

Zentrum für Innere Medizin der Universität Ulm  
Klinik für Innere Medizin III  
Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie, Infektionskrankheiten und  
Palliativmedizin  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

**Inzidenz und prognostische Bedeutung von Mutationen  
in den Genen *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1* bei Patienten  
mit myelodysplastischem Syndrom**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der  
Universität Ulm

Vorgelegt von Berit Svenja Kolbinger,  
aus Freiburg im Breisgau

2018

Meinen Eltern, Karin und Dr. Frank Kolbinger

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. T. Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. med. V. Gaidzik

2. Berichterstatter: apl. Prof. Dr. med. M. Denking

Tag der Promotion: 14. Dezember 2018

## **Inhalt**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Myelodysplastische Syndrome (MDS)	1
1.2 Das Additional Sex Combs-Like transcriptional regulator 1 ( <i>ASXL1</i> )-Gen	9
1.3 Das Serine/ Arginine-rich splicing factor 2 ( <i>SRSF2</i> )-Gen	11
1.4 Das Runt-related transcription factor 1 ( <i>RUNX1</i> )-Gen	13
1.5 Zielsetzung	15
<b>2. Material und Methodik</b>	<b>17</b>
2.1 Material	17
2.2 Methoden	21
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1 <i>ASXL1</i>	46
3.2 <i>SRSF2</i>	53
3.3 <i>RUNX1</i>	60
<b>4. Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1 Verwendetes Material und Methodik	67
4.2 <i>ASXL1</i>	69
4.3 <i>SRSF2</i>	72
4.4 <i>RUNX1</i>	75
4.5 Schlussfolgerung	78
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
Danksagung	
Lebenslauf	

## Abkürzungsverzeichnis

<b>%</b>	Prozent
<b>°C</b>	Grad Celcius
<b>5-JÜ</b>	Fünfjahresüberleben
<b>ALL</b>	Akute Lymphatische Leukämie
<b>AML</b>	Akute Myeloische Leukämie
<b>Aqua dest./</b>	destilliertes Wasser zu Injektionszwecken
<b>Aqua ad iniectabilia</b>	
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ASX</b>	Amino-terminale Homologie-Domäne ASX
<b>ASXL1</b>	Additional sex combs like transcriptional regulator 1
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>CBF<math>\alpha</math>2</b>	Core Binding Factor $\alpha$ 2
<b>CBF<math>\beta</math></b>	Core Binding Factor $\beta$
<b>CBL</b>	Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase
<b>CCD</b>	Charge Coupled Device
<b>cDNA</b>	complementary desoxyribonucleic acid
<b>CES</b>	Core Enhancer Sequence
<b>CLL</b>	Chronische Lymphatische Leukämie
<b>CMML</b>	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
<b>CMML-1/-2</b>	1: < 5 % Blasten im peripheren Blut und < 10 % Blasten im Knochenmark, keine Auerstäbchen. 2: < 20 % Blasten im peripheren Blut und < 20 % Blasten im Knochenmark, Auerstäbchen möglich. (Leitlinie Onkopedia MDS 2016: WHO-Klassifikation (2016) myelodysplastisch/myeloproliferativer Neoplasien)
<b>CpG</b>	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
<b>CSR</b>	Cycle Sequencing Reaction
<b>CTP</b>	Cytidintriphosphat
<b>D1-Puffer</b>	Denaturierungspuffer 1
<b>Da</b>	Dalton

<b>del</b>	Deletion
<b>ddNTPs</b>	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
<b>DGHO</b>	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie
<b>DLB-Puffer</b>	Dual Live Buffer
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleic acid
<b>Dnasen</b>	Enzyme, die die Spaltung von DNA katalysieren
<b>DNMT3A</b>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha
<b>dNTPs</b>	Desoxynukleosid-Triphosphate
<b>DSMO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EB-Puffer</b>	Elution buffer
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetate
<b>EPO</b>	Erythropoetin
<b>ETO</b>	Eight, Twenty-One-Protein
<b>ETP</b>	Enhancer of Trithorax and Polycomb
<b>EVI1</b>	Ecotropic Viral Integration site 1
<b>EZH2</b>	Enhancer of Zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
<b>F</b>	Vorwärtsprimer (forward)
<b>FISH</b>	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
<b>G-CSF</b>	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (granulocyte-colony stimulating factor)
<b>g</b>	Gramm
<b>GATA2</b>	GATA binding protein 2
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	Stunde (hour)
<b>Hb</b>	Hämoglobin
<b>HiDi</b>	Highly Deionized
<b>IDH1/2</b>	Isocitrate Dehydrogenase 1/2
<b>IPSS</b>	International Prognostic Scoring System
<b>IPSS-R</b>	International Prognostic Scoring System- Revised
<b>J</b>	Jahre
<b>JAK2</b>	Janus kinase 2
<b>kb</b>	Kilobasen (= 1000 Basenpaare)
<b>kbp</b>	Kilobasenpaare
<b>KM</b>	Knochenmark

<b>komb.</b>	kombiniert
<b>KRAS</b>	Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
<b>MDS</b>	Myelodysplastische Syndrome
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MNC</b>	Mononuclear cells
<b>MP-PCR</b>	Multiplex polymerase chain reaction
<b>MPS</b>	Myeloproliferative Syndrome
<b>MUT/mut</b>	Mutiert
<b>n</b>	Anzahl
<b>N1-Puffer</b>	Neutralisierungspuffer 1
<b>NF1</b>	Neurofibromatose 1
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NM</b>	Nukleäres Matrixhaftungsmotiv
<b>NPM1</b>	Nucleophosmin 1
<b>NR</b>	Nuclear Receptor
<b>NRAS</b>	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
<b>NTC</b>	No Template Control
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>OS</b>	Overall Survival
<b><i>P</i></b>	p-value; probability (Signifikanzwert)
<b>PB</b>	Peripheres Blut
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PcG</b>	Polycomb Group
<b>PHD</b>	Plant Homeo Domain
<b>pmol</b>	Picomol
<b>polymorph</b>	Polymorphismus
<b>PPAR-g</b>	Peroxisomenproliferator-aktivierender Rezeptor $\gamma$
<b>pre-mRNA</b>	Precursor messenger ribonucleic acid
<b>PST</b>	Prolin/Serin/Threonin-reiche Region
<b>R</b>	Rückwärtsprimer (rewind)

<b>RA</b>	Refraktäre Anämie
<b>RAEB</b>	Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung
<b>RAR</b>	Retinolsäurerezeptor (retinol acid receptor)
<b>RARA</b>	Retinolsäurerezeptor-Aktivator (retinol acid receptor activator)
<b>RARS</b>	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
<b>Rb</b>	Retinoblastom-Protein
<b>RCMD</b>	Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien mit oder ohne Ringsideroblasten
<b>RCUD</b>	Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie
<b>RD</b>	Runt DNA-Bindungsdomäne
<b>RN</b>	Refraktäre Neutropenie
<b>RNA</b>	Ribonucleid acid
<b>Rnasen</b>	Enzyme, die Spaltung von RNA katalysieren
<b>RPMI-Medium</b>	Roswell Park Memorial Institute medium
<b>RRM</b>	RNA recognition motif
<b>RS</b>	Arginine/Serine-rich domain
<b>RT</b>	Refraktäre Thrombopenie
<b>RUNX1/2/3</b>	Runt- related transcription factor 1/2/3
<b>RXR</b>	Retinoid X Receptor
<b>S</b>	Svedberg (Sedimentationsverhalten nach Svedberg, Größenangabe bei rRNA)
<b>Schmelztemp.</b>	Schmelztemperatur
<b>sec</b>	Sekunde(n)
<b>SETBP1</b>	SET binding protein 1
<b>SF3B1</b>	Splicing Factor 3b subunit 1
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>snRNP</b>	Small Nuclear Ribonucleic Protein Complex
<b>SRSF1/2</b>	Serine/arginine-rich splicing factor 1/2
<b>TA</b>	C-Terminale transkriptionale Transaktivierungsdomäne
<b>TAE</b>	Tris base, acetic acid, EDTA
<b>TE</b>	Tris base, EDTA
<b>TET2</b>	Tet methylcytosine dioxygenase 2
<b>Tm</b>	Maximaltemperatur
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$

<b>TP53</b>	Tumor protein p53
<b>TTP</b>	Thymidintriphosphat
<b>TX</b>	Transplantation
<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>U2AF1</b>	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
<b>UE</b>	Untereinheit
<b>UV</b>	Ultraviolettes Licht
<b>V</b>	Volt
<b>Vol</b>	Volumen
<b>VWRPY-Motiv</b>	Groucho-bindender Co-Repressor
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>ZRSR2</b>	Zinc finger, RNA-binding motif and serine/arginine-rich 2
$\lambda$	Lambda, Wellenlänge
$\mu\text{l}$	Mikroliter

# **1. Einleitung**

## **1.1 Myelodysplastische Syndrome (MDS)**

### **1.1.1 Definition des MDS**

Unter dem Begriff 'Myelodysplastische Syndrome' (MDS) versteht man eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Knochenmarks, bei welchen die hämatopoetische Stammzelle betroffen ist und es dadurch zu Dysplasien von Knochenmarks- und Blutzellen sowie zu Zytopenien kommt. Infolgedessen entwickelt sich eine hämatopoetische Insuffizienz und das Risiko der Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie steigt (Tefferi 2009). In Deutschland liegt die Inzidenz des MDS bei 4,15/100 000 Einwohnern pro Jahr (Neukirchen et al. 2011), womit das MDS zu einer der häufigsten hämatologischen Erkrankungen zählt. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 75 Jahren, wobei Frauen etwas seltener erkranken als Männer. Bei ca. 10% des MDS handelt es sich um sekundäre Formen, die durch vorangegangene Chemo- oder Strahlentherapie ausgelöst wurden; bei ca. 90% der MDS lässt sich jedoch keine bestimmte Noxen-Exposition nachweisen.

Typische Symptome eines MDS sind von der hämatopoetischen Insuffizienz abzuleiten: durch verminderte Erythrozytenzahl kommt es zur Anämie, welche unter anderem Müdigkeit, Blässe und Leistungsminderung als Symptome hat; durch verminderte Thrombozyten kommt es zu einer erhöhten Blutungsneigung und verminderte Leukozyten führen zu einer gehäuften Infektanfälligkeit.

### **1.1.2 Zytomorphologie und Genetik-Risikostratifizierung des MDS**

Zur Diagnosestellung müssen mindestens 10% der Zellen einer betroffenen Zellreihe Dysplasiezeichen aufweisen, wobei auch in allen Zellreihen Dysplasien vorkommen können (Arber et al. 2016). Bei Diagnosestellung weisen 50% der Patienten chromosomale Aberrationen auf (Schanz 2012). Da das MDS eine Ausschlussdiagnose ist, gehört zur Diagnosestellung die Anfertigung eines Blutbildes, eines Differentialblutbildes und eine Knochenmarkuntersuchung. Vor

allein die Zytomorphologie ist hier entscheidend, da hierdurch Dysplasien erkannt werden können und der Blastengehalt sowohl für die Stellung der Diagnose als auch für die weitere Risikostratifizierung von entscheidender Bedeutung ist. Ein Problem allerdings ist, dass die Untersuchung von peripherem Blut oder Knochenmark auf Anzeichen von Dysplasien sehr untersucherabhängig ist und es daher eine starke Varianz in der MDS-Diagnosestellung gibt (Font et al. 2013). Da diese Klassifizierung entscheidend für die Risikostratifizierung und nachfolgende Therapie ist, ist es möglich, dass MDS-Patienten untersucherabhängig unterschiedlichen Subklassifikationen zugeordnet werden und konsekutiv möglicherweise auch eine andere Therapie erhalten.

Die myelodysplastischen Syndrome wurden anhand der WHO-Klassifikation in verschiedene Subtypen unterteilt; Kriterien hierfür sind die Anzahl der betroffenen Zellreihen mit Zytopenie, der Blastenanteil im Knochenmark und der Nachweis von Ringsideroblasten oder Auerstäbchen.

**Tabelle 1: WHO-Klassifikation 2008 myelodysplastischer Syndrome** (nach Leitlinie MDS der DGHO Onkopedia, 2013, Stand März 2014). Bisherige Unterteilung der myelodysplastischen Syndrome (MDS) in die verschiedenen Subtypen abhängig von verschiedenen Unterscheidungsmerkmalen in peripherem Blut und Knochenmark. del= Deletion.

<b>MDS-Subtyp</b>	<b>Blut</b>	<b>Knochenmark</b>
Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie ( <b>RCUD</b> ), <b>RA</b> (refraktäre Anämie), <b>RN</b> (refraktäre Neutropenie), <b>RT</b> (refraktäre Thrombopenie)	Uni- oder Bizytopenie, < 1% Blasten	Dysplasien in $\geq 10\%$ der Zellen einer Reihe, <5% Blasten
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten ( <b>RARS</b> )	Anämie, keine Blasten	$\geq 15\%$ Ringsideroblasten innerhalb der Erythropoiese, ausschließlich Dyserythropoiese, <5% Blasten
Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien ( <b>RCMD</b> ) mit oder ohne Ringsideroblasten	Zytopenie(n), < 1% Blasten, <1000/ $\mu$ l Monozyten	Dysplasien in $\geq 10\%$ der Zellen von 2-3 Reihen, <5% Blasten
MDS mit isolierter del(5q)	Anämie, $\leq 1\%$ Blasten, Thrombozyten oft vermehrt	meist typische mononukleäre Megakaryozyten, isolierte del(5q) Anomalie, <5% Blasten
Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung I ( <b>RAEB I</b> )	Zytopenie(n), <5% Blasten, <1000/ $\mu$ l Monozyten	Uni- oder multilineäre Dysplasien, Blasten 5-9%, keine Auerstäbchen
Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung II ( <b>RAEB II</b> )	Zytopenie(n), <20% Blasten, <1000/ $\mu$ l Monozyten	Uni- oder multilineäre Dysplasien, Blasten 10-19%, Auerstäbchen möglich
Unklassifizierte MDS: a) <b>RCUD</b> mit Panzytopenie b) <b>RCMD/RCUD</b> mit 1 % Blasten im Blut c) MDS-typische chromosomale Aberration ohne klare Dysplasiezeichen	$\leq 1\%$ Blasten, <1000/ $\mu$ l Monozyten	<5% Blasten

Im April 2016 wurde eine überarbeitete Version der WHO-Klassifikation für myeloide Neoplasien und akute Leukämien vorgestellt (Arber et al. 2016), welche in der folgenden Tabelle (Tabelle 2) kurz erklärt wird. Neben Änderung der Bezeichnungen für die verschiedenen Subtypen des MDS wurden die Gruppe des MDS del(5q) um Patienten erweitert, die auch eine einzelne weitere chromosomale Aberration aufweisen (mit Ausnahme von Patienten mit einer zusätzlichen Anomalie auf Chromosom 7). Auch wurde die Gruppe der MDS-MLD (multilineage dysplasia) mit Ringsideroblasten und/ oder *SF3B1*-Mutation als eigenständige Entität definiert (Leitlinie Onkopedia MDS 2016).

**Tabelle 2: überarbeitete WHO-Klassifikation 2016 myelodysplastischer Syndrome** (nach Leitlinie MDS der DGHO Onkopedia, 2016, Stand 19.07.2016).

Aktuelle Unterteilung der myelodysplastischen Syndrome (MDS) in die verschiedenen Subtypen abhängig von verschiedenen Unterscheidungsmerkmalen in peripherem Blut und Knochenmark. Die alten Bezeichnungen aus der WHO-Klassifikation von 2008 sind in kursiv geschrieben.

\*Zytopenien definiert als Hämoglobin <10g/L, Thrombozyten <100x10<sup>9</sup>/L, Neutrophile Granulozyten <1,8x10<sup>9</sup>/L

\*\*falls *SF3B1* mutiert

\*\*\*1% periphere Blasten müssen zu 2 verschiedenen Zeitpunkten beurteilt werden

\*\*\*\*Fälle mit ≥15% Ringsideroblasten haben per Definition eine signifikante Dyserythropoiese und sind daher MDS-RS-SLD

MDS=Myelodysplastische Syndrome, RUCD=refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie, RCMD=Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien, RAEB=Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung, KM=Knochenmark, PB=peripheres Blut, non-chr=nicht auf Chromosom 7 liegend, del=Deletion

Kategorie	Dysplastische Reihen	Zytopenien*	Ringsideroblasten (% der erythroiden Zellen)	Blasten im KM und PB	Karyotyp (konventionelle Bänderung)
MDS with single lineage dysplasia (MDS-SLD) (=RUCD)	1	1 oder 2	<15% / <5%**	KM <5%, PB <1%, keine Auerstäbchen	alle, außer del(5q) +-1 andere non-chr 7 Aberration
MDS with multilineage dysplasia (MDS-MLD) (=RCMD)	2 oder 3	1 bis 3	<15% / <5%**	KM <5%, PB <1%, keine Auerstäbchen	alle, außer del(5q) +-1 andere non-chr 7 Aberration
MDS with ring sideroblasts (MDS-RS) with single lineage dysplasia (MDS-RS-SLD)	1	1 oder 2	≥15% / ≥5%**	KM <5%, PB <1%, keine Auerstäbchen	alle, außer del(5q) +-1 andere non-chr 7 Aberration
MDS with ring sideroblasts (MDS-RS) with multilineage dysplasia (MDS-RS-MLD)	2 oder 3	1 bis 3	≥15% / ≥5%**	KM <5%, PB <1%, keine Auerstäbchen	alle, außer del(5q) +-1 andere non-chr 7 Aberration
MDS with del(5q)	1 bis 3	1 bis 3	irrelevant	KM <5%, PB <1%, keine Auerstäbchen	del(5q) isoliert oder mit 1 anderen non-chr 7 Aberration
MDS with excess blasts 1 (MDS-EB1) (=RAEB I)	0 bis 3	1 bis 3	irrelevant	KM 5-9% oder PB 2-4%, keine Auerstäbchen	irrelevant
MDS with excess blasts 2 (MDS-EB2) (=RAEB II)	0 bis 3	1 bis 3	irrelevant	KM 10-19% oder PB 5-19% oder Auerstäbchen	irrelevant
MDS, unclassifiable (MDS-U) with 1% blood blasts***	1 bis 3	1 bis 3	irrelevant	KM <5%, PB=1%, keine Auerstäbchen	irrelevant
MDS, unclassifiable (MDS-U) with single lineage dysplasia and pancytopenia	1	3	irrelevant	KM <5%, PB<1%, keine Auerstäbchen	alle, außer del(5q) +-1 andere non-chr 7 Aberration
MDS, unclassifiable (MDS-U) based on defining cytogenetic abnormality	0	1 bis 3	<15%****	KM <5%, PB <1%, keine Auerstäbchen	MDS-definierende Abnormalität

Um die Risikoprognose einer erkrankten Person besser abschätzen zu können, werden zusätzlich zu Alter, Geschlecht und Komorbiditäten krankheitsbiologische Parameter, wie der medulläre Anteil der Blasten (in %), die Zahl der Zytopenien

(welche Zellreihen betroffen sind, maximal 3) und der Karyotyp (günstig, intermediär oder schlecht) hinzugezogen. Diese Parameter werden mit Hilfe des IPSS (International Prognostic Scoring System) in Score-Punkte umgerechnet, womit dann ein Gesamtrisiko-Score errechnet werden kann, welcher sich wiederum in Low Risk (0 Punkte), Intermediate Risk I (0,5 - 1 Punkte), Intermediate Risk II (1,5 - 2 Punkte) und High Risk ( $\geq 2,5$  Punkte) aufteilt. Mit Hilfe des Risiko-Scores kann entsprechend die Therapie geplant werden. 2012 wurde dieses Risiko-Scoring-System überarbeitet (IPSS-R; International Prognostic Scoring System- Revised; Greenberg et al. 2012), wobei nun neben dem Anteil der Blasten in % im Knochenmark, der Karyotyp (hier jetzt 5 anstatt 3 prognostische Subtypen), nun zusätzlich der Hb-Wert, Thrombozyten-Wert und Anzahl der neutrophilen Granulozyten mit einberechnet werden. Eingeteilt wird seitdem in die 5 Risiko-Gruppen: Very Low Risk ( $< 1,5$  Punkte), Low Risk (2 - 3 Punkte), Intermediate Risk I (3,5 - 4,5 Punkte), Intermediate Risk II (5 bis 6 Punkte) und High Risk ( $> 6$  Punkte).

**Tabelle 3: International Prognostic Scoring System/ IPSS** (nach Leitlinie MDS der DGHO Onkopedia, 2013, Stand März 2014) Med.= medullär.

\* Günstig: normal, -Y, del(5q), del(20q); Schlecht: komplex ( $\geq 3$  Anomalien) oder Aberrationen auf Chr. 7, Intermediär: anderen.

\*\* Hämoglobin  $< 10$  g/dl, Neutrophile  $< 1,8/$  nl, Thrombozyten  $< 100/$  nl

Score Punkte	0	0,5	1	1,5	2
Med. Blasten (%)	weniger als 5	5 bis 10		11 bis 20	21 bis 30
Karyotyp*	günstig	intermediär	schlecht		
Zahl der Zytopenien**	0 oder 1	2 oder 3			
<b>Risiko-Score</b>					
Low Risk	0				
Intermediate Risk I	0,5 bis 1				
Intermediate Risk II	1,5 bis 2				
High Risk	$\geq 2,5$				

**Tabelle 4: IPSS-R** (nach Leitlinie MDS der DGHO Onkopedia, 2013, Stand März 2014). Hb= Hämoglobin.

\* A: Sehr gut (-Y, del(11q)); B: Gut (Normal, del(5q), del(12p), del(20q), Doppel-Klon mit del(5q)außer chr7); C: Intermediär (del(7q), +8, +19, i(17q), andere Einzel- oder Doppel-Klone); D: Schlecht (-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), Doppel-Klon mit -7/del(7q), komplex (3 Abberationen)); E: Sehr schlecht (Komplex > 3 Aberrationen)

Score Punkte	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Karyotyp*	A		B		C	D	E
Blasten (%)	≤2		>2 bis <5		5 bis 10		>10
Hb-Wert (g/dl)	≥10		8 bis <10	<8			
Thrombozyten (/nl)	≥100	50 bis <100	<50				
Neutrophile (/nl)	≥800	<800					
<b>Risiko Score</b>							
Very Low Risk	≤1,5						
Low Risk	2 bis 3						
Intermediate I	3,5 bis 4,5						
Intermediate II	5 bis 6						
High Risk	>6						

### 1.1.3 Zyto- und molekulargenetische Veränderungen des MDS

Zusätzlich zu zytomorphologischen Veränderungen werden auch, wie oben bereits bei der WHO-Klassifikation sowie den Risiko-Scores kurz erwähnt, zytogenetische Veränderungen im Knochenmark oder im Blut der an MDS erkrankten Personen herangezogen, welche das Risikoprofil des einzelnen MDS-Patienten beeinflussen und eine bessere Aussage über Prognose und Verlauf der Erkrankung erlauben.

Neben diesen zytogenetischen Veränderungen findet man beim MDS jedoch eine eine große Anzahl genetischer Aberrationen, insbesondere Genmutationen. Bei ca. 78% (Haferlach et al. 2014: 89,5%, Cazzola et al. 2013: 90%) aller Patienten mit MDS liegt mindestens eine onkogene Mutation vor, bei ca. 43% aller Patienten mit MDS werden 2-3 onkogene Punktmutationen oder zytogenetische Abnormalitäten und bei ca. 10% sogar 4-8 Mutationen (Papaemmanuil et al. 2013) gefunden. Das leukämiefreie Überleben eines MDS-Patienten bis zur Transformation in eine akute Leukämie wird vor allem durch die Anzahl der sogenannten Driver-Mutationen (inaktivierende Mutationen für Tumorsuppressorgene und Hotspotmutationen in Onkogenen) beeinflusst, welche schon sehr früh in der Krankheitsentwicklung entstehen und die anschließende genomische Evolution der Krankheit beeinflussten (Papaemmanuil et al. 2013). Betroffen sind hierbei Gene, welche unter anderem die Signaltransduktion (*JAK2*, *KRAS*, *CBL*), die DNA-Methylierung (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*), die Regulation der

Transkription (*EVI1*, ***RUNX1***, *GATA2*, *TP53*), die Chromatinmodifikation (*EZH2*, ***ASXL1***) und das RNA-Splicing (*SF3B1*, *U2AF1*, ***SRSF2***, *ZRSR2*) betreffen (Abdel-Wahab et al. 2011; Ernst et al. 2010; Boulton et al. 2010; Gelsi-Boyer et al. 2009; Graubert et al. 2012; Yoshida et al. 2011; Papaemmanuil et al. 2011; Grand et al. 2009; Levine et al. 2005; Delhommeau et al. 2009; Langemeijer et al. 2009; Walter et al. 2011; Haferlach et al. 2014, Pellagatti u. Boulton, 2015).

Die oben genannten Genmutationen werden bisher noch nicht, abgesehen von *SF3B1*, in die Prognose-Scores wie IPSS einbezogen, obwohl publizierte Daten zeigen, dass die Prognosevorhersage durch Einbeziehung solcher Mutationen verbessert wird (Bejar et al. 2012; Cazzola et al. 2013; Haferlach et al. 2014, Della Porta et al. 2016).

Sowohl zur besseren Prognoseeinschätzung als auch zur Entwicklung verbesserter therapeutischer Ansätze ist es wichtig, weitere Erkenntnisse über die Inzidenz und Zusammensetzung molekulargenetischer Veränderungen bei MDS-Patienten zu gewinnen. In dieser Arbeit wurde die Kohorte des Ulmer MDS-Registers auf Mutationen in den Genen *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1* untersucht. Diese Gene treten bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) gehäuft auf und werden auch als rekurrent mutiert bei MDS beschrieben. Sie könnten das Risikoprofil des MDS-Subtyps und die notwendigen Therapieansätze entscheidend beeinflussen (siehe nächstes Kapitel).

#### **1.1.4 Therapie des MDS**

##### **1.1.4.1 Supportive Therapie**

Abhängig von Alter, Komorbiditäten und Allgemeinzustand kann bei geringer Zytopenie bzw. Asymptomatik die Strategie ‚watch and wait‘ angewandt werden.

Bei Anämiesymptomatik besteht die Therapie zuerst einmal aus einer supportiven Basistherapie bestehend aus Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten (abhängig von klinischem Zustand und dem Hb-Wert), Transfusionen von Thrombozytenkonzentraten bei Blutungen und großzügiger Antibiotikagabe bei Infektionen, auch bei Bagatellinfektionen. Zusätzlich wird eine jährliche Influenza-Impfung und ab 65 Jahren die Pneumokokken-Impfung empfohlen.

Zur Therapie einer sekundären Hämochromatose (mit Komplikationen wie Hepatomegalie oder Kardiomyopathie einhergehend), welche durch häufige Erythrozyten-Transfusionen entstehen kann, kann die Gabe von Eisenchelatoren

wie Deferasirox und Deferoxamin (Exjade) hilfreich sein. Eisenchelatoren sind ab einer Gabe von mehr als 20 Erythrozytenkonzentraten oder einem Ferritin-Wert von > 1000 ng/ml indiziert.

Eine weitere Therapiesäule sind hämatopoetische Wachstumsfaktoren, vor allem Erythropoetin (EPO) oder Darbapoetin alpha (synthetisches EPO; Aranesp), gegebenenfalls zusammen mit Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF), welches die Wirkung von EPO verstärkt. Indikation für eine Therapie mit EPO sind ein Erythropoetinspiegel <100 (500) IE/ml, eine geringe Transfusionsabhängigkeit (maximal 2 Erythrozytenkonzentrate innerhalb von 8 Wochen benötigt) und eine Einteilung in die IPSS-Risikogruppen Low oder Intermediate I. G-CSF allein ist nur sehr eingeschränkt indiziert, zum Beispiel bei wiederholt komplizierten Infektionen und Neutropenie. Bei schwerer Thrombozytopenie kann die Gabe von Thrombopoetin-Rezeptor-Agonisten wie Romiplostim oder Eltrombopag indiziert sein.

Eine weitere Therapieoption ist die immunsuppressive Therapie mit ATG (Antithymozytenglobulin) und CsA (Cyclosporin), welche bei Niedrigrisiko-MDS mit transfusionsabhängiger Anämie, Alter unter 60 Jahren, Knochenmarkblasten <5% und normaler Zytogenetik indiziert sein kann. Circa 30% der Patienten, die mit Antithymozytenglobulin behandelt wurden, erreichen Transfusionsfreiheit (Quelle für Kapitel „Supportive Therapie“: Leitlinie MDS Onkopedia, 2016).

#### **1.1.4.2 Spezifische Therapie**

Die einzig kurative Therapie ist die allogene Stammzelltransplantation.

Für MDS-Patienten mit einer del5q-Veränderung und einer Low Risk oder Intermediate I Risk- Einteilung sind immunmodulatorische Chemotherapeutika wie die Weiterentwicklung von Thalidomid, Lenalidomid, zugelassen. Diese führen zu einer TNF- $\alpha$ -Inhibition und zu einer T-Zell/ NK-Zell-Aktivierung und wirken somit proapoptotisch. Aber auch bei Patienten ohne del5q-Veränderung konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit Lenalidomid zu einer Verlängerung der transfusionsfreien Zeit von Erythrozytenkonzentraten führt (Santini et al. 2014).

Histon-Deacetylase-Inhibitoren wie Valproinsäure steigern die Erythropoese und sind vor allem bei Low Risk-Patienten und fehlendem Ansprechen auf Wachstumsfaktoren oder Immunmodulatoren ein mögliches therapeutisches Konzept.

Außerdem können Pyrimidin-Analoga wie Azacytidin/ Decitabin eingesetzt werden, die anstelle von Cytosin in die DNA eingebaut werden, dadurch zytotoxisch wirken und zusätzlich die Methylierung von CpG-Abschnitten verhindern. Die Gabe von Azacytidin bei Patienten mit MDS führt zu signifikant erhöhten Ansprechraten, höherer Lebensqualität, vermindertem Risiko für die Transformation in eine akute Leukämie sowie verlängertem Überleben im Vergleich zu alleiniger supportiver Therapie (Silverman et al. 2002; Fenaux et al. 2009).

Des Weiteren wird in Studien das hypomethylierende Dinukleotid von Decitabin und Desoxyguanosin Guadecitabin (in klinischen Studien) bei Patienten mit MDS und AML eingesetzt (Issa et al. 2015; Kharfan-Dabaja 2015). Pharmakologischer Vorteil dieses Wirkstoffes ist seine Widerstandsfähigkeit gegenüber der Degradierung durch die Cytidin-Deaminase (Issa et al. 2015).

Für diese hier vorliegende Arbeit wurden die Gene *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1* ausgewählt, um deren Vorkommen und Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Patienten des Ulmer MDS-Registers zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt wird jeweils ein kurzer Überblick über Struktur, Funktion und Bedeutung dieser drei Gene im MDS sowie in der AML gegeben.

