

Aus der III. Medizinischen Klinik, Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann)

Identifikation neuer molekularer, therapeutischer Zielfaktoren in der
Pathogenese von Fröhrtodesfällen bei der
Akuten Promyelozyten Leukämie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Alexander Streuer

aus
Sawodoukowsk

2021

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Daniel Nowak

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
TABELLENVERZEICHNIS.....	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 Akute Myeloische Leukämie	4
1.2 Akute Promyelozyten Leukämie	7
1.2.1 Epidemiologie.....	7
1.2.2 Pathomechanismus	7
1.2.3 Klinische Manifestation und Diagnostik	12
1.2.4 Fröhrtodesereignisse bei der APL	13
1.2.5 Prädiktive Faktoren von Fröhrtodesereignissen und Gesamtüberleben	14
1.2.6 Pathomechanismus der Koagulopathie in APL	15
1.2.7 Therapie der APL.....	18
1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit	21
2 MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 Materialgewinnung	22
2.1.1 Patienten	22
2.1.2 Isolation mononuklearer hämatopoetischer Zellen mittels Ficoll	25
2.1.3 RNA Extraktion.....	25

2.1.4	Qualitätsbestimmung von RNA.....	26
2.1.5	cDNA Synthese.....	26
2.2	RNA Sequenzierung.....	27
2.2.1	Herstellung der Sequenzierungsbibliothek.....	27
2.2.2	Sequenzierung.....	28
2.2.3	Bioinformatische Auswertung.....	30
2.3	Realtime quantitative Polymerase Kettenreaktion.....	38
2.4	Sanger Sequenzierung.....	39
2.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	40
3	ERGEBNISSE.....	41
3.1	Screeningkohorte.....	41
3.1.1	Globale Expressionsmuster.....	41
3.1.2	Differenziell exprimierte Gene in der Screeningkohorte.....	43
3.2	Validierungskohorte.....	45
3.2.1	Technische Validierung des Expressionsausmaßes der RNA Sequenzierung.....	45
3.3	Kandidatengene in der Validierungskohorte.....	46
3.4	Differentielle Genexpression nach Blutungsereignissen.....	49
3.4.1	Ergebnisse in der angepassten Screeningkohorte.....	49
3.4.2	MT1G und MT1E in der Validierungskohorte.....	50
3.5	Fusionsgene.....	52
3.6	Klinische Relevanz der neuen entdeckten Biomarker.....	54
4	DISKUSSION.....	56
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	61
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	62

7 PUBLIKATIONEN UND ABSTRACTS: ALEXANDER STREUER.....	78
7.1 Publikationen	78
7.2 Kongressvorträge	78
7.3 Abstracts	78
8 LEBENSLAUF	80
9 DANKSAGUNG	82

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Struktur des PML-RARA Fusionstranskripts	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der PML-RARA-getriebenen APL-Pathogenese	11
Abbildung 3: Vereinfachtes Schema der APL assoziierten Koagulopathie.	16
Abbildung 4: Überblick der Behandlung von neu diagnostizierten APL Fällen	20
Abbildung 5: Kaplan-Meier Kurve des Gesamtüberleben der Screeningkohorte	23
Abbildung 6: Kapillarelektropherogramm eines Bioanalyser 2100	26
Abbildung 7: Schritte der Herstellung der Sequenzierungsbibliothek.....	29
Abbildung 8: Paired-End Sequenzierung und das Alignment	30
Abbildung 9: Vulcano Plot	41
Abbildung 10: Heatmap der signifikant exprimierten Gene	42
Abbildung 11: Gene Set Enrichment Analyse	43
Abbildung 12: Expression von EFEMP1, ALOX15B, S100A8 und S100A9 in der Screeningkohorte.....	44
Abbildung 13: Genexpression von bekannten Mediatoren der APL Koagulopathie ..	45
Abbildung 14: Korrelation des Expressionsausmaß in der RNA Sequenzierung und der RT-qPCR.....	46
Abbildung 15: Genexpression und Langzeitüberleben in der Validierungskohorte ...	48
Abbildung 16: Subgruppenanalyse nach Blutungen	49
Abbildung 17: Anteil der Überexpression von MT1G gruppiert nach dem Blutungsgrad	50
Abbildung 18: Genexpression und Gesamtüberleben in der Subgruppenanalyse	51
Abbildung 19: Fusionstranskript TPM4-KLF2.....	53

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML von 2016	5
Tabelle 2: Frühod Rate in verschiedenen Studien*ED definiert als Tod innerhalb von 10 Tagen	14
Tabelle 3: Charakteristika der beiden Kohorten	24
Tabelle 4: Beschreibung von bioinformatischen Dateiformaten	31
Tabelle 5: Primer Sequenzen der untersuchten Gene und Transkripten	39
Tabelle 6: Univariate Analyse des Gesamtüberlebens	54
Tabelle 7: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens	55

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALOX15B	Arachidonate 15-lipoxygenase, type B
AML	Akute Myeloische Leukämie
ANXA2	Annexin A2
APL	Akute Promyelozytenleukämie
ATO	Arsen Trioxid
ATRA	All-trans-Retinsäure
cDNA	<i>Engl.:</i> complementary DNA
CR	<i>Engl.:</i> Complete Remission; „Langzeitremission“
DIC	<i>Engl.:</i> Disseminated Intravascular Coagulation, „disseminierte intravasale Koagulopathie“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
ED	<i>Engl.:</i> Early Death; „Frühtode“
EFEMP1	EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1
FAB	French-American-British
FC	Foldchange
FDR	<i>Engl.:</i> false discovery rate
FISH	<i>Engl.:</i> Fluorescence in situ hybridization
GPI	Glucose-6-phosphat-Isomerase
GSEA	Gene Set Enrichment Analyse
HDAC	Histone Deacetylasen
HR	Hazard Ratio
IGV	Integrated Genome Viewer
KLF2	Krüppel-like Factor 2
log2-FC	Log-2 transformierter Foldchange
lncRNA	Long non-coding RNA
mRNA	messenger RNA
MT1E	Metallothionein-1E
MT1G	Metallothionein-1G
NB	nuclear bodies
N-CoR	nuclear receptor corepressor
NES	<i>Engl.:</i> normalized score
OS	<i>Engl.:</i> Overall Survival; „Gesamtüberleben“
p_{adj}	<i>Engl.:</i> p-value adjusted
PCA	Principal Component Analyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDPN	Podoplanin
PML	Promyelocytic Leukemia Protein
R²	Bestimmtheitsmaß

RARA	Retinoic Acid Receptor Alpha
RARE	<i>Engl.:</i> Retinoic Acid responsive elements
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
RT-qPCR	Real-time quantitative PCR
RXR	retinoid X receptor cofactor
S100A8	S100-Calcium-bindendes Protein A8
S100A9	S100-Calcium-bindendes Protein A9
SMRT	<i>Eng.:</i> thyroid hormone receptor
tPA	Tissue plasminogen activator
TPM4	Tropomyosin 4
uPA	Urokinase plasminogen activator

1 EINLEITUNG

Die Akute Promyelozyten Leukämie (APL) ist eine Sonderform der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) und macht ca. 10 bis 15% der AML-Erkrankungen aus (Grimwade et al., 2010). Die APL ist molekulargenetisch durch die Chromosomentranslokation t(15,17), die für das Fusionsgen *PML-RAR α* codiert (de Thé et al., 1990; Longo et al., 1990; Rowley et al., 1977) (Grignani, cell 1993) oder eine ähnliche Translokation mit der Beteiligung von *RAR α* (Mistry et al., 2003) definiert. Das dabei entstehende onkogene Fusionsprotein *PML-RAR α* fungiert zum einen als transkriptioneller Repressor von *RAR α* Ziel-Genen und stört zum anderen die homöostatische Funktion von *PML* „nuclear bodies“. Dies führt zu einer Proliferation von myeloischen Vorläuferzellen und bewirkt einen Differenzierungsarrest auf Ebene der Promyelozyten (Grignani F, Nature 1998, Wang K, Cancer Cell 2010, Martens JHA, Cancer Cell 2010, Fabiani E, Oncotarget 2017).

Durch die Entschlüsselung des Pathomechanismus und dem zielgerichteten Einsatz von all-trans Retinsäure (ATRA), wurde die Therapie in den letzten Dekaden revolutioniert und es konnte die 5 Jahres relative Überlebensrate von 18% (1975 – 1990) auf 64% (2000 - 2008) gesteigert werden (Chen et al., 2012). Durch den zusätzlichen Einsatz von Arsen Trioxid (ATO) zusammen mit ATRA konnte die Prognose sogar noch weiter verbessert werden (Lo-Coco et al., 2013; Platzbecker et al., 2017).

Trotz der großen Fortschritte der letzten Jahrzehnte und Verträglichkeit der Therapie bleibt die Rate der Frühode („Early Death“, ED), definiert als Tod innerhalb der ersten 30 Tage nach Diagnosestellung, unverändert hoch. In populationsbasierten Studien wird diese mit 17% bis 29% angegeben und konnten in den letzten beiden Dekaden kaum verbessert werden. Darüber hinaus treten immer noch bei ca. 40% bis 65% in der frühen Krankheitsphase APL spezifische lebensgefährliche Koagulopathien in Form von Thrombosen oder Blutungskomplikationen auf (Lehmann et al., 2011; McClellan et al., 2012; Park et al., 2011). Es besteht also dringend der Bedarf, die Pathogenese der APL Frühodesfälle weiter aufzuklären und neue therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren.

1.1 Akute Myeloische Leukämie

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine Neoplasie der Myelopoese mit variabler Beteiligung der myeloischen Zelllinien. Die AML wurde früher anhand morphologischer Kriterien nach der French-American-British (FAB) Klassifikation eingeteilt. Heutzutage wird die WHO-Klassifikation von 2016 verwendet, die die AML anhand mikroskopischer, zytogenetischer und molekulargenetischer Charakteristika unterteilt (Tabelle 1)(Arber et al., 2016).

Sie tritt in etwa bei 3,7 Menschen pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf, wobei die Inzidenz im Alter stark ansteigt auf bis zu 13,7 Fälle pro 100.000 Einwohner im Alter über 65 Jahre in Europa (Visser et al., 2012). Der Altersmedian lag bei erwachsenen Patienten bei 72 Jahren in einer schwedischen Registerstudie (Juliusson et al., 2009). Für die Erkrankung verantwortlich ist eine pathologische Proliferation klonaler myeloischer Zellen, die meist dem hochproliferativen „Progenitorpool“ oder seltener dem „Stammzellpool“ entspringen. Dieser schnellwachsende Klon verdrängt die übrige gesunde Hämatopoese mit den daraus resultierenden klinischen Konsequenzen. Es kommt zu einer Granulozytopenie mit Infektanfälligkeit, Thrombozytopenie mit Blutungsneigung und Anämie mit Leistungsminderung und Dyspnoe.

Subgruppe	Spezifikation
AML mit wiederkehrenden genetischen Veränderungen	<ul style="list-style-type: none"> • AML mit t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> • AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> • APL mit t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i> • AML mit t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i> • AML mit t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> • AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i> • AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> • Provisorische Entität: AML mit <i>BCR-ABL1</i> • AML mit <i>NPM1</i>-Mutation • AML mit biallelischer <i>CEBPA</i>-Mutation • Provisorische Entität: AML mit mutierten <i>RUNX1</i>
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien	
AML, nicht anderweitig klassifiziert (Not otherwise specified, NOS)	<ul style="list-style-type: none"> • AML mit minimaler Differenzierung • AML ohne Ausreifung • AML mit Ausreifung • Akute myelomonozytäre Leukämie • Akute Monoblasten-/Monozytenleukämie • Akute Erythrozytenleukämie • Akute Megakaryoblastenleukämie • Akute Basophilenleukämie • Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Down-Syndrom-assoziierte Proliferation	<ul style="list-style-type: none"> • Transiente abnorme Myelopoese (TAM) • Myeloische Leukämie mit Down Syndrom

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML von 2016
 Nach (Arber et al., 2016)

Neben rekurrenten chromosomalen Aberrationen wie Trisomie 8, Monosomie 7 oder Gentranslokationen wie den Fusionstranskripten *RUNX1-RUNX1T1* t(8;21), *PML-RAR α* t(15;17), führen molekulare Veränderungen zu einem Überlebensvorteil des Klons. Diese Veränderungen treten häufig in Form von Mutationen auf und können in funktionelle Gruppen eingeteilt werden wie beispielsweise 2016 von Papaemmanuil et al. vorgeschlagen (Papaemmanuil et al., 2016):

1. AML mit NPM1 Mutation
2. AML mit mutierten Chromatin, RNA-Splicing Genen, oder beides
3. AML mit TP53 Mutationen, chromosomaler Aneuploidie, oder beides
4. AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBF β -MYH11
5. AML mit biallelischer CEBPA Mutation
6. AML mit t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
7. AML mit t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
8. AML mit MLL Fusionsgene; t(x;11)(x;q23)
9. AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM(EVI1)
10. AML mit IDH2^{R172} Mutationen ohne andere Klassen-definierende Läsion
11. AML mit t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
12. AML mit Treibermutationen, aber ohne Klassen-definierenden Läsionen
13. AML ohne detektierten Treibermutationen
14. AML mit passenden Kriterien für ≥ 2 genomischen Untergruppen

Darüber hinaus können mehrere Klone in einem Patienten gleichzeitig auftreten (Mossner et al., 2016).

Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der molekularen Veränderungen kann durch die Exposition gegenüber Risikofaktoren stark erhöht werden. Zu diesen zählen radioaktive Strahlung, Benzolen, Tabak, Mineralölprodukte, Farben, Äthylenoxyden, Herbizide, Pestizide als auch Zytostatika, typischerweise Alkylanzien.

Die Diagnosesicherung erfolgt über eine Knochenmarkspunktion mit Knochenmarkzytologie und -zytochemie, Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulargenetik. Dabei ist ein Blastenanteil von 20% im Knochenmark bzw. im peripheren Blut krankheitsdefinierend.

Die Therapie der AML richtet sich zunehmend nach dem molekulargenetischen Subtyp und dem individuellen Risiko nach der ELN Klassifikation (Doehner et al., 2017) und dem Performance Status. In der Regel besteht die Therapie bei Patienten mit gutem Performance Status aus einer intensivierten Chemotherapie, die sich in mehrere

Phasen unterteilen lässt. In der Induktionsphase werden mit hochdosierten Chemotherapeutika über mehrere Wochen in Zyklen eine massive Reduktion der Tumorzellen und das Erreichen einer Vollremission angestrebt. Bei der Postremissionsphase kann eine Konsolidierungstherapie mit hochdosiertem Cytarabin oder einer allogenen Blutstammzelltransplantation erfolgen zum Erhalt der Remission erfolgen.

Bei Vorliegen von bestimmten Mutationen oder Fusionstranskripten können auch so genannte „targeted therapies“ eingesetzt werden, welche zielgerichtet gegen aberrante Faktoren wirken. Wie beispielsweise Midostaurin bei *FLT3* Mutationen oder *ATRA* bei der *PML-RAR α* Translokation bei der APL.

1.2 Akute Promyelozyten Leukämie

Die APL ist eine Sonderform der AML mit einer eigenen molekularen Pathogenese und einem charakteristischen klinischen Erscheinungsbild. Sie wird nach der FAB Klassifikation als M3-Subtyp und nach WHO-Klassifikation als AML mit rekurrenter genetischer Aberration klassifiziert. Krankheitsdefinierend ist die t(15;17)-Translokation, welche für das Fusionstranskript *PML-RAR α* codiert. In ca. 5% der Fälle mit dem histologischen Bild einer APL findet sich eine andere, ähnliche Translokation mit der Beteiligung von *RARA* (Mistry et al., 2003).

1.2.1 Epidemiologie

Bei der APL handelt es sich um eine seltene Erkrankung mit einem Anteil von 5% bis 10% der neu diagnostizierten AML Erkrankungen hat eine geschätzte Inzidenz von 0,1/100.000 Einwohnern in westlichen Ländern (Sant et al., 2010). Höhere Inzidenzen sind in Italien, Spanien, Nord-, Mittel- und Südamerika zu beobachten. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 40 bis 50 Jahre, wobei die Inzidenz zwischen dem 10. Und dem 60. Lebensjahr ein konstantes Niveau aufweist (Vickers et al., 2000). Männer und Frauen sind in etwa gleich häufig betroffen.

1.2.2 Pathomechanismus

Für die Erkrankung ist bei über 95% der Patienten mit APL die reziproke chromosomale Translokation t(15;17)(q22;q12) mit der Beteiligung der Gene *Retinoic Acid Receptor-alpha* (*RARA*) und *Promyelocytic Leukemia Gene* (*PML*) auf Ebene der

Promyelozyten verantwortlich (Alcalay et al., 1991; Borrow et al., 1990; de Thé et al., 1990).

PML ist auf dem Chromosomenband 15q24 lokalisiert und besitzt 9 Exons, welche mehrere alternativ-gespleißte Transkripte produzieren (Jensen et al., 2001). PML interagiert mit mehr als 170 Proteinen (Lallemand-Breitenbach, 2010). Für die meisten dieser Interaktionen ist die RBCC Domäne (Exon 1-3) verantwortlich, welche eine PML Multimerisation und die Organisation in sogenannten nuclear bodies (NB) erlaubt (Bernardi and Pandolfi, 2007; de The et al., 2012; Zhong et al., 2000). Über die NB und andere PML Isoform-spezifische Domänen entsteht eine Vielfalt verschiedener Bindungsstellen, welche PML erlauben in einer Vielzahl zellulärer Vorgänge wie p53-abhängige und unabhängige Apoptose und Seneszenz (Bischof et al., 2002; Ito et al., 2008; Ivanschitz et al., 2015; Matt and Hofmann, 2018), Selbsterneuerung (Ito et al., 2012; Viale et al., 2009) und epigenetische Regulation und Transkription hämatopoetischer Stammzellen (Khan et al., 2001; Nguyen et al., 2005; Wang and Chen, 2008; Yoshida et al., 2007) involviert zu sein.

RARA ist auf dem Chromosomenband 17q21 lokalisiert und besitzt 10 Exons, welche für 2 Isoformen *RARA1* und *RARA2* codieren (Zelent et al., 2001). Das *RARA* Protein gehört zur Klasse der Kernrezeptor Superfamilie (aus Engl.: *nuclear receptor superfamily*) und fungiert als Transkriptionsfaktor, welcher durch Retinoide, Vitamin-A Derivate, aktiviert werden kann (Collins, 2002). In Anwesenheit seiner Liganden, bildet *RARA* Heterodimere mit *retinoid X receptor cofactor* (RXR) um an spezifische Motive (bspw. *Retinoic Acid responsive elements*, RARE) im Promotor der Zielgene zu binden (Leroy et al., 1991). In Abwesenheit der Liganden, interagiert *RARA/RXR* mit nukleären Korepressoren wie *thyroid hormone receptor* (SMRT) und *nuclear receptor corepressor* (N-CoR) und formt gemeinsam mit Gerüstproteinen und *histone deacetylases* (HDAC) Nukleosome, welche in einer transkriptionellen Repression resultieren (Nagy et al., 1997). Als Liganden-abhängiger Schalter ist *RARA* beispielsweise in der Differenzierung von myeloischen Progenitorzellen involviert (Kastner et al., 2001)

Die Translokation t(15;17)(q22;q21) zwischen *PML* und *RARA* kann verschiedene Bruchpunkte aufweisen (Abb. 1). Dabei sind drei typische Bruchpunkte im *PML* Gen, welche als *bcr1*, *bcr2* und *bcr3* („breakpoint cluster region“, bcr) bezeichnet werden (Alcalay et al., 1991; Borrow et al., 1990; de Thé et al., 1990; Lemons et al., 1990). Daneben gibt es nur einen typischen Bruchpunkt im *RARA* Gen (Pandolfi et al., 1992).

Abhängig davon welcher Bruchpunkt vorliegt können unterschiedliche Fusionstranskripte generiert werden, welche als L (long, bcr1), V (variant, bcr2) oder S (short, bcr3) bezeichnet werden. Dies sind die am häufigsten vorkommenden Transkripte und finden sich in 90-95% aller APL Fälle. In nur 70% bis 80% der Fälle wird das reziproke Transkript *RARA1-PML* bzw. *RARA2-PML* transkribiert, was darauf hinweist, dass dies nicht für die Entwicklung der APL benötigt wird (Alcalay et al., 1992; Goddard et al., 1991).

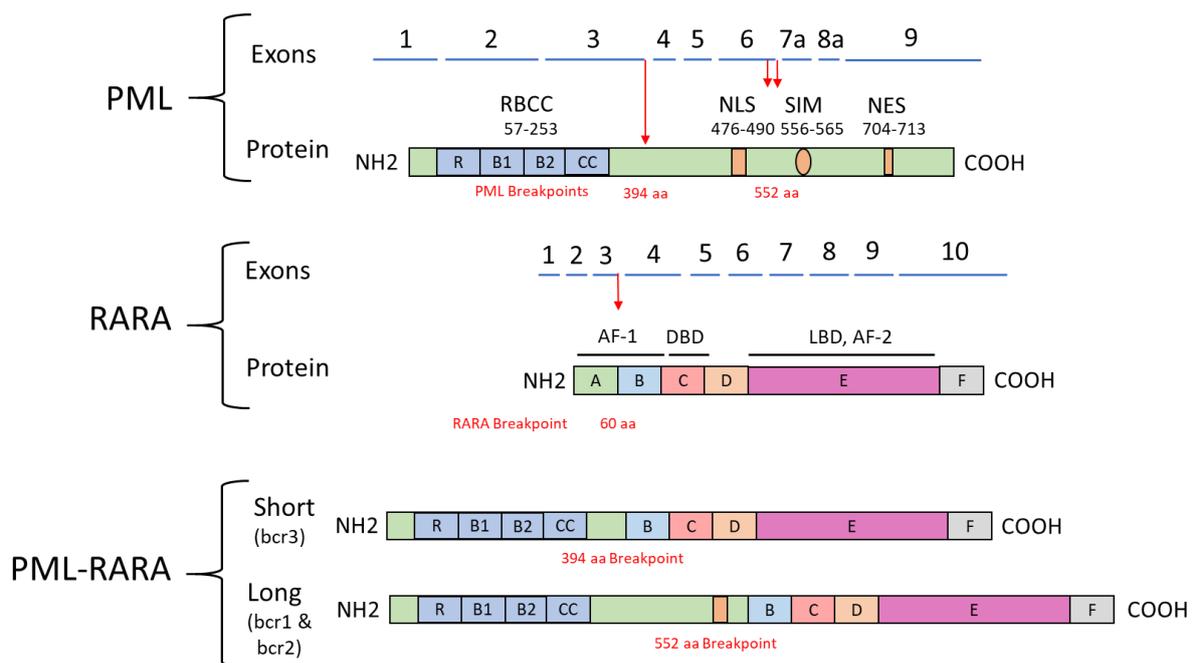


Abbildung 1: Struktur des PML-RARA Fusionstranskripts

Promyelocytic leukemia (PML) und *retinoic acid receptor-α* (RARA) Proteine und das entsprechende *PML-RARA*-Fusionsprotein mit den Bruchpunktregionen (rot markiert).

Bei *PML*: Ringfinger (R), B-Boxen (B1 und B2), „Coiled-coil“-Domäne (CC), „nuclear localization signal“ (NLS), SUMO-Interaktionsmotiv (SIM) und „nuclear export signal“ (NES).

Bei *RARA*: N-terminale Domäne (A, B), einschließlich der „activation function“ Domäne 1 (AF-1), DNA-bindende Domäne (C), Hormon-bindende Domäne (E) und andere regulatorische Domänen (D und F).

Angepasst nach (Liquori et al., 2020)

In 1-2% aller Patienten mit dem zytologischen Bild einer APL treten andere Translokationen als die typische t(15;17) auf. Bis heute sind 12 Fusionstranskripte beschrieben, von denen alle *RARA* beinhalten (Baba et al., 2019). Dabei ist *ZBTB16* (früher *PLZF*)-*RARA* in über 30 beschriebenen Patienten die häufigste Variante (Chen et al., 1993). Andere Fusionspartner sind unter anderem *NPM1* (Corey et al., 1994), *NUMA1* (Wells et al., 1997), *STAT5B* (Arnould et al., 1999), *PRKAR1A* (Catalano et al., 2007), *FIP1L1* (Kondo et al., 2008), *BCOR* (Yamamoto et al., 2010), *GTF2I* (Li et al., 2015) oder *FNDC3B* (Cheng et al., 2017). Nicht nur diagnostisch ist dies zu

berücksichtigen, sondern auch therapeutisch, da einige dieser Fusionstranskripte eine veränderte Sensitivität gegenüber *ATRA* und *ATO* aufweisen (Sanz et al., 2019).

Das Protein aus dem Fusionstranskript *PML-RAR α* weist sowohl einen dominant negativen als auch einen gain-of-function Effekt betreffend der Funktion von *PML* und *RARA* auf (Lo-Coco and Hasan, 2014; Pandolfi, 2001) (Abb. 2).

Vermutlich wird dies durch die erhaltene Fähigkeit des *PML*-Abschnitts des Fusionsproteins *PML-RAR α* mit einer Vielzahl von Proteinen, darunter *PML* und anderen Transkriptionsfaktoren zu interagieren möglich (Lin and Evans, 2000; Minucci et al., 2000; Saeed et al., 2012). Durch das Fusionstranskript kommt es zu einer Disruption der PML-NB (Grignani et al., 1998; Koken et al., 1994), welche in zahlreichen zellulären Vorgängen involviert sind wie p53-abhängige und unabhängige Apoptose und Seneszenz (Bischof et al., 2002; Ito et al., 2008; Ivanschitz et al., 2015; Matt and Hofmann, 2018), Selbsterneuerung der Zellen (Ito et al., 2012; Viale et al., 2009).

Außerdem blockiert *PML-RAR α* die Transkription von *RAR α* Zielgenen, die in der myeloischen Differenzierung involviert sind, und bewirkt dadurch ein Ausbleiben einer Differenzierung zu granulozytären Reifungsstufen (Grisolano et al., 1997; He et al., 1997). Darüber hinaus erkennt der *PML-RAR α -RXR* Komplex weitere atypische *RARE* Abschnitte, deren Transkription eine Proliferationsfähigkeit und einen Überlebensvorteil verleiht (Kamashev et al., 2004; Pandolfi, 2001). Daraus resultiert eine Akkumulation von leukämischen Zellen im Knochenmark auf der Stufe der Promyelozyten.

Weitere Mechanismen sind in neueren Studien *PML-RAR α* und wichtigen genetischen Modulatoren wie *PHF8* (Arteaga et al., 2013), *DNMT3A* (Cole et al., 2016), *TRIB3* (Li et al., 2017), *HDAC3* (Mehdipour et al., 2017) und *PHRF1* (Prunier et al., 2015) zugeschrieben worden, müssen allerdings in weiteren Studien und Experimenten validiert werden.

