

Molekulárně genetické vyšetření u akutní myeloidní leukemie

Molecular Genetic Testing for Acute Myeloid Leukemia

Janečková V., Semerád L., Ježíšková I., Dvořáková D., Čulen M., Šustková Z., Mayer J., Ráčil Z.

Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

Souhrn

Východiska: Akutní myeloidní leukemie (AML) je klinicky i molekulárně značně heterogenní onemocnění. Standardně používané konvenční cytogenetické vyšetření a vyšetření FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) přinášejí významnou informaci o biologické i klinické povaze onemocnění a umožňují rozdělení AML pacientů do tří rizikových skupin. Stanovení prognózy však stále zůstává složité u cca 50 % nemocných s AML, kteří mají normální cytogenetický nále. V poslední dekádě byla u nemocných s cytogeneticky normální AML objevena celá řada rekurentních mutací genů, u kterých byl následně prokázán jejich vliv na prognózu. Objev těchto mutací byl umožněn rychlým vývojem molekulárně biologických metod, zejména metod sekvenování nové generace. Kromě prognostického významu je možné v některých případech využít genové mutace při monitoraci minimální reziduální nemoci v průběhu a po ukončení léčby AML a představují také potenciál pro vývoj nové cílené léčby. Důležitost vyšetření genových mutací u nemocných s cytogeneticky normální AML potvrzuje fakt, že WHO klasifikace AML zařadila od roku 2008 přítomnost genových mutací u cytogeneticky normální AML do definice několika samostatných jednotek. **Cíl:** V této práci přinášíme přehled nejvýznamnějších mutací genů, které prokazujeme u nemocných s cytogeneticky normální AML, popisujeme jejich význam pro prognózu nemocných, jejich význam při sledování minimální reziduální nemoci a jejich potenciál pro vývoj nové cílené léčby. Dále je stručně popsán význam akumulace genových mutací při klonálním vývoji onemocnění a zásadní vliv tohoto fenoménu při relapsu AML.

Klíčová slova

akutní myeloidní leukemie – genetika – mutace – prognóza – minimální reziduální nemoc – klonální vývoj

Summary

Background: Acute myeloid leukemia (AML) is a clinically complex and very heterogeneous disease at the molecular level. Conventional cytogenetic analysis and FISH (fluorescence *in situ* hybridization) tests provide important information about the biological and clinical background of the disease and enable the classification of AML patients into three risk groups. However, up to half of patients have normal cytogenetics. Determining prognosis and treatment strategies in this group of patients is challenging. The development of molecular genetic methods, including next generation sequencing in the last decade, has led to the discovery of a number of recurrent mutations that have contributed to increasing the accuracy of prognosis of those patients with cytogenetically normal AML. Besides the prognostic value of these mutations, they may also be used to monitor minimal residual disease during and after treatment of AML and additionally constitute potential targets for the development of new therapeutic agents. The importance of molecular genetic testing of all patients with AML is highlighted by the WHO classification of 2008 in which subgroups of AML are purely defined by molecular genetics markers. **Aim:** In this article, we provide an overview of the most significant mutations in patients with cytogenetically normal AML. We describe their significance for prognosis, their importance in monitoring minimal residual disease, and their potential for the development of new targeted therapies. Further, we briefly draw attention to the significance of gene mutation accumulation in clonal disease development and how it affects the time of AML relapse.

Key words

acute myeloid leukemia – genetics – mutation – prognosis – minimal residual disease – clonal evolution

Tato práce byla podpořena programovým projektem MZ ČR s reg. č. 15-25809A a z projektu Masarykovy univerzity, Brno MUNI/A/1028/2016.

This work was supported by the program project of the Czech Ministry of Health reg. No. 15-25809A and by the project of Masaryk University, Brno MUNI/A/1028/2016.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Lukáš Semerád
Interní hematologická
a onkologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: lukas.semerad@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 8. 9. 2016

Přijato/Accepted: 30. 9. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2016411>

Úvod

Akutní myeloidní leukemie (AML) je klonální onemocnění krvetvorby charakterizované přítomností proliferujících, abnormálně diferencovaných buněk hematopoetického systému v kostní dřeni, periferní krvi a případně extramedulárních tkáních.

Standardní diagnostické postupy pro klasifikaci AML v současné době zahrnují nejen morfologické hodnocení nátěru periferní krve i kostní dřeni a analýzu povrchových nebo cytoplazmatických markerů pomocí průtokové cytometrie, ale také identifikaci chromozomálních změn pomocí metod konvenční cytogenetiky nebo metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a vyšetření mutačního stavu vybraných molekulárních markerů.

Již od 90. let minulého století je známo, že cytogenetické aberace jsou spojeny s různým průběhem onemocnění. Na základě výsledků cytogenetického vyšetření byla v roce 1998 vytvořena první kategorizace AML do rizikových skupin dle Grimwade (tab. 1) [1]. Zařazení AML do rizikové skupiny má důležitý význam pro stanovení prognózy onemocnění a výběr vhodné léčebné strategie. Stanovení individuálního rizika onemocnění umožňuje vyčlenit skupinu nemocných s vysokým rizikem relapsu (RR) onemocnění, kteří benefitují z provedení alogenní transplantace v rámci 1. léčebné linie, a naopak skupinu nemocných s nízkým RR, u kterých alogenní transplantaci krvetvorby v rámci 1. léčebné linie standardně neprovádíme z důvodu vysoké

morbidity a mortality spojené s touto vysoce intenzivní léčebnou metodou. Z cytogenetických aberací hrají základní roli v leukemogenezi rekurentní chromozomální strukturální variace, např. t(15;17), t(8;21), inv(16), t(16;16), t(9;21), t(9;11), del5, del7, které jsou již zavedenými diagnostickými a prognostickými markery.