## **1.2 Das Additional Sex Combs-Like transcriptional regulator 1 (*ASXL1*)-Gen**

### **1.2.1 Struktur des *ASXL1*-Gens und Funktion des Proteins**

Das *ASXL1*-Gen, lokalisiert auf der chromosomalen Bande 20q11.2 (Fisher et al. 2003), ist ein proteinkodierendes Gen, welches homolog zum *ASX*-Gen der Fruchtfliege *Drosophila* für ein chromatinbindendes Protein kodiert; dies gehört zu den „Enhancer der Trithorax und Polycomb (ETP)“ Genen, einer Genfamilie, die eine duale Funktion in der epigenetischen Aktivierung wie auch in der Repression von Gentranskription besitzt (Fisher et al. 2006).

Das *ASXL1*-Gen besteht aus 13 Exons (Fisher et al. 2003), wobei Exon 3 nur drei Basenpaare lang ist und deshalb meist nur 12 Exone genannt werden. Das vom *ASXL1*-Gen kodierte Protein besteht aus 1541 Aminosäuren (Uniprot ID: Q8IXJ9) und besitzt eine relative molekulare Masse von 165 462 Da (Fisher et al. 2003).

Als Mitglied der Polycomb Gruppe (PcG) ist das Protein an der transkriptionalen Regulation beteiligt, die durch ligandengebundene, nukleäre Hormonrezeptoren wie die Retinolsäurerezeptoren (RARs) oder den Peroxisomenproliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$  (PPARG) vermittelt werden. Das Protein agiert als Coaktivator von Retinolsäurerezeptoren (RARA). *In Vitro* führen *ASXL1*-Mutationen zu einem Verlust des Polycomb-Repressive-Complex 2, welcher normalerweise für die Unterdrückung von leukämischen Zielgenen zuständig ist (Abdel-Wahab O et al. 2012).

Mutationen im *ASXL1*-Gen werden vor allem in Exon 12 detektiert und es wird angenommen, dass diese zu einer Trunkierung des Proteins führen (Gelsi-Boyer et al. 2009), welches in der Chromatinmodifizierung involviert ist. In Exon 12 treten die Mutationen am häufigsten in der glycin-reichen Region auf (Boulwood et al. 2010, siehe schematische Darstellung des *ASXL1*-Proteins Abbildung 1)

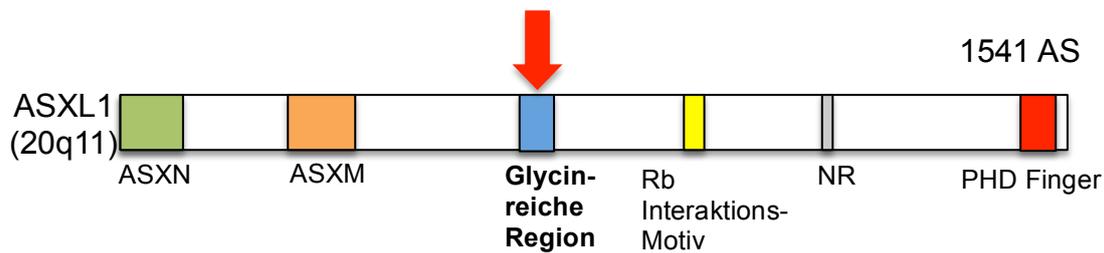
### **1.2.2 *ASXL1*-Mutationen bei AML und bei MDS sowie ihre Bedeutung**

Bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie haben ca. 6,1% der Patienten Mutationen im *ASXL1*-Gen (Paschka et al. 2015). Diese Mutationen sind mit höherem Alter, männlichem Geschlecht, sekundärer AML, niedrigeren Knochenmarkblasten und Blasten im peripheren Blut und einer schlechten Prognose assoziiert (Paschka et al. 2015).

Bei MDS-Patienten kommen Mutationen im *ASXL1*-Gen mit einer Häufigkeit von ca. 15-20% vor (Cazzola et al. 2013. Thol et al. 2011: 20,7%; Raza u. Galili 2012: 15-20%, Pellagatti u. Boulwood 2015: 11-15%); bei 70% dieser Mutationen handelt sich es um Frameshift-Mutationen, welche mit einer kürzeren Zeit bis zum Auftreten einer akuten myeloischen Leukämie (leukemia-free survival) assoziiert sind (Thol et al. 2011). *ASXL1*-Mutationen kommen vor allem in den MDS-Subtypen RCMD und RAEB vor und sind in beiden Fällen mit einem höheren Risiko assoziiert, eine sekundäre AML zu entwickeln (Cazzola et al. 2013). Des Weiteren sind *ASXL1*-Mutationen mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert: in einer Studie von 2011 betrug das mediane Überleben 1,33 Jahre bei Patienten mit *ASXL1*-Mutation, während das mediane Überleben der gesamten Kohorte 1,86 Jahre betrug (Bejar et al. 2011).

Die Rolle der Assoziationen von *ASXL1*-Mutationen mit anderen genetischen Markern bei MDS ist momentan noch nicht vollständig geklärt, jedoch treten

ASXL1-Mutationen häufig gemeinsam mit *RUNX1*, *EZH2*, *IDH*, *NRAS*, *JAK2*, *SETBP1* und *SRSF2* (Chen et al. 2014) auf.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des ASXL1-Proteins mit den bekannten Motiven und Domänen** (nach Boulwood et al. 2010, Abdel-Wahab et al. 2011). ASXN/ASXM (grün/orange): amino-terminale Homologie-Domänen, Bindungsstellen für nukleäre Rezeptoren; Glycin-reiche Domäne (blau), mit Pfeil markiert: am häufigsten durch Mutationen betroffene Region (Exon 12; Aminosäuresequenz 642-685); Rb Interaktionsmotiv (gelb); NR (Nuclear Receptor) (grau): Bindemotiv für nukleäre-Rezeptoren RAR und RXR; PHD (Plant Homeo Domain) Finger (rot): hoch konservierte cysteinreiche Region für Interaktion mit anderen Proteinen. AS=Aminosäuren

### 1.3 Das Serine/ Arginine-rich splicing factor 2 (*SRSF2*)-Gen

#### 1.3.1 Struktur des *SRSF2*-Gens und Funktion des Proteins

Der *Serine/ Arginine-rich splicing-factor 2* liegt auf Chromosom 17q25.1, besteht aus 2 Exonen und ist Teil des post-transkriptionalen RNA-Splicing-Prozesses, welcher dafür zuständig ist, nicht kodierende Sequenzen (Introns) aus dem primären RNA-Transkript (pre-mRNA) zu entfernen (Yoshida et al. 2011). Splicosom-Mutationen wurden bisher in MDS, AML, chronisch lymphatischer Leukämie (CLL: Inzidenz ca. 7-17%) und chronisch myelomonozytärer Leukämie (CMML, hier mit einer Inzidenz von ca. 21-47%), beobachtet; diese Mutationen können ein abnormales Expressionsmuster von Genen, die in die Krebspathogenese involviert sind, bewirken (Chesnais et al. 2012). So beschrieben Qiu und Kollegen, dass die Splicing-Signaturen von MDS-Patienten überwiegend die Zellzykluskontrolle sowie die Antwort auf DNA-Schäden betreffen. Hingegen beziehen sich die Splicing-Signaturen der normalen Hämatopoese vor allem auf die Signalweiterleitung und Differenzierungsprogramme (Qiu et al. 2016). Zur Splicing-Maschinerie gehören einerseits die Gruppe von kleinen nukleären Ribonukleoproteinkomplexen

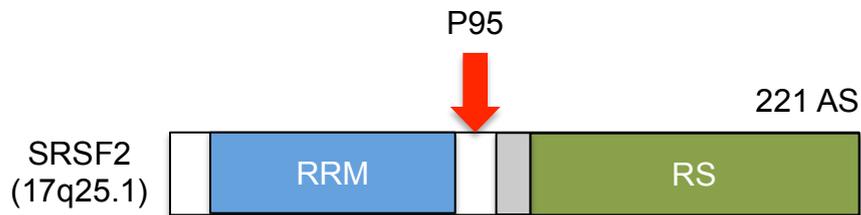
(snRNP; U1, U2 und entweder U4/5/6 oder U11/12) sowie viele andere Proteinkomponenten wie z.B. SRSF2. SRSF1 und SRSF2 binden an den U2 auxiliary factor (U2AF) und sind damit an der Erkennung der 3'-Splicing Region und dem in der Nähe liegenden Polypyrimidin-Komplex beteiligt. Zusätzlich scheint SRSF2 an der Regulation der DNA-Stabilität involviert, da es bei einer Depletion von SRSF2 zu genomischen Instabilität kommen kann (Xiao R et al. 2007).

### **1.3.2 SRSF2-Mutationen bei AML und MDS und ihre Bedeutung**

Bei Patienten mit AML haben ca. 6% dieser Patienten Mutationen im *SRSF2*-Gen (Papaemmanuil et al. 2016). Der prognostische Effekt dieser Mutationen ist vor allem additiv, was bedeutet, eine einzelne Mutation nur in *SRSF2* hat keinen signifikanten Effekt. Ein gemeinsames Auftreten von Mutationen in *ASXL1*, *SRSF2* und *TP53* zeigt eine schlechtere Prognose auf (Papaemmanuil et al. 2016).

*SRSF2*-Mutationen kommen bei ca. 10-20% der MDS-Patienten vor (Cazzola et al. 2013) (Papaemmanuil et al. 2013: 14%, Pellagatti u. Boulwood 2015: 12-15%) und sind mit dem männlichen Geschlecht und höherem Alter (Wu et al. 2012) sowie mit Neutropenie und Thrombozytopenie (Damm et al. 2012) assoziiert. Die häufigste *SRSF2*-Mutation ist in Kodon P95 auf Exon 1 lokalisiert, eine Position zwischen dem RNA-Erkennungsmotiv (RRM) und der Arginin/ Serin reichen-Domäne (RS) (Visconte et al. 2012, siehe Abbildung 2). *SRSF2*-Mutationen traten gehäuft in Exon 1 auf und sind größtenteils heterozygote Punktmutationen (Thol et al. 2012). MDS-Patienten mit einem mutierten *SRSF2*-Gen hatten im Vergleich zu MDS-Patienten mit Wildtyp-*SRSF2* ein kürzeres Gesamtüberleben (OS=overall survival) sowie eine häufigere Progression zu AML (Thol et al. 2012, Wu et al. 2012). In der Studie von Thol et al. 2012 wurden 193 Patienten mit MDS auf Mutationen von *SRSF2* gescreent, 24 (12,4%) davon waren mutiert. Diese Patienten hatten eine höhere Transformationsrate in eine AML ( $P=0.013$ ) und ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (Fünffjahresüberleben (5-JÜ): 17% vs. 39%,  $P=0,049$ ). *SRSF2*-Mutationen kamen in dieser Studie vor allem bei der Low-Risk Gruppe und der Intermediate-I Gruppe nach IPSS vor und konnten hier zur genaueren Risikostratifizierung beitragen (Thol et al. 2012). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass eine Mutation in *SRSF2* häufig von einer Mutation in *RUNX1*, *IDH2* oder *ASXL1* begleitet war (Nagata et al. 2011, Wu et al. 2012; Thol

et al. 2012). Insgesamt sind *SRSF2*-Mutationen am häufigsten in den MDS-Subtypen RCMD und RAEB zu finden, welche beide zu den High-Risk MDS-Subtypen gehören (Cazzola et al. 2013).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des SRSF2-Proteins mit bekannten Motiven und Domänen (nach Yoshida et al. 2011). RRM (blau): RNA recognition motif; RS (grün): arginine/ serine-rich domains. Roter Pfeil markiert Prolin an Position 95 (P95), eine der häufigsten Mutationen bei SRSF2. AS=Aminosäuren

## 1.4 Das Runt-related transcription factor 1 (*RUNX1*)-Gen

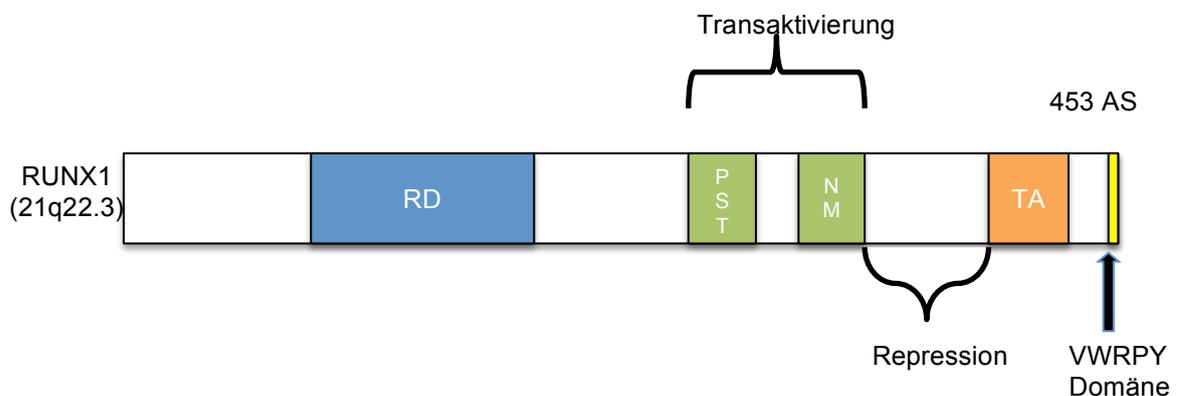
### 1.4.1 Struktur des *RUNX1*-Gens und Funktion des Proteins

Das *RUNX1*-Gen befindet sich in der Chromosomenregion 21q22.12 (Avramopoulos et al. 1992), besteht aus 10 Exonen und das vom *RUNX1*-Gen kodierte Protein ist 453 Aminosäuren lang (Osato 2004).

Das *RUNX1*-Gen wird auch auch *AML1*-Gen oder *CBF $\alpha$ 2* (core binding factor  $\alpha$ ) genannt und kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der zur Familie der core binding factors (*RUNX1*, *RUNX2*, *RUNX3*) gehört und die normale Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen reguliert, indem er mit *CBF $\beta$* , einem weiteren Transkriptionsfaktor, einen heterodimeren Komplex eingeht (Lorsbach et al. 2001). Dadurch wird die DNA-Bindung 10fach erhöht, was stabilisierend auf den Protein-DNA-Komplex wirkt und zu erhöhter Transkription der entsprechenden Gene führt. Die primäre Rolle von *CBF $\beta$*  ist es, die Bindung von *RUNX1* an die DNA zu verstärken, indem es eine bestimmte Konformation der RUNT-Domäne stabilisiert (Mangan u. Speck 2011). Jedes Mitglied der *RUNX*-Familie besitzt eine RUNT-Domäne (RD, siehe Abbildung 3), die homolog zum RUNT-Protein von Drosophila ist (Ogawa et al. 1993) und welche die Heterodimerisierung mit *CBF $\beta$*  und die DNA-Bindung des *RUNX*-Proteins an die Core Enhancer Sequenz (CES) TGTGGT vermittelt (Lorsbach et al. 2001).

*RUNX1*-Mutationen sind häufig in Translokationen von hämatologischen Malignomen wie AML, ALL und MDS zu finden. Häufige Translokationen bei der

AML sind beispielsweise  $t(8;21)(q22;q22)$  oder *RUNX1-RUNX1T1*,  $t(3;21)(q26.2;q22)$  oder *MECOM(EVI1)-RUNX1*; bei der ALL finden sich vor allem  $t(12;21)(p13;q22)$  oder *TEL-RUNX1* als chromosomale Translokationen (Ohki 1993; Imai et al. 2000, Bernard et al. 1996). Außerdem scheint *RUNX1* eine Rolle bei Ovarial-Karzinomen (Keita et al. 2013) und Mamma-Karzinomen (van Bragt et al. 2014) zu spielen. Zusätzlich konnten Keimbahnmutationen von *RUNX1* bei dem familial platelet disorder, einer autosomal-dominanten familiären Thrombozytopathie gefunden werden, die in 35% der Fälle für eine Entwicklung von MDS und AML prädisponieren (Song et al. 1999; Owen et al. 2008). Des Weiteren sind *RUNX1*-Mutationen mit Strahlenexposition wie bei der Hiroshima-Atombomben-Katastrophe assoziiert (Harada et al. 2003).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des RUNX1-Proteins mit bekannten Motiven und Domänen (nach Lorschach et al. 2001). RD (blau): Runt-DNA-Bindungs-Domäne, PST (grün): Prolin/Serin/Threonin-reiche Region, NM (grün): Nukleäres Matrixhaftungsmotiv, TA (orange): C-Terminale transkriptionale Transaktivierungsdomäne, VWRPY-Motiv (gelb): bindet Groucho Co-Repressor. AS=Aminosäuren

#### 1.4.2 *RUNX1*-Mutationen bei Akuter Myeloischer Leukämie und bei MDS sowie ihre Bedeutung

*RUNX1* ist eines der Gene, welches bei chromosomalen Translokationen in menschlichen Leukämien am häufigsten betroffen ist. Etwa 5% aller akuten myeloischen Leukämien haben eine  $t(8;21)(q22;q22)$ -Translokation (Gaidzik/Teleanu et al. 2016: 5,5%; Papaemmanuil et al. 2016: 4%) welche zur Entstehung eines *RUNX1-RUNX1T1*-Fusionsproteins (früher: AML1-ETO (Eight, Twenty-One)) führt, bestehend aus dem N-terminalen Teil von *RUNX1* inklusive RD-

Domäne und nahezu dem kompletten RUNX1T1-Protein (Miyoshi et al. 1991). Das RUNX1-RUNX1T1-Fusionsprotein stört die Funktion von CBF $\alpha$  und führt somit zu einer gestörten Hämatopoese (Lorsbach et al. 2001).

Die meisten *RUNX1*-Mutationen bei MDS und AML führen, unabhängig von dem DNA-Bindungspotential, zu einem Verlust des Transaktivierungspotentials und dadurch zu einem Funktionsverlust (Harada et al. 2004), da die Transkription dereguliert wird, welche wiederum für eine normale Hämatopoese notwendig ist (Lutterbach u. Hiebert 2000).

Bei der akuten myeloischen Leukämie tragen etwa 6% der Patienten eine Mutation im *RUNX1*-Gen und kommen vor allem in den Exonen 3, 4 und 8 vor (Gaidzik et al. 2011; Gaidzik/ Teleanu et al. 2016). Diese Mutationen sind mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapie assoziiert sowie einem schlechteren Überleben. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die schlechte Prognose dieser Patienten durch eine allogene Stammzelltransplantation verbessert werden kann (Gaidzik et al. 2011).

Bei MDS-Patienten tragen ca. 10-15% (Cazzola et al. 2013: 10%; Raza u. Galili 2012: 15%, Pellagatti u. Boulwood 2015: 10%) der Patienten Mutationen im *RUNX1*-Gen, diese kommen vor allem bei RCMD oder RAEB vor, sind ebenfalls mit einem schlechteren klinischen Verlauf (Cazzola et al. 2013) und einer kürzeren Gesamtüberlebensdauer (Bejar et al. 2011) assoziiert. In einer Studie von Bejar und Kollegen (Bejar et al. 2011) wurde das Knochenmark von 288 Patienten mit MDS in der Lower-Risk-IPSS-Kategorie untersucht und auf 22 Mutationen gescreent. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit Mutationen in den Genen *RUNX1*, *TP53*, *ASXL1* und *EZH2* unabhängig von der LR-IPSS ein kürzeres Gesamtüberleben hatten (Medianes Überleben der *RUNX1*-mutierten Patienten: 1,16 Jahre vs. gesamter Kohorte: medianes Überleben 1,86 Jahre) (Bejar et al. 2011).

## **1.5 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war es, eine große Kohorte (n=116) von gut charakterisierten Patienten aus dem Ulmer MDS-Register auf Mutationen in den Genen *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1* zu untersuchen. Im Rahmen des Ulmer MDS-Registers werden Knochenmark- und periphere Blutproben von MDS Patienten für wissenschaftliche Untersuchungen asserviert; ebenso werden die klinischen

Daten dieser Patienten dokumentiert. Neben der Bestimmung der Inzidenz von Mutationen in den Genen *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1* war es ein wichtiges Ziel die Korrelation dieser Genmutationen mit klinischen und genetischen Charakteristika zu untersuchen, aber auch deren prognostische Bedeutung insbesondere im Hinblick auf das Überleben. Die Auswahl der drei Gene basierte im Wesentlichen auf den bereits existierenden Daten zu Genmutationen von *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1*, die darauf hinweisen, dass diese von hoher prognostischer Bedeutung sind.

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 5: Verwendete Geräte.** Aufzählung der verwendeten Geräte in alphabetischer Reihenfolge.

Gerät	Nummer	Hersteller
(-20)°C MiniCooler		
2720 Thermal Cycler	4359659	Applied Biosystems, Foster City, USA
Accu-jet®		BRAND GMBH&CO KG Wertheim
Blockthermostat	2099-04	Liebisch, Bielefeld
Combi-Spin Mini-Centrifuge/Vortex	FVL-2400 N	Biosan, Riga, Latvia
Combi-Spin PCV-2400		Grant Instruments
Gefrierschrank Comfort		Liebherr, Biberach a.d.Riss
Geldokumentationsgerät GeneGenius Bio Imaging System		Syngene, Frederick, USA
HandyStep	705004	BRAND GMBH&CO KG Wertheim
Magnetrührer IKAMAG® REO		IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipette Transferpipette		BRAND GMBH&CO KG Wertheim
NanoDrop1000		Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Owl EasyCast A2 MiniGelElectrophoresis		Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Owl EasyCast B2 MultiGel Combs		Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
P-touch 2730		Brother International GmbH
Pipette 0,1-2,5 µl	3120 000.011	Eppendorf, Hamburg
Pipette 0,5-10 µl	3120 000.020	Eppendorf, Hamburg
Pipette 10-100 µl	3120 000.046	Eppendorf, Hamburg
Pipette 100-1.000 µl	3120 000.062	Eppendorf, Hamburg
Pipette 2,0-20 µl	3120 000.038	Eppendorf, Hamburg
Pipette 20-200 µl	3120 000.054	Eppendorf, Hamburg
Prazisionswaage MS603S	MS603S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
QIAvac 96	19504	Qiagen GmbH, Hilden
Reagenzglasschüttler Reax Top	541-10000-00	Heidolph, Schwabach,
Scotsman AF100 IceFlaker	DA-253094	Scotsman IceSystems
Sequenzierer 3500xL Dx Genetic Analyzer		Applied Biosystems, Foster City, USA
Stabpipette costar® STRIPETTE 50 ml	4490	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Stromquelle Electrophoresis Powersupply EPS1001		Amersham pharmacia biotech, Freiburg
Stromquelle Electrophoresis Powersupply EPS600		Amersham pharmacia biotech, Freiburg
Thermomixer 5437	5437B0020	Eppendorf, Hamburg
Transferpipette 8 0,5-10µl		VWR, Darmstadt
Transferpipette 8 5-100µl		VWR, Darmstadt
Vakuumpumpe Laboport		KNF Neuberger
Vortex	444-1372	VWR, Darmstadt
Zellzählgerät Sysmex XS800i		Sysmex, Schweiz
Zentrifuge BIOFUGE fresco	75005521	Heraeus,Newport PagnellUK
Zentrifuge Centrifuge5424	5424000	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Galaxy Mini	521-2812	VWR, Darmstadt
Zentrifuge Galaxy MiniStar	521-2844	VWR, Darmstadt
Zentrifuge Multifuge 4 KR	75004461	Heraeus,Newport PagnellUK

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien.** Aufzählung der verwendeten Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge.

Material	Nummer	Hersteller
0,2 ml MicroAmp Reaction Tube with cap	N8010540	Applied Biosystems, Foster City, USA
96 Well Plate Septa	4315933	Applied Biosystems, Foster City, USA
Alufolie extra breit/extra stark (Normale Haushaltsfolie)		CATBUY
Auffangtubes, Microtubes 2,0 ml capless	MCT200NL	AXYGEN Inc., VWR, Darmstadt
Biosphere® Filter Tips 10 µl	701116210	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 100 µl	70760212	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 1250 µl extra long	701186210	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 20 µl	70760213	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 200 µl	70760211	Sarstedt, Nümbrecht
Combitips 12,5ml	22261401	Eppendorf, Hamburg
Cryo-Babies 1.28x0.50inch	CRY-1000	Diversifia Biotech
Entsorgungsbeutel	E706.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Falcon BlueMax™ 50 ml	352070	Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien
gr.blau Rolle (Papier)Kimwipes 7301 33x38cm 2lagig		Kimberly Clark
Half Skirt 96 Well PCR Plate	83007-374	VWR, Darmstadt
Handschuhe,Unt.,Nitril,pf,unst. Gr.S		Ansell GMBH
Kimtech fusselfreie Labortücher		Kimtech Science
Kleenex God 7102 Lite 100		MARCO - MARTIN
Kraft-Alufolie		Toppits
Kryo-Box (aus Karton, beschichtet) 136*136*50		ratiolab
Kryo-Box, beschichtet 136x136x50 (blau)		ratiolab
Kryo-Box, beschichtet 136x136x50 (gelb)		ratiolab
Kryo-Box, beschichtet 136x136x50 (grün)		ratiolab
Kryo-Box, beschichtet 136x136x50 (rot)		ratiolab
Kryo-Box, beschichtet 136x136x50 (weiß)		ratiolab
Markierungspunkte 8 mm, leuchtorange		HERMA,Vario
Markierungspunkte 8 mm, leuchtrot		HERMA,Vario
MicroAmp 8-Cap Strip	N8010535	Applied Biosystems, Foster City, USA
MicroAmp 8-Tube Strip (0,2 ml)	N8018580	Applied Biosystems, Foster City, USA
MicroAmp Optical 96-Well	N8010560	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mikrotiterplatte 96-Well	83007-374	VWR, Darmstadt
Mikrotiterplatte U-Form 96-Well	391-1923	ANICRIN S.R.L., VWR, Darmstadt
Mülleimer 30L (Sondermüllbehälter)		INFA LENTJES
Orig. Videoprinterpapier K 65 HM/KP 65 H (Mitsubishi)		DIAGRAMM-HALBACH GMBH
Präzisions Dispenser-Tips 0,5 ml	702684	BRAND GMBH&CO KG Wertheim
Präzisions Dispenser-Tips 2,5 ml	702388	BRAND GMBH&CO KG Wertheim
QIAquick 96 Plates (24)	436178989	Qiagen GmbH, Hilden
QIAshredder (250)	79656	Qiagen GmbH, Hilden
ratiolab® Rastereinsätze für Kryo-Boxen, Raster 10 x 10		ratiolab
Reagiergefäß 1,5 ml SafeSeal	72706400	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 2,0 ml SafeSeal	72695400	Sarstedt, Nümbrecht
Roti®-Tape-Markierbänder, Länge 12,7 m, Kern-Ø 2,54 cm		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Saran DOW 300mm x 300m		Dow Chemical
Vernichtungsbeutel		ratiolab

## 2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

**Tabelle 7: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.** Aufzählung der verwendeten Reagenzien und Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge.

