

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann

Molekulare Charakterisierung von Leukämien

Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

eines habilitierten Doktors der Medizin

an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dr. med. Tobias Marcus Herold

2017

Holzhacken ist deshalb so beliebt, weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht.

Albert Einstein (vermutlich)

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung.....	4
1.1. Hintergrund	4
1.2. Klinik, Diagnose, Klassifikation und Behandlung von Leukämien	4
1.3. Chronisch lymphatische Leukämie (CLL).....	5
1.4. Akute lymphatische Leukämie (ALL).....	6
1.5. Akute myeloische Leukämie (AML).....	7
2. Molekulare Charakterisierung der CLL.....	8
2.1. Hintergrund	8
2.2. Eigene Arbeiten	9
2.2.1. Entwicklung einer auf Genexpression basierten Signatur zur Vorhersage des Gesamtüberlebens für Patienten mit CLL.....	9
2.2.2. Genexpressionsanalyse der deletierten Regionen 13q14 und 11q22-23 bei Patienten mit CLL.....	10
2.2.3. Die hohe Expression von <i>MZB1</i> ist mit einem ungünstigen klinischen Verlauf bei Patienten mit CLL, FL und DLBCL assoziiert	12
2.3. Diskussion und Ausblick	14
3. Molekulare Charakterisierung der ALL.....	15
3.1. Hintergrund	15
3.2. Eigene Arbeiten	16
3.2.1. Inzidenz der Ph-like-ALL bei erwachsenen Patienten	16
3.2.2. Prognose und molekulare Charakteristika erwachsener Ph-like-ALL-Patienten	17
3.3. Diskussion und Ausblick	19
4. Molekulare Charakterisierung der AML.....	20
4.1. Hintergrund	20
4.2. Eigene Arbeiten	20

4.2.1.	Entwicklung eines auf Genexpression basierenden prognostischen Scores zur Vorhersage des Gesamtüberlebens bei Patienten mit AML	21
4.2.2.	Charakterisierung seltener molekularer Subgruppen	23
4.2.2.1.	AML-Patienten mit isolierter Trisomie 13	24
4.2.2.2.	AML-Patienten mit del(9q)	26
4.3.	Diskussion und Ausblick	27
5.	Zusammenfassung und Perspektive	29
6.	Danksagung	31
7.	Literaturverzeichnis	32
8.	Anhang	34
8.1.	Verzeichnis der eigenen wissenschaftlichen Veröffentlichungen	34
8.2.	Verzeichnis der bisher abgehaltenen Lehrveranstaltungen	40
8.3.	Eidesstattliche Erklärung	41

1. Einführung

1.1. Hintergrund

Der Begriff „Leukämie“ (griechisch „Weißblütigkeit“) umfasst eine heterogene Gruppe von malignen Erkrankungen des lymphatischen oder myeloischen Systems. „Leukämie“ beschreibt die sichtbaren Veränderungen im peripheren Blut eines Erkrankten. Aufgrund der Dynamik der Erkrankung erfolgt eine weitere Unterteilung in akute und chronische Formen. Allerdings ist diese Beschreibung lediglich orientierend. So können etwa auch Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) einen rasch progredienten und schweren Verlauf aufweisen, während bestimmte Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) einen sehr langsamen Verlauf zeigen. Ein weiterer Unterschied ergibt sich durch das Ansprechen auf Therapie. Während bestimmte Erkrankungsuntergruppen empfindlich auf allgemeine Zellgifte (klassische Chemotherapie) sind, gibt es Subgruppen, die kaum oder gar kein Ansprechen zeigen. Wiederum andere Subgruppen sprechen nur auf sogenannte zielgerichtete Therapien an. Die diesen Unterschieden zugrundeliegenden Mechanismen sind in der Regel durch molekulare Veränderungen in den Leukämiezellen selbst begründet. Dies können unter anderem Mutationen, Deletionen oder Translokationen der Desoxyribonukleinsäure (DNS) sein. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der weiterführenden Charakterisierung molekularer Veränderungen von Leukämien mit dem Ziel ein besseres Verständnis der Erkrankung zu entwickeln.

1.2. Klinik, Diagnose, Klassifikation und Behandlung von Leukämien

Das klinische Erscheinungsbild von Leukämien richtet sich nach dem Ausmaß der Aktivität des malignen Klons und ist in der Regel durch einen Abfall der gesunden Zellen im peripheren Blut gekennzeichnet. Hierdurch kann es zu schweren Infektionen, zum Teil auch mit gewöhnlich nicht humanpathogenen Erregern kommen (Granulozytopenie). Eine deutliche Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit ist möglich (Anämie) oder es kann eine spontane Blutungsneigung auftreten (Thrombozytopenie). Während langsam voranschreitende Erkrankungen häufig eine Adaption des Körpers an zum Beispiel sehr niedrige Hämoglobin-Werte ermöglichen,

können hoch proliferative Erkrankungen innerhalb weniger Tage zu lebensbedrohlichen Krankheitssituationen führen. Diese können unter anderem durch ein Nierenversagen aufgrund des hohen Zellumsatzes und anfallenden Stoffwechselprodukten oder durch Zirkulationsprobleme bei einer Leukostase entstehen. Die Diagnose wird in der Regel durch die Untersuchung des peripheren Blutes und/oder des Knochenmarks gestellt. Zum Einsatz kommen hier neben der konventionellen Zytologie und Histologie weitere Verfahren wie die Immunphänotypisierung, die eine Charakterisierung der Oberflächenantigene der malignen Zellen erlaubt, und zahlreiche weitere molekulare Verfahren wie Zytogenetik, Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) oder Sequenzierungen.

1.3. Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

Die CLL ist die häufigste Form der Leukämie (etwa 40% aller Leukämien; ca. 6/100.000 Neuerkrankungen pro Jahr) und ist typischerweise eine Erkrankung des älteren Menschen.¹ Das mediane Erkankungsalter liegt bei etwa 70 Jahren.¹ Sie wird den niedrigmalignen (indolenten) Non-Hodgkin-Lymphomen zugeordnet.² Die CLL ist oft durch ausgedehnte Lymphknotenschwellungen gekennzeichnet. Typischerweise kommt es mit der Zeit zur Akkumulation von reifen Lymphozyten im peripheren Blut. Im Gegensatz zur AML, bei der es aufgrund der Größe der malignen Zellen und adhäsiver Kräfte durchaus zu mikrozirkulatorischen Problemen im Sinne eines Leukostase-Syndroms kommen kann, tritt dieses Phänomen selbst bei extremen Leukozytosen bei Patienten mit CLL in der Regel nicht auf. Die Prognose der CLL ist ausgesprochen heterogen. Einige wenige Patienten können zum Teil über Jahrzehnte einen stabilen Krankheitsverlauf zeigen. Ein weiterer kleiner Teil der Patienten zeigt einen extrem aggressiven Verlauf, der innerhalb weniger Monate oder Jahre zum Tode führen kann. Die Mehrzahl der Patienten bewegt sich zwischen diesen Extremen. Die Diagnose der CLL wird nach den Kriterien des *International Workshop on CLL (IWCLL) 2008* gestellt, wenn sich (1.) im peripheren Blut mindestens 5000 klonale B-Lymphozyten pro µl nachweisen lassen, es sich bei diesen (2.) um reife Lymphozyten in der zytologischen Untersuchung handelt und (3.) sich in der Immunphänotypisierung eine Koexpression der B-Zell-Antigene CD19, CD20 und CD23 mit dem T Zell-Antigen CD5 zeigt. Weitere charakteristische Merkmale in der Immunphänotypisierung sind eine schwache Expression von CD20 und CD79b. Eine Leichtkettenrestriktion kann die Monoklonalität der Zellen nachweisen.

Die Standardtherapie der CLL besteht bei körperlich fitten Patienten zum aktuellen Zeitpunkt noch auch einer Kombinationstherapie mit dem Antikörper Rituximab und den Chemotherapeutika Fludarabin und Cyclophosphamid.¹ In den letzten Jahren konnten jedoch zahlreiche Substanzen entwickelt werden, die zielgerichtet spezifische Signalwege der CLL-Zellen unterdrücken können.¹ Als Beispiele seien der BTK-Inhibitor Ibrutinib und der BCL2-Inhibitor Venetoclax genannt, die gezielt in diese Signalwege der CLL-Zellen eingreifen.¹ Hierdurch konnten selbst bei Patienten mit refraktären Erkrankungen sehr hohe Ansprechraten erreicht werden. Diese vielversprechenden Ergebnisse und das Verständnis der zugrundeliegenden Krankheitsmechanismen wecken Hoffnungen auf eine Heilung dieser Erkrankung in der Zukunft.

1.4. Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Die ALL ist eine vergleichsweise seltene, meist sehr aggressive Form der Leukämie mit etwa 1,5/100.000 Neuerkrankungen pro Jahr. Jungen und Männer erkranken etwas häufiger, etwa 60% der Patienten sind jünger als 20 Jahre.³ Die Diagnose wird meist durch Zytomorphologie und Immunphänotypisierung aus peripherem Blut oder Knochenmark gestellt. Anhand von Oberflächenmarkern kann zwischen B- und T-ALL unterschieden werden. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung werden die allermeisten erwachsenen ALL-Patienten in Deutschland in den multizentrischen Studien der German Multicenter Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GMALL) mit einem komplexen, intensiven Chemotherapie-Konzept kombiniert mit Strahlentherapie mit oder ohne allogener Stammzelltransplantation (SZT) behandelt. Von entscheidender therapeutischer Bedeutung sind die Risikostratifikation und das Monitoring des Ansprechens auf die Behandlung.³ Die Risikostratifikation der GMALL richtet sich nach klinischen, zytogenetischen und MRD-Verlaufsparametern und ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

Hohe Leukozytenzahl	> 30.000/ μ l bei B-Vorläufer-ALL
Subtyp	pro B, early T, reife T
Späte CR	> 3 Wo (nach Induktion II)
Fusionsgen	t(9;22) - BCR-ABL t(4;11) - ALL1-AF4

Minimale Resterkrankung	Hohes MRD-Niveau nach Frühkonsolidation oder MRD-Anstieg unter Therapie
-------------------------	---

Im Rahmen der GMALL Studien erfolgen eine zentrale Erfassung der minimalen Resterkrankung (MRD) und eine entsprechende Modifikation der Behandlungsempfehlung. Bei erwachsenen Patienten mit einer Hochrisiko-Konstellation wird, soweit möglich nach Erreichen eines negativen MRD-Befunds, eine allogene SZT durchgeführt. In den letzten Jahren konnten vor allem durch die monoklonalen Antikörper Blinatumomab und Inotuzumab bei Patienten mit refraktärer oder rezidivierter Erkrankung Fortschritte in der Behandlung erzielt werden.

1.5. Akute myeloische Leukämie (AML)

Mit einer Inzidenz von drei Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr liegt die AML in ihrer Häufigkeit zwischen ALL und CLL. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren. Ähnlich wie bei der ALL erkranken etwas mehr Männer als Frauen (1,4:1). Der Verlauf der Erkrankung kann sehr variabel sein. Während die *de novo* AML häufig aggressiv voranschreitet, können die sekundäre AML, die z.B. aus einem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder einer primären Myelofibrose (PMF) entsteht, einen langsamen klinischen Verlauf zeigen. Die Behandlung besteht seit mehreren Jahrzehnten maßgeblich aus einer Chemotherapie bestehend aus Cytarabin und einem Anthrazyklin. Patienten mit hohem Risikoprofil wird eine SZT empfohlen. Auf diese Weise können etwa 40% der Patienten unter 60 Jahre und etwa 15% der Patienten über 60 Jahre geheilt werden.⁴ Etwa 20% der Patienten sind bereits auf die initiale Behandlung refraktär und erreichen keine Remission. Für diese Patienten bestehen derzeit keine effektiven Behandlungskonzepte. Ein weiteres Problem stellen Rezidive der Erkrankungen dar. Bei refraktärer oder rezidivierter AML kann aktuell alleine eine SZT eine Heilung erreichen. Die Prognose ist in diesen Fällen jedoch sehr schlecht. Molekulare Risikoparameter, die mittels Zytogenetik oder Sequenzierung identifiziert werden, sind inzwischen in der Routine-Diagnostik dieser Erkrankung verankert.