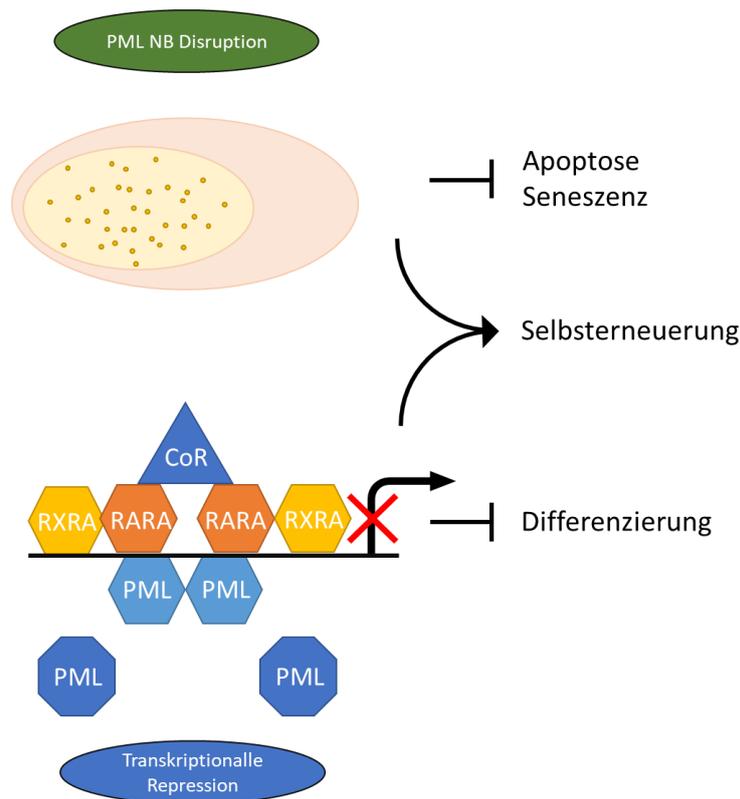


Abbildung 2: Schematische Darstellung der PML-RARA-getriebenen APL-Pathogenese
PML-RARα übt dominant-negative Effekte auf den Aufbau der *PML-NB* (oben) und die *RAR/RXR*-abhängige Transkriptionskontrolle (unten) aus.
 Letztere wird durch die Rekrutierung von Co-Repressor-Komplexen (CoR) erreicht. *PML-RARα* führt schließlich zu einem verstärkten Selbsterneuerungs- und Differenzierungsblock.

Angepasst nach (de Thé et al., 2017)

Das *PML-RARα* Fusionsprotein ist der wichtigste pathogenetische Treiber der APL. Die gleichmäßige Altersverteilung der Inzidenz suggeriert dabei, dass ein einziges zelluläres Event ausreicht um eine APL hervorzurufen (Vickers et al., 2000; Welch et al., 2012).

Andererseits zeigen transgene *PML-RARα* knock-in Mäuse einen myeloproliferativen Phänotyp, der sich nach einer gewissen Latenz von 6 bis 18 Monaten und unvollständiger Penetranz (15% bis 90%, abhängig vom Mausmodell) zu einer APL entwickelt (Brown et al., 1997; Grisolano et al., 1997; He et al., 1997; Kogan, 2007; Westervelt et al., 2003). Diese lange Latenz suggeriert die Notwendigkeit von zusätzlichen genetischen Aberrationen um eine klassische APL zu entwickeln. Dabei konnte mittels Next Generation Sequencing (NGS) im Mausmodell rekurrente Mutationen in *jak1* V657F (human: V658F) und Histone demethylase *kdm6a* identifiziert werden (Wartman et al., 2011).

Beim Menschen wurden bei der Untersuchung von 163 primären APL Proben und 69 Rezidiven mittels Whole Genome Sequencing weitere rekurrente Mutationen wie *FLT3*, *WT1*, *NRAS*, *KRAS*, *ARID1B*, *ARID1A* identifiziert (Madan et al., 2016).

Fasan et al. untersuchte 123 de novo APL Fälle mittels eines 26-Gene Panels und bestätigte *FLT3* (65/123) und *WT1* (13/123) als die häufigsten Mutationen. Andere Mutationen in *ARID1A*, *ARID1B*, *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *ETV6*, *KRAS*, *NRAS*, *RUNX1*, *SF3B1* und *TET2* wurden in weniger als 10% der Fälle gefunden (Fasan et al., 2017). Es gibt Hinweise, dass beispielsweise Mutationen in *FLT3*, *NRAS* und *MYC* die Erkrankungspenetranz zu erhöhen scheinen, jedoch nehmen sie nicht so eine zentrale Rolle, wie *PML-RAR α* ein (de Thé and Chen, 2010). Mutationen im *FLT3* Signalweg scheinen dabei aktivierend zu sein und zeigen einen proliferativen Phänotyp mit Hyperleukozytose (Beitinjaneh et al., 2010; Noguera et al., 2002)

1.2.3 Klinische Manifestation und Diagnostik

Lange Zeit galt die APL als die gefürchtetste Leukämieerkrankung. Patienten mit APL zeigen bei Präsentation in ca. 80% eine typische Koagulopathie in Form einer DIC und/oder einer Hyperfibrinolyse (Mitrovic et al., 2013). Aufgrund des meist foudroyanten Verlaufs handelt es sich bei dem Verdacht auf eine APL um einen hämatologischen Notfall, welcher schnellstmöglich abgeklärt werden sollte. Laborchemisch zeigt sich häufig eine Hypofibrinogenämie, Thrombozytopenie, erhöhter INR, verlängerte PTT, erhöhte D-Dimere als Ausdruck einer aktivierten und abgelaufenen Gerinnungskaskade. Klinisch treten Schleimhaut-assoziierte Blutungen bis hin zu schweren inneren Blutungen, die vor allem intrakranial oder pulmonal letal enden, auf. Weniger häufig überwiegen Symptome der Thrombose bei der initialen Manifestation (Breen et al., 2012). Analog zu anderen Akuten Leukämien können auch Symptome der Panzytopenie wie Anämie mit Leistungsabfall und Infektneigung im Vordergrund stehen.

Bei Verdacht auf APL sollte immer eine umfassende Diagnostik erfolgen, welche auch eine Knochenmarksbiopsie beinhaltet. Hier kann zytologisch bereits aufgrund einer typischen Morphologie der APL-Blasten häufig die Diagnosestellung erfolgen. Die häufigere, hypergranulierte Form zeigt dabei große Blasten mit zahlreichen Granula, Auerstäbchen, welche sich oft in Bündeln finden, und so genannte Fagott-Zellen (FAB M3). In selteneren Fällen (5-10%) zeigt die APL eher monozytoide Blasten, welche mikrogranulär erscheinen und wenige bis keine Auerstäbchen aufweisen (FAB M3).

Die Diagnosesicherung sollte mit RT-qPCR, Interphase-Zytogenetik (FISH) oder mittels Immunfluoreszenz erfolgen. Außerdem bietet die RT-qPCR die spätere Durchführung des molekularen Monitoring des messbaren Resterkrankung (MRD, minimal residual disease) bei der genauen Quantifizierung des *PML-RARa* Transkripts.

1.2.4 Frühodesereignisse bei der APL

Die APL stellt in vielerlei Hinsicht einen Sonderfall unter den AMLs dar. Sie hat sich von der gefürchtetsten Unterformen vor der Behandlung mit ATRA zu der AML mit der besten Prognose heutzutage entwickelt. In aktuellen Studien beträgt die Fünfjahresüberlebensrate ca. 95% mit der Behandlung mit ATRA und ATO.

Eine der letzten Herausforderungen stellt die Mortalität zu Beginn der Erkrankung dar. Diese sogenannten Frühode (Early Deaths, ED), die als Tod innerhalb von 30 Tagen definiert sind, treten in großen klinischen Studien mit einer Inzidenz von 3% bis 10% auf (Fenaux et al., 1999; Lo-Coco et al., 2013; Mandelli et al., 1997; Powell et al., 2010; Sanz et al., 2004; Sanz et al., 2010). Dabei sind Blutungen als die häufigste und Infektionen als die zweithäufigste Ursache für das Versterben verantwortlich. Das Risiko an einer Hämorrhagie bedingten Mortalität zu erleiden beträgt in großen klinischen Studien 3% bis 5% in der ATRA Ära (de la Serna et al., 2008).

Allerdings wird die Todesrate in klinischen Studien vermutlich aufgrund einer Selektion der Patienten zu Beginn der Studie und der Behandlung nach Protokoll und durch erfahrene Experten deutlich unterschätzt. In nicht klinischen Studien wird die Frühodesrate mit ca. 20% angegeben (Micol et al., 2014).

In populationsbasierten Studien ist diese deutlich höher und liegt bei ca. 11% bis 30% in entwickelten Industrienationen und sogar noch höher in Schwellenländern (Tabelle 2).

Trotz des Einsatzes von modernen Medikamenten geht aus der nordamerikanischen, schwedischen und kanadischen Studie hervor, dass die Frühodesrate in den letzten Dekaden kaum verbessert werden konnte.

Studie	Fallzahl	Frühtod Rate
Mandelli F, Blood, 1997	240	11 (5%)
Tallman MS, N Engl J Med, 1997	174 (IDA) 172 (ATRA)	24 (14%) (IDA) 19 (11%) (ATRA)
Fenaux P, Blood, 1999	181	31 (7%)
de la Serna, Blood, 2008	732	66 (9%)
Di Bona E, Br J Haematol, 2000	499 (ATRA + IDA) 123 (IDA)	19 (3,8%)* 7 (7,3%)*
Lehmann S, Leukemia, 2011 (Schweden)	105	30 (29%)
Park JH, Blood, 2011 (USA)	1400	238 (17%) 24% (>55a)
Rahmé R, Leukemia, 2014 (French)	399	39 (9.6%)
Paulsen K, Br J Haematol, 2014 (Kanada)	399	87 (22%)
Jacomo RH, Haematologica, 2007 (Brasilien)	134	43 (32%)
Serefhanoglu S, Leuk Res, 2010 (Türkei)	49	20 (40%)

Tabelle 2: Frühtod Rate in verschiedenen Studien

*ED definiert als Tod innerhalb von 10 Tagen

Die hämorrhagische Diathese ist für die meisten Tode während der Induktionsphase verantwortlich. Dabei ist meist eine intrakranielle bzw. pulmonale Lokalisation mit 65% bzw. 32% der Tode durch Einblutung für einen letalen Ausgang verantwortlich (de la Serna et al., 2008). Blutungen können aber auch in Form von Schleimhautblutungen, Ekchymosen, Petechien, Epistaxis oder als Blutung nach inadäquatem Trauma auftreten. So treten bei ca. 50% bis 60% aller Patienten mit APL Blutungen auf (Tallman et al., 1997).

Durch optimales Management der APL-spezifischen Komplikationen kann die Fröhntodesrate gesenkt werden. In der Studie von Lehmann et al. Betrag diese 22% an Universitätskrankenhäusern im Vergleich zu 56% an kleineren Häusern. Es besteht also dringend der Bedarf die Fröhntodesmortalität weiter zu senken.

1.2.5 Prädiktive Faktoren von Fröhntodesereignissen und Gesamtüberleben

Es wurden zahlreiche Studien, die sich mit möglichen prädiktiven Faktoren von ED und Blutungsereignissen beschäftigt haben, durchgeführt. Die Risikostratifizierung erfolgt bis heute vor allem mithilfe dem sogenannten Sanz-Score (Sanz et al., 2000). Dieser

beschreibt aus einer Kombination der prätherapeutischen Leuko- und Thrombozytenzahl das Rezidivrisiko. Niedriges und intermediäres Risiko Patienten weisen dabei jeweils eine Leukozytenzahl unter 10.000/ μ L auf und werden durch eine Thrombozytenzahl von 40.000/ μ L getrennt. Hochrisiko-Patienten zeigen dabei Leukozytenzahlen über 10.000/ μ L auf.

Weitere potenzielle Faktoren wie eine verlängerte PTT, erniedrigter INR, erniedrigtes Fibrinogen, hohe D-Dimere, hohes LDH und niedriger Performance Status wurden als Risikofaktor für einen Fröhntod durch Hämorrhagien diskutiert (Chang et al., 2012; Dally et al., 2005; de la Serna et al., 2008; Higuchi et al., 1997; Kim et al., 2011; Mantha et al., 2017; Mitrovic et al., 2013; Yanada et al., 2007). Allerdings sind hier die Daten inkonsistent. In der diesbezüglich größten durchgeführten Metaanalyse mit 1009 Patienten von Mantha et. al zeigte sich in einer multivarianten Analyse nur ein hoher Leukozytenwert und ein ECOG Performance Status von 3 bis 4 als statistisch signifikanter Prädiktor von frühen Todesereignissen durch hämorrhagische Diathesen. Blutungsereignisse äußern sich häufig in Form von Nasenbluten, Ecchymosen, gastrointestinale, pulmonale oder zerebrale Blutungen. Wobei letztere beiden häufig für die Todesursache verantwortlich sind (Mantha et al., 2017).

Auf molekularer Ebene wurde von Hecht et al. ein Score zur Risikostratifizierung der APL entwickelt. Dabei ging die Expression von *BAALC*, *ERG* und *WT1* in die Bewertung ein. Ein hoher Wert war dabei mit einem geringeren Gesamtüberleben und einer höheren Rezidiv-Wahrscheinlichkeit einhergehend (Hecht et al., 2017).

Bei der Analyse von Genome Wide SNP Array von APL Patienten konnten Nowak et al. feststellen, dass Patienten mit 2 oder mehr Kopienzahlvarianten ein schlechteres Gesamtüberleben aufwiesen. Außerdem war eine Deletion auf dem Chromosomenband 1q31.3 mit einem höheren Rezidivrisiko assoziiert (Nowak et al., 2012).

1.2.6 Pathomechanismus der Koagulopathie in APL

Zu den schwersten Symptomen der APL gehört eine komplexe Koagulopathie bei der Hämorrhagien als auch Thrombosen auftreten.

Auch im Vergleich zu anderen AMLs scheint eine Koagulopathie deutlich häufiger bei Patienten mit APL aufzutreten und demzufolge einen eigenen Pathomechanismus zu haben (Lee et al., 2013).

Heute geht man davon aus, dass die APL spezifische Koagulopathie komplex ist und durch multiple Mechanismen getriggert wird.

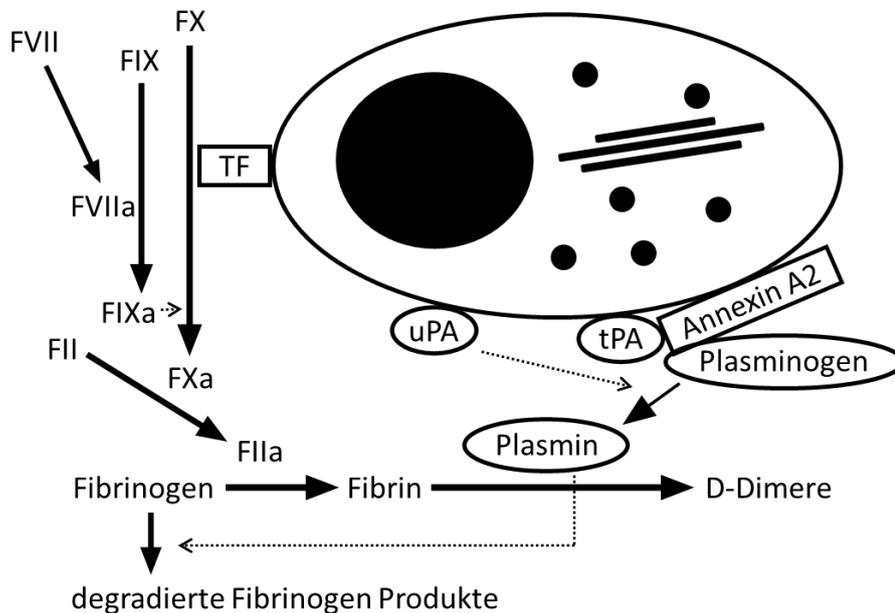


Abbildung 3: Vereinfachtes Schema der APL assoziierten Koagulopathie.

Tissue Faktor (TF), der auf der Oberfläche von leukämischen Blasten exprimiert wird, aktiviert Faktor (F) VII. Er bindet auch FVIIa, wodurch FIX und FX aktiviert werden. Letztere führen zur Bildung von Thrombin, das seinerseits die Fibrinbildung katalysiert. Parallel zu diesem Prozess der Gerinnungsaktivierung und des Faktorverbrauchs bindet das auf der Oberfläche der malignen Leukozyten vorhandene Annexin A2 tPA und Plasminogen, was zur Bildung von Plasmin führt, das dann Fibrin und Fibrinogen spaltet.

FII: Prothrombin; FIX: Gerinnungsfaktor IX; FVII: Gerinnungsfaktor VII; FX: Gerinnungsfaktor X; tPA, tissue plasminogen activator; uPA, urokinase-type plasminogen activator

Angepasst nach (Mantha et al., 2016)

Wesentlich scheint dabei eine durch *tissue factor* (TF) induzierte disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) und eine durch unter anderem *Annexin A2* (ANXA2) vermittelte primäre Hyperfibrinolyse zu sein (Mantha et al., 2016).

TF ist der primäre Mediator der regulären und pathologischen Hämostase. Es konnte gezeigt werden, dass TF in hohem Maße auf den APL Zelllinien NB4 exprimiert wird (Falanga et al., 1998; Koyama et al., 1994). Das Fusionsprotein *PML-RARα* kann möglicherweise dessen Promotor aktivieren (Yan et al., 2010). Außerdem soll die Apoptose ein potenter Induktor der TF Expression sein (Wang et al., 2001). Das Ergebnis einer erhöhten TF Expression ist die DIC mit einem Verbrauch der Gerinnungsfaktoren und Fibrinogen und einer sekundären Hyperfibrinolyse, welche durch Fibrin getriggert wird. Allerdings scheint diese Aktivierung der Gerinnung nicht

so ausgeprägt wie in einer Sepsis-induzierten DIC zu sein und eine Tendenz aufweisen natürliche Antikoagulanzen wie Protein C, Protein S und Antithrombin im geringeren Umfang zu verbrauchen (Rodeghiero et al., 1984). Außerdem ist die PTT nicht so stark verlängert und das Fibrinogen nicht im gleichen Maße erniedrig. Dies veranlasste viele Forscher zu dem Schluss, dass DIC nicht der einzige Mediator der APL Koagulopathie sein könne (Breen et al., 2012).

Die APL Promyelozyten exprimieren außerdem *ANXA2* in hohem Maße (Liu et al., 2011; Menell et al., 1999). *ANXA2* besitzt die Fähigkeit Plasminogen und *tissue plasminogen activator* (tPA) zu binden und so die Formation von Plasmin um den Faktor 60 zu steigern (Cesarman et al., 1994). Plasmin schneidet Fibrin. Außerdem kann es Fibrinogen und die Gerinnungsfaktoren V und VIII deaktivieren. Diese primär fibrinolytische Aktivität kann in sehr niedrigen Fibrinogenwerten resultieren und ist möglicherweise so für schwerwiegende hämorrhagische Diathesen in der APL verantwortlich (Stein et al., 2009).

Außerdem wurde die Expression von weiteren Plasminogenaktivatoren wie tPA und *urokinase plasminogen activator* (uPA) auf der Oberfläche von APL Zellen gefunden (Bennett et al., 1989; Dombret et al., 1993). Wie bereits vorher erwähnt, kann tPA über die Bindung von Plasminogen eine Fibrinolyse auslösen (Jardi et al., 2012). Darüber hinaus haben APL Patienten ein erworbenes Defizit an *alpha-2-antiplasmin* und *plasminogen activator inhibitor-1*, was ebenfalls eine Fibrinolyse begünstigt. (Avvisati et al., 1988; Sakata et al., 1991).

In neueren Untersuchungen wurden weitere Faktoren entdeckt, welche eine Rolle bei der APL Koagulopathie spielen könnten. Lavallée et al. untersuchten mittels „RNA Sequencing“ und FACS Analysen APL im Vergleich zu Nicht-APL AML Proben.

Dabei wurde *Podoplanin* (PDPN) als der spezifischste Oberflächenmarker für die APL identifiziert. Im Xenograftmodell war eine Überexpression von *PDPN* auf leukämischen Zellen mit Thrombozytopenie und verlängerter Blutungszeit assoziiert (Lavallée et al., 2018).

Darüber hinaus spielen wahrscheinlich auch weitere APL nicht spezifische Faktoren eine Rolle. Beispielsweise eine in Leukämien häufig beobachtete Thrombozytopenie durch Verdrängung der Megakaryopoese durch die neoplastischen Zellen.

1.2.7 Therapie der APL

Aufgrund der sich akut präsentierenden Blutungsneigung galt die APL lange Zeit als die gefürchtetste Leukämie Erkrankung.

Nachdem 1973 erstmals erfolgreich Anthrazykline (Daunorubicin) (Bernard et al., 1973) eingesetzt worden sind, revolutionierte die Einführung von ATRA (Huang et al., 1988) und ATO (Chen et al., 1996) die Therapie der APL und machte sie zum AML Subtyp mit der besten Prognose.

In neusten Studien konnte sogar gezeigt werden, dass ein Chemotherapie-freies Regime bei Patienten mit niedrigen bis intermediären Risiko genauso wirksam wie eins mit Chemotherapie bei weniger Nebenwirkungen ist. Auch die Rezidivrate ist unter der Kombination ATRA/ATO geringer (Abaza et al., 2017; Cicconi et al., 2016; Platzbecker et al., 2017).

Dadurch, dass *PML-RAR α* die zentrale Rolle bei der Entstehung der Erkrankung spielt, bietet dies einen Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie.

Die beiden empirisch gefunden Substanzen binden an *PML-RAR α* : ATRA an den *RARA* Abschnitt und ATO an die *PML*-Seite (Jeanne et al., 2010; Zhang et al., 2010). Die Bindung von ATRA aktiviert zum einen die Transkription von *RARA* abhängigen DNA-Abschnitten und zum anderen initiiert es die Degradierung des *PML-RAR α* Fusionsproteins als Teil seiner eigenen Feedback Schleife (de Thé et al., 1991; Zhu et al., 1999). Andererseits aktiviert die Bindung von ATO an *PML-RAR α* die SUMOlyation, welche in einer Degradierung resultiert (Chen et al., 1997; Jeanne et al., 2010; Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Lallemand-Breitenbach et al., 2001; Zhu et al., 1997).

Darüber hinaus ist bei der Behandlung der Erkrankung ein optimales Therapiemanagement wesentlich und beinhaltet eine frühe Diagnose, aggressive supportive Therapie, Prophylaxe und Behandlung von Therapie-assoziierten Komplikationen.

Um Fröhrtode und Komplikationen zu vermeiden sollten APL-suspekte Patienten sofort hospitalisiert und als Notfall behandelt werden. Die Diagnose sollte mittels Knochenmarkaspiraten genetisch in einem erfahrenen Referenzlabor bestätigt werden. Vor der Bestätigung sollte allerdings basierend auf der reinen Klinik und eines peripheren Blutausschrich mit der Therapie mit ATRA begonnen und Maßnahmen gegen die typische Koagulopathie getroffen werden. Der Nachweis der *PML-RAR α* Translokation kann im konventionellen Karyotypisierung, „fluorescence in situ

hybridization“ (FISH), „reverse transcriptase polymerase chain reaction“ (RT-PCR) oder „real-time quantitative PCR“ (RT-qPCR) erfolgen (Spinelli et al., 2015). Dabei stellt die RT-PCR und RT-qPCR die höchste Sensitivität und Spezifität dar und erlaubt die Bestimmung der *PML-RAR α* Isoform und die Quantifizierung für eine subsequeunte Minimal Residual Disease (MRD) Evaluation. Die prognostische Aussage der Bestimmung von *FLT3-ITD* und *WT1*, *NRAS* oder *KRAS* Mutationen bleibt ungewiss in der ATRA-ATO Ära und wird in der Routine nicht empfohlen (Sanz et al., 2019). In großen NGS basierten Studien lieferten beim Vergleich der Mutationen in Primären Proben und Rezidiven ebenfalls keinen prognostischen Mehrwert (Fasan et al., 2017; Madan et al., 2016).

Die komplexe Koagulopathie der APL stellt die häufigste Todesursache vor und kurz nach dem Beginn der Therapie dar und spiegelt sich in einer konsumierenden Koagulopathie als auch in einer primären und sekundären Hyperfibrinolyse mit intrazerebralen und pulmonalen Hämorrhagien, seltener mit Thrombosen, wider.

Das Monitoring sollte die Bestimmung von Thrombozyten, INR, aPTT, Thrombinzeit als auch von Fibrinogen und D-Dimere mindestens einmal täglich beinhalten. Die Transfusion von Fibrinogen und/oder Thrombozytenkonserven (TK) und fresh-frozen plasma (FFP) sollten sofort beim klinischen Verdacht großzügig transfundiert und anschließend mindestens einmal täglich wiederholt werden um die Fibrinogenkonzentration über 100-150 mg/dL, die Thrombozyten über 30-50 x10⁹/L und den INR unter 1,5 zu halten. Die supportive Therapie sollte bis zum Verschwinden klinischer und laboratorischer Zeichen einer Koagulopathie beibehalten werden. Der Vorteil vom Einsatz von Heparin, Tranexamsäure und andere Antikoagulanzen und antifibrinolytischen Substanzen bleibt weiterhin unklar und wird nicht empfohlen (Sanz et al., 2019).

Darüber hinaus kann sich rasch nach Therapiebeginn mit ATRA oder ATO ein potentiell letales APL-Differenzierungssyndrom entwickeln. Die Ursachen hierfür sind nicht abschließend geklärt. Es kommt jedoch durch die ATRA induzierte Differenzierung zu einer Ausschüttung diverser proinflammatorischer Zytokine, darunter IL1b, IL6, IL8 und TNF α , welche zu einem SIRS (aus Engl.: *Systemic inflammatory response syndrome*) führen (Stahl and Tallman, 2019). Dabei kann es zu einer Gewichtszunahme, Atemnot, Fieber ungeklärter Ursache, Lungeninfiltraten, Pleura oder Perikardergüssen kommen. Die Diagnose wird ausschließlich klinisch gestellt und gilt als gesichert, wenn drei der genannten Symptome auftreten.

Therapeutisch kommen dabei hochdosierte Steroide zum Einsatz. Prophylaktisch können Glucocorticoide zur Vorbeugung eines APL-Differenzierungssyndroms verabreicht werden.

