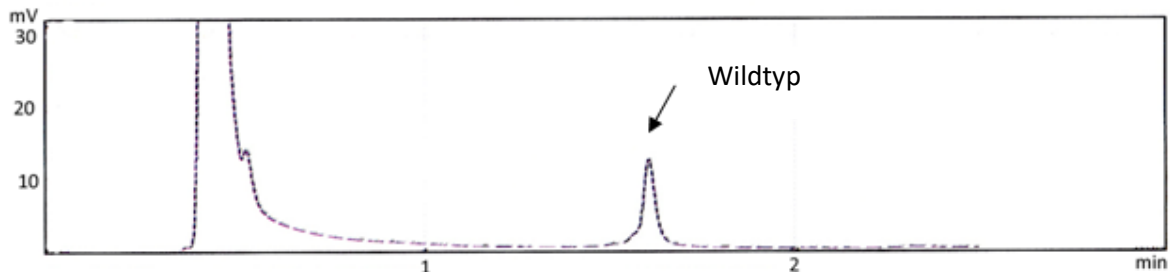


Abbildung 4. Der Wildtyp wird nach etwa 1min 30sek eluiert.

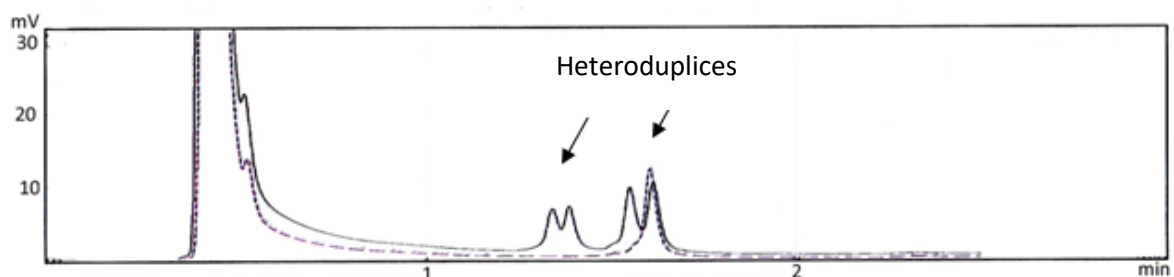


Abbildung 5. IDH1 Sequenzvariation. Im Hintergrund ist zum Vergleich der Wildtyp (gestrichelte Linie) zu sehen.

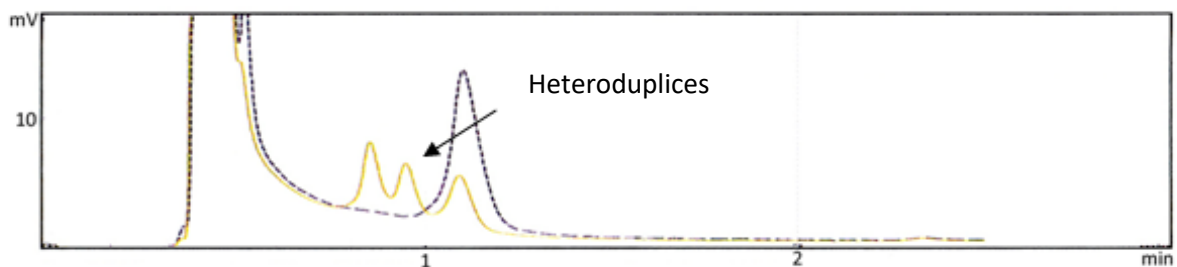


Abbildung 6. IDH2 Sequenzvariation. Im Hintergrund ist zum Vergleich der Wildtyp (gestrichelte Linie) zu sehen.

2.8 PCR und Gelelektrophorese der Proben mit auffälligen DHPLC Profilen

Zur Re-Amplifikation der Produkte, die im Wave System eine auffällige Sequenzvariation aufwiesen, erfolgte mit Patienten-DNA eine erneute PCR unter Verwendung der Amplitaq® Gold DNA Polymerase der Firma Applied Biosystems.

Tabelle 13. PCR Ansatz

Reagenzien	Volumen in μl
10x PCR Gold Puffer	5
Aqua ad iniectabilia Braun	31,1
DNA (100 ng/ μl)	2
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 2,5 mM)	4
IDH1/2-F-Primer (10pmol/ μl)	2
IDH1/2-R-Primer (10pmol/ μl)	2
MgCl ₂ PCR Puffer (25 mM)	3,6
Amplitaq® Gold Polymerase	0,3
=50 μl	

Die beiden Puffer, Polymerase, dNTPs, Primer und DNA wurden bei -20°C gelagert, das destillierte Wasser bei Raumtemperatur. Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

2.8.1 Temperaturprofil der PCR

IDH1:

- | | | | |
|---------|-------------|---|-------------------|
| 1. 95°C | 11 Minuten | } | Schritte 2-4: x34 |
| 2. 95°C | 30 Sekunden | | |
| 3. 54°C | 30 Sekunde | | |
| 4. 72°C | 40 Sekunden | | |
| 5. 72°C | 7 Minuten | | |
| 6. 4°C | ∞ | | |

IDH2:

- | | | | |
|-----------|-------------|---|-------------------|
| 1. 95°C | 5 Minuten | } | Schritte 2-4: x34 |
| 2. 95°C | 30 Sekunden | | |
| 3. 58,3°C | 30 Sekunde | | |
| 4. 72°C | 30 Sekunden | | |
| 5. 72°C | 7 Minuten | | |
| 6. 4°C | ∞ | | |

Die Durchführung der Gelelektrophorese zur Überprüfung der Produktgewinnung war mit dem oben genannten Protokoll identisch.

2.9 Aufreinigung der PCR-Produkte

Tabelle 14. Für die Aufreinigung benötigten Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
QIAquick® PCR Purification Kit (250)	Qiagen GmbH, Hilden
- QIAquick spin columns	
- Auffangtubes, 2 ml	
- Puffer: PB-Puffer	
PE-Puffer (Konzentrat)	
EB-Puffer	
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Die Aufbewahrung der Reagenzien erfolgte bei Raumtemperatur.

Um aufgereinigte DNA aus dem PCR-Produkt zu gewinnen, wurden die Proben mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kit (250) der Firma Qiagen prozessiert. Dabei wurden die mitgelieferten Lösungen verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Als erstes wurde der restliche PCR Ansatz von etwa 45 µl mit 200 µl PB-Puffer durchmischt. Der gesamte Ansatz wurde dann auf die QIAquick spin columns pipettiert und bei 13000 rpm für eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. In den Aufreinigungssäulen ist eine Silikamembran enthalten, an die die DNA bindet. Der PB- Puffer enthält eine hohe Salzkonzentration und gewährleistet optimalen pH Wert ($\leq 7,5$), was Voraussetzungen für die Bindung der DNA an die Säule ist. Auf der anderen Seite dient der PB-Puffer auch als Waschpuffer; so werden bei der Sequenzierung unerwünschte Primerreste, dNTPs, Polymerase, Puffer und Salze entfernt. Nach Verwerfen des Eluats wurden im nächsten Waschschrift 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und dadurch die DNA von den Salzen aus dem PCR-Rest durch Zentrifugation über 60 Sekunden bei 13000 rpm getrennt. Das Eluat wurde wieder verworfen und anschließend wurde die Säule bei identischen Einstellungen trocken zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues 2 ml Auffangtube mit abgeschnittenem Deckel gestellt und 30 µl EB-Puffer (Eluationspuffer) in die Mitte der Säulenmembran pipettiert. Nach einminütiger Inkubation wurde die DNA durch anschliessende Zentrifugation bei identischen Einstellungen eluiert. Die aufgereinigte DNA wurde in ein 1,5 ml-Reaktionstube übergeführt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.10 Cycle Sequencing Reaction (CSR)

Die CSR basiert auf dem Prinzip der enzymatischen Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Hierfür wurde mit dem zuvor aufgereinigten PCR Produkt eine weitere, lineare PCR durchgeführt. Es wurden jedoch zwei Mastermixe angefertigt, d.h. es wurde pro Mix nur ein Primer (entweder Vorwärts- oder Rückwärtsprimer) in den Reaktionsansatz pipettiert, damit alle synthetisierten Stränge über dieselbe Orientierung verfügen und es bei der anschließenden Sequenzierung zu keiner Überlagerung der F- und R- Sequenz kommt. Die CSR wurde mit dem BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Dieser enthält neben der thermostabilen AmpliTaq-DNA-Polymerase und modifizierten Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs) auch vier verschiedene, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten, Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTPs; ddATP: grün, ddCTP: blau, ddGTP: schwarz, ddTTP: rot markiert). Während des CSR-Vorganges werden dNTPs und ddNTPs nach dem Zufallsprinzip eingebaut. Da den ddNTPs eine 3'-OH-Gruppe fehlt, kann die Taq-Polymerase den Strang nicht mehr weiter synthetisieren, sobald sie auf ein ddNTP trifft und es kommt zum Kettenabbruch. Auf diese Weise entstehen, von dem zu untersuchenden DNA-Templet, eine Vielzahl, in der Länge variierenden, DNA-Fragmente, die sich jeweils um ein Nukleotid unterscheiden. Die terminierende Base am 3'-Ende kann durch ihre Fluoreszenz mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes kapillarelektrophoretisch detektiert und computergestützt analysiert werden. Die Aufbewahrung der fluoreszenzmarkierten Produkte erfolgte bis zur Weiterverarbeitung lichtgeschützt bei 4 °C im Kühlschrank.

Tabelle 15. PCR-Ansatz für die CSR

Reagenzien	Volumen in µl	Hersteller
Aqua ad iniectabilia Braun	10	Braun, Melsungen
BigDye Terminator v.1.1	2	Applied Biosystems, Foster
- dNTPs		City, USA
- fluoreszenzgefärbte ddNTPs		
- AmpliTaq-DNA- Polymerase		
- MgCl ₂ Puffer		

- Tris-HCl-Puffer		
Big Dye Terminator v.1.1,	1	Applied Biosystems, Foster City, USA
3.1 5x Sequencing Buffer		
IDH1/2-F oder R Primer	1	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
(10pmol/μl)		
Aufgereinigtes PCR Produkt	1	
= 15 μl		

Die Reagenzien wurden bei -20°C aufbewahrt, mit Ausnahme des Aqua ad iniectabilia, welches bei Raumtemperatur gelagert wurde. Der Big Dye Terminator wurde zudem dunkel gelagert, da die Fluoreszenzkraft bei Tageslicht abnimmt. Das Zusammenpipettieren der Reagenzien erfolgt auf Eis, um ein frühzeitiges Starten der Reaktion zu verhindern.

Temperaturprofil der CSR:

1. Initiale Denaturierung	96°C	2 Minuten	} Schritte 2-4: x30
2. Denaturierung	95°C	15 Sekunden	
3. Annealing	55°C	1 Minute	
4. Elongation	60°C	3 Minuten	
5.	4°C	10 Minuten	
6.	4°C	∞	

2.11 Aufreinigung der CSR-Produkte

Tabelle 16. Für die Aufreinigung benötigte Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
DyeEx® 2.0 Spin Kit (250)	Qiagen GmbH, Hilden
- Dye Ex Spin Columns	
- Auffangtubes 2 ml	

Im Anschluss an die CSR wurden die amplifizierte DNA-Fragmente mit dem DyeEx Spin Kit der Firma QIAGEN aufgereinigt, um nicht eingebaute, fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosid-Triphosphate zu entfernen. Das Prinzip des Dye Ex Spin Kits beruht auf der Gelfiltrationschromatographie, wobei die Auftrennung der Moleküle nach deren Molekulargewicht erfolgt. Hierfür wurden „Collection Tubes“ mit flüssigem Gelfiltrationsharz durch Zentrifugation bei 3000 rpm für drei Minuten von der flüssigen in

die feste Phase überführt. Diese Kügelchen mit einheitlicher Porengröße entsprechen der stationären Phase. Die mobile Phase besteht aus den CSR-Proben inklusive der darin gelösten DNA-Fragmente. Die CSR-Proben (15 µl) wurden auf die Chromatographiesäulen aufgetragen und nochmals bei 3000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Hierbei diffundierten die kleinen Bestandteile, wie die überschüssigen ddNTPs, in das Gel und verblieben dort, wohingegen die größeren DNA-Fragmente durch das Gel hindurchfließen konnten und im Eluat wiedergewonnen wurden.

Der erhaltene Durchfluss wurde in ein 0,5 ml-Reaktionstube pipettiert und bis zur Sequenzierung dunkel bei -20 °C gelagert.

2.12 Sequenzierung

Tabelle 17. Für die Sequenzierung notwendiges Reagenz

Reagenzien	Hersteller
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, Foster City, USA
POP-7™ Polymer	Applied Biosystems, Foster City, USA

Die Sequenzierung mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes ermöglicht die Bestimmung der Nukleotidsequenz. Die bei der CSR hergestellten DNA-Stränge sind am 3'-Ende mit einem fluoreszenzmarkierten ddNTP versehen und besitzen eine unterschiedliche Länge. In einer 96-Well Mikrotiterplatte wurden jeweils die 15 µl DNA-Produkt mit 5 µl Formamid, welches der Stabilisierung und Denaturierung von Nukleinsäuren dient, gemischt. Die DNA-Stränge wurden vor der Sequenzierung durch Erhitzen auf 95 °C über 2 Minuten in Einzelstränge denaturiert. Mittels Kapillarelektrophorese wurden die Einzelstränge der Länge nach auf dem Kapillarsequenzierer 3130xl Genetic Analyser aufgetrennt. Die Detektion der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Fragmente erfolgte durch Anregung der Farbstoffe über zwei fokussierte Argon-Ionen Laserstrahlen und die Erfassung der Emission nach spektraler Aufspaltung mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (Charge Coupled Device-Kamera). Als Ergebnis erhielt man eine Abfolge von Fluoreszenz-Peaks, die aufgrund ihrer Wellenlänge computergestützt durch die Software Sequencing Analysis 5.2 den einzelnen Nukleotiden zugeordnet werden konnten. Das Elektropherogramm (=Abfolge der Farbsignale) entspricht der Sequenz der Basen. Stellen, an denen sich die beiden Allele voneinander unterscheiden, erscheinen als Doppelsignale.

Für die exakte Analyse der Basenabfolge von *IDH1* und *IDH2* wurde jede Probensequenz mit einer Wildtyp-Referenzsequenz (Zelllinie OCI-AML3) verglichen.

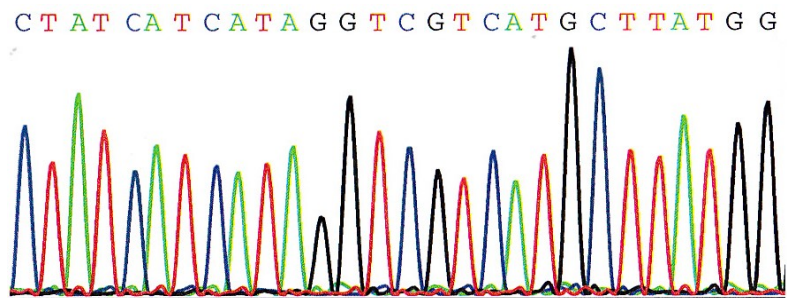


Abbildung 7. Sequenzprofil einer IDH-Wildtypsequenz (OCI-AML3)

Tabelle 18. Fluoreszenzmarkierung der ddNTPs und deren Farbe im Sequenzprofil

Terminierendes ddNTP	Fluoreszenzmarkierung	Farbe
ddA ^{Grün} TP	R6G	Grün
ddC ^{Blau} TP	R110	Blau
ddG ^{Schwarz} TP	TAMRA	Schwarz
ddT ^{Rot} TP	ROX	Rot

2.13 Klonierung

Tabelle 19. Für die Klonierung notwendigen Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Aqua ad iniectionem	Braun, Melsungen
Bacto™ Agar	Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien
Bacto™ Tryptone (pankreatischer Casein-Auszug)	Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien
Bacto™ Yeast Extract (bakterieller Hefeextrakt mit Vitamin B Komplex)	Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien
Kanamycin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe

Um im Falle des Auftretens von zwei unterschiedlichen Mutationen bei einem Patienten entscheiden zu können, ob diese auf unterschiedlichen Allelen lokalisiert sind, wurde eine Klonierung der entsprechend veränderten PCR-Produkte in *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien vorgenommen. Hierfür wurde der TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing der Firma Invitrogen verwendet. Zur Durchführung der Klonierung wurde zunächst wie unter 2.7 beschrieben, eine PCR mit der Amplitaq Gold Polymerase durchgeführt. Diese Taq-Polymerase besitzt eine terminale Transferaseaktivität, durch die ein zusätzliches Adenin (A) an die 3'-Enden der DNA-Produkte angehängt wurde. Anschließend wurde das PCR-Produkt gelelektrophoretisch nachgewiesen und mit dem Purification Kit aufgereinigt (2.5 und 2.8). Der im Kit enthaltene Plasmidvektor (pCR® 4-TOPO®) besteht aus 2956 bp, besitzt in seiner linearisierten Form einen 3'-Thymidin Überhang und hat an beiden Enden die Topoisomerase I des *Vaccinia virus* gebunden, was zur Aktivierung des Vektors notwendig ist (TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing User Manual, Invitrogen, 2006). Diese überhängenden, „klebrigen“ (sticky) Enden führen zu einer effizienten Ligation des PCR Produktes mit dem Vektor. Des Weiteren enthält der Plasmid-Vektor das sogenannte CcdB-Gen (Control of cell death B) und ist mit dem C-terminalen Ende eines LacZ α -Fragmentes, welches für die Spaltung von Lactose verantwortlich ist, fusioniert. Das CcdB-Gen führt normalerweise zu Gyrase-vermittelten DNA-Doppelstrangbrüchen und somit zur Letalität von Zellen (Bernard und Couturier 1992). Durch den Einbau eines PCR-Produkts in den Plasmid-Vektor wird die LacZ α -ccdB-Fusion gehemmt, was zum selektiven Überleben der Zellen mit rekombinantem, d.h. das PCR-Produkt tragendem, Vektor führt (Bernard et al. 1994). Als weiteren Bestandteil des Plasmidvektors ist das Gen für Kanamycin-Resistenz nennenswert, da nur Zellen im Nährmedium überleben, die dieses Gen tragen.

Tabelle 20. Klonierungsansatz

Reagenzien	Volumen in μ l
Aqua ad iniectionabilia	2
PCR-Produkt	2
Salt Solution	1
pCR® 4-TOPO®-Vektor	1
= 6 μ l	

Der Klonierungsansatz wurde zusammen pipettiert, gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde er bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gestellt. Während der Klonierungsreaktion kam es zur Ligation des PCR Produktes mit dem Vektor. In der anschließenden Transformationsreaktion erfolgte die Einschleusung der rekombinanten Vektoren in E.coli. Hierfür wurden 2 µl der Klonierungsreaktions-Lösung zu den auf Eis aufgetauten E. coli One Shot® TOP 10 dazugegeben und vorsichtig vermischt. Anschließend folgte eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Danach erfolgte bei 42°C im Wasserbad ein Hitzeschock für 30 Sekunden, um die Transformation des Vektors in die Zellen zu ermöglichen. Nach dem kurzen Hitzeschock wurden die Proben sofort wieder auf Eis gestellt. Anschließend wurden 250 µl, des bei Raumtemperatur aufgetauten S.O.C. Mediums, hinzugefügt und die Proben horizontal bei 37°C für eine Stunde im Schüttel-Inkubator bei 200 rpm inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden 100 µl und 150 µl jeweils auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte mit 50 µg/ml Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank mit dem Deckel nach unten inkubiert.

