

Aus der Klinik für  
Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Haas

Stellenwert von somatischen Genmutationen auf die Prognose von Patienten mit  
Myelodysplastischen Syndromen sowie deren Assoziation zu Komorbiditäten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors in der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Jenny Seidler  
2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Dagmar Wiczorek

Unseren Patienten

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Als Posterpräsentation:

Andrea Kuendgen, MD, Jenny Seidler, Michael Lauseker, Torsten Haferlach, MD, Susanne Schnittger, PhD, Alexander Kohlmann, PhD, Barbara Hildebrandt, PhD, Catharina Müller-Thomas, MD, Beate Betz, PhD, Rainer Haas, MD, Norbert Gattermann, MD, Brigitte Royer-Pokora, PhD, Katharina Götze, M.D. and Ulrich Germing, MD

*Prognostic Impact Of Molecular Mutations In 182 Patients With Myelodysplastic Syndromes.*  
55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA, December 7-10, 2013.

## I Zusammenfassung

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind sehr heterogene Erkrankungen in Bezug auf ihr molekulares sowie klinisches Erscheinungsbild, was sich in ihrer Prognose und Behandlung widerspiegelt. Die Therapie richtet sich nach der Zugehörigkeit zu einer Risikogruppe und somit nach einem prognostischen Bewertungssystem. Der bislang bestehende Goldstandard IPSS (International Prognostic Scoring System) wurde 2012 überarbeitet (Greenberg et al. 1997). Der aktuelle in Anwendung befindliche IPSS-R verwendet weiterhin Zellzahlen, Knochenmarkblasten sowie Veränderungen des Karyotyps, um Patienten in Risikogruppen zu stratifizieren (Greenberg et al. 2012). Mehr als die Hälfte aller MDS-Patienten weisen einen normalen Karyotyp auf und sogar bei Patienten mit identischen chromosomalen Veränderungen unterscheiden sich die Auswirkungen in Bezug auf Prognose und Therapieerfolg auf die Patienten erheblich. Somatische Mutationen sind bei mehr als 70% aller MDS-Patienten nachweisbar und somit häufiger als zytogenetische Aberrationen (Bejar et al. 2011). Dies eröffnet die Möglichkeit, somatische Mutationen in etablierte Prognosesysteme mitaufzunehmen, um diese zu spezifizieren und um therapeutische Strategien weiter zu personalisieren.

Das Interesse dieser Arbeit gilt den molekularen Veränderungen der Patienten ebenso wie den Komorbiditäten in Zusammenhang mit den untersuchten Biomarkern.

Für die vorliegende Arbeit wurden 166 Patienten mit verschiedenen MDS-Subtypen analysiert, von denen 74 Personen bis zum Ende des Beobachtungszeitraums verstarben. Das Durchschnittsalter des Patientenkollektivs lag bei 68 Jahren (16-87 Jahre), die mediane Überlebenszeit betrug 5,7 Jahre (95% CI 3,5-7,8). Für die molekulargenetischen Analysen des Gen-Panels (ASXL1, DNMT3A, EZH2, FLT3-ITD, IDH1, IDH2, MLL-PTD, KRAS, NRAS, CBL, RUNX1, SF3B1, SRSF2, TET2, JAK2 und TP53) wurde hauptsächlich *Next-Generation Sequencing* verwendet. Innerhalb des vorliegenden Patientenkollektivs waren TET2-Mutationen (30,7%) am häufigsten vertreten, gefolgt von SF3B1 (27,5%), ASXL1 (23,5%), RUNX1 (21,1%), SRSF2 (19,5%), DNMT3A (13,9%), EZH2 (8,5%), TP53 (6,7%), MLL-PTD (4,2%), NRAS (3,9%), JAK2 (3,8%), FLT3-ITD (3,7%), IDH1 (3,1%), IDH2 (3,1%), KRAS (2,5%) und CBL (2,2%) -Mutationen.

