

Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik III
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann

Genetische Subgruppen und individuelle Krankheitsursache
der Akuten Myeloischen Leukämie (AML)

Habilitationsschrift
zum Erwerb der Lehrbefähigung für Experimentelle Innere Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Dr. med. Philipp Alexander Greif
aus München

2017

Inhalt

1. Einleitung	3
1.1 Hintergrund	3
1.2 Klinik, Diagnose und Klassifikation der AML	4
1.3 Therapie der AML	4
2. Eigene Arbeiten	5
2.1 Oncogene Kollaboration in genetischen Subgruppen der AML	5
2.1.1 AML mit CALM/AF10 Fusionsgen	5
2.1.2 AML mit t(15;17) Translokation (Akute Promyelozytenleukämie; APL)	6
2.1.3 AML mit biallelischen CEBPA Mutationen	7
2.1.4 AML mit RUNX1 Mutation	8
2.1.5 AML mit Trisomie 13	9
2.1.6 Core-binding Factor Leukämie	10
2.1.6.1 N676K Mutationen bei der AML mit inversion inv(16)	10
2.1.6.2 ZBTB7A Mutationen bei der AML mit Translokation t(8;21)	11
2.2 Diagnostische Anwendungen	12
2.2.1 Korrelation von NGS-Daten mit Zytogenetik	12
2.3 Klonale Tumorevolution	13
3. Ausblick	14
Zusammenfassung	15
Literaturverzeichnis	16
Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen	21
Eidesstattliche Erklärung	24
Danksagung	25

1. Einleitung

1.1 Hintergrund

Mit einer Häufigkeit von 3-4 Fällen pro 100.000 Einwohner im Jahr ist die Akute Myeloische Leukämie (AML) die häufigste akute Blutkrebserkrankung bei Erwachsenen. Die AML ist eine genetisch heterogene Erkrankung. Während etwa die Hälfte der AML-Patienten mindestens eine chromosomale Aberration aufweist, wird die andere Hälfte als zytogenetisch normal (CN-AML) eingeordnet. Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurde bei AML Patienten eine wachsende Anzahl von wiederholt auftretenden, somatischen Mutationen identifiziert. Trotz ihrer pathologischen und prognostischen Bedeutung, ist keine dieser Mutationen allein ausreichend, um AML auszulösen. Die Untersuchung von 200 unselektionierten AML-Patienten durch das TCGA-Konsortium erbrachte eine Liste von 23 signifikant mutierten Genen (TCGA, 2013) (Abb. 1). Allerdings wurden bei dieser wegweisenden Arbeit Mutationen nicht erfasst, die nur in definierten genetischen Subgruppen auftreten. Lawrence und Kollegen schätzten, dass ein umfassender Katalog von häufigen (>20%) und selteneren (2-20%) somatischen krebserrelevanten Punktmutationen die Untersuchung von etwa 2000 Tumoren pro Entität erfordert (Lawrence et al., 2014). Meine Forschung fokussiert sich daher auf die Untersuchung von genetischen Subgruppen der AML, in denen bei der Erkrankung insgesamt eher seltene Mutationen oft gehäuft auftreten und Hinweise auf die individuelle Krankheitsursache geben.

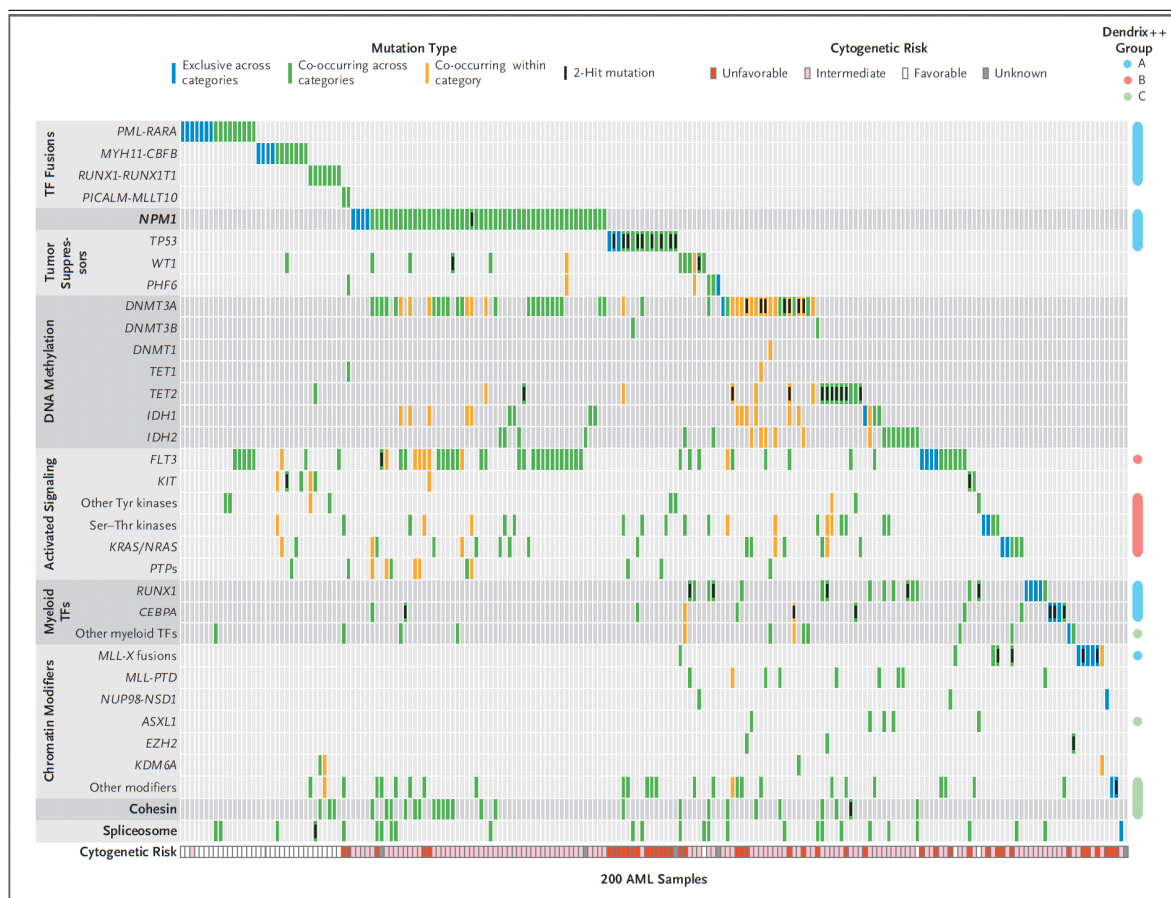


Abb. 1 Übersicht der Veränderungen von 23 signifikant mutierten Genen in 200 AML Patienten (TCGA, 2013).

1.2 Klinik, Diagnose und Klassifikation der AML

Durch die klonale Expansion von unreifen Blastenzellen (>20%) im Knochenmark kommt es bei der AML zu einer Unterdrückung der normalen Blutbildung mit den typischen Symptomen Anämie, Infektanfälligkeit und Blutungsneigung. Die French–American–British (FAB) Klassifikation teilt die AML in acht Subtypen ein (M0-M7) anhand morphologischer und zytochemischer Eigenschaften (Bennett et al., 1976). Bei der WHO-Klassifikation werden auch zyto- und molekulargenetische Kriterien berücksichtigt (Arber et al., 2016; Vardiman et al., 2009) (Tab. 1).

WHO 2008 classification of acute myeloid leukemia (Vardiman et al, 2009)
<ul style="list-style-type: none">• Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities• Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes• Therapy-related myeloid neoplasms• Acute myeloid leukemia, not otherwise specified

Tab. 1: Hauptkategorien der AML gemäß der WHO-Klassifikation.

Darüber hinaus hat eine Expertengruppe des European LeukemiaNet (ELN) genetische Risikogruppen der AML definiert, um die Vergleichbarkeit von klinischen Studien zu erleichtern (Dohner et al., 2017; Dohner et al., 2010). Beispielsweise gehen die Translokation t(8;21) und die Inversion inv(16) mit einem eher günstigen Krankheitsverlauf einher, während ein komplexer Karyotyp mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist.

1.3 Therapie der AML

Die Induktionschemotherapie der AML hat sich in den letzten 30 Jahren kaum geändert. Zumeist handelt es sich um die Gabe von Hochdosis Ara-C in Kombination mit einem Anthrazyklin wie z.B. das sog. 7+3 Schema. Je nach Alter, erreichen 40-80% der AML-Patienten eine Vollremission, definiert durch eine Reduktion der Blasten im Knochenmark auf <5% (Burnett et al., 2011). Im Anschluss erfolgt ggf. als Postremissionstherapie eine Konsolidierung, die entweder weitere Chemotherapiezyklen oder eine allogene Stammzelltransplantation beinhaltet. Die Empfehlung für eine allogene Stammzelltransplantation hängt vor allem vom genetischem Risikoprofil sowie vom Alter der Patienten ab (Dohner et al., 2015). Angesichts der hohen Therapie-assoziierten Mortalität der allogenen Stammzelltransplantation, hat die Stratifizierung anhand von genetischen Markern einen sehr hohen Stellenwert bzw. weitreichende Konsequenzen für die Patienten.

Bei Patienten, die nicht mit einer intensiven Chemotherapie behandelt werden können (z.B. aufgrund von Komorbiditäten), werden oftmals niedrig dosiertes Ara-C, Hydroxy-Harnstoff oder DNA-Hypomethylierende Substanzen im Rahmen einer palliativen Behandlung verabreicht (Dohner et al., 2015).