2.13.1 Durchführung der Kolonie-PCR

Am nächsten Tag wurden mit Hilfe von sterilen Pipettenspitzen einzelne Kolonien geerntet und direkt in den vorbereiteten Mastermix (s. Tabelle 10) hinzugegeben. Als Polymerase wurde die hitzestabile Optimase Polymerase verwendet, da in einem weiteren Schritt eine DHPLC durchgeführt werden soll. Die anschließende PCR wurde wie unter 2.5.3 beschrieben durchgeführt. Die Durchführung der Gelelektrophorese zur Überprüfung der Produktgewinnung war mit dem unter 2.6 genannten Protokoll identisch.

2.14 Thermische Denaturierung

Wie in 2.7.5 beschrieben werden bei homozygoten Anlageträgern keine Heteroduplices gebildet, sodass ein homogener Peak im Chromatogramm resultiert und die Unterscheidung zum Wildtyp am Wave® unmöglich ist. Durch Zugabe von amplifizierter Wildtyp-DNA in gleichen Teilen lässt sich die Mutation jedoch darstellen. Hierfür wurden jeweils 5 µl des eben gewonnenen PCR Produktes mit 5 µl Wildtyp gemischt. Beim anschließenden Denaturieren auf einem Thermocycler wurden die Doppelstränge aufgetrennt und durch langsames Abkühlen des Denaturierungsprogrammes lagerten sich

die beiden Stränge wieder aneinander. Dabei bildete sich bei einer homozygoten Mutation ein Heteroduplex zwischen homozygoten PCR Produkt und Wildtyp.

Temperaturprofil der thermischen Denaturierung:

- | | | | |
|----|-----------------|------------|------------------|
| 1. | 95°C | 10 Minuten | |
| 2. | 95°C | 1 Minute | } Schritt 2: x46 |
| | -1,5°C / Zyklus | | |
| 3. | 25°C | 5 Minuten | |
| 4. | 4°C | ∞ | |

2.15 Vervollständigung der Klonierung

Zur Analyse der Gensequenzen wurden die Schritte 2.7 (DHPLC), 2.9 (Aufreinigung mittels Purification Kit), 2.10 (CSR), 2.11 (Aufreinigung mittels Big Dye) und 2.12 (Sequenzierung) wie beschrieben erneut durchgeführt.

2.16 Patientenkohorte und Untersuchungsmaterial

Mit Hilfe des etablierten Mutations-Assays wurden in dieser Arbeit 920 Patienten mit neu diagnostizierter akuter myeloischen Leukämie im Alter zwischen 18 und 60 Jahren retrospektiv auf das Vorhandensein einer *IDH1* und/oder *IDH2* Mutation untersucht. Alle Patienten wurden innerhalb der multizentrischen Therapiestudie AMLSG 07-04 behandelt (s. Abbildung 8). Die Patienten wurden zwischen 2004 und 2009 in die Studie aufgenommen. Die untersuchten Proben stammten entweder aus dem Knochenmark (KM; n=645) oder aus dem peripheren Blut (PB; n=275) und wurden jeweils bei Diagnosestellung entnommen. Die entnommenen Proben wurden nach Aufarbeitung als mononukleäres Zellpellet bei -80 °C asserviert. In diese Studie konnten Patienten mit *de novo* AML, sekundärer AML (s-AML), sowie therapieassoziiierter AML (t-AML) eingeschlossen werden. Die Diagnose der AML musste vor Einschluss nach den Kriterien der WHO-Klassifikation gesichert sein (Swerdlow et al. 2008).

2.17 Therapieablauf in der AMLSG 07-04 Studie

Die AMLSG 07-04 Studie war eine randomisierte Phase II Studie, welche Valproinsäure, All-trans-Retinolsäure (ATRA) und Pegfilgrastim in Kombination mit konventioneller intensiver Chemotherapie geprüft hatte (s. Abbildung 8). Der Zeitraum, in dem 1180 Patienten in die

AMLSG 07-04 Studie rekrutiert werden konnten lag zwischen 2004 und 2011. Es wurden jüngere Patienten (<60 Jahre) mit einer neu diagnostizierten AML eingeschlossen. Einer intensiven Doppelinduktion folgte eine risikoadaptierte Konsolidierungstherapie. Die Patienten wurden vor der Doppelinduktion in den Standardarm oder in den Prüfarm randomisiert. Der Standardarm enthielt als Induktionstherapie ICE (Idarubicin, Cytarabin, Etoposid), wohingegen im Prüfarm zusätzlich ATRA enthalten war. Beim Erreichen einer CR erhielten die Patienten ohne genetisch hohe Risikokonstellation weitere Zyklen einer Konsolidierungstherapie. Die Patienten mit einer CBF-AML, die durch eine balancierte Translokation t(8;21) oder inv(16)/t (16;16) charakterisiert sind, erhielten insgesamt drei Zyklen von hochdosierter intravenöser Chemotherapie mit Cytarabin +/- orales ATRA sowie anschließend nach jedem Zyklus Pegfilgrastim subkutan. Die Patienten, die ATRA erhielten, wurden in zwei Gruppen randomisiert, wobei nur eine Gruppe zusätzlich plasmaspiegel-adaptiert Valproinsäure oral erhalten hatte. Nur Patienten mit anhaltender CR qualifizierten sich für den jeweils nächsten der drei Konsolidierungsblöcke. Für Patienten mit Hochrisiko-Zytogenetik (z.B. komplexer Karyotyp), sowie für refraktäre Patienten wurde eine allogene Stammzelltransplantation von einem HLA-identen Familienspender bzw. von einem Fremdspender, angestrebt. Standardrisikopatienten (nicht „Hoch Risiko“, nicht CBF-AML) erhielten eine Hochdosis-Cytarabin Therapie oder alternativ eine allogene Stammzelltransplantation bei Vorhandensein eines geeigneten Familienspenders. Die primären Ziele der Studie waren die Ermittlung des Einflusses von ATRA auf die CR-Rate nach Doppelinduktionstherapie; die vergleichende Evaluation unterschiedlicher zeitlicher Sequenzen nach Konsolidierungstherapie mit hochdosiertem Cytarabin in Bezug auf die antileukämische Wirksamkeit; und die Ermittlung des *NPM1*-Mutationsstatus als prädiktiver Faktor für ATRA Therapie-Effekte auf das ereignisfreie Überleben (EFS; event free survival). Ereignisse wären beispielsweise Tod während der Induktionstherapie oder refraktäre Erkrankung nach der Induktionstherapie.

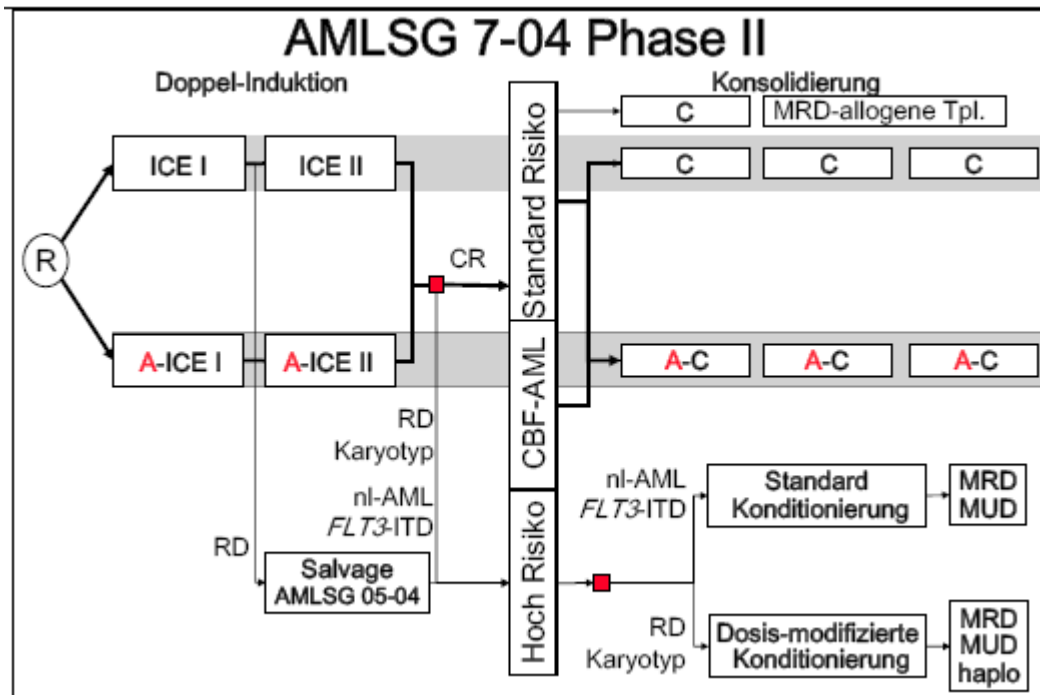


Abbildung 8. Übersicht über das Therapieschema der Therapiestudie AMLSG 07-04, aus dem Studienprotokoll der Therapiestudie AMLSG ULM. Abkürzungen: A= All-trans-Retinolsäure, AML= akute myeloische Leukämie, C= Cytarabin, CBF: core binding factor, CR= komplette Remission, E= Etoposidphosphat, haplo= haplo identischer Familienspender, MRD= Familienspender, MUD= Fremdspender, nl= normaler Karyotyp, R= Randomisation, RD= Refraktäre Erkrankung, Tpl= Transplantation

2.18 Statistische Auswertung

Der Schwerpunkt dieser experimentellen Arbeit lag in der molekulargenetischen Untersuchung von Mutationen der *IDH1* und *IDH2* Gene in einer großen Kohorte von jüngeren AML Patienten. Die untersuchten Patientenproben und die korrespondierenden klinischen Daten wurden im Rahmen einer multizentrischen Studie (Leiter: Prof. Dr. med. H. Döhner) der AMLSG gewonnen. Die Daten der Mutationsanalysen stellten die Grundlage für die Durchführung von Auswertungen zur Häufigkeit dieser Genmutationen in der Population von jüngeren AML Patienten, zur Assoziation der Mutationen mit klinischen und genetischen Merkmalen und zu ihrer prognostischen Bedeutung bei der AML dar. Die Dokumentation und die Pflege der Daten und die statistischen Auswertungen erfolgten in der AMLSG-Studienzentrale der Klinik für Innere Medizin III in Ulm. Aufgrund der Komplexität und der Größe des klinischen Datensatzes erfolgten die statistischen Analysen durch eine Mitarbeiterin der Studienzentrale, Frau Daniela Weber. Ich war im Rahmen der

Promotionsarbeit kontinuierlich an der Diskussion zur Durchführung der statistischen Analysen und Interpretation der Daten und Ergebnisse beteiligt.

Definitionen zur Beurteilung des klinischen Verlaufs:

Die folgenden Definitionen für den klinischen Verlauf beruhen auf den Empfehlungen des European Leukemia Net (ELN) (Döhner et al. 2010). Eine komplette Remission lag vor, wenn weniger als 5% Blasten im Knochenmark und keine Blasten mit Auerstäbchen vorhanden waren. Es durfte keine extramedulläre Erkrankung vorliegen. Die absolute Neutrophilenzahl musste größer als $1,0 \times 10^9/L$; die absolute Thrombozytenzahl musste größer als $100 \times 10^9/l$ sein. Das rezidivfreie Überleben (relapse free survival, RFS) ist nur für Patienten die eine komplette Remission bzw. eine komplette Remission mit inkompletter Regeneration erreicht hatten definiert; es wurde vom Datum des Erlangens der Remission bis zum Datum des Rezidivs oder des Eintritts des Todes berechnet. Das Gesamtüberleben (overall survival, OS) ist für alle Studienteilnehmer definiert; es wurde vom Datum des Eintritts in die Studie bis zum Datum des Todes berechnet.

3. Ergebnisse

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der molekulargenetischen Analyse auf Mutationen der *IDH1* und *IDH2* Gene in einer großen (n=920) Kohorte von jüngeren (<60 Jahre) AML Patienten. Die untersuchten Patientenproben wurden im Rahmen von einer multizentrischen Studie gewonnen (Aktenzeichen Ethikvotum 108/2004). Die Daten der Mutationsanalysen stellten die Grundlage für die Durchführung von Auswertungen zur Häufigkeit dieser Genmutationen in dieser Population von jüngeren Patienten, zur Assoziation der Mutationen mit klinischen und genetischen Merkmalen und zu ihrer prognostischen Bedeutung bei der AML des Jüngeren.

3.1 *IDH1* und *IDH2* Mutationstypen

Insgesamt wurden 920 Patienten aus der AMLSG 07-04 Studie auf *IDH1* und *IDH2* Mutationen untersucht. Eine *IDH1* und/oder *IDH2* Mutation (in weiterer Folge im Text als *IDH1/2* beschrieben) konnte bei 147 Patienten (16,0%) detektiert werden. Die Mutationen wurden nach den Empfehlungen der *Human Genome Variation Society* unter Verwendung der NCBI Referenzsequenzen NM_005896.2 (*IDH1*) und NM_002168.2 (*IDH2*) benannt (den Dunnen und Antonarakis 2000). Auf Basis dieser Referenzsequenzen wurde für die Nummerierung der Nukleotide das erste Nukleotid des Startcodons als „+1“ gesetzt. Die Veränderungen der Aminosäuresequenz wurden theoretisch abgeleitet. Die Benennung der Mutationen auf der Proteinebene erfolgte ebenfalls nach den Empfehlungen der *Human Genome Variation Society*. Die mutierten Veränderungen der Nukleotid- und Aminosäuresequenz sowie deren Häufigkeit sind in Tabelle 21 bis 24 aufgeführt.

Tabelle 21. Häufigkeiten der *IDH1* und/oder *IDH2* Mutationen der untersuchten Patienten (n=920; Therapiestudie AMLSG 07-04)

Inzidenz	Anzahl der Patienten	[%]
<i>IDH1</i> mutiert	53	5,8
<i>IDH2</i> mutiert	89	9,7
<i>IDH1</i> und <i>IDH2</i> mutiert	5	0,5
<i>IDH1</i> oder <i>IDH2</i> mutiert	142	15,5
<i>IDH1</i> und/oder <i>IDH2</i> mutiert	147	16,0

Tabelle 22. Häufigkeiten und Typen der *IDH1* Mutationen im Exon 4 (n=53; Therapiestudie AMLSG 07-04)

Veränderungen der Nukleotidsequenz	Veränderungen der Aminosäuresequenz	Anzahl der Patienten	[%]
c.G395A	p.R132H	28	52,8
c.C394T	p.R132C	23	43,4
c.C394A	p.R132S	1	1,9
c.C394G	p.R132G	1	1,9

Abkürzungen: c: kodierende DNA Sequenz, p: Protein Sequenz; Basen: A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin; Aminosäuren: C: Cystein, G: Glycin, H: Histidin, R: Arginin, S: Serin; *IDH1/2*: Isocitratdehydrogenase 1/2

Tabelle 23. Häufigkeiten und Typen der *IDH2* Mutationen im Exon 4 (n=89; Therapiestudie AMLSG 07-04)

Veränderungen der Nukleotidsequenz	Veränderungen der Aminosäuresequenz	Anzahl der Patienten	[%]
c.G419A	p.R140Q	58	65,2
c.G515A	p.R172K	27	30,3
c.C418T	p.R140W	2	2,3
c.C418G	p.R140G	1	1,1
c.G516-A518delinsTCT	p.R172S(+p.H173L)	1	1,1

Abkürzungen: c: kodierende DNA Sequenz, p: Protein Sequenz; Basen: A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin; Aminosäuren: G: Glycin, H: Histidin, K: Lysin, L: Leucin, Q: Glutamin, R: Arginin, S: Serin, W: Tryptophan; *IDH1/2*: Isocitratdehydrogenase 1/2

Tabelle 24. Häufigkeiten der *IDH1* und *IDH2* Mutationen im Exon 4 (n=5; Therapiestudie AMLSG 07-04)

Veränderungen der Nukleotidsequenz	Veränderungen der Aminosäuresequenz	Anzahl der Patienten	[%]
c.C395A (<i>IDH1</i>), c.G419A (<i>IDH2</i>)	p.R132H (<i>IDH1</i>), p.R140Q (<i>IDH2</i>)	3	60,0
c.C394T (<i>IDH1</i>), c.G419A (<i>IDH2</i>)	p.R132C (<i>IDH1</i>), p.R140Q (<i>IDH2</i>)	1	20,0
c.C395A (<i>IDH1</i>), c.G446A (<i>IDH2</i>)	p.R132H (<i>IDH1</i>), p.R149Q (<i>IDH2</i>)	1	20,0

Abkürzungen: c: kodierende DNA Sequenz, p: Protein Sequenz; Basen: A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin; Aminosäuren: C: Cystein, H: Histidin, Q: Glutamin, R: Arginin; *IDH1/2*: Isocitratdehydrogenase 1/2

3.2 Inzidenz der *IDH1* und *IDH2* Mutationen

Von den 920 sequenzierten AML Patienten wiesen insgesamt 147 (16,0%) Patienten eine *IDH1* und/oder *IDH2* Mutation auf. Bei 58 (6,3%) Patienten konnten *IDH1* Mutationen nachgewiesen werden; bei 94 (10,2%) Patienten *IDH2* Mutationen. Hiervon konnte bei 5 (0,5%) Patienten gleichzeitig eine Mutation in *IDH1* und *IDH2* nachgewiesen werden (s. Tabelle 21-24). Bei allen Patienten mit *IDH1* Mutation war das Codon R132 betroffen; alle Mutationen führten zum Austausch von Arginin an der Position 132, wobei die Substitution mit Histidin (55,2%) am Häufigsten war, gefolgt von Cystein (41,4%), Serin (1,7%) und Glycin (1,7%). Bei *IDH2* Mutationen führten Mutationen zum Austausch von Arginin an der Position 140, wobei die Substitution mit Glutamin (65,9%) am Häufigsten war, gefolgt von Tryptophan (2,1%) und Glycin (1,1%). Außerdem fanden wir *IDH2* Mutationen, welche zum Austausch von Arginin mit der Substitution von Lysin (28,7%) an der Position 172 führte. Die *IDH2* Mutation c.G446A, infolge welcher es zum Ersatz des Arginins an der Position 149 kommt, sowie die Mutation c.G516-A518delinsTCT, die zur Insertion von zwei Aminosäuren (SL) zwischen R172 und H173 führt, waren bis zu dem Zeitpunkt noch nicht beschrieben und fanden sich bei jeweils einem Patienten. In der Subgruppe der Patienten mit CN-AML (n=427) wiesen 10,0% (n=43) der Patienten eine *IDH1* Mutation auf und 14,3% (n=61) eine *IDH2* Mutation auf.