In einer univariaten Analyse konnte ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit für folgende Biomarker demonstriert werden: TP53 ( $p \leq 0,001$ ), EZH2 ( $p = 0,011$ ), SF3B1 ( $p = 0,014$ ), ASXL1 ( $p \leq 0,001$ ), NRAS ( $p = 0,022$ ), IDH2 ( $p = 0,031$ ) und RUNX1 ( $p = 0,006$ ). SF3B1-Mutationen waren bei Patienten mit einem MDS mit einer günstigeren Prognose, Mutationen in den Genen TP53, EZH2, RUNX1, ASXL1, NRAS sowie IDH2 mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert.

Einen ebenfalls signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit hatte das Alter bei Erstdiagnose ( $p < 0,014$ ), die FAB-Klassifikation ( $p < 0,011$ ), die WHO2016 Klassifikation ( $p \leq 0,001$ ), der Hb nach IPSS und IPSS-R ( $p = 0,002 / p = 0,015$ ), die Thrombozytenzahl nach IPSS und IPSS-R ( $p = 0,006 / p = 0,019$ ), die Anzahl an Knochenmarkblasten nach IPSS ( $p = 0,006$ ) und die Prognoseklassifikation nach IPSS-R ( $p < 0,033$ ). Mit Hilfe der multivariaten Regressionsanalyse konnten ASXL1 und KRAS sowie die Klassifikation der Genetik nach IPSS-R als unabhängige prognostische Variablen mit Einfluss auf die Überlebenszeit definiert werden.

Komorbiditäten haben einen signifikanten Einfluss auf die Prognose von Patienten mit MDS. In der vorliegenden Arbeit konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen Mutationen und Komorbiditäten konstatiert werden. Ein Beispiel ist ein möglicher Zusammenhang von Autoimmunerkrankungen und SRSF2-Mutationen insbesondere bei männlichen MDS-Patienten. Perspektivisch erscheint es erstrebenswert, patientenindividuelle Parameter (weiterhin und großzügiger) in Prognose-Scores zu integrieren.

Die Integration von Mutationsanalysen sowie Komorbiditäten in die klinische Routine könnte somit zur weiteren Spezifizierung der Diagnostik, Prognose und somit Therapiestrategieerstellung im Sinne einer personalisierten Medizin den Patienten zugutekommen.

## I Summary

Myelodysplastic syndromes (MDS) are heterogeneous in terms of clinical and molecular characteristics, as well as prognosis and treatment approaches. Therapeutic decision-making relies greatly on prognostic scoring systems. In 2012 the gold-standard IPSS (International prognostic scoring system) has been revised (Greenberg et al. 1997). The new IPSS-R still uses cell counts, marrow blast count and karyotypic abnormalities to stratify patients (pts) into risk groups (Greenberg et al. 2012). However, more than 50% of all MDS pts present with a normal karyotype and even in pts with identical chromosomal abnormalities outcome may vary. Somatic mutations are more common than cytogenetic abnormalities and can be identified in over 70% of pts including pts with normal karyotype (Bejar et al. 2011). Therefore, the addition of such mutations to common prognostic markers might help to refine prognostication in MDS pts and improve therapeutic procedures by individualizing MDS treatment.

Due to the highly individual course of MDS, and to individualize therapeutic decisions, somatic mutations and the connection of somatic mutations and comorbidities (present in over 60% of patients) were examined.

We analyzed 166 pts with different subtypes of MDS. Most of the data was collected prospectively within the clinical routine diagnostic procedures. During that time the marker panel was adjusted, when new analyses became available. Thus, not all markers are currently available for all pts. To assess the impact of the biomarkers, Kaplan-Meier analyses were estimated starting from the day of diagnosis.