Vor der Einführung von ATO in die Erstlinien Therapie der APL lag lange Zeit der Studienfokus auf der Optimierung einer Chemotherapie in Kombination mit ATRA. So entwickelten sich unterschiedliche Therapieregime, unter anderem der deutsche AMLCG und der spanische PETHEMA Ansatz (Lengfelder et al., 2018).

In der aktuellen Empfehlung der AML-Intergroup werden APL Patienten nach der prätherapeutischen Leukozytenzahl stratifiziert. Die Standardtherapie für Patienten mit niedrigem oder intermediärem Risiko (Standardrisiko) besteht aus der Kombination von ATO und ATRA ohne zusätzliche Chemotherapie. Bei Hochrisiko APL kommt ATRA in Kombination mit Chemotherapie zum Einsatz (Abbildung 4).

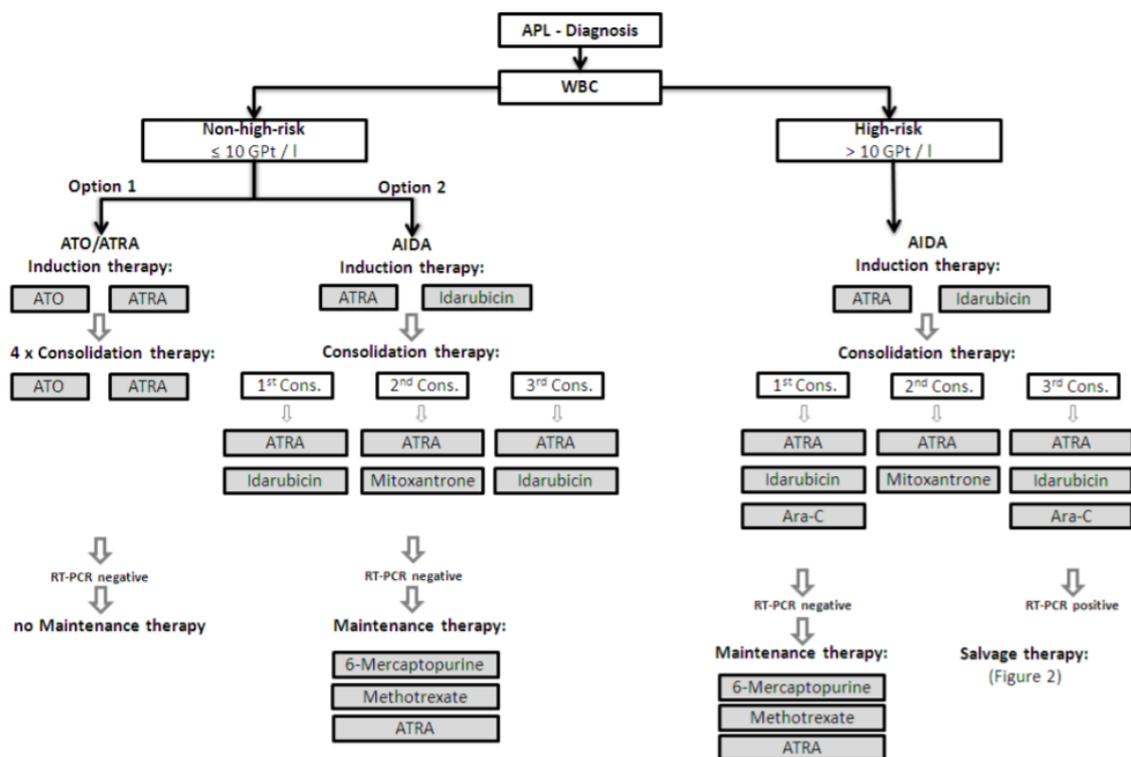


Abbildung 4: Überblick der Behandlung von neu diagnostizierten APL Fällen

Angepasst nach (Kompetenznetz-Leukämie, 2015)

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Trotz großer Fortschritte in den letzten Jahrzehnten bei der Therapie der APL birgt die APL spezifische Koagulopathie nach wie vor ein hohes Risiko einen Fröhrtod durch eine hämorrhagische Diathese zu erleiden. Bis auf den frühestmöglichen Einsatz von ATRA und einer aggressiven supportiven Therapie mit der Substitution von Gerinnungsfaktoren besteht keine zielgerichtete Therapie das Blutungsrisiko zu minimieren. Bis heute bleibt ungeklärt welche molekularen Faktoren dafür verantwortlich sind, dass es in einem Teil der APL Patienten zu schwerwiegenden Blutungen kommt.

Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit:

- 1) Lassen sich mittels „RNA Sequencing“ spezifische Charakteristika des globalen Transkriptoms von Patienten mit APL Fröhrtod im Vergleich zu Patienten mit Langzeitremission detektieren?
- 2) Gibt es Gene, welche in APL Fröhrtod Patienten hochreguliert und somit Mediatoren der APL spezifischen Koagulopathie sind?
- 3) Welchen Einfluss haben differenziell exprimierte Gene auf die Rate der Blutungsereignisse und das Langzeitüberleben?
- 4) Lassen sich weitere, bisher unbekannte molekulare Aberrationen wie Fusionstranskripte bei der APL nachweisen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialgewinnung

2.1.1 Patienten

Es wurden Proben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose aus dem Labor der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg zwischen den Jahren 1997 und 2010 herangezogen. Darunter waren 55 Knochenmarksproben und 17 periphere Blutproben.

Die molekularen Untersuchungen für Forschungszwecke sind mit dem schriftlichen Einverständnis der Patienten und im Einklang der Deklaration von Helsinki durchgeführt worden.

Aus diesem Bestand wurden zwei unabhängige Kohorten aus Patienten mit Akuter Promyelozyten Leukämie gebildet. Zum einen eine explorative Screeningkohorte mit $n=14$ Patienten und zum anderen eine Validierungskohorte mit $n=58$ Patienten. Die Screeningkohorte bestand aus sieben Patienten in der ED Gruppe und sieben in der CR Gruppe (Median 15 Monate, Range 3 bis 18 Monate), die für wichtige prognostische Parameter wie Alter, Leukozyten-, Thrombozyten und Sanz-Risiko gematcht worden sind. Das Gesamtüberleben der Patienten der beiden Gruppen ist in Abb. 5 dargestellt. Die Charakteristika beider Gruppen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Von diesen wurde das gesamte Transkriptom mittels „RNA Sequencing“ untersucht um differentiell exprimierte Gene zwischen den beiden Gruppen zu identifizieren.

Die Validierungskohorte bestand aus 15 ED und 43 CR Proben. Die klinischen Eigenschaften beider Patientenkohorten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Die statistische Auswertung der klinischen Parameter und des Gesamtüberleben erfolgte mit *R v3.6.1* (Team, 2019). Um die statistische Signifikanz zwischen den unabhängigen Gruppen zu berechnen wurde für kategoriale Variablen der Fisher's Exakt Test und für kontinuierliche Variablen der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Um das klinische Outcome und Unterschiede im Gesamtüberleben zu berechnen wurden die R-Pakete „*survival*“ (Therneau and Lumley, 2015) und „*survminer*“ (Kassambara et al., 2017) verwendet und eine univariate Cox-Regressionsanalysen und ein Log-Rank-Test mit der „*Surv*“ und „*Survfit*“-Funktion mit Standardparametern durchgeführt.

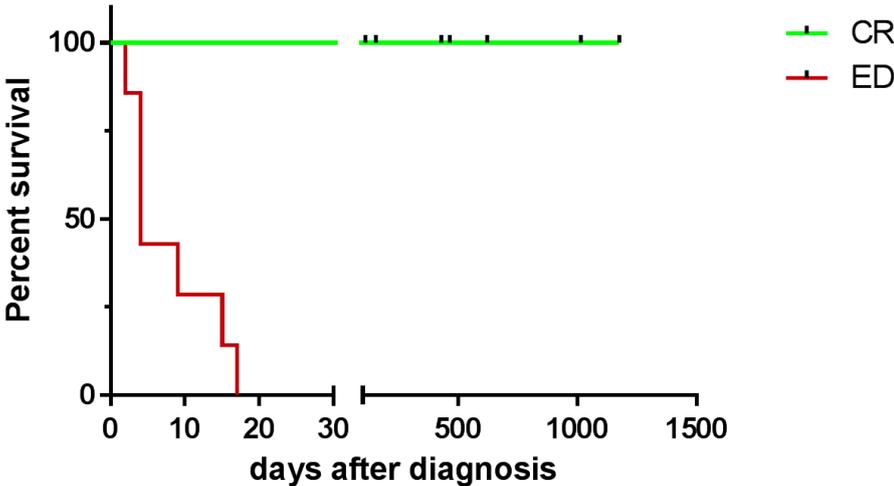


Abbildung 5: Kaplan-Meier Kurve des Gesamtüberleben der Screeningkohorte
ED: Early Death („Frühtode“); CR: Complete Remission („Langzeitremission“)

	Screeningkohorte			Validierungskohorte		
	APL-CR (n=7) n (%)	APL-ED (n=7) n (%)	p	APL-CR (n=43) n (%)	APL-ED (n=15) n (%)	p
Geschlecht (m)	1 (14)	1 (14)	1	18 (42)	5 (33)	0.76
Alter						
Median	57	67	0.25	52	62	0.075
Bereich	42-67	46-83		22-75	30-82	
Morphologie						
M3	7 (100)	4 (57)	0.19	24 (56)	5 (33)	0.16
M3v	0 (0)	3 (43)		10 (23)	3 (20)	
na	0	0		9 (21)	7 (47)	
Transkript						
S	6 (86)	5 (71)	1	15 (35)	5 (33)	0.12
L	1 (14)	2 (29)		19 (44)	3 (20)	
na	0	0		9 (21)	7 (47)	
KM Blasten in %						
Median	57	85	0.64	87	87	0.45
Bereich	24-90	68-100		50-100	9-99	
na	5	3		3	4	
Leukozyten, $\times 10^9/l$						
Median	2,600	9,600	0.16	1400	20210	0.001
Bereich	600-25,400	440-95,000		350-63790	400-130300	
na	0	0		0	3	
Thrombozyten, $\times 10^9/l$						
Median	22,000	27,000	1	26,000	34,500	0.67
Bereich	9,000-107,000	11,000-32,000		6,000-203,000	12,000-93,000	
na	2	0		0	3	
LDH, U/l						
Durchschn.	448	719	0.33	245	856	0.01
Bereich	378-517	346-3167		127-1268	177-1648	
na	5	0		0	8	
Sanz-Score						
niedrig	1 (14)	0 (0)	0.55	26 (60)	1 (7)	0.0001
intermed.	5 (71)	4 (57)		11 (26)	2 (13)	
hoch	1 (14)	3 (43)		6 (14)	9 (60)	
na	0	0		0 (0)	0 (20)	
Therapie Protokoll						
AMLCG	2 (29)	5 (71)	0.11	10 (23)	1 (7)	0.13
PETHEMA	2 (29)	0		3 (7)	1 (7)	
Andere	2 (29)	0		29 (67)	3 (20)	
na	1 (14)	2 (29)		26 (60)	10 (67)	

Tabelle 3: Charakteristika der beiden Kohorten

2.1.2 Isolation mononuklearer hämatopoetischer Zellen mittels Ficoll

Um die KM und PB Aspirate in ihre Bestandteile aufzutrennen und um mononukleäre Zellen zu isolieren, wurde eine Ficoll-Paque™ Dichtegradientenzentrifugation (GE Healthcare, München, Deutschland) entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Diese beruht auf einer physikalischen Auftrennung der Blutbestandteile aufgrund deren unterschiedlichen Dichte unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte. Mononukleäre Zellen und andere Bestandteile wie Thrombozyten mit einer niedrigen Dichte bilden dabei eine Interphase zwischen der Ficollschicht und den restlichen Bestandteilen von Knochenmark bzw. Blut.

2.1.3 RNA Extraktion

RNA wurde mittels TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) oder Qiagen AllPrep®, DNA/RNA Micro Kit (Hilden, Deutschland) isoliert.

Die Isolation mit TRIzol basiert auf der „single step RNA isolation“ Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). Dabei lysiert das in Trizol enthaltene Guanidiniumthiocyanat die Zellen aus den KM und PB Aspiraten und inhibiert gleichzeitig RNasen und andere Enzyme. Nach Homogenisierung der Proben in TRIzol Reagent wird Chloroform dazugegeben um eine Phasentrennung einer wässrigen Phase mit RNA, einer Interphase und einer roten organischen Phase erreicht.

RNA wird aus der wässrigen Chloroform Phase mit Isopropanol präzipitiert. Anschließend wird sie mit Ethanol gewaschen und resuspendiert.

Die Technik des Allprep Kits basiert auf einem DNA/RNA bindenden Säulensystem. Auch hier werden die Zellen in Guanidiniumthiocyanat-haltigen Puffer gegeben um sie zu lysieren und DNasen und RNasen zu inaktivieren. Das Lysat wird auf eine AllPrep-DNA-Spinsäule geleitet, gewaschen und danach kann gebrauchsfertige DNA eluiert werden. Beim Durchfluss mit Ethanol werden geeignete Bindungsbedingungen für RNA geschaffen und das Gemisch wird auf eine RNeasy MinElute-Spinsäule gebracht, wo Gesamt-RNA an die Membran bindet und Verunreinigungen weggespült werden. Anschließend kann RNA in RNase-freiem Wasser eluiert werden.

2.1.4 Qualitätsbestimmung von RNA.

Um sicherzustellen, dass nur RNA von hoher Qualität für die molekulargenetischen Analysen genutzt wurde, wurde der Bioanalyser 2100 (Agilent, Santa Clara, USA) genutzt, der einen RNA Qualitätsscore, den sogenannten RIN (RNA integrity number), ermittelt (Abb. 6).

Dieser basiert auf einer Kapillarelektrophorese bei der die Wanderung der negativ geladenen RNA Moleküle durch eine Elektrolytlösung in einem dünnen Kapillarrohr stattfindet und dabei eine Auftrennung aufgrund unterschiedlicher Fragmentgrößen erreicht wird. Die RNA wird mittels Fluoreszenz detektiert und es wird ein Elektropherogramm erstellt. Dadurch ist eine quantitative Größenbestimmung der RNA Fragmente im Bereich von 50 bis 7000 bp bei einer Sensitivität von pg/ μ L möglich. Anhand unterschiedlicher Kriterien wie beispielsweise dem Verhältnis der Peaks der ribosomalen Untereinheiten, 28S und 18S, wird der RIN berechnet. Dabei kann ein Wert von maximal 10 erreicht werden. Für die Herstellung einer NGS Sequenzierungsbibliothek sollte dieser einen Wert von 8 nicht unterschreiten.

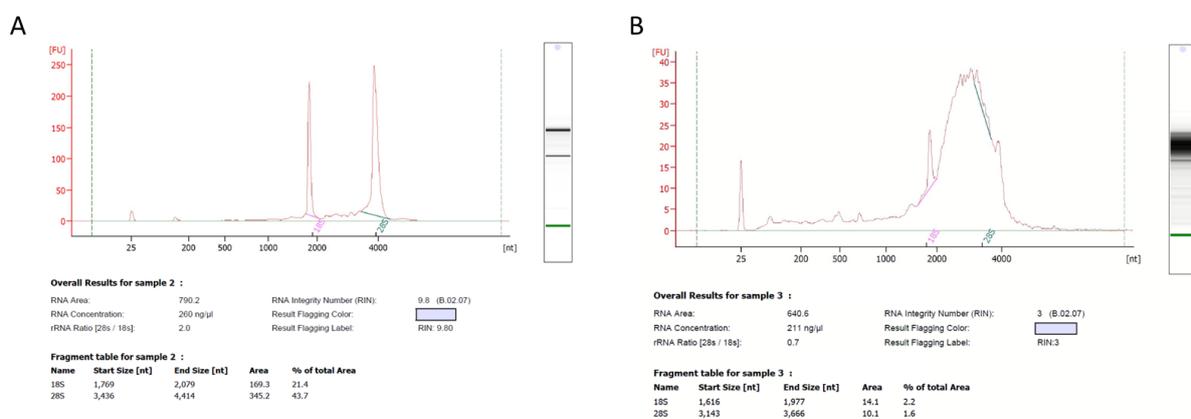


Abbildung 6: Kapillarelektropherogramm eines Bioanalyzers 2100

A: Abgebildet ist eine RNA mit erhaltener Integrität. Die beiden Fluoreszenzintensitäten der 28S und der 18S-rRNA Bande stehen dabei in einem Verhältnis von etwa 2:1. B: Abgebildet ist beispielhaft eine degradierte RNA.

2.1.5 cDNA Synthese

Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA von engl. complementary DNA) erfolgte mit RNA in Konzentrationen von 500 ng/ μ L und mit der Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in der

Anwesenheit eines RNase Inhibitors (RNasin; Promega, Madison, USA). RNA und cDNA wurden eingefroren und bei -80°C bzw. -20°C gelagert.

2.2 RNA Sequenzierung

Die RNA Sequenzierung ist eine Methode zur Quantifizierung von RNA um daraus ein Expressionsausmaß für das jeweilige Gen zu berechnen und gehört zu den modernen Hochdurchsatzsequenzierungsmethoden „Next Generation Sequencing“ (NGS).

Darüber hinaus lassen sich Fusionsgene, Spleißvarianten und allelspezifische Expressionen detektieren und seltene und neuartige Transkripte untersuchen.

Grob lässt sich das „RNA Sequencing“ in drei Schritte unterteilen:

1. Präparation der Sequenzierungsbibliothek
2. Sequenzierung
3. bioinformatische Auswertung.

Dabei weist „RNA Sequencing“ deutliche Vorteile gegenüber anderen Methoden wie beispielsweise den Micro-Arrays wie weniger Hintergrundrauschen, bessere Detektion im unteren und oberen Expressionsbereich, keine Vorselektion von Genombereichen und eine höhere Auflösung.

2.2.1 Herstellung der Sequenzierungsbibliothek

Die Präparation der Sequenzierungsbibliothek erfolgte mit dem Illumina TruSeq Stranded Total RNA Kit mit dem Einsatz von 150 ng RNA. Da wir uns in unserem Experiment vor allem für messenger RNA (mRNA), long non coding RNA (lncRNA) und andere funktionelle RNA Spezies interessieren muss ribosomale RNA (rRNA), die 90% der Gesamt-RNA ausmachen, depletiert werden. Dies erfolgte mittels selektiver Hybridisierung durch biotinylierte rRNA-spezifische Oligonukleotide. Um die Depletierung zu validieren kann die Probe erneut an einem Bioanalyser untersucht werden. Nach der Aufreinigung erfolgte die thermische Fragmentierung mithilfe von zweiwertigen Kationen. RNA wird in cDNA umgeschrieben, damit die Methode der DANN Sequenzierung angewandt werden kann. Die Synthese des ersten cDNA Strangs erfolgte mithilfe einer reversen Transkriptase und zufälligen Primern. Actinomycin D wird dazugeben um eine DNA abhängige Synthese zu verhindern und dadurch die Strang-Spezifität zu erhöhen. Bei der Synthese des zweiten Strangs werden dUTPs anstatt von dTTPs verwendet um eine Amplifikation des zweiten Strangs zu verhindern. Anschließend werden die 3' Enden adenolysiert um eine

Bindung der Fragmente während der Adapter Ligation untereinander zu verhindern. Ein korrespondierendes einzelnes Thymin am 3' Ende des Adapters liefert einen komplementären Überhang zur Ligation des Adapters an das Fragment. Die Indexierung kann als dual index oder als single index erfolgen. In unserem Fall verwendeten wir single index. Der Vorteil von dual index ist, dass man sogenanntes „Index hopping“ besser identifizieren kann. Die umgewandelte cDNA wird mithilfe einer PCR angereichert, wobei der zweite dUTP Strang nicht mit amplifiziert wird. Außerdem werden Fragmente mit keinem oder lediglich einem Adapter nicht mitamplifiziert. Anschließend wird eine Qualitätskontrolle mithilfe des Bioanalyzers 2100 durchgeführt um die Reinheit und Produktgröße der cDNA Fragmente zu kontrollieren. Im letzten Schritt wird die Sequenzierungsbibliothek auf 10 nM normalisiert. Dies erfolgt anhand einer Konzentrationsbestimmung mithilfe von qPCR.

2.2.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte auf einem *Illumina HiSeq 2000* Gerät als „Paired-end“, 2x100 bp in München (Genzentrum, LMU). Dieses basiert auf der sogenannten *Sequencing by Synthesis* (SBS) Technologie. Dabei katalysiert eine DNA Polymerase den Einbau von Fluoreszenz-markierten Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) in einem Strang der als Vorlage dient während der aufeinander folgenden Zyklen der DNA Synthese. Nach jedem Zyklus werden die Nukleotide an der Stelle des Einbaus durch Fluorophor-Anregung identifiziert. Der entscheidende Unterschied zu Sequenzierungen der ersten Generation besteht darin, dass dieser Prozess nicht auf ein einzelnes Fragment beschränkt wird, sondern Millionen bis Milliarden von Clustern von Fragmenten gleichzeitig untersucht werden.

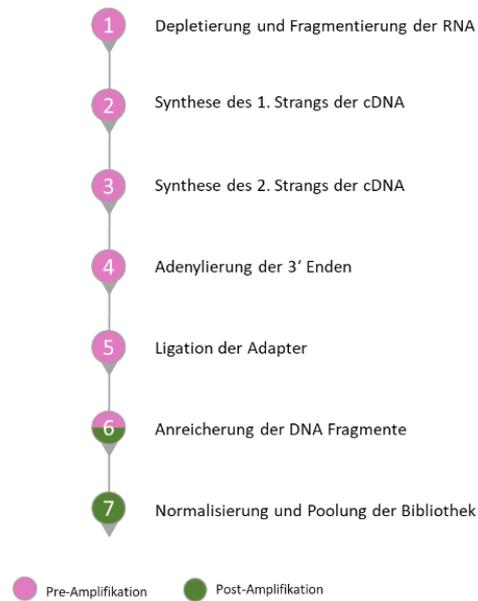


Abbildung 7: Schritte der Herstellung der Sequenzierungsbibliothek

Angepasst nach (Illumina, 2017)

Im ersten Schritt wird die fertige Sequenzierungsbibliothek auf eine „Flow cell“ geladen, wo die mit Adapter versehenen Fragmente an die komplementären Oligos, die auf der Oberfläche befestigt sind, binden können. Man kann die Sequenzierungsbibliothek auf verschiedene Lanes verteilen um Batch Effekte zu reduzieren. Jedes dieser Fragmente wird durch die sogenannte Brückenamplifikation (aus Engl.: *bridge amplification*) in ein lokales, klonales Cluster amplifiziert. Die eigentliche Sequenzierung erfolgt anschließend mit einer reversiblen Terminator-basierten Methode, mit der einzelne Basen detektiert werden, wenn sie in den DNA-Vorlagen Strang eingebaut werden. Dabei befinden sich stets alle vier dNTPs in Lösung, welche pro Zyklus genau einmal eingebaut werden und mithilfe einer hochauflösenden Kamera detektiert werden. Aus der Abfolge der Fluoreszenz an einer bestimmten Stelle, welche einem Cluster entspricht, ergibt sich die DNA Sequenz des jeweiligen Fragments. In unserem Experiment wurden 100 Zyklen durchgeführt aus welchen sich 100 bp lange Fragmente ergeben.

Außerdem wurde das sogenannte „Paired-end“ Sequenzierung angewandt. Dabei erfolgt eine Sequenzierung von beiden Enden des cDNA Fragments aus. Bei der späteren bioinformatischen Auswertung liegen beide Fragmente als Forward und Reverse Paar vor und ermöglichen so ein deutlich besseres Alignment und verbessern die Detektion von Indels oder Fusionsgenen.

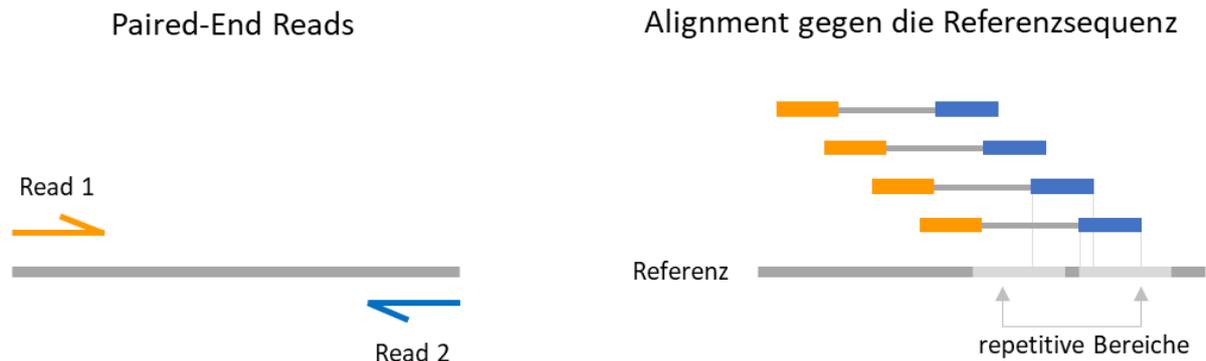


Abbildung 8: Paired-End Sequenzierung und das Alignment

Paired-End Sequenzierung ermöglicht es, dass beide Enden der DNA-Fragmente sequenziert werden. Durch den bekannten Abstand zwischen 2 Reads ist es Alignment Algorithmen möglich diese Reads über repetitive Regionen besser zu mapen.

2.2.3 Bioinformatische Auswertung

Um aus den generierten Rohsequenzdaten biologisch relevante Informationen zu gewinnen werden verschiedene bioinformatische Tools angewandt.

In unserem Experiment wurde vor allem eine differentielle Genexpressionsanalyse und die Detektion von Fusionsgenen durchgeführt.

Die differentielle Genexpressionsanalyse dient vor allem dazu signifikant unterschiedlich regulierte Gene mit einem unterschiedlichen Expressionsausmaß zwischen verschiedenen Konditionen zu identifizieren.

Bei der Detektion von Fusionsgenen sucht man nach strukturellen Aberrationen bei denen die Read Paare teilweise weit auseinander liegen können, weshalb hier ein grundsätzlich anderes Vorgehen notwendig ist.

Die eingesetzten Tools sind in der Regel Linux-basiert und werden ohne grafische Oberfläche in der Linus-Shell verwendet. Dabei können viele verschiedene Tools in einer „Pipeline“ hintereinander geschaltet werden um somit eine schnelle Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit der Analysen zu erreichen.

2.2.3.1 Dateiformate

Für die Bioinformatische Analyse wird eine Reihe von Dateiformaten benötigt.