Problém pro stanovení prognózy představuje značně heterogenní skupina pacientů s cytogeneticky normální AML (CN-AML). Do této skupiny spadá 40–50 % pacientů. Je proto vyvíjena snaha o hledání dalších faktorů, které umožní lepší stratifikaci CN-AML a definují skupinu nemocných, kteří budou profitovat z intenzifikace terapie a provedení alogenní transplantace krvetvorných buněk v 1. léčebné linii. Kromě klinických prognostických faktorů, jako je přítomnost hyperleukocytózy či nedostatečná blastoredukce při časném hodnocení v průběhu první indukční terapie, hrají důležitou roli v prognostické stratifikaci molekulárně genetické markery.

Etiopatogenetickým podkladem pro vznik AML je kumulace mutací v genech, které hrají významnou roli v regulaci dělení a diferenciace hematopoetických buněk. Typ mutací a jejich komplexnost ovlivňuje klinický průběh onemocnění a odpověď na léčbu. Význam komplexnosti mutačního stavu hematopoetické buňky dokládají v recentní práci Wakita et al, kteří analyzovali přítomnost 28 různých mutací u 271 pacientů s AML v souvislosti s jejich prognózou [2]. Bylo pro-

kázáno, že u mladších nemocných ve středním cytogenetickém riziku je celkové přežití (overall survival – OS) významně sníženo v případě přítomnosti tří a více mutací genů (5leté OS 18,1 vs. 45,9 %; $p = 0,0006$), a to i ve skupině nemocných s *FLT3-ITD* negativitou (5leté OS 28,3 vs. 63,2 %; $p = 0,001$). Předpokládá se tedy, že vyšší počet mutací je znakem vysoké genetické nestability, která souvisí s horší odpovědí choroby na léčbu.

Význam molekulárně genetického vyšetření u nemocných s AML dokládá také ta skutečnost, že mutace v genech *NPM1* a *CEBPA* jsou od roku 2008 součástí klasifikace AML dle Světové zdravotnické organizace (WHO) [3] a spolu s mutacemi ve *FLT3* jsou začleněny do prognostické klasifikace AML dle European LeukemiaNet (ELN) z roku 2010 (tab. 2) [4]. Při recentní revizi WHO klasifikace v roce 2016 byla přidána rovněž provizorní kategorie AML s mutací v genu *RUNX1* [5].

Díky značnému poklesu ceny a automatizaci většiny kroků analytického postupu se široce rozšířily ve výzkumných i rutinně diagnostických laboratořích nové genomické metodické přístupy založené zejména na sekvenování nové generace. V rámci rozvoje celogenomového sekvenování byly v posledním desetiletí zjištěny další rekurentní somatické mutace, jejichž prognostický význam je intenzivně studován. Velkým přínosem je naprosto nový pohled na spektrum a frekvenci mutací, jejich kooperaci nebo vzájemnou vylučnost. Umožňují navíc sledovat skladbu buněčných subklonů a klonální evoluci v průběhu onemocnění.

Genomický pohled na AML

Leukemogeneze AML je víceokrový proces, který vyžaduje spolupráci nejméně dvou tříd mutací [6,7]. Mutace třídy I aktivují dráhy signální transdukce a dávají proliferační výhodu hematopoetickým buňkám (např. mutace vedoucí k aktivaci tyrozinkinázových receptorů FLT3, c-kit a Ras), mutace třídy II ovlivňují transkripční faktory a poškozují hematopoetickou diferenciaci (např. rekurentní chromozomální aberace t(8;21), inv(16), t(15;17), které generují fúzní transkripty *RUNX1T1*, *CBFB/MYH11* a *PML/RARA*, a rovněž mutace v genech *RUNX1*, *CEBPA* a *MLL*).

Tab. 1. Cytogenetické riziko dle Grimwade et al (1998) [1].

Riziková skupina	Cytogenetická abnormalita
nízké riziko	t(8,21)
	t(15,17)
	inv(16)
střední riziko	normální cytogenetika
	+8, +21, +22, del(7q), del(9q)
	abnormality 11q23
	další strukturální či numerické změny
vysoké riziko	-5, -7, del(5q), abnormality 3q
	komplexní změny

Konsekvence mutací v dalších genech asociovaných s AML jako *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *ASXL1* nejsou dosud známy. Bývají nalezeny obvykle u CN-AML (tab. 3).

Klonální evoluce u AML

Celogenomové sekvenování u pacientů s AML ukázalo, že klonálně odvozená hematopoetická buňka akumuluje obrovský počet mutací v závislosti na věku, avšak naprostou většinu těchto mutací lze považovat za náhodné benigní události. Tyto mutace byly tedy zřejmě přítomny již v hematopoetické buňce, která byla transformována iniciující (driver) mutací [8]. Mnohé studie prokazují, že většina případů AML je charakterizována klonální heterogenitou v době diagnózy, s přítomností jak zakládajícího klonu, tak alespoň jednoho subklonu [9]. Byla publikována různá schémata klonální evoluce, která se mohou skrývat za relapsem onemocnění a být příčinou jeho rezistence [10–13]. Základní model uvádí dvě možné situace: 1. zakládající klon získává mutace a vyvíjí se v relabující klon; 2. subklony s různými mutacemi se vyskytují mezi zakládajícími klony a jeden ze subklonů z této populace expanduje v relaps [10]. U pacientů v morfologické remisi může pokračovat klonální hematopoéza těch klonálních populací, které jsou blíže příbuzné klonu zakládajícímu. Zároveň však byla pozorována expanze hematopoetické populace, která nebyla příbuzná s iniciální AML, ale nesla mutace v genech často mutovaných u AML a myelodysplastického syndromu (MDS). Tyto mutace bylo možné detekovat ve velmi nízkých frekvencích již v době diagnózy AML. Výsledky podporují hypotézu, že neleukemické hematopoetické kmenové a progenitorové buňky, které nesou určité mutace, mohou získat kompetitivní výhodu díky perzistenci těchto mutací během i po ukončení indukční chemoterapie [14]. Cytoredukční chemoterapie tak působí selekčním tlakem na leukemickou i neleukemickou hematopoetickou populaci [10,15].