Various molecular assays were performed including sensitive next-generation sequencing for mutations in ASXL1, DNMT3A, EZH2, FLT3-ITD, IDH1, IDH2, MLL-PTD, KRAS, NRAS, CBL, RUNX1, SF3B1, SRSF2, TET2, JAK2, and TP53. The most frequent mutation was TET2 (30.7%), followed by SF3B1 (27.5%), ASXL1 (23.5%), RUNX1 (21.1%), SRSF2 (19.5%), DNMT3A (13.9%), EZH2 (8.5%), TP53 (6.7%), MLL-PTD (4.2%), NRAS (3.9%), JAK2 (3.8%), FLT3-ITD (3.7%), IDH1 (3.1%), IDH2 (3.1%), KRAS (2.5%) and CBL (2.2%). A significant influence on survival in univariate analysis could be demonstrated for TP53 ( $p \leq 0.001$ ), EZH2 ( $p = 0.011$ ), SF3B1 ( $p = 0.014$ ), ASXL1 ( $p \leq 0.001$ ), NRAS ( $p = 0.022$ ), IDH2 ( $p = 0.031$ ) and RUNX1 ( $p = 0.006$ ). Other prognostic variables with significant impact regarding survival were age at diagnosis ( $p < 0.014$ ), FAB subgroup ( $p \leq 0.011$ ), WHO2016 subgroup ( $p \leq 0.001$ ), Hb according to IPSS and IPSS-R ( $p = 0.002 / p = 0.015$ ), platelet count according to IPSS and IPSS-R ( $p = 0.006 / p = 0.019$ ), marrow blast count according to IPSS ( $p = 0.006$ ) and the IPSS-R classification ( $p < 0.033$ ).

We could confirm mutations in TP53, EZH2, RUNX1 and ASXL1 to be predictors of poor overall survival and demonstrate a poor outcome for mutations in NRAS, IDH2, while SF3B1 mutations conferred a favorable prognosis in pts with MDS. To determine the relative contribution of mutation status to overall survival, we generated a multivariable Cox model, using a stepwise variable-selection procedure incorporating cytogenetics according to IPSS-R and mutation status for the 16 most frequently mutated genes in this study. Mutations of ASXL1 and KRAS and cytogenetics according to IPSS-R emerged as independent predictors of survival.

Comorbidities also have a significant impact on the prognosis of patients with MDS. The purpose of this study, inter alia, was to determine the association of somatic mutations with comorbidities in MDS. In the present work a possible connection between e.g. autoimmune diseases and SRSF2 in patients with MDS was stated. Additionally, incorporating comorbidities in risk assessment systems may improve the prediction of prognosis and allow for a more individual treatment approach.

Integrating mutation assessment and individual comorbidities into the clinical routine might improve diagnostic procedures as well as prognostication, and individualize treatment approaches.

## II Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -KG	- Alpha-Ketoglutarat
2-HG	- 2-Hydroxyglutarat
5hmC	- 5-Hydroxymethylcytosin

### A

Abb.	- Abbildung
ABCB7-Gen	- ATP Binding Cassette Subfamily B Member 7-Gen
Ac	- Acetylgruppe
ADD	- ATRX-DNMT3-DNMT3L Domain
AE	- Autoimmunerkrankung
AKT	- AKT Serine / Threonine Kinase 1
alloHSCT	- Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation
AML	- Akute Myeloische Leukämie
ANA's	- Antinukleäre Antikörper
ANC	- Absolute Neutrophil Count
Art.	- Arteriell
Ass.	- Assoziiert
ASXL1	- Additional Sex Combs Like Transcriptional Regulator 1

### B

BAD	- Bcl-2 Antagonist of Cell Death
BAP1	- BRCA1 Associated Protein 1
Bcl-2	- B-Cell-Lymphoma-Protein
Bcr-abl	- Breakpoint Cluster Region-Abelson Murine Leukemia 1
BPS	- Branch Point Sequence

### C

C	- Cytosin
C	- Kohlenstoff
CA	- Carcinoma
CBL	- Casitas B-Cell Lymphoma
CBFA2	- Core-Binding Factor Subunit Alpha-2
CBP	- Creb (cAMP Response Element) Binding Protein
CCC	- Cholangiozelluläres Karzinom
CH3	- Methylgruppe
CD34	- Cluster of Differentiation 34
CHIP	- Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential
CI	- Confidence Interval
CMML	- Chronische Myelomonozytäre Leukämie
COPD	- Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CpG	- 5'-C-Phosphat-G-3'
CPSS-Mol	- CMML-Specific Prognostic Scoring System (CPSS) - Molecular
CREB	- cAMP Response Element