Reagenz	Nummer	Hersteller
0,5 M EDTA pH 8,0	AM9260G	Ambion, Austin, USA
1 M TRIS pH 8,0	AM9855G	Ambion, Austin, USA
10x Blue Juice Loading Buffer	10816015	Invitrogen, Karlsruhe
10x Puffer mit EDTA	402824	Applied Biosystems, Foster City, USA
Agarose Standard	38103	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
ALL-Prep DNA/RNA Mini Kit (50)	80204	Qiagen GmbH, Hilden
AmpliTaQ Gold with Gene Amp Twelve Paq	4311820	Applied Biosystems, Foster City, USA
Aqua ad iniectionabilia Braun	2351744	Braun, Melsungen
Aqua Delta Select	8771079	AlleMan Pharma GmbH, Rimbach
BigDye Terminator v.1.1, v.3.1 5x Sequencing Buffer	4339843	Applied Biosystems, Foster City, USA
BigDye Terminator v.3.1 CycleSequencing Kit	4336919	Applied Biosystems, Foster City, USA
DEPC Water	750024	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxide (DMSO)	D8418- 100ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DyeEx 96 Kit	63183	Qiagen GmbH, Hilden
DyeEx® 2.0 Spin Kit (250)	63206	Qiagen GmbH, Hilden
Essigsäure 100 %	CAS 64-19-7	AppliChem, Darmstadt
Ethanol absolute	CAS 64-17-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromidlösung 1 %; 10mg/ml	2218.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
GeneScan™-600LIZ® Size Standard	4366589	Applied Biosystems, Foster City, USA
Glycerol	CAS 56-81-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hi-Di™ Formamide	4311320	Applied Biosystems, Foster City, USA
HotStarTaq DNA Polymerase 1000	203205	Qiagen GmbH, Hilden
OrangeG	CAS 1936-15-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pancoll	P04-60500	PAN Biotech
POP-7TM Polymer	4393714	Applied Biosystems, Foster City, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	27106	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit (250)	28106	Qiagen GmbH, Hilden
REPLI-g Mini Kit (100)	150025	Qiagen GmbH, Hilden
RNAse-free DNase Set	79254	Qiagen GmbH, Hilden
RPMI-Medium		Biochrom
TrackIt™ 1 kb DNA Ladder	10488-072	Invitrogen, Karlsruhe
TrackIt™ 100 bp DNA Ladder	10488-058	Invitrogen, Karlsruhe
Trizma base, minimum 99,9% titration	CAS 77-86-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Type-it Microsatellite PCR Kit	206243	Qiagen GmbH, Hilden
Zelllinie HL-60 (Wildtypkontrolle)	DSMZ Nr. ACC 3	DSMZ GmbH, Braunschweig
Zelllinie Kasumi-1 (mutierte Zelllinie)	DSMZ Nr. ACC 220	DSMZ GmbH, Braunschweig

### 2.1.3.1 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

- 1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
- 50x TAE-Puffer (2 M Tris, 1 M Essigsäure, 50mM EDTA, pH 8.5)

- 3x Laufpuffer OrangeG (2 g/L OrangeG, 15 Vol% Glycerol)

### 2.1.3.2 Verwendete Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

**Tabelle 8: Verwendete Primer für ASXL1.** Aufzählung der verwendeten Primer für ASXL1. An das 5'-Ende der Vorwärtsprimer („F“) wurden verschiedene fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt, um die entstehenden Fragmente unterscheiden und detektieren zu können. Bei ‚GTTTCTT‘-Anhang am 5'-Ende des Rückwärtsprimers („R“) handelt es sich um einen Pigtail, wodurch am Ende der Reaktion das Anhängen eines Adenins provoziert wird. Dadurch werden Stotterpeaks bei der DNA-Fragmentlängenanalyse verringert. Schmelztemp.=Schmelztemperatur, Tm=Maximaltemperatur

ASXL1 Primer	Nukleotidsequenz (5'-3')	Schmelztemp. Tm [°C]	Modifikation
ASXL1-I11F	TCACACAGTCCCACCAGAAA	57,3	5'-FAM
ASXL1-Ex12R2	GTTTCTTACTTTCCAGGGTGCTC	65,0	Pigtail
ASXL1-Ex12F3	ACAGATGGGCTAGGAGATGC	59,4	5'-A T565
ASXL1-Ex12R3pt	GTTTCTTATCATTTCGATGGGATGGGTA	61,9	pigtail
ASXL1-Ex12F4	TGGAAGAAATGGATTCCAAAG	54,0	5'-FAM
ASXL1-Ex12R4pt	GTTTCTTCCTTGGCCTGTAACATTGCT	63,4	pigtail
ASXL1-Ex12F5-2	TTAAGGCAAATGCCGAGAAC	55,3	5'-FAM
ASXL1-Ex12R5-2	GTTTCTTACTGGAGCGAGATGCTTT	63,4	pigtail
ASXL1-Ex12F6	AGCAGTGGTGATGGTGGTG	58,8	5'-FAM
ASXL1-Ex12R6-2pt	GTTTCTTCCCCTAGAGACGGAATGG	65,0	pigtail
ASXL1-Ex12F7	CTTGAAAACCAAGGCTCTCG	57,3	5'-A T550
ASXL1-Ex12R7-2pt	GTTTCTTGGGTTTCTCATCCTTGTC	63,4	pigtail
ASXL1-Ex12F8	CCTCGAGAACACCTCGTTTC	59,4	5'-A T550
ASXL1-Ex12R8-1pt	GTTTCTTAGTCCATGACAAAGGGCATC	63,4	pigtail
ASXL1-Ex12F9	GACAGCAGTGAGGCTGACAC	61,4	5'-A T550
ASXL1-Ex12R9pt	GTTTCTTAGCAACTGCATCACAAGTGG	63,4	pigtail
ASXL1-Ex12F10	TCCCAGATTCCCTACTGCTG	59,4	5'-A T565
ASXL1-Ex12R10pt	GTTTCTTCTTTCTGGAGCAGCATTT	61,9	pigtail
ASXL1-Ex12F11-1	CAGTGCATCACTTTCCTTGC	57,3	5'-FAM
ASXL1-Ex12R11	GTTTCTTGAAGAGTGCTCCTGCCTAA	65,0	pigtail

**Tabelle 9: Verwendete Primer für *SRSF2*.** Aufzählung der verwendeten Primer für *SRSF2*. Schmelztemp.=Schmelztemperatur, T<sub>m</sub>=Maximaltemperatur

<i>SRSF2</i> Primer	Nukleotidsequenz (5'-3')	Schmelztemp. T <sub>m</sub> [°C]	Modifikation
<i>SRSF2_1F</i>	GAGCGATATAAACGGGCGCA	59,4	Keine
<i>SRSF2_1R</i>	CATTATCTCGCCGCCAGACG	61,4	Keine
<i>SRSF2_2F</i>	CTTCCGCCGTCTGCGACC	62,8	Keine
<i>SRSF2_2R</i>	TCCGAGCAGCACTCCTAATGA	59,8	Keine

**Tabelle 10: Verwendete Primer für *RUNX1/AML1*.** Aufzählung der verwendeten Primer für *RUNX1*. Schmelztemp.=Schmelztemperatur, T<sub>m</sub>=Maximaltemperatur

<i>RUNX1</i> Primer	Nukleotidsequenz (5'-3')	Schmelztemp. T <sub>m</sub> [°C]	Modifikation
<i>AML1_1F</i>	GTAAAACGACGGCCAGTTGAGGCTGAAACAGTGACCTG	73,8	Keine
<i>AML1_1R</i>	TGCCTCAGTTTGAATTCCTCTC	58,4	Keine
<i>AML1_2F</i>	AACCACGTGCATAAGGAACAG	57,9	Keine
<i>AML1_2R</i>	GTAAAACGACGGCCAGTTGCACCTATGGTAAACGCTG	72,8	Keine
<i>AML1_3F</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGAGCTGCTTGCTGAAGATCC	73,9	Keine
<i>AML1_3R</i>	CAAGCTAGGAAGACCGACCC	61,4	Keine
<i>AML1_4F</i>	GTAAAACGACGGCCAGTCATTGCTATTCTCTGCAACC	72,7	Keine
<i>AML1_4R</i>	CCGAGTTTCTAGGGATTCCATC	60,3	Keine
<i>AML1_5F</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGTAACCTGTGCTGAAGGGCTG	73,8	Keine
<i>AML1_5R</i>	CAAGGAATCTGAGACATGGTCC	60,3	Keine
<i>AML1_6F</i>	CCCAAATTCAGCTGGCATATC	57,9	Keine
<i>AML1_6R</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGTTGGTCTGGGAAGGTGTGTG	74,9	Keine
<i>AML1_7F</i>	AAACCCTGGTACATAGGCCAC	59,8	Keine
<i>AML1_7R</i>	GTAAAACGACGGCCAGTTTCTGCCACCTCCTTCATGC	72,8	Keine
<i>AML1_8F</i>	GTAAAACGACGGCCAGTTCCGCTCCGTTCTCTTGC	74,2	Keine
<i>AML1_8R</i>	GCTTGTGCGGAACAGGAG	58,2	Keine

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Patientenkohorte, Untersuchungsmaterial und Ethikvotum

Mit Hilfe etablierter Untersuchungsmethoden wie der PCR, der GeneScan-Fragmentanalyse und der Sequenzierung nach Sanger wurden in dieser Arbeit retrospektiv 116 Patienten mit diagnostizierter MDS im Alter zwischen 32 und 84 Jahren auf das Vorhandensein von *ASXL1*-, *SRSF2*- und *RUNX1*-Mutationen untersucht. Diese Patienten wurden alle in das 2007 gegründete Ulmer MDS-Register aufgenommen, in welchem genetisches Material in Form von Knochenmark, peripherem Blut oder Wangenschleimhaut sowie klinische Daten gesammelt werden. Das Knochenmark oder periphere Blut wurde entweder zum Diagnosezeitpunkt (vor Therapiebeginn) oder zum frühestmöglichen Zeitpunkt entnommen. Die Knochenmark- und Blutproben wurden in Form von

mononukleären Zellen eingefroren und zur Untersuchung weiterverarbeitet. Davon wurden für diese Studie 109 Knochenmarkproben sowie 7 peripherem Blut-Proben (Gesamtkohorte, n=116) verwendet.

Die Studie hat das positive Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Baden-Württemberg erhalten (Aktenzeichen: 135/07)

### **2.2.2 Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll**

Zur Gewinnung von mononukleären Zellen aus Blut- und Knochenmarkproben der Patienten wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe des synthetischen Polymers Ficoll (Saccharose-Epichorhydrin-Copolymer) durchgeführt. Ficoll hat eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten, aber eine kleinere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten.

Bei Knochenmark-Proben werden diese zuerst 1:1 mit RPMI-Medium (Biochrom) verdünnt und vorsichtig mit einer Pipette gemischt. Um eine Separation der verschiedenen Bestandteile des Bluts oder Knochenmarks durchzuführen, wird Ficoll-Lösung (Pancoll, PAN Biotech; Katalognummer P04-60500) in ein 50 ml Falcon gegeben und diese vorsichtig mit derselben Menge Blut oder Knochenmark mit einer Pipette überschichtet (1:1 Verhältnis). Daraufhin wird das Falcon 30 Minuten lang bei 400 g mit einer Beschleunigung von 5 und einer Bremse von 1 bei Raumtemperatur zentrifugiert, wodurch sich die unterschiedlich dichten Zellen auftrennen. Anschließend wird mit einer sterilen Pasteurpipette die Interphase, welche die mononukleären Zellen beinhaltet, abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon pipettiert. In 2 Waschschritten mit 1xPBS (Gibco Life) und Zentrifugieren bei 1200 U/min für je 7 Minuten bei einer Beschleunigung von 9, einer Bremse von 5 und Raumtemperatur wird die Zellsuspension von anderen Bestandteilen befreit. Das entstandene Zell-Pellet wird daraufhin mit einem äquivalenten Volumen an RPMI-Medium (Biochrom) resuspendiert und das exakte Volumen bestimmt, welches zur Berechnung der Gesamtzellzahl benötigt wird. Die Leukozytenzellzählung erfolgt mit einem Zellzählgerät (Sysmex XS800i). Hierzu werden 50 µl des resuspendierten Zell-Pellets zu 200 µl 1xPBS gegeben, gut gemischt und hiermit die Zellzählung durchgeführt. Zur Errechnung der Zellzahl der Probe wird die Zellzahl vom Gerät x 5 (Verdünnungsfaktor) multipliziert.

### 2.2.3 DNA/ RNA-Extraktion

Zur Gewinnung der DNA aus dem peripheren Blut oder dem Knochenmark wurden die mononukleären Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll angereichert und anschließend pelletiert. Aus dem Zell-Pellet wurde darauffolgend mit Hilfe des Qiagen AllPrep Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland; Katalog-Nummer 80204) die DNA und RNA extrahiert. Es wurden die im Kit mitgelieferten Lösungen verwendet und entsprechend der Anleitung des Herstellers das Protokoll durchgeführt.

Dafür werden zuerst zu dem auf  $-70^{\circ}\text{C}$  gefrorenen Zell-Pellet 600  $\mu\text{l}$  oder 350  $\mu\text{l}$  RLTplus-Puffer (abhängig von der Pelletgröße:  $\geq 0,5 \times 10^7 - 1 \times 10^7$  Zellen = 600  $\mu\text{l}$  RLTplus-Puffer,  $< 0,5 \times 10^7$  Zellen = 350  $\mu\text{l}$  RLTplus-Puffer) gegeben, welcher die Zellen lysiert und RNasen und DNasen denaturiert. Durch Auf- und Abpipettieren sowie Schütteln mit einem Vortex-Schüttler wird die Mischung homogenisiert und nun auf den QIAShredder (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland; Katalog-Nummer 79656) gegeben. Beim anschließenden 3-minütigen Zentrifugieren bei 13000 U/min werden die Zellbestandteile auf der QIAShredder-Membran zurückgehalten, während die lösliche DNA und RNA den QIAShredder passieren und in einem 2 ml Röhrchen aufgefangen werden (Microtubes, Axygen GmbH, Darmstadt, Deutschland). Das erhaltene Lysat wird nun zuerst auf eine DNA-Aufreinigungssäule gegeben und bei 13000 U/min 1 Minute lang zentrifugiert. Nun befindet sich die genomische DNA auf der Säule, während sich die totale RNA im Durchlauf (Lysat) befindet.

Das die totale RNA enthaltende Lysat (600  $\mu\text{l}$  beziehungsweise 350  $\mu\text{l}$ ) wird anschließend mit 600  $\mu\text{l}$  (350  $\mu\text{l}$  bei kleinerer Zellzahl) 70%igem Ethanol gemischt, auf eine RNAeasy-Säule (Qiagen) gegeben und bei 13000 U/min 1 Minute zentrifugiert. Durch die Zugabe des 70%igen Ethanols bindet die totale RNA an die RNAeasy-Säule, während restliche Zellbestandteile und Proteine durch verschiedene Waschschriffe entfernt werden. Dazu wird zuerst mit 350  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer gewaschen, 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Danach wird 80  $\mu\text{l}$  RNase-freie DNase-Lösung (RNAase-free DNAase Set, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland; Katalog-Nummer 79254) auf die RNAeasy-Säule gegeben und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, um noch vorhandene Reste von genomischer DNA zu zerstören.

Nach der Inkubationszeit wird die RNAeasy-Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen, 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert und der Durchlauf wiederum verworfen. Anschließend wird zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und zum Schluss noch einmal trocken zentrifugiert um restliches Ethanol zu entfernen. Zuletzt wird die totale RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser durch einminütiges Zentrifugieren bei 13000 U/min von der Säule gelöst und in ein 2.0 ml Eppendorf-Röhrchen überführt.

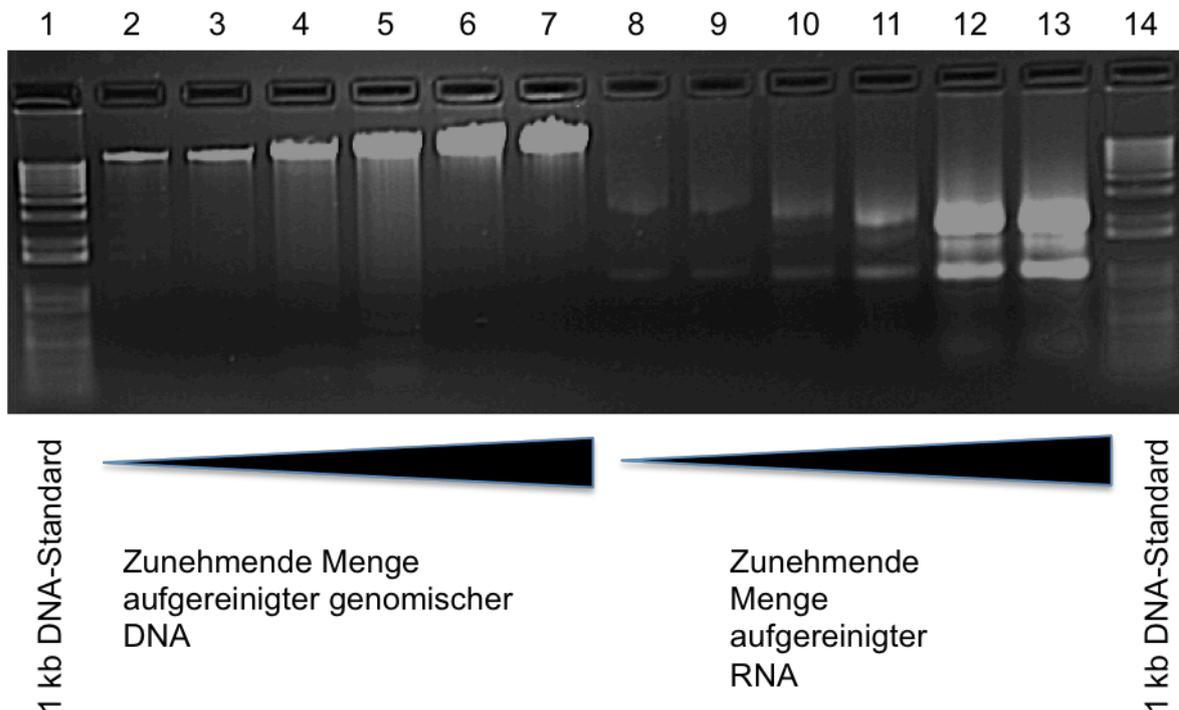
Für die genomische DNA-Extraktion werden nacheinander 2 Waschpuffer, AW1 und AW2, auf die DNA-Aufreinigungssäule pipettiert, jeweils bei 13000 U/min zentrifugiert (für AW1-Puffer 1 Minute; für AW2-Puffer 2 Minuten) und der Durchlauf verworfen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1 Minute bei 13000 U/min) zur Entfernung der restlichen Ethanolreste, wird die genomische DNA mit 100 µl TE-Puffer (pH 7,0) von der Säule gelöst und in ein 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt.

Um zu überprüfen, ob die DNA/RNA-Extraktion funktioniert hat, werden jeweils 2 µl DNA beziehungsweise 2 µl RNA zusammen mit 2 µl BlueJuice™ Ladepuffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland; Katalog-Nr. 10816-015; enthält Farbstoff und Glycerol) und 8 µl RNase-freiem Wasser auf ein 1%iges Agarosegel (1,5g Agarose+ 150ml 1x TAE-Puffer) geladen. Zur Größenbestimmung wird außerdem ein 1 kb DNA Längenstandard (TrackIt 1kb DNA Ladder, Invitrogen, Katalog-Nr. 10488-072) aufgetragen. Anschließend wird die genomische DNA bzw. RNA im Gel für circa 40 Minuten bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Da die Nukleinsäuren wegen ihrer Phosphatgruppen negativ geladen sind, wandern sie durch das Gel von Kathode (Minuspole) zu Anode (Pluspol) und trennen sich dabei der Größe nach auf; je kürzer ein Fragment, desto weiter wandert es durch das Agarosegel.

Um die DNA- und RNA-Fragmente auf dem Gel sichtbar zu machen wird das Gel anschließend 30 Minuten lang in einer 1%igen Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und unter UV-Licht betrachtet.

In Abbildung 4 ist ein Foto eines mit UV-Licht bestrahlten Gels zu sehen: Die genomische DNA (15-30 kbp) stellt sich als eine Bande dar, während die RNA sich als zwei Banden darstellt. Das hat den Grund, dass 80-85% der RNA in einer eukaryotischen Zelle ribosomale RNA ist und diese aus einer kleinen (18S) und

einer großen (28S) Untereinheit besteht. Die obere Bande ist also die 28S-UE und die untere die 18S-UE. Die mRNA ist meist nicht erkennbar, weil sie zwischen ein paar Hundert Basen und mehreren Kilobasen lang sein kann und nur 1-5% der Gesamt-RNA einer Zelle ausmacht.



**Abbildung 4: Beispiel eines Agarosegels nach erfolgreicher DNA/RNA-Aufreinigung.**

Position 1, 14: TrackIt™ 1 kb DNA Ladder (Invitrogen).

Position 2-7: genomische DNA isoliert aus MNCs (2,3:  $0.1 \times 10^7$  MNC; 4,5:  $0.5 \times 10^7$  MNC; 6,7:  $1 \times 10^7$  MNC)

Position 8-13: ribosomale RNA isoliert aus denselben MNC-Pellets wie oben genannt). MNC= mononuclear cells. Kb= Kilobasen.

Zum Schluss wird spektrophotometrisch die Konzentration der DNA und der RNA mit Hilfe eines NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) gemessen. Dies geschieht über die Messung der optischen Dichte bei  $\lambda=260$  nm (OD260), was dem Absorptionsmaximum der DNA und der RNA entspricht.

Zusätzlich kann man durch das Absorptionsverhältnis von 260 nm/230 nm und 260 nm/280 nm die Qualität der Probe überprüfen. Liegt das Absorptionsverhältnis von 260 nm/230 nm über 1,8 kann man von einer Verunreinigung der Probe mit organischen Chemikalien oder Lösungsmitteln ausgehen- und liegt das

Absorptionsverhältnis von 260 nm/280 nm unter 1,8 ist die Probe mit Protein kontaminiert.

#### **2.2.4 Vervielfältigung der genomischen DNA (REPLI-g)**

Um sehr niedrig konzentrierte genomische DNA oder nur noch wenig vorhandene restliche genomische DNA zu amplifizieren, wurde diese mit Hilfe des REPLI-g Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland; Katalog-Nr. 150025) vervielfältigt. Dazu wurden die im Kit mitgelieferten Lösungen verwendet und entsprechend der Anleitung des Herstellers die Vervielfältigung der genomischen DNA durchgeführt.

Zu 2,5 µl Template-DNA wird zuerst 2,5 µl Denaturierungspuffer D1, bestehend aus rekonstituiertem DLB-Puffer und nukleasefreiem Wasser, gegeben und dann mit einem Vortex Schüttler geschüttelt und kurz zentrifugiert. Der Denaturierungspuffer lysiert das vorhandene Material und denaturiert die DNA. Um die Denaturierung nach 3 Minuten wieder zu beenden wird 5 µl Neutralisierungspuffer N1, bestehend aus Stop Lösung und nukleasefreiem Wasser, hinzugefügt. Die Mischung wird mit einem Vortex Schüttler geschüttelt und kurz zentrifugiert. Um danach die Vervielfältigung zu beginnen wird im nächsten Schritt ein Mastermix aus DNA-Polymerase, Puffer und nukleasefreiem Wasser (pro Probe: 10 µl nukleasefreies Wasser, 29 µl REPLI-g Mini Reaction Puffer, 1 µl REPLI-g Mini DNA Polymerase) zur Mischung hinzugegeben und diese auf einem Heizblock 10-16 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit inaktiviert man die DNA-Polymerase durch 3-minütiges Erhitzen der Probe auf 65 °C.

Zum Schluss wird kontrolliert ob die Amplifikation funktioniert hat und in welcher Konzentration die amplifizierte DNA vorliegt. Dazu wird die Konzentration spektrophotometrisch mit dem NanoDrop1000 gemessen (s. 2.2.1 DNA/RNA-Extraktion).

#### **2.2.5 Methodik zur Analyse von ASXL1**

##### **2.2.5.1 ASXL1-Mutationsscreening mittels DNA-Fragmentlängenanalyse**

## **Multiplex-PCR**

Um das für Mutationen im *ASXL1*-Gen (Entrez Gene ID: 171023) bevorzugte Exon 12 auf frameshift-Mutationen (Insertion oder Deletion) zu untersuchen, wurde eine Screening-Methode zur Detektion dieser Mutationen etabliert (Herzig, 2011). Diese Methode besteht aus einer Multiplex-Polymerasekettenreaktion (PCR= Polymerase Chain Reaction) und einer darauf folgenden DNA-Fragmentanalyse. Eine PCR beruht auf einem zyklischen Vorgang, bei welchem zuerst genomische DNA-Stränge durch Denaturierung bei 95 °C voneinander getrennt werden, danach bei 60 °C zwei spezifische Primer an die genomische DNA binden (Annealing) um einen bestimmten Ausschnitt der DNA zu vervielfältigen, und damit dieser Ausschnitt bei 72 °C durch eine hitzeresistente DNA-Polymerase mit Hilfe von Desoxynukleosid-Triphosphaten (=dNTPs) verlängert wird (Elongation). Diese Schritte werden in insgesamt 35 Zyklen wiederholt. Dadurch findet eine exponentielle Vervielfältigung des spezifischen DNA-Abschnitts statt.

Die Multiplex-PCR unterscheidet sich dadurch von einer normalen PCR, dass nicht nur ein bestimmter Abschnitt vervielfältigt wird, sondern parallel mehrere Abschnitte mit Hilfe von mehreren Primern in einem einzigen PCR-Ansatz vervielfältigt werden.

Um das gesamte Exon 12 von *ASXL1* abzudecken wurden 10 Genabschnitte mittels 20 verschiedener, sich überlappende Primer amplifiziert, welche zur Detektion im Kapillarsequenzierer 3500xL Dx Genetic Analyzer noch zusätzlich mit unterschiedlichen Farbstoffen fluoreszenzmarkiert wurden.

Es wurden 2 verschiedene Mastermixe, bestehend aus je 5 fluoreszenzmarkierten, verschiedenen Primerpaaren in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung und dem Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland; Katalog-Nr. 206243) hergestellt und zu diesen genomische DNA mit einer Konzentration von 12,5 ng/µl als Template hinzugegeben. Zusätzlich wurden bei jeder Patientenanalyse je ein Ansatz mit der Zelllinie Kasumi1 (*ASXL1*-mutiert) als Positivkontrolle, ein Ansatz mit der Zelllinie HL60 (*ASXL1*-Wildtyp) als Negativkontrolle und ein Ansatz ohne DNA (NTC=no template control) zur Kontrolle der Sterilität der Reagenzien hergestellt.

Die PCR-Mischung ist aufgrund der fluoreszenzmarkierten Primer lichtsensibel und sollte in Alufolie verpackt werden.

**Tabelle 11: Multiplex-PCR (polymerase chain reaction)-Ansatz ASXL1**

Reagenz	Volumen [µl]
Aqua dest.	9,5
2x Mastermix	12,5
Primermix 1/ Primermix 2	1,0
DNA [12,5 ng/µl]	2,0
<b>Total</b>	<b>25,0</b>

**Tabelle 12: Temperaturprofil der Multiplex-PCR (polymerase chain reaction)-ASXL1**

Initiale Denaturierung	95°C - 5 min	
Denaturierung	95°C - 30 sec	
Annealing	60°C - 30 sec	10 Zyklen
Elongation	72°C - 30 sec	
Denaturierung	95°C - 30 sec	
Annealing	60°C - 1'30 sec	25 Zyklen
Elongation	72°C - 30 sec	
Finale Elongation	60°C - 60 min	

**Tabelle 13: Zusammensetzung Primermix 1 für ASXL1**

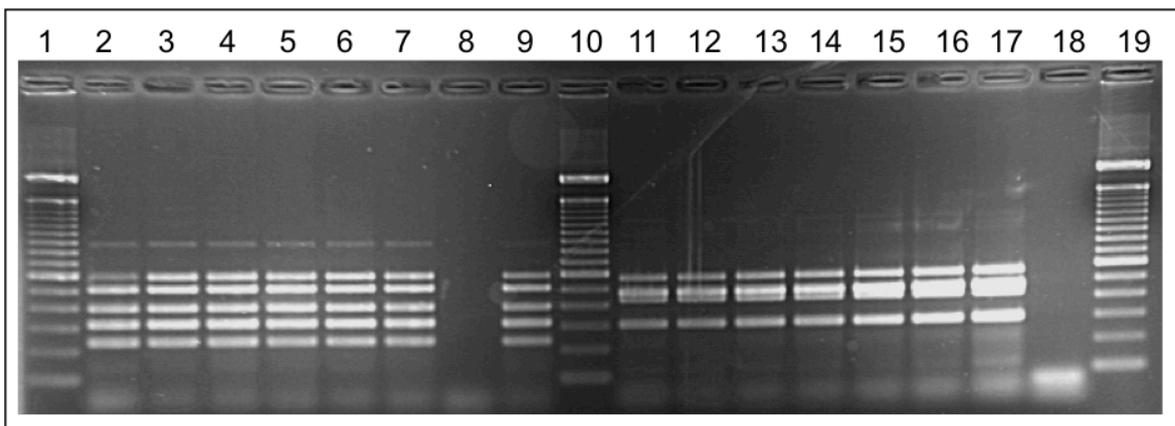
Oligonukleotid [100 pmol/µl]	Nukleotidsequenz (5'-3')	Volumen	Konzentration [pmol/µl]
ASXL1-I11F	TCACACAGTCCCACCAGAAA	3 µl	15
ASXL1-Ex12R2	GTTTCTTTACACTTTCCAGGGGTGCTC	3 µl	15
ASXL1-Ex12F3	ACAGATGGGCTAGGAGATGC	1 µl	5
ASXL1-Ex12R3pt	GTTTCTTATCATTCGATGGGATGGGTA	1 µl	5
ASXL1-Ex12F4	TGGAAGAAATGGATTCCAAAG	1 µl	5
ASXL1-Ex12R4pt	GTTTCTTCCTTGGCCTGTAACATTGCT	1 µl	5
ASXL1-Ex12F5-2	TTAAGGCAAATGCCGAGAAC	1 µl	5
ASXL1-Ex12R5-2	GTTTCTTACACTGGAGCGAGATGCTTT	1 µl	5
ASXL1-Ex12F9	GACAGCAGTGAGGCTGACAC	1 µl	5
ASXL1-Ex12R9pt	GTTTCTTAGCAACTGCATCACAAGTGG	1 µl	5
Aqua ad iniectionabilia		ad 20 µl	

**Tabelle 14: Zusammensetzung Primermix 2 für ASXL1**

Oligonukleotid [100 pmol/µl]	Nukleotidsequenz (5'-3')	Volumen	Konzentration [pmol/µl]
ASXL1-Ex12F6	AGCAGTGGTGATGGTGGTG	1 µl	5
ASXL1-Ex12R6-2pt	GTTTCTTTCCCACTAGAGACGGAATGG	1 µl	5
ASXL1-Ex12F7	CTTGAAAACCAAGGCTCTCG	1 µl	5
ASXL1-Ex12R7-2pt	GTTTCTTTGGGTTTCTCATCCTTGTC	1 µl	5
ASXL1-Ex12F8	CCTCGAGAACACCTCGTTTC	1 µl	5
ASXL1-Ex12R8-1pt	GTTTCTTAGTCCATGACAAAGGGCATC	1 µl	5
ASXL1-Ex12F10	TCCCAGATTCCCTACTGCTG	1 µl	5
ASXL1-Ex12R10pt	GTTTCTTTCTTTCTGAGCAGCATT	1 µl	5
ASXL1-Ex12F11-1	CAGTGCATCACTTTCTTGC	0,5 µl	2,5
ASXL1-Ex12R11	GTTTCTTGCAAGAGTGCTCCTGCCTAA	0,5 µl	2,5
Aqua ad iniectionabilia		ad 20 µl	

Zur Überprüfung, ob einerseits die MP-PCR gelungen ist und andererseits der Ansatz ohne Template-DNA (NTC) steril war, werden je 5  $\mu$ l PCR-Produkt zusammen mit 5  $\mu$ l OrangeG Ladungspuffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland; Katalog-Nr. CAS 1936-158) in die Geltaschen eines 3%igen Agarosegels (4,5 g Agarose + 150 ml 1xTAE-Puffer) pipettiert. Zusätzlich werden die PCR-Produkte beidseits mit einem 100 bp DNA-Längenstandard (TrackIt, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland; Katalog-Nr. 10488-058) flankiert. In der Gelelektrophorese wandern die unterschiedlich großen DNA-Fragmente bei 140 V für etwa 1:15 h unterschiedlich weit durch das Gel.

Nach erfolgter Gelelektrophorese wird das Gel 30 Minuten in einer 1%igen Ethidiumbromidlösung gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und macht diese im UV-Licht sichtbar. Durch die verschiedenen Längen der amplifizierten DNA-Fragmente sind diese gut unter UV-Licht als verschiedene Banden auf dem Gel zu erkennen.



**Abbildung 5: Beispiel eines Agarosegels nach erfolgter Multiplex-PCR.** An Position 2-7 und 9 sind die 5 verschiedenen Banden der Fragmente des Primermix 1 zu sehen, an Position 11-17 die Banden der Fragmente des Primermix 2. Position 8 + 18: NTC (no template control), Position 1, 10, 19: TrackIt™ 100bp DNA Ladder (Invitrogen). bp= Basenpaare

### Fragmentanalyse

Nach erfolgter MP-PCR werden je 2  $\mu$ l der beiden Primermix-Ansätze zusammengeführt und mit 48  $\mu$ l Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen, Katalog-Nr. 2351744) verdünnt.

**Tabelle 15: Verdünnung der PCR (polymerase chain reaction)-Produkte für den GeneScan von ASXL1**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
Aqua dest.	96,0
PCR-Produkt 1+2	2,0 + 2,0
<b>Total</b>	<b>100,0</b>

Zu diesem verdünnten, zusammengeführten Produkt werden auf einer 96-Well-Plate die für die Fragmentanalyse benötigten Reagenzien- 0,4  $\mu$ l GeneScan<sup>TM</sup>-600LIZSizeStandard (Applied Biosystems, Foster City, USA, Katalog-Nr. 4366589) und 15  $\mu$ l HiDi<sup>TM</sup>Formamide (Applied Biosystems, Foster City, USA, Katalog-Nr. 4311320)- hinzugegeben. LIZ600 ist ein fluoreszenzmarkierter Längenstandard, der sich bei der Fragmentanalyse als orange-farbene Peaks darstellt und so die Längen der Fragment-Peaks erkennen lässt. Um die DNA-Stränge voneinander zu trennen, werden die Proben auf der Platte 2 Minuten auf einem 92 °C heißen Heizblock denaturiert und danach auf Eis gestellt, damit die DNA-Stränge sich nicht wieder vereinigen.