Format	Beschreibung
FASTA	Text-basierte Datei zur Speicherung von ungemappten Nukleotidsequenzen. Im NGS Kontext lediglich zur Speicherung von Referenzdaten gebraucht.
FASTQ	Text-basierte Datei zur Speicherung von ungemappten Nukleotidsequenzen und die dazu gehörigen Quality-Scores
SAM	Sequence Alignment Map Text-basierte Datei zur Speicherung von gemappten Nukleotidsequenzen gegen ein Referenzgenom
BAM	Komprimiertes Binäres Format einer SAM-Datei
GFF/GTF	General feature format / Gene transfer format Text-basiertes Format zur Beschreibung der Struktur von Genen, DNA, RNA oder Protein Sequenzen
BED	Browser Extensible Data Text-basierte Datei zur Speicherung von Genom Annotationsdaten

Tabelle 4: Beschreibung von bioinformatischen Dateiformaten

2.2.3.2 Qualitätskontrolle der Sequenzierungsdaten

Da während der Generierung der Sequenzierungsbibliothek die Proben gepoolt werden und anschließend oft auf verschiedene Lanes während des Sequenzierungsvorgangs verteilt werden, müssen die Rohdaten im *FASTQ*-Format zunächst demultiplext und von den verschiedenen Lanes zusammengeführt werden. Dafür wurde das Tool *fastq-multx* v1.02.684 aus dem *ea-utils* Paket verwendet. Oft nimmt die Qualität der Reads gegen Ende ihrer Länge ab. Daher wurde das Tool *Seqtk* v1.2 verwendet um Basenpaare mit einer niedrigen Qualität zu trimmen. Anschließend folgte eine umfassende Qualitätskontrolle der prozessierten *FASTQ*-Dateien. Mithilfe des Pakets *FastQC* v0.11.5 wurden verschiedene Parameter erhoben, anhand deren sich die Qualität der Sequenzierung beurteilen lässt. Beispielsweise der Phred Score in Abhängigkeit der Basenposition, die

Sequenzqualität in Abhängigkeit der „flow cell tile“ (Kontrolle auf problematische Bereiche der *Illumina* „flow cell“), Basenanteil in Abhängigkeit der Basenposition (Kontrolle auf das Vorhandensein von Adaptersequenzen), GC Anteil der Reads (Kontrolle auf Kontaminationen bspw. mit rRNA), Verteilung der Fragmentlängen, Anteil der Read Duplikaten und das Vorhandensein von überrepräsentativen Sequenzen wurden erhoben. Zudem wurden mithilfe des Pakets *RSeQC* v2.6.4 RNA-Sequenzierungs-spezifische Qualitätsparameter untersucht wie beispielsweise die Anzahl der generierten Reads, Coverage über die Länge aller Gene (Kontrolle auf Degradierungszeichen der RNA), Verteilung der inneren Distanz zwischen den beiden Readpaaren (Kontrolle des Fragmentierungsschritts während der Sequenzierungsbibliotheksgenerierung), Verteilung der Reads auf funktionelle Bereiche des Genoms wie bspw. Exons, Introns, UTRs und der Anteil bekannter und neuer Spleißbruchpunkte. Außerdem kann beurteilt werden, ob das durchgeführte Experiment ausreichend tief sequenziert worden ist, indem die sogenannte Sättigung der Spleißbruchpunkte oder der RPKM Werte berechnet wird. Dabei werden Subfraktionen von 5%, 10%, 15%, ... 100% der Sequenzierungsdaten gebildet und untersucht, ob ab einer bestimmten Größe der Subfraktionen keine neuen Spleißbruchpunkte mehr gefunden werden bzw. ob der relative Fehler bei der Bestimmung von RPKM Werten vernachlässigbar kleine Werte annimmt.

Zudem wurde der Anteil der ribosomalen RNA in den Sequenzierungsdaten überprüft um sicherzustellen, dass die rRNA Depletion während der Generierung der Sequenzierungsbibliothek ausreichend gut funktioniert hat. Dies erfolgte indem die *FASTQ*-Dateien der einzelnen Proben gegen das ribosomale Referenzgenom *GRCh38* von *Ensembl* mithilfe des Mappers *HISAT2* v2.0.4 gemappt worden sind und der Anteil der gemappten Reads bestimmt worden ist.

2.2.3.3 Differentielle Genexpressionsanalyse

2.2.3.3.1 Pipelines zur Generierung einer Genexpressionsmatrix

Das Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden welche Gene sind in der APL ED Kohorte herauf beziehungsweise herunterreguliert um daraus Rückschlüsse auf die Pathogenese der APL Frühodesereignisse zu schließen, aber auch um mögliche pharmakologische Zielstrukturen zur Bekämpfung der APL spezifischen Koagulopathie zu identifizieren.

Dies lässt sich mithilfe der differentiellen Genexpressionsanalyse bewerkstelligen, welche das Hauptanwendungsgebiet der RNA Sequenzierung darstellt. Dabei wird das Expressionsausmaß der RNA in jeder Probe bestimmt, welches quantitative und qualitative Aussagen über die Aktivität und Regulierung der zugrundeliegenden Gene in unterschiedlichen Konditionen ermöglicht.

Der erste Schritt der Datenanalyse ist die generierten Reads korrekt einem Referenzgenom zuzuordnen. Da bei der RNA Sequenzierung das Transkriptom untersucht wird, ist es notwendig einen Mapper zu verwenden, der alternatives Spleißen berücksichtigt und somit Introns beim „Mappen“ überspringen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Pipelines entwickelt. Die im Folgendem als *StringTie*-, *Cufflinks*- und *HTSeq-Count*-Pipeline bezeichnet werden. Der Name leitet sich dabei von dem Tool ab, welches die Transkript Quantifizierung vornimmt. Als Maß für die Genexpression werden verschiedene Werte generiert. Der simpelste Expressionswert ist dabei der sogenannte „Count“. Dieser beschreibt lediglich wie viele Sequenzierungsreads auf ein Gen mappen. Dadurch lässt sich die Expression zwischen verschiedenen Proben vergleichen, jedoch nicht zwischen verschiedenen Genen. Der Grund dafür ist, dass auf längere Gene aufgrund der längeren Transkriptgröße mehr Reads entfallen. Außerdem lassen sich Counts zwischen verschiedenen Sequenzierungsläufen nicht vergleichen, da eine tiefere Sequenzierung auch zu mehr Reads und somit auch zu mehr Counts pro Gen führt. Um dieses Problem zu umgehen, führte man den sogenannten RPKM (Reads Per Kilobase Million) bzw. FPKM (Fragments Per Kilobase Million) Wert ein. Dabei werden die Reads zunächst auf die Sequenzierungstiefe und anschließend auf die Genlänge normalisiert.

$$RPKM = \frac{NR}{\frac{GL}{1.000} \times \frac{TR}{1.000.000}}$$

Formel: RPKM

RPKM: Reads per kilo base per million mapped reads; NR: Anzahl an Reads, welche auf ein Gen mappen; GL: Länge der Gensequenz in Basenpaaren; TR: Gesamtzahl an gemapten Reads einer Probe

RPKM bezieht sich auf single-end Sequenzierungen. Im Gegensatz dazu beziehen sich FPKM Werte auf paired-end Sequenzierungen. Bei FPKM Werten wird zusätzlich berücksichtigt, dass zwei Reads vom selben Fragment kommen können.

Neuer ist der TPM (Transcripts Per Kilobase Million) Wert, welcher sehr ähnlich zu RPKM bzw. FPKM ist. Der einzige Unterschied ist hierbei die Reihenfolge der Normalisierung, bei der zu erst auf die Genlänge und anschließend auf die Sequenzierungstiefe angepasst wird. Der resultierende Unterschied zu FPKM ist, dass die Summe aller TPM Werte in jeder Probe gleich ist und sich dadurch besser Proportionen der Genexpression für ein Gen zwischen verschiedenen Proben besser vergleichen lässt (Wagner et al., 2012).

$$TPM = A \times \frac{1}{\sum(A)} \times 10^6$$
$$A = \frac{NR \times 10^3}{GL}$$

Formel: TPM

TPM: Transcripts Per Kilobase Million; NR: Anzahl an Reads, welche auf ein Gen mappen; GL: Länge der Gensequenz in Basenpaaren;

Der sogenannte „*Foldchange*“ (FC) beschreibt das Verhältnis zwischen einer Kontrollgruppe und einer Vergleichsgruppe und drückt als Quotient der beiden Gruppen das Expressionsausmaß aus. In der Regel wird der FC anschließend log-2 transformiert (log2-FC) um symmetrische Werte für eine Über- und Unterexpression zu erhalten.

2.2.3.3.1.1 *Cufflinks Pipeline*

Als endgültige Pipeline wurde die weit verbreitete „Tuxedo“ Pipeline gewählt. Dabei wird der *Tophat2* v2.0.9 Mapper verwendet. Das Mappen erfolgte gegen das Referenzgenom *GRCh38* Release 94 von *Ensembl*. Als Eingabe wurden die Reads verwendet, welche nicht auf das ribosomale Referenzgenom mappen um die Geschwindigkeit der nachfolgenden Tools zu erhöhen. Mithilfe des *MarkDuplicates* v1.100 aus dem *PICARD* Paket wurden PCR Duplikate aus den *BAM*-Dateien entfernt und mithilfe des *samtools* v1.7 indexiert um sich die Sequenzierungsdaten im *Integrative Genome Viewer* (IGV) (Robinson et al., 2011) zu visualisieren und Ergebnisse zu validieren. Anschließend erfolgte die Transkript Rekonstruktion und Abundanzählung durch *Cufflinks* v2.1.1. Im Folgenden wurde aus den generierten Transkriptrekonstruktionen mithilfe der *Cufflinks merge* Funktion alle gefundenen Transkripte aus der Screeningkohorte zu einer Mastertranskriptreferenzdatei im *GTF*-Format zusammengefügt. Diese Referenzdatei diente *Cuffdiff* v2.1.1 aus dem *Cufflinks* Paket erneut zur Abundanzählung bei der bestimmt wird, wie viele Reads, gemessen

in Counts, auf die einzelnen Transkripte in jeder Probe mappen. Diese zweistufige Expressionsbestimmung dient der genaueren Quantifizierung der einzelnen Transkripte. Außerdem führt *Cuffdiff* eine Varianzschätzung der Read Count Werte für einzelne Gene innerhalb einer Gruppe durch und berechnet damit die Signifikanz der beobachteten Veränderungen in der Expression und gibt einen p-Wert aus. Da stets eine große Zahl an Genen im Rahmen von RNA Sequenzierung untersucht wird, besteht eine große Wahrscheinlichkeit rein durch Zufall Gene mit einem kleineren p-Wert als das Signifikanzniveau zu detektieren. Aus diesem Grund wird der p-Wert für das multiple Testen angepasst und als p-adjusted (p_{adj}) angegeben. Generell lässt sich dies mit der Methode nach Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) oder nach Bonferroni (Bonferroni, 1936) durchführen.

Anschließend können die Ergebnisse mithilfe des Tools *CummeRbund* aus dem *Cufflinks* Paket in die Statistikprogrammiersprache *R* v3.6.1 (Team, 2019) importiert und visualisiert werden. Außerdem ist es dadurch möglich mit weiteren *R* Paketen Analysen durchzuführen. Weitere nützliche Informationen wurden jedem Gen aus der Ausgabematrix von *CummeRbund* wie die FPKM Expressionswerte für jede Probe der Screeningkohorte, die Transkriptlänge und die genomische Position aus der *Cuffdiff* „genes.fpkm_tracking“-Datei und der Transkripttyp aus der *Ensembl*-Datenbank zugeordnet.

2.2.3.3.1.2 *StringTie Pipeline*

Bei der *StringTie*-Pipeline wurde als Mapper *HISAT2* v2.0.4 (Kim et al., 2015) eingesetzt. Die Transkriptionsrekonstruktion und die Bestimmung des Expressionsausmaßes erfolgten mit *StringTie* v1.1.1 (Pertea et al., 2016). Read Counts wurden mithilfe des in *StringTie* integrierten *prepDE.py* Skriptes extrahiert und die weitere Analyse erfolgte in *R* mit *DESeq2* v1.10.1 (Love et al., 2014). Dieses schätzt die Varianz-Mittelwert Abhängigkeit in den Sequenzierungsdaten und testet die statistische Signifikanz der differentiellen Expression anhand eines Modells basierend auf der negativen Binomialverteilung und gibt einen p-Wert aus. Dieser wird anschließend für das multiple Testen nach der Methode von Benjamini-Hochberg angepasst (p_{adj}).

2.2.3.3.1.3 *HTSeq Pipeline*

Außerdem wurde zur Erstellung einer Genexpressionsmatrix das Tool *HTSeq-Count* verwendet und die zugrundeliegende Pipeline als *HTSeq-Count*-Pipeline bezeichnet.

Als Eingabe erhielt das Tool die aus *HISAT2* generierten *BAM*-Dateien und als Referenz das *GRCh38* Release 94 von *Ensembl* im *GTF*-Format. Im Gegensatz zu den vorherigen beiden Pipelines erfolgt keine Transkriptrekonstruktion, wodurch die Geschwindigkeit massiv erhöht wird. Es werden lediglich die Reads ausgezählt, welche auf ein annotiertes Gen fallen und in Counts wiedergegeben. Dadurch können allerdings auch keine Transkript-Isoformen und keine nicht-annotierten Transkripte ausgegeben werden. Die Expressionsmatrix wurde ebenfalls in *DESeq2* eingespielt um differentiell exprimierte Gene zu ermitteln.

2.2.3.3.2 Clusteranalyse

Um einen Hinweis zu erlangen, ob es tatsächlich einen biologischen Unterschied zwischen zwei oder mehr Versuchsgruppen gibt, werden häufig Clusteranalysen angewandt.

Hierfür wurde anhand der Genexpressionstabelle eine *Principal Component Analyse* (PCA) durchgeführt (Wold et al., 1987). Dabei wird die Hyperdimensionalität der Daten in einige wenige Hauptkomponenten transformiert und in einem X-Y-Diagramm für die beiden Hauptkomponenten *PCA1* und *PCA2* aufgetragen. Proben mit einem ähnlichen Expressionsmuster clustern beziehungsweise gruppieren sich dabei zusammen und liefern so einen Hinweis für ein ähnliches Expressionsmuster mit einer mutmaßlich ähnlichen biologischen Funktion.

Außerdem wurden Heatmaps mithilfe des *R* Tools *pheatmap* v1.0.12 (Kolde, 2015) generiert. Als Input dienten normalisierte Genexpressionswerte. Aufgetragen wird der so genannte z-Score, welcher sich für jedes Gen aus der Subtraktion des Mittelwerts dividiert durch die Standardabweichung berechnet. Auch hier lässt sich darstellen, ob sich Proben aus den jeweiligen Konditionen zusammengruppierten und Cluster bilden.

2.2.3.3.3 Gene Set Enrichment Analyse

Die *Gene Set Enrichment Analyse* (GSEA) ist eine Methode um eine Anreicherung von vordefinierten Gruppen von Genen in einer der Versuchsgruppen anhand der Expressionsmatrix festzustellen (Mootha et al., 2003). Es wird also untersucht ob eine Versuchsgruppe mit einer bestimmten Gensignatur assoziiert ist. Die vordefinierten Gruppen werden in verschiedensten Genkollektionen zusammengestellt und richten sich beispielsweise nach den manuell kuriierten *Gene Ontology* Annotationen,

publizierten onkogenen Signaturen oder nach Gengruppen, die aus unterschiedlichsten Studien ermittelt worden sind.

Im ersten Schritt werden die aus der RNA-Sequenzierungspipeline generierten Genexpressionstabellen in ein bestimmtes Format als sogenannte „*Preranked List*“ gebracht. Dafür sind verschiedene Vorgehen möglich. In dieser Arbeit wurde der p-Wert \log_{10} -transformiert und das Vorzeichen des \log_2 -FC vorangestellt.

Es wurden alle verfügbaren „Gene Sets Collections“ aus der *MSigDB* der *GSEA* Homepage ausgewählt, auf deren Anreicherung in der Genexpressionsliste untersucht werden soll. Das primäre Ergebnis der GSEA ist der Enrichment Score (ES), der den Grad der Überrepräsentierung eines Gensets am oberen oder unteren Ende einer Rangliste von Genen widerspiegelt. Der Normalized Enrichment Score (NES) ist die primäre Statistik zur Untersuchung der Ergebnisse der Genset-Anreicherung. Durch die Normalisierung des ES berücksichtigt die GSEA Unterschiede in der Genset-Größe und in den Korrelationen zwischen Gensets und dem Expressionsdatensatz. Daher können der NES verwendet werden, um die Analyseergebnisse verschiedener Gensets zu vergleichen. Die False Discovery Rate (aus Engl.: „Falschfindungsrate“) (FDR) ist die geschätzte Wahrscheinlichkeit, dass ein Genset mit einem bestimmten NES falsch positiv angereichert ist.

2.2.3.3.4 Manuelle Auswahl von Kandidatengenen

Um der Fragestellung welche Gene für die Fröhrtode bei der APL und welche eine Rolle in Pathogenese der APL spezifischen Koagulopathie spielen auf den Grund zu gehen wurde die differentielle Genexpressionstabelle nach dem „*Foldchange*“ sortiert und es wurde eine ausführliche Literaturrecherche zu jedem Gen betrieben.

Dabei wurde auf mehrere Kriterien geachtet. Im Vordergrund stand zunächst die Frage, ob dem Gen oder dem Genprodukt bereits eine pathologische Rolle im Rahmen der Koagulation zugeschrieben worden sei. Außerdem wurde vor allem nach Effektorproteinen und nicht nach Transkriptionsfaktoren gesucht, da nach einer Zielstruktur zur pharmakologischen Inhibition geahndet worden ist. Zudem sollte der „*Foldchange*“ möglichst groß und der statistische Unterschied möglichst signifikant sein.

2.2.3.4 Detektion von Fusionsgenen

Um Fusionstranskripte zu detektieren wurde das Tool *FusionCatcher* v1.0 mit Standardeinstellungen verwendet (Nicorici et al., 2014). Dabei wurden die *FASTQ*-Dateien jeder Probe einzeln als Eingabe eingefügt. Dabei wird der *Bowtie* Mapper (Langmead et al., 2009) verwendet um anhand einer Referenzdatei Exon-Exon Fusionen zu detektieren. Für Chromosomenbrüche innerhalb eines Exons oder Introns wurde zusätzlich die Mapper *BLAT* (Kent, 2002) und *STAR* (Dobin et al., 2012) verwendet.

Die Ergebnisse wurden im Tabellenformat *CSV* gespeichert. Anschließend wurden bekannt falsch positive Fusionen aus *FusionCatcher's* eigener Datenbank, benachbarten Fusionsgene, und Gene mit Reads, die auf beide Fusionspartner aufgrund von Homologien gleichzeitig mappen, herausgefiltert.

Die Validierung erfolgte durch eine PCR und Sanger Sequenzierung. Die Primer hierfür wurden wie in Abschnitt 2.3 beschrieben designt.

2.3 Realtime quantitative Polymerase Kettenreaktion

Um die Ergebnisse der RNA Sequenzierung zu validieren wurde die RT-qPCR als Goldstandard der Genquantifizierung genutzt. Die Untersuchung erfolgte auf dem *LightCycler® 480* (Roche, Basel, Schweiz) mit *SYBRGreen Master Mix* (Life Technologies, Carlsbad, USA) durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte in Triplikaten aus denen ein Mittelwert gebildet worden ist. Die Expressionsbestimmung erfolgte anhand der sogenannten *delta-delta CT Methode* (Livak and Schmittgen, 2001).

Als Referenzgene, deren Expression als konstant angenommen wird, diente *Glucose-6-phosphat isomerase* (GPI), für die Bestimmung der Gene *EGF Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 1* (EFEMP1), *Arachidonate 15-Lipoxygenase Type B* (ALOX15B), *S100 Calcium Binding Protein A8* (S100A8), *S100 Calcium Binding Protein A9* (S100A9), *Metallothionein 1G* (MT1G) und *Metallothionein 1E* (MT1E).

Die Inkubationszeit der PCR betrug 10 min bei 95°C, danach folgten 45 Zyklen mit 30 sek. Denaturierung bei 95°C, 30 sek. Primerhybridisierung bei 60°C und 30 sek. Elongation bei 72°C.

Die Primer wurden mithilfe von *Primer-BLAST* (Ye et al., 2012) ausgewählt und in einer Gelelektrophorese auf ihre Spezifität und Produktgröße überprüft. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Für *EFEMP1*, *ALOX15B*, *S100A8* und *S100A9* diente eine AML Knochenmarkprobe als Kalibrator zwischen verschiedenen

PCR Platten, die diese Gene exprimiert. Für *MT1G* und *MT1E* und diene cDNA von der APL Zelllinie *NB4*.

Um die Güte der Korrelation zwischen den Expressionswerten aus der RNA Sequenzierung und der RT-qPCR zu bestimmen wurde eine lineare Regression mithilfe des Programms *GraphPad v6.0* durchgeführt und als Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben.

Gen	Forward-Primer	Reverse-Primer
<i>GPI</i>	5`-TCTTCGATGCCAACAAAGGAC	5`-GCATCACGTCTCCGTCAC
<i>EFEMP1</i>	5`-CGTGTGCCAAGACATAGACG	5`-GCTCCCCTCGCTTCTGATAT
<i>ALOX15B</i>	5`-GTACCAGTGGAAGGCTTACAACC	5`-GCATTCTTGGCTGTGGAGTATTT
<i>S100A8</i>	5`-TCATCGACGTCTACCACAAGT	5`-ACGTCTGCACCCTTTTTCCT
<i>S100A9</i>	5`-TGTCTGCATTTGTGTCCAGGT	5`-AGCTGGAACGCAACATAGAGA
<i>MT1G</i>	5`-CTTCTCGCTTGGGAACTCTA	5`-AGGGGTCAAGATTGTAGCAAA
<i>MT1E</i>	5`-AGCATCCCCTTTGCTCGAAA	5`-CACTTCTCCGATGCCCCCTT
<i>TPM4-KLF2 ex1</i>	5`-GGACGAGGCGGAAGACC	5`-TCTGAGCGCGCAAACCTCC
<i>TPM4-KLF2 ex2</i>	5`-TGACGCACCTCCAGAAGAAAC	5`-CGTGAGCTCGTCTGAGCG

Tabelle 5: Primer Sequenzen der untersuchten Gene und Transkripten

2.4 Sanger Sequenzierung

Die Sanger Sequenzierung erfolgte in erster Linie dazu um die Bruchpunkte der detektierten Fusionstranskripte zu validieren. Der Forward-Primer lag auf dem Exon des „upstream“ Fusionspartners und der Reverse-Primer lag auf dem Exon des „downstream“ Fusionspartners.

Die Sequenzierung beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruch-Synthese und wurde 1975 von Sanger und Coulson entwickelt und bescherte 1980 den Nobelpreis für Chemie.

Dabei wird die zu untersuchende DNA Probe, spezifische DNA Primer, eine DNA-Polymerase, herkömmliche Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und Fluoreszenzmarkierte, modifizierte Desoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs), die die DNA Elongation terminieren, in eine Reaktion gegeben. Durch Erwärmung denaturiert die DNA zu Einzelsträngen und die spezifischen Primer können an die DNA binden. Von diesen aus wird der komplementäre Strang durch den Einbau von dNTPs gebildet bis

zufälligerweise ein ddNTP eingebaut wird und die Verlängerung beendet wird. In der Folge entstehen DNA Fragmente unterschiedlicher Länge, die stets für eine bestimmte Länge mit dem gleichen ddNTP enden. Nach der Sequenzierungsreaktion werden die Fluoreszenz-markierten Abbruchprodukte mittels einer Kapillarelektrophorese der Länge nach aufgetrennt und mithilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt und mit einem Detektor die Abfolge der Fluoreszenz registriert. Da jedes ddNTP mit einem unterschiedlichen Farbstoff markiert wurde, lässt sich daraus die Sequenz ableiten. Bis zu 500 Nukleotide lassen sich auf diese Weise detektieren, wobei es durch Überlagerungseffekte vor allem zu Beginn der Sequenz zu Problemen bei der Auslesung der Nukleotide kommt. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie auch der Reverse-Primer der Fusionsgene mitsequenziert.

2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuresträngen ihrer Größe nach.

Zunächst wird Agarosepulver in TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE) gelöst und aufgekocht. Anschließend wird es in die Gelkammer gegossen, wo sich die Agarose abkühlt und sich durch Wasserstoffbrücken, kettenförmig quervernetzt und so kleine Poren ausbildet. Je höher die Konzentration (zwischen 0,5 und 3%) desto kleiner die Poren.

Die zu untersuchenden Nukleinsäuren werden mit einem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Fischer), vermischt, die Geltaschen befüllt und es wird ein elektrisches Feld angelegt. Da Nukleinsäuren negativ geladen sind, wandern diese zum Plus Pol. Dabei funktioniert das Agarosegel durch die Quervernetzungen wie ein Sieb und hält große und stark verzweigte Moleküle zurück, während kleinere schneller durchlaufen. Dadurch wird die Größenauftrennung erreicht. Außerdem wird ein standardisierter DNA Leiter, O'RangeRuler™ 20 bp DNA Ladder (Thermo Fischer), mitlaufen gelassen.

Zum Schluss wird mithilfe eines Lasers der Fluoreszenzfarbstoff des „Loading Dyes“ angeregt und durch einen Detektor kann das typische Bandenmuster aufgenommen werden.

3 ERGEBNISSE

Um der Fragestellung, welche Gene für die Frühodesereignisse und die APL spezifische Koagulopathie verantwortlich sind, auf den Grund zu gehen, wurde ein zweistufiges Verfahren der differentiellen Genexpressionsanalyse gewählt. Im ersten Schritt wurde in einer Screeningkohorte mittels „RNA Sequencing“ das globale Transkriptom auf differenziell exprimierte Gene untersucht. Im zweiten Schritt wurden geeignete Gene gesucht und in einer unabhängigen Kohorte durch RT-qPCR validiert. Außerdem wurden die Sequenzierungsdaten auf Fusionsgene hin untersucht und validiert.

3.1 Screeningkohorte

3.1.1 Globale Expressionsmuster

Bei der differentiellen Genexpressionsanalyse wurden in der *Cufflinks*-Pipeline insgesamt 630 differenziell exprimierte Gene identifiziert ($p_{\text{adj}} \leq 0.05$, $\log_2\text{-FC} \geq 1$, Abb. 9).