### D

Dm	- Diabetes mellitus
DNA	- Deoxyribonucleic acid
DNMT3A	- DNA (Cytosine-5) -Methyltransferase 3Alpha

### E

E	- Enzym
E	- Exon ( <i>expressed region</i> )
ED	- Erstdiagnose
EDTA	- Ethylendiamintetraacetat

EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor  
EPO - Erythropoetin  
EZH2 - Enhancer of Zeste Homolog 2

## **F**

FA - Fanconi-Anämie  
FAB - French-American-British  
Fe<sup>2+</sup> - Zweiwertiges Eisen  
FGFR1 - Fibroblast Growth Factor Receptor 1  
FLT3 - Fms-Related Tyrosine Kinase 3  
FLT3-ITD - Fms-Related Tyrosine Kinase 3-Internal Tandem Duplication

## **G**

G - Guanin  
GAB1 - GRB2 Associated Binding Protein 1  
GAP - GTPase Activating Proteins  
G-CSF - Granulocyte-Colony Stimulating Factor  
GDP - Guanosindiphosphat  
GEF - Guanine Nucleotide Exchange Factor  
GH - Growth Hormone  
GM-CSF - Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor  
GRB2 - Growth Factor Receptor Bound Protein-2  
GTP - Guanosintriphosphat

## **H**

H2A - Histon2A  
H2B - Histon2B  
H3K4 - HistonH3K4  
H3K27 - HistonH3K27  
Hb - Hämoglobin  
HCC - Hepatocellular Carcinoma  
HIF-1 $\alpha$  - Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$   
HMA's - Hypomethylating Agents  
HOX-Genes - Homeobox Genes  
HRST - Herzrhythmusstörung  
HSZ - Hämatopoetische Stammzelle  
HSC - Hematopoietic Stem Cell

## **I**

ICC - Intrahepatisches Cholangiokarzinom  
IDAX - Inhibitor of Dvl and Axin complex  
IDH 1 - Isocitrat Dehydrogenase 1  
IDH 2 - Isocitrat Dehydrogenase 2  
IGFR - Insulin-like Growth Factor Receptor  
Il-3 - Interleukin 3  
int-2 - Intermediate 2  
IPSS - International Prognostic Scoring System  
IPSS-R - International Prognostic Scoring System- Revised  
ITD - Internal Tandem Duplication  
ITP - Immunthrombozytopenie  
ISCN - International System of Cytogenetic Nomenclature  
IR - Insulin Receptor

## **J**

JAK2 - Januskinase 2, Just-another-kinase 2  
JH1 - JAK-Homologie-Domänen



## K

Kb	- Kilobase
KHK	- Koronare Herzkrankheit
KM	- Knochenmark
Kum.	- Kumulativ
KRAS	- Kirsten Rat Sarcoma

## L

L	- Ligand
LDH	- Laktatdehydrogenase

## M

m	- Männlich
M.	- Morbus
MAP-Kinase	- Mitogen-Activated Protein- Kinase
M-CSF	- Macrophage Colony-Stimulating Factor
MDS	- Myelodysplastisches Syndrom
MDS del(5q)	- MDS with Chromosome 5 Deletion
MDS-EB1	- MDS with Excess Blasts1
MDS-EB2	- MDS with Excess Blasts2
MDS-MLD	- MDS with Multilineage Dysplasia
MDS-RS	- MDS with Ring Sideroblasts
MDS-RS-SLD	- MDS-RS with Single Lineage Dysplasia
MDS-RS-MLD	- MDS-RS with Multilineage Dysplasia
MDS-SLD	- MDS with Single Lineage Dysplasia
MDS-U	- MDS, Unclassifiable
Me-	- Methylgruppe
MLL	- Münchner Leukämielabor (GmbH)
MLLPTD	- Mixed Lineage Leukemia – Partial Tandem Duplication
Mo.	- Monate
MPD	- Myeloproliferative Disorders
MPN	- Myeloproliferative Neoplasien
mRNA	- Messenger-RNA
m-TOR	- Mammalian Target of Rapamycin

