

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt



**Validierung eines klinisch anwendbaren Biomarkers
zur Vorhersage des Therapieansprechens
bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian Moser

aus
Eggenfelden

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. Tobias Herold

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Michael Albert
PD Dr. Hanna-Mari Baldauf
Prof. Dr. Christina Rieger

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Dipl.-Math. Vindi Jurinovic

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2024

In der vorliegenden Dissertationsschrift wird aufgrund der besseren Lesbarkeit bei personenbezogenen Formulierungen ausschließlich die männliche Form gebraucht. Diese Ausdrucksweise bezieht sich stets auf alle Geschlechter.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Akute myeloische Leukämie	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie.....	1
1.1.3	Klinik und Diagnose	1
1.1.4	Therapiekonzepte	2
1.1.5	Prognose und Prognosefaktoren.....	4
1.2	Vorhersage des Therapieansprechens	6
1.2.1	Stellenwert prädiktiver Modelle	6
1.2.2	Walter-Score	6
1.2.3	<i>Retrained-Response-LSC17</i>	7
1.2.4	<i>Predictive Score 29 Medical Research Council</i>	7
1.2.5	Vergleich bisheriger prädiktiver Modelle	8
1.3	Methoden zur Genexpressionsanalyse	9
1.3.1	Genexpressionsanalytik als diagnostische Ergänzung	9
1.3.2	Microarray-Technologie	9
1.3.3	Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierung	10
1.3.4	NanoString-Plattform.....	10
2	Zielsetzung	11
3	Patienten und Methodik	12
3.1	Studiendesign	12
3.2	Datenerhebung	12
3.3	Ein- und Ausschlusskriterien.....	13
3.4	Therapieprotokolle	14
3.5	Beurteilung der Zytogenetik	15
3.6	Beurteilung des Ansprechens auf die Induktionschemotherapie.....	15
3.7	Entnahme, Verarbeitung und Lagerung der Proben	17
3.8	Genanalytik	18
3.8.1	Präparation der RNA.....	18
3.8.2	Auswahl des Gen-Panels.....	19
3.8.3	Hybridisierung und Purifikation der Proben.....	21
3.8.4	Quantifizierung der Genexpression.....	22
3.9	Berechnung der prädiktiven Scores	23
3.10	Anpassung des Cut-Off-Wertes des PS29MRC.....	24

3.11	Statistische Auswertungen.....	26
3.11.1	Definition des primären Endpunkts	26
3.11.2	Deskriptive und analytische Statistik	26
3.11.3	Überlebensanalysen	27
4	Ergebnisse.....	29
4.1	Hinweis zu den Ergebnissen.....	29
4.2	Deskriptive Analyse des Patientenkollektivs	30
4.3	PS29MRC als kontinuierliche Variable.....	33
4.3.1	Prädiktion des PS29MRCcont im Gesamtkollektiv.....	33
4.3.2	Prädiktion des PS29MRCcont in verschiedenen Subgruppen	35
4.3.3	Vergleich des PS29MRCcont mit weiteren prädiktiven Scores	37
4.4	PS29MRC als dichotome Variable	40
4.4.1	Prädiktion des PS29MRCdic in Abhängigkeit vom Cut-Off-Wert... 40	40
4.4.2	Prädiktion des PS29MRCdic in verschiedenen Subgruppen	42
4.5	Überlebensanalysen	53
4.5.1	Gesamtüberleben des Patientenkollektivs	53
4.5.2	PS29MRC als Modell zur Vorhersage des Gesamtüberlebens.....	57
4.5.3	Optimierung der ELN-2017-Risikostratifizierung	60
4.5.4	Gesamtüberleben der Patienten mit <i>TP53</i> -Mutation	63
4.5.5	PS29MRC bei der Vorhersage des rezidiv-freien Überlebens	64
4.6	Individuelle Risikovorhersage	65
4.7	Multivariate Analyse	67
5	Diskussion	73
6	Zusammenfassung	83
7	Summary	85
8	Verzeichnisse	86
8.1	Abkürzungsverzeichnis	86
8.2	Abbildungsverzeichnis	87
8.3	Tabellenverzeichnis	88
8.4	Literaturverzeichnis	90
9	Veröffentlichungen.....	101
10	Danksagung	102
11	Eidesstattliche Erklärung	103

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

1.1.1 Definition

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine heterogene maligne Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen (Arber et al. 2016). Im physiologischen Knochenmark unterliegen die blutbildenden Zellen lebenslang einer Balance zwischen Differenzierungs-, Migrations- und Apoptoseprozessen (Steinman 2002). Im Falle einer AML kommt es hingegen zu einer Dysregulation des myeloischen Blutbildungssystems (Ley et al. 2013). Charakteristisch dabei sind der Abbruch der Zelldifferenzierung sowie die unkontrollierte klonale Proliferation unreifer neoplastischer Vorläuferzellen, sogenannter Blasten (Kouchkovsky und Abdul-Hay 2016; Licht und Sternberg 2005). Durch die blastäre Infiltration des hämatopoetischen Knochenmarks wird die physiologische Blutbildung beeinträchtigt (Forsberg et al. 2010). Dies führt unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tod (Southam et al. 1951).

1.1.2 Epidemiologie

Mit etwa 25 % aller Leukämien im Erwachsenenalter ist die AML die häufigste Form der akuten Leukämie in den Industrienationen (Deschler und Lübbert 2006; Howlader et al. 2020). Die Inzidenz liegt in Deutschland bei circa drei Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr und nimmt mit steigendem Lebensalter deutlich zu (Nennecke et al. 2014; Howlader et al. 2020). Mit einem medianen Erkrankungsalter von 68 Jahren sind vor allem Menschen höheren Alters betroffen (Pulte et al. 2016). Bedingt durch die steigende Lebenserwartung ist eine Zunahme der Inzidenz in den kommenden Jahrzehnten zu erwarten (Hao et al. 2019).

1.1.3 Klinik und Diagnose

Die klinische Präsentation der AML hängt maßgeblich von der blastären Infiltration des Knochenmarks ab. Dadurch manifestiert sich die AML häufig mit den Symptomen einer Anämie, einer Neutropenie sowie einer

Thrombozytopenie, wie Müdigkeit, Blässe, eingeschränkte Leistungsfähigkeit, Infektanfälligkeit und/oder verstärkte Blutungsneigung.

Der Verdacht auf eine AML ergibt sich bei entsprechender Anamnese, körperlichem Untersuchungsbefund und typischen Veränderungen des Blutbildes. Die Diagnosesicherung erfolgt zytomorphologisch mit Nachweis eines Blastenanteils von $\geq 20\%$ im peripheren Blut oder im Knochenmarkaspirat (Arber et al. 2016). Auch die Befunde der Durchflusszytometrie oder die AML definierenden genetischen Aberrationen wie die Translokationen $t(8;21)(q22;q22.1)$, $t(15;17)(q24.1;q21.2)$ oder die Inversion $inv(16)(p13.1q22)$ können zur Diagnosestellung herangezogen werden (Arber et al. 2016). Generell sind im Rahmen der Erst- und Verlaufsdagnostik zytomorphologische, durchflusszytometrische, zytogenetische und molekulargenetische Analysen von Bedeutung.

In den meisten Fällen entsteht eine AML *de novo* ohne objektivierbare Exposition gegenüber spezifischen Risikofaktoren oder vorhergehende Knochenmarkserkrankung (Cheson et al. 2003). Eine sekundäre AML liegt vor, wenn in der Vorgeschichte ein myelodysplastisches Syndrom, eine myeloproliferative Erkrankung oder eine (Radio-)Chemotherapie bekannt ist (Cheson et al. 2003).

1.1.4 Therapiekonzepte

Grundsätzlich lassen sich die Behandlungskonzepte der AML in eine intensive Chemotherapie, eine nicht-intensive, palliative Chemotherapie und eine rein supportive Behandlung einteilen. Für ein erfolgreiches Therapieansprechen ist neben dem Alter und den Komorbiditäten besonders das genetische Risikoprofil entscheidend (Schlenk und Döhner 2013).

Das primäre Ziel der intensiven Therapie ist eine komplette Remission (CR), sodass über die alleinige Chemotherapie oder eine zusätzliche allogene Stammzelltransplantation eine Heilung der Erkrankung erreicht wird (Döhner et al. 2017). Für eine CR muss der Blastenanteil im Knochenmark auf unter 5 % reduziert werden (Döhner et al. 2017). Zudem dürfen weder Blasten mit Auerstäbchen noch extramedullärer Befall noch Blasten im peripheren Blut detektiert werden (Döhner et al. 2017). Eine hämatologische Regeneration liegt

bei einer absoluten Neutrophilenzahl ≥ 1 G/L sowie einer Thrombozytenzahl ≥ 100 G/L vor (Döhner et al. 2017). Wird keine CR bzw. keine CR mit inkompletter hämatologischer Regeneration (CRi) erreicht, wird dies als Therapieversagen gewertet (Döhner et al. 2017).

Die intensive Therapie der AML unterlag in den letzten 40 Jahren im Vergleich zu der Behandlung anderer Krebsformen kaum Veränderungen. Kurativ werden das Nukleosidanalogen Cytarabin und ein Anthracyclin im Rahmen der intensiven Induktionschemotherapie eingesetzt (Yates et al. 1973). Diese Behandlung ist unabhängig vom Alter bei allen medizinisch belastbaren Patienten indiziert (Juliusson et al. 2009). Die Induktionschemotherapie ist aufgrund des zytostatischen Effekts mit unerwünschten Nebenwirkungen assoziiert: Durch die induzierte Myelosuppression und die Aplasie des Knochenmarks kann es zu einer Neutropenie sowie einer Thrombozytopenie kommen. Diese Blutbildveränderungen können Fieber, Infektionen und Blutungen begünstigen (Braess et al. 2018). Auch gastrointestinale Symptome wie Mukositis, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe treten häufig auf (Woelich et al. 2017). Außerdem sind Patienten anfällig für die Entwicklung systemischer Mykosen (Tang et al. 2015). In Anbetracht dieser mitunter schwerwiegenden Nebenwirkungen ist es entscheidend, ausschließlich diejenigen Patienten mit der intensiven Induktionschemotherapie zu behandeln, wenn ihr Nutzen größer als ihr Schaden ist. Wird nach ein bis zwei Induktionszyklen eine CR bzw. eine CRi erreicht, erfolgt in Abhängigkeit vom prognostischen Risikoprofil eine konsolidierende Postremissionstherapie in Form einer hochdosierten Cytarabin-Chemotherapie oder einer allogenen Stammzelltransplantation (Döhner et al. 2017).

Bei Patienten mit erheblichen Komorbiditäten oder geringen Heilungschancen besteht das primäre therapeutische Ziel in einer Lebenszeitverlängerung bei möglichst hoher Lebensqualität. Hierfür können mit einer nicht-intensiven, palliativen Therapie Krankheitsstabilität und Symptomkontrolle erreicht werden. Eingesetzt werden Substanzen wie Azacitidin/Venetoclax, hypomethylierende Substanzen (Azacitidin, Decitabin) sowie niedrigdosiertes Cytarabin in Kombination mit Venetoclax oder Glasdegib (Fenaux et al. 2010; Kantarjian et al. 2012; DiNardo et al. 2020; Wolska-Washer und Robak 2019; Qin et al. 2022).

Die supportive Therapie besteht aus der Prophylaxe und der Behandlung von Infektionen, der Transfusion von Blut und Blutprodukten und/oder einer adäquaten Schmerzbehandlung.

Aufgrund der Fortschritte in der Gensequenzierung sowie aufgrund eines besseren Verständnisses molekularer Mechanismen der AML können neben den herkömmlichen Zytostatika neue Therapieansätze angeboten werden (Ley et al. 2013; Cucchi et al. 2021). Bei der Behandlung mit Substanzen wie dem FLT3-Inhibitor Midostaurin, dem BCL-2-Inhibitor Venetoclax, dem CD33-Inhibitor Gemtuzumab-Ozogamicin oder auch dem Kombinationspräparat CPX-351 wurde in klinischen Studien ein verlängertes Gesamtüberleben beobachtet (Stone et al. 2017; DiNardo et al. 2020; Hills et al. 2014; Lambert et al. 2019; Lancet et al. 2018; Castaigne et al. 2012). Trotz der Fortschritte in der Therapie der AML besteht bei etwa 20–30 % der Patienten eine primäre Resistenz der Erkrankung (Gurnari et al. 2020; Döhner et al. 2017). Dies geht häufig mit einer schlechten Prognose einher (Ferguson et al. 2016).

1.1.5 Prognose und Prognosefaktoren

Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Patienten unter 60 Jahren 35–40 % und bei älteren Patienten 5–15 % (Döhner et al. 2015). Eine Ausnahme stellt der Subtyp der akuten Promyelozytenleukämie mit spezifischer Chromosomentranslokation $t(15;17)(q22;q21)$ bzw. dem Fusionsgen *PML::RARA* dar, da mit einer gezielten Therapie eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von > 90 % erreicht werden kann (Platzbecker et al. 2017). Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der AML ohne das Fusionsgen *PML::RARA*, da hier die Optimierung des Langzeitüberlebens und des Therapieansprechens weiterhin eine große Herausforderung darstellt (Appelbaum et al. 2006; Howlader et al. 2020).

Zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs etablierten sich verschiedene patienten- sowie krankheitsbezogene Prognosefaktoren (Clark et al. 2006). Hierzu zählen etwa das Alter, Komorbiditäten, der Performance-Status nach *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) sowie zytogenetische und molekulare Aberrationen (Grimwade et al. 2010; Fröhling et al. 2006; Döhner et al. 2017). Mit steigendem Alter erhöhen sich sowohl die Inzidenz eines ungünstigen

zytogenetischen Profils als auch das Auftreten von Begleiterkrankungen, was mit einer schlechteren Prognose einhergehen kann (Appelbaum et al. 2006). Auch im Falle einer sekundären AML wird aufgrund einer erhöhten Inzidenz genetischer Veränderungen ein reduziertes Gesamtüberleben beobachtet (Hulegårdh et al. 2015).

Im Jahr 2017 integrierte das internationale Expertenpanel des *European LeukemiaNet* (ELN-2017) neben zytogenetischen auch molekulargenetische Daten in ein prognostisches Risikomodell (Döhner et al. 2017). Gemäß ELN-2017 werden Patienten mit AML drei Risikogruppen zugeordnet, die in Tabelle 1 dargestellt werden (Döhner et al. 2017). Die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei Patienten der günstigen ELN-2017-Subgruppe lag bei 54 %, bei Patienten der intermediären Risikogruppe bei 31 %, bei Patienten mit nach ELN-2017 ungünstiger Prognose bei 12 % (Herold et al. 2020).

Tabelle 1: Prognostische Risikostratifizierung gemäß den Empfehlungen nach *European LeukemiaNet 2017* (Döhner et al. 2017).

Risiko	Genetische Aberration
Günstig	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB::MYH11</i>
	<i>NPM1</i> -Mutation ohne <i>FLT3</i> -ITD oder mit <i>FLT3</i> -ITD ^{niedrige Ratio}
	Biallelische <i>CEBPA</i> -Mutationen
Intermediär	<i>NPM1</i> -Mutation mit <i>FLT3</i> -ITD ^{hohe Ratio}
	<i>NPM1</i> -Wildtyp ohne <i>FLT3</i> -ITD oder mit <i>FLT3</i> -ITD ^{niedrige Ratio}
	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3::KMT2A</i>
	Nicht als günstig oder ungünstig klassifizierte Entitäten
Ungünstig	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK::NUP214</i>
	t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> -Genumlagerung
	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR::ABL1</i>
	inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MECOM</i>
	-5 oder del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Komplexer Karyotyp (≥ 3 Aberrationen), Monosomie
	<i>NPM1</i> -Wildtyp mit <i>FLT3</i> -ITD ^{hohe Ratio}
	<i>RUNX1</i> -, <i>ASXL1</i> -, <i>TP53</i> -Mutation

1.2 Vorhersage des Therapieansprechens

1.2.1 Stellenwert prädiktiver Modelle

In zahlreichen Modellen wird der Fokus auf die Prognose der AML gelegt (Döhner et al. 2017; Ng et al. 2016; Liersch et al. 2014). Prognostische Analysen liefern Informationen zum möglichen Krankheitsverlauf, wie etwa das Gesamtüberleben oder das rezidiv-freie Überleben (Clark et al. 2006). Bislang existieren jedoch wenige prädiktive Modelle, die die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf eine bestimmte Therapie angeben (Clark et al. 2006). Die Vorhersage des Therapieansprechens ermöglicht eine Identifikation der Patienten, die mit großer Wahrscheinlichkeit keinen Nutzen aus der therapeutischen Intervention ziehen. Somit kann die Therapie individuell angepasst werden und im besten Fall zu geringeren Nebenwirkungen und/oder einem besseren Therapieergebnis führen. Therapieansätze wie eine allogene Stammzelltransplantation, eine Behandlung mit hypomethylierenden Substanzen oder experimentelle Verfahren könnten für Hochrisikogruppen eine Alternative darstellen. Zudem ist ein erfolgreiches Therapieansprechen mit einem verlängerten Gesamtüberleben assoziiert (Ferguson et al. 2016). Klinische, biologische und biochemische Variablen können in prognostischen respektive prädiktiven Modellen genutzt werden (Clark et al. 2006). Zudem eignen sich Mutations- und Genexpressionsanalysen zur Entwicklung von Biomarkern für prognostische und prädiktive Analysen (Narrandes und Xu 2018; Goossens et al. 2015).

1.2.2 Walter-Score

Prädiktive Modelle können in Form eines Scores ausgedrückt werden, der die Summe aus Variablen darstellt, die das Therapieansprechen vorhersagen. Der Score nach Walter et al. (2015) integriert klinische, laborchemische sowie molekulargenetische Daten. Er wurde mit vier unabhängigen Kohorten (n = 4601) entwickelt, deren Patienten zwischen 1987 und 2013 in den USA mit einer intensiven Induktionschemotherapie behandelt wurden (Walter et al. 2015). Die Variablen wurden linear gewichtet und zu einem Score addiert (Walter et al. 2015). Als besonders signifikant prädiktive Variablen erwiesen sich das Alter, die Zytogenetik-Einteilung gemäß *Medical Research Council* (MRC) und der *NPM1/FLT3-ITD*-Status (Walter et al. 2015). Um das prädiktive Potential des

Modells zu quantifizieren, wurde die *Area Under the Curve* (AUC) bestimmt, die die Fläche unter der *Receiver-Operating-Characteristic*-Kurve (ROC) angibt. Dabei repräsentieren Werte zwischen 0,6 und 0,7 eine schlechte, Werte zwischen 0,7 und 0,8 eine moderate und Werte zwischen 0,8 und 0,9 eine gute Unterscheidungsfähigkeit (Muller et al. 2005; Ishihara et al. 2009; Roelen et al. 2013). Die AUC für den Walter-Score betrug im gesamten Kollektiv der 4601 Patienten 0,78 (Walter et al. 2015).

1.2.3 *Retrained-Response-LSC17*

Ein weiterer prädiktiver Score stellt eine Abänderung der stammzell-assoziierten Genexpressionssignatur nach Ng et al. (2016) (LSC17) dar. Der LSC17 wurde mit Daten von 573 Patienten mit AML entwickelt (Ng et al. 2016). Im finalen Score wurden die gewichteten Microarray-Expressionswerte von 17 Genen addiert (Ng et al. 2016). Für den LSC17 konnte in fünf unabhängigen Kohorten mit $n = 908$ eine Assoziation mit dem Gesamtüberleben gezeigt werden (Ng et al. 2016). Mit den Daten einer der Validierungskohorten mit $n = 307$ wurde ein prädiktiver Score entwickelt (Ng et al. 2016). Dabei wurden die gewichteten NanoString-Expressionswerte von sechs LSC17-Genen zum *Retrained-Response-LSC17* (RR-LSC17) addiert (Ng et al. 2016). Die analysierten Patienten wurden zwischen 1999 und 2012 mit einer intensiven Induktionstherapie behandelt (Ng et al. 2016). Hohe RR-LSC17-Werte korrelierten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines refraktären Krankheitsverlaufs (Ng et al. 2016). Mit dem RR-LSC17 konnte in der Validierungskohorte ($n = 307$) eine AUC von 0,81 erreicht werden (Ng et al. 2016).

1.2.4 *Predictive Score 29 Medical Research Council*

Ein weiterer auf Genexpression basierender Score ist der *Predictive Score 29 MRC* (PS29MRC) nach Herold et al. (2018). Um diesen zu entwickeln, wurden Analysen mit klinischen, zytogenetischen sowie molekulargenetischen Daten aus Kohorten zweier voneinander unabhängigen Studien durchgeführt: der AMLCG-1999-Studie (*Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group*) mit $n = 407$ sowie der Kohorte der HOVON-Studien (*Haemato-Oncology Foundation for Adults in the*

Netherlands) mit $n = 449$ (Büchner et al. 2016; Büchner et al. 2006; Wouters et al. 2009; Taskesen et al. 2011; Herold et al. 2018). Die Genexpression wurde jeweils mittels Microarrays analysiert (Herold et al. 2018). Der finale kontinuierliche Prädiktor (PS29MRCcont) setzt sich aus der Summe der 29 gewichteten Genexpressionswerte und der zytogenetischen Risikostratifizierung nach MRC zusammen (Herold et al. 2018). Zur Einordnung der Patienten in Niedrigrisiko- und Hochrisikogruppen wird der PS29MRCcont mit Hilfe eines Cut-Off-Wertes dichotomisiert (PS29MRCdic) (Herold et al. 2018). Validiert wurde der PS29MRC in einer unabhängigen Kohorte von Patienten der AMLCG-2008- und der AMLCG-1999-Studie mit $n = 250$ (Herold et al. 2018; Braess et al. 2018; Büchner et al. 2016; Büchner et al. 2006). Hierbei wurden die Genexpressionsanalysen mit der Hochdurchsatz-Sequenzierung von Ribonukleinsäuren (RNAseq) durchgeführt (Herold et al. 2018). In der unabhängigen Validierungskohorte konnte mit dem PS29MRCcont eine AUC von 0,76 erreicht werden (Herold et al. 2018). Mit der Risikostratifizierung durch den PS29MRCdic wurden eine Spezifität von 90 %, eine Sensitivität von 46 % sowie eine Genauigkeit von 77 % erzielt (Herold et al. 2018).

1.2.5 Vergleich bisheriger prädiktiver Modelle

Durch die Integration von Genexpressionsanalysen sowie zytogenetischen Daten ist der kontinuierliche PS29MRC in der Validierungskohorte mit $n = 250$ bisherigen prädiktiven Modellen überlegen: So beträgt die AUC des PS29MRCcont 0,76, während sie beim Walter-Score bzw. beim RR-LSC17 bei 0,71 bzw. 0,61 liegt (Herold et al. 2018). Der dichotome PS29MRC ermöglicht zudem eine Einteilung der Patienten in Niedrigrisiko- und Hochrisikogruppen (Herold et al. 2018). Jedoch eignet sich die für den Score notwendige Genexpressionsanalyse mittels Microarrays oder RNAseq in der klinischen Routine nur bedingt: Die Bestimmung des Risikos für Therapieversagen sollte innerhalb von fünf Tagen nach Diagnosestellung erfolgen, da eine Verzögerung der Therapie mit einer Verschlechterung der Prognose assoziiert sein kann (Döhner et al. 2017). Ein automatisiertes und reproduzierbares Verfahren könnte eine Implementation des PS29MRC in der klinischen Routine deutlich erleichtern.

1.3 Methoden zur Genexpressionsanalyse

1.3.1 Genexpressionsanalytik als diagnostische Ergänzung

Durch die Entwicklung und die Verbreitung der Sequenzierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Hochdurchsatzverfahren wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Mutationen bei Patienten mit AML identifiziert (Ley et al. 2013). Eine Ergänzung gegenüber der Mutationsanalyse einzelner Gene stellt die Genexpressionsanalyse dar, bei der die Level der Ribonukleinsäuren (RNA) gemessen werden. Eine Genexpressionsanalyse kann für einzelne Transkripte oder für das gesamte Transkriptom durchgeführt werden. Dies ermöglicht eine qualitative und quantitative Beurteilung der Aktivität der untersuchten Gene. Genexpressionsdaten zeigen epigenetische Veränderungen an und können als Surrogat für bisher unbekannte Mutationen genutzt werden (Ley et al. 2013; Kohlmann et al. 2010). Zudem werden Genexpressionsanalysen zur Entwicklung prognostischer Scores eingesetzt (Ng et al. 2016; Metzeler et al. 2008; Huet et al. 2018). Für Genexpressionsanalysen etablierten sich in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Verfahren, wie etwa die Microarray-Technologie, die RNAseq oder auch die NanoString-Plattform.

1.3.2 Microarray-Technologie

Bei der Microarray-Technologie wird zunächst RNA isoliert und mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt (Narrantes und Xu 2018). Die Messung der Genexpression erfolgt über die Hybridisierung der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten cDNA mit den Sonden des DNA-Arrays (Draghici et al. 2006). Mittels Microarrays wird die Erstellung eines breiten Expressionsprofils von bis zu 50 000 Transkripten ermöglicht (Narrantes und Xu 2018). Jedoch wird die Qualität der Genexpressionsdaten durch ein hohes Hintergrundrauschen sowie eine geringere Auflösung eingeschränkt (Zhang et al. 2020). Im Vergleich zu der RNAseq und der NanoString-Plattform ist eine höhere RNA-Konzentration für eine valide Messung notwendig (Zhang et al. 2020).

1.3.3 Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierung

Auch bei der RNAseq wird die isolierte RNA zunächst über reverse Transkription in cDNA umgewandelt (Kukurba und Montgomery 2015). Im Anschluss wird die entstandene cDNA fragmentiert und gereinigt (Narrantes und Xu 2018; Kukurba und Montgomery 2015). Die Fragmente werden dann mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert, sequenziert und mit dem Referenzgenom verglichen (Narrantes und Xu 2018). Mit diesem Hochdurchsatzverfahren ist eine Analyse des gesamten Transkriptoms mit hoher Sensitivität möglich, die Durchführung ist jedoch im Vergleich zur Microarray-Technologie und NanoString-Plattform zeitintensiv (Narrantes und Xu 2018).

1.3.4 NanoString-Plattform

Genexpressionsanalysen mittels Microarrays oder der RNAseq sind aufwendige Verfahren, die für den Einsatz im klinischen Alltag wenig effizient erscheinen (Narrantes und Xu 2018). Beim Einsatz der NanoString-Plattform wird die Genexpression ohne Amplifizierung, Klonung oder enzymatische Zwischenschritte direkt mit hoher Sensitivität gemessen (Veldman-Jones et al. 2015). Dabei beruht die NanoString-Methode auf der direkten Hybridisierung der Sonden mit den RNA-Transkripten (Reis et al. 2011; Geiss et al. 2008). Für die Analyse eignen sich auch Proben von geringerer Qualität (Tsang et al. 2017). In der Routinediagnostik bei Mamma-Karzinomen beispielsweise basiert ein Score für die Rückfallwahrscheinlichkeit auf der Genexpressionsanalyse mit Hilfe der NanoString-Plattform (Wallden et al. 2015). Besonders bei einer begrenzten und bekannten Anzahl an Genen erweist sich diese größtenteils automatisierte Methode anderen Verfahren gegenüber als überlegen (Tsang et al. 2017).

2 Zielsetzung

Die AML ist eine klinisch sowie biologisch heterogene Erkrankung multifaktorieller Genese. Nicht alle Patienten profitieren von einer intensiven Induktionstherapie. Besonders für Hochrisikogruppen ist die therapeutische Entscheidungsfindung erschwert.

Prädiktive Biomarker können dazu beitragen, Patienten mit wahrscheinlichem Therapieversagen zu identifizieren. Für die klinische Umsetzbarkeit prädiktiver Modelle ist ein effizientes, schnelles und reproduzierbares Verfahren unabdingbar. Ziele dieser Arbeit sind deshalb die Übertragung des prädiktiven Modells nach Herold et al. (2018) auf die NanoString-Plattform sowie die Validierung des PS29MRC mit einer unabhängigen, multizentrischen Patientenkohorte.

Dazu wurde das prädiktive Modell im Hinblick auf die Vorhersage des Gesamtüberlebens und des Therapieversagens analysiert. Ein Fokus wurde hierbei auf das prognostische und prädiktive Potential des PS29MRC in Patientengruppen gelegt, die aufgrund klinischer, zytogenetischer oder molekulargenetischer Charakteristika ein hohes Risiko für einen ungünstigen Krankheitsverlauf haben. Zudem wurde der Cut-Off-Wert des prädiktiven Modells an die NanoString-Plattform angepasst. Dadurch wurde eine Einteilung der Patienten in Niedrigrisiko- und Hochrisikogruppen möglich. Schließlich wurde zur Verbesserung der Kommunikation zwischen dem ärztlichen Team und den Patienten ein Modell der individuellen Risikovorhersage für Therapieversagen entwickelt. Dies könnte die Integration des PS29MRC in den klinischen Alltag und letztlich eine individualisierte Therapie ermöglichen.

3 Patienten und Methodik

3.1 Studiendesign

Für die vorliegende Arbeit wurden aus zwölf deutschen Studienzentren Daten und Gewebeproben von Patienten mit AML retrospektiv analysiert, die im klinischen AMLCG-Studienregister von 2009 bis 2019 erfasst wurden (Deutsches Register Klinischer Studien ID: DRKS 00020816). Dieses wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität Dresden geprüft und angenommen (EK 98032010) und enthält Daten zu biologischen Markern, zum Therapieansprechen und zum klinischen Verlauf von Patienten mit AML. Zu allen Patienten, die in dieses Projekt aufgenommen wurden, lag eine Einverständniserklärung über die Verwendung der Daten und der Gewebeproben zum Zwecke weiterer Analysen vor. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) geprüft und angenommen (EK 427-13). Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte gemäß der Deklaration von Helsinki.

3.2 Datenerhebung

Die Datenerhebung erfolgte elektronisch sowie papierbasiert in enger Kooperation mit der Zentrale des AMLCG-Studienregisters. Für Patienten mit Diagnosestellung und Behandlung im Klinikum Großhadern wurden folgende Datenbanken zur Erhebung demographischer und krankheitsbezogener Daten herangezogen:

1. Datenbank des Labors für Leukämiediagnostik, Klinikum Großhadern
2. Klinische Patientenakte in elektronischer Form
3. Datenbank der Laboratoriumsmedizin der LMU, Klinikum Großhadern
4. Patientenakten des Zentralarchivs
5. Arztbriefe externer Kliniken

Der Datensatz der Patienten aus externen Zentren wurde kontinuierlich um die Angaben aus dem AMLCG-Studienregister erweitert.

3.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Um ein homogenes Patientenkollektiv und im Rahmen der Validierung des PS29MRC eine adäquate Vergleichbarkeit zu sichern, wurden die bereits bei der Entwicklung des PS29MRC festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien angewandt (Herold et al. 2018). Für die Analysen des PS29MRC wurden im Verlauf der Messungen weitere Ausschlusskriterien definiert (Moser et al. 2021). Eine Übersicht zu Ein- und Ausschlüssen von Patienten ist in Abbildung 1 zusammengestellt.