2. Eigene Arbeiten

2.1 Oncogene Kollaboration in genetischen Subgruppen der AML

2.1.1 AML mit CALM/AF10 Fusionsgen

Die Translokation t(10;11)(p13;q14) führt zu der Fusion der Proteine CALM und AF10 (Dreyling et al., 1996). Eine derartige Translokation kommt sowohl bei der Akuten Lymphatischen Leukämien (ALL), als auch bei der AML sowie bei malignen Lymphomen vor (Bohlander et al., 2000). Bei einigen Patienten ist die t(10;11) die einzige zytogenetische Veränderung, was darauf hin weist, dass die CALM/AF10 Fusion ein ursächliches Ereignis bei der Leukämogenese ist. Die Expression von CALM/AF10 in hämatopoetischen Zellen führt zur Entwicklung einer aggressiven Leukämie in murinen Modellen (Caudell et al., 2007; Deshpande et al., 2006; Dutta et al., 2016). CALM (Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid leukemia gene) hat eine Funktion bei der Clathrin-vermittelten Endocytose (Tebar et al., 1999). AF10, ein putativer Transkriptionsfaktor mit einem PHD-Motiv (plant homeo domain) und einer Leuzinzipper-Domäne, wurde ursprünglich als Fusionspartner von MLL kloniert (Chaplin et al., 1995; Linder et al., 2000). Durch welchen Mechanismus das CALM/AF10 Fusionsprotein zur Entstehung von Leukämien beiträgt, ist noch weitgehend unbekannt. Wir haben gezeigt, dass AF10 über die Leuzinzipper-Domäne mit dem Transkriptionsfaktor Ikaros (IKZF1) interagiert (Greif et al., 2008). Interessanterweise handelt es sich bei Ikaros um einen Schlüsselregulator der Hämatopoese. Ikaros wird insbesondere für eine normale Differenzierung bzw. Proliferation der B- und T-Lymphozyten benötigt (Georgopoulos et al., 1994; Georgopoulos et al., 1992; Georgopoulos et al., 1997). Durch Interaktion mit einer Vielzahl von Faktoren im Zellkern kann Ikaros anscheinend sowohl eine aktivierende als auch eine hemmende Wirkung auf die Transkription haben. In verschiedenen Formen der ALL sowie bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) konnten Deletionen von Ikaros nachgewiesen werden (Herold et al., 2016; Mullighan et al., 2008). Im Maus-Modell löst die Expression einer dominant-negativen Isoform von Ikaros Leukämien und Lymphome aus (Winandy et al., 1995). Während AF10 und Ikaros im Zellkern kolokalisieren, führt die Koexpression von CALM/AF10 und Ikaros zu einer veränderten zytoplasmatischen Ikaros-Lokalisation (Abb. 2) (Greif et al., 2008). Der hemmende Einfluss von AF10 auf Ikaros-abhängige Repression der Transkription ist bei CALM/AF10 abgeschwächt. Der lymphatische Phänotyp der Leukämie-propagierenden Zelle in

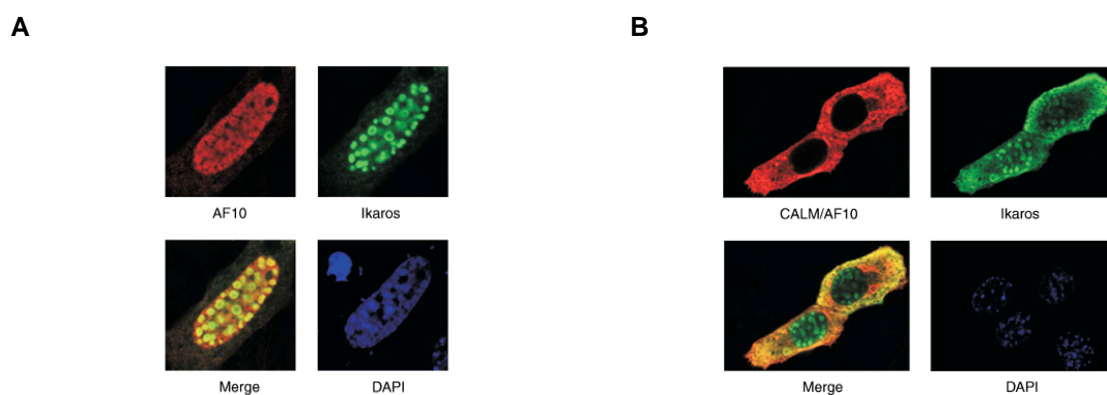


Abb. 2: Subzelluläre Lokalisation nach Immunfluoreszenzfärbung in NIH 3T3 Zellen von (A) AF10 und (B) CALM/AF10 jeweils in Kombination mit Ikaros (Greif et al., 2008).

einem retroviralen CALM/AF10 Mausmodell (Deshpande et al., 2006) ist möglicherweise durch die beeinträchtigte Ikaros-Funktion bedingt.

Kürzlich haben wir in einem transgenen CALM/AF10 Mausmodell mittels Exom-Sequenzierung systematisch nach sekundären genetischen Läsionen gesucht und dabei Mutationen in Flt3 und Ptpn11 gefunden, wobei das humane PTPN11 auch in CALM/AF10 positiven Patienten rekurrent mutiert ist (Dutta et al., 2016). Diese Ergebnisse zeigen, dass onkogene Kollaborationen in Mausmodellen und Patienten durchaus vergleichbar sind.

2.1.2 AML mit t(15;17) Translokation (Akute Promyelozytenleukämie; APL)

Die Akute Promyelozytenleukämie (APL) ist gekennzeichnet durch die Translokation t(15;17), die zur PML/RARA Fusion führt und dadurch die myeloische Differenzierung blockiert (de Thé H, 1990; de Thé H, 1991). Zur systematischen Suche nach sekundären genetischen Veränderungen haben wir drei APL Patienten mittels Exomsequenzierung untersucht und dabei u.a. Mutationen in den bekannten Driver-Genen KRAS und WT1 identifiziert (Greif et al., 2011b). Darüber hinaus fanden wir Mutationen in den Kandidatengen LYN und TMEM56, welche vor kurzem ebenfalls in einer unabhängigen Kohorte von 25 APL Patienten als rekurrent mutiert beschrieben wurden (Ibanez et al., 2016). TMEM56 kodiert ein bisher weitgehend unbekanntes Transmembranprotein, während die Tyrosinkinase LYN eine wichtige Rolle für die Erythropoese spielt (Slavova-Azmanova et al., 2013). Funktionelle Experimente wie z.B. Expression in Ba/F3 Zellen sind erforderlich, um das Transformationspotential von LYN Mutationen zu überprüfen.

2.1.3 AML mit biallelischen CEBPA Mutationen

Mittels Exomsequenzierung haben wir eine spezifische Assoziation von Mutationen in den interagierenden Transkriptionsfaktoren CEBPA und GATA2 entdeckt (Greif et al., 2012a). Diese Transkriptionsfaktoren sind für die Regulation der myeloischen Blutbildung wichtig. Erbliche und erworbene Läsionen der beiden Gene sind ursächlich mit der Entwicklung von Leukämie vergesellschaftet (West et al., 2014). Interessanter Weise fanden wir somatische GATA2 Mutationen ausschließlich bei AML Patienten mit biallelischen CEBPA Mutationen (13/33, 39.4%) (Abb. 3 A). Dabei handelt es sich um eine wichtige klinische Subgruppe mit einer eher günstigen Prognose (Dufour et al., 2009; Green et al., 2010; Wouters et al., 2009). Innerhalb der Subgruppe von Patienten mit CEBPA Doppelmutation beobachteten wir einen günstigeren Krankheitsverlauf für die Patienten mit zusätzlicher GATA2 Mutation, während andere Studiengruppen diesen Zusammenhang nicht bestätigen konnten (Theis et al., 2016).

In funktionellen Experimenten zeigten wir, dass durch diese Genmutationen der Synergismus der Transkriptionsfaktoren bei der Aktivierung von Zielgenen verloren geht (Abb. 3 B). Vereinbar mit diesem Mechanismus beobachteten wir bei den Patienten mit Mutationen in beiden Transkriptionsfaktoren eine Deregulation von CEBPA Zielgenen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die scheinbare genetische Komplexität der AML definierte Läsionen in Signalwegen widerspiegelt, welche für die Leukämieentstehung eine entscheidende Rolle spielen. Dabei scheint die zeitliche Reihenfolge der Mutationen nicht beliebig zu sein. Die Allelfrequenzen sprechen dafür, dass die CEBPA Mutationen initial auftreten, gefolgt von sekundären GATA2 Mutationen. Möglicherweise versetzt die frühere Mutation die betroffene blutbildende Zelle in einen Zustand, der sie für Veränderungen in einem oder wenigen bestimmten weiteren Genen anfällig macht. Erwirbt die Zelle mit der ersten Läsion dagegen zufällig eine weitere Mutation in einem Gen, dessen veränderte Funktion mit dem ersten Hit inkompatibel ist, geht die Zelle entweder daran zu Grunde (synthetische Letalität) oder ihr wird der weitere Weg in Richtung Leukämie auf eine andere Weise versperrt.

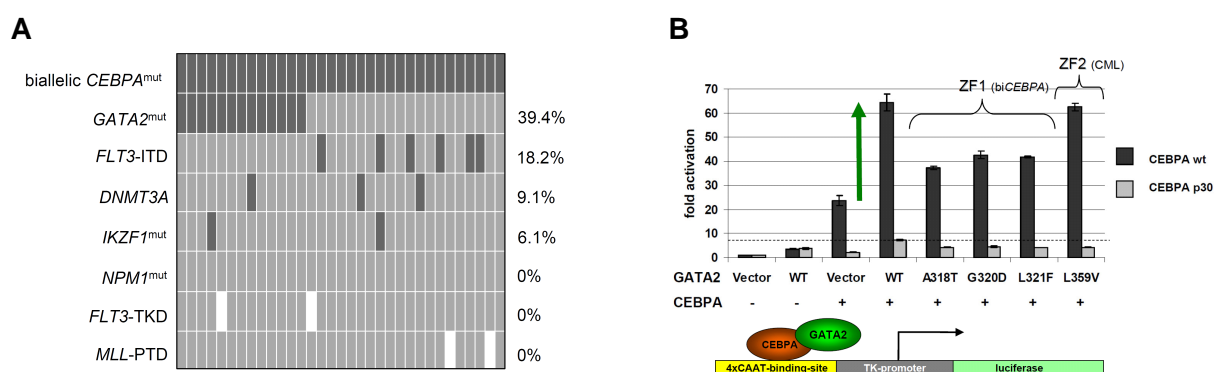


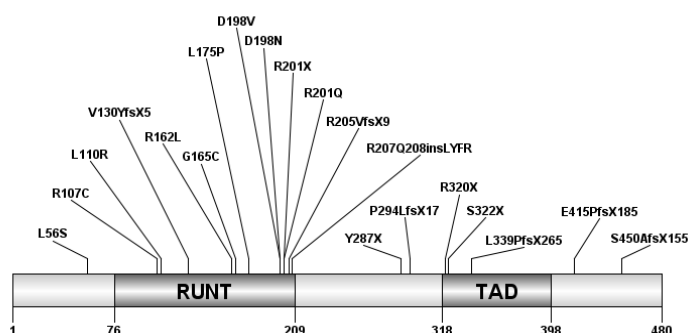
Abb. 3: (A) Häufigkeit von zusätzlichen genetischen Läsionen in 33 AML Patienten mit bi-allelischen CEBPA Mutationen. (B) Transkriptions-Assay unter Verwendung eines CEBPA-responsiven Luciferase-Reporters. Der Synergismus zwischen CEBPA and GATA2 bei der Transkriptionsaktivierung (grüner Pfeil) ist signifikant reduziert bei drei verschiedenen GATA2 ZF1 Mutationen, aber nicht bei einer GATA2 ZF2 Mutation, welche als Kontrolle verwendet wurde (Greif et al., 2012a).