## N

NADP	- Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	- Stickstoffmonoxid
NPM1	- Nucleophosmin1
NRAS	- Neuroblastoma Rat Sarcoma
NSG	- Next-Generation-Sequencing

## O

OH-	- Hydroxylgruppe
-----	------------------

## P

P53	- Protein 53
PaD	- Polycomb-Associated Deubiquitinase
PAS	- Periodic Acid-Schiff Reaction, Perjodsäure-Schiff-Färbung
PCM1	- Pericentriolar Material 1
PDGFR	- Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDK1	- Phosphoinositide-Dependent Kinase-1
PI3K	- Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC	- Phospholipase C
PRC2	- Polycomb Repressive Complex 2
Pro	- Prolin
PTPN11	- Tyrosine-Protein Phosphatase Non-Receptor Type 11

Pts - Patients  
PWWP(domain)- PWWP Domäne (Pro-Trp-Trp-Pro motif)

## **R**

RA - Refraktäre Anämie  
RARS - Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten  
RAS - Rat Sarcoma  
Ras-MAPK - Rat Sarcoma - Mitogen-Activated Protein  
RAEB - Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss  
RAEB-T - Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss in Transformation  
RAF - Rapidly Accelerated Fibrosarcoma  
RALD - RAS-Associated Autoimmune Leukoproliferative Disease  
RARS-T - Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten und Thrombozytose  
RCMD - Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien  
RNA - Ribonukleinsäure  
RN - Refraktäre Neutropenie  
ROS - Reactive Oxygen Species, Radikale Sauerstoffspezies  
RS - Ringsideroblasten  
RT - Refraktäre Thrombozytopenie  
RTK - Rezeptor-Tyrosinkinase  
RUNX1 - Runt-Related Transcription Factor 1  
RQ-PCR - Real-time Quantitative PCR

## **S**

SAM - S-Adenosyl-L-Methionin  
SAMD9 - Sterile Alpha Motif Domain Containing 9  
SAMD9L - Sterile Alpha Motif Domain Containing 9 Like  
sAML - Sekundäre Akute Myeloische Leukämie  
SCT - Stem Cell Transplantation  
SD - Schilddrüse  
SET-Domäne - Su (Var)3-9, Enhancer-of-Zeste, Trithorax- Domäne  
SF3B1 - Splicing Factor Subunit 1  
SH2-Domäne - Src-Homology- 2 (SH2) Domäne  
SHC - Src Homology 2 Containing Protein  
SHIP - Src Homology 2 Domain Containing Inositol Polyphosphate 5- Phosphatase 1  
SHP2 - Src Homology Region 2 (SH2)-Containing Protein Tyrosine Phosphatase 2  
SLE - Systemischer Lupus Erythematoses  
snRNP - Small Nuclear Ribonucleo Proteins  
SOS - Son of Sevenless  
SPSS - Statistical Package for the Social Sciences  
Src - Sarcoma  
SRSF2 - Serine and Arginine Rich Splicing Factor 2  
STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription  
STIKO - Ständige Impfkommission  
STK-1 - Stem Cell Tyrosine Kinase 1  
SUV39H1 - Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1

## **T**

TAD1 - Transaktivierungsdomäne 1  
T-ALL - T-Zell Akute Lymphatische Leukämie  
TET2 - Tet-Methylcytosin Dioxygenase 2  
TF - Transkriptionsfaktor  
TKB - Tyrosine Kinase Binding  
TKD - Tyrosine Kinase Domain  
TP 53 - Tumorprotein p53  
TU - Tumor

## U

- U2AF1 - U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1
- Ub - Ubiquitin
- UKD - Universitätsklinikum Düsseldorf
- Unabh. - Unabhängig
- UV - Ultraviolettstrahlung
- ÜZ/ ÜLZ - Überlebenszeit

## V

- VPA - Valproic acid

## W

- w - Weiblich
- WHO - World Health Organization
- WPSS - WHO Classification-Based Prognostic Scoring System
- WT - Wildtyp