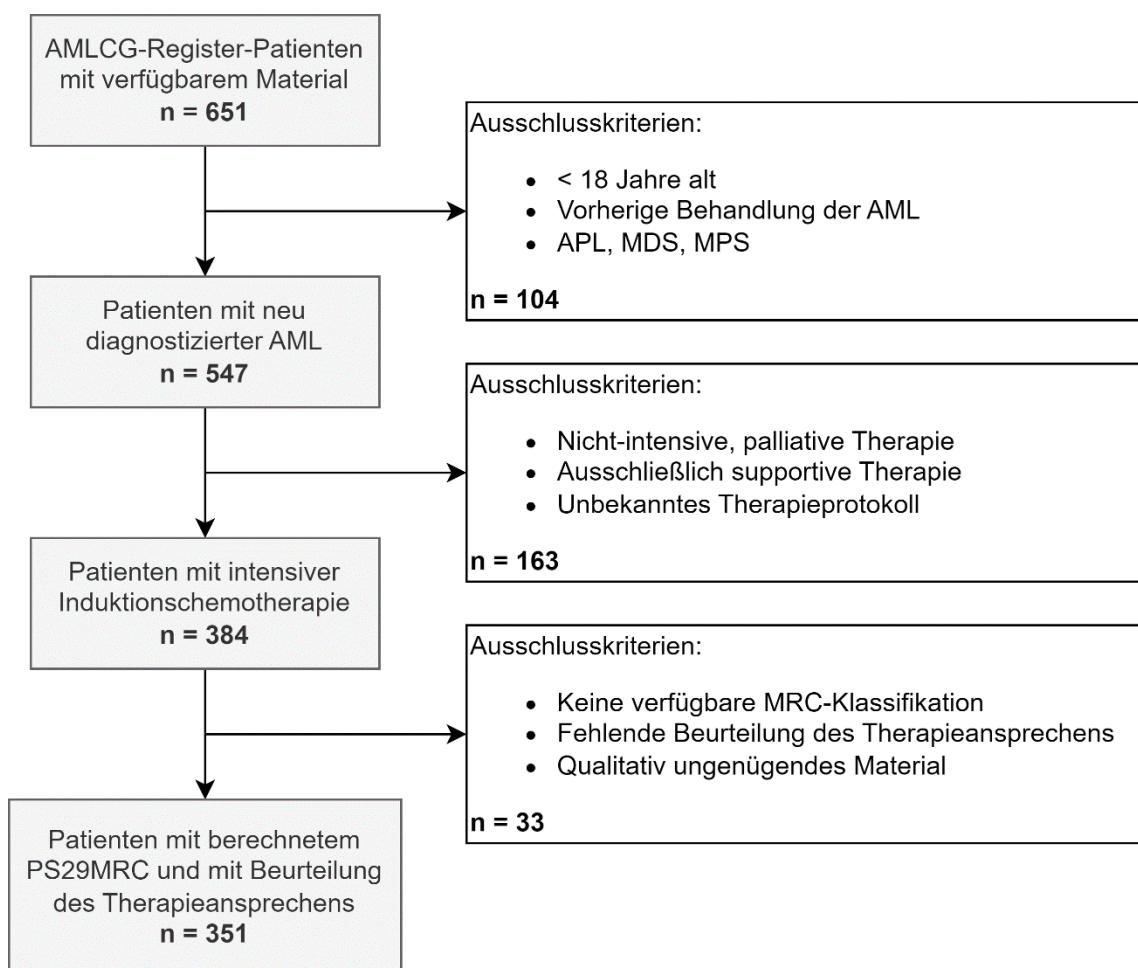


Abbildung 1: Flussdiagramm der ein- und ausgeschlossenen Patienten (Moser et al. 2021).

AMLCG: *Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group*; APL: Akute Promyelozytenleukämie; MDS: Myelodysplastisches Syndrom; MPS: Myeloproliferatives Syndrom; MRC: *Medical Research Council*.

3.4 Therapieprotokolle

Eingeschlossene Patienten erhielten mindestens einen Zyklus einer intensiven Induktionschemotherapie gemäß folgender Therapieprotokolle: ‚7+3‘-Schema (n = 121; 31 %), S-HAM (n = 226; 59 %), TAD/HAM(-HAM) (n = 37; 10 %) (Moser et al. 2021). Das ‚7+3‘-Schema besteht aus einer siebentägigen Cytarabintherapie (100–200 mg/m²) und einer dreitägigen Gabe eines Anthracyclins (Daunorubicin 60 mg/m², Idarubicin 10–12 mg/m², Mitoxantron 10–12 mg/m²) (Döhner et al. 2017). Hierbei konnten bei Patienten unter 60 Jahren Remissionsraten von 60–80 % beobachtet werden, während 40–60 % der Patienten ab 60 Jahren eine CR bzw. eine CRi erreichten (Döhner et al. 2017). Vergleichbare Remissionsraten wurden mit anderen Therapieprotokollen erzielt, die in Tabelle 2 gelistet sind (Braess et al. 2018).

Tabelle 2: Schemata der Induktionschemotherapie der AMLCG-2008-Studie samt Remissionsraten (Braess et al. 2018).

Protokoll	Medikament	Dosierung	Zeitpunkt	Remission
S-HAM < 60 Jahre	Cytarabin	2 × 3 g/m ²	Tag 1–2, 8–9	80 %
	Mitoxantron	1 × 10 mg/m ²	Tag 3–4, 10–11	
S-HAM ≥ 60 Jahre	Cytarabin	2 × 1 g/m ²	Tag 1–2, 8–9	70 %
	Mitoxantron	1 × 10 mg/m ²	Tag 3–4, 10–11	
TAD-HAM < 60 Jahre	Cytarabin	1 × 100 mg/m ²	Tag 1–2	76 %
	Cytarabin	2 × 100 mg/m ²	Tag 3–8	
	Thioguanin	2 × 100 mg/m ²	Tag 3–9	
	Daunorubicin	1 × 60 mg/m ²	Tag 3–5	
	Cytarabin	2 × 3 g/m ²	Tag 21–23	
	Mitoxantron	1 × 10 mg/m ²	Tag 23–25	
HAM(-HAM) ≥ 60 Jahre	Cytarabin	2 × 1 g/m ²	Tag 1–3	65 %
	Mitoxantron	1 × 10 mg/m ²	Tag 3–5	
	Cytarabin	2 × 1 g/m ²	Tag 21–23	
	Mitoxantron	1 × 10 mg/m ²	Tag 23–25	

3.5 Beurteilung der Zytogenetik

Für die Berechnung des PS29MRCcont war die Beurteilung der Zytogenetik nach MRC notwendig. Die drei prognostischen MRC-Risikogruppen sind in Tabelle 3 angegeben (Grimwade et al. 2010). Zu neun von 384 Patienten lag keine MRC-Klassifikation vor (Moser et al. 2021).

Tabelle 3: Prognostische Risikostratifizierung nach *Medical Research Council* (Grimwade et al. 2010).

Risiko	Zytogenetische Aberration
Günstig	t(15;17)(q22;q21)
	t(8;21)(q22;q22)
	inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)
Intermediär	Nicht als günstig oder ungünstig klassifizierte Entitäten
Ungünstig	abn(3q) [außer t(3;5)(q21~25;q31~35)]
	inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)
	add(5q), del(5q), -5
	-7, add(7q)/del(7q)
	t(6;11)(q27;q23)
	t(10;11)(p11~13;q23)
	t(11q23) [außer t(9;11)(q21~22;q23) und t(11;19)(q23;p13)]
	t(9;22)(q34;q11)
	-17/abn(17p)
	Komplexer Karyotyp (≥ 4 Aberrationen)

3.6 Beurteilung des Ansprechens auf die Induktionschemotherapie

Für die Validierung des PS29MRC war neben der MRC-Klassifikation die Beurteilung des Therapieansprechens ein Einschlusskriterium. Dabei wurde das Therapieansprechen gemäß den ELN-2017-Empfehlungen beurteilt, die in Tabelle 4 abgebildet sind (Döhner et al. 2017). Für die Untersuchung auf Refraktärität wurden Daten zu Knochenmarkaspiraten und peripheren Blutproben bis zum Tag 90 nach Therapiebeginn herangezogen. Bei acht Patienten fehlte die klinische Einordnung des Therapieansprechens (Moser et al. 2021).

Tabelle 4: Kriterien des Therapieansprechens/-versagens (Döhner et al. 2017).

Ansprechen der Induktionschemotherapie: Remission	
Komplette Remission (CR)	<ul style="list-style-type: none"> • Blastenreduktion im Knochenmark auf < 5 %; • Weder Hinweis auf periphere Blasten noch Blasten mit Auerstäbchen noch extramedullärer Befall; • Absolute Neutrophile ≥ 1 G/L; • Thrombozyten ≥ 100 G/L
Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration (CRi)	<p>Alle CR-Kriterien außer</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neutropenie (< 1 G/L) oder • Thrombozytopenie (< 100 G/L)
Versagen der Induktionschemotherapie: Refraktärität	
Primär refraktäre AML	Ausbleiben der CR oder CRi nach zwei Zyklen intensiver Induktionschemotherapie
Teilremission	<ul style="list-style-type: none"> • Alle hämatologischen CR-Kriterien; • Blastenreduktion im Knochenmark auf 5–25 %; • Verringerung des Anteils der Blasten im Knochenmark um mindestens 50 %
Tod in Aplasie	<ul style="list-style-type: none"> • Todesfälle in Zytopenie ab dem siebten Tag nach dem Ende der Induktionschemotherapie; • Mit aplastischem oder hypoplastischem Knochenmark innerhalb von sieben Tagen, ohne Hinweis auf eine primär refraktäre AML
Tod unbekannter Ursache	<ul style="list-style-type: none"> • Todesfälle vor dem Ende der Induktionschemotherapie oder • Todesfälle innerhalb von höchstens sechs Tagen nach dem Ende der Induktionschemotherapie oder • Todesfälle ab dem siebten Tag nach dem Ende der Induktionschemotherapie

3.7 Entnahme, Verarbeitung und Lagerung der Proben

Das Material wurde zum Zeitpunkt der Erstdiagnose durch Knochenmarkpunktion (n = 320; 83 %) oder intravenöse Blutentnahmen (n = 64; 17 %) gewonnen (Moser et al. 2021). Der mediane Anteil der Blasten betrug 68,5 % im Knochenmark (Spannweite: 9–97 %) respektive 11,5 % im peripheren Blut (Spannweite: 0–98 %) (Moser et al. 2021). Zur Isolation der leukämischen Blasten wurde die Ficoll-Separation angewandt, ein Verfahren zur Trennung der mononukleären Zellen von den Erythrozyten, den Granulozyten und dem Plasma (Bøyum et al. 1991). Nach der Isolierung wurden die Blasten mit Hilfe eines Blutbildmessgeräts gemäß den Empfehlungen des Herstellers quantifiziert. Anschließend wurde das Material in Guanidinium-Isothiocyanat-haltigen Lysepuffer (RLT) überführt und mit beta-Mercaptoethanol versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C in der Gendatenbank des Labors für Leukämiediagnostik im Klinikum Großhadern. Durch die Verarbeitung und die Lagerung der Proben in der Biobank wurde der Abbau der RNA verlangsamt, um eine ausreichende Qualität zu sichern. Die für die Prozessierung der Proben notwendigen Materialien, Chemikalien und Gerätschaften sind in Tabelle 5 und 6 aufgeführt.

Tabelle 5: Materialien und Chemikalien zur Verarbeitung und Lagerung der Proben.

Produkt	Hersteller
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
2-Mercaptoethanol 98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Cellclean	Sysmex, Norderstedt
Cellpack	Sysmex, Norderstedt
Eight-check-3WP	Sysmex, Norderstedt
Falcon-Röhrchen 50 ml	Falcon, Corning, USA
Filter Tips Biosphere 100–1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Leucosep mit Separationsmedium	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PBS-Dulbecco	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Probenständer Nalgene	Nunc, Langenselbold
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden

Produkt	Hersteller
Specific Albumin	Medion Diagnostics, Gräfelfing
Stripette Einweg-Pipette 10 ml	Costar, Wiesbaden
Stromatolyser-WH	Sysmex, Norderstedt
Thermopapier	Sysmex, Norderstedt

Tabelle 6: Geräte zur Verarbeitung und Lagerung der Proben.

Gerät	Hersteller
Blutbildmessgerät	Sysmex, Norderstedt
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus, Nürnberg
Pipetten 1000 µl	Gilson, Den Haag, Niederlande
Pipettierhilfe	Brand, Wertheim
Tischzentrifuge	Heraeus, Nürnberg
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen

3.8 Genanalytik

3.8.1 Präparation der RNA

Nach der Selektion der 384 Proben wurde das aufgetaute RLT-Lysat jeweils mit RLT-Puffer versetzt. Für alle weiteren Verfahren wurden die Proben mit festem Kohlenstoffdioxid gekühlt in das Pathologische Institut der LMU München transportiert. Für die RNA-Extraktion wurden das *RNeasy Mini Kit* sowie der automatisierte Pipettierroboter *QIAcube* gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Zur Entfernung potenzieller Verunreinigungen durch DNA wurde das *Rnase-Free DNase Set* eingesetzt. Mit Hilfe des *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* wurden die Qualität sowie die Konzentration der extrahierten RNA photometrisch bestimmt. Ausschließlich Proben mit einer Konzentration über 20 ng/µl und einem Reinheitsgrad des A260/A280-Quotienten von 1,5–2,3 wurden für die weitere Analyse verwendet (n = 373). Im Anschluss an die Isolation der RNA wurden alle Proben bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die für die Präparation der RNA notwendigen Materialien, Chemikalien und Gerätschaften sind in Tabelle 7 und 8 beschrieben.

Tabelle 7: Materialien und Chemikalien für die Isolierung der RNA.

Produkt	Hersteller
Ethanol 70 %	Merck, Darmstadt
Filter Tips 1000 µl	Qiagen, Hilden
Filter Tips wide-bore 1000 µl	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden
Rnase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Rotor Adapters	Qiagen, Hilden
Safe Lock Tubes 2 ml	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 8: Geräte für die Isolierung der RNA.

Gerät	Hersteller
Gefrierschrank -80 °C	Fryka Kältetechnik, Esslingen
Nanodrop Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
QIAcube	Qiagen, Hilden
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

3.8.2 Auswahl des Gen-Panels

Eine Übersicht des für die Genexpressionsanalyse verwendete NanoString-Panels (*CodeSet*) ist in Tabelle 9 gegeben. Das *CodeSet* setzte sich aus insgesamt 40 Genen zusammen: vier *Housekeeping*-Genen, dem *CALCRL*-Gen, sechs Genen des RR-LSC17 sowie 29 PS29MRC-Genen (Herold et al. 2018; Ng et al. 2016; Moser et al. 2021). Zudem beinhaltete das *CodeSet* gemäß der Empfehlung des Herstellers sechs Positiv- sowie acht Negativkontrollen. Dabei dienen Positivkontrollen als Maß für die Hybridisierungseffizienz, während Negativkontrollen zur Bereinigung des Hintergrundrauschens genutzt werden (Kulkarni 2011). *Housekeeping*-Gene kodieren Proteine, die für die Aufrechterhaltung diverser Zellfunktionen notwendig sind (Eisenberg und

Levanon 2013). Diese Gene eignen sich in Genexpressionsstudien als Kontrollgene, da sie nahezu konstant exprimiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten *Housekeeping*-Gene *ABL1*, *GAPDH*, *PGK1* und *RPS27* ermöglichten unter Einbezug der Positiv- und Negativkontrollen eine relative Quantifizierung der entsprechenden Zielgene.

Tabelle 9: Übersicht zum NanoString-CodeSet (Moser et al. 2021).

Gen	Accession	Position	Beschreibung
<i>ABL1</i>	NM_005157.3	3201–3300	<i>Housekeeping</i> -Gen
<i>GAPDH</i>	NM_002046.3	973–1072	<i>Housekeeping</i> -Gen
<i>PGK1</i>	NM_000291.2	1031–1130	<i>Housekeeping</i> -Gen
<i>RPS27</i>	NM_001030.4	116–215	<i>Housekeeping</i> -Gen
<i>CALCRL</i>	NM_005795.3	1586–1685	<i>CALCRL</i>
<i>CD34</i>	NM_001025109.1	1581–1680	RR-LSC17
<i>GPR56</i>	NM_005682.4	1146–1245	RR-LSC17
<i>KIAA0125</i>	NM_014792.2	7181–7280	RR-LSC17
<i>LAPTM4B</i>	NM_018407.4	1736–1835	RR-LSC17
<i>MMRN1</i>	NM_007351.2	3271–3370	RR-LSC17
<i>NYNRIN</i>	NM_025081.2	7441–7540	RR-LSC17
<i>ALDH2</i>	NM_000690.2	826–925	PS29MRC
<i>APBA2</i>	NM_001130414.1	1186–1285	PS29MRC
<i>C17orf58</i>	NM_181655.2	1081–1180	PS29MRC
<i>C2CD2</i>	NM_015500.1	843–942	PS29MRC
<i>COL8A2</i>	NM_005202.1	4001–4100	PS29MRC
<i>CYP2E1</i>	NM_000773.3	573–672	PS29MRC
<i>DSG2</i>	NM_001943.3	236–335	PS29MRC
<i>EIF5A2</i>	NM_020390.5	451–550	PS29MRC
<i>EVI5</i>	NM_005665.4	1379–1478	PS29MRC
<i>H1FO</i>	NM_005318.3	1250–1349	PS29MRC
<i>INHBA</i>	NM_002192.2	491–590	PS29MRC
<i>JAGN1</i>	NM_032492.3	679–778	PS29MRC
<i>LAMC1</i>	NM_002293.3	4916–5015	PS29MRC
<i>LRRC17</i>	NM_001031692.1	676–775	PS29MRC

Gen	Accession	Position	Beschreibung
<i>MIR155HG</i>	NR_001458.3	361–460	PS29MRC
<i>NPDC1</i>	NM_015392.3	1435–1534	PS29MRC
<i>PCTP</i>	NM_001102402.2	473–572	PS29MRC
<i>PI4KB</i>	NM_001198775.1	2711–2810	PS29MRC
<i>PLSCR4</i>	NM_001128304.1	1701–1800	PS29MRC
<i>PROCR</i>	NM_006404.3	165–264	PS29MRC
<i>RASD1</i>	NM_016084.4	1581–1680	PS29MRC
<i>RHBDD2</i>	NM_001040456.2	1189–1288	PS29MRC
<i>SEC16B</i>	NM_033127.2	1967–2066	PS29MRC
<i>SLC35F2</i>	NM_017515.4	1395–1494	PS29MRC
<i>SPAG1</i>	NM_172218.2	871–970	PS29MRC
<i>ST14</i>	NM_021978.3	1406–1505	PS29MRC
<i>TAF1C</i>	NM_005679.2	3361–3460	PS29MRC
<i>TANC1</i>	NM_033394.1	1241–1340	PS29MRC
<i>ZNF415</i>	NM_001136038.2	1911–2010	PS29MRC

RR-LSC17: *Retrained-Response-LSC17*.

3.8.3 Hybridisierung und Purifikation der Proben

Die Messung der Genexpression erfolgte durch digitale Auslesung der mit einem Barcode markierten RNA-Moleküle (Kulkarni 2011). Dafür war zunächst die Hybridisierung der RNA an fluoreszierende Reporter- und Capture-Sonden essenziell. Dies wird in Abbildung 2 veranschaulicht.



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Capture- und Reportersonden gebunden am Zielgen (Abbildung aus *nCounter Gene Expression CodeSet RNA Hybridization Protocol Manual MAN-10056-05*, Seite 3).

Die Reporter-Sonde verfügte über den für das Zielgen spezifischen Barcode, während die Capture-Sonde den neu gebildeten Komplex aus Reporter-Sonde und Zielgen immobilisierte (Kulkarni 2011). Die Hybridisierung wurde bei 65 °C für 18–20 Stunden mit dem *Veriti 96-Well Thermal Cycler* gemäß NanoString-Protokoll durchgeführt. Im Anschluss wurden die Ziel-Sonden-Komplexe in der vollautomatisierten *nCounter Prep Station* verarbeitet. Hierbei wurden die hybridisierten Proben gereinigt und auf der *nCounter*-Kartusche fixiert. Mit der *nCounter Prep Station* können insgesamt zwölf Proben innerhalb von drei Stunden prozessiert werden. Die hier beschriebenen Materialien, Chemikalien und Gerätschaften sind in Tabelle 10 und 11 aufgelistet.

Tabelle 10: Chemikalien und Materialien für die Hybridisierung und Purifikation der Proben.

Produkt	Hersteller
Customized CodeSet	NanoString, Seattle, USA
nCounter Master Kit	NanoString, Seattle, USA

Tabelle 11: Geräte für die Hybridisierung und Purifikation der Proben.

Gerät	Hersteller
nCounter Prep Station	NanoString, Seattle, USA
Tischzentrifuge	Neolab, Heidelberg
Veriti 96-Well Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

3.8.4 Quantifizierung der Genexpression

Die Expression der Zielgene wurde mit Hilfe des *nCounter Digital Analyzer* gemessen (NanoString Technologies, Seattle, USA). Nach Platzierung der *nCounter*-Kartusche wurden über eine mikroskopische CCD-Kamera (CCD: *Charge-coupled device*) die immobilisierten fluoreszierenden Ziel-Sonden-Komplexe fotografiert und vergrößert (Kulkarni 2011). Die Genexpression wurde durch das Zählen der Barcodes innerhalb von drei Stunden quantifiziert. Der *nCounter Digital Analyzer* konnte mit bis zu sechs Kartuschen beladen werden, wodurch bis zu 72 Proben analysiert werden konnten. Die Ergebnisse wurden als

RCC-Dateien (RCC: *Reporter-Code-Count*) mit der nSolver 4.0 Analyse-Software weiterverarbeitet. Dabei wurden im Rahmen der Qualitätskontrolle zunächst die Bildqualität, die Sättigung sowie das Hintergrundrauschen überprüft. Die Ausfallquote betrug insgesamt 1 % ($n = 5$) (Moser et al. 2021). Die rohen Expressionsdaten der Proben mit ausreichender Qualität ($n = 368$) wurden mit dem nSolver-Algorithmus in drei Schritten normalisiert (Moser et al. 2021): Normalisierung durch das arithmetische Mittel der Positivkontrollen, Subtraktion des Mittelwerts der negativen Kontrollen und Normalisierung durch das geometrische Mittel der vier *Housekeeping*-Gene. Anschließend wurden die normalisierten Expressionsdaten log-transformiert. Dies ermöglichte den relativen Vergleich der Werte sowie die Berechnung des PS29MRCcont als Summe der normalisierten und gewichteten Expressionsdaten.

3.9 Berechnung der prädiktiven Scores

Der kontinuierliche PS29MRC wurde als Summe der gewichteten Genexpressionswerte samt MRC-Klassifikation wie folgt berechnet (Herold et al. 2018):

$$\begin{aligned}
 \text{PS29MRCcont} &= (\text{CYP2E1}) \times (-0,587) + (\text{MRC günstig}) \times (-0,193) \\
 &+ (\text{RHBDD2}) \times (-0,190) + (\text{APBA2}) \times (-0,175) \\
 &+ (\text{EVI5}) \times (-0,151) + (\text{EIF5A2}) \times (-0,133) \\
 &+ (\text{TAF1C}) \times (-0,0920) + (\text{PCTP}) \times (-0,0872) \\
 &+ (\text{LRRC17}) \times (-0,0731) + (\text{SEC16B}) \times (-0,0268) \\
 &+ (\text{C17orf58}) \times (-0,0204) + (\text{PI4KB}) \times (-0,00264) \\
 &+ (\text{ST14}) \times 0,000197 + (\text{RASD1}) \times 0,0147 \\
 &+ (\text{SLC35F2}) \times 0,0177 + (\text{JAGN1}) \times 0,0226 \\
 &+ (\text{NPDC1}) \times 0,0230 + (\text{H1FO}) \times 0,0239 \\
 &+ (\text{ALDH2}) \times 0,0400 + (\text{COL8A2}) \times 0,0451 \\
 &+ (\text{PROCR}) \times 0,0467 + (\text{ZNFA15}) \times 0,0545 \\
 &+ (\text{C2CD2}) \times 0,607 + (\text{INHBA}) \times 0,123 \\
 &+ (\text{PLSCR4}) \times 0,128 + (\text{SPAG1}) \times 0,154 \\
 &+ (\text{TANCI}) \times 0,169 + (\text{LAMCI}) \times 0,183 \\
 &+ (\text{DSG2}) \times 0,264 + (\text{MIR155HG}) \times 0,325 \\
 &+ (\text{MRC ungünstig}) \times 0,653
 \end{aligned}$$

Um den PS29MRCcont mit bisherigen prädiktiven Modellen zu vergleichen, erfolgte die Berechnung der Scores nach Walter et al. (2015) sowie nach Ng et

al. (2016). Dem prädiktiven Modell nach Walter et al. (2015) liegt folgende Formel zugrunde:

Walter-Score

$$\begin{aligned}
 &= (\text{MRC günstig}) \times 0,23 \\
 &+ (\text{NPM1-Mutation ohne FLT3-ITD}) \times 0,31 \\
 &+ (\text{NPM1-Mutation mit FLT3-ITD}) \times 0,47 \\
 &+ (\text{Blastenanteil Knochenmark}) \times 0,99 \\
 &+ (\text{Thrombozytenzahl in } 10^4/\mu\text{l}) \times 1,02 \\
 &+ (\text{Alter in Jahren}) \times 1,04 \\
 &+ (\text{männliches Geschlecht}) \times 1,07 \\
 &+ (\text{ECOG-Status größer 1}) \times 1,36 \\
 &+ (\text{Leukozytenzahl in } 10^4/\mu\text{l}) \times 1,42 \\
 &+ (\text{NPM1-Wildtyp mit FLT3-ITD}) \times 1,45 \\
 &+ (\text{sekundäre AML}) \times 2,19 \\
 &+ (\text{MRC ungünstig}) \times 2,75
 \end{aligned}$$

Der Score nach Ng et al. (2016) wurde als Summe der gewichteten Genexpressionswerte folgendermaßen ermittelt:

Retrained-Response-LSC17-Score

$$\begin{aligned}
 &= -6,58 + (\text{MMRN1}) \times 0,0442 + (\text{KIAA0125}) \times 0,0814 \\
 &+ (\text{CD34}) \times 0,104 + (\text{GPR56}) \times 0,208 \\
 &+ (\text{LAPTM4B}) \times 0,168 + (\text{NYNRIN}) \times 0,121
 \end{aligned}$$

Zu den Gleichungen ist anzumerken: Kategoriale Variablen (MRC günstig bzw. ungünstig, *NPM1*-Mutation mit oder ohne *FLT3*-ITD bzw. *NPM1*-Wildtyp mit *FLT3*-ITD, männliches Geschlecht, ECOG-Status > 1, sekundäre AML) wurden bei Vorliegen mit 1 bzw. bei Nicht-Vorliegen mit 0 gleichgesetzt. Quantitative Variablen (Genexpressionswerte, Blastenanteil im Knochenmark, Alter, Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl) wurden nach Anpassung der Einheit mit dem entsprechenden Gewichtungskoeffizienten multipliziert.

3.10 Anpassung des Cut-Off-Wertes des PS29MRC

Um die klinische Anwendbarkeit des PS29MRC zu optimieren, wurde ein dichotomer Score verwendet, der die Kohorte in Niedrigrisiko- und Hochrisikopatienten einteilte (Herold et al. 2018). Hierfür war die Bestimmung eines angemessenen Cut-Off-Wertes notwendig. Der Cut-Off-Wert des ursprünglichen PS29MRC lag bei 1,0 und basierte auf Analysen mit Microarray-

Genexpressionsdaten (Herold et al. 2018). In Vorarbeiten wurde eine Genexpressionsanalyse mit der NanoString-Plattform an einer Kohorte mit 48 unbehandelten AML-Proben durchgeführt, zu denen auch Microarray-Messwerte verfügbar waren (Herold et al. 2018). Dadurch war ein Vergleich der Genexpressionsdaten des NanoString *nCounter Digital Analyzer* mit denen, die mittels Microarrays gemessen worden waren, möglich. Wie in Abbildung 3 verdeutlicht wird, wiesen die Werte beider Methoden eine hohe Korrelation auf ($r = 0,902$) (Herold et al. 2018). Folglich stellt die NanoString-Plattform eine reproduzierbare und reliable Methode zur Genexpressionsanalyse dar. Die Auswahl des optimalen Cut-Off-Wertes erfolgte über die Konkordanz der Microarray- sowie NanoString-Genexpressionsdaten mit der Risikoeinteilung nach dem PS29MRCdic (Moser et al. 2021). Gewählt wurde dabei ein Cut-Off-Wert mit der geringsten Anzahl an falsch klassifizierten Patienten (Moser et al. 2021). Für den PS29MRCdic wurde der Cut-Off-Wert auf 0,4 festgelegt (Moser et al. 2021).

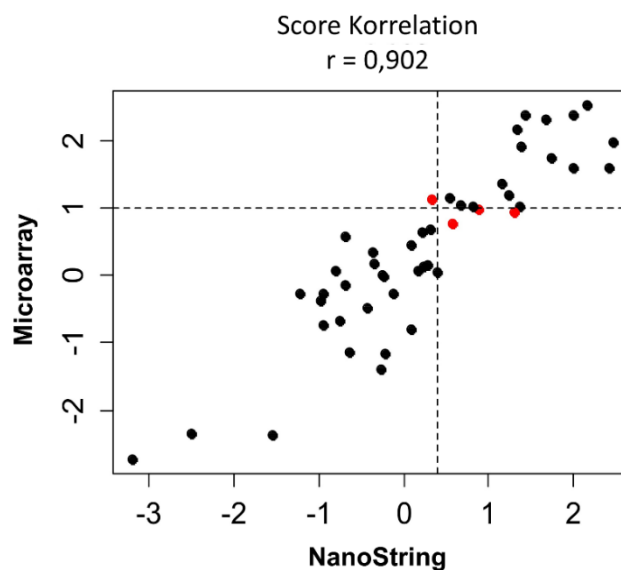


Abbildung 3: Korrelation der Microarray- und NanoString-Genexpressionsdaten (Moser et al. 2021; Herold et al. 2018).

Die horizontale gestrichelte Linie zeigt den Cut-Off-Wert des ursprünglichen Scores bei 1,0 an. Die vertikale gestrichelte Linie zeigt den Cut-Off-Wert des auf die NanoString-Plattform übertragenen Scores bei 0,4 an. Gewählt wurde ein Cut-Off-Wert mit der geringsten Anzahl an falsch klassifizierten Patienten (rot markiert).

3.11 Statistische Auswertungen

3.11.1 Definition des primären Endpunkts

Als primärer Endpunkt wurde das Therapieversagen gemäß ELN-2017 definiert: Primär refraktäre AML, Teilremission, Tod in Aplasie oder Tod unbekannter Ursache (Döhner et al. 2017). Neben den ELN-2017-Kriterien für ein Therapieversagen wurden zusätzlich die Definitionen für Refraktärität nach Herold et al. (2018) sowie nach Walter et al. (2015) zur Analyse des kontinuierlichen Modells des PS29MRC im Gesamtkollektiv herangezogen. Herold et al. (2018) modifizierten die Definition für Therapieversagen nach Cheson et al. (2003) mit Ausschluss der frühverstorbenen Patienten (Überlebenszeit nach Therapiebeginn < 16 Tage). Walter et al. (2015) hingegen definierten vier Untergruppen für eine Therapieresistenz. Dabei wurden Patienten mit einer Überlebenszeit nach Therapiebeginn von unter 28 Tagen ausgeschlossen (Walter et al. 2015). Die erste Untergruppe entsprach primär refraktären Patienten, die keine CR erreichten (Walter et al. 2015). Die weiteren Untergruppen für Therapieversagen schlossen zusätzlich ein rezidiv-freies Überleben von bis zu drei, sechs oder zwölf Monaten ein (Walter et al. 2015). Für alle weiteren Analysen des PS29MRC wurde die Definition für Refraktärität gemäß ELN-2017 verwendet.

3.11.2 Deskriptive und analytische Statistik

Hinsichtlich der relevanten statistischen Testverfahren erfolgte vor Beginn der Auswertung eine Beratung am IBE der LMU, dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie. Statistische Analysen wurden mit R Version 4.2.0 (*R Foundation for Statistical Computing*, Wien, Österreich) durchgeführt. Für quantitative Merkmale wurden die Mediane samt Spannweite ermittelt, für qualitative Merkmale wurden die absoluten und relativen Häufigkeiten angegeben. Kontinuierliche Variablen wurden mit dem U-Test nach Mann und Whitney geprüft, während der Chi-Quadrat-Test zum Vergleich kategorialer Parameter verwendet wurde.

Univariate binäre logistische Regressionsanalysen wurden zur Beurteilung der Beziehung zwischen dem PS29MRC und dem Vorliegen bzw. dem Nicht-Vorliegen eines Therapieversagens im Gesamtkollektiv sowie in einzelnen

Subgruppen eingesetzt. Zudem wurden univariate binäre logistische Regressionsanalysen zur Vorhersage eines Therapieversagens mit dem Score nach Walter et al. (2015), mit dem RR-LSC17 sowie mit weiteren demographischen und krankheitsbezogenen Variablen durchgeführt. Für die Prädiktoren der Regressionsmodelle wurden der Regressionskoeffizient, der Standardfehler, die *Odds Ratio* (OR) mit 95%-Konfidenzintervall (CI) und der p-Wert ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Als Trend zur Signifikanz wurde das Niveau $0,05 \leq p \leq 0,1$ bezeichnet. Variablen mit $p < 0,1$ in der univariaten Analyse wurden in die multivariate binäre logistische Regressionsanalyse mit der Zielvariable ‚Therapieversagen‘ einbezogen. Zudem wurde mit der Berechnung der p-Werte für jeden einzelnen PS29MRCcont-Wert ein Modell der individuellen Risikovorhersage konzipiert. Zur Überprüfung und zum Vergleich der Güte der prädiktiven Modelle wurden ROC-Kurven erstellt. Anschließend wurde die Fläche unter jeder ROC-Kurve (AUC) berechnet. Die AUC kann Werte zwischen 0,50 und 1,00 annehmen, wobei ein höherer Wert die bessere Güte anzeigt.