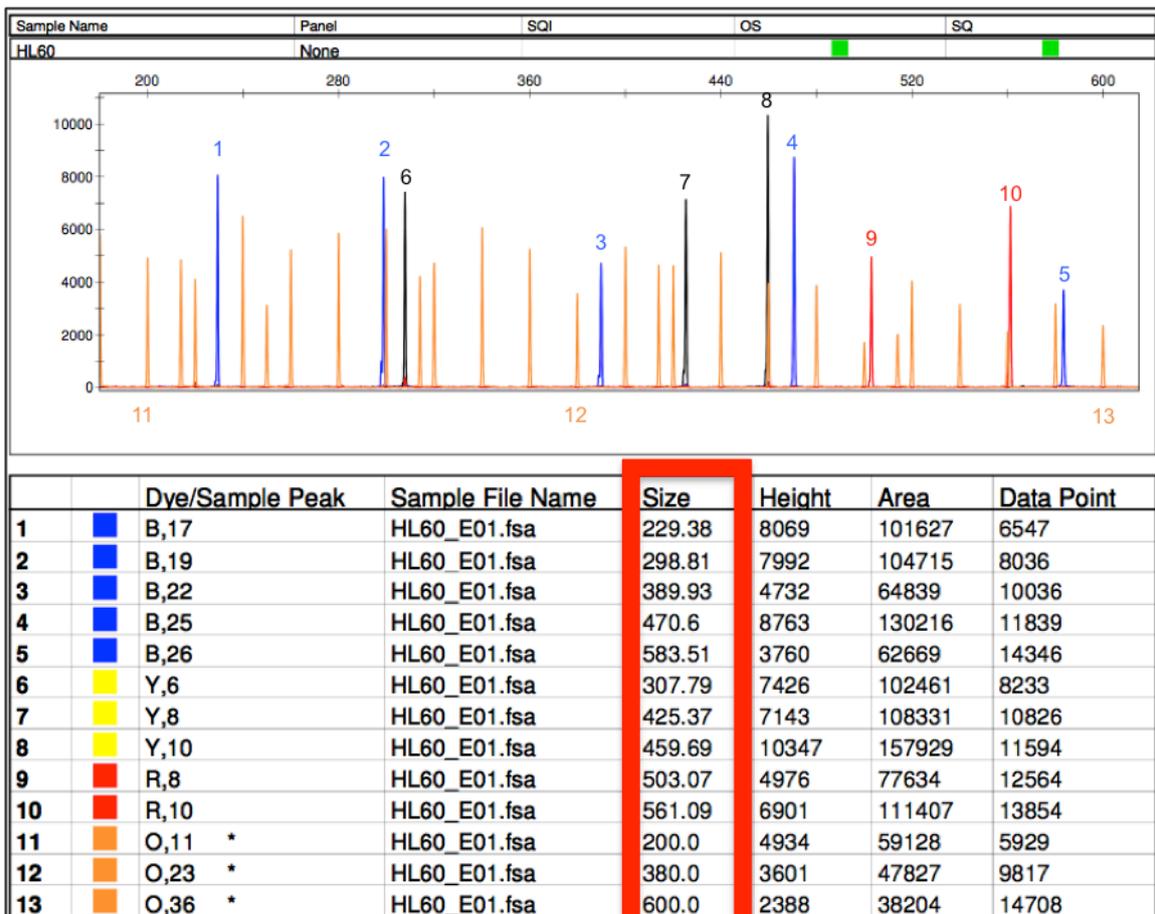
**Tabelle 16: Zusammensetzung für den GeneScan von ASXL1**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
HiDi-Formamid	15,0
LIZ600	0,4
Verdünntes, kombiniertes PCR-Produkt	0,7
<b>Total</b>	<b>16,1</b>

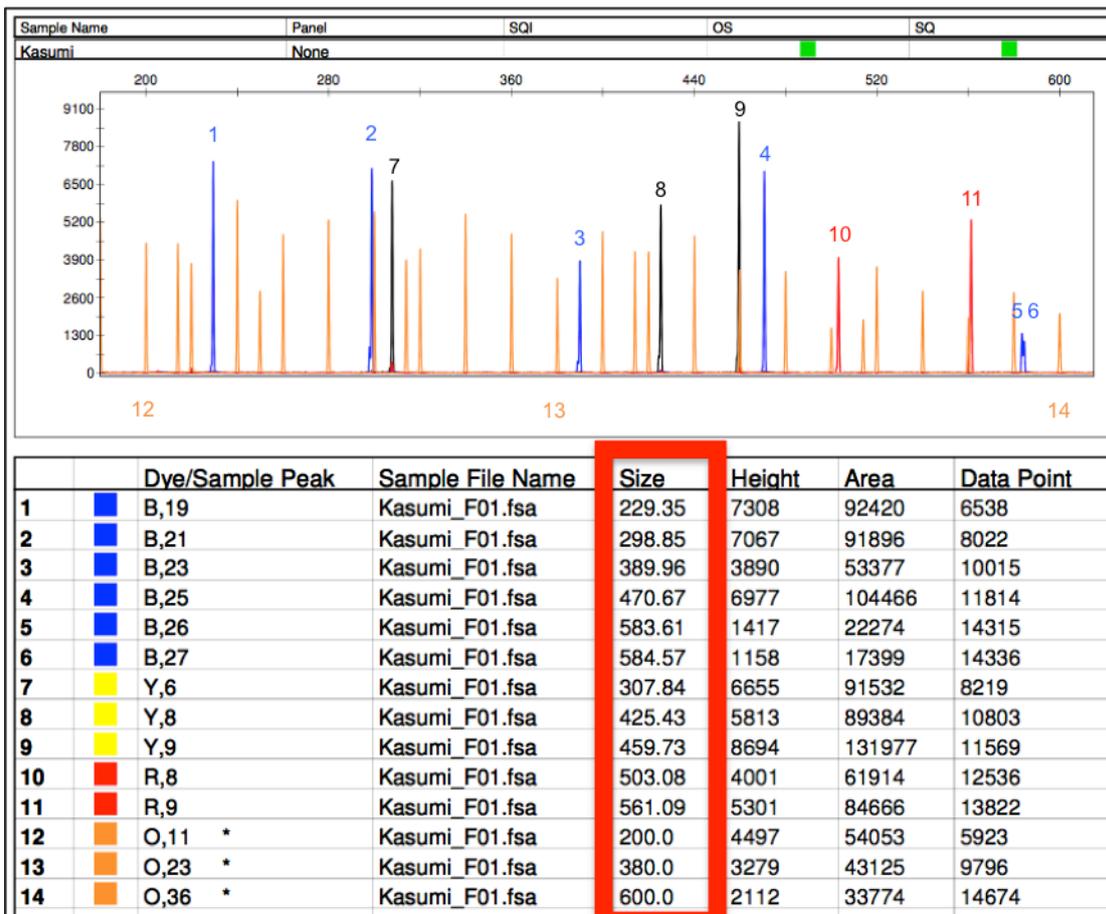
Um nun die verschiedenen Längen der Fragmente zu messen, wird die oben beschriebene Mischung (16,1  $\mu$ l) in einer 96-Well-Plate auf den 3500xL Dx Genetic Analyzer geladen, welcher eine Kapillarelektrophorese durchführt. Die Proben werden elektrokinetisch injiziert und direkt in der Kapillare analysiert. Die DNA-Fragmente trennen sich in der Kapillare der Länge nach auf und passieren dabei ein Detektionsfenster. Da die DNA-Fragmente mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind, können diese durch einen Festkörper-Dioden-Laser angeregt werden und emittieren dadurch Licht in unterschiedlichen Wellenlängen. Dieses Licht wird wiederum von einer CCD-Kamera aufgenommen und als elektrisches Signal gespeichert, welches dann von der Analyse-Software zu farbigen Elektropherogrammen umgerechnet wird.

So entsteht eine Abbildung wie die unten gezeigte: Die orange-farbenen Peaks stellen die verschiedenen Längenstandards des LIZ600 und die roten, blauen und

schwarzen Peaks die verschiedenen amplifizierten DNA-Fragmente dar. Da 10 Primerpaare verwendet wurden, sollten auch 10 Peaks (=Fragmente) erscheinen (s. Abbildung 6). Liegt nun aber eine Mutation vor, wie hier im Beispiel eine heterozygote Mutation des letzten Fragments, sind anstelle eines Peaks zwei Peaks zu sehen, da ein Allel dieses Fragments durch eine Deletions- oder Insertionsmutation eine andere Länge hat (s. Abbildung 7).



**Abbildung 6: Elektropherogramm ASXL1 Wildtyp (Zelllinie HL60):** Peak 1-10 (blau, schwarz, rot) repräsentiert die 10 unterschiedlich langen, fluoreszenzmarkierten Fragmente, die in der Multiplex-PCR entstanden sind. Peak 11-13 (orange) repräsentiert die markierten Längenstandards des LIZ600. Rot umrandet sind die Größen der verschiedenen Fragmente.



**Abbildung 7: Elektropherogramm ASXL1 Mutation (Zelllinie Kasumi):** Peak 1-11 repräsentiert die 11 unterschiedlich langen, fluoreszenzmarkierten Fragmente, die in der Multiplex-PCR entstanden sind. Peak 12-14 repräsentiert die markierten Längenstandards des LIZ600. Peak 5 und 6 zeigt eine Mutation auf einem der beiden Allele (heterozygot), weswegen das eine Fragment etwas länger als das andere ist. Rot umrandet sind die Größen der verschiedenen Fragmente.

Die mutierten Proben wurden danach mittels PCR des betroffenen Fragments und anschließender Sequenzierung nach Sanger weiter untersucht.

### 2.2.5.2 Charakterisierung und Validierung der ASXL1-Mutationen mittels direkter Sequenzierung

#### PCR (Polymerase Chain Reaction)

Um zu bestätigen, dass sich in der durch die DNA-Fragmentanalyse als positiv identifizierten Probe tatsächlich eine Mutation befindet und um diese exakt zu definieren, wird das auffällige DNA-Fragment mit unmarkierten Primern durch PCR vervielfältigt. Hierzu wurde die AmpliTaq Gold DNA Polymerase [5 U/μl] mit

Gold Buffer und  $MgCl^2$  (Applied Biosystems, Foster City, USA, Katalog-Nr. 4311820) verwendet.

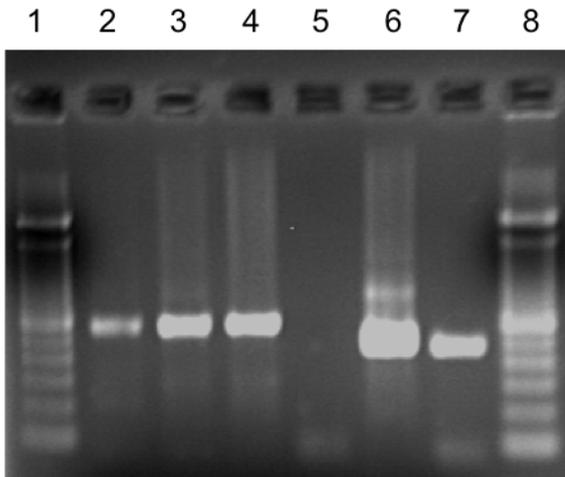
**Tabelle 17: PCR (polymerase chain reaction)-Ansatz für ASXL1**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
Aqua dest.	16,00
Puffer	2,50
MgCl <sub>2</sub>	1,50
dNTPs [25 mM each]	0,25
Vorwärtsprimer [10 pmol/ $\mu$ l]	0,50
Rückwärtsprimer [10 pmol/ $\mu$ l]	0,50
DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1,00
AmpliTa <sub>q</sub> -Polymerase	0,50
<b>Total</b>	<b>22,75</b>

**Tabelle 18: Temperaturprofil der PCR (polymerase chain reaction) für ASXL1**

Initiale Denaturierung	95°C - 5 min
Denaturierung	95°C - 30 sec
Annealing	56°C - 30 sec 40 Zyklen
Elongation	72°C - 1 min
Finale Elongation	72°C - 2 min

Nach erfolgter PCR wird mit Hilfe einer Gelelektrophorese überprüft, ob eine erfolgreiche Amplifikation stattgefunden hat. Hierzu wird ein 2%iges Agarosegel (3 g Agarose + 150 ml 1x TAE-Puffer) vorbereitet, dieses dann mit einer Mischung aus 5  $\mu$ l OrangeG Ladungspuffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland; Katalog-Nr. CAS 1936-158) + 5  $\mu$ l PCR-Produkt beladen und an den Seiten mit einem 100 bp DNA-Längenstandard (TrackIt, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland; Katalog-Nr. 10488-058) flankiert. Bei 40 Minuten mit 140 V trennen sich die unterschiedlich langen DNA-Fragmente im Gel auf. Anschließend wird das Gel 30 Minuten in 1%er Ethidiumbromidlösung gefärbt. Daraufhin kann das Gel unter einer UV-Lampe betrachtet werden. Es sollten 1 Bande bei den amplifizierten Proben zu sehen sein und keine bei der NTC-Probe.



**Abbildung 8: Beispiel eines Agarosegels nach erfolgter PCR (polymerase chain reaction) von Exon 12 des *ASXL1*-Gens.**

Position 1,8: TrackIt™ 100bp DNA Ladder (Invitrogen), Position 2,3,4,6,7: DNA-Fragmente des mutierten *ASXL1*-Abschnitts, Position 5: no template control (=NTC) (PCR der Mutierten vom 17.05.13). bp= Basenpaare

#### **Aufreinigung der PCR-Produkte**

Um die restliche DNA-Polymerase, Puffer und Primer sowie nicht verwendete dNTPs aus der Probe zu entfernen und ein reines PCR-Produkt zu erhalten, wird die Probe mit Hilfe des PCR Purification Kit (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland; Katalog-Nr.28106) aufgereinigt.

Es werden 200 µl PB-Puffer zur Probe (22,75 µl) gegeben, das Ganze vorsichtig gemischt und anschließend die gesamte Flüssigkeit auf eine Silikamembran-Säule gegeben, unter welcher ein 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen steht. Da diese Säule aus einer Silikamembran besteht, welche die PCR-Produkte in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen adsorbiert, durchlaufen die Verunreinigungen die Membran und enden im zu verwerfenden Durchlauf. Nun wird 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und es werden 700 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben. Wieder wird 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Daraufhin wird 1 Minute bei 13000 U/min trocken zentrifugiert. Zum Schluss werden 30 µl Elutionspuffer auf die Säule gegeben, damit sich das PCR-Produkt von der Säule löst- dies wird 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und danach 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert. Nun befindet sich das PCR-Produkt im Eluat und wird als letzten Schritt in ein 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt.

Zur Aufreinigung von Proben auf einer 96-Well-Plate wurde das QIAquick 96 PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden; Katalognummer 28183) benutzt. Zu den Proben wird zuerst 200  $\mu$ l PM-Puffer mit Hilfe einer 8er-Transfer-Pipette pipettiert. Die gesamte Mischung wird auf eine 96-Well-Filter-Platte transferiert, welche sich auf einer Vakuumpumpe befindet (Laboport, KNF Neuberger). Die Vakuumpumpe wird eingeschaltet und Verunreinigungen und Puffer durchlaufen den Filter, während die PCR-Produkte im Filter verbleiben. Nach Ausschalten des Vakuums wird zum Waschen 700  $\mu$ l PE-Puffer mit Hilfe einer Handystep-Pipette auf den Filter pipettiert. Anschließend wird die Vakuumpumpe 10 Minuten lang eingeschaltet und etwaige, noch vorhandene Verunreinigungen gelangen ins Lysat. Um den restlichen Puffer von den Filterspitzen zu entfernen, wird die Filterplatte danach auf einem Papierhandtuch mehrfach ausgeklopft. Daraufhin wird jeweils 40  $\mu$ l EB-Puffer mit Hilfe des Handy-Steps auf die Filter pipettiert und die Filterplatte auf eine 96-Well-Platte gestellt. Bei 6-minütigem Zentrifugieren mit 3800 U/min löst sich das PCR-Produkt vom Filter und befindet sich danach im Eluat.

### **CSR (Cycle Sequencing Reaction)**

In der Cycle Sequencing Reaction wird das PCR-Produkt als Template für eine Sequenzierungsreaktion nach Sanger (Sanger et al. 1977) verwendet.

Die CSR wurde mit dem BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA; Katalog-Nr. 4336919) durchgeführt. Das CSR-Kit beinhaltet DNA-Polymerase, 5x Sequenzing Puffer, Desoxyribonucleotide (dNTPs) und Didesoxyribonucleotide (ddNTPs).

Die Methode beruht darauf, dass den ddNTPs die 3'-OH-Gruppe fehlt, welche für die Elongation benötigt ist, da die DNA-Polymerase hieran die Phosphatgruppe der nächsten Base knüpft. Wird daher ein ddNTP anstatt eines dNTPs eingebaut, kommt es zu einem Kettenabbruch. Zusätzlich sind die einzelnen ddNTPs mit verschiedenen Farbstoffen markiert, womit man die verschiedenen Basen (ATP, TTP, GTP, CTP) unterscheiden kann.

Bei der CSR findet eine PCR statt, aber es entstehen verschieden lange Fragmente, da zu unterschiedlichen Punkten ddNTPs eingebaut werden und es somit zu einem Kettenabbruch kommt.

Für die CSR benötigt man zusätzlich zum BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit das aufgereinigte PCR-Produkt und, um nur lineare CSR-Produkte zu erhalten, den Forward-Primer. Die CSR wird auf Eis pipettiert und wegen der fluoreszenzmarkierten ddNTPs auch direkt nach dem Pipettieren in Alufolie verpackt.

**Tabelle 19: CSR (cycle sequencing reaction)-Ansatz für ASXL1; auf Eis pipettiert**

Reagenz	Volumen [µl]
Aqua dest.	10,0
BigDye Terminator v3.1	2,0
5x Sequenzing Buffer	1,0
Vorwärtsprimer [10 pmol/µl]	1,0
PCR-Produkt	1,0
<b>Total</b>	<b>15,0</b>

**Tabelle 20: Temperaturprofil der CSR (cycle sequencing reaction) für ASXL1**

Initiale Denaturierung	96°C - 2 min	
Denaturierung	95°C - 15 sec	
Annealing	55°C - 1 min	40 Zyklen
Elongation	60°C - 3 min	
	4°C - 10 min	

### **Aufreinigung der CSR-Produkte**

Um DNA-Polymerase, Puffer, Primer sowie nicht verwendete dNTPs und insbesondere die fluoreszenzmarkierten, nicht verwendeten ddNTPs aus der Probe zu entfernen, wird die Probe mit Hilfe des DyeEx 2.0 Spin Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA; Katalog-Nr. 63206) aufgereinigt.

Das Verfahren, welches in diesem Kit verwendet wird, entspricht einer Gelfiltrationschromatographie.

Die dazu verwendeten Gelsäulen werden zuerst kurz auf einem Vortex Schüttler geschüttelt, danach wird der Deckel ¼ Drehung geöffnet, die Flügel unterhalb der Säule abgebrochen und die Säule auf ein 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen gesetzt. Nun wird die Säule 3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert.

Jetzt werden 15 µl des CSR-Produkts auf die Säule gegeben und wieder 3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Hierbei kommt es zu einer Auftrennung der Moleküle nach ihrem Molekulargewicht. Die Verunreinigungen diffundieren in die Poren des Gelfiltrationsmaterials und werden dadurch zurückgehalten, während

die DNA-Fragmente durch das Gel hindurchwandern und im Eluat aufgefangen werden.

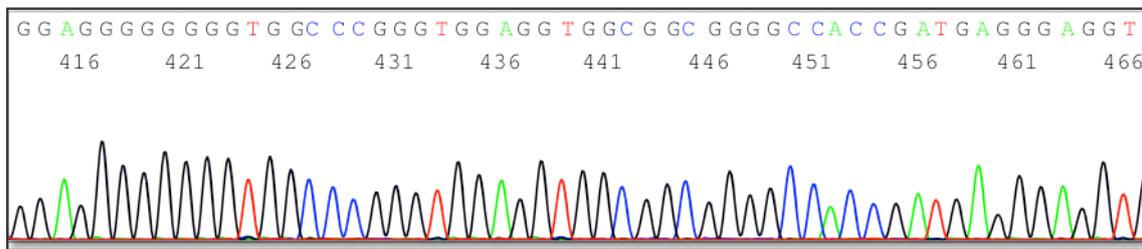
15 µl gereinigtes CSR-Produkt wird nun zusammen mit 5 µl HiDi™Formamide (Applied Biosystems, Foster City, USA, Katalog-Nr. 4311320) -benötigt, um Proben vor elektrokinetischen Injektion zu resuspendieren- auf eine 96-Well-Plate pipettiert und zentrifugiert. Das CSR-Produkt kann daraufhin zur Sequenzierung im 3500xL Dx Genetic Analyzer verwendet werden.

CSR-Produkte auf einer 96-Well-Platte wurden mit Hilfe des DyeEx 96 Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Katalognummer 63183) aufgereinigt. Hierfür wird eine im Kühlraum aufbewahrte Gelplatte auf eine Auffangplatte gesetzt und 6 Minuten bei 2350 U/min, einer Bremseinstellung von 7 und einer Beschleunigung von 4 zentrifugiert. Währenddessen werden je 5 µl HiDi™Formamide in eine neue 96-Well-Platte pipettiert. Nach dem Zentrifugieren wird das CSR-Produkt mit einer 8er-Transfer-Pipette auf die Gelsäulen pipettiert und die 96-Well-Platte mit dem HiDi™Formamide unter die Gelplatte gestellt. Wieder wird 6 Minuten bei 2350U/min, einer Bremseinstellung von 7 und einer Beschleunigung von 4 zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren befindet sich das gereinigte CSR-Produkt im Eluat und kann direkt zum Sequenzieren weiterverwendet werden.

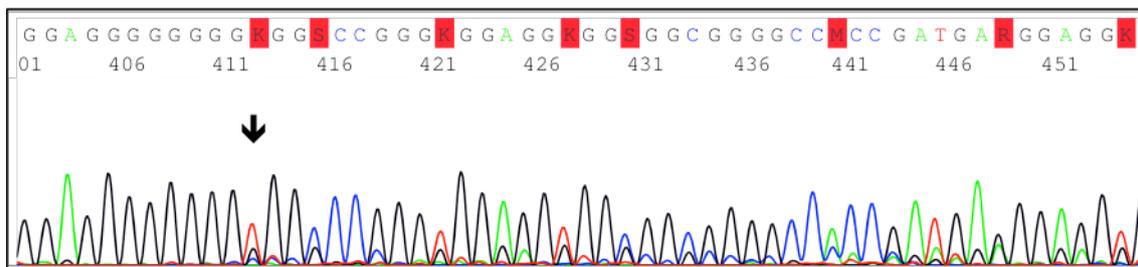
### **Sequenzanalyse**

Der Kapillarsequenzierer 3500xL Dx Genetic Analyzer wird verwendet, um die direkte Abfolge der Basen der Zielsequenz zu bestimmen. Dies ist möglich, da die unterschiedlich langen fluoreszenzmarkierten Fragmente der CSR sich der Länge nach in der Kapillare des Sequenzierers auftrennen. Während dieses Vorgangs passieren die Fragmente ein Detektionsfenster, durch welches ein Festkörper-Dioden-Laser die fluoreszierenden Farbstoffe anregt, diese Fragmente Licht abgeben, welches mittels einer CCD-Kamera detektiert wird. Da die vier verschiedenen ddNTPs jeweils mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt sind, entstehen vier unterschiedliche Lichtsignale, die computerunterstützt durch die Software Sequencing Analysis v5.4 analysiert und in ein Elektropherogramm (=Abfolge der Farbsignale) umgerechnet werden. Dieses Elektropherogramm gibt die direkte Abfolge der Basen der Zielsequenz wieder. In Abbildung 9 und 10 sind

Ausschnitte der Sequenzprofile einer *ASXL1*-Wildtypsequenz und einer *ASXL1*-Mutationssequenz zu sehen.



**Abbildung 9: Sequenzprofil einer *ASXL1*-Wildtypsequenz (HL60).** (Identifikations-IDs: Entrez Gene: 171023; Ensembl: ENSG00000171456). Der Ausschnitt zeigt verschiedene farbige Peaks, welche die direkte Abfolge der Basen darstellen: Arginin (grün), Cytosin (blau), Guanin (schwarz), Thymin (rot).



**Abbildung 10: Sequenzprofil der *ASXL1*-Mutation c.1934dupG; p.G646, fsx12.** Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzanalyse des Patientenmaterials Q9144, welches die heterozygote Mutation (Duplikation eines Guanins) enthält (↓Pfeilmarkierung). Der Ausschnitt zeigt verschiedene farbige Peaks, welche die direkte Abfolge der Basen darstellen: Arginin (grün), Cytosin (blau), Guanin (schwarz), Thymin (rot). An der Stelle der Mutation, an welcher nur ein roter Peak (Thymin) sichtbar sein sollte, ist zudem ein niedriger schwarzer Peak (Guanin) sichtbar.

## 2.2.6 Methodik zur Analyse von *SRSF2*

### PCR

Um Mutationen im *SRSF2*-Gen aufzufinden, wird jeweils eine Vervielfältigung von Exon 1 und Exon 2 mit Hilfe je einer DNA-basierter PCR mit jeweils einem Primerpaar (s. PCR *ASXL1*) durchgeführt. Es wird zu jedem Durchgang immer eine NTC-Probe mitgeführt, um die Sterilität der Reagenzien und Materialien nachzuweisen.

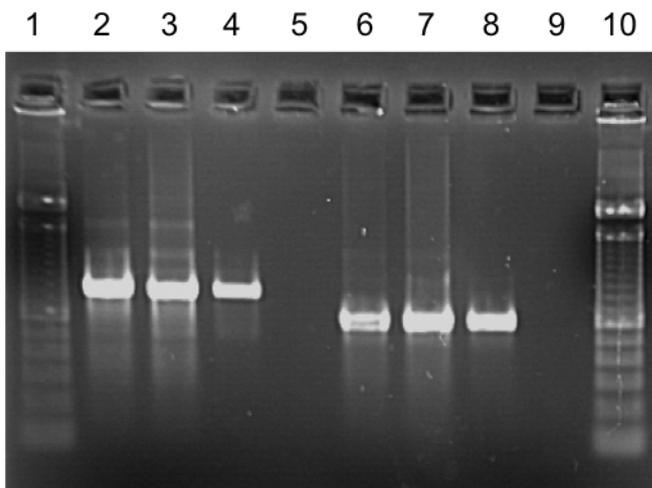
**Tabelle 21: PCR (polymerase chain reaction)-Ansatz für *SRSF2***

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
Aqua dest.	31,0
Puffer	5,0
Q-Solution	10,0
dNTPs [25 mM each]	0,5
Vorwärtsprimer [10 pmol/ $\mu$ l]	1,0
Rückwärtsprimer [10 pmol/ $\mu$ l]	1,0
DNA [100 ng/ $\mu$ l]	1,0
HotStar Taq-Polymerase	0,5
<b>Total</b>	<b>50,0</b>

**Tabelle 22: Temperaturprofil der PCR (polymerase chain reaction) für *SRSF2***

Initiale Denaturierung	95°C - 10 min
Denaturierung	95°C - 1 min
Annealing	60°C - 1 min 40 Zyklen
Elongation	72°C - 1 min
Finale Elongation	72°C - 10 min

Zur Produktkontrolle werden die PCR-Produkte und die NTC-Probe auf ein 2%iges Agarosegel (s. *ASXL1* PCR) geladen.



**Abbildung 11: Beispiel eines Agarosegels nach erfolgter PCR (polymerase chain reaction) von Exon 1 und 2 des *SRSF2*-Gens.**

Position 1, 10: TrackIt™ 100bp DNA Ladder (Invitrogen); Position 2-4: DNA-Fragmente von Exon 1; Position 6-8: DNA-Fragmente von Exon 2; Position 5, 9: no template control (NTC) (PCR1 vom 15.07.13). bp= Basenpaare

### **Aufreinigung der PCR-Produkte**

Um die restliche DNA-Polymerase, Puffer und Primer und nicht verwendete dNTPs aus der Probe zu entfernen und nur noch das PCR-Produkt zu erhalten, wird die Probe mit Hilfe des PCR Purification Kits von Qiagen aufgereinigt (für genaue Durchführung s. Aufreinigung der PCR bei *ASXL1*).

## CSR

Wie bereits für *ASXL1* beschrieben, wird auch hier bei *SRSF2* nun eine CSR durchgeführt (s. CSR *ASXL1*). Hierfür wird ebenfalls das BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems verwendet.

**Tabelle 23: CSR (cycle sequencing reaction)-Ansatz für *SRSF2*; auf Eis pipettiert**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
Aqua dest.	10,0
BigDye Terminator v3.1	2,0
5x Sequenzierung Buffer	1,0
Vorwärtsprimer [10 pmol/ $\mu$ l]	1,0
PCR-Produkt	1,0
<b>Total</b>	<b>15,0</b>

**Tabelle 24: Temperaturprofil der CSR (cycle sequencing reaction) für *SRSF2***

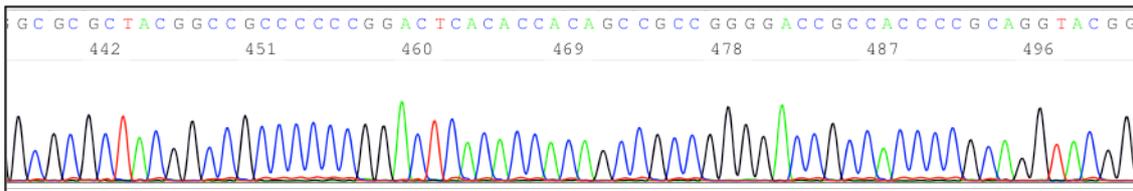
Initiale Denaturierung	96°C - 2 min	
Denaturierung	95°C - 15 sec	
Annealing	55°C - 1 min	40 Zyklen
Elongation	60°C - 3 min	
	4°C - 10 min	

## Aufreinigung der CSR-Produkte

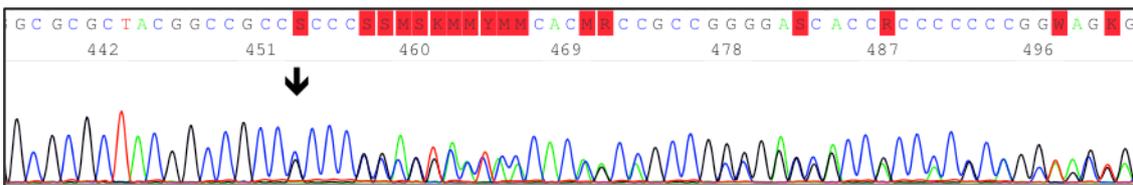
Um restliche DNA-Polymerase, Puffer, Primer sowie nicht verwendete dNTPs und insbesondere die fluoreszenzmarkierten, nicht verwendeten ddNTPs aus der Probe zu entfernen und nur noch das CSR-Produkt zu erhalten, wird die Probe mit Hilfe des DyeEx Spin Kits von Qiagen aufgereinigt (s. Aufreinigung der CSR-Produkte bei *ASXL1*)

## Sequenzanalyse

Mit Hilfe des Kapillarsequenzierers 3500xL Dx Genetic Analyzer werden die Fragmente im aufgereinigten CSR-Produkt nun der Größe nach aufgetrennt und über die fluoreszierenden Enden der Fragmente die Abfolge der Basen analysiert (s. Sequenzanalyse *ASXL1*).