3.3 Inzidenz von Polymorphismen

Einzelnukleotidpolymorphismen, auch als „SNPs“ bezeichnet, sind keine Mutationen im eigentlichen Sinne. Es sind vererbare genetische Varianten, die in unserer Analyse nicht zu den Mutationen gezählt wurden.

Bei 87 der 920 Patienten (9,5%) war ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) im *IDH1* Gen nachweisbar, bei dem die Base Cytosin an der Position 315 gegen die Base Thymin ausgetauscht ist. Da in diesem Fall das Triplet weiterhin für die gleiche Aminosäure codiert, spricht man von einem synonymen SNP. Der genannte Polymorphismus c.C315T wird genauso in Gesunden, nicht an einer AML erkrankten Personen, gefunden.

Außerdem wurde bei einem Patienten ein noch unbekannter, möglicherweise seltener Polymorphismus gefunden. Der Basenaustausch von Guanin durch Adenin an der Position 205 (c.G205A) verursacht eine Veränderung in der Proteinsequenz (p.V69I). Es ist noch unklar, ob es sich um einen Polymorphismus oder möglicherweise doch eine Mutation handelt. In anderen Studien gab es einige wenige AML-Patienten mit p.V71I Allel (Ho et al. 2010; Marcucci et al. 2010; Ward et al. 2012), doch auch hier ist nicht klar, ob es sich um einen seltenen Keimbahn-SNP oder doch um eine neue somatische- oder Keimbahn-Mutation handelt.

3.4 Klinische Charakteristika der Patienten

In der Gruppe der *IDH1* und/oder *IDH2* mutierten Patienten betrug das mediane Alter 51,3 Jahre (Spanne 21-60 Jahre), das mediane Alter in der Gruppe der unmutierten Patienten lag bei 48,2 Jahren (Spanne 18-61 Jahre). Männer und Frauen waren etwa gleich häufig von einer *IDH1/2* Mutation betroffen (51% der Patienten mit *IDH1/2*-Wildtyp und 53% der Patienten mit *IDH1/2* Mutation waren Männer). In der hier untersuchten Patientenkohorte waren *IDH1/2* Mutationen mit höherem Alter ($p=0,001$) assoziiert. Die Patienten mit *IDH1/2* Mutationen hatten niedrigere Leukozytenzahlen ($p=0,009$), niedrigere Werte für Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum ($p<0,0001$) und höhere Thrombozytenzahlen ($p<0,0001$). Außerdem hatten Patienten mit *IDH1/2* Mutationen im Trend einen höheren Blastenanteil im Knochenmark ($p=0,06$) bzw. im peripheren Blut ($p=0,08$) als Patienten ohne *IDH1* oder *IDH2* Mutationen.

In Tabelle 25 sind die klinischen Charakteristika in Abhängigkeit des *IDH1/2* Mutationsstatus aufgelistet.

Tabelle 25. Klinische Charakteristika der untersuchten Patienten (n=920; Therapiestudie AMLSG 07-04)

	<i>IDH1/2</i> Wildtyp (n=773)	<i>IDH1</i> und/oder <i>IDH2</i> Mutation (n=147)	P
Alter, in Jahren			0,001
Median	48,2	51,3	
Spanne	18-61	21-60	

Männliches Geschlecht, n (%)	394 (51,0)	78 (52,7)	0,72
Zytogenetisches Risiko			<0,0001
Niedrig, n (%)	106 (14,6)	2 (1,5)	
Intermediär, n (%)	447 (61,5)	122 (90,4)	
Hoch, n (%)	174 (23,9)	11 (8,1)	
Fehlende Werte, n	45	13	
Leukozytenzahl, x10⁹/L			0,009
Median	15,2	7,7	
Spanne	0,2-532,7	0,3-349,0	
Thrombozytenzahl, x10⁹/L			<0,0001
Median	52	76,5	
Spanne	4-933	10-574	
Hämoglobin, g/dL			0,68
Median	9,1	9,0	
Spanne	2,7-16,2	4,7-14,6	
Blasten im peripheren Blut, %			0,08
Median	32	45	
Spanne	0-100	0-100	
Blasten im Knochenmark, %			0,06
Median	75	79	
Spanne	0-100	10-100	
LDH, U/l			<0,0001
Median	446	331,5	
Spanne	84-15098	137-1791	

Abkürzungen: g/dl: Gramm pro Deziliter, L: Liter, U/l: Units pro Liter, LDH: Laktatdehydrogenase, *IDH1/2*: *Isocitratdehydrogenase 1/2*, n: Anzahl der untersuchten Patienten

3.5 Verteilung der *IDH1* und *IDH2* Mutationen über die zytogenetisch definierten Risikogruppen

Wir untersuchten die Fragestellung, ob *IDH1/2* Mutationen mit bestimmten zytogenetischen Veränderungen bzw. den 3 zytogenetischen Risikogruppen assoziiert waren. Die Analyse der Gesamtkohorte (n=920) zeigte, dass Patienten mit *IDH1/2*

Mutationen signifikant mit einem intermediärem zytogenetischen Risiko assoziiert sind ($p < 0,0001$). Von den 147 Patienten mit *IDH1* und/oder *IDH2* Mutation wiesen 122 (90,4%) einen Karyotyp der intermediären Risikogruppe auf, 11 (8,1%) hatten Hoch-Risikozytogenetik und nur 2 (1,5%) Niedrig-Risikozytogenetik. Die Verteilung der *IDH1/2* Mutationen in den unterschiedlichen Risikogruppen zeigt Tabelle 26.

Tabelle 26. Vorkommen der *IDH1/2* Mutationen in den unterschiedlichen Risikogruppen (Therapiestudie AMLSG 07-04)

	<i>IDH1/2</i> Wildtyp (n=773)	<i>IDH1</i> und/oder <i>IDH2</i> Mutation (n=147)	P
Zytogenetische Risikogruppe			<0,0001
Niedriges Risiko, n (%)	106 (15)	2 (1,5)	
Intermediäres Risiko, n (%)	447 (61,5)	122 (90)	
Hohes Risiko, n (%)	174 (24)	11 (8)	
Fehlende Werte, n	46	12	

Abkürzungen: *IDH1/2*: Isocitratdehydrogenase 1/2, n: Anzahl der untersuchten Patienten

3.6 Molekulare Charakteristika der Patienten mit *IDH1* und/oder *IDH2* Mutation

IDH1/2 Mutationen waren häufiger mit *NPM1* Mutationen assoziiert (s. Tabelle 27-29) ($p < 0,0001$): 65 (24,2%) von 269 Patienten mit *NPM1* Mutation hatten *IDH1/2* Mutationen (*IDH1*, n=35; *IDH2*, n=36, *IDH2* R172; n=0), wohingegen nur bei 79 (12,5%) von 633 Patienten mit Wildtyp-*NPM1* *IDH1/2* Mutationen zu finden waren (*IDH1*, n=23; *IDH2*, n=56; *IDH2* R172, n=26). Interessanterweise waren *NPM1* Mutation vor allem mit der *IDH2* R140 Mutation assoziiert (54,8% der Patienten mit *NPM1* Mutation zeigten gleichzeitig eine *IDH2* R140 Mutation auf) und bei keinem Patienten mit *NPM1* Mutation lag eine *IDH2* R172 Mutation vor ($p < 0,0001$) (s. Tabelle 30).

IDH1/2 Mutationen zeigten sich im Trend (nicht statistisch signifikant) seltener mit *FLT3*-ITD Mutationen assoziiert ($p = 0,07$): 22 (11,6%) von 189 Patienten mit *FLT3*-ITD Mutation hatten *IDH1/2* Mutationen, wohingegen bei 122 (17,1%) von 713 Patienten mit Wildtyp-*FLT3*-ITD *IDH1/2* Mutationen zu finden waren (s. Tabelle 31).

IDH1/2 Mutationen zeigen sich statistisch signifikant seltener mit *CEBPA* Mutationen assoziiert ($p=0,01$): 5 (6,7%) von 74 Patienten mit *CEBPA* Mutation hatten *IDH1/2* Mutationen, wohingegen bei 135 (17,7%) von 764 Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* *IDH1/2* Mutationen zu finden waren (s. Tabelle 31).

Tabelle 27. Assoziation der *IDH1/2* Mutationen mit *NPM1* Mutationen (Therapiestudie AMLSG 07-04)

	<i>IDH1/2</i> Wildtyp (n=773)	<i>IDH1</i> und/oder <i>IDH2</i> Mutation (n=147)	<i>P</i>
<i>NPM1</i>, n (%)			<0,0001
Wildtyp	554 (73,1)	79 (54,9)	
Mutation	204 (26,9)	65 (45,1)	
Fehlende Werte, n	15	3	

Abkürzungen: *IDH1/2*: Isocitratdehydrogenase 1/2, n: Anzahl der untersuchten Patienten, *NPM1*: Nucleophosmin

Tabelle 28. Assoziation der *IDH1* Mutationen mit *NPM1* Mutationen (Therapiestudie AMLSG 07-04)

	<i>IDH1</i> Wildtyp (n=862)	<i>IDH1</i> Mutation (n=58)	<i>P</i>
<i>NPM1</i>, n (%)			<0,0001
Wildtyp	610 (72,3)	23 (39,7)	
Mutation	234 (27,7)	35 (60,3)	
Fehlende Werte, n	18	0	

Abkürzungen: *IDH1/2*: Isocitratdehydrogenase 1/2, n: Anzahl der untersuchten Patienten, *NPM1*: Nucleophosmin

Tabelle 29. Assoziation der *IDH2* Mutationen mit *NPM1* Mutationen (Therapiestudie AMLSG 07-04)

	<i>IDH2</i> Wildtyp (n=826)	<i>IDH2</i> Mutation (n=94)	<i>P</i>
<i>NPM1</i>, n (%)			0,04

Wildtyp	577 (71,2)	56 (60,9)	
Mutation	233 (28,8)	36 (39,1)	
Fehlende Werte, n	16	2	

Abkürzungen: *IDH1/2*: Isocitratdehydrogenase 1/2, n: Anzahl der untersuchten Patienten, *NPM1*: Nucleophosmin

Tabelle 30. Assoziation der *IDH2* (R140 und R172) Mutationen mit *NPM1* Mutationen (Therapiestudie AMLSG 07-04)

	<i>IDH2</i> Typ R140 (n=65)	<i>IDH2</i> Typ R172 (n=27)	P
<i>NPM1</i>, n (%)			<0,0001
Wildtyp	28 (45,2)	26 (100,0)	
Mutation	34 (54,8)	0 (0,0)	
Fehlende Werte, n	3	1	

Abkürzungen: *IDH1/2*: Isocitratdehydrogenase 1/2, n: Anzahl der untersuchten Patienten, *NPM1*: Nucleophosmin

Tabelle 31. Assoziation der *IDH1/2* Mutationen mit *FLT3-ITD* und *CEBPA* Mutationen (Therapiestudie AMLSG 07-04)

	<i>IDH1/2</i> Wildtyp (n=773)	<i>IDH1</i> und/oder <i>IDH2</i> Mutation (n=147)	P
<i>FLT3-ITD</i>, n (%)			0,07
Nicht-vorhanden	591 (78,0)	122 (84,7)	
Vorhanden	167 (22,0)	22 (15,3)	
Fehlende Werte	15	3	
<i>CEBPA</i>, n (%)			0,01
Nicht-vorhanden	629 (90,1)	135 (96,4)	
Vorhanden	69 (9,9)	5 (3,6)	
Fehlende Werte, n	75	7	

Abkürzungen: *IDH1/2*: Isocitratdehydrogenase 1/2, n: Anzahl der untersuchten Patienten, *FLT3*: FMS-like tyrosine kinase 3, ITD: interne Tandemduplikation, *CEBPA*: CCAAT/enhancer binding protein alpha

3.7 Prognostische Relevanz der *IDH1* und *IDH2* Mutationen

Die prognostische Relevanz wurde durch univariate Analysen des Therapieansprechens auf die Induktionstherapie, des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens untersucht. Diese Analysen wurden für die Gesamtkohorte und die Subgruppe der Patienten mit normalem Karyotyp durchgeführt.

3.7.1 Ansprechen auf die Induktionstherapie

IDH1/2 Mutationen als eine gemeinsame Gruppe hatten keinen Einfluss auf das Erreichen einer kompletten Remission (CR) ($p=0,53$). Dies galt auch für die Analyse, in der die *IDH1* und *IDH2* Mutationen als separate Variablen betrachtet wurden. So erreichten 69,0% der Patienten mit *IDH1* Mutation ($p=0,34$), sowie 76,6% der Patienten mit *IDH2* Mutation ($p=0,90$) eine komplette Remission. Im Vergleich hierzu erreichten 75,2% der Patienten mit *IDH1/2* Wildtyp eine komplette Remission. Das Ansprechen auf die Induktionstherapie der Patienten mit und ohne *IDH1/2* Mutationen ist in Tabelle 32 aufgelistet.

Tabelle 32. Ansprechen auf die Induktionstherapie in Abhängigkeit des *IDH1/2* Mutationsstatus (Therapiestudie AMLSG 07-04)

	<i>IDH1/2</i> mutiert	<i>IDH1/2</i> Wildtyp
CR	72,6%	75,2%
RD	19,9%	20,7%
ED/HD	7,5%	4,1%

Abkürzungen: CR: komplette Remission, ED: früher Tod (=Tod im Verlauf der Induktionstherapie ungeachtet der Ursache oder des Ansprechens), HD: hypoplastischer Tod, RD: refraktäre Erkrankung

Ähnliche Ergebnisse für das Ansprechen auf die Induktionstherapie lieferte die Subgruppenanalyse der Patienten mit einem normalen Karyotyp (s. Tabelle 33).

Tabelle 33. Ansprechen auf die Induktionstherapie von Patienten mit normalen Karyotyp in Abhängigkeit des *IDH1/2* Mutationsstatus (Therapiestudie AMLSG 07-04)

	<i>IDH1/2</i> mutiert	<i>IDH1/2</i> Wildtyp
CR	76,5%	81,9%
RD	18,4%	15,6%
ED/HD	5,1%	2,5%

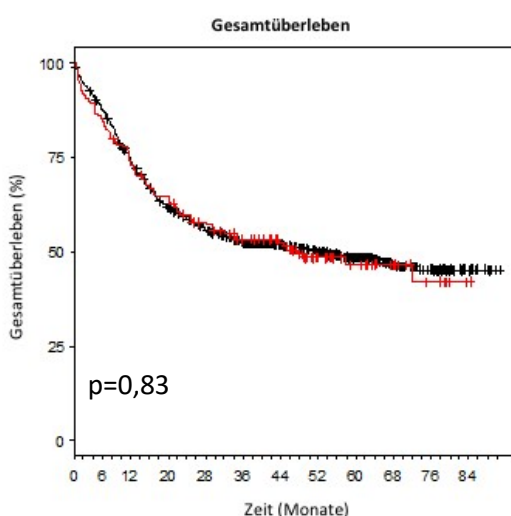
Abkürzungen: CR: komplette Remission, ED: früher Tod, HD: hypoplastischer Tod, RD: refraktäre Erkrankung

3.7.2 Überlebensanalysen

Um zu evaluieren, ob *IDH1* bzw. *IDH2* Mutationen mit dem Outcome der AML Patienten korrelieren, wurde das Gesamtüberleben (overall survival, OS) und das rezidivfreie Überleben (relapse free survival, RFS) analysiert. Die mediane Nachbeobachtungszeit in der gesamten Kohorte lag bei 54,5 Monaten. Die Analysen wurden univariat durchgeführt.

Das OS ($p=0,83$) und RFS ($p=0,65$) der Patienten mit *IDH1/2* Mutationen war nicht unterschiedlich im Vergleich zu Patienten ohne diese Mutationen. Das Gesamtüberleben betrug im Median bei Patienten mit *IDH1/2* Mutation 47,6 Monate, bei Patienten mit *IDH1/2* Wildtyp 52,3 Monate. Das rezidivfreie Überleben betrug im Median bei Patienten mit *IDH1/2* Mutation 23,1 Monate, bei Patienten mit *IDH1/2* Wildtyp 21,4 Monate.

Die Überlebenskurven für das Gesamtüberleben der Gruppe mit *IDH1/2* Mutationen und der ohne *IDH1/2* Mutationen sind in Abbildung 9 dargestellt:



	n	Events	Median (in Monaten)
IDH1/2 Wildtyp	773	381	52,3
IDH1/2 Mutiert	147	75	47,6

Abbildung 9. Vergleich des Gesamtüberlebens zwischen AML Patienten mit einer *IDH1/2*-Mutation (rot) und *IDH1/2*-Wildtyp (schwarz); Therapiestudie AMLSG 07-04. Abkürzungen: *IDH*: Isocitratdehydrogenase, n: Anzahl der Patienten, p: p-Wert

Der Vergleich für das rezidivfreie Überleben zwischen der Gruppe mit *IDH1/2*-Mutation und der *IDH1/2*-Wildtyp-Gruppe ist in Abbildung 10 dargestellt:

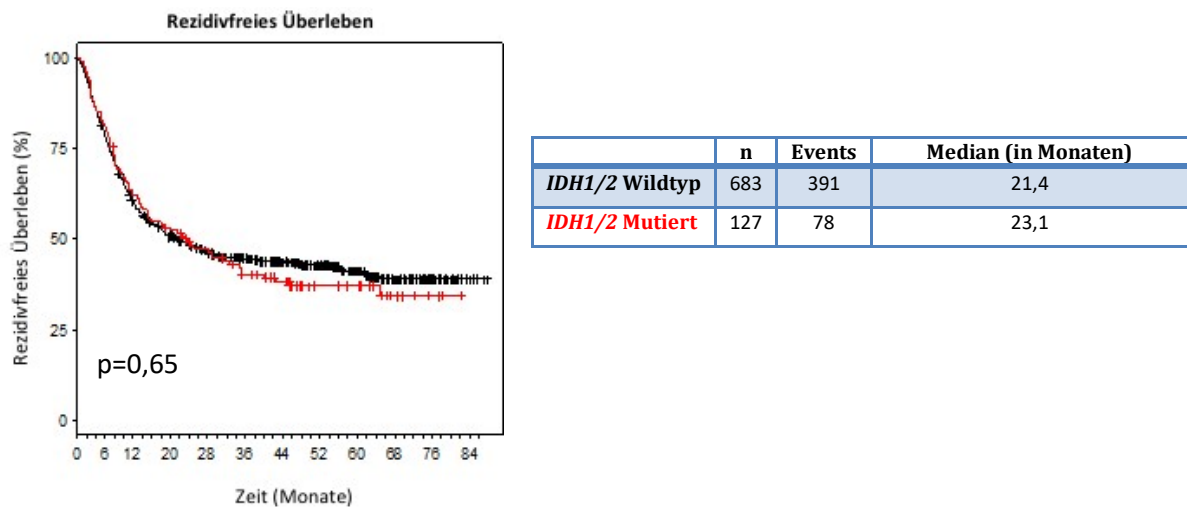
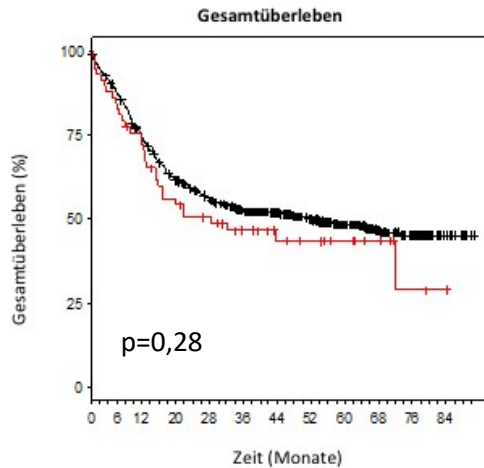


Abbildung 10. Vergleich des rezidivfreien Überlebens zwischen AML Patienten mit *IDH1/2*-Mutation (rot) und der mit *IDH1/2* Wildtyp (schwarz); Therapiestudie AMLSG 07-04. Abkürzungen: *IDH*: Isocitratdehydrogenase, n: Anzahl der Patienten, p: p-Wert

Das Gesamtüberleben betrug im Median bei Patienten mit *IDH1* Mutation 28,3 Monate, bei Patienten mit *IDH1* Wildtyp 52,3 Monate ($p=0,28$). Das rezidivfreie Überleben betrug im Median bei Patienten mit *IDH1* Mutation 15,2 Monate, bei Patienten mit *IDH1* Wildtyp 21,4 Monate ($p=0,21$).