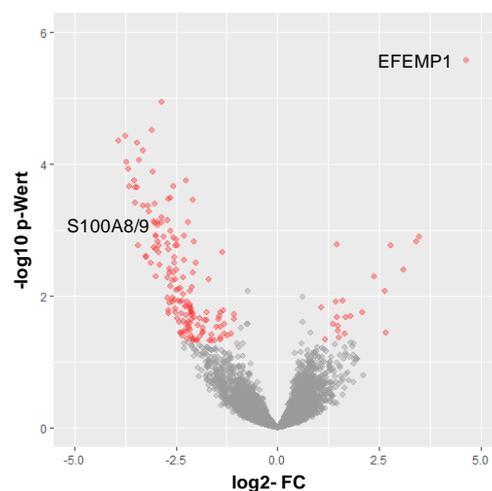


Abbildung 9: Vulcano Plot

Jedes detektierte Gen der RNA Sequenzierungsanalyse ist hier als der log-10 transformierte p-Wert in Abhängigkeit des log-2 transformierten „Foldchanges“ aufgetragen. Rot markiert sind signifikant über- oder unterexprimierte Gene.

Um das globale Expressionsprofil beider Gruppen zu vergleichen wurde zunächst eine „unsupervised“ PCA Analyse aller exprimierten Gene durchgeführt. Dabei gruppieren die beiden Versuchsgruppen ausreichend gut miteinander (Abb. 10). Außerdem wurde

eine heatmap für alle differenziell exprimierte Gene generiert. Hierbei zeigte sich, dass die meisten Gene in der ED Gruppe unterexprimiert waren.

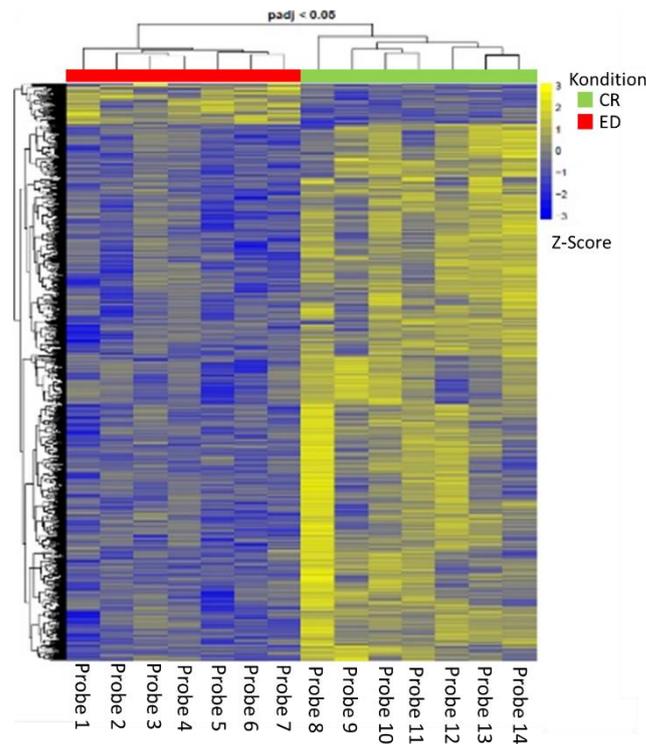


Abbildung 10: Heatmap der signifikant exprimierten Gene

Die Reihen entsprechen Genen, welche signifikant zwischen der CR und ED Gruppe exprimiert sind. Eine Spalte entspricht einer Probe. Ein Feld beschreibt das Expressionsausmaß. Negative Werte zeigen eine Unterexpression an. Zu erkennen ist, dass die meisten Gene in der ED Gruppe unterexprimiert waren.

Die weitere Charakterisierung des globalen Expressionsmusters erfolgte mit der GSEA.

Hier ergab sich eine signifikante Herunterregulierung in der ED Gruppe von Genkollektionen die mit der inflammatorischen Immunantwort (NES -1.91, FDR 0.02) und Gensignaturen von Infektionen mit gram-negativen Bakterien, Pilzen als auch mit der zellulären Schadensantwort (aus Engl.: *damage response*) (NES -2.0, FDR 0.007) assoziiert waren. Interessanterweise in diesem Zusammenhang gehörten zu den am stärksten herunterregulierten Genen in der ED Gruppe viele Mitglieder der S100-Familie, die als Schlüsselakteure als Reaktion auf verschiedene zelluläre Schadenssignale (aus Engl.: *damage-associated molecular pattern*, DAMPs) entdeckt wurden (Foell et al., 2007).

Darüber hinaus zeigte die GSEA eine signifikante Anreicherung aus dem „PARK TRETINOIN RESPONSE“ Genset aus Genen, die in APL Fusionsprotein tragenden Zellen bei der Behandlung von ATRA hochreguliert werden. Dieses Gen-Set war in der CR Gruppe überexprimiert.

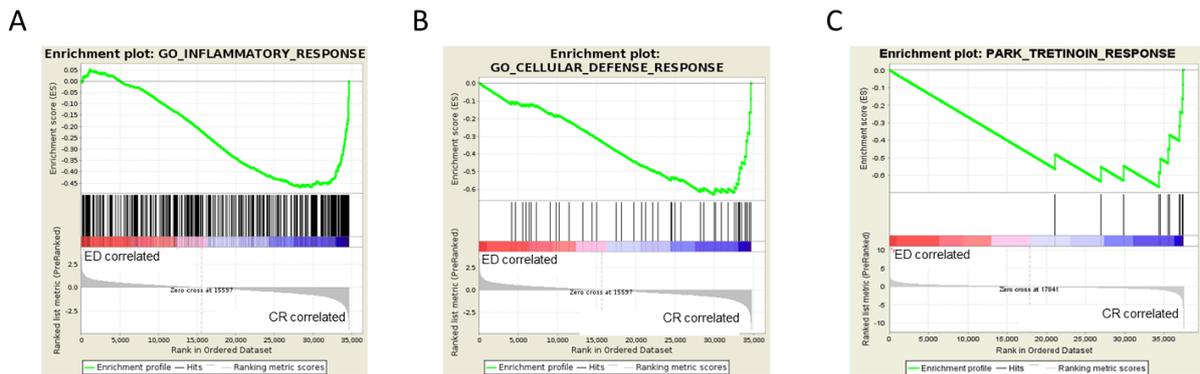


Abbildung 11: Gene Set Enrichment Analyse

A: Kollektion von Genen (Gensets), welche mit der Immunantwort assoziiert sind B: Kollektionen von Genen, welche zellulären Schadenssignalen zugeordnet werden können C: Kollektion von Genen, welche in APL Fusionsprotein-tragenden Zellen bei der Behandlung von ATRA hochreguliert werden

3.1.2 Differenziell exprimierte Gene in der Screeningkohorte

Um einzelne, relevante Gene aus der hohen Anzahl differenziell exprimierten Gene zu identifizieren, die bei der Genese der APL Koagulopathie eine Rolle spielen könnten, wurden verschiedene Auswahlkriterien erarbeitet. Dabei suchten wir speziell nach Genen mit einer ausreichend großen Expression, guter Diskriminierung zwischen den beiden Versuchsgruppen und mit vorzugsweise extrazellulären Genprodukten und Genen, die für Effektorproteine codieren.

Die am stärksten überexprimierten Gene in der ED Gruppe waren *EFEMP1* mit einem FC von 4.6 ($p_{\text{adj}} = 2e-6$) und *ALOX15B* mit einem FC von 3.6 ($p_{\text{adj}} = 0.002$). Zu den am stärksten unterexprimierten Genen in der ED Gruppe gehörten unter anderem *S100A8* (Log2-FC: -3.06, $p_{\text{adj}} = 0.001$), *S100A9* (log2-FC: -2.75, $p_{\text{adj}} = 0.003$). Die Expression dieser Gene ist in Abb. 12 zusammengefasst.

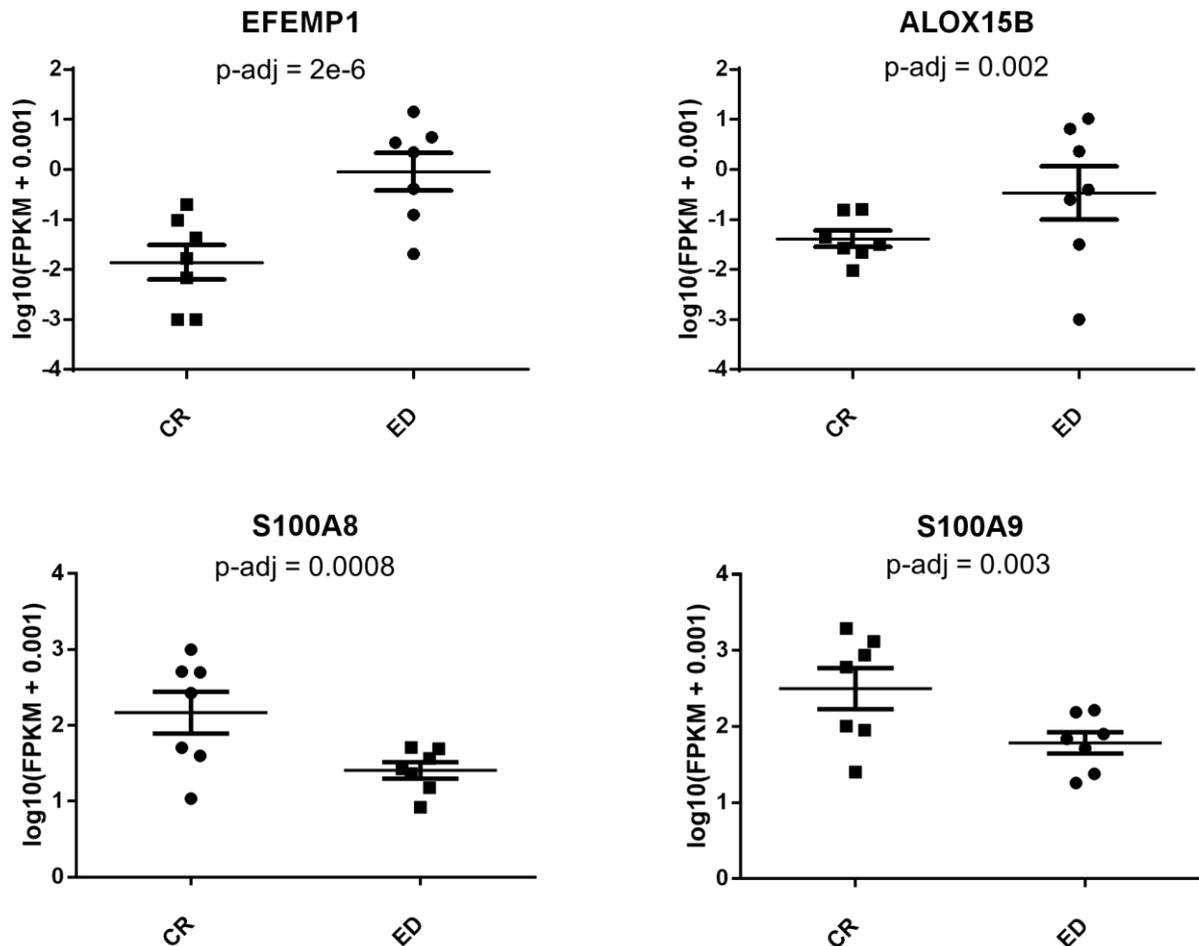


Abbildung 12: Expression von EFEMP1, ALOX15B, S100A8 und S100A9 in der Screeningkohorte

Auf der y-Achse ist der log₁₀ transformierte FPKM Expressionswert aufgetragen. Da einige Proben eine Expression von 0 aufwiesen, wurde ein sehr kleiner Wert addiert um den log₁₀-transformierten FC berechnen zu können

Darüber hinaus wurde untersucht, ob bekannte mutmaßliche Mediatoren der APL Koagulopathie wie *ANXA2*, *TF*, *uPA* unterschiedlich innerhalb der beiden Versuchsgruppen exprimiert sind. Für *ANXA2* und *TF* konnte man eine Überexpression in der ED Gruppe feststellen, jedoch war diese nicht signifikant ($p_{adj} > 0.3$). In neueren Untersuchungen wurde PDPN als spezifischer Marker für APL identifiziert und wurde möglicherweise mit der APL Koagulopathie in Verbindung gebracht (Lavallée et al., 2018). Obwohl PDPN in unserer Kohorte hoch exprimiert war, war dieses nicht spezifisch für ED Ereignisse (Abb. 13).

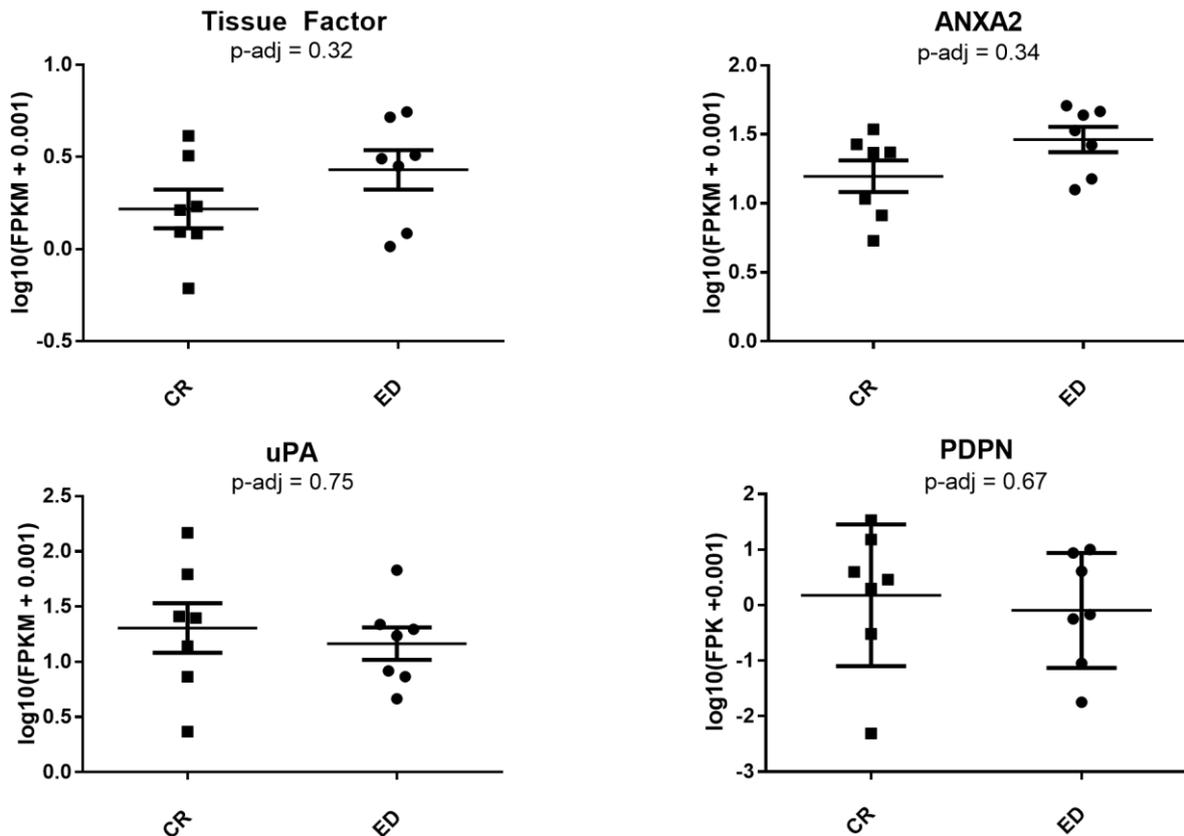


Abbildung 13: Genexpression von bekannten Mediatoren der APL Koagulopathie

Auf der y-Achse ist der log₁₀ transformierte FPKM Expressionswert aufgetragen. Da einige Proben eine Expression von 0 aufwiesen, wurde ein sehr kleiner Wert addiert um den log₁₀-transformierten FC berechnen zu können

3.2 Validierungskohorte

3.2.1 Technische Validierung des Expressionsausmaßes der RNA Sequenzierung

Um die Genexpressionswerte aus der RNA Sequenzierung zu überprüfen und zu validieren wurde zunächst die Expression der ausgewählten Gene in den Proben der Screeningkohorte des Goldstandards *RT-qPCR* untersucht. Es zeigte sich eine starke Korrelation zwischen den *FPKM* Werten aus der „RNA Sequencing“ und dem FC Werten aus der *RT-qPCR* ($R^2 = 0.71 - 0.79$; Abb. 12).

Die Korrelation konnte sogar noch weiter gesteigert werden, indem die Messung einer *qPCR* emuliert worden ist und die Expressionswerte aus der RNA Sequenzierung des Target-Gens durch die des Haushaltgens dividiert worden ist (Daten nicht gezeigt). Dies entspricht nämlich eher der Messung der *RT-qPCR*, da hier die Expression des Target-Gens im Verhältnis zu der Expression eines Haushaltgens steht. In unseren

RNA Sequenzierungsdaten konnten wir feststellen, dass auch Haushaltsgene in ihrer Expression ungefähr um den Faktor 2 zwischen verschiedenen Proben schwanken können.

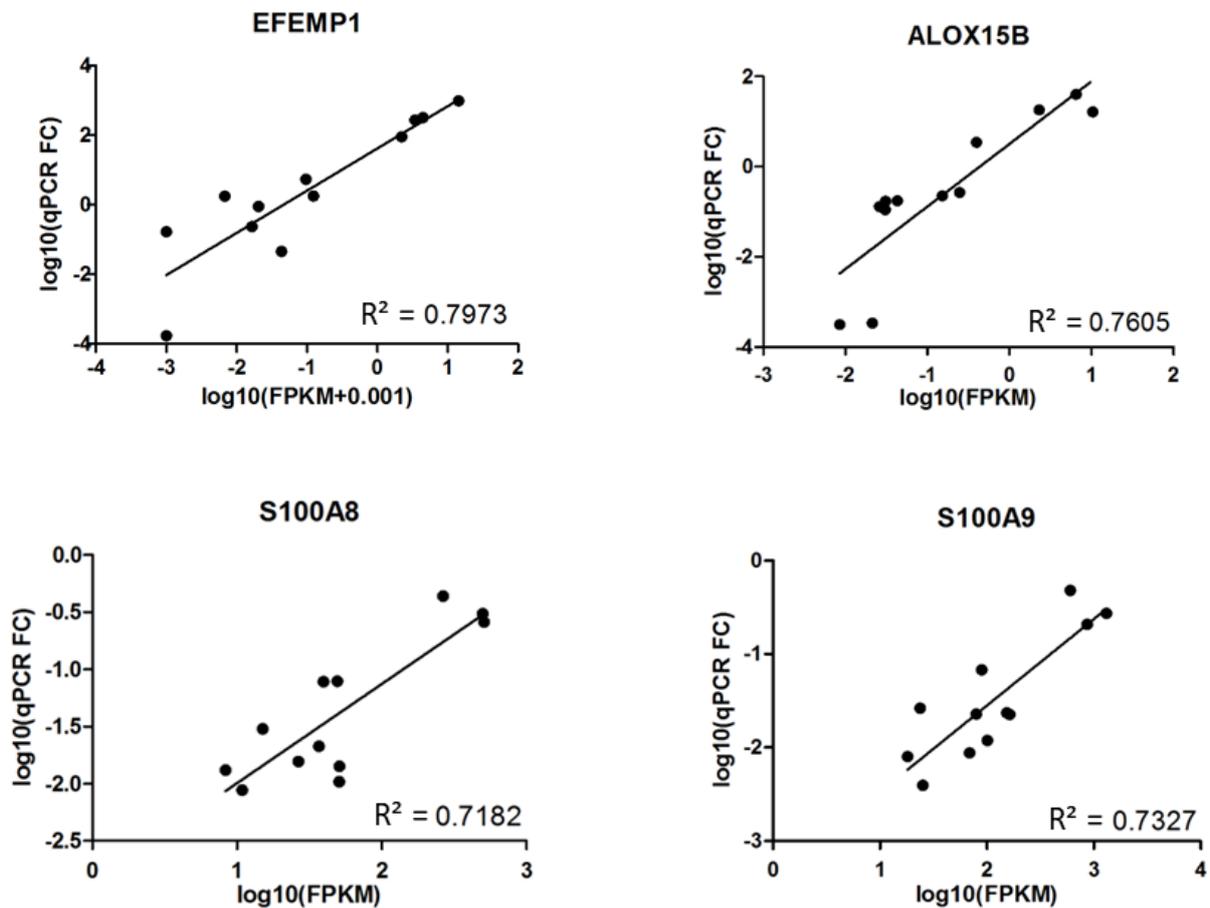


Abbildung 14: Korrelation des Expressionsausmaß in der RNA Sequenzierung und der RT-qPCR

3.3 Kandidatengene in der Validierungskohorte

Um die neu entdeckten Kandidatengene, *EFEMP1*, *ALOX15B*, *S100A8* und *S100A9* der Screeningkohorte als robuste Parameter in der Pathogenese der Fröhntodesereignisse zu bestätigen, untersuchten wir diese in einer zweiten, größeren und unabhängigen Validierungskohorte von diagnostischen APL Proben.

Diese Kohorte enthielt zusätzliche n=58 APL-Fälle, einschließlich n=15 ED Ereignisse. Dabei behielt *EFEMP1* eine Überexpression in der ED Gruppe mit einem FC von 4,1 bei, welche allerdings nicht signifikant war ($p_{\text{adj}} = 0,2$; Abb. 15A).

Bei der Einteilung der Patienten nach der 75%-Quantile der *EFEMP1*-Genexpression, zeigten Patienten mit einer hohen Expression ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben, das interessanterweise auch über die 30d-Mortalität hinaus erhalten blieb (HR = 3,3; $p = 0,001$ Abb. 15B).

Die übrigen getesteten Kandidatengene *ALOX15B*, *S100A8* und *S100A9* konnten überraschenderweise ihre in der Screeningkohorte identifizierten signifikanten differentiellen Profile nicht beibehalten ($p > 0,2$ für alle Parameter, Abb. 15A). Erwartungsgemäß gab es keinen prognostischen Einfluss auf das Gesamtüberleben. Hierbei wurden die Patienten ebenfalls nach der 75%-Quantile in eine hoch und niedrig Expressionsgruppe stratifiziert (Abb. 15B).

Darüber hinaus war die Expression aller vier Kandidatengene auch nicht mit anderen klinischen Parametern und Ereignissen wie dem ATRA-Syndrom, Infektionen oder Blutungen assoziiert (Daten nicht gezeigt).

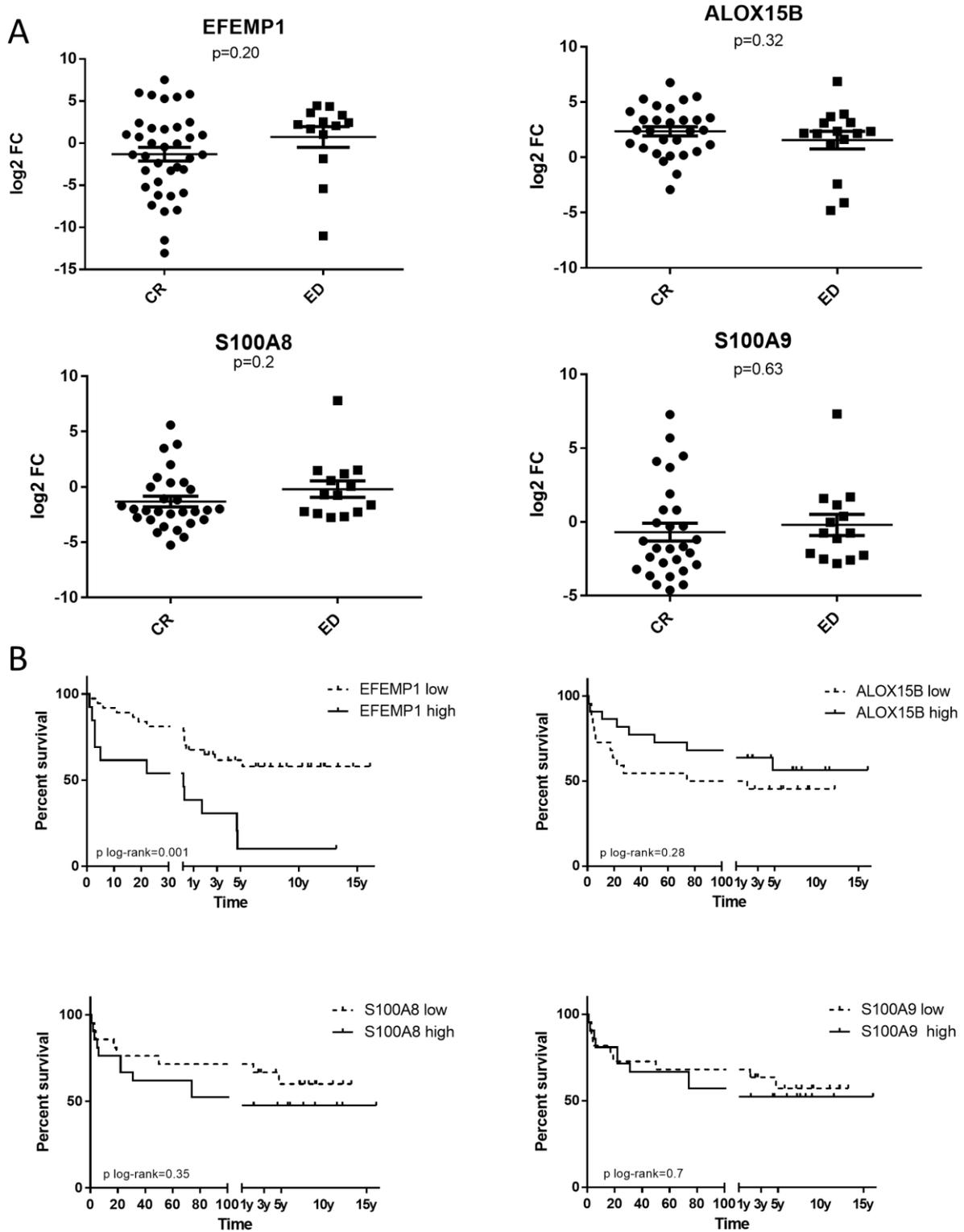


Abbildung 15: Genexpression und Langzeitüberleben in der Validierungskohorte

A: Genexpression der Kandidatengene in der Validierungskohorte B: Langzeitüberleben in der Validierungskohorte stratifiziert nach dem 75% Quantil der Genexpression der Kandidatengene

3.4 Differentielle Genexpression nach Blutungsereignissen

Da sich die Ursachen für die Frühodesereignisse in unserer Screeningkohorte sehr heterogen zeigten, stellte sich die Frage, ob diesen Ursachen unterschiedliche Entstehungsmechanismen zugrunde liegen und daraus folgend heterogene Genexpressionsprofile resultieren.

Aus diesem Grund wurde die Screeningkohorte neu zusammengesetzt und es wurden lediglich Patienten, die Frühodesereignisse durch Hämorrhagien erlitten, mit Patienten mit Langzeitremission ohne jegliche Blutungsereignisse verglichen.