**Abbildung 12: Sequenzprofil einer SRSF2-Wildtypsequenz (Exon 1, Q8599)** (Identifikations-IDs: Entrez Gene: 6427; Ensembl: ENSG00000161547). Der Ausschnitt zeigt verschiedene farbige Peaks, welche die direkte Abfolge der Basen darstellen: Arginin (grün), Cytosin (blau), Guanin (schwarz), Thymin (rot).



**Abbildung 13: Sequenzprofil der SRSF2-Mutation im Exon 1 (c.284\_286insGCC in frame; p.P95R\_ins).** Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzanalyse des Patientenmaterials P8729, welches die heterozygote frameshift-Mutation (Insertion von Guanin-Cytosin-Cytosin) enthält (↓Pfeilmarkierung). Der Ausschnitt zeigt verschiedene farbige Peaks, welche die direkte Abfolge der Basen darstellen: Arginin (grün), Cytosin (blau), Guanin (schwarz), Thymin (rot).

## 2.2.7 Methodik zur Analyse von *RUNX1*

### PCR

Für die Analyse der 8 Exone von *RUNX1* werden pro Patientenprobe 8 DNA-basierte PCRs mit je 8 Primerpaaren durchgeführt. Hierfür wurde das HotStarTaq DNA Polymerase Set (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland; Katalog-Nr. 203205) verwendet. In jeder Analyse wird immer eine NTC-Probe mitgeführt, um die Sterilität der Reagenzien zu überprüfen.

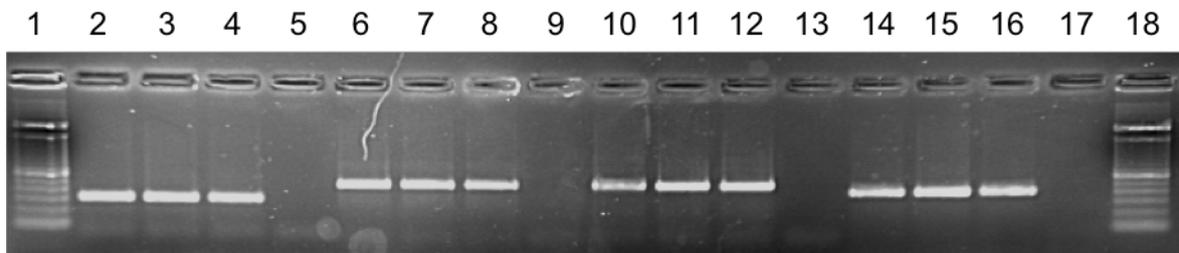
**Tabelle 25: PCR (polymerase chain reaction)-Ansatz für *RUNX1***

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
Aqua dest.	18,40
10xPCR-Puffer	2,50
DSMO	0,60
dNTPs [je 25 mM]	0,25
Vorwärtsprimer [10 pmol/ $\mu$ l]	1,00
Rückwärtsprimer [10 pmol/ $\mu$ l]	1,00
DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1,00
HotStar Taq-Polymerase	0,50
<b>Total</b>	<b>25,25</b>

**Tabelle 26: Temperaturprofil der PCR (polymerase chain reaction) für *RUNX1***

Initiale Denaturierung	97°C - 2 min
Denaturierung	97°C - 2 min
Annealing	63°C - 1 min 35 Zyklen
Elongation	72°C - 1 min
Finale Elongation	72°C - 5 min

Zur Produktkontrolle werden nach erfolgter PCR immer die letzten 3 PCR-Produkte einer 96-Well-Plate und die NTC-Probe auf ein 2%iges Agarosegel pipettiert (s. Gel ASXL1) und danach in 1%iger Ethidiumbromidlösung gefärbt. In Abbildung 14 ist ein Agarosegel nach erfolgter PCR der Exone 1-4 des *RUNX1*-Gens zu sehen.



**Abbildung 14: Beispiel eines Agarosegels nach erfolgter PCR (polymerase chain reaction) der Exone 1-4 des *RUNX1*-Gens.**

Position 1, 18: TrackIt™ 100bp DNA Ladder (Invitrogen); Position 2-4: DNA-Fragmente von Exon 1; Position 6-8: DNA-Fragmente von Exon 2; Position 10-12: DNA-Fragmente von Exon 3; Position 14-16: DNA-Fragmente von Exon 4; Position 5, 9, 13, 17: no template control (NTC) (PCR3 vom 23.04.13). bp= Basenpaare

### **Aufreinigung der PCR-Produkte**

Um die PCR-Produkt-Proben von Verunreinigungen wie nicht eingebauten dNTPs, Puffer und DNA-Polymerase zu befreien, werden die PCR-Produkte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt (s. Aufreinigung der PCR ASXL1).

### **CSR**

Um eine Sequenzierreaktion nach Sanger zu starten wird im Anschluss an die Aufreinigung der PCR-Produkte mit diesen eine Cycling Sequencing Reaction durchgeführt. Dafür werden je 2 µl des aufgereinigten PCR-Produkts und je 1 µl des benötigten Primers (1F, 2R, 3F, 4F, 5F, 6R, 7R, 8F) zusammen mit dem

BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems verwendet. Um die fluoreszenzmarkierten Primer vor Licht zu schützen, sollten die Reagenzien und die Reaktionsgefäße in Alufolie verpackt werden. Zusätzlich ist die CSR auf Eis zu pipettieren.

**Tabelle 27: CSR (cycle sequencing reaction)-Ansatz für *RUNX1*; auf Eis pipettiert**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
Aqua dest.	8,3
BigDye Terminator v3.1	2,0
5x Sequenzing Buffer	1,7
Vorwärtsprimer [10 pmol/ $\mu$ l] bzw. Rückwärtsprimer [10 pmol/ $\mu$ l]	1,0
PCR-Produkt	1,0
<b>Total</b>	<b>14,0</b>

**Tabelle 28: Temperaturprofil CSR (cycle sequencing reaction) für *RUNX1***

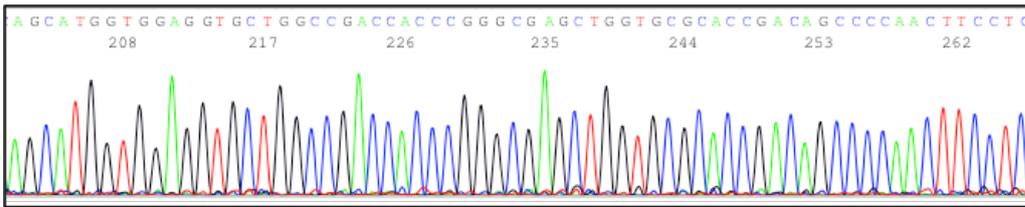
Initiale Denaturierung	96°C - 2 min
Denaturierung	94°C - 1 min
Annealing	55°C - 1 min 35 Zyklen
Elongation	60°C - 3 min
	10°C - $\infty$

### **Aufreinigung der CSR-Produkte**

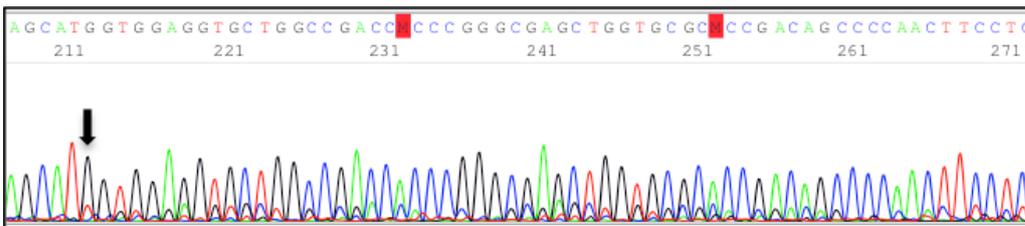
Zur Entfernung von Verunreinigungen wie ddNTPs, dNTPs, Puffer und DNA-Polymerase wird eine Aufreinigung der CSR-Produkte durchgeführt. Dafür wird das DyeEx Spin Kit von Qiagen verwendet (s. Aufreinigung der CSR-Produkte bei ASXL1).

### **Sequenzanalyse**

Mit Hilfe des Kapillarsequenzierers 3500xL Dx Genetic Analyzer werden die Fragmente im aufgereinigten CSR-Produkt der Größe nach aufgetrennt und über die fluoreszierenden Enden der Fragmente die Abfolge der Basen analysiert (s. Sequenzanalyse ASXL1).



**Abbildung 15: Sequenzprofil einer *RUNX1*-Wildtypsequenz (Exon 3, Q8811)** (Identifikations-IDs: Entrez Gene: 861, Ensembl: ENSG00000159216). Der Ausschnitt zeigt verschiedene farbige Peaks, welche die direkte Abfolge der Basen darstellen: Arginin (grün), Cytosin (blau), Guanin (schwarz), Thymin (rot).



**Abbildung 16: Sequenzprofil der Mutation *RUNX1* Exon 3 (c.423\_424insT, p.M78Ifsx60).** Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzanalyse des Patientenmaterials Q9144, welches die Insertion eines Thymin (roter Peak bei ↓Pfeilmarkierung) enthält. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters und nach 60 Basentriplets zu einem Stopp. Der Ausschnitt zeigt verschiedene farbige Peaks, welche die direkte Abfolge der Basen darstellen: Arginin (grün), Cytosin (blau), Guanin (schwarz), Thymin (rot).

### 2.2.8 Statistische Auswertung

Da der Schwerpunkt dieser Dissertation aus überwiegend experimentellen Arbeiten bestand, wurde die statistische Analyse der erhobenen Ergebnisse sowie deren Korrelation mit klinischen Daten und den Endpunkten Gesamt- und leukämiefreies Überleben durch die Studienzentrale der AMLSG in Ulm unter der Leitung von Herrn Dr. Frank Stegelmann durchgeführt.

Die klinischen und prognostischen Daten wurden zum Zeitpunkt der Diagnose dokumentiert (Alter, Geschlecht, Zytogenetik, MDS-Klassifikation, IPSS/-R, Anzahl der Zellen im Blut und Morphologie dieser) und zwischen der Gruppe der Patienten mit Mutationen und der Gruppe der Patienten ohne Mutation (=Wildtyp) verglichen. Dies wurde für jedes der untersuchten Gene einzeln analysiert. Die Auswertung der Inzidenz von *ASXL1*-, *SRSF2*- und *RUNX1*-Mutationen in unserem Studienkollektiv erfolgte mittels deskriptiver Methoden. Für die weiteren Analysen wurden der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für zwei verbundene Stichproben sowie der Fisher-Exakt-Test eingesetzt.

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test diente dem Vergleich quantitativer Variablen wie Alter und Anzahl der Zellen im Blut. Zur Berechnung von Differenzen in der Häufigkeit qualitativer Merkmale (Geschlecht, IPSS/-R, etc) wurde der Fisher-Exakt-Test durchgeführt. Die Kaplan-Meier-Methode diente der Schätzung und Visualisierung der klinischen Endpunkte Gesamtüberleben und leukämiefreies Überleben in Hinblick auf die An- oder Abwesenheit von Mutationen. Für alle Tests galt das Signifikanzniveau  $P < 0.05$ .

Alle Analysen erfolgten unter Zuhilfenahme der Software Environment R Version 3.2.1.

Zur Untersuchung einer möglichen prädiktiven oder prognostischen Bedeutung der in dieser Arbeit untersuchten Gene *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1* wurden die Daten aus der Metadatei des MDS-Registers verwendet. Die Daten zu den Veränderungen in den Genen *TP53* und *SF3B1* wurden im Rahmen der Dissertation von Til Wallrabenstein erhoben und hier nur für die klinische und genetische Korrelation mit den Genen *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1* verwendet.

## 3. Ergebnisse

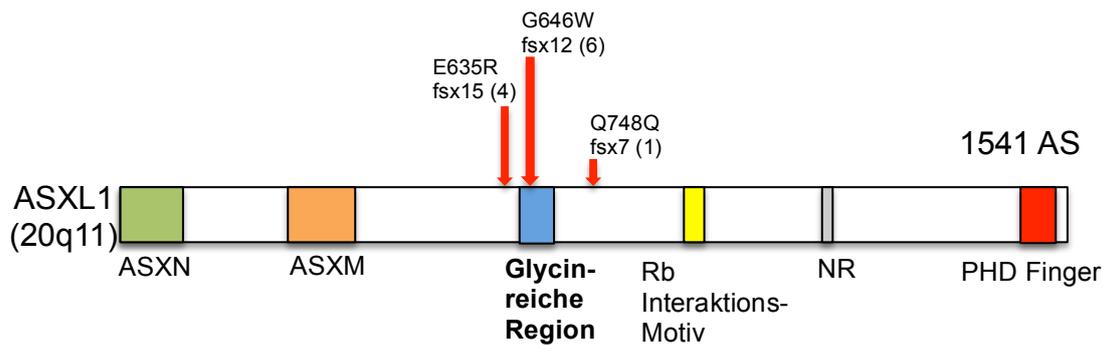
### 3.1 ASXL1

#### 3.1.1 Inzidenz von ASXL1-Mutationen

Bei 11 von 116 Patienten (9,5%) unserer MSD-Kohorte konnten Mutationen im ASXL1-Gen gefunden werden. Alle zunächst mit Hilfe der GeneScan-Methode detektierten Mutationen wurden durch DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al. 1977) bestätigt. Bei den 11 gefundenen ASXL1-Mutationen handelte es sich in 7 Fällen um Duplikationen bzw. Insertionen und in 4 Fällen um Deletionen, welche zu einer Verschiebung des Leserasters (frame shift mutations) führten und damit zu einer frühzeitigen Termination des translatierten Proteins (siehe Tabelle 29 und Abbildung 17)

**Tabelle 29: ASXL1-Mutationen im Exon 12.** Auflistung der in dieser Arbeit entdeckten Mutationen im ASXL1-Gen bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013)

Mutation der Nukleotidsequenz	Mutation der Aminosäure	Anzahl	[%]
Proben gesamt	Proben gesamt	105	100
Veränderungen gesamt	Veränderungen gesamt	11	10,5
c.1934dupG	p.G646WfsX12	6	54,5
c.1900_1922del	p.E635RfsX15	4	36,4
c.2209_2244dup	p.Q748QfsX7	1	9,1



**Abbildung 17:** Lokalisation der *ASXL1*-Mutationen. Schematische Darstellung des *ASXL1* Proteins mit den bekannten Motiven und Domänen (nach Boulwood et al. 2010, Abdel-Wahab et al. 2011). ASXN/ASXM (grün/orange): aminoterminaler Homologie-Domänen, Bindungsstellen für nukleäre Rezeptoren; Glycin-reiche Domäne (blau), mit Pfeil markiert: am häufigsten durch Mutationen betroffene Region (Exon 12; Aminosäuresequenz 642-685); Rb Interaktionsmotiv (gelb); NR (Nuclear Receptor) (grau): Bindemotiv für nukleäre-Rezeptoren RAR und RXR; PHD (Plant Homeo Domain) Finger (rot): hoch konservierte cysteinreiche Region für Interaktion mit anderen Proteinen. Nahe glycin-reicher Region Lokalisation der in dieser Arbeit detektierten Mutationen, diese mit Pfeilen markiert. In Klammer steht jeweils die Anzahl der gefundenen Mutationen. AS=Aminosäuren

### 3.1.2 Assoziation von *ASXL1*-Mutationen mit klinischen Charakteristika

In Hinblick auf die klinischen Charakteristika bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit einer Mutation im *ASXL1*-Gen und Patienten mit *ASXL1*-Wildtyp, wenn man diese mit den Parametern Alter ( $P=0.53$ ), Geschlecht ( $P=1.0$ ), Blastenanteil im peripheren Blut  $> 5\%$  ( $P=0.85$ ), Ringsideroblasten  $> 15\%$  ( $P=0.47$ ), Hämoglobingehalt ( $P=0.93$ ) und Leukozytenanzahl ( $P=0.19$ ) korrelierte.

MSD-Patienten mit *ASXL1*-Mutationen hatten eine höhere Zahl an neutrophilen Granulozyten (Median: 2,4%) als Patienten ohne *ASXL1*-Mutation (Median: 1,3%), dies war allerdings statistisch nicht signifikant ( $P=0.11$ ). Außerdem hatten Patienten mit *ASXL1*-Mutation eine niedrigere Anzahl an Thrombozyten (Median:  $74 \times 10^9/L$ ) im Vergleich zu Patienten ohne *ASXL1*-Mutation, auch dies war ebenfalls statistisch nicht signifikant (Median:  $153 \times 10^9/L$ ,  $P=0.1$ ) (siehe Tabelle 30).

**Tabelle 30: Assoziation von ASXL1-Mutationen mit klinischen Charakteristika bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013).** MUT=mutiert, WT=Wildtyp, n=Anzahl, P=P-Wert.

<b>Charakteristika</b>	<b>ASXL1 MUT</b>	<b>ASXL1 WT</b>	<b>P</b>
<b>Alter (Jahre)</b>			0.53
Median	63,66	67,98	
Bereich	50,48-77,18	32,61-84,34	
<b>Geschlecht</b>			1
männlich, n (%)	7 (63,6)	62 (59,1)	
weiblich, n (%)	4 (36,4)	43 (40,9)	
<b>Blasten &gt;5%</b>			0.85
ja, n (%)	1 (11,1)	6 (7,1)	
nein, n (%)	8 (88,9)	79 (92,9)	
nicht verfügbar	2	20	
<b>Ringsideroblasten &gt;15%</b>			0.47
ja, n (%)	0	6 (10)	
nein, n (%)	4 (100)	54 (90)	
nicht verfügbar	7	45	
<b>Neutrophile Granulozyten (10<sup>9</sup>/L)</b>			0.11
Median	2,4	1,34	
Bereich	0,2-60,69	-1,99-30,61	
<b>Hämoglobin (g/dl)</b>			0.93
Median	9,6	9,7	
Bereich	8,2-13,3	6-14,5	
<b>Thrombozyten (10<sup>9</sup>/L)</b>			0.1
Median	74	153	
Bereich	21-463	8-662	
<b>Leukozyten (10<sup>9</sup>/L)</b>			0.19
Median	3,7	3,1	
Bereich	1,7-97,9	1,1-56,7	

### 3.1.3 Assoziation von ASXL1-Mutationen mit Zytogenetik und anderen molekularen Markern

Es bestanden keine statistisch signifikante Assoziation zwischen ASXL1-mutierten Patienten gegenüber ASXL1-Wildtyp Patienten in Bezug auf die zytogenetischen Veränderungen ( $P=0.36$ ) (siehe Tabelle 31). Unter den ASXL1-mutierten Patienten hatten acht Patienten einen normalen Karyotyp und drei Patienten einen abnormalen Karyotyp.

**Tabelle 31: Assoziation von *ASXL1*-Mutationen mit der Zytogenetik bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013). MUT=mutiert, WT=Wildtyp, n=Anzahl, P=P-Wert.**

<b>Charakteristika</b>	<b><i>ASXL1</i> MUT</b>	<b><i>ASXL1</i> WT</b>	<b>P</b>
<b>Zytogenetik</b>			0.36
normal, n (%)	8 (72,7)	60 (57,1)	
abnormal, n (%)	3 (27,3)	45 (42,9)	

Im Bezug auf die Koinzidenz mit anderen molekularen Markern zeigte sich eine signifikante Assoziation von *ASXL1*-Mutationen mit *RUNX1*-Mutationen ( $P=0.02$ ) sowie im Trend mit Mutationen im *SRSF2*-Gen ( $P=0.07$ ). Mutationen in *TP53* und *SF3B1* waren nicht signifikant mit *ASXL1*-Mutationen assoziiert ( $P=0.6$ ;  $P=0.69$ ; siehe Tabelle 32). Bei einer MSD-Patientin (Nr.84) waren alle drei der untersuchten Gene mutiert, sie hatte den MDS-Subtyp RCDM, wurde bei IPSS in „Intermediate I“ eingestuft, hatte nach FISH-Analyse keine Chromosomenanomalien und erhielt als Therapie Darbapoetin und Azacytidin. Außerdem waren bei einem anderen Patienten *ASXL1* zusammen mit *RUNX1* und bei zwei weiteren Patienten *ASXL1* zusammen mit *SRSF2* mutiert.

**Tabelle 32: Molekulargenetische Assoziationen zwischen *ASXL1* und den restlichen untersuchten Markern bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013). Die Daten zu *TP53*, *TP53 polymorph* und *SF3B1* sind Bestandteil der Metadatei des MDS-Registers, wurden von Til Wallrabenstein im Rahmen seiner Dissertation erhoben und mit den in dieser vorliegenden Arbeit erhobenen Daten korreliert. MUT/mut=mutiert, WT/wt=Wildtyp, n=Anzahl, P=P-Wert.**

<b>Charakteristika</b>	<b>ASXL1 MUT</b>	<b>ASXL1 WT</b>	<b>P</b>
<b><i>SRSF2</i></b>			<b>0.07</b>
mut, n (%)	3 (27,3)	8 (7,6)	
wt, n (%)	8 (72,7)	97 (92,4)	
<b><i>RUNX1</i></b>			<b>0.02</b>
mut, n (%)	2 (18,2)	1 (0,9)	
wt, n (%)	9 (81,8)	104 (99,1)	
<b><i>TP53</i></b>			<b>0.6</b>
mut, n (%)	0	11 (10,5)	
wt, n (%)	11 (100)	94 (89,5)	
<b><i>TP53 polymorph</i></b>			<b>1</b>
mut, n (%)	0	5 (4,8)	
wt, n (%)	11 (100)	100 (95,2)	
<b><i>SF3B1</i></b>			<b>0.69</b>
mut, n (%)	1 (9,1)	19 (18,1)	
wt, n (%)	10 (90,9)	86 (81,9)	

### **3.1.4 *ASXL1*-Mutationen im Kontext der MDS-Klassifikation sowie der Prognosescores IPSS und IPSS-R**

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit einer Mutation im *ASXL1*-Gen und Patienten mit *ASXL1*-Wildtyp im Hinblick auf die Einteilung in die verschiedenen MDS-Subtypen ( $P=0.36$ ). Des Weiteren konnten wir keinen signifikanten Einfluss von *ASXL1*-Mutationen in Bezug auf die Einteilung in die Risikostratifikationssysteme IPSS ( $P=0.14$ ) und IPSS-R ( $P=0.62$ ) (siehe Tabelle 33) feststellen.

**Tabelle 33: Assoziationen von ASXL1-Mutationen mit MDS-Klassifikation und IPPS und IPSS-R bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013).** MUT=mutiert, WT=Wildtyp, n=Anzahl, MDS=Myelodysplastisches Syndrom, RARS=Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten, RAEB=Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung, RCMD=Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien mit oder ohne Ringsideroblasten, RCUD=Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie, CMML=Chronische Myelomonozytäre Leukämie, MDS-MPS=Myelodysplastische Syndrome-Myeloproliferative Syndrome, IPSS=International Prognostic Scoring System, IPSS-R= International Prognostic Scoring System- Revised, P=P-Wert.

<b>Charakteristika</b>	<b>ASXL1 MUT</b>	<b>ASXL1 WT</b>	<b>P</b>
<b>MDS-Klassifikation</b>			0.36
RARS, n (%)	0	6 (6,1)	
RAEB I, n (%)	1 (10)	22 (22,4)	
RAEB II, n (%)	2 (20)	14 (14,3)	
RCMD, n (%)	3 (30)	35 (35,7)	
RCUD, n (%)	2 (20)	9 (9,2)	
CMML I, n (%)	2 (20)	3 (3,1)	
CMML II, n (%)	0	1 (1,4)	
MDS-MPS, n (%)	0	2 (2)	
nicht klassifizierbar	0	6 (6,1)	
nicht verfügbar	1	7	
<b>IPSS</b>			0.14
Low Risk, n (%)	3 (27,3)	28 (26,7)	
Intermediate I, n (%)	3 (27,3)	50 (47,6)	
Intermediate II, n (%)	4 (36,4)	10 (9,5)	
High Risk, n (%)	1 (9,1)	10 (9,5)	
nicht beurteilbar, n (%)	0	7 (6,7)	
<b>IPSS-R</b>			0.62
Very Low Risk, n (%)	0	4 (3,8)	
Low Risk, n (%)	3 (27,3)	39 (37,1)	
Intermediate, n (%)	5 (45,5)	33 (31,4)	
High Risk, n (%)	3 (27,3)	13 (12,4)	
Very High Risk, n (%)	0	6 (5,7)	
nicht beurteilbar, n (%)	0	10 (9,5)	

### **3.1.5 Assoziationen von ASXL1-Mutationen mit der Therapie und deren Einfluss auf das Überleben**

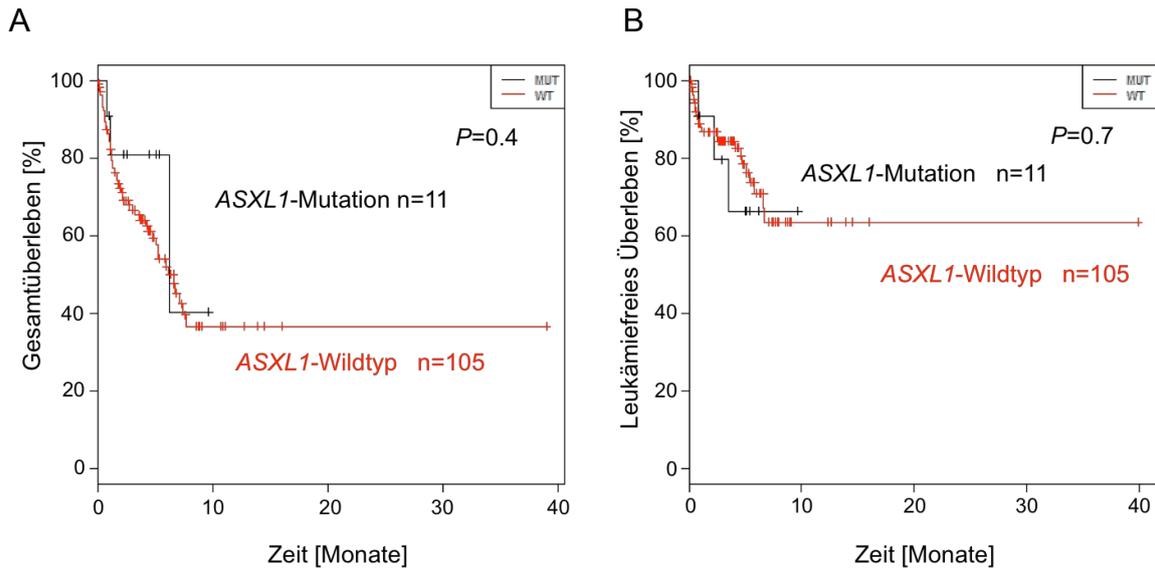
81,8 % der Patienten mit einer Mutation im ASXL1-Gen erhielten eine spezifische Therapie, während nur 44,8% der Patienten mit einem Wildtyp-ASXL1-Gen eine spezifische Therapie erhielten ( $P=0.03$ ). Zu den spezifischen Therapien zählen die Gabe von Lenalidomid, Azacytidin und anderen Chemotherapeutika. In dieser Studie erhielten 23 Patienten eine Therapie mit Lenalidomid/ Thalidomid, 15 Patienten eine Therapie mit Azacytidin und 8 Patienten eine Therapie mit Litalir (=Hydroxycarbamin, Zytostatikum).

Im Vergleich dazu erhielten die beiden Gruppen jeweils in fast gleichem Ausmaß eine allogene Stammzelltransplantation (mut: 9,1%; wt: 9,5%;  $P=1$ , n=11) oder eine Supportivtherapie (mut: 63,6%; wt: 60%;  $P=1$ )(siehe Tabelle 34) wie Darbepoetin alpha (=synthetisches EPO)/ EPO (n=45) oder Eisenchelatoren (n=41).

**Tabelle 34: Assoziationen von ASXL1-Mutationen mit der Therapie bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013).** MUT=mutiert, WT=Wildtyp, n=Anzahl, TX=Transplantation,  $P$ = $P$ -Wert.

<b>Charakteristika</b>	<b>ASXL1 MUT</b>	<b>ASXL1 WT</b>	<b>P</b>
<b>Spezifische Therapie</b>			<b>0.03</b>
ja, n (%)	9 (81,8)	47 (44,8)	
nein, n (%)	2 (18,2)	58 (55,2)	
<b>Allogene Stammzell-TX</b>			<b>1</b>
ja, n (%)	1 (9,1)	10 (9,5)	
nein, n (%)	10 (90,9)	95 (90,5)	
<b>Supportivtherapie</b>			<b>1</b>
ja, n (%)	7 (63,6)	63 (60)	
nein, n (%)	4 (36,4)	42 (40)	

Im Hinblick auf den Einfluss einer ASXL1-Mutation auf das Gesamtüberleben ließ sich bei unserer Patientenkohorte kein signifikanter Unterschied bezüglich einer veränderten Überlebenszeit erkennen ( $P=0.4$ ). Ein signifikanter Einfluss auf die Zeit bis zu einer Transformation in eine akute myeloische Leukämie (= leukämiefreies Überleben) wurde ebenfalls nicht beobachtet ( $P=0.7$ ) (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf das (A) Gesamtüberleben und (B) leukämiefreies Überleben bis zum Übergang in eine akute myeloische Leukämie von Patienten mit *ASXL1*-Mutation (=MUT) im Vergleich zu Patienten mit *ASXL1*-Wildtyp (=WT), erhoben bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013). n=Anzahl, P=P-Wert.

## 3.2 SRSF2

### 3.2.1 Inzidenz von *SRSF2*-Mutationen

Bei 11 von 116 Patienten (9,5%) konnten *SRSF2*-Mutationen nachgewiesen werden. Diese traten alle in Exon 1 auf.