V rámci Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network byly analyzovány genomy 200 pacientů a téměř v každém vzorku byla nalezena jedna potenciální

Tab. 2. Cytogeneticko-molekulární riziko dle ELN 2010.

Riziková skupina dle ELN 2010	Cytogenetické/molekulární genetické nálezy
nízké riziko	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> mutace <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> (normální karyotyp) mutace <i>CEBPA</i> (normální karyotyp)
střední riziko I	mutace <i>NPM1</i> a <i>FLT3-ITD</i> (normální karyotyp) wt <i>NPM1</i> a <i>FLT3-ITD</i> (normální karyotyp) wt <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> (normální karyotyp)
střední riziko II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i> ostatní strukturální či numerické změny karyotypu
vysoké riziko	inv(3)(q21q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EV11</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> přestavby -5 nebo del(5q); -7; abn(17p); komplexní změny

ELN – European LeukemiaNet

Tab. 3. Prognostický význam mutací u CN-AML.

Mutace	Incidence AML	Incidence CN-AML	Prognóza
<i>NPM1</i>	25–35 %	45–60 %	příznivá (platí pouze pokud <i>FLT3</i> -)
<i>FLT3-ITD</i>	~20 %	28–34 %	nepříznivá (alelický poměr < 0,5 = nepříznivá, pouze pokud <i>NPM1</i> -)
<i>DNMT3A</i>	18–22 %	30–37 %	nepříznivá
<i>IDH1</i> , <i>IDH2</i>	15–20 %	25–30 %	nejistá (nepříznivá u <i>IDH2 R172</i>)
<i>TET2</i>	~13 %	9–23 %	nejistá (nepříznivá u <i>FLT3</i> + nebo <i>NPM1</i> -)
<i>ASXL1</i>	5–11 %	5–12 %	nepříznivá
bialelická mutace <i>CEBPA</i>	10 %	10 %	příznivá (nepříznivá u mutace pouze v jedné alele)

CN-AML – cytogeneticky normální AML

driver mutace, která poskytuje hematopoetické progenitorové buňce růstovou výhodu vedoucí ke klonální expanzi [9]. Signifikantně mutované geny, které jsou relevantní pro patogenezi, byly organizovány do devíti funkčních kategorií – fúze transkripčních faktorů (18 % případů),

NPM1 (27 %), tumor-supresorové geny (16 %), geny vztahující se k DNA metylaci (44 %), signální geny (59 %), geny modifikující chromatin (30 %), geny pro myeloidní transkripční faktory (22 %), geny pro koheziový komplex (13 %) a geny pro komplex spliceozomu (14 %). Systém

Tab. 4. Indikace k provedení alogenní HSCT v 1. léčebné linii.

	5leté RR s alogenní HSCT	5leté RR bez alogenní HSCT	p	Indikace k alogenní HSCT v 1. léčebné linii
<i>NPM1+</i>/<i>FLT3-ITD-</i>	35 ± 7 %	20 ± 11 %	0,49	ne
<i>NPM1+</i>/<i>FLT-ITD+</i> (nízký alelický poměr < 0,5)	22 ± 15 %	19 ± 20 %	0,566	ne
<i>NPM1+</i>/<i>FLT3-ITD+</i> (vysoký alelický poměr > 0,5)	20 ± 13 %	80 ± 9 %	0,014	ano
<i>NPM1-</i>/<i>FLT3-</i> (bez přítomnosti bíaleické mutace <i>CEBPA</i>)	25 ± 10 %	45 ± 7 %	0,08	ano
<i>NPM1-</i>/<i>FLT3+</i> (nízký i vysoký alelický poměr)	42 ± 14 %	100 %	0,00016	ano

HSCT – transplantace krvetvorné tkáně, RR – riziko relapsu

vzájemné spolupráce a vylučnosti mezi mutačními událostmi v těchto genech pak pravděpodobně přispívá k patogenезi AML u konkrétního pacienta.

Sekvenování nové generace a prognostická klasifikace CN AML

Nejvýznamnějším prognostickým parametrem byly dosud rekurentní cytogenetické aberace [16]. Předmětem intenzivního výzkumu je nyní hodnocení molekulárně genetických lézí jako prognostických a prediktivních markerů [17–19]. V současné době jsou na základě doporučení ELN v klinické praxi používány tři molekulární markery (*NPM1*, *CEBPA* a *FLT3-ITD*) [4]. V budoucnu je očekáváno zařazení dalších markerů (např. *RUNX1*, *ASXL1* a *TP53*), které byly opakovaně asociovány s horší prognózou, přičemž prognostický význam dalších často mutovaných genů (např. *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*) je stále nejasný.

FLT3

FLT3 je buněčný receptor s tyrozinázovou aktivitou patřící do stejné skupiny receptorů jako je *c-kit* nebo *PDGF-R*. *FLT3* protein hraje důležitou roli v dělení a diferenciaci myeloidních buněk. Nejčastější mutací genu *FLT3* je interní tandemová duplikace (*FLT3-ITD*), která je prokazována u 20–30 % případů AML [20,21]. Mutace vede k trvalé aktivaci kinázové domény *FLT3* receptoru a následně poruše diferenciaci myeloid-

ních buněk a jejich leukemické transformaci. Druhou méně častou mutací genu *FLT3* je bodová mutace v aktivaci smyčce druhé tyrozinázové domény (*FLT3-TKD*). Tato mutace je prokazována u 5–8 % případů AML [6,22,23]. Obě tyto mutace v genu pro *FLT3* jsou asociovány s vyšším počtem leukocytů, nižším počtem trombocytů a vyšším zastoupením blastů v kostní dřeni v době diagnózy. Relativně častěji je mutovaný gen *FLT3* prokazován u akutní monocytární leukemie (AML FAB M5), a to cca ve 40 % případů. Častěji je přítomen u CN-AML ve srovnání s AML s cytogenetickou abnormalitou [22]. Mutace *FLT3-ITD* je také často asociována s *t(6;9)* (88–90 %) a *MLL-PTD*. Kooperativní mutace byly nalezeny také u *FLT3-TKD* a *CBFB/MYH1* [7].

