

Einfluss von *ASXL1*-Mutationen auf das
Therapieansprechen bei Patienten mit
chronischer myeloischer Leukämie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-
Universität Jena

von Lioba Schönfeld
geboren am 14.01.1994

Gutachter

1. apl. Prof. Dr. Thomas Ernst, Jena

2. Prof. Dr. Aria Baniahmad, Jena

3. Prof. Dr. Klaus Metzeler, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.07.2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Zusammenfassung	6
1 Einleitung	8
1.1 Medikamentöse Therapie und Ursachen für Therapieversagen.....	8
1.2 Risikostratifizierung bei Erstdiagnose.....	9
1.3 Molekulares Ansprechen und dessen Monitoring	9
1.4 Zusatzmutationen bei der CML	9
1.4.1 Klonale Hämatopoese bei hämatologisch Gesunden und CML-Patienten	10
1.4.2 Dynamik von Zusatzmutationen	10
1.4.3 ASXL1-Mutationen	12
1.5 <i>Next-Generation Sequencing</i>	13
1.6 TIGER-Studie	14
2 Ziele der Arbeit.....	15
3 Publierte Originalarbeit.....	16
<i>Schönfeld L, Rinke J, Hinze A, Nagel SN, Schäfer V, Schenk T, Fabisch C, Brümmendorf TH, Burchert A, le Coutre P, Krause SW, Saussele S, Safizadeh F, Pfirrmann M, Hochhaus A, Ernst T. 2022. ASXL1 mutations predict inferior molecular response to nilotinib treatment in chronic myeloid leukemia. Leukemia, 36 (9):2242-2249.</i>	
4 Diskussion der Ergebnisse.....	25
5 Schlussfolgerungen.....	32
Literatur- und Quellenverzeichnis	33
Anhang	42

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

<i>ABL1</i>	<i>ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>
AKT	Proteinkinase B
<i>ASXL1</i>	<i>Additional Sex Combs Like 1</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
BAP1	BRCA1 associated protein 1
<i>BCR</i>	<i>Breakpoint cluster region</i>
<i>BCR::ABL1</i>	Fusionsgen aus <i>BCR</i> und <i>ABL1</i>
BRD4	Bromodomain-containing protein 4
CHIP	Clonal hematopoiesis of indeterminate potential
CML	Chronische myeloische Leukämie
<i>DNMT3A</i>	<i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>
DUB	Deubiquitinase
ELTS	EUTOS long-term survival score
EMA	European Medicines Agency
EUTOS	European Treatment and Outcome Study
FDA	US Food and Drug Administration
<i>GUS</i>	<i>Glucuronidase beta</i>
KD	Kinasedomäne
MDS	Myelodysplastische Neoplasien
MMR	Major molecular response
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MRD	Minimal residual disease
mTOR	Mammalian target of rapamycin

Abkürzungsverzeichnis

NGS	Next-generation sequencing
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Ph	Philadelphia Chromosom
PRC	Polycomb Repressive Complex
<i>TET2</i>	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TIGER Studie	TKI and Interferon alpha evaluation initiated by the German CML Study Group
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
VAF	Variant allele frequency
WHO	World Health Organization

Zusammenfassung

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist charakterisiert durch das Vorhandensein des *BCR::ABL1* Fusionsgens, welches für eine ständig aktive Tyrosinkinase kodiert. Die Einführung des selektiven Tyrosinkinase-Inhibitors (TKI) Imatinib hat die Behandlung der CML revolutioniert und sie zu einer Modellerkrankung für andere neoplastische Erkrankungen werden lassen. Neben Mutationen des *BCR::ABL1* Fusionsgens konnten in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Mutationen anderer Gene wie *Additional Sex Combs Like 1 (ASXL1)*, *DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3A)*, und *tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2)* nachgewiesen werden, die zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus rücken.

Um die Prävalenz, Dynamik und klinische Relevanz dieser Zusatzmutationen systematisch zu untersuchen, wurden im Rahmen der Promotionsarbeit Blutproben von 222 CML-Patienten mittels *Next-Generation Sequencing* (NGS) auf Mutationen in 54 Leukämie-assoziierten Genen untersucht. Die Patienten wurden im Rahmen der multizentrischen klinischen Phase-III-Studie „TKI and Interferon alpha evaluation initiated by the **German** CML Study Group“ (TIGER-Studie; CML-V; NCT01657604) behandelt. Zum Diagnosezeitpunkt konnte bei 53/222 (24%) der Patienten mindestens eine Mutation festgestellt werden. Dabei war *ASXL1* mit $n = 20$ Patienten das am häufigsten betroffene Gen. Eine Minderheit der Patienten ($n = 6$) wies zwei oder mehr Mutationen auf.

Um Mutationsdynamiken unter TKI-Therapie zu untersuchen, wurden von 100 Patienten zusätzlich zum Diagnosezeitpunkt Verlaufspuren zu den Monaten 12, 24 und 36 nach Therapiestart analysiert. Die Auswahl der Patienten erfolgte prospektiv. Die Mutationskinetiken ließen sich drei Mustern zuordnen: Eradikation ($n = 19$ Patienten), Neuauftreten ($n = 13$ Patienten) und Persistenz ($n = 5$ Patienten).

Patienten mit einer *ASXL1*-Mutation zur Erstdiagnose zeigten ein signifikant unterlegenes Therapieansprechen mit seltenerem Erreichen einer tiefen molekularen Remission (MMR) zu Monat 12 ($p = 0,0036$), 18 ($p = 0,0018$) und 24 ($p = 0,0076$) im Vergleich zu allen anderen Patienten. Die betroffenen Patienten waren signifikant jünger als Patienten mit anderen Mutationen ($p = 0,0380$). Außerdem waren sie häufiger der Hoch-Risiko-Gruppe zugeordnet als Patienten mit anderen Mutationen ($p = 0,0005$) oder keinen Mutationen ($p = 0,0012$). Angesichts dieser Erkenntnisse ist

Zusammenfassung

anzunehmen, dass *ASXL1*-Mutationen eine wichtige Rolle in der Pathogenese und klonalen Evolution der CML spielen. Nach weiterer Erforschung des dahinterstehenden molekularen Mechanismus sind zukünftig Kombinations- oder Folgetherapien denkbar, um das Therapieansprechen von Patienten mit *ASXL1*-Mutation zu verbessern. Darüber hinaus könnte der *ASXL1*-Mutationsstatus nach weiterer Evaluation zukünftig zur Risikostratifizierung von CML-Patienten dienen.

1 Einleitung

Die chronische myeloische Leukämie (CML) basiert auf einer neoplastischen Transformation einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Kennzeichnend ist das Vorhandensein der chromosomalen Translokation $t(9;22)(q34;q11)$. Das daraus resultierende veränderte Chromosom 22 wurde als „Philadelphia Chromosom“ (Ph) bekannt. Die genomische Umlagerung resultiert in dem *BCR::ABL1*-Fusionsgen, welches für die gleichnamige konstitutiv aktive Tyrosinkinase kodiert (Hehlmann et al. 2007). Die *BCR::ABL1*-Kinase fungiert als Onkogen und wird als essenziell für Entstehung, Aufrechterhaltung und Voranschreiten der CML angesehen (Ren 2005). Die CML wird meist in der chronischen Phase diagnostiziert und schreitet ohne Therapie oder bei Therapieresistenz über eine akzelerierte Phase in eine Blastenphase fort (Melo und Barnes 2007). In der neuesten World Health Organization (WHO) Definition der CML wird die akzelerierte Phase zu Gunsten von Hochrisikomerkmale (s.u.) abgelöst und ein biphasischer Verlauf der Erkrankung propagiert (Khoury et al. 2022).

1.1 Medikamentöse Therapie und Ursachen für Therapieversagen

Die Markteinführung des TKI Imatinib, welcher selektiv die *BCR::ABL1*-Kinase hemmt, hat die Therapie der CML revolutioniert. Im langfristigen Verlauf konnte eine gute Wirksamkeit bei akzeptablem Nebenwirkungsprofil festgestellt werden (Hochhaus et al. 2017), sodass sich die Lebenserwartung von Patienten mit CML annähernd normalisiert. Die Ansprechraten wurden durch den Einsatz von TKI der zweiten Generation (z.B. Bosutinib, Dasatinib, Nilotinib) weiter verbessert. Mittlerweile existieren vier Zulassungen der US Food and Drug Administration (FDA) und European Medicines Agency (EMA) für eine TKI-Erstlinientherapie der CML (Bosutinib, Dasatinib, Imatinib, Nilotinib). Bei der Auswahl des Präparates stehen die individuellen Nebenwirkungsprofile mit Blick auf die Komorbiditäten des Patienten im Mittelpunkt. Des Weiteren wird auch das Absetzen der TKI-Therapie zu einem realistischen Ziel für viele Patienten. Mit der Einführung der TKI-basierten Therapie rückte das vormalige Mittel der Wahl Interferon α zunehmend in den Hintergrund. Gegenwärtig wird Interferon α in pegylierter Form im Rahmen von Studien in Kombination mit TKI eingesetzt (Hochhaus et al. 2020).

Einleitung

Einige wenige Patienten weisen unter Therapie mit TKIs ein Therapieversagen auf. Bekannte Gründe dafür sind neben Medikamentenincompliance, Mutationen der BCR::ABL1-Kinasedomäne (KD) oder zytogenetische Aberrationen (additional chromosomal abnormalities, ACA). Jedoch findet sich nicht bei jedem der betroffenen Patienten eine Ursache für die Therapieresistenz (Hochhaus et al. 2020).

1.2 Risikostratifizierung bei Erstdiagnose

Mit dem Sokal, Euro (auch Hasford), European Treatment and Outcome Study (EUTOS) Score, und EUTOS long-term survival score (ELTS) wurden über vier Dekaden vier verschiedene Scores zur Risikostratifizierung eines CML-Patienten bei Erstdiagnose etabliert. Der Berechnung dieser vier Scores liegen hämatologische bzw. klinische Daten zu Grunde (Sokal et al. 1984, Hasford et al. 1998, Hasford et al. 2011, Pffirmann et al. 2016). Molekulare Daten gehen aktuell in keinen der klinischen Risikoscores ein. Angesichts dessen, dass ein Absetzen der TKI-Therapie ein realistisches Ziel für viele Patienten wird (Hochhaus et al. 2020), gewinnt eine sorgfältige Risikostratifizierung weiter an Bedeutung.

1.3 Molekulares Ansprechen und dessen Monitoring

Der Erfolg der Therapie wird mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) über die Bestimmung des Quotienten von *BCR::ABL1* mRNA zu einem Vergleichstranskript (*ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase (ABL1)* oder *Glucuronidase beta (GUS)*) ermittelt und auf einer logarithmischen Skala aufgetragen. Um methodisch bedingte Abweichungen des Ergebnisses in den Referenzlaboren auszugleichen, wurde die International Scale (IS) eingeführt (Cross et al. 2015) und in Folgejahren standardisiert. Ein *BCR::ABL1*-Quotient von $\leq 0,1\%$ wurde als major molecular response (MMR) bzw. MR³ definiert. Ein Anteil von $\leq 0,01\%$ wurde als MR⁴, $\leq 0,0032\%$ als MR^{4,5}, und $\leq 0,001\%$ als MR⁵ definiert (Cross et al. 2012). Das molekulare Ansprechen soll laut aktueller Therapieempfehlung mindestens alle drei Monate bestimmt werden.

1.4 Zusatzmutationen bei der CML

Neben der Weiterentwicklung der TKIs und des Therapiemonitorings traten in den letzten Jahren vor allem Zusatzmutationen in den Fokus der Wissenschaft. Hier wurde

Einleitung

insbesondere ein Augenmerk auf Gene gelegt, welche mit anderen hämatologischen Erkrankungen assoziiert sind (Branford et al. 2019).

1.4.1 Klonale Hämatopoese bei hämatologisch Gesunden und CML-Patienten

Groß angelegte Bevölkerungsstudien wiesen nach, dass auch bei hämatologisch gesund geltenden Menschen Genmutationen existieren. Am häufigsten betroffen waren die Gene *ASXL1*, *DNMT3A*, und *TET2*. Diese Mutationen können zu einer klonalen Expansion führen, auch klonale Hämatopoese genannt. Eindrücklich war dabei insbesondere die starke Altersassoziation der klonalen Hämatopoese. Die Mutationsrate nahm mit steigendem Alter zu und lag in gehobenem Alter deutlich oberhalb der Prävalenz von hämatologischen Erkrankungen (Genovese et al. 2014, Jaiswal et al. 2014). So konnte bei 10% der Menschen über 65 Jahren und bei Menschen unter 50 Jahren nur bei 1% eine Mutation gefunden werden (Genovese et al. 2014). Diese Mutationsträger blieben in der Mehrzahl hämatologisch gesund, hatten jedoch ein leicht erhöhtes Risiko, eine hämatologische Erkrankung zu entwickeln (Genovese et al. 2014, Jaiswal et al. 2014). Nachfolgend entstand der Terminus „clonal hematopoiesis of indeterminate potential“ (CHIP), um zum Ausdruck zu bringen, dass in einem Teil der Patienten diese Mutation mit nachfolgender klonaler Hämatopoese als Vorläufer für eine hämatologische Erkrankung fungiert, dies jedoch nicht zwingend der Fall ist (Steensma et al. 2015).

Wie oben erläutert, wurde eine starke Altersassoziation beim Auftreten von CHIP-Mutationen beschrieben. Aus einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe ist jedoch bekannt, dass bei Patienten mit neu diagnostizierter CML solche Zusatzmutationen mit etwa einem Drittel der Fälle deutlich häufiger vorhanden sind als bei dem zu Grunde liegenden Altersmedian von 58 Jahren zu erwarten wäre (Schmidt et al. 2014). Des Weiteren konnte unsere Arbeitsgruppe bei der seltenen Entität der pädiatrischen CML ebenfalls häufig *ASXL1*-Mutationen nachweisen (Ernst et al. 2018). Dies legt den Schluss nahe, dass das Auftreten von *ASXL1*-Mutationen bei der CML eher ein krankheits- als altersassoziiertes Ereignis ist.

1.4.2 Dynamik von Zusatzmutationen

Die Dynamik solcher Zusatzmutationen unter TKI-Therapie wurde bislang in zwei retrospektiven Studien erforscht. Beide Studien legten nahe, dass die Mutationen

Einleitung

unterschiedlichen Dynamiken folgen (Kim et al. 2017, Branford et al. 2018). Im Wesentlichen handelt es sich dabei um drei Muster: Eradikation, Neuauftreten und Persistenz.

