

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinikum der Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Wolfgang Hiddemann

Genetik der akuten myeloischen Leukämie:
Bedeutung für Pathogenese, Prognose und Therapie

vorgelegt von Dr. med. Klaus H. Metzeler



Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinikum der Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Wolfgang Hiddemann

Genetik der akuten myeloischen Leukämie:
Bedeutung für Pathogenese, Prognose und Therapie

vorgelegt von Dr. med. Klaus H. Metzeler
Januar 2017

Inhalt

1	EINFÜHRUNG	5
2	GENEXPRESSIONSPROFILE BEI DER AML.....	9
2.1	HINTERGRUND	9
2.2	EIGENE WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE	9
2.2.1	<i>Entwicklung einer prognostischen Genexpressions-Signatur für Patienten mit zytogenetisch normaler AML</i>	<i>9</i>
2.2.2	<i>Expressionsmessungen einzelner Gene als prognostische Marker bei der AML</i>	<i>13</i>
2.3	DISKUSSION UND AUSBLICK.....	17
3	GENMUTATIONEN IN EPIGENETISCHEN REGULATOREN ALS PROGNOSEFAKTOREN UND THERAPEUTISCHE ZIELSTRUKTUREN BEI DER AML	19
3.1	HINTERGRUND	19
3.2	EIGENE WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE	22
3.2.1	<i>Prognostische Bedeutung von Mutationen in den epigenetischen Regulator-Genen TET2 und ASXL1 bei de novo AML mit normalem Karyotyp</i>	<i>22</i>
3.2.2	<i>Mutationen in IDH1, IDH2 und DNMT3A als prognostische und prädiktive Marker.</i>	<i>25</i>
3.2.3	<i>Weitere Arbeiten zu molekularen Risikofaktoren bei der AML</i>	<i>29</i>
3.2.4	<i>Die komplexe genetische Landschaft der AML und ihre Bedeutung für den klinischen Verlauf der Erkrankung</i>	<i>30</i>
3.3	DISKUSSION UND AUSBLICK.....	36
4	AKTUELLE ENTWICKLUNG UND ZUKÜNFTIGE PERSPEKTIVEN.....	37
5	DANKSAGUNG	40
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	41
	ANHANG I: AKTUELLER LEBENSLAUF.....	#
	ANHANG II: VERZEICHNIS DER EIGENEN WISSENSCHAFTLICHEN VERÖFFENTLICHUNGEN.....	50
	ANHANG III: VERZEICHNIS DER BISHER ABGEHALTENEN LEHRVERANSTALTUNGEN	#
	ANHANG IV: EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	60
	ANHANG V: SONDERDRUCKE EIGENER WISSENSCHAFTLICHER VERÖFFENTLICHUNGEN.....	#

Diese Anhänge sind nur in der gedruckten, nicht aber in der elektronischen Form der Habilitationsschrift enthalten.

1 EINFÜHRUNG

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine auf vielen Ebenen heterogene Erkrankung: Aufgrund des mikroskopischen Erscheinungsbildes der neoplastischen Zellen wurden 1976 in der French-American-British (FAB)-Klassifikation unterschiedliche morphologische Subtypen definiert (Bennet 1976). Diese Klassifikation fand weltweite Anwendung, jedoch zeigte sich, dass die derart definierten Untergruppen der Erkrankung keine zuverlässigen Rückschlüsse auf das Therapieansprechen und den Erkrankungsverlauf erlauben. Zur selben Zeit wurde die Methodik der Chromosomenanalyse (zytogenetische Untersuchung) entwickelt, und es gelang, chromosomale Veränderungen nachzuweisen, die rekurrent bei der AML auftreten und deswegen wahrscheinlich kausal mit der Krankheitsentstehung verknüpft sind (Abbildung 1) (Rowley, 1973; Rowley & La Chapelle, 1978).

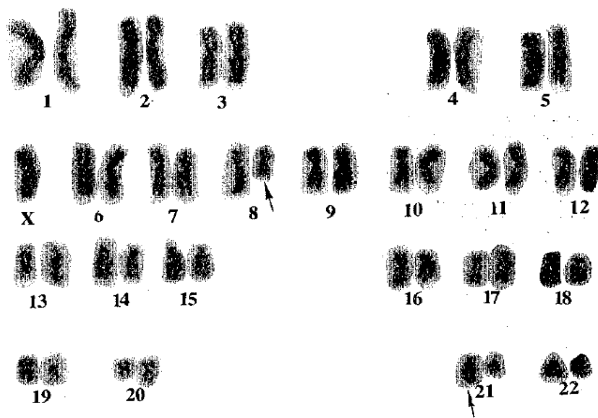


Abbildung 1: Die chromosomale Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 8 und 21 [Pfeile: t(8;21)(q22;q22)], die im Jahr 1972 von Janet D. Rowley als erste rekurrente genetische Veränderung bei der AML identifiziert wurde.

Kurze Zeit später wurde, ebenfalls durch Janet Rowley, auch das Philadelphia-Chromosom bei der CML als Ergebnis einer Translokation t(9;22)(q34;q11) aufgeklärt. Abbildung aus Rowley 1973.

Relativ früh zeigten diese Untersuchungen, dass es einen starken Zusammenhang zwischen bestimmten zytogenetischen Veränderungen und dem Ansprechen der Erkrankung auf eine Chemotherapie gibt (Rowley & La Chapelle, 1978; Arthur et al., 1989; Byrd et al., 2002).

Durch die zytogenetische Untersuchung können bei etwa der Hälfte aller erwachsenen AML-Patienten mikroskopisch sichtbare, numerische oder strukturelle Chromosomenveränderungen nachgewiesen werden. Die andere Hälfte der Patienten zeigt hingegen einen normalen Karyotyp. Ermöglicht durch die Weiterentwicklung molekulargenetischer Methoden wurden in den frühen 1990er Jahren Gene identifiziert, die bei AML-Patienten wiederkehrend von DNA-Sequenzmutationen betroffen sind (Abbildung 2). Auch hier konnte in den folgenden Jahren nachwiesen werden, dass der Mutationsstatus bestimmter Gene mit einer günstigen oder ungünstigen Prognose

assoziiert ist. Insbesondere innerhalb der Gruppe der Patienten mit normalem zytogenetischen Befund zeigte sich, dass Mutationen in *NPM1* oder *CEBPA* prognostisch günstig sind, während interne Tandem-Duplikationen im *FLT3*-Gen (*FLT3-ITD*) mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit und kürzerem Überleben einhergehen (Thiede et al., 2002; Schnittger et al., 2005; Marcucci et al., 2008; Dufour et al., 2010).

Allerdings zeigten etwa ein Viertel der AML-Patienten mit normalem Karyotyp auch keine der genannten Genmutationen, so dass die molekularen Ursachen der Krankheitsentstehung bei diesen Patienten unklar blieben. Durch die Entwicklung von Hochdurchsatz-Sequenzieretechniken (next generation sequencing) wurde es vor etwa 10 Jahren erstmals möglich, das gesamte Genom einer Tumorzellpopulation (whole genome sequencing) oder dessen proteinkodierende Anteile (whole exome sequencing) mit vertretbarem Aufwand zu sequenzieren. Dadurch konnten erstmals nicht mehr nur einzelne, im Voraus ausgewählte Kandidaten-Gene auf Mutationen untersucht werden, sondern es konnte genomweit nach neuen tumorassoziierten Veränderungen gefahndet werden. Die AML war dabei die erste Entität, bei der ein Tumorgenom mittels dieser Technologie komplett sequenziert wurde (Ley et al., 2008). In der Folge wurden rasch eine Reihe von rekurrenten Mutationen identifiziert, die bei einem erheblichen Prozentsatz der erwachsenen AML-Patienten vorkommen (Abbildung 2).

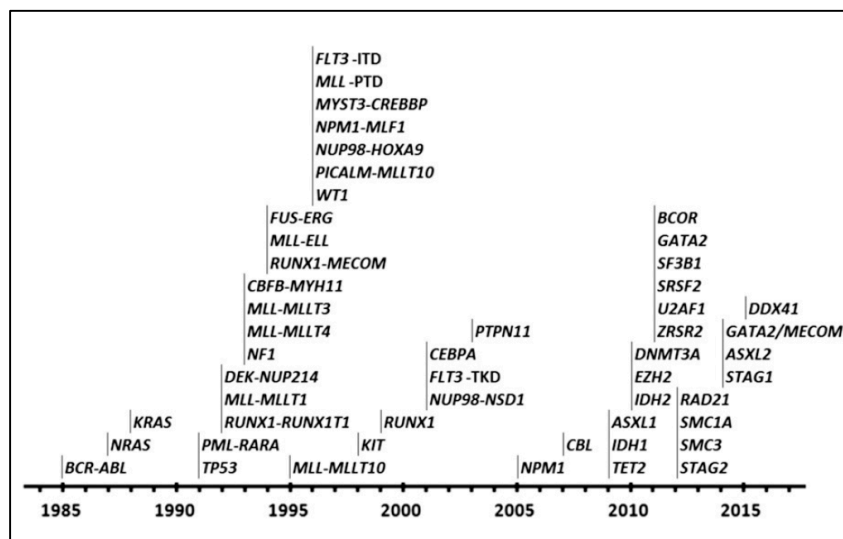


Abbildung 2: Übersicht über die Entdeckung rekurrenter genetischer Veränderungen bei der AML in den letzten 30 Jahren. Abbildung aus Grimwade et al., 2016.

Gleichzeitig wurde durch diese immer umfassenderen Untersuchungen aber auch die große Heterogenität deutlich, die dem Krankheitsbild AML auf genetischer Ebene zugrunde liegt. Diese Heterogenität zeigt sich einerseits auf inter-individueller Ebene: Im Median werden bei AML-Patienten 13 nicht-synonyme Mutationen in protein-

kodierenden Sequenzen des Genoms gefunden (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Etwa die Hälfte dieser Mutationen entfällt dabei auf Gene, von denen heute bekannt ist, dass sie bei der AML rekurrent von Veränderungen betroffen sind. Darunter lässt sich eine kleine Gruppe von etwa 10 Genen definieren, die bei in 10% oder mehr aller AML-Patienten mutiert sind (Papaemmanuil et al., 2016; Metzeler et al., 2016). Darüber hinaus findet sich aber eine lange Reihe von Genen, die jeweils nur in einem sehr kleinen Anteil aller AML-Patienten mutiert sind. Daraus ergibt sich eine extrem hohe Anzahl möglicher Kombinationen von Mutationen, so dass jeder einzelne Patient ein hochgradig individuelles Mutationsmuster aufweist. Zwar sind sehr wahrscheinlich nicht alle in der Tumorzell-Population somatisch erworbenen Mutationen auch funktionell relevant (sog. „Driver-Mutationen“), sondern manche Veränderungen üben nur einen geringen oder gar keinen biologischen Effekt aus (sog. „Passenger-Mutationen“). Andererseits ist es möglich, dass die Auswirkungen einzelner Mutationen durch andere, koexistierende Veränderungen moduliert werden. Daher sind Untersuchungen sehr großer Patientenkohorten nötig, um die biologische und prognostische Relevanz verschiedener Kombinationen von Mutationen aufzuklären (Papaemmanuil et al., 2016).

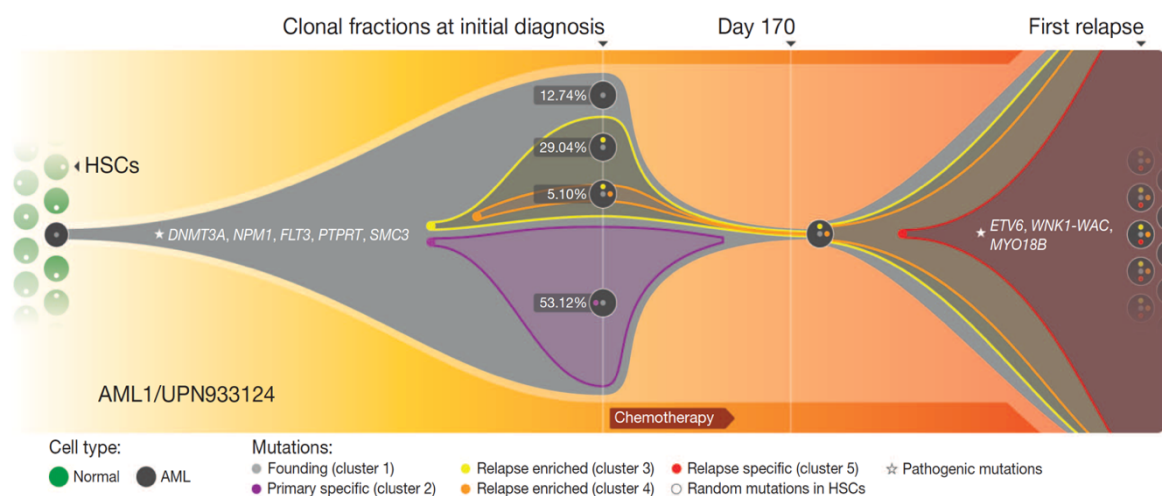


Abbildung 3: Beispielhafte schematische Darstellung klonaler Heterogenität und genetischer Evolution bei einem AML-Patienten. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung setzt sich die Tumorzellpopulationen aus mehreren, genetisch unterscheidbaren Subklonen zusammen. Während der Therapie kommt es zu einer Elimination mancher Klone, während andere Klone während der Phase der klinischen Remission unterhalb der morphologischen Nachweisgrenze persistieren („minimal residual disease“). Das Krankheitsrezidiv geht im hier gezeigte Fall von einem Klon aus, der zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nur einen kleinen Anteil der Leukämiezellen umfasst hatte (orange). Außerdem hat der im Rezidiv vorherrschende Klon (rot) noch zusätzliche Mutationen hinzugewonnen. Daten und Abbildung aus Ding et al, 2012.

Über diese interindividuelle Diversität hinaus zeigten genomweite Analysen, dass auch innerhalb des einzelnen Patienten die AML keine streng monoklonale, genetisch homogene Erkrankung ist. Vielmehr zeigen die Allel-Häufigkeiten der verschiedenen bei AML-Patienten gefundenen Mutationen, dass häufig mehrere genetisch verwandte Klone parallel existieren (klonale Heterogenität; Abbildung 3). Diese Populationen sind überdies nicht statisch, sondern können sich über den Erkrankungsverlauf hinweg weiterentwickeln. Durch eine antileukämische Therapie wird ein Selektionsdruck auf die unterschiedlichen Klone ausgeübt, der zur klonalen Evolution der Erkrankung und zu einer Auslese therapie-refraktärer Subklone beitragen kann (Ding et al., 2012; Landau et al., 2014).

Trotz dieser herausfordernden Komplexität eröffnen genetische Untersuchungen akuter Leukämien, und insbesondere translationale Untersuchungen an großen und gut charakterisierten Patientenkohorten, auch viele neue Perspektiven (Übersicht bei Grimwade et al., 2016): Genetische Veränderungen können als prognostische Marker dienen und dazu beitragen, Patienten besser über das Risiko Ihrer Erkrankung zu informieren. Ein verwandtes, wichtiges Ziel ist die Etablierung prädiktiver Marker, die Auskunft über die Erfolgswahrscheinlichkeit einer bestimmten Therapie geben und so zur Auswahl der optimalen Behandlungsstrategie beitragen können. Während und nach der Therapie können Genmutationen zum Monitoring des Erkrankungsverlaufes und zum sensitiven Nachweis einer minimalen Resterkrankung unterhalb der morphologischen Nachweisgrenze (minimal residual disease, MRD) genutzt werden, um so ein drohendes Rezidiv der Erkrankung frühzeitig zu erkennen. Auch hier besteht über die rein prognostische Aussage hinaus die Hoffnung, bei solchen Patienten durch den gezielten und frühzeitigen Einsatz präemptiver Therapien das Auftreten eines klinischen Rezidivs vermeiden zu können. Durch eine genetische Charakterisierung der Erkrankung in verschiedenen Stadien (z.B. vor Therapie und im Rezidiv) können zudem genetische Veränderungen identifiziert werden, die mit einer Resistenz gegenüber den eingesetzten Behandlungsstrategien assoziiert sind. Es besteht die Hoffnung, dass solche Daten eine Grundlage für die funktionelle Aufklärung von Resistenzmechanismen und, darauf aufbauend, für die Entwicklung von effektiveren Therapiestrategien bilden.

2 GENEXPRESSIONSPROFILE BEI DER AML

2.1 Hintergrund

Wie einleitend geschildert, stellte die Entwicklung von Hochdurchsatz-Methoden (sogenannte „Omics“-Technologien wie Transcriptomics, Genomics, Epigenomics, Proteomics) einen bedeutenden Fortschritt in der Untersuchung der genetischen und zellbiologischen Grundlagen der Leukämieentstehung dar. Eine der ersten dieser Hochdurchsatz-Methoden, die in die klinisch-translationale Leukämieforschung Eingang fand, war die simultane Messung der Expression einer Vielzahl von Genen mithilfe von Microarrays. Diese vor mittlerweile etwa 20 Jahren entwickelte Technologie ermöglichte es zum ersten Mal, einen (nach damaligem Wissensstand) „globalen“ Überblick über die Aktivität der einzelnen Gene des Genoms zu erhalten. Zu dieser Zeit war das verfügbare Wissen über genetische Veränderungen bei der AML auf zytogenetisch erkennbare Chromosomenveränderungen und Punktmutationen in wenigen einzelnen Genen, wie *NRAS*, *RUNX1* oder *FLT3* beschränkt. Während viele der an der Leukämieentstehung beteiligten genetischen Veränderungen noch unbekannt waren, ermöglichten Genexpressions-Analysen es zunächst, die Konsequenzen dieser Mutationen auf der Ebene der Genexpression und die daraus resultierende Heterogenität der Erkrankung zu erfassen (Valk et al., 2004; Bullinger et al., 2004).

2.2 Eigene wissenschaftliche Beiträge

2.2.1 Entwicklung einer prognostischen Genexpressions-Signatur für Patienten mit zytogenetisch normaler AML

Ausgewählte eigene Publikationen:

- Metzeler KH et al: An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 112(10):4193-4201
- Eppert K et al: Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature Medicine* 2011; 17(9):1086–1093.
- Metzeler KH et al: A stem cell-like gene expression signature associates with inferior outcomes and a distinct microRNA expression profile in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2013; 27(10):2023–2031.
- Ng SW et al: A 17-Gene Stemness Score for Rapid Determination of Risk in Acute Leukemia. *Nature* 2016; doi:10.1038/nature20598 (published online 07 December 2016)

Wir konnten in unseren eigenen Arbeiten eine Kohorte von Patienten untersuchen, die in klinischen Studien der Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group (AMLCG) behandelt worden waren. Von diesen Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mononukleäre Zellen aus dem Blut oder Knochenmark isoliert, und deren Geneexpression mittels Affymetrix HG-U133 Microarrays untersucht worden. Wir stellten die Frage, ob diese Genexpressions-Daten einen Beitrag zu einer verbesserten Risikoabschätzung für Patienten mit akuter myeloischer Leukämie leisten können (Metzeler et al., 2008). Dazu untersuchten wir eine Kohorte von 163 Patienten mit normalem Karyotyp (zytogenetisch normale oder „CN“-AML). Aus den über 44.000 Genexpressions-Messwerten („probe sets“), die mittels der Microarray-Analyse für jeden Patienten bestimmt wurden, konnten wir mittels „supervised principal component analysis“ 86 Sonden identifizieren, die jeweils eine starke statistische Assoziation mit dem Gesamtüberleben der Patienten zeigten. Diese 86 „probe sets“ repräsentierten die Expression von 66 unterschiedlichen Genen. Aus der gewichteten Summe der Expressionswerte dieser 86 probe sets wurde dann ein numerischer Score abgeleitet. Die Auswahl der verwendeten probe sets und ihrer Gewichtung erfolgte strikt innerhalb des 163 Patienten umfassenden Trainings-Datensatzes. Anschließend untersuchten wir in zwei weiteren, unabhängigen AML-Patientenkohorten, ob der so entwickelte Prognosescore auch hier eine Assoziation mit dem Überleben der Patienten zeigte. Für diese Validierung betrachteten wir einerseits eine 79 Patienten umfassende Stichprobe aus der AMLCG-1999 Studie, als auch eine Gruppe von 64 CN-AML-Patienten, die in Studien der amerikanischen Cancer and Leukemia Group B (CALGB) behandelt worden waren. In beiden Validierungskohorten zeigt der Genexpressions-basierte Score eine hochsignifikante Assoziation mit allen betrachteten Endpunkten (Gesamtüberleben, ereignisfreies Überleben und Gesamtüberleben) (Abbildung 4).

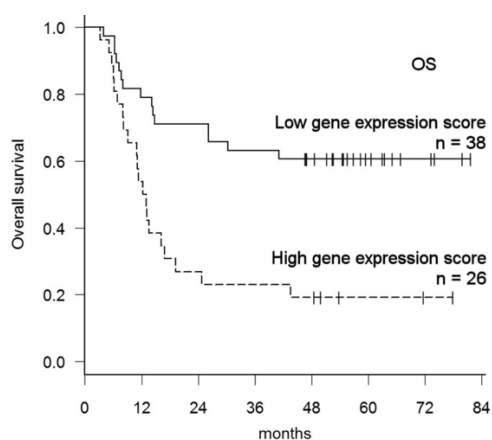


Abbildung 4: Gesamtüberleben von Patienten mit zytogenetisch normaler AML, die anhand eines auf Gen-Expressionsdaten basierenden Prognose-Scores in zwei Gruppen unterteilt wurden. Gezeigt ist die Untersuchung einer unabhängigen Validierungs-Kohorte von AMLCG-Studienpatienten, welche nicht für die Etablierung der Signatur herangezogen wurden. Patienten mit einem überdurchschnittlich hohen Wert des Prognose-Scores zeigten ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben ($P < .001$). Abbildung aus Metzeler et al. 2008.