2.1.4 AML mit RUNX1 Mutation

Der Transkriptionsfaktor RUNX1 ist ein entscheidender Regulator der Blutbildung und insbesondere an der Stammzellregulation beteiligt (Swiers et al., 2010). Punktmutationen in RUNX1 wurden zuerst bei sekundärer AML beschrieben (Osato, 2004). Zur Untersuchung der prognostischen Relevanz von RUNX1 Mutationen untersuchten wir mittels Sanger-Sequenzierung 93 AML Patienten mit normalem Karyotyp (CN-AML) auf RUNX1 Mutationen (Greif et al., 2011a; Greif et al., 2012b). Insbesondere die RUNT-Domäne von RUNX1 war häufig von Mutationen betroffen (Abb. 4 A). RUNX1 Mutationen in unserer Kohorte (13/93, 16.1%) waren mit einem ungünstigen klinischen Verlauf (Abb. 4 B) sowie mit der Überexpression von lymphatischen Regulatoren wie *HOPX*, *DNTT* und *BLNK* assoziiert (Greif et al., 2012b). Unsere Ergebnisse waren weitgehend konsistent mit vergleichbaren Studien in unabhängigen Kohorten (Gaidzik et al., 2011; Mender et al., 2012; Schnittger et al., 2011; Tang et al., 2009). In die aktuelle WHO-Klassifikation wurde die AML mit RUNX1 Mutation als provisorische Entität mit schlechter Prognose aufgenommen (Arber et al., 2016). Gemäß der aktuellen ELN-Klassifikation führt der Nachweis einer RUNX1-Mutation zu einer Einordnung in die prognostisch ungünstige (adverse) Gruppe (Dohner et al., 2017).

Beachtlicher Weise treten RUNX1-Mutationen so gut wie nie zusammen mit den häufigen NPM1-Mutationen auf, was auf alternative bzw. inkompatible Mechanismen der Leukämogenese hinweist. Nachdem wir bei einem RUNX1-mutierten Patienten mittels Transkriptom-Sequenzierung auch eine Mutation in TLE4 fanden, das einen RUNX1-Proteininteraktor kodiert, haben wir TLE4 in der Gesamtkohorte sequenziert und zwei weitere TLE4-Mutationen gefunden, die allerdings unabhängig von RUNX1 Mutationen auftraten (Greif et al., 2011a). Somit scheint es sich beim Auftreten von mehreren Punktmutationen im RUNX1-TLE4 Proteinkomplex um ein seltenes Ereignis zu handeln. Allerdings tritt die Deletion von TLE4 in der 9q Region häufig zusammen auf mit der t(8;21) Translokation, die zur RUNX1/RUNX1T1 Fusion führt, was auf eine onkogene Kooperation hinweist (Dayyani et al., 2008).

A



B

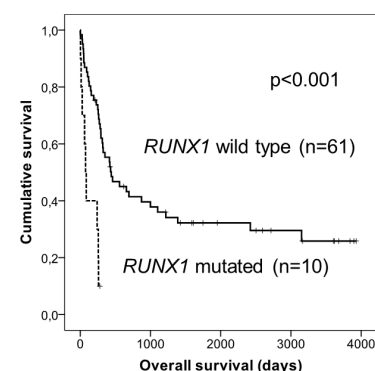


Abb. 4: (A) RUNX1 Mutationen bei CN-AML Patienten. (B) Gesamtüberleben von CN-AML Patienten stratifiziert nach RUNX1 Mutationsstatus (Greif et al., 2012b).

2.1.5 AML mit Trisomie 13

Bei der AML ist seit langem bekannt, dass man anhand von bestimmten Chromosomen-Veränderungen der Leukämiezellen den Verlauf der Erkrankung vorhersagen kann. Bei den seltener vorkommenden Mutationen ist die prognostische Bedeutung bisher zumeist unklar. Dies galt zum Beispiel auch für das Auftreten eines zusätzlichen Chromosoms 13 (erworbene Trisomie 13), was nur bei etwa einem Prozent der AML-Patienten beobachtet wird (AML+13). Bisher wird die Trisomie 13 nach ELN einer intermediären Prognose zugeordnet (Dohner et al., 2017; Dohner et al., 2010). Um die klinische Relevanz von derartig seltenen Veränderungen erforschen zu können, sind deshalb sehr hohe Fallzahlen notwendig. Das Rezeptor-Tyrosinkinase-Gen FLT3, dessen aktivierende Mutationen bei der AML häufig sind, liegt auf Chromosom 13. Es wurde daher ein FLT3-Dosismechanismus bei der AML+13 postuliert (Dicker et al., 2007; Silva et al., 2007).

Die angeborene Trisomie 13 ist Ursache des Patau-Syndroms, eine schwerwiegende Entwicklungsstörung mit Aneuploidie und Herzfehlern, die oft bereits während der Schwangerschaft oder innerhalb des ersten Lebensjahrs zum Tode führt (Baty et al., 1994). Außerdem besteht beim Patau-Syndrom eine Tumorneigung (Satge and Van Den Berghe, 1996). In der Literatur ist ein einziger Fall von Patau-Syndrom mit myeloischer Leukämie beschrieben (Schade et al., 1962).

Anhand der klinischen Auswertung von rund 7000 AML Patienten konnten wir zeigen, dass AML Patienten mit der seltenen Trisomie 13 nicht nur ein homogenes Mutationsprofil mit Veränderungen in Spliceosom-Genen aufweisen (Abb. 5 A), sondern auch eine sehr ungünstige Prognose haben (Abb. 5 B) (Herold et al., 2014). Solche Spliceosom-Mutationen treten oft gemeinsam auf mit RUNX1 Mutationen, welche ebenfalls mit einer geringen Überlebensrate bei CN-AML Patienten vergesellschaftet sind (Greif et al., 2012b). Spliceosom-Inhibitoren wie z.B. E7107 befinden sich derzeit in der präklinischen Erprobung (Lee and Abdel-Wahab, 2016; Lee et al., 2016). Somit könnten die häufigen Spliceosom-Mutationen bei der AML mit Trisomie 13 ein Ziel für pharmakologische Interventionen liefern.

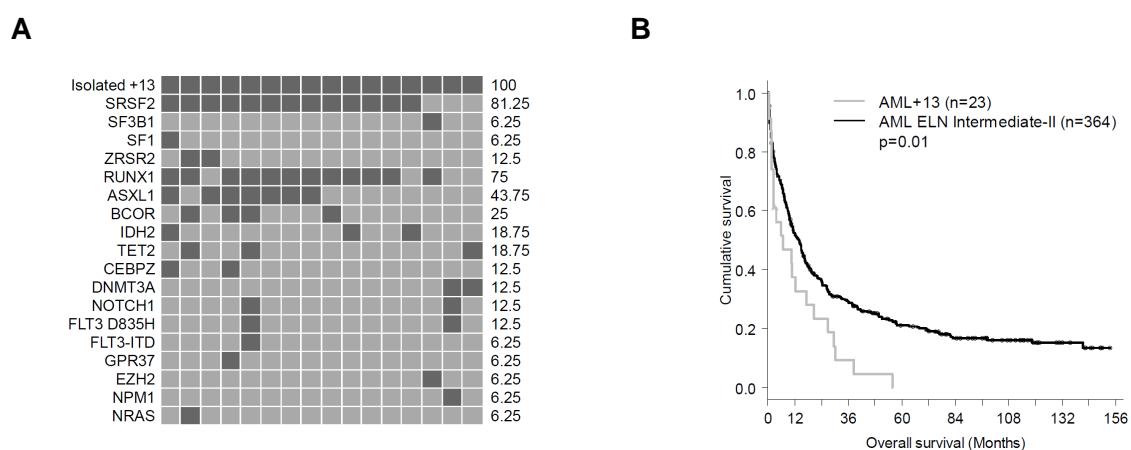


Abb. 5: (A) Häufigkeit von zusätzlichen Mutationen in 16 AML Patienten mit isolierter Trisomie 13 (AML+13). (B) Gesamtüberleben von AML+13 im Vergleich zu ELN intermediate 2 Patienten, die innerhalb der AMLCG-99 Studie behandelt wurden (Herold et al., 2014).

2.1.6 Core-binding Factor Leukämie

RUNX1 bildet zusammen mit CFBF den Core-Binding Factor (CBF) Proteinkomplex, der eine wichtige Rolle für die physiologische Hämatopoese spielt. Sowohl die Translokation t(8;21) als auch die Inversion inv(16) führen durch die resultierenden Fusionen RUNX1/RUNX1T1 und CFBF/MYH11 zu einer gestörten Funktion des CBF-Komplexes, was eine Beeinträchtigung der myeloischen Differenzierung zur Folge hat (Marcucci, 2006). Derartige CBF-Rearrangements findet man in 15-20% der *de novo* AML Fälle bei Erwachsenen und sind mit einer eher günstigen Prognose assoziiert (Mrozek and Bloomfield, 2008; Speck and Gilliland, 2002). Trotz ihrer ursächlichen Relevanz für die Erkrankung reichen die Fusionen RUNX1/RUNX1T1 und CFBF/MYH11 allein nicht aus, um Leukämie auszulösen (Castilla et al., 2004; Schessl et al., 2005; Speck and Gilliland, 2002). Bei CBF-Leukämien findet man häufig zusätzliche Mutationen in Genen, die Signalwege regulieren, wie z.B. KIT, FLT3 oder RAS (Bacher et al., 2006; Boissel et al., 2006; Paschka et al., 2006). In einem erheblichen Teil der Patienten findet man jedoch keine solcher bekannten zusätzlichen Läsionen.

2.1.6.1 N676K Mutationen bei der AML mit inversion inv(16)

Um systematisch nach zusätzlichen somatischen Läsionen zu suchen, untersuchten wir das Knochenmark eines CFBF/MYH11-positiven AML Patienten mittels Exomsequenzierung und fanden eine N676K Mutation im wachstumsregulierenden FLT3 Rezeptor (Opatz et al., 2013). In einer Kohorte von 84 AML inv(16) Patienten (AML M4eo nach der FAB-Klassifikation) fanden wir eine derartige Veränderungen in insgesamt fünf Fällen (6%) (Abb. 6 A). Zuvor waren bei FLT3 Aminosäuresubstitutionen an der Position N676 nur im Zusammenhang mit Resistenz gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren bei gleichzeitig bestehender interner Tandem-Duplikation (ITD) beschrieben (Cools et al., 2004; Heidel et al., 2006; Pauwels et al., 2012). Unser Patient hatte jedoch keine zusätzliche FLT3-ITD Mutation. Durch retrovirale Expression von FLT3-N676K in Ba/F3 Zellen konnten wir zeigen, dass es sich um eine aktivierende Mutation handelt (Abb. 6 B), deren Effekt durch Tyrosin-Kinase Inhibitoren (TKI) gehemmt werden kann. Diese Ergebnisse liefern die Grundlage um CBF-AML Patienten gezielt auf FLT3-N676K zu untersuchen und ggf. eine TKI-Behandlung in Erwägung zu ziehen.