Das Gesamtüberleben betrug im Median bei Patienten mit *IDH2* Mutation 57,8 Monate, bei Patienten mit *IDH2* Wildtyp 52,3 Monate ($p=0,63$). Das rezidivfreie Überleben betrug im Median bei Patienten mit *IDH2* Mutation 28,4 Monate, bei Patienten mit *IDH2* Wildtyp 21,4 Monate ($p=0,83$).

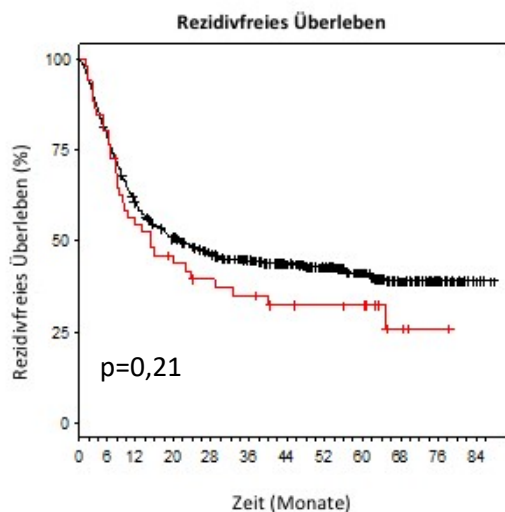
Der Vergleich für das Gesamtüberleben zwischen der Gruppe mit *IDH1* Mutation und der Wildtyp-Gruppe ist in Abbildung 11 dargestellt:



	n	Events	Median (in Monaten)
IDH1 Wildtyp	683	391	28,3
IDH1 Mutiert	51	34	52,3

Abbildung 11. Vergleich des Gesamtüberlebens zwischen AML Patienten mit *IDH1* Mutation (rot) und der Wildtyp-Gruppe (schwarz); Therapiestudie AMLSG 07-04. Abkürzungen: *IDH*: Isocitratdehydrogenase, n: Anzahl der Patienten, p: p-Wert

Der Vergleich für das rezidivfreie Überleben zwischen der Gruppe mit *IDH1* Mutation und der Wildtyp-Gruppe ist in Abbildung 12 dargestellt:



	n	Events	Median (in Monaten)
IDH1 Wildtyp	773	381	21,4
IDH1 Mutiert	58	32	15,2

Abbildung 12. Vergleich des rezidivfreien Überlebens zwischen AML Patienten mit *IDH1* Mutation (rot) und der Wildtyp-Gruppe (schwarz); Therapiestudie AMLSG 07-04. Abkürzungen: *IDH*: Isocitratdehydrogenase, n: Anzahl der Patienten, p: p-Wert

Ähnliche Ergebnisse für das OS und RFS lieferte die Subgruppenanalyse für Patienten mit CN-AML. Das OS ($p=0,45$) und RFS ($p=0,26$) der Patienten mit *IDH1/2* Mutationen war nicht unterschiedlich im Vergleich zu Patienten ohne diese Mutationen. Bei CN-AML betrug das OS der Patienten mit einer *IDH1/2* Mutation im Median 48,8 Monate und derjenigen mit *IDH1/2* Wildtyp 68,5 Monate; innerhalb dieser zytogenetischen AML-Subgruppe lag das

RFS für Patienten mit einer *IDH1/2* Mutation im Median bei 18,4 Monaten, und für die mit *IDH1/2* Wildtyp bei 25,8 Monaten.

Innerhalb der CN-AML Patienten lag das OS der Patienten mit *IDH1* Mutation bei 28,3 Monaten und der mit *IDH1* Wildtyp bei 68,5 Monaten; das rezidivfreie Überleben der Patienten mit *IDH1* Mutation betrug im Median 15,1 Monate, und der mit *IDH1* Wildtyp 25,8 Monate; mit P-Werten von 0,16 für das OS und 0,14 für das RFS besteht jedoch keine statistische Signifikanz.

Das Gesamtüberleben bei den CN-AML Patienten mit *IDH2* Mutation betrug im Median 57,8 Monate, bei Patienten mit *IDH2* Wildtyp 68,5 Monate ($p=0,92$). Das rezidivfreie Überleben bei CN-AML Patienten mit *IDH2* Mutation betrug im Median 24,6 Monate, bei Patienten mit *IDH2* Wildtyp 25,8 Monate ($p=0,71$).

4. Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Durchführung der Experimente zur Mutationsanalyse von *IDH1* und *IDH2* in einer großen Kohorte von jüngeren AML Patienten. Die Ergebnisse dieser Arbeit waren essentielle Voraussetzung für die Korrelation mit den klinischen Daten bzw. der Evaluierung der prognostischen Bedeutung der *IDH1* und *IDH2* Mutationen. An dieser Stelle soll nochmals betont werden, dass die klinischen Daten der Patienten aus einer großen multizentrischen Studie der AML Studien Gruppe (Leiter: Professor Dr. Hartmut Döhner) stammen. Aufgrund der Komplexität und der Größe des klinischen Datensatzes erfolgten die statistischen Analysen mit Unterstützung der Mitarbeiter der AMLSG Studienzentrale, Frau Daniela Weber und Herrn PD Dr. med. Peter Paschka. Ich war während der Promotionsarbeit kontinuierlich an der Diskussion zur Durchführung der statistischen Analysen und Interpretation der Daten und Ergebnisse beteiligt. Aufgrund der hier aufgeführten Aspekte werden im folgenden Diskussionsteil auch die Ergebnisse zu den Korrelationen der experimentellen Daten mit den klinischen Daten dargestellt.

4.1 Inzidenz von *IDH* und *IDH2* Mutationen bei der AML

Die Heterogenität der AML zeigt sich u.a. in der Vielfalt der genetischen Alterationen. Klonale chromosomale Abberationen können in konventioneller zytogenetischer Analyse bei etwa 50 – 60% % der AML-Patienten nachgewiesen werden und stellen einen der wichtigsten Prognosefaktoren über allen Altersgruppen hinweg dar (Bloomfield et al. 1998; Döhner 2007; Mrózek und Bloomfield 2006). Allerdings weisen etwa 40-45% der Patienten mit neu diagnostizierter AML keine mikroskopisch sichtbaren Chromosomenaberrationen, also einen normalen Karyotyp, auf. Diese AML Patienten mit einem normalen Karyotyp werden mit zur AML-Gruppe mit intermediärem Risiko gezählt (Fröhling et al. 2006; Mrózek et al. 2007). Besonders in dieser AML-Subgruppe wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Genmutationen identifiziert und deren prognostische Bedeutung evaluiert (Döhner et al. 2010; Mrózek et al. 2012; Patel et al. 2012). Zu den betroffenen Genen gehören u.a. *ASXL1*, *CEPBA*, *DNMT3A*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *KIT*, *NPM1* und *TET2* (Network TCGA 2013). Die Identifikation molekulargenetischer Abberationen hat zum einem zum Verständnis der Mechanismen der Leukämogenese beigetragen, andererseits werden diese Aberrationen als

Prognoseparameter evaluiert und einige als Strukturen für die klinische Entwicklung von zielgerichteten Therapieansätzen herangezogen.

Im Jahre 2009 konnten nach Sequenzierung eines AML Genoms erstmals Mutationen des *IDH1* Gens bei der AML nachgewiesen werden (Mardis et al. 2009). Nach Sequenzierung des *IDH1* Gens bei 188 Patienten mit unselektierter AML wurden dann in dieser Studie *IDH1* Mutationen bei 15 (8%) der AML Fälle gefunden, wobei diese Mutationen häufig mit einem normalen Karyotyp assoziiert waren [13/80; 16%]. In allen Fällen mit *IDH1* Mutation war Codon 132 betroffen. Mutationen, die zur Substitution von Arginin mit Cystein führten (p.R132C) waren am häufigsten. *IDH2* Mutationen wurden in dieser Kohorte nicht gefunden (Mardis et al. 2009).

Im Jahr 2010 wurde eine Studie mit einer großen Kohorte von 805 jüngeren Erwachsenen (<60 Jahre) AML Patienten veröffentlicht (Paschka et al. 2010). In dieser Studie wurden *IDH1* oder *IDH2* Mutationen bei 16% von Patienten mit unselektierter AML gefunden; *IDH1* in 7,6% und erstmals *IDH2* in 8,7%; bei zwei Patienten fand sich sowohl eine *IDH1*, als auch eine *IDH2* Mutation. Bei den *IDH1* war die R132H Mutation am häufigsten, bei *IDH2* die Mutation R140Q. Eine Übersicht der größeren Studien zeigt Tabelle 34 und 35 im Anhang. Die Häufigkeit der *IDH1* Mutationen für unselektierte AML liegt zwischen 5% und 9% und für CN-AML zwischen 11% und 16%. Für *IDH2* Mutationen wird bei unselektierter AML eine Häufigkeit von 9% bis 14% beschrieben, bei der Subgruppe der CN-AML liegt die Häufigkeit dieser Mutationen bei 12% bis 19 % (Abbas et al. 2010; Boissel et al. 2010; Chou et al. 2010a; Ho et al. 2010; Marcucci et al. 2010; Mardis et al. 2009; Paschka et al. 2010; Ravandi et al. 2012; Schnittger et al. 2010; Shen et al. 2011; Thol et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wiesen 147 von 920 Patienten mindestens eine *IDH1* oder *IDH2* Mutation auf, was einer Inzidenz von 16,0% entspricht. Somit konnte bestätigt werden, dass *IDH1/2* Mutationen rekurrente genetische Alterationen bei der AML darstellen. Hierbei konnten wir bei 58 (6,3%) Patienten eine *IDH1* Mutationen nachweisen, bei 94 (10,2%) Patienten *IDH2* Mutationen finden, und bei 5 (0,5%) Patienten gleichzeitig Mutationen in *IDH1* und *IDH2*.

Innerhalb der hier genannten Studien, sowie in unserer Studie, konnte ein Anstieg der Inzidenz an *IDH1/2* Mutationen mit zunehmendem Alter beobachtet werden. Dies gilt insbesondere für *IDH2* Mutationen, deren Häufigkeit mit zunehmenden Alter ansteigt (Boissel et al. 2010; Marcucci et al. 2010; Paschka et al. 2010). In den bisher durchgeführten

Studien an unselektierten AML Kohorten zeigte sich jedoch, dass die Häufigkeit von *IDH1/2* Mutationen bei Patienten <60 Jahre etwa gleich hoch wie bei älteren Patienten ist. In unserer Studie, sowie in der Studie von Paschka et al. wurden nur Patienten <60 Jahre eingeschlossen (Paschka et al. 2010). In der Studie von Ravandi et al. waren >96% der 170 Patienten <65 Jahre (Ravandi et al. 2012). Wenn man die Ergebnisse für jüngere Patienten mit AML betrachtet, ist die Häufigkeit von *IDH1/2* Mutationen in der Arbeit von Paschka et al. (*IDH1*: 8%; *IDH2*: 9%) mit denen in unserer Studie (*IDH1*: 6%; *IDH2*: 10%) vergleichbar. In der Studie von Ravandi et al. betrug die Inzidenz der *IDH1* Mutationen 7% und die der *IDH2* Mutationen 14%. Vergleicht man dies mit der Subgruppe der AML Patienten >60 Jahre, zeigt sich in der Studie von Abbas et al. ein *IDH1* Mutationsanteil von 6% und ein *IDH2* Mutationsanteil von 11% (Abbas et al. 2010). In einer weiteren Studie von Ho et al. konnte gezeigt werden, dass *IDH1* Mutationen bei Kindern mit AML nicht nachweisbar waren (Ho et al. 2010): In einer Kohorte von Patienten mit einem medianen Alter von 10 Jahren konnte keine *IDH1* Mutation nachgewiesen werden. Die jüngsten Patienten mit nachgewiesener *IDH1* Mutation waren in dieser Studie 34 Jahre alt (Ho et al. 2010). Zusammenfassend gibt dies Grund zu Annahme, dass *IDH1/2* Mutationen im Laufe des Lebens mit zunehmendem Alter erworben werden. In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Studien, welche 2014 im New England Journal of Medicine veröffentlicht wurden, konnte gezeigt werden, dass für bisher gesunde Personen mit nachgewiesenen Mutationen wie *DNMT3A*, *TET2* und *ASXL1*, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer hämatologischen Erkrankung besteht. Mit zunehmendem Alter häuften sich die nachgewiesenen Mutationen. Bei Personen unter 40 Jahren konnten nur wenige Mutationen nachgewiesen werden, bei Personen über 70 Jahre in mehr als 10%. (Genovese et al. 2014; Jaiswal et al. 2014). In einer Studie von Chou et al. konnte gezeigt werden, dass *IDH1/2* Mutationen auch in Patienten, die in kompletter Remission waren, nachgewiesen werden konnten (Chou et al. 2012). Dies konnte auch für AML Patienten mit *DNMT3A* Mutation nachgewiesen werden (Debarri et al. 2015). Dies deutet darauf hin, dass in einer hämatopoetischen Stammzelle *IDH1/2* bzw. *DNMT3A* Mutationen wahrscheinlich frühe Ereignisse in der Leukämogenese darstellen, während z.B. Mutationen in *TP53* oder *RAS* (*Rat sarcoma viral oncogene homolog*) Genen später im Prozess der Leukämogenese auftreten (Papaemmanuil et al. 2016).

Für die Entstehung einer AML ist somit sowohl eine gesteigerte Zellproliferation, als auch eine Blockade der Zelldifferenzierung von Bedeutung. Beiden Eigenschaften liegen Veränderungen in unterschiedlichen Genen zu Grunde. Man geht davon aus, dass gleichzeitig Veränderungen in verschiedenen Genen zusammenwirken müssen, damit sich das Vollbild einer AML entwickeln kann (Gilliland et al. 2004; Kelly und Gilliland 2002).

Ein deutlicher Unterschied in der Inzidenz von Mutationen ist zwischen Patienten mit unselektierter AML und Patienten mit CN-AML zu sehen. In der Studie von Marcucci et al. konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz an *IDH1/2* Mutationen bei Patienten mit CN-AML höher ist im Vergleich zu unselektierter AML (*IDH1*: 14%; *IDH2*: 19%) (Marcucci et al. 2010). Auch in der Studie von Boissel et al. konnte ein größerer Mutationsanteil bei Patienten mit normalen Karyotyp, allerdings nur bei *IDH1* Mutationen, nachgewiesen werden (*IDH1*: 16%; *IDH2*: 6%) (Boissel et al. 2010). Der niedrigere Anteil an *IDH2* Mutationen könnte dadurch erklärt sein, dass nur für *IDH2* R172 Mutationen und nicht für *IDH2* R140 Mutationen gescreent wurde. Ravandi et al. konnte ebenfalls in der Subgruppe von 104 CN-AML Patienten einen höheren *IDH1/2* Mutationsanteil (*IDH1*: 11%, *IDH2*: 17%) zeigen als bei unselektierten AML Patienten (*IDH1*: 7%, *IDH2*: 14%) (Ravandi et al. 2012). Die Ergebnisse der Studien von Marcucci et al., Boissel et al. und Ravandi et al. sind vergleichbar mit den Ergebnissen unserer Studie; wir konnten in der Subgruppe der Patienten mit CN-AML (n=427) *IDH1* Mutationen in 10% der Fälle und *IDH2* Mutationen bei 14% identifizieren.

Die Art der häufigsten *IDH1/2* Mutationen in den verschiedenen Studien waren vergleichbar. Die Mehrzahl der von uns detektierten Mutationen war in anderen Studien bereits vorbeschrieben. *IDH1* Mutationen finden sich exklusiv im Codon 132 (Abbas et al. 2010; Mardis et al. 2009; Paschka et al. 2010). *IDH2* Mutationen führen zum Aminosäurenaustausch des Arginin an der Position 140 oder 172 (Marcucci et al. 2010; Paschka et al. 2010; Ravandi et al. 2012). Auch in unserem Kollektiv war bei allen Patienten mit *IDH1* Mutation Codon R132 betroffen; alle Mutationen führten zum Austausch von Arginin an der Position 132, wobei die Substitution mit Histidin (55,2%) am häufigsten war, gefolgt von Cystein (41,4%), Serin (1,7%) und Glycin (1,7%). Bei *IDH2* Mutationen führten Mutationen zum Austausch von Arginin an der Position 140, wobei die Substitution mit Glutamin (65,9%) am häufigsten war gefolgt von Tryptophan (2,1%) und Glycin (1,1%).

Außerdem fanden wir *IDH2* Mutationen, welche zum Austausch von Arginin mit der Substitution von Lysin (28,7%) an der Position 172 führte.

Die *IDH2* Mutation c.G446A, infolge welcher es zum Ersatz des Arginins an der Position 149 kommt, sowie die Mutation c.G516-A518delinsTCT, die zur Insertion von zwei Aminosäuren (SL) zwischen R172 und H173 führt, waren bis zu dem Zeitpunkt noch nicht beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Inzidenz der *IDH1/2* Mutationen vor allem von der Selektion der Patientengruppe, und hier insbesondere vom zytogenetischen Status, als auch von der Altersstruktur abhängt. Weitere Gründe für die unterschiedlichen Inzidenzen könnte die Heterogenität der Studienpopulationen sein. Es wurden unterschiedlich große Kohortengrößen untersucht und die untersuchten Patienten stammten aus verschiedenen Populationen (Europa, Asien, USA).