2. Molekulare Charakterisierung der CLL

2.1. Hintergrund

Auf molekularer Ebene lässt sich die CLL in zwei Untergruppen anhand des Mutationsstatus der variablen Region der schweren Kette der Immunglobulin-Gene (IGHV) einteilen.¹ Das Vorliegen eines mutierten IGVH-Status ist in der Regel mit einem günstigen klinischen Verlauf assoziiert. Ferner finden sich bei etwa 80% der Patienten mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) Kopienzahlveränderungen der Chromosomen oder bestimmter Teilbereiche. Mit etwa 60% ist eine Deletion auf Chromosom 13 (del(13q)) die häufigste beobachtete genetische Aberration.¹ Weitere Veränderungen sind Deletionen von Chromosom 11 (del(11q)) (Häufigkeit ~20%) und 17 (del(17p)) (Häufigkeit <10%) sowie eine Trisomie 12 (Häufigkeit ~15%).¹ Die chromosomal Veränderungen haben prognostische Bedeutung. Patienten mit einer del(13q) haben eine relativ günstige Prognose während Patienten mit einer del(17p) eine deutlich ungünstigere Prognose aufweisen. Zudem konnten durch den Einsatz von Sequenzierungstechniken im Hochdurchsatzverfahren rekurrente Mutationen vor allem in *NOTCH1* und *SF3B1* (Häufigkeit jeweils ~10%) nachgewiesen werden.¹

Aufgrund des ausgesprochen heterogenen Krankheitsverlaufs besteht in der Behandlung der CLL ein großer Bedarf an Modellen zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs. Kürzlich wurden im Rahmen eines internationalen Kollaborationsprojekts 8 Phase III-Studien mit insgesamt 3472 unbehandelten CLL-Patienten aus Frankreich, Deutschland, Großbritannien, Polen und den USA hinsichtlich prognostischer Biomarker gemeinsam ausgewertet.⁵ Das Ergebnis, der *International Prognostic Index for patients with CLL* (CLL-IPI), setzt sich aus den Variablen Alter, Ausbreitungsstadium, Beta2-Mikroglobulin, IGVH-Status und Aberrationen von TP53 (Deletion und oder Mutation) zusammen.⁵ Der CLL-IPI wurde an mehreren weiteren internationalen Patientenkollektiven validiert.⁵ Es können vier Risikogruppen mit hoch signifikanten unterschiedlichen 5-Jahres-Überlebensraten von 93%, 79%, 63% und 23% unterschieden werden.⁵ Eine wichtige Einschränkung des CLL-IPI ist, dass er nicht an Patientenkollektiven, die mit aktuellen zielgerichteten Substanzen wie z.B. Ibrutinib behandelt wurden, validiert ist.

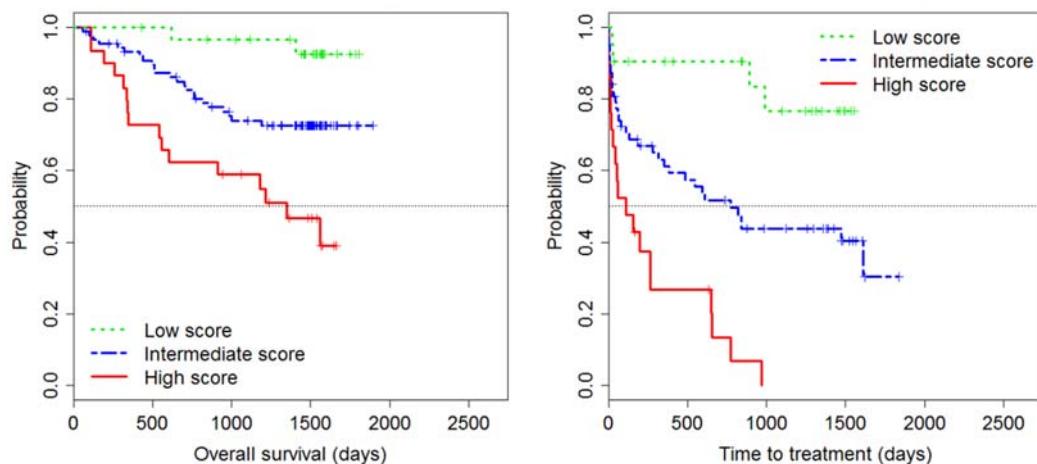
2.2. Eigene Arbeiten

- Herold T et al.: An eight-gene expression signature for the prediction of survival and time to treatment in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia, 2011
- Herold T et al.: Expression analysis of genes located in the minimally deleted regions of 13q14 and 11q22-23 in chronic lymphocytic leukemia-unexpected expression pattern of the RHO GTPase activator ARHGAP20. Genes Chromosomes Cancer, 2011
- Herold T et al.: 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. Leuk Lymphoma, 2013

2.2.1. Entwicklung einer auf Genexpression basierten Signatur zur Vorhersage des Gesamtüberlebens für Patienten mit CLL

Wie bereits unter 2.1. beschrieben besteht aufgrund des heterogenen Krankheitsverlaufs bei Patienten mit CLL ein großer Bedarf an Modellen, die eine Vorhersage des klinischen Verlaufs erlauben. Wir nutzten Affymetrix Microarray Daten von 151 CLL-Patienten, um einen auf Genexpression basierten prognostischen Score zur Vorhersage der Zeit bis zur Behandlungsbedürftigkeit und dem Gesamtüberleben zu erstellen. Durch einen komplexen Prozess unter Verwendung von *bootstrapping* und *principal component* Analyse entwickelten wir nach Präselektion von besonders effizienten Genexpressionsvariablen eine Signatur bestehend aus 8 Genen (*Prognostic Score 8; PS.8*). Der Score wird als kontinuierliche Variable aus der Summe der mit spezifischen Gewichten multiplizierten Expressionsdaten berechnet. Die Validierung erfolgte in einem unabhängigen Kollektiv von 149 Patienten, in dem die Genexpression mittels qRT-PCR bestimmt wurde. Durch die Aufteilung der Patienten in eine Hochrisiko-Gruppe und Niedrigrisiko-Gruppe (höchstes und niedrigstes Score-Quintile) sowie eine Intermediäre-Gruppe (übrige Patienten) konnte eine hoch signifikante Diskriminierung in drei Risikogruppen erzielt werden (**Abbildung 1**). In multivariaten Analysen war PS.8 die dominierende Variable für die Vorhersage der Zeit bis zur Notwendigkeit einer Therapie sowie mit Alter und der 17p Deletion die einzige signifikante Variable zur Vorhersage des Gesamtüberlebens. PS.8 zeigte auch in multiplen Subgruppen wie Patienten mit der Erstdiagnose einer CLL, einem frühen Erkrankungsstadium (Binet A) sowie bei Patienten mit Hoch- bzw. Niedrigrisiko-CLL (kategorisiert nach FISH und IGVH-Status) eine hochsignifikante Auf trennung.

Abbildung 1: Kaplan Meier Kurve von Patienten mit CLL. Die linke Kurve zeigt die Auftrennung des Genexpressionsscores PS.8 hinsichtlich des Gesamtüberlebens ($p<0.001$). Die rechte Kurve stellt den Verlauf bis zur Notwendigkeit einer Therapie dar ($p<0.001$).

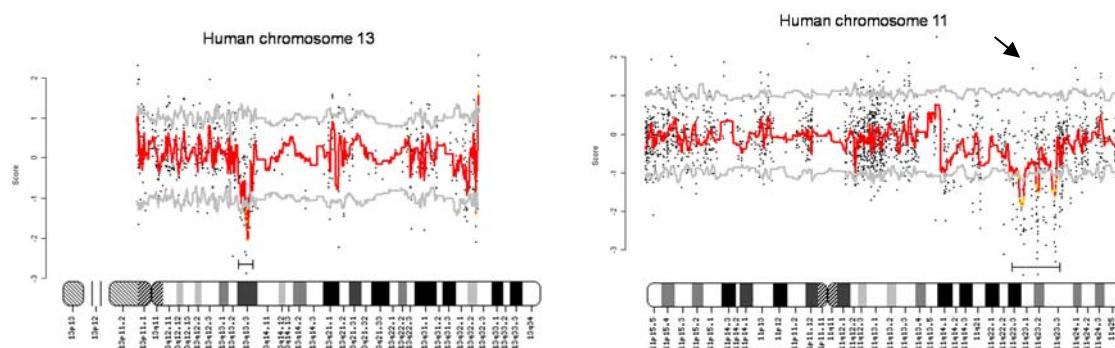


2.2.2. Genexpressionsanalyse der deletierten Regionen 13q14 und 11q22-23 bei Patienten mit CLL

Bei Patienten mit CLL zeigen sich in mehr als 60% der Fälle Deletionen der Regionen 13q14 und/oder 11q22-23.¹ Während in der 13q14 Region die Deletion von zwei Micro-RNA's als pathogenetisch relevante Veränderung identifiziert wurde, war die Rolle der Deletion 11q22-23 weitgehend unklar.¹ In vorausgegangenen Arbeiten wurde hervorgehoben, dass Teile der deletierten Regionen beider Chromosomen sich aus einer begrenzten, konservierten, chromosomal gemeinsamen Region im Rahmen der Evolution entwickelt haben.⁶ Wir nutzen daher unseren bereits unter 2.2.1. beschriebenen Genexpressionsdatensatz, um die differentielle Genexpression dieser von Deletionen betroffenen Regionen bei CLL Patienten genauer zu untersuchen. Mittels dem *MicroArray Chromosome Analysis Tool* (MACAT) gelang es uns, die regionale Genexpression weiterführend zu analysieren (**Abbildung 2**). Hierdurch lässt sich die verminderte Expression der Gene in den betroffenen Regionen grafisch darstellen. Die verminderte Genexpression wird mit der *gene dosage* Hypothese erklärt, welche besagt, dass durch die verminderte Anzahl an Allelen weniger transkribierte Produkte entstehen. Dieser Effekt lässt sich natürlich nur bei abgelesenen Genen nachweisen und kann sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Paradoxerweise zeigte das Gen *ARHGAP20*, welches sich in der deletierten Region

11q22-23 befindet, keine verminderte, sondern im Gegenteil eine signifikant gesteigerte Expression.

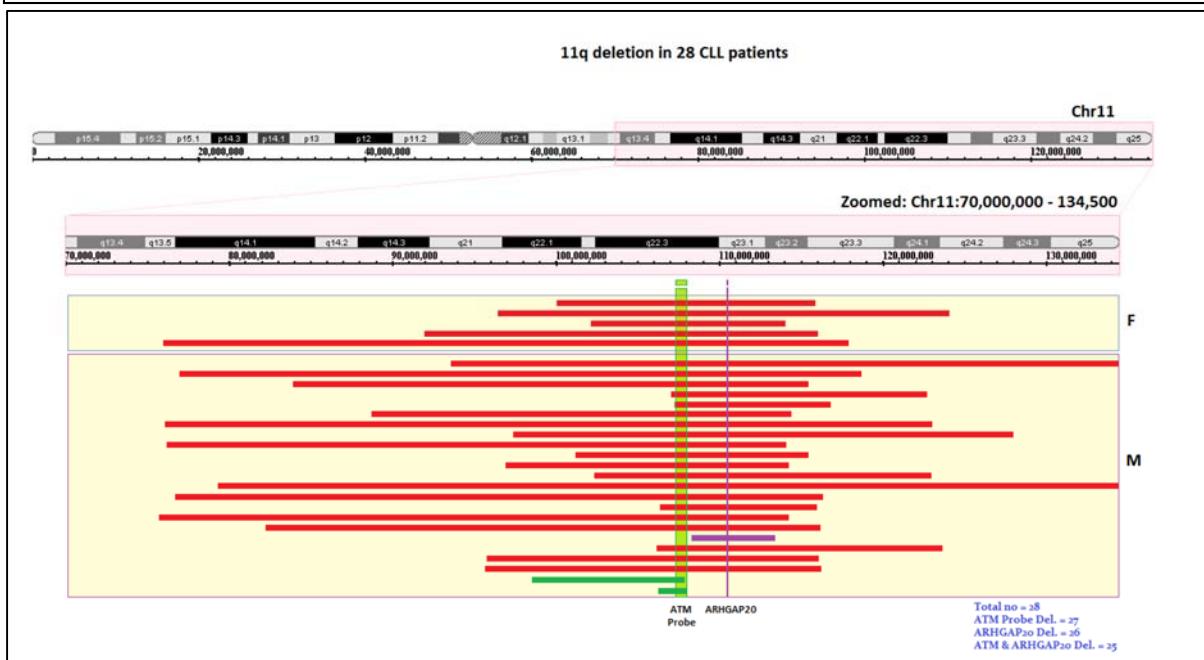
Abbildung 2: Darstellung der lokalen Genexpression auf den Chromosomen 13 und 11. Einzelne Expressionsdaten sind durch Punkte dargestellt. Regionen mit signifikant verminderter Genexpression zeichnen sich durch eine Überschreitung des grauen Konfidenzbandes aus. Die signifikant (gelbe Punkte) vermindert exprimierten Regionen 13q14 und 11q22-23 sind markiert. Das Gen ARHGAP20 ist mit einem Pfeil markiert.



Interessanterweise handelt es sich hierbei um eines der Gene, die z.B. noch bei Zebrafischen zusammen mit einigen Genen der 13q14 Region in einer chromosomalen Region lokalisiert sind. Um zu belegen, dass *ARHGAP20* sich auch tatsächlich in der minimal deletierten Region befindet nutzten wir öffentlich zugängliche SNP-Datensätze. Hierdurch konnten wir belegen, dass *ARHGAP20* tatsächlich in der Regel von der Deletion 11q22-23 betroffen ist (**Abbildung 3**).