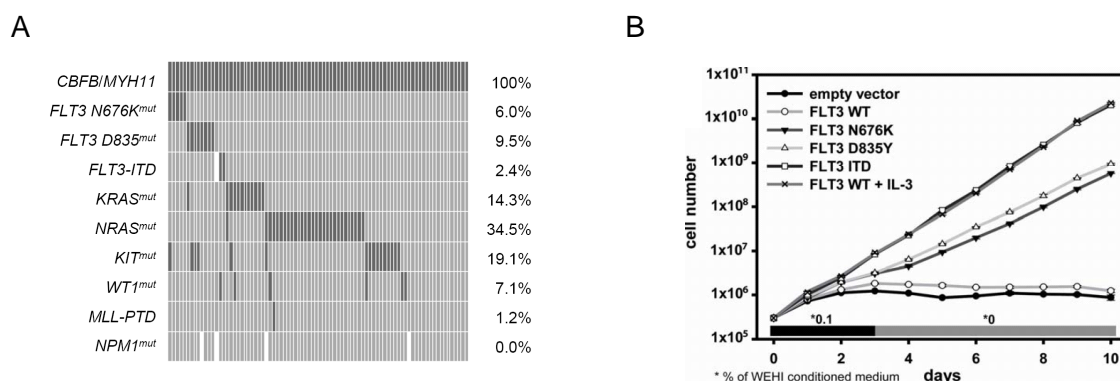
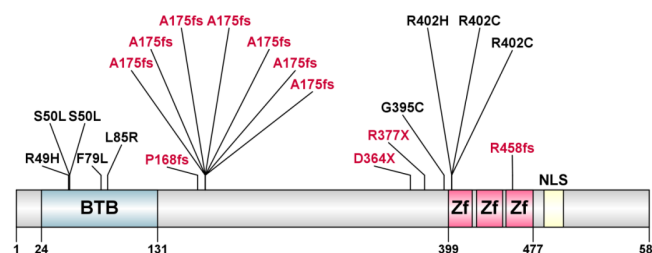


Abb. 6: (A) Häufigkeit von zusätzlichen Mutationen in 84 AML Patienten mit CFBF/MYH11 Rearrangement. (B) Ba/F3 Zellen wurden mit verschiedenen FLT3-Konstrukten transduziert. IL-3 unabhängiges Wachstum weist auf aktivierende Mutationen der Rezeptor-Tyrosin-Kinase FLT3 hin (Opatz et al., 2013).

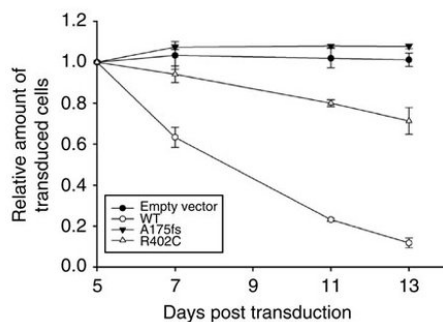
2.1.6.2 ZBTB7A Mutationen bei der AML mit Translokation t(8;21)

Die Translokation t(8;21) wurde bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) von Janet Rowley entdeckt und lieferte den ersten Beleg für eine genetische Ursache von Krebserkrankungen (Rowley, 1973). Zahlreiche Studien zeigten jedoch, dass dieser Chromosomenumbau allein nicht ausreicht, um Leukämie auszulösen (Hatlen et al., 2012). Während einige AML Patienten mit t(8;21) Translokation zusätzliche Mutationen in Genen wie KIT, NRAS oder FLT3 aufweisen, war der Mechanismus der Leukämieentwicklung bei einem erheblichen Teil der Fälle bisher unklar. Mittels Exomsequenzierung fanden wir bei rund einem Viertel (13/56; 23%) der AML Patienten mit Translokation t(8;21) im ZBTB7A-Gen neuartige Mutationen (Abb. 7 A), die das Wachstum der Krebszellen begünstigen (Hartmann et al., 2016). Die Häufigkeit von ZBTB7A Mutationen in unabhängigen AML t(8;21) Kohorten war mit unseren Ergebnissen vergleichbar (Faber et al., 2016; Lavalley et al., 2016). In gesunden Zellen reguliert der Transkriptionsfaktor ZBTB7A die Glykolyse und wirkt somit wie eine Handbremse für den Stoffwechsel. Ist das Gen defekt, erhalten die Krebszellen mehr Energie, um sich ungebremst zu teilen (Liu et al., 2014). Wir konnten zeigen, dass die stabile Überexpression von Wildtyp-ZBTB7A das Wachstum von t(8;21) positiven Leukämiezellen hemmt und diese Tumorsuppressor-Funktion durch Mutationen der Zinkfingerdomäne verloren geht (Abb. 7 B). Bei der AML mit normalem Karyotyp fanden wir eine prognostische Relevanz der ZBTB7A-Expression: Patienten mit hoher ZBTB7A-Expression lebten deutlich länger, als solche, bei denen das Gen weniger oder gar nicht aktiv war (Abb. 7 C). Diese Ergebnisse legen nahe, dass bei der AML allgemein ein Zusammenhang zwischen der ZBTB7A Funktion und dem Wachstum der Tumorzellen besteht. Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist dieser Mechanismus vielversprechend. Mit modifizierten Zuckermolekülen (z.B. 2-Deoxyglucose) lässt sich der Energiegewinnungsprozess von Tumorzellen gezielt hemmen (Liu et al., 2015).

A



B



C

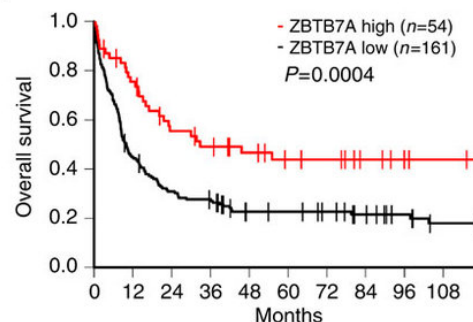


Abb. 7: (A) ZBTB7A Mutationen bei der AML t(8;21). **(B)** Wachstum von Kasumi-1 Zellen, die stabil ZBTB7A Wildtyp oder Mutanten exprimieren. **(C)** Überleben von CN-AML Patienten stratifiziert nach ZBTB7A Expression (Hartmann et al., 2016).

2.2 Diagnostische Anwendungen

2.2.1 Korrelation von NGS-Daten mit Zytogenetik

Mittels DNA-Sequenzierung im Hochdurchsatzverfahren können neben Punktmutationen und kleinen Insertionen oder Deletionen auch größere Deletionen, Amplifikationen sowie unbalancierte chromosomale Veränderungen (sog. Copy Number Alterations; CNAs) nachgewiesen werden. Daher haben wir bioinformatische Algorithmen zum Nachweis von somatischen CNAs bei der AML entwickelt (Abb. 8). In vielen Fällen gelingt uns damit der Nachweis von (aus der Routinediagnostik) bekannten zytogenetischen Veränderungen wie z.B. Aneuploidie oder Deletionen (Vosberg et al., 2016b). Limitierend ist allerdings die klonale Architektur der Leukämie, so dass subklonale CNAs in den Sequenzdaten oft nicht erfasst werden, wohl aber in der Zytogenetik auf Einzelzellebene erkennbar sind. Umgekehrt gibt es jedoch auch Fälle, in denen wir CNAs detektieren, die entsprechenden Zellen aber evtl. in Kultur nicht wachsen und somit in der Zytogenetik nicht nachweisbar sind. Für künftige AML-Diagnostik werden also weiterhin komplementäre Untersuchungsverfahren benötigt.

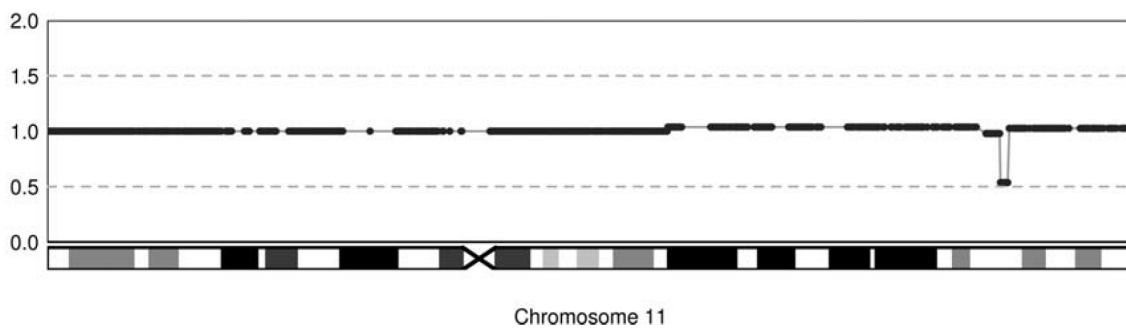
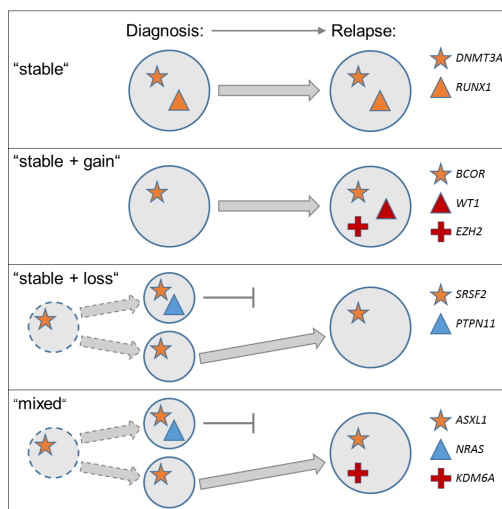


Abb 8: Beispiel für die Detektion von copy number alterations (CNAs) in Exomdaten eines AML Patienten mit einer unbalanzierten Translokation t(9;11), die zu einem MLL/AF9 Fusionsgen und Deletion der 3' Region von MLL (KMT2A) sowie benachbarten Genen führt. Dargestellt ist das Verhältnis der normalisierten Lesetiefe von AML- und Remissionsprobe auf Chromosom 11. Das Ergebnis bestätigt den FISH-Befund (Vosberg et al., 2016b).

2.3 Klonale Tumorevolution

Aktuell untersucht meine Arbeitsgruppe die klonale Evolution der AML von der Erstdiagnose zum Rezidiv anhand von jeweils mehreren Verlaufspröben. Dabei zeigt sich in vielen Fällen eine Persistenz von bekannten Leukämie-auslösenden Mutationen (z.B. in DNMT3A), trotz scheinbar erfolgreicher Chemotherapie, bei fehlendem mikroskopischen Nachweis von Leukämiezellen (<5% Blasten im Knochenmark; komplette Remission). Andere initial gefundene Mutationen (z.B. in FLT3) waren dagegen in Remission nicht mehr oder nur noch auf niedrigem Niveau nachweisbar (Allelfrequenz <5%). Diese Ergebnisse sind vereinbar mit der Existenz von präleukämischen Klonen, welche im Gegensatz zu den Leukämiezellen, gegenüber der Therapie vergleichsweise unempfindlich sind und evtl. in ursächlichem Zusammenhang mit dem Rückfall der Erkrankung stehen (Jan and Majeti, 2013). Anhand von 50 CN-AML Fällen haben wir die Stabilität der Mutationen im Krankheitsverlauf bestimmt (Vosberg et al., 2016a). Stabile Mutationen, die sowohl bei Erstdiagnose als auch im Rezidiv nachweisbar sind, weisen auf krankheitsinitiierende Ereignisse hin und eignen sich besonders als diagnostische Marker zur Überwachung des Krankheitsverlaufs und der Therapiesteuerung. Rezidiv-spezifische Mutationen können unter dem Selektionsdruck der Therapie entstehen und Mechanismen der Therapie-Resistenz aufzeigen (Abb. 9 A). Interessanter Weise war der Zugewinn von genetischen Veränderungen im Rezidiv in unserer Kohorte mit einem längeren Rezidiv-freien Überleben assoziiert (Abb. 9 B). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass bei einigen AML Patienten klonale Tumorevolution über einen längeren Zeitraum benötigt wird, um Therapie-Resistenz zu erlangen. Der Resistenzmechanismus von Mutationen in Kandidatengenen, die z.B. Histondemethylasen kodieren, wird derzeit funktionell untersucht.