4.2 Assoziation von *IDH1* und *IDH2* Mutationen mit klinischen Charakteristika, Zytogenetik und anderen molekularen Markern

Unsere Ergebnisse zur Korrelation der klinischen Charakteristika mit dem *IDH1/2* Mutationsstatus sind mit den Daten aus anderen Studien vergleichbar.

Männer und Frauen sind etwa gleich häufig von einer *IDH1/2* Mutation betroffen (Abbas et al. 2010; Marcucci et al. 2010; Paschka et al. 2010). Dies zeigte sich auch in unserer Arbeit, 51% der Patienten mit *IDH1/2*-Wildtyp und 53% der Patienten mit *IDH1/2* Mutation waren Männer.

In der von uns untersuchten Patientenkohorte waren *IDH1/2* Mutationen mit höherem Alter ($p=0,001$) assoziiert. Dies zeigte sich auch in anderen Studien (Boissel et al. 2010; Mardis et al. 2009; Paschka et al. 2010). In unserer Arbeit betrug das mediane Alter der Gruppe der *IDH1/2* mutierten Patienten 51,3 Jahre (Spanne 21-60 Jahre), das mediane Alter in der Gruppe der unmutierten Patienten lag bei 48,2 Jahren (Spanne 18-61 Jahre). Im Vergleich hierzu betrug der Altersmedian von Patienten mit *IDH1/2* Mutation in der Studie von Paschka et al. 51 Jahre, für *IDH1/2* Wildtyp-Patienten 47 Jahre (Paschka et al. 2010).

Des Weiteren fanden wir, dass die Leukozytenzahl bei Patienten mit einer *IDH1/2* Mutation signifikant niedriger war ($p=0,009$) als bei Patienten ohne eine *IDH1/2* Mutation. Dies zeigte sich auch in der Studie von Paschka et al. bei AML Patienten <60 Jahre und von Marcucci et

al. bei CN-AML Patienten, sowie in der Studie von Boissel et al., allerdings nur für CN-AML mit *IDH2* Mutation.

Die Patienten mit *IDH1/2* Mutation in unserer Arbeit hatten zudem eine signifikant höhere Thrombozytenzahl ($p < 0,0001$). Diese Assoziation konnte ebenfalls in anderen Studien nachgewiesen werden (Abbas et al. 2010; Marcucci et al. 2010; Paschka et al. 2010).

Patienten mit *IDH1/2* Mutationen hatten in Trend einen höheren Blastenanteil im Knochenmark ($p = 0,06$) bzw. im peripheren Blut ($p = 0,08$) als Patienten ohne *IDH1/2* Mutationen. Auch diese Beziehung konnte bereits in vorangegangenen Studien beobachtet werden (Abbas et al. 2010; Marcucci et al. 2010; Paschka et al. 2010). Eine Übersicht der klinischen Charakteristika bei Patienten mit *IDH1/2* Mutationen in größeren Studien zeigt Tabelle 36 (siehe Anhang). Wir untersuchten ferner die Fragestellung, ob *IDH1/2* Mutationen mit bestimmten zytogenetischen Veränderungen bzw. zytogenetisch definierten Risikogruppen assoziiert waren. Die Analyse der Gesamtkohorte ($n = 920$) zeigte, dass Patienten mit *IDH1/2* Mutationen signifikant mit einem intermediärem zytogenetischen Risiko assoziiert sind ($p < 0,0001$). Von den 147 Patienten mit *IDH1/2* Mutation wiesen 122 (90,4%) einen Karyotyp der intermediären Risikogruppe auf, 11 (8,1%) hatten Aberrationen der zytogenetisch ungünstigen Risikogruppe und nur 2 (1,5%) der zytogenetisch günstigen Risikogruppe.

In unserer Arbeit wiesen 427 (46,4%) der Gesamtkohorte ($n = 920$) einen normalen Karyotyp auf. Von den 427 CN-AML Patienten wiesen 10,0% ($n = 43$) eine *IDH1* Mutation auf und 14,3% ($n = 61$) eine *IDH2* Mutation.

Diese signifikante Assoziation zwischen *IDH1/2* Mutationen mit einem zytogenetisch normalen Karyotyp konnte bereits im Jahre 2009 in der ersten Studie, in der *IDH1* Mutationen nach Sequenzierung eines AML-Genoms gefunden wurden, nachgewiesen werden (Mardis et al. 2009) und in weiteren Studien bestätigt werden (Abbas et al. 2010; Paschka et al. 2010; Ravandi et al. 2012).

IDH1/2 Mutationen sind bei der AML mit weiteren molekularen Veränderungen sowohl häufiger als auch seltener assoziiert. Wir konnten eine häufigere Assoziation von *IDH1/2* Mutationen mit *NPM1* nachweisen ($p < 0,0001$): 65 (24,2%) von 269 Patienten mit *NPM1* Mutation hatten *IDH1/2* Mutationen (*IDH1*, $n = 35$; *IDH2*, $n = 36$, *IDH2* R172, $n = 0$), wohingegen nur bei 79 (12,5%) von 633 Patienten mit Wildtyp-*NPM1* *IDH1/2* Mutationen zu finden waren (*IDH1*, $n = 23$; *IDH2*, $n = 56$; *IDH2* R172, $n = 26$). Interessanterweise waren

NPM1 Mutation streng mit der *IDH2* R140 Mutation assoziiert und bei keinem Patienten mit *NPM1* Mutation war eine *IDH2* R172 Mutation zu finden ($p < 0,0001$). Eine positive Assoziation zwischen *IDH1/2* Mutationen und *NPM1* wurde in den vorhergegangenen großen Studien beschrieben (Abbas et al. 2010; Boissel et al. 2010; Paschka et al. 2010). In der von Paschka et al. untersuchten Gruppe von unselektierten AML-Patienten <60 Jahre ($n=805$) trugen 25% der *NPM1*-mutierten Patienten eine *IDH1/2* Mutation, wohingegen nur 14% der Patienten mit *NPM1* Wildtyp eine *IDH1/2* Mutation hatten. Boissel et al. konnte die Assoziation von *NPM1* nur für CN-AML Patienten mit *IDH1* Mutationen nachweisen, *IDH2* war in seiner Studie mit keinen weiteren Mutationen assoziiert. Auch in der Studie von Patel et al. konnte die Assoziation mit *NPM1* nur für *IDH1* Mutationen, und nicht für *IDH2* Mutationen, nachgewiesen werden (Patel et al. 2011).

Im Gegensatz dazu korrelierten *IDH1/2* Mutationen in unserer Arbeit im Trend invers mit *FLT3-ITD* Mutationen ($p=0,07$). Eine *FLT3-ITD* Mutation trat bei 15% der Patienten mit *IDH1/2* Mutation auf. Konkordante Ergebnisse zur inversen Assoziation von *IDH1/2* Mutationen und *FLT3-ITD* zeigten auch andere größere AML Studien mit unterschiedlichen Patientenkollektiven. Paschka et al. konnten bei Patienten <60 Jahre mit unselektierter AML in 15% der Fälle gleichzeitig eine *IDH1/2* und eine *FLT3-ITD* Mutation nachweisen (Paschka et al. 2010). Marcucci et al. detektierten bei CN-AML Patienten (<60 Jahre) mit einer *FLT3-ITD* Mutation in 20% der Fälle gleichzeitig eine *IDH1* Mutation und in 27% der Fälle eine *IDH2* R140 Mutation (Marcucci et al. 2010).

Auch *CEBPA* Mutationen korrelierten in unserer Arbeit invers mit *IDH1/2* Mutationen ($p=0,01$). *CEBPA* Mutation traten bei 4% der Patienten mit *IDH1/2* Mutation auf. Dies zeigte sich auch in der Studie von Paschka et al., wo 6 Patienten (7%) der *CEBPA*-mutierten AML Patienten auch eine *IDH1/2* Mutation hatten. In der Subgruppe der CN-AML Patienten zeigte sich in dieser Studie ebenfalls keine Assoziation zwischen *IDH1/2* Mutationen und *CEBPA* Mutationen (Paschka et al. 2010). Marcucci et al. detektierten eine *CEBPA* Mutation bei 6% von CN-AML Patienten mit einer *IDH1* Mutation und bei 9% von Patienten mit einer *IDH2* R140 Mutation (Marcucci et al. 2010). Eine Übersicht der Assoziation von *IDH1/2* Mutationen mit anderen molekularen Alterationen in größeren Studien zeigt Tabelle 37 im Anhang.

4.3 Prognostische Bedeutung von *IDH1* und *IDH2* Mutationen

Die prognostische Relevanz von *IDH1* und *IDH2* Mutationen wurde in univariaten Analysen in Hinblick auf das Therapieansprechen auf die Induktionstherapie, das RFS und das OS untersucht. Diese Analysen wurden für die Gesamtkohorte, und auch für die Subgruppe der CN-AML Patienten durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit hatten *IDH1/2* Mutationen als gemeinsame Gruppe keinen Einfluss auf das Erreichen einer kompletten Remission (CR). Dies gilt auch für die Analyse in der die *IDH1* und *IDH2* Mutationen als separate Variablen betrachtet wurden. Eine komplette Remission erreichten 69% der Patienten mit einer *IDH1* Mutation, 77% der Patienten mit einer *IDH2* Mutation und 75% der Patienten mit *IDH1/2*-Wildtyp. Ähnliche Ergebnisse für das Ansprechen auf die Induktionstherapie lieferte die Subgruppenanalyse der Patienten mit einem normalen Karyotyp.

Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen einiger vorangegangener Studien, in denen *IDH1/2* Mutationen bei unselektierter AML keinen Einfluss auf die CR-Rate hatten (Paschka et al. 2010; Ravandi et al. 2012; Schnittger et al. 2010). In der vom Patientenkollektiv am ehesten vergleichbaren Studie von Paschka et al. (Patienten mit unselektierter AML und <60 Jahre) lag die CR-Rate der Patienten mit *IDH1/2* Mutationen bei 66% und die der Patienten mit einer *IDH1/2* Wildtyp bei 71% (Paschka et al. 2010). In der Subgruppe der CN-AML Patienten konnte hingegen in einigen Studien eine niedrigere CR-Rate, vor allem für Patienten mit *IDH2* R172 Mutationen, nachgewiesen werden (Boissel et al. 2010; Green et al. 2011; Marcucci et al. 2010; Wagner et al. 2010). In der Studie von Boissel et al. lag die CR-Rate bei CN-AML Patienten mit *IDH1* Mutation bei 76%, bei Patienten mit *IDH1*-Wildtyp bei 86%. Bei CN-AML Patienten mit *IDH2* Mutation lag die CR-Rate bei 58%, bei *IDH2*-Wildtyp Patienten bei 87% (Boissel et al. 2010).

In einer weiteren Studie von Boissel et al. 2011 wurden 205 CN-AML-Patienten untersucht; bei 100% der Patienten mit *IDH2* R140 Mutation konnte eine komplette Remission nachgewiesen werden, bei Patienten mit *IDH2* R172 Mutation hingegen nur bei 58% und bei Patienten mit *IDH2* Wildtyp bei 85% (Boissel et al. 2011).

Außerdem scheint die CR-Rate von der Lokalisation der Mutation abhängig zu sein: In der Studie von Green et al. wurden 1473 Patienten mit unselektierter AML untersucht, bei 88% der Patientin mit *IDH2* R140 Mutation konnte eine komplette Remission nachgewiesen werden, bei Patienten mit *IDH2* R172 Mutation hingegen nur bei 48% und bei Patienten mit *IDH1/2* Wildtyp bei 75% (Green et al. 2011). In der Studie von Marcucci et al. konnte

eine signifikant niedrigere CR-Rate bei CN-AML Patienten mit einer *IDH2* R172 Mutation im Gegensatz zu *IDH1/2* Wildtyp Patienten nachgewiesen werden (38% vs. 75%) (Marcucci et al. 2010). Zusammenfassend scheint das Erlangen einer kompletten Remission sowohl von der Zytogenetik des Patientenkollektiv (unselektierte AML vs. CN-AML), als auch von der Lokalisation der Mutation abhängig sein.

Um zu evaluieren, ob *IDH1* bzw. *IDH2* Mutationen mit dem Outcome korrelieren, wurde das OS und das RFS analysiert. Die mediane Nachbeobachtungszeit in der gesamten Kohorte lag bei 54,5 Monaten. Die Analysen wurden univariat durchgeführt.

Das OS ($p=0,83$) und RFS ($p=0,65$) der Patienten mit *IDH1/2* Mutationen war nicht unterschiedlich im Vergleich zu Patienten ohne diese Mutationen. Auch in der Subgruppenanalyse der Patienten mit CN-AML war das OS ($p=0,45$) und RFS ($p=0,26$) der Patienten mit *IDH1/2* Mutationen nicht unterschiedlich zu Patienten ohne diese Mutationen.

Die Datenlage zur Bedeutung der *IDH1/2* Mutationen für die Langzeitprognose ist uneinheitlich. In einigen Studien konnte kein Zusammenhang zwischen dem *IDH1/2* Mutationsstatus und der prognostischen Signifikanz nachgewiesen werden (Chou et al. 2010a; Ho et al. 2010; Ravandi et al. 2012; Shen et al. 2011; Thol et al. 2010). In anderen Studien konnte aber in bestimmten AML Subgruppen ein ungünstiger prognostischer Effekt gezeigt werden. Ein prognostisch ungünstiger Effekt (kürzeres RFS und OS) der *IDH1/2* Mutationen bei CN-AML konnte für jüngere Patienten (<60 Jahre) mit dem Genotyp *NPM1*^{mutiert}/*FLT3*-ITD^{wildtyp} gezeigt werden (Boissel et al. 2010; Marcucci et al. 2010; Paschka et al. 2010; Ravandi et al. 2012). In der Studie von Paschka et al. betrug bei Patienten mit CN-AML und dem Genotyp *NPM1*^{mutiert}/*FLT3*-ITD^{wildtyp} das RFS nach 5 Jahren 37%, wenn gleichzeitig eine *IDH1/2* Mutation vorlag; und 67% beim Vorliegen eines *IDH1/2* Wildtyps ($p=0,02$). Außerdem waren nach 5 Jahren noch 41% der Patienten mit *IDH1/2* Mutation, und 65% der Patienten mit *IDH1/2* Wildtyp am Leben ($p=0,03$) (Paschka et al. 2010).

Auch in der Gruppe der Patienten mit unselektierter AML gibt es unterschiedlichste Ergebnisse: In der Studie von Schnittger et al. ($n=1414$) konnte gezeigt werden, dass unselektierte AML Patienten mit *IDH1* Mutation ein signifikant kürzeres RFS hatten als Patienten mit Wildtyp *IDH1/2* ($p=0,003$). Für das OS konnte nur ein Trend gezeigt werden ($p=0,110$). In der Subgruppe unselektierter AML Patienten mit <60 Jahre und *NPM1*

Mutation zeigte sich bei Nachweis einer *IDH1* Mutation ein signifikant kürzeres rezidivfreies Leben ($p=0,044$) (Schnittger et al. 2010). In der Studie von Abbas et al. konnte gezeigt werden, dass unselektierte AML-Patienten <60 Jahre ($n=829$) mit *IDH1/2* Mutation und *NPM1* Wildtyp ein kürzeres RFS hatten als Patienten mit Wildtyp *IDH1/2* ($p=0,02$). Bei 14 Patienten mit *IDH1* Mutation und *FLT3*^{wildtyp}/*NPM1*^{wildtyp} ließ sich ein kürzeres OS ($p=0,032$) und RFS ($p=0,005$) nachweisen; auf Grund der kleinen Patientengruppe ist diese Analyse jedoch nur eingeschränkt beurteilbar (Abbas et al. 2010).

Bei der CN-AML konnte für Patienten mit *IDH2* Mutationen ein kürzeres OS als bei *IDH1/IDH2* Wildtyp nachgewiesen werden (Boissel et al. 2010; Green et al. 2011; Marcucci et al. 2010). Aktuelle Studien führen auch zur Annahme, dass die prognostische Relevanz von *IDH2* Mutationen von der Lokalisation der Mutation abhängt; so konnte unerwarteter Weise gezeigt werden, dass *IDH2* R140 Mutationen einen günstigen prognostischen Effekt im Bezug auf das OS und RFS haben als Patienten mit *IDH1/2* Wildtyp. *IDH2* R172 Mutationen zeigten wiederum ein kürzeres RFS und OS (Boissel et al. 2011; Green et al. 2011; Patel et al. 2012). In der Studie von Boissel et al. wurden 205 CN-AML-Patienten untersucht; nach 5 Jahren waren noch 67% der Patienten mit *IDH2* R140 am Leben, 0% der Patienten mit *IDH2* R172 und 43 der Patienten mit *IDH2* Wildtyp (Boissel et al. 2011).

In der Studie von Green et al. ließ sich in der Subgruppe der *IDH2* R172 mutierten Patienten mit zusätzlichem Genotyp *FLT3*^{wildtyp}/*NPM1*^{wildtyp} eine schlechte Prognose mit deutlich kürzerem Gesamtüberleben nachweisen: Nach 5 Jahren waren noch 28% der Patienten mit *IDH2* R172 und *FLT3*^{wildtyp}/*NPM1*^{wildtyp} am Leben vs. 38% der Patienten mit *IDH2* R140 und *FLT3*^{wildtyp}/*NPM1*^{wildtyp} (Green et al. 2011).

Warum es zu so unterschiedlichen Ergebnissen in den verschiedenen Studien kommt und ein prognostisch günstiger Effekt für Patienten mit *IDH2* R140 Mutationen nachgewiesen werden konnte ist Gegenstand der Forschung. Ein Grund hierfür sind sicherlich die relativ kleinen Patientenzahlen in den verschiedenen Subgruppen, die eine statistisch aussagekräftige Analyse nicht mehr zulassen.

Weitere Gründe für die nicht einheitlichen Ergebnisse des Einflusses von *IDH1/2* Mutationen auf das RFS und OS könnten sein, dass unterschiedliche Altersstrukturen der Patientenkollektive herangezogen werden. Zudem sind die bisher vorhandenen Studien zu *IDH1/2* retrospektiv durchgeführt worden und stammen aus verschiedenen Populationen (Europa, Asien, USA). Auch die Zytogenetik des Patientenkollektivs (unselektierte AML vs.