Mutace v genu *FLT3* mají jasně prokázaný negativní prognostický význam. Pravděpodobnost dosažení kompletní remise (complete remission – CR) onemocnění po indukční terapii není sice mutací *FLT3* ovlivněna, četnost CR u mladších nemocných je v případě *FLT-ITD* negativity 66,8 % a v případě *FLT3-ITD* pozitivity 71,2 %. Mutace *FLT3* jsou však spojeny s významně vyšším RR onemocnění. OS pacientů s CN-AML s mutací *FLT3-ITD* nebo *TKD* je tak horší oproti nemocným bez přítomnosti těchto mutací. Na OS nemocných má kromě samotné přítomnosti mutace *FLT3* vliv alelický poměr *FLT3* mutovaného/nemutovaného genu (*FLT3* mutant/wt). Bylo prokázáno, že nemocní s mutací *NPM1* a současnou mu-

tací *FLT3* s nízkým alelickým poměrem *FLT3* mutant/wt mají stejně dobrou prognózu jako nízké rizikové CN-AML nemocní s mutací *NPM1* bez mutace *FLT3* (5leté OS 47 ± 10 vs. 56 ± 5 %; p = nonsignifikantní). Oproti tomu nemocní s mutací *NPM1* a vysokým alelickým poměrem *FLT3* mutant/wt mají OS významně zkrácené (5leté OS 29 ± 7 vs. 56 ± 5 %; p = 0,017). Prognóza pacientů s nízkým alelickým poměrem *FLT3* mutant/wt a nemutovaným genem *NPM1* je spojena s vyšší pravděpodobností relapsu onemocnění a horším OS (5leté RR 74 ± 20 vs. 48 ± 6 %; p = 0,017; 5leté OS 20 ± 12 vs. 39 ± 6 %; p = 0,014) [24].

Provedení alogenní transplantace krvetvorné tkáně (hematopoietic stem cell transplantation – HSCT) v rámci 1. léčebné linie snižuje RR onemocnění a vede k prodloužení OS u nemocných s mutací *NPM1* a vysokým alelickým poměrem *FLT3* mutant/wt (5leté RR 20 ± 13 vs. 80 ± 9 %; p = 0,014; 5leté OS 22 ± 10 vs. 70 ± 14 %; p = 0,03) (tab. 4). Naopak z provedení alogenní HSCT v 1. CR nebenefitují pacienti s mutací *NPM1* bez mutace *FLT3* (5leté RR 35 ± 7 vs. 20 ± 11 %; p = 0,49; 5leté OS 64 ± 7 vs. 79 ± 11 %; p = 0,296) a také nemocní s mutací *NPM1* s nízkým alelickým poměrem *FLT3* mutant/wt (5leté RR 22 ± 15 vs. 19 ± 20 %; p = 0,566; 5leté OS 67 ± 16 vs. 56 ± 17 %; p = 0,873). Pacienti s cytogeneticky normální AML bez přítomnosti mutace *NPM1* obecně profitují z provedení alogenní HSCT v rámci 1. lé-

čebné linie. Alogenní HSCT snižuje 5leté RR u pacientů s *NPM1* wt a *FLT3-ITD* (5leté RR 42 ± 14 vs. 100 %; $p = 0,00016$) a také u pacientů s *NPM1* wt a *FLT3* wt (5leté RR 25 ± 10 vs. 45 ± 7 %; $p = 0,08$) [24].

FLT3-ITD je nestabilní prognostický marker – až u 30 % pacientů, kteří nesli tuto mutaci při diagnóze choroby, byla pozorována ztráta nebo změna počtu tandemových duplikací v době relapsu [24].

NPM1

Nukleofosmin je fosfoprotein, který plní úlohu molekulárního chaperonu a transportního proteinu. NPM1 se uplatňuje v různých buněčných procesech – při biogenezi ribozomů, zdvojení centrozomu, reparaci DNA a odpovědi na buněčný stres, ovlivňuje funkci p53 a p19. *NPM1* wt chrání hematopoetické buňky před apoptotickými účinky p53 v podmínkách buněčného stresu. Existuje více než 40 různých variant mutací, přičemž nejčastější je inserce 4 bp v exonu 12 způsobující aberantní delokalizaci proteinu z jádra do cytoplazmy. Buňky jsou následně citlivější k buněčnému stresu vyvolanému chemoterapií, což znamená lepší prognózu [25].

Mutace *NPM1* je nejčastější mutací u pacientů s AML (25–30 %) a je prokazována cca u 45–60 % pacientů s CN-AML mladších 60 let [26]. Nemocní s CN-AML a mutací *NPM1* bez přítomnosti jiné mutace lépe odpovídají na indukční chemoterapii a mají významně nižší RR onemocnění po ukončení léčby. Nejlepší léčebná odpověď na indukční terapii byla u nemocných s mutací *NPM1* a nemutovaným *FLT3* (86 %), následovala skupina nemocných s nemutovaným *NPM1* a mutací *FLT3-ITD* (76 %), ve skupině s nemutovaným *NPM1* i *FLT3* byla odpověď na indukci 68,5 % a nejnižší pravděpodobnost dosažení CR onemocnění po indukci byla pozorována ve skupině se současnou mutací *NPM1* a *FLT3-ITD* (63 %) [27,28]. Na základě těchto poznatků současná prognostická klasifikace dle ELN z roku 2010 zařazuje CN-AML s mutací *NPM1* bez mutace *FLT3* či *DNMT3A* do nízké rizikové skupiny, u které není v rámci 1. léčebné linie doporučeno provedení alogenní transplantace krvetvorných buněk [4].