A



B

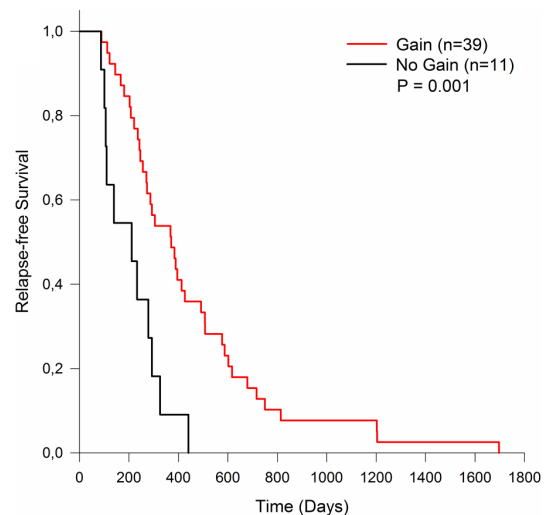


Abb. 9: (A) Schematische Darstellung der klonalen Evolution bei der AML. **(B)** Rezidiv-freies Überleben stratifiziert nach dem vorhandenen oder fehlenden Nachweis eines Zugewinns von genetischen Veränderung im Rezidiv (Vosberg et al., 2016a)

3. Ausblick

Die oben genannten Beispiele aus meiner Forschung verdeutlichen, dass der genetischen Heterogenität der AML individuelle Läsionen in kollaborierenden Onkogenen zugrunde liegen. Unsere Entdeckung von genetisch und klinisch homogenen Subgruppen bei der AML weckt die Hoffnung auf maßgeschneiderte Behandlungen unter Berücksichtigung der individuellen Krankheitsursache. In wie fern der genetische Hintergrund zum Erwerb von krankheitsauslösenden Mutationen prädisponiert, ist noch weitgehend unbekannt. Allerdings verdichten sich die Hinweise, dass eine initiale genetische Läsion die Aquisition von definierten weiteren Mutationen begünstigt. Beispiele dafür sind Megakaryoblastenleukämie beim Down-Syndrom (konstitutive Trisomie 21) mit somatischen GATA1 Mutationen in nahezu allen Fällen (Wechsler et al., 2002), die spezifische Assoziation zwischen somatischen GATA2 ZF1 und biallelischen CEBPA Mutationen (Greif et al., 2012a) sowie die erworbene Trisomie 13 in Kombination mit zusätzlichen Spliceosom-Mutationen (Herold et al., 2014). Die Erkundung der individuellen Krankheitsursache von AML Patienten, welche heutzutage zumeist mit einer sehr ähnlichen Chemotherapie behandelt werden, bietet die Perspektive auf neue Angriffspunkte für Therapien unter Berücksichtigung des individuellen Mutationsprofils. Hochsensitive Messverfahren für Patienten-spezifische Leukämiemarker können eine bessere Therapiesteuerung und somit eine schonendere Behandlung ermöglichen.

Zusammenfassung

Neuartige Sequenzierverfahren ermöglichen die systematische Identifikation von somatischen Mutationen in Tumorproben. Mittels Exomsequenzierung haben wir Subgruppen der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) untersucht und spezifische Assoziationen von Mutationen entdeckt. Beispielsweise fanden wir Läsionen im CEBPA-GATA2 Transkriptionsfaktor-Komplex, welche die Aktivierung von Zielgenen stören. Außerdem identifizierten wir in der AML M4eo Subgruppe die N676K Mutation im FLT3-Rezeptor, deren wachstumssteigernder Effekt mit Tyrosinkinase-Inhibitoren gehemmt werden kann. AML Patienten mit Trisomie 13 zeigten einen sehr ungünstigen klinischen Verlauf sowie ein homogenes Mutationsprofil mit häufigen Mutationen in Spliceosomgenen. Bei der AML mit t(8;21) Translokation fanden wir häufige genetische Läsionen in ZBTB7A, die zu einer Deregulation des Tumorstoffwechsels führen. Weiterhin detektierten wir in den Sequenzdaten somatische Copy Number Alterations (CNAs), welche die zytogenetischen Befunde in der Routinediagnostik ergänzen können. Die Veränderung der Mutationsprofile im Krankheitsverlauf war mit dem Rezidiv-freien Überleben korreliert und wies auf Mechanismen der Therapieresistenz hin. Das Verständnis der individuellen Krankheitsursache der AML liefert neue pharmakologische Angriffspunkte und bereitet den Weg für maßgeschneiderte Behandlungen.

Literaturverzeichnis

- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391-2405.
- Bacher, U., Haferlach, T., Schoch, C., Kern, W., and Schnittger, S. (2006). Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 107, 3847-3853.
- Baty, B.J., Blackburn, B.L., and Carey, J.C. (1994). Natural history of trisomy 18 and trisomy 13: I. Growth, physical assessment, medical histories, survival, and recurrence risk. *Am J Med Genet* 49, 175-188.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33, 451-458.
- Bohlander, S.K., Muschinsky, V., Schrader, K., Siebert, R., Schlegelberger, B., Harder, L., Schemmel, V., Fonatsch, C., Ludwig, W.D., Hiddemann, W., and Dreyling, M.H. (2000). Molecular analysis of the CALM/AF10 fusion: identical rearrangements in acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma patients. *Leukemia* 14, 93-99.
- Boissel, N., Leroy, H., Brethon, B., Philippe, N., de Botton, S., Auvrignon, A., Raffoux, E., Leblanc, T., Thomas, X., Hermine, O., Quesnel, B., Baruchel, A., Leverger, G., Dombret, H., and Preudhomme, C. (2006). Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 20, 965-970.
- Burnett, A., Wetzler, M., and Lowenberg, B. (2011). Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 29, 487-494.
- Castilla, L.H., Perrat, P., Martinez, N.J., Landrette, S.F., Keys, R., Oikemus, S., Flanagan, J., Heilman, S., Garrett, L., Dutra, A., Anderson, S., Pihan, G.A., Wolff, L., and Liu, P.P. (2004). Identification of genes that synergize with Cbfb-MYH11 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4924-4929.
- Caudell, D., Zhang, Z., Chung, Y.J., and Aplan, P.D. (2007). Expression of a CALM-AF10 fusion gene leads to Hoxa cluster overexpression and acute leukemia in transgenic mice. *Cancer Res* 67, 8022-8031.
- Chaplin, T., Ayton, P., Bernard, O.A., Saha, V., Della, V.V., Hillion, J., Gregorini, A., Lillington, D., Berger, R., and Young, B.D. (1995). A novel class of zinc finger/leucine zipper genes identified from the molecular cloning of the t(10;11) translocation in acute leukemia. *Blood* 85, 1435-1441.
- Cools, J., Mentens, N., Furet, P., Fabbro, D., Clark, J.J., Griffin, J.D., Marynen, P., and Gilliland, D.G. (2004). Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia. *Cancer research* 64, 6385-6389.
- Dayyani, F., Wang, J., Yeh, J.R., Ahn, E.Y., Tobey, E., Zhang, D.E., Bernstein, I.D., Peterson, R.T., and Sweetser, D.A. (2008). Loss of TLE1 and TLE4 from the del(9q) commonly deleted region in AML cooperates with AML1-ETO to affect myeloid cell proliferation and survival. *Blood* 111, 4338-4347.
- de Thé H, C.C., Lanotte M, Degos L, Dejean A. (1990). The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347, 558-561.
- de Thé H, L.C., Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A (1991). The PML-RAR-alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675-684.
- Deshpande, A.J., Cusan, M., Rawat, V.P., Reuter, H., Krause, A., Pott, C., Quintanilla-Martinez, L., Kakadia, P., Kuchenbauer, F., Ahmed, F., Delabesse, E., Hahn, M., Lichter, P., Kneba, M., Hiddemann, W., Macintyre, E., Mecucci, C., Ludwig, W.D., Humphries, R.K., Bohlander, S.K., Feuring-Buske, M., and Buske, C. (2006). Acute myeloid leukemia is propagated by a leukemic stem cell with lymphoid characteristics in a mouse model of CALM/AF10-positive leukemia. *Cancer Cell* 10, 363-374.