In weiterführenden Analysen konnten wir zeigen, dass auch bei Patienten mit einer 13q14 Deletion ein vergleichbares Expressionslevel von *ARHGAP20* zu verzeichnen ist. Die Ergebnisse für beide chromosomale Regionen konnten zudem mittels qRT-PCR an einem unabhängigen Patientenkollektiv bestätigt werden. Dieses als Syntenie bezeichnete Muster zweier auf den ersten Blick getrennter chromosomaler Regionen deutet auf einen evolutionär konservierten, gemeinsamen Regulierungsmechanismus beider bei der CLL häufig betroffenen Regionen hin.

Abbildung 3: Darstellung der Kopienzahlveränderung auf Chromosom 11 bei Patienten mit Nachweis einer 11q22-23 Deletion. Das Gen ARHGAP20 befindet sich in >90% der Fälle im Bereich der betroffenen Region.



2.2.3. Die hohe Expression von *MZB1* ist mit einem ungünstigen klinischen Verlauf bei Patienten mit CLL, FL und DLBCL assoziiert

Da es sich bei Genen der unter 2.2.1. beschriebenen Signatur um zum Teil wichtige Marker von zellulären Signalwegen wie Proliferation und Adhäsion handelte, analysierten wir die Rolle dieser Gene in weiterführenden Arbeiten in anderen hämatologischen Erkrankungen. Wir nutzten hierzu die in öffentlichen Datenbanken hinterlegten Expressionsdaten von Patienten mit AML, Multiplem Myelom, folliculärem Lymphom (FL) und diffus großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL). Wir konnten zeigen, dass ein Signatur-Gen (*MZB1*) nicht nur bei Patienten mit CLL prognostische Bedeutung besitzt, sondern auch bei Patienten mit FL und DLBCL. Im Falle des DLBCL konnte sogar eine zusätzliche Vorhersagekraft zur molekularen Klassifikation in den germinal center B-cell-like (GCB) Subtyp und den activated B-cell-like (ABC) Subtyp gezeigt werden (**Abbildung 4**). Allerdings war dieser Effekt nur in der Subgruppe ohne Rituximab-Therapie signifikant. Ein Grund hierfür könnte die geringe Zahl an Todesfällen in der R-CHOP-Gruppe im Vergleich zu der mit CHOP behandelten Patientengruppe sein (26% vs. 58%). Nach wie vor handelt es sich bei *MZB1* unseres Wissens nach um den bisher einzigen beschriebenen Genexpressionsmarker, der eine prognostische Signifikanz hinsichtlich des

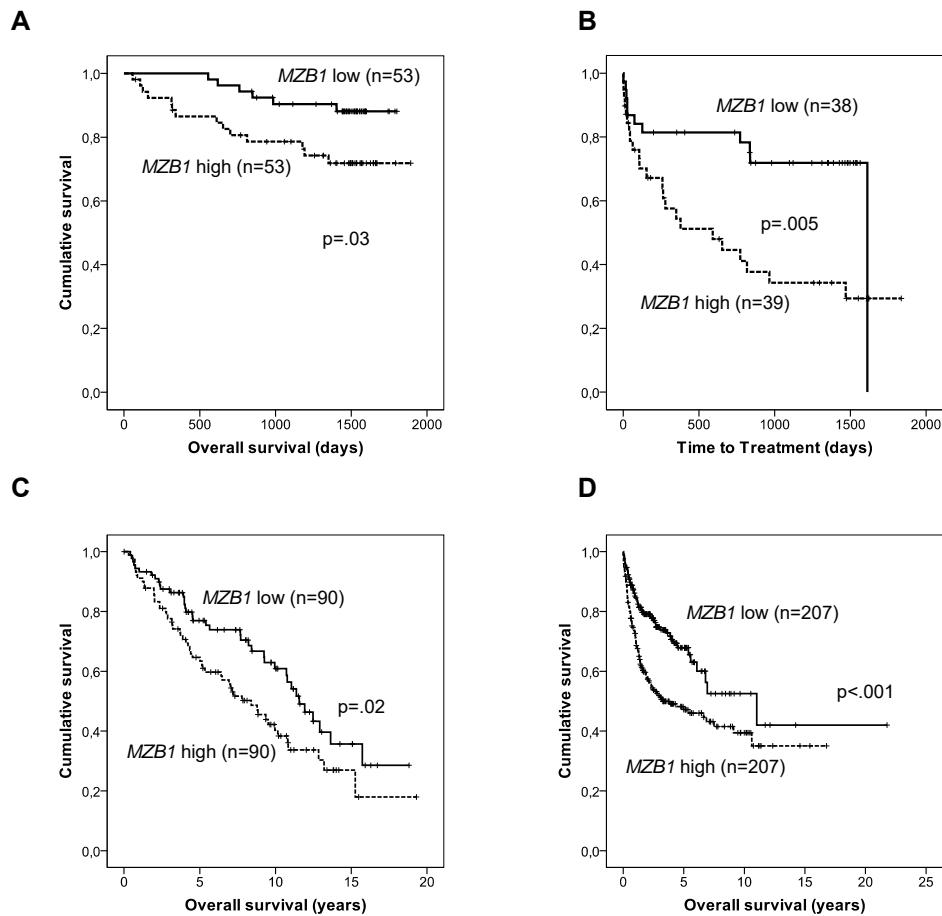


Abbildung 4: Kaplan Meier Kurve von Patienten mit CLL, FL und DLBCL. A zeigt das Gesamtüberleben von unbehandelten CLL-Patienten; B stellt die Zeit bis zur Notwendigkeit einer Behandlung dar. C und D stellen das Gesamtüberleben von Patienten mit FL und DLBCL dar.

Gesamtüberlebens in verschiedenen Lymphom-Subgruppen zeigt. Das Ergebnis zeigt, dass bei Krankheiten mit unterschiedlichem Erscheinungsbild teilweise ähnliche pathogenetische Mechanismen beteiligt sind.

2.3. Diskussion und Ausblick

Die Analyse von Genexpressionsdaten ist bei Lymphomen durch die Weiterentwicklung der Sequenzierungstechniken in den letzten Jahren in den Hintergrund gerückt. Nach wie vor stellen sie aber eine Möglichkeit dar, komplexe biologische Regelkreise aufzudecken. Im Hinblick auf die therapeutischen Möglichkeiten haben sich durch die vor allem in der Therapie der CLL neu zugelassenen, zielgerichteten Substanzen zum Teil außergewöhnliche Veränderungen ergeben. Speziell durch die Zulassung des BTK-Inhibitors Ibrutinib und des BCL2-Inhibitor Venetoclax haben sich für Patienten mit CLL hier vielversprechende und vergleichsweise nebenwirkungsarme neue Möglichkeiten der Behandlung eröffnet. In wie weit diese neuen Therapien jedoch auch in der Langzeitanwendung ihre Sicherheit beweisen und welche Variablen in Zukunft für die Vorhersage der Prognose relevant sein werden, ist aktuell noch nicht abzusehen. Letztendlich wecken jedoch die Fortschritte im Verständnis der Erkrankung und der Wirksamkeit der neuen Substanzen Hoffnungen auf weitere Fortschritte in der Zukunft.

3. Molekulare Charakterisierung der ALL

3.1. Hintergrund

Die ALL ist eine sehr heterogene Erkrankung und auf molekularer Ebene sehr häufig durch das Vorliegen von verschiedenen Fusionsgenen charakterisiert.⁷ Zusätzlich zeigen sich sehr häufig Veränderungen der Kopienzahl von Genen wie etwa *IKZF1* und rekurrente Mutationen in Genen wie z.B. *NOTCH1*.⁷

In den letzten Jahren wurde zunächst bei Kindern eine neue ALL-Subgruppe beschrieben, die aufgrund der Ähnlichkeit auf der Ebene der Genexpression zu Patienten mit BCR-ABL1-Translokation als BCR-ABL1-like oder Philadelphia(Ph)-like bezeichnet wurde.⁸ Bei dieser Subgruppe, die bei jungen Erwachsenen bis zu ca. 30% der B-Vorläufer-ALL-Patienten ausmacht,⁹ finden sich gehäuft molekulare Veränderungen, die einer zielgerichteten Therapie zugänglich sind.⁸ Es konnte gezeigt werden, dass dieselben Tyrosinkinaseinhibitoren, die auch bei Patienten mit BCR-ABL1-Translokation verwendet werden, auch andere Fusionsgene wie etwa RCSD1-ABL2 inhibieren können. Da es sich aber um ein heterogenes Spektrum von Translokationen einer ganzen Reihe von Zielgenen mit einer Vielzahl an möglichen Translokationspartnern und zusätzlich noch variablen DNA-Bruchpunkten handelt, war eine Routinediagnostik dieser Veränderungen bisher selbst in hoch spezialisierten Laboren nicht möglich. Aufgrund der therapeutischen Implikationen besteht ein großes Interesse an entsprechenden Analyseverfahren. Tabelle 2 stellt die bisher gefundenen Translokationen und Behandlungsoptionen dar.

Tabelle 2

Häufiges Fusionsgen	Möglicher Fusionspartner	Mögliche therapeutische Option
ABL1	ETV6, NUP214, RCSD1, RANBP2, SNX2, ZMIZ1	Dasatinib (oder anderer TKI)
ABL2	RCSD1, ZC3HAV1, PAG1	Dasatinib (oder anderer TKI)
CRLF2	IGH, P2RY8	Ruxolitinib
CSF1R	SSBP2	Dasatinib (oder anderer TKI)
DGKH	ZFAND3	Unbekannt
EPOR	IGH, IGK	Ruxolitinib
IL2RB	MYH9	JAK1/JAK3 Inhibitor
JAK2	PAX5, ATF7IP, EBF1, BCR, ETV6, SSBP2, TERF2, TPR, PPFIBP1, STRN3, OFD1	Ruxolitinib

LYN	NCOR1	Dasatinib (oder anderer TKI)
NTRK3	ETV6	Crizotinib
PDGFRB	EBF1, ATF7IP, ZEB2, SSBP2, TNIP1	Dasatinib (oder anderer TKI)
PTK2B	KDM6A, STAG2	FAK Inhibitor
TSLP	IQGAP2	Ruxolitinib
TYK2	MYB	Ruxolitinib

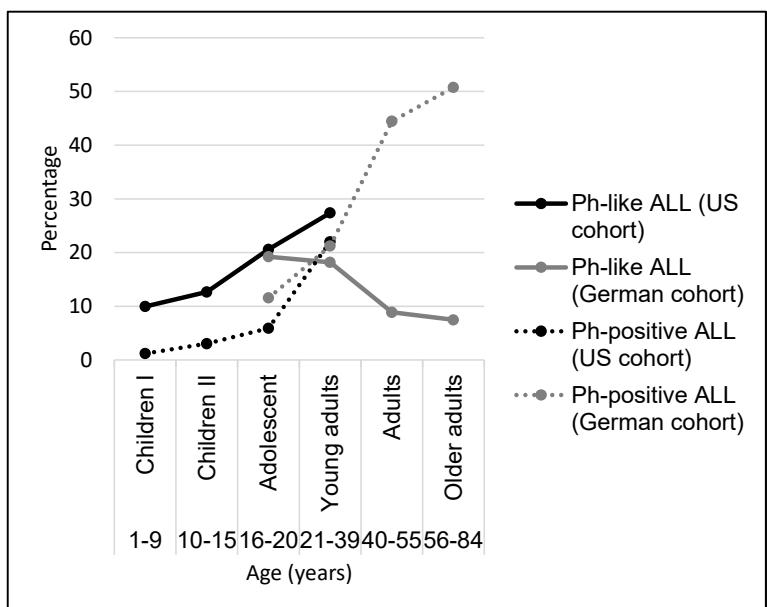
3.2. Eigene Arbeiten

- Herold T et al.: Ph-like acute lymphoblastic leukemia in older adults. N Engl J Med, 2014
- Herold T et al.: Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in adults have frequent IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis. Haematologica, 2016
- Herold T et al.: Philadelphia-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. Curr Oncol Rep, 2017

3.2.1. Inzidenz der Ph-like-ALL bei erwachsenen Patienten

In Zusammenarbeit mit der deutschen ALL-Studiengruppe (GMALL) unter Leitung von Frau Dr. Nicola Gökbüget und in Kollaboration mit der Berliner Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Claudia Baldus gelang es uns, ein Kollektiv von 207 homogen, im Rahmen der GMALL-Studien behandelten erwachsenen B-Vorläufer-ALL-Patienten mittels Affymetrix Microarray basierter Genexpressionsanalysen hinsichtlich der relevanten Subgruppen und insbesondere auch der Ph-like-ALL-Subgruppe zu klassifizieren.

Eine besondere Schwierigkeit in der Zuordnung von ALL-Patienten zur Ph-like-Subgruppe liegt in der auf Genexpressionsanalysen beruhenden derzeitigen Klassifikation begründet. Der Ph-like Subtyp wird ausschließlich bei Patienten mit B-Vorläufer-ALL beobachtet. Translokationen der Gene von *KMT2A*, *ETV6-RUNX1* oder *TCF3-PBX1* kommen nie vor. Die Ph-like-Subgruppe zeigt ein mit Patienten mit BCR-ABL1-Translokation verwandtes Expressionsprofil ohne jedoch diese Translokation aufzuweisen. Die Ähnlichkeit entsteht durch heterogene genetische Veränderungen, z.B. Translokationen von *CRLF2* oder *ABL2*, die eine mit der BCR-ABL1-Translokation verwandte Expressionsveränderung hervorrufen.