In einer multivariaten Analyse konnte zudem gezeigt werden, dass der mittels Genexpressions-Analyse bestimmte Score auch nach Adjustierung für weitere damals bekannte Risikofaktoren (Alter, *NPM1*- und *FLT3*-Mutationsstatus) signifikant mit dem Gesamtüberleben korrelierte. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung handelte es sich bei dieser Arbeit um die erste Genexpressions-Signatur, die speziell mit dem Ziel der verbesserten Risikostratifizierung bei der AML entwickelt und hierzu an mehreren unterschiedlichen Patientenkohorten validiert worden war.

Genexpressionsprofile bilden die Aktivität zahlreicher zellulärer Signalwege ab und erlauben dadurch einen Einblick in funktionelle Charakteristika der vorherrschenden Zellpopulation in den untersuchten Proben. Der zur Entwicklung der prognostischen Signatur erstellte umfangreiche Datensatz aus Microarray-Messungen und klinischen Informationen wurde unter diesem Gesichtspunkt in mehreren Folgeprojekten weiter untersucht. In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. John Dick in Toronto untersuchten wir beispielsweise die klinische Relevanz einer stammzell-assoziierten Genexpressions-Signatur (Eppert et al., 2011). Unsere Kooperationspartner hatten mittels Zellsortierung, basierend auf der Expression der Oberflächenmarker CD34 und CD38, unterschiedliche Subpopulationen von AML-Zellen aus Patientenproben isoliert. Anschließend wurden diese verschiedenen Zellpopulationen einzeln in immundefiziente Mäuse transplantiert. Durch die Analyse von 16 verschiedenen Patientenproben zeigte sich, dass leukämische Stammzellen (leukemic stem cells, LSCs), die für das Anwachsen des Transplantates in diesem System erforderlich sind, in unterschiedlichen Subpopulationen vorkommen können. Die größte LSC-Häufigkeit fand sich dabei in der CD34+/CD38- Fraktion. Die verschiedenen, sortierten Zellfraktionen wurden parallel zu den Transplantations-Experimenten auch mittels Microarrays untersucht. Durch einen Vergleich der Fraktionen mit und ohne nachweisbare LSC-Aktivität (das heißt mit bzw. ohne Anwachsen im Xenograft-Experiment) wurde eine Signatur von 42 LSC-assoziierten Genen definiert (sog. „LSC-related“ oder LSC-R-Signatur). Die in dieser Signatur enthaltenen Gene zeigten eine relativ hohe Expression in Zellfraktionen mit funktionell definierter Stammzellaktivität.

In unserer AMLCG CN-AML Patientenkohorte konnten wir sodann nachweisen, dass eine hohe Expression dieser stammzell-assoziierten Gene mit einer ungünstigen Prognose der Patienten einherging (Abbildung 5). Die prognostische Relevanz dieser Gen-Signatur wurde anschließend auch in einer unabhängigen CN-AML-Patientenkohorte der US-amerikanischen Studiengruppe CALGB nochmals bestätigt. In dieser zweiten Kohorte konnten wir außerdem in multivariaten Analysen zeigen, dass

diese Genexpressions-Signatur auch nach Adjustierung für andere bekannte Risikofaktoren wie Alter, Zytogenetik und Genmutationen zur Prognoseabschätzung hinsichtlich Remissionsrate, rezidivfreiem Überleben und Gesamtüberleben beitragen kann (Metzeler et al., 2013).

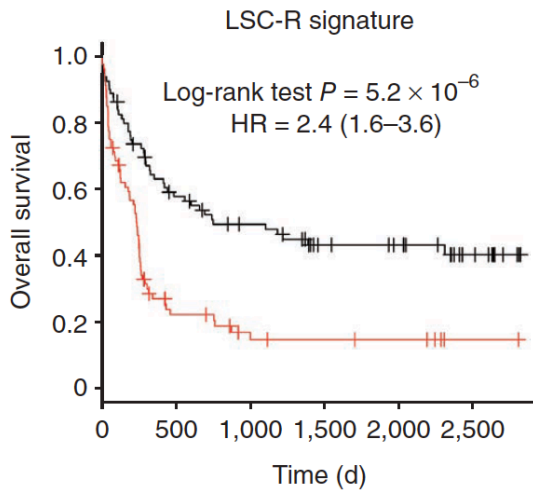


Abbildung 5: Expression von Genen, die mit einem Leukämie-Stammzell-Phänotyp assoziiert sind („LSC-R“-Gensignatur), und Gesamtüberleben bei der AML. AMLCG-Studienpatienten mit zytogenetisch normaler AML wurden anhand der Expression von 42 LSC-assoziierten Genen in zwei Gruppen unterteilt. Patienten mit hoher Expression der in der sog. LSC-R-Signatur enthaltenen Gene (rot) zeigten im Vergleich zu Patienten mit niedriger LSC-R-Expression (schwarz) ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben ($P < .001$). Abbildung aus Eppert et al. 2011.

Durch unsere Kooperationspartner an der University of Toronto wurde inzwischen aus der ursprünglichen stammzell-assoziierten Genexpressionssignatur mittels „sparse regression analysis“ ein weiterer, aus nur noch 17 Genen bestehender Expressions-Score (LSC-17) abgeleitet. Dieser Score wurde mit dem Ziel entwickelt, auch in der Klinik zur Risikoabschätzung einsetzbar zu sein. Er fasst deswegen speziell die Expression derjenigen Gene zusammen, die einen besonders engen Zusammenhang mit den klinischen Therapieergebnissen zeigen. Für den LSC-17 score wurde in 5 verschiedenen Patientenkollektiven verschiedener Studiengruppen, darunter unsere eigene AMLCG-Kohorte, eine Assoziation mit dem Gesamtüberleben gezeigt (Ng SW et al., 2016).

2.2.2 Expressionsmessungen einzelner Gene als prognostische Marker bei der AML

Ausgewählte eigene Publikationen:

- Metzeler KH et al.: *ERG* expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A comprehensive analysis of *ERG*, *MN1* and *BAALC* transcript levels using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol.* 2009; 27(30):5031-5038.
- Metzeler KH, Heilmeier B et al.: High expression of lymphoid enhancer-binding factor-1 (*LEF1*) is a novel favorable prognostic factor in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood.* 2012; 120(10):2118-2126.

Unsere oben dargestellten retrospektiven Untersuchungen konnten klar belegen, dass Expressions-Signaturen, die eine mehr oder weniger große Zahl von Genen umfassen, starke prognostische Marker bei der AML sein können. Die praktische Umsetzung dieser Erkenntnisse in klinisch nutzbare Testverfahren gestaltete sich jedoch problematisch. Die Gründe hierfür liegen unter anderem in den ausgeprägten Batch-Effekten der Microarray-basierten Messverfahren, die eine Standardisierung der Analysen zwischen verschiedenen Labors und eine prospektive Nutzung erschweren. Unter anderem aus diesem Grund wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht, ob auch die Expression einzelner Gene als prognostischer Marker bei der AML genutzt werden kann. Solche Expressionsanalysen auf Basis einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wären grundsätzlich für alle AML-Patienten anwendbar. Sie bieten gegenüber der Mutationsanalyse einer begrenzten Anzahl von Genen den konzeptionellen Vorteil, dass die Expression bestimmter Gene ein Surrogatparameter für die Aktivierung bestimmter, pathogenetisch relevanter zellulärer Signalwege sein kann. Die Messung der Genexpression könnte somit als funktioneller Parameter einen Rückschluss auf den Krankheits-Phänotyp und die Prognose erlauben – und zwar ohne dass die genetischen oder epigenetischen Veränderungen, die auf Ebene der DNA zur Aktivierung dieser Signalwege führen, im Einzelnen bekannt sein müssen. Vor diesem theoretischen Hintergrund wurden unter anderem von der Arbeitsgruppe um Guido Marcucci und Clara D. Bloomfield an der Ohio State University mehrere Gene identifiziert, deren hohe Expression mit kurzem Überleben von Patienten mit normalem Karyotyp einher geht (Baldus et al., 2003; Marcucci et al., 2005; 2007; Langer et al., 2008; 2009). Der von uns etablierte Microarray-Datensatz ermöglichte es uns, diese Zusammenhänge an unserem eigenen Kollektiv von insgesamt 210 CN-AML-Patienten zu validieren (Metzeler et al., 2009). Basierend auf den zuvor publizierten Arbeiten der Arbeitsgruppe in Ohio wurde als Schwellenwert, der eine hohe Genexpression definiert („cut-off“), für *BAALC* und

MN1 der Median und für *ERG* die 75. Perzentile gewählt. Wir konnten in unserer Untersuchung bestätigen, dass eine hohe Expression der Gene *BAALC*, *ERG* und *MN1* jeweils signifikant mit einer niedrigeren Remissionsrate und einem verkürzten Gesamtüberleben einhergeht (Abbildung 6)

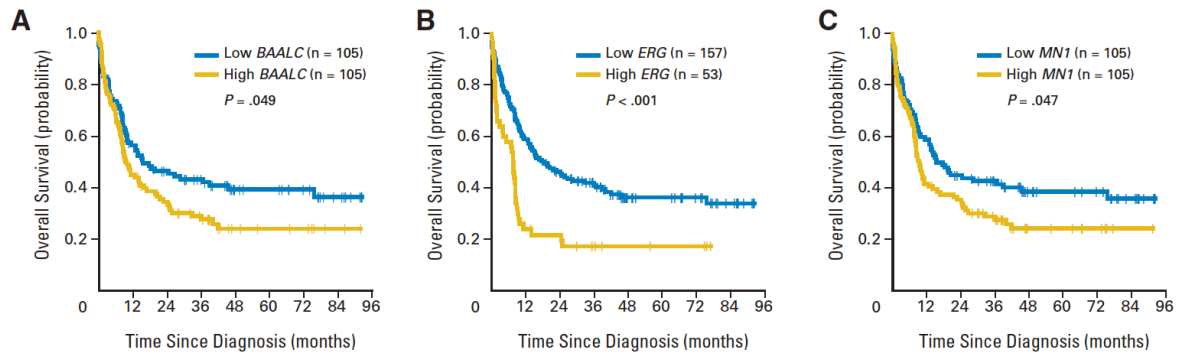


Abbildung 6: Gesamtüberleben von Patienten mit zytogenetisch normaler AML in Abhängigkeit von der Expression einzelner Gene. Eine hohe Expression von *BAALC* (oberhalb des Medians, Diagramm A), *ERG* (oberhalb der 75. Perzentile, Diagramm B) oder *MN1* (oberhalb des Medians, Diagramm C) war jeweils mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert.

Im Gegensatz zu den zuvor hierzu publizierten Arbeiten umfasste unsere Kohorte nicht nur relativ junge (<60 Jahre) sondern auch ältere (≥60 Jahre) Patienten, die alle in derselben Phase-3-Studie der AMLCG-Studiengruppe behandelt worden waren. Außerdem erlaubten die Microarray-Messungen uns, die Expression und prognostische Relevanz aller drei Gene vergleichend zu beurteilen. In paarweisen Vergleichen zeigte sich, dass die Expression von *BAALC*, *ERG* und *MN1* stark miteinander korreliert, so dass die mittels dieser Marker identifizierten Hochrisiko-Patientengruppen große Überlappungen aufwiesen. In multivariaten Analysen fanden wir, dass in einem Modell für das Gesamtüberleben letztlich nur die hohe Expression von *ERG* sowie das Alter, der *FLT3*-ITD-Mutationsstatus und eine niedrige Thrombozytenzahl als signifikante Variablen mit einem kürzeren Überleben einhergingen. In dieser Arbeit konnten wir somit zeigen, dass die Messung der Expression einzelner Gene gemeinsam mit den zu diesem Zeitpunkt bekannten Gen-Mutationen zu einer genaueren Risikostratifizierung bei der AML beitragen konnte.

Einschränkend ist zu dieser Arbeit anzumerken, dass wir lediglich eine statistische Assoziation zwischen Genexpression und Überleben, aber keinen funktionellen Zusammenhang zwischen der Expression von *ERG* oder anderen Genen und einem besonders aggressiven oder therapie-resistenten Leukämie-Phänotyp nachweisen

konnten. Es ist denkbar, dass die Expression dieser Gene lediglich ein Epiphänomen oder Surrogatparameter für andere, unbekannte genetische Veränderungen ist, welche ihrerseits kausal an der Krankheitsentwicklung beteiligt sind. Die Mechanismen, die speziell die Expression des Transkriptionsfaktors *ERG* mit dem AML-Phänotyp verknüpfen, wurden deshalb im Rahmen einer Kooperation durch die Arbeitsgruppen um Brian Huntley (Cambridge) und John Pimanda (Sydney) noch weiter untersucht. Zu diesem Projekt konnten wir wiederum unseren klinisch umfassend annotierten Genexpressions-Datensatz beitragen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die *ERG*-Expression in AML-Blasten durch eine „Heptade“ von Transkriptionsfaktoren gesteuert wird (*SCL*, *LYL1*, *LMO2*, *GATA2*, *RUNX1*, *FLI1* und *ERG* selbst). Dieselben Transkriptionsfaktoren sind auch an der Genregulation in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen beteiligt. Passend dazu wiesen AML-Patientenproben mit starker Aktivierung des *ERG*-Promoters global gesehen ein „stammzell-ähnliches“, undifferenziertes Genexpressionsprofil auf. Die Expression eines solchen stammzell-ähnlichen Expressionsprofils war in unserer Patientenkohorte wiederum mit einem kürzeren Gesamtüberleben von CN-AML-Patienten assoziiert (Diffner et al., 2013). Hiermit schließt sich somit der Kreis zu den zuvor beschriebenen LSC-Gensignaturen, die anhand funktionell charakterisierter Stammzellpopulationen im NSG-Xenograft Modell etabliert wurden. Insgesamt ist aus diesen Ergebnissen abzuleiten, dass ein undifferenziertes, stammzell-ähnliches Transkriptom der AML-Blasten offenbar mit einem klinisch aggressiveren Verlauf der Erkrankung einhergeht.

Neben der Validierung der prognostischen Relevanz von Genen wie *ERG*, die bereits von anderen Gruppen als Prognosefaktoren beschrieben waren, konnten wir ausgehend von funktionellen Untersuchungen aus unserer eigenen Arbeitsgruppe auch neue Risiko-Marker entdecken. In einem an unserer Klinik durchgeführten Grundlagenprojekt war gezeigt worden, dass eine Überexpression des Transkriptionsfaktors *Lef-1* in murinen hämatopoetischen Zellen zur Entwicklung akuter lymphatischer und myeloischer Leukämien führt. Auch in einem Teil der untersuchten AML-Patientenproben fand sich eine hohe *LEF1*-Expression (Petropoulos et al., 2008). Ausgehend von diesen Daten untersuchten wir die Expression von *LEF1* in unserer Kohorte von 210 CN-AML-Patienten und fanden, dass eine mittels Microarrays gemessene hohe Genexpression mit einem vergleichsweise günstigen rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert war (Metzeler et al., 2012a). Diese Ergebnisse konnten in Zusammenarbeit mit der AMLSG-Studiengruppe an einer unabhängigen Patientenkohorte validiert werden. In einem multivariaten Modell, in dem auch die Expression von *BAALC*, *MN1*, *ERG* und *EVI1* sowie Mutationen in *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *IDH1*, *IDH2* und *MLL* und klinische

Risikofaktoren als Kovariablen betrachtet wurden, behielt die Expression von *LEF1* als einziger der verschiedenen Expressions-Marker einen signifikanten Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben. Diese Ergebnisse basierten jedoch wiederum auf Messungen der Genexpression mittels Microarray-Technologie, mit den bereits genannten Einschränkungen hinsichtlich einer möglichen Translation in die klinische Praxis. Deswegen wurde in unserer Arbeit auch ein standardisiertes Verfahren zur Messung der *LEF1*-RNA-Expression mittels qPCR etabliert und ein Schwellenwert relativ zur Expression eines Referenzgens definiert, der eine prospektive prognostische Stratifizierung von AML-Patienten zulässt. Unabhängig von unserer Untersuchung wurde auch für die akute lymphatische Leukämie des Erwachsenen ein Zusammenhang zwischen der *LEF1*-Expression und den Therapieergebnissen berichtet, wobei hier jedoch eine hohe Expression mit einer ungünstigen Prognose einhergeht (Kuhnl et al., 2011). Die zellulären Mechanismen, über die die *LEF1*-Expression mit den Therapieergebnissen bei akuten Leukämien in Verbindung steht, sind ungeklärt. *LEF1* spielt als Transkriptionsfaktors eine wichtige Rolle im Rahmen WNT-Signalwegs. Nachdem aber eine erhöhte Expression des WNT-Effektors β -Catenin bei der AML mit einer ungünstigen Prognose korreliert (Ysebaert et al., 2006), spielen möglicherweise auch WNT/ β -Catenin-unabhängige Mechanismen hier eine Rolle.

Der von uns etablierte Microarray-Datensatz wurde außerdem noch in einer Reihe weiterer Kollaborationen mit verschiedenen internationalen Arbeitsgruppen genutzt, um die klinische Relevanz von Kandidaten-Genen zu überprüfen, die zuvor in präklinischen Untersuchungen identifiziert worden waren. So war z.B. von einer kooperierenden Arbeitsgruppe gezeigt worden, dass eine Blockade des *MELK*-Gens (durch kleinmolekulare Inhibitoren oder siRNA-knockdown) das Wachstum von AML-Zellen in verschiedenen *in vitro*-Ansätzen inhibieren kann. Wir konnten daraufhin an unserem Datensatz nachweisen, dass *MELK* insbesondere bei AML-Patienten mit ungünstigen Karyotypen hoch exprimiert wird, und dass eine hohe *MELK*-Expression mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass *MELK* auch *in vivo* ein interessantes therapeutisches Target darstellen könnte (Alachkar et al., 2014).

2.3 Diskussion und Ausblick

Microarray-Analysen waren eine der ersten Untersuchungsmethoden, die es erlaubten, die klinische Heterogenität der Erkrankung AML auf molekularer Ebene abzubilden. Dies betraf insbesondere die Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp, über deren genetische Veränderungen lange Zeit nur sehr begrenzte Informationen verfügbar waren. In unserer Publikation zur prognostischen Gen-Signatur für die zytogenetisch normale AML (Metzeler et al., 2008) hatten wir die Hypothese geäußert, dass in dieser Patientengruppe eine Vielzahl von genetischen Veränderungen existieren, die das Therapieansprechen beeinflussen. Genexpressions-Analysen sollten als Surrogat-Marker für diese noch unbekannt Genmutationen dienen, und dadurch eine Abschätzung des genetisch bedingten Risikos ermöglichen. Obwohl durch uns und mehrere andere Arbeitsgruppen klar gezeigt wurde, dass solche Gensignaturen eine statistisch hochsignifikante Unterscheidung unterschiedlicher AML-Risikogruppen erlauben, hat bislang doch keiner dieser Scores den Weg in die klinische Routine gefunden. Zum einen erschweren, wie oben kurz geschildert, methodische Hindernisse wie die schwierige Standardisierbarkeit den Einsatz der Microarray-Technologie im klinischen Alltag. Zum anderen blieb zunächst unklar, wie eine durch den Einsatz dieser Methoden verbesserte Risikostratifizierung sich in effektivere Therapiestrategien umsetzen lässt.

Inzwischen wurden neue Techniken entwickelt, die eine im Vergleich zu Microarrays deutlich robustere und einfacher standardisierbare parallele Bestimmung der Expression mehrerer Genen erlauben, etwa die „Nanostring“-Methode. Aufgrund dieser neuen technischen Möglichkeiten besteht nun wieder verstärktes Interesse an einem möglichen klinischen Einsatz von Expressions-Signaturen. So ist beispielsweise in Kanada aktuell eine prospektive Validierung des LSC-17 Genexpressions-Scores im Rahmen einer klinischen Studie geplant (Ng et al, Nature, in press). Ein aktueller Kongressbeitrag aus unserer Gruppe verdeutlicht außerdem, dass auch im Zeitalter der Mutationsanalysen mittels „next generation sequencing“ Genexpressionsanalysen immer noch einen wichtigen, eigenständigen Beitrag zur Prognoseabschätzung leisten können: Am Patientenkollektiv der AMLCG-1999 Studie wurde anhand von Genexpressions-Daten und Sequenzanalysen häufig mutierter Gene ein Score etabliert, der eine primäre Chemotherapie-Refraktärität bei AML Patienten vorhersagen soll. In den mittels Bootstrap-Verfahren entwickelten Score gehen letztlich neben der zytogenetischen Risikogruppe (MRC-Klassifikation) lediglich Expressionsmarker ein, während Genmutationen keinen Eingang fanden. In einer unabhängigen Validierungskohorte

konnte gezeigt werden, dass dieser Score das Potential bietet, etwa die Hälfte der Chemotherapie-refraktären Patienten bereits vor Behandlungsbeginn korrekt zu identifizieren (Herold et al., 2016). Diese Daten unterstreichen, dass Genexpressionsanalysen auch zukünftig einen Platz im diagnostischen Methodenspektrum der möglichst zielgerichteten und auf den einzelnen Patienten und seine Erkrankung abgestimmten "precision medicine" haben werden.