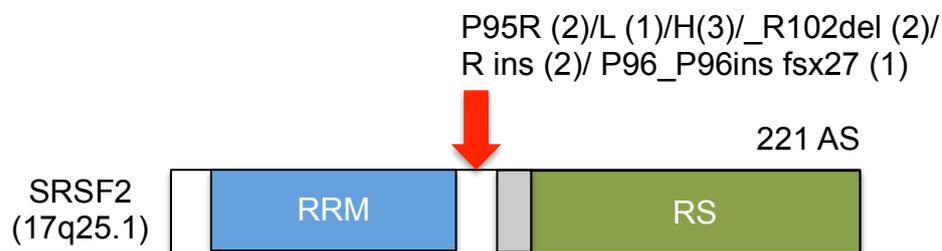
Bei 3 dieser Mutationen handelte es sich um Insertionen, davon wurde bei 2 Insertionen ein GCC eingefügt, hier blieb das Leseraster erhalten; bei einer dieser 3 Insertionen kam es zu einer Verschiebung des Leserasters durch die Insertion eines C und konsekutiv zu einem Stoppcodon nach 27 Basentriplets.

Bei 2 Mutationen handelte es sich um Deletionen, hierbei kam es zu einem Verlust von 24 Basen (= 8 Basentriplets), wobei das Leseraster erhalten blieb.

Bei den weiteren 6 *SRSF2*-Mutationen handelte es sich um Punktmutationen (siehe Tabelle 35 und Abbildung 19). Alle 6 *SRSF2*-Punktmutationen waren Missense-Mutationen, was bedeutet, dass durch den Austausch einer Base das Codon für eine andere Aminosäure kodiert und es dadurch zu einer veränderten Funktion des durch das Gen kodierten Proteins kommen könnte.

**Tabelle 35: SRSF2-Mutationen in Exon 1.** Auflistung der in dieser Arbeit entdeckten Mutationen im *SRSF2*-Gen bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013).

Mutation der Nukleotidsequenz	Mutation der Aminosäure	Anzahl	[%]
Proben gesamt	Proben gesamt	105	100
Veränderungen gesamt	Veränderungen gesamt	11	10,5
c.C284A	p.P95H	3	27,2
c.C284G	p.P95R	2	18,2
c.284_307del	p.P95_R102del	2	18,2
c.284_286insGCC	p.P95R_ins inframe	2	18,2
c.C284T	p.P95L	1	9,1
c.288dupC	p.P96_P96ins fsX27	1	9,1



**Abbildung 19: Lokalisation der SRSF2-Mutationen.** Schematische Darstellung des SRSF2-Proteins mit bekannten Motiven und Domänen (nach Yoshida et al. 2011). RRM (blau): RNA recognition motif; RS (grün): arginine/ serine-rich domains. Roter Pfeil markiert Prolin an Position 95 (P95), eine der häufigsten Mutationen bei SRSF2. Mit dem roten Pfeil ist die Lokalisation der detektierten Mutationen gekennzeichnet, in Klammer steht jeweils die Anzahl der gefundenen Mutationen. AS=Aminosäuren.

### 3.2.2 Assoziation von SRSF2-Mutationen mit klinischen Charakteristika

In Bezug auf die klinischen Charakteristika konnte im Trend eine Assoziation von *SRSF2*-Mutationen mit dem Alter der MDS-Patienten ( $P=0.08$ ; Zeitpunkt der Aufnahme in das Ulmer MDS-Register) festgestellt werden. Das Alter der MDS-Patienten mit *SRSF2*-Mutation war durchschnittlich höher (Median: 71,1 Jahre) als das Alter der Patienten ohne *SRSF2*-Mutation (Median: 65,9 Jahre). Des Weiteren wurde keine signifikante Assoziation von *SRSF2*-Mutationen mit folgenden klinischen Charakteristika detektiert: Geschlecht ( $P=0.2$ ), Anteil an Blasten im peripheren Blut  $>5\%$  ( $P=0.4$ ), Anteil an Ringsideroblasten  $>15\%$  ( $P=1$ ), Anzahl an neutrophilen Granulozyten ( $P=0.6$ ), Hämoglobinwert ( $P=0.8$ ), Thrombozyten- ( $P=0.2$ ) und Leukozytenanzahl ( $P=0.2$ ) (siehe Tabelle 36).

**Tabelle 36: Assoziation von SRSF2-Mutationen mit klinischen Charakteristika bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013).** MUT=mutiert, WT=Wildtyp, n=Anzahl, P=P-Wert.

<b>Charakteristika</b>	<b>SRSF2 MUT</b>	<b>SRSF2 WT</b>	<b>P</b>
<b>Alter (Jahre)</b>			<b>0.08</b>
Median	71,13	65,93	
Bereich	55,52-82,13	32,61-84,34	
<b>Geschlecht</b>			<b>0.2</b>
männlich, n (%)	9 (81,8)	60 (57,1)	
weiblich, n (%)	2 (18,2)	45 (42,9)	
<b>Blasten &gt;5%</b>			<b>0.43</b>
ja, n (%)	1 (9,1)	6 (5,7)	
nein, n (%)	6 (85,7)	81 (93,1)	
nicht verfügbar	4	18	
<b>Ringsideroblasten &gt;15%</b>			<b>1</b>
ja, n (%)	0	6 (5,7)	
nein, n (%)	6 (100)	52 (89,7)	
nicht verfügbar	5	47	
<b>Neutrophile Granulozyten (10<sup>9</sup>/L)</b>			<b>0.58</b>
Median	1,535	1,36	
Bereich	0,67-60,69	0-30,61	
nicht verfügbar	1	4	
<b>Hämoglobin (g/dl)</b>			<b>0.75</b>
Median	9,4	9,7	
Bereich	8,1-14,4	6-14,5	
<b>Thrombozyten (10<sup>9</sup>/L)</b>			<b>0.17</b>
Median	76	153	
Bereich	21-593	8-662	
<b>Leukozyten (10<sup>9</sup>/L)</b>			<b>0.24</b>
Median	3,6	3,1	
Bereich	1,5-97,9	1,1-56,7	

### 3.2.3 Assoziation von SRSF2-Mutationen mit der Zytogenetik und mit anderen molekularen Markern

Es bestanden keine statistisch signifikanten Assoziationen zwischen Patienten mit einer SRSF2-Mutation und Patienten mit einem Wildtyp im SRSF2-Gen in Bezug auf die Zytogenetik ( $P=0.1$ )(siehe Tabelle 37). Neun der Patienten mit SRSF2-Mutation hatten eine normalen Karyotyp, während zwei Patienten mit SRSF2-Mutation einen abnormalen Karyotyp vorwiesen.

**Tabelle 37: Assoziation von SRSF2-Mutationen mit Zytogenetik bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013).** MUT=mutiert, WT=Wildtyp, n=Anzahl, P=P-Wert.

Charakteristika	SRSF2 MUT	SRSF2 WT	P
<b>Zytogenetik</b>			0.12
normal, n (%)	9 (81,8)	59 (56,2)	
abnormal, n (%)	2 (18,2)	46 (43,8)	

Wie schon bei *ASXL1* unter 3.1.4 beschrieben, deutete sich ein Trend zu einer Assoziation der Präsenz von *SRSF2*-Mutationen mit zusätzlichen *ASXL1*-Mutationen an ( $P=0.07$ ) (siehe Tabelle 38). Es konnte keine signifikante Assoziation von *SRSF2*-Mutationen mit *RUNX1*-Mutationen ( $P=0.26$ ), *TP53*-Mutationen ( $P=0.6$ ), *TP53polymorph* ( $P=0.4$ ) oder *SF3B1*-Mutationen ( $P=0.21$ ) gezeigt werden (siehe Tabelle 38).

**Tabelle 38: Molekulargenetische Assoziationen zwischen SRSF2 und den restlichen untersuchten Markern bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013).** Die Daten zu *TP53*, *TP53 polymorph* und *SF3B1* sind Bestandteil der Metadatei des MDS-Registers, wurden von Til Wallrabenstein im Rahmen seiner Dissertation erhoben und mit den in dieser vorliegenden Arbeit erhobenen Daten korreliert. MUT/mut=mutiert, WT/wt=Wildtyp, n=Anzahl, P=P-Wert.

Charakteristika	SRSF2 MUT	SRSF2 WT	P
<b>ASXL1</b>			0.07
mut, n (%)	3 (27,3)	8 (7,6)	
wt, n (%)	8 (72,7)	97 (92,4)	
<b>RUNX1</b>			0.26
mut, n (%)	1 (9,1)	2 (1,9)	
wt, n (%)	10 (90,9)	103 (98,1)	
<b>TP53</b>			0.6
mut, n (%)	0	11 (10,5)	
wt, n (%)	11 (100)	94 (89,5)	
<b>TP53 polymorph</b>			0.4
mut, n (%)	1 (9,1)	4 (3,8)	
wt, n (%)	10 (90,9)	101 (96,2)	
<b>SF3B1</b>			0.21
mut, n (%)	0	20 (19,1)	
wt, n (%)	11 (100)	85 (80,9)	

### 3.2.4 SRSF2-Mutationen im Kontext der MDS-Klassifikation sowie der Prognosescores IPSS und IPSS-R

Betrachtete man einen möglichen Einfluss von *SRSF2*-Mutationen auf die Stratifizierung in die entsprechenden Risikoscores, so konnte folgende signifikante Assoziation ( $P=0.01$ ) festgestellt werden: Bei der Einteilung nach IPSS wurden

keine Patienten mit *SRSF2*-Mutation in der Low Risk Gruppe gefunden; diese waren in den Risikogruppen Intermediate I (n=4, 36,4%) und vermehrt in den höheren Risikogruppen Intermediate II (n=4, 36,4%) und High Risk (n=2, 18,2%) zu finden, während MDS-Patienten ohne *SRSF2*-Mutation zu 76,2% in die Low Risk Gruppe (n=31, 29,5%) oder Intermediate I (n=49, 46,7%) eingestuft wurden (siehe Tabelle 39). Es bestand kein signifikanter Zusammenhang bei der Einteilung in IPSS-R ( $P=0.92$ ), jedoch waren auch hier Patienten mit *SRSF2*-Mutation vermehrt in die Gruppen Intermediate (n=5, 45,5%) und High Risk (n=2, 18,2%) eingeteilt. Auch bei der Einteilung in die MDS-Subtypen ( $P=0.13$ ) gab es keinen signifikanten Zusammenhang für Patienten mit *SRSF2*-Mutation und Patienten mit *SRSF2*-Wildtyp (siehe Tabelle 39), Patienten mit *SRSF2*-Mutation waren jedoch am häufigsten in der Gruppe RAEB II (n=4, 36,4%) zu finden.

**Tabelle 39: Assoziation von *SRSF2*-Mutationen mit der MDS-Klassifikation und IPSS und IPSS-R bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013).** MUT=mutiert, WT=Wildtyp, n=Anzahl, MDS=Myelodysplastisches Syndrom, RARS=Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten, RAEB=Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung, RCMD=Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien mit oder ohne Ringsideroblasten, RCUD=Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie, CMML=Chronische Myelomonozytäre Leukämie, MDS-MPS=Myelodysplastische Syndrome-Myeloproliferative Syndrome, IPSS=International Prognostic Scoring System, IPSS-R= International Prognostic Scoring System- Revised, *P*=*P*-Wert.

<b>Charakteristika</b>	<b>SRSF2 MUT</b>	<b>SRSF2 WT</b>	<b><i>P</i></b>
<b>MDS-Klassifikation</b>			0.13
RARS, n (%)	0	6 (6,1)	
RAEB I, n (%)	2 (18,2)	21 (21,7)	
RAEB II, n (%)	4 (36,4)	12 (12,4)	
RCMD, n (%)	2 (18,2)	36 (37,1)	
RCUD, n (%)	0	11 (11,3)	
CMML I, n (%)	1 (9,1)	4 (4,1)	
CMML II, n (%)	0	1 (1,0)	
MDS-MPS, n (%)	1 (9,1)	1 (1,0)	
nicht klassifizierbar	1 (9,1)	5 (5,2)	
nicht verfügbar	0	7	
<b>IPSS</b>			<b>0.014</b>
Low Risk, n (%)	0	31 (29,5)	
Intermediate I, n (%)	4 (36,4)	49 (46,7)	
Intermediate II, n (%)	4 (36,4)	10 (9,5)	
High Risk, n (%)	2 (18,2)	9 (8,6)	
nicht beurteilbar, n (%)	1 (9,1)	6 (5,7)	
<b>IPSS-R</b>			0.92
Very Low Risk, n (%)	0	4 (3,8)	
Low Risk, n (%)	3 (27,3)	39 (37,1)	
Intermediate, n (%)	5 (45,5)	33 (31,4)	
High Risk, n (%)	2 (18,2)	14 (13,3)	
Very High Risk, n (%)	0	6 (5,7)	
nicht beurteilbar, n (%)	1 (9,1)	9 (8,6)	

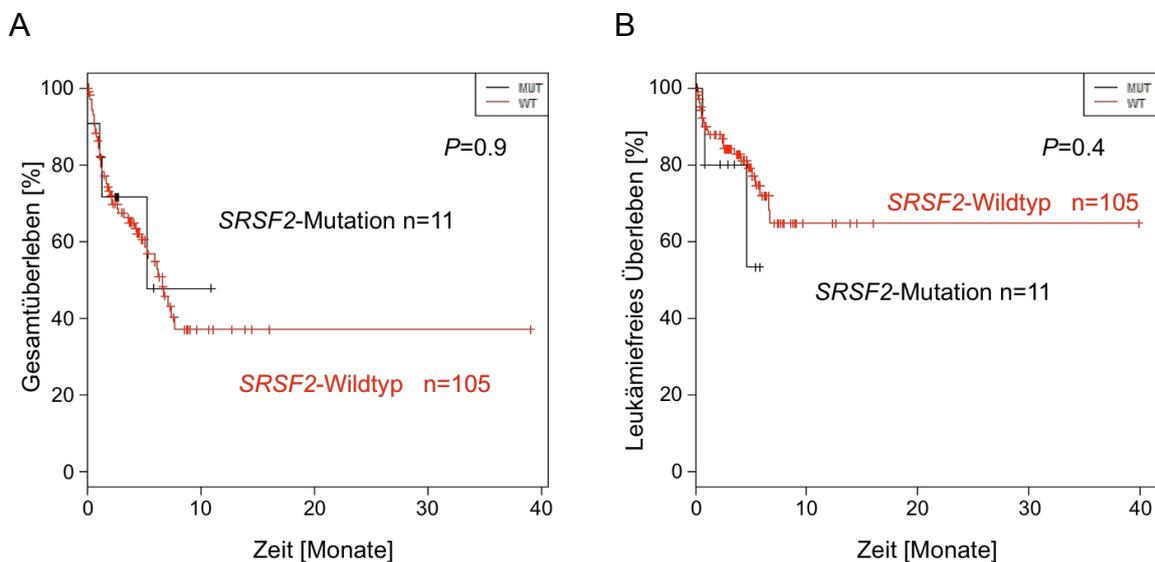
### **3.2.5 Assoziationen von *SRSF2*-Mutationen mit der Therapie und deren Einfluss auf das Überleben**

Patienten mit *SRSF2*-Mutationen und Patienten mit *SRSF2*-Wildtyp wurden im Hinblick auf den Erhalt von spezifischer Therapie (*P*=0.35), den Erhalt einer allogenen Stammzelltransplantation (*P*=0.28) oder dem Erhalt einer Supportivtherapie (*P*=0.11) nicht unterschiedlich behandelt (siehe Tabelle 40)

**Tabelle 40: Assoziation von *SRSF2*-Mutationen mit Therapie bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013).** MUT=mutiert, WT=Wildtyp, n=Anzahl, TX=Transplantation, P=P-Wert.

Charakteristika	<i>SRSF2</i> MUT	<i>SRSF2</i> WT	P
<b>Spezifische Therapie</b>			0.35
ja, n (%)	7 (63,6)	49 (46,7)	
nein, n (%)	4 (36,4)	56 (53,3)	
<b>Allogene Stammzell-TX</b>			0.28
ja, n (%)	2 (18,2)	9 (8,6)	
nein, n (%)	9 (81,8)	96 (91,4)	
<b>Supportivtherapie</b>			0.11
ja, n (%)	4 (36,4)	66 (62,9)	
nein, n (%)	7 (63,6)	39 (37,1)	

Ein signifikanter Einfluss der Anwesenheit einer *SRSF2*-Mutation auf das Gesamtüberleben war in unserer MDS-Patientenkohorte nicht erkennbar ( $P=0.9$ ). Ebenso wurde kein signifikanter Einfluss auf die Zeit bis zum Auftreten einer akuten myeloischen Leukämie (=leukämiefreies Überleben) beobachtet ( $P=0.36$ ) (siehe Abbildung 20). Insgesamt bestand die MDS-Kohorte jedoch aus einer relativ kleinen Fallzahl an Patienten ( $n=116$ ).



**Abbildung 20:** Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf das (A) Gesamtüberleben und (B) leukämiefreies Überleben bis zum Übergang in eine akute myeloische Leukämie von Patienten mit *SRSF2*-Mutation (=MUT) im Vergleich zu Patienten mit *SRSF2*-Wildtyp (=WT). n=Anzahl, P=P-Wert.

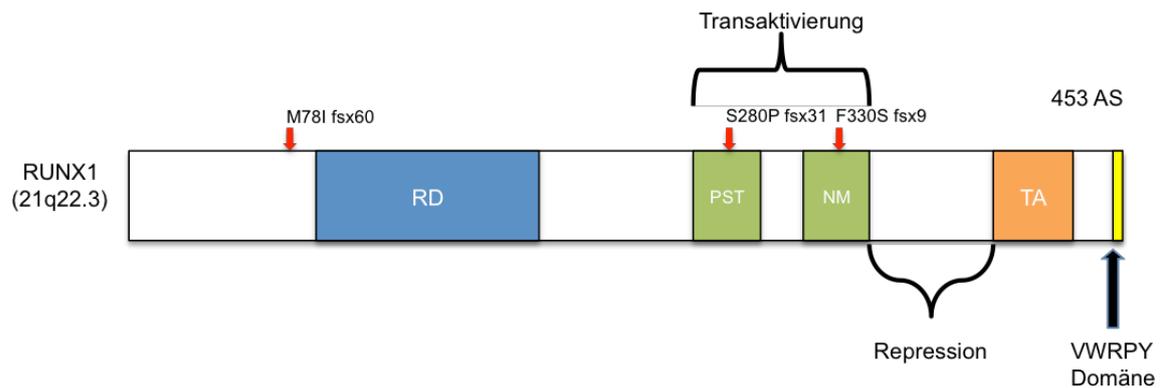
### 3.3 *RUNX1*

#### 3.3.1 Inzidenz von *RUNX1*-Mutationen

Insgesamt konnte nur bei drei von 116 Patienten (2,6%) eine Mutation im *RUNX1*-Gen detektiert werden. Bei 2 dieser *RUNX1*-Mutationen handelte es sich um Insertionen und bei einer Mutation um eine Deletion. Die Insertionen befanden sich in Exon 3 und Exon 8, die Deletion in Exon 7 (siehe Tabelle 41 und Abbildung 21). Alle 3 *RUNX1*-Mutationen führen zu einer Verschiebung des Leserasters. Außerdem wurden in Exon 3 von *RUNX1* noch 2 weitere Punktmutationen gefunden, welche als Missense-Mutationen fungieren und zu einer Änderung der kodierten Aminosäure führen. Diese beiden Punktmutationen werden als Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP=single nucleotide polymorphism) gewertet, die nicht nur bei Patienten mit AML, sondern auch in der Normalbevölkerung auftreten können.

**Tabelle 41: Mutationen im *RUNX1*-Gen:** Auflistung der in dieser Arbeit entdeckten Mutationen im *RUNX1*-Gen bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013).

Mutation der Nukleotidsequenz	Mutation der Aminosäure	Anzahl	[%]
Proben gesamt	Proben gesamt	113	100
Veränderungen gesamt	Veränderungen gesamt	3	10,5
Exon 3 c.423_424insT	p.M78IfsX60	1	33,3
Exon 7 c.1028delT	p.S280PfsX31	1	33,3
Exon 8 c.1178_1179ins32bp	p.F330SfsX9	1	33,3
SNP: Exon 3 c.T357C	p.L56S	2	0



**Abbildung 21:** Lokalisation der *RUNX1*-Mutationen. Schematische Darstellung des *RUNX1*-Proteins mit bekannten Motiven und Domänen (nach Lorschbach et al. 2001). RD: Runt-DNA-Bindungs-Domäne, PST: Prolin/Serin/Threonin-reiche Region, NM: Nukleäres Matrixhaftungsmotiv, TA: C-Terminale transkriptionale Transaktivierungsdomäne, VWRPY-Motiv: bindet Groucho Co-Repressor. Die Lokalisation der detektierten *RUNX1*-Mutationen ist mit Pfeilen markiert. AS=Aminosäuren.

### 3.3.2 Assoziation von *RUNX1*-Mutationen mit klinischen Charakteristika

In Hinblick auf die klinischen Charakteristika bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit einer Mutation im *RUNX1*-Gen und Patienten mit *RUNX1*-Wildtyp, wenn man Alter ( $P=0.3$ ), Geschlecht ( $P=0.6$ ), Blastenanteil im peripheren Blut  $> 5\%$  ( $P=1$ ), Ringsideroblasten  $> 15\%$  ( $P=1$ ), Anzahl an neutrophilen Granulozyten ( $P=0.7$ ), Hämoglobingehalt ( $P=0.8$ ), Thrombozyten- ( $P=0.6$ ) und Leukozytenanzahl ( $P=0.7$ ) betrachtet (siehe Tabelle 42).

**Tabelle 42: Assoziation von *RUNX1*-Mutationen mit klinischen Charakteristika bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013). MUT=mutiert, WT=Wildtyp, n=Anzahl, P=P-Wert.**

<b>Charakteristika</b>	<b><i>RUNX1</i> MUT</b>	<b><i>RUNX1</i> WT</b>	<b>P</b>
<b>Alter (Jahre)</b>			0.27
Median	69,39	67,35	
Bereich	69,03-78,85	32,61-84,34	
<b>Geschlecht</b>			0.57
männlich, n (%)	1 (33,3)	6 (60,2)	
weiblich, n (%)	2 (66,7)	45 (39,8)	
<b>Blasten &gt;5%</b>			1
ja, n (%)	0	7 (7,6)	
nein, n (%)	2 (100)	85 (92,4)	
nicht verfügbar	1	21	
<b>Ringsideroblasten &gt;15%</b>			1
ja, n (%)	0	6 (9,5)	
nein, n (%)	1 (100)	57 (90,5)	
nicht verfügbar	2	50	
<b>Neutrophile Granulozyten (10<sup>9</sup>/L)</b>			0.67
Median	1,75	1,355	
Bereich	0,92-3,71	0-60,69	
nicht verfügbar	0	5	
<b>Hämoglobin (g/dl)</b>			0.82
Median	9,6	9,7	
Bereich	9,3-11,7	6-14,5	
<b>Thrombozyten (10<sup>9</sup>/L)</b>			0.65
Median	125	144	
Bereich	74-153	8-662	
<b>Leukozyten (10<sup>9</sup>/L)</b>			0.73
Median	4,5	3,2	
Bereich	2-6,4	1,1-97,9	

### 3.3.3 Assoziation von *RUNX1*-Mutationen mit der Zytogenetik und mit anderen molekularen Markern

Es besteht keine statistisch signifikante Assoziation zwischen Patienten mit *RUNX1*-Mutation und Patienten mit *RUNX1*-Wildtyp im Hinblick auf die Zytogenetik ( $P=1.0$ )(siehe Tabelle 43). Zwei Patienten mit *RUNX1*-Mutation hatten einen normalen Karyotyp, während ein Patient mit *RUNX1*-Mutation einen abnormalen Karyotyp vorwies.

**Tabelle 43: Assoziation *RUNX1* mit der Zytogenetik bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013). MUT=mutiert, WT=Wildtyp, n=Anzahl, P=P-Wert.**

Charakteristika	<i>RUNX1</i> MUT	<i>RUNX1</i> WT	P
<b>Zytogenetik</b>			1
normal, n (%)	2 (66,7)	66 (57,4)	
abnormal, n (%)	1 (33,3)	47 (41,6)	

Wie schon bei *ASXL1* unter 3.1.4 beschrieben, besteht eine signifikante Assoziation von *RUNX1*-Mutationen mit *ASXL1*-Mutationen ( $P=0.02$ ). Zusätzlich lässt sich ein Trend einer Assoziation von *RUNX1*-Mutationen zu *SF3B1*-Mutationen ( $P=0.08$ ) erkennen. Keine signifikante Assoziation lässt sich zwischen Patienten mit *RUNX1*-Mutation und *SRSF2*-Mutation ( $P=0.3$ ), *TP53*-Mutation ( $P=1$ ) oder *TP53polymorph*-Mutation ( $P=1$ ) erkennen (siehe Tabelle 44).

**Tabelle 44: Molekulargenetische Assoziationen zwischen *RUNX1* und den restlichen untersuchten Markern bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013). Die Daten zu *TP53*, *TP53 polymorph* und *SF3B1* sind Bestandteil der Metadatei des MDS-Registers, wurden von Til Wallrabenstein im Rahmen seiner Dissertation erhoben und mit den in dieser vorliegenden Arbeit erhobenen Daten korreliert. MUT/mut=mutiert, WT/wt=Wildtyp, n=Anzahl, P=P-Wert.**

Charakteristika	<i>RUNX1</i> MUT	<i>RUNX1</i> WT	P
<b><i>ASXL1</i></b>			<b>0.02</b>
mut, n (%)	2 (66,7)	9 (8,0)	
wt, n (%)	1 (33,3)	104 (92,0)	
<b><i>SRSF2</i></b>			0.26
mut, n (%)	1 (33,3)	10 (8,9)	
wt, n (%)	2 (66,7)	103 (91,1)	
<b><i>TP53</i></b>			1
mut, n (%)	0	11 (9,7)	
wt, n (%)	3 (100)	102 (90,3)	
<b><i>TP53 polymorph</i></b>			1
mut, n (%)	0	5 (4,4)	
wt, n (%)	3 (100)	108 (95,6)	
<b><i>SF3B1</i></b>			<b>0.08</b>
mut, n (%)	2 (66,7)	18 (15,9)	
wt, n (%)	1 (33,3)	95 (84,1)	

### 3.3.4 *RUNX1*-Mutationen im Kontext der MDS-Klassifikation sowie der Prognosescores IPSS und IPSS-R

Es konnten keine signifikanten Assoziationen zwischen Patienten mit *RUNX1*-Mutation und Patienten mit *RUNX1*-Wildtyp in Bezug auf die Einteilung in die MDS-Subtypen ( $P=1$ ), auf die Einteilung nach IPSS ( $P=0.2$ ) oder auf die Einteilung nach IPSS-R ( $P=0.65$ ) gezeigt werden (siehe Tabelle 45), wobei die statistische

Aussagekraft bei nur 3 mutierten *RUNX1*-Patienten als eingeschränkt zu bewerten ist.

**Tabelle 45: Assoziationen von *RUNX1*-Mutationen mit der MDS-Klassifikation und mit der Einteilung nach IPSS und IPSS-R bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013).** MUT=mutiert, WT=Wildtyp, n=Anzahl, MDS=Myelodysplastisches Syndrom, RARS=Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten, RAEB=Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung, RCMD=Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien mit oder ohne Ringsideroblasten, RCUD=Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie, CMML=Chronische Myelomonozytäre Leukämie, MDS-MPS=Myelodysplastische Syndrome-Myeloproliferative Syndrome, IPSS=International Prognostic Scoring System, IPSS-R= International Prognostic Scoring System- Revised, P=P-Wert.

Charakteristika	<i>RUNX1</i> MUT	<i>RUNX1</i> WT	P
<b>MDS-Klassifikation</b>			1
RARS, n (%)	0	6 (5,7)	
RAEB I, n (%)	1 (33,3)	22 (21)	
RAEB II, n (%)	0	16 (15,2)	
RCMD, n (%)	2 (66,7)	36 (34,3)	
RCUD, n (%)	0	11 (10,5)	
CMML I, n (%)	0	5 (4,8)	
CMML II, n (%)	0	1 (1,0)	
MDS-MPS, n (%)	0	2 (1,9)	
nicht klassifizierbar	0	6 (5,7)	
nicht verfügbar	0	8	
<b>IPSS</b>			0.2
Low Risk, n (%)	0	31 (27,4)	
Intermediate I, n (%)	1 (33,3)	52 (46,0)	
Intermediate II, n (%)	1 (33,3)	13 (11,5)	
High Risk, n (%)	0	11 (9,7)	
nicht beurteilbar, n (%)	1 (33,3)	6 (5,3)	
<b>IPSS-R</b>			0.65
Very Low Risk, n (%)	0	4 (3,5)	
Low Risk, n (%)	1 (33,3)	41 (36,3)	
Intermediate, n (%)	1 (33,3)	37 (32,7)	
High Risk, n (%)	0	16 (14,2)	
Very High Risk, n (%)	0	6 (5,3)	
nicht beurteilbar, n (%)	1 (33,3)	9 (8,0)	

### 3.3.5 Assoziationen von *RUNX1*-Mutationen mit der Therapie und deren Einfluss auf das Überleben

Im Hinblick auf die Therapie lässt sich keine statistisch signifikante Assoziation von *RUNX1*-Mutationen mit dem Erhalt einer spezifischen Therapie erkennen ( $P=0.1$ ). Die 3 Patienten mit *RUNX1*-Mutation (100%) erhielten folgende Therapien: Patient 1 mit der Mutation Exon 3 c.423\_424insT erhielt Azacytidin und Darbapoetin; Patient 2 mit der Mutation Exon 7 c.1028delT erhielt Azacytidin,

Exjade und Aranesp und Patient 3 mit der Mutation Exon 8 c.1178\_1179ins32bp erhielt Aranesp und Exjade.