- Dicker, F., Haferlach, C., Kern, W., Haferlach, T., and Schnittger, S. (2007). Trisomy 13 is strongly associated with AML1/RUNX1 mutations and increased FLT3 expression in acute myeloid leukemia. *Blood* 110, 1308-1316.
- Dohner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Buchner, T., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenaux, P., Larson, R.A., Levine, R.L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M.S., Tien, H.F., Wei, A.H., Lowenberg, B., and Bloomfield, C.D. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129, 424-447.
- Dohner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Buchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M.A., Sierra, J., Tallman, M.S., Lowenberg, B., Bloomfield, C.D., and European, L. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115, 453-474.
- Dohner, H., Weisdorf, D.J., and Bloomfield, C.D. (2015). Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 373, 1136-1152.
- Dreyling, M.H., Martinez-Climent, J.A., Zheng, M., Mao, J., Rowley, J.D., and Bohlander, S.K. (1996). The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 4804-4809.
- Dufour, A., Schneider, F., Metzeler, K.H., Hoster, E., Schneider, S., Zellmeier, E., Benthaus, T., Sauerland, M.C., Berdel, W.E., Buchner, T., Wormann, B., Braess, J., Hiddemann, W., Bohlander, S.K., and Spiekermann, K. (2009). Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol* 28, 570-577.
- Dutta, S., Krause, A., Vosberg, S., Herold, T., Ksienzyk, B., Quintanilla-Martinez, L., Tizazu, B., Chopra, M., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., Greif, P.A., Vetter, A., Metzeler, K., Rothenberg-Thurley, M., Schneider, M.R., Dahlhoff, M., Spiekermann, K., Zimmer-Strobl, U., Wolf, E., and Bohlander, S.K. (2016). The target cell of transformation is distinct from the leukemia stem cell in murine CALM/AF10 leukemia models. *Leukemia* 30, 1166-1176.
- Faber, Z.J., Chen, X., Gedman, A.L., Boggs, K., Cheng, J., Ma, J., Radtke, I., Chao, J.R., Walsh, M.P., Song, G., Andersson, A.K., Dang, J., Dong, L., Liu, Y., Huether, R., Cai, Z., Mulder, H., Wu, G., Edmonson, M., Rusch, M., Qu, C., Li, Y., Vadodaria, B., Wang, J., Hedlund, E., Cao, X., Yergeau, D., Nakitandwe, J., Pounds, S.B., Shurtleff, S., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Easton, J., Parganas, E., Pui, C.H., Rubnitz, J.E., Ding, L., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Gruber, T.A., Mullighan, C.G., Schlenk, R.F., Paschka, P., Dohner, K., Dohner, H., Bullinger, L., Zhang, J., Kline, J.M., and Downing, J.R. (2016). The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Nat Genet* 48, 1551-1556.
- Gaidzik, V.I., Bullinger, L., Schlenk, R.F., Zimmermann, A.S., Rock, J., Paschka, P., Corbacioglu, A., Krauter, J., Schlegelberger, B., Ganser, A., Spath, D., Kundgen, A., Schmidt-Wolf, I.G., Gotze, K., Nachbaur, D., Pfreundschuh, M., Horst, H.A., Dohner, H., and Dohner, K. (2011). RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *J Clin Oncol* 29, 1364-1372.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143-156.
- Georgopoulos, K., Moore, D.D., and Derfler, B. (1992). Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* 258, 808-812.
- Georgopoulos, K., Winandy, S., and Avitahl, N. (1997). The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. *Annu Rev Immunol* 15, 155-176.
- Green, C.L., Koo, K.K., Hills, R.K., Burnett, A.K., Linch, D.C., and Gale, R.E. (2010). Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol* 28, 2739-2747.
- Greif, P.A., Dufour, A., Konstandin, N.P., Ksienzyk, B., Zellmeier, E., Tizazu, B., Sturm, J., Benthaus, T., Herold, T., Yaghmaie, M., Dorge, P., Hopfner, K.P., Hauser, A., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., Kakadia, P.M., Schneider, S., Hoster, E., Schneider, F., Stanulla, M., Braess, J., Sauerland,

- M.C., Berdel, W.E., Buchner, T., Woermann, B.J., Hiddemann, W., Spiekermann, K., and Bohlander, S.K. (2012a). GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. *Blood* 120, 395-403.
- Greif, P.A., Eck, S.H., Konstandin, N.P., Benet-Pages, A., Ksienzyk, B., Dufour, A., Vetter, A.T., Popp, H.D., Lorenz-Depiereux, B., Meitinger, T., Bohlander, S.K., and Strom, T.M. (2011a). Identification of recurring tumor-specific somatic mutations in acute myeloid leukemia by transcriptome sequencing. *Leukemia* 25, 821-827.
- Greif, P.A., Konstandin, N.P., Metzeler, K.H., Herold, T., Pasalic, Z., Ksienzyk, B., Dufour, A., Schneider, F., Schneider, S., Kakadia, P.M., Braess, J., Sauerland, M.C., Berdel, W.E., Buchner, T., Woermann, B.J., Hiddemann, W., Spiekermann, K., and Bohlander, S.K. (2012b). RUNX1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are associated with a poor prognosis and up-regulation of lymphoid genes. *Haematologica* 97, 1909-1915.
- Greif, P.A., Tizazu, B., Krause, A., Kremmer, E., and Bohlander, S.K. (2008). The leukemogenic CALM/AF10 fusion protein alters the subcellular localization of the lymphoid regulator Ikaros. *Oncogene* 27, 2886-2896.
- Greif, P.A., Yaghmaie, M., Konstandin, N.P., Ksienzyk, B., Alimoghaddam, K., Ghavamzadeh, A., Hauser, A., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., and Bohlander, S.K. (2011b). Somatic mutations in acute promyelocytic leukemia (APL) identified by exome sequencing. *Leukemia* 25, 1519-1522.
- Hartmann, L., Dutta, S., Opatz, S., Vosberg, S., Reiter, K., Leubolt, G., Metzeler, K.H., Herold, T., Bamopoulos, S.A., Braundl, K., Zellmeier, E., Ksienzyk, B., Konstandin, N.P., Schneider, S., Hopfner, K.P., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., Middeke, J.M., Stolzel, F., Thiede, C., Wolf, S., Bohlander, S.K., Preiss, C., Chen-Wichmann, L., Wichmann, C., Sauerland, M.C., Buchner, T., Berdel, W.E., Wormann, B.J., Braess, J., Hiddemann, W., Spiekermann, K., and Greif, P.A. (2016). ZBTB7A mutations in acute myeloid leukaemia with t(8;21) translocation. *Nat Commun* 7, 11733.
- Hatlen, M.A., Wang, L., and Nimer, S.D. (2012). AML1-ETO driven acute leukemia: insights into pathogenesis and potential therapeutic approaches. *Front Med* 6, 248-262.
- Heidel, F., Solem, F.K., Breitenbuecher, F., Lipka, D.B., Kasper, S., Thiede, M.H., Brandts, C., Serve, H., Roesel, J., Giles, F., Feldman, E., Ehninger, G., Schiller, G.J., Nimer, S., Stone, R.M., Wang, Y., Kindler, T., Cohen, P.S., Huber, C., and Fischer, T. (2006). Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood* 107, 293-300.
- Herold, T., Metzeler, K.H., Vosberg, S., Hartmann, L., Rollig, C., Stolzel, F., Schneider, S., Hubmann, M., Zellmeier, E., Ksienzyk, B., Jurinovic, V., Pasalic, Z., Kakadia, P.M., Dufour, A., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., Sauerland, M.C., Buchner, T., Berdel, W.E., Woermann, B.J., Bornhauser, M., Ehninger, G., Mansmann, U., Hiddemann, W., Bohlander, S.K., Spiekermann, K., and Greif, P.A. (2014). Isolated trisomy 13 defines a homogeneous AML subgroup with high frequency of mutations in spliceosome genes and poor prognosis. *Blood* 124, 1304-1311.
- Herold, T., Schneider, S., Metzeler, K., Neumann, M., Hartmann, L., Roberts, K.G., Konstandin, N.P., Greif, P.A., Braundl, K., Ksienzyk, B., Huk, N., Schneider, I., Zellmeier, E., Jurinovic, V., Mansmann, U., Hiddemann, W., Mullighan, C.G., Bohlander, S.K., Spiekermann, K., Holzer, D., Bruggemann, M., Baldus, C.D., Dreyling, M., and Gokbuget, N. (2016). Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in adults have frequent IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis. *Haematologica*.
- Ibanez, M., Carbonell-Caballero, J., Garcia-Alonso, L., Such, E., Jimenez-Almazan, J., Vidal, E., Barragan, E., Lopez-Pavia, M., M, L.L., Martin, I., Gomez-Segui, I., Montesinos, P., Sanz, M.A., Dopazo, J., and Cervera, J. (2016). The Mutational Landscape of Acute Promyelocytic Leukemia Reveals an Interacting Network of Co-Occurrences and Recurrent Mutations. *PLoS One* 11, e0148346.
- Jan, M., and Majeti, R. (2013). Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene* 32, 135-140.
- Lavallee, V.P., Lemieux, S., Boucher, G., Gendron, P., Boivin, I., Armstrong, R.N., Sauvageau, G., and Hebert, J. (2016). RNA-sequencing analysis of core binding factor AML identifies recurrent ZBTB7A mutations and defines RUNX1-CBFA2T3 fusion signature. *Blood* 127, 2498-2501.
- Lawrence, M.S., Stojanov, P., Mermel, C.H., Robinson, J.T., Garraway, L.A., Golub, T.R., Meyerson, M., Gabriel, S.B., Lander, E.S., and Getz, G. (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505, 495-501.

- Lee, S.C., and Abdel-Wahab, O. (2016). Therapeutic targeting of splicing in cancer. *Nat Med* 22, 976-986.
- Lee, S.C., Dvinge, H., Kim, E., Cho, H., Micol, J.B., Chung, Y.R., Durham, B.H., Yoshimi, A., Kim, Y.J., Thomas, M., Lobry, C., Chen, C.W., Pastore, A., Taylor, J., Wang, X., Krivtsov, A., Armstrong, S.A., Palacino, J., Buonamici, S., Smith, P.G., Bradley, R.K., and Abdel-Wahab, O. (2016). Modulation of splicing catalysis for therapeutic targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal proteins. *Nat Med* 22, 672-678.
- Linder, B., Newman, R., Jones, L.K., Debernardi, S., Young, B.D., Freemont, P., Verrijzer, C.P., and Saha, V. (2000). Biochemical analyses of the AF10 protein: the extended LAP/PHD-finger mediates oligomerisation. *JMolBiol* 299, 369-378.
- Liu, X.S., Haines, J.E., Mehanna, E.K., Genet, M.D., Ben-Sahra, I., Asara, J.M., Manning, B.D., and Yuan, Z.M. (2014). ZBTB7A acts as a tumor suppressor through the transcriptional repression of glycolysis. *Genes Dev* 28, 1917-1928.
- Liu, X.S., Liu, Z., Gerarduzzi, C., Choi, D.E., Ganapathy, S., Pandolfi, P.P., and Yuan, Z.M. (2015). Somatic human ZBTB7A zinc finger mutations promote cancer progression. *Oncogene*.
- Marcucci, G. (2006). Core binding factor acute myeloid leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* 4, 339-341.
- Mendler, J.H., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrozek, K., Becker, H., Metzeler, K.H., Schwind, S., Whitman, S.P., Khalife, J., Kohlschmidt, J., Nicolet, D., Powell, B.L., Carter, T.H., Wetzler, M., Moore, J.O., Kolitz, J.E., Baer, M.R., Carroll, A.J., Larson, R.A., Caligiuri, M.A., Marcucci, G., and Bloomfield, C.D. (2012). RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. *J Clin Oncol* 30, 3109-3118.
- Mrozek, K., and Bloomfield, C.D. (2008). Clinical significance of the most common chromosome translocations in adult acute myeloid leukemia. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 52-57.
- Mullighan, C.G., Miller, C.B., Radtke, I., Phillips, L.A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T.P., Le Beau, M.M., Pui, C.H., Relling, M.V., Shurtleff, S.A., and Downing, J.R. (2008). BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 453, 110-114.
- Opatz, S., Polzer, H., Herold, T., Konstandin, N.P., Ksienzyk, B., Zellmeier, E., Vosberg, S., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., Hopfner, K.P., Kakadia, P.M., Schneider, S., Dufour, A., Braess, J., Sauerland, M.C., Berdel, W.E., Buchner, T., Woermann, B.J., Hiddemann, W., Spiekermann, K., Bohlander, S.K., and Greif, P.A. (2013). Exome sequencing identifies recurring FLT3 N676K mutations in core-binding factor leukemia. *Blood* 122, 1761-1769.
- Osato, M. (2004). Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene* 23, 4284-4296.
- Paschka, P., Marcucci, G., Ruppert, A.S., Mrozek, K., Chen, H., Kittles, R.A., Vukosavljevic, T., Perrotti, D., Vardiman, J.W., Carroll, A.J., Kolitz, J.E., Larson, R.A., and Bloomfield, C.D. (2006). Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, 3904-3911.
- Pauwels, D., Sweron, B., and Cools, J. (2012). The N676D and G697R mutations in the kinase domain of FLT3 confer resistance to the inhibitor AC220. *Haematologica*.
- Rowley, J.D. (1973). Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet* 16, 109-112.
- Satge, D., and Van Den Berghe, H. (1996). Aspects of the neoplasms observed in patients with constitutional autosomal trisomy. *Cancer Genet Cytogenet* 87, 63-70.
- Schade, H., Schoeller, L., and Schultze, K.W. (1962). [D-trisomy (Paetau syndrome) with congenital myeloid leukemia]. *Med Welt* 50, 2690-2692.
- Schessl, C., Rawat, V.P., Cusan, M., Deshpande, A., Kohl, T.M., Rosten, P.M., Spiekermann, K., Humphries, R.K., Schnittger, S., Kern, W., Hiddemann, W., Quintanilla-Martinez, L., Bohlander, S.K., Feuring-Buske, M., and Buske, C. (2005). The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *The Journal of clinical investigation* 115, 2159-2168.