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) ist eine Mutationseradikation mit einem guten Therapieansprechen assoziiert (Jongen-Lavrencic et al. 2018). Daher nimmt die Bestimmung der minimal residual disease (MRD) im Therapiemonitoring der AML gemäß den aktuellen Therapieempfehlungen einen hohen Stellenwert ein. Dazu gehört die Bestimmung der Mutationslast von somatischen Mutationen, die zum Erstdiagnosezeitpunkt gefunden wurden (Döhner et al. 2022). Es ist jedoch notwendig, zwischen Mutationen mit direktem Krankheitsbezug und solchen, welche ohne Einfluss auf das Therapieansprechen im Sinne einer klonalen Hämatopoese persistieren, zu differenzieren (Jongen-Lavrencic et al. 2018). Bei der CML gibt es bislang keinen Hinweis auf ein überlegenes Therapieansprechen bei Patienten mit Mutationseradikation (Kim et al. 2017).

Es ist bekannt, dass bei Therapieversagen, insbesondere auch in der akzelerierten Phase und Blastenphase vermehrt Zusatzmutationen nachzuweisen sind (Grossmann et al. 2011, Kim et al. 2017, Branford et al. 2018). Häufig handelte es sich um *ABL1*-KD Mutationen (Kim et al. 2017, Branford et al. 2018) und somit einem bekannten TKI-Resistenzmechanismus (Soverini et al. 2005, Soverini et al. 2011). Branford et al. wiesen dabei eine sehr hohe Ko-Existenz von anderen somatischen Mutationen bei Patienten mit *ABL1*-KD Mutation und Therapieversagen nach, wobei diese anderen Mutationen der *ABL1*-KD in der Mehrzahl der Fälle vorausgingen (Branford et al. 2018). In der retrospektiven Untersuchung von Kim et al. war das Neuauftreten von einer Mutation unter TKI-Therapie mit einem unterlegenen Therapieansprechen assoziiert (Kim et al. 2017).

Persistierende Mutationen unterstützen die Theorie der klonalen Evolution, welche bereits in den Anfängen der CML-Forschung aufgestellt wurde. So zeigte eine Isoenzymanalyse in Ph-negativen Zellen eine Verschiebung hin zum Ph-positiven Klon, was einen Hinweis lieferte, dass zumindest bei einem Teil der Patienten die Entstehung des Philadelphia-Chromosoms nicht das Erstereignis der CML-Pathogenese darstellt, sondern vielmehr ein mehrstufiger Mechanismus zu Grunde liegt (Fialkow et al. 1981, Raskind et al. 1993). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von

Einleitung

Prof. Ernst konnte 2014 diese Theorie mit molekularen Erkenntnissen untermauert werden. So fand sich in einem Patienten eine *DNMT3A*-Mutation zum Diagnosezeitpunkt, welche in einer Verlaufsprobe unter TKI-Therapie in Ph-negativen Zellen mit niedrigerer Mutationslast weiterhin nachgewiesen werden konnte. Dies legte den Schluss nahe, dass die *DNMT3A*-Mutation bereits existierte, bevor *BCR::ABL1* entstand (Schmidt et al. 2014). Auch in der Studie von Kim et al. ergab sich weitere Evidenz für diese These. Hier wurden zusätzlich T-Zellen sequenziert. Die jeweilige Mutation konnte jedoch nur in einem Teil der Zellen als direkte Evidenz für einen präleukämischen Klon gefunden werden. Es ist davon auszugehen, dass die Mutationen in den anderen Fällen nach Differenzierung der Stammzelle in Richtung der myeloischen Reihe aufgetreten sind (Kim et al. 2017).

1.4.3 *ASXL1*-Mutationen

Das humane *ASXL1*-Gen ist auf dem Chromosom 20q11 lokalisiert und kodiert für ein gleichnamiges Protein, welches aus 1541 Aminosäuren besteht. *ASXL1* ist über eine Vielzahl an Interaktionspartnern an epigenetischer, transkriptionaler und translationaler Regulation beteiligt (Asada et al. 2019). Bei der CML konnten in bisherigen Studien zwar häufig *ASXL1*-Mutationen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gefunden werden, der klinische Einfluss blieb jedoch unklar (Branford et al. 2019). Auch bei anderen myeloischen Erkrankungen wie der akuten myeloischen Leukämie (AML), den myelodysplastischen Neoplasien (MDS) und der chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML) gehört *ASXL1* zu den am häufigsten mutierten Genen. *ASXL1*-Mutationen sind hier mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Die meisten Mutationen wurden im letzten Exon (Exon 12) gefunden, wobei es sich größtenteils um *frameshift* oder *nonsense* Mutationen handelt (Gelsi-Boyer et al. 2012). In Mausexperimenten führte eine solche Exon 12 Mutation mit nachfolgend verkürztem Protein zu einem Funktionszugewinn. Die Verkürzung des Proteins hatte ein offeneres Chromatin zur Folge. Des Weiteren lag eine Dysregulation der Expression von Genen vor, welche entscheidend für die Erneuerung und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen sind (Yang et al. 2018). *ASXL1* ist physiologisch ein wichtiger Bestandteil des BRCA1 associated protein 1 (BAP1) Deubiquitinase (DUB) Komplex, der die Entfernung von Ubiquitierungsgruppen von Lysin 119 auf Histon H2A (H2AK119Ub) vermittelt. H2AK119Ub wird vom Polycomb

Einleitung

Repressive Complex (PRC) 1 katalysiert, was die dreifache Methylierung von Lysin 27 auf Histon 3 (H3K27me3) durch PRC2 verstärkt, eine charakteristische Markierung reprimierter Genexpression. Die mutationsbedingte Verkürzung von ASXL1 steigert die Stabilität von BAP1 und erhöht die Chromatinbindung des Komplexes. Diese gain-of-function Aktivität verursacht eine globale Reduktion von H2AK119Ub und H3K27me3, was zur aberranten Aktivierung leukämischer Genexpression führt (Balasubramani et al. 2015, Asada et al. 2018, Guo et al. 2018, Wang et al. 2021). Darüber hinaus ist ASXL1 über eine Vielzahl von Interaktionspartnern an epigenetischer, transkriptioneller und translationaler Regulation beteiligt, die Gegenstand derzeitiger Forschung sind (Medina et al. 2022). Zum besseren Verständnis der Rolle, die ASXL1 physiologisch in der Stammzellentwicklung innehat, sowie des Einflusses des verkürzten Proteins, sind weitere Studien notwendig.

1.5 *Next-Generation Sequencing*

Zur Detektion der Zusatzmutationen wurde sich für *Next-Generation Sequencing* (NGS) entschieden. Das verwendete TruSight Myeloid Panel enthielt 54 Leukämie-assoziierte Gene. Die Sequenzierdaten wurden mit der VariantStudio Software (Version 2.0; Illumina, San Diego, CA, USA) ausgewertet. Der Software eigene PASS Filter wurde genutzt und die Sensitivität auf 5% *variant allele frequency* (VAF) festgelegt. Varianten mit einer niedrigeren Allelfrequenz wurden nur berücksichtigt, wenn die gleiche Veränderung in mindestens einer weiteren Probe des betroffenen Patienten oberhalb des Sensitivitätslevels detektiert werden konnte. Synonym kodierende und intronische Mutationen wurden von der Analyse ausgeschlossen und separat aufgeführt. Ebenso wurde mit Varianten mit einer Populationsfrequenz $\geq 1\%$ verfahren. Bei der Bewertung der Mutationen wurde entsprechend der Empfehlungen von Branford et al. (Branford et al. 2019) gefiltert: Zunächst wurden Varianten mit einem Combined Annotation Dependent Depletion (CADD; version 1.3) (Rentzsch et al. 2019) Wert < 20 ausgeschlossen. Des Weiteren wurden Varianten exkludiert, welche nicht von mindestens drei der vier verwendeten Prädiktionstools als schädlich eingestuft wurden.

1.6 TIGER-Studie

Bei dem im Folgenden untersuchten Patientenkollektiv handelt es sich um eine zufällig ausgewählte Kohorte der TIGER-Studie (CML-V; NCT01657604). Im Rahmen dieser multizentrischen Phase-III-Studie wurde das molekulare Ansprechen unter einer Nilotinib-Monotherapie mit der Kombinationstherapie aus Nilotinib und pegyliertem Interferon α verglichen. Das Studiendesign sah nach Randomisierung zunächst eine Induktionsphase vor, in der die Patienten je nach Therapiearm für mindestens 24 Monate eine Mono- bzw. Kombinationstherapie erhielten. Patienten mit Nachweis von mindestens einer MMR nach Ablauf der zwei Jahre qualifizierten sich für die Erhaltungsphase. In dieser erhielten alle Patienten eine Monotherapie, je nach Therapiearm in Form von TKI bzw. Interferon α . War nach weiteren 12 Monaten mindestens eine MR⁴ nachweisbar, konnte die Medikation in beiden Therapiearmen abgesetzt werden (Hochhaus et al. 2019). Es handelt sich somit um eine Patientenkohorte, welche nicht nur zum Erstdiagnosezeitpunkt, sondern auch während des gesamten Therapieverlaufes klinisch und molekular intensiv beobachtet wurde. Darüber hinaus ermöglichte das prospektive Studiendesign der TIGER-Studie auch in der hier vorliegenden Promotionsarbeit einen prospektiven Ansatz.

2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollten CML-Patientenproben hinsichtlich Zusatzmutationen neben *BCR::ABL1* mit Blick auf Prävalenz, Dynamik und prognostischer Relevanz systematisch untersucht werden. Die untersuchte Patientenkohorte bestand aus insgesamt 222 CML-Patienten, die im Rahmen der TIGER-Studie (CML-V; NCT01657604) behandelt wurden. Die Blutproben der Patienten wurden mittels *Next-Generation Sequencing* (NGS) untersucht, wobei das verwendete Panel insgesamt 54 Leukämie-assoziierte Gene abdeckte. Von 100 der Patienten wurden zudem Verlaufspuren zu Monat 12, 24 und 36 nach Erstdiagnose zur Untersuchung der Mutationsdynamiken analysiert.

Hypothesen der Arbeit:

- (1) Mutationen außerhalb von *BCR::ABL1* können häufig zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei CML-Patienten nachgewiesen werden.
- (2) Zusatzmutationen weisen im Therapieverlauf unterschiedliche Dynamiken auf.
- (2) Zusatzmutationen haben einen Einfluss auf das molekulare Ansprechen betroffener Patienten.

3 Publizierte Originalarbeit

Schönfeld L, Rinke J, Hinze A, Nagel SN, Schäfer V, Schenk T, Fabisch C, Brümmendorf TH, Burchert A, le Coutre P, Krause SW, Saussele S, Safizadeh F, Pfirrmann M, Hochhaus A, Ernst T. 2022. ASXL1 mutations predict inferior molecular response to nilotinib treatment in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **36** (9):2242-2249.

ARTICLE OPEN



ASXL1 mutations predict inferior molecular response to nilotinib treatment in chronic myeloid leukemia

Lioba Schönfeld^{1,8}, Jenny Rinke^{1,8}, Anna Hinze¹, Saskia N. Nagel¹, Vivien Schäfer¹, Thomas Schenk¹, Christian Fabisch¹, Tim H. Brümmendorf², Andreas Burchert³, Philipp le Coutre⁴, Stefan W. Krause⁵, Susanne Saussele⁶, Fatemeh Safizadeh⁷, Markus Pfirrmann⁷, Andreas Hochhaus¹ and Thomas Ernst¹✉

© The Author(s) 2022

Gene mutations independent of *BCR::ABL1* have been identified in newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia (CML) in chronic phase, whereby mutations in epigenetic modifier genes were most common. These findings prompted the systematic analysis of prevalence, dynamics, and prognostic significance of such mutations, in a clinically well-characterized patient population of 222 CML patients from the TIGER study (CML-V) by targeted next-generation sequencing covering 54 myeloid leukemia-associated genes. In total, 53/222 CML patients (24%) carried 60 mutations at diagnosis with *ASXL1* being most commonly affected ($n = 20$). To study mutation dynamics, longitudinal deep sequencing analysis of serial samples was performed in 100 patients after 12, 24, and 36 months of therapy. Typical patterns of clonal evolution included eradication, persistence, and emergence of mutated clones. Patients carrying an *ASXL1* mutation at diagnosis showed a less favorable molecular response to nilotinib treatment, as a major molecular response (MMR) was achieved less frequently at month 12, 18, and 24 compared to all other patients. Patients with *ASXL1* mutations were also younger and more frequently found in the high risk category, suggesting a central role of clonal evolution associated with *ASXL1* mutations in CML pathogenesis.

Leukemia; <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01648-4>

INTRODUCTION

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by the *BCR::ABL1* gene fusion, which codes for a constitutively active tyrosine kinase [1]. Inhibition of this aberrant kinase via imatinib – a selective tyrosine kinase inhibitor (TKI), revolutionized the treatment of CML [2]. Second-generation TKIs such as nilotinib improved treatment further, resulting in earlier and higher response rates while offering lower risk of disease progression [3]. Whilst some patients show resistance to TKI treatment and are at high risk of progression, for a large number of patients living without treatment has become a realistic aim if durable deep molecular remission under TKI treatment has been achieved [4, 5]. According to previous studies, myeloid-leukemia associated mutations occur in addition to *BCR::ABL1* in approximately 30% of newly diagnosed CML patients [6–8]. Mutations were most commonly identified in epigenetic modifier genes such as *ASXL1*, *DNMT3A*, and *TET2*. Two retrospective studies suggested an inferior response to TKI of CML patients harboring mutations of epigenetic regulator genes [7, 9]. Large population studies revealed an increased prevalence of such variants also in elderly people lacking hematological disorders [10–12], suggesting a rate of 10% in people older than 65 years but only 1% in people younger than 50 years of age [11]. However, our recent findings of *ASXL1* mutations in children and young

adults with CML indicate that the existence of such mutations can be disease- rather than age-related in CML patients [13].