CN-AML), das Vorhandensein weiterer Mutationen und auch die Lokalisation der Mutation scheint eine wichtige Rolle zu spielen. Des Weiteren werden Patienten häufig nicht innerhalb von kontrollierten klinischen Studien behandelt, was die Aussagen zur prognostischen Signifikanz oft limitiert. Deshalb war es wichtig weitere Mutationsanalysen des *IDH1* und *IDH2* Gens an einer großen, homogen behandelten AML-Kohorte durchzuführen und die Mutationsdaten mit den gut dokumentierten klinischen Daten zu korrelieren. Im Unterschied zu den vorausgegangenen Studien bekamen die Patienten der 07/04 Studie randomisiert All-trans-Retinolsäure (ATRA) zusätzlich zur Chemotherapie. ATRA, ein Derivat der Vitamin A-Säure, bewirkt auf molekularer Ebene eine Aufhebung des Differenzierungsblocks der promyelozytären Blasten und induziert die Ausreifung in reife neutrophile Granulozyten. Die hohe Wirksamkeit von ATRA ist hierbei vor allem für die akute promyelozytäre Leukämie (APL) nachgewiesen (Tallman et al. 1997). Ob ATRA eine epigenetische Funktion und somit Einfluss auf die *IDH1/2* Mutationen bzw. die prognostische Bedeutung hat ist unklar und muss noch erforscht werden.

Es ist nicht restlos geklärt, auf welche Weise *IDH1/2* Mutationen zur Pathogenese der AML beitragen. Gene, die für die DNA Methylierung und somit auch für die Regulierung der Genexpression, verantwortlich sind, spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AML (Figueroa et al. 2010a; Figueroa et al. 2009; Network TCGA 2013). So sind die *IDH1* und *IDH2* Mutationen, sowie weitere bei der AML kürzlich entdeckte Mutationen, wie *ASXL1* (Chou et al. 2010b), *DNMT3A* (Thol et al. 2011) und *TET2* (Gaidzik et al. 2012), an der epigenetischen Regulation beteiligt und aktuell Gegenstand der Forschung. Es wird angenommen, dass *IDH1* und *IDH2* als Proto-Onkogene mit neomorpher Enzymaktivität funktionieren. Durch eine erhöhte Enzymaktivität entsteht aus α -Ketoglutarat (α -KG) vermehrt 2-Hydroxyglutarat (2-HG), welches als Onkometabolit funktioniert (Dang et al. 2009; Reitman et al. 2010; Ye et al. 2012). Aktuelle Studien zeigen, dass 2-HG als Antagonist von α -KG funktioniert, indem es Dioxygenasen, wie Histon- und DNA Demethylasen z.B. *TET2*, inhibiert (Figueroa et al. 2010a; Lu et al. 2012; Turcan et al. 2012; Xu et al. 2011). Diese α -KG abhängigen Dioxygenasen sind in der epigenetischen Kontrolle von Genexpression und Zelldifferenzierung involviert und spielen daher auch eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. So konnte für die Pathogenese der Glioblastome gezeigt werden, dass durch die Dominanz von 2-HG die α -KG abhängige Prolylhydroxylase inhibiert wird und in Folge HIF-1L übermäßig aktiviert wird (Ichimura 2012). Dass 2-HG auch in der

Leukämogenese von Bedeutung zu sein scheint, wurde in mehreren aktuellen Studien nachgewiesen. So konnten erhöhte 2-HG Spiegel in Patienten mit AML und *IDH 1/2* Mutation nachgewiesen werden (Fathi et al. 2012; Gross et al. 2010; Janin et al. 2014; Losman et al. 2013; Ward et al. 2010).

Es gibt bereits Ansätze für das Untersuchen des Therapieansprechens von AML Patienten mithilfe von Methoden, die den Nachweis von leukämischen Blasten weit unterhalb der zytologischen Nachweisgrenze erlauben, die sog. „minimal residual disease“ (MRD) (Buccisano et al. 2012; Hourigan und Karp 2013; Krönke et al. 2011). Damit können bei Patienten, die klinisch und zytologisch in kompletter Remission sind, Leukämiezellen nachgewiesen und im Verlauf untersucht werden. Eine Studie von Krönke et al. konnte zeigen, dass *NPM1*-MRD-Monitoring zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Diagnose, während und nach der Therapie) es ermöglicht, Patienten einem hohen bzw. geringen Rückfallrisiko zuzuordnen (Krönke et al. 2011). So entsteht die Möglichkeit, durch früheres Eingreifen, beispielsweise mit einer allogenen Stammzelltransplantation, das Überleben von Patienten mit erhöhtem Rückfallrisiko zu verbessern. In einer aktuellen Studie von Debarri et al. ließ sich bei 17 von 31 unselektierten AML Patienten mit *NPM1* Mutation eine *IDH1/2* Mutation nachweisen, die MRD wurde mittels „next-generation-sequencing“ nach der Induktionstherapie sowie nach der ersten und zweiten Konsolidierungstherapie ermittelt. Bei 100% der Patienten, die ein Rezidiv erlitten hatten konnte auch wieder eine *IDH1/2* Mutation nachgewiesen werden (ein Patient erlitt ein MDS) (Debarri et al. 2015).

In einer weiteren aktuellen Studie von Janin et al. konnte bei AML-Patienten mit *IDH1/2* Mutation nachgewiesen werden, dass ein signifikant erhöhter 2-HG Spiegel, auch als MRD Marker herangezogen werden könnte. Es wurden bei 82 Patienten mit *de novo* AML (*IDH1/2* Mutation, n=53), sowie bei 68 Patienten ohne AML die 2-HG Spiegel im Serum mittels Massenspektrometrie untersucht und nachgewiesen, dass die 2-HG Spiegel bei Patienten mit *IDH1/2* Mutation signifikant höher waren als bei Patienten mit *IDH1/2* Wildtyp. In den follow-up Untersuchungen wurde der 2-HG Wert auch nach der Induktionstherapie untersucht. Hier zeigten Patienten mit 2-HG Werten unter dem festgelegtem cut-off von <2 µmol/L ein längeres RFS und OS im Gegensatz zu Patienten mit höheren 2-HG Spiegel. (Janin et al. 2014). Außerdem zeigten die 2-HG Spiegel während dem follow-up eine positive Korrelation mit den Mutationen *WT1* und *NPM1*. In einer Arbeit von Sasaki et al. führte die Expression von *IDH1* R132 Mutationen in knock-in Maus

Modellen im hämatologischen Gewebe zu einem Nachweis von 10-fach höheren 2-HG Serum Spiegeln als in Wildtyp-Mäusen und zu einer Zunahme an frühen Vorläuferzellen, Anämie, Splenomegalie und extramedullärer Hämatopoese. Außerdem wiesen die Zellen der Mäuse mit den *IDH1* R132 Mutationen übermäßig stark methylierte Histone und veränderte DNA-Methylierungsmuster, die AML Blasten mit *IDH1* bzw. *IDH2* Mutationen ähnlich waren, auf (Sasaki et al. 2012). Die Mäuse mit *IDH1* R132 Mutation wiesen keinen leukämischen Phänotyp auf und überlebten ähnlich lange wie die Wildtyp Mäuse, was darauf hinweist, dass eine *IDH1* bzw. *IDH2* Mutation alleine nicht ausreicht um eine AML zu induzieren. In einer weiteren Arbeit von Chaturvedi et al. konnte ebenfalls im Mausmodell gezeigt werden, dass eine *IDH1* Mutation alleine zu keiner Transformation hämatopoetischer Zellen führt. Bei zusätzlicher Überexpression von HoxA9 konnte das Auftreten von myeloproliferativen Erkrankung in den Mäusen mit einer mittleren Latenzzeit von 83 Tagen festgestellt werde. Im Vergleich dazu lag die Latenzzeit bei Wildtyp *IDH1* bzw. einem Kontrollvektor bei 167 und 210 Tagen.

In mehreren Studien konnte sowohl in vivo als auch in vitro gezeigt werden, dass es durch *IDH1* bzw. *IDH2* Mutationen zu erhöhten 2-HG Spiegeln und in weiterer Folge zu DNA- und Histon Hypermethylierung kommen kann. Epigenetische Veränderungen sind potenziell reversibel und daher mögliche Ansatzpunkte neuer molekular zielgerichteter Therapiestrategien. Mutierte *IDH1* und *IDH2* Proteine können pharmakologisch inhibiert werden und so die Produktion von 2-HG reduziert werden (Chaturvedi et al. 2013; Wang et al. 2013). Im Rahmen der Jahrestagung im Dezember 2014 der *American Society of Hematology* wurden von Stein und Kollegen erste sehr vielversprechende Ergebnisse einer Phase-I-Studie präsentiert, welche Sicherheit, Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Wirksamkeit des ersten oralen *IDH2*-Inhibitors AG-221 bei Patienten mit fortgeschrittenen *IDH2*-mutierten myeloischen Neoplasien untersuchte (Stein et al. 2014). In die Studie wurden bis Dezember 2014 73 Patienten mit einem medianen Alter von 67 Jahren eingeschlossen. Die Patienten litten an einer meist rezidierten bzw. refraktären AML (n=62), einem MDS (n=6), einer nicht-therapierten AML (n=5), einer chronisch myelomonozytäre Leukämie (n=5) oder einem myeloischen Sarkom (n=1). In dieser prognostisch sehr ungünstigen, vorbehandelten Patientengruppe war das Ansprechen auf eine orale Monotherapie bemerkenswert: Die Gesamtansprechrate der 45 bisher auswertbaren Patienten betrug 56%. Hiervon erreichten 6 Patienten eine komplette

Remission, sowie weitere 9 Patienten eine komplette Remission mit unvollständiger hämatopoetischer Rekonstitution. An Nebenwirkungen traten bei einigen Patienten gastrointestinale Beschwerden, wie Übelkeit und Diarrhoe auf. Im Jahr 2015 wurden die Ergebnisse der Expansionsphase dieser Studie mit insgesamt 209 Patienten mit *IDH2* Mutation vorgestellt. Von den 209 Patienten waren 159 Patienten (76 %) rezidiert oder refraktär auf im Median 2 Vortherapien und 66 der Patienten (32 %) zum Zeitpunkt der Analyse noch aktiv in der Studie. Die Patienten erhielten eine festgelegte Dosis im Phase-2-Teil von 100 mg/Tag. In dieser prognostisch ungünstigen, mit einem medianen Alter von 69 Jahren älteren Patientengruppe, war der Behandlungserfolg mit einer oral verabreichbaren AML-Monotherapie beachtlich. Die Gesamtansprechrates betrug 38% (n=79), wobei der Subtyp der *IDH2* Mutation keinen Einfluss auf das Ansprechen hatte; 37 Patienten erreichten eine komplette Remission (Stein et al. 2015). Basierend auf der bisher positiven Nutzen-Risiko-Relation wird AG-221 nun aktuell in einer randomisierten Phase-III-Studie getestet.

Im Rahmen der Jahrestagung im Dezember 2014 der *American Society of Hematology* wurde zudem von Hansen und Kollegen präsentiert, dass *IDH1*-R132 experimentell pharmakologisch inhibiert und so die Produktion von 2-HG reduziert werden kann (Hansen et al. 2014). Auch für Patienten mit *IDH1* Mutation wurde 2015 eine Phase-I-Studie präsentiert, welche Sicherheit, Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Wirksamkeit des ersten oralen *IDH1*-Inhibitors AG-120 bei 78 Patienten mit fortgeschrittenen *IDH1*-mutierten myeloischen Neoplasien untersucht. Die Gesamtansprechrates betrug hier 35 % (n=27); 12 Patienten erreichten eine komplette Remission (DiNardo et al. 2015).

Zusammengefasst wecken die Ergebnisse dieses neuen Therapieprinzips die Hoffnung, dass in näherer Zukunft für die Patientengruppe mit *IDH1/2*-Mutationen eine gut verträgliche, wirksame orale Monotherapie zur Verfügung stehen könnte.

Der Anteil an *IDH1* und/oder *IDH2* Mutationen bei der AML liegt bei 15%-20%. Der Vorteil des *IDH1/2*-Screenings in meiner Arbeit liegt im höheren Probendurchsatz bei einem niedrigeren Zeit- und auch Kostenfaktor. Durch den Einsatz der *denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC)* wird der Umfang der Sequenzierungen signifikant verringert, da man bereits mit der Fragmentanalyse feststellen kann, bei welchem Patienten und in welcher Region des Exons 4 eine mögliche Mutation vorliegt. So konnte hier relativ schnell und kostengünstig der *IDH1/2* Mutationsstatus bestimmt

werden. Dies könnte von Bedeutung im Kontext von zielgerichteten Therapiekonzepten mit spezifischen IDH Inhibitoren werden, da hier ein *IDH1/2* Mutationsscreening ins diagnostische „work-up“ implementiert wird. Des Weiteren ermöglicht ein solcher Assay ein effizientes Mutations-Screening im Rahmen von retrospektiven Studien, in denen viele Patientenproben untersucht werden müssen.

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte ich bestätigen, dass *IDH1/2* Mutationen häufig auftretende genetische Alterationen bei jüngeren AML Patienten (<60 Jahre) darstellen. In dieser Arbeit hatten *IDH1/2* Mutationen keine signifikante prognostische Bedeutung (CR, RFS, OS).

5. Zusammenfassung

Wie in mehreren Studien eindrucksvoll gezeigt werden konnte stellen *IDH1* (*Isocitrate dehydrogenase 1*) und *IDH2* (*Isocitrate dehydrogenase 2*) Mutationen rekurrente genetische Alterationen bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) dar: Der Anteil an *IDH1* und *IDH2* Mutationen bei der AML liegt bei 15%-20%. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an einem großen Kollektiv (n=920) jüngerer AML Patienten (<60 Jahre) Mutationsanalysen der *IDH1* und *IDH2* Gene durchzuführen und die Daten zum *IDH1/2* Mutationsstatus mit weiteren genetischen und klinischen Charakteristika zu korrelieren sowie die prognostische Relevanz der *IDH1/2* Mutationen zu evaluieren. Der Vorteil des hier verwendeten Assays zum *IDH1/2*-Screening liegt im höheren Probendurchsatz bei einem niedrigeren Zeit- und auch Kostenfaktor durch den Einsatz der *denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC)*. Von den 920 untersuchten AML Patienten wiesen insgesamt 147 (16,0%) Patienten eine *IDH1* und/oder *IDH2* Mutation (*IDH1/2*) auf. Bei 58 (6,3%) Patienten konnten *IDH1* Mutationen nachgewiesen werden; bei 94 (10,2%) Patienten *IDH2* Mutationen. Hiervon lag in 5 (0,5%) der Patienten eine Mutation in *IDH1* und *IDH2* vor. *IDH1/2* Mutationen waren in meiner Arbeit signifikant mit einem zytogenetisch normalen Karyotyp und einer *Nucleophosmin 1 (NPM1)* Mutationen assoziiert. In der Gruppe der *IDH1* und/oder *IDH2* mutierten Patienten betrug das mediane Alter 51,3 Jahre (Spanne 21-60 Jahre). Männer und Frauen waren etwa gleich häufig von einer *IDH1/2* Mutation betroffen. In der hier untersuchten Patientenkohorte waren *IDH1/2* Mutationen mit höherem Alter ($p=0,001$) assoziiert, hatten niedrigere Leukozytenzahlen ($p=0,009$), niedrigere Werte für Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum ($p<0,0001$) und höhere Thrombozytenzahlen ($p<0,0001$). In der vorliegenden Arbeit gab es keinen Effekt der *IDH1/2* Mutationen auf den Erfolg der Induktionstherapie und auch nicht auf die Langzeitprognose hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens (relapse free survival, RFS) und des Gesamtüberlebens (overall survival, OS). Dies gilt sowohl für die Patienten mit unselektierter AML, als auch für die Subgruppe der Patienten mit normalen Karyotyp (cytogenetically normal - (CN)) - AML Patienten. Die wissenschaftliche Datenlage zur Bedeutung der *IDH1/2* Mutationen für die Langzeitprognose ist uneinheitlich. Mögliche Gründe für die nicht einheitlichen Ergebnisse des Einflusses von *IDH1/2* Mutationen auf das RFS und OS könnten sein, dass unterschiedliche Altersstrukturen der

Patientenkollektive herangezogen werden. Zudem sind die bisher vorhandenen Studien zu *IDH1/2* retrospektiv durchgeführt worden und stammen aus verschiedenen Populationen (Europa, Asien, USA). Auch die Zytogenetik des Patientenkollektivs (unselektierte AML vs. CN-AML), das Vorhandensein weiterer Mutationen und auch die Lokalisation der Mutation scheint eine wichtige Rolle zu spielen. Des Weiteren werden Patienten häufig nicht innerhalb von kontrollierten klinischen Studien behandelt, was die Aussagen zur prognostischen Signifikanz oft limitiert. Deshalb war es wichtig, weitere Mutationsanalysen des *IDH1* und *IDH2* Gens an einer großen, homogen behandelten AML-Kohorte durchzuführen und die Mutationsdaten mit den gut dokumentierten klinischen Daten zu korrelieren. Es gibt inzwischen hinreichende Evidenz, dass durch Mutationen in *IDH1* und *IDH2* die epigenetische Regulation gestört wird. Als Substrat der mutierten Enzyme fungiert nicht mehr Isocitrat, sondern es wird eine Reaktion katalysiert, in der α -Ketoglutarat zu 2-Hydroxyglutarat (2-HG) umgesetzt wird. 2-Hydroxyglutarat fungiert als Inhibitor von α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, wie z.B. Histon- und DNA-Demethylasen. Folglich kommt es zu einer DNA- und Histon Hypermethylierung. Dies führt zu einer Blockade der Zelldifferenzierung und stellt einen wesentlichen Pathomechanismus bei den *IDH1/2*-mutierten myeloischen Neoplasien dar. Epigenetische Veränderungen sind potenziell reversibel und daher mögliche Ansatzpunkte neuer molekular zielgerichteter Therapiestrategien. Die Bestimmung des *IDH1/2* Mutationsstatus hat daher hohe klinische Relevanz: mutierte *IDH1* und *IDH2* Proteine konnten bereits in ersten Studien experimentell pharmakologisch inhibiert und so die Produktion von 2-HG reduziert werden (Chaturvedi et al. 2013; Wang et al. 2013). Zudem gibt es erste sehr vielversprechende Ergebnisse von Phase-I-Studien, welche Sicherheit, Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Wirksamkeit des ersten oralen *IDH1* bzw. *IDH2*-Inhibitors AG-121 bzw. AG-221 bei Patienten mit fortgeschrittenen *IDH1/2*-mutierten myeloischen Neoplasien untersuchte. Somit stellen *IDH1*- und *IDH2*-Inhibitoren eine dringend benötigte Erweiterung des therapeutischen Arsenal für AML Patienten dar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern wichtige Informationen zum Auftreten von *IDH1/2* Mutationen bei der AML des jüngeren Patienten (<60 Jahre) und sind somit eine wichtige Basis für weitere Studien, die optimalerweise prospektiv und an einem großen Patientenkollektiv, insbesondere im Kontext mit neuen zielgerichteten Substanzen, durchgeführt werden sollten.