- Schnittger, S., Dicker, F., Kern, W., Wendland, N., Sundermann, J., Alpermann, T., Haferlach, C., and Haferlach, T. (2011). RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood* 117, 2348-2357.
- Silva, F.P., Lind, A., Brouwer-Mandema, G., Valk, P.J., and Giphart-Gassler, M. (2007). Trisomy 13 correlates with RUNX1 mutation and increased FLT3 expression in AML-M0 patients. *Haematologica* 92, 1123-1126.
- Slavova-Azmanova, N.S., Kucera, N., Satiaputra, J., Stone, L., Magno, A., Maxwell, M.J., Quilici, C., Erber, W., Klinken, S.P., Hibbs, M.L., and Ingley, E. (2013). Gain-of-function Lyn induces anemia: appropriate Lyn activity is essential for normal erythropoiesis and Epo receptor signaling. *Blood* 122, 262-271.
- Speck, N.A., and Gilliland, D.G. (2002). Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nature reviews Cancer* 2, 502-513.
- Swiers, G., de Bruijn, M., and Speck, N.A. (2010). Hematopoietic stem cell emergence in the conceptus and the role of Runx1. *Int J Dev Biol* 54, 1151-1163.
- Tang, J.L., Hou, H.A., Chen, C.Y., Liu, C.Y., Chou, W.C., Tseng, M.H., Huang, C.F., Lee, F.Y., Liu, M.C., Yao, M., Huang, S.Y., Ko, B.S., Hsu, S.C., Wu, S.J., Tsay, W., Chen, Y.C., Lin, L.I., and Tien, H.F. (2009). AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood* 114, 5352-5361.
- TCGA (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 368, 2059-2074.
- Tebar, F., Bohlander, S.K., and Sorkin, A. (1999). Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *MolBiolCell* 10, 2687-2702.
- Theis, F., Corbacioglu, A., Gaidzik, V.I., Paschka, P., Weber, D., Bullinger, L., Heuser, M., Ganser, A., Thol, F., Schlegelberger, B., Gohring, G., Kohne, C.H., Germing, U., Brossart, P., Horst, H.A., Haase, D., Gotze, K., Ringhoffer, M., Fiedler, W., Nachbaur, D., Kindler, T., Held, G., Lubbert, M., Wattad, M., Salih, H.R., Krauter, J., Dohner, H., Schlenk, R.F., and Dohner, K. (2016). Clinical impact of GATA2 mutations in acute myeloid leukemia patients harboring CEBPA mutations: a study of the AML study group. *Leukemia* 30, 2248-2250.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A., and Bloomfield, C.D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-951.
- Vosberg, S., Hartmann, L., Metzeler, K.H., Schumacher, D., Pastore, F., Bräundl, K., Zellmeier, E., Ksienzyk, B., Konstandin, N.P., Schneider, S., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., Neumann, M., Baldus, C.D., Bohlander, S.K., Wolf, S., Hiddemann, W., Spiekermann, K., and Greif, P.A. (2016a). Evolutionary Patterns of Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia Correlate with Time to Relapse. *Blood* 128, 288-288. ASH-Annual Meeting Abstract.
- Vosberg, S., Herold, T., Hartmann, L., Neumann, M., Opatz, S., Metzeler, K.H., Schneider, S., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., Baldus, C.D., Hiddemann, W., Spiekermann, K., Bohlander, S.K., Mansmann, U., and Greif, P.A. (2016b). Close correlation of copy number aberrations detected by next-generation sequencing with results from routine cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 55, 553-567.
- Wechsler, J., Greene, M., McDevitt, M.A., Anastasi, J., Karp, J.E., Le Beau, M.M., and Crispino, J.D. (2002). Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet* 32, 148-152.
- West, A.H., Godley, L.A., and Churpek, J.E. (2014). Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. *Ann N Y Acad Sci* 1310, 111-118.
- Winandy, S., Wu, P., and Georgopoulos, K. (1995). A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* 83, 289-299.
- Wouters, B.J., Lowenberg, B., Erpelinck-Verschueren, C.A., van Putten, W.L., Valk, P.J., and Delwel, R. (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. *Blood* 113, 3088-3091.

Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Original articles:

1. Mohamed MA, Greif PA, Diamond J, Sharaf O, Maxwell P, Montironi R, Young RA, Hamilton PW. Epigenetic events, remodelling enzymes and their relationship to chromatin organization in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. *BJU Int.* 2007 Apr;99(4):908-15.
2. Putnik J, Zhang CD, Archangelo LF, Tizazu B, Bartels S, Kickstein M, Greif PA, Bohlander SK. The interaction of ETV6 (TEL) and TIP60 requires a functional histone acetyltransferase domain in TIP60. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Dec;1772(11-12):1211-24.
3. Greif PA, Tizazu B, Krause A, Kremmer E, Bohlander SK. The leukemogenic CALM/AF10 fusion protein alters the subcellular localization of the lymphoid regulator Ikaros. *Oncogene.* 2008 May 1;27(20):2886-96.
4. Bararia D, Trivedi AK, Zada AA, Greif PA, Mulaw MA, Christopeit M, Hiddemann W, Bohlander SK, Behre G. Proteomic identification of the MYST domain histone acetyltransferase TIP60 (HTATIP) as a co-activator of the myeloid transcription factor C/EBPalpha. *Leukemia.* 2008 Apr;22(4):800-7.
5. Archangelo LF, Greif PA, Hölzel M, Harasim T, Kremmer E, Przemeczek G, Eick D, Deshpande AJ, C Buske, Hrabé de Angelis M, Saad STO, Bohlander SK. The CALM and CALM/AF10 interactor CATS is a marker for proliferation. *Mol Oncol.* 2008 Dec;2(4):356-67.
6. Mohamed MA, Greif PA, Diamond J, Sharafeldin O, Maxwell P, Montironi R, O'Brien A, Young M, Hamilton PW. Changes in chromatin phenotype predict the response to hormonal deprivation therapy in patients with prostate cancer. *BJU Int.* 2009 Feb;103(3):391-8.
7. Reindl C, Quentmeier H, Petropoulos K, Greif PA, Benthaus T, Argiropoulos B, Mellert G, Vempati S, Duyster J, Buske C, Bohlander SK, Humphries KR, Hiddemann W and Spiekermann K. CBL exon 8/9 mutants autoactivate the FLT3 pathway and cluster in CBF/11q deletion AML/MDS subtypes. *Clin Cancer Res.* 2009 Apr 1;15(7):2238-47.
8. Greif PA*, Eck SH*, Konstandin NP*, Benet-Pagès A, Ksienzyk B, Dufour A, Vetter AT, Popp HD, Lorenz-Depiereux B, Meitinger T, Bohlander SK, Strom TM. Identification of recurring tumor-specific somatic mutations in acute myeloid leukemia by transcriptome sequencing. *Leukemia.* 2011 May;25(5):821-7. *Equal contribution
9. Greif PA, Yaghmaie M, Konstandin NP, Ksienzyk B, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, Hauser A, Graf A, Krebs S, Blum H, Bohlander SK. Somatic mutations in acute promyelocytic leukemia (APL) identified by exome sequencing. *Leukemia.* 2011 Sep;25(9):1519-22.
10. Deshpande AJ, Rouhi A, Lin Y, Stadler C, Greif PA, Arseni N, Opatz S, Quintanilla-Fend L, Holzmann K, Hiddemann W, Döhner K, Döhner H, Xu G, Armstrong SA, Bohlander SK, Buske C. The clathrin-binding domain of CALM and the OM-LZ domain of AF10 are sufficient to induce acute myeloid leukemia in mice. *Leukemia.* 2011 Nov;25(11):1718-27.
11. Pasalic Z, Greif PA, Jurinovic V, Mulaw M, Kakadia PM, Tizazu B, Fröhlich-Archangelo L, Krause A and Bohlander SK. FHL2 (four and a half LIM domain protein 2) interacts with CALM (clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein) and is highly expressed in acute erythroid leukemia (AML M6). *Blood Cancer J.* 2011 Nov;1(11):e42.
12. Greif PA*, Dufour A*, Konstandin NP, Ksienzyk B, Zellmeier E, Tizazu B, Sturm J, Benthaus T, Herold T, Yaghmaie M, Dörge P, Hopfner KP, Hauser A, Graf A, Krebs S, Blum H, Kakadia PM, Schneider S, Hoster E, Schneider F, Stanulla M, Braess J, Sauerland MC, Berdel WE, Büchner T, Woermann BJ, Hiddemann W, Spiekermann K, Bohlander SK. GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. *Blood.* 2012 Jul 12;120(2):395-403. *Equal contribution
13. Greif PA, Konstandin NP, Metzeler KH, Herold T, Pasalic Z, Ksienzyk B, Dufour A, Schneider F, Schneider S, Kakadia PM, Braess J, Sauerland MC, Berdel WE, Büchner T, Woermann BJ, Hiddemann W, Spiekermann K, Bohlander SK. RUNX1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are associated with poor prognosis and up-regulation of lymphoid genes. *Haematologica.* 2012 Dec;97(12):1909-15.
14. Archangelo LF, Greif PA, Maucuer A, Manceau V, Koneru N, Bigarella CL, Niemann F, Dos Santos MT, Kobarg J, Bohlander SK, Saad ST. The CATS (FAM64A) protein is a substrate of the Kinase Interacting Stathmin (KIS). *Biochim Biophys Acta.* 2013 May;1833(5):1269-79.