Der Cut-Off-Wert des PS29MRCdic wurde wie oben beschrieben auf 0,4 festgelegt. Für die Analyse des PS29MRCdic im Gesamtkollektiv wurde einmalig ein alternativer Cut-Off-Wert von 0,7 angewandt, um den Einfluss des Cut-Off-Wertes auf die diagnostische Güte zu untersuchen. Die Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic wurde mit Säulendiagrammen dargestellt. Zur Bewertung des dichotomen Scores wurden mittels Kreuztabellen die diagnostischen Gütekriterien der Sensitivität, der Spezifität sowie der positive und der negative prädiktive Wert ermittelt.

3.11.3 Überlebensanalysen

Das Gesamtüberleben wurde als Zeitraum von der Diagnosestellung bis zum Tod definiert, während das rezidiv-freie Überleben die Zeit vom Erreichen einer CR bzw. einer CRi bis zum Rezidiv oder Tod umfasst (Döhner et al. 2017). Ein Rezidiv entspricht einem Wiederanstieg der Blasten im Knochenmark auf $\geq 5\%$, neuauftretenden Blasten im peripheren Blut oder einer extramedullären Manifestation der AML (Döhner et al. 2017). Patienten, bei denen kein Todesfall oder kein Rezidiv verzeichnet wurde, wurden zum letzten Follow-Up-Datum

zensiert. Das Überleben wurde mit der Kaplan-Meier-Methode sowie mit Cox-Regressionsmodellen analysiert. Hierbei wurden mediane Überlebenszeiten und *Hazard Ratios* (HR) mit dem 95%-CI angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen Subgruppen wurden nach dem Log-Rank-Test überprüft. Alle Variablen mit $p < 0,1$ in der univariaten Analyse wurden in einer multivariaten Cox-Regressions-Überlebensanalyse berücksichtigt. Zudem wurde die prognostische Risikostratifizierung nach ELN-2017 mit der Ergänzung einer PS29MRCdic-Hochrisikogruppe angepasst.

4 Ergebnisse

4.1 Hinweis zu den Ergebnissen

Ein Großteil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde folgender Publikation entnommen:

Moser, Christian; Jurinovic, Vindi; Sagebiel-Kohler, Sabine; Ksienzyk, Bianka; Batcha, Aarif M. N.; Dufour, Annika; Schneider, Stephanie; Rothenberg-Thurley, Maja; Sauerland, Cristina M.; Görlich, Dennis; Berdel, Wolfgang E.; Krug, Utz; Mansmann, Ulrich; Hiddemann, Wolfgang; Braess, Jan; Spiekermann, Karsten; Greif, Philipp A.; Vosberg, Sebastian; Metzeler, Klaus H.; Kumbrink, Jörg; Herold, Tobias (2021):

A clinically applicable gene expression-based score predicts resistance to induction treatment in acute myeloid leukemia.

In: *Blood Advances* 5 (22), S. 4752–4761.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse der Studie in einem umfangreicheren Kontext dargestellt und um mehrere zusätzliche Analysen ergänzt. Im Sinne der Lesbarkeit wurde auf eine gesonderte Markierung dieser Ergebnisse verzichtet.

4.2 Deskriptive Analyse des Patientenkollektivs

Der PS29MRC sowie eine Evaluation des Therapieansprechens waren für 351 Patienten verfügbar. Dabei erreichten 71 % (n = 249) der Patienten eine CR (n = 197) bzw. eine CRi (n = 52), wohingegen sich bei 29 % (n = 102) der Patienten ein Therapieversagen zeigte (primär refraktäre AML: n = 68; Teilremission: n = 11; Tod in Aplasie: n = 10; Tod unbekannter Ursache: n = 13). Alle Patienten erhielten bis zu zwei Zyklen einer intensiven Induktionschemotherapie nach dem ‚7+3‘-Schema (n = 108; 31 %), nach dem S-HAM-Schema (n = 211; 60 %) oder nach anderen intensiven Regimen wie TAD(-HAM) oder HAM(-HAM) (n = 32; 9 %).

Die Altersverteilung zwischen jüngeren (< 60 Jahre; n = 184; 52 %) und älteren Patienten (≥ 60 Jahre; n = 167; 48 %) war ausgeglichen. Das mediane Alter betrug 58 Jahre (Spannweite: 18–87 Jahre). Ein Therapieversagen lag bei jüngeren Patienten (n = 35; 19 %) deutlich seltener als bei älteren Patienten (n = 67; 40 %) vor. Zwischen Frauen (n = 179; 51 %) und Männern (n = 172; 49 %) bestand keine wesentliche Diskrepanz bezüglich der Häufigkeit für ein Versagen der Induktionschemotherapie (Frauen mit Therapieversagen n = 50; 28 %; Männer mit Therapieversagen n = 52; 30 %).

Der Großteil der AML-Diagnosen wurde *de novo* gestellt (n = 292; 83 %), während 17 % (n = 59) der Patienten an einer sekundären AML litten. Dabei wurde ein Versagen der Induktionschemotherapie bei *de-novo*-Diagnosen (n = 79; 27 %) seltener als bei Patienten mit sekundärer AML (n = 23; 39 %) beobachtet. Eine *NPM1*-Mutation lag bei 37 % (n = 129) der Patienten vor, von denen es bei 21 % (n = 27) zu einem Therapieversagen kam. Molekulargenetische Analysen ergaben einen *NPM1*-Wildtyp bei 63 % (n = 222) der Patienten; 34 % (n = 75) von ihnen konnten keine CR bzw. keine CRi erreichen. Bei 227 *RUNX1*-Mutationsanalysen wurden 15 % (n = 34) Positivbefunde festgestellt. 50 % (n = 17) dieser Patienten zeigten ein Therapieversagen. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Patienten mit *ASXL1*- sowie *TP53*-Mutationen beobachtet (Tabelle 12).

Das mediane Follow-Up betrug 3,3 Jahre, wobei der Stichtag des letzten Follow-Ups der 22. 5.2020 war. Die Patientencharakteristika samt Refraktäritätsraten sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Charakteristika des Gesamtkollektivs samt Anteil refraktärer Patienten.

Patientencharakteristika	Ergebnisse	Refraktär	Absolut
		n (%)	n (%)
Alter, Jahre			351 (100)
Median	58	–	
Wertebereich	18–87	–	
Altersgruppen, n (%)			351 (100)
unter 60 Jahren	184 (52)	35 (19)	
ab 60 Jahren	167 (48)	67 (40)	
Geschlecht, n (%)			351 (100)
weiblich	179 (51)	50 (28)	
männlich	172 (49)	52 (30)	
Ursprung der AML, n (%)			351 (100)
<i>de novo</i>	292 (83)	79 (27)	
sekundär	59 (17)	23 (39)	
ECOG-Status, n (%)			342 (97)
0	126 (37)	30 (24)	
1	154 (45)	48 (31)	
2	56 (16)	14 (25)	
3	4 (1)	2 (50)	
4	2 (1)	2 (100)	
Leukozytenzahl, G/L			350 (100)
Median	13,7	–	
Wertebereich	0,3–364	–	
Hämoglobinwert, g/dl			350 (100)
Median	8,9	–	
Wertebereich	4,2–17,7	–	
Thrombozytenzahl, G/L			349 (99)
Median	58	–	
Wertebereich	2–703	–	
LDH, U/L			344 (98)
Median	431	–	
Wertebereich	59–21356	–	

Patientencharakteristika	Ergebnisse	Refraktär	Absolut
		n (%)	n (%)
Blasten im Knochenmark, %			301 (86)
Median	77,5	–	
Wertebereich	9–97	–	
Blasten im peripheren Blut, %			50 (14)
Median	24,5	–	
Wertebereich	1–96	–	
Mutationen, n (%)			
<i>NPM1</i>	129 (37)	27 (21)	351 (100)
<i>FLT3</i> -ITD	84 (24)	24 (29)	351 (100)
<i>FLT3</i> -TKD	35 (10)	7 (20)	338 (96)
<i>MLL</i> -PTD	18 (5)	4 (22)	341 (97)
<i>CEBPA</i>	24 (8)	3 (13)	306 (87)
<i>RUNX1</i>	34 (15)	17 (50)	227 (65)
<i>ASXL1</i>	28 (12)	13 (46)	227 (65)
<i>TP53</i>	14 (6)	6 (43)	227 (65)
<i>IDH1</i>	11 (5)	4 (36)	216 (62)
<i>IDH2</i>	38 (18)	12 (32)	216 (62)
MRC-Klassifikation, n (%)			351 (100)
günstig	33 (9)	3 (9)	
intermediär	250 (71)	69 (28)	
ungünstig	68 (19)	30 (44)	
ELN-2017-Klassifikation, n (%)			301 (86)
günstig	129 (43)	17 (13)	
intermediär	68 (23)	21 (31)	
ungünstig	104 (35)	48 (46)	
Behandlungsort, n (%)			351 (100)
Klinikum Großhadern	191 (54)	54 (28)	
Extern	160 (46)	48 (30)	
Behandlungszeitraum, n (%)			351 (100)
2009–2014	124 (35)	37 (30)	
2015–2019	227 (65)	65 (29)	

Patientencharakteristika	Ergebnisse	Refraktär	Absolut
		n (%)	n (%)
Therapieprotokoll, n (%)			351 (100)
,7+3'-Schema	108 (31)	44 (41)	
S-HAM	211 (60)	46 (22)	
TAD(-HAM) oder HAM(-HAM)	32 (9)	12 (38)	
Therapieansprechen, n (%)			351 (100)
CR	197 (56)	0 (0)	
CRi	52 (15)	0 (0)	
Primär refraktäre AML	68 (19)	68 (100)	
Teilremission	11 (3)	11 (100)	
Tod in Aplasie	10 (3)	10 (100)	
Tod unbekannter Ursache	13 (4)	13 (100)	
Allogene SCT, n (%)	187 (53)	47 (25)	351 (100)
Rezidiv, n (%)	129 (52)	102 (79)	249 (71)

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; ELN-2017: *European LeukemiaNet 2017*; LDH: Laktatdehydrogenase; MRC: *Medical Research Council*; SCT: Stammzelltransplantation.

4.3 PS29MRC als kontinuierliche Variable

4.3.1 Prädiktion des PS29MRCcont im Gesamtkollektiv

Das kontinuierliche Modell des PS29MRC erwies sich in der logistischen Regressionsanalyse der 351 Patienten mit einer OR von 2,37 (95%-CI [1,82–3,18]) und einem p-Wert von $1,20 \cdot 10^{-9}$ als signifikante Variable zur Vorhersage des Versagens einer Induktionschemotherapie (AUC = 0,75). Die in dieser Arbeit verwendete Definition für ein Therapieversagen orientierte sich maßgeblich an den ELN-2017-Empfehlungen (Döhner et al. 2017).

Da in der Literatur bis dato keine universelle Beurteilung des Therapieansprechens bei AML existiert, wurden zur Bewertung des PS29MRCcont im Gesamtkollektiv zusätzliche Analysen mit unterschiedlichen Definitionen für Therapieversagen durchgeführt. Gemäß der Definition nach Herold et al. (2018) wurden frühverstorbene Patienten mit einer Überlebenszeit unter 16 Tagen nach

Therapiebeginn ausgeschlossen (n = 5). Auch hier konnte bei den analysierten Patienten (n = 346) mit einer OR von 2,46 (95%-CI [1,87–3,32]) und einem p-Wert von $6,33 \cdot 10^{-10}$ eine signifikante Vorhersage für ein Therapieversagen erzielt werden (AUC = 0,76).

Nach den vier Definitionen nach Walter et al. (2015) wurden frühverstorbene Patienten mit einer Überlebenszeit unter 28 Tagen nach Therapiebeginn ausgeschlossen (n = 16). In allen Untergruppen für Refraktärität war der PS29MRCcont signifikant in der Vorhersage des Therapieversagens (Tabelle 13). Mit Zunahme des rezidiv-freien Überlebens nahm die OR von 2,36 auf 1,67 kontinuierlich ab.

In mehreren Analysen mit je unterschiedlichen Definitionen für Refraktärität wurde der PS29MRCcont als signifikante Variable bestätigt. In Tabelle 13 werden die Ergebnisse der Analysen des PS29MRCcont in Abhängigkeit von der Definition für ein Therapieversagen dargestellt.

Tabelle 13: Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem PS29MRCcont bei variierender Definition der Zielvariablen ‚Therapieversagen‘.

Definition für Refraktärität		OR	95%-CI	p	AUC	Refraktär n (%)
ELN-2017, n = 351		2,37	1,82– 3,18	$1,20 \cdot 10^{-9}$	0,75	102 (29)
Herold et al. (2018), n = 346		2,46	1,87– 3,32	$6,33 \cdot 10^{-10}$	0,76	97 (28)
Walter et al. (2015), n = 335	Refraktär	2,36	1,78– 3,22	$1,39 \cdot 10^{-8}$	0,76	86 (25)
	Refraktär; RFS ≤ 3 Monate	2,27	1,72– 3,06	$1,97 \cdot 10^{-8}$	0,74	99 (30)
	Refraktär; RFS ≤ 6 Monate	2,05	1,59– 2,72	$1,49 \cdot 10^{-7}$	0,71	115 (34)
	Refraktär; RFS ≤ 12 Monate	1,67	1,33– 2,13	$2,60 \cdot 10^{-5}$	0,66	142 (42)

AUC: Area Under the Curve; CI: Konfidenzintervall; ELN-2017: *European LeukemiaNet 2017*; OR: Odds Ratio; RFS: rezidiv-freies Überleben.

4.3.2 Prädiktion des PS29MRCcont in verschiedenen Subgruppen

Die Risikostratifizierung nach MRC war ein integraler Bestandteil bei der Entwicklung des PS29MRC (Herold et al. 2018; Grimwade et al. 2010). Um das unabhängige prädiktive Potential des Genexpressionsteils des PS29MRCcont zu überprüfen, wurden Analysen in MRC-Subgruppen durchgeführt. Eine Einteilung nach MRC war für 351 Patienten verfügbar (günstig: $n = 33$; intermediär: $n = 250$; ungünstig: $n = 68$). Mit dem PS29MRCcont konnte in der intermediären und ungünstigen MRC-Subgruppe signifikant ein Therapieversagen vorhergesagt werden (intermediär: $p = 5,66 \cdot 10^{-6}$; ungünstig: $p = 0,021$). In der günstigen Subgruppe konnte dies aufgrund der geringen Anzahl an Patienten mit Therapieversagen ($n = 3$) nicht beobachtet werden ($p = 0,22$).

Die Einteilung der Risikogruppen gemäß den ELN-2017-Empfehlungen ermöglichte die Berücksichtigung zytogenetischer sowie molekulargenetischer Analysen in einem prognostischen Modell (Döhner et al. 2017). Eine Einteilung nach ELN-2017 war für 301 Patienten verfügbar. Im Vergleich zur MRC-Klassifikation waren die Patienten nach ELN-2017 gleichmäßiger verteilt (günstig: $n = 129$; intermediär: $n = 68$; ungünstig: $n = 104$). In der günstigen sowie ungünstigen ELN-2017-Subgruppe konnte das prädiktive Modell Patienten mit Therapieversagen signifikant identifizieren (günstig: $p = 6,59 \cdot 10^{-3}$; ungünstig: $p = 9,92 \cdot 10^{-3}$). Geringfügig über dem Signifikanzniveau lag der PS29MRCcont in der intermediären Subgruppe ($p = 0,064$).

Mutationen der Gene *RUNX1*, *ASXL1* oder *TP53* wurden in die Kriterien der ungünstigen ELN-2017-Subgruppe aufgenommen (Döhner et al. 2017). Sie waren mit einer hohen Rate refraktärer Verläufe assoziiert: 50 % (*RUNX1*), 46 % (*ASXL1*), 43 % (*TP53*). Der PS29MRCcont war bei Patienten mit *RUNX1*-, *ASXL1*- oder *TP53*-Mutation nicht signifikant in der Vorhersage eines Therapieversagens (*RUNX1*: $p = 0,31$; *ASXL1*: $p = 0,061$; *TP53*: $p = 0,14$).

Dies gilt nicht für Patienten mit *de-novo*- oder sekundärer AML (*de-novo*-AML: $p = 6,16 \cdot 10^{-8}$; sekundäre AML: $p = 0,017$). Die Vorhersage des Therapieversagens war mit einer OR von 2,41 in der *de-novo*-Subgruppe der OR von 2,08 in der Subgruppe der sekundären AML überlegen. Auch in beiden Altersgruppen war der PS29MRCcont signifikant in der Vorhersage refraktärer Verläufe (< 60 Jahre: $p = 2,17 \cdot 10^{-4}$; ≥ 60 Jahre: $p = 3,54 \cdot 10^{-5}$).

Alle analysierten Patienten erhielten mindestens einen Zyklus einer intensiven Induktionstherapie nach verschiedenen Therapieprotokollen. Signifikant war der PS29MRCcont in der Vorhersage eines Therapieversagens in der ‚7+3‘- sowie S-HAM-Subgruppe (‚7+3‘: $p = 7,99 \cdot 10^{-5}$; S-HAM: $p = 6,98 \cdot 10^{-5}$). In der Subgruppe der Patienten, die nach dem TAD(-HAM)- oder HAM(-HAM)-Schema behandelt wurden, zeigte sich mit dem PS29MRCcont lediglich eine Tendenz in der Vorhersage des Therapieversagens ($p = 0,059$). Insgesamt erhielten 14% ($n = 15$) der nach dem ‚7+3‘-Schema behandelten Patienten den seit 2017 zugelassenen FLT3-Inhibitor Midostaurin. In dieser kleinen Subgruppe war der PS29MRCcont mit einem p-Wert von 0,091 nicht signifikant.

Damit wurde der PS29MRCcont in verschiedenen Subgruppen als signifikanter Prädiktor bestätigt. In Tabelle 14 ist eine Übersicht zur Subgruppenanalyse des prädiktiven Potentials des PS29MRCcont gegeben.

Tabelle 14: Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem PS29MRCcont in ausgewählten Subgruppen.

Subgruppe	B	SE	OR	95%-CI	p
(A) Krankheitsbezogene Subgruppen					
MRC günstig	2,90	2,35	18,13	0,93–12366,72	0,22
MRC intermediär	1,01	0,22	2,75	1,82–4,36	$5,66 \cdot 10^{-6}$
MRC ungünstig	0,63	0,27	1,87	1,15–3,38	0,021
ELN-2017 günstig	1,24	0,46	3,45	1,50–9,12	$6,59 \cdot 10^{-3}$
ELN-2017 intermediär	0,62	0,33	1,85	1,06–4,01	0,064
ELN-2017 ungünstig	0,55	0,21	1,73	1,18–2,71	$9,92 \cdot 10^{-3}$
<i>NPM1</i> -Mutation	1,17	0,39	3,22	1,61–7,42	$2,70 \cdot 10^{-3}$
<i>FLT3</i> -ITD	0,54	0,30	1,71	0,99–3,27	0,072
<i>RUNX1</i> -Mutation	0,36	0,35	1,43	0,76–3,22	0,31
<i>ASXL1</i> -Mutation	0,68	0,36	1,96	1,10–4,70	0,061
<i>TP53</i> -Mutation	1,57	1,06	4,80	0,87–80,31	0,14
AML <i>de novo</i>	0,88	0,16	2,41	1,79–3,38	$6,16 \cdot 10^{-8}$
AML sekundär	0,73	0,31	2,08	1,19–4,01	0,017

Subgruppe	B	SE	OR	95%-CI	p
(B) Patientenbezogene Subgruppen					
Alter < 60 Jahre	0,96	0,26	2,60	1,62–4,50	2,17·10⁻⁴
Alter ≥ 60 Jahre	0,70	0,17	2,01	1,47–2,86	3,54·10⁻⁵
Geschlecht weiblich	0,95	0,21	2,58	1,74–4,04	9,46·10⁻⁶
Geschlecht männlich	0,80	0,19	2,22	1,57–3,31	2,43·10⁻⁵
ECOG-Status < 2	0,78	0,16	2,18	1,61–3,01	9,81·10⁻⁷
ECOG-Status ≥ 2	1,09	0,37	2,96	1,59–6,85	3,10·10⁻³
(C) Therapiebezogene Subgruppen					
,7+3'-Schema	1,01	0,26	2,75	1,73–4,75	7,99·10⁻⁵
S-HAM	0,76	0,19	2,14	1,50–3,18	6,98·10⁻⁵
TAD/HAM(-HAM)	0,89	0,47	2,44	1,11–7,24	0,059
,7+3' mit Midostaurin	3,68	2,17	39,53	1,90–18189,14	0,091

B: Regressionskoeffizient; CI: Konfidenzintervall; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; ELN-2017: *European LeukemiaNet 2017*; MRC: *Medical Research Council*; OR: *Odds Ratio*; SE: Standardfehler.

4.3.3 Vergleich des PS29MRCcont mit weiteren prädiktiven Scores

Das prädiktive Modell nach Walter et al. (2015) setzt sich zusammen aus der Summe gewichteter klinischer, laborchemischer, zytogenetischer und molekular-genetischer Variablen. Von den 384 intensiv behandelten Patienten konnte für 349 Patienten der Walter-Score berechnet werden. Für 342 Patienten war eine Beurteilung des Ansprechens auf die Induktionschemotherapie gegeben. In logistischen Regressionsanalysen erwies sich das Modell als nicht signifikant in der Vorhersage des Therapieversagens ($p = 0,66$) (Tabelle 15). Auch seine AUC von 0,53 war im Vergleich zu der des PS29MRCcont mit 0,75 deutlich erniedrigt (Abbildung 4).

Tabelle 15: Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit verschiedenen prädiktiven Modellen.

Prädiktives Modell	OR	95%-CI	p	AUC	n
PS29MRCcont	2,37	1,82–3,18	1,20·10⁻⁹	0,75	351
Walter-Score	1,00	0,98–1,01	0,66	0,53	342
<i>Retrained-Response-LSC17</i>	1,001	1,000–1,002	0,046	0,56	360

AUC: Area Under the Curve; CI: Konfidenzintervall; OR: Odds Ratio.

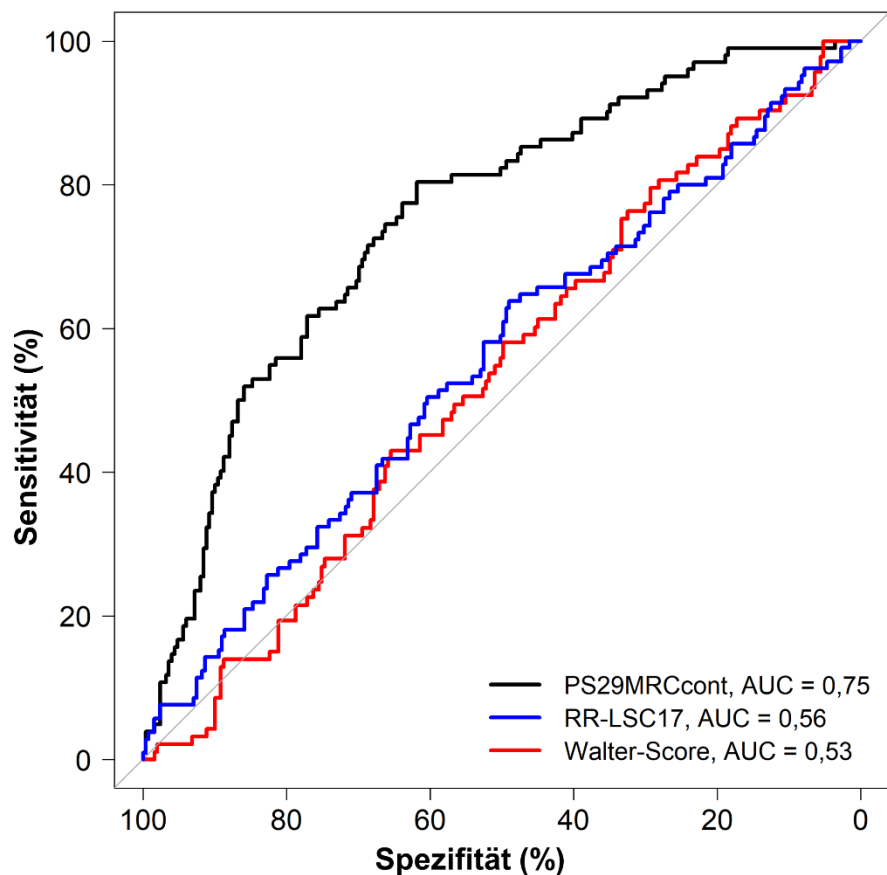


Abbildung 4: ROC-Kurven des PS29MRCcont, des Walter-Scores und des *Retrained-Response-LSC17*.

AUC: Area Under the Curve; RR-LSC17: *Retrained-Response-LSC17*.

Bei der Analyse der einzelnen Variablen des Walter-Scores waren das Alter (OR = 1,04; 95%-CI [1,02–1,06]; $p = 1,37 \cdot 10^{-4}$), eine günstige (OR = 0,23; 95%-CI [0,05–0,66]; $p = 0,016$) sowie eine ungünstige Zytogenetik nach MRC (OR = 2,33; 95%-CI [1,35–4,01]; $p = 2,22 \cdot 10^{-3}$) und *NPM1*-Mutationen ohne *FLT3*-ITD (OR = 0,45; 95%-CI [0,23–0,83]; $p = 0,015$) signifikant in der

Vorhersage des Therapieversagens. Die Diagnose der sekundären AML lag als Variable geringfügig über dem Signifikanzniveau ($p = 0,063$). Tabelle 16 enthält eine Übersicht zu den Analysen des Walter-Scores sowie der Einzelvariablen des Walter-Scores in Bezug auf die Vorhersage des Therapieversagens.

Tabelle 16: Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem Score nach Walter et al. (2015) sowie mit den Einzelvariablen dieses Scores.

Parameter	OR	95%-CI	p	n
Walter-Score	1,00	0,98–1,01	0,66	342
Alter	1,04	1,02–1,06	$1,37 \cdot 10^{-4}$	375
MRC günstig	0,23	0,05–0,66	0,016	366
MRC ungünstig	2,33	1,35–4,01	$2,22 \cdot 10^{-3}$	366
<i>NPM1</i> -Mutation ohne <i>FLT3</i> -ITD	0,45	0,23–0,83	0,015	372
<i>NPM1</i> -Mutation mit <i>FLT3</i> -ITD	0,73	0,37–1,35	0,33	372
<i>NPM1</i> -Wildtyp mit <i>FLT3</i> -ITD	1,56	0,67–3,48	0,29	372
AML sekundär	1,70	0,96–2,94	0,063	375
ECOG-Status > 1	1,06	0,57–1,91	0,84	365
Geschlecht männlich	1,12	0,72–1,77	0,61	375
Leukozytenzahl	1,00	1,00–1,00	0,67	374
Thrombozytenzahl	1,00	1,00–1,00	0,64	373
Blastenanteil im Knochenmark	1,01	1,00–1,02	0,12	364

CI: Konfidenzintervall; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; MRC: *Medical Research Council*; OR: *Odds Ratio*.

Ein weiteres prädiktives Modell ist der RR-LSC17, der sich aus der Summe sechs gewichteter Genexpressionswerte zusammensetzt (Ng et al. 2016). Der Score war verfügbar für 360 Patienten. Der RR-LSC17 war mit einer OR von 1,001 (95%-CI [1,000–1,002]) und einem p-Wert von 0,046 schwach signifikant in der Vorhersage refraktärer Verläufe. Mit einer AUC von 0,56 war der RR-LSC17 dem PS29MRCcont unterlegen (Abbildung 4). Tabelle 15 fasst die Ergebnisse der Analysen des PS29MRCcont sowie bisheriger prädiktiver Modelle für Therapieversagen zusammen. In Abbildung 4 werden die jeweiligen ROC-Kurven dargestellt.

4.4 PS29MRC als dichotome Variable

4.4.1 Prädiktion des PS29MRCdic in Abhängigkeit vom Cut-Off-Wert

Das dichotome Modell des PS29MRC ermöglichte eine Unterscheidung der Patienten mit einem niedrigen bzw. hohen Risiko für einen refraktären Therapieverlauf (Herold et al. 2018). Eine zentrale Rolle stellte dabei die Selektion eines geeigneten Cut-Off-Wertes dar, denn dieser sollte die Anzahl der falsch gewerteten Niedrigrisiko- und Hochrisikopatienten möglichst geringhalten. Bei Anwendung des in dieser Arbeit verwendeten Cut-Off-Wertes von 0,4 wurden 67% (n = 234) der Patienten als Niedrigrisikopatienten bzw. 33 % (n = 117) der Patienten als Hochrisikopatienten eingestuft. In der PS29MRCdic-Niedrigrisikogruppe waren 18 % (n = 42) der Patienten refraktär, während in der PS29MRCdic-Hochrisikogruppe bei 51 % (n = 60) der Patienten ein Therapieversagen beobachtet wurde. Mit einer OR von 4,81 (95%-CI [2,95–7,93]) und einem p-Wert von $4,15 \cdot 10^{-10}$ konnten über den PS29MRCdic Patienten mit einem Versagen der Induktionschemotherapie signifikant identifiziert werden. Mit einer Sensitivität von 59 % und einer Spezifität von 77 % konnte eine Genauigkeit von 72 % erzielt werden. Jedoch wurden 28 % (n = 99) der Patientenkohorte einer falschen Risikokategorie zugeordnet. Eine Übersicht zur Risikoeinteilung nach dem PS29MRCdic sowie zu den Ergebnissen der diagnostischen Gütekriterien ist in Tabelle 17A und 18 zusammengestellt.

Die Wahl des Cut-Off-Wertes war maßgeblich von der Überführung der Genexpressionsanalysen auf die NanoString-Plattform abhängig. Bei Änderung des Cut-Off-Wertes von 0,4 auf beispielsweise 0,7 konnte über den PS29MRCdic mit einer OR von 6,55 (95%-CI [3,86–11,26]) und einem p-Wert von $5,22 \cdot 10^{-12}$ signifikant Patienten mit Therapieversagen identifiziert werden. Mit einer Sensitivität von 50 % und einer Spezifität von 87 % erreichte der alternative PS29MRCdic eine Genauigkeit von 76 %. Insgesamt wurden 24 % (n = 84) der Patienten falsch kategorisiert. Tabelle 17B zeigt dazu eine Kreuztabelle. Abbildung 5 stellt die Verteilung der über den PS29MRCdic korrekt und inkorrekt klassifizierten Patienten in Abhängigkeit vom Cut-Off-Wert dar. Ein Vergleich der diagnostischen Gütekriterien ist Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 17: Ergebnisse der Kreuztabelle des PS29MRCdic für Therapieversagen mit dem Cut-Off-Wert bei 0,4 und 0,7.

	Refraktär	CR/CRi	Absolut
	n (%)	n (%)	n (%)
(A) PS29MRCdic Cut-Off = 0,4			
Hochrisiko	60 (17)	57 (16)	117 (33)
Niedrigrisiko	42 (12)	192 (55)	234 (67)
Absolut	102 (29)	249 (71)	351 (100)
(B) PS29MRCdic Cut-Off = 0,7			
Hochrisiko	51 (15)	33 (9)	84 (24)
Niedrigrisiko	51 (15)	216 (62)	267 (76)
Absolut	102 (29)	249 (71)	351 (100)

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration.

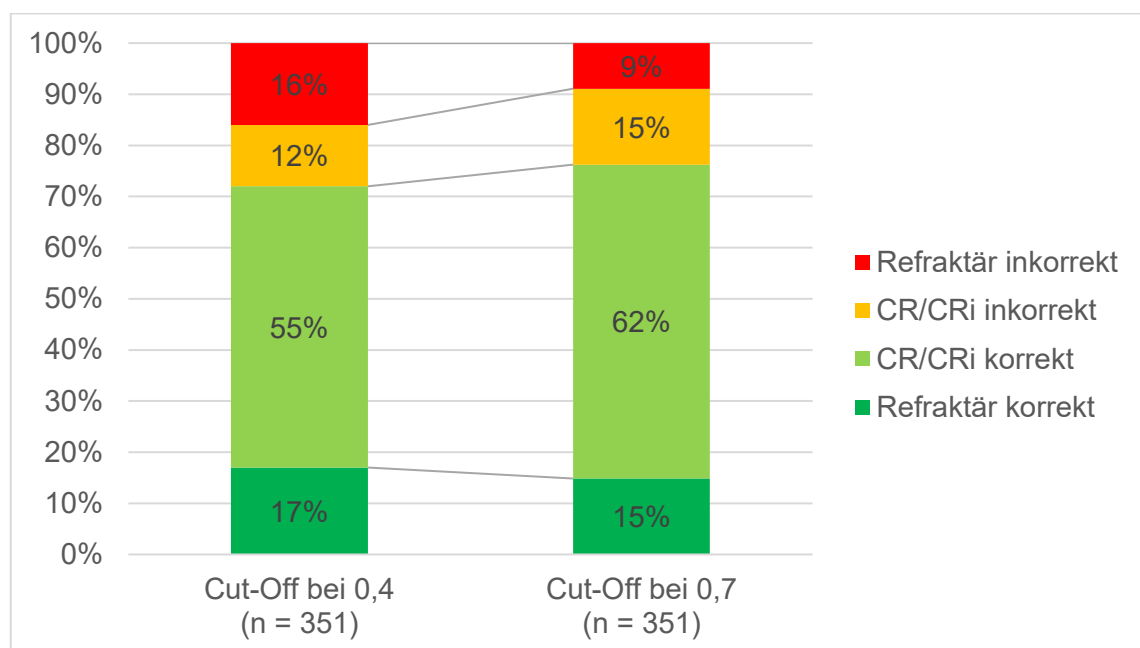


Abbildung 5: Säulendiagramm zur Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic in der Gesamtkohorte in Abhängigkeit vom Cut-Off-Wert.