CEBPA

Gen *CEBPA* kóduje myeloidní transkripční faktor. Je mutovaný u přibližně 10 % CN-AML a může se vyskytnout také současně s chromozomálními aberacemi, např. del(9q) a vzájemně se vylučují s balancovanými chromozomálními přestavbami [29]. V genu *CEBPA* se u AML vyskytují zejména dva typy mutací – 33 bp inserce na C-konci, která zasahuje oblast, které se podílí na dimerizaci proteinu a jeho vazbě na DNA, a frameshift delece na N-konci s důsledkem zkrácené formy proteinu [30]. Výskyt obou těchto mutací v bialelické formě se vyskytuje u více než poloviny pacientů s prokázanou mutací *CEBPB* a slouží jako příznivý prognostický faktor s nevýznamně delším OS a významně nižším výskytem relapsu. Pouze jedna mutace je přitom spojována s horší prognózou. Tento biologický paradox dosud nebyl zcela objasněn [31,32].

Mutace v epigenetických regulátorech

Epigenetické regulátory zodpovídají za regulaci transkripce prostřednictvím dvou hlavních mechanismů – metylace DNA (enzymy kódované geny *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* a *TET2*) a modifikace histonů (*ASXL1*). Výsledky studií zabývajících se klonální evolucí podporují hypotézu, že mutace v genech, které jsou zahrnuty v epigenetické regulaci (tj. *DNMT3A*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* a *TET2*), jsou přítomny již v preleukemické hematopoetické kmenové buňce a objevují se velmi časně ve vývoji AML [10,11,33]. Tyto původní preleukemické kmenové buňky jsou schopny diferenciace do více linií, dokáží přežít chemoterapii a expandovat během remise až k rozvoji potenciálního relapsu. Současné studie ukazují, že klonální hematopoéza se somatickými mutacemi, obvykle v genech *DNMT3A*, *TET2* a *ASXL1*, vzrůstá spolu s věkem a je asociována se zvýšeným rizikem rozvoje hematologické malignity [34]. Prognostický význam těchto mutací však nebyl jednoznačně stanoven.

DNMT3A

DNMT3A patří mezi DNA metyltransferázy, které katalyzují adici metylové skupiny na cytozinové zbytky CpG dinukleotidů. Funkční experimenty ukazují, že

ztráta *DNMT3A* (DNA metyltransferáza 3 alfa) poškozuje diferenciaci hematopoetických buněk a působí zvýšenou akumulací těchto buněk v kostní dřeni [35]. Mutace v *DNMT3A* nejčastěji (60–64 %) postihují arginin R882 a způsobují redukcovanou aktivitu enzymu způsobující globální hypometylacii [36,37]. Ostatní méně časté mutace se nacházejí po celém genu, především v exonech 13–23. Zahrnují missense, nonsense, frameshift a mutace měnící místo sestřihu a jsou obvykle heterozygotní. Různé typy mutací mohou mít různý dopad na funkci enzymu. Delece *DNMT3A* v myších modelech vede k inhibici diferenciace hematopoetických kmenových buněk, avšak samotný deficit tohoto genu nevede ke vzniku AML. Zdá se tedy, že pro vznik AML je nutný vznik další tzv. driving mutace v jiných genech.

Mutace v genu *DNMT3A* jsou prokazovány u 17–20 % nemocných s AML, ve skupině pacientů s normálním cytogenetickým nálezem je prokazována až ve 27–30 % případů [38–40]. Jedná se tak o třetí nejčastější prokazovanou mutaci u nemocných s AML. Mutace *DNMT3A* je spojena s vyšším věkem nemocných, vyšším počtem leukocytů a krevních destiček v periferní krvi v době diagnózy. Významně častěji je prokazována u nemocných se současnou mutací genu *NPM1*, *IDH1/2* nebo mutací *FLT3-ITD*. Asociace mutace *DNMT3A* je silná zejména v případech mutace *NPM1*, až 80 % pacientů s mutací *DNMT3A* má současně přítomnou mutaci *NPM1*.

Z hlediska prognostického významu mutace *DNMT3A* jsou výsledky jednotlivých klinických studií diskrepantní. V původní práci Thol et al z roku 2011 bylo prokázáno signifikantně horší přežití nemocných s mutací *DNMT3A* a současnou mutací *NPM1* a *FLT3-ITD* oproti těmto pacientům s nemutovaným genem *DNMT3A* (medián OS 12,3 vs. 41,1 měsíce; $p < 0,0001$) [38,39]. Ve stejné práci však nebyl prokázán vliv mutace *DNMT3A* na OS nízké rizikových pacientů s mutací *NPM1* bez *FLT3-ITD*. Tyto výsledky nekorelují s dosud nejrozsáhlejší prací Gaidzik et al, ve které vliv mutace na OS a dobu do relapsu u CN-AML prokázán nebyl [41]. Gale et al vysvětlují diskrepantní výsledky tzv. Simpsonovým paradoxem, který je dán

vysokou koincidenci mutace *DNMT3A* s prognosticky příznivou mutací *NPM1* [37]. Aby mohl být tedy ukázán negativní prognostický význam mutace *DNMT3A*, musí být výsledky stratifikovány podle *NPM1* genotypu. Pokud hodnotíme skupinu CN-AML pacientů jako celek, nebyl prokázán vliv mutace *DNMT3A* na OS pacientů ($p = 0,7$). Pokud rozdělíme nemocné na dvě skupiny podle přítomnosti či nepřítomnosti mutace *NPM1*, byl v obou těchto skupinách prokázán negativní prognostický vliv mutace *DNMT3A* na OS nemocných. Mutace *DNMT3A* je tedy obecně považována za negativní prognostický marker u nemocných s AML.