15. Neumann M, Heesch S, Schlee C, Schwartz S, Gökbuget N, Hoelzer D, Konstandin NP, Ksienzyk B, Vosberg S, Graf A, Krebs S, Blum H, Raff T, Brüggemann M, Hofmann WK, Hecht J, Bohlander SK, **Greif PA***, Baldus CD*. Whole exome sequencing in adult ETP-ALL reveals a high rate of DNMT3A mutations. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4749-52. *Equal contribution
16. Opatz S, Polzer H, Herold T, Konstandin NP, Ksienzyk B, Zellmeier E, Vosberg S, Graf A, Krebs S, Blum H, Hopfner KP, Kakadia PM, Schneider S, Dufour A, Braess J, Sauerland MC, Berdel WE, Büchner T, Woermann BJ, Hiddemann W, Spiekermann K, Bohlander SK, **Greif PA**. Exome sequencing identifies recurring FLT3 N676K mutations in core-binding factor leukemia. *Blood*. 2013 Sep 5;122(10):1761-9.
17. Herold T, Metzeler KH, Vosberg S, Hartmann L, Röllig C, Stölzel F, Schneider S, Hubmann M, Zellmeier E, Ksienzyk B, Jurinovic V, Pasalic Z, Kakadia PM, Dufour A, Graf A, Krebs S, Blum H, Sauerland MC, Büchner T, Berdel WE, Woermann BJ, Bornhäuser M, Ehninger G, Mansmann U, Hiddemann W, Bohlander SK, Spiekermann K, **Greif PA**. Isolated trisomy 13 defines a homogeneous AML subgroup with high frequency of mutations in spliceosome genes and poor prognosis. *Blood*. 2014 Aug 21;124(8):1304-11.
18. Neumann M, Seehawer M, Schlee C, Vosberg S, Heesch S, von der Heide EK, Graf A, Krebs S, Blum H, Gökbuget N, Schwartz S, Hoelzer D, **Greif PA**, Baldus CD. FAT1 expression and mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*. 2014 Jun 27;4:e224.
19. Pastore F, **Greif PA**, Schneider S, Ksienzyk B, Mellert G, Zellmeier E, Braess J, Sauerland CM, Heinecke A, Krug U, Berdel WE, Buechner T, Woermann B, Hiddemann W, Spiekermann K. The NPM1 Mutation Type Has No Impact on Survival in Cytogenetically Normal AML. *PLoS One*. 2014 Oct 9;9(10):e109759.
20. Neumann M, Vosberg S, Schlee C, Heesch S, Schwartz S, Gökbuget N, Hoelzer D, Graf A, Krebs S, Bartram I, Blum H, Brüggemann M, Hecht J, Bohlander SK, **Greif PA***, Baldus CD*. Mutational spectrum of adult T-ALL. *Oncotarget*. 2015 Feb 20;6(5):2754-66. *Equal contribution
21. Lübking A, Vosberg S, Konstandin NP, Dufour A, Graf A, Krebs S, Blum H, Weber A, Lenhoff S, Ehinger M, Spiekermann K, **Greif PA***, Cammenga J*. Young woman with mild bone marrow dysplasia, GATA2 and ASXL1 mutation treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Res Rep*. 2015 Oct 17;4(2):72-5. *Equal contribution
22. Dutta S, Krause A, Vosberg S, Herold T, Ksienzyk B, Quintanilla-Martinez L, Tizazu B, Chopra M, Graf A, Krebs S, Blum H, **Greif PA**, Vetter A, Metzeler K, Rothenberg-Thurley M, Schneider MR, Dahlhoff M, Spiekermann K, Zimmer-Strobl U, Wolf E, Bohlander SK. The target cell of transformation is distinct from the leukemia stem cell in murine CALM/AF10 leukemia models. *Leukemia*. 2016 May;30(5):1166-76.
23. Vosberg S, Herold T, Hartmann L, Neumann M, Opatz S, Metzeler KH, Schneider S, Graf A, Krebs S, Blum H, Baldus CD, Hiddemann W, Spiekermann K, Bohlander SK, Mansmann U, **Greif PA**. Close correlation of copy number aberrations detected by next-generation sequencing with results from routine cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016 Jul;55(7):553-67.
24. Hartmann L, Dutta S, Opatz S, Vosberg S, Reiter K, Leubolt G, Metzeler KH, Herold T, Bamopoulos SA, Bräundl K, Zellmeier E, Ksienzyk B, Konstandin NP, Schneider S, Hopfner KP, Graf A, Krebs S, Blum H, Middeke JM, Stölzel F, Thiede C, Wolf S, Bohlander SK, Preiss C, Chen-Wichmann L, Wichmann C, Sauerland MC, Büchner T, Berdel WE, Wörmann BJ, Braess J, Hiddemann W, Spiekermann K, **Greif PA**. ZBTB7A mutations in acute myeloid leukaemia with t(8;21) translocation. *Nat Commun*. 2016 Jun 2;7:11733.
25. Sandhöfer N, Bauer J, Reiter K, Dufour A, Rothenberg M, Konstandin NP, Zellmeier E, Tizazu B, **Greif PA**, Metzeler KH, Hiddemann W, Polzer H, Spiekermann K. The new and recurrent FLT3 deletion mutation (p.Q569fs) shows a dominant negative effect on the wild-type FLT3 receptor. *Sci Rep*. 2016 Jun 27;6:28032.
26. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Goerlich D, Schneider S, Konstandin NP, Dufour A, Bräundl K, Ksienzyk B, Zellmeier E, Hartmann L, **Greif PA**, Fiegl M, Subklewe M, Bohlander SK, Krug U, Faldum A, Berdel WE, Wörmann B, Büchner T, Hiddemann W, Braess J, Spiekermann K. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016 Aug 4;128(5):686-98.
27. Herold T, Schneider S, Metzeler K, Neumann M, Hartmann L, Roberts KG, Konstandin NP, **Greif PA**, Bräundl K, Ksienzyk B, Huk N, Schneider I, Zellmeier E, Jurinovic V, Mansmann U, Hiddemann W, Mullighan CG, Bohlander SK, Spiekermann K, Hölzer D, Brüggemann M, Baldus CD, Dreyling M, Gökbuget N. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in adults have frequent IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis. *Haematologica*. 2016 Aug 25. [Epub ahead of print]

28. Woischke C, Schaaf CW, Yang HM, Vieth M, Veits L, Geddert H, Märkl B, Stömmer P, Schaeffer DF, Frölich M, Blum H, Vosberg S, **Greif PA**, Jung A, Kirchner T, Horst D. In-depth mutational analyses of colorectal neuroendocrine carcinomas with adenoma or adenocarcinoma components. *Mod Pathol*. 2016 Sep 2. [Epub ahead of print]
29. Herold T, Metzeler KH, Vosberg S, Hartmann L, Jurinovic V, Opatz S, Konstandin NP, Schneider S, Zellmeier E, Ksienzyk B, Graf A, Krebs S, Blum H, Cristina Sauerland M, Büchner T, Berdel WE, Wörmann BJ, Mansmann U, Hiddemann W, Bohlander SK, Spiekermann K, **Greif PA**. Acute myeloid leukemia with del(9q) is characterized by frequent mutations of NPM1, DNMT3A, WT1 and low expression of TLE4. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017 Jan;56(1):75-86. [Epub ahead of print]
30. Cusan M, Vegi NM, Mulaw MA, Bamezai S, Kaiser LM, Deshpande AJ, **Greif PA**, Quintanilla-Fend L, Göllner S, Müller-Tidow C, Humphries KR, Armstrong SA, Hiddemann W, Feuring-Buske M, Buske C. Controlled stem cell amplification by HOXB4 depends on its unique proline-rich region near the N-terminus. *Blood*. 2016 Nov 8. [Epub ahead of print]
31. von der Heide EK, Neumann M, Vosberg S, James AR, Schroeder MP, Sanchez JO, Isaakidis K, Schlee C, Luther M, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Mochmann LH, Nowak D, Hofmann WK, **Greif PA**, Baldus CD. Molecular alterations in bone marrow mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2016 Nov 11. [Epub ahead of print]

Reviews and Editorials:

1. **Greif PA**, Bohlander SK. Up a lymphoid blind alley: Does CALM/AF10 disturb Ikaros during leukemogenesis? *World J Biol Chem*. 2011 Jun 26;2(6):115-8.
2. Neumann M, **Greif PA**, Baldus CD. Mutational landscape of adult ETP-ALL. *Oncotarget*. 2013 Jul;4(7):954-5.

Textbook contributions:

MANUAL Leukämien, MDS, MPS © 2015 by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- die schriftliche Habilitationsleistung selbständig verfasst wurde und die Herkunft des verwendeten oder zitierten Materials ordnungsgemäß kenntlich gemacht wurde

- mir bisher kein akademischer Grad entzogen wurde und kein Verfahren gegen mich anhängig ist, welches die Entziehung eines akademischen Grades zur Folge haben könnte

- ich noch kein Habilitationsverfahren im gleichen Fach erfolglos beendet habe.

München, 01.03.2017

Dr. med. Philipp Greif

Danksagung

Mein Dank gilt den Mitgliedern des Fachmentorats.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann für die Möglichkeit, meine eigene Arbeitsgruppe aufzubauen, Frau Prof. Dr. Ortrud Steinlein für die klinische Weiterbildung im Fach Humangenetik, Herrn Prof. Dr. Ulrich Mansmann für die Unterstützung bei der Bioinformatik.

Bei Herrn Dr. Tobias Herold, Herrn Dr. Klaus Metzeler und Herrn Prof. Dr. Karsten Spiekermann bedanke ich mich für die erfolgreiche und kollegiale Zusammenarbeit. Darüber hinaus danke ich meinem ehemaligen Arbeitsgruppenleiter und Mentor, Herrn Prof. Dr. Stefan Bohlander, für die Motivation in der Krebsforschung tätig zu werden.

Die unentbehrliche Grundlage für die Erforschung der AML lieferten mir die AMLCG-Studiengruppe und alle Patienten, die an den klinischen Studien teilgenommen haben.

Ich bedanke mich bei meinen Kooperationspartnern im Rahmen des Deutschen Konsortiums für Translationale Krebsforschung (DKTK), insbesondere Herrn Dr. Martin Neumann und Frau Prof. Dr. Claudia Baldus in Berlin sowie Herrn Dr. Friedrich Stölzel, Herrn Dr. Moritz Middeke und Herrn Prof. Christian Thiede in Dresden.

Diese Arbeiten wären nicht möglich gewesen ohne das herausragende Engagement meiner Doktoranden und Mitarbeiter Frau Sabrina Opatz, Herrn Dr. Sebastian Vosberg, Frau Katrin Reiter, Frau Dr. Luise Hartmann, Herrn Georg Leubolt und Frau Dr. Sayantane Datta.

Schließlich danke ich meiner Familie, vor allem meiner Frau, Dr. Naschla Greif-Kohistani, für ihre Geduld, die oft durch meine wissenschaftlichen Arbeiten beansprucht wurde.