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration.

Tabelle 18: Vergleich der diagnostischen Gütekriterien des PS29MRCdic in Abhängigkeit vom Cut-Off-Wert.

Cut-Off-Wert	SEN	SPE	PLR	NLR	PPV	NPV	ACC
	in %	in %			in %	in %	in %
Cut-Off = 0,4	59	77	2,6	0,5	51	82	72
Cut-Off = 0,7	50	87	3,8	0,6	61	81	76

ACC: Genauigkeit; NLR: *Negative Likelihood Ratio*; NPV: Negativer prädiktiver Wert; PLR: *Positive Likelihood Ratio*; PPV: Positiver prädiktiver Wert; SEN: Sensitivität; SPE: Spezifität.

4.4.2 Prädiktion des PS29MRCdic in verschiedenen Subgruppen

Die MRC-Risikostratifizierung war für 351 Patienten verfügbar. Über den PS29MRCdic konnten in der intermediären sowie in der ungünstigen MRC-Subgruppe signifikant Patienten mit einem Therapieversagen detektiert werden (intermediär: $p = 2,83 \cdot 10^{-6}$; ungünstig: $p = 0,027$). In der günstigen MRC-Subgruppe zeigte der PS29MRCdic eine Spezifität von 100 % sowie eine Genauigkeit von 91 %. Patienten mit Therapieversagen ($n = 3$) wurden hier nach dem PS29MRCdic nicht korrekt eingestuft. In der intermediären MRC-Subgruppe erreichte der PS29MRCdic eine Sensitivität von 48 %, eine Spezifität von 82 % sowie eine Genauigkeit von 73 %. In der ungünstigen MRC-Subgruppe wurde mit einer Sensitivität von 90 % ein Großteil der refraktären Patienten identifiziert. Aufgrund der niedrigen Spezifität von 34 % erzielte der PS29MRCdic in der ungünstigen MRC-Subgruppe jedoch nur eine Genauigkeit von 59 %. Eine Übersicht der Subgruppenanalysen ist in Tabelle 19 und in Abbildung 6 gegeben.

Tabelle 19: Ergebnisse der Kreuztabelle des PS29MRCdic für Therapieversagen in MRC-Subgruppen.

	Refraktär	CR/CRI	Absolut
	n (%)	n (%)	n (%)
(A) MRC günstig			
Hochrisiko	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Niedrigrisiko	3 (9)	30 (91)	33 (100)
Absolut	3 (9)	30 (91)	33 (100)

	Refraktär	CR/CRi	Absolut
	n (%)	n (%)	n (%)
(B) MRC intermediär			
Hochrisiko	33 (13)	32 (13)	65 (26)
Niedrigrisiko	36 (14)	149 (60)	185 (74)
Absolut	69 (28)	181 (72)	250 (100)
(C) MRC ungünstig			
Hochrisiko	27 (40)	25 (37)	52 (76)
Niedrigrisiko	3 (4)	13 (19)	16 (24)
Absolut	30 (44)	38 (56)	68 (100)

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration; MRC: *Medical Research Council*.

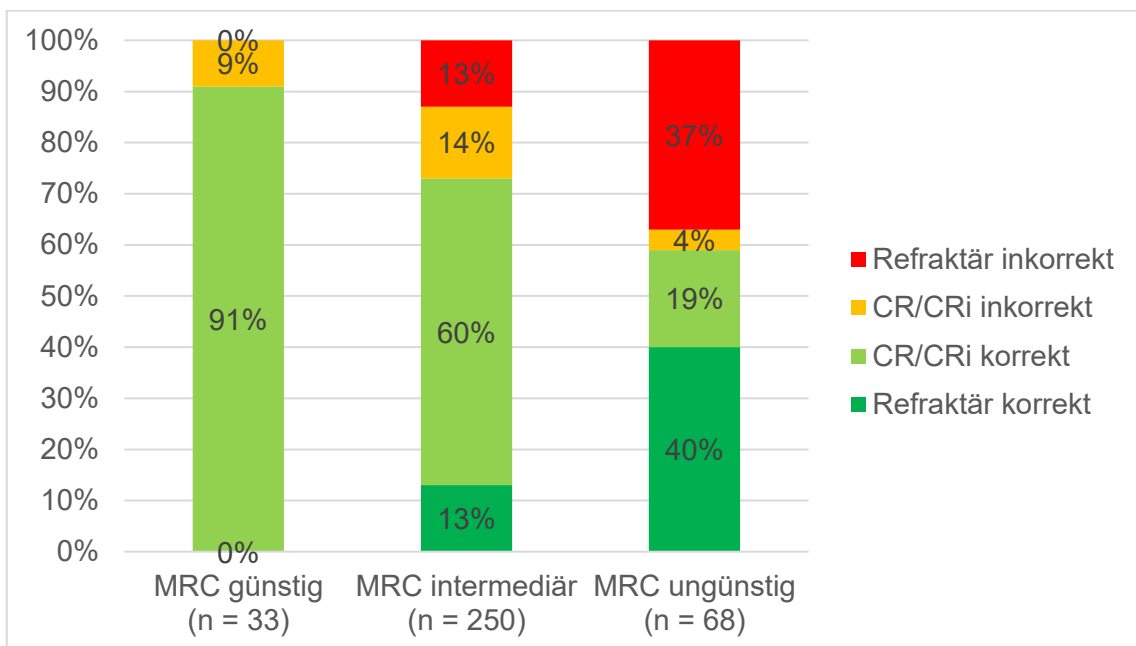


Abbildung 6: Säulendiagramm zur Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic in MRC-Subgruppen.

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration; MRC: *Medical Research Council*.

Die Einteilung der Risikogruppen nach ELN-2017 war verfügbar für 301 Patienten. Der PS29MRCdic konnte in der günstigen, der intermediären sowie der ungünstigen ELN-2017-Subgruppe signifikant Patienten mit einem Versagen der Induktionstherapie identifizieren (günstig: $p = 0,017$; intermediär: $p = 0,011$; ungünstig: $p = 0,034$). In der günstigen ELN-2017-Subgruppe erreichte der PS29MRCdic eine Sensitivität von 24 %, eine Spezifität von 95 % und eine Genauigkeit von 85 %. In der intermediären ELN-2017-Subgruppe erzielte der PS29MRCdic eine Sensitivität von 48 %, eine Spezifität von 83 % und eine Genauigkeit von 72 %. In der ungünstigen ELN-2017-Subgruppe wurde mit einer Sensitivität von 77 % ein Großteil der refraktären Patienten identifiziert. Die Spezifität betrug 43 % und die Genauigkeit belief sich auf 59 %. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 und Abbildung 7 dargestellt.

Tabelle 20: Ergebnisse der Kreuztabelle des PS29MRCdic für Therapieversagen in ELN-2017-Subgruppen.

	Refraktär	CR/CRi	Absolut
	n (%)	n (%)	n (%)
(A) ELN-2017 günstig			
Hochrisiko	4 (3)	6 (5)	10 (8)
Niedrigrisiko	13 (10)	106 (82)	119 (92)
Absolut	17 (13)	112 (87)	129 (100)
(B) ELN-2017 intermediär			
Hochrisiko	10 (15)	8 (12)	18 (26)
Niedrigrisiko	11 (16)	39 (57)	50 (74)
Absolut	21 (31)	47 (69)	68 (100)
(C) ELN-2017 ungünstig			
Hochrisiko	37 (36)	32 (31)	69 (66)
Niedrigrisiko	11 (11)	24 (23)	35 (34)
Absolut	48 (46)	56 (54)	104 (100)

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration; ELN-2017: *European LeukemiaNet 2017*.

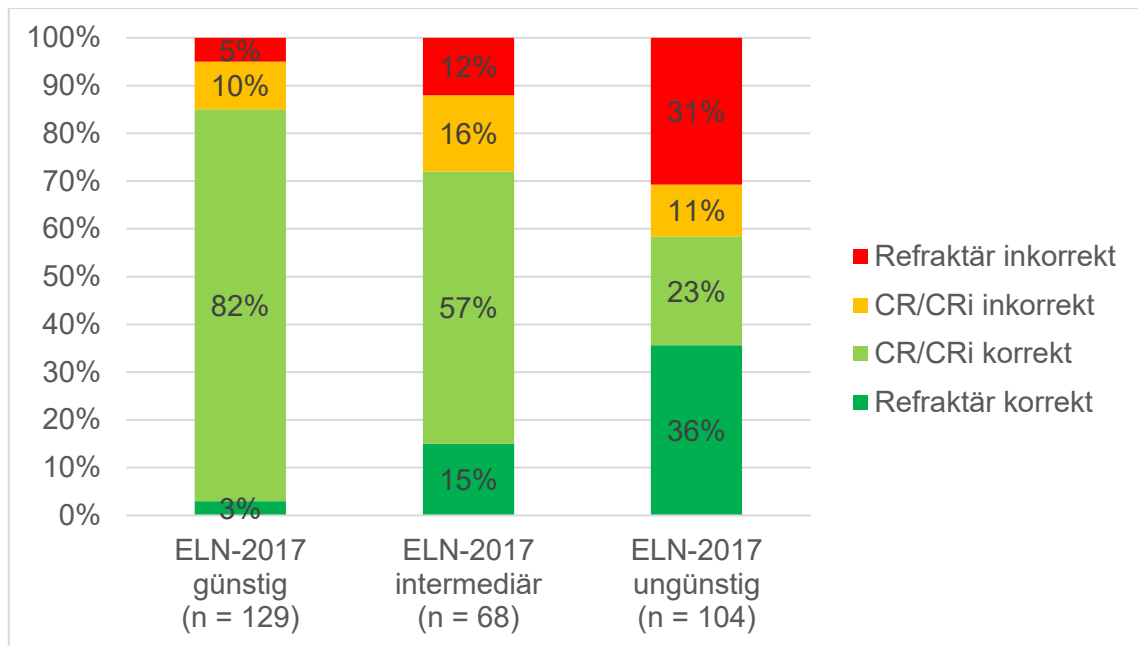


Abbildung 7: Säulendiagramm zur Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic in ELN-2017-Subgruppen.

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration; ELN-2017: *European LeukemiaNet 2017*.

Im Vergleich zur Subgruppe mit *de-novo*-AML wurde mit dem PS29MRCdic auch bei Patienten mit sekundärer AML ein Therapieversagen signifikant identifiziert (*de-novo*-AML: $p = 2,79 \cdot 10^{-7}$; sekundäre AML: $p = 1,37 \cdot 10^{-3}$). Bei Patienten mit *de-novo*-AML wurden eine Sensitivität von 53 %, eine Spezifität von 79 % sowie eine Genauigkeit von 72 % erreicht, während bei Patienten mit sekundärer AML eine Sensitivität von 78 %, eine Spezifität von 67 % sowie eine Genauigkeit 71 % erzielt wurden. In Tabelle 21 und Abbildung 8 wird eine Übersicht der durch den PS29MRCdic erfolgten Einteilung dargelegt.

Tabelle 21: Ergebnisse der Kreuztabelle des PS29MRCdic für Therapieversagen in *de-novo*- und sekundärer AML.

	Refraktär	CR/CRi	Absolut
	n (%)	n (%)	n (%)
(A) De-novo-AML			
Hochrisiko	42 (14)	45 (15)	87 (30)
Niedrigrisiko	37 (13)	168 (58)	205 (70)
Absolut	79 (27)	213 (73)	292 (100)
(B) Sekundäre AML			
Hochrisiko	18 (31)	12 (20)	30 (51)
Niedrigrisiko	5 (8)	24 (41)	29 (49)
Absolut	23 (39)	36 (61)	59 (100)

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration.

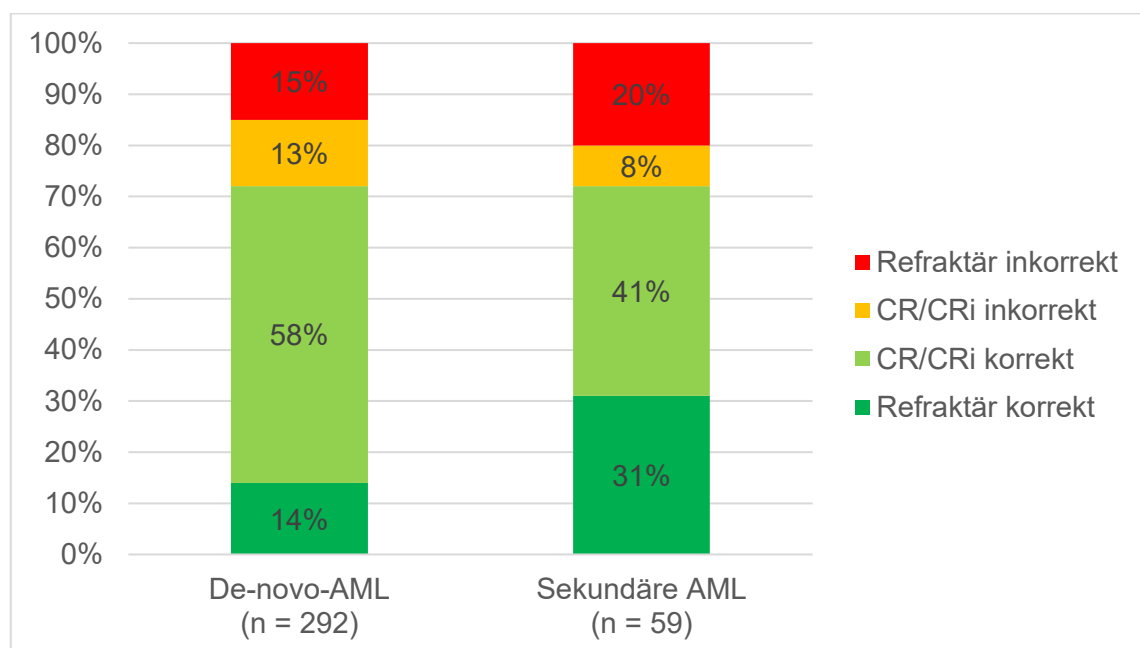


Abbildung 8: Säulendiagramm zur Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic in *de-novo*- und sekundärer AML.

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration.

Auch in beiden Altersgruppen konnten über den PS29MRCdic signifikant Patienten mit refraktärem Verlauf erkannt werden (< 60 Jahre: $p = 4,57 \cdot 10^{-3}$; ≥ 60 Jahre: $p = 1,25 \cdot 10^{-6}$). Im jüngeren Kollektiv wurde mit einer Sensitivität von 43 % und einer Spezifität von 81 % eine Genauigkeit von 73 % erreicht. Diese standen einer Sensitivität von 67 %, einer Spezifität von 72 % und einer Genauigkeit von 70 % im älteren Kollektiv gegenüber. Eine Übersicht der Analysen ist Tabelle 22 sowie Abbildung 9 zu entnehmen.

Tabelle 22: Ergebnisse der Kreuztabelle des PS29MRCdic für Therapieversagen in den Altersgruppen.

	Refraktär	CR/CRi	Absolut
	n (%)	n (%)	n (%)
(A) Jüngere Patienten (< 60 Jahre)			
Hochrisiko	15 (8)	29 (16)	44 (24)
Niedrigrisiko	20 (11)	120 (65)	140 (76)
Absolut	35 (19)	149 (81)	184 (100)
(B) Ältere Patienten (≥ 60 Jahre)			
Hochrisiko	45 (27)	28 (17)	73 (44)
Niedrigrisiko	22 (13)	72 (43)	94 (56)
Absolut	67 (40)	100 (60)	167 (100)

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration.

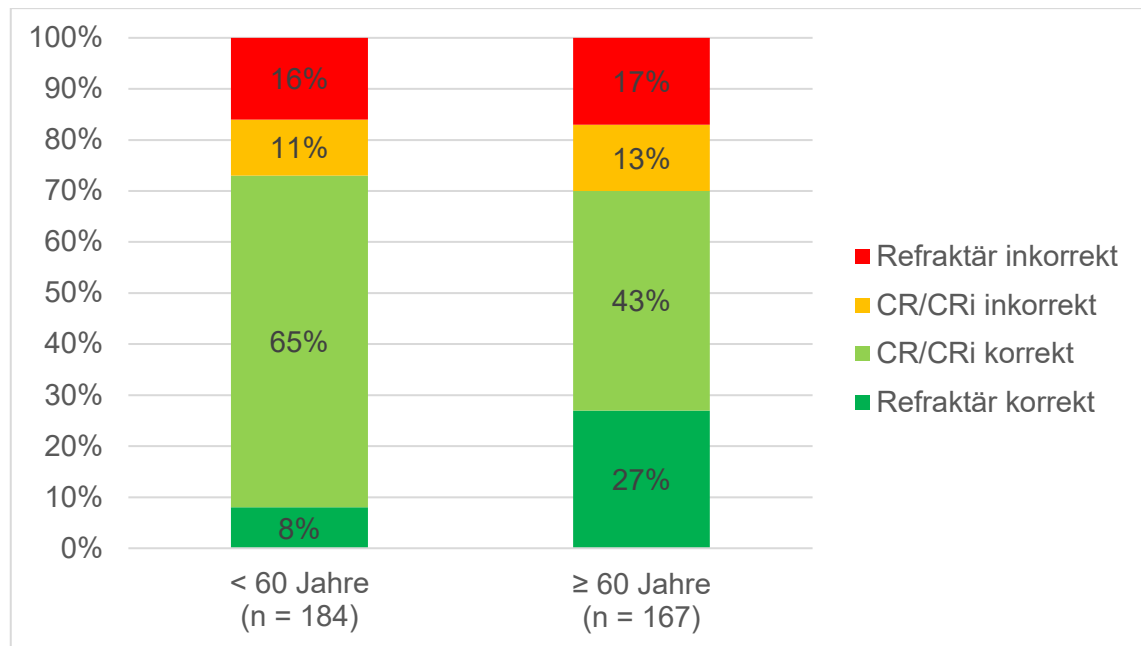


Abbildung 9: Säulendiagramm zur Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic in Altersgruppen.

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration.

In der ‚7+3‘- sowie der S-HAM-Subgruppe wurden durch den PS29MRCdic signifikant Patienten mit Therapieversagen identifiziert (‚7+3‘: $p = 1,49 \cdot 10^{-5}$; S-HAM: $p = 5,77 \cdot 10^{-5}$). In der TAD/HAM(-HAM)-Subgruppe zeigte sich eine signifikante Tendenz in der Vorhersage des Therapieversagens ($p = 0,066$). In der Midostaurin-Subgruppe ($n = 15$) war der PS29MRCdic nicht signifikant ($p = 0,60$). Die Verteilung der durch den PS29MRCdic klassifizierten Patienten ist in Tabelle 23 und Abbildung 10 abzulesen.

Tabelle 23: Ergebnisse der Kreuztabelle des PS29MRCdic für Therapieversagen in den Therapie-Subgruppen.

	Refraktär	CR/CRi	Absolut
	n (%)	n (%)	n (%)
(A),7+3‘-Schema			
Hochrisiko	27 (25)	12 (11)	39 (36)
Niedrigrisiko	17 (16)	52 (48)	69 (64)
Absolut	44 (41)	64 (59)	108 (100)

	Refraktär	CR/CRi	Absolut
	n (%)	n (%)	n (%)
(B) S-HAM			
Hochrisiko	26 (12)	40 (20)	66 (31)
Niedrigrisiko	20 (9)	125 (59)	145 (69)
Absolut	46 (22)	165 (78)	211 (100)
(C) TAD/HAM(-HAM)			
Hochrisiko	7 (22)	5 (16)	12 (38)
Niedrigrisiko	5 (16)	15 (47)	20 (63)
Absolut	12 (38)	20 (63)	32 (100)

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration.

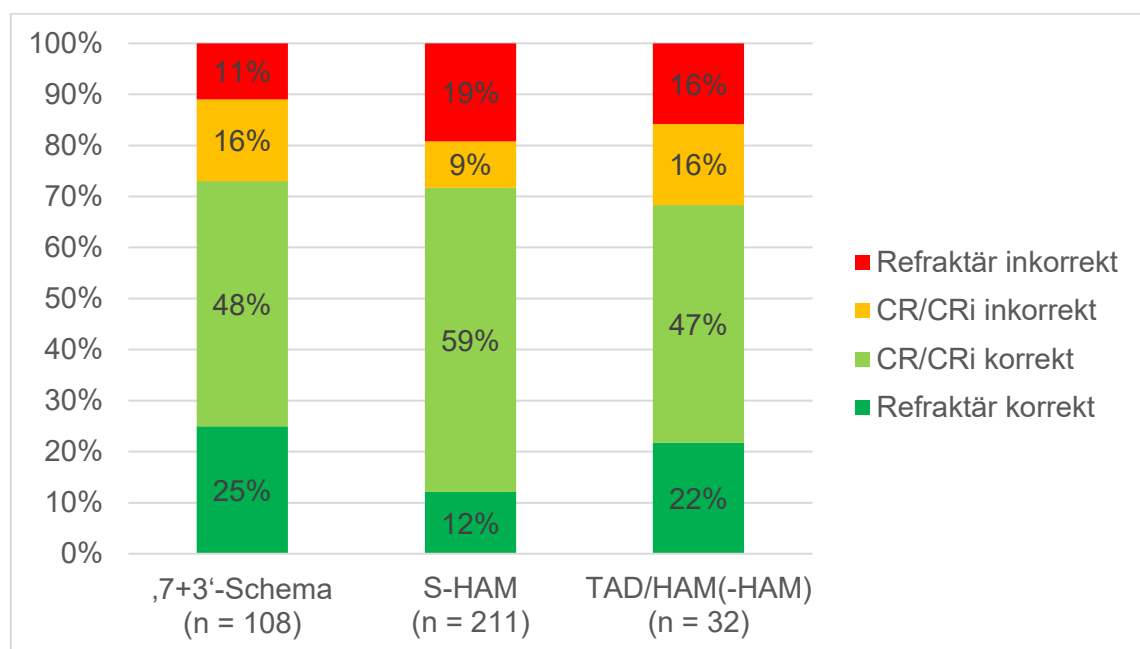


Abbildung 10: Säulendiagramm zur Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic in Therapie-Subgruppen.

CR: Komplette Remission; CRi: Komplette Remission mit inkompletter hämatologischer Regeneration.

In verschiedenen Subgruppen konnten durch den PS29MRCdic Patienten mit refraktärem Verlauf identifiziert werden. In Tabelle 24 ist eine Übersicht zu den Subgruppenanalysen des prädiktiven Potentials des PS29MRCdic abgebildet. Ein Vergleich der diagnostischen Gütekriterien in den verschiedenen Subgruppen ist Tabelle 25 zu entnehmen.

Tabelle 24: Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem PS29MRCdic in ausgewählten Subgruppen.

Subgruppe	B	SE	OR	95%-CI	p
(A) Krankheitsbezogene Subgruppen					
MRC günstig	–	–	–	–	–
MRC intermediär	1,45	0,31	4,27	2,33–7,89	2,83·10⁻⁶
MRC ungünstig	1,54	0,70	4,68	1,32–22,19	0,027
ELN-2017 günstig	1,69	0,71	5,44	1,26–21,72	0,017
ELN-2017 intermediär	1,49	0,58	4,43	1,43–14,44	0,011
ELN-2017 ungünstig	0,93	0,44	2,52	1,09–6,11	0,034
<i>NPM1</i> -Mutation	1,74	0,58	5,71	1,85–18,20	2,45·10⁻³
<i>FLT3</i> -ITD	0,69	0,54	2,00	0,68–5,76	0,20
<i>RUNX1</i> -Mutation	-0,25	0,71	0,78	0,19–3,13	0,72
<i>ASXL1</i> -Mutation	1,61	0,84	5,00	1,03–30,14	0,056
<i>TP53</i> -Mutation	18,75	3765,85	–	–	1,00
AML <i>de novo</i>	1,44	0,28	4,24	2,45–7,40	2,79·10⁻⁷
AML sekundär	1,97	0,62	7,20	2,28–26,36	1,37·10⁻³
(B) Patientenbezogene Subgruppen					
Alter < 60 Jahre	1,13	0,40	3,10	1,41–6,80	4,57·10⁻³
Alter ≥ 60 Jahre	1,66	0,34	5,26	2,72–10,46	1,25·10⁻⁶
Geschlecht weiblich	1,56	0,36	4,76	2,39–9,69	1,15·10⁻⁵
Geschlecht männlich	1,58	0,36	4,85	2,44–9,88	8,98·10⁻⁶
ECOG-Status < 2	1,35	0,28	3,85	2,22–6,72	1,72·10⁻⁶
ECOG-Status ≥ 2	2,18	0,64	8,84	2,67–33,59	6,29·10⁻⁴

Subgruppe	B	SE	OR	95%-CI	p
(C) Therapiebezogene Subgruppen					
,7+3'-Schema	1,93	0,45	6,88	2,94–17,02	1,49·10⁻⁵
S-HAM	1,40	0,35	4,06	2,06–8,13	5,77·10⁻⁵
TAD/HAM(-HAM)	1,44	0,78	4,20	0,94–21,00	0,066
,7+3' mit Midostaurin	0,81	1,54	2,25	0,08–67,65	0,60

B: Regressionskoeffizient; CI: Konfidenzintervall; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; ELN-2017: *European LeukemiaNet 2017*; MRC: *Medical Research Council*; OR: *Odds Ratio*; SE: Standardfehler.

Tabelle 25: Vergleich der diagnostischen Gütekriterien des PS29MRCdic in ausgewählten Subgruppen.

Subgruppe	SEN	SPE	PLR	NLR	PPV	NPV	ACC
	in %	in %			in %	in %	in %
(A) Krankheitsbezogene Subgruppen							
MRC günstig	0	100	–	1,0	–	91	91
MRC intermediär	48	82	2,7	0,6	51	81	73
MRC ungünstig	90	34	1,4	0,3	52	81	59
ELN-2017 günstig	24	95	4,4	0,8	40	89	85
ELN-2017 intermediär	48	83	2,8	0,6	56	78	72
ELN-2017 ungünstig	77	43	1,4	0,5	54	69	59
<i>NPM1</i> -Mutation	30	93	4,3	0,8	53	83	80
<i>FLT3</i> -ITD	33	80	1,7	0,8	40	75	67
<i>RUNX1</i> -Mutation	59	35	0,9	1,2	48	46	47
<i>ASXL1</i> -Mutation	77	60	1,9	0,4	63	75	68
<i>TP53</i> -Mutation	100	38	1,6	0	55	100	64
AML <i>de novo</i>	53	79	2,5	0,6	48	82	72
AML sekundär	78	67	2,4	0,3	60	83	71

Subgruppe	SEN	SPE	PLR	NLR	PPV	NPV	ACC
	in %	in %			in %	in %	in %
(B) Patientenbezogene Subgruppen							
Alter < 60 Jahre	43	81	2,2	0,7	34	86	73
Alter ≥ 60 Jahre	67	72	2,4	0,5	62	77	70
Geschlecht weiblich	58	78	2,6	0,5	50	83	72
Geschlecht männlich	60	77	2,6	0,5	53	81	72
ECOG-Status < 2	54	77	2,3	0,6	47	81	70
ECOG-Status ≥ 2	72	77	3,2	0,4	57	87	76
(C) Therapiebezogene Subgruppen							
,7+3'-Schema	61	81	3,3	0,5	69	75	73
S-HAM	57	76	2,3	0,6	39	86	72
TAD/HAM(-HAM)	58	75	2,3	0,6	58	75	69
,7+3' mit Midostaurin	20	90	2,0	0,9	50	69	67

ACC: Genauigkeit; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; ELN-2017: *European LeukemiaNet 2017*; MRC: *Medical Research Council*; NLR: *Negative Likelihood Ratio*; NPV: *Negativer prädiktiver Wert*; PLR: *Positive Likelihood Ratio*; PPV: *Positiver prädiktiver Wert*; SEN: *Sensitivität*; SPE: *Spezifität*.

4.5 Überlebensanalysen

4.5.1 Gesamtüberleben des Patientenkollektivs

In Abbildung 11 ist das Gesamtüberleben der analysierten Kohorte ($n = 351$) dargestellt. Das mediane Follow-Up betrug 3,3 Jahre. Im Beobachtungszeitraum verstarben 47 % ($n = 164$) der Patienten. Innerhalb der ersten drei Monate verstarben insgesamt 9 % ($n = 31$) der Patienten. Das mediane Gesamtüberleben belief sich auf 3,3 Jahre (95%-CI [2,5–5,8 Jahre]).

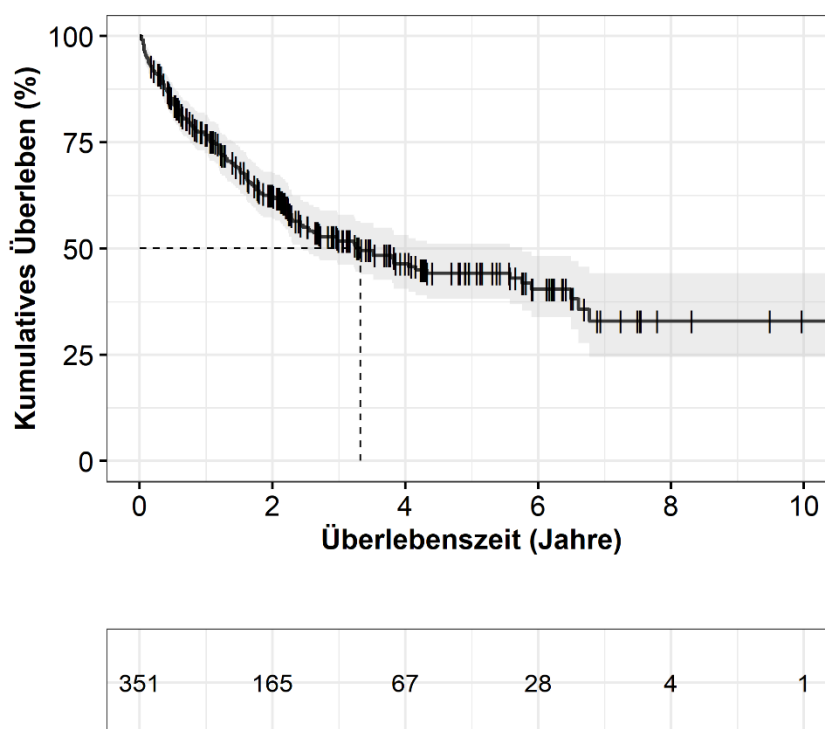


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben aller Patienten.

Die schwarz gestrichelte vertikale Linie zeigt ein medianes Gesamtüberleben von 3,3 Jahren an. Die graue Fläche entspricht dem 95%-Konfidenzintervall. Zensierte Fälle wurden in der Kurve mit einem vertikalen Strich gekennzeichnet. Die Anzahl der Patienten unter Risiko bei 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Jahren wird in der Tabelle unter der x-Achse aufgelistet.

In Abbildung 12 ist das Überleben nach Beurteilung des Ansprechens auf die Induktionschemotherapie aufgezeigt. Bei Patienten mit einer CR oder einer CRi wurde ein medianes Gesamtüberleben von 5,8 Jahren (95%-CI [3,5 Jahre; –]) beobachtet. Dies stand einem medianen Gesamtüberleben von einem Jahr (95%-CI [0,5–1,6 Jahre]) im refraktären Patientenkollektiv gegenüber. Der Unterschied zwischen den Überlebenskurven war mit einem p-Wert von $1,11 \cdot 10^{-14}$ nach dem Log-Rank-Test signifikant. Das mediane Alter der Patienten mit einer CR oder einer CRi betrug 56 Jahre, während bei refraktären Patienten ein medianes Alter von 63 Jahren festgestellt wurde.