3 GENMUTATIONEN IN EPIGENETISCHEN REGULATOREN ALS PROGNOSEFAKTOREN UND THERAPEUTISCHE ZIELSTRUKTUREN BEI DER AML

3.1 Hintergrund

Seit es Hochdurchsatz-Sequenzieretechniken erlauben, das gesamte Genom einer Tumorzellpopulation (whole genome sequencing) oder dessen proteinkodierende Anteile (whole exome sequencing) mit vertretbarem Aufwand zu sequenzieren, wurde eine Vielzahl von rekurrenten Genmutationen bei der AML identifiziert (Abbildung 7) (Ley et al., 2008; Stratton et al., 2009). Hierzu gehören beispielsweise Mutationen in der DNA-Methyltransferase *DNMT3A* (Yamashita et al., 2010; Ley et al., 2010), und in den Isozitat-Dehydrogenase-Genen *IDH1* und *IDH2* (Mardis et al., 2009; Marcucci et al., 2010).

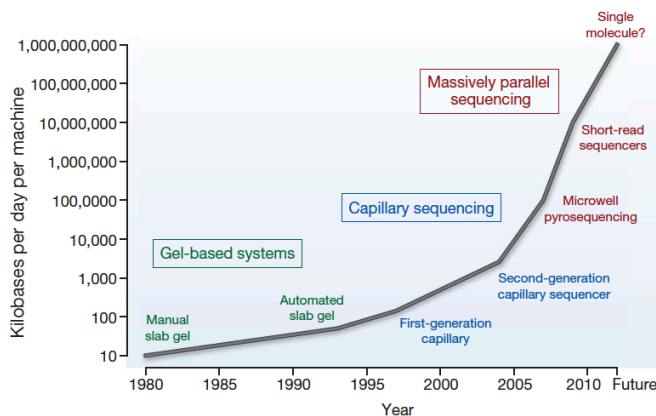


Abbildung 7: Entwicklung der DNA-Sequenzieretechniken in den vergangenen 35 Jahren. Seit der Entwicklung der DNA-Sequenzierung nach der Sanger-Methode konnte der Datenausstoß pro Zeiteinheit der verfügbaren Sequenziergeräte um mehr das 1,000,000-fache gesteigert werden. Abbildung aus Stratton et al., 2009.

Neben der Hochdurchsatzsequenzierung haben aber auch andere Methoden, wie Microarrays zur Genotypisierung von genomischen Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNP-Arrays), zu dieser Entwicklung beigetragen. So wurden mit dieser Technik bei Patienten mit verschiedenen myeloischen Neoplasien Deletionen im Bereich der Chromosomenbande 4q24 identifiziert. In der Folge wurden dann Punktmutationen in dem in diesem Bereich lokalisierten *TET2*-Gen gefunden (Delhommeau et al., 2009; Langemeijer et al., 2009). Mithilfe einer verwandten Mikroarray-Technologie, der array-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (Array-CGH), wurden bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen Deletionen im Bereich der Chromosomenbande 20q11 nachgewiesen. Anschließend wurden dann auch Punktmutationen im hier gelegenen *ASXL1*-Gen identifiziert (Gelsi-Boyer et al., 2009).

Insgesamt lassen sich über das gesamte Genom eines AML-Patienten hinweg in WES- oder WGS-Untersuchungen im Mittel etwa 13 nicht-synonyme Mutationen in

proteinkodierenden Genen nachweisen. Davon betreffen etwa 5 Veränderungen Gene, von denen bekannt ist, dass sie bei der AML rekurrent alteriert sind (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Damit weist die AML im Vergleich mit anderen Tumorentitäten eine relativ niedrige Mutationshäufigkeit auf (Abbildung 8; ca. 0,4 somatische Mutationen je Megabase genomischer DNA-Sequenz) und gehört so zu den genetisch wenig komplexen Tumorentitäten (Alexandrov et al., 2013).

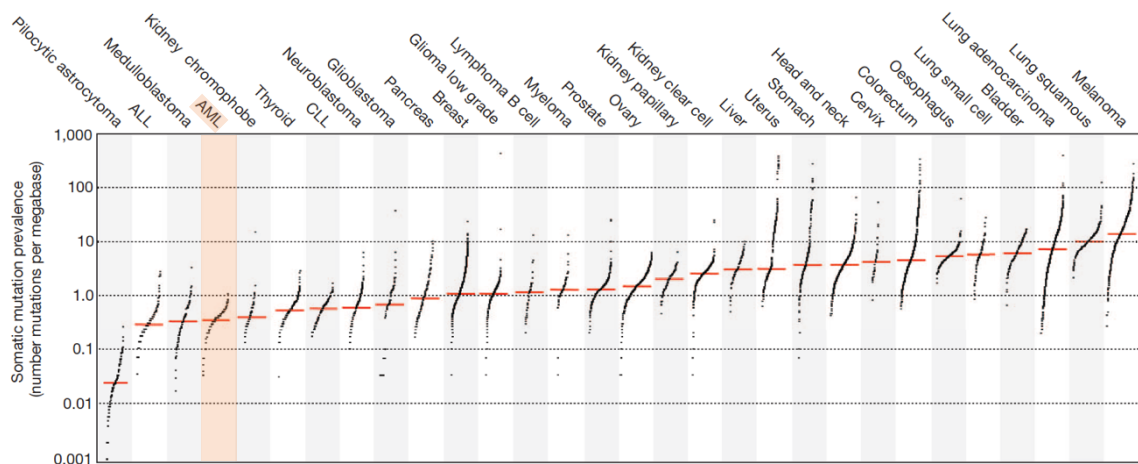


Abbildung 8: Häufigkeit somatischer Mutationen in den Genomen häufiger Tumorentitäten. Die AML weist eine relativ niedrige Mutationshäufigkeit auf. Tumoren, die mit Karzinogen- bzw. Mutagen-Exposition assoziiert sind, wie das Bronchialkarzinom (Tabakrauch) und das Melanom (UV-Strahlung), weisen gegenüber der AML eine mehr als 10 Mal höhere Mutationshäufigkeit auf. Abbildung aus Alexandrov et al., Nature 2013.

Dennoch wurde aufgrund der Vielzahl neu identifizierter Genmutationen deutlich, dass ältere Modellvorstellungen zur Pathogenese der Erkrankung eine zu starke Vereinfachung darstellten und einer Anpassung und Erweiterung bedurften (Abbildung 9) (Gilliland & Griffin, 2002; Thiede, 2012; Döhner et al., 2015).

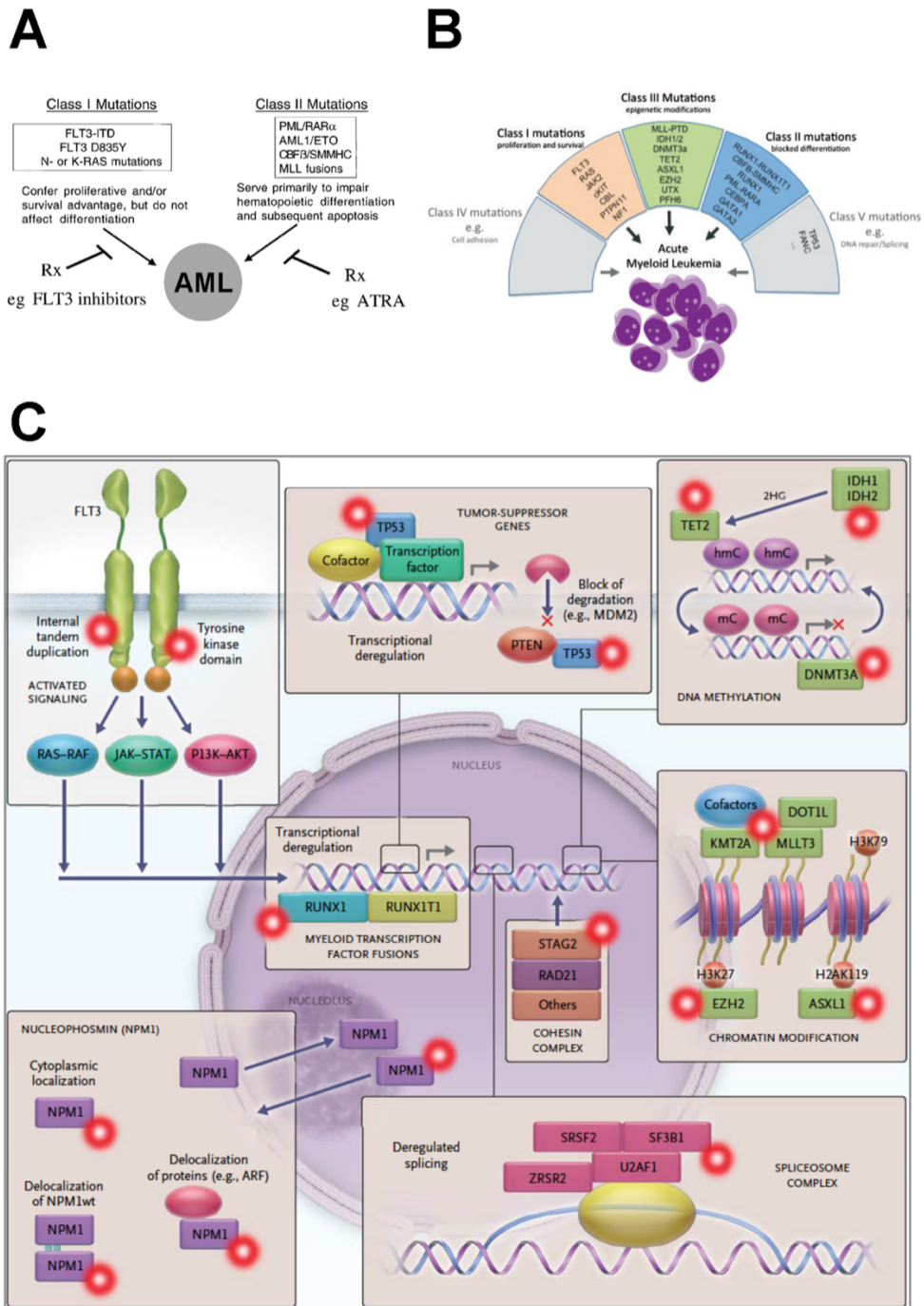


Abbildung 9: Die zunehmende Kenntnis genetischer Veränderungen beeinflusst Modellvorstellungen zur Pathogenese der AML. A) Klassisches Modell der Leukämogenese nach Gilliland und Griffin. Nach diesem Modell entsteht eine AML durch das Zusammenwirken von „Klasse I“-Veränderungen, die zu einer gesteigerten Proliferation führen, und „Klasse II“-Veränderungen, die eine Differenzierungs-Blockade bewirken. Abbildung aus Gilliland & Griffin, 2002. **B) Erweitertes Modell der Leukämogenese unter Einschluss epigenetischer Veränderungen.** Durch die Entdeckung zahlreicher Genmutationen, die sich nicht eindeutig der „Klasse I“ oder „Klasse II“ des zuordnen lassen, war eine Erweiterung des klassischen Modells nötig. Nach dem hier gezeigten Vorschlag von Thiede wird das Modell um eine Klasse III erweitert, die Mutationen in epigenetischen Regulator-Genen umfasst. Die Existenz weiterer funktionell definierter Mutations-Klassen (z.B. Klasse IV: Zelladhäsion, Klasse V: DNA-Reparatur, Splicing) wird postuliert. Abbildung aus Thiede, 2012. **C) Übersicht über zelluläre Signalwege und Mechanismen, von denen aktuell bekannt ist, dass sie eine Rolle in der Pathogenese der AML spielen.** Abbildung aus Döhner et al., 2015.

3.2 Eigene wissenschaftliche Beiträge

3.2.1 Prognostische Bedeutung von Mutationen in den epigenetischen Regulator-Genen *TET2* und *ASXL1* bei *de novo* AML mit normalem Karyotyp

Ausgewählte eigene Publikationen:

- Metzeler KH et al.: *TET2* mutations improve the new European LeukemiaNet (ELN) risk classification of acute myeloid leukemia: A Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2011; 29(10):1373-1381.
- Metzeler KH et al.: *ASXL1* mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood* 2011; 118(26):6920-6929.

Mutationen im *TET2*-Gen wurden, wie bereits geschildert, zunächst bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen (MDS) oder myeloproliferativen Neoplasien (MPN) identifiziert. Die ersten Berichte über *TET2*-Mutationen bei der AML betrafen vor allem Patienten, die eine sekundäre akute Leukämie (sAML) aus einer vorbestehenden MDS- oder MPN-Erkrankung heraus entwickelt hatten. In einer Arbeit im Rahmen der US-amerikanischen Cancer and Leukemia Group B (CALGB) setzten wir es uns deswegen zum Ziel, die Inzidenz und klinische Bedeutung von *TET2*-Mutationen speziell bei Patienten mit *de novo* AML, also ohne vorausgehende andere hämatologische Erkrankung, zu untersuchen. Dazu wurde eine vergleichsweise große Kohorte (n=427) von Studienpatienten mit normaler Zytogenetik analysiert (Metzeler et al., 2011a).

Wir fanden *TET2*-Mutationen bei 23% aller untersuchten *de novo* CN-AML-Patienten. Diese Daten wurden später in mehreren großen Arbeiten verschiedener interantionaler Studiengruppen bestätigt, so dass *TET2* zu den 6 am häufigsten bei der AML mutierten Gene gehört (Papaemanni et al., 2016; Metzeler et al., 2016). Auffällig war in unserer Kohorte, dass es eine deutliche Altersabhängigkeit der *TET2*-Mutationshäufigkeit gab: während von den Patienten im Alter unter 30 Jahren nur rund 7% eine *TET2*-Mutation aufwiesen, stieg dieser Anteil bei den über 70-jährigen auf 32% an. Hinsichtlich der Therapieergebnisse zeigte sich in der Gesamtkohorte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *TET2*-Mutationsstatus und dem Gesamtüberleben (Abbildung 10, oberer Bildteil). Wenn jedoch andere zu diesem Zeitpunkt bereits etablierte molekulare Prognosemarker in die Analyse mit einbezogen wurden, ergab sich ein abweichendes Ergebnis: Patienten in der günstigen Risikogruppe gemäß den 2010 publizierten Empfehlungen des European LeukemiaNet (ELN, Döhner et al., 2010), also Patienten

mit *CEBPA*-Mutation oder mit *NPM1*-Mutation und negativem *FLT3*-ITD-Befund, die zusätzlich eine *TET2*-Mutation aufwiesen, hatten ein deutlich schlechteres Gesamtüberleben als „ELN Favorable“-Patienten ohne *TET2*-Mutation ($P=.001$; Abbildung 10, unterer Bildteil). Bei den übrigen Patienten, die aufgrund ihres normalen Zytogenetik-Befundes allesamt in die ELN-Risikogruppe „Intermediate-I“ eingeteilt wurden, fand sich dagegen kein Einfluss von *TET2*-Mutationen auf das Gesamtüberleben ($P=.72$). In multivariaten Analysen bestätigte sich eine Assoziation von *TET2*-Mutationen mit kürzerem ereignisfreiem Überleben in der „ELN Favorable“-Subgruppe ($P=.05$). Darüber hinaus untersuchten wir in dieser Arbeit die Gen- und MicroRNA (miR)-Expressionsprofile von Patienten mit *TET2*-Mutationen, und identifizierten Signaturen deregulierter Gene und miRs.

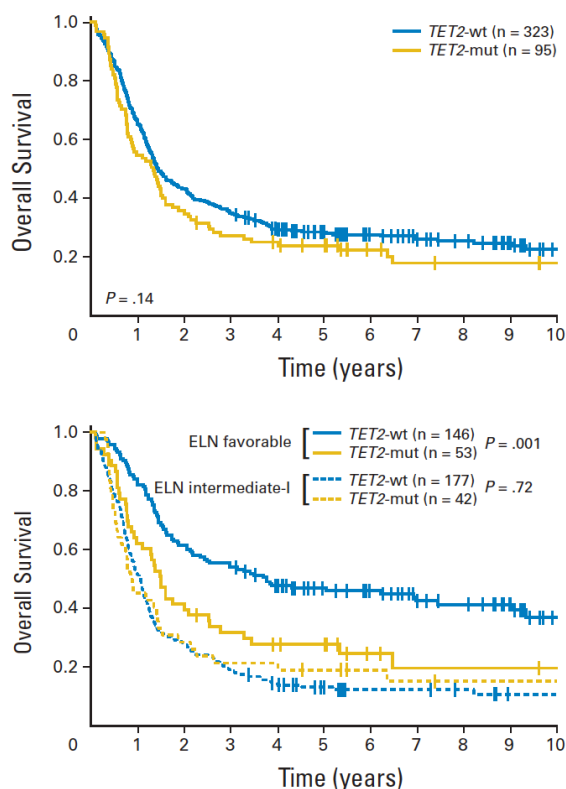


Abbildung 10: Gesamtüberleben von Patienten mit zytogenetisch normaler *de novo* AML in Abhängigkeit vom *TET2*-Mutationsstatus. Oben: in der Gesamtkohorte von CN-AML-Patienten der US-amerikanischen CALGB-Studiengruppe fand sich kein Zusammenhang zwischen *TET2*-Mutationen und dem Gesamtüberleben. Unten: Werden die Patienten anhand ihres Genotyps für die bekannten prognostischen Marker *NPM1*, *FLT3* und *CEBPA* nach den Empfehlungen des European LeukemiaNet (ELN) in 2 Gruppen eingeteilt, dann zeigt sich innerhalb der prognostisch günstigen „ELN Favorable“-Subgruppe eine Assoziation von *TET2*-Mutationen mit kürzerem Überleben. In der „ELN Intermediate-I“-Subgruppe hingegen war weiterhin kein prognostischer Einfluss von *TET2* nachweisbar. Abbildung aus Metzeler et al., 2011a.

Die Bedeutung dieser Arbeit lag in der Feststellung, dass das im klinischen Alltag damals bereits akzeptierte ELN-Schema zur genetischen Einteilung der AML durch die Einbeziehung weiterer molekularer Marker weiter verfeinert werden konnte. Außerdem verdeutlichten unsere Ergebnisse, dass die prognostische Relevanz neu identifizierter Marker vom genetischen Kontext abhängen kann, weil die An- oder Abwesenheit weiterer genetischer Veränderungen die prognostische Bedeutung der zu untersuchenden Läsion beeinflusst. Folglich müssen neu identifizierte Risikomarker immer im Kontext mit anderen Prognosefaktoren untersucht werden.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch in einer weiteren Arbeit, in der wir Mutationen in einem weiteren epigenetischen Regulator-Gen, *ASXL1*, untersuchten. Diese Untersuchung wurde an einer Kohorte von 427 CN-AML Studienpatienten der CALGB-Gruppe durchgeführt, die eine weitgehende Überlappung mit der auf *TET2*-Mutationen untersuchten Kohorte aufwies (Metzeler et al., 2011b). In dieser Untersuchung zeigte sich für *ASXL1* eine noch deutlichere Altersabhängigkeit der Mutations-Häufigkeit, als dies für *TET2* der Fall war: Nur 3,2% der Patienten im Alter unter 60 Jahren wiesen eine *ASXL1*-Mutation auf, während eine solche Veränderung bei 16,2% der älteren Patienten gefunden wurde. Daneben zeigten sich auch interessante Zusammenhänge zwischen *ASXL1*-Mutationen und Mutationen in anderen Genen: Nur sehr wenige Patienten mit einer *ASXL1*-Mutation wiesen zugleich eine *NPM1*- oder *FLT3*- Mutation auf, während andererseits in unserer Kohorte *ASXL1*-Mutationen häufig zusammen mit Mutationen in *CEBPA* beobachtet wurden. In dieser Untersuchung konnten wir erstmals nachweisen, dass *ASXL1*-Mutationen bei älteren Patienten mit *de novo* CN-AML mit einer ungünstigen Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens einhergehen. Auch hier zeigte sich, ähnlich zu den Ergebnissen für *TET2*, dass vor allem bei Patienten mit einer ansonsten günstigen genetischen Risikokonstellation („ELN Favorable“-Gruppe) der Nachweis einer *ASXL1*-Mutation mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ist ($P < .001$; Abbildung 11). Bei Patienten in der ELN Intermediate-I Risikogruppe zeigte sich hingegen kein Unterschied.

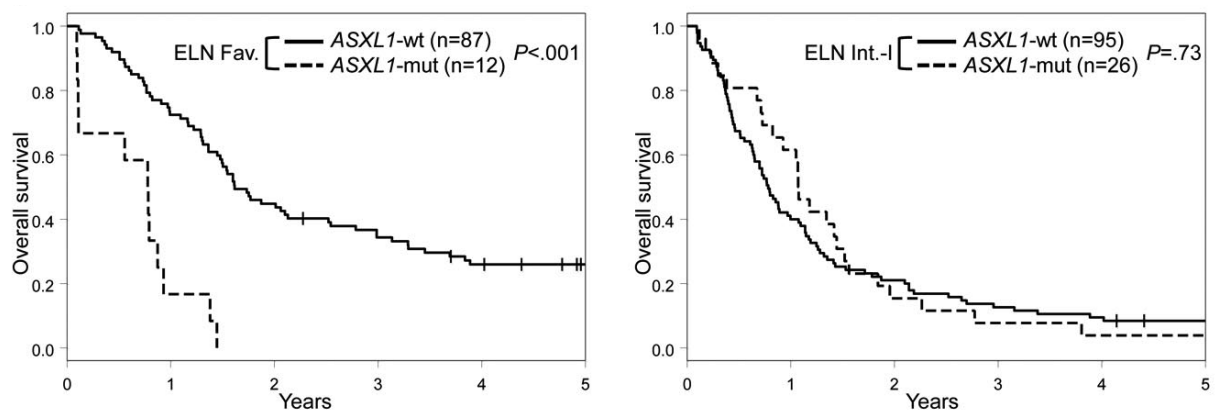


Abbildung 11: Gesamtüberleben von Patienten mit *de novo* CN-AML im Alter >60 Jahre in Abhängigkeit vom *ASXL1*-Mutationsstatus. Links: In der Subgruppe mit einem günstigen Genotyp gemäß der Einteilung des European LeukemiaNet (ELN) überlebten Patienten mit *ASXL1*-Mutation signifikant kürzer als diejenigen ohne Mutation. Rechts: in der Subgruppe mit „Intermediate-I“-Risikoprofil war hingegen kein Einfluss von *ASXL1*-Mutationen erkennbar. Abbildung aus Metzeler et al., 2011b.