## X

- $\chi^2$  - Chi-Quadrat

## Z

- ZRSR2 - Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif and Serine/Arginine Rich 2

### III Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	MDS.....	1
1.2	Molekulargenetische Veränderungen (Biomarker) bei MDS.....	10
1.3	Komorbiditäten bei MDS.....	30
1.4	Ziel der Arbeit - Fragestellung.....	30
2	Material und Methoden .....	31
2.1	Patienten und Datenrecherche.....	31
2.2	Untersuchungsmaterial & Materialanalyse.....	31
2.3	Statistische Methoden .....	34
3	Ergebnisse .....	35
3.1	Patientenkollektiv .....	35
3.2	Prognose.....	44
3.3	Zusammenhang zwischen Komorbiditäten und Biomarkern.....	60
3.4	Multivariate Analyse.....	74
4	Diskussion .....	75
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse & kritische Betrachtung der eigenen Untersuchungsmethoden und Materialien .....	75
4.2	Biomarker .....	77
4.3	Patientenindividuelle Prognoseparameter.....	85
4.4	Klinische Prognoseparameter .....	85
4.5	Biomarker und Komorbiditäten .....	86
4.6	Schlussfolgerung.....	91
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	93
6	Anhang .....	100
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	100
6.2	Tabellenverzeichnis .....	103

# 1 Einleitung

## 1.1 MDS

### 1.1.1 Definition

Myelodysplastische („griechisch, *myelós* = Knochenmark, *dys* = schlecht, *plasein* = bilden“) Syndrome („griechisch, *syndromos* = zusammentreffen“) (Kunkel-Razum et al. 2017) sind eine Gruppe heterogener, erworbener maligner Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle, die durch Dysplasien der Blut- und Knochenmarkszellen, als Folge einer ineffektiven Hämatopoese, in Erscheinung tritt. Bei betroffenen Patienten besteht ein erhöhtes Risiko, eine akute myeloische Leukämie zu entwickeln (Germing et al. 2013).

Der Verlauf dieser Erkrankung ist unterschiedlich: Bei manchen Patienten findet sich für viele Jahre eine milde Verlaufsform in Form einer Anämie, welche meist zufällig beim Hausarzt entdeckt wird, bis hin zu akuten Formen mit raschem Übertritt in eine akute myeloische Leukämie, so bei ca. 40 % aller MDS-Patienten (Pellagatti et al. 2010).

### 1.1.2 Epidemiologie

Die MDS zählen mit einer Inzidenz von 4,15/100.000 Einwohnern und Jahr zu den häufigsten malignen hämatologischen Erkrankungen (Neukirchen et al. 2011). Auch Kinder können, wenn auch sehr selten, von einem myelodysplastischen Syndrom betroffen sein. Ca. 10 Kinder pro Jahr werden in Deutschland neu mit einem MDS diagnostiziert (Reinhardt 2007).

Die Inzidenz der MDS steigt mit dem Alter der Patienten an und beträgt bei über 70-Jährigen bis zu 24,5/100.000/Jahr. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 70 Jahren. Das Geschlecht spielt bei MDS im Kindesalter und jungen Erwachsenenalter keine Rolle, jedoch zeigt sich eine Zunahme der Inzidenz bei Männern ab dem 50. Lebensjahr im Vergleich zu Frauen. Es ist möglich, dass man in der Zukunft aufgrund der steigenden Lebenserwartung in den Industrienationen mehr Patienten mit MDS sehen wird (Germing et al. 2009).