3.4.1 Ergebnisse in der angepassten Screeningkohorte

In der nun gefilterten Screeningkohorte verglichen wir 5 ED aufgrund Blutungsereignissen gegen 6 CR ohne jegliche Blutungen.

Hier wurden insgesamt 391 differentiell exprimierte Gene identifiziert. Darunter befand sich eine hohe Überlappung von 257 Genen, die zuvor auch in der Ausgangskohorte differentiell exprimiert wurden (Abb. 16A). Erwartungsgemäß, waren auch hier die meisten Gene herunterreguliert (Abb. 16B). Im Vergleich zur ursprünglichen Analyse ergab die auf Blutungskomplikationen beschränkte Subgruppenanalyse von ED 134 Gene, die für diese Gruppe spezifisch sind (Abb. 16). Unter diesen auch diverse Metallothioneine wie *MT1P3*, *MT1G*, *MT1E*, *MT2A*, *MT2P1*.

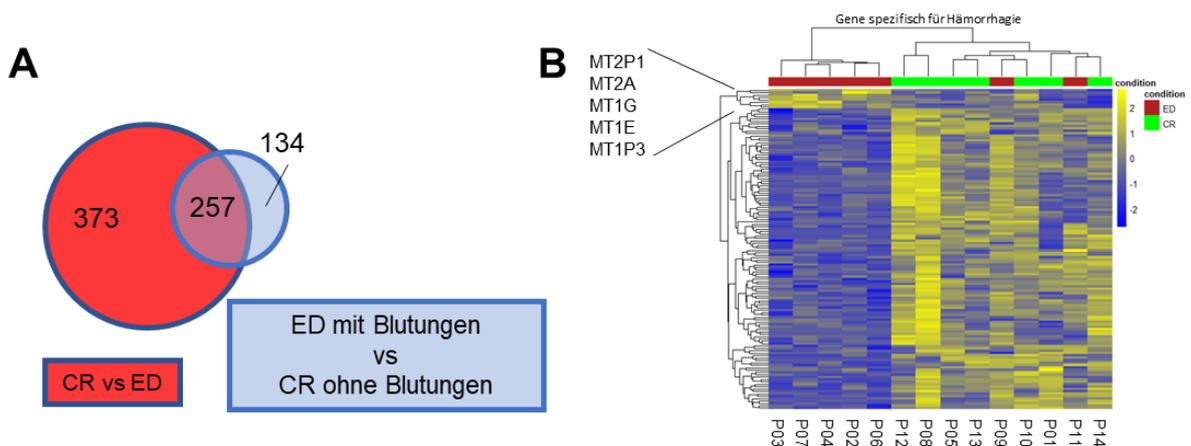


Abbildung 16: Subgruppenanalyse nach Blutungen

A: Venn-Diagramm zur Darstellung des Vergleichs der CR vs ED Analyse und der ED mit Blutungen vs CR ohne Blutungen Analyse B: Heatmap der signifikanten Gene aus der Blutungsanalyse angewandt auf die gesamte Kohorte.

3.4.2 MT1G und MT1E in der Validierungskohorte

Um zu überprüfen, ob diese Gene als robuste Gensignatur in Verbindung mit klinischen Blutungskomplikationen validiert werden können, haben wir die beiden am stärksten exprimierten Gene dieser Gruppe *Metallothionein 1G* (MT1G) und *Metallothionein 1E* (MT1E) in der Validierungskohorte analysiert. Auch hier korrelierten die RNA Sequenzierungsexpressionswerte sehr gut mit den RT-qPCR Expressionswerten der Screeningkohorte (Daten nicht gezeigt).

Wir untersuchten weiter, ob die Expression der am häufigsten exprimierten Metallothioneine *MT1G* und *MT1E* mit klinisch gestuften Blutungen korrelierte. Dafür wurden die Expressionsniveaus von *MT1G* und *MT1E* nach dem 75%-Quantil in eine hoch und niedrig Expressionsgruppe eingeteilt. Das Ausmaß der Blutung wurde nach der WHO Blutungsskala bestimmt. In Korrelation der Expressionswerte mit den klinisch gestuften Blutungen zeigte sich fest, dass eine hohe Expression von *MT1G* mit einer höheren Rate an Blutungen gemäß WHO-Klassifikation assoziiert war (Abb. 17). So zeigten in der Gruppe ohne dokumentierte Anzeichen von Blutungen (WHO 0) nur 12,5% der Patienten (1 von 8) eine deutliche Überexpression von *MT1G*, während 50% der Patienten (1 von 2) mit Blutungen, die zu einer Transfusion roter Blutkörperchen führten, eine relativ erhöhte *MT1G*-Expression aufwiesen. Für *MT1E* war die Korrelation weniger eindeutig (Daten nicht gezeigt).

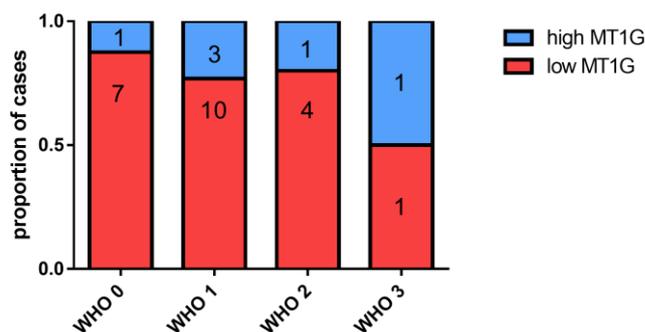


Abbildung 17: Anteil der Überexpression von MT1G gruppiert nach dem Blutungsgrad
Einteilung in eine Hoch- und Niedriggruppe anhand des 75%-Quantil der MT1G Expression

Darüber hinaus zeigten *MT1G* und *MT1E* eine signifikante Überexpression in der ED Gruppe mit einem FC von 13,6 ($p = 0,0005$) bzw. 5,0 ($p = 0,006$, Abb. 18A). Erwartungsgemäß war eine Überexpression von *MT1G* und *MT1E* mit einem schlechteren Gesamtüberleben (Abb. 18B) und einem erhöhten Sterberisiko assoziiert (HR 2,8 [95%-CI 1,2-6,6]; $p = 0,007$). Bemerkenswert war, dass die Trennung der

beiden Gruppen in den ersten 30 Tagen besonders ausgeprägt war, was auf eine ED als Hauptursache hinweist.

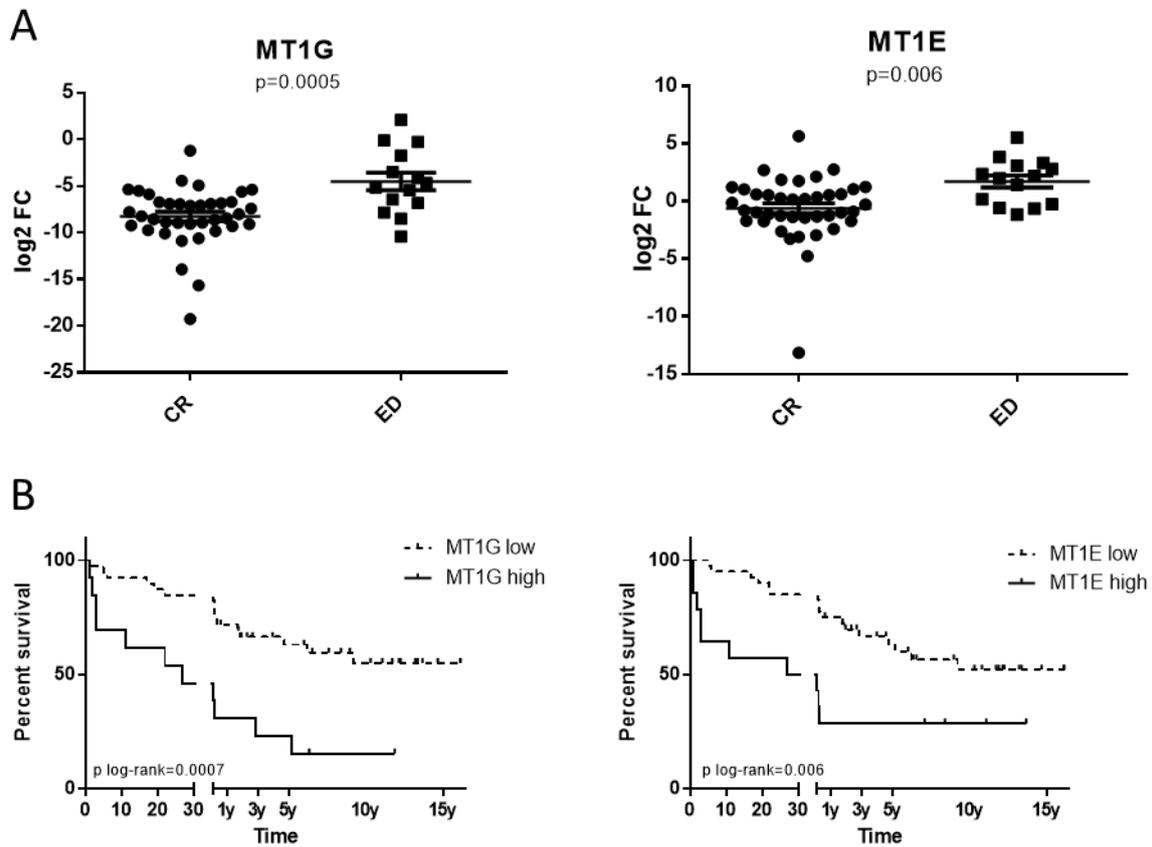


Abbildung 18: Genexpression und Gesamtüberleben in der Subgruppenanalyse

A: Genexpression von *MT1G* und *MT1E* in der Validierungskohorte B: Gesamtüberleben in der Validierungskohorte stratifiziert nach dem 75%-Quantil der Genexpression von *MT1G* und *MT1E*; n(*MT1G* high) = 13; n(*MT1G* low) = 39; n(*MT1E* high) = 14; n(*MT1E* low) = 40

3.5 Fusionsgene

Um die Sequenzierungsdaten des Transkriptoms auf Fusionsgene zu untersuchen, wurde das Tool *FusionCatcher* verwendet und auf jede Probe einzeln angewandt. Mit diesem konnten wir das Fusionstranskript *PML-RAR α* in 13 von 14 Proben detektieren. In der verbliebenden 14. Probe konnte mittels manueller Inspektion im *IGV Viewer* Reads identifiziert werden, welche den Bruchpunkt abdeckten.

Nach Entfernung vermeintlich falsch-positiver Transkripte wurde untersucht, ob ein Fusionstranskript exklusiv für die ED oder CR Gruppe sei. Da dies für keins zutraf, konzentrierten wir uns auf das in allen Proben am häufigsten vorkommende Fusionstranskript, das aus einer intrachromosomalen Fusion zwischen *Tropomyosin 4* (*TPM4*) und *Krüppel-like-Faktor 2* (*KLF2*) bestand. Diese Sequenz konnte in 6 von 14 Proben (3 ED und 3 CR) nachgewiesen werden. Bei n=3 dieser Proben detektierte *FusionCatcher* zwei verschiedene Bruchpunkte in *TPM4*, die unterschiedlichen Exons zugeordnet werden können (Abb. 19A). Die Validierung dieser Fusionstranskripte durch Sanger Sequenzierung beider Varianten ergab, dass die häufiger vorkommende Fusion (5': *TPM4-219_ex1*: chr19:16.076.306-16.076.697) höchstwahrscheinlich einer homologen Sequenz entspricht, die auch auf dem upstream Exon von *KLF2* vorzufinden ist und daher wahrscheinlich ein Sequenzierungsartefakt darstellt. Dies wurde durch die Tatsache erhärtet, dass diese vermeintliche Fusion in der RNA von 10 gesunden Knochenmarkspendern ebenfalls amplifizieren werden konnte. Im Gegensatz dazu war die Fusionssequenz innerhalb der 5'-Sequenz von *TPM4-221_ex2* (chr19:16076047- 16076172) (Abb. 19B) spezifisch, und es konnte keine andere Homologie gefunden werden. Um die genomische Architektur von *TPM4-KLF2* aufzuklären, analysierten wir genomischen Kopienzahlvariationsdaten eines SNP-Arrays der *TPM4-KLF2*-positiven Proben, die bereits publiziert worden waren, erneut (Nowak et al., 2012). Die 250 Kilobasenregion zwischen den beiden Fusionspartnern *TPM4* und *KLF2* wurde im SNP Array mit 92 Sonden abgedeckt. Hier konnten wir keine signifikante Verzerrung der Allelverhältnisse feststellen, was auf eine balancierte intrachromosomale Fusion deutet.

Nachdem wir die Spezifität von *TPM4-KLF2* validieren konnten, testeten wir die intrachromosomale Fusion in unserer Screeningkohorte und in n=50 Proben der Validierungskohorte mittels RT-qPCR und konnten *TPM4-KLF2* in insgesamt in 69% (44 von 64 Fällen) der diagnostischen APL Proben detektieren.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob *TPM4-KLF2* mit dem leukämischen Verlauf assoziiert war. Dafür konnten n=6 klinische Folgeproben während der ATRA-Behandlung identifiziert werden. Wir stellten fest, dass mit der Elimination von *PML-RAR α* im Verlauf der Therapie *TPM4-KLF2* in 5 Fällen nicht mehr nachweisbar war. In der verbliebenen 6. Probe war das Fusionstranskript weder in der Primär- noch in der Folgeprobe nachweisbar (Abb. 19C).

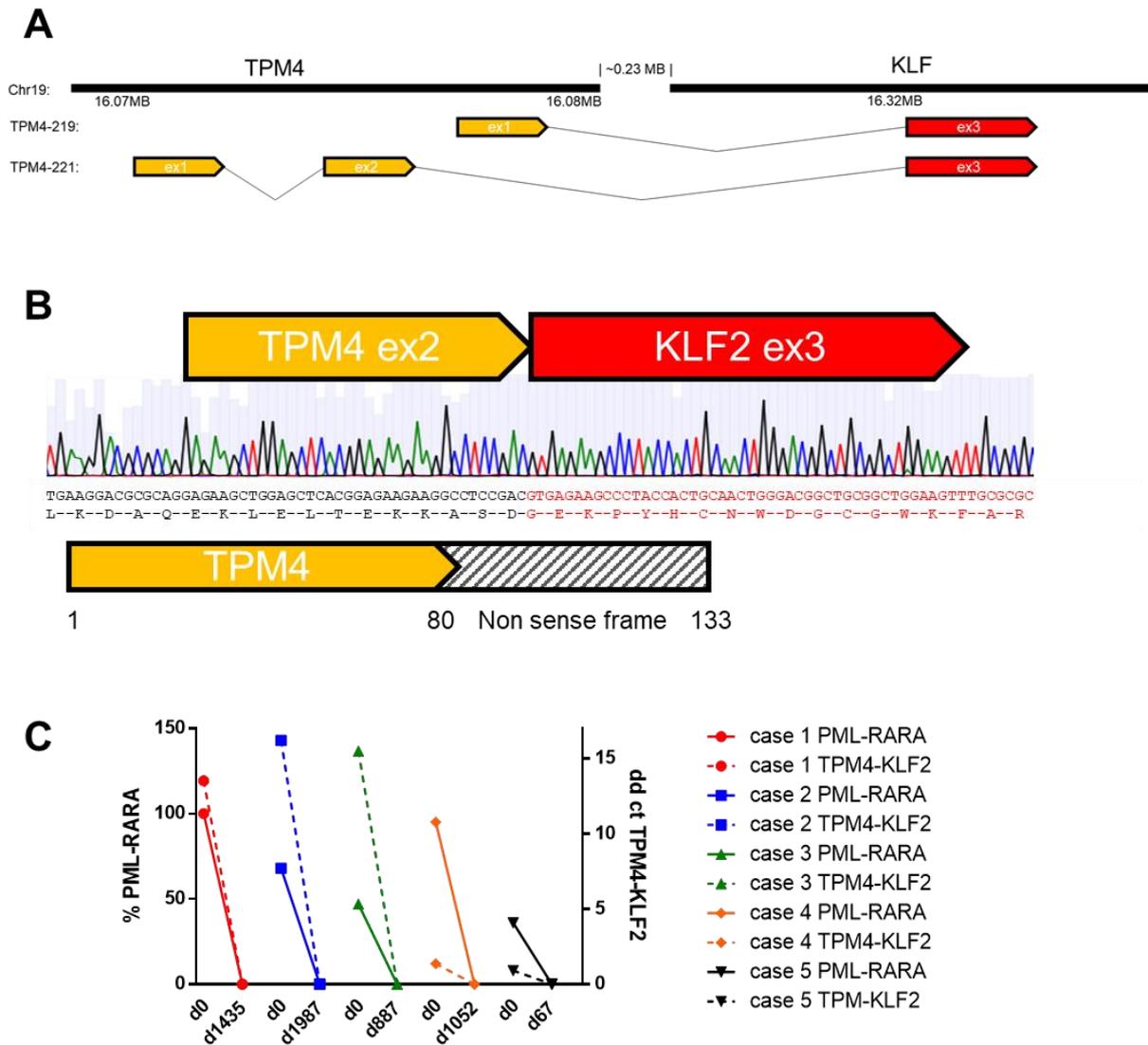


Abbildung 19: Fusionstranskript TPM4-KLF2

A: Struktur der beiden gefundenen Isoformen von *TPM4-KLF2* B: Sanger Elektropherogramm der Gensequenz von *TPM4-KLF2* C: Expression von *PML-RAR α* und *TPM4-KLF2* im Therapieverlauf; d: days (aus Engl.: Tage)

3.6 Klinische Relevanz der neuen entdeckten Biomarker

Um den Einfluss unserer neu entdeckten Biomarker auf das Gesamtüberleben (*Engl.* Overall Survival, OS) und die Frühsterblichkeit zu demonstrieren wurde eine univariate Analyse für n=58 Proben der Validierungskohorte durchgeführt. Als Parameter wurden sowohl bereits bekannte Risikofaktoren für ED wie hoher Blastenanteil im Knochenmark, Sanz-Score (Leukozyten > 10.000/ μ L, Thrombozyten < 40.000/ μ L), LDH > Median (323 U/L) und Alter > 65 Jahre, als auch unsere neu identifizierten molekularen Marker wie *EFEMP1*, *MT1G*, *MT1E* (stratifiziert nach dem Median der Expression) und dem positiven Nachweis von *TPM4-KLF2* herangezogen (Tabelle 6).

Parameter	Gesamtüberleben (n=30 Ereignisse)			30d Mortalität (n=15 Ereignisse)		
	HR	95% KI für HR	p Wert	HR	95% KI für HR	p Wert
KM Blastenanteil (%)	0,98	0,96-1	0,065	0,98	0,96-1	0,06
Leukozyten (>10.000/ μ L)	4,4	2-9,5	0,00019	16	3,5-77	0,0002
Thrombozyten (<40.000/ μ L)	1,2	0,54-2,6	0,69	1,7	0,53-5,6	0,21
LDH (>Median)	5,3	1,9-14	0,0012	6,8	0,81-56	0,077
Alter (>65J)	2	0,99-4,2	0,053	1,6	0,58-4,6	0,36
EFEMP1 hoch	2,5	1,5-7,4	0,026	3,8	1-14	0,042
MT1G hoch	2,5	1,6-7,7	0,02	4,4	1,2-16	0,023
MT1E hoch	1,5	1,3-6,3	0,27	3	0,93-9,5	0,066
TPM4-KLF2 positiv	0,7	0,29-1,7	0,43	0,91	0,23-3	0,88

Tabelle 6: Univariate Analyse des Gesamtüberlebens

KI: Konfidenzintervall; HR: Hazard Ratio

Dabei zeigte lediglich eine Leukozytose, mit Leukozyten über 10.000/ μ L eine Signifikanz in unserer Validierungskohorte sowohl für die Frühsterblichkeit als auch für das Gesamtüberleben. Eine erhöhte LDH (HR 5,3 und 6,8) war der stärkste Prädiktor für OS, versagte jedoch in Bezug auf die statistische Signifikanz der ED-Mortalität. Auffallend war, dass ein niedriger Thrombozyten-Wert keine statistische Signifikanz für ein klinisches Ergebnis erreichte. Darüber hinaus zeigten unsere neu identifizierten Biomarker ein signifikant erhöhtes Sterberisiko (EFEMP1: HR 2,5 und 3,8, MT1G: HR 2,5 und 4,4).

Um mögliche Einflussgrößen gleichzeitig zu betrachten und um den Faktor mit dem größten Faktor auf die Zielvariabel zu finden führten wir eine multivariate Analyse mit Einschließung unserer molekularen Marker und etablierten Risikoparametern durch. Dabei wurden lediglich die Variablen mit einbezogen, die in der univariaten Analyse eine Signifikanz als Prädiktor für das OS aufzeigten und bei denen eine vollständige Annotation verfügbar war (n=37; Tabelle 7). Hier war lediglich *EFEMP1* der einzige signifikante Prädiktor für ED mit einer HR von 18,7 (95%-CI 1,1-315).

Parameter	Gesamtüberleben (n=16 Events)			30d Mortalität (n=5 Events)		
	HR	95% CI for HR	p value	HR	95% CI for HR	p value
Leukozyten (>10.000/uL)	1.7	0.5 - 6.5	0.41	14.4	0.4 - 537	0.14
LDH (>median, 323U/L)	3.1	0.9 - 10.9	0.07 .	0.7	0.03 – 18	0.85
Alter (>65y)	2.2	0.8 - 6.6	0.14	1.9	0.2 – 20	0.59
EFEMP1 hoch	2.8	0.9 - 9.3	0.08 .	18.7	1.1 – 315	0.042
MT1G hoch	1.9	0.6 - 6.1	0.26	7.6	0.5 - 124	0.15

Tabelle 7: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens

4 DISKUSSION

Heute hat die APL die beste Prognose unter den AML Erkrankungen mit hervorragenden Langzeit-Überlebensraten in klinischen Studien von bis zu 95% (Lo-Coco et al., 2013; Platzbecker et al., 2017). Jedoch erscheint hier die Wirklichkeit nicht in vollem Umfang widergespiegelt zu sein, denn klinische Studien unterliegen einem Selektionsbias bei der Rekrutierung von Patienten. So werden häufig kritisch kranke Patienten mit einem hohen Risiko fürs Versterben nicht miteingeschlossen. Jedoch gerade zu Beginn der APL Erkrankung besteht ein hohes Risiko einen sogenannten FrühTod zu erleiden. So wird die FrühTodesrate in Populationsbasierten Studien als deutlicher höher angegeben und konnte in den letzten Dekaden kaum verbessert werden (Lehmann et al., 2011; McClellan et al., 2012; Park et al., 2011).

Es besteht daher ein ungedeckter medizinischer Bedarf eines besseren Verständnisses der molekularen Grundlagen der ED-Mortalität bei der APL. Es wurde vermutet, dass externe Faktoren wie ein möglichst schneller Beginn der zielgerichteten Therapie, die Verfügbarkeit einer optimalen supportiven Behandlung eines erfahrenen Teams und das Management septischer Komplikationen zur ED-Mortalität bei APL beitragen (Paulson et al., 2014). Im Gegensatz dazu konnte eine Studie von Rahme et al. keine Relevanz der Dauer des Zeitintervalls zwischen dem ersten abnormalen Blutbild, dem Krankenhausaufenthalt und der Knochenmarkspunktion bis zum Beginn der *ATRA*-Behandlung und der ED-Rate nachweisen (Rahme et al., 2014). Diese Diskrepanzen und die Tatsache, dass selbst unter optimalen Bedingungen ED auftreten, unterstützen die Vorstellung, dass ED auch durch intrinsische, biologische Faktoren der APL Leukämiezellen abhängig sein könnte.

Es wurde bisher noch keine Studie publiziert, welche das globale Transkriptom in APL FrühTodesfällen mit APL Langzeitremissionen vergleicht. Eine ähnliche Studien, jüngst von Lavallée et al. publiziert, verglich das Transkriptom von APL mit Nicht-APL AML Proben und konnte *PDPN* als einen möglichen Faktor für die ED Ereignisse identifizieren (Lavallée et al., 2018). Jedoch erklärt diese Studie nicht, weshalb einige Patienten eine Blutung erleiden und möglicherweise an dieser versterben und andere wiederum nicht. Passend dazu war *PDPN* als auch andere bekannte Faktoren der APL

Koagulopathie wie *TF*, *ANXA2*, *uPA* in unserer Screeningkohorte nicht differenziell exprimiert.

Unsere Studie ist somit die erste, welche die APL ED Pathogenese auf globaler Transkriptomenebene untersucht, um die biologische Heterogenität innerhalb der Erkrankung weiter aufzuklären. Dafür wurden moderne Hochdurchsatzverfahren durchgeführt und die Methode der RNA Sequenzierung im Rahmen des *Next Generation Sequencing* angewandt. Die technische Validierung dieser Methode lieferte sehr gute Ergebnisse und es konnte eine hohe Sequenzierungstiefe erreicht werden. Die verwendeten Proben stammen aus der jahrzehntelangen Sammlung des hämatookologischen Labor Mannheims. Trotz der Seltenheit der APL Erkrankung und seltenem ED Ereignis war es möglich sieben ED gegen sieben CR Proben, welche für bekannte Risikofaktoren und klinische Parameter wie Alter, Geschlecht, Blastenanteil im Knochenmark, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und Sanz-Score gut gematcht waren und eine sehr gute RNA Qualität aufwiesen für die Screeningkohorte herauszusuchen.

Innerhalb der Screeningkohorte konnte gezeigt werden, dass sich die globale Genexpression in ED Proben von den in CR Proben deutlich unterscheidet und in der PCA in getrennten Gruppen clustert. Zu unserer Überraschung stellten wir fest, dass innerhalb der transkriptionellen Veränderungen die meisten Gene in der ED Gruppe unterexprimiert waren. Das Ergebnis der GSEA konnte zeigen, dass auch das Immunsystem möglicherweise bei der Pathogenese der APL Koagulopathie involviert ist. Außerdem deutet die Anreicherung von ATRA sensitiven Genen in der CR Gruppe möglicherweise auf einen „tieferen“ Differenzierungsblock in der ED Gruppe hin.

Da wir in unserem Experiment das gesamte Knochenmark sequenziert haben, besteht die Möglichkeit, dass der Anteil der im Knochenmark vorhandenen Zellfraktionen in den beiden Versuchsgruppen unterschiedlich stark ausgeprägt war.