To advance our understanding of the role of mutations in addition to *BCR::ABL1*, the study presented here aimed to evaluate their prevalence and dynamics in a large, well-characterized patient population in an ongoing prospective clinical trial. Furthermore, the clinical impact of such mutations was investigated to understand their effect on molecular response during TKI treatment.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The patient cohort consisted of 222 randomly selected chronic phase CML patients treated within the prospective German TIGER study (CML-V; NCT01657604). All patients received nilotinib based TKI therapy. Patients' characteristics are provided in Table 1 and Supplementary Table 1. Median age was 52 years (range, 18–79 years), 140 (63%) were male. 116 patients (52.3%) received nilotinib monotherapy and 106 patients (47.7%) a combination with nilotinib and pegylated interferon alpha 2b (pegIFN) according to the study protocol. All procedures were in accordance with the standards of the ethics committee and the Declaration of Helsinki. Informed consent for participation in the trial and molecular analysis was obtained from all patients.

¹Abteilung Hämatologie und Internistische Onkologie, Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Jena, Jena, Germany. ²Department of Hematology, Oncology, Hemostaseology and Stem Cell Transplantation, Medical Faculty, RWTH Aachen University, Aachen, Germany. ³Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie, Universitätsklinikum Marburg, Marburg, Germany. ⁴Medizinische Klinik, Hämatologie und Onkologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ⁵Medizinische Klinik 5 (Hämatologie und Internistische Onkologie), Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen, Germany. ⁶III. Medizinische Klinik, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg, Mannheim, Germany. ⁷Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie – IBE, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany. ⁸These authors contributed equally: Lioba Schönfeld, Jenny Rinke. [✉]email: thomas.ernst@med.uni-jena.de

Received: 26 February 2022 Revised: 21 June 2022 Accepted: 1 July 2022

Published online: 28 July 2022

Table 1. Patients' characteristics.

	Total	No mutations	All mutations		
			ASXL1 mutations	Other mutations	
Age at diagnosis (years)					
Median (range)	52 (18–79)	52 (18–79)	54 (19–78)	47 (24–68)	56 (19–78)
Sex (n, %)					
Male	140 (63%)	108 (64%)	32 (60%)	15 (75%)	17 (52%)
Female	82 (37%)	61 (36%)	21 (40%)	5 (25%)	16 (48%)
EUTOS score (n, %)					
Low risk	203 (91%)	157 (93%)	46 (87%)	13 (65%)	33 (100%)
High risk	19 (9%)	12 (7%)	7 (13%)	7 (35%)	0 (0%)
<i>BCR::ABL1</i> transcript type (n, %)					
b2a2	86 (39%)	69 (41%)	17 (32%)	5 (25%)	12 (36%)
b3a2	100 (45%)	72 (43%)	28 (53%)	11 (55%)	17 (52%)
b2a2 + b3a2	36 (16%)	28 (17%)	8 (15%)	4 (20%)	4 (12%)
Total	222	169	53	20	33

EUTOS European Treatment and Outcome Study.

Sample preparation

Peripheral blood samples of all patients were collected at diagnosis and every three months on treatment. Genomic DNA (gDNA) was isolated from peripheral blood leukocytes after red cell lysis using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Additionally, buccal swab samples were used where available for the isolation of constitutional DNA to verify the somatic origin of mutations. The RNeasy Mini Kit (Qiagen) or TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used according to the manufacturer's recommendations to extract total leukocyte RNA after red cell lysis from at least 20 ml of peripheral blood. As previously published, complementary DNA synthesis was performed using random hexamer primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) [14] or SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to manufacturer's instructions.

Real-time quantitative PCR and Sanger sequencing

For this study, patients' molecular response to therapy was measured after 12, 18, 24, and 36 months of therapy, unless the patient had died or dropped out. In total 657 samples were analyzed. LightCycler technology (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) or the Quantstudio5 (Thermo Fisher) system was employed for *BCR::ABL1* transcript quantification as described previously [15, 16]. Molecular response was assessed by RT-qPCR determining the ratio of *BCR::ABL1* to *ABL1* transcripts and reported on the International Scale (IS) [17]. Treatment response was reported as log level reduction of *BCR::ABL1*^{IS} according to the European LeukemiaNet (ELN) recommendations: major molecular response (MMR) $\leq 0.1\%$, MR⁴ $\leq 0.01\%$, MR^{4.5} $\leq 0.0032\%$, MR⁵ $\leq 0.001\%$ [18, 19]. Patients with failure criteria according to ELN 2013 recommendations [18] were analyzed by Sanger sequencing for the presence of *BCR::ABL1* kinase domain mutations.

Next-generation sequencing

Next-generation sequencing (NGS) of 54 genes frequently mutated in various entities of myeloid malignancies was performed using the TruSight Myeloid Panel on the Mini Seq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) with 8 samples per run. In total, 522 samples were analyzed; 222 samples at diagnosis with follow-up analyses for 100 patients after 12, 24, and 36 months of therapy. Mean amplicon coverage ranged from 1762–21,465 reads/amplicon. The collected data was analyzed using the VariantStudio Software (version 2.0; Illumina, San Diego, CA, USA) with the hg19 genome build and a sensitivity level of 5% variant allele frequency (VAF). Variants detected at low VAF (<5%) were only included if the same variant was found with a frequency above 5% in at least one sample of the respective patient. As recommended by the developers, the software's own PASS filter was used. Synonymous coding mutations and intronic polymorphisms were excluded. Variants with an allele frequency of $\geq 1\%$ in the general population were also excluded. In accordance to recent

recommendations of Branford et al. [8] the Combined Annotation Dependent Depletion (CADD; version1.3) [20] was used with a threshold of ≥ 20 to filter missense variants; additionally, only those variants predicted to be damaging by at least 3 of 4 prediction tools were included. We used the open access tools Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2) [21] and dbNSFP version 4.0a [22] for SIFT [23], MutationTaster [24] and FATHMM [25]. Missense variants considered to be germline by buccal-swap analysis ($n = 5$) or due to a VAF of 50% or consistent VAF of 50 or 100% over time ($n = 6$) which otherwise met the published criteria of clinically relevant mutations [8] were regarded separately. For the predictive analysis, the *ASXL1* c.1934dupG mutation was excluded based on frequent sequencing artifacts in this homopolymer area.

Statistics

For statistical analysis, all timepoints were calculated from the day of randomization or from the day of the first visit when trial participation was confirmed. To be allocated to a certain time, a molecular analysis was performed within the ± 3 -months interval around that time. Any event worse than "no MMR", that is disease progression or death from any cause within an interval, was rated as "no MMR" for this and any following interval. The probability of MMR was given as the proportion of patients with at least MMR or "no MMR" at 12, 18, and 24 months, according to their mutation status. The association between two categorical variables was assessed with Fisher's exact test. Group comparisons with regard to continuous variables were performed with the Mann-Whitney U-Test. To investigate the influence of mutations on molecular status at 12, 18, and 24 months under consideration of other baseline variables, multiple logistic regression was used. All statistical tests were explorative. The level of significance was 0.05. Point estimations are given together with their 95% confidence interval (95%-CI). SAS version 9.4 was used for analysis.

RESULTS

Molecular response

BCR::ABL1^{IS} was assessed at months 12, 18, and 24 for all 222 patients of this sub-cohort of the TIGER study. After one year of TKI treatment, 181 patients (82% of 222, 95%-CI: 76–86%) had achieved at least MMR, whilst 49% of patients showed a molecular response of MR⁴ or better (95%-CI: 43–56%), 29% had at least MR^{4.5} (95%-CI: 23–35%), and 5% were in MR⁵ (95%-CI: 3–9%). At 18 months, one patient had been lost to follow-up and three patients (rated as "no MMR") had died. Thus, of 221 patients, 192 (87%, 95%-CI: 82–91%) had achieved at least MMR, whilst 54% (95%-CI: 48–61%) were assessed as MR⁴ or better and 32% (95%-CI: 26–39%) had achieved at least MR^{4.5}. MR⁵ was achieved for 8% (95%-CI: 5–13%) of 221 patients. Before month 24, one more

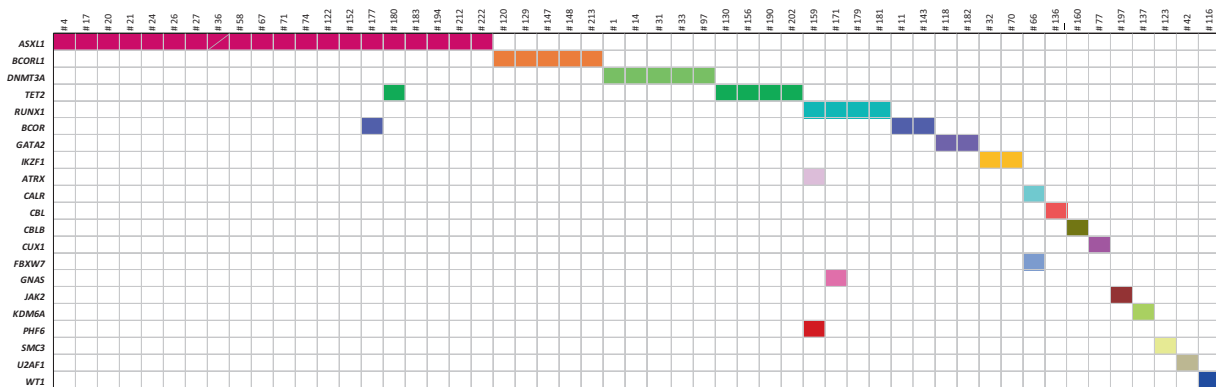


Fig. 1 Landscape of somatic mutations in 222 chronic phase CML patients at diagnosis by targeted next-generation sequencing. Mutations were found in 53/222 patients (24%) with *ASXL1* being the most commonly affected gene ($n = 20$). Patients and genes are displayed in columns and rows, respectively. A unique color is assigned to each mutated gene. Bisected cell represents two variants in the same gene and patient.

patient was lost to follow-up. At 24 months, of 220 patients, 193 (88%, 95%-CI: 83–91%) had achieved at least MMR. Proportions of patients with at least MR⁴, at least MR^{4,5}, or MR⁵ were 59% (95%-CI: 52–65%), 38% (95%-CI: 32–45%), and 14% (95%-CI: 10–19%), respectively.

Mutations at diagnosis

At the time of diagnosis, 53 of 222 patients (24%) carried 60 mutations in addition to *BCR::ABL1*, affecting the genes *ASXL1*, *ATRX*, *BCOR*, *BCORL1*, *CALR*, *CBL*, *CBLB*, *CUX1*, *DNMT3A*, *FBXW7*, *GATA2*, *GNAS*, *IKZF1*, *JAK2*, *KDM6A*, *PHF6*, *RUNX1*, *SMC3*, *TET2*, *U2AF1*, and *WT1* (Fig. 1). In detail, 18 distinct nonsense mutations, 13 frameshift variants, 22 missense mutations, two inframe deletions and one inframe insertion were detected. *ASXL1* mutations were most frequently identified and were observed in 20 patients (9%). Six patients showed more than one additional mutation. This affected patient #36 (*ASXL1*, *ASXL1*), #66 (*CALR*, *FBXW7*), #159 (*RUNX1*, *ATRX*, *PHF6*), #171 (*RUNX1*, *GNAS*), #177 (*ASXL1*, *BCOR*) and #180 (*ASXL1*, *TET2*). Median age of patients carrying additional mutations to *BCR::ABL1* at diagnosis was 54 years (range, 19–78 years). Buccal swab samples were available for 13 patients and showed no or lower-level mutation frequencies, hence indicating a somatic origin of the respective mutations.

Apart from the mutations described above, 10 distinct missense variants were detected in 14 patients that were considered to be germline but otherwise met the published criteria of clinically relevant mutations [8] (Supplementary Table 1). The affected genes were *ASXL1*, *ATRX*, *CBL*, *IDH2*, *KDM6A*, *RUNX1*, *TET2*, *TP53*, and *ZRSR2*. These variants were found in all analyzed samples of the respective patients with a VAF of approximately 50% ($n = 8$) or 100% ($n = 2$) and/or were confirmed to be germline via buccal swab analysis if available ($n = 5$). Four patients not analyzed in follow-up carried a *TET2* variant with a VAF of approximately 50% that was otherwise considered clinically relevant.

Mutation dynamics

Investigating follow-up samples of 100 randomly chosen patients of the cohort described above, we observed three mutational patterns: (I) eradication, (II) persistence, (III) emergence of mutations (Table 2a–c). Regarding mutation prevalence at month 12, 24, and 36 please refer to Fig. 2A–C.

Most mutations were eradicated together with the *BCR::ABL1* clone under nilotinib therapy (pattern I, Table 2a). Nineteen patients showed this type of mutation pattern, most commonly

affecting *ASXL1* with $n = 12$ detections. For most patients, the mutation was detected at diagnosis only and was undetectable during treatment. However, in patient #36 two *ASXL1* mutations detected at diagnosis were also found at month 12. After a year of nilotinib treatment the mutations had been suppressed to low VAFs of 2.7% and 2.3%, respectively (Table 2a). At this point the patient showed a *BCR::ABL1*¹⁵ transcript level of 2.8%. Analysis of subsequent follow-up samples showed that *BCR::ABL1* as well as both *ASXL1* mutations were cleared which indicates that the *ASXL1* mutations were located in Ph⁺ cells. At month 24, patient #21 showed re-emergence of an *ASXL1* mutation initially detected at diagnosis (the month 12 sample was tested negative) with a *BCR::ABL1*¹⁵ transcript level of 13% at that time (Table 2a). Another follow-up sample was analyzed at month 36. The *ASXL1* variant increased in frequency compared to month 24 and a *BCR::ABL1*¹⁵ transcript level of 35% was assessed at this point. The patient underwent allogeneic stem cell transplantation. Though not included in NGS follow-up analysis, patient #194, who presented with an *ASXL1* mutation at diagnosis, showed an E255K *BCR::ABL1* mutation at months 12 and 18 as detected by Sanger sequencing (Supplementary Table 1).

In five patients mutations persisted (pattern II; Table 2b). Follow-up samples also revealed a reduction of the allele burden of four of these mutations (*DNMT3A* in all cases) compared to the level at diagnosis whereas the *CALR* mutation displayed a slightly increased VAF in follow up analyses. Since VAF was significantly above *BCR::ABL1* transcript levels in all patients, the *BCR::ABL1* translocation has most likely occurred on top of the preexisting mutation. Median age of these patients was 59 years (range, 42–71 years) at diagnosis.