### 1.1.3 Ätiologie

Bislang konnte die Frage nach der Ursache der myelodysplastischen Syndrome nicht ausreichend beantwortet werden. In 5-10% der Fälle spricht man von einem sekundären oder erworbenen MDS und kann die Ursache auf Faktoren wie iatrogen bedingte Radiojodtherapie, Bestrahlung oder Chemotherapie (insbesondere Alkylanzien wie Cyclophosphamid, Ifosfamid oder Dacarbazin) zurückführen. Diese Therapien sind bei anderen Erkrankungen erforderlich und können nach einigen Jahren zu einem therapieassoziierten MDS führen. Die Exposition zu Toxinen wie Benzol, Lösungsmitteln, Haarfärbemitteln, Pestiziden oder Tabakrauch in der Patientenanamnese scheint ein MDS zu begünstigen. In über 90% der Fälle ist keine direkte Ursache zu eruieren. Man spricht von einem idiopathischen, primären oder *de novo* MDS (Aul et al. 1998; Germing et al. 2009).

Verschiedene genetische Erkrankungen, verbunden mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit ein MDS in jungen Jahren zu entwickeln, wie die Fanconi Anämie (FA), bei welcher 2-3% der Patienten ein MDS entwickeln, bzw. 30-40% bis zu einem Alter von 40 Jahren, sind bekannt (Germing et al. 2009). Vielen Patienten wird die Diagnose der FA erst bei Auftreten eines MDS oder einer AML gestellt. Bei FA-Patienten präsentiert sich das MDS meist als RCMD. Zytogenetische Abnormalitäten sind dabei häufig, wie auch Veränderungen des Onkogens RUNX1/AML1. Weitere MDS/AML typische Onkogene und Veränderungen in Tumorsuppressorgen sind bei der FA jedoch spärlich zu finden (Quentin et al. 2011). Andere sekundäre genetisch prädisponierende Erkrankungen sind das Bloom-Syndrom, die Neurofibromatose Typ1, Shwachman-Diamond-Syndrom, Li-Fraumeni-Syndrom oder hämatologische Systemerkrankungen wie die aplastische Anämie oder die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (Haase 2005). Bei Patienten mit einer Dyskeratosis congenita besteht die Möglichkeit, ein MDS zu entwickeln in 1-2% der Fälle (Germing et al. 2009).

#### 1.1.4 Pathophysiologie

Die genaue Pathogenese der MDS ist weiterhin aktueller Gegenstand der Forschung. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei MDS um eine klonale Abnormalität der hämatopoetischen Stammzelle handelt, welche durch fehlerhafte Reifung und unkontrollierte Proliferation in fortgeschrittenen Stadien charakterisiert ist. Die einzelnen Defekte und deren Chronologie sind jedoch noch nicht gut charakterisiert (Germing et al. 2009, 2013). Aktuell ist die Erstellung molekulargenetischer Profile und Beleuchtung der Mikroumgebung sowie immunologischer Prozesse im Fokus der Forschung.

Die Grundlagen der Hypothese einer mehrschrittigen Pathogenese lieferte 1953 Carl O. Nordling. 1971 wurde diese von Alfred G. Knudson weitergeführt, welcher der Frage nachging, wie viele Mutationen mindestens nötig sind, um zu einem Tumorgeschehen zu führen. Es entstand die „*two-hit-hypothesis*“, die Basis der Mehrschrittpathogenese, die u.a. die Grundlage der Genese der MDS darstellt (Knudson 1971, 1996).

HSZ sind im Laufe des Lebens Strahlung, chemischen Noxen, ggf. Zytostatika und durch das Lebensalter bedingt, diversen endogenen Mutationen ausgesetzt. Sie erfahren nach dem Mehrschritt-Pathogenese-Prinzip einen ersten Schaden. Im Krankheitsprozess besteht nun ein MDS in der Frühphase mit gesteigerter Apoptose und daraus resultierenden peripheren Zytopenien unvollständiger Differenzierung gekennzeichnet durch eine dysplastische Hämatopoese (Germing et al. 2009). Welches Ereignis genau zur dysplastischen Veränderung beiträgt, ist nicht bekannt (Haase 2005). Durch die schrittweise Akkumulation von Defekten ist es möglich, dass es zu einem Progress des MDS kommt und der krankhafte Klon dadurch die Hämatopoese dominiert. Die Folge sind schwere Reifungsstörungen, ein Übergang zur verminderten Apoptose und eine Zunahme an Blasten (Germing et al. 2009). Zusammenfassend stellt das MDS eine Erkrankung der alternden Stammzelle dar, da die Blutbildung zu Beginn von mehreren hundert HSC unterhalten wird, welche sich im Verlauf deutlich reduzieren, (MDS-typische) somatische Mutationen anhäufen und ein unklares Potential bzw. den Nährboden zur weiteren malignen Entartung tragen könnten (Müller-Hermelink et al. 2019).