Dies könnte die verminderte Expression von *S100A8* und *S100A9* und anderen entzündlichen Schlüsselfiguren erklären, die eine erhöhte Expression während der Granulozyten- und Monozytendifferenzierung aufweisen (Lagasse and Clerc, 1988). Interessanterweise gehören *S100A8* und *S100A9* auch bei anderen Subtypen der AML zu den am stärksten hochregulierten Genen (Network, 2013) und waren mit einer schlechten Prognose assoziiert (Nicolas et al., 2011). Außerdem wurden in der ED

Gruppe eine Überexpression von Erythropoese-spezifischen Genen gefunden, was darauf hinweisen könnte, dass der Anteil der erythropoetischen Vorläuferzellen in der ED Gruppe und der von neutrophilen Vorläuferzellen in der CR Gruppe erhöht war, obwohl beide Gruppen einen ähnlich hohen Blastenanteil aufwiesen.

Bei der Suche nach Mediatoren der Pathogenese der Koagulopathie konzentrierten wir uns vor allem auf überexprimierte Gene, die für Effektorproteine codieren und so möglicherweise eine pharmakologische Hemmung ermöglichen könnten. Es wurde *EFEMP1* und *ALOX15B* als die zwei wichtigsten Kandidatengene mit einer starken Überexpression in der ED Gruppe identifiziert. Der *EFEMP1*-Plasmaspiegel wurde bereits als Blut- und Effusionsbiomarker für das Pleuramesotheliom beschrieben (Pass et al., 2012). Das enzymatische Produkt von *ALOX15B*, welches auch in Makrophagen exprimiert wird, konnte nachweislich die Thrombozytenaggregation und Thrombinbildung erhöhen (Vijil et al., 2014). In unserer Studie konnten wir eine *EFEMP1*-Überexpression als unabhängigen Biomarker für ein schlechteres Gesamtüberleben und eine erhöhte ED-Mortalität validieren. *ALOX15B* jedoch verfehlte in der Validierungskohorte eine Signifikanz und konnte als stabiler Biomarker nicht bestätigt werden.

Da die Ursachen für einen FrühTod vielfältig und die damit zusammenhängenden die molekularen Abläufe und Genexpressionsprofile potentiell unterschiedlich sind, führten wir eine Subgruppenanalyse durch und untersuchten in der Screeningkohorte lediglich Patienten die an einem FrühTod durch Blutung verstorben sind gegen Patienten mit einer Langzeitremission ohne jegliche Blutungen. Hier konnten wir feststellen, dass das Metallothionein *MT1G* bei Patienten mit Blutungskomplikationen häufiger überexprimiert und mit einem schlechterem OS assoziiert war. Es wurde berichtet, dass Metallothioneine die zelluläre Homöostase von Zink und Kupfer kontrollieren und auch Cadmium, Quecksilber, Platin oder andere ähnliche Schwermetalle binden könnten um so die Zelle vor einer Schwermetalltoxizität zu schützen (Atrian and Capdevila, 2013). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Metallothioneine eine Rolle bei der Karzinogenese und Therapieresistenz spielen könnten (Si and Lang, 2018). Außerdem wurde *MT1G* als Ziel des myeloischen Masterregulator *PU.1* beschrieben und eine Überexpression von *MT1G* schien die ATRA-induzierte Differenzierung in NB4-Zellen zu hemmen (Hirako et al., 2014).

Zusammengenommen könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass *MT1G* eine gestörte Differenzierung in ED-Fällen bedingt und eine Verzögerung der ATRA und ATO Wirkung bedingt.

Ferner ergab die Analyse unserer transkriptionellen Sequenzierungsdaten das Vorhandensein eines weiteren Fusiontranskriptes neben *PML-RAR α* . So konnten wir *TPM4-KLF2* in 44 von 64 (69%) APL-Patienten nachweisen. Der von uns gefundene Bruchpunkt erzeugt jedoch keine In-Frame-Fusion und die spezifische Zinkfingerdomäne von *KLF2* im offenen Leseraster bleiben nicht erhalten. Über *TPM4-KLF2* wurde bereits in anderen Studien in nicht-APL AMLs berichtet (n=42 Fälle). Der von uns gefundene spezifische Bruchpunkt stimmt exakt mit dem überein, welcher auch von Tyner et al. in der „beat AML“-Kohorte publiziert wurde (Tyner et al., 2018). Dieser wurde auch in einem unabhängigen Vergleich von verschiedenen Methoden der Generierung einer Sequenzierungsbibliothek mit PolyA- und Ribo-Depletionsansätzen identifiziert (Kumar et al., 2017). In einem Abstract wurde auch über den Nachweis von *TPM4-KLF2* neben AMLs auch in gesunden Probanden berichtet. Allerdings fehlt hier die Angabe des genauen Bruchpunktes (Locher et al., 2017). Wir konnten zeigen, dass ein Transkript von *TPM4-KLF2* homologe Sequenzen am 3' Ende zu einem Exon von *KLF2* aufwies und so möglicherweise auch bei gesunden Spendern artifiziell gefunden werden könnte. Für unser spezifisches Transkript konnten wir in der Sanger Sequenzierung sauber den von FusionCatcher vorhergesagten Bruchpunkt bestätigen. Darüber hinaus war *TPM4-KLF2* in Verlauf der ATRA Therapie parallel zum Abfall von *PML-RAR α* ebenfalls nicht mehr nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass es sich tatsächlich um eine Translokation ausschließlich im *PML-RAR α* -tragendem Klon handelt und es sich daher um ein Leukämie-spezifisches und erworbenes Rearrangement als ein PCR-Artefakt darstellt.

Ein limitierender Faktor unserer Studie ist die geringe Anzahl von Patientenproben. Dies ist dadurch bedingt, dass es sich bei der APL um einen seltenen AML Subtyp handelt und ED-Fälle sehr seltene Ereignisse darstellen. So bestand in unserer Validierungskohorte ein Ungleichgewicht von mehr Hochrisikopatienten in der ED Gruppe trotz Bemühungen solche Verzerrungen zu vermeiden. Dies schränkt die Bedeutung unserer neu identifizierten Marker etwas ein und rechtfertigt eine weitere Validierung in einer noch größeren, unabhängigen Patientenkohorte.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie die molekulare Gensignatur, die der APL spezifischen Koagulopathie innewohnt mittels einer unvoreingenommenen globalen Transkriptomanalyse untersucht. Unsere umfassende Untersuchung der Expressionsdaten ermöglichte die Identifizierung neuer potentieller Biomarker für das ED Ereignis wie *EFEMP1* und *MT1G*. Darüber hinaus konnten wir ein neues, potentiell Leukämie-spezifisches Fusionstranskript *TPM4-KLF2* detektieren. Weitere Untersuchungen sind notwendig um deren Bedeutung in der APL Biologie und Vorhersagekraft für einen Fröhrtod zu eruieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl sich die Akute Promyelozyten Leukämie (APL) zu der AML-Subgruppe mit der besten Prognose entwickelt hat, machen sogenannte Fröhrtodesereignisse („early death“; ED = Tod innerhalb der ersten 30 Tage der Diagnosestellung) in bevölkerungsbezogenen Studien immer noch einen Anteil von ca. 20% aus.

Mögliche molekulare Mechanismen der Pathogenese von Fröhrtodesereignissen sind bisher kaum bekannt. Fragestellung der aktuellen Arbeit war daher, ob sich in einer vergleichenden Transkriptomanalyse von diagnostischen Proben von APL Patienten mit Fröhrtodesereignissen im Vergleich zu APL Patienten mit komplikationslosem Verlauf Biomarker zur Prädiktion von Fröhrtodesereignissen identifizieren lassen. Wir führten dafür eine RNA Sequenzierungsanalyse in einer Screeningkohorte von n=7 APL Fröhrtodesfällen versus n=7 APL-Fälle mit Langzeitremission („Complete Remission“; CR) durch. Kandidatenläsionen wurden in einer Validierungskohorte von n=58 APL Patienten mittels quantitativer real time PCR untersucht.

Insgesamt konnten n=630 differenziell exprimierte Gene identifiziert werden, von denen die meisten bei den Fröhrtodesfällen herunterreguliert waren. Die Alarmgene *S100A8/S100A9* und das extrazelluläre Matrixprotein *EFEMP1* waren die am stärksten differenziell exprimierten Faktoren. In der Validierungskohorte von n=58 APL-Patienten (davon n=15 Fröhrtodesfälle) war die *EFEMP1*-Überexpression mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. Eine Subgruppenanalyse in Fröhrtodesfällen aufgrund von Blutungskomplikationen zeigte eine Assoziation der Überexpression von Metallothioneinen (*MT1G/MT1E*) mit höheren Blutungsraten und negativem Effekt auf das Gesamtüberleben. Darüber hinaus identifizierten wir ein neuartiges *TPM4-KLF2* Fusionstranskript in 44 von 64 APL-Proben, welches im Therapieverlauf parallel zum bekannten *PML-RARA* reduziert wurde.

In der hier vorliegenden Untersuchung wurde erstmals spezifisch die APL Fröhrtodespathogenese auf globaler Transkriptomebene untersucht. Die durchgeführte Gensignaturanalyse könnte darauf hinweisen, dass ein inflammatorischer Phänotyp der APL Zellen mit Fröhrtodesereignissen assoziiert ist. Weitere funktionelle Untersuchungen sind notwendig um die genaue Rolle der identifizierten Biomarker *EFEMP1* und *MT1G* bei der Entstehung der APL Koagulopathie zu analysieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2020 in *Leukemia and Lymphoma* (Impact factor 2,969, PMID: 32723198) publiziert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abaza, Y., Kantarjian, H., Garcia-Manero, G., Estey, E., Borthakur, G., Jabbour, E., Faderl, S., O'Brien, S., Wierda, W., Pierce, S., *et al.* (2017). Long-term outcome of acute promyelocytic leukemia treated with all-trans-retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab. *Blood* 129, 1275-1283.

Alcalay, M., Zangrilli, D., Fagioli, M., Pandolfi, P.P., Mencarelli, A., Lo Coco, F., Biondi, A., Grignani, F., and Pelicci, P.G. (1992). Expression pattern of the RARA-alpha PML fusion gene in acute promyelocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4840-4844.

Alcalay, M., Zangrilli, D., Pandolfi, P.P., Longo, L., Mencarelli, A., Giacomucci, A., Rocchi, M., Biondi, A., Rambaldi, A., Lo Coco, F., *et al.* (1991). Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor-alpha locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1977-1981.

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.

Arnould, C., Philippe, C., Bourdon, V., Gregoire, M.J., Berger, R., and Jonveaux, P. (1999). The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Human Molecular Genetics* 8, 1741-1749.

Arteaga, M.F., Mikesch, J.-H., Qiu, J., Christensen, J., Helin, K., Kogan, S.C., Dong, S., and So, C.W.E.J.C.c. (2013). The histone demethylase PHF8 governs retinoic acid response in acute promyelocytic leukemia. 23, 376-389.

Atrian, S., and Capdevila, M. (2013). Metallothionein-protein interactions. *Biomol Concepts* 4, 143-160.

Avvisati, G., ten Cate, J.W., Sturk, A., Lamping, R., Petti, M.G., and Mandelli, F. (1988). Acquired alpha-2-antiplasmin deficiency in acute promyelocytic leukaemia. *British journal of haematology* 70, 43-48.

Baba, S.M., Pandith, A.A., Shah, Z.A., and Baba, R.A. (2019). Pathogenetic implication of fusion genes in acute promyelocytic leukemia and their diagnostic utility. *Clinical Genetics* 95, 41-52.

Beitinjaneh, A., Jang, S., Roukoz, H., and Majhail, N.S. (2010). Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: A systematic review. *Leukemia Research* 34, 831-836.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)* 57, 289-300.

Bennett, B., Booth, N.A., Croll, A., and Dawson, A.A. (1989). The bleeding disorder in acute promyelocytic leukaemia: fibrinolysis due to u-PA rather than defibrination. *British journal of haematology* 71, 511-517.

Bernard, J., Weil, M., Boiron, M., Jacquillat, C., Flandrin, G., and Gemon, M.F. (1973). Acute promyelocytic leukemia - results of treatment by daunorubicin. *Blood* 41, 489-496.

Bernardi, R., and Pandolfi, P.P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 1006-1016.

Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P.G., and Dejean, A. (2002). Deconstructing PML-induced premature senescence. *Embo Journal* 21, 3358-3369.

Bonferroni, C. (1936). *Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilita*. Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze 8, 3-62.

Borrow, J., Goddard, A., Sheer, D., and Solomon, E. (1990). Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science* 249, 1577-1580.

Breen, K.A., Grimwade, D., and Hunt, B.J. (2012). The pathogenesis and management of the coagulopathy of acute promyelocytic leukaemia. *British journal of haematology* 156, 24-36.

Brown, D., Kogan, S., Lagasse, E., Weissman, I., Alcalay, M., Pelicci, P.G., Atwater, S., and Bishop, J.M. (1997). A PMLRAR α transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 2551-2556.

Catalano, A., Dawson, M.A., Somana, K., Opat, S., Schwarzer, A., Campbell, L.J., and Iland, H. (2007). The PRKAR1A gene is fused to RARA in a new variant acute promyelocytic leukemia. *Blood* 110, 4073-4076.

Cesarman, G.M., Guevara, C.A., and Hajjar, K.A. (1994). An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *The Journal of biological chemistry* 269, 21198-21203.

Chang, H., Kuo, M.C., Shih, L.Y., Dunn, P., Wang, P.N., Wu, J.H., Lin, T.L., Hung, Y.S., and Tang, T.C. (2012). Clinical bleeding events and laboratory coagulation

profiles in acute promyelocytic leukemia. *European journal of haematology* 88, 321-328.

Chen, G.Q., Shi, X.G., Tang, W., Xiong, S.M., Zhu, J., Cai, X., Han, Z.G., Ni, J.H., Shi, G.Y., Jia, P.M., *et al.* (1997). Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL) .1. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 89, 3345-3353.

Chen, G.Q., Zhu, J., Shi, X.G., Ni, J.H., Zhong, H.J., Si, G.Y., Jin, X.L., Tang, W., Li, X.S., Xong, S.M., *et al.* (1996). In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood* 88, 1052-1061.

Chen, Y., Kantarjian, H., Wang, H., Cortes, J., and Ravandi, F. (2012). Acute promyelocytic leukemia: A population-based study on incidence and survival in the United States, 1975-2008. *Cancer* 118, 5811-5818.

Chen, Z., Brand, N.J., Chen, A., Chen, S.J., Tong, J.H., Wang, Z.Y., Waxman, S., and Zelent, A. (1993). Fusion between a novel kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11,17) translocation associated with acute promyelocytic leukemia. *Embo Journal* 12, 1161-1167.

Cheng, C.K., Wang, A.Z., Wong, T.H.Y., Wan, T.S.K., Cheung, J.S., Raghupathy, R., Chan, N.P.H., and Ng, M.H.L. (2017). FNDC3B is another novel partner fused to RARA in the t(3;17)(q26;q21) variant of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 129, 2705-2709.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Cicconi, L., Divona, M., Ciardi, C., Ottone, T., Ferrantini, A., Lavoragna, S., Alfonso, V., Paoloni, F., Piciocchi, A., Avvisati, G., *et al.* (2016). PML-RAR α kinetics and impact of FLT3-ITD mutations in newly diagnosed acute promyelocytic leukaemia treated with ATRA and ATO or ATRA and chemotherapy. *Leukemia* 30, 1987.

Cole, C.B., Verdoni, A.M., Ketkar, S., Leight, E.R., Russler-Germain, D.A., Lamprecht, T.L., Demeter, R.T., Magrini, V., and Ley, T.J.J.T.J.o.c.i. (2016). PML-RARA requires DNA methyltransferase 3A to initiate acute promyelocytic leukemia. *126*, 85-98.

Collins, S.J. (2002). The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis. *Leukemia* 16, 1896-1905.

Corey, S.J., Locker, J., Oliveri, D.R., Shekhterlevin, S., Redner, R.L., Penchansky, L., and Gollin, S.M. (1994). A nonclassical translocation involving 17q12 (retinoic acid receptor-alpha) in acute promyelocytic leukemia (APML) with atypical features. *Leukemia* 8, 1350-1353.

Dally, N., Hoffman, R., Haddad, N., Sarig, G., Rowe, J.M., and Brenner, B. (2005). Predictive factors of bleeding and thrombosis during induction therapy in acute promyelocytic leukemia—a single center experience in 34 patients. *Thrombosis research 116*, 109-114.

de la Serna, J., Montesinos, P., Vellenga, E., Rayon, C., Parody, R., Leon, A., Esteve, J., Bergua, J.M., Milone, G., Deben, G., *et al.* (2008). Causes and prognostic factors of remission induction failure in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and idarubicin. *Blood 111*, 3395-3402.

de Thé, H., and Chen, Z. (2010). Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nature Reviews Cancer 10*, 775.

de Thé, H., Chomienne, C., Lanotte, M., Degos, L., and Dejean, A. (1990). The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. *Nature 347*, 558.

de Thé, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR α fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell 66*, 675-684.

de The, H., Le Bras, M., and Lallemand-Breitenbach, V. (2012). The cell biology of disease: Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *The Journal of cell biology 198*, 11-21.

de Thé, H., Pandolfi, P.P., and Chen, Z. (2017). Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein-Targeted Cure. *Cancer cell 32*, 552-560.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2012). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics 29*, 15-21.

Doehner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Buechner, T., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenaux, P., Larson, R.A., *et al.* (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood 129*, 424-447.

Dombret, H., Scrobohaci, M.L., Ghorra, P., Zini, J.M., Daniel, M.T., Castaigne, S., and Degos, L. (1993). Coagulation disorders associated with acute promyelocytic leukemia: corrective effect of all-trans retinoic acid treatment. *Leukemia 7*, 2-9.

Falanga, A., Consonni, R., Marchetti, M., Locatelli, G., Garattini, E., Passerini, C.G., Gordon, S.G., and Barbui, T. (1998). Cancer procoagulant and tissue factor are differently modulated by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood 92*, 143-151.

Fasan, A., Haferlach, C., Perglerova, K., Kern, W., and Haferlach, T. (2017). Molecular landscape of acute promyelocytic leukemia at diagnosis and relapse. *Haematologica* 102, E222-E224.

Fenaux, P., Chastang, C., Chevret, S., Sanz, M., Dombret, H., Archimbaud, E., Fey, M., Rayon, C., Huguet, F., Sotto, J.J., *et al.* (1999). A randomized comparison of all transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. *Blood* 94, 1192-1200.

Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T., and Roth, J. (2007). S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 81, 28-37.

Goddard, A.D., Borrow, J., Freemont, P.S., and Solomon, E. (1991). Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15,17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* 254, 1371-1374.

Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Ciocce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F.F., Zamir, I., *et al.* (1998). Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 815-818.

Grimwade, D., Hills, R.K., Moorman, A.V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A.H., Wheatley, K., Harrison, C.J., and Burnett, A.K. (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. *Blood* 116, 354-365.

Grisolano, J.L., Wesselschmidt, R.L., Pelicci, P.G., and Ley, T.J. (1997). Altered Myeloid Development and Acute Leukemia in Transgenic Mice Expressing PML-RAR α Under Control of Cathepsin G Regulatory Sequences. *Blood* 89, 376-387.

He, L.-Z., Tribioli, C., Rivi, R., Peruzzi, D., Pelicci, P.G., Soares, V., Cattoretti, G., and Pandolfi, P.P. (1997). Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RAR α transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 5302-5307.

Hecht, A., Doll, S., Altmann, H., Nowak, D., Lengfelder, E., Rollig, C., Ehninger, G., Spiekermann, K., Hiddemann, W., Weiss, C., *et al.* (2017). Validation of a Molecular Risk Score for Prognosis of Patients With Acute Promyelocytic Leukemia Treated With All-trans Retinoic Acid and Chemotherapy-containing Regimens. *Clinical Lymphoma Myeloma & Leukemia* 17, 889-+.

Higuchi, T., Shimizu, T., Mori, H., Niikura, H., and Omine, M. (1997). Coagulation patterns of disseminated intravascular coagulation in acute promyelocytic leukemia. *Hematological oncology* 15, 209-217.

Hirako, N., Nakano, H., and Takahashi, S. (2014). A PU.1 suppressive target gene, metallothionein 1G, inhibits retinoic acid-induced NB4 cell differentiation. *PLoS One* *9*, e103282.

Huang, M.E., Ye, Y.C., Chen, S.R., Chai, J.R., Lu, J.X., Zhao, L., Gu, L.J., and Wang, Z.Y. (1988). Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* *72*, 567-572.

Illumina (2017): TruSeq Stranded mRNA Reference Guide. Online: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/tru-seq-stranded-mrna-workflow/truseq-stranded-mrna-workflow-reference-1000000040498-00.pdf, Stand: 11.05.2021

Ito, K., Bernardi, R., Morotti, A., Matsuoka, S., Saglio, G., Ikeda, Y., Rosenblatt, J., Avigan, D.E., Teruya-Feldstein, J., and Pandolfi, P.P. (2008). PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature* *453*, 1072-U1074.

Ito, K., Carracedo, A., Weiss, D., Arai, F., Ala, U., Avigan, D.E., Schafer, Z.T., Evans, R.M., Suda, T., Lee, C.-H., *et al.* (2012). A PML-PPAR-delta pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nature Medicine* *18*, 1350-+.

Ivanschitz, L., Takahashi, Y., Jollivet, F., Ayrault, O., Le Bras, M., and de The, H. (2015). PML IV/ARF interaction enhances p53 SUMO-1 conjugation, activation, and senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, 14278-14283.

Jardi, M., Fabregas, P., Sagarra-Tio, M., Perez-Lucena, M.J., and Felez, J. (2012). Characterization of plasminogen binding to NB4 promyelocytic cells using monoclonal antibodies against receptor-induced binding sites in cell-bound plasminogen. *Journal of biomedicine & biotechnology* *2012*, 984589.

Jeanne, M., Lallemand-Breitenbach, V., Ferhi, O., Koken, M., Le Bras, M., Duffort, S., Peres, L., Berthier, C., Soilihi, H., Raught, B., *et al.* (2010). PML/RARA Oxidation and Arsenic Binding Initiate the Antileukemia Response of As₂O₃. *Cancer cell* *18*, 88-98.

Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P.S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* *20*, 7223-7233.

Juliusson, G., Antunovic, P., Derolf, Å., Lehmann, S., Möllgård, L., Stockelberg, D., Tidfelt, U., Wahlin, A., and Höglund, M. (2009). Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* *113*, 4179.

Kamashev, D., Vitoux, D., and de The, H. (2004). PML-RARA-RXR oligomers mediate retinoid and rexinoid/cAMP cross-talk in acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine* *199*, 1163-1174.

Kassambara, A., Kosinski, M., Biecek, P., and Fabian, S. (2017). Package 'survminer'. Drawing Survival Curves using 'ggplot2'(R package version 03 1).

Kastner, P., Lawrence, H.J., Waltzinger, C., Ghyselinck, N.B., Chambon, P., and Chan, S. (2001). Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RAR alpha. *Blood* 97, 1314-1320.

Kent, W.J. (2002). BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* 12, 656-664.

Khan, M.M., Nomura, T., Kim, H., Kaul, S.C., Wadhwa, R., Shinagawa, T., Ichikawa-Iwata, E., Zhong, S., Pandolfi, P.P., and Ishii, S. (2001). Role of PML and PML-RAR alpha in Mad-mediated transcriptional repression. *Molecular Cell* 7, 1233-1243.

Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* 12, 357-360.

Kim, D.Y., Lee, J.H., Lee, J.H., Kim, S.D., Lim, S.N., Choi, Y., Lee, Y.S., Kang, Y.A., Seol, M., Jeon, M., *et al.* (2011). Significance of fibrinogen, D-dimer, and LDH levels in predicting the risk of bleeding in patients with acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res* 35, 152-158.

Kogan, S.C. (2007). Mouse models of acute promyelocytic leukemia. In *Acute Promyelocytic Leukemia: Molecular Genetics, Mouse Models and Targeted Therapy*, P.P. Pandolfi, and P.K. Vogt, eds., pp. 3-29.

Koken, M.H.M., Puvionduilleul, F., Guillemain, M.C., Viron, A., Linarescruz, G., Stuurman, N., Dejong, L., Szostecki, C., Calvo, F., Chomienne, C., *et al.* (1994). The t(15;17) translocation alters a nuclear-body in a retinoic acid-reversible fashion. *Embo Journal* 13, 1073-1083.

Kolde, R. (2015). pheatmap: Pretty heatmaps [Software].

Kompetenznetz-Leukämie (2015): Napoleon Register Treatment Recommendation. Online: https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/sites/kompetenznetz-leukaemie/content/e53457/e55758/e57007/NapoleonRegister_TreatmentRecommendation_Final_V3.0_20150630.pdf, Stand: 11.05.2021

Kondo, T., Mori, A., Darmanin, S., Hashino, S., Tanaka, J., and Asaka, M. (2008). The seventh pathogenic fusion gene FIP1L1-RARA was isolated from a t(4;17)-positive acute promyelocytic leukemia. *Haematologica-the Hematology Journal* 93, 1414-1416.

Koyama, T., Hirosawa, S., Kawamata, N., Tohda, S., and Aoki, N. (1994). All-trans retinoic acid upregulates thrombomodulin and downregulates tissue-factor expression in acute promyelocytic leukemia cells: distinct expression of thrombomodulin and tissue factor in human leukemic cells. *Blood* 84, 3001-3009.

Kumar, A., Kankainen, M., Parsons, A., Kallioniemi, O., Mattila, P., and Heckman, C.A. (2017). The impact of RNA sequence library construction protocols on transcriptomic profiling of leukemia. *BMC Genomics* 18, 629.

Lagasse, E., and Clerc, R.G. (1988). Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 8, 2402-2410.

Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B., and de The, H. (2008). Arsenic degrades PML or PML - RAR alpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nature Cell Biology* 10, 547-555.

Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honore, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P.P., Puvion, E., Freemont, P., *et al.* (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As₂O₃-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *Journal of Experimental Medicine* 193, 1361-1371.

Lallemand-Breitenbach, V.J.C.S.H.p.i.b. (2010). PML nuclear bodies. 2, a000661.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10, R25.

Lavallée, V.-P., Chagraoui, J., MacRae, T., Marquis, M., Bonnefoy, A., Krosi, J., Lemieux, S., Marinier, A., Pabst, C., Rivard, G.-É., *et al.* (2018). Transcriptomic landscape of acute promyelocytic leukemia reveals aberrant surface expression of the platelet aggregation agonist Podoplanin. *Leukemia* 32, 1349-1357.

Lee, H.J., Park, H.J., Kim, H.W., and Park, S.G. (2013). Comparison of laboratory characteristics between acute promyelocytic leukemia and other subtypes of acute myeloid leukemia with disseminated intravascular coagulation. *Blood research* 48, 250-253.