V rámci optimalizace dávek daunorubicinu u standardní indukční terapie 3 + 7 bylo prokázáno, že nemocní s mutací *DNMT3A* výrazně více profitují z podání vyšší dávky daunorubicinu oproti jiným geneticky definovaným skupinám [38,39].

IDH1, IDH2

IDH1 a *IDH2* kódují NADP-dependentní izocitrát-dehydrogenázy, které katalyzují oxidativní dekarboxylaci izocitrátu na 2-oxoglutarát v citrátovém cyklu. Mutace v *IDH1* a *IDH2* jsou hemizygotní, způsobující v *IDH1* záměnu argininu R132 a v *IDH2* argininu R172 nebo R140 [42]. Nové mutace byly nalezeny pomocí masivního paralelního sekvenování zejména u CN-AML jak v *IDH1* [43], tak *IDH2* [44]. *IDH1* a *IDH2* se uplatňují především v buněčném metabolismu a syntéze lipidů, v ochraně buňky před oxidativním stresem [45]. *IDH1* a *IDH2* způsobují aberantní hypermetylaci a potvrdila se vzájemná vylučnost mutací v *IDH1* a *IDH2* a v *TET2* [46,47].

Mutace genů *IDH1* a *IDH2* byla prokázána u 7,6, resp. u 8,7 % nemocných s AML [42]. Je asociována s vyšším věkem nemocných ($p = 0,002$), s nižším počtem leukocytů ($p = 0,04$) a vyšším počtem trombocytů v době diagnózy ($p = 0,007$). Mutace *IDH1* a *IDH2* je častěji prokazována u nemocných s CN-AML, zejména u nemocných s mutovaným *NPM1* bez *FLT3-ITD* ($p < 0,001$). Asociace s mutací *NPM1* neplatí pro mutaci *IDH2* v kodonu 172. Mutovaný *IDH1* zároveň silně asociuje s *MLL-PTD* [48].

Význam mutace *IDH1* a *IDH2* pro určení prognózy není zcela jasně defino-

ván, výsledky jednotlivých prací se liší. Paschka et al ve své práci neprokazují vliv mutace na dosažení remise onemocnění po indukční terapii [42]. Negativní vliv mutace *IDH1* a *IDH2* na OS byl v jeho práci prokázán pouze ve skupině nemocných s CN-AML s mutovaným *NPM1* bez mutace *FLT3-ITD* (5leté OS 41 vs. 65 %; $p = 0,03$). Pokud hodnotíme skupinu nemocných s CN-AML jako celek, nebyl vliv mutace *IDH1* a *IDH2* na OS nemocných prokázán. Patel et al naopak u nemocných s AML ve středním cytogenetickém riziku prokázali významně lepší 3leté OS nemocných, kteří byli nositeli mutace *NPM1* a současně mutace *IDH1* a *IDH2*, ve srovnání s nemocnými, kteří měli mutovaný pouze *NPM1* bez *IDH1* a *IDH2* (3leté OS 89 vs. 31 %; $p < 0,001$) [49]. V tomto srovnání však nebyl brán v potaz negativní vliv mutace *FLT3-ITD* na OS nemocných. Analýza jednotlivých geneticky definovaných podskupin v práci Patel et al potvrdila negativní prognostický význam mutace *IDH2* v kodonu 172 na OS nemocných ve středním riziku, což je pravděpodobně dáno malou asociací této konkrétní mutace s mutací genu *NPM1*.

TET2

Enzym *TET2* je dioxygenáza, která dokáže konvertovat 5-metylcytozin (5-mC) na 5-hydroxymetylcytozin (5-hmC), který je meziproduktem DNA demethylace [50]. Pacienti nesoucí mutaci v *TET2* jsou tedy charakterizováni hypermetylevaným fenotypem s místně specifickou metylací cytozinu cílových genů a zároveň poklesem 5-hmC. Pokles 5-hmC je tedy pravděpodobně průvodním jevem stárnutí hematopoetického systému, na němž se podílí právě mutace v *TET2*. Ztráta *TET2* vyvolává vzrůstající sebeobnovu hematopoetických kmenových buněk a kompetitivní růstovou výhodu [51].

Mutace genu *TET2* jsou prokazovány v 7–13 % případů AML. Tato mutace je asociována s vyšším věkem nemocných, vyšším počtem leukocytů a nižším počtem trombocytů v době diagnózy. Častěji je také prokazována u nemocných s mutací *NPM1*, *CEPBA* a *ASXL1* [46]. Naopak mutace *TET2* není téměř nikdy prokazována u nemocných s mutovanými *IDH1/2*.

Prognostický vliv mutace *TET2* je nejasný. Chou et al prokázali negativní prognostický význam a horší OS nemocných s mutací *TET2* ve středním cytogenetickém riziku (medián OS – medián OS nebyl dosažen vs. 14,7 měsíce; $p = 0,021$) [52]. Silná asociace mutace *TET2* s horším OS byla pozorována zejména ve skupině pacientů s *FLT3-ITD* pozitivitou (medián OS 5,0 vs. 16,9 měsíce; $p = 0,001$) a ve skupině pacientů s nemutovaným *NPM1* (medián OS 12,3 vs. 61,0 měsíce; $p = 0,055$). Tyto výsledky však nebyly potvrzeny v práci Gaidzik et al, která neprokázala žádný vliv mutace *TET2* na OS nemocných s AML, a to ani ve skupině nemocných ve středním cytogenetickém riziku či s normálním cytogenetickým nálezem [53]. Do této práce však byli zahrnuti pouze mladší nemocní do 60 let, což z důvodu asociace mutace *TET2* s vyšším věkem nemocných pravděpodobně ovlivnilo výsledky.