6. Literaturverzeichnis

1. **Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, Schelen A, Koenders JE, Zeilemaker A, van Putten WJ, Rijneveld AW, Lowenberg B, and Valk PJ.** 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. **Aboul-ela F, Koh D, Tinoco I, Jr., and Martin FH.** 1985. Base-base mismatches. Thermodynamics of double helix formation for dCA3XA3G + dCT3YT3G (X, Y = A,C,G,T). *Nucleic Acids Res* 13: 4811-4824.
3. **Adamson RH, and Seiber SM.** 1981. Chemically induced leukemia in humans. *Environ Health Perspect* 39: 93-103.
4. **Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, and Vardiman JW.** 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127: 2391-2405.
5. **Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, and Schnittger S.** 2008. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients. *Blood* 111: 2527-2537.
6. **Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, and von Deimling A.** 2008. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 116: 597-602.
7. **Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, 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.
8. **Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, and Sultan C.** 1985. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine* 103: 620-625.
9. **Bernard P, and Couturier M.** 1992. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* 226: 735-745.

- 10. Bernard P, Gabant P, Bahassi EM, and Couturier M.** 1994. Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* 148: 71-74.

- 11. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, Frattini M, Molinari F, Knowles M, Cerrato A, Rodolfo M, Scarpa A, Felicioni L, Buttitta F, Malatesta S, Marchetti A, and Bardelli A.** 2009. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat* 30: 7-11.

- 12. Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, Patil SR, Davey FR, Berg DT, Schiffer CA, Arthur DC, and Mayer RJ.** 1998. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 58: 4173-4179.

- 13. Boissel N, Leroy H, Brethon B, Philippe N, de Botton S, Auvrignon A, Raffoux E, Leblanc T, Thomas X, Hermine O, Quesnel B, Baruchel A, Leverger G, Dombret H, and Preudhomme C.** 2006. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 20: 965-970.

- 14. Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Gardin C, Reman O, Contentin N, Bordessoule D, Pautas C, de Revel T, Quesnel B, Huchette P, Philippe N, Geffroy S, Terre C, Thomas X, Castaigne S, Dombret H, and Preudhomme C.** 2010. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol* 28: 3717-3723.

- 15. Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Huchette P, Dombret H, and Preudhomme C.** 2011. Differential prognosis impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 117: 3696-3697.

- 16. Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, Larrayoz MJ, Garcia-Delgado M, Giagounidis A, Malcovati L, Della Porta MG, Jadersten M, Killick S, Hellstrom-Lindberg E, Cazzola M, and Wainscoat JS.** 2010. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 24: 1062-1065.

17. **Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F, Arcese W, Amadori S, and Venditti A.** 2012. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* 119: 332-341.

18. **Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, and Bloomfield CD.** 2002. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100: 4325-4336.

19. **Ceccarelli C, Grodsky NB, Ariyaratne N, Colman RF, and Bahnson BJ.** 2002. Crystal structure of porcine mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase complexed with Mn²⁺ and isocitrate. Insights into the enzyme mechanism. *J Biol Chem* 277: 43454-43462.

20. **Chaturvedi A, Araujo Cruz MM, Jyotsana N, Sharma A, Yun H, Gorlich K, Wichmann M, Schwarzer A, Preller M, Thol F, Meyer J, Haemmerle R, Struys EA, Jansen EE, Modlich U, Li Z, Sly LM, Geffers R, Lindner R, Manstein DJ, Lehmann U, Krauter J, Ganser A, and Heuser M.** 2013. Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML. *Blood* 122: 2877-2887.

21. **Chomczynski P, and Sacchi N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

22. **Chomienne C, Rain JD, and Briere J.** 2004. Risk of leukemic transformation in PV and ET patients. *Pathol Biol (Paris)* 52: 289-293.

23. **Chou WC, Chou SC, Liu CY, Chen CY, Hou HA, Kuo YY, Lee MC, Ko BS, Tang JL, Yao M, Tsay W, Wu SJ, Huang SY, Hsu SC, Chen YC, Chang YC, Kuo KT, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tseng MH, Huang CF, and Tien HF.** 2011. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood* 118: 3803-3810.

24. Chou WC, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay W, Ko BS, Wu SJ, Huang SY, Hsu SC, Chen YC, Huang YN, Chang YC, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tseng MH, Huang CF, and Tien HF. 2010a. Distinct clinical and biologic characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing the isocitrate dehydrogenase 1 mutation. *Blood* 115: 2749-2754.
25. Chou WC, Huang HH, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay W, Ko BS, Wu SJ, Huang SY, Hsu SC, Chen YC, Huang YN, Chang YC, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tseng MH, Huang CF, and Tien HF. 2010b. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood* 116: 4086-4094.
26. Chou WC, Peng KY, Lei WC, Ko BS, Tsay W, Kuo CH, and Tien HF. 2012. Persistence of mutant isocitrate dehydrogenase in patients with acute myeloid leukemia in remission. *Leukemia* 26: 527-529.
27. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, and Su SM. 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462: 739-744.
28. Debarri H, Lebon D, Roumier C, Cheok M, Marceau-Renaut A, Nibourel O, Geffroy S, Helevaut N, Rousselot P, Gruson B, Gardin C, Chretien ML, Sebda S, Figeac M, Berthon C, Quesnel B, Boissel N, Castaigne S, Dombret H, Renneville A, and Preudhomme C. 2015. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association. *Oncotarget* 6: 42345-42353.
29. den Dunnen JT, and Antonarakis SE. 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15: 7-12.
30. DiNardo C, de Botton S, and Pollyea D. 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. *ASH 2015, Orlando, Abstract* 1306.

31. **Döhner H.** 2007. Implication of the molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 412-419.

32. **Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Lowenberg B, and Bloomfield CD.** 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.

33. **Döhner K, and Döhner H.** 2008. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 93: 976-982.

34. **Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, and Döhner 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.

35. **Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, Hoster E, Schneider S, Zellmeier E, Benthaus T, Sauerland MC, Berdel WE, Büchner T, Wormann B, Braess J, Hiddemann W, Bohlander SK, and Spiekermann K.** 2010. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol* 28: 570-577.

36. **Ensembl Genome Browser.** URL:
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000138413;r=2:209100951-209130798;t=ENST00000345146 [Aufruf am 13.11.2016, 16:30]

37. **Ensembl Genome Browser.** URL:
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000182054;r=15:90626277-90645736;t=ENST00000330062 [Aufruf am 13.11.2016, 16:30]

38. **Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, and Herman JG.** 2000. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343: 1350-1354.

- 39. Estey E, and Döhner H.** 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368: 1894-1907.

- 40. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, and Martelli MF.** 2005. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 352: 254-266.

- 41. Fathi AT, Sadrzadeh H, Borger DR, Ballen KK, Amrein PC, Attar EC, Foster J, Burke M, Lopez HU, Matulis CR, Edmonds KM, Iafrate AJ, Straley KS, Yen KE, Agresta S, Schenkein DP, Hill C, Emadi A, Neuberg DS, Stone RM, and Chen YB.** 2012. Prospective serial evaluation of 2-hydroxyglutarate, during treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, to assess disease activity and therapeutic response. *Blood* 120: 4649-4652.

- 42. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, Tallman MS, Sun Z, Wolniak K, Peeters JK, Liu W, Choe SE, Fantin VR, Paietta E, Lowenberg B, Licht JD, Godley LA, Delwel R, Valk PJ, Thompson CB, Levine RL, and Melnick A.** 2010a. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 18: 553-567.

- 43. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, Schifano E, Booth J, van Putten W, Skrabanek L, Campagne F, Mazumdar M, Greally JM, Valk PJ, Lowenberg B, Delwel R, and Melnick A.** 2010b. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 17: 13-27.

- 44. Figueroa ME, Skrabanek L, Li Y, Jiemjit A, Fandy TE, Paietta E, Fernandez H, Tallman MS, Greally JM, Carraway H, Licht JD, Gore SD, and Melnick A.** 2009. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* 114: 3448-3458.

- 45. Fisher CL, Randazzo F, Humphries RK, and Brock HW.** 2006. Characterization of Asxl1, a murine homolog of Additional sex combs, and analysis of the Asx-like gene family. *Gene* 369: 109-118.

- 46. Fröhling S, Schlenk RF, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, and Döhner K.** 2002. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 100: 4372-4380.
- 47. Fröhling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Döhner K, and Döhner H.** 2006. Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood* 108: 3280-3288.
- 48. Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, and Döhner K.** 2004. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 22: 624-633.
- 49. Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, and Levine RL.** 2005. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology* 23: 6285-6295.
- 50. Frueh FW, and Noyer-Weidner M.** 2003. The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. *Clin Chem Lab Med* 41: 452-461.
- 51. Fu Y, Huang R, Du J, Yang R, An N, and Liang A.** 2010. Glioma-derived mutations in IDH: from mechanism to potential therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 397: 127-130.
- 52. Gaidzik VI, Paschka P, Späth D, Habdank M, Köhne CH, Germing U, von Lilienfeld-Toal M, Held G, Horst HA, Haase D, Bentz M, Götze K, Döhner H, Schlenk RF, Bullinger L, and Döhner K.** 2012. TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. *J Clin Oncol* 30: 1350-1357.
- 53. Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Döhner H, and Döhner K.** 2009. Prognostic impact of WT1

mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood* 113: 4505-4511.

54. Geisbrecht BV, and Gould SJ. 1999. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 274: 30527-30533.

55. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M, Purcell SM, Svantesson O, Landen M, Hoglund M, Lehmann S, Gabriel SB, Moran JL, Lander ES, Sullivan PF, Sklar P, Gronberg H, Hultman CM, and McCarroll SA. 2014. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* 371: 2477-2487.

56. Gilliland DG, Jordan CT, and Felix CA. 2004. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 80-97.

57. Green CL, Evans CM, Zhao L, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, and Gale RE. 2011. The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood* 118: 409-412.

58. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, and Gale RE. 2010. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol* 28: 2739-2747.

59. Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, Bloomfield CD, Borate U, De Castro CM, Deeg HJ, Frankfurt O, Gaensler K, Garcia-Manero G, Gore SD, Head D, Komrokji R, Maness LJ, Millenson M, O'Donnell MR, Shami PJ, Stein BL, Stone RM, Thompson JE, Westervelt P, Wheeler B, Shad DA, and Naganuma M. 2013. Myelodysplastic syndromes: clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 11: 838-874.

60. Grimwade D, and Hills RK. 2009. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 385-395.

61. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, and Goldstone A. 1998. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *The*

Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92: 2322-2333.

62. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, and Pandolfi PP. 2006. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 493-505.

63. Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, Sasaki M, Jin S, Schenkein DP, Su SM, Dang L, Fantin VR, and Mak TW. 2010. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med* 207: 339-344.

64. Hansen E, Quivoron C, and Straley Kea. 2014. AG-120, an Oral, Selective, First-in-Class, Potent Inhibitor of Mutant IDH1, Reduces Intracellular 2HG and Induces Cellular Differentiation in TF-1 R132H Cells and Primary Human IDH1 Mutant AML Patient Samples Treated Ex Vivo. *Blood American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting*. December 6-9, 2014; San Francisco, CA. Abstract 3734.

65. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, and von Deimling A. 2009. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 118: 469-474.

66. Haselbeck RJ, and McAlister-Henn L. 1993. Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. *J Biol Chem* 268: 12116-12122.

67. Ho PA, Alonzo TA, Kopecky KJ, Miller KL, Kuhn J, Zeng R, Gerbing RB, Raimondi SC, Hirsch BA, Oehler V, Hurwitz CA, Franklin JL, Gamis AS, Petersdorf SH, Anderson JE, Reaman GH, Baker LH, Willman CL, Bernstein ID, Radich JP, Appelbaum FR, Stirewalt DL, and Meshinchi S. 2010. Molecular alterations of the IDH1 gene in AML: a Children's Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *Leukemia* 24: 909-913.

68. Hourigan CS, and Karp JE. 2013. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol* 10: 460-471.

- 69. Huber CG, Oefner PJ, and Bonn GK.** 1993. High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on nonporous alkylated styrene-divinylbenzene copolymers. *Anal Biochem* 212: 351-358.
- 70. Ichimaru M, Ishimaru T, and Belsky JL.** 1978. Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950--71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia. *J Radiat Res* 19: 262-282.
- 71. Ichimura K.** 2012. Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol.*
- 72. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Backlund LM, Chan R, Jones DT, and Collins VP.** 2009. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* 11: 341-347.
- 73. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberger D, Altshuler D, and Ebert BL.** 2014. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 371: 2488-2498.
- 74. Janin M, Mylonas E, Saada V, Micol JB, Renneville A, Quivoron C, Koscielny S, Scourzic L, Forget S, Pautas C, Caillot D, Preudhomme C, Dombret H, Berthon C, Barouki R, Rabier D, Auger N, Griscelli F, Chachaty E, Leclercq E, Courtier MH, Bennaceur-Griscelli A, Solary E, Bernard OA, Penard-Lacronique V, Ottolenghi C, and de Botton S.** 2014. Serum 2-hydroxyglutarate production in IDH1- and IDH2-mutated de novo acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol* 32: 297-305.
- 75. Jo SH, Son MK, Koh HJ, Lee SM, Song IH, Kim YO, Lee YS, Jeong KS, Kim WB, Park JW, Song BJ, and Huh TL.** 2001. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 276: 16168-16176.

- 76. Jongbloed RJE, Smeets H, Doevendans PA, and van den Wijngaard A.** 2005. Methods in molecular cardiology: DHPLC mutation detection analysis. *Netherland Heart Journal* 13.
- 77. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard L, Stockelberg D, Tidefelt U, Wahlin A, and Hoglund M.** 2009. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* 113: 4179-4187.
- 78. Kaelin WG, Jr., and Ratcliffe PJ.** 2008. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 30: 393-402.
- 79. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Seo SI, Lee JY, Yoo NJ, and Lee SH.** 2009. Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer* 125: 353-355.
- 80. Kelly LM, and Gilliland DG.** 2002. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3: 179-198.
- 81. Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, and Gilliland DG.** 2002. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 99: 310-318.
- 82. Kim SY, Lee SM, Tak JK, Choi KS, Kwon TK, and Park JW.** 2007. Regulation of singlet oxygen-induced apoptosis by cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Mol Cell Biochem* 302: 27-34.
- 83. King-Underwood L, and Pritchard-Jones K.** 1998. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood* 91: 2961-2968.
- 84. Koh HJ, Lee SM, Son BG, Lee SH, Ryoo ZY, Chang KT, Park JW, Park DC, Song BJ, Veech RL, Song H, and Huh TL.** 2004. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *J Biol Chem* 279: 39968-39974.

85. **Krell D, Assoku M, Galloway M, Mulholland P, Tomlinson I, and Bardella C.** 2011. Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and L2HGDH mutations in glioblastoma. *PLoS One* 6: e19868.

86. **Krönke J, Schlenk RF, Jensen KO, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, Paschka P, Onken S, Eiwen K, Habdank M, Späth D, Lubbert M, Wattad M, Kindler T, Salih HR, Held G, Nachbaur D, von Lilienfeld-Toal M, Germing U, Haase D, Mergenthaler HG, Krauter J, Ganser A, Gohring G, Schlegelberger B, Döhner H, and Döhner K.** 2011. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol* 29: 2709-2716.

87. **Kühnl A, and Grimwade D.** 2012. Molecular markers in acute myeloid leukaemia. *Int J Hematol* 96: 153-163.

88. **Lee SH, Jo SH, Lee SM, Koh HJ, Song H, Park JW, Lee WH, and Huh TL.** 2004. Role of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-ICDH) on cellular defence against oxidative injury by gamma-rays. *Int J Radiat Biol* 80: 635-642.

89. **Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, and Wilson RK.** 2010. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 363: 2424-2433.

90. **Losman JA, Looper RE, Koivunen P, Lee S, Schneider RK, McMahon C, Cowley GS, Root DE, Ebert BL, and Kaelin WG, Jr.** 2013. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science* 339: 1621-1625.

91. **Löwenberg B, Downing JR, and Burnett A.** 1999. Acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 341: 1051-1062.

92. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A, Wellen KE, O'Rourke DM, Berger SL, Chan TA, Levine RL, Mellinghoff IK, and Thompson CB. 2012. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 483: 474-478.
93. Marcucci G, Haferlach T, and Döhner H. 2011. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology* 29: 475-486.
94. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Whitman SP, Becker H, Schwind S, Metzeler KH, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, and Bloomfield CD. 2010. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 28: 2348-2355.
95. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, Becker H, Maharry K, Mrózek K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Nicolet D, Whitman SP, Wu YZ, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Moore JO, Caligiuri MA, Larson RA, and Bloomfield CD. 2012. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 30: 742-750.
96. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipiek C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, and Ley TJ. 2009. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 361: 1058-1066.
97. Mead AJ, Linch DC, Hills RK, Wheatley K, Burnett AK, and Gale RE. 2007. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more

favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 110: 1262-1270.

98. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrózek K, Nicolet D, Whitman SP, Wu YZ, Schwind S, Powell BL, Carter TH, Wetzler M, Moore JO, Kolitz JE, Baer MR, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, and Bloomfield CD. 2011. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood* 118: 6920-6929.

99. Molenaar RJ, Verbaan D, Lamba S, Zanon C, Jeuken JW, Boots-Sprenger SH, Wesseling P, Hulsebos TJ, Troost D, van Tilborg AA, Leenstra S, Vandertop WP, Bardelli A, van Noorden CJ, and Bleeker FE. 2014. The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro Oncol* 16: 1263-1273.

100. Mrózek K, and Bloomfield CD. 2006. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 169-177.

101. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, Metzeler KH, Schwind S, Wu YZ, Kohlschmidt J, Pettenati MJ, Heerema NA, Block AW, Patil SR, Baer MR, Kolitz JE, Moore JO, Carroll AJ, Stone RM, Larson RA, and Bloomfield CD. 2012. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 30: 4515-4523.

102. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, and Bloomfield CD. 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.

103. 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. *Hum Genet* 71: 37-40.

- 104. National Cancer Institute. Acute myeloid leukemia.** URL:
<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html> [Aufruf am 13.11.2016, 16:30]
- 105. Network TCGA.** 2013. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 368: 2059-2074.
- 106. Oefner PJ, and Underhill PA.** 1995. Comparative DNA-Sequencing by Denaturing High-Performance Liquid-Chromatography (Dhplc). *Am J Hum Genet* 57: 1547-1547.
- 107. Oh IU, Inazawa J, Kim YO, Song BJ, and Huh TL.** 1996. Assignment of the human mitochondrial NADP(+)-specific isocitrate dehydrogenase (IDH2) gene to 15q26.1 by in situ hybridization. *Genomics* 38: 104-106.
- 108. Pabst T, and Mueller BU.** 2007. Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML. *Oncogene* 26: 6829-6837.
- 109. Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, and Tenen DG.** 2001a. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med* 7: 444-451.
- 110. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, and Tenen DG.** 2001b. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 27: 263-270.
- 111. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, Van Loo P, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O'Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF, Ganser A, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, and Campbell PJ.** 2016. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 374: 2209-2221.
- 112. Park SH, Chi HS, Min SK, Park BG, Jang S, and Park CJ.** 2011. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 35: 1376-1383.
- 113. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam**

DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, and Kinzler KW. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321: 1807-1812.