Auch hier konnten wir außerdem eine mit *ASXL1*-Mutationen vergesellschaftete Genexpressions-Signatur definieren, die Einblicke in die veränderte Genregulation bei Patienten mit dieser Mutation erlaubt. Hierbei zeigte sich unter anderem eine verstärkte Expression von Genen, die an der Stroma-Interaktion hämatopoetischer Zellen beteiligt sind.

3.2.2 Mutationen in *IDH1*, *IDH2* und *DNMT3A* als prognostische und prädiktive Marker

Ausgewählte eigene Publikationen:

- Marcucci G*, Metzeler KH*, Schwind S*, Becker H* 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. (*equal contribution)
- Metzeler KH et al: *DNMT3A* Mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012; 26(5):1106-1107 [letter]

Neben den zuvor ausführlich dargestellten Untersuchungen zu *TET2* und *ASXL1* konnten wir am Patientenkollektiv der CALGB-Studiengruppe Mutationen in weiteren Genen untersuchen, die an der epigenetischen Regulation der Genexpression beteiligt sind. Hierzu zählen Mutationen in der DNA-Methyltransferase *DNMT3A* (Marcucci et al., 2012), sowie in den Isozitat-Dehydrogenase-Genen *IDH1* und *IDH2* (Marcucci et al., 2010). Mutationen in *IDH1* gehörten zu den ersten genetischen Veränderungen, die mittels der Genom- bzw. Exomsequenzierung von Tumoren entdeckt wurden – zunächst beim Glioblastoma multiforme, kurze Zeit später dann auch bei der AML (Parsons et al., 2008; Mardis et al., 2009). Wir konnten in unserer Arbeit neben den schon bekannten *IDH1*-Mutationen erstmalig auch Mutationen im *IDH2*-Gen bei der AML nachweisen. *IDH2*-Mutationen waren zuvor lediglich bei Gliomen, nicht aber bei hämatologischen Neoplasien beschrieben worden (Yan et al., 2009). Wir konnten außerdem zeigen, dass heterozygote *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen bei insgesamt etwa einem Drittel aller CN-AML Patienten auftreten, und dass dabei praktisch nie beide Gene gleichzeitig von Mutationen betroffen sind (Marcucci et al., 2010). Später konnten wir und andere Gruppen zudem nachweisen, dass auch Mutationen in *TET2* nur sehr selten gemeinsam mit *IDH1*- oder *IDH2*-Mutationen vorkommen (Metzeler et al., 2011a; Gaidzik et al., 2012). In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurde die Ursache für diese negative

Assoziation aufgeklärt, die in der pathophysiologischen Funktion der mutierten IDH-Enzyme liegt. *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen führen zu einer veränderten enzymatischen Aktivität des Proteins, die in einer Produktion und intrazellulären Akkumulation des Metaboliten 2-Hydroxyglutarat (2-HG) resultiert. Die erhöhte 2-HG-Konzentration wiederum inhibiert durch Konkurrenz mit dem Kofaktor α -Ketoglutarat die katalytische Aktivität von *TET2*, einem Enzym, das an der Hydroxymethylierung von Cytosin-Resten in der DNA beteiligt ist (Figueroa et al., 2010). Dadurch bewirken *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen indirekt eine reduzierte Aktivität von *TET2*. Somit haben Mutationen in allen drei Genen überlappende funktionelle Konsequenzen. Dieser zuvor nicht bekannte mechanistische Zusammenhang mag als Beispiel dafür dienen, dass Beobachtungen aus klinisch-translationalen Analysen wichtige Hinweise auf zugrundeliegende funktionelle Interaktionen auf Ebene der Zellbiologie geben können.

In unserer Arbeit zu *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen war außerdem auffällig, dass Patienten mit einer *IDH2*-Mutation an einer spezifischen Aminosäure, dem Arginin an Position 172 (*IDH1* R172), allesamt keinerlei zusätzlichen Mutationen in den damals als prognostisch relevant bekannten Genen *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *WT1* oder *MLL* aufwiesen. Mutationen des *IDH2* Codon 140 oder des *IDH1*-Gens hingegen traten häufig gemeinsam mit diesen anderen Veränderungen auf. Die Sonderrolle der *IDH2* R172-Mutation wurde unlängst in einer großen und umfassend genetisch untersuchten AML -Patientenkohorte bestätigt, die zudem auch eine günstige prognostische Bedeutung dieser Veränderung zeigte (Papaemmanuil et al., 2016). Somit scheint diese spezifische, in der CALGB-Kohorte erstmals beschriebene Mutation wohl eine klinisch und genetisch distinkte Subgruppe von AML-Patienten zu kennzeichnen. Hier führt die klinisch-translational Beobachtung der Sonderstellung der *IDH2* R172-Mutationen wiederum zu einer biologischen Fragestellung, nämlich inwieweit diese spezielle Mutation sich funktionell von anderen *IDH2*- und *IDH1*-Mutationen unterscheidet. Diese Frage ist aktuell noch ungeklärt.

Mutationen in der DNA-Methyltransferase *DNMT3A* wurden erstmals durch Yamashita und Kollegen mittels einer array-basierten Sequenzieretechnik bei der AML entdeckt (Yamashita et al., 2010). *DNMT3A*-Mutationen gehören mit einer Häufigkeit von etwa 35% zu den drei häufigsten Genmutationen bei Patienten mit *de novo*-AML und normalem Karyotyp (Ley et al., 2010). Wir konnten aus dem Patientenkollektiv der CALGB-Studiengruppe die zum damaligen Zeitpunkt größte Kohorte von CN-AML-Patienten auf *DNMT3A*-Mutationen untersuchen (Marcucci et al., 2012). In unserer ersten Analyse zeigten *DNMT3A*-Mutationen zwar einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit einem verkürzten Gesamtüberleben, der absolute Unterschied in

den 3-Jahres-Überlebensraten zwischen *DNMT3A*-mutierten und -unmutierten Patienten war jedoch gering (45% versus 52% für Patienten im Alter <60 Jahren). Bei einer getrennten Untersuchung älterer und jüngerer Patienten (<60 Jahre bzw. ≥60 Jahre) deuteten unsere damaligen Ergebnisse darauf hin, dass Mutationen im Bereich des häufig betroffenen Codons Arginin-882 vor allem bei älteren Patienten mit kürzerem Überleben einhergehen, während bei jüngeren Patienten Mutationen an anderen Positionen, nicht jedoch an Codon R882, einen solchen Zusammenhang zeigten. Dieses Ergebnis wurde in dieser Form jedoch von anderen Studiengruppen nicht bestätigt.

Die britische MRC-Studiengruppe konnte in einer großen Untersuchung an überwiegend jüngeren Patienten mit AML und intermediärem zytogenetischen Risiko jedoch nachweisen, dass *DNMT3A*-Mutationen insgesamt ein ungünstiger Risikofaktor sind – und dies, obwohl bei isolierter Betrachtung Patienten mit und ohne Mutation praktisch identische Überlebenskurven zeigten (Abbildung 12A) (Gale et al., 2015).

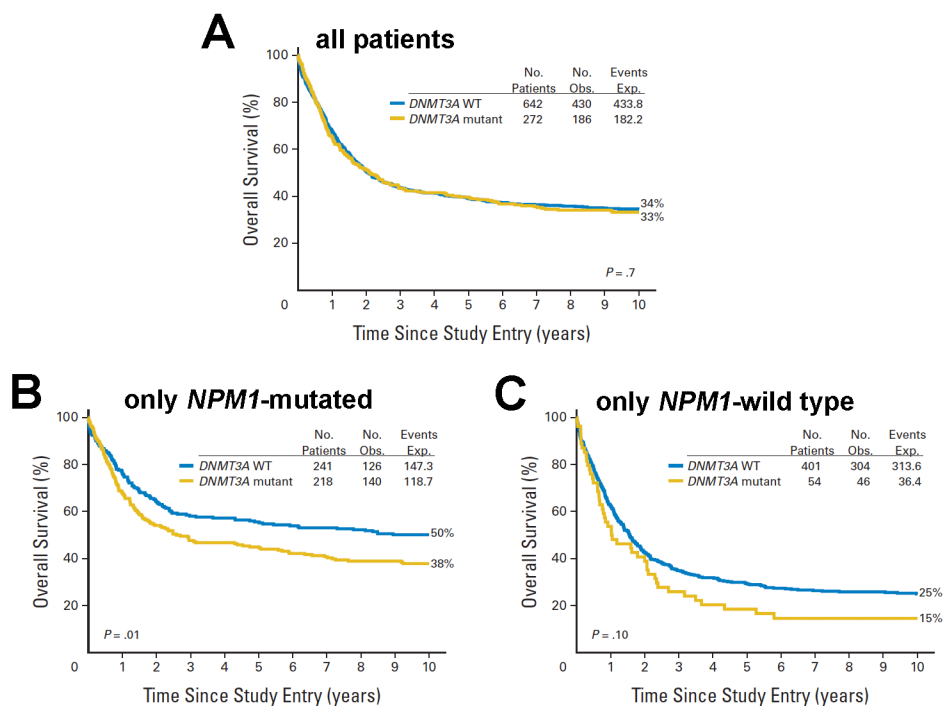


Abbildung 12: „Simpsons Paradox“ und die Bedeutung von *DNMT3A*-Mutationen als prognostischer Marker. A) In der gezeigten britischen MRC-Studienkohorte ist kein Unterschied im Gesamtüberleben *DNMT3A*-mutierter und -unmutierter Patienten erkennbar. B) Innerhalb der Subgruppe mit *NPM1*-Mutation wiesen über 45% der Patienten zusätzlich eine *DNMT3A*-Mutation auf. C) In der -insgesamt prognostisch weniger günstigen- Gruppe ohne *NPM1*-Mutation wiesen nur knapp 12% der Patienten eine *DNMT3A*-Mutation auf. Innerhalb der Subgruppe war die *DNMT3A*-Mutation aber wiederum ein ungünstiger Risikofaktor. Abbildung modifiziert aus Gale et al., 2015.

Der Grund für diesen scheinbaren Widerspruch liegt in der engen Assoziation zwischen *DNMT3A* und einem weiteren Prognosefaktor, nämlich Mutationen im *NPM1*-Gen. Mutationen in beiden Genen treten sehr häufig gemeinsam auf, und *NPM1*-Mutationen sind ihrerseits mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert. Wenn die Subgruppen der Patienten mit und ohne *NPM1*-Mutationen getrennt betrachtet wurden (Abbildung 12B bzw. 12C), dann wurde in jeder Subgruppe jeweils erkennbar, dass Patienten mit mutiertem *DNMT3A*-Gen ein kürzeres Überleben zeigten als diejenigen mit unmutiertem *DNMT3A*. Jedoch traten in der prognostisch insgesamt günstigeren *NPM1*-mutierten Gruppe deutlich mehr *DNMT3A*-Mutationen auf als in der insgesamt betrachtet deutlich ungünstigeren, *NPM1*-unmutierten Gruppe. In Summe führen diese Zusammenhänge dazu, dass bei univariater Analyse die prognostische Relevanz von *DNMT3A* nicht erkennbar ist – ein Phänomen, das auch als „Simpson’s Paradox“ bekannt ist (Gale et al., 2015). Dieses Beispiel soll nochmals verdeutlichen, dass bei der Analyse von molekularen Prognosefaktoren solche Assoziationen und Interaktionen in Betracht gezogen werden müssen, und dass aus diesem Grund die Untersuchung ausreichend großer Kohorten oder Meta-Analysen der Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen notwendig sind.

In späteren eigenen Arbeiten unter Einbeziehung weiterer Genmutationen konnten wir am Patientenkollektiv der AMLCG-Studiengruppe dann ebenfalls nachweisen, dass *DNMT3A*-Mutationen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus anderer Gene einen relevanten ungünstigen Risikofaktor gerade bei jüngeren Patienten darstellen (Metzeler et al., 2016; vgl. Abschnitt 3.2.4).

Neben ihrer möglichen prognostischen Bedeutung sind Mutationen im *DNMT3A*-Gen auch unter therapeutischen Gesichtspunkten von großem Interesse. In den letzten Jahren wurden mit Azacitidin und dessen Deoxy-Derivat Decitabin zwei verschiedene Substanzen für die Therapie der AML zugelassen, deren Wirkmechanismus zumindest teilweise auf einer Inhibition von DNA-Methyltransferasen mit konsekutiver Demethylierung der zellulären DNA beruht. Unter diesem Aspekt liegt die Frage nahe, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus der DNA-Methyltransferase *DNMT3A* und dem Therapieansprechen auf demethylierende Substanzen gibt. Wir konnten dazu eine kleine Kohorte von insgesamt 46 überwiegend älteren Patienten untersuchen, die in Phase-II-Studien an der Ohio State University im Rahmen der Erstlinientherapie einer AML-Erkrankung Decitabin erhalten hatten (Metzeler et al., 2012b). Während die Rate an Komplettremissionen (CR) bei den Patienten ohne

DNMT3A-Mutation bei 34% lag, erreichten immerhin 6 der 8 *DNMT3A*-mutierten Patienten (75%) eine CR ($P=0.008$). Angesichts der sehr geringen Patientenzahl bedarf die Hypothese, dass *DNMT3A*-Mutationen mit einem besserem Ansprechen auf Decitabin einhergehen, selbstverständlich der Validierung in größeren Kohorten. Ähnliche Untersuchungen anderer Studiengruppen konnten unsere Ergebnisse jedoch zumindest teilweise bestätigen. So zeigte eine retrospektive Analyse an 92 Patienten mit MDS oder sAML, dass Mutationen in *DNMT3A* und / oder *TET2* mit einer höheren Ansprechrate auf die Therapie mit demethylierenden Substanzen assoziiert waren (Traina et al., 2014). In einer anderen Studie an 68 AML-Patienten gingen *DNMT3A*-Mutationen ebenfalls mit einer numerisch höheren CR-Rate nach einer Erstlinientherapie mit diesen Substanzen einher (40% gegenüber 22% für Patienten mit Wildtyp-*DNMT3A*), der Unterschied war statistisch aber nicht signifikant (DiNardo et al., 2014). Dagegen fand sich in einer großen Kohorte von 213 MDS-Patienten kein Zusammenhang zwischen dem *DNMT3A*-Mutationsstatus und dem Ansprechen auf demethylierende Therapien (Bejar et al., 2014). Die Gründe für diese divergierenden Ergebnisse können in den unterschiedlichen Einschlusskriterien der zugrundeliegenden Patientenkohorten sowie den unterschiedlichen Therapieschemata liegen. Nachdem in den vergangenen Jahren zwei Phase-III-Studien zur Behandlung der AML bei Patienten im Alter über 65 Jahre mit demethylierenden Substanzen veröffentlicht wurden (Kantarjian et al., 2012 und Dombret et al., 2015), besteht auch weiterhin ein großes Interesse an weiteren Untersuchungen zu prädiktiven Markern für das Therapieansprechen. Entsprechende Daten aus der im letzten Jahr publizierte AML-AZA-001-Studie werden erwartet, sind aktuell jedoch noch nicht verfügbar.

3.2.3 Weitere Arbeiten zu molekularen Risikofaktoren bei der AML

In den oben dargestellten Arbeiten konnten wir erstmals eine prognostische Bedeutung mehrerer neu identifizierter Genmutationen bei Patienten mit AML, und insbesondere für die Subgruppe mit zytogenetisch normaler *de novo* AML nachweisen. Über die geschilderten Untersuchungen zu Mutationen in den epigenetischen Regulator-Gene *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, und *ASXL1* hinaus haben wir an Kohorten der amerikanischen CALGB- wie auch der deutschen AMLCG-Studiengruppe noch eine Reihe weiterer rekurrent mutierter Gene auf ihre klinische und prognostische Relevanz hin untersucht. In zwei unabhängigen Auswertungen beider Studiengruppen wurde so zum Beispiel gezeigt, dass Mutationen im *RUNX1*-Gen vor allem bei älteren Patienten auftreten, und eine Hochrisiko-Patientengruppe mit niedrigen Remissionsraten sowie ungünstigem rezidivfreiem Überleben und Gesamtüberleben markieren (Mendler et al.,

2012; Greif et al., 2012). Außerdem konnten wir an der AMLCG-Patientenkohorte zeigen, dass biallelische (aber nicht monoallelische) Mutationen in *CEBPA* ein günstiger Prognosefaktor bei der CN-AML sind (Dufour et al., 2010). Unter anderem aufgrund dieser Ergebnisse, die auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt wurden, ist die AML mit biallelischen *CEBPA*-Mutationen jüngst als eigenständige Entität in die Klassifikation hämatologischer Neoplasien der Weltgesundheitsorganisation WHO aufgenommen worden (Arber et al., 2016).

Trotz dieser Fortschritte haben bisher aber nur wenige molekulargenetische Marker verbreiteten Eingang in den klinischen Alltag gefunden und nehmen Einfluss auf Therapieentscheidungen. In den 2010 publizierten Empfehlungen des European LeukemiaNet (ELN) zur Diagnose und Therapie der AML fanden nur Mutationen in *NPM1* und *CEBPA* sowie interne Tandemduplikationen in *FLT3* Beachtung (Döhner et al., 2010). In aktuelleren Expertenempfehlungen, und auch in der jüngst publizierten neuen Ausgabe der ELN-Richtlinien werden zwar noch weitere Gene wie *TP53*, *ASXL1* und *RUNX1* in die Risikostratifizierung mit einbezogen (Estey, 2016, Döhner et al., 2016), jedoch beruhen diese Empfehlungen auf retrospektiven Analysen und wurden bisher nicht an unabhängigen Patientenkohorten validiert. Unter diesem Gesichtspunkt hatten wir es uns im Rahmen der AMLCG-Studiengruppe zum Ziel gesetzt, eine große Patientenkohorte möglichst umfassend für die bekannten genetischen Veränderungen zu charakterisieren.

3.2.4 Die komplexe genetische Landschaft der AML und ihre Bedeutung für den klinischen Verlauf der Erkrankung

Ausgewählte eigene Publikationen:

- Metzeler KH et al.: Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016; 128(5):686-698

Um die klinische Relevanz rekurrenter Genmutationen bei der AML zu betrachten, untersuchten wir insgesamt 664 erwachsene AML-Patienten im Alter zwischen 18 und 86 Jahren, die in den Phase-III-Studien AMLCG-1999 und AMLCG-2008 behandelt worden waren und von denen geeignete Biomaterialproben (Blut oder Knochenmark) vom Zeitpunkt der Diagnosestellung verfügbar waren (Metzeler et al., 2016). Wir nutzten eine DNA-Amplifizierungsmethode, um gezielt die kodierenden Sequenzen oder Hotspot-Regionen von 68 Kandidatengenen aus der genomischen DNA anzureichern

und anschließend mittels eines Hochdurchsatz-Sequenzierers (Illumina MiSeq) zu analysieren (sog. „targeted resequencing“). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte über eine von uns eigens etablierte, skriptbasierte Software-Pipeline. Nachdem für die meisten untersuchten Patientenproben kein geeignetes Vergleichsmaterial als Keimbahn-Kontrolle zur Verfügung stand, bestand eine besondere Schwierigkeit in der Unterscheidung zwischen somatischen tumorspezifischen Mutationen und angeborenen Polymorphismen. Zur Abgrenzung wahrscheinlich pathophysiologisch relevanter, leukämie-assoziiierter Mutationen von funktionell neutralen Polymorphismen wurden große, öffentlich verfügbare Varianten-Datenbanken (z.B. 1000 Genomes Project, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) und verschiedene Prognose-Algorithmen (z.B. Mutation Analyzer, SIFT) eingesetzt.

Insgesamt konnten wir so bei über 99% aller untersuchten AML-Patienten eine molekulargenetisch definierte, wahrscheinlich krankheitsrelevante Veränderung („Driver-Mutation“) finden. Besonders auffällig war dabei, dass es eine Gruppe von 8 genetischen Veränderungen gibt, die fast nie gleichzeitig bei demselben Patienten mutiert sind. Zu diesen Veränderungen gehören Translokationen der „core binding factor“ (CBF)-Transkriptionsfaktoren, balancierte Translokationen des *KMT2A*- (*MLL*-) Gens, die chromosomale Inversion *inv(3)(q21q26.2)* bzw. Translokation *t(3;3)(q21;q26.2)* (*GATA2*; *MECOM*-Rearrangement), die Translokation *t(6;9)(p22;q34)* (*DEK-NUP214*-Rearrangement), sowie biallelische Mutationen in *CEBPA* und Mutationen in *TP53*, *NPM1*, oder *RUNX1*. Bei gut 75% aller untersuchten AML-Patienten ließ sich genau eine der genannten Veränderungen nachweisen, diese Patienten konnten somit eindeutig in eine der 8 oben definierten genetischen Untergruppen eingeordnet werden (Abbildung 13A). Bei den meisten verbleibenden Patienten fand sich keine der subgruppen-definierenden Veränderungen, während in nur gut 2% der Fälle mehr als eine dieser Läsionen nachweisbar war ($P < 10^{-80}$ für die Nicht-Überlappung zwischen den Gruppen).