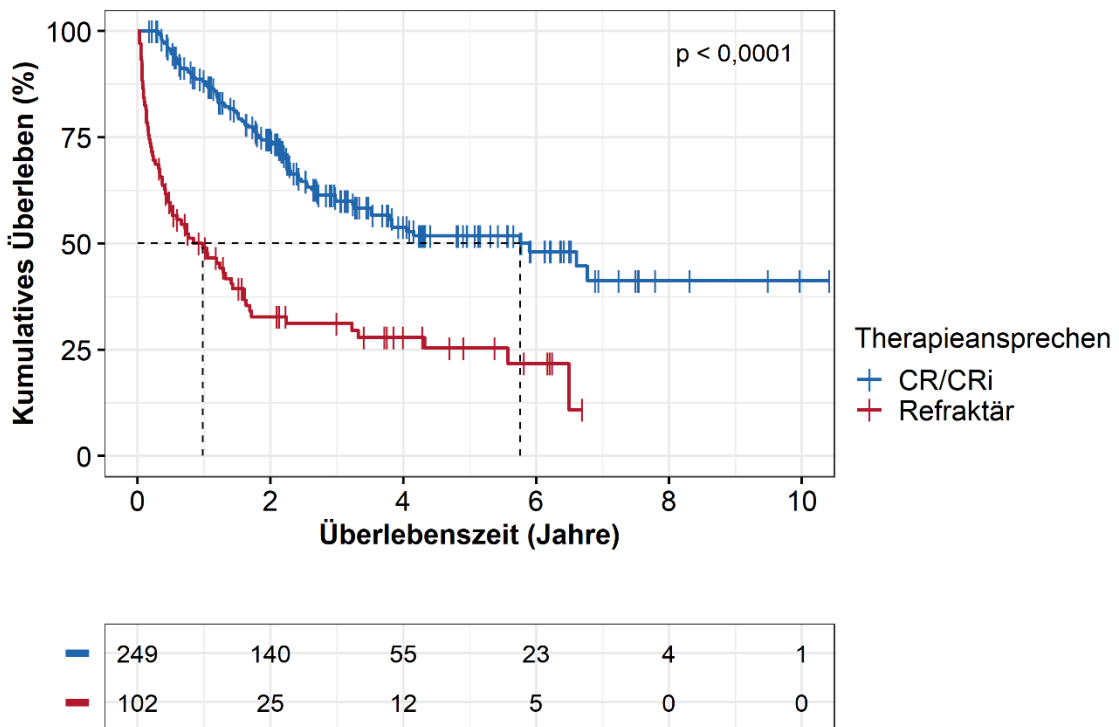


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurven nach Therapieansprechen.

Die schwarz gestrichelten vertikalen Linien zeigen ein medianes Gesamtüberleben von 5,8 Jahren (CR/CRi) bzw. einem Jahr (refraktär) an. Zensierte Fälle wurden in den Kurven mit einem vertikalen Strich gekennzeichnet. Die Anzahl der Patienten unter Risiko bei 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Jahren wird in der Tabelle unter der x-Achse aufgelistet.

In Abbildung 13 ist das Überleben der Patienten unter bzw. ab 60 Jahren dargestellt. Bei jüngeren Patienten wurde ein medianes Gesamtüberleben von 5,8 Jahren (95%-CI [3,5 Jahre; –]) beobachtet. Ältere Patienten erreichten hingegen ein medianes Gesamtüberleben von 2,1 Jahren (95%-CI [1,4–3,0 Jahre]). Hier war der Unterschied der Überlebenskurven mit einem p-Wert von $3,33 \cdot 10^{-5}$ nach dem Log-Rank-Test signifikant.

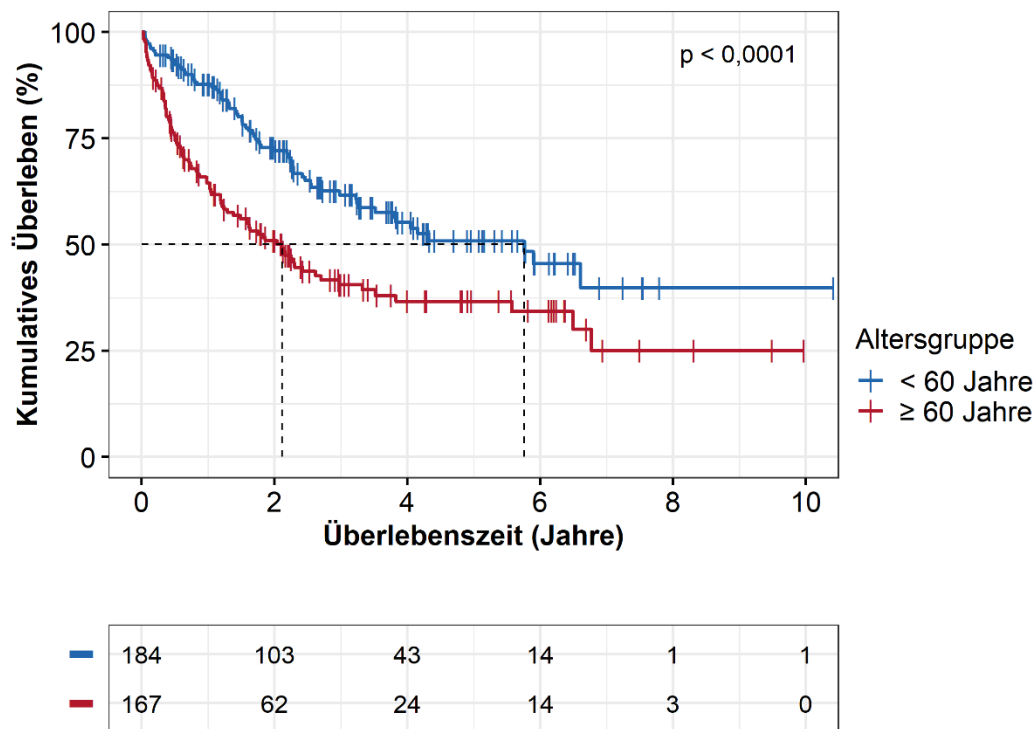


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurven nach Altersgruppe.

Die schwarz gestrichelten vertikalen Linien zeigen ein medianes Gesamtüberleben von 5,8 Jahren (< 60 Jahre) bzw. 2,1 Jahren (\geq 60 Jahre) an. Zensierte Fälle wurden in den Kurven mit einem vertikalen Strich gekennzeichnet. Die Anzahl der Patienten unter Risiko bei 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Jahren wird in der Tabelle unter der x-Achse aufgelistet.

Abbildung 14 ist das Überleben je nach MRC-Risikostratifizierung zu entnehmen. In der günstigen Subgruppe verstarben 21 % (n = 7) der Patienten. Dagegen wurde bei 46 % (n = 116) der Patienten in der intermediären Subgruppe bzw. bei 60 % (n = 41) der Patienten in der ungünstigen Subgruppe der Tod festgestellt. Das mediane Gesamtüberleben betrug 3,5 Jahre (95%-CI [2,6–5,9 Jahre]) in der intermediären Subgruppe bzw. 1,6 Jahre (95%-CI [1,2–2,5 Jahre]) bei Patienten mit nach MRC ungünstiger Zytogenetik. Der Log-Rank-Test ergab mit einem p-Wert von $1,16 \cdot 10^{-4}$ einen signifikanten Unterschied in den Überlebenskurven.

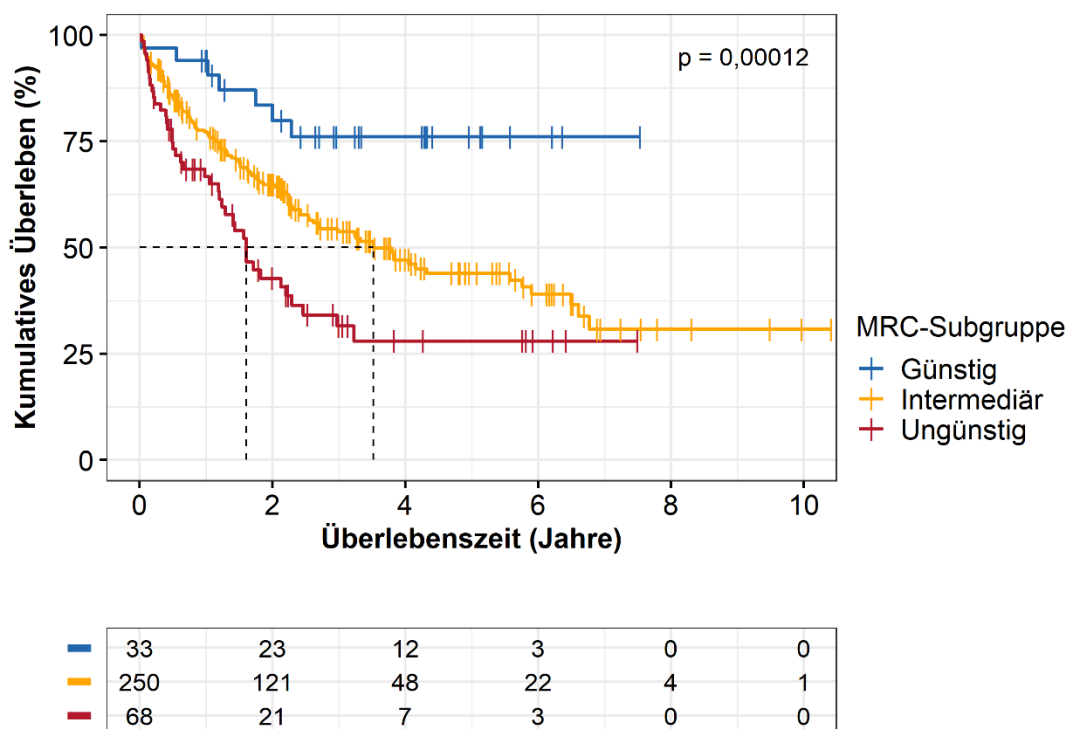


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurven nach MRC-Klassifikation.

Die schwarz gestrichelten vertikalen Linien zeigen ein medianes Gesamtüberleben von 3,5 Jahren (MRC intermediär) bzw. 1,6 Jahren (MRC ungünstig) an. Zensierte Fälle wurden in den Kurven mit einem vertikalen Strich gekennzeichnet. Die Anzahl der Patienten unter Risiko bei 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Jahren wird in der Tabelle unter der x-Achse aufgelistet.

4.5.2 PS29MRC als Modell zur Vorhersage des Gesamtüberlebens

Das prädiktive Modell des PS29MRC wurde primär zur Vorhersage eines Therapieversagens konzipiert (Herold et al. 2018). Da ein erfolgreiches Ansprechen auf eine Induktionschemotherapie mit einem längeren Überleben assoziiert ist, wurden zusätzlich prognostische Überlebensanalysen mit dem PS29MRC durchgeführt. Hier zeigte sich, dass sowohl über den PS29MRCcont mit einer HR von 1,38 (95%-CI [1,21–1,58]; $p = 2,62 \cdot 10^{-6}$) als auch über den PS29MRCdic mit einer HR von 1,73 (95%-CI [1,27–2,37]; $p = 5,12 \cdot 10^{-4}$) signifikant das Gesamtüberleben vorhergesagt werden konnte. Die Ergebnisse der Überlebensanalysen des PS29MRC werden in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Ergebnisse der Cox-Regressions-Überlebensanalysen des PS29MRCcont sowie des PS29MRCdic.

PS29MRC	HR	95%-CI	P
PS29MRCcont	1,38	1,21–1,58	$2,62 \cdot 10^{-6}$
PS29MRCdic	1,73	1,27–2,37	$5,12 \cdot 10^{-4}$

CI: Konfidenzintervall; HR: *Hazard Ratio*.

In Abbildung 15 sind die Überlebenskurven der nach dem PS29MRCdic eingeteilten Niedrigrisiko- bzw. Hochrisikogruppen eingezeichnet. In der PS29MRCdic-Niedrigrisikogruppe ($n = 234$) verstarben 41 % ($n = 95$) der Patienten. Dabei wurde ein medianes Gesamtüberleben von 4,3 Jahren (95%-CI [3,3 Jahre; –]) beobachtet. Im Gegensatz dazu verstarben in der PS29MRCdic-Hochrisikogruppe ($n = 117$) insgesamt 59 % ($n = 69$) der Patienten. Zudem war deren medianes Gesamtüberleben mit 1,8 Jahren (95%-CI [1,3–3,0 Jahre]) im Vergleich zur Niedrigrisikogruppe deutlich verkürzt. Mit einem Signifikanzniveau von $p = 4,33 \cdot 10^{-4}$ nach dem Log-Rank-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenskurven.

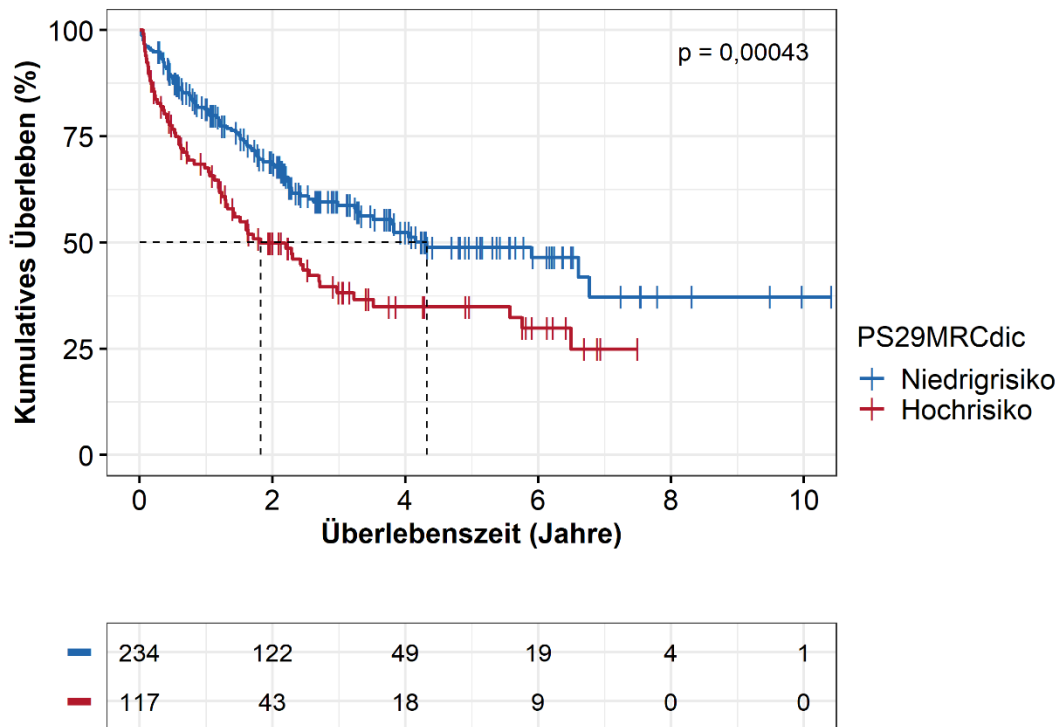


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurven nach PS29MRCdic-Risikostratifizierung.

Die schwarz gestrichelten vertikalen Linien zeigen ein medianes Gesamtüberleben von 4,3 Jahren (PS29MRCdic-Niedrigrisiko) bzw. 1,8 Jahren (PS29MRCdic-Hochrisiko) an. Zensierte Fälle wurden in den Kurven mit einem vertikalen Strich gekennzeichnet. Die Anzahl der Patienten unter Risiko bei 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Jahren wird in der Tabelle unter der x-Achse aufgelistet.

Das Überleben der analysierten Altersgruppen ist in Abhängigkeit von der PS29MRCdic-Risikostratifizierung in Abbildung 16 und 17 dargestellt. Im jüngeren Patientenkollektiv (< 60 Jahre) konnte kein signifikanter Unterschied im Überleben bei der PS29MRCdic-Risikostratifizierung konstatiert werden ($p = 0,11$; Log-Rank-Test). In der Subgruppe der älteren Patienten (≥ 60 Jahre) zeigte sich mit einem p-Wert von 0,024 nach dem Log-Rank-Test ein signifikanter Unterschied im Überleben. Das mediane Gesamtüberleben betrug 2,3 Jahre (95%-CI [1,9 Jahre; –]) in der PS29MRCdic-Niedrigrisikogruppe bzw. 1,2 Jahre (95%-CI [0,6 –2,7 Jahre]) in der PS29MRCdic-Hochrisikogruppe. Auch der Anteil der Hochrisikopatienten war mit 44 % ($n = 73$) im älteren Patientenkollektiv höher als bei den jüngeren Patienten mit 24 % ($n = 44$).

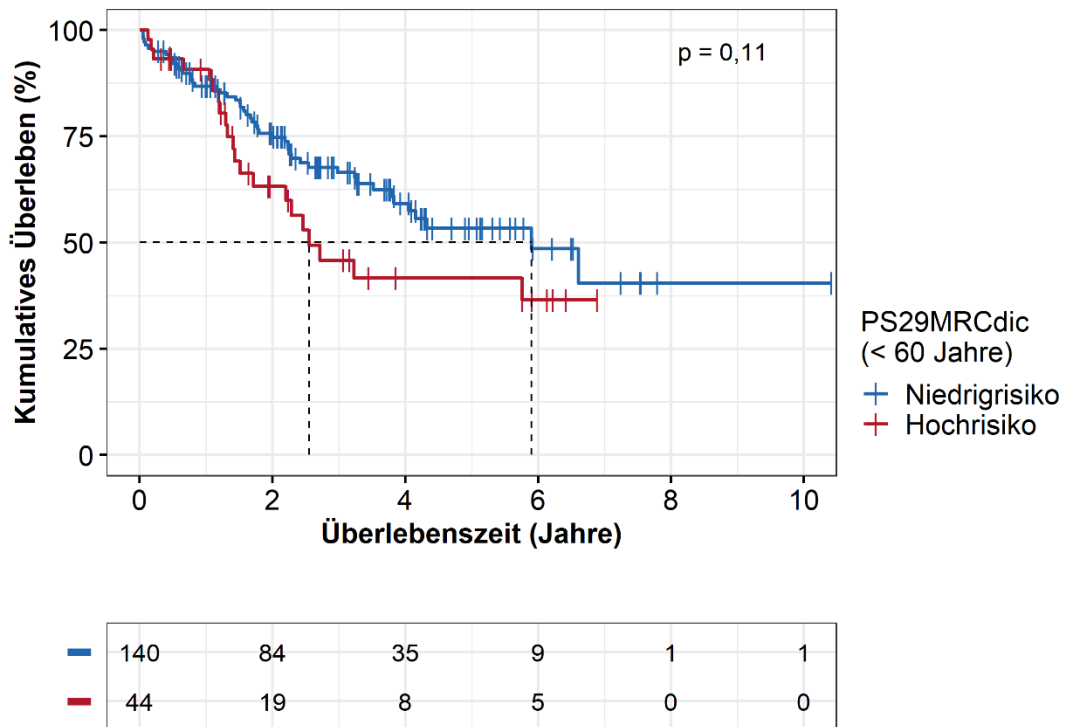


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurven nach PS29MRCdic-Risikostratifizierung im jüngeren Patientenkollektiv (< 60 Jahre).

Die schwarz gestrichelten vertikalen Linien zeigen ein medianes Gesamtüberleben von 5,9 Jahren (PS29MRCdic-Niedrigrisiko) bzw. 2,6 Jahren (PS29MRCdic-Hochrisiko) an. Zensierte Fälle wurden in den Kurven mit einem vertikalen Strich gekennzeichnet. Die Anzahl der Patienten unter Risiko bei 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Jahren wird in der Tabelle unter der x-Achse aufgelistet.

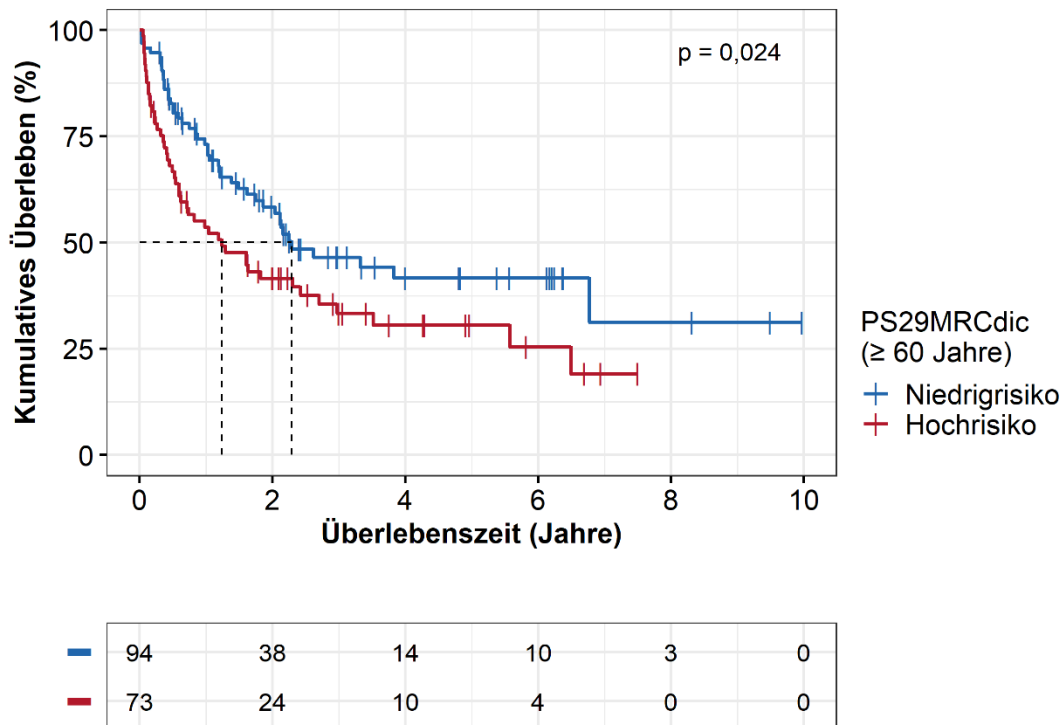


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurven nach PS29MRCdic-Risikostratifizierung im älteren Patientenkollektiv (≥ 60 Jahre).

Die schwarz gestrichelten vertikalen Linien zeigen ein medianes Gesamtüberleben von 2,3 Jahren (PS29MRCdic-Niedrigrisiko) bzw. 1,2 Jahren (PS29MRCdic-Hochrisiko) an. Zensierte Fälle wurden in den Kurven mit einem vertikalen Strich gekennzeichnet. Die Anzahl der Patienten unter Risiko bei 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Jahren wird in der Tabelle unter der x-Achse aufgelistet.

4.5.3 Optimierung der ELN-2017-Risikostratifizierung

Die Risikostratifizierung nach ELN-2017 ermöglicht die Vorhersage des Gesamtüberlebens bei Diagnosestellung (Herold et al. 2020; Döhner et al. 2017). In allen ELN-2017-Subgruppen konnten über den PS29MRCdic wie oben erläutert signifikant refraktäre Therapieerläufe identifiziert werden. Aufgrund der prognostischen Relevanz des Therapieansprechens wird im Folgenden eine mögliche Optimierung der ELN-2017-Risikostratifizierung mit der PS29MRCdic-Hochrisikogruppe beschrieben.

Die Überlebenskurven nach der ELN-2017-Klassifikation werden in Abbildung 18 dargestellt. Von 129 Patienten mit günstiger Prognose verstarben 35 % ($n = 45$). Das mediane Gesamtüberleben betrug 6,8 Jahre (95%-CI [3,8 Jahre; –]). In der intermediären Risikogruppe mit 68 Patienten kam es bei 37 % ($n = 25$) zum Tod.

Das mediane Überleben der intermediären Risikogruppe lag bei 4,2 Jahren (95%-CI [2,6 Jahre; –]). Von den 104 Patienten mit ungünstiger Prognose verstarben insgesamt 58 % (n = 60). Hier wurde ein medianes Gesamtüberleben von 1,8 Jahren (95%-CI [1,4–2,7 Jahre]) beobachtet. Zwischen den ELN-2017-Subgruppen bestand mit einem p-Wert von $1,69 \cdot 10^{-4}$ nach dem Log-Rank-Test ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben.

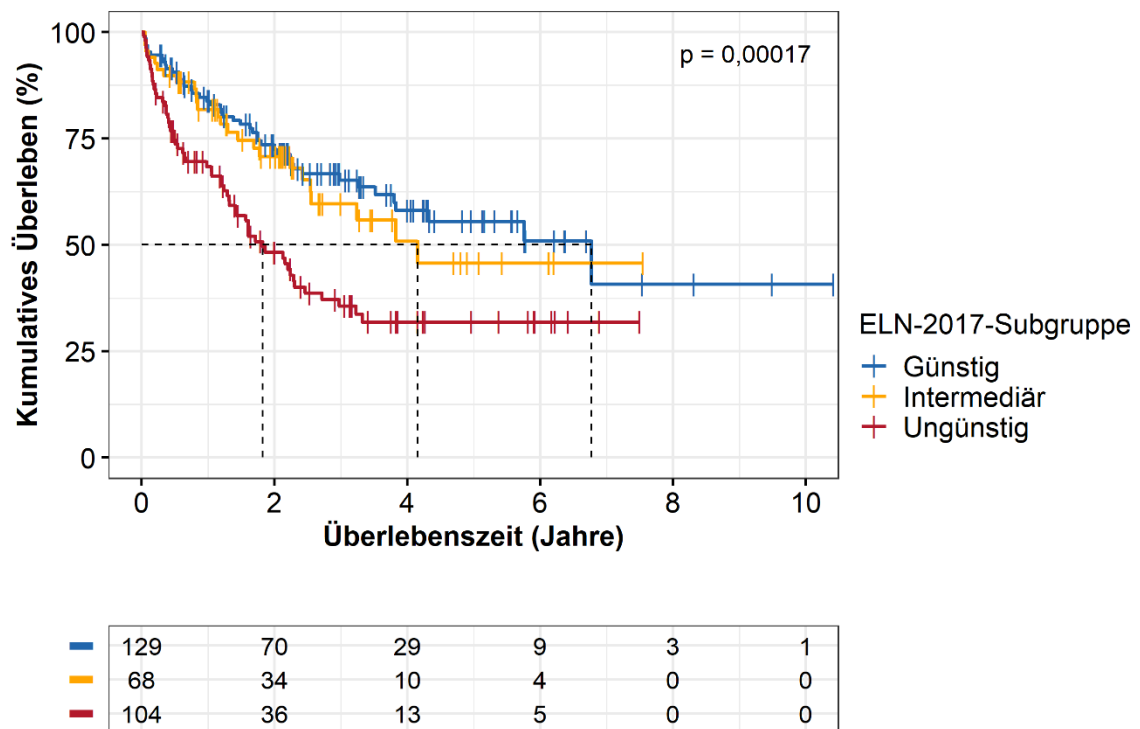


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven nach ELN-2017-Klassifikation.

Die schwarz gestrichelten vertikalen Linien zeigen ein medianes Gesamtüberleben von 6,8 Jahren (ELN-2017 günstig), 4,2 Jahren (ELN-2017 intermediär) und 1,8 Jahren (ELN-2017 ungünstig) an. Zensierte Fälle wurden in den Kurven mit einem vertikalen Strich gekennzeichnet. Die Anzahl der Patienten unter Risiko bei 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Jahren wird in der Tabelle unter der x-Achse aufgelistet.

In Abbildung 19 wurde das Modell nach ELN-2017 mit der Ergänzung einer PS29MRCdic-Hochrisikogruppe (n = 97) angepasst. Dabei setzte sich die neue Risikogruppe aus Patienten der günstigen (n = 10; 10 %), der intermediären (n = 18; 19 %) sowie der ungünstigen Subgruppe (n = 69; 71 %) zusammen (Abbildung 20). In der günstigen Risikogruppe (n = 119) verstarben 34 % (n = 41) der Patienten. Hier wurde ein medianes Gesamtüberleben von 6,8 Jahren

(95%-CI [6,8 Jahre; –]) beobachtet. Von den Patienten mit intermediärer Prognose (n = 50) verstarben 32 % (n = 16). Das mediane Gesamtüberleben wurde in dieser Gruppe im Beobachtungszeitraum nicht erreicht. In der ungünstigen Risikogruppe (n = 35) wurde bei 51 % (n = 18) der Patienten der Tod bei einem medianen Gesamtüberleben von 2,2 Jahren (95%-CI [1,6 Jahre; –]) verzeichnet. Letztlich verstarben in der PS29MRCdic-Hochrisikogruppe (n = 97) insgesamt 57 % (n = 55) der Patienten. Das mediane Gesamtüberleben betrug lediglich 1,8 Jahre (95%-CI [1,3–3,2 Jahre]). Mit einem p-Wert von $4,27 \cdot 10^{-4}$ nach dem Log-Rank-Test war auch dieses Modell signifikant in der Vorhersage des Gesamtüberlebens.

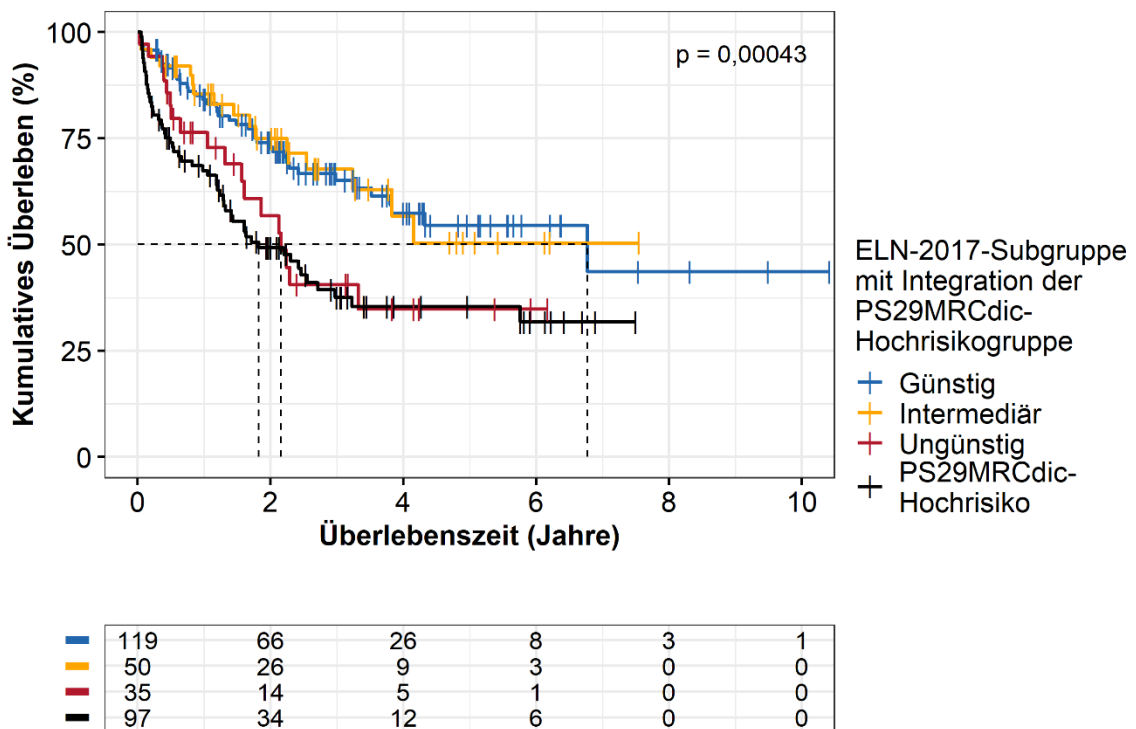


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurven nach ELN-2017-Klassifikation mit Ergänzung um eine PS29MRCdic-Hochrisikogruppe.

Die schwarz gestrichelten vertikalen Linien zeigen ein medianes Gesamtüberleben von 6,8 Jahren (ELN-2017 günstig), 2,2 Jahren (ELN-2017 ungünstig) und 1,8 Jahren (PS29MRCdic-Hochrisiko) an. Zensierte Fälle wurden in den Kurven mit einem vertikalen Strich gekennzeichnet. Die Anzahl der Patienten unter Risiko bei 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Jahren wird in der Tabelle unter der x-Achse aufgelistet.

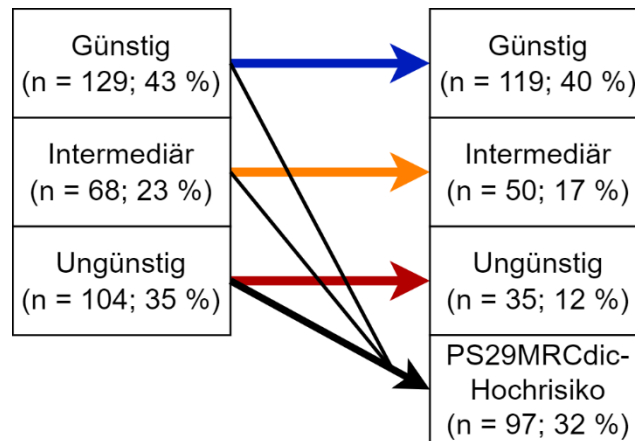


Abbildung 20: Umverteilung der drei ELN-2017-Subgruppen in vier neue Risikogruppen durch die Ergänzung einer PS29MRCdic-Hochrisikogruppe.