Als erste Arbeitsgruppe weltweit konnten wir durch die Analyse von 204 Genexpressionsprofilen von erwachsenen Patienten (16-84 Jahre) mit B-Vorläufer-ALL, die im Rahmen von GMALL-Studien behandelt wurden, zeigen, dass die Inzidenz der Ph-like-ALL bei nord-europäischen Patienten

Abbildung 5: Altersabhängige Inzidenz der Ph-like und Ph-positiven-Subgruppen in US- und GMALL-Kohorten. Die Inzidenz zeigt ein Maximum bei jungen Erwachsenen.

einen glockenförmigen Verlauf zeigt (**Abbildung 5**). Die Inzidenz ist mit ca. 19-27% aller Patienten mit B-Vorläufer-ALL bei heranwachsenden und jungen Erwachsenen am höchsten und fällt mit steigendem Alter im Verlauf ab. Dies bestätigte zum einen unabhängig die Daten einer amerikanischen Arbeitsgruppe und ermöglichte zum ersten Mal eine Einschätzung der Frequenz der Ph-like-Subgruppe bei älteren ALL-Patienten.⁸ Aktuellere Daten deuten neben der altersabhängigen Inzidenz zusätzlich auf einen herkunftsspezifischen Effekt hin. Amerikanische Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Ph-like-Subgruppe gehäuft bei Patienten mit hispanoamerikanischer oder spanischer Herkunft auftritt.¹⁰ Warum es hier eine scheinbare Prädisposition gibt, ist derzeit noch unklar und Gegenstand aktueller Untersuchungen.

3.2.2. Prognose und molekulare Charakteristika erwachsener Ph-like-ALL-Patienten

In Anknüpfung an die Vorarbeiten, die unter 3.2.1. beschrieben sind, führten wir weitere Analysen an dieser homogenen ALL-Patientenkohorte durch. Insbesondere wurden Ph-like-Patienten und Patienten ohne bekannte Translokation hinsichtlich rekurrenter genetischer Aberrationen mit FISH, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) zur Detektion von Kopienzahlveränderungen und gezielter DNS-Sequenzierung für 131 Zielgene weiterführend molekular untersucht. Des Weiteren

wurden die Analysen durch die klinischen Daten der GMALL und die Daten zur MRD ergänzt. Durch diese Arbeiten gelang es uns erstmals, ein homogen und nach aktuellen Therapieschemata behandeltes Kollektiv von erwachsenen Ph-like-ALL-Patienten weiterführend zu charakterisieren. Wir konnten zeigen, dass die Ansprechraten der Patienten mit Ph-like-ALL zwar vergleichbar der anderer Patienten-Subgruppen waren, es jedoch gehäuft zu zum Teil sehr raschen Rezidiven kommt, welche für die schlechte Prognose der Patienten verantwortlich sind. Ebenfalls als erste Arbeitsgruppe konnten wir nachweisen, dass hier die Bestimmung von MRD bei erwachsenen Patienten zur Detektion der Risikogruppe von größter Wichtigkeit ist.

Die molekularen Untersuchungen der Ph-like-Subgruppe zeigten im Vergleich zu anderen B-Vorläufer-ALL-Patienten ein dem bei Kindern ähnliches beobachtetes Spektrum an Kopienzahlveränderungen und Mutationen (**Abbildung 6**). Wir konnten jedoch nachweisen, dass die Frequenz von *JAK2*-Mutationen bei älteren Patienten signifikant zunimmt. Ähnlich wie die Frequenz von *IKZF1*-Deletionen scheint hier eine altersabhängige Verteilung vorzuliegen.

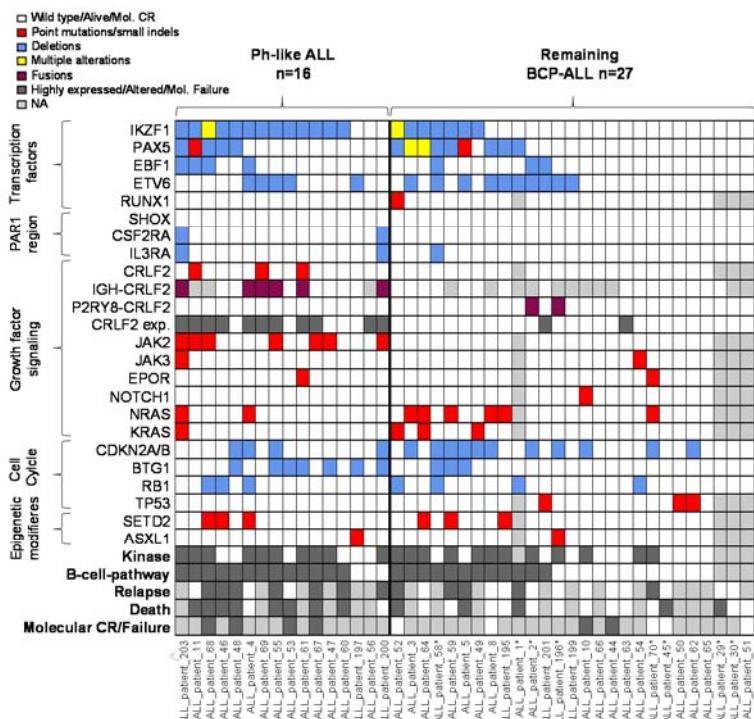


Abbildung 6: Grafische Darstellung der Verteilung verschiedener genetischer und auf Genexpression basierender Unterschiede zwischen Patienten mit Ph-like ALL- und weiteren B-Vorläufer-ALL-Patienten. Es zeigt sich eine Häufung von *IKZF1*-Deletionen, Translokationen von *CRLF2* und Mutationen in *JAK2* in der Gruppe der Patienten mit einem Ph-like Expressionsprofil.

3.3. Diskussion und Ausblick

Kürzlich konnte durch eine Arbeitsgruppe um Prof. Charles Mullighan (St. Jude, USA) eine alle Altersgruppen umfassende Analyse von Patienten mit Ph-like-ALL publiziert werden.¹¹ Diese Arbeit bestätigte in großen Teilen unsere Ergebnisse. Wichtigster Unterschied zwischen den amerikanischen und nordeuropäischen Studienkollektiven scheint eine höhere Frequenz der Ph-like Subgruppe in den US-Kollektiven aufgrund einer Häufung bei Patienten mit hispanoamerikanischer oder spanischer Herkunft zu sein. Dies führt vermutlich zu der beobachteten verminderen Fallzahl in den Studienkollektiven der GMALL. Die intensiven molekularen Analysen an inzwischen mehr als 2000 ALL-Patienten haben das Verständnis der molekularen Grundlage der ALL erweitert.¹² Es fanden sich zahlreiche, durch zielgerichtete Medikamente behandelbare genetische Veränderungen.^{7,8} Einen Überblick gibt Tabelle 2.¹² Die derzeitige Schwierigkeit besteht darin, die Detektion dieser Veränderungen in die klinische Routine zu integrieren. Aufgrund heterogener Bruchpunkte und zahlreicher beteiligter Gene sind bisherige Routineverfahren wie PCR und FISH nicht geeignet, um eine Diagnose aller Veränderungen zu erlauben, die einer zielgerichteten Therapie zugänglichen wären. Andererseits sind Verfahren wie RNA-Sequenzierung noch nicht im klinischen Routinealltag etabliert. Zahlreiche Studien wurden initiiert (unter anderem ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02723994, NCT02420717), um ein verbessertes Therapieansprechen bei Patienten mit Ph-like-ALL zu prüfen. Diese Ergebnisse werden den Stellenwert der ausgedehnten molekularen Charakterisierung und deren zukünftige Rolle im klinischen Alltag aufzeigen. Einen Überblick über den gegenwärtigen Stand der Forschung und deren Implikationen in der klinischen Praxis konnten wir in einem Review kürzlich veröffentlichen.¹²

4. Molekulare Charakterisierung der AML

4.1. Hintergrund

Die AML gilt aus vielerlei Gründen als eine molekulare Modellerkrankung und viele inzwischen alltägliche Verfahren oder Veränderungen wurden hier erstmals angewandt oder beschrieben. Einer der Gründe hierfür ist, dass die Tumorzellen vergleichsweise einfach durch eine Abnahme von peripherem Blut gewonnen werden können. Zudem gelang es vergleichsweise früh, diese Zellen auch *ex vivo* in Teilung zu bringen. Hierdurch waren die Entdeckungen der ersten Fusionsgene durch Prof. Janet D. Rowley in den siebziger Jahren möglich. Die erste Genomsequenzierung eines Tumors überhaupt wurde an AML-Zellen 2008 durchgeführt.¹³ In Folge dieser Pilotstudien konnten in den letzten Jahren zunächst durch große Konsortien größere Patientenkollektive mittels der Hochdurchsatzsequenzierung analysiert werden.¹⁴ Aktuell geht man davon aus, dass sich im Median bei AML-Patienten 13 nicht-synonyme Mutationen finden.¹⁴ Dies ist im Vergleich mit anderen Tumoren wie etwa dem Pankreaskarzinom eine eher geringe Anzahl an Veränderungen. Dennoch stellt sich die AML als heterogene Erkrankung sowohl klinisch, als auch molekular dar. Dies liegt an der Vielzahl der betroffenen Gene sowie deren vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten. Für die klinische Forschung sind vor allem zwei Punkte von besonderer Relevanz. Erstens können die molekularen Besonderheiten der AML für die Vorhersage der Prognose der Erkrankung genutzt werden und zweitens zeigt sich, dass die Veränderungen der Erkrankung zwar komplex und heterogen, jedoch nicht unendlich sind. Hierdurch bietet sich die Möglichkeit, spezifische Therapien zu entwickeln.

4.2. Eigene Arbeiten

Ausgewählte eigene Publikationen:

- Li Z*, Herold T*, He C*: Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: an international collaborative study. *J Clin Oncol*, 2013
*geteilte Erstautorenschaft
- Herold T et al.: Isolated trisomy 13 defines a genetically homogenous AML subgroup with high frequency of mutations in spliceosome genes and poor prognosis. *Blood*, 2014.

- Herold T et al.: Acute Myeloid Leukemia with Del(9q) is Characterized by Frequent Mutations of NPM1, DNMT3A, WT1 and Low Expression of TLE4. *Genes Chromosomes Cancer*, 2016.
- Ng SW et al.: A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*, 2016
- Metzeler KH et al.: Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2016

4.2.1. Entwicklung eines auf Genexpression basierenden prognostischen Scores zur Vorhersage des Gesamtüberlebens bei Patienten mit AML

Die AML ist eine prognostisch und biologisch heterogene Erkrankung.¹⁵ Die größte prognostische Aussagekraft über den Krankheitsverlauf hat neben dem Alter und dem Ansprechen auf die Behandlung das Ergebnis der zytogenetischen Untersuchung sowie einige AML typische Mutationen (zusammengefasst in der *European LeukemiaNet (ELN) Genetic Classification*).¹⁵ Können in den günstigsten Risikogruppen noch Heilungsraten von >50% auch bei älteren Menschen erzielt werden, so sind die Überlebenschancen bei Patienten mit ungünstigem Risikoprofil gering.¹⁵ Durch die Identifikation AML-typischer Mutationen wie z. B. *FLT3*, *NPM1* und *CEBPA* (die in die ELN-Klassifikation von 2010 Eingang gefunden haben) konnte eine deutliche Verbesserung der Risikoklassifizierung von Patienten mit AML ohne zytogenetische Aberrationen erreicht werden.¹⁵ Durch die Entwicklung und Verbreitung der DNA-Sequenzierung im Hochdurchsatzverfahren wurden zahlreiche weitere Mutationen bei AML Patienten identifiziert.¹⁴ Hierzu gehören Mutationen in *IDH1*¹⁴, *IDH2*¹⁴, *TP53*¹⁴, *DNMT3A*¹⁶, *RUNX1*¹⁴, *TET2*¹⁷ oder *ASXL1*¹⁸. Im Durchschnitt liegen 13 nicht-synonyme Varianten bei einem AML Patienten vor.¹⁴ Hiervon betreffen etwa fünf Varianten häufig bei AML Patienten mutierte Gene.¹⁴ Inwiefern diese Vielzahl von Mutationen Eingang in neue Risikoklassifikationen gewinnen werden, ist noch nicht abzuschätzen. Neuere Publikationen schlagen eine auf die Mutationsanalyse beschränkte Analyse zur Risikovorhersage vor.¹⁹ Diese Modelle erfordern jedoch noch weitere Validierung. Ob durch bestimmte Mutationen wie z.B. *TP53*, *RUNX1* oder *ASXL1* eine sichere Vorhersage des klinischen Verlaufs möglich sein könnte, ist derzeit ebenfalls noch unklar.