114. Paschka P. 2008. Core binding factor acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 35: 410-417.

115. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, Vukosavljevic T, Perrotti D, Vardiman JW, Carroll AJ, Kolitz JE, Larson RA, and Bloomfield CD. 2006. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 24: 3904-3911.

116. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrózek K, Maharry K, Langer C, Baldus CD, Zhao W, Powell BL, Baer MR, Carroll AJ, Caligiuri MA, Kolitz JE, Larson RA, and Bloomfield CD. 2008. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol* 26: 4595-4602.

117. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, Späth D, Kayser S, Zucknick M, Götze K, Horst HA, Germing U, Döhner H, and Döhner 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. *J Clin Oncol* 28: 3636-3643.

118. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci ND, Heguy A, Cherry A, Vance G, Higgins RR, Ketterling RP, Gallagher RE, Litzow M, van den Brink MR, Lazarus HM, Rowe JM, Luger S, Ferrando A, Paietta E, Tallman MS, Melnick A, Abdel-Wahab O, and Levine RL. 2012. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 366: 1079-1089.

119. Patel KP, Ravandi F, Ma D, Paladugu A, Barkoh BA, Medeiros LJ, and Luthra R. 2011. Acute myeloid leukemia with IDH1 or IDH2 mutation: frequency and clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol* 135: 35-45.

- 120. Ravandi F, Patel K, Luthra R, Faderl S, Konopleva M, Kadia T, Brandt M, Pierce S, Kornblau S, Andreeff M, Wang X, Garcia-Manero G, Cortes J, and Kantarjian H.** 2012. Prognostic significance of alterations in IDH enzyme isoforms in patients with AML treated with high-dose cytarabine and idarubicin. *Cancer* 118: 2665-2673.
- 121. Reitman ZJ, Parsons DW, and Yan H.** 2010. IDH1 and IDH2: not your typical oncogenes. *Cancer Cell* 17: 215-216.
- 122. Robison LL, and Neglia JP.** 1987. Epidemiology of Down syndrome and childhood acute leukemia. *Prog Clin Biol Res* 246: 19-32.
- 123. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and Arnheim N.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- 124. Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- 125. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, and Delattre JY.** 2009. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 27: 4150-4154.
- 126. Sasaki M, Knobbe CB, Munger JC, Lind EF, Brenner D, Brustle A, Harris IS, Holmes R, Wakeham A, Haight J, You-Ten A, Li WY, Schalm S, Su SM, Virtanen C, Reifemberger G, Ohashi PS, Barber DL, Figueroa ME, Melnick A, Zuniga-Pflucker JC, and Mak TW.** 2012. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature* 488: 656-659.
- 127. Schlenk RF, and Döhner K.** 2009. Impact of new prognostic markers in treatment decisions in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 16: 98-104.
- 128. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, and Döhner H.** 2008. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 358: 1909-1918.

- 129. Schmitt TJ, Robinson ML, and Doyle J.** 2000. Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Insertion & Deletion Detection on the WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System. Transgenomic Inc Application Note 112.
- 130. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, Kohlmann A, Illig T, Klopp N, Wichmann HE, Kreuzer KA, Schmid C, Staib P, Peceny R, Schmitz N, Kern W, Haferlach C, and Haferlach T.** 2013. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia* 27: 82-91.
- 131. Schnittger S, Haferlach C, Ulke M, Alpermann T, Kern W, and Haferlach T.** 2010. IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood* 116: 5486-5496.
- 132. Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Spiekermann K, and Schoch C.** 2006. KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood* 107: 1791-1799.
- 133. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, and Falini B.** 2005. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 106: 3733-3739.
- 134. Shen Y, Zhu YM, Fan X, Shi JY, Wang QR, Yan XJ, Gu ZH, Wang YY, Chen B, Jiang CL, Yan H, Chen FF, Chen HM, Chen Z, Jin J, and Chen SJ.** 2011. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 118: 5593-5603.
- 135. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, and Velculescu VE.** 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314: 268-274.

- 136. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, and Appelbaum FR.** 2000. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96: 4075-4083.
- 137. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J, Vardiman JW, Rowley JD, and Larson RA.** 2003. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* 102: 43-52.
- 138. Stein E, Altman J, and Collins Rea.** 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. American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting December 6-9, 2014; San Francisco, CA Abstract 115.
- 139. Stein E, DiNardo C, and Altman J.** 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. American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting December 5-8, 2015; Orlando Abstract 323.
- 140. Stone RM, Mandrekar S, Sanford BL, Geyer S, Bloomfield CD, Döhner K, Thiede C, Marcucci G, Lo-Coco F, Klisovic RB, Wei A, Sierra J, Sanz A, Brandwein JM, de Witte T, Niederwieser D, Appelbaum FR, Medeiros BC, Tallman MS, Krauter J, Schlenk RF, Ganser A, Serve H, Ehninger G, Amadori S, Larson RA, and Döhner H.** 2015. The Multi-Kinase Inhibitor Midostaurin (M) Prolongs Survival Compared with Placebo (P) in Combination with Daunorubicin (D)/Cytarabine (C) Induction (ind), High-Dose C Consolidation (consol), and As Maintenance (maint) Therapy in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients (pts) Age 18-60 with FLT3 Mutations (mut): An International Prospective Randomized (rand) P-Controlled Double-Blind Trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]). *Blood* 126:6.

141. **Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, and Vardiman JW.** 2008. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press.
142. **Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Ogden A, Shepherd L, Willman C, Bloomfield CD, Rowe JM, and Wiernik PH.** 1997. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 337: 1021-1028.
143. **Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CA, Wouters BJ, van der Poel-van de Luytgaarde SC, Damm F, Krauter J, Ganser A, Schlenk RF, Lowenberg B, Delwel R, Döhner H, Valk PJ, and Döhner 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.
144. **Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, and Ehninger G.** 2006. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 107: 4011-4020.
145. **Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhauser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, and Illmer T.** 2002. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99: 4326-4335.
146. **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. *J Clin Oncol* 29: 2889-2896.
147. **Thol F, Damm F, Wagner K, Gohring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, Lubbert M, Heit W, Kanz L, Schlimok G, Raghavachar A, Fiedler W, Kirchner H, Heil G, Heuser M, Krauter J, and Ganser A.** 2010. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 116: 614-616.

- 148. Thompson CB.** 2009. Metabolic enzymes as oncogenes or tumor suppressors. *N Engl J Med* 360: 813-815.

- 149. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AW, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy A, Viale A, Morris LG, Huse JT, Mellinghoff IK, and Chan TA.** 2012. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 483: 479-483.

- 150. Vardiman JW, Harris NL, and Brunning RD.** 2002. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100: 2292-2302.

- 151. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, and Bloomfield CD.** 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.

- 152. Wagner K, Damm F, Göhring G, Gorlich K, Heuser M, Schafer I, Ottmann O, Lubbert M, Heit W, Kanz L, Schlimok G, Raghavachar AA, Fiedler W, Kirchner HH, Brugger W, Zucknick M, Schlegelberger B, Heil G, Ganzer A, and Krauter J.** 2010. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol* 28: 2356-2364.

- 153. Wagner T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E, Muhr D, Pages S, Sandberg T, Caux V, Moeslinger R, Langbauer G, Borg A, and Oefner P.** 1999. Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. *Genomics* 62: 369-376.

- 154. 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 JO, Salituro FG, Yan S, Murray S, Wei W, Gao Y, Dang L, Dorsch M, Agresta S, Schenkein DP, Biller SA, Su SM, de Botton S, and Yen KE.** 2013. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science* 340: 622-626.

155. Wang K, Wang YY, Ma J, Wang JF, Li SW, Jiang T, and Dai JP. 2014. Prognostic value of MGMT promoter methylation and TP53 mutation in glioblastomas depends on IDH1 mutation. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 10893-10898.
156. Ward PS, Cross JR, Lu C, Weigert O, Abel-Wahab O, Levine RL, Weinstock DM, Sharp KA, and Thompson CB. 2012. Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. *Oncogene* 31: 2491-2498.
157. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat CV, Perl AE, Rabinowitz JD, Carroll M, Su SM, Sharp KA, Levine RL, and Thompson CB. 2010. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 17: 225-234.
158. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, and Ohgaki H. 2009. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 174: 1149-1153.
159. Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Racke F, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, and Bloomfield CD. 2008. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood* 111: 1552-1559.
160. Xiao W, and Oefner PJ. 2001. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 17: 439-474.
161. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, Ito S, Yang C, Xiao MT, Liu LX, Jiang WQ, Liu J, Zhang JY, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu YH, Lei QY, Guan KL, Zhao SM, and Xiong Y. 2011. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 19: 17-30.
162. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW,

Velculescu VE, Vogelstein B, and Bigner DD. 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360: 765-773.

163. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, Shi JY, Zhu YM, Tang L, Zhang XW, Liang WX, Mi JQ, Song HD, Li KQ, Chen Z, and Chen SJ. 2011. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 43: 309-315.

164. Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, and Naoe T. 2005. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 19: 1345-1349.

165. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, and Minden MD. 2007. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* 21: 868-876.

166. Ye D, Xiong Y, and Guan KL. 2012. The mechanisms of IDH mutations in tumorigenesis. *Cell Res.*

167. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan KL, and Xiong Y. 2009. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science* 324: 261-265.

7. Anhang

Tabelle 34. Synopsis ausgewählter Studien zur Inzidenz der *IDH1* und *IDH2* Mutationen bei unselektierter AML

Studie	Untersuchte Patienten, n	Inzidenz der <i>IDH1</i> Mutationen, %	Inzidenz der <i>IDH2</i> Mutationen, %	Medianes Alter, Jahre <i>IDH1/2</i> mutiert	Medianes Alter, Jahre <i>IDH1/2</i> wildtyp
Mardis et al. 2009	188	8	0	49	46
Paschka et al. 2010	805	7,6	8,7	51	47
Schnittger et al. 2010	1414	6,6	Nicht untersucht	67	66
Abbas et al. 2010	893	6	11	50	45
Chou et al. 2010	493	5,5	Nicht untersucht	k.A.	k.A.
Ho et al. 2010	257	0	Nicht untersucht	k.A.	10
Shen et al. 2011	1185	9,3	9,8	k.A.	k.A.
Ravandi et al. 2012	170	7	14	53 (<i>IDH1</i> R132); 56 (<i>IDH2</i> R172 & R140)	53

Disser- tation Madar 2016	920	6,3	10,2	51	49
--	-----	-----	------	----	----

Abkürzungen: *IDH1/2*: Isocitrat-Dehydrogenase 1/2; AML: akute myeloische Leukämie; k.A.: keine Angaben; n: Anzahl der untersuchten Patienten.

Tabelle 35. Synopsis ausgewählter Studien zur Inzidenz der *IDH1/2* Mutationen bei CN-AML Patienten.

Studie	Untersuchte Patienten, n	Inzidenz der <i>IDH1</i> Mutation, %	Inzidenz der <i>IDH2</i> Mutation, %	Medianes Alter, Jahre <i>IDH1/2</i> mutiert	Medianes Alter, Jahre <i>IDH1/2</i> wildtyp
Marcucci et al. 2010	358	14	19	62 (<i>IDH1</i> R132); 64 (<i>IDH2</i> R140); 70 (<i>IDH2</i> R172)	60
Boissel et al. 2010	213 (<i>IDH1</i>); 205 (<i>IDH2</i>)	16	6	54 (<i>IDH1</i>) 57 (<i>IDH2</i>)	48
Thol et al. 2010	272	Nicht unter- sucht	12	k.A.	k.A.
Ravandi et al. 2012	104	11	17	53 (<i>IDH1</i> R132); 56 (<i>IDH2</i> R172 & R140)	53
Disser- tation Madar 2016	427	10	14	51	49

Abkürzungen: *IDH1/2*: Isocitrat-Dehydrogenase 1/2; AML: akute myeloische Leukämie; CN: zytogenetisch normal; k.A.: keine Angaben; n: Anzahl der untersuchten Patienten.

Tabelle 36. Synopsis über die größeren AML Studien zu den klinischen Charakteristika der *IDH1/2* Mutationen.

Studie	<i>IDH1/2</i> Mutationsstatus	Anzahl der untersuchten Patienten, n	Leuko- zytenzahl, x10 ⁹ /L (Median)	Thrombo- zytenzahl, x10 ⁹ /L (Median)	Blasten im Knochen- mark, Median in %	Blasten im peripher- en Blut, Median in %
Paschka et al. 2010	<i>IDH</i> -WT	607	11,3	68	74	40
	<i>IDH1/2</i> - MUT	128	14,9	51	80	41
Marcucci et al. 2010	<i>IDH</i> -WT	240	28	53	63	50
	<i>IDH1</i> -MUT	49	25	98	73	59
	<i>IDH2</i> R140- MUT	56	22,5	73	74	45
	<i>IDH2</i> R172- MUT	13	1,5	131	66	7
Boissel et al. 2010	<i>IDH1</i> -WT	179	12	k.A.	k.A.	k.A.
	<i>IDH1</i> -MUT	34	20			
	<i>IDH2</i> -WT	193	12			
	<i>IDH2</i> -MUT	12	3			
Abbas et al. 2010	<i>IDH</i> -WT	743	46	83	k.A.	k.A.
	<i>IDH1</i> -MUT	55	48	131		
	<i>IDH2</i> -MUT	97	42	104		

Abkürzungen: *IDH1/2*: Isocitrat-Dehydrogenase 1/2; WT: Wildtyp; MUT: Mutation; k.A.: keine Angaben; n: Anzahl der untersuchten Patienten.

Tabelle 37. Synopsis über die größeren AML Studien zur Assoziation von *IDH1/2* Mutationen mit anderen molekularen Alterationen.

Studie	<i>IDH1/2</i> Status	Patienten, n	<i>NPM1</i> Mutation, %	<i>FLT3</i> -ITD Mutation, %	<i>CEBPA</i> Mutation, %
Paschka et al. 2010	<i>IDH</i> -WT	607	26	22	12
	<i>IDH1/2</i> -MUT	128	42	15	7
Marcucci et al. 2010	<i>IDH</i> -WT	240	60	38	18
	<i>IDH1</i> -MUT	49	71	20	6
	<i>IDH2</i> R140-MUT	56	57	27	9
	<i>IDH2</i> R172-MUT	13	0	0	0
Boissel et al. 2010	<i>IDH1</i> -WT	179	37	20	13
	<i>IDH1</i> -MUT	34	62	18	0
	<i>IDH2</i> -WT	193	43	22	11
	<i>IDH2</i> -MUT	12	0	0	0

Abkürzungen: *IDH1/2*: Isocitrat-Dehydrogenase 1/2; WT: Wildtyp; MUT: Mutation; *CEBPA*: CCAAT/enhancer binding protein alpha; *NPM1*: Nucleophosmin 1; *FLT3*: Fms-related tyrosinkinase 3; ITD: interne Tandemduplikation; n: Anzahl der untersuchten Patienten.

8. Danksagung

Herrn Professor Dr. Hartmut Döhner möchte ich dafür danken, dass ich meine Promotionsarbeit in seiner Abteilung durchführen durfte.

Ebenso danke ich Frau Professor Dr. Konstanze Döhner für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die wissenschaftliche Betreuung meiner Promotionsarbeit und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Peter Paschka für die gute Betreuung zu jedem Zeitpunkt. Ich möchte mich insbesondere dafür bedanken, dass ich mich mit allen Fragen zu jedem Zeitpunkt an ihn wenden durfte, für die Korrekturen meiner Arbeit und die konstruktive Kritik. Vielen Dank für jedes Gespräch und die immer freundliche, professionelle und hilfsbereite Unterstützung.

Zudem möchte ich allen Mitarbeiterinnen des Labors für zytogenetische und molekulare Diagnostik der Medizinischen Klinik III danken. Diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen, weshalb ich mich bei allen herzlich bedanken will.

Insbesondere Anja Stölzle danke ich für die unermüdliche und professionelle Einführung, während der sie mir mit viel Geduld das Arbeiten im Labor mit allen Abläufen erklärte.

Ich möchte mich weiterhin bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben: Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichte und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite stand.

Zu guter Letzt danke ich meinem Freund Christian Birkel, der mich immer wieder bestärkt und wenn nötig wieder aufgebaut und motiviert hat.

9. Lebenslauf

Angelika Madar

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 16.03.1988
Geburtsort: Wien
Staatsangehörigkeit: Österreich

Schulbildung

09/1994 – 07/1998 Grundschole, 1140 Wien
09/1998 – 06/2006 Gymnasium BRG14, 1140 Wien

Studium

10/2006 – 07/2007 Studium der Kultur- und Sozialanthropologie und
Spanisch an der Universität Wien
10/2007 – 08/2009 vorklinischer Abschnitt Studium der Humanmedizin an
der Universität Ulm
08/2009 erfolgreicher Abschluss 1. Staatsexamen
10/2009 – 10/2013 klinischer Abschnitt Studium der Humanmedizin an
der Universität Ulm
11/2013 erfolgreicher Abschluss 2. Staatsexamen

Praktische Erfahrung

2007/2008 Dreimonatiges Pflegepraktikum (Innere und
Chirurgie), St. Josef Krankenhaus, 1140 Wien

Famulaturen

03/2010 Praxis Dr. Birkel, Internist, Mengen
08/2010 Kardiologie, St. Josef Krankenhaus, Wien
09/2011 Gynäkologie, Universitätsklinikum Ulm

03/2012	Psychiatrie und Psychosomatik, Otto Wagner Spital, Wien
Praktisches Jahr	
08/2012 – 10/2012	Chirurgie, Nepean Hospital Sydney, Australien (Viszeralchirurgie, Handchirurgie)
10/2012 – 12/2012	Chirurgie, Universitätsklinikum Ulm (Unfallchirurgie)
12/2012 – 04/2013	Innere Medizin, Universitätsklinikum Ulm (Notaufnahme/IMC-Station)
04/2013 – 07/2013	Dermatologie und Allergologie, Universitätsklinikum Ulm
Klinische Erfahrung	
04/2014 bis 06/2015	Assistenzärztin in der Kardiologie, Innere Medizin II, Universitätsklinikum Ulm
07/2015 bis 06/2016	Assistenzärztin in der Dermatologie und Allergologie, Universitätsklinikum Ulm
08/2016 bis 03/2018	Assistenzärztin in der Kardiologie, Klinikum Memmingen
Seit 05/2018	Weiterbildungsassistentin für Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. Andreas Tosch, Ulm
Sprachkenntnisse	
Englisch: sehr gut in Wort und Schrift	
01/2005 – 07/2005	Auslandsaufenthalt in den USA, Highschool
Spanisch: Grundkenntnisse	
Latein	