Chou et al dále dokládají nevhodnost mutace *TET2* pro sledování minimální reziduální nemoci v průběhu a po ukončení léčby. Mezi 13 pacienty, kteří byli vstupně *TET2* pozitivní a u kterých došlo po ukončení léčby k relapsu onemocnění, šest pacientů ztratilo při relapsu onemocnění původní mutaci *TET2* [52].

ASXL1

ASXL1 (additional sex comb-like 1) patří do rodiny Polycomb proteinů podílejících se na regulaci remodelace chromatinu. Ve spolupráci s HP1 ovlivňuje metylaci histonů prostřednictvím regulace aktivity demethylázy *LSD1* [54]. Funkce *ASXL1* v hematopoéze je však dosud nejasná. Mutace v genu *ASXL1* byly nalezeny u chronické myelomonocytární leukemie (CMML), MDS, sekundárních AML, které se vyvinuly z CMML, i *de novo* AML [55,56].

Mutace *ASXL1* jsou typu delecí nebo bodových mutací. Jejich výskyt u pacientů s AML je 9–18 % [57–59]. U nemocných se středně rizikovou AML je mutace *ASXL1* asociována s mužským pohlavím (23,5 vs. 9,9 %; $p < 0,001$), s vyšším věkem nemocných (medián 71,8 vs. 61,8; $p < 0,001$). Mutace je významně častěji prokazována u nemocných s mu-

tací *RUNX1*, naopak její přítomnost negativně koreluje se současnou přítomností mutací *NPM1*, *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD* a *DNMT3A*. Významně častěji je mutace *ASXL1* prokazována u AML s trizomií chromozomu 8 (52,7 %) [58].

Mutace *ASXL1* je spojena s výrazně horší prognózou pacientů s AML. Bylo prokázáno významně zkrácené OS nemocných se středně rizikovou AML (medián OS 11,0 vs. 62,2 měsíce; $p < 0,001$) [57]. Zkrácení OS bylo prokázáno ve všech geneticky definovaných rizikových a věkových skupinách. Mutace *ASXL1* je tedy považována za významný negativní prognostický marker u nemocných s AML a pacienti s touto mutací by měli být směřováni k provedení alogenní HSCT v rámci léčby 1. linie.

Závěr

Hledání nových molekulárně genetických markerů u nemocných s AML je důležité pro stanovení individuálního léčebného přístupu, zejména u nemocných ve středním cytogenetickém riziku. Z důvodu vysoké peritransplantační morbidity a mortality je nutné vyčlenit skupinu nemocných, kteří v rámci 1. léčebné linie neprofitují z provedení alogenní transplantace. Metody celogenomového sekvenování umožnily prokázat celou řadu mutací genů, které hrají významnou roli v patogenezi AML a mají význam pro prognostickou stratifikaci. Kromě prognostického významu představují mutované geny také potenciál pro vývoj nové cílené léčby. V rámci klinických studií jsou v současné době hodnoceny inhibitory *FLT3*, *IDH1* a *IDH2*. Nové terapeutické přístupy jsou z důvodu neuspokojivé prognózy nemocných s AML vysoce očekávány.

Velké klinické studie prokázaly příznivý vliv na OS nemocných pouze u mutace genu *NPM1* a bialelické mutace *CEBPA*, naopak jasně negativní vliv na prognózu má mutace genu *FLT3* a *DNMT3A*. Mutace *NPM1*, *FLT3-ITD* a *DNMT3A* se na pracovišti Interní hematologické a onkologické kliniky (IHOK) FN Brno rutinně vyšetřují u všech nemocných s nově diagnostikovanou AML, u kterých je plánováno zahájení intenzivní terapie. Z důvodu velmi nízké incidence bialelické mutace *CEBPA* se tato mutace stan-

dardně nevyšetřuje. Z nových molekulárně genetických markerů je negativní prognostický význam prokázán pouze u mutace *ASXL1*, která rovněž z důvodů nízké incidence není na IHOK vyšetřována. U ostatních markerů jsou výsledky jednotlivých prací diskrepantní a jejich prognostický význam není zcela jasně definován.

Literatura

- Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. 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* 1998; 92(7): 2322–2333.
- Wakita S, Yamaguchi H, Ueki T et al. Complex molecular genetic abnormalities involving three or more genetic mutations are important prognostic factors for acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2016; 30(3): 545–554. doi: 10.1038/leu.2015.288.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon (France): IARC 2008.
- Döhner H, Estey EH, Amadori S et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115(3): 453–474. doi: 10.1182/blood-2009-07-235358.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127(20): 2391–2405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100(5): 1532–1542.
- Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2011; 4: 36. doi: 10.1186/1756-8722-4-36.
- Welch JS, Ley TJ, Link DC et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 2012; 150(2): 264–278. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.023.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013; 368(22): 2059–2074. doi: 10.1056/NEJMoa1301689.
- Ding L, Ley TJ, Larson DE et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012; 481(7382): 506–510. doi: 10.1038/nature10738.
- Shlush LI, Zandi S, Mitchell A et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 2014; 506(7488): 328–333. doi: 10.1038/nature13038.
- Xie M, Lu C, Wang J et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med* 2014; 20(12): 1472–1478. doi: 10.1038/nm.3733.
- Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* 2016; 127(1): 29–41. doi: 10.1182/blood-2015-07-604496.
- Wong TN, Miller CA, Klcó JM et al. Rapid expansion of preexisting nonleukemic hematopoietic clones frequently follows induction therapy for de novo AML. *Blood* 2016; 127(7): 893–897. doi: 10.1182/blood-2015-10-677021.
- Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481(7381): 306–313.
- Grimwade D, Walker H, Harrison G et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in

older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1,065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 2001; 98(5): 1312–1320.