Eine Ergänzung bzw. eine Alternative gegenüber der Mutationsanalyse einzelner Gene stellt die Genexpressionsanalyse dar. Mit ihr ist es aktuell möglich, innerhalb kürzester Zeit nahezu alle kodierenden und auch zahlreiche nicht kodierenden RNAs

gleichzeitig zu analysieren. Im Gegensatz zur reinen Sequenzierungsanalyse bilden Genexpressionsdaten auch epigenetische Veränderungen ab und können zudem als Surrogat für bisher unbekannte Mutationen, unter anderem auch in regulatorischen Sequenzen dienen. Genexpressionsanalysen erlauben Rückschlüsse auf vorliegende Mutationen und sind zum Teil in der Lage, die Mutationsanalysen in Hinblick auf prognostische Aussagen zu übertreffen.^{20,21} Genexpressionsanalysen wurden bereits erfolgreich zur Etablierung von prognostischen Scores zur Risikoklassifikation eingesetzt. So konnten Metzeler *et al.* mittels einer 66 Gene umfassenden Signatur eine signifikante Verbesserung der Vorhersage des Gesamtüberlebens bei Patienten mit AML ohne zytogenetische Veränderungen zeigen.²²

Im Rahmen einer internationalen Kooperation mit HOVON (Hemato-Oncologie voor Volwassenen Nederland), AMLSG (Deutsch-Österreichische Studiengruppe Akute Myeloische Leukämie) und CALGB (The Cancer and Leukemia Group B, USA) konnte unsere Arbeitsgruppe (Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group, AMLCG) durch die Integration einer Gensignatur in die damalige ELN-Klassifikation von 2010 eine Verbesserung der prognostischen Vorhersage demonstrieren.²³ Dies gelang durch die Analyse von sogenannten Expressions-Arrays. Hier erfolgt die Analyse von mehreren tausend Genexpressions-Markern parallel. Eine besondere Schwierigkeit stellte in diesem Projekt die Verwendung zahlreicher verschiedener Analyseplattformen mit unterschiedlichem Proben-Design dar. Durch unsere amerikanischen Kollaborationspartner wurde auf verschiedenen kleineren Plattformen eine prognostische Genexpressionssignatur erstellt. Diese wurde dann von uns und den anderen beteiligten Studiengruppen unabhängig validiert.

Die AMLCG führte eine der größten Studien zur Behandlung der AML durch (AMLCG-1999 Studie).²⁴ Alle Patienten erhielten eine Standardbehandlung mit Cytarabin und einem Anthrazyklin. An einer Subgruppe (562 Patienten, Querschnitt der Studienpopulation) wurden Genexpressionsprofile (Affymetrix HGU 133 A&B und Plus 2.0) bei Erstdiagnose bestimmt. Diese Genexpressionsdaten wurden verwendet, um die Patienten anhand der durch die Genexpression modifizierten integrierten Klassifikation in Risikogruppen einzuteilen. Sowohl für die Gesamtkohorte der Patienten als auch für die Subgruppe der Patienten >60 Jahre konnten wir eine Verbesserung der Risiko-Vorhersage im Vergleich zur ELN Klassifikation von 2010 nachweisen (**Abbildung 7**).

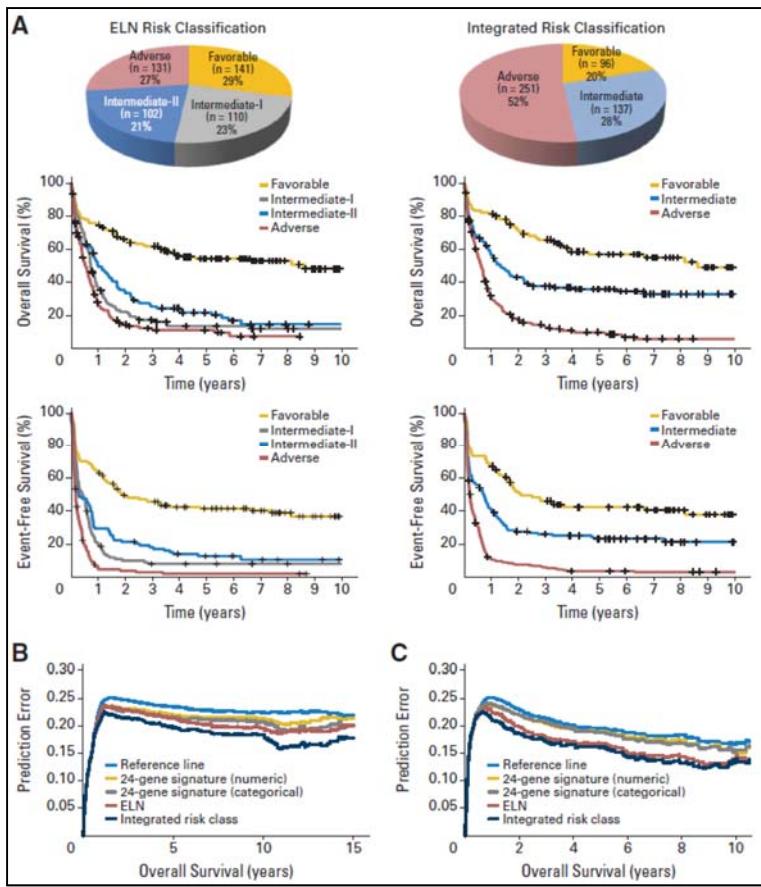


Abbildung 7: Darstellung der Risikovorhersage für das Gesamt- und Ereignisfreie Überleben mittels der ELN2010 Klassifikation und eines Models basierend auf der Integration von Genexpressionsmarkern in das ELN2010 Modell (A). B und C zeigen den prognostischen Zusatznutzen des integrierten Modells mittels *prediction error curves*.

Gesamtüberleben gezeigt.²⁵

4.2.2. Charakterisierung seltener molekularer Subgruppen

Wie unter 4.1. und 4.2.1 beschrieben entfällt etwa die Hälfte aller bisher gefundenen Mutationen auf Gene, von denen heute bekannt ist, dass sie bei der AML gehäuft von Veränderungen betroffen sind. Hiervon lässt sich eine kleine Gruppe von etwa 10 Genen definieren, die bei mehr als 10% aller AML-Patienten betroffen sind.²⁶ Des Weiteren gibt es aber eine große Anzahl von Genen, die jeweils nur in einem sehr

Die integrierte Risiko-Klassifikation zeigte sich allen zu diesem Zeitpunkt in der Routine bestimmten Prognosemarkern überlegen.

Auf einem ähnlichen Prinzip beruhte die Erstellung einer sogenannten stammzell-assoziierten Genexpressions-Signatur. Im Rahmen einer weiteren internationalen Kollaboration wurde durch unsere Partner an der University of Toronto ein weiterer, aus nur noch 17 Genen bestehender

Genexpressions-Score (LSC-17) abgeleitet. Der LSC-17 wurde ebenfalls mit dem Ziel entwickelt, mittels Genexpression eine Risikoabschätzung für das Gesamtüberleben bei Erstdiagnose zu erreichen. Für den LSC-17 wurde in fünf unabhängigen Patientenkollektiven verschiedener Studiengruppen, darunter unsere eigene AMLCG-Kohorte, eine Assoziation mit dem

kleinen Anteil der Patienten verändert sind. Hieraus ergibt sich eine hohe Anzahl möglicher Kombinationen von Mutationen und jeder Patient zeigt ein hochgradig individuelles und spezifisches Mutationsmuster.

Mittels zielgerichteter Sequenzierung von genomischer DNA von 68 Kandidatengenen bei insgesamt 664 erwachsenen AML-Patienten konnten wir bei über 99% aller untersuchten AML-Patienten eine molekulargenetisch definierte, wahrscheinlich krankheitsrelevante Veränderung („Driver Mutation“) finden.²⁶ Interessanterweise zeigte sich hierbei, dass bestimmte Kombinationen nie und andere häufig gemeinsam auftreten. Dies bestätigte in Teilen unsere Ergebnisse aus vorherigen Arbeiten, die wir und andere durch die Charakterisierung von seltenen zytogenetischen Subgruppen gewonnen hatten.

4.2.2.1. AML-Patienten mit isolierter Trisomie 13

Bei der AML mit isolierter Trisomie 13 handelt es sich um eine ausgesprochen seltene zytogenetische Subgruppe. Die Inzidenz wird mit 0.7% aller AML-Fälle angegeben. Interessanterweise wurde diese seltene Subgruppe bereits 1990 und 2007 mehrfach genauer untersucht.²⁷⁻²⁹ Besonderes Interesse erweckte der Umstand, dass eine enge Assoziation mit bestimmten morphologischen Charakteristika (French-American-British (FAB)-Klassifikation FAB M0) und dem gehäuften Auftreten von *RUNX1*-Mutationen besteht. Wir konnten anhand unserer Genexpressionsdaten dieser Subgruppe ein einzigartiges und hoch spezifisches Genexpressionsprofil zuordnen. Zudem zeigten Patienten mit dieser Subgruppe ein schlechteres Gesamtüberleben (**Abbildung 8**). Von zwei Patienten standen uns genetisches Material von Erstdiagnose und Remission zur Verfügung. An diesen Proben führten wir eine Exom-Sequenzierung durch und suchten dann die gefundenen Varianten

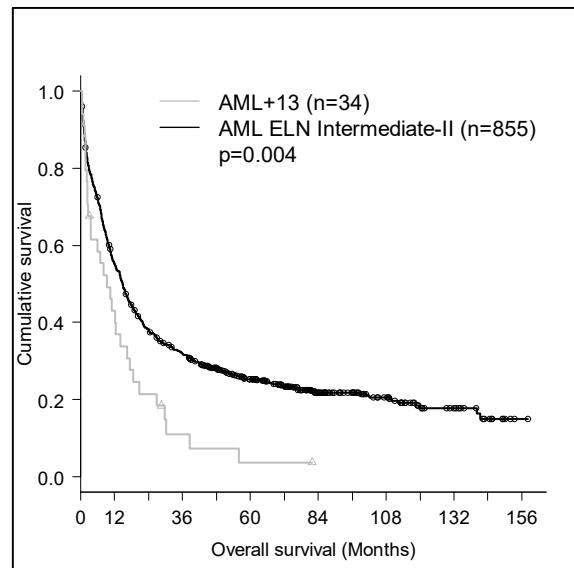


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit AML und isolierter Trisomie 13 (AML+13) sowie einer entsprechenden Referenzgruppe mit intermediärem Risikoprofil.

Gesamtüberleben (**Abbildung 8**). Von zwei Patienten standen uns genetisches Material von Erstdiagnose und Remission zur Verfügung. An diesen Proben führten wir eine Exom-Sequenzierung durch und suchten dann die gefundenen Varianten

sowie bekannte rekurrent mutierte Gene in der AML an einer Kohorte von 16 Patienten mit isolierter Trisomie 13. Erstaunlicherweise konnten wir neben der bekannten Assoziation mit *RUNX1* eine massive Häufung (ca. 90%) von Mutationen in Genen des Spliceosomes (vor allem *SRSF2*) nachweisen (**Abbildung 9**). Nahezu alle Patienten mit einer isolierten Trisomie 13 weisen also neben einer *RUNX1*-Mutation eine weitere Mutation in *SRSF2* auf. Eine solche Konstellation lässt sich nur durch einen kooperativen Effekt der einzelnen Veränderungen erklären. Dies ist vor allem deshalb von Bedeutung, da *RUNX1* Mutationen mit etwa 15% und *SRSF2*-Mutationen mit ca. 10% zu den häufigsten wiederkehrenden Mutationen bei AML-Patienten gehören. Ebenso wie bei Patienten mit isolierter Trisomie 13 findet sich hier eine enge Assoziation beider Mutationen miteinander. Als potentiellen weiteren Partner dieser kooperativen Veränderungen analysierten wir das Expressionsprofil des Chromosoms 13. Neben der in der AML bekannten Tyrosinkinase *FLT3*, welches vermehrt exprimiert wurde, fanden wir das Gen *SPRY2*, welches ebenfalls auf Chromosom 13 liegt und paradoxe Weise deutlich vermindert exprimiert wurde (**Abbildung 10**).

Abbildung 9: Darstellung der Verteilung von Mutationen bei Patienten mit AML+13. Die Pfeile markieren Patienten mit Exom-Sequenzierung.