4.5.4 Gesamtüberleben der Patienten mit *TP53*-Mutation

Die Entscheidung für oder gegen eine Induktionstherapie stellt vor allem bei Hochrisikopatienten eine große Herausforderung dar. Eine *TP53*-Mutation geht mit einer sehr schlechten Prognose einher (Herold et al. 2020; Kadia et al. 2016). Patienten mit einer *TP53*-Mutation ($n = 14$) erreichten in der Gesamtkohorte ein medianes Überleben von 1,4 Jahren (95%-CI [0,6 Jahre; –]). Patienten ohne *TP53*-Mutation, deren PS29MRCcont-Werte zu den höchsten 10 % der Gesamtkohorte zählten ($n = 20$), hatten ein vergleichbar kurzes medianes Überleben von 1,2 Jahren (95%-CI [0,5 Jahre; –]). Die Fünf-Jahres-Überlebensrate lag in beiden Gruppen bei 0 %. Abbildung 21 ist zu entnehmen, dass zwischen den beiden mit unterschiedlichen Methoden identifizierten Hochrisikogruppen keine signifikanten Abweichungen im Überleben vorlagen ($p = 0,89$; Log-Rank-Test). Mit dem Modell des PS29MRC ist demnach die Identifikation einer weiteren Subgruppe mit deutlich reduziertem Gesamtüberleben möglich.

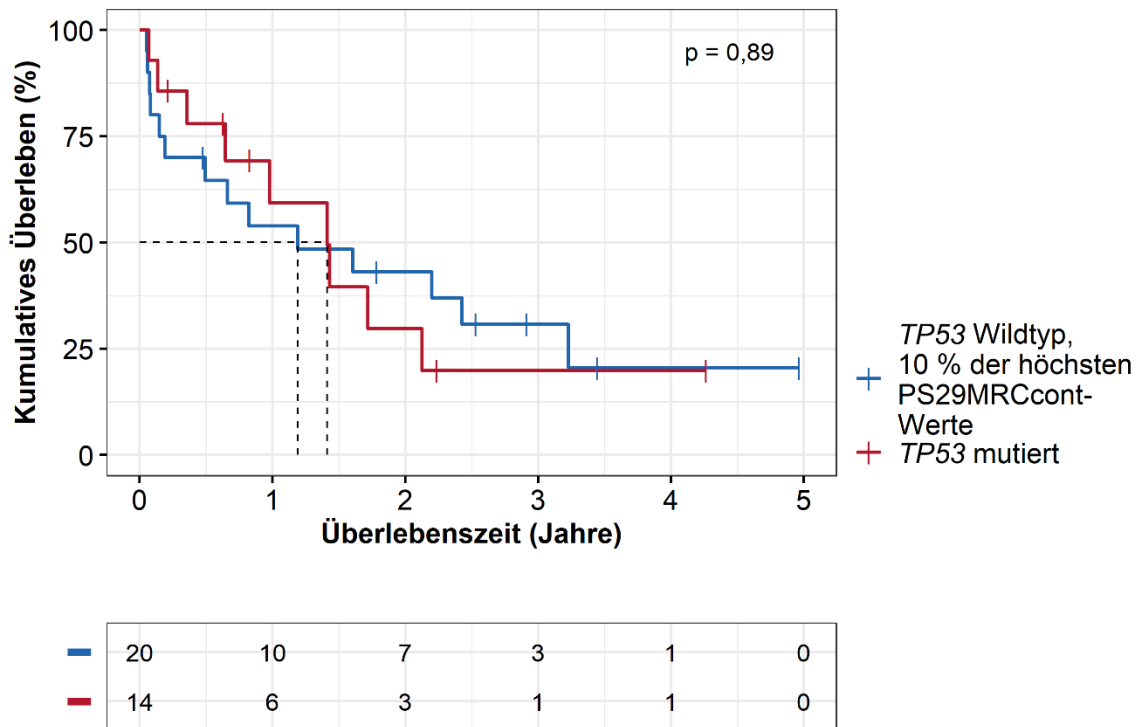


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurven der Patienten mit *TP53*-Mutation und 10 % der höchsten PS29MRCcont-Werte.

Die schwarz gestrichelten vertikalen Linien zeigen ein medianes Gesamtüberleben von 1,4 Jahren (*TP53* mutiert) bzw. 1,2 Jahren (10 % der höchsten PS29MRCcont-Werte) an. Zensierte Fälle wurden in den Kurven mit einem vertikalen Strich gekennzeichnet. Die Anzahl der Patienten unter Risiko bei 0, 1, 2, 3, 4 und 5 Jahren wird in der Tabelle unter der x-Achse aufgelistet.

4.5.5 PS29MRC bei der Vorhersage des rezidiv-freien Überlebens

Grundsätzlich wurde das Modell des PS29MRC als prädiktiver Marker entwickelt (Herold et al. 2018). Aufgrund der signifikanten Vorhersage des Gesamtüberlebens durch den PS29MRC wurde das Modell zusätzlich auf die Vorhersage des rezidiv-freien Überlebens hin untersucht. Die Prognose der Patienten mit Rezidiv ist schlecht (Brandwein et al. 2020). Das rezidiv-freie Überleben der PS29MRCdic-Risikogruppen wird in Abbildung 22 dargestellt. Zu 249 Patienten lagen Angaben zum Vorliegen eines Rezidivs vor: Es erlitten 52 % ($n = 129$) ein Rezidiv, von denen 73 % ($n = 94$) verstarben. Das mediane Gesamtüberleben der Patienten mit Rezidiv lag bei 2,2 Jahren (95%-CI [1,8–2,4 Jahre]). Das mediane rezidiv-freie Überleben betrug 2,4 Jahre (95%-CI [1,5–4,3 Jahre]) in der PS29MRCdic-Niedrigrisikogruppe und 1,7 Jahre (95%-CI [1,1–

5,4 Jahre]) in der PS29MRCdic-Hochrisikogruppe. Es bestand kein signifikanter Unterschied des rezidiv-freien Überlebens zwischen der PS29MRCdic-Niedrigrisiko- und Hochrisikogruppe ($p = 0,44$; Log-Rank-Test). Der PS29MRCcont sowie der PS29MRCdic waren nicht signifikant in der Vorhersage des rezidiv-freien Überlebens (PS29MRCcont: HR = 1,13; 95%-CI [0,96–1,33]; $p = 0,13$; PS29MRCdic: HR = 1,17; 95%-CI [0,79–1,73]; $p = 0,44$).

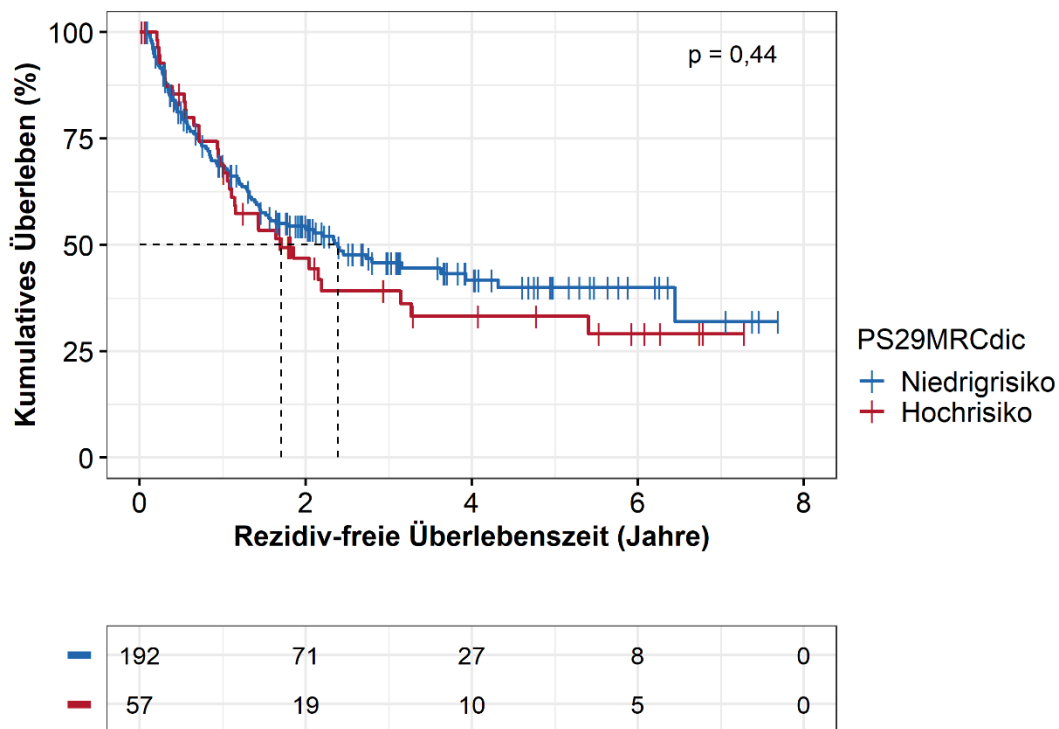


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurven für das rezidiv-freie Überleben nach PS29MRCdic-Risikostratifizierung.

Die schwarz gestrichelten vertikalen Linien zeigen ein medianes rezidiv-freies Überleben von 2,4 Jahren (PS29MRCdic-Niedrigrisiko) bzw. 1,7 Jahren (PS29MRCdic-Hochrisiko) an. Zensierte Fälle wurden in den Kurven mit einem vertikalen Strich gekennzeichnet. Die Anzahl der Patienten unter Risiko bei 0, 2, 4, 6 und 8 Jahren wird in der Tabelle unter der x-Achse aufgelistet.

4.6 Individuelle Risikovorhersage

Der PS29MRCcont zeigt die Wahrscheinlichkeit an, ob es zu einem Versagen der Induktionschemotherapie kommt. Jedoch ist der einzelne Wert für das ärztliche Team und für Patienten klinisch nicht nutzbar, eine individuelle Risikovorhersage ist somit nicht möglich. Es wurden daher das beobachtete und das

vorhergesagte Therapieversagen überprüft und in Beziehung gesetzt. In Abbildung 23 ist zu sehen, dass der PS29MRCcont in der ersten Hälfte der vorhergesagten Werte angemessen kalibriert war. Bei sehr hohen Werten wurde das Risiko für Refraktärität jedoch überschätzt.

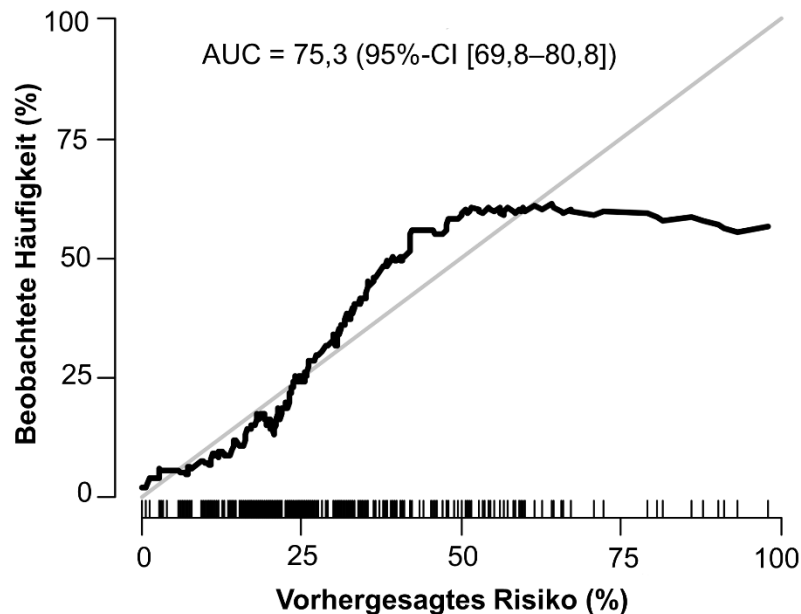


Abbildung 23: Analyse der Kalibration des PS29MRCcont.

Die x-Achse zeigt das vorhergesagte Risiko für Refraktärität an. Die einzelnen Markierungen auf der x-Achse entsprechen den für die Analyse herangezogenen Patientenverläufen.

Die y-Achse gibt die beobachtete Häufigkeit des Therapieversagens an.

Mit den berechneten p-Werten für das Therapieversagen jedes einzelnen PS29MRCcont-Wertes (Median: -0,01; Spannweite: -5,91–5,72) wurde ein prädiktives Modell erstellt, das eine individuelle Risikovorhersage ermöglicht. Jeder PS29MRCcont-Wert ist mit einem Prozentsatz des Risikos für Refraktärität assoziiert. So haben Patienten mit einem PS29MRCcont ab 4,0 beispielsweise ein Risiko für Refraktärität von mindestens 90 %, während die Wahrscheinlichkeit für ein Therapieversagen bei Patienten mit einem PS29MRCcont unter -1,0 bei unter 10 % liegt. Das prädiktive Modell ist in Abbildung 24 dargestellt.

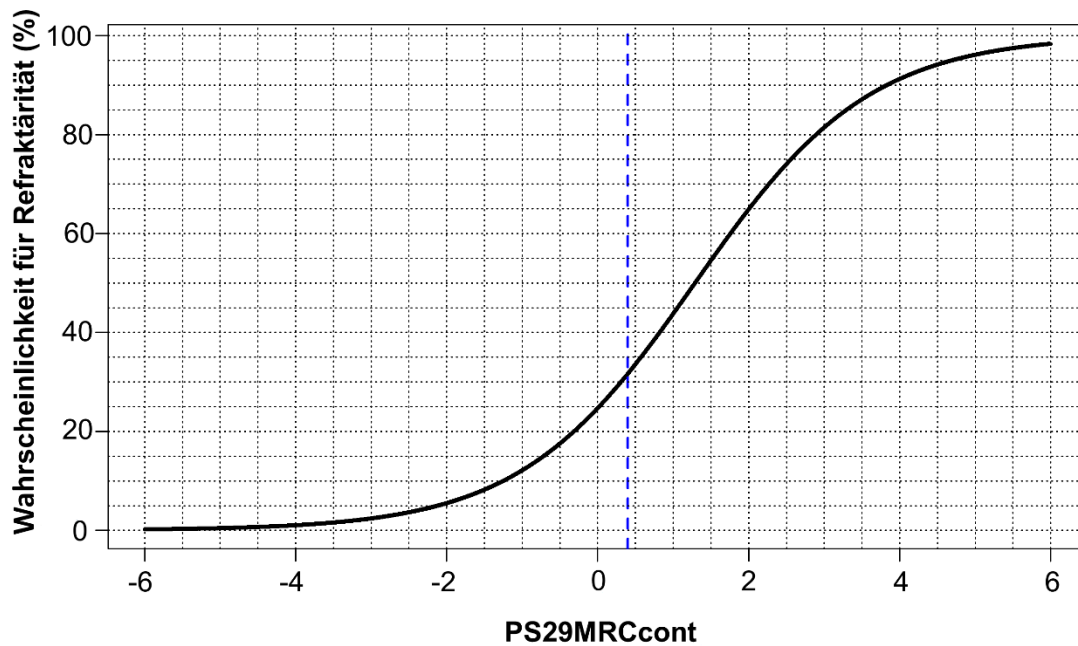


Abbildung 24: Graph zur Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens in Abhängigkeit vom PS29MRCcont.

Die blau gestrichelte vertikale Linie zeigt den Cut-Off-Wert bei 0,4 an.

4.7 Multivariate Analyse

Sowohl der kontinuierliche als auch der dichotome PS29MRC waren in univariaten Analysen signifikant in der Vorhersage refraktärer Verläufe bei einer Induktionstherapie. Die univariaten Analysen basierten auf der Annahme, dass die Variablen unabhängig voneinander sind. Zur Adjustierung möglicher Einflussgrößen wurde eine multivariate Analyse mit dem PS29MRCdic und neun weiteren prädiktiven Variablen des initial ausgewählten Patientenkollektivs für die Zielvariable ‚Therapieversagen‘ durchgeführt (Tabelle 27). In der multivariaten Analyse mit $n = 227$ konnten ausschließlich über das Patientenalter (OR = 1,03; 95%-CI [1,00–1,06]; $p = 0,044$) sowie über den PS29MRCdic (OR = 3,47; 95%-CI [1,65–7,39]; $p = 1,09 \cdot 10^{-3}$) signifikant Patienten mit einem Therapieversagen identifiziert werden. Nach multivariater Analyse der älteren Patienten ab 60 Jahren ($n = 82$) war ausschließlich der PS29MRCdic signifikant (OR = 4,41; 95%-CI [1,55–13,41]; $p = 6,62 \cdot 10^{-3}$) (Tabelle 28). Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem PS29MRCcont erzielt (Tabelle 29). In Bezug auf die Vorhersage des Therapieversagens konnte der PS29MRC als signifikanter unabhängiger Prädiktor bestätigt werden.

Tabelle 27: Ergebnisse der univariaten und multivariaten logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem PS29MRCdic und mit neun weiteren prädiktiven Variablen im Gesamtkollektiv.

	Multivariate Analyse, Gesamtkollektiv, n = 227			Univariate Analyse, Gesamtkollektiv			
	OR	95%-CI	p	OR	95%-CI	p	n
PS29MRC dichotom	3,47	1,65– 7,39	1,09·10⁻³	4,81	2,95– 7,93	4,15·10⁻¹⁰	351
RR-LSC17	1,00	1,00– 1,00	0,65	1,001	1,000– 1,002	0,046	360
Alter	1,03	1,00– 1,06	0,044	1,04	1,02– 1,06	1,37·10⁻⁴	375
AML sekundär	1,06	0,45– 2,43	0,89	1,70	0,96– 2,94	0,063	375
<i>NPM1</i> Mutation	0,81	0,34– 1,93	0,64	0,49	0,29– 0,79	4,80·10⁻³	372
<i>RUNX1</i> Mutation	1,27	0,46– 3,44	0,64	2,58	1,24– 5,35	0,011	238
<i>TP53</i> Mutation	0,67	0,16– 2,75	0,58	2,62	0,93– 7,43	0,065	237
<i>ASXL1</i> Mutation	0,97	0,34– 2,75	0,96	2,21	0,98– 4,87	0,051	237
ELN-2017 günstig	0,41	0,12– 1,39	0,15	0,17	0,09– 0,32	5,72·10⁻⁸	319
ELN-2017 intermediär	0,94	0,33– 2,70	0,91	0,50	0,26– 0,94	0,033	319

CI: Konfidenzintervall; ELN-2017: *European LeukemiaNet 2017*; OR: *Odds Ratio*; RR-LSC17: *Retrained-Response-LSC17*.

Tabelle 28: Ergebnisse der univariaten und multivariaten logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem PS29MRCdic und neun weiteren prädiktiven Variablen bei Patienten ab 60 Jahren.

	Multivariate Analyse, Patienten ab 60 Jahren, n = 82			Univariate Analyse, Patienten ab 60 Jahren			
	OR	95%-CI	p	OR	95%-CI	p	n
PS29MRC dichotom	4,41	1,55– 13,41	6,62·10⁻³	5,26	2,72– 10,46	1,25·10⁻⁶	145
RR-LSC17	1,00	1,00– 1,00	0,39	1,00	1,00– 1,00	0,12	152
Alter	1,01	0,91– 1,11	0,90	1,01	0,96– 1,07	0,60	161
AML sekundär	0,68	0,22– 1,93	0,48	1,25	0,62– 2,47	0,53	161
<i>NPM1</i> Mutation	0,76	0,22– 2,76	0,67	0,31	0,15– 0,60	7,47·10⁻⁴	159
<i>RUNX1</i> Mutation	1,50	0,36– 6,46	0,58	1,91	0,71– 5,12	0,19	91
<i>TP53</i> Mutation	0,58	0,08– 3,97	0,58	1,44	0,39– 5,11	0,57	90
<i>ASXL1</i> Mutation	2,31	0,54– 10,44	0,26	2,12	0,78– 5,85	0,14	90
ELN-2017 günstig	1,06	0,15– 7,39	0,95	0,20	0,08– 0,44	1,40·10⁻⁴	128
ELN-2017 intermediär	2,14	0,42– 11,18	0,36	0,81	0,33– 1,98	0,65	128

CI: Konfidenzintervall; ELN-2017: *European LeukemiaNet 2017*; OR: *Odds Ratio*; RR-LSC17: *Retrained-Response-LSC17*.

Tabelle 29: Ergebnisse der multivariaten logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem PS29MRCcont und mit neun weiteren prädiktiven Variablen im Gesamtkollektiv und bei Patienten ab 60 Jahren.

	Multivariate Analyse, Gesamtkollektiv, n = 227			Multivariate Analyse, Patienten ab 60 Jahren, n = 82		
	OR	95%-CI	p	OR	95%-CI	p
PS29MRC kontinuierlich	1,72	1,19– 2,63	6,89·10⁻³	1,55	1,01– 2,57	0,065
RR-LSC17	1,00	1,00– 1,00	0,66	1,00	1,00– 1,00	0,25
Alter	1,02	1,00– 1,05	0,076	1,00	0,90– 1,10	0,93
AML sekundär	1,10	0,47– 2,46	0,83	0,67	0,23– 1,83	0,44
<i>NPM1</i> Mutation	0,82	0,34– 1,95	0,65	0,77	0,22– 2,76	0,68
<i>RUNX1</i> Mutation	1,50	0,55– 4,12	0,43	1,37	0,33– 5,81	0,67
<i>TP53</i> Mutation	0,88	0,22– 3,50	0,86	0,69	0,09– 4,56	0,70
<i>ASXL1</i> Mutation	1,02	0,35– 2,91	0,97	2,02	0,48– 8,85	0,34
ELN-2017 günstig	0,48	0,13– 1,72	0,26	0,88	0,13– 6,09	0,89
ELN-2017 intermediär	0,95	0,33– 2,72	0,92	1,71	0,35– 8,49	0,50

CI: Konfidenzintervall; ELN-2017: *European LeukemiaNet 2017*; OR: *Odds Ratio*; RR-LSC17: *Retrained-Response-LSC17*.

Auch in der univariaten Überlebensanalyse erwiesen sich der PS29MRCcont sowie der PS29MRCdic als signifikante Prognosefaktoren. In Tabelle 30 sind die Ergebnisse zur uni- und multivariaten Cox-Regressions-Überlebensanalyse des PS29MRCcont sowie neun weiterer prognostischer Variablen aufgeführt. Dabei

waren in der multivariaten Analyse das Alter, der ECOG-Status, die Leukozytenzahl, die Laktatdehydrogenase und das Vorliegen einer *TP53*-Mutation signifikant in der Vorhersage des Gesamtüberlebens. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem PS29MRCdic erzielt (Tabelle 31). Der PS29MRC konnte nicht als signifikanter unabhängiger Prognosefaktor bestätigt werden.

Tabelle 30: Ergebnisse der univariaten und multivariaten Cox-Regressions-Überlebensanalysen mit dem PS29MRCcont.

	Multivariate Analyse, n = 220			Univariate Analyse			
	HR	95%-CI	p	HR	95%-CI	p	n
PS29 MRC ^{cont}	1,17	0,95– 1,45	0,15	1,39	1,22– 1,59	1,22·10⁻⁶	359
Alter	1,02	1,00– 1,04	0,016	1,04	1,03– 1,05	1,91·10⁻⁹	384
sAML	0,86	0,46– 1,59	0,63	1,36	0,96– 1,93	0,084	384
Frau/ Mann	1,35	0,84– 2,15	0,21	1,45	1,08– 1,93	0,013	384
ECOG Status	1,55	1,16– 2,07	2,97·10⁻³	1,57	1,31– 1,90	1,95·10⁻⁶	374
WBC	1,004	1,001– 1,007	8,18·10⁻³	1,003	1,000– 1,005	0,042	383
LDH	1,0001	1,0001– 1,0002	1,30·10⁻⁴	1,0001	1,00007– 1,00018	9,52·10⁻⁶	376
<i>TP53</i> mutiert	2,97	1,32– 6,70	8,63·10⁻³	2,99	1,62– 5,49	4,35·10⁻⁴	243
ELN fav	0,67	0,35– 1,27	0,22	0,44	0,31– 0,64	1,67·10⁻⁵	327
ELN int	0,93	0,51– 1,71	0,82	0,53	0,34– 0,82	4,29·10⁻³	327

CI: Konfidenzintervall; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; ELN fav: günstiges Risiko nach *European LeukemiaNet 2017*; ELN int: intermediäres Risiko nach *European LeukemiaNet 2017*; HR: *Hazard Ratio*; LDH: Laktatdehydrogenase; sAML: sekundäre AML; WBC: Leukozytenzahl.

Tabelle 31: Ergebnisse der univariaten und multivariaten Cox-Regressions-Überlebensanalysen mit dem PS29MRCdic.

	Multivariate Analyse, n = 220			Univariate Analyse			
	HR	95%-CI	p	HR	95%-CI	p	n
PS29 MRC ^{dic}	1,20	0,71– 2,04	0,49	1,78	1,31– 2,42	2,24·10⁻⁴	359
Alter	1,02	1,01– 1,04	0,013	1,04	1,03– 1,05	1,91·10⁻⁹	384
sAML	0,84	0,45– 1,56	0,58	1,36	0,96– 1,93	0,084	384
Frau/ Mann	1,40	0,88– 2,23	0,16	1,45	1,08– 1,93	0,013	384
ECOG Status	1,56	1,17– 2,08	2,69·10⁻³	1,57	1,31– 1,90	1,95·10⁻⁶	374
WBC	1,004	1,001– 1,007	0,014	1,003	1,000– 1,005	0,042	383
LDH	1,0001	1,0001– 1,0002	9,23·10⁻⁵	1,0001	1,00007– 1,00018	9,52·10⁻⁶	376
TP53 mutiert	2,92	1,29– 6,58	9,89·10⁻³	2,99	1,62– 5,49	4,35·10⁻⁴	243
ELN fav	0,58	0,31– 1,09	0,090	0,44	0,31– 0,64	1,67·10⁻⁵	327
ELN int	0,88	0,48– 1,64	0,69	0,53	0,34– 0,82	4,29·10⁻³	327

CI: Konfidenzintervall; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; ELN fav: günstiges Risiko nach *European LeukemiaNet 2017*; ELN int: intermediäres Risiko nach *European LeukemiaNet 2017*; HR: *Hazard Ratio*; LDH: Laktatdehydrogenase; sAML: sekundäre AML; WBC: Leukozytenzahl.

5 Diskussion

Die akute myeloische Leukämie stellt aufgrund ihrer epigenetischen, genetischen sowie klinischen Variabilität eine äußerst heterogene Erkrankung dar (Chen et al. 2010; Döhner et al. 2017; Metzeler et al. 2016). In den vergangenen Jahrzehnten kam es zu keinen wesentlichen Veränderungen in der Therapie der AML (Green und König 2020). Erst in den letzten Jahren wurden aufgrund eines besseren Verständnisses der Pathophysiologie der AML neue therapeutische Ansätze entwickelt, die auf das individuelle Risikoprofil der Patienten abgestimmt sind (Kantarjian et al. 2021; Bhatt 2019). Umso bedeutender ist die Entscheidung bezüglich der therapeutischen Strategie bei Diagnosestellung. Viele Patienten profitieren nicht von der nebenwirkungsreichen intensiven Induktionschemotherapie (Gurnari et al. 2020). Bei der korrekten Identifikation solcher Patienten könnten ihnen alternative Therapien, wie etwa eine allogene Stammzelltransplantation, eine rein supportive Behandlung oder experimentelle Ansätze, angeboten werden. Das Modell des PS29MRC nach Herold et al. (2018) integrierte zytogenetische Risikoprofile sowie Microarray- bzw. RNAseq-Genexpressionsdaten in einem Score. In Vorarbeiten ermöglichte der PS29MRC mit einer hohen Sensitivität und einer hohen Spezifität die Identifikation von Patienten mit einem Therapieversagen (Herold et al. 2018). Für eine klinische Implementation des PS29MRC müssen Genexpressionsanalysen mit einem validierten, reliablen klinischen Assay innerhalb kurzer Zeit durchgeführt werden können.

In dieser Arbeit wurde der PS29MRC erstmals auf die NanoString-Plattform übertragen und mit Hilfe einer unabhängigen, multizentrischen Patientenkohorte validiert (Moser et al. 2021). Das Modell des PS29MRC wurde als signifikanter Prädiktor für Therapieversagen im Gesamtkollektiv mit $n = 351$ sowie in mehreren Subgruppenanalysen bestätigt (Moser et al. 2021). Bisherigen prädiktiven Modellen wie den Scores nach Walter et al. (2015) oder Ng et al. (2016) war der PS29MRC im direkten Vergleich überlegen (Moser et al. 2021). Zudem wurde der Cut-Off-Wert mit Daten einer unabhängigen Kohorte mit $n = 48$ an die neue Methode der Genexpressionsanalyse angepasst, um Patienten in eine Niedrigrisiko- und Hochrisikogruppe einzuteilen (Moser et al. 2021).

Auch nach multivariater logistischer Regression konnte ein gesteigertes Risiko für refraktäre Therapieverläufe bei Patienten mit erhöhten PS29MRC-Werten aufgezeigt werden (Moser et al. 2021). Schließlich erwies sich der PS29MRC durch die Identifikation einer Risikogruppe mit besonders reduziertem Gesamtüberleben auch als prognostischer Marker (Moser et al. 2021). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Risikostratifizierung von Patienten mit AML durch den PS29MRC möglich ist (Moser et al. 2021).

Für die Ermittlung des PS29MRC sind Analysen der Zytogenetik sowie der Genexpression von 29 Genen bei der Diagnosestellung einer AML notwendig (Herold et al. 2018). Da die Verzögerung des Therapiebeginns mit einem Therapieversagen und mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert sein kann, sollte für auf Genexpression basierende prädiktive Biomarker eine möglichst zeiteffiziente und sensitive Methode zur Genexpressionsanalyse eingesetzt werden (Sekeres et al. 2009; Narrandes und Xu 2018; Goossens et al. 2015). In der klinischen Routine werden Genexpressionsanalysen bereits bei Patienten im Frühstadium eines Mamma-Karzinoms zur Bestimmung des *OncotypeDX-Breast-Recurrence-Scores* angewandt, der die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs angibt (Albain et al. 2010). Die Genexpressionsanalyse wird hier mittels *Real-Time-quantitative-Polymerase-Chain-Reaction* (RT-qPCR) durchgeführt, die ebenso wie die NanoString-Plattform sensitive, reproduzierbare und technisch robuste Ergebnisse liefert (Pescarmona et al. 2019). Aktuell ist die Methode der RT-qPCR im Vergleich zur NanoString-Plattform noch in deutlich mehr Laboratorien etabliert (Eastel et al. 2019). Durch die längere manuelle Bearbeitungszeit der RT-qPCR ist das Verfahren jedoch anfälliger für Fehler, die die Qualität der Messungen beeinträchtigen können (Pescarmona et al. 2019). Neben der RT-qPCR bewährte sich auch die NanoString-Methode in der Routinediagnostik: Eingesetzt wird die NanoString-Plattform für Genexpressions-tests von *Prosigna*, *MammaPrint* sowie *EndoPredict*, die Auskunft über die Rückfallwahrscheinlichkeit bei einem Mamma-Karzinom geben (Wallden et al. 2015; Buyse et al. 2006; Denkert et al. 2012). Bei einer Genexpressionsanalyse mit der NanoString-Plattform ist ein sensibles, reproduzierbares und größtenteils vollautomatisiertes Ergebnis innerhalb kurzer Zeit möglich (Tsang et al. 2017). Dies kann die Integration prädiktiver Signaturen wie des PS29MRC in Studien und im klinischen Alltag ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit der NanoString-Plattform die Quantifizierung der Genexpressionen von insgesamt 373 Proben innerhalb weniger Wochen durchgeführt werden (Moser et al. 2021). Bei geringer manueller Bearbeitungszeit war die Vorbereitung, Hybridisierung und Genexpressionsanalyse von je zwölf Proben innerhalb von circa 24 Stunden möglich (Moser et al. 2021). Nach der Qualitätskontrolle der Genexpressionsdaten mussten fünf weitere Proben ausgeschlossen werden, sodass die Daten zu 368 Patienten für weitere Analysen verwendet werden konnten (Moser et al. 2021). Dies entspricht einer geringen Ausfallrate von circa 1 % (Moser et al. 2021). Aufgrund standardisierter und größtenteils automatisierter Arbeitsschritte ist eine Genexpressionsanalyse mit der NanoString-Plattform weniger fehleranfällig als andere Verfahren (Pescarmona et al. 2019; Narrandes und Xu 2018).