Diese Subgruppen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Prognose deutlich und haben somit auch klinische Relevanz (Abbildung 13B,C). Zwei der so in unserer Arbeit identifizierten, genetisch definierten Subgruppen wurden auch in die WHO-Klassifikation 2016 als neue Entitäten aufgenommen, nämlich die AML mit biallelischer *CEBPA*- und (als „vorläufige“ Entität) die AML mit *RUNX1*-Mutation (Arber et al., 2016). Aus der Beobachtung, dass es zwischen den von uns identifizierten 8 genetischen Untergruppen praktisch keine Überlappung gibt, lässt sich die Hypothese ableiten, dass die subgruppen-definierenden Mutationen kennzeichnend für fundamental unterschiedliche,

und möglicherweise sogar miteinander unvereinbare, Mechanismen der AML-Pathogenese sind.

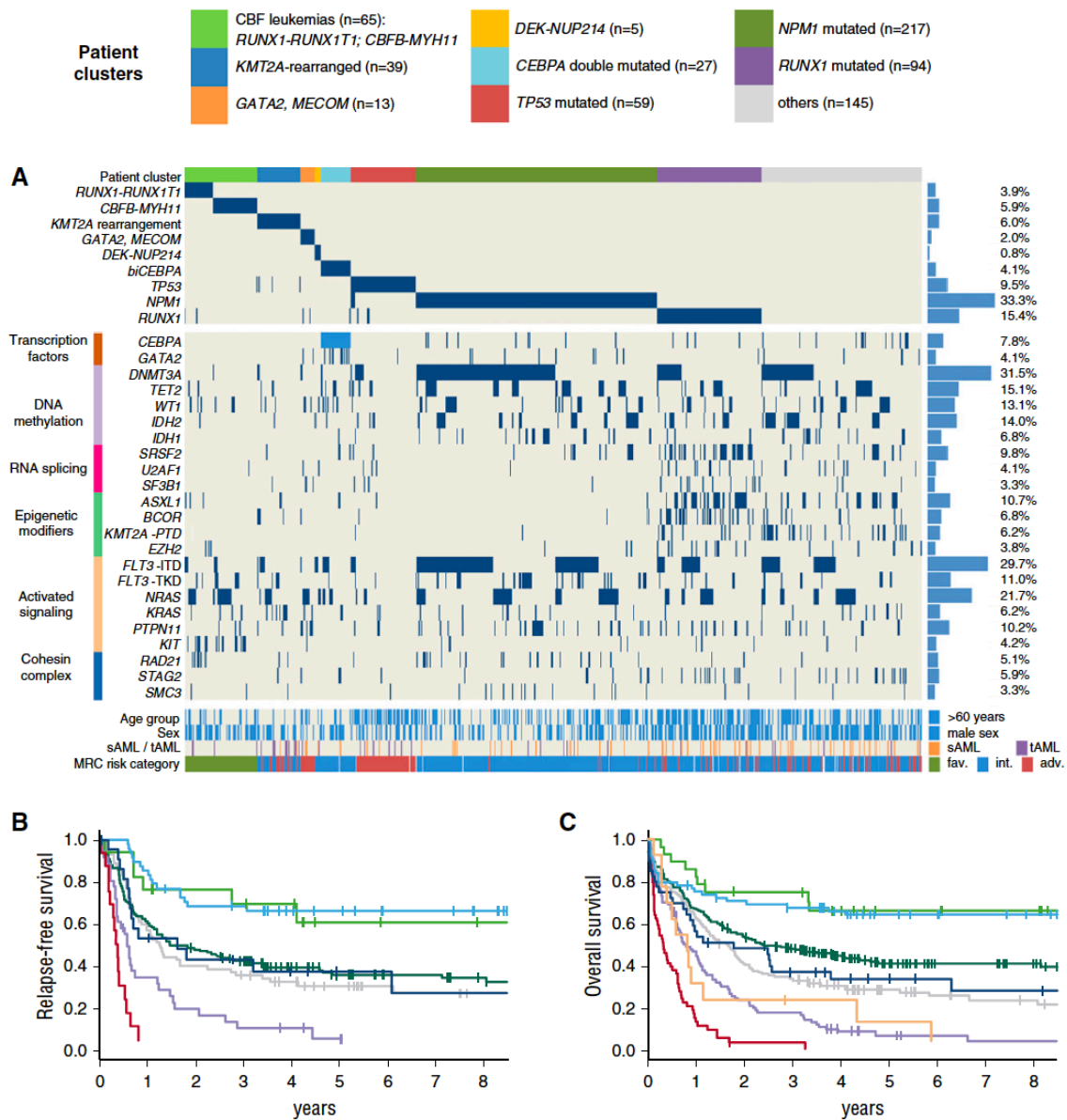


Abbildung 13: Genetische Veränderungen definieren nicht-überlappende Subgruppen von AML-Patienten.

A) Überblick über zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei 664 AML-Patienten. Jede Spalte der Grafik entspricht einem Patienten, ein blaues Feld zeigt den Nachweis der entsprechenden Veränderung an. Im oberen Teil der Grafik sind die 8 genetischen Veränderungen dargestellt, die mittels des MEGSA (mutually exclusive gene set analysis)-Algorithmus als kennzeichnend für nicht-überlappende Patienten-Subgruppen identifiziert wurden. **B)** Rezidivfreies Überleben (relapse-free survival, RFS) und **C)** Gesamtüberleben (overall survival, OS) der so definierten genetischen Subgruppen. Die farbliche Darstellung der Überlebenskurven entspricht der Legende am oberen Rand der Abbildung. Die Subgruppen *DEK-NUP214* (RFS und OS) und *GATA2-MECOM* (RFS) sind wegen der zu geringen Patientenzahl nicht dargestellt. Abbildung aus Metzeler et. al., 2016.

In einer ähnlichen Arbeit unter Beteiligung der deutschen AMLSG-Studiengruppe wurde eine sehr große Kohorte zumeist jüngerer (<60 Jahre) AML-Patienten ebenfalls mittels gezielter Sequenzierung von Kandidatengenomen untersucht. Auch hier wurden molekulare Subgruppen identifiziert, die eine sehr starke Überschneidung mit den von uns definierten Gruppen zeigen, was die Validität der Ergebnisse beider Studien unterstreicht (Papaemmanuil et al., 2016).

Unsere relativ große und einheitlich behandelte Patientenkohorte erlaubte es uns auch, die prognostische Bedeutung rekurrenter Genmutationen zu untersuchen. Aufgrund der komplexen Assoziationen zwischen klinischen Parametern wie z.B. dem Alter, zytogenetischen Veränderungen und molekulargenetischen Mutationen wurden die einzelnen Variablen dabei nicht nur isoliert, sondern auch gemeinsam im Rahmen multivariater Modelle untersucht. Hier konnten wir zeigen, dass neben schon etablierten genetischen Prognosefaktoren (z.B. Zytogenetik, biallelische *CEBPA*-Mutationen und die Kombination aus *NPM1*-Mutation und Negativität für *FLT3-ITD*) auch Mutationen in *DNMT3A* und *RUNX1* einen ungünstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben haben. (Abbildung 14). Zudem zeigte sich eine Interaktion mit dem Patientenalter, so dass der ungünstige Einfluss dieser beiden Veränderungen insbesondere bei jüngeren Patienten mit Intermediärrisiko-Karyotyp zu beobachten war (Abbildung 15). Darüber hinaus konnten wir auch die extrem ungünstige prognostische Wertigkeit von *TP53*-Mutationen bei der AML bestätigen (Kihara et al., 2014; Rucker et al., 2012).

Die Bedeutung dieser Arbeit liegt in der umfassenden Charakterisierung genetischer „Driver-Veränderungen“ in einer homogen behandelten Patientenkohorte, die einen hohen Anteil älterer Patienten umfasst – eine klinisch wichtige Patientengruppe, die in ähnlichen Studien oft unterrepräsentiert ist. Künftig sollen diese Daten einen Beitrag zur Weiterentwicklung von Modellen zur Prognoseabschätzung und Risikostratifizierung leisten – eine Herausforderung, die aber wahrscheinlich nur in einer Kooperation mehrerer Studiengruppen zu bewältigen ist.

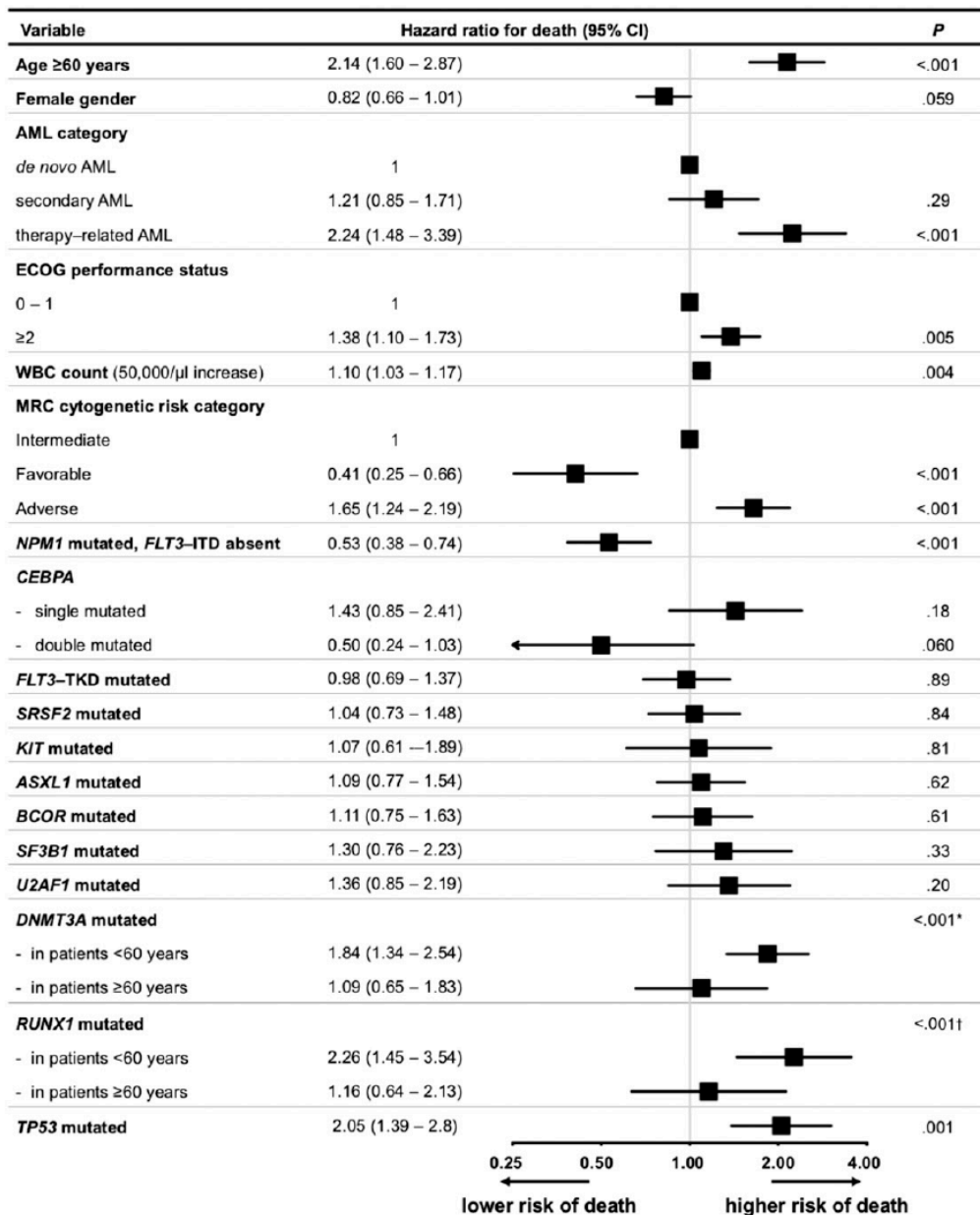


Abbildung 14: Multivariate Analyse für das Gesamtüberleben. Untersucht wurden 664 AML-Patienten der AMLCG-Studiengruppe. Abbildung aus Metzeler et. al., 2016.

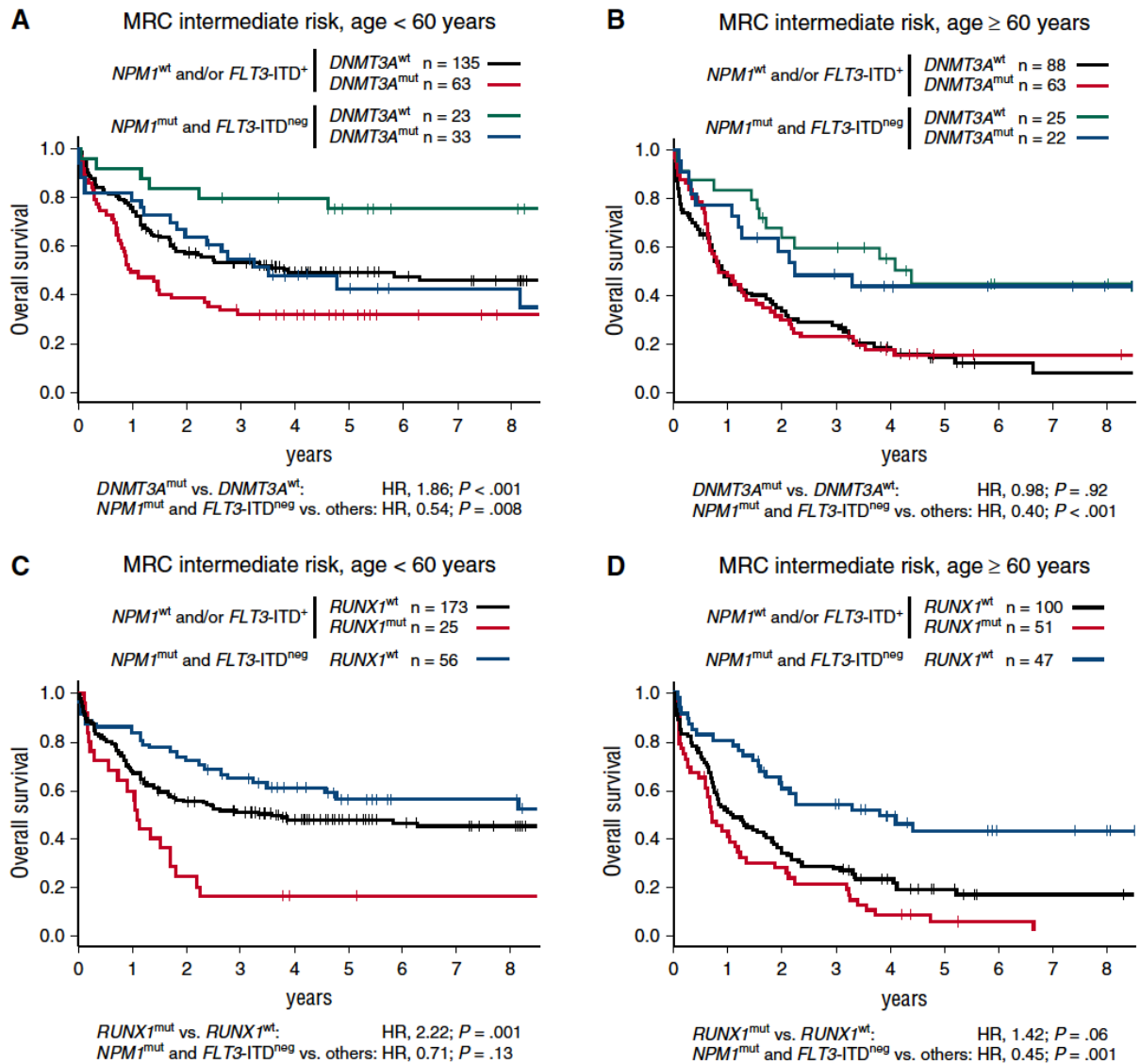


Abbildung 15: Genmutationen und Gesamtüberleben von AML-Patienten mit intermediärem zytogenetischem Risikoprofil. A) Einfluss von *DNMT3A*-Mutationen bei Patienten <60 Jahre. B) Einfluss von *DNMT3A*-Mutationen bei Patienten ≥ 60 Jahre C) Einfluss von *RUNX1*-Mutationen bei Patienten <60 Jahre. D) Einfluss von *RUNX1*-Mutationen bei Patienten ≥ 60 Jahre. Alle Analysen sind stratifiziert bezüglich des Mutationsstatus für *NPM1* und *FLT3-ITD*. Abbildung aus Metzeler et. al., 2016.

3.3 Diskussion und Ausblick

Im klinischen Alltag besteht die Herausforderung bei der Interpretation genetischer Risikofaktoren darin, dass einzelne Patienten häufig eine komplexe Kombination unterschiedlicher genetischer Veränderungen aufweisen (Abbildung 16). Wenn manche dieser Veränderungen in retrospektiven Analysen mit einer günstigen, und andere Läsionen mit einer ungünstigen Prognose in Verbindung gebracht wurden, dann stellt sich für den individuellen Patienten die Frage, wie der gefundene Genotyp in seiner Gesamtheit zu bewerten ist. Die Entwicklung neuer, validierter und klinisch nutzbarer Modelle zur Risikostratifizierung, die den Gesamtkontext einer Vielzahl potentieller genetischer und klinischer Risikofaktoren mit einbeziehen, ist daher ein wichtiges Ziel und gleichzeitig eine immense Herausforderung. Statistische Abschätzungen lassen den Schluss zu, dass für die Entwicklung solcher Modelle sehr große Patientenkohorten von ≥ 10.000 Patienten nötig sind, um auch den Einfluss seltener Risikofaktoren und deren mögliche Interaktionen erfassen zu können (Gerstung et al., 2015). Daher werden solche Analysen nur durch die internationale Zusammenarbeit vieler Studiengruppen möglich sein, und wir hoffen, mit unseren Untersuchungen einen Beitrag zu diesem Vorhaben leisten zu können.

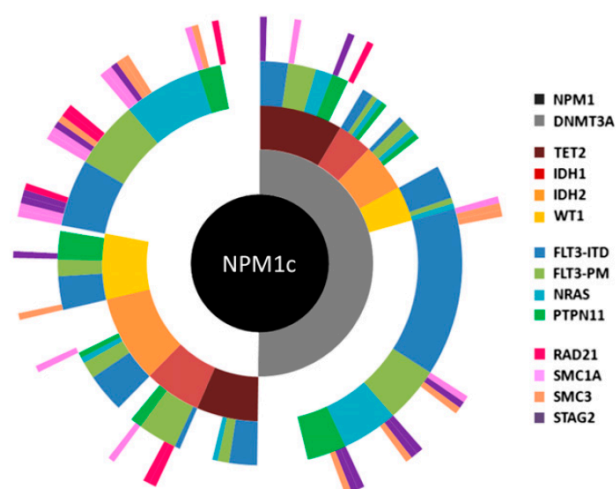


Abbildung 16: Genetische Komplexität der AML.

Graphische Darstellung der Mutationskombinationen bei 224 AML-Patienten mit *NPM1*-Mutation. Jede „Speiche“ des Kreisdiagrammes entspricht einem Patienten, und jedes gefärbte Kreissegment einer zusätzlichen Mutation entsprechend der Legende. Die Abbildung soll verdeutlichen, dass auch in einer früher als relativ „homogen“ wahrgenommene Patientengruppe in Wirklichkeit zahlreiche Kombinationen verschiedener Mutationen vertreten sind. Abbildung aus Grimwade et al., 2016.

4 AKTUELLE ENTWICKLUNG UND ZUKÜNFTIGE PERSPEKTIVEN

Aufbauend auf der in unserer Arbeitsgruppe genetisch charakterisierten großen AML-Patientenkohorte bearbeiten wir derzeit Fragestellungen zum Thema klonale Heterogenität und klonale Evolution bei der AML. Wie in der Einleitung kurz dargestellt, wurde in den letzten Jahren in zahlreichen Untersuchungen deutlich, dass eine AML-Zellpopulation nicht im strengen Sinn monoklonal ist. Vielmehr koexistieren bei vielen Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mehrere Subklone, die zwar von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen, sich aber in einem Teil ihrer genetischen Veränderungen unterscheiden (Ding et al., 2012). Diese heterogene Leukämiezellpopulation entwickelt sich zudem im Zeitverlauf in einem evolutionären Prozess weiter. Eine antileukämische Therapie übt in diesem System einen Selektionsdruck aus. Dadurch kann die klonale Architektur der Erkrankung beeinflusst werden, und es kann zu einer Selektion besonders aggressiver oder therapieresistenter Klone kommen (Landau et al., 2014). Ein besseres Verständnis der klonalen Diversität und evolutionärer Prozesse während der Entstehung und Therapie einer AML ist also von unmittelbarer Bedeutung für die weitere Entwicklung effektiverer Behandlungsstrategien.