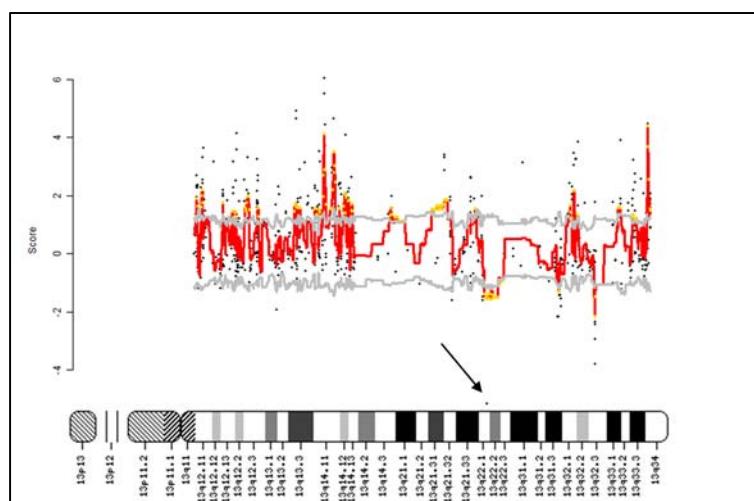
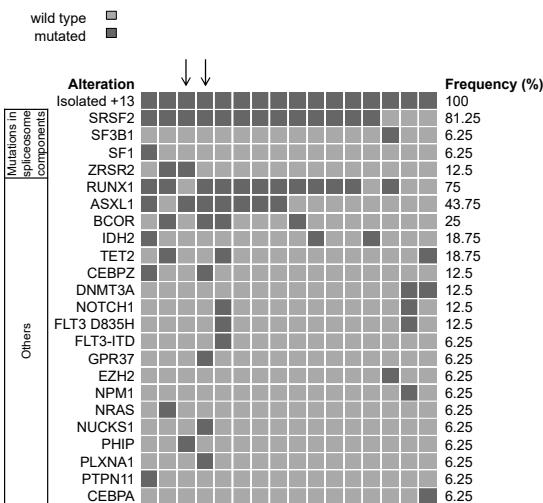


Abbildung 10: Regionale Genexpression auf Chromosom 13. Einzelne Expressionsdaten sind durch Punkte dargestellt. Regionen mit signifikant verminderter bzw. gesteigerter Expression zeigen ein Überschreiten des grauen Konfidenzbandes. Das Gen *SPRY2* ist mit einem Pfeil markiert.

SPRY2 ist ein Inhibitor von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Eine drastische Verminderung der Expression von *SPRY2* führt demnach möglicherweise zu einer verminderten Bildung des Inhibitors und führt in der Folge zu einer gesteigerten Aktivität von Tyrosin-Kinasen, die wiederum, wie im Falle von *FLT3*, zu einem verstärkten Zellwachstum führen. Diese Hypothese und die Rolle in weiteren AML-Subgruppen werden derzeit noch in weiteren Experimenten geprüft.

Zusammenfassend sind unsere Analysen an der seltenen AML Subgruppe mit isolierter Trisomie 13 ein Beispiel, inwiefern seltene, klar definierte Subgruppen zum Teil Rückschlüsse auf deutlich größere Patientengruppen zulassen können.

4.2.2.2. AML-Patienten mit del(9q)

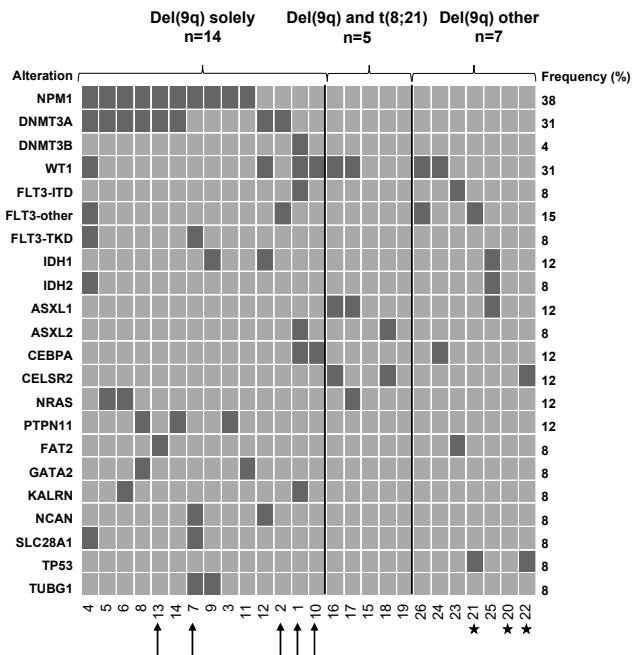
Bei der del(9q) handelt es sich um eine seltene zytogenetische Veränderung (Inzidenz ca. 2%), die isoliert oder in Kombination mit einer t(8;21) oder t(15;17) auftreten kann.^{15,30} In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine t(8;21) als alleinige genetische Veränderung nicht in der Lage ist, eine AML auszulösen.³¹ Durch zusätzliche Veränderungen, wie sie durch die del(9q) hervorgerufen werden, konnte jedoch eine Transformation der t(8;21) tragenden Zellen in eine AML erreicht werden.³¹ Als potentiell verantwortliche Gene in der del(9q) Region konnten *TLE1* und *TLE4* identifiziert werden.³¹

Analog zur Analyse der Patienten mit isolierter Trisomie 13 führten wir bei 5 Patienten mit verfügbarem Material eine Exom-Sequenzierung durch, um weitere rekurrent mutierte Gene in der AML zu detektieren. Die identifizierten Kandidaten-Gene und weitere als rekurrent verändert bei der AML bekannte Gene wurden dann in einer Kohorte von 26 Patienten mit del(9q) analysiert. Begleitend führten wir in zytogenetisch und molekular definierten Subgruppen Genexpressionsanalysen durch. Erneut fanden wir in der zytogenetischen Subgruppe der Patienten mit isolierter del(9q) eine hochgradige Assoziation mit spezifischen genetischen Veränderungen. Es zeigte sich eine hohe Frequenz von *NPM1* Mutationen (71%) und *DNMT3A* Mutationen (57%) (**Abbildung 11**).

Bisher konnten in keiner AML-Subgruppe höhere Raten an *DNMT3A* Mutationen gefunden werden. Durch unsere Expressionsanalysen der del(9q) Subgruppe konnten wir eine reduzierte Expression von *TLE4* als mögliche Folge der del(9q) identifizieren.

Erneut zeigte sich in einer zytogenetisch definierten Subgruppe ein homogenes Muster von Mutationen. Dies impliziert onkogene

Abbildung 11: Darstellung der Verteilung von Mutationen bei Patienten mit del(9q). Die Pfeile markieren Patienten mit Exom-Sequenzierung; Sterne Patienten mit komplexem Karyotyp.



Kooperativität. Da *NPM1* und *DNMT3A* Mutationen generell zu den häufigsten genetischen Veränderungen bei AML-Patienten gehören, zeigte sich erneut, dass eine seltene, homogene, zytogenetisch definierte Subgruppe Rückschlüsse auf die AML als Ganzes erlaubt.

4.3. Diskussion und Ausblick

Die dargestellten Beispiele spiegeln das Voranschreiten der molekularen Diagnostik der AML wider. Durch unsere Arbeiten konnten wir unter anderem die Effizienz von Genexpressionsmarkern in der Risikovorhersage demonstrieren. Hieran angeknüpft wurden von uns Folgeprojekte initiiert, die eine Vorhersage des Ansprechens der Erkrankung auf die Behandlung auf Basis von Genexpressionsmarker erlauben soll. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass seltene Subgruppen der Erkrankung durch ihre Homogenität wichtige Erkenntnisse über die Erkrankung als Ganzes vermitteln können. Inzwischen ist die erweiterte molekulare Diagnostik fester Bestandteil der Diagnosestellung und Therapieempfehlung der AML geworden. Bedauerlicherweise haben sich die therapeutischen Optionen, die sich im Bereich der CLL oder ALL in den letzten Jahren entwickelt haben, noch nicht auf die AML übertragen lassen. Hoffnungen ruhen hier auf der Entwicklung von zielgerichteten Medikamenten wie

IDH-Inhibitoren oder Substanzen zur Restaurierung des natürlichen Zelltodes (Apoptose) wie z.B. dem BCL2-Inhibitor Venetoclax. Allerdings werden diese Behandlungen vermutlich zunächst nur bei Subgruppen von Patienten zum Einsatz kommen können. Daher ist die weitere Optimierung der Behandlungsalgorithmen anhand der durch die erweiterte molekulare Diagnostik gewonnenen Daten notwendig.

5. Zusammenfassung und Perspektive

Zusammenfassend zeigen die vorgelegten Arbeiten, wie komplex und vielschichtig die Pathogenese der Leukämien ist. Obwohl im Erscheinungsbild verschieden und zahlreiche Gene involviert sind, finden sich ähnliche oder im Falle von z.B. *MZB1* auch identische Befunde in unterschiedlichen Erkrankungen. Diese onkogene Kooperativität könnte einen der Schlüssel zur besseren Behandlung der Erkrankungen darstellen. Dies spiegelt sich in dem Trend der letzten Jahre wider, sich von einer allgemeinen Therapie aller sich rasch teilenden Zellen zu lösen und spezifische Therapien für spezifische genetische Veränderungen zu verwenden. So kann zum Beispiel der JAK2-Inhibitor Ruxolitinib bei Patienten mit einer primären Myelofibrose und vermutlich in Zukunft auch bei bestimmten Patienten mit Ph-like-ALL eingesetzt werden.

Allerdings steht diese Entwicklung noch am Anfang. Eine große Herausforderung ist hier die Implementierung der bisher meist experimentellen Diagnostik in die klinische Routine. So können etwa die zahlreichen Translokationen, die man bei Patienten mit Ph-like-ALL findet, nicht mittels herkömmlicher diagnostischer Labortechniken abgedeckt werden. Aufgrund der therapeutischen Implikationen wird eine Etablierung aber notwendig werden. Hier hilft der rasante technische Fortschritt mit inzwischen bereits in der klinischen Routine verfügbaren Hochdurchsatz-Sequenzierungsverfahren. Diese sind zum Teil auch bereits in aktuellen Behandlungsempfehlungen wie etwa der ELN 2017 Risikoklassifikation der AML umgesetzt. Hier wird neben der zytogenetischen Analyse auch die Sequenzierung der Gene *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *ASXL1*, *RUNX1* und *TP53* gefordert.

Es ist absehbar, dass weitere Analysen die notwendige Diagnostik komplexer werden lassen. Dies gilt nicht nur für hämatologische Erkrankungen sondern auch für solide Tumoren wie z.B. Brust- oder Darmkrebs, wo bereits Zulassungsbeschränkungen für bestimmte Medikamente und bestimmte genetische Veränderungen bestehen. Neben diesen rein technischen Aspekten ist die Analyse der gewonnenen hochdimensionalen Daten eine besondere Herausforderung. Ein gutes Beispiel ist die Suche von Fusionsgenen in RNA-Sequenzierungsdaten von mehreren Gigabyte. Die Voraussetzung an Hardware- und passenden Software-Lösungen sowie das

entsprechende Wissen um die Interpretation dieser Daten für den klinischen Alltag sind hier bisher noch unzureichend gelöste Probleme.

Festzustellen ist, dass molekulare Diagnostik nur sinnvoll ist, wenn eine Konsequenz aus ihr gezogen werden kann. Gerade die ungerichtete Sequenzierung großer Teile des Genoms bieten hier zahlreiche ethische und datenschutzrechtliche Probleme. So können natürlich bei der Exom-Sequenzierung der genomischen DNA auch Hinweise auf ein potentielles Risiko für weitere Krankheiten wie z.B. Brustkrebs (u.a. *BRCA1* und *BRCA2*), Darmkrebs (u.a. *HNPPCC*) oder Chorea Huntington (*Huntingtin*) gefunden werden. Zusätzlich zu diesen „klassischen“ Beispielen steht uns aber auch eine Vielzahl an kaum zu interpretierenden Veränderungen gegenüber. So kann eine bisher unbekannte genetische Variante in einem bekannten Onkogen große Ängste auslösen und eine Information über ein 2% erhöhtes Diabetes-Risiko vollkommen irrelevant sein.

Bei all diesen Problematiken steht allerdings außer Frage, dass das Wissen über die maligne Erkrankung und deren zielgerichtete, möglichst nebenwirkungsarme Behandlung das Ziel der erweiterten molekularen Diagnostik ist.

6. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hidemann, an dessen Klinik die hier vorgestellten Arbeiten entstanden sind. Insbesondere möchte ich mich für die kontinuierliche Unterstützung und den „Schubs“ in die richtige Richtung bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Michael Hallek, Herrn PD Dr. Ulrich Hacker, Frau PD Dr. Hildegard Büning, Herrn Dr. Franz Gerner, Herrn Prof. Christian Buske, Herrn Prof. Stefan Bohlander, Herrn Prof. Karsten Spiekermann und Herrn Prof. Ulrich Mansmann für das Vermitteln des wissenschaftlichen Rüstzeugs.

Ich danke Herrn Dr. Klaus Metzeler für die Grundkurse im wissenschaftlichen Schreiben und den Begriff des „Metzelerns“ für vollständig rot gefärbte Manuskriptentwürfe und dem Kommentar „Ich fand es ziemlich gut“. Herrn Dr. Klaus Metzeler und Herrn Dr. Philipp Greif für die vielen gemeinsamen Projekte und den Spaß an der Arbeit an gemeinsamen Fragestellungen und der Bildung einer „kritischen Masse“.

Frau Dipl. math. Vindi Jurinovic für Ihren Zeigefinger und jede Menge Hilfe.

Frau Dr. Stephanie Schneider für das richtige Wort zur richtigen Zeit.

Herrn Dr. Georg Ledderose für das Vermitteln des „Flow“.

Ich danke den vielen Patienten die uns ihre Proben und ihre klinischen Daten für unsere Forschung zur Verfügung gestellt haben; den vielen Geldgebern, die universitäre Forschung ermöglichen, Förderstufe und Bafög, ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.