Fifteen variants in 13/100 (13%) patients newly emerged in follow-up that had not been detected in the corresponding diagnostic samples (pattern III; Table 2c). Affected genes were *ASXL1*, *BCOR*, *DNMT3A*, *IKZF1*, *JAK2*, *STAG2*, *TET2*, and *TP53* with the highest prevalence in *DNMT3A* ($n = 5$). Since VAFs of these variants were significantly above *BCR::ABL1*¹⁵ transcript levels in all patients, these mutated clones are considered to be *BCR::ABL1* negative. Patients gaining a mutation in follow-up had a median age of 56 years (range, 32–73 years) at diagnosis.

Data further suggests different mutational dynamics in follow-up samples in patients with more than one mutation. In patients #19 and #36 both mutations followed the same mutation patterns of eradication and emergence, respectively (Table 2a, c). Non-parallel mutation dynamics were observed in patients #11 (*BCOR* eradication; *TET2* emergence), #21 (*ASXL1* eradication/re-

Table 2. Dynamics of somatic mutations in 100 chronic phase CML patients at diagnosis and after 12, 24, and 36 months of nilotinib therapy.

a Eradication (pattern I)				Variant allele frequency (%)		
Patient	Gene	Mutation	Diagnosis	Month 12	Month 24	Month 36
#4	ASXL1	Y591X	6.6	0	0	0
#17	ASXL1	S1064EfsX23	41.3	0	0	0
#20	ASXL1	R693X	5.7	0	0	0
#21	ASXL1	L775X	38	0	10.6	21.6
#24	ASXL1	Q757X	34	0	0	0
#26	ASXL1	A752LfsX20	9.9	0	0	0
#27	ASXL1	R1068X	5	0	0	0
#36	ASXL1	E635RfsX15	11.3	(2.7)	0	0
	ASXL1	Q1039X	12.5	(2.3)	0	0
#58	ASXL1	L775X	10.7	0	0	0
#67	ASXL1	E850X	45	0	0	0
#71	ASXL1	C856X	38	0	0	0
#74	ASXL1	R693X	40.7	0	0	0
#11	BCOR	N1459S	51.4	0	0	0
#77	CUX1	I1092NfsX14	38.3	0	0	0
#1	DNMT3A	Y197X	46.8	0	0	0
#66	FBXW7	R465H	7.9	0	0	0
#32	IKZF1	C203VfsX14	39.2	0	0	0
#70	IKZF1	R143W	6.8	0	0	0
#42	U2AF1	R156H	27.1	0	0	0

b Persistence (pattern II)				Variant allele frequency (%)		
Patient	Gene	Mutation	Diagnosis	Month 12	Month 24	Month 36
#66	CALR	E398_N400del	36.6	43.4	42.9	43.7
#14	DNMT3A	S786X	43.4	23.7	23.2	26.4
#31	DNMT3A	Q696X	48.7	(2.6)	(3.4)	(2.4)
#33	DNMT3A	K744del	46.9	(4.6)	7.5	8.7
#97	DNMT3A	N797D	47	22.4	20.0	19.9

c Emergence (pattern III)				Variant allele frequency (%)		
Patient	Gene	Mutation	Diagnosis	Month 12	Month 24	Month 36
#21	ASXL1	R693X	0	0	21.6	4.4
	STAG2	I855NfsX2	0	15.2	0	0
#59	BCOR	E1255G	0	7.3	0	0
#19	DNMT3A	W176R	0	0	7.3	0
	IKZF1	E401K	0	0	8.2	0
#88	DNMT3A	Q249X	0	6.2	8.1	12.2
#87	DNMT3A	V296L	0	(1.5)	(4.0)	5.0
#90	DNMT3A	R882S	0	(4.3)	5.9	6.7
#71	DNMT3A	Y528X	0	0	5.1	8.6
#85	IKZF1	N392S	0	0	0	5.2
#76	JAK2	V617F	0	31.7	29.4	25.2
#89	STAG2	R259Q	0	0	0	5.2
#8	TET2	K1338LfsX21	0	10.0	10.9	9.0
#11	TET2	Q618X	0	16.9	22.0	26.7
#47	TP53	E198del	0	(4.5)	6.5	(4.9)

(a) Variants detected only at diagnosis or suppressed and subsequently eradicated in follow-up. ASXL1 L775X re-occurred at month 24 in patient #21. Samples with molecular response of at least MMR are shaded in green, no MMR is shaded in red. Low level allele variants (<5% variant allele frequency) are displayed in brackets. $n = 19$ patients.

(b) Variants detected in every analyzed sample of the respective patient. Samples with molecular response of at least MMR are shaded in green. Low level allele variants (<5% variant allele frequency) are displayed in brackets. $n = 5$ patients.

(c) Variants detected only in follow-up samples. Samples with molecular response of at least MMR are shaded in green, no MMR is shaded in red. Low level allele variants (<5% variant allele frequency) are displayed in brackets. $n = 13$ patients.

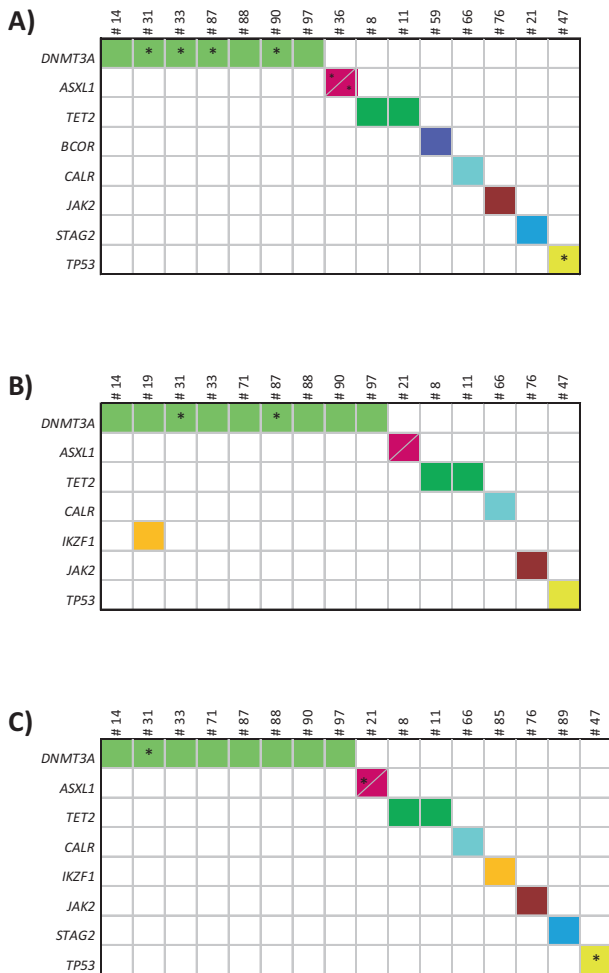


Fig. 2 Prevalence of somatic mutations in 100 chronic phase CML patients during nilotinib treatment. Longitudinal deep sequencing analysis of serial samples after (A) 12, (B) 24, and (C) 36 months of therapy. *DNMT3A* mutations were most frequently identified. Patients and genes are displayed in columns and rows, respectively. A unique color was assigned to each mutated gene. A bisected cell represents two variants in the same gene and patient. Asterisks stand for low allele variants (<5% variant allele frequency).

emergence, *ASXL1* and *STAG2* emergence), #66 (*FBXW7* eradication, *CALR* persistence) and #71 (*ASXL1* eradication, *DNMT3A* emergence) (Table 2a–c).

Clinical impact of mutations

In patients without mutation at diagnosis, the probabilities of achieving MMR or better were 85% (95%-CI: 78–89%) at 12 months, 89% (95%-CI: 84–93%) at 18 months, and 89% (95%-CI: 84–93%) at 24 months. With 82% (95%-CI: 66–91%) at 12 months, 91% (95%-CI: 76–97) at 18 months, and 94% (95%-CI: 80–98%) at 24 months the probabilities of MMR in the patients with mutations (excluding *ASXL1*) were not significantly different. In contrast, patients carrying an *ASXL1* mutation at diagnosis achieved significantly lower MMR probabilities than patients without any mutation (Fig. 3), showing 55% (95%-CI: 34–74%) at 12 months ($p = 0.0036$), 60% (95%-CI: 39–78%) at 18 months ($p = 0.0018$), and 65% (95%-CI: 43–82%) at 24 months ($p = 0.0076$). Investigating the categorizations “at least MR^{4w}”, “at least MR^{4.5w}”, and “at least MR^{5w}”, no statistically significant and clinically relevant difference between “no mutations” and either “*ASXL1*” or “other mutations” was found.

Using multiple logistic regression, apart from mutation status, no additional variable reported in Table 1 had a significant influence on the achievement of the molecular status “MMR or better” at 12, 18, or 24 months. The odds ratios of *ASXL1* as compared with “no mutations” were 0.222 (95%-CI: 0.084–0.589), 0.179 (95%-CI: 0.065–0.496), and 0.223 (95%-CI: 0.079–0.631) with increasing MMR proportions and time.

Table 1 displays patient characteristics distinguished by “no mutations” and “all mutations”, the latter separated in “*ASXL1* mutations” and “other mutations”. Any mutations at diagnosis occurred in 46/203 (22.7%) low risk patients according to the EUTOS score and in 7/19 (36.8%) high risk patients (n.s.). However, all mutations other than *ASXL1* were only identified in low-risk patients and accordingly, all seven mutations identified in 19 high-risk patients were *ASXL1* mutations. *ASXL1* mutations at diagnosis occurred in 13/203 (6.4%) low risk patients and 7/19 (38.8%) high risk patients ($p = 0.0004$). Patients with *ASXL1* mutation were more frequently at high risk than patients with other ($p = 0.0005$) or no mutations ($p = 0.0012$). Moreover, patients with *ASXL1* mutation were younger than patients with other mutations ($p = 0.0380$). No further associations between mutations and other patient characteristics were observed.

DISCUSSION

This study provides a prospective analysis of leukemia-associated gene mutations in newly diagnosed CML patients treated within a controlled clinical trial. Several retrospective studies found that mutations in leukemia-associated genes in addition to *BCR::ABL1* are not only a phenomenon seen in advanced or blast crisis CML but also in chronic phase CML [6–9]. As CML is primarily diagnosed in chronic phase, a better understanding of clonal molecular evolution may aid therapeutic decision-making, risk-stratification and management in the future.

At the time of diagnosis, patients most frequently carried *ASXL1* mutations ($n = 20$). *ASXL1* mutations are also commonly detected in other myeloid malignancies and are generally associated with a poor clinical outcome. As an epigenetic and transcriptional regulator, *ASXL1* is involved in chromatin modifications and interacts with polycomb complex proteins as well as transcriptional activators and suppressors [26]. Recently, Yang et al. showed a gain-of-function in mice carrying *ASXL1* exon 12 mutations yielding gene truncation. The truncation resulted in more open chromatin and a dysregulated expression of genes critical for the self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells [27]. Moreover, as a component of the BAP1 histone H2A deubiquitinase complex, *ASXL1* truncation increases its stability, strengthening the association of the BAP1 complex with chromatin, driving oncogenic gene expression [28].

ASXL1 mutations have previously been observed in CML in adults [6–8] and also in children [13] where *ASXL1* was the only gene found to be mutated which may indicate a relevant role of such mutations in some cases. The study presented here provides novel evidence for an adverse response to TKI treatment of CML patients carrying mutant *ASXL1* as the presence of an *ASXL1* mutation at diagnosis was associated with a worse response to nilotinib treatment as measured by MMR achievement at month 12, 18, and 24. Mutations other than *ASXL1* mutations at diagnosis did not affect molecular response during follow-up. Moreover, patients with *ASXL1* mutations were younger than patients with other mutations and more frequently at high risk than patients with other or no mutations. All mutations other than *ASXL1* were only identified in low risk patients. These findings indicate that *ASXL1* mutations may have an active role in CML pathogenesis and clonal evolution.

Our data confirm previous findings which show that *ASXL1* mutations are rarely detected during MMR suggesting eradication of the mutation in most patients by TKI treatment [7]. However,

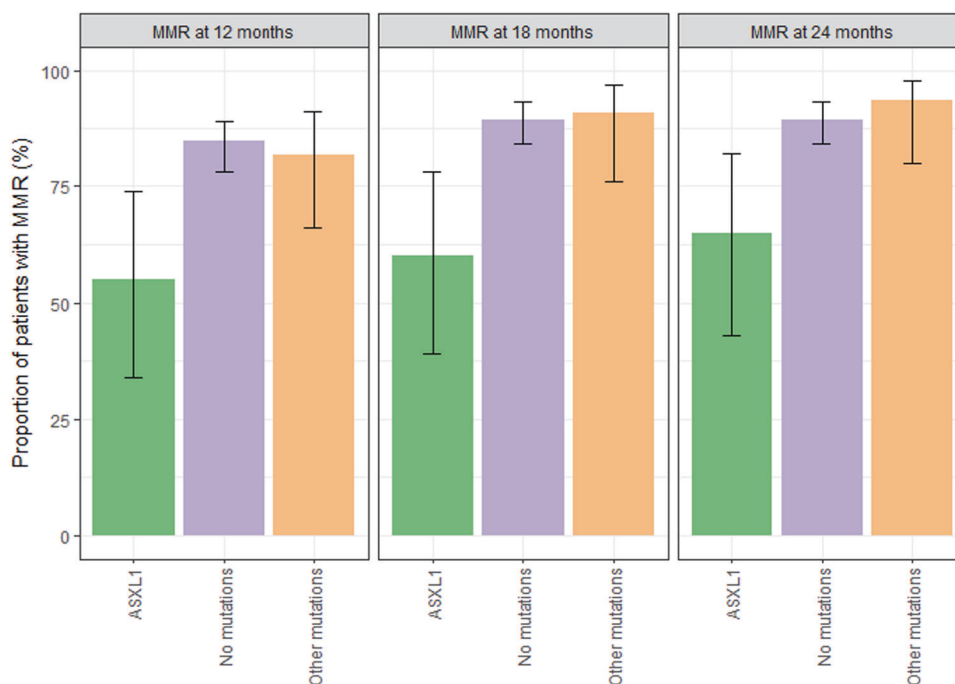


Fig. 3 Proportion of patients with major molecular response (MMR) based on mutation status at diagnosis. Patients carrying an *ASXL1* mutation at diagnosis achieved significantly lower MMR probabilities than patients without any mutation, showing 55% (95%-CI: 34–74%) at 12 months ($p = 0.0036$), 60% (95%-CI: 39–78%) at 18 months ($p = 0.0018$), and 65% (95%-CI: 43–82%) at 24 months ($p = 0.0076$). Black vertical lines describe the 95% confidence intervals around the proportions indicated by the upper end of the bars. MMR Major molecular response.

we found a slower treatment response in CML patients carrying an *ASXL1* mutation at diagnosis despite mutation clearance in 11/12 of the affected patients in which follow-up samples were analyzed. This suggests that clonal evolution with *ASXL1* mutations on top of *BCR::ABL1* influences TKI susceptibility of leukemic cells and thus response to therapy. The molecular mechanism behind this phenomenon needs to be explored further. Recently, Wang et al. [28] identified a small molecule inhibitor which targets aberrant BAP1 catalytic activity in *ASXL1*-mutated leukemia, reversing oncogenic gene expression. In the future, combined or sequential treatment strategies could help CML patients with *ASXL1* mutations achieve better molecular responses.