Unsere aktuellen Arbeiten in diesem Themenbereich werden deswegen von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereiches (SFB) 1243 „Genetic and Epigenetic Evolution of Hematopoietic Neoplasms“ gefördert. Mit unseren Kooperationspartnern innerhalb dieses SFB arbeiten wir unter anderem an der Etablierung und Validierung neuer Modellsysteme, die eine kontrollierte Untersuchung evolutionärer Vorgänge bei der AML und eine funktionelle Charakterisierung subklonaler genetischer Veränderungen ermöglichen sollen. Eine wichtige Rolle spielt hier für uns die Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Jeremias, in der Xenografts (Patient-derived xenografts, Pdx) von humanen primären AML-Zellen in immundefizienten Mäusen etabliert wurden. Diese Pdx-Zellen können anschließend mittels lentiviraler Transduktion genetisch manipuliert werden (Vick et al., 2015). Außerdem unterstützen wir mit unserer Expertise im Bereich translationale Genetik andere Arbeitsgruppen innerhalb der Medizinischen Klinik III der LMU München (Arbeitsgruppen Prof. Subklewe und Prof. Spiekermann), die Untersuchungen zu neuen molekular zielgerichteten Therapieansätzen einschließlich der Immuntherapie durchführen (Krupka et al., 2014; Sandhöfer et al., 2015).

Eines unserer ersten eigenen Ergebnisse aus dem neuen inhaltlichen Schwerpunkt „Klonale Heterogenität“ ist eine Untersuchung zur Bedeutung präleukämischer Klone bei AML-Patienten in Remission. Untersuchungen anderer Gruppen hatten gezeigt, dass bei einem Teil der AML-Patienten, die nach einer Chemotherapie eine Remission ihrer Erkrankung erreichen, im Knochenmark weiterhin präleukämische Klone nachweisbar sind (Shlush et al., 2014; Corces-Zimmerman et al., 2014). Diese präleukämischen Klone sind zu einer morphologisch normalen Zelldifferenzierung fähig, tragen aber einen Teil der somatischen Mutationen in sich, die auch zum Zeitpunkt der AML-Diagnosestellung nachweisbar waren. Man geht daher davon aus, dass es sich evolutionär gesehen um Vorläufer des AML-Klons handelt. In solchen präleukämischen Klonen finden sich häufig Mutationen in den epigenetischen Regulatoren *DNMT3A*, *TET2* oder *ASXL1*. Mutationen in diesen Genen werden auch bei phänotypisch gesunden, alten Menschen mit klonaler Hämatopoese gefunden (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014). Persistierende präleukämische Klone könnten bei AML-Patienten möglicherweise einen Ausgangspunkt für ein späteres Krankheitsrezidiv darstellen. Eine kürzlich publizierte Studie berichtete in der Tat über einen Zusammenhang zwischen der Persistenz Leukämie-assoziiertes Mutationen bei AML-Patienten in Remission und einem kürzeren krankheitsfreien Überleben (Klco et al., 2015).

Aus unserer eigenen Patientenkohorte konnten wir zu dieser Fragestellung 107 Patienten untersuchen, die in der Phase-III-Studie AMLCG-2008 behandelt wurden und eine komplette Remission ihrer Erkrankung erreicht hatten (Rothenberg-Thurley et al., Plenarvortrag beim 21. Kongress der European Hematology Association, Kopenhagen, Juni 2016). Durch eine vergleichende Untersuchung von Proben vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und nach Therapie konnten wir bei 37% die Persistenz mindestens einer AML-assoziierten Mutation während der Remission nachweisen. Am häufigsten persistierten Mutationen in *DNMT3A* (62% der bei Diagnosestellung gefundenen Mutationen), *TET2* (69%), *SRSF2* (63%) und *ASXL1* (42%). Andere, in der AML-Probe häufig koexistierende Mutationen in Genen wie zum Beispiel *NPM1*, *FLT3*, *WT1* oder *NRAS* waren in der jeweiligen Remissionsprobe regelhaft nicht nachweisbar. Diese Daten belegen, dass die beobachteten persistierenden Mutationen tatsächlich einem präleukämischen Klon entsprechen und nicht residuellen AML-Zellen. Patienten mit Nachweis mindestens einer persistierenden Mutation waren im Median deutlich älter als Patienten ohne Mutationspersistenz. Vor allem aber zeigten Patienten, bei denen während der Remission mindestens eine persistierende Mutation nachweisbar war, ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben als Patienten, bei denen in der Remissionsprobe keine Mutationen mehr nachweisbar waren. Dieser

Unterschied war besonders ausgeprägt bei Patienten, die keine allogene Stammzelltransplantation erhalten hatten. Auch in einer multivariaten Analyse, in die Alter und die zytogenetische Risikogruppe als Kovariablen eingingen, bestätigte sich die prognostische Bedeutung der Mutationspersistenz. Wir stellten aufgrund dieser Daten die Hypothese auf, dass bei vielen älteren Patienten eine AML-Erkrankung aus einem nachweisbaren präleukämischen Klon hervorgeht, und dass dieser Klon nach einer Leukämie-Therapie häufig im Knochenmark persistiert. Aus klinischer Sicht könnte die mit dem Alter zunehmende Häufigkeit solcher persistierender präleukämischer Klone ein möglicher Grund für die schlechteren Therapieergebnisse bei älteren AML-Patienten sein. Wir wollen zukünftig unter anderem die Mechanismen untersuchen, durch die solche präleukämischen Klone zum Erkrankungsrezidiv beitragen.

5 DANKSAGUNG

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet, die mich auf meinem Weg stets begleitet, gefördert und unterstützt haben. Ich bin ihnen sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann, an dessen Klinik ein großer Teil der hier vorgestellten Arbeiten entstanden ist, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und seine Unterstützung über die vergangenen 10 Jahre. Das durchweg positive Arbeitsumfeld an der Medizinischen Klinik III hat mich immer wieder motiviert, als klinisch tätiger Arzt die Herausforderungen einer wissenschaftlichen Tätigkeit anzunehmen. Ebenso danke ich meinen Mentoren Prof. Clara Bloomfield, Prof. Guido Marcucci und Prof. Stefan Bohlander für Ihre bis heute andauernde, kontinuierliche Förderung und ihren wertvollen Rat.

Die hier vorgestellten Arbeiten wären ohne die Mithilfe zahlreicher Kolleginnen und Kollegen aus München und Columbus/Ohio und die Beiträge unserer verschiedenen Kooperationspartner nicht zustande gekommen. Besonders danken möchte ich hier meinen Kollegen Dr. Heiko Becker und Dr. Tobias Herold für die langjährige, intensive Zusammenarbeit und viele spannende und motivierende Diskussionen. Ein großer Dank geht auch an Frau Dr. Maja Rothenberg-Thurley, die in den letzten Jahren viel zur Weiterentwicklung unserer Projekte beigetragen hat, sowie an Frau Dr. Stephanie Schneider, Frau Prof. Dr. Marion Subklewe und Herr Prof. Dr. Karsten Spiekermann und die übrigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter im Labor für Leukämiediagnostik.

Schließlich danke ich Frau Luise Hartmann für ihre Unterstützung, ihr Vertrauen und ihr Verständnis, mit dem sie mich in den letzten Jahren begleitet hat.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alachkar, H., Mutonga, M.B.G., Metzeler, K., Fulton, N., Malnassy, G., Herold, T., Spiekermann, K., Bohlander, S.K., Hiddemann, W., Matsuo, Y., Stock, W. & Nakamura, Y. (2014) Preclinical efficacy of maternal embryonic leucine-zipper kinase (MELK) inhibition in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 5 (23), 12371–12382.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A.J.R., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A.P., Caldas, C., Davies, H.R., Desmedt, C., Eils, R., Eyfjörd, J.E., Foekens, J.A., et al. (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 500 (7463), 415–421.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M. & Vardiman, J.W. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 127 (20), 2391–2405.
- Arthur, D.C., Berger, R., Golomb, H.M., Swansbury, G.J., Reeves, B.R., Alimena, G., Van den Berghe, H., Bloomfield, C.D., La Chapelle, De, A. & Dewald, G.W. (1989) The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 40 (2), 203–216.
- Baldus, C.D., Tanner, S.M., Ruppert, A.S., Whitman, S.P., Archer, K.J., Marcucci, G., Caligiuri, M.A., Carroll, A.J., Vardiman, J.W., Powell, B.L., Allen, S.L., Moore, J.O., Larson, R.A., Kolitz, J.E., la Chapelle, de, A. & Bloomfield, C.D. (2003) BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 102 (5), 1613–1618.
- Bejar, R., Lord, A., Stevenson, K., Bar-Natan, M., Pérez-Ladaga, A., Zaneveld, J., Wang, H., Caughey, B., Stojanov, P., Getz, G., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Chen, R., Stone, R.M., Neuberg, D., Steensma, D.P. & Ebert, B.L. (2014) TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 124 (17), 2705–2712.
- Bullinger, L., Döhner, K., Bair, E., Fröhling, S., Schlenk, R.F., Tibshirani, R., Döhner, H. & Pollack, J.R. (2004) Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 350 (16), 1605–1616.
- Byrd, J.C., Mrózek, K., Dodge, R.K., Carroll, A.J., Edwards, C.G., Arthur, D.C., Pettenati, M.J., Patil, S.R., Rao, K.W., Watson, M.S., Koduru, P.R.K., Moore, J.O., Stone R.M., Mayer, R.J., Feldman, E.J., Davey, F.R., Schiffer, C.A., Larson, R.A. & Bloomfield, C.D. (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 (13), 4325–4336.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 368 (22), 2059–2074.

- Corces-Zimmerman, M.R., Hong, W.-J., Weissman, I.L., Medeiros, B.C. & Majeti, R. (2014) Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111 (7), 2548–2553.
- Delhommeau, F., Dupont, S., Valle, Della, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., Lécluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F.J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S.P., Dessen, P., Soulier, J., et al. (2009) Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England Journal of Medicine*. 360 (22), 2289–2301.
- Diffner, E., Beck, D., Gudgin, E., Thoms, J.A.I., Knezevic, K., Pridans, C., Foster, S., Goode, D., Lim, W.K., Boelen, L., Metzeler, K., Micklem, G., Bohlander, S.K., Buske, C., Burnett, A.K., Ottersbach, K., Vassiliou, G.S., Olivier, J., Wong, J.W.H., Gottgens, B., Huntley, B.J. & Pimanda, J.E. (2013) Activity of a heptad of transcription factors is associated with stem cell programs and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*. 121 (12), 2289–2300.
- DiNardo, C.D., Patel, K.P., Garcia-Manero, G., Luthra, R., Pierce, S., Borthakur, G., Jabbour, E., Kadia, T., Pemmaraju, N., Konopleva, M., Faderl, S., Cortes, J., Kantarjian, H.M. & Ravandi, F. (2014) Lack of association of IDH1, IDH2 and DNMT3A mutations with outcome in older patients with acute myeloid leukemia treated with hypomethylating agents. *Leukemia & Lymphoma*. 55 (8), 1925–1929.
- Ding, L., Ley, T.J., Larson, D.E., Miller, C.A., Koboldt, D.C., Welch, J.S., Ritchey, J.K., Young, M.A., Lamprecht, T., McLellan, M.D., McMichael, J.F., Wallis, J.W., Lu, C., Shen, D., Harris, C.C., Dooling, D.J., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Chen, K., et al. (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 481 (7382), 506–510.
- Dombret, H., Seymour, J.F., Butrym, A., Wierzbowska, A., Selleslag, D., Jang, J.H., Kumar, R., Cavenagh, J., Schuh, A.C., Candoni, A., Recher, C., Sandhu, I., del Castillo, T.B., Al-Ali, H.K., Martinelli, G., Falantes, J., Noppeney, R., Stone, R.M., Minden, M.D., et al. (2015) International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with $\geq 30\%$ blasts. *Blood*. 126 (3), 291–299.
- Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M.A., Sierra, J., Tallman, M.S., Löwenberg, B. & Bloomfield, C.D. (2010) Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 115 (3), 453–474.
- Döhner, H., Weisdorf, D.J. & Bloomfield, C.D. (2015) Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 373 (12), 1136–1152.
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H., Wei, A. H., Löwenberg, B., & Bloomfield, C. D. (2016). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. doi: blood-2016-08-733196 [Epub ahead of print].

- Dufour, A., Schneider, F., Metzeler, K., Hoster, E., Schneider, S., Zellmeier, E., Benthaus, T., Sauerland, M.-C., Berdel, W.E., Büchner, T., Wörmann, B., Braess, J., Hiddemann, W., Bohlander, S.K. & 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. *Journal of Clinical Oncology*. 28 (4), 570–577.
- Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E.R., Waldron, L., Nilsson, B., van Galen, P., Metzeler, K., Poepl, A., Ling, V., Beyene, J., Canty, A.J., Danska, J.S., Bohlander, S.K., Buske, C., Minden, M.D., Golub, T.R., Jurisica, I., Ebert, B.L. & Dick, J.E. (2011) Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature Medicine*. 17 (9), 1086–1093.
- Estey, E. (2016) Acute myeloid leukemia: 2016 Update on risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*. 91 (8), 824–846.
- Figuroa, M.E., Abel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., Tallman, M.S., Sun, Z., Wolniak, K., Peeters, J.K., Liu, W., Choe, S.E., Fantin, V.R., Paietta, E., Löwenberg, B., et al. (2010) Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 18 (6), 553–567.
- Gaidzik, V.I., Paschka, P., Späth, D., Habdank, M., Köhne, C.-H., Germing, U., Lilienfeld-Toal, von, M., Held, G., Horst, H.-A., Haase, D., Bentz, M., Götze, K., Döhner, H., Schlenk, R.F., Bullinger, L. & Döhner, K. (2012) TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. *Journal of Clinical Oncology*. 30 (12), 1350–1357.
- Gale, R.E., Lamb, K., Allen, C., El-Sharkawi, D., Stowe, C., Jenkinson, S., Tinsley, S., Dickson, G., Burnett, A.K., Hills, R.K. & Linch, D.C. (2015) Simpson's Paradox and the Impact of Different DNMT3A Mutations on Outcome in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 33 (18), 2072–2083.
- Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Adélaïde, J., Bonansea, J., Cervera, N., Carbuccia, N., Lagarde, A., Prebet, T., Nezri, M., Sainty, D., Olschwang, S., Xerri, L., Chaffanet, M., Mozziconacci, M.-J., Vey, N. & Birnbaum, D. (2009) Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 145 (6), 788–800.
- Genovese, G., Kähler, A.K., Handsaker, R.E., Lindberg, J., Rose, S.A., Bakhoum, S.F., Chambert, K., Mick, E., Neale, B.M., Fromer, M., Purcell, S.M., Svantesson, O., Landén, M., Höglund, M., Lehmann, S., Gabriel, S.B., Moran, J.L., Lander, E.S., Sullivan, P.F., et al. (2014) Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England Journal of Medicine*. 371 (26), 2477–2487.
- Gerstung, M., Papaemmanuil, E., Martincorena, I., Bullinger, L., Gaidzik, V.I., Paschka, P., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., Ganly, P., Ganser, A., McDermott, U., Stratton, M.R., Döhner, K., Döhner, H., Schlenk, R.F. & Campbell, P.J. (2015) Personally Tailored Risk Prediction of AML Based on Comprehensive Genomic and Clinical Data [Abstract]. *Blood*. 126 (23), 85–85.

- Gilliland, D.G. & Griffin, J.D. (2002) The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 100 (5), 1532–1542.
- Greif, P.A., Konstandin, N.P., Metzeler, K., Herold, T., Pasalic, Z., Ksienzyk, B., Dufour, A., Schneider, F., Schneider, S., Kakadia, P.M., Braess, J., Sauerland, M.-C., Berdel, W.E., Büchner, T., Woermann, B.J., Hiddemann, W., Spiekermann, K. & Bohlander, S.K. (2012) RUNX1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are associated with a poor prognosis and up-regulation of lymphoid genes. *Haematologica*. 97 (12), 1909–1915.
- Grimwade, D., Ivey, A. & Huntly, B.J.P. (2016) Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 127 (1), 29–41.
- Herold, T., Jurinovic, V., Metzeler, K.H., Batcha, A., Bamopoulos, S.A., Rothenberg-Thurley, M., Ksienzyk, B., Hartmann, L., Greif, P.A., Philippou-Massier, J., Krebs, S., Krebs, B., Blum, H., Amler, S., Schneider, S., Sauerland, M.C., Görlich, D., Büchner, T., Berdel, W.E., et al. (2016) PS29MRC - a Novel Predictive Score for Response to Therapy in Acute Myeloid Leukemia [Abstract]. *Blood*. 128 (22), 1209.
- Jaiswal, S., Fontanillas, P., Flannick, J., Manning, A., Grauman, P.V., Mar, B.G., Lindsley, R.C., Mermel, C.H., Burt, N., Chavez, A., Higgins, J.M., Moltchanov, V., Kuo, F.C., Kluk, M.J., Henderson, B., Kinnunen, L., Koistinen, H.A., Ladenvall, C., Getz, G., et al. (2014) Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *The New England Journal of Medicine*. 371 (26), 2488–2498.
- Kantarjian, H.M., Thomas, X.G., Dmoszynska, A., Wierzbowska, A., Mazur, G., Mayer, J., Gau, J.-P., Chou, W.-C., Buckstein, R., Cermak, J., Kuo, C.-Y., Oriol, A., Ravandi, F., Faderl, S., Delaunay, J., Lysák, D., Minden, M. & Arthur, C. (2012) Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 30 (21), 2670–2677.
- Kihara, R., Nagata, Y., Kiyoi, H., Kato, T., Yamamoto, E., Suzuki, K., Chen, F., Asou, N., Ohtake, S., Miyawaki, S., Miyazaki, Y., Sakura, T., Ozawa, Y., Usui, N., Kanamori, H., Kiguchi, T., Imai, K., Uike, N., Kimura, F., et al. (2014) Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 28 (8), 1586–1595.
- Klco, J.M., Miller, C.A., Griffith, M., Petti, A., Spencer, D.H., Ketkar-Kulkarni, S., Wartman, L.D., Christopher, M., Lamprecht, T.L., Helton, N.M., Duncavage, E.J., Payton, J.E., Baty, J., Heath, S.E., Griffith, O.L., Shen, D., Hundal, J., Chang, G.S., Fulton, R., et al. (2015) Association Between Mutation Clearance After Induction Therapy and Outcomes in Acute Myeloid Leukemia. *JAMA*. 314 (8), 811–822.
- Krupka, C., Kufer, P., Kischel, R., Zugmaier, G., Bögeholz, J., Köhnke, T., Lichtenegger, F.S., Schneider, S., Metzeler, K., Fiegl, M., Spiekermann, K., Baeuerle, P.A., Hiddemann, W., Riethmüller, G. & Subklewe, M. (2014) CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. *Blood*. 123 (3), 356–365.
- Kuhnl, A., Gökbüget, N., Kaiser, M., Schlee, C., Stroux, A., Burmeister, T., Mochmann, L.H., Hoelzer, D., Hofmann, W.-K., Thiel, E. & Baldus, C.D. (2011) Overexpression of LEF1 predicts unfavorable outcome in adult patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 118 (24), 6362–6367.

- Landau, D.A., Carter, S.L., Getz, G. & Wu, C.J. (2014) Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia*. 28 (1), 34–43.
- Langemeijer, S.M.C., Kuiper, R.P., Berends, M., Knops, R., Aslanyan, M.G., Massop, M., Stevens-Linders, E., van Hoogen, P., van Kessel, A.G., Raymakers, R.A.P., Kamping, E.J., Verhoef, G.E., Verburch, E., Hagemeijer, A., Vandenberghe, P., de Witte, T., van der Reijden, B.A. & Jansen, J.H. (2009) Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics*. 41 (7), 838–842.
- Langer, C., Radmacher, M.D., Ruppert, A.S., Whitman, S.P., Paschka, P., Mrózek, K., Baldus, C.D., Vukosavljevic, T., Liu, C.-G., Ross, M.E., Powell, B.L., la Chapelle, de, A., Kolitz, J.E., Larson, R.A., Marcucci, G. & Bloomfield, C.D. (2008) High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood*. 111 (11), 5371–5379.
- Langer, C., Marcucci, G., Holland, K.B., Radmacher, M.D., Maharry, K., Paschka, P., Whitman, S.P., Mrózek, K., Baldus, C.D., Vij, R., Powell, B.L., Carroll, A.J., Kolitz, J.E., Caligiuri, M.A., Larson, R.A. & Bloomfield, C.D. (2009) Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *Journal of Clinical Oncology*. 27 (19), 3198–3204.
- Ley, T.J., Mardis, E.R., Ding, L., Fulton, B., McLellan, M.D., Chen, K., Dooling, D., Dunford-Shore, B.H., McGrath, S., Hickenbotham, M., Cook, L., Abbott, R., Larson, D.E., Koboldt, D.C., Pohl, C., Smith, S., Hawkins, A., Abbott, S., Locke, D., et al. (2008) DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 456 (7218), 66–72.
- Ley, T.J., Ding, L., Walter, M.J., McLellan, M.D., Lamprecht, T., Larson, D.E., Kandoth, C., Payton, J.E., Baty, J., Welch, J., Harris, C.C., Lichti, C.F., Townsend, R.R., Fulton, R.S., Dooling, D.J., Koboldt, D.C., Schmidt, H., Zhang, Q., Osborne, J.R., et al. (2010) DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 363 (25), 2424–2433.
- Marcucci, G., Baldus, C.D., Ruppert, A.S., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Whitman, S.P., Kolitz, J.E., Edwards, C.G., Vardiman, J.W., Powell, B.L., Baer, M.R., Moore, J.O., Perrotti, D., Caligiuri, M.A., Carroll, A.J., Larson, R.A., la Chapelle, de, A. & Bloomfield, C.D. (2005) Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology*. 23 (36), 9234–9242.
- Marcucci, G., Maharry, K., Whitman, S.P., Vukosavljevic, T., Paschka, P., Langer, C., Mrózek, K., Baldus, C.D., Carroll, A.J., Powell, B.L., Kolitz, J.E., Larson, R.A. & Bloomfield, C.D. (2007) High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*. 25 (22), 3337–3343.