Ich denke in Dank und Trauer an meine Eltern. Ohne Ihre Geduld mit mir wäre mein Weg ein anderer gewesen.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Frau, die meist mit Geduld und Humor dieses verrückte Hobby ertragen hat.

7. Literaturverzeichnis

1. Fabbri G, Dalla-Favera R: The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 16:145-62, 2016
2. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al: The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117:5019-32, 2011
3. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG: Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 381:1943-55, 2013
4. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD: Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 373:1136-52, 2015
5. International CLLIPIwg: An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 17:779-90, 2016
6. Auer RL, Riaz S, Cotter FE: The 13q and 11q B-cell chronic lymphocytic leukaemia-associated regions derive from a common ancestral region in the zebrafish. *Br J Haematol* 137:443-53, 2007
7. Roberts KG, Mullighan CG: Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol* 12:344-57, 2015
8. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, et al: Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 371:1005-15, 2014
9. Herold T, Baldus CD, Gokbuget N: Ph-like acute lymphoblastic leukemia in older adults. *N Engl J Med* 371:2235, 2014
10. Jain N, Roberts KG, Jabbour E, et al: Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. *Blood* 129:572-581, 2017
11. Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D, et al: High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *J Clin Oncol* 35:394-401, 2017
12. Herold T, Gokbuget N: Philadelphia-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Curr Oncol Rep* 19:31, 2017
13. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al: DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 456:66-72, 2008
14. TCGA: Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 368:2059-74, 2013
15. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115:453-74, 2010
16. Metzeler KH, Walker A, Geyer S, et al: DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 26:1106-7, 2012
17. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, et al: TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 29:1373-81, 2011

18. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, et al: ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood* 118:6920-9, 2011
19. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al: Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129:424-447, 2017
20. Kohlmann A, Bullinger L, Thiede C, et al: Gene expression profiling in AML with normal karyotype can predict mutations for molecular markers and allows novel insights into perturbed biological pathways. *Leukemia* 24:1216-20, 2010
21. Bullinger L, Dohner K, Kranz R, et al: An FLT3 gene-expression signature predicts clinical outcome in normal karyotype AML. *Blood* 111:4490-5, 2008
22. Metzeler KH, Hummel M, Bloomfield CD, et al: An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 112:4193-201, 2008
23. Li Z, Herold T, He C, et al: Identification of a 24-Gene Prognostic Signature That Improves the European LeukemiaNet Risk Classification of Acute Myeloid Leukemia: An International Collaborative Study. *J Clin Oncol*, 2013
24. Buchner T, Berdel WE, Schoch C, et al: Double induction containing either two courses or one course of high-dose cytarabine plus mitoxantrone and postremission therapy by either autologous stem-cell transplantation or by prolonged maintenance for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 24:2480-9, 2006
25. Ng SW, Mitchell A, Kennedy JA, et al: A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature* 540:433-437, 2016
26. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, et al: Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 128:686-98, 2016
27. Silva FP, Lind A, Brouwer-Mandema G, et al: Trisomy 13 correlates with RUNX1 mutation and increased FLT3 expression in AML-M0 patients. *Haematologica* 92:1123-6, 2007
28. Dicker F, Haferlach C, Kern W, et al: Trisomy 13 is strongly associated with AML1/RUNX1 mutations and increased FLT3 expression in acute myeloid leukemia. *Blood* 110:1308-16, 2007
29. Dohner H, Arthur DC, Ball ED, et al: Trisomy 13: a new recurring chromosome abnormality in acute leukemia. *Blood* 76:1614-21, 1990
30. Langabeer SE, Grimwade D, Walker H, et al: A study to determine whether trisomy 8, deleted 9q and trisomy 22 are markers of cryptic rearrangements of PML/RARalpha, AML1/ETO and CBFB/MYH11 respectively in acute myeloid leukaemia. MRC Adult Leukaemia Working Party. Medical Research Council. *Br J Haematol* 101:338-40, 1998
31. Sweetser DA, Peniket AJ, Haaland C, et al: Delineation of the minimal commonly deleted segment and identification of candidate tumor-suppressor genes in del(9q) acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 44:279-91, 2005

8. Anhang

8.1. Verzeichnis der eigenen wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Erstautorschaften – Kumulativer Impact: 109.63

1. **Herold T**, Schneider S, Metzeler K, Neumann M, Hartmann L, Roberts KG, Konstandin NP, Greif PA, Braundl K, Ksienzyk B, Huk N, Schneider I, Zellmeier E, Jurinovic V, Mansmann U, Hiddemann W, Mullighan CG, Bohlander SK, Spiekermann K, Holzer D, Bruggemann M, Baldus CD, Dreyling M, Gokbuget N. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in adults have frequent IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis. **Haematologica 2016.**

Impact Factor (2015/2016): 6.671

2. **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, Cristina Sauerland M, Buchner T, Berdel WE, Wormann 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. **Genes Chromosomes Cancer 2016.**

Impact Factor (2015/2016): 3.960

3. **Herold T**, Baldus CD, Gokbuget N. Ph-like acute lymphoblastic leukemia in older adults. **N Engl J Med 2014;371:2235.**

Impact Factor (2014): 55.873

4. **Herold T**, Metzeler KH, Vosberg S, Hartmann L, Rollig C, Stolzel 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, Buchner T, Berdel WE, Woermann BJ, Bornhauser M, Ehninger G, Mansmann U, Hiddemann W, Bohlander SK, Spiekermann K, Greif PA. Isolated trisomy 13 defines a genetically homogenous AML subgroup with high frequency of mutations in spliceosome genes and poor prognosis. **Blood 2014.**

Impact Factor (2013/2014): 9.775

5. Li Z*, **Herold T***, He C*, Valk PJ, Chen P, Jurinovic V, Mansmann U, Radmacher MD, Maharry KS, Sun M, Yang X, Huang H, Jiang X, Sauerland MC, Buchner T, Hiddemann W, Elkahloun A, Neilly MB, Zhang Y, Larson RA, Le Beau MM, Caligiuri MA, Dohner K, Bullinger L, Liu PP, Delwel R, Marcucci G, Lowenberg B, Bloomfield CD, Rowley JD, Bohlander SK, Chen J. Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: an international collaborative study. **J Clin Oncol 2013;31:1172-81.** *geteilte Erstautorenschaft

Impact Factor (2013/2014): 17.879

6. **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, 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. **Leuk Lymphoma 2013;54:1652-7.**

Impact Factor (2013): 2.605

7. **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, Bohlander SK. An eight-gene expression signature for the prediction of survival and time to treatment in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia 2011;25:1639-45.**

Impact Factor (2011): 9.561

8. **Herold T**, Jurinovic V, Mulaw M, Seiler T, Dufour A, Schneider S, Kakadia PM, Feuring-Buske M, Braess J, Spiekermann K, Mansmann U, Hiddemann W, Buske C, Bohlander SK. Expression analysis of genes located in the minimally deleted regions of 13q14 and 11q22-23 in chronic lymphocytic

leukemia-unexpected expression pattern of the RHO GTPase activator ARHGAP20. **Genes Chromosomes Cancer** 2011;50:546-58.

Impact Factor (2011): 3.306

Koautorschaften – Kumulativer Impact: 238.889

1. 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. **Genes Chromosomes Cancer** 2016;55:553-67.

Impact Factor (2015/2016): 3.960

2. Pabst C, Bergeron A, Lavallee VP, Yeh J, Gendron P, Nordahl GL, Krosl J, Boivin I, Deneault E, Simard J, Imren S, Boucher G, Eppert K, **Herold** T, Bohlander SK, Humphries K, Lemieux S, Hebert J, Sauvageau G, Barabe F. GPR56 identifies primary human acute myeloid leukemia cells with high repopulating potential in vivo. **Blood** 2016;127:2018-27.

Impact Factor (2015/2016): 11.841

3. Ng SW, 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, Gorlich D, Buchner T, Hiddemann W, Berdel WE, Wormann B, Cheok M, Preudhomme C, Dombret H, Metzeler K, Buske C, Lowenberg B, Valk PJ, Zandstra PW, Minden MD, Dick JE, Wang JC. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. **Nature** 2016;540:433-7.

Impact Factor (2015/2016): 38.138

4. Metzeler KH, **Herold** T, Rothenberg-Thurley M, Amher S, Sauerland MC, Gorlich D, Schneider S, Konstandin NP, Dufour A, Braundl K, Ksienzyk B, Zellmeier E, Hartmann L, Greif PA, Fiegl M, Subklewe M, Bohlander SK, Krug U, Faldum A, Berdel WE, Wormann B, Buchner T, Hiddemann W, Braess J, Spiekermann K, Group AS. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. **Blood** 2016;128:686-98.

Impact Factor (2015/2016): 11.841

5. Laverdiere I, Boileau M, **Herold** T, Rak J, Berdel WE, Wormann B, Hiddemann W, Spiekermann K, Bohlander SK, Eppert K. Complement cascade gene expression defines novel prognostic subgroups of acute myeloid leukemia. **Exp Hematol** 2016.

Impact Factor (2015/2016): 2.303

6. Jiang X, Hu C, Arnovitz S, Bugno J, Yu M, Zuo Z, Chen P, Huang H, Ulrich B, Gurbuxani S, Weng H, Strong J, Wang Y, Li Y, Salat J, Li S, Elkahloun AG, Yang Y, Neilly MB, Larson RA, Le Beau MM, **Herold** T, Bohlander SK, Liu PP, Zhang J, Li Z, He C, Jin J, Hong S, Chen J. miR-22 has a potent anti-tumour role with therapeutic potential in acute myeloid leukaemia. **Nature communications** 2016;7:11452.

Impact Factor (2015/2016): 11.329

7. Jiang X, Bugno J, Hu C, Yang Y, **Herold** T, Qi J, Chen P, Gurbuxani S, Arnovitz S, Strong J, Ferchen K, Ulrich B, Weng H, Wang Y, Huang H, Li S, Neilly MB, Larson RA, Le Beau MM, Bohlander SK, Jin J, Li Z, Bradner JE, Hong S, Chen J. Eradication of Acute Myeloid Leukemia with FLT3 Ligand-Targeted miR-150 Nanoparticles. **Cancer Res** 2016;76:4470-80.

Impact Factor (2015/2016): 8.556

8. Hockendorf U, Yabal M, **Herold** T, Munkhbaatar E, Rott S, Jilg S, Kauschinger J, Magnani G, Reisinger F, Heuser M, Kreipe H, Sotlar K, Engleitner T, Rad R, Weichert W, Peschel C, Ruland J, Heikenwalder M, Spiekermann K, Slotta-Huspenina J, Gross O, Jost PJ. RIPK3 Restricts Myeloid Leukemogenesis by Promoting Cell Death and Differentiation of Leukemia Initiating Cells. **Cancer cell** 2016;30:75-91.

Impact Factor (2015/2016): 23.214

9. Hartmann L, Dutta S, Opatz S, Vosberg S, Reiter K, Leubolt G, Metzeler KH, **Herold** T, Bamopoulos SA, Braundl K, Zellmeier E, Ksienzyk B, Konstandin NP, Schneider S, Hopfner KP, Graf A, Krebs S, Blum H, Middeke JM, Stolzel F, Thiede C, Wolf S, Bohlander SK, Preiss C, Chen-Wichmann L, Wichmann C, Sauerland MC, Buchner T, Berdel WE, Wormann BJ, Braess J, Hiddemann W,

Spiekermann K, Greif PA. ZBTB7A mutations in acute myeloid leukaemia with t(8;21) translocation. **Nature communications** 2016;7:11733.
Impact Factor (2015/2016): 11.329

10. Fransecky L, Neumann M, Heesch S, Schlee C, Ortiz-Tanchez J, Heller S, Mossner M, Schwartz S, Mochmann LH, Isaakidis K, Bastian L, Kees UR, **Herold T**, Spiekermann K, Gokbuget N, Baldus CD. Silencing of GATA3 defines a novel stem cell-like subgroup of ETP-ALL. **J Hematol Oncol** 2016;9:95.

Impact Factor (2015/2016): 6.263

11. 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 K, Rothenberg-Thurley M, Schneider MR, Dahlhoff M, Spiekermann K, Zimber-Strobl U, Wolf E, Bohlander SK. The target cell of transformation is distinct from the leukemia stem cell in murine CALM/AF10 leukemia models. **Leukemia** 2016;30:1166-76.

Impact Factor (2015/2016): 12.104

12. Zoellner AK, Fritsch S, Prevalsek D, Engel N, Hubmann M, Reibke R, Rieger CT, Hellmuth JC, Haas M, Mumm F, **Herold T**, Ledderose G, Hiddemann W, Dreyling M, Hausmann A, Tischer J. Sequential therapy combining clofarabine and T-cell-replete HLA-haploidentical haematopoietic SCT is feasible and shows efficacy in the treatment of refractory or relapsed aggressive lymphoma. **Bone marrow transplantation** 2015;50:679-84.