Whilst the presence of multiple mutations per patient are commonly detected in blast crisis CML, acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic neoplasms (MDS) [29–31], 47/53 (89%) of all affected patients in this study showed only one mutation in addition to *BCR::ABL1* at diagnosis indicating that the clonal architecture in CML might be less complex compared to other myeloid malignancies (Fig. 1). However, five patients of the cohort investigated in this study (#36, #66, #171, #177 and #180) showed two mutations and one patient (#159) showed three distinct mutations in addition to *BCR::ABL1* at diagnosis. Patient #159 also carried an Y253H *BCR::ABL1* mutation (month 12) as detected by Sanger sequencing and was the only patient in this cohort to develop blast crisis. The patient died 21 months after treatment initiation. As CML samples are increasingly sequenced to investigate causes of resistance, persistence, and relapse, future analyses may confirm that the number of additional mutations has clinical consequences, as seen in AML and chronic myelomonocytic leukemia (CMML), where the number of mutations detected is associated with a worse prognosis [32, 33]. The current study is based on targeted NGS, including a panel of 54 leukemia-associated genes, whereas whole exome or genome analyses might reveal additional mutations. As clinical datasets combined with sequencing information expand (e.g., within the HARMONY Plus Alliance; www.harmony-alliance.eu), a clearer picture of the impact of additional mutations may emerge.

Sequencing analyses of diagnosis samples and corresponding annual follow-up samples in 100 selected patients revealed various mutation patterns under therapy, including eradication (pattern I), persistence (pattern II), and emergence (pattern III). Regarding the eradication group, in 19/100 (19%) patients (at least one) additional mutation was detected at diagnosis that was subsequently undetectable under nilotinib treatment (Table 2a). As these mutations were not detectable in subsequent *BCR::ABL1* negative follow-up samples, it may be concluded that only *BCR::ABL1* positive cells harbored these additional mutations. One patient showed re-occurrence of a variant at month 24 with a concurrently increased *BCR::ABL1*^{LS} transcript level of 1.1%, supporting the notion that these additional mutations are located in *BCR::ABL1* cells. To further strengthen these findings, future analyses could employ error-corrected NGS to increase sensitivity further and confirm mutation concomitance.

Fifteen variants in 13/100 (13%) patients were only detected in follow-up samples. One of these mutations was the *JAK2* V617F mutation in patient #76 which has been previously described as uncommon in CML [34]. In some of these rare cases the diagnosis of a *JAK2* V617F-positive disease preceded the acquisition of the Ph-chromosome [35, 36]; in others the second myeloproliferative disease emerged in the remission phase of CML [37–39]. In the case presented here, the *JAK2* V617F mutation was not detected at diagnosis, indicating that it was either initially masked by the predominantly existing Ph+ cells or arose during nilotinib treatment. It is known that there are multiple pathways in which expression of the *BCR::ABL1* tyrosine kinase causes genetic instability with subsequently emerging mutations. The resulting adverse response to treatment may no longer depend on the *BCR::ABL1* kinase itself [40].

In a minority of patients (5/100; 5%) mutations in addition to *BCR::ABL1* persisted over all time points analyzed and therefore seem to precede the *BCR::ABL1* translocation indicating a multi-step pathogenesis in CML as suggested previously [6, 41, 42]. One mutation affecting *CALR* displayed slightly increased VAFs in follow-up samples despite successful suppression of the *BCR::ABL1*

clone. *CALR* mutations are known drivers of myeloproliferative neoplasms [43] and may therefore contribute to a clonal advantage and expansion even after the *BCR::ABL1* clone has been eradicated. Four *DNMT3A* mutations showed stable lower VAFs in follow up samples compared to the respective diagnosis sample. A suppression of the mutation, but not eradication despite good response, indicates the existence of a preleukemic clone that subsequently acquired *BCR::ABL1*. *DNMT3A* is known to be frequently mutated with increasing age in the general population as part of a phenomenon termed clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) [10–12]. In elderly people without hematologic disorders *DNMT3A* mutant clones are unlikely to expand over time [44], which supports the finding of stable VAFs under TKI therapy in CML patients. Age-related clonal hematopoiesis is associated with an increased risk of developing hematologic cancer [11]. In the study presented here, median age of patients carrying additional mutations at diagnosis was 54 years (range, 22–78 years) whilst mutation frequency was 24%, thus exceeding the previously established age-related mutation prevalence of <5% within the healthy population in this age range [11]. Whilst most detected mutations are likely a direct feature of CML pathology, the *DNMT3A* mutations in particular may have occurred as age-related events which might predispose individuals to CML. The precise implication of preleukemic clonal hematopoiesis for CML has been analyzed in a few studies but will undoubtedly be better understood as sequencing efforts expand [6–8]. Similarly, in 14 patients germline mutations were detected which met the published criteria of clinically relevant mutations [8]. Five of the affected patients also carried at least one somatic mutation. This indicates that germline mutations may also function as predisposing factors to CML.

CONCLUSION

The study presented here aimed to evaluate the prevalence, dynamics and clinical impact of *BCR::ABL1* independent gene mutations in chronic phase CML patients treated with nilotinib in an ongoing prospective clinical trial. Mutations in addition to *BCR::ABL1* were frequently identified at diagnosis and were found to vary in their dynamics during treatment. *ASXL1* mutations were most common and affected patients showed MMR less frequently at month 12, 18, and 24 compared to all other patients. *ASXL1* may, after further validation, serve as an additional prognostic factor for molecular response in newly diagnosed CML patients.

REFERENCES

- Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:172–83.
- Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, et al. Long-term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2017;376:917–27.
- Kantarjian HM, Hughes TP, Larson RA, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, et al. Long-term outcomes with frontline nilotinib versus imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 10-year analysis. *Leukemia*. 2021;35:440–53.
- Saussele S, Richter J, Guilhot J, Gruber FX, Hjorth-Hansen H, Almeida A, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol*. 2018;19:747–57.
- Etienne G, Guilhot J, Rea D, Rigal-Huguet F, Nicolini F, Charbonnier A, et al. Long-term follow-up of the french stop imatinib (STIM1) study in patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35:298–305.
- Schmidt M, Rinke J, Schafer V, Schnittger S, Kohlmann A, Obstfelder E, et al. Molecular-defined clonal evolution in patients with chronic myeloid leukemia independent of the BCR-ABL status. *Leukemia*. 2014;28:2292–9.
- Kim T, Tyndel MS, Kim HJ, Ahn JS, Choi SH, Park HJ, et al. Spectrum of somatic mutation dynamics in chronic myeloid leukemia following tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*. 2017;129:38–47.

- Branford S, Kim DDH, Apperley JF, Eide CA, Mustjoki S, Ong ST, et al. Laying the foundation for genomically-based risk assessment in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019;33:1835–50.
- Nteliopoulos G, Bazeos A, Claudiani S, Gerrard G, Curry E, Szydlo R, et al. Somatic variants in epigenetic modifiers can predict failure of response to imatinib but not to second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica*. 2019;104:2400–9.
- Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371:2488–98.
- Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014;371:2477–87.
- Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*. 2014;20:1472–8.
- Ernst T, Busch M, Rinke J, Ernst J, Haferlach C, Beck JF, et al. Frequent *ASXL1* mutations in children and young adults with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2018;32:2046–9.
- Cross NC, Feng L, Bungey J, Goldman JM. Minimal residual disease after bone marrow transplant for chronic myeloid leukaemia detected by the polymerase chain reaction. *Leuk Lymphoma*. 1993;11:39–43.
- Emig M, Saussele S, Wittor H, Weissner A, Reiter A, Willer A, et al. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia*. 1999;13:1825–32.
- Muller MC, Erben P, Saglio G, Gottardi E, Nyvold CG, Schenk T, et al. Harmonization of BCR-ABL mRNA quantification using a uniform multifunctional control plasmid in 37 international laboratories. *Leukemia*. 2008;22:96–102.
- Cross NC, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29:999–1003.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122:872–84.
- Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34:966–84.
- Rentszsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:D886–D894.
- Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;7:20.
- Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP: a lightweight database of human non-synonymous SNPs and their functional predictions. *Hum Mutat*. 2011;32:894–9.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4:1073–81.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11:361–2.
- Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Stenson PD, Barker GL, Edwards KJ, et al. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat*. 2013;34:57–65.
- Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. Mutations in *ASXL1* are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*. 2012;5:12.
- Yang H, Kurtenbach S, Guo Y, Lohse I, Durante MA, Li J, et al. Gain of function of *ASXL1* truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood*. 2018;131:328–41.
- Wang L, Birch NW, Zhao Z, Nestler CM, Kazmer A, Shilati A, et al. Epigenetic targeted therapy of stabilized BAP1 in *ASXL1* gain-of-function mutated leukemia. *Nat Cancer*. 2021;2:515–26.
- Grossmann V, Kohlmann A, Zenger M, Schindela S, Eder C, Weissmann S, et al. A deep-sequencing study of chronic myeloid leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9% of cases. *Leukemia*. 2011;25:557–60.
- Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368:2059–74.
- Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28:241–7.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374:2209–21.

33. Patnaik MM, Tefferi A. Chronic Myelomonocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2020;95:97–115.
34. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood.* 2005;106:2162–8.
35. Bornhäuser M, Mohr B, Oelschlaegel U, Bornhäuser P, Jacki S, Ehninger G, et al. Concurrent JAK2(V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis. *Leukemia.* 2007;21:1824–6.
36. Bocchia M, Vannucchi AM, Gozzetti A, Guglielmelli P, Poli G, Crupi R, et al. Insights into JAK2-V617F mutation in CML. *Lancet Oncol.* 2007;8:864–6.
37. Krämer A, Reiter A, Kruth J, Erben P, Hochhaus A, Müller M, et al. JAK2-V617F mutation in a patient with Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2007;8:658–60.
38. Inami M, Inokuchi K, Okabe M, Kosaka F, Mitamura Y, Yamaguchi H, et al. Polycythemia associated with the JAK2V617F mutation emerged during treatment of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia.* 2007;21:1103–4.
39. Hussein K, Bock O, Seegers A, Flasshove M, Henneke F, Buesche G, et al. Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation. *Blood.* 2007;109:4106–7.
40. Skorski T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene.* 2002;21:8591–604.
41. Raskind WH, Ferraris AM, Najfeld V, Jacobson RJ, Moohr JW, Fialkow PJ. Further evidence for the existence of a clonal Ph-negative stage in some cases of Ph-positive chronic myelocytic leukemia. *Leukemia.* 1993;7:1163–7.
42. Fialkow PJ, Martin PJ, Najfeld V, Penfold GK, Jacobson RJ, Hansen JA. Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1981;58:158–63.
43. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127:2391–405.
44. Midic D, Rinke J, Perner F, Muller V, Hinze A, Pester F, et al. Prevalence and dynamics of clonal hematopoiesis caused by leukemia-associated mutations in elderly individuals without hematologic disorders. *Leukemia.* 2020;34:2198–205.

ACKNOWLEDGEMENTS

The excellent technical assistance of Ms. Anja Waldau is gratefully acknowledged. We thank all colleagues who actively participated in the trial.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TE and AHO designed the study; AHO coordinated the TIGER trial; AHO, THB, AB, PLC, SWK, SS participated in the steering board of the trial and treated patients; LS, JR, AHi, SNN, VS, TE performed the molecular work; FS and MP did the statistical analysis; TS,

CF and TE coordinated the collection of patients' data; LS, JR, AHO and TE wrote the manuscript; all authors edited the manuscript and agreed on its content.

FUNDING

The study was supported by the HARMONY Plus Alliance through the European LeukemiaNet Foundation and by Novartis through the European Treatment and Outcome Study (EUTOS) for CML. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01648-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Thomas Ernst.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons

Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

4 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Promotionsarbeit und eingebundenen Publikation erfolgte eine systematische Analyse von Leukämie-assoziierten Mutationen zusätzlich zur *BCR::ABL1*-Genfusion in CML-Patienten. Untersucht wurden Blutproben von 222 Patienten mit neu diagnostizierter CML, welche eine Therapie mit dem Zweitgenerations-TKI Nilotinib erhielten, und deren Therapieerfolg im Rahmen einer klinischen Studie (TIGER-Studie) prospektiv untersucht wurde. Aus einigen retrospektiven Untersuchungen war bereits bekannt, dass Mutationen in Leukämie-assoziierten Genen bei der CML nicht nur in der akzelerierten Phase oder der Blastenphase zu finden sind, sondern bereits in der chronischen Phase auftreten (Schmidt et al. 2014, Kim et al. 2017, Branford et al. 2018, Nteliopoulos et al. 2019). Da die CML größtenteils in der chronischen Phase diagnostiziert wird, könnte ein besseres Verständnis der molekularen Entwicklung zur Verbesserung zukünftiger Therapieentscheidungen, sowie zur besseren Risikostratifizierung und -handhabung beitragen.