- Meyer SC, Levine RL. Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 2014; 15(9): e382–e394. doi: 10.1016/S1473-2045(14)70008-7.
- Marcucci P, Haferlach T, Döhner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2011; 29(5): 475–486. doi: 10.1200/JCO.2010.30.2554.
- Klco JM, Miller CA, Griffith M et al. Association between mutation clearance after induction therapy and outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA* 2015; 314(8): 811–822. doi: 10.1001/jama.2015.9643.
- Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98(6): 1752–1759.
- Nakao M, Yokota S, Iwai T et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10(12): 1911–1918.
- Thiede C, Studel C, Mohr B et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99(12): 4326–4335.
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97(8): 2434–2439.
- Cloos J, Goemans BF, Hess CJ et al. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia* 2006; 20(7): 1217–1220.
- Li J, Zhang X, Sejas DP et al. Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells. *Leuk Res* 2005; 29(12): 1415–1423.
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005; 352(3): 254–266.
- Krönke J, Bullinger L, Teleanu V et al. Clonal evolution in relapsed *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia. *Blood* 2013; 122(1): 100–108. doi: 10.1182/blood-2013-01-479188.
- Thiede C, Koch S, Creutzig E et al. Prevalence and prognostic impact of *NPM1* mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 107(10): 4011–4020.
- Pabst T, Mueller BU, Zhang P et al. Dominant-negative mutations of *CEBPA*, encoding CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2001; 27(3): 263–270.
- Fasan A, Haferlach C, Alpermann T et al. The role of different genetic subtypes of *CEBPA* mutated AML. *Leukemia* 2014; 28(4): 794–803. doi: 10.1038/leu.2013.273.
- Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA et al. Double *CEBPA* mutations, but not single *CEBPA* mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009; 113(13): 3088–3091. doi: 10.1182/blood-2008-09-179895.
- Green CL, Koo KK, Hills RK et al. 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* 2010; 28(16): 2739–2747. doi: 10.1200/JCO.2009.26.2501.
- Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL et al. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission.

- Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111(7): 2548–2553. doi: 10.1073/pnas.1324297111.
34. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* 2014; 371(26): 2477–2487. doi: 10.1056/NEJMoa1409405.
35. Challen GA, Sun D, Jeong M et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet* 2012; 44(1): 23–31. doi: 10.1038/ng.1009.
36. Yan XJ, Xu J, Gu ZH et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; 43(4): 309–315. doi: 10.1038/ng.788.
37. Gale RE, Lamb K, Allen C et al. Simpson's paradox and the impact of different dnmt3a mutations on outcome in younger adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2015; 33(18): 2072–2083. doi: 10.1200/JCO.2014.59.2022.
38. Thol F, Damm F, Lüdeking A et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011; 29(21): 2889–2896. doi: 10.1200/JCO.2011.35.4894.
39. Ley TJ, Ding L, Walter MJ et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363(25): 2424–2433. doi: 10.1056/NEJMoa1005143.
40. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S et al. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012; 30(7): 742–750. doi: 10.1200/JCO.2011.39.2092.
41. Gaidzik VI, Schlenk RF, Paschka P et al. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG). *Blood* 2013; 121(23): 4769–4777. doi: 10.1182/blood-2012-10-461624.
42. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI et al. 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* 2010; 28(22): 3636–3643. doi: 10.1200/JCO.2010.28.3762.
43. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009; 361(11): 1058–1066. doi: 10.1056/NEJMoa0903840.
44. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ et al. 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* 2010; 28(14): 2348–2355. doi: 10.1200/JCO.2009.27.3730.
45. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(13): 932–941. doi: 10.1093/jnci/djq187.
46. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2011; 29(10): 1373–1381. doi: 10.1200/JCO.2010.32.7742.
47. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010; 18(6): 553–567. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.015.
48. Schnittger S, Haferlach C, Ulke M et al. 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* 2010; 116(25): 5486–5496. doi: 10.1182/blood-2010-02-267955.
49. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366(12): 1079–1089. doi: 10.1056/NEJMoa1112304.
50. Ko M, Huang Y, Jankowska AM et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 2010; 468(7325): 839–843. doi: 10.1038/nature09586.
51. Busque L, Patel JP, Figueroa ME et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet* 2012; 44(11): 1179–1181. doi: 10.1038/ng.2413.
52. Chou WC, Chou SC, Liu CY et al. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood* 2011; 118(14): 3803–3810. doi: 10.1182/blood-2011-02-339747.
53. Gaidzik VI, Paschka P, Späth D et al. TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. *J Clin Oncol* 2012; 30(12): 1350–1357. doi: 10.1200/JCO.2011.39.2886.
54. Lee SW, Cho YS, Na JM et al. ASXL1 represses retinoic acid receptor-mediated transcription through associating with HP1 and LSD1. *J Biol Chem* 2010; 285(1): 18–29. doi: 10.1074/jbc.M109.065862.
55. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; 145(6): 788–800. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x.
56. Abdel-Wahab O, Manshoury T, Patel J et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010; 70(2): 447–452. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3783.
57. Schnittger S, Eder C, Jeromin S et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia* 2013; 27(1): 82–91. doi: 10.1038/leu.2012.262.
58. Chou WC, Huang HH, Hou HA et al. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood* 2010; 116(20): 4086–4094. doi: 10.1182/blood-2010-05-283291.
59. Rocquain J, Carbuca N, Trouplin V et al. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer* 2010; 10: 401. doi: 10.1186/1471-2407-10-401.