Lehmann, S., Ravn, A., Carlsson, L., Antunovic, P., Deneberg, S., Möllgård, L., Rangert Derolf, Å., Stockelberg, D., Tidefelt, U., Wahlin, A., *et al.* (2011). Continuing high early death rate in acute promyelocytic leukemia: a population-based report from the Swedish Adult Acute Leukemia Registry. *Leukemia* 25, 1128.

Lemons, R.S., Eilender, D., Waldmann, R.A., Rebentisch, M., Frej, A.K., Ledbetter, D.H., Willman, C., McConnell, T., and Oconnell, P. (1990). Cloning and characterization of the t(15-17) translocation breakpoint region in acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes & Cancer* 2, 79-87.

Lengfelder, E., Görlich, D., Nowak, D., Spiekermann, K., Haferlach, C., Krug, U., Kreuzer, K.-A., Braess, J., Schliemann, C., Lindemann, H.-W., *et al.* (2018). Frontline therapy of acute promyelocytic leukemia: Randomized comparison of ATRA and

intensified chemotherapy versus ATRA and anthracyclines. *European journal of haematology* 100, 154-162.

Leroy, P., Nakshatri, H., and Chambon, P. (1991). Mouse retinoic acid receptor- α -2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10138-10142.

Li, J., Zhong, H.-Y., Zhang, Y., Xiao, L., Bai, L.-H., Liu, S.-F., Zhou, G.-B., and Zhang, G.-S. (2015). GTF2I-RARA is a novel fusion transcript in a t(7;17) variant of acute promyelocytic leukaemia with clinical resistance to retinoic acid. *British journal of haematology* 168, 904-908.

Li, K., Wang, F., Cao, W.-B., Lv, X.-X., Hua, F., Cui, B., Yu, J.-J., Zhang, X.-W., Shang, S., and Liu, S.-S.J.C.C. (2017). TRIB3 promotes APL progression through stabilization of the oncoprotein PML-RAR α and inhibition of p53-mediated senescence. *31*, 697-710. e697.

Lin, R.J., and Evans, R.M. (2000). Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. *Molecular Cell* 5, 821-830.

Liquori, A., Ibanez, M., Sargas, C., Sanz, M.A., Barragan, E., and Cervera, J. (2020). Acute Promyelocytic Leukemia: A Constellation of Molecular Events around a Single PML-RARA Fusion Gene. *Cancers* 12.

Liu, Y., Wang, Z., Jiang, M., Dai, L., Zhang, W., Wu, D., and Ruan, C. (2011). The expression of annexin II and its role in the fibrinolytic activity in acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res* 35, 879-884.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* 25, 402-408.

Lo-Coco, F., Avvisati, G., Vignetti, M., Thiede, C., Orlando, S., Iacobelli, S., Ferrara, F., Fazi, P., Cicconi, L., and Di Bona, E. (2013). Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 369, 111-121.

Lo-Coco, F., and Hasan, S.K. (2014). Understanding the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 27, 3-9.

Locher, I.J., Arindrarto, W., Borràs, D.M., Honders, M.W., de Leeuw, R.H., Kroes, W.G.M., de Knijff, P., van Bergen, C.A.M., t Hoen, P.A.C., Kielbasa, S.M., *et al.* (2017). Fusion Transcripts without Corresponding Cytogenetic Abnormalities in Acute Myeloid Leukemia: Implications for AML Pathogenesis. *Blood* 130, 2703.

Longo, L., Pandolfi, P.P., Biondi, A., Rambaldi, A., Mencarelli, A., Lo Coco, F., Diverio, D., Pegoraro, L., Avanzi, G., and Tabilio, A. (1990). Rearrangements and aberrant expression of the retinoic acid receptor alpha gene in acute promyelocytic leukemias. *The Journal of Experimental Medicine* 172, 1571-1575.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550.

Madan, V., Shyamsunder, P., Han, L., Mayakonda, A., Nagata, Y., Sundaresan, J., Kanojia, D., Yoshida, K., Ganesan, S., Hattori, N., *et al.* (2016). Comprehensive mutational analysis of primary and relapse acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 30, 1672.

Mandelli, F., Diverio, D., Avvisati, G., Luciano, A., Barbui, T., Bernasconi, C., Brocchia, G., Cerri, R., Falda, M., Fioritoni, G., *et al.* (1997). Molecular remission in PML/RAR alpha-positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. Gruppo Italiano-Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto and Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica Cooperative Groups. *Blood* 90, 1014-1021.

Mantha, S., Goldman, D.A., Devlin, S.M., Lee, J.W., Zannino, D., Collins, M., Douer, D., Iland, H.J., Litzow, M.R., Stein, E.M., *et al.* (2017). Determinants of fatal bleeding during induction therapy for acute promyelocytic leukemia in the ATRA era. *Blood* 129, 1763-1767.

Mantha, S., Tallman, M.S., and Soff, G.A. (2016). What's new in the pathogenesis of the coagulopathy in acute promyelocytic leukemia? *Curr Opin Hematol* 23, 121-126.

Matt, S., and Hofmann, T.G. (2018). Crosstalk between p53 modifiers at PML bodies. *Molecular & Cellular Oncology* 5, e1074335.

McClellan, J.S., Kohrt, H.E., Coutre, S., Gotlib, J.R., Majeti, R., Alizadeh, A.A., and Medeiros, B.C. (2012). Treatment advances have not improved the early death rate in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 97, 133-136.

Mehdipour, P., Santoro, F., Botrugno, O., Romanenghi, M., Pagliuca, C., Matthews, G., Johnstone, R., and Minucci, S.J.L. (2017). HDAC3 activity is required for initiation of leukemogenesis in acute promyelocytic leukemia. *31*, 995.

Menell, J.S., Cesarman, G.M., Jacovina, A.T., McLaughlin, M.A., Lev, E.A., and Hajjar, K.A. (1999). Annexin II and Bleeding in Acute Promyelocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 340, 994-1004.

Micol, J.B., Raffoux, E., Boissel, N., Lengline, E., Canet, E., Daniel, M.T., de Labarthe, A., Maarek, O., Cassinat, B., Ades, L., *et al.* (2014). Management and treatment results in patients with acute promyelocytic leukaemia (APL) not enrolled in clinical trials. *European Journal of Cancer* 50, 1159-1168.

Minucci, S., Maccarana, M., Cioce, M., De Luca, P., Gelmetti, V., Segalla, S., Di Croce, L., Giavara, S., Matteucci, C., Gobbi, A., *et al.* (2000). Oligomerization of RAR and AML1 transcription factors as a novel mechanism of oncogenic activation. *Molecular Cell* 5, 811-820.

Mistry, A.R., Pedersen, E.W., Solomon, E., and Grimwade, D. (2003). The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Reviews* 17, 71-97.

Mitrovic, M., Suvajdzic, N., Bogdanovic, A., Kurtovic, N.K., Sretenovic, A., Elezovic, I., and Tomin, D. (2013). International Society of Thrombosis and Hemostasis Scoring System for disseminated intravascular coagulation ≥ 6 : a new predictor of hemorrhagic early death in acute promyelocytic leukemia. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 30, 478.

Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., *et al.* (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics* 34, 267-273.

Mossner, M., Jann, J.-C., Wittig, J., Nolte, F., Fey, S., Nowak, V., Obländer, J., Pressler, J., Palme, I., Xanthopoulos, C., *et al.* (2016). Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood* 128, 1246-1259.

Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L., and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89, 373-380.

Network, T.C.G.A.R. (2013). Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 368, 2059-2074.

Nguyen, L.A., Pandolfi, P.P., Aikawa, Y., Tagata, Y., Ohki, M., and Kitabayashi, I. (2005). Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML. *Blood* 105, 292-300.

Nicolas, E., Ramus, C., Berthier, S., Arlotto, M., Bouamrani, A., Lefebvre, C., Morel, F., Garin, J., Ifrah, N., Berger, F., *et al.* (2011). Expression of S100A8 in leukemic cells predicts poor survival in de novo AML patients. *Leukemia* 25, 57-65.

Nicorici, D., Satalan, M., Edgren, H., Kangaspeska, S., Murumagi, A., Kallioniemi, O., Virtanen, S., and Kilku, O. (2014). FusionCatcher - a tool for finding somatic fusion genes in paired-end RNA-sequencing data (bioRxiv).

Noguera, N., Breccia, M., Divona, M., Diverio, D., Costa, V., De Santis, S., Avvisati, G., Pinazzi, M., Petti, M.C., Mandelli, F., *et al.* (2002). Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis

of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. *Leukemia* 16, 2185-2189.

Nowak, D., Klaumuenzer, M., Hanfstein, B., Mossner, M., Nolte, F., Nowak, V., Oblaender, J., Hecht, A., Hütter, G., Ogawa, S., *et al.* (2012). SNP array analysis of acute promyelocytic leukemia may be of prognostic relevance and identifies a potential high risk group with recurrent deletions on chromosomal subband 1q31.3. *Genes, Chromosomes and Cancer* 51, 756-767.

Pandolfi, P.P. (2001). Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Human Molecular Genetics* 10, 769-775.

Pandolfi, P.P., Alcalay, M., Fagioli, M., Zangrilli, D., Mencarelli, A., Diverio, D., Biondi, A., Lo coco, F., Rambaldi, A., Grignani, F., *et al.* (1992). Genomic variability and alternative splicing generate multiple pml/rar-alpha transcripts that encode aberrant pml proteins and pml/rar-alpha isoforms in acute promyelocytic leukemia. *Embo Journal* 11, 1397-1407.

Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V.I., Paschka, P., Roberts, N.D., Potter, N.E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., *et al.* (2016). Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 374, 2209-2221.

Park, J.H., Qiao, B., Panageas, K.S., Schymura, M.J., Jurcic, J.G., Rosenblat, T.L., Altman, J.K., Douer, D., Rowe, J.M., and Tallman, M.S. (2011). Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all-trans retinoic acid. *Blood* 118, 1248-1254.

Pass, H.I., Levin, S.M., Harbut, M.R., Melamed, J., Chiriboga, L., Donington, J., Huflejt, M., Carbone, M., Chia, D., Goodglick, L., *et al.* (2012). Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *The New England journal of medicine* 367, 1417-1427.

Paulson, K., Serebrin, A., Lambert, P., Bergeron, J., Everett, J., Kew, A., Jones, D., Mahmud, S., Meloche, C., Sabloff, M., *et al.* (2014). Acute promyelocytic leukaemia is characterized by stable incidence and improved survival that is restricted to patients managed in leukaemia referral centres: a pan-Canadian epidemiological study. *British journal of haematology* 166, 660-666.

Pertea, M., Kim, D., Pertea, G.M., Leek, J.T., and Salzberg, S.L. (2016). Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nature Protocols* 11, 1650.

Platzbecker, U., Avvisati, G., Cicconi, L., Thiede, C., Paoloni, F., Vignetti, M., Ferrara, F., Divona, M., Albano, F., Efficace, F., *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. *Journal of Clinical Oncology* 35, 605-612.

Powell, B.L., Moser, B., Stock, W., Gallagher, R.E., Willman, C.L., Stone, R.M., Rowe, J.M., Coutre, S., Feusner, J.H., Gregory, J., *et al.* (2010). Arsenic trioxide improves event-free and overall survival for adults with acute promyelocytic leukemia: North American Leukemia Intergroup Study C9710. *Blood* 116, 3751-3757.

Prunier, C., Zhang, M.-Z., Kumar, S., Levy, L., Ferrigno, O., Tzivion, G., and Atfi, A. (2015). Disruption of the PHRF1 Tumor Suppressor Network by PML-RAR alpha Drives Acute Promyelocytic Leukemia Pathogenesis. *Cell Reports* 10, 883-890.

Rahme, R., Thomas, X., Recher, C., Vey, N., Delaunay, J., Deconinck, E., Hirsch, P., Bordessoule, D., Micol, J.B., Stamatoullas, A., *et al.* (2014). Early death in acute promyelocytic leukemia (APL) in French centers: a multicenter study in 399 patients. *Leukemia* 28, 2422-2424.

Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 29, 24-26.

Rodeghiero, F., Mannucci, P.M., Vigano, S., Barbui, T., Gugliotta, L., Cortellaro, M., and Dini, E. (1984). Liver dysfunction rather than intravascular coagulation as the main cause of low protein C and antithrombin III in acute leukemia. *Blood* 63, 965-969.

Rowley, J., Golomb, H., and Dougherty, C. (1977). 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *The Lancet* 309, 549-550.

Saeed, S., Logie, C., Francoijs, K.-J., Frige, G., Romanenghi, M., Nielsen, F.G., Raats, L., Shahhoseini, M., Huynen, M., Altucci, L., *et al.* (2012). Chromatin accessibility, p300, and histone acetylation define PML-RAR alpha and AML1-ETO binding sites in acute myeloid leukemia. *Blood* 120, 3058-3068.

Sakata, Y., Murakami, T., Noro, A., Mori, K., and Matsuda, M. (1991). The specific activity of plasminogen activator inhibitor-1 in disseminated intravascular coagulation with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 77, 1949.

Sant, M., Allemani, C., Tereanu, C., De Angelis, R., Capocaccia, R., Visser, O., Marcos-Gragera, R., Maynadie, M., Simonetti, A., Lutz, J.-M., *et al.* (2010). Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 116, 3724-3734.

Sanz, M.A., Fenaux, P., Tallman, M.S., Estey, E.H., Lowenberg, B., Naoe, T., Lengfelder, E., Doehner, H., Burnett, A.K., Chen, S.-J., *et al.* (2019). Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood* 133, 1630-1643.

Sanz, M.A., Lo Coco, F., Martin, G., Avvisati, G., Rayon, C., Barbui, T., Diaz-Mediavilla, J., Fioritoni, G., Gonzalez, J.D., Liso, V., *et al.* (2000). Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic

leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood* 96, 1247-1253.

Sanz, M.A., Martin, G., Gonzalez, M., Leon, A., Rayon, C., Rivas, C., Colomer, D., Amutio, E., Capote, F.J., Milone, G.A., *et al.* (2004). Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood* 103, 1237-1243.

Sanz, M.A., Montesinos, P., Rayon, C., Holowiecka, A., de la Serna, J., Milone, G., de Lisa, E., Brunet, S., Rubio, V., Ribera, J.M., *et al.* (2010). Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia based on all-trans retinoic acid and anthracycline with addition of cytarabine in consolidation therapy for high-risk patients: further improvements in treatment outcome. *Blood* 115, 5137-5146.

Si, M., and Lang, J. (2018). The roles of metallothioneins in carcinogenesis. *Journal of hematology & oncology* 11, 107-107.

Spinelli, O., Rambaldi, A., Rigo, F., Zanghi, P., D'Agostini, E., Amicarelli, G., Colotta, F., Divona, M., Ciardi, C., Coco, F.L., *et al.* (2015). Simple, rapid and accurate molecular diagnosis of acute promyelocytic leukemia by loop mediated amplification technology. *Oncoscience* 2, 50-58.

Stahl, M., and Tallman, M.S. (2019). Differentiation syndrome in acute promyelocytic leukaemia. *British journal of haematology* 187, 157-162.

Stein, E., McMahon, B., Kwaan, H., Altman, J.K., Frankfurt, O., and Tallman, M.S. (2009). The coagulopathy of acute promyelocytic leukaemia revisited. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 22, 153-163.

Tallman, M.S., Andersen, J.W., Schiffer, C.A., Appelbaum, F.R., Feusner, J.H., Ogden, A., Shepherd, L., Willman, C., Bloomfield, C.D., Rowe, J.M., *et al.* (1997). All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 337, 1021-1028.

Team, R.C. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Therneau, T.M., and Lumley, T. (2015). Package 'survival'. *R Top Doc* 128, 28-33.

Tyner, J.W., Tognon, C.E., Bottomly, D., Wilmot, B., Kurtz, S.E., Savage, S.L., Long, N., Schultz, A.R., Traer, E., Abel, M., *et al.* (2018). Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature* 562, 526-531.

Viale, A., De Franco, F., Orleth, A., Cambiaghi, V., Giuliani, V., Bossi, D., Ronchini, C., Ronzoni, S., Muradore, I., Monestiroli, S., *et al.* (2009). Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature* 457, 51-U52.

Vickers, M., Jackson, G., and Taylor, P. (2000). The incidence of acute promyelocytic leukemia appears constant over most of a human lifespan, implying only one rate limiting mutation. *Leukemia* 14, 722.

Vijil, C., Hermansson, C., Jeppsson, A., Bergström, G., and Hultén, L.M. (2014). Arachidonate 15-Lipoxygenase Enzyme Products Increase Platelet Aggregation and Thrombin Generation. *PLOS ONE* 9, e88546.

Visser, O., Trama, A., Maynadié, M., Stiller, C., Marcos-Gragera, R., De Angelis, R., Mallone, S., Tereanu, C., Allemani, C., Ricardi, U., *et al.* (2012). Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *European Journal of Cancer* 48, 3257-3266.

Wagner, G.P., Kin, K., and Lynch, V.J. (2012). Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory Biosci* 131, 281-285.

Wang, J., Weiss, I., Svoboda, K., and Kwaan, H.C. (2001). Thrombogenic role of cells undergoing apoptosis. *British journal of haematology* 115, 382-391.

Wang, Z.-Y., and Chen, Z. (2008). Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 111, 2505-2515.

Wartman, L.D., Larson, D.E., Xiang, Z., Ding, L., Chen, K., Lin, L., Cahan, P., Klco, J.M., Welch, J.S., Li, C., *et al.* (2011). Sequencing a mouse acute promyelocytic leukemia genome reveals genetic events relevant for disease progression. *Journal of Clinical Investigation* 121, 1445-1455.

Welch, John S., Ley, Timothy J., Link, Daniel C., Miller, Christopher A., Larson, David E., Koboldt, Daniel C., Wartman, Lukas D., Lamprecht, Tamara L., Liu, F., Xia, J., *et al.* (2012). The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cell* 150, 264-278.

Wells, R.A., Catzavelos, C., and KamelReid, S. (1997). Fusion of retinoic acid receptor alpha to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Nature Genetics* 17, 109-113.

Westervelt, P., Lane, A.A., Pollock, J.L., Oldfather, K., Holt, M.S., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., DiPersio, J.F., and Ley, T.J. (2003). High-penetrance mouse model of acute promyelocytic leukemia with very low levels of PML-RAR α expression. *Blood* 102, 1857-1865.

Wold, S., Esbensen, K., and Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2, 37-52.

Yamamoto, Y., Tsuzuki, S., Tsuzuki, M., Handa, K., Inaguma, Y., and Emi, N. (2010). BCOR as a novel fusion partner of retinoic acid receptor alpha in a t(X;17)(p11;q12) variant of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 116, 4274-4283.

Yan, J., Wang, K., Dong, L., Liu, H., Chen, W., Xi, W., Ding, Q., Kieffer, N., Caen, J.P., Chen, S., *et al.* (2010). PML/RARalpha fusion protein transactivates the tissue factor promoter through a GAGC-containing element without direct DNA association. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 3716-3721.

Yanada, M., Matsushita, T., Asou, N., Kishimoto, Y., Tsuzuki, M., Maeda, Y., Horikawa, K., Okada, M., Ohtake, S., Yagasaki, F., *et al.* (2007). Severe hemorrhagic complications during remission induction therapy for acute promyelocytic leukemia: incidence, risk factors, and influence on outcome. *European journal of haematology* 78, 213-219.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134-134.

Yoshida, H., Ichikawa, H., Tagata, Y., Katsumoto, T., Ohnishi, K., Akao, Y., Naoe, T., Pandolfi, P.P., and Kitabayashi, I. (2007). PML-retinoic acid receptor alpha inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBP epsilon expression in myeloid differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 27, 5819-5834.

Zelent, A., Guidez, F., Melnick, A., Waxman, S., and Licht, J.D. (2001). Translocations of the RAR alpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 20, 7186-7203.

Zhang, X.-W., Yan, X.-J., Zhou, Z.-R., Yang, F.-F., Wu, Z.-Y., Sun, H.-B., Liang, W.-X., Song, A.-X., Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., *et al.* (2010). Arsenic Trioxide Controls the Fate of the PML-RAR alpha Oncoprotein by Directly Binding PML. *Science* 328, 240-243.

Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., and Pandolfi, P.P. (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95, 2748-2753.

Zhu, J., Gianni, M., Kopf, E., Honore, N., Chelbi-Alix, M., Koken, M., Quignon, F., Rochette-Egly, C., and de The, H. (1999). Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and oncogenic RAR alpha fusion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14807-14812.

Zhu, J., Koken, M.H.M., Quignon, F., ChelbiAlix, M.K., Degos, L., Wang, Z.Y., Chen, Z., and deThe, H. (1997). Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: Implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3978-3983.

7 PUBLIKATIONEN UND ABSTRACTS: ALEXANDER STREUER

7.1 Publikationen

Jann, J.C., **Streuer, A.**, Hecht, A., Nolte, F., Nowak, V., Danner, J., Oblander, J., Palme, I., Lengfelder, E., Platzbecker, U., *et al.* (2020). RNA-sequencing of acute promyelocytic leukemia primary blasts reveals novel molecular biomarkers of early death events. *Leukemia & Lymphoma*, 12. (Impact factor: 2,969)

Flach, J., Jann, J.C., Knaflic, A., Riabov, V., **Streuer, A.**, Altrock, E., Xu, Q., Schmitt, N., Obländer, J., Nowak, V., *et al.* (2020). Replication stress signaling is a therapeutic target in myelodysplastic syndromes with splicing factor mutations. *Haematologica Online ahead of print.* (Impact factor: 7,116)

Riabov, V., Mossner, M., Stohr, A., Jann, J.C., **Streuer, A.**, Schmitt, N., Knaflic, A., Nowak, V., Weimer, N., Oblander, J., *et al.* High erythroferrone expression in CD71(+) erythroid progenitors predicts superior survival in myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*, 13. (Impact factor: 5,518)

Schmitt N., Jann J.-C., Altrock E., Flach J., Danner J., Uhlig S., **Streuer A.**, Knaflic A., Ryabov V., Xu Q., Mehralivand A., Palme I., Nowak V., Obländer J., Weimer N., Haselmann V., Jawhar A., Darwich A., Weis C.-A., Marx A., Metzgeroth G., Boch T., Nolte F., Hofmann W.-K., Nowak D. Pre-clinical evaluation of eltrombopag in a PDX model of Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia (in Review)* (Impact factor: 8,665)

7.2 Kongressvorträge

Streuer, A., Jann, J.C., Boch, T., Mossner, M., Nowak, V., Oblaender, J., Palme, I., Weimer, N., Metzgeroth, G., Hecht, A., *et al.* (2020). Comprehensive sequential whole exome analysis indicates partial clonal responsiveness to treatment of MDS patients with Asunercept. *Oncol Res Treat* 43, 168-169.

Streuer, A., Jann, J.C., Hecht, D.A., Nolte, F., Platzbecker, U., Nowak, V., Danner, J., Oblander, J., Palme, I., Drager, N., *et al.* (2019). Comprehensive RNA-sequencing analysis indicates a heterogeneous pathogenesis of early death events in acute promyelocytic leukemia. *Oncol Res Treat* 42, 7-7.

7.3 Abstracts

Abstract: Jann JC, Flach J, Knaflic A, Altrock E, Schmitt N, **Streuer A**, Danner J, Hofmann F, Nowak V, Draeger N. R-Loops-Induced Atr Signaling as a Potential Therapeutic Target in Myelodysplastic Syndrome. American Society of Hematology Washington, DC, 2019.

Abstract: Altrock E Sens-Albert C, Jann JC, Flach J, Ryabov V, Schmitt N, **Streuer A**, Xu Q, Nowak V, Danner J. Comparison of Four Different Humanized Hematopoietic Niche Xenotransplantation Methods to Engraft Myelodysplastic Syndromes (MDS). American Society of Hematology Washi ngton, DC, 2019.

Abstract: Schmitt N, Jann JC, Altrock E, Flach J, Sens-Albert C, Weis C.-A.2, Danner J, Uhlig S, **Streuer A**, Palme I, Nowak V, Obländer J, Draeger N, Metzgeroth G, Jawhar A, Marx A, Boch T, Nolte F, Hofmann WK, Nowak D Patient-individual substance testing of Eltrombopag in a preclinical xenograft model of Myelodysplastic Syndromes (MDS) DGHO, 2019

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Streuer, Alexander
Geburtsdatum: 22.09.1994
Geburtsort: Sawodoukowsk
Familienstand: ledig
Vater: Stefan Streuer
Mutter: Dr. med. Irina Streuer

SCHULISCHER WERDEGANG

2005 – 2013 Geschwister-Scholl-Gymnasium Lüdenscheid
19.06.2013 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2013/14 bis SS15	Studium Medizin, Vorklinik an der Universität Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
21.09.2015	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
WS15/16 – SS2020	Studium Medizin, Klinik an der Medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
11.10.2018	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
25.05.2020	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)
01.08.2020	Einstellung als Wissenschaftler im hämatologischen Forschungslabor Mannheim
01.10.2020	Einstellung als Arzt an der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikum Mannheim

9 DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Daniel Nowak und Prof. Dr. Wolf-Karsten Hofmann für die Bereitstellung eines außerordentlich interessanten und anspruchsvollen Themas für meine Dissertation, sowie für die vielseitige Unterstützung während der Promotion und die Möglichkeit neue innovative Methoden zu erlernen bedanken.

Für die exzellente Betreuung dieser Doktorarbeit, unzähligen Anregungen und über vier Jahre erfolgreicher und schöner Zusammenarbeit möchte ich meinem Betreuer und Mentor Herrn Dr. Johann-Christoph Jann danken.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des hämatologischen Forschungslabors, insbesondere Frau Verena Nowak, Frau Julia Obländer, Frau Nina Dräger für die freundliche Aufnahme, Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Arbeit danken.

Für die gute Zusammenarbeit und dem Spaß im Labor und während der täglichen Arbeit möchte ich Frau Nanni Schmitt, Herrn Arwin Mehralivand und Dr. Vladimir Riabov, Dr. Eva Altrock, Dr. Johanna Flach und Frau Qingyu Xu danken.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Johann-Christoph Jann und Herrn Prof. Dr. Daniel Nowak für die kritische Durchsicht der Arbeit und die wertvollen Anregungen. So möchte ich auch meiner Freundin, Frau Christin Juliana Müller und ihrer Mutter Erika Müller für das Korrekturlesen meinen herzlichen Dank aussprechen!

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an Frau Christin Juliana Müller, und ihren Eltern, Frau Erika Müller und Herrn Ulrich Johannes Müller, für die unendlichen aufbauenden Gespräche und für die stets offene Tür, auch während einer globalen Pandemie, richten.

Diese Arbeit ist meinen Eltern, Frau Dr. Irina Streuer und Herrn Stefan Streuer, gewidmet für die liebevolle Fürsorge über alle die Jahre des Studiums und die volle Unterstützung während der Promotion.