In der vorliegenden Untersuchung konnte insgesamt bei 53 von 222 Patienten (24%) zum Erstdiagnosezeitpunkt eine Mutation festgestellt werden. Das Alter der betroffenen Patienten betrug dabei im Median 54 Jahre (Spanne 19-78 Jahre). Die Mutationsprävalenz lag mit 24% deutlich oberhalb der publizierten Prävalenz in einer hämatologisch gesunden Kohorte von <5% (Jaiswal et al. 2014). Es ist somit wahrscheinlich, dass die meisten der hier gefundenen Mutationen direkt in die CML-Evolution involviert sind. Insbesondere bei *ASXL1*-Mutationen ist angesichts der publizierten Prävalenz von 29% bei pädiatrischen CML-Patienten (Ernst et al. 2018) von einem Krankheits-, nicht Alters-assoziiertes Auftreten auszugehen.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wurden in der vorliegenden Arbeit bei 20 Patienten *ASXL1*-Mutationen gefunden. Es handelt sich damit um das Gen mit den häufigsten detektierten Mutationen. Aus Analysen anderer myeloischer Erkrankungen ist bekannt, dass auch bei diesen *ASXL1*-Mutationen am häufigsten und mit einem unterlegenen Therapieansprechen verbunden sind (Gelsi-Boyer et al. 2012). Bei Patienten mit MDS wurde eine Prävalenz von 11-21% *ASXL1*-Mutationen sowie ein verringertes Gesamtüberleben der betroffenen Patienten beschrieben (Gelsi-Boyer et al. 2009, Bejar et al. 2011, Thol et al. 2011). Handelt es sich um eine *frameshift ASXL1*-

Diskussion der Ergebnisse

Mutation, wurde außerdem eine kürzere Zeit bis zum Progress in eine AML berichtet (Thol et al. 2011). 39-49% der Patienten mit CMML tragen eine *ASXL1*-Mutation (Gelsi-Boyer et al. 2009, Itzykson et al. 2013, Patnaik et al. 2013, Patnaik et al. 2014). Die betroffenen Patienten weisen ein verringertes Gesamtüberleben auf (Gelsi-Boyer et al. 2010, Itzykson et al. 2013, Patnaik et al. 2014). Auch bei Patienten mit AML ist der Nachweis einer *ASXL1*-Mutation bei einigen Subgruppen mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Chou et al. 2010, Metzeler et al. 2011, Pratcorona et al. 2012, Schnittger et al. 2013, Devillier et al. 2015, Paschka et al. 2015). In einer unselektierten AML-Kohorte wurde eine Prävalenz von *ASXL1*-Mutationen von 11% beschrieben (Chou et al. 2010).

Bei der CML wurden *ASXL1*-Mutationen mit einer Prävalenz von ~10% in der chronischen Phase ebenfalls als häufig beschrieben (Schmidt et al. 2014, Kim et al. 2017, Branford et al. 2018, Nteliopoulos et al. 2019). Bei der seltenen Entität der pädiatrischen CML war *ASXL1* sogar das einzige Gen aus einem Panel von 30 leukämie-assoziierten Genen, bei dem eine Mutation nachgewiesen werden konnte. Die Mutationsprävalenz war hingegen hoch mit 29% (Ernst et al. 2018). Trotz dieser Nachweise blieb die prognostische Relevanz von *ASXL1*-Mutationen bei CML-Patienten bislang unklar (Branford et al. 2019). Die hier vorliegende Untersuchung bietet nun erstmalig Evidenz für ein unterlegenes Therapieansprechen von CML-Patienten mit *ASXL1*-Mutation zum Erstdiagnosezeitpunkt in einer prospektiven klinischen Studie. So erreichten Mutationsträger seltener MMR zu Monat 12, 18, und 24. Patienten mit *ASXL1*-Mutation waren außerdem signifikant jünger und häufiger als Hochrisiko stratifiziert. Patienten mit Mutationen in anderen Genen als *ASXL1* hatten kein signifikant unterlegenes Therapieansprechen und befanden sich ausschließlich in der Niedrigrisiko-Gruppe. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass *ASXL1*-Mutationen eine aktive Rolle in der Pathogenese und Evolution der Erkrankung spielen könnten. Eine aktuelle retrospektive Studie mit einem hohen Anteil von Patienten mit Therapieversagen lieferte nach der hier vorliegenden Veröffentlichung Evidenz dafür, dass *ASXL1*-Mutationen im Rahmen einer Multivariante Analyse den einzigen unabhängigen Risikofaktor für ein ereignisfreies Überleben darstellen. Des Weiteren wiesen Patienten mit *ASXL1*-Mutation ein unterlegenes Überleben ohne Therapieversagen auf (Bidikian et al. 2022). Möglicherweise kann nach weiterer

Diskussion der Ergebnisse

Evaluation der *ASXL1*-Mutationsstatus zukünftig als zusätzlicher Faktor bei der Risikostratifizierung von CML-Patienten herangezogen werden.

Nach Erreichen von MMR konnten in der vorliegenden Analyse nur wenige *ASXL1*-Mutationen nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit vorherigen Erkenntnissen (Kim et al. 2017) und legt nahe, dass die Mutation gemeinsam mit *BCR::ABL1* im Rahmen der TKI-Therapie eradiziert wird. Auffällig war jedoch, dass bei den betroffenen Patienten trotz der Eradikation der *ASXL1*-Mutation ein unterlegenes Therapieansprechen zu verzeichnen war. Auf welchem molekularen Mechanismus der Einfluss von *ASXL1* auf das Therapieansprechen beruht, ist aktuell unklar und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen werden. Möglicherweise ist durch die Mutation die Empfänglichkeit des leukämischen Klon für die TKI-Therapie verändert.

Wie eingangs beschrieben ist *ASXL1* ein wichtiger Bestandteil des BAP1 Histon H2AK119Ub DUB Komplexes. Mechanistisch scheint die gain-of-function Aktivität des trunkierten *ASXL1*-BAP1-DUB Komplexes eine zentrale Funktion in *ASXL1* mutierten myeloischen Krankheiten zu spielen (Medina et al. 2022). Wang et al. haben einen ersten Inhibitor gegen die katalytische Aktivität von BAP1 entwickelt, der leukämische Genexpression reversieren und Tumorprogression in Mausmodellen verzögern konnte (Wang et al. 2021). Darüber hinaus interagiert mutiertes *ASXL1* mit dem epigenetischen Regulator Bromodomain-containing protein 4 (BRD4) und verstärkt Proteinkinase B/Mammalian target of rapamycin (AKT/mTOR) Signalwege durch eine Stabilisierung von AKT. Interessanterweise sind *ASXL1*-mutierte hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen besonders sensitiv gegenüber BET-Inhibitoren und dem mTOR-Inhibitor Rapamycin (Yang et al. 2018, Fujino et al. 2021). Möglicherweise ergeben sich aus weiterer Erforschung der *ASXL1*-Interaktionen Therapieansätze, die das Ansprechen von Patienten mit *ASXL1*-Mutationen zukünftig verbessern.

Bereits in vorangegangenen Studien zur Dynamik von Zusatzmutationen bei der CML ließen sich Zusatzmutationen im Wesentlichen drei Mustern zuordnen: Eradikation, Neuauftreten und Persistenz (Kim et al. 2017, Branford et al. 2018). Beide Studien waren retrospektiv angelegt und enthielten eine hohe Zahl an Patienten mit Therapieversagen. In der hier vorliegenden Studie wurde die bislang größte Anzahl an Verlaufsproben systematisch zu Monat 12, 24, und 36 von 100 prospektiv ausgewählten Patienten untersucht. Die Patientenkohorte entspricht dank des

Diskussion der Ergebnisse

prospektiven Ansatzes eher dem der klinischen Realität und kann so einen repräsentativeren Einblick für eben diese Patienten gewähren.

Am häufigsten war das Muster der Eradikation zu beobachten. So lag bei 19 Patienten (19/100, 19%) zum Erstdiagnosezeitpunkt mindestens eine Zusatzmutation vor, welche im Verlauf nicht mehr nachweisbar war. Die Tatsache, dass eine Mutation zur Erstdiagnose, einem Zeitpunkt zu dem der leukämische Zellklon vorherrscht, nicht aber in Remission nachweisbar ist, legt nahe, dass der leukämische Zellklon diese Zusatzmutation trägt. Interessant ist hier insbesondere der Fall von Patient #21. Bei diesem Patienten konnte zur Erstdiagnose eine *ASXL1*-Mutation festgestellt werden, welche zum Monat 12 nicht mehr nachweisbar war. Der Patient wies mit 1,1% *BCR::ABL1*^{IS} kein optimales Therapieansprechen nach einem Jahr TKI-Therapie auf. Zum Monat 24 war die *ASXL1*-Mutation mit einer VAF von 10,6% wieder nachweisbar, während *BCR::ABL1* bei 13% lag. Zum Monat 36 lag die *ASXL1*-Mutation bei 21,6% und *BCR::ABL1* bei 35%. Diese Probe wurde gewonnen, kurz bevor der Patient eine allogene Stammzelltransplantation erhielt. Die Dynamik der *ASXL1*-Mutation verhält sich passend zu der oben erläuterten These, dass die Mutation in dem leukämischen Klon lokalisiert ist.

Bei 13/100 (13%) der Patienten konnten Mutationen in den Verlaufsproben gefunden werden, welche zum Diagnosezeitpunkt nicht nachweisbar waren. Die VAF dieser Mutationen lag jeweils oberhalb des *BCR::ABL1*^{IS} Transkriptlevels, woraus postuliert werden kann, dass es sich um einen *BCR::ABL1* negativen Klon handelt. Dieses Mutationsmuster war in der retrospektiven Studie von Kim et al. mit einem negativen Therapieansprechen assoziiert, was anhand unserer Daten nicht bestätigt werden konnte. Möglicherweise liegt der Grund in der unterschiedlichen Patientenauswahl. So enthielt die Studie von Kim et al. einen deutlich höheren Teil an Patienten mit Therapieversagen. Etwa die Hälfte der neu aufgetretenen Mutationen betraf die *BCR::ABL1*-Kinasedomäne (Kim et al. 2017). Hierbei handelt es sich um einen bekannten Faktor für Therapieresistenz (Soverini et al. 2005, Soverini et al. 2011), sodass die Assoziation mit schlechterem Therapieansprechen nicht verwunderlich erscheint. Darüber hinaus beschrieben Branford et al. eine hohe Ko-Existenz von anderen somatischen Mutationen bei Patienten mit Therapieversagen und *BCR::ABL1*-Kinasedomäne-Mutationen, wobei diese zusätzliche somatische Mutation in der Mehrzahl zuerst auftrat (Branford et al. 2018). Möglicherweise würde bei einer

Diskussion der Ergebnisse

Ausweitung des Nachverfolgungs-Intervalls bei einem Teil der Patienten mit neu aufgetretener Mutation eine solche *BCR::ABL1*-Kinasedomäne-Mutation und Therapieversagen verzeichnet werden.

In Patient #76 wurde in den Verlaufspuren eine *JAK2-V617F*-Mutation nachgewiesen. Diese gilt als häufig in verschiedenen Subentitäten der myeloproliferativen Neoplasien (MPN), nicht aber bei der CML (Jones et al. 2005). Dennoch existieren Berichte von Patienten mit sowohl *BCR::ABL1* als auch *JAK2-V617F*-Mutation, wobei die Mutation sowohl der CML vorausging (Bocchia et al. 2007, Bornhauser et al. 2007) als auch unter TKI-Therapie nachgewiesen wurde (Hussein et al. 2007, Inami et al. 2007, Kramer et al. 2007). Darüber hinaus scheint es keine einheitliche klonale Struktur zu geben. So liegen Hinweise dafür vor, dass die beiden Mutationen sowohl auf dem gleichen Klon ko-existieren (Bocchia et al. 2007, Wang et al. 2013), als auch unabhängig voneinander auftreten und konkurrieren können (Cambier et al. 2008, Martin-Cabrera et al. 2017, Soderquist et al. 2018). Nach Analyse größerer Kohorten wird das Phänomen dieses doppelt mutierten Phänotyps weiterhin als selten angesehen (Pieri et al. 2011, Martin-Cabrera et al. 2017, Soderquist et al. 2018). In dem hier vorliegenden Fall konnte die *JAK2-V617F*-Mutation zur Erstdiagnose nicht nachgewiesen werden und lag in den Verlaufspuren trotz jeweils niedrigerem *BCR::ABL1*^{IS} Transkriptlevel bei einer VAF von >25%. Es bleibt jedoch unklar, ob die Mutation zur Erstdiagnose durch den vorherrschenden leukämischen Klon maskiert wurde oder im Verlauf neu entstand.

Das dritte Mutationsmuster umfasst Mutationen, die zu allen vier analysierten Zeitpunkten nachgewiesen werden konnten und betraf fünf Patienten (5/100, 5%). Diese wiesen mit durchgehend mindestens MMR ein gutes Therapieansprechen auf. Angesichts dieser Dynamik ist davon auszugehen, dass diese Mutationen der *BCR::ABL1*-Genfusion vorausgingen, was auf einen mehrstufigen Prozess bei der Pathogenese der CML in diesen Patienten hindeuten könnte, wie in der Literatur vorbeschrieben (Fialkow et al. 1981, Raskind et al. 1993, Schmidt et al. 2014, Kim et al. 2017). Bei Patient #66 konnte eine solche persistierende Mutation im *Calreticulin* (*CALR*) Gen nachgewiesen werden. Die VAF der *CALR*-Mutation lag zum Monat 12 etwas höher als zum Erstdiagnosezeitpunkt und hielt sich über die weiteren Analysezeitpunkte auf diesem Niveau bei anhaltender MMR. *CALR*-Mutationen gehören als bekannte Treibermutationen von *BCR::ABL1*-negativen MPN zu deren

Diskussion der Ergebnisse

Diagnosekriterien (Arber et al. 2016). Es ist denkbar, dass die *CALR*-Mutation auch nach Eradikation des *BCR::ABL1* tragenden Teil des Klons zu einem Vorteil im klonalen Wettbewerb führt. Bei vier weiteren Patienten lag jeweils eine *DNMT3A*-Mutation vor. Unter TKI-Therapie reduzierte sich die VAF jeweils im Vergleich zur Erstdiagnose und wies im weiteren Verlauf keine auffällige Dynamik auf. Auch hier ist von einem präleukämischen Zellklon mit sekundärem Erwerb der *BCR::ABL1*-Genfusion auszugehen.