- Marcucci, G., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Vukosavljevic, T., Paschka, P., Whitman, S.P., Langer, C., Baldus, C.D., Liu, C.-G., Ruppert, A.S., Powell, B.L., Carroll, A.J., Caligiuri, M.A., Kolitz, J.E., Larson, R.A. & Bloomfield, C.D. (2008) Prognostic significance of, and gene and microRNA expression signatures associated with, CEBPA mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*. 26 (31), 5078–5087.
- Marcucci, G., Maharry, K., Wu, Y.Z., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Margeson, D., Holland, K.B., Whitman, S.P., Becker, H., Schwind, S., Metzeler, K., Powell, B.L., Carter, T.H., Kolitz, J.E., Wetzler, M., Carroll, A.J., Baer, M.R., Caligiuri, M.A., Larson, R.A., et al. (2010) IDH1 and IDH2 Gene Mutations Identify Novel Molecular Subsets Within De Novo Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*. 28 (14), 2348–2355.
- Marcucci, G., Metzeler, K., Schwind, S., Becker, H., Maharry, K., Mrózek, K., Radmacher, M.D., Kohlschmidt, J., Nicolet, D., Whitman, S.P., Wu, Y.-Z., Powell, B.L., Carter, T.H., Kolitz, J.E., Wetzler, M., Carroll, A.J., Baer, M.R., Moore, J.O., Caligiuri, M.A., et al. (2012) Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 30 (7), 742–750.
- Mardis, E.R., Ding, L., Dooling, D.J., Larson, D.E., McLellan, M.D., Chen, K., Koboldt, D.C., Fulton, R.S., Delehaunty, K.D., McGrath, S.D., Fulton, L.A., Locke, D.P., Magrini, V.J., Abbott, R., Vickery, T.L., Reed, J.S., Robinson, J.S., Wylie, T., Smith, S.M., et al. (2009) Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *The New England Journal of Medicine*. 361 (11), 1058–1066.
- Mendler, J.H., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Becker, H., Metzeler, K., Schwind, S., Whitman, S.P., Khalife, J., Kohlschmidt, J., Nicolet, D., Powell, B.L., Carter, T.H., Wetzler, M., Moore, J.O., Kolitz, J.E., Baer, M.R., Carroll, A.J., Larson, R.A., et al. (2012) RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. *Journal of Clinical Oncology*. 30 (25), 3109–3118.
- Metzeler, K., Hummel, M., Bloomfield, C.D., Spiekermann, K., Braess, J., Sauerland, M.-C., Heinecke, A., Radmacher, M., Marcucci, G., Whitman, S.P., Maharry, K., Paschka, P., Larson, R.A., Berdel, W.E., Büchner, T., Wörmann, B., Mansmann, U., Hiddemann, W., Bohlander, S.K. & Buske, C. (2008) An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 112 (10), 4193–4201.
- Metzeler, K., Dufour, A., Benthaus, T., Hummel, M., Sauerland, M.-C., Heinecke, A., Berdel, W.E., Büchner, T., Wörmann, B., Mansmann, U., Braess, J., Spiekermann, K., Hiddemann, W., Buske, C. & Bohlander, S.K. (2009) ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays. *Journal of Clinical Oncology*. 27 (30), 5031–5038.

- Metzeler, K., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Margeson, D., Becker, H., Curfman, J., Holland, K.B., Schwind, S., Whitman, S.P., Wu, Y.Z., Blum, W., Powell, B.L., Carter, T.H., Wetzler, M., Moore, J.O., Kolitz, J.E., Baer, M.R., Carroll, A.J., et al. (2011a) TET2 Mutations Improve the New European LeukemiaNet Risk Classification of Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*. 29 (10), 1373–1381.
- Metzeler, K., Becker, H., Maharry, K., Radmacher, M.D., Kohlschmidt, J., Mrózek, K., Nicolet, D., Whitman, S.P., Wu, Y.-Z., Schwind, S., Powell, B.L., Carter, T.H., Wetzler, M., Moore, J.O., Kolitz, J.E., Baer, M.R., Carroll, A.J., Larson, R.A., Caligiuri, M.A., et al. (2011b) ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood*. 118 (26), 6920–6929.
- Metzeler, K., Heilmeier, B., Edmaier, K.E., Rawat, V.P.S., Dufour, A., Döhner, K., Feuring-Buske, M., Braess, J., Spiekermann, K., Büchner, T., Sauerland, M.C., Döhner, H., Hiddemann, W., Bohlander, S.K., Schlenk, R.F., Bullinger, L. & Buske, C. (2012a) High expression of lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF1) is a novel favorable prognostic factor in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 120 (10), 2118–2126.
- Metzeler, K., Walker, A., Geyer, S., Garzon, R., Klisovic, R.B., Bloomfield, C.D., Blum, W. & Marcucci, G. (2012b) DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 26 (5), 1106–1107.
- Metzeler, K., Maharry, K., Kohlschmidt, J., Volinia, S., Mrózek, K., Becker, H., Nicolet, D., Whitman, S.P., Mendler, J.H., Schwind, S., Eisfeld, A.-K., Wu, Y.Z., Powell, B.L., Carter, T.H., Wetzler, M., Kolitz, J.E., Baer, M.R., Carroll, A.J., Stone, R.M., et al. (2013) A stem cell-like gene expression signature associates with inferior outcomes and a distinct microRNA expression profile in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 27 (10), 2023–2031.
- Metzeler, K., Herold, T., Rothenberg-Thurley, M., Amler, S., Sauerland, M.C., Görlich, D., Schneider, S., Konstandin, N.P., Dufour, A., Bräundl, K., Ksienzyk, B., Zellmeier, E., Hartmann, L., Greif, P.A., Fiegl, M., Subklewe, M., Bohlander, S.K., Krug, U., Faldum, A., et al. (2016) Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 128 (5), 686–698.
- Ng, S.W., Mitchell, A., Kennedy, J.A., Chen, W.C., McLeod, J., Ibrahimova, N., Arruda, A., Popescu, A., Gupta, V., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Yee, K.W., Bullinger, L., Herold, T., Görlich, D., Büchner, T., Hiddemann, W., Berdel, W.E., Wörmann, B., Cheok, M., Preudhomme, C., Dombret, H., Metzeler, K., Buske, C., Löwenberg, B., Valk, P.J., Zandstra, P.W., Minden, M.D., Dick, J.E. & Wang, J.C (2016) A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*; doi: 10.1038/nature20598. [Epub ahead of print]
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V.I., Paschka, P., Roberts, N.D., Potter, N.E., 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, D.R., et al. (2016) Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 374 (23), 2209–2221.

- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz, L.A., et al. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 321 (5897), 1807–1812.
- Petropoulos, K., Arseni, N., Schessl, C., Stadler, C.R., Rawat, V.P.S., Deshpande, A.J., Heilmeyer, B., Hiddemann, W., Quintanilla-Martinez, L., Bohlander, S.K., Feuring-Buske, M. & Buske, C. (2008) A novel role for Lef-1, a central transcription mediator of Wnt signaling, in leukemogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*. 205 (3), 515–522.
- Rothenberg-Thurley, M., Amler, S., Goerlich, D., Sauerland, M.C., Schneider, S., Konstandin, N. P., Schaaf, S., Batcha, A.M., Bräundl, K., Ksienzyk, B., Zellmeier, E., Mansmann, U., Fiegl, M., Subklewe, M., Bohlander, S.K., Faldum, A., Hiddemann, W., Spiekermann, K., Braess, J. & Metzeler, K.H. (2016) Persistence of driver mutations during complete remission associates with shorter survival and contributes to the inferior outcomes of elderly patients with acute myeloid leukemia [Abstract]. *Haematologica*. 101 (s1), 22–23.
- Rowley, J.D. (1973) Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Annales de génétique*. 16 (2), 109–112.
- Rowley, J.D. & La Chapelle, De, A. (1978) General report on the First International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *International Journal of Cancer*. 21 (3), 307–308.
- Rücker, F.G., Schlenk, R.F., Bullinger, L., Kayser, S., Teleanu, V., Kett, H., Habdank, M., Kugler, C.-M., Holzmann, K., Gaidzik, V.I., Paschka, P., Held, G., Lilienfeld-Toal, von, M., Lübbert, M., Fröhling, S., Zenz, T., Krauter, J., Schlegelberger, B., Ganser, A., et al. (2012) TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 119 (9), 2114–2121.
- Sandhöfer, N., Metzeler, K., Rothenberg, M., Herold, T., Tiedt, S., Groß, V., Carlet, M., Walter, G., Hinrichsen, T., Wachter, O., Grunert, M., Schneider, S., Subklewe, M., Dufour, A., Fröhling, S., Klein, H.-G., Hiddemann, W., Jeremias, I. & Spiekermann, K. (2015) Dual PI3K/mTOR inhibition shows antileukemic activity in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 29 (4), 828–838.
- Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., Mecucci, C., Tschulik, C., Martelli, M.F., Haferlach, T., Hiddemann, W. & Falini, B. (2005) Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 106 (12), 3733–3739.
- Shlush, L.I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W.C., Brandwein, J.M., Gupta, V., Kennedy, J.A., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Yee, K.W., McLeod, J.L., Doedens, M., Medeiros, J.J.F., Marke, R., Kim, H.-J., Lee, K., McPherson, J.D., Hudson, T.J., HALT Pan-Leukemia Gene Panel Consortium, et al. (2014) Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 506 (7488), 328–333.
- Stratton, M.R., Campbell, P.J. & Futreal, P.A. (2009) The cancer genome. *Nature*. 458 (7239), 719–724.

- Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schäkel, U., Platzbecker, U., Wermke, M., Bornhäuser, M., Ritter, M., Neubauer, A., Ehninger, G. & 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 (12), 4326–4335.
- Thiede, C. (2012) Impact of mutational analysis in acute myeloid leukemia. *Hematology Education*. 6 (2012), 33–40.
- Traina, F., Visconte, V., Elson, P., Tabarrokhi, A., Jankowska, A.M., Hasrouni, E., Sugimoto, Y., Szpurka, H., Makishima, H., O'Keefe, C.L., Sekeres, M.A., Advani, A.S., Kalaycio, M., Copelan, E.A., Sauntharajah, Y., Olalla Saad, S.T., Maciejewski, J.P. & Tiu, R.V. (2014) Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia*. 28 (1), 78–87.
- Valk, P.J.M., Verhaak, R.G.W., Beijen, M.A., Erpelinck, C.A.J., Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., Boer, J.M., Beverloo, H.B., Moorhouse, M.J., van der Spek, P.J., Löwenberg, B. & Delwel, R. (2004) Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 350 (16), 1617–1628.
- Vick, B., Rothenberg, M., Sandhöfer, N., Carlet, M., Finkenzeller, C., Krupka, C., Grunert, M., Trumpp, A., Corbacioglu, S., Ebinger, M., André, M.C., Hiddemann, W., Schneider, S., Subklewe, M., Metzeler, K., Spiekermann, K. & Jeremias, I. (2015) An advanced preclinical mouse model for acute myeloid leukemia using patients' cells of various genetic subgroups and in vivo bioluminescence imaging. *PloS one*. 10 (3), e0120925.
- Yamashita, Y., Yuan, J., Suetake, I., Suzuki, H., Ishikawa, Y., Choi, Y.L., Ueno, T., Soda, M., Hamada, T., Haruta, H., Takada, S., Miyazaki, Y., Kiyoi, H., Ito, E., Naoe, T., Tomonaga, M., Toyota, M., Tajima, S., Iwama, A., et al. (2010) Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene*. 29 (25), 3723–3731.
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B. & Bigner, D.D. (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England Journal of Medicine*. 360 (8), 765–773.
- Ysebaert, L., Chicanne, G., Demur, C., De Toni, F., Prade-Houdellier, N., Ruidavets, J.-B., Mansat-De Mas, V., Rigal-Huguet, F., Laurent, G., Payrastre, B., Manenti, S. & Racaud-Sultan, C. (2006) Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia*. 20 (7), 1211–1216.

ANHANG II: VERZEICHNIS DER EIGENEN WISSENSCHAFTLICHEN VERÖFFENTLICHUNGEN

Stand: 27.11.2016

1. Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
8.	Metzeler KH , Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Goerlich D, Schneider S, Konstandin NP, Dufour A, Bräundl K, Ksienzyk B, Zellmeier E, Hartmann L, Greif PA, Fiegl M, Subklewe M, Bohlander SK, Krug U, Faldum A, Berdel WE, Wörmann B, Büchner T, Hiddemann W, Braess J, Spiekermann K. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. <i>Blood</i> . 2016; 128(5):686-98.	11,841 (2015)
7.	Metzeler KH , Maharry K, Kohlschmidt J, Volinia S, Mrózek K, Becker H, Nicolet D, Whitman SP, Mendler J, Schwind S, Eisfeld AK, Wu Y-Z, Powell BL, Carter TH, Wetzler M, Kolitz JE, Baer MR, Carroll AJ, Stone RM, Caligiuri MA, Marcucci G and Bloomfield CD: A stem cell-like gene expression signature associates with inferior outcomes and a distinct microRNA expression profile in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. <i>Leukemia</i> . 2013; 27(10):2023-2031.	9,379
6.	Metzeler KH , Heilmeyer B, Edmaier KE, Rawat VPS, Dufour A, Döhner K, Feuring-Buske M, Braess J, Spiekermann K, Büchner T, Sauerland MC, Döhner H, Hiddemann W, Bohlander SK, Schlenk RF, Bullinger L and Buske C: High expression of lymphoid enhancer-binding factor-1 (<i>LEF1</i>) is a novel favorable prognostic factor in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. <i>Blood</i> . 2012; 120(10):2118-2126.	9,060
5.	Metzeler KH , Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrózek K, Nicolet D, Whitman SP, Wu Y-Z, 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: <i>ASXL1</i> mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. <i>Blood</i> . 2011; 118(26):6920-6929.	9,898
4.	Metzeler KH , Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Becker H, Curfman J, Holland KB, Schwind S, Whitman SP, Wu Y-Z, Blum W, Powell BL, Carter TH, Wetzler M, Moore JO, Kolitz JE, Baer MR, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G and Bloomfield CD: <i>TET2</i> mutations improve the new European LeukemiaNet (ELN) risk classification of acute myeloid leukemia: A Cancer and Leukemia Group B study. <i>J Clin Oncol</i> . 2011; 29(10):1373-1381.	18,372

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
3.	Metzeler KH , Dufour A, Benthous T, Hummel M, Sauerland MC, Heinecke A, Berdel WE, Büchner T, Wörmann B, Mansmann U, Braess J, Spiekermann K, Hiddemann W, Buske C and Bohlander SK: <i>ERG</i> expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A comprehensive analysis of <i>ERG</i> , <i>MNI</i> and <i>BAALC</i> transcript levels using oligonucleotide microarrays. <i>J Clin Oncol.</i> 2009; 27(30):5031-5038.	17,793
2.	Metzeler KH , Hummel M, Bloomfield CD, Spiekermann K, Sauerland MC, Heinecke A, Radmacher M, Marcucci G, Whitman SP, Maharry K, Paschka P, Larson RA, Berdel WE, Büchner T, Wörmann B, Mansmann U, Hiddemann W, Bohlander SK and Buske C: An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. <i>Blood.</i> 2008; 112(10):4193-4201.	10,432
1.	Metzeler K , Agoston A and Gratzl M: An intrinsic GABAergic system in the adrenal cortex: findings from human and rat adrenal glands and the NCI-H295R cell line. <i>Endocrinology.</i> 2004; 145(5):2402-2411.	5,151

2. Originalarbeiten als Koautor

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
45.	Herold T, Metzeler KH , Vosberg S, Hartmann L, Jurinovic V, Opatz S, Konstandin NP, Schneider S, Zellmeier E, Ksienzyk B, Graf A, Krebs S, Blum H, Sauerland MC, Büchner T, Berdel WE, Wörmann BJ, Mansmann U, Hiddemann W, Bohlander SK, Spiekermann K, Greif PA. Acute Myeloid Leukemia with Del(9q) is Characterized by Frequent Mutations of NPM1, DNMT3A, WT1 and Low Expression of TLE4. <i>Genes Chromosomes Cancer.</i> 2017; 56(1)75-86.	3,960 (2015)
44.	Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, Arruda A, Popescu A, Gupta V, Schimmer AD, Schuh AC, Yee KW, Bullinger L, Herold T, Görlich D, Büchner T, Hiddemann W, Berdel WE, Wörmann B, Cheok M, Preudhomme C, Dombret H, Metzeler KH , Buske C, Löwenberg B, Valk PJM, Zandstra PW, Minden MD, Dick JE, and Wang JCY. A 17-Gene Stemness Score for Rapid Determination of Risk in Acute Leukemia. <i>Nature.</i> 540(7633):433-437.	38,138 (2015)
43.	Herold T, Schneider S, Metzeler K , Neumann M, Hartmann L, Roberts KG, Konstandin NP, Greif PA, Bräundl K, Ksienzyk B, Huk N, Schneider I, Zellmeier E, Jurinovic V, Mansmann U, Hiddemann W, Mullighan CG, Bohlander SK, Spiekermann K, Hölzer D, Brüggemann M, Baldus CD, Dreyling M, Gökbuget N. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in adults have frequent IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis. <i>Haematologica.</i> 2016; pii: haematol.2015.136366. [Epub ahead of print]	6,671 (2015)

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
42.	Riba J, Renz N, Niemöller C, Bleul S, Pfeifer D, Stosch JM, Metzeler KH , Hackanson B, Lübbert M, Duyster J, Koltay P, Zengerle R, Claus R, Zimmermann S, Becker H. Molecular Genetic Characterization of Individual Cancer Cells Isolated via Single-Cell Printing. <i>PLoS One</i> . 2016;11(9):e0163455.	3,057 (2015)
41.	Sandhöfer N, Bauer J, Reiter K, Dufour A, Rothenberg M, Konstandin NP, Zellmeier E, Tizazu B, Greif PA, Metzeler KH , Hiddemann W, Polzer H, Spiekermann K. The new and recurrent FLT3 juxtamembrane deletion mutation shows a dominant negative effect on the wild-type FLT3 receptor. <i>Sci Rep</i> . 2016; 6:28032.	5,228 (2015)
40.	Hartmann L, Dutta S, Opatz S, Vosberg S, Reiter K, Leubolt G, Metzeler KH , Herold T, Bamopoulos SA, Brändl K, Zellmeier E, Ksienzyk B, Konstandin NP, Schneider S, Hopfner KP, Graf A, Krebs S, Blum H, Middeke JM, Stölzel F, Thiede C, Wolf S, Bohlander SK, Preiss C, Chen-Wichmann L, Wichmann C, Sauerland MC, Büchner T, Berdel WE, Wörmann BJ, Braess J, Hiddemann W, Spiekermann K, Greif PA. ZBTB7A mutations in acute myeloid leukaemia with t(8;21) translocation. <i>Nat Commun</i> . 2016; 7:11733	10,995 (2015)
39.	Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Lichtenegger FS, Köhnke T, Vick B, Jeremias I, Metzeler KH , Altmann T, Schneider S, Fiegl M, Spiekermann K, Bauerle PA, Hiddemann W, Riethmüller G and Subklewe M: Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3 BiTE antibody construct AMG 330: reversing a T-cell-induced immune escape mechanism. <i>Leukemia</i> . 2016; 30(2):484-491	12,104 (2015)
38.	Vosberg S, Herold T, Hartmann L, Neumann M, Opatz S, Metzeler KH , Schneider S, Graf A, Krebs S, Blum H, Baldus CD, Hiddemann W, Spiekermann K, Bohlander SK, Mansmann U, Greif PA. Close correlation of copy number aberrations detected by next-generation sequencing with results from routine cytogenetics in acute myeloid leukemia. <i>Genes Chromosomes Cancer</i> . 2016; 55(7):553-567	3,960 (2015)
37.	Dutta S, Krause A, Vosberg S, Herold T, Ksienzyk B, Quintanilla-Martinez L, Tizazu B, Chopra M, Graf A, Krebs S, Blum H, Greif PA, Vetter A, Metzeler KH , Rothenburg-Thurley M, Schneider M, Dahlhoff M, Spiekermann K, Zimmer-Strobl U, Wolf E, and Bohlander S: The target cell of transformation is distinct from the leukemia stem cell in murine CALM/AF10 knock-in leukemia models. <i>Leukemia</i> . 2016; 30(5):1166-1176	12,104 (2015)
36.	Vick B, Rothenberg M, Sandhöfer N, Carlet M, Finkenzeller C, Krupka C, Grunert M, Trumpp A, Corbacioglu S, Ebinger M, André MC, Hiddemann W, Schneider S, Subklewe M, Metzeler KH , Spiekermann K, and Jeremias I: An advanced preclinical mouse model for acute myeloid leukemia using patients' cells of various genetic subgroups and in vivo bioluminescence imaging. <i>PLoS One</i> . 2015;10(3):e0120925.	3,057