Als multizentrische Studie mit klar definierten Ein- und Ausschlusskriterien erfüllt diese Arbeit hohe methodologische Standards. Die retrospektiv analysierten Proben mit $n = 351$ stammten aus einem aktuellen multizentrischen Patientenkollektiv, wobei der Großteil der Patienten ($n = 227$; 65 %) zwischen 2015 und 2019 behandelt wurde (Moser et al. 2021). Etwas mehr als die Hälfte der Patienten ($n = 191$; 54 %) wurde im Klinikum Großhadern therapiert (Moser et al. 2021). Die Behandlung aller Patienten wurde im Rahmen des multizentrischen AMLCG-Registers erfasst und dokumentiert. Dadurch konnten die Analysen für diese Studie mit einem nahezu lückenlosen Datensatz durchgeführt werden. Das mediane Alter der Patienten, deren Daten in dieser Studie analysiert wurden, war mit 58 Jahren niedriger als das mediane Erkrankungsalter von Patienten mit AML mit 68 Jahren (Moser et al. 2021; Pulte et al. 2016). Aufgrund des Einschlusskriteriums einer intensiven Induktionstherapie waren insbesondere ältere multimorbide Patienten mit rein supportiver Therapie ausgenommen. Das prädiktive Potential des PS29MRC konnte aufgrund bis dato fehlender Fallzahlen nicht an Daten von Patienten mit aktuellen Therapieverfahren wie einer Behandlung mit Gemtuzumab-Ozogamicin ($n = 0$) oder mit CPX-351 ($n = 0$) überprüft werden (Moser et al. 2021). Die Verteilungen der Geschlechter sowie der Altersgruppen waren weitestgehend gleichmäßig (Moser et al. 2021). Die Rate refraktärer Verläufe nach Induktionstherapie entsprach mit 29 % in etwa der Häufigkeit eines Therapieversagens in anderen klinischen Studien (Moser et al. 2021; Braess et al. 2018; Döhner et al. 2017; Burnett et al. 2012).

Das kontinuierliche Modell des PS29MRC konnte im Gesamtkollektiv ($n = 351$) mit einer OR von 2,37 (95%-CI [1,82–3,18]), einem p-Wert von $1,20 \cdot 10^{-10}$ und einer AUC von 0,75 als signifikanter prädiktiver Biomarker bestätigt werden (Moser et al. 2021). Gemäß der adaptierten Definition des Therapieversagens nach Herold et al. (2018) war das prädiktive Potential des PS29MRCcont mit einer OR von 2,46 (95%-CI [1,87–3,32]), einem p-Wert von $6,33 \cdot 10^{-10}$ und einer AUC von 0,76 am besten (Moser et al. 2021). Ein möglicher Grund hierfür ist, dass das Modell des PS29MRC initial unter Verwendung der adaptierten Definition mit Ausschluss der Frühverstorbenen konzipiert wurde, da ein frühes Versterben häufig nicht auf ein Therapieversagen, sondern auf infektiöse oder hämorrhagische Komplikationen zurückzuführen ist (Cheson et al. 2003; Herold et al. 2018; Malkan et al. 2015; Slats et al. 2005). Durch den Ausschluss der frühverstorbenen Patienten wurde folglich sichergestellt, dass der PS29MRC spezifisch für die Identifikation eines Therapieversagens konzipiert wurde (Herold et al. 2018). Da für eine klinische Integration des PS29MRC eine Analyse in einem möglichst realitätsnahen Patientenkollektiv notwendig ist, wurden in dieser Arbeit auch Frühverstorbenen eingeschlossen (Moser et al. 2021). Auch bei einer umfassenderen Definition der Refraktärität mit Einschluss des rezidiv-freien Überlebens erwies sich der PS29MRCcont als signifikanter Prädiktor für Therapieversagen. Die AUC nahm jedoch mit Zunahme des rezidiv-freien Überlebens von 0,76 auf 0,66 kontinuierlich ab. Dies lässt sich möglicherweise damit erklären, dass das rezidiv-freie Überleben häufig von weiteren Faktoren wie einer Konsolidierungstherapie, Therapieverzögerungen aufgrund von Infektionen oder einer allogenen Stammzelltransplantation beeinflusst wird (Döhner et al. 2017). Auch bei variierender Definition der Refraktärität ermöglichte der Score eine signifikante Vorhersage des Versagens der Induktionstherapie (Moser et al. 2021).

Das Fehlen einer universellen Definition für Refraktärität nach einer Induktionstherapie stellt eine Herausforderung bei klinischen Studien und bei der therapeutischen Entscheidungsfindung dar (Ravandi 2011). Ferguson et al. (2016) definierten in einer retrospektiven Analyse von 8907 Patienten vier einzelne Untergruppen für Therapieversagen. Dabei wurde eine Hochrisikogruppe identifiziert, die bereits nach einem Zyklus der Induktionstherapie ein ungenügendes Ansprechen aufwies und von einer frühen allogenen

Stammzelltransplantation deutlich profitieren würde (Ferguson et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde das Therapieversagen vorrangig gemäß der Definition nach ELN-2017 überprüft (Moser et al. 2021; Döhner et al. 2017). Für die Bedeutung des PS29MRC bei der Vorhersage differenzierter Untergruppen für Therapieversagen sind folglich weitere Analysen mit größeren Patientenkohorten notwendig.

Nach der in dieser Arbeit verwendeten ELN-2017-Definition für Refraktärität war der PS29MRCcont in mehreren Subgruppenanalysen signifikant in der Vorhersage des Therapieversagens (Moser et al. 2021). In MRC-Subgruppen (intermediär, ungünstig), in ELN-2017-Subgruppen (günstig, ungünstig), bei Patienten mit *de-novo*- bzw. sekundärer AML, in unterschiedlichen Altersgruppen (< 60 Jahre, ≥ 60 Jahre) sowie nach verschiedenen Therapieschemata (‘7+3’, S-HAM) erwies sich der PS29MRCcont als signifikantes prädiktives Modell (Moser et al. 2021). Auch hinsichtlich der kleinen Subgruppen zeichnete sich tendenziell eine korrekte Vorhersage des Therapieversagens bei Patienten ab, die nach dem TAD/HAM(-HAM)-Regimen (n = 32) oder mit dem FLT3-Inhibitor Midostaurin (n = 15) behandelt wurden (Moser et al. 2021).

Besonders bei älteren Patienten oder Patienten mit sekundärer AML ist die Entscheidung für oder gegen eine intensive Induktionschemotherapie erschwert (Webster und Pratz 2018). Auch bei Patienten, bei denen keine etablierten prädiktiven Biomarker vorliegen, ist es das Ziel, diejenigen mit wahrscheinlichem Therapieversagen zu identifizieren, um ihnen alternative Therapien anbieten zu können (Walter et al. 2015). Durch die zunehmende Individualisierung der AML-Therapie, wie etwa mit FLT3-Inhibitoren, sind weitere prädiktive Signaturen notwendig, um bisher etablierte Modelle zu komplementieren (Stone et al. 2017; Wei und Tiong 2017). Hierzu könnte möglicherweise der PS29MRCcont durch eine differenzierte Risikostratifizierung beitragen.

Auffällig war, dass der PS29MRCcont bei Hochrisikopatienten mit *RUNX1*-, *ASXL1*- oder *TP53*-Genmutation nicht als signifikanter Prädiktor für Therapieversagen bestätigt werden konnte. Ein möglicher Grund hierfür ist die geringe Fallzahl in den analysierten Subgruppen. Zudem könnten die Mutationen mit distinktiven Veränderungen in der Genexpression und bis jetzt noch unbekanntem

molekulargenetischen Mechanismen assoziiert sein (Li et al. 2021; Shivarov et al. 2015; Huang et al. 2018).

Verglichen mit den bisherigen prädiktiven Modellen nach Walter et al. (2015) (AUC = 0,53) sowie nach Ng et al. (2016) (AUC = 0,56) war der PS29MRCcont mit einer AUC von 0,75 in einem für alle Modelle vollkommen neuen und unabhängigen Datensatz überraschend deutlich überlegen (Moser et al. 2021). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der Walter-Score sowie der RR-LSC17 im Gegensatz zum PS29MRCcont mit Patientenkollektiven aus den 1990er und 2000er Jahren konzipiert wurde (Walter et al. 2015; Ng et al. 2016). Seitdem konnten besonders in der supportiven Behandlung von Patienten mit AML erhebliche Fortschritte erzielt werden (Sasaki et al. 2021). Außerdem unterliegen die im Walter-Score integrierten Leukozyten- und Thrombozytenzahlen teilweise täglichen Fluktuationen (Pritchett und Reddy 2015). Diese Variablen sind folglich nur bedingt für prädiktive Analysen geeignet. Der Score nach Ng et al. (2016) beschränkt sich zudem lediglich auf die Messung von sechs Genexpressionswerten, was der Komplexität der AML womöglich nicht gerecht wird. Dahingegen ermöglichte PS29MRC unter Berücksichtigung des zytogenetischen Profils sowie der Expressionsanalyse von 29 Genen mit einer AUC von 0,75 eine moderate Vorhersage der Refraktärität, die vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Modellentwicklung war (Moser et al. 2021; Herold et al. 2018).

Für eine klinische Integration des prädiktiven Modells nach Herold et al. (2018) wurde mit Daten einer unabhängigen Patientenkohorte (n = 48) ein Cut-Off-Wert festgelegt, mit dem die Patienten in Gruppen mit niedrigem (n = 234; 67 %) und hohem (n = 117; 33 %) Risiko für Therapieversagen eingeteilt werden konnten (Moser et al. 2021). Ein Therapieversagen wurde bei PS29MRCdic-Niedrigrisikopatienten (n = 42; 18 %) deutlich seltener beobachtet als bei PS29MRCdic-Hochrisikopatienten (n = 60; 51 %) oder als im Gesamtkollektiv (n = 102; 29 %) (Moser et al. 2021). Klinisch relevant für einen angemessenen prädiktiven Biomarker ist vor allem eine hohe Spezifität, durch die sich die Anzahl der Patienten verringert, die fälschlicherweise einer Hochrisikogruppe zugeordnet worden wären. Falsch klassifizierte Patienten, die eigentlich von einer standardisierten und erprobten Induktionschemotherapie profitiert hätten, bekämen so eine andere, womöglich inadäquate Therapie. Bei einer Spezifität

von 77 % und einer Sensitivität von 59 % konnte mit dem PS29MRCdic eine Genauigkeit von 72 % erreicht werden (Moser et al. 2021). Bei Veränderung des Cut-Off-Wertes zur Verbesserung der Spezifität und der Genauigkeit verschlechterte sich die Sensitivität des PS29MRCdic. Auffällig war zudem, dass sich die Spezifität und die Genauigkeit des PS29MRCdic in Subgruppen mit ungünstiger Prognose (MRC/ELN-2017 ungünstig; Alter ≥ 60 Jahre; sekundäre AML) im Vergleich zu den Subgruppen mit günstigerer Prognose verschlechterten (Moser et al. 2021). Mit größeren Patientenkohorten könnten eine Optimierung des Cut-Off-Wertes und damit eine bessere Identifikation der Patienten mit Therapieversagen erzielt werden.

In univariaten Analysen wurde der PS29MRCdic im Gesamtkollektiv (OR = 4,81; 95%-CI [2,95–7,93]; $p = 4,15 \cdot 10^{-10}$) und in verschiedenen Subgruppen (MRC-Subgruppen; ELN-2017-Subgruppen; Altersgruppen; *de-novo*-AML/sekundäre AML; ,7+3'/S-HAM) als signifikanter Biomarker zur Vorhersage der Refraktärität bestätigt (Moser et al. 2021). Multivariate Analysen wurden zur Adjustierung neun potenzieller Einflussgrößen durchgeführt. Hier waren im Gesamtkollektiv das Patientenalter sowie der PS29MRCdic die einzigen signifikanten prädiktiven Variablen (Moser et al. 2021). Bei multivariater Analyse der Patienten ab 60 Jahren waren außer des PS29MRCdic keine weiteren Variablen signifikant in der Vorhersage des Therapieversagens (Moser et al. 2021). Folglich könnte der PS29MRCdic besonders in dieser Hochrisikogruppe die Entscheidung für oder gegen eine intensive Induktionschemotherapie unterstützen. Um weitere mögliche Einflussfaktoren auf ein Therapieversagen bei AML zu untersuchen, sind noch zusätzliche multivariate Analysen mit weiteren prädiktiven Variablen, wie etwa die laborchemische Konzentration des Fibrinogens oder die Körperkerntemperatur bei Diagnosestellung, notwendig (Krug et al. 2010).

Ein Therapieversagen ist häufig mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert (Ferguson et al. 2016). Dieser Zusammenhang konnte auch mit den Ergebnissen der Überlebensanalysen dieser Arbeit bestätigt werden (Moser et al. 2021). Aus diesem Grund wurden prognostische Analysen mit dem Modell des PS29MRC durchgeführt. Auch in der Analyse des Gesamtüberlebens erwiesen sich der PS29MRCcont mit einer HR von 1,38 (95%-CI [1,21–1,58]; $p = 2,62 \cdot 10^{-6}$) und der PS29MRCdic mit einer HR von 1,73 (95%-CI [1,27–2,37];

$p = 5,12 \cdot 10^{-4}$) als prognostische Variablen (Moser et al. 2021). Bei Patienten mit einer *TP53*-Mutation wurde eine ähnlich schlechte Prognose wie bei den oberen 10 % der Patienten mit hohem PS29MRCcont beobachtet (Moser et al. 2021). In der PS29MRCdic-Niedrigrisikogruppe betrug das mediane Gesamtüberleben 4,3 Jahre, das der PS29MRCdic-Hochrisikogruppe hingegen nur 1,8 Jahre (Moser et al. 2021). Das Modell des PS29MRC ermöglichte somit die Identifikation einer Subgruppe von Patienten mit besonders schlechter Prognose, für die die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Verbesserung des Gesamtüberlebens unabdingbar ist. Ihnen könnte statt einer intensiven Induktionschemotherapie beispielsweise eine Behandlung mit Azacitidin/Venetoclax angeboten werden. Mit dieser Behandlung wurde bei älteren, multimorbiden Patienten ein besseres Therapieansprechen sowie ein längeres Gesamtüberleben beobachtet (DiNardo et al. 2020). Ob der PS29MRC als Methode zur Stratifikation zwischen einer intensiven Chemotherapie und einer Behandlung mit Azacitidin/Venetoclax eingesetzt werden könnte, ließ sich an den vorliegenden Daten nicht beurteilen. Eine Zulassung dieser neuen Substanzen zur Behandlung der AML lag im Zeitraum der Arbeit noch nicht vor und die Anzahl der Patienten mit einer entsprechenden Behandlung im AMLCG-Register war zu gering, um solche Hypothesen zu prüfen. In zukünftigen Arbeiten sollte dieser wichtige klinische Aspekt fokussiert werden.

Aufgrund des prognostischen Potentials des PS29MRC wurde die Risikostratifizierung nach den ELN-2017-Empfehlungen in den weiteren Analysen dieser Arbeit mit der Ergänzung einer PS29MRCdic-Hochrisikogruppe angepasst. Insgesamt war der Unterschied zwischen dem Gesamtüberleben der neuen Subgruppen signifikant, nicht jedoch zwischen der neuen ungünstigen Subgruppe und der PS29MRCdic-Hochrisikogruppe. Letztlich konnten mit diesem Modell nicht genügend Risikopatienten aus der günstigen und der intermediären ELN-2017-Subgruppe identifiziert werden. Auch in der Vorhersage des rezidiv-freien Überlebens war das Modell des PS29MRC nicht signifikant (Moser et al. 2021). Mit einem für die Überlebenszeit optimierten Cut-Off-Wert ließe sich die ELN-2017-Risikostratifizierung möglicherweise um den PS29MRCdic differenzierter ergänzen und folglich die Vorhersage des Gesamtüberlebens und des rezidiv-freien Überlebens signifikant verbessern.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der klinischen Implementation eines prädiktiven Biomarkers ist eine patientenzentrierte Kommunikation des Testergebnisses (Roberts et al. 2016). Der *OncotypeDX*-Test gibt beispielsweise neben dem Score auch die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv des Mamma-Karzinoms innerhalb von neun Jahren nach Operation an (Albain et al. 2010). Mit dem Modell der individuellen Risikovorhersage des PS29MRCcont ist die Zuordnung der Wahrscheinlichkeit für ein Versagen der Induktionschemotherapie möglich: Im Vergleich wurde bei Patienten mit hohem PS29MRCcont deutlich häufiger ein Therapieversagen verzeichnet als bei Patienten mit niedrigem PS29MRCcont (Moser et al. 2021). Dieses vereinfachte Modell kann somit die Kommunikation zwischen dem ärztlichen Team und den Patienten erleichtern und zu einer informierten Therapieentscheidung beitragen. Für ein noch aussagekräftigeres Modell der individuellen Risikovorhersage sind allerdings die Analyse einer Kohorte mit einer ausreichend hohen Fallzahl und eine optimierte Kalibration des PS29MRCcont notwendig.

Schließlich könnte das Modell des PS29MRC nicht nur in der klinischen Routine, sondern auch in der Entwicklung experimenteller Studien eingesetzt werden. Die molekularbiologischen Prozesse, die mit einer erhöhten Expression der PS29MRC-Gene einhergehen, könnten mit dem Therapieversagen und dem Gesamtüberleben der Patienten assoziiert sein (Moser et al. 2021; Herold et al. 2018). Denkbar wären genauere Analysen dieser Gene, um möglicherweise neue therapeutische Ziele zu identifizieren (Mrózek et al. 2007). Eine erhöhte Expression des PS29MRC-Gens *MIR155HG* wurde in einem aggressiven Subtypen der AML ohne aberranten Karyotypen beobachtet (Marcucci et al. 2013). *MIR155HG* könnte mit dem Medikament Pevonedistat inhibiert werden, was bereits in Studien untersucht wurde (Khalife et al. 2015; Cojocari et al. 2022; Swords et al. 2015). Das in dieser Arbeit untersuchte Modell des PS29MRC könnte folglich zur Entwicklung von neuen gezielten Ansätzen in der AML-Therapie beitragen.

Zusammenfassend wurde das Modell nach Herold et al. (2018) erfolgreich auf die NanoString-Plattform übertragen und mit einer unabhängigen, multi-zentrischen Patientenkohorte validiert. Die NanoString-Plattform stellt dabei eine praxistaugliche Methode zur Genexpressionsanalyse dar. Der PS29MRC wurde

in verschiedenen univariaten und multivariaten Analysen als signifikanter prädiktiver Biomarker bestätigt. Trotz der signifikanten Vorhersage refraktärer Verläufe sollten die Sensitivität, die Spezifität und die Genauigkeit des PS29MRC für den klinischen Einsatz optimiert werden. Hierfür sind prospektive Untersuchungen mit größeren Fallzahlen und einem Kollektiv diverser AML-Subtypen notwendig. Dabei muss der klinische Endpunkt des Therapieversagens möglichst präzise und einheitlich definiert werden. Zudem sollten Einflussfaktoren auf ein Therapieversagen, wie etwa das Alter, Genmutationen oder Komorbiditäten, berücksichtigt werden. Gerade durch die Einführung weiterer Therapiekonzepte wie die Behandlung mit Azacitidin/Venetoclax ist die Notwendigkeit prädiktiver Marker von immer größerer Bedeutung. Auf der Basis der Ergebnisse dieser Arbeit könnte das Modell des PS29MRC für die Vorhersage refraktärer Verläufe weiter optimiert werden und in Zukunft als ergänzende therapeutische Entscheidungshilfe in der klinischen Routine oder auch in Studien eingesetzt werden. Dadurch könnten Therapieansätze individuell weiter angepasst und das Therapieansprechen sowie Langzeitüberleben von Patienten mit AML verbessert werden.

6 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) stellt eine klinisch und biologisch heterogene Erkrankung dar. Die Entscheidung für oder gegen eine intensive Induktionstherapie bei Diagnosestellung ist in vielen Risikogruppen deutlich erschwert. Prädiktive Biomarker ermöglichen die Identifikation von Patienten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht von einer Induktionstherapie profitieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das prädiktive, auf Genexpression basierende Modell des PS29MRC (*Predictive Score 29 Medical Research Council*) nach Herold et al. (2018) auf die praxistaugliche NanoString-Plattform zu übertragen und in einem unabhängigen, multizentrischen, retrospektiv analysierten Patientenkollektiv zu validieren.

Initial wurden 384 unbehandelte Proben aus dem Register der AMLCG (*Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group*) in die Studie eingeschlossen. Nach der Präparation, Hybridisierung und Purifikation der Proben erfolgte die Quantifizierung der Genexpression mit Hilfe des automatisierten NanoString-Analyzers. Für weitere Analysen wurden schließlich nur Proben mit adäquater Qualität, zytogenetischer MRC-Risikostratifizierung (*Medical Research Council*) und erfolgter Evaluation des Ergebnisses der Induktionstherapie einbezogen (n = 351). Den primären Endpunkt stellte ein Versagen der Induktionstherapie gemäß den Empfehlungen des *European LeukemiaNet 2017* dar.

Das Modell des PS29MRC wurde in univariaten sowie multivariaten Analysen als signifikanter prädiktiver Biomarker für ein Versagen der Induktionstherapie bestätigt. Das kontinuierliche Modell des PS29MRC war bisherigen prädiktiven Scores wie denen nach Walter et al. (2015) oder nach Ng et al. (2016) in der Vorhersage eines Therapieversagens deutlich überlegen. Durch die Anpassung des Cut-Off-Wertes an die NanoString-Plattform konnte das dichotome Modell des PS29MRC Patienten mit niedrigem (n = 234) und hohem (n = 117) Risiko identifizieren, das jeweils mit der Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens sowie mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert war. Im behandlungsbezogenen Gespräch mit Patienten eingesetzt könnte das Modell

der individuellen Risikovorhersage zudem die Kommunikation erleichtern und zu einer informierten Therapieentscheidung beitragen.

Zur Optimierung des Modells nach Herold et al. (2018) sind weitere prospektive Untersuchungen mit größeren Fallzahlen unter Berücksichtigung neuer Behandlungsregime notwendig. Das Ziel sollte dabei sein, Hochrisikopatienten zu identifizieren, individuelle Therapiekonzepte zu formulieren und somit das Langzeitüberleben von Patienten mit AML zu verbessern.

7 Summary

Acute myeloid leukemia (AML) is a clinically and biologically heterogeneous disease. At initial diagnosis, the decision for or against intensive induction chemotherapy may be challenging in various risk groups. Predictive biomarkers can identify patients who most likely will not benefit from intensive induction chemotherapy.

This present thesis examines the transfer of the predictive, gene expression-based model of PS29MRC (Predictive Score 29 Medical Research Council) by Herold et al. (2018) to the NanoString platform. Additionally, PS29MRC was validated in an independent, multi-center, and retrospectively analyzed patient cohort.

Initially, 384 untreated samples of AMLCG (Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group) registry patients were included. After preparation, hybridization and purification of the samples, gene expression analysis was performed by the automated NanoString Analyzer. Only samples with adequate quality, cytogenetic risk profile according to MRC (Medical Research Council) and evaluation of the response to induction chemotherapy were included for further analysis (n = 351). The primary endpoint was induction failure according to the recommendations of the European LeukemiaNet 2017.

The model of PS29MRC was confirmed as a significant predictive classifier of induction failure in univariate and multivariate analyses. The continuous model of PS29MRC was superior to the predictive classifiers by Walter et al. (2015) and Ng et al. (2016). A pre-defined cutoff could successfully be implemented. The dichotomous model of PS29MRC identified patients with low (n = 234) and high (n = 117) risk. The risk was associated with induction failure and with inferior overall survival. The model for individual risk prediction could facilitate communication between physicians and patients.

To optimize the model by Herold et al. (2018), prospective studies with larger patient cohorts and new therapeutic agents are warranted. The goal should be to identify high risk patients, to individualize therapy regimens and to improve the long-term outcome of AML patients.

8 Verzeichnisse

8.1 Abkürzungsverzeichnis

7+3	Standard-Induktionstherapie („7+3“-Schema)
abn(*)	Aberration
add(*)	Addition
AML	akute myeloische Leukämie
AMLCG	Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group
ASXL1	ASXL transcriptional regulator 1
AUC	Area Under the Curve
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEBPA	CCAAT enhancer binding protein alpha
CI	Konfidenzintervall
CR	komplette Remission
CRi	CR mit inkompletter hämatologischer Regeneration
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ELN-2017	European LeukemiaNet 2017
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
FLT3-ITD	interne FLT3-Tandemduplikation
HAM	Hochdosis Cytarabin plus Mitoxantron
HR	Hazard Ratio
inv(*)	Inversion
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LSC17	17-gene leukemia stem cell score
MRC	Medical Research Council
NPM1	Nucleophosmin 1
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerasekettenreaktion
PML	PML nuclear body scaffold
PS29MRC	Predictive Score 29 MRC
PS29MRCcont	kontinuierlicher PS29MRC
PS29MRCdic	dichotomer PS29MRC
RARA	retinoic acid receptor alpha
RLT	Guanidinium-Isothiocyanat Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseq	Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierung
ROC	Receiver Operating Characteristic
RR-LSC17	Retrained-Response-LSC17
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RUNX1	RUNX family transcription factor 1
S-HAM	zeitlich modifiziertes sequenzielles HAM
t(*;*)	Translokation
TAD	Cytarabin plus Daunorubicin und Thioguanin
TP53	tumor protein p53

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flussdiagramm der ein- und ausgeschlossenen Patienten (Moser et al. 2021).	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Capture- und Reportersonden gebunden am Zielgen (Abbildung aus <i>nCounter Gene Expression CodeSet RNA Hybridization Protocol Manual MAN-10056-05</i> , Seite 3).	21
Abbildung 3: Korrelation der Microarray- und NanoString-Genexpressionsdaten (Moser et al. 2021; Herold et al. 2018).	25
Abbildung 4: ROC-Kurven des PS29MRCcont, des Walter-Scores und des <i>Retrained-Response-LSC17</i> .	38
Abbildung 5: Säulendiagramm zur Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic in der Gesamtkohorte in Abhängigkeit vom Cut-Off-Wert...	41
Abbildung 6: Säulendiagramm zur Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic in MRC-Subgruppen.	43
Abbildung 7: Säulendiagramm zur Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic in ELN-2017-Subgruppen.	45
Abbildung 8: Säulendiagramm zur Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic in <i>de-novo</i> - und sekundärer AML.	46
Abbildung 9: Säulendiagramm zur Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic in Altersgruppen.	48
Abbildung 10: Säulendiagramm zur Einteilung des Therapieansprechens durch den PS29MRCdic in Therapie-Subgruppen.	49
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben aller Patienten.	53
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurven nach Therapieansprechen.	54
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurven nach Altersgruppe.	55
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurven nach MRC-Klassifikation.	56
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurven nach PS29MRCdic-Risikostratifizierung.	58
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurven nach PS29MRCdic-Risikostratifizierung im jüngeren Patientenkollektiv (< 60 Jahre).	59
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurven nach PS29MRCdic-Risikostratifizierung im älteren Patientenkollektiv (≥ 60 Jahre).	60
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven nach ELN-2017-Klassifikation.	61
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurven nach ELN-2017-Klassifikation mit Ergänzung um eine PS29MRCdic-Hochrisikogruppe.	62
Abbildung 20: Umverteilung der drei ELN-2017-Subgruppen in vier neue Risikogruppen durch die Ergänzung einer PS29MRCdic-Hochrisikogruppe.	63
Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurven der Patienten mit <i>TP53</i> -Mutation und 10 % der höchsten PS29MRCcont-Werte.	64
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurven für das rezidiv-freie Überleben nach PS29MRCdic-Risikostratifizierung.	65
Abbildung 23: Analyse der Kalibration des PS29MRCcont.	66
Abbildung 24: Graph zur Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens in Abhängigkeit vom PS29MRCcont.	67

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prognostische Risikostratifizierung gemäß den Empfehlungen nach <i>European LeukemiaNet 2017</i> (Döhner et al. 2017).....	5
Tabelle 2: Schemata der Induktionschemotherapie der AMLCG-2008-Studie samt Remissionsraten (Braess et al. 2018).	14
Tabelle 3: Prognostische Risikostratifizierung nach <i>Medical Research Council</i> (Grimwade et al. 2010).....	15
Tabelle 4: Kriterien des Therapieansprechens/-versagens (Döhner et al. 2017).	16
Tabelle 5: Materialien und Chemikalien zur Verarbeitung und Lagerung der Proben.	17
Tabelle 6: Geräte zur Verarbeitung und Lagerung der Proben.	18
Tabelle 7: Materialien und Chemikalien für die Isolierung der RNA.	19
Tabelle 8: Geräte für die Isolierung der RNA.....	19
Tabelle 9: Übersicht zum NanoString-CodeSet (Moser et al. 2021).....	20
Tabelle 10: Chemikalien und Materialien für die Hybridisierung und Purifikation der Proben.	22
Tabelle 11: Geräte für die Hybridisierung und Purifikation der Proben.....	22
Tabelle 12: Charakteristika des Gesamtkollektivs samt Anteil refraktärer Patienten.....	31
Tabelle 13: Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem PS29MRCcont bei variierender Definition der Zielvariablen ‚Therapieversagen‘.	34
Tabelle 14: Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem PS29MRCcont in ausgewählten Subgruppen.....	36
Tabelle 15: Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit verschiedenen prädiktiven Modellen.	38
Tabelle 16: Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem Score nach Walter et al. (2015) sowie mit den Einzelvariablen dieses Scores.	39
Tabelle 17: Ergebnisse der Kreuztabelle des PS29MRCdic für Therapieversagen mit dem Cut-Off-Wert bei 0,4 und 0,7.....	41
Tabelle 18: Vergleich der diagnostischen Gütekriterien des PS29MRCdic in Abhängigkeit vom Cut-Off-Wert.	42
Tabelle 19: Ergebnisse der Kreuztabelle des PS29MRCdic für Therapieversagen in MRC-Subgruppen.....	42
Tabelle 20: Ergebnisse der Kreuztabelle des PS29MRCdic für Therapieversagen in ELN-2017-Subgruppen.....	44
Tabelle 21: Ergebnisse der Kreuztabelle des PS29MRCdic für Therapieversagen in <i>de-novo</i> - und sekundärer AML.	46
Tabelle 22: Ergebnisse der Kreuztabelle des PS29MRCdic für Therapieversagen in den Altersgruppen.	47
Tabelle 23: Ergebnisse der Kreuztabelle des PS29MRCdic für Therapieversagen in den Therapie-Subgruppen.....	48

Tabelle 24: Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem PS29MRCdic in ausgewählten Subgruppen.	50
Tabelle 25: Vergleich der diagnostischen Gütekriterien des PS29MRCdic in ausgewählten Subgruppen.	51
Tabelle 26: Ergebnisse der Cox-Regressions-Überlebensanalysen des PS29MRCcont sowie des PS29MRCdic.	57
Tabelle 27: Ergebnisse der univariaten und multivariaten logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem PS29MRCdic und mit neun weiteren prädiktiven Variablen im Gesamtkollektiv.	68
Tabelle 28: Ergebnisse der univariaten und multivariaten logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem PS29MRCdic und neun weiteren prädiktiven Variablen bei Patienten ab 60 Jahren.	69
Tabelle 29: Ergebnisse der multivariaten logistischen Regressionsanalysen zur Prädiktion eines Therapieversagens mit dem PS29MRCcont und mit neun weiteren prädiktiven Variablen im Gesamtkollektiv und bei Patienten ab 60 Jahren.	70
Tabelle 30: Ergebnisse der univariaten und multivariaten Cox-Regressions-Überlebensanalysen mit dem PS29MRCcont.	71
Tabelle 31: Ergebnisse der univariaten und multivariaten Cox-Regressions-Überlebensanalysen mit dem PS29MRCdic.	72

8.4 Literaturverzeichnis

Albain, Kathy S.; Barlow, William E.; Shak, Steven; Hortobagyi, Gabriel N.; Livingston, Robert B.; Yeh, I-Tien et al. (2010): Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. In: *The Lancet Oncology* 11 (1), S. 55–65. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70314-6.

Appelbaum, Frederick R.; Gundacker, Holly; Head, David R.; Slovak, Marilyn L.; Willman, Cheryl L.; Godwin, John E. et al. (2006): Age and acute myeloid leukemia. In: *Blood* 107 (9), S. 3481–3485. DOI: 10.1182/blood-2005-09-3724.

Arber, Daniel A.; Orazi, Attilio; Hasserjian, Robert; Thiele, Jürgen; Borowitz, Michael J.; Le Beau, Michelle M. et al. (2016): The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. In: *Blood* 127 (20), S. 2391–2405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.

Bhatt, Vijaya Raj (2019): Personalizing therapy for older adults with acute myeloid leukemia: Role of geriatric assessment and genetic profiling. In: *Cancer treatment reviews* 75, S. 52–61. DOI: 10.1016/j.ctrv.2019.04.001.