DNMT3A-Mutationen werden als häufiger Auslöser von CHIP beschrieben (Genovese et al. 2014, Jaiswal et al. 2014, Xie et al. 2014). Es ist denkbar, dass es sich bei den persistierenden *DNMT3A*-Mutationen um alters-assoziierte Ereignisse handelt, welche die Patienten möglicherweise für die Entstehung einer CML prädisponierten. Patienten mit CHIP-Mutationen haben ein erhöhtes Risiko, eine hämatologische Krebserkrankung im Allgemeinen zu entwickeln (Genovese et al. 2014, Jaiswal et al. 2014). Die Daten bezüglich der CML im Speziellen sind aktuell noch nicht ausreichend, um eine Aussage zur Rolle von CHIP-Mutationen bei deren Pathogenese oder Evolution zu treffen (Branford et al. 2019). Dank der zunehmend erweiterten Datenlage wird diese Rolle zukünftig zweifelsfrei besser verstanden werden (Schmidt et al. 2014, Kim et al. 2017, Branford et al. 2018, Branford et al. 2019)

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei der Mehrzahl der Patienten mit Mutationen zum Diagnosezeitpunkt lediglich eine Zusatzmutation gefunden (47/53; 89%). Auch hier scheint sich die chronische Phase der CML von der Blastenphase und anderen myeloischen Erkrankungen zu unterscheiden. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei Vorliegen einer Blastenphase häufig mehrere Zusatzmutationen nachgewiesen werden können (Grossmann et al. 2011, Branford et al. 2018). Gleiches gilt für Patienten mit MDS und AML (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013, Haferlach et al. 2014). Die klonale Architektur der chronischen Phase der CML scheint somit weniger komplex als die anderer myeloischer Erkrankungen. In fünf der hier analysierten Fälle (#36, #66, #171, #177 und #180) lagen zur Erstdiagnose jedoch zwei Mutationen vor. Besonders interessant ist der Fall #159, bei dem jeweils eine Mutation in drei verschiedenen Genen vorlag. Zum Monat 12 wurde bei diesem Patienten mittels Sanger-Sequenzierung eine Y253H *BCR::ABL1*-Mutation nachgewiesen. Es handelt sich um den einzigen Patienten der Kohorte, der eine Blastenphase entwickelte. Der Patient starb 21 Monate nach Therapiebeginn. Dies

Diskussion der Ergebnisse

unterstreicht, dass eine höhere Anzahl detektierter Mutationen möglicherweise mit einem schlechteren Krankheitsverlauf einhergeht. Angesichts der niedrigen Fallzahlen von Patienten mit mehr als einer Zusatzmutation sind weitere Analysen notwendig, um zu prüfen, ob das Vorliegen von mehreren Mutationen tatsächlich einen negativen Einfluss auf das Therapieansprechen hat. Dies ist beispielsweise bei Patienten mit AML oder CMML bereits belegt (Elena et al. 2016, Papaemmanuil et al. 2016). Neben einer erhöhten Stichprobengröße könnten insbesondere vollständige Exom- oder Genom-Analysen bei weiterführenden Untersuchungen nützliche Erkenntnisse zum Einfluss der Mutationsanzahl liefern.

Zur Identifikation von Mutationen wurde ein NGS-Panel genutzt, welches 54 mit myeloischer Leukämie assoziierte Gene enthält. Gene wurden entweder komplett oder in relevanten *hotspot*-Regionen sequenziert. Da nicht alle Exons von *ABL1* in dem Panel enthalten waren, wurde zusätzlich Sanger-Sequenzierung genutzt, wenn ein Patient die Kriterien für ein Therapieversagen erfüllte (Baccarani et al. 2013). Bei der Bewertung der gefundenen Mutationen wurde ein Sensitivitätslevel von mindestens 5% VAF angewandt. Mutationen mit einer geringeren VAF wurden nur berücksichtigt, wenn die gleiche Mutation zu einem anderen Zeitpunkt bei den betroffenen Patienten detektiert wurde. Für zukünftige Analysen ist die Anwendung von *error-corrected* NGS zur Erhöhung der Sensitivität denkbar, wie auch für die MRD-Diagnostik der AML empfohlen (Ghannam et al. 2020, Patkar et al. 2021, Döhner et al. 2022). Im Übrigen wurden die von Branford et al. (Branford et al. 2019) publizierten Kriterien zur Beurteilung der Pathogenität angewandt, um die Krankheitsrelevanz und –assoziation gefundener Variationen sicherzustellen. Eine Kombination von DNA-Analysen mit Expressionsanalysen auf RNA- und Proteinebene könnte bei der Identifizierung relevanter Veränderungen zusätzlich hilfreich sein und zu einem besseren Verständnis molekularer Hintergründe beitragen. Vollständige Exom- oder Genom-Sequenzierung könnte darüber hinaus dabei helfen, weitere Mutationen zu detektieren.

Mit Erweiterung der Datenlage bezüglich Zusatzmutationen zu *BCR::ABL1*, speziell *ASXL1*-Mutationen, wird sich zeigen, ob sich dadurch die Risikostratifizierung und möglicherweise auch die Therapie der CML verbessern lässt.

5 Schlussfolgerungen

Ziel der hier vorliegenden Promotionsarbeit und eingebundenen Publikation war es, Zusatzmutationen zur *BCR::ABL1*-Genfusion hinsichtlich ihrer Prävalenz, Kinetik und prognostischen Relevanz bei CML-Patienten zu untersuchen. Die Therapie der untersuchten Patienten erfolgte im Rahmen einer multizentrischen klinischen prospektiven Studie (TIGER-Studie). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wurde bei etwa einem Viertel der Patienten eine Zusatzmutation detektiert. Anhand der Analyse von Verlaufsproben konnten drei Kinetik-Muster nachgewiesen werden: Eradikation, Neuauftreten, und Persistenz.

Am häufigsten betroffen war das Gen *ASXL1*. Patienten mit *ASXL1*-Mutation wiesen im Vergleich mit allen anderen Patienten seltener eine MMR zu Monat 12, 18, und 24 und somit ein unterlegenes Therapieansprechen auf. Nach Erforschung des zu Grunde liegenden Signalwegs, sind darin eingreifende Therapien denkbar, um das Ansprechen von Patienten mit *ASXL1*-Mutationen zu verbessern. Patienten mit *ASXL1*-Mutation wurden außerdem signifikant häufiger als Hochrisiko stratifiziert und waren durchschnittlich jünger. Nach weiterer Evaluation könnte der *ASXL1*-Mutationsstatus als zusätzlicher prognostischer Marker für neu diagnostizierte CML-Patienten dienen.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127 (20):2391-2405.
- Asada S, Fujino T, Goyama S, Kitamura T. 2019. The role of ASXL1 in hematopoiesis and myeloid malignancies. *Cell Mol Life Sci*, 76 (13):2511-2523.
- Asada S, Goyama S, Inoue D, Shikata S, Takeda R, Fukushima T, Yonezawa T, Fujino T, Hayashi Y, Kawabata KC, Fukuyama T, Tanaka Y, Yokoyama A, Yamazaki S, Kozuka-Hata H, Oyama M, Kojima S, Kawazu M, Mano H, Kitamura T. 2018. Mutant ASXL1 cooperates with BAP1 to promote myeloid leukaemogenesis. *Nat Commun*, 9 (1):2733.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Martinelli G, Mayer J, Muller MC, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rousselot P, Saglio G, Saussele S, Schiffer C, Silver R, Simonsson B, Steegmann JL, Goldman JM, Hehlmann R. 2013. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 122 (6):872-884.
- Balasubramani A, Larjo A, Bassein JA, Chang X, Hastie RB, Togher SM, Lahdesmaki H, Rao A. 2015. Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex. *Nat Commun*, 6:7307.
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, Ebert BL. 2011. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*, 364 (26):2496-2506.
- Bidikian A, Kantarjian H, Jabbour E, Short NJ, Patel K, Ravandi F, Sasaki K, Issa GC. 2022. Prognostic impact of ASXL1 mutations in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer J*, 12 (10):144.
- Bocchia M, Vannucchi AM, Gozzetti A, Guglielmelli P, Poli G, Crupi R, Defina M, Bosi A, Francesco L. 2007. Insights into JAK2-V617F mutation in CML. *Lancet Oncol*, 8 (10):864-866.
- Bornhauser M, Mohr B, Oelschlaegel U, Bornhauser P, Jacki S, Ehninger G, Thiede C. 2007. Concurrent JAK2(V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis. *Leukemia*, 21 (8):1824-1826.
- Branford S, Kim DDH, Apperley JF, Eide CA, Mustjoki S, Ong ST, Nteliopoulos G, Ernst T, Chuah C, Gambacorti-Passerini C, Mauro MJ, Druker BJ, Kim DW, Mahon FX, Cortes J, Radich JP, Hochhaus A, Hughes TP, International

- CMLFGA. 2019. Laying the foundation for genomically-based risk assessment in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 33 (8):1835-1850.
- Branford S, Wang P, Yeung DT, Thomson D, Purins A, Wadham C, Shahrin NH, Marum JE, Nataren N, Parker WT, Geoghegan J, Feng J, Shanmuganathan N, Mueller MC, Dietz C, Stangl D, Donaldson Z, Altamura H, Georgievski J, Braley J, Brown A, Hahn C, Walker I, Kim SH, Choi SY, Park SH, Kim DW, White DL, Yong ASM, Ross DM, Scott HS, Schreiber AW, Hughes TP. 2018. Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease. *Blood*, 132 (9):948-961.
- Cambier N, Renneville A, Cazaentre T, Soenen V, Cossement C, Giraudier S, Gardel N, Lai JL, Rose C, Preudhomme C. 2008. JAK2V617F-positive polycythemia vera and Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia: one patient with two distinct myeloproliferative disorders. *Leukemia*, 22 (7):1454-1455.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ, Jr., Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL, Kulkarni S, Lamprecht TL, Larson DE, Lin L, Lu C, McLellan MD, McMichael JF, Payton J, Schmidt H, Spencer DH, Tomasson MH, Wallis JW, Wartman LD, Watson MA, Welch J, Wendl MC, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield Y, Chiu R, Chu A, Chuah E, Chun HJ, Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, Holt RA, Jones S, Karsan A, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall K, Parker J, Pleasance E, Plettner P, Schein J, Stoll D, Swanson L, Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zhao Y, Gabriel S, Getz G, Sougnez C, Zou L, Leiserson MD, Vandin F, Wu HT, Applebaum F, Baylin SB, Akbani R, Broom BM, Chen K, Motter TC, Nguyen K, Weinstein JN, Zhang N, Ferguson ML, Adams C, Black A, Bowen J, Gastier-Foster J, Grossman T, Lichtenberg T, Wise L, Davidsen T, Demchok JA, Shaw KR, Sheth M, Sofia HJ, Yang L, Downing JR, Eley G. 2013. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 368 (22):2059-2074.
- Chou WC, Huang HH, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay W, Ko BS, Wu SJ, Huang SY, Hsu SC, Chen YC, Huang YN, Chang YC, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tseng MH, Huang CF, Tien HF. 2010. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood*, 116 (20):4086-4094.
- Cross NC, White HE, Muller MC, Saglio G, Hochhaus A. 2012. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 26 (10):2172-2175.
- Cross NC, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, Lange T, Lion T, Machova Polakova K, Dulucq S, Martinelli G, Oppliger Leibundgut E, Pallisgaard N, Barbany G, Sacha T, Talmaci R, Izzo B, Saglio G, Pane F, Muller MC, Hochhaus A. 2015. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 29 (5):999-1003.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Devillier R, Mansat-De Mas V, Gelsi-Boyer V, Demur C, Murati A, Corre J, Prebet T, Bertoli S, Brecqueville M, Arnoulet C, Recher C, Vey N, Mozziconacci MJ, Delabesse E, Birnbaum D. 2015. Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes. *Oncotarget*, 6 (10):8388-8396.
- Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Godley LA, Hasserjian RP, Larson RA, Levine RL, Miyazaki Y, Niederwieser D, Ossenkoppele G, Rollig C, Sierra J, Stein EM, Tallman MS, Tien HF, Wang J, Wierzbowska A, Lowenberg B. 2022. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*, 140 (12):1345-1377.
- Elena C, Galli A, Such E, Meggendorfer M, Germing U, Rizzo E, Cervera J, Molteni E, Fasan A, Schuler E, Ambaglio I, Lopez-Pavia M, Zibellini S, Kuendgen A, Travaglino E, Sancho-Tello R, Catricala S, Vicente AI, Haferlach T, Haferlach C, Sanz GF, Malcovati L, Cazzola M. 2016. Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, 128 (10):1408-1417.
- Ernst T, Busch M, Rinke J, Ernst J, Haferlach C, Beck JF, Hochhaus A, Gruhn B. 2018. Frequent ASXL1 mutations in children and young adults with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 32 (9):2046-2049.
- Fialkow PJ, Martin PJ, Najfeld V, Penfold GK, Jacobson RJ, Hansen JA. 1981. Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 58 (1):158-163.
- Fujino T, Goyama S, Sugiura Y, Inoue D, Asada S, Yamasaki S, Matsumoto A, Yamaguchi K, Isobe Y, Tsuchiya A, Shikata S, Sato N, Morinaga H, Fukuyama T, Tanaka Y, Fukushima T, Takeda R, Yamamoto K, Honda H, Nishimura EK, Furukawa Y, Shibata T, Abdel-Wahab O, Suematsu M, Kitamura T. 2021. Mutant ASXL1 induces age-related expansion of phenotypic hematopoietic stem cells through activation of Akt/mTOR pathway. *Nat Commun*, 12 (1):1826.
- Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. 2012. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*, 5:12.
- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D. 2009. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 145 (6):788-800.
- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, Adelaide J, Carbuccia N, Esterni B, Finetti P, Murati A, Arnoulet C, Zerazhi H, Fezoui H, Tadriz Z, Nezri M, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D. 2010. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 151 (4):365-375.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M, Purcell SM, Svantesson O, Landen M, Hoglund M, Lehmann S, Gabriel SB, Moran JL, Lander ES, Sullivan PF, Sklar P, Gronberg H, Hultman CM, McCarroll SA. 2014. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*, 371 (26):2477-2487.
- Ghannam J, Dillon LW, Hourigan CS. 2020. Next-generation sequencing for measurable residual disease detection in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 188 (1):77-85.
- Grossmann V, Kohlmann A, Zenger M, Schindela S, Eder C, Weissmann S, Schnittger S, Kern W, Muller MC, Hochhaus A, Haferlach T, Haferlach C. 2011. A deep-sequencing study of chronic myeloid leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9% of cases. *Leukemia*, 25 (3):557-560.
- Guo Y, Yang H, Chen S, Zhang P, Li R, Nimer SD, Harbour JW, Xu M, Yang FC. 2018. Reduced BAP1 activity prevents ASXL1 truncation-driven myeloid malignancy in vivo. *Leukemia*, 32 (8):1834-1837.
- Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S. 2014. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 28 (2):241-247.
- Hasford J, Pffirmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, Alimena G, Steegmann JL, Ansari H. 1998. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst*, 90 (11):850-858.
- Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G, Guilhot F, Porkka K, Ossenkoppele G, Lindoerfer D, Simonsson B, Pffirmann M, Hehlmann R. 2011. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*, 118 (3):686-692.
- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M, European L. 2007. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, 370 (9584):342-350.
- Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, Baccarani M, Deininger MW, Cervantes F, Fujihara S, Ortmann CE, Menssen HD, Kantarjian H, O'Brien SG, Druker BJ, Investigators I. 2017. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 376 (10):917-927.
- Hochhaus A, Burchert A, Saussele S, Baerlocher GM, Brümmendorf TH, La Rosée P, Heim D, Krause SW, le Coutre PD, Niederwieser D, Lange T, Fabarius A,