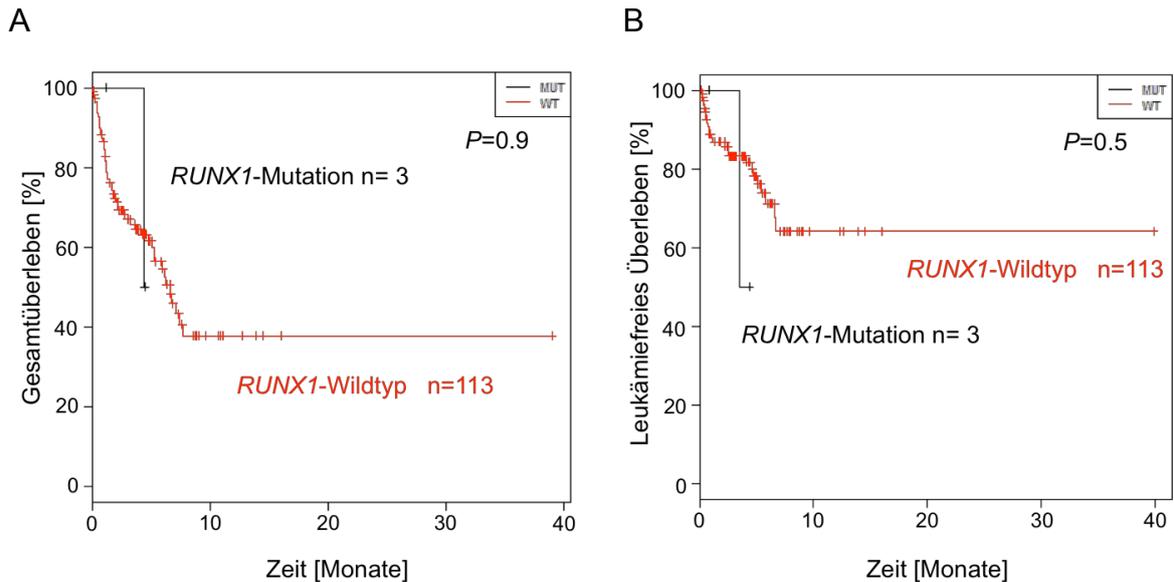
Von den Patienten ohne *RUNX1*-Mutation erhielten lediglich 46,9% eine spezifische Therapie. Auch finden sich keine signifikanten Assoziationen bei Patienten mit Mutationen im *RUNX1*-Gen zu Patienten mit *RUNX1*-Wildtyp in Bezug auf Erhalt einer allogenen Stammzelltransplantation ( $P=1$ ). Von den Patienten mit *RUNX1*-Mutation erhielt keiner eine allogene Stammzell-Transplantation- oder eine Supportivtherapie ( $P=0.3$ )(siehe Tabelle 46).

**Tabelle 46: Assoziation von *RUNX1*-Mutationen mit Therapie bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013).**

MUT=mutiert, WT=Wildtyp, n=Anzahl, TX=Transplantation,  $P$ =P-Wert.

Charakteristika	<i>RUNX1</i> MUT	<i>RUNX1</i> WT	$P$
<b>Spezifische Therapie</b>			0.11
ja, n (%)	3 (100)	53 (46,9)	
nein, n (%)	0	60 (53,1)	
<b>Allogene Stammzell-TX</b>			1
ja, n (%)	0	11 (9,7)	
nein, n (%)	3 (100)	102 (90,3)	
<b>Supportivtherapie</b>			0.28
ja, n (%)	3 (100)	67 (59,3)	
nein, n (%)	0	46 (40,7)	

Bezüglich der Gesamtüberlebensrate und der Zeitspanne bis zum Auftreten einer AML war kein statistisch signifikanter Zusammenhang zu sehen ( $P=0.9$  für Gesamtüberlebenszeit;  $P=0.5$  für leukämiefreies Überleben) (siehe Abbildung 22), wobei auch hier die eingeschränkte statistische Aussagekraft aufgrund der geringen Fallzahl zu benennen ist.



**Abbildung 22:** Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf das (A) Gesamtüberleben und (B) leukämiefreies Überleben bis zum Übergang in eine akute myeloische Leukämie von Patienten mit *RUNX1*-Mutation (=MUT) im Vergleich zu Patienten mit *RUNX1*-Wildtyp (=WT), erhoben bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013). n=Anzahl, P=P-Wert.

Insgesamt war die statistische Aussagekraft für die Korrelationen der Genmutationen mit klinischen Parametern aufgrund der sehr kleinen Fallzahlen eingeschränkt. Dennoch war es möglich, die bisherigen Ergebnisse zur Inzidenz und möglichen prognostischen Bedeutung von Mutationen in *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1* aus anderen Studien weitgehend zu bestätigen und somit die Relevanz dieser Genmutationen zur Riskoeinteilung und damit Prognosevorhersage weiter aufzuzeigen und zu belegen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Verwendetes Material und Methodik

In dieser Arbeit wurde der Mutationsstatus von 116 MDS-Patienten aus dem Ulmer MDS-Register mit Hilfe von PCR, Fragmentanalyse und Sequenzierung auf das Vorhandensein von Mutationen im *ASXL1*-, *SRSF2*- und *RUNX1*-Gen untersucht. Dabei wurde entweder die DNA des Knochenmarks oder die des peripheren Blutes analysiert und jeweils das am frühesten vorhandene Material verwendet (Entnahme zum Diagnosezeitpunkt oder bei Aufnahme in das Ulmer MDS-Register). Diese Unterschiede im Zeitpunkt der Materialasservierung und der Diagnosestellung könnten zu Unterschieden in der Häufigkeit des Auftretens von Mutationen geführt haben. Ebenso könnte das verwendete Material hier eine Rolle spielen, wenngleich nur in 7 Fällen peripheres Blut verwendet wurde. In der Arbeit von Papaemmanuil et al. 2013 konnte jedoch gezeigt werden, dass die Quelle der DNA (Knochenmark oder peripheres Blut) keinen signifikanten Unterschied auf die Verteilung der sogenannten „Driver“-Mutationen hat.

Insgesamt fanden wir bei 20 der 116 Patienten (17,2 %) mindestens eine der drei untersuchten Mutationen, davon traten bei drei Patienten 2 und einer Patientin 3 der von uns untersuchten Mutationen simultan auf. In zwei größeren Studien von Haferlach (n=944, 104 Gene untersucht) sowie Papammanueil (n=738, 111 Gene untersucht) wurden mittels Next Generation Sequencing bei bis zu 80-90% der Patienten mindestens eine onkogene Mutation gefunden (Haferlach et al. 2014; Papaemmanuil et al. 2013). Davon hatten bei Papaemmanuil et al. 2013 78% der Patienten mindestens eine onkogene Mutation, 43% hatten 2 oder 3 onkogene Mutationen und 10% der Patienten 4 bis 8 onkogene Mutationen. Bei Haferlach et al. 2014 hatten 89,5% der Patienten mindestens eine onkogene Mutation mit einem Median von 3 (0-12) Mutationen pro Probe. Dies deutet auf eine hohe Mutationshäufigkeit in verschiedenen Genen bei MDS-Patienten hin, wobei die am häufigsten mutierten Gene (>10%) *TET2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *SRSF2*, *DNMT3A* und *RUNX1* waren (Haferlach et al. 2014).

In der hier vorliegenden Arbeit handelte es sich um eine relativ kleine Patientenkohorte, da sich das Ulmer MDS-Register noch im Aufbau befindet. Es

wurden 3 der am häufigsten mutierten Marker ausgewählt und diese deskriptiv analysiert.

Im Gegensatz zu den großen publizierten Studien zu dem Thema ‚Molekulare Marker bei MDS‘ wurde hier mit der konventionellen Sequenzierung nach Sanger gearbeitet, während die großen Studien Next Generation Sequencing (NGS) (Papaemmanuil et al. 2013, Haferlach et al. 2014) verwendet haben. Bei Next Generation Sequencing ist die Sensitivität zur Entdeckung von Mutationen höher als bei der Sequenzierung nach Sanger. Bei der Sanger-Methode werden nur Mutationen entdeckt, die in mehr als ca. 7% der untersuchten Zellen vorhanden sind (Lionetti et al. 2014). Im Gegensatz dazu werden bei NGS auch Mutationen mit einer Inzidenz von 0.5 bis 1% aufgrund der höheren Sensitivität detektiert, was zu einer Erhöhung der Inzidenzrate führt (Lionetti et al. 2014; Sensitivität bei Papaemmanuil et al. 2013: 95,2%; Haferlach et al 2014: 99,4% overall concordance). Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den verwendeten Methoden ist, dass mittels NGS in der Regel viele Gene gleichzeitig untersucht werden können wie z.B. in der Arbeit von Papaemmanuil et al (2013), in der insgesamt Mutationen in 111 Genen untersucht wurden.

Als weitere Ursache der abweichenden Inzidenzraten dieser Arbeit im Vergleich zu anderen Studien wurde für *ASXL1* nur Exon 12 untersucht und dies mit Hilfe der GeneScan-Analyse, bei welcher nur Frameshift-Mutationen nachgewiesen werden, sodass die in diesem Gen (etwa in etwa 30% der Fälle) als Punktmutation auftretende Mutationen nicht entdeckt wurden.

In Hinblick auf das Alter der Patienten lag das mediane Alter in dieser Studie bei 65,2 Jahren (der jüngste Patient war 32,6 J, der älteste 84,3 J alt). In der Studie von Papaemmanuil et al. 2013 war das durchschnittliche Alter 68J ( $\pm$  standard deviation 13 J), bei Haferlach et al. 2014 der Median des Alters 72,8 J (23,3-90,8 J).

Ein weiterer Aspekt, der zu berücksichtigen ist, ist die Tatsache, dass es sich bei dieser Studie um eine Kohorte handelt, die überwiegend kaukasischer Herkunft ist. Ethnische Unterschiede zwischen den verschiedenen Studien könnten daher einen Einfluss auf die Häufigkeit der detektierten Mutationen haben.

## 4.2 ASXL1

### 4.2.1 Häufigkeit von ASXL1-Mutationen, Lokalisation und Mutationstyp

In unserer Kohorte fand sich bei 11 von 116 Patienten (9,5%) eine ASXL1-Mutation; in der Literatur sind Häufigkeiten von ASXL1-Mutationen von bis zu 15-20% zu finden (Thol et al. 2011: 20,7% (40 von 193 untersuchten Patienten mit MDS); Cazzola et al. 2013 (review) und Raza u. Galili 2012(review): 15-20%; Pellagatti u. Boulwood 2015 (review): 11-15%, Bejar et al. 2011: 14,4% (63/439). Eine mögliche Ursache könnte in der Methodik liegen: In der vorliegenden Studie wurden die ASXL1-Mutationen mittels Fragmentlängenanalyse und anschließender Sequenzierung detektiert, während beispielsweise bei Thol et al. 2011 und den neueren NGS-basierten Studien (z.B. Haferlach et al. 2014; Papaemmanuil et al. 2013) das ASXL1-Gen direkt sequenziert und somit auch die Punktmutationen, die nicht zu Fragmentlängenunterschieden führen, identifiziert wurden. Des Weiteren wurde in dieser Studie nur Exon 12 und nicht das gesamte ASXL1-Gen untersucht, wodurch weitere Mutationen in den anderen Exonen des Gens nicht detektiert werden. Ein weiterer Aspekt ist, dass beispielsweise in der Studie von Cazzola et al. 2013 auch CMML-Patienten zu MDS gezählt wurden, welche Mutationen im ASXL1-Gen besitzen, was ebenfalls die Inzidenzrate erhöht. In der CMML kommen ASXL1-Mutationen gehäuft vor (v.a. myeloproliferative CMML, Gelsi-Boyer et al. 2010; bei Abdel-Wahab et al. 2011: 20%; bei Boulwood et al. 2010: 33%); in unsere Studie wurden keine Patienten mit CMML aufgenommen.

Im Einklang mit den publizierten Studien befinden sich die Mutationen im ASXL1-Gen in dieser Arbeit alle auf Exon 12, vor allem in der glycin-reichen Region (Boulwood et al. 2010). Von den in dieser Studie entdeckten 11 Mutationen befinden sich ebenfalls 10 (90,9%) in dieser glycinreichen Region. Dabei handelt es sich bei allen ASXL1-Mutationen um Frameshift-Mutationen, da die Methodik des GeneScan angewendet wurde (siehe oben). Aufgrund des häufigen Auftretens von Frameshift-Mutationen im ASXL1-Gen in Exon 12 [z.B. 70% (28/193) Frameshift-Mutationen im Vergleich zu 30% (12/193) heterozygoten Punktmutationen (alles Missense-Mutationen) bei Thol et al. 2011] stellt diese Diagnostik in dieser Region eine gute Methodik für sensitive Detektions-Arrays dar (Boulwood et al. 2010). Auch in der Studie von Chen et al. 2014 wurden bei

22,7% (106/466) Patienten *ASXL1*-Mutationen gefunden, davon hatte der Großteil der Patienten (n=96/466) Frameshift-Mutationen, 10/466 Patienten hatten Nonsense-Mutationen.

#### **4.2.2 Assoziationen von *ASXL1*-Mutationen mit klinischen Charakteristika und molekularen Markern**

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Trend für eine Assoziation von *ASXL1*-Mutationen mit erniedrigten Thrombozytenwerten beobachtet ( $P=0.1$ ). Bejar et al. 2011 untersuchten in ihrer Studie unter anderem den Effekt von *ASXL1*-Mutationen auf Thrombozytenwerte. Es waren bei nahezu 80% der Patienten Thrombozytenwerte unter  $150 \times 10^9/L$  zu messen, diese Assoziation war jedoch nicht statistisch signifikant.

Außerdem zeigten Patienten mit *ASXL1*-Mutation in unserer Kohorte im Vergleich zu Patienten ohne *ASXL1*-Mutation nominal höhere, jedoch nicht statistisch signifikante ( $P=0.11$ ) neutrophile Granulozytenwerte. Dies wurde unseres Wissens in anderen Studien bislang nicht beschrieben.

Im Hinblick auf das gemeinsame Auftreten verschiedener molekularer Marker konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Mutationen im *ASXL1*-Gen gehäuft zusammen mit Mutationen im *RUNX1*-Gen vorkommen ( $P=0.02$ ). Zusätzlich wurde ein Trend zum gemeinsamen Auftreten von *ASXL1*- mit *SRSF2*-Mutationen beobachtet ( $P=0.07$ ). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit neueren Arbeiten, welche statistisch signifikante Korrelationen von *ASXL1*-Mutationen mit Mutationen in *RUNX1* (Chen et al. 2014) und *SRSF2* (Haferlach et al. 2014; Chen et al. 2014) beschrieben haben.

Analog dazu wurden diese Korrelationen von *ASXL1*-Mutationen mit *RUNX1*-Mutationen auch bei der AML beschrieben [Paschka et al. 2015 (n=1696, Alter 18-61J), Schnittger et al. 2013 (n=740, Alter 18-100J)]. Hier hatten in der Studie von Paschka et al. 2015 30% (31/103) der Patienten mit *ASXL1*-Mutation eine genetische Abnormalität im *RUNX1*-Gen [n=22 (71%) mit somatischer Mutation, n=9 (29%) mit t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*-Fusion], Bei den Patienten mit somatischer Mutation im *RUNX1*-Gen wie auch im *ASXL1*-Gen präsentierten sich 15 (48,4%) Patienten mit einer *de novo*-AML, 5 (16,1%) Patienten hatten eine sekundäre AML und 1 (3%) Patient eine therapieassoziierte AML. Auch bei

Schnittger et al. 2013 zeigte sich ein gehäuftes gemeinsames Auftreten von *ASXL1*-Mutationen mit *RUNX1*-Mutationen, 7,6% (56/740) Patienten hatten sowohl eine *ASXL1*- als auch eine *RUNX1*-Mutation.

#### **4.2.3 *ASXL1*-Mutationen im Kontext der MDS-Klassifikation sowie der Prognosescores IPSS und IPSS-R**

In Übereinstimmung zu publizierten Daten fanden sich *ASXL1*-Mutationen in der hier vorliegenden Arbeit mehrheitlich bei denjenigen Patienten, die in die MDS-Subtypen RAEB und RCMD eingeteilt worden waren (6/11, nicht signifikant,  $P=0.36$ ). Eine derartige Häufung von *ASXL1*-Mutationen bei den MDS-Subtypen mit höherem Risiko (RAEB und RCMB) wurde auch von Cazzola et al. 2013 (Cazzola et al. 2013, review, Tabelle 3) sowie Boulwood et al. 2010, beschrieben. Dabei ist die Mutationshäufigkeit von *ASXL1* in den frühen Risiko-Stufen von MDS niedrig, bei den späten Risiko-Stufen (RAEB I und II) sowie bei sekundärer AML, *de novo* AML und CMML jedoch deutlich höher (Boulwood et al. 2010). In der Studie von Boulwood et al. 2010 wurden 300 Patienten mit MDS, AML oder CMML sowie 111 gesunde Kontrollen auf Mutationen im *ASXL1*-Gen mit Hilfe von Sequenzierung nach Sanger untersucht. Insgesamt wurden bei 62/300 Patienten (21%) *ASXL1*-Mutationen gefunden. Davon hatten beispielsweise 5/79 (6%) MDS-Patienten mit Refraktärer Anämie, 17/55 (31%) mit Refraktärer Anämie mit Blastenexzess (RAEB I, II) und 17/67 (25%) mit einer AML jeweils eine Mutation im *ASXL1*-Gen. Hierbei zeigt sich die oben beschriebene Häufung von *ASXL1*-Mutationen vor allem in den späten Risiko-Stufen des MDS bzw. der AML.

#### **4.2.4 Assoziationen von *ASXL1*-Mutationen mit der Therapie und deren prognostische Bedeutung**

In dieser Studie erhielten 81,8% der Patienten mit *ASXL1*-Mutation eine spezifische Therapie wie beispielsweise Revlimid (=Lenalidomid, Immunmodulator), Thalidomid (Immunmodulator) oder Azacytidin (=Pyrimidin-Analogon, zytostatisch wirkend), während nur 44,76% ohne *ASXL1*-Mutation eine spezifische Therapie erhielten ( $P=0.03$ ). Ob ein Patient eine spezifische, immunmodulierende Therapie wie Lenalidomid, Azacytidin oder Chemotherapie erhält, hängt von Faktoren wie Alter, Symptomen und Vortherapien ab. Grund für

den häufigeren Einsatz spezifischer, immunmodulierender Therapie bei Patienten mit *ASXL1*-Mutation könnte sein, dass diese Patienten im Vergleich zu Patienten ohne *ASXL1*-Mutation vermehrt klinische Symptome z.B. aufgrund von einer erhöhten Rate an Zytopenien aufweisen und deswegen häufiger eine spezifische Therapie begonnen wurde.

In dieser Studie wurde, eventuell bedingt durch die geringe Fallzahl, keine statistisch signifikante Assoziation von Mutationen im *ASXL1*-Gen und dem Einfluss dieser auf leukämiefreies Überleben oder das Gesamtüberleben gefunden. Für *ASXL1* lässt sich jedoch ein Trend zu einem erniedrigten leukämiefreien Überleben erkennen und steht damit im Einklang mit den Daten von Thol et al. 2011, welche in 193 Patienten einen Zusammenhang von *ASXL1*-Mutationen mit vermindertem leukämiefreiem Überleben und einem verminderten Gesamtüberleben bei MDS-Patienten beschrieb. Ebenfalls beobachtete Bejar und Kollegen 2011 ein vermindertes Gesamtüberleben (Fünfjahresüberleben (5-JÜ): 1,33 Jahre bei Patienten mit einer *ASXL1*-Mutation vs. 1,86 Jahre der gesamten Kohorte) bei 439 Patienten mit MDS.

Eine Patientin der vorliegenden Studie wies Mutationen in allen drei untersuchten Genen, *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1* auf. Diese Patientin hatte den aggressiveren MDS-Subtyp RCMD, wurde nach IPSS in Intermediate I eingestuft, hatte jedoch nach FISH-Analyse keine Chromosomenanomalien. Sie wurde mit den Darbapoetin und Azacytidin behandelt.

Aufgrund der niedrigen Fallzahlen und der relativ niedrigen Inzidenz der Genmutationen im *ASXL1*-Gen konnten in dieser Studie keine statistisch aussagekräftigen Analysen durchgeführt werden. Jedoch bedeutet dieser fehlende Nachweis einer statistischen Signifikanz nicht, dass es hier keine Korrelation mit den verschiedenen Endpunkten, insbesondere dem Gesamtüberleben, gibt.

## **4.3 *SRSF2***

### **4.3.1 Häufigkeit von *SRSF2*-Mutationen, Lokalisation und Mutationstyp**

Eine *SRSF2*-Mutation fand sich bei 11 der 116 Patienten (9,5%); somit ist die Inzidenz in unserer Kohorte etwas geringer als die in den publizierten Studien in

denen bei ca. 10-20% der MDS-Patienten Mutationen im *SRSF2*-Gen gefunden wurden (Cazzola et al. 2013. Papaemmanuil et al. 2013: 14%; Pellagatti u. Boulwood 2015: 12-15%). Die höhere Mutationsfrequenz bei Papaemmanuil im Vergleich zu der vorliegenden Studie könnte damit zusammenhängen, dass in ihrer Studie auch Patienten mit CMML (9%) und MDS-AML (5%) mit einbezogen wurden. Vor allem bei CMML ist eine erhöhte Inzidenz an *SRSF2*-Mutationen (Inzidenz: 28,4%) beschrieben (Yoshida et al. 2011). Patienten mit CMML oder MDS-AML wurden in unserer Studie nicht mit einbezogen. Des Weiteren könnte, auch wie oben beschrieben, die Methodik einen möglichen Einfluss haben. In diesen Studien wurde meist Next Generation Sequencing (Papaemmanuil et al. 2013: whole genome amplification) durchgeführt, womit auch Mutationen mit einer Mutationsfrequenz unter 5% detektiert werden können (siehe 4.1).

Die häufigste Lokalisation für *SRSF2*-Mutationen ist das Kodon P95 in Exon 1 (Thol et al. 2012); hier waren 10 der 11 *SRSF2*-Mutationen dieser Arbeit lokalisiert; eine Mutation wurde im Kodon P96 detektiert. 6 dieser Mutationen waren Punktmutationen, 3 Insertionen und 2 Deletionen. Im Einklang dazu wurde bei Thol et al. 2012 beschrieben, dass es sich bei Mutationen im *SRSF2*-Gen vor allem um heterozygote Punktmutationen handelt. In dieser Studie wurden 193 Patienten mit MDS mit Hilfe von Sequenzierung nach Sanger untersucht. Davon hatten insgesamt 24/193 (12.4%) der Patienten eine Mutation im *SRSF2*-Gen, von diesen wiesen wiederum 19 Patienten eine heterozygote Punktmutation (18 davon in Kodon P95, 1 in Kodon P96) und 5 Patienten eine Frameshift-Mutation in Kodon P95 auf.

#### **4.3.2 Assoziationen von *SRSF2*-Mutationen mit klinischen Charakteristika und molekularen Markern**

Bei den klinischen Charakteristika der Patienten dieser Studie ließ sich ein Trend für eine Assoziation von *SRSF2*-Mutationen mit einem höheren Alter der Patienten feststellen. Durchschnittlich waren Patienten mit *SRSF2*-Mutation 71,1 Jahre alt, während Patienten ohne *SRSF2*-Mutation 65,9 Jahre alt waren ( $P=0.08$ ). In Übereinstimmung dazu beschrieben Wu et al. 2012, dass *SRSF2*-Mutationen ebenfalls mit einem höherem Alter assoziiert waren (Alter der Patienten mit *SRSF2*-Mutation: Median 74,5 J vs. Alter der Patienten ohne *SRSF2*-Mutation:

Median 63 J,  $P < 0.001$ ). In dieser Studie wurden 233 Patienten mit MDS untersucht, hier hatten 34/233 (14,6%) eine Mutation im *SRSF2*-Gen. Bei Damm et al. 2012 waren *SRSF2*-Mutationen außerdem mit Neutropenie und Thrombozytopenie assoziiert. Hier wurden 221 Patienten mit MDS untersucht. Davon hatten 25/221 (11,1%) eine Mutation im *SRSF2*-Gen, diese Patienten präsentierten sich mit einer erniedrigten Anzahl an neutrophilen Granulozyten (Median: 1,1 vs. 2,3 x 10<sup>9</sup>/L) und Thrombozyten (Median: 88 vs. 165 x 10<sup>9</sup>/L). Die Assoziation von *SRSF2*-Mutationen mit Neutropenie und Thrombozytopenie war jedoch in unserer Studie nicht statistisch signifikant. Bei der Anzahl der Thrombozyten (Median: 76 vs. 153 x 10<sup>9</sup>/L) ist in der hier vorliegenden Arbeit nominal eine Assoziation vorhanden, jedoch nicht statistisch signifikant ( $P = 0.17$ ), bei der Anzahl der neutrophilen Granulozyten war kein Unterschied zu sehen (Median: 1,54 vs. 1,36 x 10<sup>9</sup>/L,  $P = 0.58$ ).

Eine mögliche Assoziation ( $P = 0.07$ ) des gemeinsamen Auftretens von *ASXL1*- und *SRSF2*-Mutationen bei MDS Patienten wurde schon in Kapitel 4.2.3 beschrieben. Ein gemeinsames Auftreten von *ASXL1*- und *SRSF2*-Mutationen bei MDS-Patienten wurde von verschiedensten Arbeitsgruppen untersucht (Nagata et al. 2011; Wu et al. 2012; Thol et al. 2012; Haferlach et al. 2014). Zusätzlich wurde ein gemeinsames Auftreten von *SRSF2* zusammen mit *RUNX1* oder *IDH2* beschrieben (Thol et al. 2012). In der vorliegenden Studie war allerdings nur bei einer von drei Personen *RUNX1*, *ASXL1* und *SRSF2* gemeinsam (siehe oben) mutiert.

#### **4.3.3 *SRSF2*-Mutationen im Kontext der MDS-Klassifikation sowie der Prognosescores IPSS und IPSS-R**

Statistisch signifikant war die Einstufung der Patienten mit einer *SRSF2*-Mutation in eine höhere Stufe nach IPSS ( $P = 0.01$ ). Während Patienten ohne *SRSF2*-Mutation zu 76,2% in die Stufen Low und Intermediate I eingestuft wurden, waren nur 36,4% der *SRSF2*-mutierten Patienten in diese beiden unteren IPSS-Stufen eingeteilt worden. Thol et al. 2012 konnten eine statistisch signifikante Assoziation von *SRSF2*-Mutationen zu einem bestimmten IPSS-Risikoprofil nicht nachweisen. Nach Cazzola et al. 2013 wurden *SRSF2*-Mutationen vor allem bei Patienten mit den MDS-Subtypen RCMD und RAEB gefunden, welche zu den Hochrisiko-Gruppen gehören. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden: 8 der 11 (72,7%)

Patienten mit *SRSF2*-Mutation waren in die MDS-Subtypen RCMD oder RAEB eingeteilt. Insgesamt scheint das Vorhandensein einer *SRSF2*-Mutation bei MDS-Patienten mit einem erhöhten Risikoprofil einherzugehen.

#### **4.3.4 Prognostische Bedeutung von *SRSF2*-Mutationen**

Ein Einfluss von *SRSF2*-Mutationen auf die leukämiefreie Überlebenszeit oder die Gesamtüberlebenszeit konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür könnte die kleine Patientenkohorte mit der geringen Mutationsinzidenz sein. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve zu leukämiefreiem Überlebenszeit (Abbildung 20 B) lässt jedoch erkennen, dass *SRSF2*-Mutationen mit einer kürzeren ereignisfreien Überlebenszeit assoziiert sind und steht damit im Einklang mit Thol et al. 2012, wo gezeigt wurde, dass *SRSF2*-Mutationen schneller zu einer Transformation in eine sekundäre AML führten und das Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit *SRSF2*-Wildtyp verkürzt war (5-JÜ: 17% vs. 39%). Auch Qiu et al. 2016 fanden heraus, dass bei Patienten mit Mutationen in den Splicing-Faktoren *U2AF1*, *SRSF2* und *SF3B1* unterschiedliche Splicing-Pfade betroffen sind und diese unabhängig die MDS-Prognose und das Risiko für eine Transformation in eine AML beeinflussen (Qiu et al. 2016).

Aufgrund der niedrigen Fallzahlen und der relativ niedrigen Inzidenz der Genmutationen im *SRSF2*-Gen konnten in dieser Studie keine statisch aussagekräftigen Analysen durchgeführt werden. Jedoch bedeutet dieser fehlende Nachweis einer statistischen Signifikanz nicht, dass es hier keine Korrelation mit den verschiedenen Endpunkten, insbesondere dem Gesamtüberleben, gibt.

## **4.4 *RUNX1***

### **4.4.1 Häufigkeit von *RUNX1*-Mutationen, Lokalisation und Mutationstyp**

In dieser Arbeit fand sich bei 3 von 116 (2,6%) Patienten eine Mutation in den untersuchten 8 Exonen des *RUNX1*-Gen. Im Vergleich dazu war in anderen Studien bei etwa 10-15% der untersuchten MDS-Patienten *RUNX1* mutiert (Cazzola et al. 2013: 10%; Raza u. Galili 2012: 15%; Pellagatti u. Boulwood 2015: 10%, Bejar et al. 2011: 8,7%). Auch hier könnte eine mögliche Ursache der geringeren Frequenz von *RUNX1*-Mutationen in dieser Studie eine niedrigere

Sensitivität im Vergleich zu den modernen Technologien wie NGS sein. Zudem wurden in dieser Studie nur 8 der insgesamt 10 Exone des *RUNX1*-Gens untersucht, sodass auch hierin eine Erklärung der niedrigeren Inzidenz liegen könnte.

Die 3 beobachteten *RUNX1*-Mutationen befanden sich in Exon 3, 7 und 8; 2 dieser Mutationen waren Insertionen und eine Mutation eine Deletion. Alle führten zu einer Verschiebung des Leserasters (Frameshift-Mutationen). Bei Patienten mit AML sind Mutationen im *RUNX1*-Gen vor allem in den Exons 3, 4 und 8 zu finden (Gaidzik et al. 2011; Gaidzik/ Teleanu et al. 2016). In der Studie von 2016 wurden 2439 Patienten mit AML auf *RUNX1*-Mutationen untersucht. Davon waren die meisten Mutationen in den Exonen 3 (n=48), 4 (n=81) und 8 (n=63) lokalisiert. Zusätzlich waren bei zwei Patienten SNPs (single nucleotide polymorphism) in Exon 3 (cT357C, p.L56S) zu finden, wie sie auch bei Patienten mit AML oder gesunden Menschen vorkommen (Langabeer et al. 2002).

#### **4.4.2 Assoziationen von *RUNX1*-Mutationen mit klinischen Charakteristika und molekularen Markern**

Bei Bejar et al. 2011 wurde beschrieben, dass *RUNX1*-Mutationen mit Thrombozytopenie assoziiert sind. In dieser Studie wurden 439 Patienten mit MDS auf Mutationen im Knochenmarksaspirat untersucht, Mutationen im *RUNX1*-Gen waren mit einer schweren Thrombozytopenie assoziiert (mehr als 50% der Patienten mit *RUNX1*-Mutation (n=37) hatten weniger als  $50 \times 10^9/L$  Thrombozyten). Dies war in unserer Studie nominal ebenfalls der Fall, jedoch nicht statistisch signifikant (Median: 125 vs.  $144 \times 10^9/L$ ,  $P=0.64$ ).

Wie schon unter 4.2.3 beschrieben, kamen in dieser Studie *RUNX1*-Mutationen gehäuft zusammen mit *ASXL1*-Mutationen vor ( $P=0.02$ ). Diese Assoziation wurde auch von Chen et al. 2014 beschrieben (32,4% vs. 6,8%,  $P<0.001$ ).