Impact Factor (2015/2016): 3.636

13. Ponnusamy K, Kohrs N, Ptasińska A, Assi SA, **Herold T**, Hiddemann W, Lausen J, Bonifer C, Henschler R, Wichmann C. RUNX1/ETO blocks selectin-mediated adhesion via epigenetic silencing of PSGL-1. **Oncogenesis** 2015;4:e146.

Impact Factor (2015/2016): 7.932

14. Niavarani A, **Herold T**, Reyal Y, Sauerland MC, Buchner T, Hiddemann W, Bohlander SK, Valk PJ, Bonnet D. A 4-gene expression score associated with high levels of Wilms Tumor-1 (WT1) expression is an adverse prognostic factor in acute myeloid leukaemia. **British journal of haematology** 2015.

Impact Factor (2015/2016): 5.401

15. Lichtenegger FS, Kondla I, Krempasky M, Weber AL, **Herold T**, Krupka C, Spiekermann K, Schneider S, Buchner T, Berdel WE, Wormann BJ, Hiddemann W, Subklewe M. RNA and protein expression of herpesvirus entry mediator (HVEM) is associated with molecular markers, immunity-related pathways and relapse-free survival of patients with AML. **Cancer immunology, immunotherapy : CII** 2015;64:1505-15.

Impact Factor (2015/2016): 4.846

16. Kuett A, Rieger C, Perathoner D, **Herold T**, Wagner M, Sironi S, Sotlar K, Horny HP, Deniffel C, Drolle H, Fiegl M. IL-8 as mediator in the microenvironment-leukaemia network in acute myeloid leukaemia. **Sci Rep** 2015;5:18411.

Impact Factor (2015/2016): 5.228

17. Drolle H, Wagner M, Vasold J, Kutt A, Deniffel C, Sotlar K, Sironi S, **Herold T**, Rieger C, Fiegl M. Hypoxia regulates proliferation of acute myeloid leukemia and sensitivity against chemotherapy. **Leukemia research** 2015;39:779-85.

Impact Factor (2015/2016): 2.606

18. Sandhofer N, Metzeler KH, Rothenberg M, **Herold T**, Tiedt S, Groiss V, Carlet M, Walter G, Hinrichsen T, Wachter O, Grunert M, Schneider S, Subklewe M, Dufour A, Frohling S, Klein HG, Hiddemann W, Jeremias I, Spiekermann K. Dual PI3K/mTOR inhibition shows antileukemic activity in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. **Leukemia** 2014.

Impact Factor (2014): 10.431

19. De Bin R, **Herold T**, Boulesteix AL. Added predictive value of omics data: specific issues related to validation illustrated by two case studies. **BMC medical research methodology** 2014;14:117.

Impact Factor (2014): 2.270

20. Alachkar H, Mutonga MB, Metzeler KH, Fulton N, Malnassy G, **Herold** T, Spiekermann K, Bohlander SK, Hiddemann W, Matsuo Y, Stock W, Nakamura Y. Preclinical efficacy of maternal embryonic leucine-zipper kinase (MELK) inhibition in acute myeloid leukemia. **Oncotarget** 2014;5:12371-82.

Impact Factor (2014): 6.359

21. Janke H, Pastore F, Schumacher D, **Herold** T, Hopfner KP, Schneider S, Berdel WE, Buchner T, Woermann BJ, Subklewe M, Bohlander SK, Hiddemann W, Spiekermann K, Polzer H. Activating FLT3 Mutants Show Distinct Gain-of-Function Phenotypes In Vitro and a Characteristic Signaling Pathway Profile Associated with Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. **PloS one** 2014;9:e89560.

Impact Factor (2013/2014): 3.534

22. Opatz S, Polzer H, **Herold** T, Konstandin NP, Ksienzyk B, Zellmeier E, Vosberg S, Graf A, Krebs S, Blum H, Hopfner KP, Kakadia PM, Schneider S, Dufour A, Braess J, Sauerland MC, Berdel WE, Buchner T, Woermann BJ, Hiddemann W, Spiekermann K, Bohlander SK, Greif PA. Exome sequencing identifies recurring FLT3 N676K mutations in core-binding factor leukemia. **Blood** 2013;122:1761-9.

Impact Factor (2013): 9.775

23. 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, Buchner T, Woermann BJ, Hiddemann W, Spiekermann K, Bohlander SK. RUNX1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are associated with a poor prognosis and up-regulation of lymphoid genes. **Haematologica** 2012;97:1909-15.

Impact Factor (2012): 5.935

24. Greif PA, Dufour A, Konstandin NP, Ksienzyk B, Zellmeier E, Tizazu B, Sturm J, Benthaus T, **Herold** T, Yaghmaie M, Dorge P, Hopfner KP, Hauser A, Graf A, Krebs S, Blum H, Kakadia PM, Schneider S, Hoster E, Schneider F, Stanulla M, Braess J, Sauerland MC, Berdel WE, Buchner T, Woermann BJ, Hiddemann W, Spiekermann K, Bohlander SK. GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. **Blood** 2012;120:395-403.

Impact Factor (2012): 9.06

25. Konstandin N, Bultmann S, Szwagierczak A, Dufour A, Ksienzyk B, Schneider F, **Herold** T, Mulaw M, Kakadia PM, Schneider S, Spiekermann K, Leonhardt H, Bohlander SK. Genomic 5-hydroxymethylcytosine levels correlate with TET2 mutations and a distinct global gene expression pattern in secondary acute myeloid leukemia. **Leukemia** 2011;25:1649-52.

Impact Factor (2011): 9.561

26. Thoene S, Rawat VP, Heilmeier B, Hoster E, Metzeler KH, **Herold** T, Hiddemann W, Gokbuget N, Hoelzer D, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C. The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed and associated with an inferior prognosis in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia** 2009;23:649-55.

Impact Factor (2009): 8.296

27. Hacker UT, Wingenfeld L, Kofler DM, Schuhmann NK, Lutz S, **Herold** T, King SB, Gerner FM, Perabo L, Rabinowitz J, McCarty DM, Samulski RJ, Hallek M, Buning H. Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency. **The journal of gene medicine** 2005;7:1429-38.

Impact Factor (2008): 3.141

Case reports - Kumulativer Impact: 4.845

1. **Herold** T, Seiler T, Egensperger R, Trumm C, Bergmann M, Franke D, Mumm FF, Schinwald N, Buske C, Dreyling M. Progressive multifocal leukoencephalopathy after treatment with rituximab, fludarabine and cyclophosphamide in a patient with chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Lymphoma** 2012;53:169-72.

[case report]

Impact Factor (2012): 2.301

2. Rieger C, Geiger S, **Herold T**, Nickenig C, Ostermann H. Breakthrough infection of Trichosporon asahii during posaconazole treatment in a patient with acute myeloid leukaemia. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the **European Society of Clinical Microbiology** 2007;26:843-5. [case report].

Impact Factor (2013): 2.544

Reviews - Kumulativer Impact: 2.653

1. Herold T, Gokbuget N. Philadelphia-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. **Curr Oncol Rep** 2017;19:31.

Impact Factor (2015/2016): 2.653

Bibliographisch zitierfähige Abstracts von Vorträgen und Postern (nur Erstautorschaften)

1. **Tobias Herold**, Vindi Jurinovic, Klaus H. Metzeler, Aarif Batcha, Stefan Bamopoulos, Maja Rothenberg-Thurley, Bianka Ksienzyk, Luise Hartmann, Philipp Greif, Julia Phillipou-Massier, Stefan Krebs, Helmut Blum, Susanne Amler, Stephanie Schneider, Christina Sauerland, Dennis Görlich, Thomas Büchner, Wolfgang E Berdel, Bernhard J Wörmann, Marion Subklewe, Michael Fiegl, Stefan K. Bohlander, Jan Braess, Wolfgang Hiddemann, Ulrich Mansmann and Karsten Spiekermann. PS29MRC - a Novel Predictive Score for Response to Therapy in Acute Myeloid Leukemia. **ASH 2016** oral presentation (international)

2. **Tobias Herold**, Stephanie Schneider, Klaus H Metzeler, Martin Neumann, Luise Hartmann, Nikola P Konstandin, Philipp A Greif, Kathrin Brändl, Bianka Ksienzyk, Natalia Huk, Irene Schneider, Evelyn Zellmeier, Vindi Jurinovic, Ulrich Mansmann, Wolfgang Hiddemann, Stefan K Bohlander, Karsten Spiekermann, Dieter Hoelzer, Claudia D Baldus, Martin Dreyling and Nicola Gökbüget. *BCR-ABL1-like* Acute Lymphoblastic Leukemia Is Associated with *IKZF1* and *JAK2* Alterations and inferior Outcome in Adults. **ASH 2014** poster presentation (international)

3. **Tobias Herold**, Klaus H Metzeler, Sebastian Vosberg, Stephanie Schneider, Max Hubmann, Evelyn Zellmeier, Bianca Ksienzyk, Vindi Jurinovic, Zlatana Pasalic, Purvi M Kakadia, Annika Dufour, Alexander Graf, Stefan Krebs, Helmut Blum, Maria Cristina Sauerland, Thomas Büchner, Wolfgang E Berdel, Bernhard J Woermann, Ulrich Mansmann, Wolfgang Hiddemann, Stefan K Bohlander, Karsten Spiekermann and Philipp A Greif. Acute myeloid leukemia with isolated trisomy 13 is a genetically homogenous entity with a high frequency of mutations in genes encoding components of the splicing machinery and extremely poor prognosis. **ASH 2013** oral presentation (international)

4. **Tobias Herold**, Medhanie A Mulaw, Vindi Jurinovic, Till Seiler, Klaus H Metzeler, Annika Dufour, Stephanie Schneider, Purvi M Kakadia, Karsten Spiekermann, Ulrich Mansmann, Wolfgang Hiddemann, Christian Buske, Martin Dreyling and Stefan K Bohlander. High Expression of the Endoplasmic Reticulum Protein MZB1 Predicts Inferior Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia, Follicular Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma and is Associated with a Unique Gene Expression Profile. **ASH 2011** poster presentation (international)

5. **Herold T**, Jurinovic V, Metzeler KH, Boulesteix A.-L., Bergmann M, Seiler T, Mulaw M, Thoene S, Dufour A, Pasalic Z, Schmidberger M, Schmidt M, Schneider S, Kakadia P M, Feuring-Buske M, Braess J, Spiekermann K, Mansmann U, Hiddemann W, Buske C and Bohlander S K. A validated 8 gene expression signature for the prediction of overall survival and time to treatment in chronic lymphocytic leukemia (CLL); **EHA 2011** poster presentation (international)

6. **Herold T**, Jurinovic V, Buske C and Bohlander S K. Chronic lymphocytic leukemia with deletion of 13q14 or 11q22-23 – Evidence for a common pathogenetic pathway from gene expression data; **EHA 2010** poster presentation (international)

7. **Herold T**, Jurinovic V, Mulaw M, Seiler T, Dufour A, Schneider S, Kakadia P, Feuring-Buske M, Braess J, Spiekermann K, Mansmann U, Hiddemann W, Buske C and Bohlander SK. Subgroups in

chronic lymphocytic leukaemia (CLL) – A microarray-based differential gene expression study, **DGHO 2010** poster presentation (national)

8.2. Verzeichnis der bisher abgehaltenen Lehrveranstaltungen

Semester	Vorlesungsverzeichnis	Art der Veranstaltung	Semesterwochenstunden (SWS)
WiSe 2007/08 SoSe 2008 WiSe 2008/09	7M1003	Tutorial	54 Einzelstunden
WiSe 2007/08 SoSe 2008 WiSe 2008/09 SoSe 2008 WiSe 2009/10	7M1004 7M1005	Unterricht am Krankenbett Blockpraktikum Innere Medizin	26 Einzelstunden 50 Einzelstunden
SoSe 2016 WiSe 2016/17 SoSe 2017	7P0054	Intensivmedizinische Lehrvisite	5-stündig
WiSe 2013/14 SoSe 2014 SoSe 2015 WiSe 2015/16 SoSe 2016 WiSe 2016/17 SoSe 2017	7P0071	Seminar: Internistisches Curriculum der Med. Kliniken I,II,III	1-stündig
WiSe 2015/16 SoSe 2017	7M1362	Bedside Teaching Blut und Infektion	8 Einzelstunden
SoSe 2016 WiSe 2016/17 SoSe 2017	7M1363	Seminar Blut und Infektion	12 Einzelstunden
SoSe 2013 WiSe 2013/14 SoSe 2014 WiSe 2014/15 SoSe 2015	7M1364	Tutorial - Organblock Blut	16 Einzelstunden
WiSe 2015/16	7M1365	Übung Patientenorientierte Kommunikation (POK) in Blut und Infektion	5 Einzelstunden
WiSe 2015/16	7M1384	Interdisziplinäres Tutorial Modul 23	32 Einzelstunden
WiSe 2006/07	7M2800	Longitudinalkurs L-5, U5 interdisziplinärer Untersuchungskurs	12 Einzelstunden
WiSe 2009/10	7M2801	Untersuchungskurs U5	30 Einzelstunden

8.3. Eidesstattliche Erklärung

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.

Andechs, den 24. April 2017

Dr. med. Tobias Herold