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Hänel M, Stegelmann F, Mayer J, Gil A, Himsel D, Hasford J, Hehlmann R, Ernst T, Fabisch C, Pfirrmann M. 2019. Nilotinib Vs Nilotinib Plus Pegylated Interferon α (Peg-IFN) Induction and Nilotinib or Peg-IFN Maintenance Therapy for Newly Diagnosed BCR-ABL1 Positive Chronic Myeloid Leukemia Patients in Chronic Phase (TIGER Study): The Addition of Peg-IFN Is Associated with Higher Rates of Deep Molecular Response. *Blood*, 134 (Supplement_1):495-495.
- Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Deininger MW, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Janssen J, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Mayer J, Nicolini F, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rea D, Richter J, Rosti G, Rousselot P, Saglio G, Saussele S, Soverini S, Steegmann JL, Turkina A, Zaritskey A, Hehlmann R. 2020. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 34 (4):966-984.
- Hussein K, Bock O, Seegers A, Flasshove M, Henneke F, Buesche G, Kreipe HH. 2007. Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation. *Blood*, 109 (9):4106-4107.
- Inami M, Inokuchi K, Okabe M, Kosaka F, Mitamura Y, Yamaguchi H, Dan K. 2007. Polycythemia associated with the JAK2V617F mutation emerged during treatment of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*, 21 (5):1103-1104.
- Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, Berthon C, Ades L, Fenaux P, Beyne-Rauzy O, Vey N, Braun T, Haferlach T, Dreyfus F, Cross NC, Preudhomme C, Bernard OA, Fontenay M, Vainchenker W, Schnittger S, Birnbaum D, Droin N, Solary E. 2013. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 31 (19):2428-2436.
- Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL. 2014. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*, 371 (26):2488-2498.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC. 2005. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 106 (6):2162-2168.
- Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, Erpelink-Verschueren CAJ, Gradowska PL, Meijer R, Cloos J, Biemond BJ, Graux C, van Marwijk Kooy M, Manz MG, Pabst T, Passweg JR, Havelange V,

- Ossenkoppele GJ, Sanders MA, Schuurhuis GJ, Lowenberg B, Valk PJM. 2018. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 378 (13):1189-1199.
- Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X, Chng WJ, Choi JK, Colmenero I, Coupland SE, Cross NCP, De Jong D, Elghetany MT, Takahashi E, Emile JF, Ferry J, Fogelstrand L, Fontenay M, Germing U, Gujral S, Haferlach T, Harrison C, Hodge JC, Hu S, Jansen JH, Kanagal-Shamanna R, Kantarjian HM, Kratz CP, Li XQ, Lim MS, Loeb K, Loghavi S, Marcogliese A, Meshinchi S, Michaels P, Naresh KN, Natkunam Y, Nejati R, Ott G, Padron E, Patel KP, Patkar N, Picarsic J, Platzbecker U, Roberts I, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Tembhare P, Tyner J, Verstovsek S, Wang W, Wood B, Xiao W, Yeung C, Hochhaus A. 2022. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, 36 (7):1703-1719.
- Kim T, Tyndel MS, Kim HJ, Ahn JS, Choi SH, Park HJ, Kim YK, Kim SY, Lipton JH, Zhang Z, Kim DD. 2017. Spectrum of somatic mutation dynamics in chronic myeloid leukemia following tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*, 129 (1):38-47.
- Kramer A, Reiter A, Kruth J, Erben P, Hochhaus A, Muller M, Cross NC, Jones AV, Ho AD, Hensel M. 2007. JAK2-V617F mutation in a patient with Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*, 8 (7):658-660.
- Martin-Cabrera P, Haferlach C, Kern W, Schnittger S, Haferlach T. 2017. BCR-ABL1-positive and JAK2 V617F-positive clones in 23 patients with both aberrations reveal biologic and clinical importance. *Br J Haematol*, 176 (1):135-139.
- Medina EA, Delma CR, Yang FC. 2022. ASXL1/2 mutations and myeloid malignancies. *J Hematol Oncol*, 15 (1):127.
- Melo JV, Barnes DJ. 2007. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 7 (6):441-453.
- Metzeler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrozek K, Nicolet D, Whitman SP, Wu YZ, Schwind S, Powell BL, Carter TH, Wetzler M, Moore JO, Kolitz JE, Baer MR, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD. 2011. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood*, 118 (26):6920-6929.
- Nteliopoulos G, Bazeos A, Claudiani S, Gerrard G, Curry E, Szydlo R, Alikian M, Foong HE, Nikolakopoulou Z, Loaiza S, Khorashad JS, Milojkovic D, Perrotti D, Gale RP, Foroni L, Apperley JF. 2019. Somatic variants in epigenetic modifiers can predict failure of response to imatinib but not to second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica*, 104 (12):2400-2409.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, Van Loo P, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O'Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF, Ganser A, Dohner K, Schlenk RF, Dohner H, Campbell PJ. 2016. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 374 (23):2209-2221.
- Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Herzig JK, Aulitzky T, Bullinger L, Spath D, Teleanu V, Kundgen A, Kohne CH, Brossart P, Held G, Horst HA, Ringhoffer M, Gotze K, Nachbaur D, Kindler T, Heuser M, Thol F, Ganser A, Dohner H, Dohner K. 2015. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica*, 100 (3):324-330.
- Patkar N, Kakirde C, Shaikh AF, Salve R, Bhanshe P, Chatterjee G, Rajpal S, Joshi S, Chaudhary S, Kodgule R, Ghoghale S, Deshpande N, Shetty D, Khizer SH, Jain H, Bagal B, Menon H, Khattry N, Sengar M, Tembhare P, Subramanian P, Gujral S. 2021. Clinical impact of panel-based error-corrected next generation sequencing versus flow cytometry to detect measurable residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia*, 35 (5):1392-1404.
- Patnaik MM, Itzykson R, Lasho TL, Kosmider O, Finke CM, Hanson CA, Knudson RA, Ketterling RP, Tefferi A, Solary E. 2014. ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients. *Leukemia*, 28 (11):2206-2212.
- Patnaik MM, Padron E, LaBorde RR, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, Hodnefield JM, Knudson RA, Ketterling RP, Al-kali A, Pardanani A, Ali NA, Komrokji RS, Tefferi A. 2013. Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes. *Leukemia*, 27 (7):1504-1510.
- Pfirschmann M, Baccharani M, Saussele S, Guilhot J, Cervantes F, Ossenkoppele G, Hoffmann VS, Castagnetti F, Hasford J, Hehlmann R, Simonsson B. 2016. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 30 (1):48-56.
- Pieri L, Spolverini A, Scappini B, Occhini U, Birtolo S, Bosi A, Albano F, Fava C, Vannucchi AM. 2011. Concomitant occurrence of BCR-ABL and JAK2V617F mutation. *Blood*, 118 (12):3445-3446.
- Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, Koenders JE, Kavelaars FG, Erpelinck-Verschueren CA, Zeilemakers A, Lowenberg B, Valk PJ. 2012. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica*, 97 (3):388-392.
- Raskind WH, Ferraris AM, Najfeld V, Jacobson RJ, Moohr JW, Fialkow PJ. 1993. Further evidence for the existence of a clonal Ph-negative stage in some cases of Ph-positive chronic myelocytic leukemia. *Leukemia*, 7 (8):1163-1167.

- Ren R. 2005. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 5 (3):172-183.
- Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. 2019. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res*, 47 (D1):D886-D894.
- Schmidt M, Rinke J, Schafer V, Schnittger S, Kohlmann A, Obstfelder E, Kunert C, Ziermann J, Winkelmann N, Eigendorff E, Haferlach T, Haferlach C, Hochhaus A, Ernst T. 2014. Molecular-defined clonal evolution in patients with chronic myeloid leukemia independent of the BCR-ABL status. *Leukemia*, 28 (12):2292-2299.
- Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, Kohlmann A, Illig T, Klopp N, Wichmann HE, Kreuzer KA, Schmid C, Staib P, Peceny R, Schmitz N, Kern W, Haferlach C, Haferlach T. 2013. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*, 27 (1):82-91.
- Soderquist CR, Ewalt MD, Czuchlewski DR, Geyer JT, Rogers HJ, Hsi ED, Wang SA, Bueso-Ramos CE, Orazi A, Arber DA, Hexner EO, Babushok DV, Bagg A. 2018. Myeloproliferative neoplasms with concurrent BCR-ABL1 translocation and JAK2 V617F mutation: a multi-institutional study from the bone marrow pathology group. *Mod Pathol*, 31 (5):690-704.
- Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, Tso CY, Braun TJ, Clarkson BD, Cervantes F, et al. 1984. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*, 63 (4):789-799.
- Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, Pane F, Muller MC, Ernst T, Rosti G, Porkka K, Baccarani M, Cross NC, Martinelli G. 2011. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*, 118 (5):1208-1215.
- Soverini S, Martinelli G, Rosti G, Bassi S, Amabile M, Poerio A, Giannini B, Trabacchi E, Castagnetti F, Testoni N, Luatti S, de Vivo A, Cilloni D, Izzo B, Fava M, Abruzzese E, Alberti D, Pane F, Saglio G, Baccarani M. 2005. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*, 23 (18):4100-4109.
- Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, Ebert BL. 2015. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*, 126 (1):9-16.
- Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Chaturvedi A, Sharma A, Wichmann M, Gohring G, Schumann C, Bug G, Ottmann O, Hofmann WK, Schlegelberger B, Heuser M, Ganser A. 2011. Prognostic

Literatur- und Quellenverzeichnis

- significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*, 29 (18):2499-2506.
- Wang L, Birch NW, Zhao Z, Nestler CM, Kazmer A, Shilati A, Blake A, Ozark PA, Rendleman EJ, Zha D, Ryan CA, Morgan MAJ, Shilatifard A. 2021. Epigenetic targeted therapy of stabilized BAP1 in ASXL1 gain-of-function mutated leukemia. *Nat Cancer*, 2 (5):515-526.
- Wang X, Tripodi J, Kremyanskaya M, Blouin A, Roda P, Hoffman R, Najfeld V. 2013. BCR-ABL1 is a secondary event after JAK2V617F in patients with polycythemia vera who develop chronic myeloid leukemia. *Blood*, 121 (7):1238-1239.
- Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, Dpersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L. 2014. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*, 20 (12):1472-1478.
- Yang H, Kurtenbach S, Guo Y, Lohse I, Durante MA, Li J, Li Z, Al-Ali H, Li L, Chen Z, Field MG, Zhang P, Chen S, Yamamoto S, Li Z, Zhou Y, Nimer SD, Harbour JW, Wahlestedt C, Xu M, Yang FC. 2018. Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood*, 131 (3):328-341.

Anhang

Danksagung

Ich möchte mich hiermit aufrichtig bei all jenen Personen und Institutionen bedanken, die dieses Promotionsprojekt ermöglicht haben und ebenso bei all jenen, die mich auf vielfältige Weise während der Durchführung unterstützt haben.

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Andreas Hochhaus für die Möglichkeit der Promotion im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II am Universitätsklinikum Jena. Bei meinem Doktorvater apl. Prof. Dr. med. Thomas Ernst bedanke ich mich für die Vergabe des Promotionsthemas und die enthusiastische, aufmerksame Betreuung während der Laborarbeit und im Publikationsprozess.

Ich bedanke mich herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Insbesondere danke ich Dr. rer. nat. Jenny Rinke, die mich in jedem Schritt dieses Projektes unermüdlich unterstützt hat.

Bei der Studienstiftung des Deutschen Volkes bedanke ich mich für die finanzielle und auch ideelle Förderung während meines Studiums und im Speziellen während des Promotionsprojektes.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern, die für mich immer eine zuverlässige Anlaufstelle waren und mich stets mit offenen Armen und Ohren empfangen. Auch bei dem Rest meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich für die liebevolle Unterstützung bedanken.

Ein besonders großes Dankeschön gilt meinem Mann Jonas, der immer und mit unverbesserlichem Optimismus an mich geglaubt hat.

Anhang

Aus der Promotion hervorgegangene Publikation, Präsentationen und Auszeichnungen

Publikation

Jul 2022 Schönfeld L, Rinke J, Hinze A, Nagel SN, Schäfer V, Schenk T, Fabisch C, Brümmendorf TH, Burchert A, le Coutre P, Krause SW, Saussele S, Safizadeh F, Pffirmann M, Hochhaus A, Ernst T. 2022. *ASXL1* mutations predict inferior molecular response to nilotinib treatment in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **36**, 2242-2249 (2022).

Präsentationen und Auszeichnungen

Feb 2020 Posterpräsentation
„Prevalence and dynamics of BCR-ABL independent gene mutations in chronic phase CML patients“
Deutscher Krebskongress 2020 der Deutschen Krebsgesellschaft e.V.

Sep 2018 Best Abstract Award
„Prävalenz und Kinetik *BCR-ABL*-unabhängiger Genmutationen bei CML Patienten in der chronischen Phase“
Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie

Sep 2018 Anne Liese Gaebel-Wissenschaftspreis für hervorragende Arbeiten, insbesondere zur Ergründung der Ursache von Krebs

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

mir die geltende Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt (Selbstständigkeitserklärung), keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: apl. Prof. Dr. med. Thomas Ernst, Dr. rer. nat. Jenny Rinke, Prof. Dr. med. Andreas Hochhaus,

die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,

ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Mainz, 4. Juli 2024

Lioba Schönfeld