Bøyum, A.; Løvhaug, D.; Tresland, L.; Nordlie, E. M. (1991): Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. In: *Scandinavian journal of immunology* 34 (6), S. 697–712. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1991.tb01594.x.

Braess, Jan; Amler, Susanne; Kreuzer, Karl-Anton; Spiekermann, Karsten; Lindemann, Hans Walter; Lengfelder, Eva et al. (2018): Sequential high-dose cytarabine and mitoxantrone (S-HAM) versus standard double induction in acute myeloid leukemia—a phase 3 study. In: *Leukemia* 32 (12), S. 2558–2571. DOI: 10.1038/s41375-018-0268-9.

Brandwein, Joseph M.; Saini, Lalit; Geddes, Michelle N.; Yusuf, Dimas; Liu, Fei; Schwann, Kiersten et al. (2020): Outcomes of patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia: a population-based real-world study. In: *American Journal of Blood Research* 10 (4), S. 124–133.

Büchner, T.; Krug, U. O.; Peter Gale, R.; Heinecke, A.; Sauerland, M. C.; Haferlach, C. et al. (2016): Age, not therapy intensity, determines outcomes of adults with acute myeloid leukemia. In: *Leukemia* 30 (8), S. 1781–1784. DOI: 10.1038/leu.2016.54.

Büchner, Thomas; Berdel, Wolfgang E.; Schoch, Claudia; Haferlach, Torsten; Serve, Hubert L.; Kienast, Joachim et al. (2006): 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. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (16), S. 2480–2489. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.5013.

Burnett, Alan K.; Russell, Nigel H.; Hills, Robert K.; Kell, Jonathan; Freeman, Sylvie; Kjeldsen, Lars et al. (2012): Addition of gemtuzumab ozogamicin to

induction chemotherapy improves survival in older patients with acute myeloid leukemia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (32), S. 3924–3931. DOI: 10.1200/JCO.2012.42.2964.

Buyse, Marc; Loi, Sherene; van't Veer, Laura; Viale, Giuseppe; Delorenzi, Mauro; Glas, Annuska M. et al. (2006): Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. In: *Journal of the National Cancer Institute* 98 (17), S. 1183–1192. DOI: 10.1093/jnci/djj329.

Castaigne, Sylvie; Pautas, Cécile; Terré, Christine; Raffoux, Emmanuel; Bordessoule, Dominique; Bastie, Jean-Noel et al. (2012): Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. In: *The Lancet* 379 (9825), S. 1508–1516. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60485-1.

Chen, Jianjun; Odenike, Olatoyosi; Rowley, Janet D. (2010): Leukaemogenesis: more than mutant genes. In: *Nature reviews. Cancer* 10 (1), S. 23–36. DOI: 10.1038/nrc2765.

Cheson, Bruce D.; Bennett, John M.; Kopecky, Kenneth J.; Büchner, Thomas; Willman, Cheryl L.; Estey, Elihu H. et al. (2003): Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (24), S. 4642–4649. DOI: 10.1200/JCO.2003.04.036.

Clark, Gary M.; Zborowski, Denni M.; Culbertson, Jennifer L.; Whitehead, Marlo; Savoie, Michelle; Seymour, Lesley; Shepherd, Frances A. (2006): Clinical utility of epidermal growth factor receptor expression for selecting patients with advanced non-small cell lung cancer for treatment with erlotinib. In: *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 1 (8), S. 837–846.

Cojocari, Dan; Smith, Brianna N.; Purkal, Julie J.; Arrate, Maria P.; Huska, Jason D.; Xiao, Yu et al. (2022): Pevonedistat and azacitidine upregulate NOXA (PMAIP1) to increase sensitivity to venetoclax in preclinical models of acute myeloid leukemia. In: *Haematologica* 107 (4), S. 825–835. DOI: 10.3324/haematol.2020.272609.

Cucchi, David G. J.; Polak, Tobias B.; Ossenkoppele, Gert J.; Uyl-De Groot, Carin A.; Cloos, Jacqueline; Zweegman, Sonja; Janssen, Jeroen J. W. M. (2021): Two decades of targeted therapies in acute myeloid leukemia. In: *Leukemia* 35 (3), S. 651–660. DOI: 10.1038/s41375-021-01164-x.

Denkert, Carsten; Kronenwett, Ralf; Schlake, Werner; Bohmann, Kerstin; Penzel, Roland; Weber, Karsten E. et al. (2012): Decentral gene expression analysis for ER+/Her2- breast cancer: results of a proficiency testing program for the EndoPredict assay. In: *Virchows Archiv* 460 (3), S. 251–259. DOI: 10.1007/s00428-012-1204-4.

- Deschler, Barbara; Lübbert, Michael (2006): Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. In: *Cancer* 107 (9), S. 2099–2107. DOI: 10.1002/cncr.22233.
- DiNardo, Courtney D.; Jonas, Brian A.; Pullarkat, Vinod; Thirman, Michael J.; Garcia, Jacqueline S.; Wei, Andrew H. et al. (2020): Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. In: *The New England journal of medicine* 383 (7), S. 617–629. DOI: 10.1056/NEJMoa2012971.
- Döhner, Hartmut; Estey, Elihu; Grimwade, David; Amadori, Sergio; Appelbaum, Frederick R.; Büchner, Thomas et al. (2017): Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. In: *Blood* 129 (4), S. 424–447. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196.
- Döhner, Hartmut; Weisdorf, Daniel J.; Bloomfield, Clara D. (2015): Acute Myeloid Leukemia. In: *The New England journal of medicine* 373 (12), S. 1136–1152. DOI: 10.1056/NEJMra1406184.
- Draghici, Sorin; Khatri, Purvesh; Eklund, Aron C.; Szallasi, Zoltan (2006): Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. In: *Trends in genetics : TIG* 22 (2), S. 101–109. DOI: 10.1016/j.tig.2005.12.005.
- Eastel, Jennifer Mary; Lam, Ka Wai; Lee, Nga Lam; Lok, Wing Yan; Tsang, Andy Hin Fung; Pei, Xiao Meng et al. (2019): Application of NanoString technologies in companion diagnostic development. In: *Expert Review of Molecular Diagnostics* 19 (7), S. 591–598. DOI: 10.1080/14737159.2019.1623672.
- Eisenberg, Eli; Levanon, Erez Y. (2013): Human housekeeping genes, revisited. In: *Trends in genetics : TIG* 29 (10), S. 569–574. DOI: 10.1016/j.tig.2013.05.010.
- Fenaux, Pierre; Mufti, Ghulam J.; Hellström-Lindberg, Eva; Santini, Valeria; Gattermann, Norbert; Germing, Ulrich et al. (2010): Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (4), S. 562–569. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.8329.
- Ferguson, Paul; Hills, Robert K.; Grech, Angela; Betteridge, Sophie; Kjeldsen, Lars; Dennis, Michael et al. (2016): An operational definition of primary refractory acute myeloid leukemia allowing early identification of patients who may benefit from allogeneic stem cell transplantation. In: *Haematologica* 101 (11), S. 1351–1358. DOI: 10.3324/haematol.2016.148825.
- Forsberg, E. Camilla; Passegué, Emmanuelle; Prohaska, Susan S.; Wagers, Amy J.; Koeva, Martina; Stuart, Joshua M.; Weissman, Irving L. (2010): Molecular signatures of quiescent, mobilized and leukemia-initiating hematopoietic stem cells. In: *PloS one* 5 (1), e8785. DOI: 10.1371/journal.pone.0008785.
- Fröhling, Stefan; Schlenk, Richard F.; Kayser, Sabine; Morhardt, Martina; Benner, Axel; Döhner, Konstanze; Döhner, Hartmut (2006): Cytogenetics and

age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. In: *Blood* 108 (10), S. 3280–3288. DOI: 10.1182/blood-2006-04-014324.

Geiss, Gary K.; Bumgarner, Roger E.; Birditt, Brian; Dahl, Timothy; Dowidar, Naeem; Dunaway, Dwayne L. et al. (2008): Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. In: *Nature biotechnology* 26 (3), S. 317–325. DOI: 10.1038/nbt1385.

Goossens, Nicolas; Nakagawa, Shigeki; Sun, Xiaochen; Hoshida, Yujin (2015): Cancer biomarker discovery and validation. In: *Translational cancer research* 4 (3), S. 256–269. DOI: 10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.04.

Green, Steven D.; Konig, Heiko (2020): Treatment of Acute Myeloid Leukemia in the Era of Genomics-Achievements and Persisting Challenges. In: *Frontiers in Genetics* 11, S. 480. DOI: 10.3389/fgene.2020.00480.

Grimwade, David; Hills, Robert K.; Moorman, Anthony V.; Walker, Helen; Chatters, Stephen; Goldstone, Anthony H. et al. (2010): Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. In: *Blood* 116 (3), S. 354–365. DOI: 10.1182/blood-2009-11-254441.

Gurnari, Carmelo; Pagliuca, Simona; Visconte, Valeria (2020): Deciphering the Therapeutic Resistance in Acute Myeloid Leukemia. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22). DOI: 10.3390/ijms21228505.

Hao, Taisen; Li-Talley, Min; Buck, Alison; Chen, WenYong (2019): An emerging trend of rapid increase of leukemia but not all cancers in the aging population in the United States. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 12070. DOI: 10.1038/s41598-019-48445-1.

Herold, Tobias; Jurinovic, Vindi; Batcha, Aarif M. N.; Bamopoulos, Stefanos A.; Rothenberg-Thurley, Maja; Ksienzyk, Bianka et al. (2018): A 29-gene and cytogenetic score for the prediction of resistance to induction treatment in acute myeloid leukemia. In: *Haematologica* 103 (3), S. 456–465. DOI: 10.3324/haematol.2017.178442.

Herold, Tobias; Rothenberg-Thurley, Maja; Grunwald, Victoria V.; Janke, Hanna; Goerlich, Dennis; Sauerland, Maria C. et al. (2020): Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. In: *Leukemia*. DOI: 10.1038/s41375-020-0806-0.

Hills, Robert K.; Castaigne, Sylvie; Appelbaum, Frederick R.; Delaunay, Jacques; Petersdorf, Stephen; Othus, Megan et al. (2014): Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. In: *The Lancet Oncology* 15 (9), S. 986–996. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70281-5.

Howlader, N; Noone, AM; Krapcho, M; Miller, D; Brest, A; Yu, M et al. (2020): SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018. National Cancer Institute,

Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/, based on November 2020 SEER data submission, posted to the SEER website, April 2021.

Huang, Rui; Liao, Xiwen; Li, Qiaochuan (2018): Identification of key pathways and genes in TP53 mutation acute myeloid leukemia: evidence from bioinformatics analysis. In: *OncoTargets and therapy* 11, S. 163–173. DOI: 10.2147/OTT.S156003.

Huet, Sarah; Tesson, Bruno; Jais, Jean-Philippe; Feldman, Andrew L.; Magnano, Laura; Thomas, Emilie et al. (2018): A gene-expression profiling score for prediction of outcome in patients with follicular lymphoma: a retrospective training and validation analysis in three international cohorts. In: *The Lancet Oncology* 19 (4), S. 549–561. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30102-5.

Hulegårdh, Erik; Nilsson, Christer; Lazarevic, Vladimir; Garelius, Hege; Antunovic, Petar; Rangert Derolf, Åsa et al. (2015): Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: a report from the Swedish Acute Leukemia Registry. In: *American journal of hematology* 90 (3), S. 208–214. DOI: 10.1002/ajh.23908.

Ishihara, Ryu; Yamada, Takuya; Iishi, Hiroyasu; Kato, Motohiko; Yamamoto, Shunsuke; Yamamoto, Sachiko et al. (2009): Quantitative analysis of the color change after iodine staining for diagnosing esophageal high-grade intraepithelial neoplasia and invasive cancer. In: *Gastrointestinal endoscopy* 69 (2), S. 213–218. DOI: 10.1016/j.gie.2008.04.052.

Juliusson, Gunnar; Antunovic, Petar; Derolf, Asa; Lehmann, Sören; Möllgård, Lars; Stockelberg, Dick et al. (2009): Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. In: *Blood* 113 (18), S. 4179–4187. DOI: 10.1182/blood-2008-07-172007.

Kadia, Tapan M.; Jain, Preetesh; Ravandi, Farhad; Garcia-Manero, Guillermo; Andreef, Michael; Takahashi, Koichi et al. (2016): TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: Clinicomolecular characteristics, response to therapy, and outcomes. In: *Cancer* 122 (22), S. 3484–3491. DOI: 10.1002/cncr.30203.

Kantarjian, Hagop; Kadia, Tapan; DiNardo, Courtney; Daver, Naval; Borthakur, Gautam; Jabbour, Elias et al. (2021): Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. In: *Blood cancer journal* 11 (2), S. 41. DOI: 10.1038/s41408-021-00425-3.

Kantarjian, Hagop M.; Thomas, Xavier G.; Dmoszynska, Anna; Wierzbowska, Agnieszka; Mazur, Grzegorz; Mayer, Jiri et al. (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. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (21), S. 2670–2677. DOI: 10.1200/JCO.2011.38.9429.

- Khalife, J.; Radomska, H. S.; Santhanam, R.; Huang, X.; Neviani, P.; Saultz, J. et al. (2015): Pharmacological targeting of miR-155 via the NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924 (Pevonedistat) in FLT3-ITD acute myeloid leukemia. In: *Leukemia* 29 (10), S. 1981–1992. DOI: 10.1038/leu.2015.106.
- Kohlmann, A.; Bullinger, L.; Thiede, C.; Schaich, M.; Schnittger, S.; Döhner, K. et al. (2010): Gene expression profiling in AML with normal karyotype can predict mutations for molecular markers and allows novel insights into perturbed biological pathways. In: *Leukemia* 24 (6), S. 1216–1220. DOI: 10.1038/leu.2010.73.
- Kouchkovsky, I. de; Abdul-Hay, M. (2016): 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. In: *Blood cancer journal* 6 (7), e441. DOI: 10.1038/bcj.2016.50.
- Krug, Utz; Röllig, Christoph; Koschmieder, Anja; Heinecke, Achim; Sauerland, Maria Cristina; Schaich, Markus et al. (2010): Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. In: *The Lancet* 376 (9757), S. 2000–2008. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62105-8.
- Kukurba, Kimberly R.; Montgomery, Stephen B. (2015): RNA Sequencing and Analysis. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2015 (11), S. 951–969. DOI: 10.1101/pdb.top084970.
- Kulkarni, Meghana M. (2011): Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system. In: *Current protocols in molecular biology* Chapter 25, Unit25B.10. DOI: 10.1002/0471142727.mb25b10s94.
- Lambert, Juliette; Pautas, Cécile; Terré, Christine; Raffoux, Emmanuel; Turlure, Pascal; Caillot, Denis et al. (2019): Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial. In: *Haematologica* 104 (1), S. 113–119. DOI: 10.3324/haematol.2018.188888.
- Lancet, Jeffrey E.; Uy, Geoffrey L.; Cortes, Jorge E.; Newell, Laura F.; Lin, Tara L.; Ritchie, Ellen K. et al. (2018): CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 36 (26), S. 2684–2692. DOI: 10.1200/JCO.2017.77.6112.
- Ley, Timothy J.; Miller, Christopher; Ding, Li; Raphael, Benjamin J.; Mungall, Andrew J.; Robertson, A. Gordon et al. (2013): Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. In: *The New England journal of medicine* 368 (22), S. 2059–2074. DOI: 10.1056/NEJMoa1301689.
- Li, Jingming; Jin, Wen; Tan, Yun; Wang, Beichen; Wang, Xiaoling; Zhao, Ming; Wang, Kankan (2021): Distinct gene expression pattern of RUNX1 mutations coordinated by target repression and promoter hypermethylation in acute myeloid leukemia. In: *Frontiers of medicine*. DOI: 10.1007/s11684-020-0815-4.

- Licht, Jonathan D.; Sternberg, David W. (2005): The molecular pathology of acute myeloid leukemia. In: *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, S. 137–142. DOI: 10.1182/asheducation-2005.1.137.
- Liersch, Ruediger; Müller-Tidow, Carsten; Berdel, Wolfgang E.; Krug, Utz (2014): Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults--biological significance and clinical use. In: *British journal of haematology* 165 (1), S. 17–38. DOI: 10.1111/bjh.12750.
- Malkan, Umit Yavuz; Gunes, Gursel; Eliacik, Eylem; Haznedaroglu, Ibrahim Celalettin; Etgul, Sezgin; Aslan, Tuncay et al. (2015): The factors affecting early death after the initial therapy of acute myeloid leukemia. In: *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (12), S. 22564–22569.
- Marcucci, Guido; Maharry, Kati S.; Metzeler, Klaus H.; Volinia, Stefano; Wu, Yue-Zhong; Mrózek, Krzysztof et al. (2013): Clinical role of microRNAs in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: miR-155 upregulation independently identifies high-risk patients. In: *Journal of Clinical Oncology* 31 (17), S. 2086–2093. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.6228.
- Metzeler, Klaus H.; Herold, Tobias; Rothenberg-Thurley, Maja; Amler, Susanne; Sauerland, Maria C.; Görlich, Dennis et al. (2016): Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. In: *Blood* 128 (5), S. 686–698. DOI: 10.1182/blood-2016-01-693879.
- Metzeler, Klaus H.; Hummel, Manuela; Bloomfield, Clara D.; Spiekermann, Karsten; Braess, Jan; Sauerland, Maria-Cristina et al. (2008): An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. In: *Blood* 112 (10), S. 4193–4201. DOI: 10.1182/blood-2008-02-134411.
- Moser, Christian; Jurinovic, Vindi; Sagebiel-Kohler, Sabine; Ksienzyk, Bianka; Batcha, Aarif M. N.; Dufour, Annika et al. (2021): A clinically applicable gene expression-based score predicts resistance to induction treatment in acute myeloid leukemia. In: *Blood Advances* 5 (22), S. 4752–4761. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021004814.
- Mrózek, Krzysztof; Marcucci, Guido; Paschka, Peter; Whitman, Susan P.; Bloomfield, Clara D. (2007): Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? In: *Blood* 109 (2), S. 431–448. DOI: 10.1182/blood-2006-06-001149.
- Muller, Matthew P.; Tomlinson, George; Marrie, Thomas J.; Tang, Patrick; McGeer, Allison; Low, Donald E. et al. (2005): Can routine laboratory tests discriminate between severe acute respiratory syndrome and other causes of community-acquired pneumonia? In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 40 (8), S. 1079–1086. DOI: 10.1086/428577.

- Narrandes, Shavira; Xu, Wayne (2018): Gene Expression Detection Assay for Cancer Clinical Use. In: *Journal of Cancer* 9 (13), S. 2249–2265. DOI: 10.7150/jca.24744.
- Nennecke, A.; Wienecke, A.; Kraywinkel, K. (2014): Inzidenz und Überleben bei Leukämien in Deutschland nach aktuellen standardisierten Kategorien. In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 57 (1), S. 93–102. DOI: 10.1007/s00103-013-1869-0.
- Ng, Stanley W. K.; Mitchell, Amanda; Kennedy, James A.; Chen, Weihsu C.; McLeod, Jessica; Ibrahimova, Narmin et al. (2016): A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. In: *Nature* 540 (7633), S. 433–437. DOI: 10.1038/nature20598.
- Pescarmona, Rémi; Belot, Alexandre; Villard, Marine; Besson, Laurie; Lopez, Jonathan; Mosnier, Isabelle et al. (2019): Comparison of RT-qPCR and Nanostring in the measurement of blood interferon response for the diagnosis of type I interferonopathies. In: *Cytokine* 113, S. 446–452. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.10.023.
- Platzbecker, Uwe; Avvisati, Giuseppe; Cicconi, Laura; Thiede, Christian; Paoloni, Francesca; Vignetti, Marco et al. (2017): Improved Outcomes With Retinoic Acid and Arsenic Trioxide Compared With Retinoic Acid and Chemotherapy in Non-High-Risk Acute Promyelocytic Leukemia: Final Results of the Randomized Italian-German APL0406 Trial. In: *Journal of Clinical Oncology* 35 (6), S. 605–612. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.1982.
- Pritchett, David; Reddy, Akhilesh B. (2015): Circadian Clocks in the Hematologic System. In: *Journal of biological rhythms* 30 (5), S. 374–388. DOI: 10.1177/0748730415592729.
- Pulte, Dianne; Jansen, Lina; Castro, Felipe A.; Krilaviciute, Agne; Katalinic, Alexander; Barnes, Benjamin et al. (2016): Survival in patients with acute myeloblastic leukemia in Germany and the United States: Major differences in survival in young adults. In: *International journal of cancer* 139 (6), S. 1289–1296. DOI: 10.1002/ijc.30186.
- Qin, Yao; Kuang, Pu; Liu, Ting (2022): Venetoclax combined with hypomethylating agents or low-dose cytarabine as induction chemotherapy for patients with untreated acute myeloid leukemia ineligible for intensive chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. In: *Clinical and experimental medicine*. DOI: 10.1007/s10238-021-00784-y.
- Ravandi, Farhad (2011): Primary refractory acute myeloid leukaemia - in search of better definitions and therapies. In: *British journal of haematology* 155 (4), S. 413–419. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08869.x.
- Reis, Patricia P.; Waldron, Levi; Goswami, Rashmi S.; Xu, Wei; Xuan, Yali; Perez-Ordóñez, Bayardo et al. (2011): mRNA transcript quantification in archival samples using multiplexed, color-coded probes. In: *BMC biotechnology* 11, S. 46. DOI: 10.1186/1472-6750-11-46.

Roberts, Megan C.; Bryson, Amy; Weinberger, Morris; Dusetzina, Stacie B.; Dinan, Michaela A.; Reeder-Hayes, Katherine E.; Wheeler, Stephanie B. (2016): Patient-Centered Communication for Discussing Oncotype DX Testing. In: *Cancer investigation* 34 (5), S. 205–212. DOI: 10.3109/07357907.2016.1172637.

Roelen, Corné A.; van Rhenen, Willem; Groothoff, Johan W.; van der Klink, Jac J.; Bültmann, Ute; Heymans, Martijn W. (2013): The development and validation of two prediction models to identify employees at risk of high sickness absence. In: *European journal of public health* 23 (1), S. 128–133. DOI: 10.1093/eurpub/cks036.

Sasaki, Koji; Ravandi, Farhad; Kadia, Tapan M.; DiNardo, Courtney D.; Short, Nicholas J.; Borthakur, Gautam et al. (2021): De novo acute myeloid leukemia: A population-based study of outcome in the United States based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database, 1980 to 2017. In: *Cancer* 127 (12), S. 2049–2061. DOI: 10.1002/cncr.33458.

Schlenk, Richard F.; Döhner, Hartmut (2013): Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. In: *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2013, S. 324–330. DOI: 10.1182/asheducation-2013.1.324.

Sekeres, Mikkael A.; Elson, Paul; Kalaycio, Matt E.; Advani, Anjali S.; Copelan, Edward A.; Faderl, Stefan et al. (2009): Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. In: *Blood* 113 (1), S. 28–36. DOI: 10.1182/blood-2008-05-157065.

Shivarov, Velizar; Gueorguieva, Ralitzia; Ivanova, Milena; Tiu, Ramon V. (2015): ASXL1 mutations define a subgroup of patients with acute myeloid leukemia with distinct gene expression profile and poor prognosis: a meta-analysis of 3311 adult patients with acute myeloid leukemia. In: *Leukemia & Lymphoma* 56 (6), S. 1881–1883. DOI: 10.3109/10428194.2014.974596.

Slats, A. M.; Egeler, R. M.; van der Does-van den Berg, A.; Korbijn, C.; Hählen, K.; Kamps, W. A. et al. (2005): Causes of death--other than progressive leukemia--in childhood acute lymphoblastic (ALL) and myeloid leukemia (AML): the Dutch Childhood Oncology Group experience. In: *Leukemia* 19 (4), S. 537–544. DOI: 10.1038/sj.leu.2403665.

Southam, Chester M.; Craver, Lloyd F.; Dargeon, Harold W.; Burchenal, Joseph H. (1951): A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. In: *Cancer* 4 (1), S. 39–59. DOI: 10.1002/1097-0142(195101)4:1<39::aid-cncr2820040105>3.0.co;2-g.

Steinman, Richard A. (2002): Cell cycle regulators and hematopoiesis. In: *Oncogene* 21 (21), S. 3403–3413. DOI: 10.1038/sj.onc.1205325.

Stone, Richard M.; Mandrekar, Sumithra J.; Sanford, Ben L.; Laumann, Kristina; Geyer, Susan; Bloomfield, Clara D. et al. (2017): Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. In: *The New*

England journal of medicine 377 (5), S. 454–464. DOI: 10.1056/NEJMoa1614359.

Swords, Ronan T.; Erba, Harry P.; DeAngelo, Daniel J.; Bixby, Dale L.; Altman, Jessica K.; Maris, Michael et al. (2015): Pevonedistat (MLN4924), a First-in-Class NEDD8-activating enzyme inhibitor, in patients with acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes: a phase 1 study. In: *British journal of haematology* 169 (4), S. 534–543. DOI: 10.1111/bjh.13323.

Tang, Jih-Luh; Kung, Hsiang-Chi; Lei, Weng-Chi; Yao, Ming; Wu, Un-In; Hsu, Szu-Chun et al. (2015): High Incidences of Invasive Fungal Infections in Acute Myeloid Leukemia Patients Receiving Induction Chemotherapy without Systemic Antifungal Prophylaxis: A Prospective Observational Study in Taiwan. In: *PloS one* 10 (6), e0128410. DOI: 10.1371/journal.pone.0128410.

Taskesen, Erdogan; Bullinger, Lars; Corbacioglu, Andrea; Sanders, Mathijs A.; Erpelinck, Claudia A. J.; Wouters, Bas J. et al. (2011): Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. In: *Blood* 117 (8), S. 2469–2475. DOI: 10.1182/blood-2010-09-307280.

Tsang, Hin-Fung; Xue, Vivian Weiwen; Koh, Su-Pin; Chiu, Ya-Ming; Ng, Lawrence Po-Wah; Wong, Sze-Chuen Cesar (2017): NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics. In: *Expert Review of Molecular Diagnostics* 17 (1), S. 95–103. DOI: 10.1080/14737159.2017.1268533.

Veldman-Jones, Margaret H.; Brant, Roz; Rooney, Claire; Geh, Catherine; Emery, Hollie; Harbron, Chris G. et al. (2015): Evaluating Robustness and Sensitivity of the NanoString Technologies nCounter Platform to Enable Multiplexed Gene Expression Analysis of Clinical Samples. In: *Cancer research* 75 (13), S. 2587–2593. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0262.

Wallden, Brett; Storhoff, James; Nielsen, Torsten; Dowidar, Naeem; Schaper, Carl; Ferree, Sean et al. (2015): Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. In: *BMC medical genomics* 8, S. 54. DOI: 10.1186/s12920-015-0129-6.

Walter, R. B.; Othus, M.; Burnett, A. K.; Löwenberg, B.; Kantarjian, H. M.; Ossenkopppele, G. J. et al. (2015): Resistance prediction in AML: analysis of 4601 patients from MRC/NCRI, HOVON/SAKK, SWOG and MD Anderson Cancer Center. In: *Leukemia* 29 (2), S. 312–320. DOI: 10.1038/leu.2014.242.

Webster, Jonathan A.; Pratz, Keith W. (2018): Acute myeloid leukemia in the elderly: therapeutic options and choice. In: *Leukemia & Lymphoma* 59 (2), S. 274–287. DOI: 10.1080/10428194.2017.1330956.

Wei, Andrew H.; Tiong, Ing S. (2017): Midostaurin, enasidenib, CPX-351, gemtuzumab ozogamicin, and venetoclax bring new hope to AML. In: *Blood* 130 (23), S. 2469–2474. DOI: 10.1182/blood-2017-08-784066.

Woelich, Susan K.; Braun, James T.; Schoen, Martin W.; Ramlal, Reshma; Freter, Carl E.; Petruska, Paul J.; Lionberger, Jack M. (2017): Efficacy and Toxicity of Induction Therapy with Cladribine, Idarubicin, and Cytarabine (IAC) for Acute Myeloid Leukemia. In: *Anticancer research* 37 (2), S. 713–717. DOI: 10.21873/anticancer.11368.

Wolska-Washer, Anna; Robak, Tadeusz (2019): Glasdegib in the treatment of acute myeloid leukemia. In: *Future oncology (London, England)* 15 (28), S. 3219–3232. DOI: 10.2217/fon-2019-0171.

Wouters, Bas J.; Löwenberg, Bob; Erpelinck-Verschueren, Claudia A. J.; van Putten, Wim L. J.; Valk, Peter J. M.; Delwel, Ruud (2009): Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. In: *Blood* 113 (13), S. 3088–3091. DOI: 10.1182/blood-2008-09-179895.

Yates, J. W.; Wallace, H. J.; Ellison, R. R.; Holland, J. F. (1973): Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. In: *Cancer chemotherapy reports* 57 (4), S. 485–488.

Zhang, Wei; Petegrosso, Raphael; Chang, Jae-Woong; Sun, Jiao; Yong, Jeongsik; Chien, Jeremy; Kuang, Rui (2020): A large-scale comparative study of isoform expressions measured on four platforms. In: *BMC genomics* 21 (1), S. 272. DOI: 10.1186/s12864-020-6643-8.

9 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Originalarbeit

Moser, Christian; Jurinovic, Vindi; Sagebiel-Kohler, Sabine; Ksienzyk, Bianka; Batcha, Aarif M. N.; Dufour, Annika; Schneider, Stephanie; Rothenberg-Thurley, Maja; Sauerland, Cristina M.; Görlich, Dennis; Berdel, Wolfgang E.; Krug, Utz; Mansmann, Ulrich; Hiddemann, Wolfgang; Braess, Jan; Spiekermann, Karsten; Greif, Philipp A.; Vosberg, Sebastian; Metzeler, Klaus H.; Kumbrink, Jörg; Herold, Tobias (2021):

A clinically applicable gene expression-based score predicts resistance to induction treatment in acute myeloid leukemia.

In: *Blood Advances* 5 (22), S. 4752–4761.

Poster

Moser, Christian; Jurinovic, Vindi; Metzeler, Klaus; Kumbrink, Jörg; Herold Tobias (2019):

Validation of a gene expression-based classifier for the prediction of resistance to induction treatment in acute myeloid leukemia.

Einundzwanzigstes wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Klinikum der Universität München Großhadern; Herrsching, Deutschland, Juli 2019.

Moser, Christian; Jurinovic, Vindi; Sagebiel-Kohler, Sabine; Ksienzyk, Bianka; Metzeler, Klaus H.; Kumbrink, Jörg; Herold, Tobias (2020):

Validation of a gene expression-based classifier for the prediction of resistance to induction treatment in acute myeloid leukemia.

25th Congress of the European Hematology Association, Juni 2020.

10 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

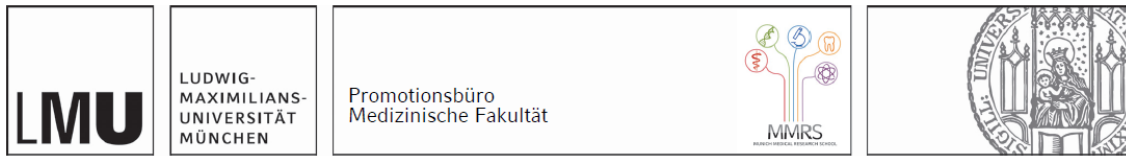
Besonders danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Tobias Herold für die Bereitstellung des Themas und für seine wertvolle Unterstützung und Anregungen.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Doktorarbeitsbetreuern Dr. Dipl.-Math. Vindi Jurinovic und Dr. Jörg Kumbrink für ihre intensive Unterstützung bei der Verwirklichung dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank dem Team des Labors für Leukämiediagnostik des Klinikum Großhadern und dem Team des Pathologischen Instituts der LMU. Insbesondere bei Sabine Sagebiel-Kohler, Bianka Ksienzyk und Dr. Stephanie Schneider möchte ich mich für ihre grenzenlose Geduld, Unterweisung in verschiedene molekularbiologische Methoden und fortwährende Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt auch den Patienten des AMLCG-Studienregisters sowie der AMLCG-Studienzentrale. Für die Datenübermittlung und eine hervorragende Kooperation bin ich insbesondere Dipl.-Math. Cristina Sauerland und Dr. Dipl.-Bioinf. Dennis Görlich sehr dankbar.

Schließlich möchte ich noch meinen Eltern Petra und Robert Moser danken, die mich während des gesamten Studiums mit Liebe und Fürsorge unterstützt haben.

11 Eidesstattliche Erklärung**Eidesstattliche Versicherung**

Moser, Christian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Validierung eines klinisch anwendbaren Biomarkers zur Vorhersage des Therapieansprechens bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 08.02.2024

Ort, Datum

Christian Moser

Unterschrift Doktorand