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
35.	Sandhöfer N, Metzeler KH , Rothenberg M, Herold T, Tiedt S, Groß V, Carlet M, Walter G, Hinrichsen T, Wachter O, Grunert M, Schneider S, Subklewe M, Dufour A, Fröhling S, Klein HG, Hiddemann W, Jeremias I and Spiekermann K: Dual PI3K/mTOR inhibition shows antileukemic activity in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. <i>Leukemia</i> . 2015; 29(4):828-838	12,104
34.	Niederwieser C, Kohlschmidt J, Volinia S, Whitman SP, Metzeler KH , Eisfeld AK, Maharry K, Yan P, Frankhouser D, Becker H, Schwind S, Carroll AJ, Nicolet D, Mendler JH, Curfman JP, Wu YZ, Baer MR, Powell BL, Kolitz JE, Moore JO, Carter TH, Bundschuh R, Larson RA, Stone RM, Mrózek K, Marcucci G and Bloomfield CD: Prognostic and biologic significance of DNMT3B expression in older patients with cytogenetically normal primary acute myeloid leukemia. <i>Leukemia</i> . 2015; 29(3):567-575	12,104
33.	Alachkar H, Mutonga MB, Metzeler KH , Fulton N, Malnassy G, Herold T, Spiekermann K, Bohlander SK, Hiddemann W, Matsuo Y, Stock W and Nakamura Y: Preclinical efficacy of maternal embryonic leucine-zipper kinase (MELK) inhibition in acute myeloid leukemia. <i>Oncotarget</i> . 2014; 5(23):12371-12382	6,359
32.	Herold T, Metzeler KH , Vosberg S, Hartmann L, Röllig C, Stölzel F, Schneider S, Hubmann M, Zellmeier E, Ksienzyk B, Jurinovic V, Pasalic Z, Kakadia PM, Dufour A, Graf A, Krebs S, Blum H, Sauerland MC, Büchner T, Berdel WE, Woermann BJ, Bornhäuser M, Ehninger G, Mansmann U, Hiddemann W, Bohlander SK, Spiekermann K and Greif PA: Isolated trisomy 13 defines a genetically homogenous AML subgroup with high frequency of mutations in spliceosome genes and poor prognosis. <i>Blood</i> . 2014;124(8):1304-1311.	10,452
31.	Pastore F, Dufour A, Benthous T, Metzeler KH , Maharry K, Schneider S, Ksienzyk B, Mellert G, Zellmeier E, Kakadia PM, Unterhalt M, Feuring-Buske M, Buske C, Braess J, Sauerland C, Heinecke A, Krug U, Berdel WE, Buechner T, Woermann B, Hiddemann W, Bohlander SK, Marcucci G, Spiekermann K, Bloomfield CD and Hoster E: Combined molecular and clinical prognostic index for relapse and survival in cytogenetically normal AML. <i>J Clin Oncol</i> . 2014; 32(15):1586-1594.	18,443
30.	Becker H, Maharry K, Mrózek K, Volinia S, Eisfeld AK, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Metzeler KH , Schwind S, Whitman SP, Mendler JH, Wu YZ, Nicolet D, Paschka P, Powell BL, Carter TH, Wetzler M, Kolitz JE, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Stone RM, Marcucci G and Bloomfield CD: Prognostic gene mutations and distinct gene- and microRNA-expression signatures in acute myeloid leukemia with a sole trisomy 8. <i>Leukemia</i> . 2014; 28(8):1754-1758.	10,431

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
29.	Alachkar H, Santhanam R, Maharry K, Metzeler KH , Huang X, Kohlschmidt J, Mendler JH, Benito JM, Hickey C, Neviani P, Dorrance AM, Anghelina M, Khalife J, Tarighat SS, Volinia S, Whitman SP, Paschka P, Hoellerbauer P, Wu YZ, Han L, Bolon BN, Blum W, Mrózek K, Carroll AJ, Perrotti D, Andreeff M, Caligiuri MA, Konopleva M, Garzon R, Bloomfield CD and Marcucci G: SPARC promotes leukemic cell growth and predicts acute myeloid leukemia outcome. <i>J Clin Invest.</i> 2014; 124(4):1512-1524.	13,262
28.	Marcucci G, Yan P, Maharry K, Frankhouser D, Nicolet K, Metzeler KH , Kohlschmidt J, Mrózek K, Wu Y-Z, Bucci D, Curfman JP, Whitman SP, Eisfeld AK, Mendler JH, Schwind S, Becker H, Bär C, Carroll AJ, Baer MR, Wetzler M, Carter TH, Powell BL, Kolitz JE, Byrd JC, Plass C, Garzon R, Caligiuri MA, Stone RM, Volinia S, Bundschuh R, and Bloomfield CD: Epigenetics Meets Genetics in Acute Myeloid Leukemia: Clinical Impact of a Novel Seven Gene Score. <i>J Clin Oncol.</i> 2014; 32(6):548-556.	18,443
27.	Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Bögeholz J, Köhnke T, Lichtenegger FS, Schneider S, Metzeler KH , Fiegl M, Spiekermann K, Baeuerle PA, Hiddemann W, Riethmüller G and Subklewe M: CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. <i>Blood.</i> 2014; 123(3):356-365.	10,452
26.	Whitman SP, Kohlschmidt J, Maharry K, Volinia S, Mrózek K, Nicolet D, Schwind S, Becker H, Metzeler KH , Mendler JH, Eisfeld AK, Carroll AJ, Powell BL, Carter TH, Baer MR, Kolitz JE, Park IK, Stone RM, Caligiuri MA, Marcucci G and Bloomfield CD: GAS6 expression identifies high-risk adult AML patients: potential implications for therapy. <i>Leukemia.</i> 2014; 28(6):1252-1258.	10,431
25.	Mendler JH, Maharry KH, Becker H, Eisfeld AK, Senter L, Mrozek K, Kohlschmidt J, Metzeler KH , Schwind S, Whitman SP, Khalife J, Caligiuri MA, Klisovic RB, Moore JO, Carter TH, Marcucci G and Bloomfield CD: In rare acute myeloid leukemia patients harboring both RUNX1 and NPM1 mutations, RUNX1 mutations are unusual in structure and present in the germline. <i>Haematologica.</i> 2013; 98(8):e92-94.	5,868
24.	Marcucci G, Maharry KS, Metzeler KH , Volinia S, Wu YZ, Mrózek K, Nicolet D, Kohlschmidt J, Whitman SP, Mendler JH, Schwind S, Becker H, Eisfeld AK, Carroll AJ, Powell BL, Kolitz JE, Garzon R, Caligiuri MA, Stone RM and Bloomfield CD: Clinical Role of microRNAs in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: miR-155 Upregulation Independently Identifies High-Risk Patients. <i>J Clin Oncol.</i> 2013; 31(17):2086-2093.	17,960
23.	Diffner E, Beck D, Gudgin E, Thoms JA, Knezevic K, Pridans C, Foster S, Goode D, Lim WK, Boelen L, Metzeler KH , Micklem G, Bohlander SK, Buske C, Burnett A, Ottersbach K, Vassiliou GS, Olivier J, Wong JW, Göttgens B, Huntly BJ and Pimanda JE: Activity of a heptad of transcription factors is associated with stem cell programs and clinical outcome in acute myeloid leukemia. <i>Blood.</i> 2013; 121(12):2289-2300.	9,775

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
22.	Herold T, Mulaw MA, Jurinovic V, Seiler T, Metzeler KH , Dufour A, Schneider S, Kakadia PM, Spiekermann K, Mansmann U, Hiddemann W, Buske C, Dreyling M and Bohlander SK: High expression of MZB1 predicts adverse prognosis in chronic lymphocytic leukemia, follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma and is associated with a unique gene expression signature. <i>Leuk Lymphoma</i> . 2013; 54(8):1652-1657.	2,605
21.	Schwind S, Edwards CG, Nicolet D, Mrózek K, Maharry K, Wu Y-Z, Paschka P, Eisfeld A-K, Hoellerbauer P, Becker H, Metzeler KH , Curfman J, Kohlschmidt J, Prior TW, Kolitz JE, Blum W, Pettenati MJ, Dal Cin P, Carroll AJ, Caligiuri MA, Larson R, Volinia S, Marcucci G and Bloomfield CD: inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia with non-type A <i>CBFB-MYH11</i> fusion transcripts associates with distinct clinical and genetic features and lacks <i>KIT</i> mutations. <i>Blood</i> . 2013; 121(2):385-391.	9,775
20.	Yan P, Frankhouser D, Murphy M, Tam HH, Rodriguez B, Curfman J, Trimarchi T, Geyer S, Wu Y-Z, Whitman SP, Metzeler K , Walker A, Klisovic R, Jacob S, Grever MR, Byrd JC, Bloomfield CD, Garzon R, Blum W, Caligiuri MA, Bundschuh R, and Marcucci G: Genome-wide Methylation Profiling in Decitabine-treated Patients with Acute Myeloid Leukemia. <i>Blood</i> . 2012; 120(12):2466-2474.	9,060
19.	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: Prognostic Significance of the European LeukemiaNet Standardized System for Reporting Cytogenetic and Molecular Alterations in Adults with Acute Myeloid Leukemia. <i>J Clin Oncol</i> . 2012; 30(36):4515-4523.	18,038
18.	Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Becker H, Metzeler KH , Schwind S, Whitman SP, Khalife J, Kohlschmidt J, Nicolet D, Powell BL, Carter TH, Wetzler M, Moore JO, Kolitz JE, Baer MR, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G and Bloomfield CD: <i>RUNX1</i> Mutations Associate with Poor Outcome in Younger and Older Patients with Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia and with Distinct Gene- and MicroRNA-Expression Signatures. <i>J Clin Oncol</i> . 2012; 30(25):3109-3118.	18,038
17.	Greif PA, Konstandin NP, Metzeler KH , Herold T, Pasalic Z, Ksienzyk B, Dufour A, Schneider F, Schneider S, Kakadia PM, Braess J, Sauerland MC, Berdel WE, Büchner T, Woermann BJ, Hiddemann W, Spiekermann K and Bohlander SK: <i>RUNX1</i> mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are associated with poor prognosis and up-regulation of lymphoid genes. <i>Haematologica</i> . 2012; 97(12):1909-1915.	5,935
16.	Eisfeld AK, Marcucci G, Maharry K, Schwind S, Radmacher MD, Nicolet D, Becker H, Mrózek K, Whitman SP, Metzeler KH , Mendler JH, Wu Y-Z, Liyanarachchi S, Patel R, Baer MR, Powell BL, Carter TH, Moore JO, Kolitz JE, Wetzler M, Caligiuri MA, Larson RA, Tanner SM, de la Chapelle A and Bloomfield CD: <i>miR-3151</i> interplays with its host gene <i>BAALC</i> and independently impacts on outcome of patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. <i>Blood</i> . 2012; 120(2):249-258.	9,060

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
15.	Whitman SP, Caligiuri MA, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Becker H, Mrózek K, Wu Y-Z, Schwind S, Metzeler KH , Mendler J, Wen J, Baer MR, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Larson RA, Marcucci G and Bloomfield CD: The MLL partial tandem duplication in adults aged 60 years and older with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia. <i>Leukemia</i> . 2012; 26(7):1713-1717.	10,164
14.	Marcucci G, Metzeler KH , Schwind S, Becker H, Maharry K, Mrózek K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Nicolet D, Whitman SP, Wu Y-Z, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Moore JO, Caligiuri MA, Larson RA and Bloomfield CD: Age-related prognostic impact of different types of <i>DNMT3A</i> mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. <i>J Clin Oncol</i> . 2012; 30(7):742-750.	18,038
13.	Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, Metzeler KH , Poepl A, Vicki Ling V, Beyene J, Canty AJ, Danska JS, Bohlander SK, Buske C, Minden MD, Golub TR, Jurisica I, Ebert BL and Dick JE: Leukemic stem cells exhibit clinical relevance in human acute myeloid leukemia. <i>Nat Med</i> . 2011; 17(9):1086-1093.	22,462
12.	Becker H, Maharry K, Radmacher M, Mrozek K, Metzeler KH, Whitman SP, Schwind S, Kohlschmidt J, Wu YZ, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Moore JO, Caligiuri MA, Larson RA, Marcucci G and Bloomfield CD: Clinical outcome and gene- and microRNA-expression profiling according to the Wilms tumor 1 (<i>WT1</i>) single nucleotide polymorphism rs16754 in adult de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. <i>Haematologica</i> . 2011; 96(10):1488-1495.	6,424
11.	Herold T, Jurinovic V, Metzeler KH , Boulesteix AL, Bergmann M, Seiler T, Mulaw M, Thoene S, Dufour A, Pasalic Z, Schmidberger M, Schmidt M, Schneider S, Kakadia PM, Feuring-Buske M, Braess J, Spiekermann K, Mansmann U, Hiddemann W, Buske C and Bohlander SK: An eight-gene expression signature for the prediction of survival and time to treatment in chronic lymphocytic leukemia. <i>Leukemia</i> . 2011; 25(10):1639-1645.	9,561
10.	Schwind S, Marcucci G, Kohlschmidt J, Radmacher MD, Mrózek K, Maharry K, Becker H, Metzeler KH , Whitman SP, Wu YZ, Powell BL, Baer MR, Kolitz JE, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA and Bloomfield CD. Low expression of MN1 associates with better treatment response in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia. <i>Blood</i> . 2011; 118(15):4188-4198.	9,898
9.	Schwind S, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Holland KB, Margeson D, Whitman SP, Hickey C, Becker H, Metzeler KH , Paschka P, Baldus CD, Liu S, Garzon R, Powell BL, Kolitz JE, Carroll AJ, Caligiuri MA, Larson RA, Marcucci G and Bloomfield CD: Prognostic Significance of expression of a single microRNA, <i>miR-181a</i> , in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. <i>J Clin Oncol</i> . 2010; 28(36):5257-5264.	18,970

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
8.	Schwind S, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Holland KB, Margeson D, Becker H, Whitman SP, Wu YZ, Metzeler KH , Powell BL, Kolitz JE, Carter TH, Moore JO, Baer MR, Carroll AJ, Caligiuri MA, Larson RA and Bloomfield CD: <i>BAALC</i> and <i>ERG</i> expression levels are associated with outcome and distinct gene- and microRNA-expression profiles in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. <i>Blood</i> . 2010; 116(25):5660-5669.	10,558
7.	Whitman SP, Maharry K, Radmacher MD, Becker H, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Wu YZ, Schwind S, Metzeler KH , Wen J, Baer MR, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Moore JO, Stone RM, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G and Bloomfield CD: FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. <i>Blood</i> . 2010; 116(18):3622-3626.	10,558
6.	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: <i>IDH1</i> and <i>IDH2</i> gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. <i>J Clin Oncol</i> . 2010; 28(14):2348-2355.	18,970
5.	Dufour A, Schneider F, Metzeler KH , Hoster E, Schneider S, Zellmeier E, Benthous T, Braess J, Hiddemann W, Bohlander SK and Spiekermann K: Acute Myeloid Leukemia with Biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. <i>J Clin Oncol</i> . 2010; 28(4):570-577.	18,970
4.	Rao AV, Valk PJM, Metzeler KH , Acharya C, Tuchman SA, Stevenson MM, Rizzieri DA, Delwel R, Buske C, Bohlander SK, Potti A and Löwenberg B: Age-specific differences in oncogenic pathway dysregulation in patients with acute myeloid leukemia. <i>J Clin Oncol</i> . 2009; 27(33):5580-5586. [Correction, <i>J Clin Oncol</i> . 2012; 30(5):572-573.]	17,793
3.	Thoene S, Rawat VP, Heilmeyer B, Hoster E, Metzeler KH , Herold T, Hiddemann W, Gökbüget N, Hoelzer D, Bohlander SK, Feuring-Buske M and Buske C: The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed and associated with an inferior prognosis in patients with acute lymphoblastic leukemia. <i>Leukemia</i> . 2009; 23(4):649-655.	8,296
2.	Hummel M, Metzeler KH , Buske C, Bohlander SK and Mansmann U: association between a prognostic gene signature and functional gene sets. <i>Bioinformatics and Biology Insights</i> . 2008; 2:335-347.	---

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
1.	Rawat VP, Thoene S, Naidu VM, Arseni N, Heilmeyer B, Metzeler K , Petropoulos K, Deshpande A, Quintanilla-Martinez L, Bohlander SK, Spiekermann K, Hiddemann W, Feuring-Buske M and Buske C: Overexpression of CDX2 perturbs <i>HOX</i> gene expression in murine progenitors depending on its N-terminal domain and is closely correlated with deregulated HOX gene expression in human acute myeloid leukemia. <i>Blood</i> . 2008; 111(1):309-319.	10,432

3. Kasuistiken/Case Reports

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
2.	Metzeler KH , Boeck S, Christ B, Hausmann A, Stemmler HJ, Parhofer KG, Ostermann H, Hiddemann W, Braess J: Idiopathic hyperammonemia (IHA) after dose-dense induction chemotherapy for acute myeloid leukemia: Case report and review of the literature. <i>Leuk Res</i> . 2009; 33:e69	2,358
1.	Boeck S, Metzeler KH , Hausmann A, Baumann A, Gallmeier E, Parhofer KG and Stemmler HJ: Cisplatin-based chemotherapy for pulmonary metastasized germ cell tumors of the testis - be aware of acute respiratory distress syndrome. <i>Onkologie</i> . 2009; 32:125-128	1,234

4. Übersichtsartikel/Reviews

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
5.	Vogl I, Eck S, Benet-Pagès A, Eck, SH, Kuhn M, Vosberg S, Greif PA, Metzeler KH , Biskup S, Müller-Reible, C and Klein HG: Applications and data analysis of next-generation sequencing <i>J Lab Med</i> [Laboratoriumsmedizin]. 2013; 37(6): 305-315	0,299
4.	Vogl I, Eck S, Benet-Pagès A, Greif PA, Hirv K, Koschote S, Kuhn M, Gehring Am Bergmann C, Bolz HJ, Stuhmann M, Biskup S, Metzeler K and Klein HG: Diagnostic applications of next generation sequencing: working towards quality standards. <i>J Lab Med</i> [Laboratoriumsmedizin]. 2012; 36(4): 227–239.	0,189
3.	Metzeler KH , Braess J, Spiekermann S, Bohlander SK, Hiddemann W, Buske C, Feuring-Buske M: Zufallsbefunde Thrombozytopenie und Thrombozytose - Wann müssen Sie aktiv werden? [<i>in German</i>] <i>MMW Fortschr Med</i> . 2007; 149(15): 34-39	---
2.	Fritsch S, Metzeler K , Hiddemann W, Buske C. (2006): Diagnostik und Therapie der akuten myeloischen Leukämie. <i>Dtsch Med Wochenschr</i> . 2006; 131:2401-2406	0,584
1.	Metzeler K , Fritsch S, Buske C, Hiddemann W. (2006): Akute myeloische Leukämie: Auf dem Weg zu einer pathogenese-orientierten Therapie. <i>Dtsch Med Wochenschr</i> . 2006; 131:1466-1468	0,584

5. Buchkapitel

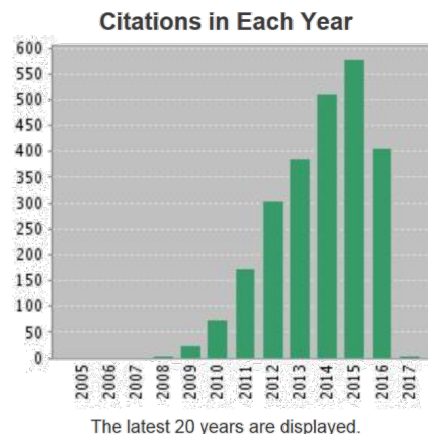
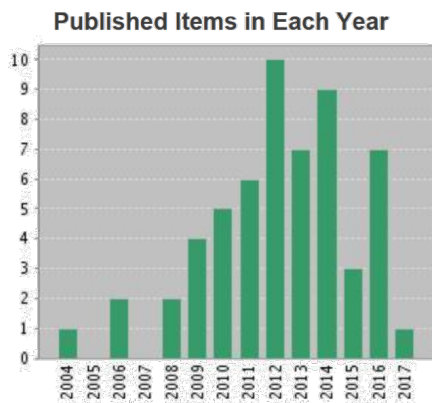
Nr.	Referenz
1.	Metzeler KH: Kapitel 3: “Clinical manifestations and diagnosis” und Kapitel 4: “Diagnostic criteria, classification, and prognosis.” In: Wolfgang Hiddemann (editor): Handbook of Acute Leukemia. ADIS / Springer International Publishing Switzerland, 2016. ISBN 978-3-319-26770-8

6. Sonstige Veröffentlichungen (z.B. Letters to the Editor)

Nr.	Referenz	Impact factor im Jahr der Publikation
2.	Metzeler KH: Inside Blood: ASXL genes and RUNX1: an intimate connection? <i>Blood</i> . 2014; 124(9):1382-1383 [editorial]	10,452
1.	Metzeler KH, Walker A, Geyer S, Garzon R, Klisovic R, Bloomfield CD, Blum W and Marcucci G: DNMT3A Mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. <i>Leukemia</i> . 2012; 26(5):1106-1107 [letter]	10,164

7. Bibliometrische Daten

(Quelle: Thomson Reuters Web of Science [v.5.23.1], 16. Dezember 2016)



Results found: 57

Sum of the Times Cited [?]: 2468

Sum of Times Cited without self-citations [?]: 2319

Citing Articles [?]: 1681

Citing Articles without self-citations [?]: 1637

Average Citations per Item [?]: 43.30

h-index [?]: 25

ANHANG IV: EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die schriftliche Habilitationsleistung selbstständig verfasst und die Herkunft des verwendeten oder zitierten Materials ordnungsgemäß kenntlich gemacht habe.

Ich erkläre außerdem, dass ich nicht schon zweimal ein Habilitationsverfahren im gleichen Fach ohne Erfolg beendet habe, mir kein akademischer Grad entzogen worden ist und auch kein Verfahren gegen mich anhängig ist, das die Entziehung eines akademischen Grades zur Folge haben könnte.

München, den 20. Dezember 2016

Dr. med. Klaus Metzeler