Außerdem lässt sich ein Trend zu einer Assoziation für das gemeinsame Auftreten von *RUNX1*-Mutationen mit *SF3B1*-Mutationen erkennen ( $P=0.08$ ) und steht damit im Einklang mit Lin et al. 2014. In dieser Studie wurden 479 Patienten mit MDS auf Mutationen im *SF3B1*-Gen untersucht. Hiervon hatten 48/479 (10%) eine Mutation im *SF3B1*-Gen und davon wiederum 4 Patienten eine Co-Mutation im *RUNX1*-Gen ( $P=0.61$ ); in dieser Studie konnte jedoch ebenfalls keine statistische

Signifikanz gezeigt werden. Auch Papaemmanuil 2015 beschreibt in einer Präsentation der MDS-Foundation ein gehäuftes Auftreten von *RUNX1*-Mutationen gemeinsam mit *SF3B1*-Mutationen mit einer Inzidenz von 6%.

Bei Thol et al. 2012 wurde zusätzlich eine Assoziation von *RUNX1*-Mutationen zusammen mit *SRSF2*-Mutationen beschrieben. Wie unter 4.3.2 erklärt, konnte dies jedoch aufgrund der geringen Anzahl an Fällen mit *RUNX1*-Mutation nicht statistisch signifikant bestätigt werden.

#### **4.4.3 *RUNX1*-Mutationen im Kontext der MDS-Klassifikation sowie der Prognosescores IPSS und IPSS-R**

Die drei Patienten mit einer *RUNX1*-Mutation wurden in die MDS-Subtypen RCMD (n=2) und RAEB I (n=1) eingeteilt. Diese Häufung in diesen Subtypen ist in Übereinstimmung zu den Daten von Cazzola et al. 2013, wo Patienten mit *RUNX1*-Mutationen ebenfalls vor allem in die Subtypen RCMD und RAEB eingeteilt waren. In der hier vorliegenden Studie war diese Häufung jedoch nicht statistisch signifikant ( $P=1$ ).

#### **4.4.4 Prognostische Bedeutung von *RUNX1*-Mutationen**

Aufgrund der geringen mutierten Fallzahl konnten die Kaplan-Meier-Überlebenskurven nicht aussagekräftig interpretiert werden. Bei Bejar et al. 2011 wurde beschrieben, dass Mutationen im *RUNX1*-Gen mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert sind (Mediane Überlebensdauer: 1,16J vs. 1,86J). Auch bei der AML sind Mutationen im *RUNX1*-Gen mit einer schlechteren Prognose assoziiert, was sich in einer verkürzten ereignisfreien Zeit (2 Monate vs. 8,2 Monate) und auch einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit (Mediane Überlebensdauer: 13,3 Monate vs. 21,2 Monate) zeigt (Gaidzik/ Teleanu et al. 2016).

Aufgrund der niedrigen Fallzahlen und der relativ niedrigen Inzidenz der Genmutationen im *RUNX1*-Gen konnten in dieser Studie keine statisch aussagekräftigen Analysen durchgeführt werden. Jedoch bedeutet dieser fehlende Nachweis einer statistischen Signifikanz nicht, dass es hier keine Korrelation mit den verschiedenen Endpunkten, insbesondere dem Gesamtüberleben, gibt.

## 4.5 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Dissertation konnten die bisherigen Ergebnisse zur Inzidenz und möglichen prognostischen Bedeutung von Mutationen in *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1* aus anderen Studien weitgehend bestätigt werden und somit die Relevanz dieser Genmutationen zur Riskoeinteilung und damit Prognosevorhersage aufgezeigt und weiter belegt werden. Eine umfassende Mutationsanalyse des MDS bei Diagnosestellung könnte daher eine verbesserte Risikoabschätzung, und dadurch eine verbesserte Therapiewahl erlauben und somit den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen. Bezüglich der Therapie sollte daher erwägt werden, bei Patienten mit positivem *ASXL1*, *SRSF2* oder (*RUNX1*)-Mutationsstatus eine intensivere Therapie mit z.B. immunmodulatorischen Substanzen, Chemotherapeutika oder Stammzelltransplantation zu wählen. Jedoch handelt es sich bei diesen drei Genen nicht um die einzig relevanten Gene, es sollten weitere Gene, wie beispielsweise *TP53* oder *SF3B1* sowie auch die Beurteilung der Zytogenetik in Kombination betrachtet werden und in die Risikoabschätzung mit einfließen. Hier bieten sich die neuen Sequenziertechniken wie das NGS an, mit Hilfe dessen einen Vielzahl von Genen gleichzeitig mit hoher Sensitivität untersucht werden kann. Ein wichtiger Schritt wäre es jedoch, die klinisch relevanten Genmutationen in die derzeit aktuellen Risiko-Scores aufzunehmen.

## 5. Zusammenfassung

Myelodysplastische Syndrome (MDS) gehören zu einer Gruppe hämatologischer Erkrankungen, die häufig bei Menschen in höherem Alter vorkommen. Hierbei handelt es sich um eine klonale Erkrankung, die zu einer Veränderung der Knochenmarksstammzelle führt und nachfolgend zu Dysplasien, Differenzierungs- und Wachstumsstörungen der Knochenmark- und Blutzellen. Dies resultiert in einer Erniedrigung von Blutzellen (Zytopenie): den Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten.

Wie auch bei anderen hämatologischen Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass Genmutationen in Knochenmark- oder Blutzellen einen signifikanten Einfluss auf Entstehung, Verlauf und Prognose des MDS haben. Um bei Vorhandensein dieser Mutationen besser und spezifischer therapieren zu können ist es wichtig, diese Mutationen genauer zu verstehen und ihren Einfluss auf diese Erkrankung herauszufinden. Hierzu wurden in dieser Arbeit drei bei myeloischen Leukämien relevante Genmutationen ausgewählt und in Knochenmark- oder Blutzellen einer Kohorte von 116 Patienten des Ulmer MDS-Registers mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Fragmentanalyse und Sequenzierung nach Sanger untersucht. Das Vorhandensein dieser Mutationen wurde danach mit unterschiedlichen klinischen Charakteristika korreliert und deren Einfluss auf die Erkrankung näher bestimmt.

Hierzu wurde jeweils das Material bei Diagnosestellung oder das frühestmöglichst gewonnene Material untersucht (zum Zeitpunkt des Einschlusses in das Ulmer MDS-Register). Bei der Untersuchung von *ASXL1* wurde mit Hilfe einer Fragmentanalyse auf das Vorhandensein einer Frameshift-Mutation vorselektioniert und nachfolgend mittels Sequenzierung nach Sanger verifiziert; bei *SRSF2* und *RUNX1* wurden alle mittels PCR vervielfältigten Gen-Produkte (ohne Vorselektion) nach Sanger sequenziert.

In dieser Arbeit hatten 9,5% der Patienten eine Mutation im *ASXL1*-Gen. Diese Mutationen befanden sich alle in Exon 12, welches in dieser Studie untersucht wurde. Es konnte ein Trend für eine Assoziation von *ASXL1*-Mutationen zusammen mit erniedrigten Thrombozytenwerten gezeigt werden ( $P=0.1$ ). Auch fiel auf, dass Mutationen im *ASXL1*-Gen gehäuft zusammen mit Mutationen im *RUNX1*-Gen auftreten ( $P=0.02$ ). Zusätzlich war ein Trend einer Assoziation von einem gemeinsamen Auftreten von *ASXL1*-Mutationen zusammen mit *SRSF2*-

Mutationen zu beobachten ( $P=0.07$ ). 81,8% der MDS-Patienten mit *ASXL1*-Mutation erhielten eine spezifische Therapie, während nur 44,7% ohne *ASXL1*-Mutation eine spezifische Therapie erhielten ( $P=0.03$ ).

Mutationen im *SRSF2*-Gen hatten in dieser Arbeit 9,5% der Patienten; 10 dieser 11 Mutationen befanden sich auf Kodon P95 des Exon 1, eine Mutation auf Kodon P96. Bei den klinischen Charakteristika der Patienten ließ sich ein Trend für eine Assoziation von *SRSF2*-Mutationen mit einem höheren Alter der Patienten feststellen ( $P=0.08$ ). Statistisch signifikant war die Einstufung der Patienten mit einer *SRSF2*-Mutation in eine höhere Stufe nach IPSS (International Prognostic Scoring System) ( $P=0.01$ ).

2,6% der Patienten hatten eine Mutation im *RUNX1*-Gen. Die 3 Mutationen befanden sich in Exon 3, 7 und 8; 2 dieser Mutationen waren Insertionen und eine Mutation eine Deletion. Es konnte zusätzlich zur oben genannten Assoziation von *RUNX1*-Mutationen mit *ASXL1*-Mutationen eine mögliche Assoziation von *RUNX1*-Mutationen mit *SF3B1*-Mutationen gezeigt werden ( $P=0.08$ ).

Abschliessend konnte basierend auf dieser Arbeit gezeigt werden, dass Mutationen in den Genen *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1* bei MDS-Patienten mit einer vergleichbaren Inzidenz, wie in der Literatur beschrieben, nachweisbar sind. Diese Mutationen zeigen zumindest im Trend nachweisbare Assoziationen mit bestimmten klinischen Charakteristika, dem Gesamtüberleben und dem leukämiefreien Überleben auf. Somit bestätigen diese Ergebnisse letztendlich die Daten der Literatur, auch wenn die Fallzahl in der hier verwendeten Studie relativ klein war und eine statistisch signifikante Aussage dadurch nur eingeschränkt möglich war. Die bislang existierenden Daten und die hier generierten Daten bilden jedoch die Basis diese klinisch relevanten Genmutationen in die aktuellen Risiko-Scores des MDS zu integrieren, mit dem Ziel eine verbesserte Risikostratifizierung durchführen zu können. Dies würde wiederum mit einer verbesserten Therapie beziehungsweise einer auf das individuell basierte Risiko beruhenden Therapie resultieren. Mit Hilfe der neuen Sequenziertechnologien lässt sich eine große Vielzahl von Genen gleichzeitig untersuchen, sodass die Entwicklung so genannter diagnostischer Genpanel eine frühe Risikoeinschätzung der MDS-Patienten erlauben würde.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, Pandey S, Patel JP, Chung YR, Koche R, Perna F, Zhao X, Taylor JE, Park CY, Carroll M, Melnick A, Nimer SD, Jaffe JD, Aifantis I, Bernstein BE, Levine RL: ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell*, 22: 180-193(2012)

2. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A, Beran M, Gilliland D G, Levine R L, Tefferi A: Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 25: 1200-1202(2011)

3. Arber D A, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz M J, Le Beau M M, Bloomfield C D, Cazzola M, Vardiman J W: The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127: 2391-2405(2016)

4. Avramopoulos D, Cox T, Blaschak JE, Chakravarti A, Antonarakis SE: Linkage mapping of the AML1 gene on human chromosome 21 using a DNA polymorphism in the 3' untranslated region. *Genomics*, 14: 506-507(1992)

5. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, Ebert BL: Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *New England Journal of Medicine*, 364: 2496-2506(2011)

6. Bejar R, Stevenson K E, Caughey B A, Abdel-Wahab O, Steensma D P, Galili N, Raza A, Kantarjian H, Levine R L, Neuberg D, Garcia-Manero G, Ebert B L: Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, 30: 3376-3382(2012)

7. Bernard O A, Romana S P, Poirel H, Berger R: Molecular Cytogenetics of t(12;21)(p13;q22). *Leukemia & Lymphoma*, 23: 459-465(1996)

8. Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz M J, Larrayoz M J, Garcia-Delgado M, Giagounidis A, Malcovati L, Della Porta M G, Jadersten M, Killick S, Hellstrom-Lindberg E, Cazzola M, Wainscoat J S: Frequent mutation of the polycomb-associated gene *ASXL1* in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 24: 1062-1065(2010)

9. Cazzola M, Della-Porta M G, Malcovati L: The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*, 122(25): 4021-34(2013).

10. Chen T, Hou H, Chou W, Tang J, Kuo Y, Chen C, Tseng M, Huang C, Lai Y, Chiang Y, Lee F, Liu M, Liu C, Liu C Yao M, Huang S, Ko B, Hsu S, Wu S, Tsay W, Chen, Y-C and Tien H-F: Dynamics of *ASXL1* mutation and other associated genetic alterations during disease progression in patients with primary myelodysplastic syndrome. *Blood Cancer Journal*, 4: e177(2014)

11. Chesnais V, Kosmider O, Damm F, Itzykson R, Bernard OA, Solary E, Fontenay M: Spliceosome mutations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Oncotarget*, 3: 1284-1293(2012)

12. Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Carbuccia N, Hidalgo-Curtis C, Della Valle V, Couronné L, Scourzic L, Chesnais V, Guerci-Bresler A, Slama B, Beyne-Rauzy O, Schmidt-Tanguy A, Stamatoullas-Bastard A, Dreyfus F, Prébet T, de Botton S, Vey N, Morgan M A, Cross N C P, Preudhomme C, Birnbaum D, Bernard O A, Fontenay M: Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 119: 3211-3218(2012)

13. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lecluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguie F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA: Mutation in *TET2* in myeloid cancers. *New England Journal of Medicine*, 360: 2289-2301(2009)

14. Della Porta M G, Galli A, Bacigalupo A, Zibellini S, Bernardi M, Rizzo E, Allione B, van Lint M T, Pioltelli P, Marengo P, Bosi A, Voso M T, Sica S, Cuzzola

M, Angelucci E, Rossi M, Ubezio M, Malovini A, Limongelli I, Ferretti V V, Spinelli O, Tresoldi C, Pozzi S, Luchetti S, Pezzetti L, Catricalà S, Milanese C, Riva A, Bruno B, Ciceri F, Bonifazi F, Bellazzi R, Papaemmanuil E, Santoro A, Alessandrino E P, Rambaldi A, Cazzola M: Clinical Effects of Driver Somatic Mutations on the Outcomes of Patients With Myelodysplastic Syndromes Treated With Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, 34: 3627-3637(2016)

15. Dohner H, Lubbert M, Fiedler W, Fouillard L, Haaland A, Brandwein J M, Lepretre S, Reman O, Turlure P, Ottmann O G, Muller-Tidow C, Kramer A, Raffoux E, Dohner K, Schlenk R F, Voss F, Taube T, Fritsch H, Maertens J: Randomized, phase 2 trial of low-dose cytarabine with or without volasertib in AML patients not suitable for induction therapy. *Blood*, 124: 1426-1433(2014)

16. Ernst T, Chase A J, Score J, Hidalgo-Curtis C E, Bryant C, Jones A V, Waghorn K, Zoi K, Ross F M, Reiter A, Hochhaus A, Drexler H G, Duncombe A, Cervantes F, Oscier D, Boulwood J, Grand F H, Cross N C: Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature Genetics*, 42: 722-726(2010)

17. Fenaux P, Mufti G J, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore S D, Seymour J F, Bennett J M, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman L R: Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology*, 10: 223-232(2009)

18. Fisher C L, Berger J, Randazzo F, Brock H W: A human homolog of Additional sex combs, ADDITIONAL SEX COMBS-LIKE 1, maps to chromosome 20q11. *Gene*, 306: 115-126(2003)

19. Fisher C L, Randazzo F, Humphries R K, Brock H W: Characterization of Asx11, a murine homolog of Additional sex combs, and analysis of the Asx-like gene family. *Gene*, 369: 109-118(2006)

20. Font P, Loscertales J, Benavente C, Bermejo A, Callejas M, Garcia-Alonso L, Garcia-Marcilla A, Gil S, Lopez-Rubio M, Martin E, Munoz C, Ricard P, Soto C, Balsalobre P, Villegas A: Inter-observer variance with the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) following the 2008 WHO classification. *Annals of Hematology*, 92: 19-24(2013)

21. Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, Zimmermann AS, Rock J, Paschka P, Corbacioglu A, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Spath D, Kundgen A, Schmidt-Wolf IG, Gotze K, Nachbaur D, Pfreundschuh M, Horst HA, Dohner H, Dohner K: *RUNX1* mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *Journal of Clinical Oncology*, 29: 1364-1372(2011)

22. Gaidzik V, Teleanu V, Papaemmanuil E, Weber D, Paschka P, Hahn J, Wallrabenstein T, Kolbinger B, Köhne C, Horst H, Brossart P, Held G, Kündgen A, Ringhoffer M, Götze K, Rummel M, Gerstung M, Campbell P, Kraus J, Kestler H, Thol F, Heuser M, Schlegelberger B, Ganser A, Bullinger L, Schlenk R, Döhner K, Döhner H: *RUNX1* mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia*, 11: 2160-2168 (2016)

23. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccioni N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci M J, Vey N, Birnbaum D: Mutations of polycomb-associated gene *ASXL1* in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 145: 788-800(2009)

24. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, Adélaïde J, Carbuccioni N, Esterni B, Finetti P, Murati A, Arnoulet C, Zerazhi H, Fezoui H, Tadriz Z, Nezri M, Chaffanet M, Mozziconacci M, Vey N, Birnbaum D: *ASXL1* mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 151: 365-375(2010)

25. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, Kreil S, Jones A, Score J, Metzgeroth G, Oscier D, Hall A, Brandts C, Serve H, Reiter A, Chase AJ, Cross NC: Frequent *CBL* mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 113: 6182-6192(2009)

26. Graubert T A, Shen D, Ding L, Okeyo-Owuor T, Lunn C L, Shao J, Krysiak K, Harris C C, Koboldt D C, Larson D E, McLellan M D, Dooling D J, Abbott R M, Fulton R S, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, Grillot M, Baty J, Heath S, Frater J L, Nasim T, Link D C, Tomasson M H, Westervelt P, DiPersio J F, Mardis E R, Ley T J, Wilson R K, Walter M J: Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat.Genet.*, 44: 53-57(2012)

27. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhaes SM, Miyazaki Y, Pfeilstocker M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D: Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120: 2454-2465(2012)

28. 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: Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 28: 241-247(2014)

29. Harada H, Harada Y, Niimi H, Kyo T, Kimura A, Inaba T: High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood*, 103: 2316-2324(2004)

30. Harada H, Harada Y, Tanaka H, Kimura A, Inaba T: Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Blood*, 101: 673-680(2003)

31. Herzig J K: Mutationen des ASXL1-Gens bei der akuten myeloischen Leukämie im Erwachsenenalter- Etablierung eines Assays zur raschen Detektion der Mutationen und Evaluation ihrer Inzidenz und klinischen Bedeutung. Bachelorarbeit Molekulare Medizin Universität Ulm, (2011)

32. Hofmann W, Platzbecher U, Götze K, Stauden R, Passweg J, Gering U: , Leitlinie Myelodysplastische Syndrome (MDS), Onkopedia (2016) (<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/myelodysplastische-syndrome-mds.com> 15.03.2016)

33. Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Takeuchi K, Maki K, Ogawa S, Chiba S, Mitani K, Hirai H: Mutations of the AML1 gene in myelodysplastic syndrome and their functional implications in leukemogenesis. *Blood*, 96: 3154-3160(2000)

34. Issa J J, Roboz G, Rizzieri D, Jabbour E, Stock W, O'Connell C, Yee K, Tibes R, Griffiths E A, Walsh K, Daver N, Chung W, Naim S, Taverna P, Oganessian A, Hao Y, Lowder J N, Azab M, Kantarjian H: Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, dose-escalation phase 1 study. *Lancet Oncology*, 16: 1099-1110(2015)

35. Keita M, Bachvarova M, Morin C, Plante M, Gregoire J, Renaud M, Sebastianelli A, Trinh X B, Bachvarov D: The RUNX1 transcription factor is expressed in serous epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell proliferation, migration and invasion. *Cell Cycle*, 12: 972-986(2013)

36. Kharfan-Dabaja M A: Guadecitabine for AML and MDS: hype or hope? *Lancet Oncology*, 16: 1009-1011(2015)

37. Langabeer S E, Gale R E, Rollinson S J, Morgan G J, Linch D C: Mutations of the AML1 gene in acute myeloid leukemia of FAB types M0 and M7. *Genes Chromosomes Cancer*, 34: 24-32(2002)

38. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, Stevens-Linders E, van Hoogen P, van Kessel AG, Raymakers RA, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburgh E, Hagemeijer A, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH: Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics*, 41: 838-842(2009)

39. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, Berger R, Clark JJ, Willis SG, Nguyen KT, Flores NJ, Estey E, Gattermann N, Armstrong

S, Look AT, Griffin JD, Bernard OA, Heinrich MC, Gilliland DG, Druker B, Deininger MW: The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 106: 3377-3379(2005)

40. Lin C, Hou H, Chou W, Kuo Y, Wu S, Liu C, Chen C, Tseng M, Huang C, Lee F, Liu M, Liu C, Tang J, Yao M, Huang S, Hsu S, Ko B, Tsay W, Chen Y, Tien H: SF3B1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes: the mutation is stable during disease evolution. *American Journal of Hematology*, 89: E109-15(2014)

41. Lionetti M, Fabris S, Cutrona G, Agnelli L, Ciardullo C, Matis S, Ciceri G, Colombo M, Maura F, Mosca L, Gentile M, Recchia AG, Ilariucci F, Musolino C, Molica S, Di Raimondo F, Cortelezzi A, Rossi D, Gaidano G, Morabito F, Ferrarini M, Neri A: High-throughput sequencing for the identification of NOTCH1 mutations in early stage chronic lymphocytic leukaemia: biological and clinical implications. *British Journal of Haematology*, 165: 629-639(2014)

42. Lorschach R B, Downing J R: The role of the AML1 transcription factor in leukemogenesis. *International Journal of Hematology*, 74: 258-265(2001)

43. Lui X: Targeting Polo-Like Kinases: A Promising Therapeutic Approach for Cancer Treatment. *Translational Oncology*, 8: 185-195(2015)

44. Lutterbach B, Hiebert S W: Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene*, 245: 223-235(2000)

45. Mangan J K, Speck N A: RUNX1 mutations in clonal myeloid disorders: from conventional cytogenetics to next generation sequencing, a story 40 years in the making. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 16: 77-91(2011)

46. Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M: t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 10431-10434(1991)

47. Nagata Y, Sanada M, Kon A, Yoshida K, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Mori H, Ishiyama K, Sakata-Yanagimoto M, Obara N, Nagasaki M, Miyawaki S, Chiba S, Miyano S, Yung S L, Koeffler H P, Ogawa S: Mutational spectrum analysis of interesting correlation and interrelationship between RNA splicing pathway and commonly targeted genes in myelodysplastic syndrome [abstract]. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 118: Abstract 273(2011)

48. Neukirchen J, Schoonen W M, Strupp C, Gattermann N, Aul C, Haas R, Germing U: Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry. Leukemia Research, 35: 1591-1596(2011)

49. Ohki M: Molecular basis of the t(8;21) translocation in acute myeloid leukaemia. Seminars in Cancer Biology, 4: 369-375(1993)

50. Osato M: Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. Oncogene, 23: 4284-4296(2004)

51. Owen CJ, Toze CL, Koochin A, Forrest DL, Smith CA, Stevens JM, Jackson SC, Poon MC, Sinclair GD, Leber B, Johnson PR, Macheta A, Yin JA, Barnett MJ, Lister TA, Fitzgibbon J: Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. Blood, 112: 4639-4645(2008)

52. Papaemmanuil E: Molecular Landscape of MDS and its clinical applications. Hyatt Regency Orlando, Orlando, Florida (2015) (<https://www.mds-foundation.org/wp-content/uploads/2015/12/Molecular-Landscape.pdf> 15.03.2016)

53. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, Pellagatti A, Wainscoat J S, Hellstrom-Lindberg E, Gambacorti-Passerini C, Godfrey A L, Rapado I, Cvejic A, Rance R, McGee C, Ellis P, Mudie L J, Stephens P J, McLaren S, Massie C E, Tarpey P S, Varela I, Nik-Zainal S, Davies H R, Shlien A, Jones D, Raine K, Hinton J, Butler A P, Teague J W, Baxter E J, Score J, Galli A, Della Porta M G, Travaglino E, Groves M, Tauro S, Munshi N C, Anderson K C, El-Naggar A, Fischer A, Mustonen V, Warren A J, Cross N C, Green A R, Futreal P A, Stratton M R, Campbell P J, Chronic Myeloid Disorders

Working Group of the International Cancer Genome Consortium: Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *New England Journal of Medicine*, 365: 1384-1395(2011)

54. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, Yoon C J, Ellis P, Wedge D C, Pellagatti A, Shlien A, Groves M J, Forbes S A, Raine K, Hinton J, Mudie L J, McLaren S, Hardy C, Latimer C, Della Porta M G, O'Meara S, Ambaglio I, Galli A, Butler A P, Walldin G, Teague J W, Quek L, Sternberg A, Gambacorti-Passerini C, Cross N C, Green A R, Boultonwood J, Vyas P, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, Cazzola M, Stratton M R, Campbell P J, Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium: Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 122: 3616-3627(2013)

55. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik V I, Paschka P, Roberts N D, Potter N E, 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 D R, Teague J W, Butler A P, Greaves M F, Ganser A, Döhner K, Schlenk R F, Döhner H, Campbell P J: Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 374: 2209-2221(2016)

56. Paschka P, Schlenk R F, Gaidzik V I, Herzig J K, Aulitzky T, Bullinger L, Spath D, Teleanu V, Kundgen A, Kohne C H, Brossart P, Held G, Horst H A, Ringhoffer M, Gotze K, Nachbaur D, Kindler T, Heuser M, Thol F, Ganser A, Döhner H, Döhner K: ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica*, 100: 324-330(2015)

57. Paschka P, Schlenk R F, Gaidzik V I, Herzig J K, Aulitzky T, Bullinger L, Spath D, Teleanu V, Kundgen A, Kohne C, Brossart P, Held G, Horst H, Ringhoffer M, Gotze K, Nachbaur D, Kindler T, Heuser M, Thol F, Ganser A, Döhner H, Döhner K: ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica*, 100: 324-330(2015)

58. Pellagatti A, Boulton J: The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *European Journal of Haematology*, 95: 3-15(2015)

59. Qiu J, Zhou B, Thol F, Zhou Y, Chen L, Shao C, DeBoever C, Hou J, Li H, Chaturvedi A, Ganser A, Bejar R, Zhang D, Fu X, Heuser M: Distinct splicing signatures affect converged pathways in myelodysplastic syndrome patients carrying mutations in different splicing regulators. *RNA*, 22: 1535-1549(2016)

60. Raza A, Galili N: The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nature Reviews Cancer*, 12: 849-859(2012)

61. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the American Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467(1977)

62. Santini V, Almeida A, Giagounidis A, Gröpper S, Jonasova A, Vey N, Mufti G J, Buckstein R, Mittelman M, Platzbecher U, Shpilberg O, Ram R, del Canizo C, Gattermann N, Ozawa K, Zhong J, Seguy F, Hoenekopp A, Beach C L, Fenaux P: Efficacy and Safety of Lenalidomide (LEN) Versus Placebo (PBO) in RBC-Transfusion Dependent (TD) Patients (Pts) with IPSS Low/Intermediate (Int-1)-Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) without Del(5q) and Unresponsive or Refractory to Erythropoiesis-Stimulating Agents (ESAs): Results from a Randomized Phase 3 Study (CC-5013-MDS-005). *Blood*, 124: 409 (2014)

63. Schanz J, Tuchler H, Sole F, Mallo M, Luno E, Cervera J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak M L, Ohyashiki K, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Valent P, Giagounidis A, Aul C, Lubbert M, Stauder R, Krieger O, Garcia-Manero G, Faderl S, Pierce S, Le Beau M M, Bennett J M, Greenberg P, Germing U, Haase D: New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of Clinical Oncology*, 30: 820-829(2012)

64. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, Kohlmann A, Illig T, Klopp N, Wichmann H, Kreuzer K, Schmid C, Staib P, Peceny R, Schmitz N, Kern W, Haferlach C, Haferlach T: ASXL1 exon 12 mutations are

frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*, 27: 82-91(2013)

65. Silverman L R, Demakos E P, Peterson B L, Kornblith A B, Holland J C, Odchimar-Reissig R, Stone R M, Nelson D, Powell B L, DeCastro C M, Ellerton J, Larson R A, Schiffer C A, Holland J F: Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *Journal of Clinical Oncology*, 20: 2429-2440(2002)

66. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM, Gilliland DG: Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nature Genetics*, 23: 166-175(1999)

67. Talati C, Griffiths E A, Wetzler M, Wang E S: Polo-like kinase inhibitors in hematologic malignancies. *Critical Reviews in Oncology*, 98: 200-210(2016)

68. Tefferi A, Vardiman J W: Myelodysplastic syndromes. *New England Journal of Medicine*, 361: 1872-1885(2009)

69. Thol F, Kade S, Schlarman C, Loffeld P, Morgan M, Krauter J, Wlodarski MW, Kolking B, Wichmann M, Gorlich K, Gohring G, Bug G, Ottmann O, Niemeyer CM, Hofmann WK, Schlegelberger B, Ganser A, Heuser M: Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 119: 3578-3584(2012)

70. Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger E, Krauter J, Wagner K, Chaturvedi A, Sharma A, Wichmann M, Gohring G, Schumann C, Bug G, Ottmann O, Hofmann W, Schlegelberger B, Heuser M, Ganser A: Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, 29(18): 2499-506 (2011)

71. van Bragt M P A, Hu X, Xie Y, Li Z: RUNX1, a transcription factor mutated in breast cancer, controls the fate of ER-positive mammary luminal cells. *eLife*, 3: e03881(2014)

72. Visconte V, Makishima H, Maciejewski J P, Tiu R V: Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders. *Leukemia*, 26: 2447-2454(2012)

73. Walter M J, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, Fulton R, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, Kandath C, Baty J, Westervelt P, DiPersio J F, Mardis E R, Wilson R K, Ley T J, Graubert T A: Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 25: 1153-1158(2011)

74. Wallrabenstein T: (unveröffentlichte Befunde)

75. Wei Y, Chen R, Dimicoli S, Bueso-Ramos C, Neuberg D, Pierce S, Wang H, Yang H, Jia Y, Zheng H, Fang Z, Nguyen M, Ganon-Gomez I, Ebert B, Levine R, Kantarjian H, Garcia-Manero G: Global H3K4me3 genome mapping reveals alterations of innate immunity signaling and overexpression of JMJD3 in human myelodysplastic syndrome CD34+ cells. *Leukemia*, 27: 2177-2186(2013)

76. Wu SJ, Kuo YY, Hou HA, Li LY, Tseng MH, Huang CF, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Lin CT, Chen CY, Chou WC, Yao M, Huang SY, Ko BS, Tang JL, Tsay W, Tien HF: The clinical implication of SRSF2 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution. *Blood*, 120: 3106-3111(2012)

77. Xiao R, Sun Y, Ding JH, Lin S, Rose DW, Rosenfeld MG, Fu XD, Li X: Splicing regulator SC35 is essential for genomic stability and cell proliferation during mammalian organogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 27: 5393-5402(2007)

78. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann W K, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler H P, Shih L Y, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S: Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 478: 64-69(2011)

## **DANKSAGUNG**

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

## **LEBENS LAUF**

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.