Für die MDS sind zytogenetische Veränderungen in Form eines Verlusts von genetischem Material wie Deletionen typisch, insbesondere del5q-, 7q-, 20q-. Daher ist zu vermuten, dass Tumorsuppressorgenen durch Deletionen oder inaktivierenden Mutationen und dadurch entstehende Haploinsuffizienz eine essentielle Funktion bei der Entstehung der MDS zukommt. Defekte wie Mutationen des RNA-Splicing-Apparates (SF3B1, SRSF2, U2AF1 oder ZRSR2), der Transkriptionsfaktoren (RUNX1, TP53), der Signaltransduktion (NRAS, JAK2) oder epigenetischer Faktoren (TET2, ASXL1, DNMT3A) sind für MDS häufig und gut beschrieben, jedoch nicht spezifisch und tragen wahrscheinlich mit zur leukämischen Transformation bei (Pellagatti et al. 2015). Wahrscheinlich stellen Chromosomenaberrationen ein Ereignis innerhalb der fortgeschrittenen Formen der MDS dar, und submikroskopische Genomveränderungen haben eine Beteiligung an Initiierung und Progress (Bacher 2014).

#### 1.1.5 Klinik

Periphere Zytopenien werden durch eine anfangs gesteigerte intramedulläre Apoptose erklärt. Das hyperzelluläre Knochenmark entsteht durch eine Hyperproliferation der myeloischen Zellen zur Kompensation der vermehrten Apoptose von pathologischen Vorläuferzellen, welche nicht mehr an der physiologischen Blutbildung teilnehmen und zu funktionalen Blutzellen reifen können. Es kommt zu einer verminderten Zellausschwemmung, welche durch die verminderte Retikulozytenzahl im Blut erhärtet werden kann (Bacher 2014). Neben Zytopenien können auch Störungen in der Funktion der Zellen auftreten. Es kommt zu Störungen der Neutrophilenfunktion, welche sich in einer erhöhten Infektanfälligkeit präsentiert. Störungen der Megakaryopoese äußern sich in Thrombozytenaggregationsstörungen mit verlängerter Blutungszeit, was sich bei betroffenen Patienten

in einer vermehrten Blutungsneigung in Form von petechialen Haut- und Schleimhautblutungen, Nasen- und Zahnfleischblutungen bis hin zu Blutungen im Magen-Darm-Trakt oder Hirnblutungen präsentieren kann. Die dysplastische Erythropoese, äußert sich durch eine Anämie mit entsprechenden Symptomen (Haase 2005). Autoimmunerkrankungen sind bei 10-30% der MDS-Patienten vertreten, insbesondere bei CMML-Patienten. Häufig ist eine Vaskulitis, eine seronegative Polyarthritits und die neutrophile Dermatose (Braun et al. 2013; Komrokji et al. 2016).

### **1.1.6 Diagnostik**

Bei den meisten Patienten wird durch Routineuntersuchungen akzidentiell oder aufgrund einer Anämie-Symptomatik ein MDS neu diagnostiziert. Die Anamnese liefert Hinweise auf vorangegangene Therapien und Exposition gegenüber typischen MDS triggernden Substanzen.

Goldstandard ist die Untersuchung des peripheren Blutes und des Knochenmarks inklusive einer Zytogenetik. Die Untersuchung des peripheren Blutes beinhaltet das Anfertigen eines Blutbildes mit Differentialblutbild und Retikulozyten sowie der Bestimmung von LDH, Ferritin und Erythropoetin. Grundlegend ist die zytomorphologische Beurteilung des Blutbildes zur Bestimmung der Anzahl an dysplastischen Zellreihen sowie des Blastenanteils.

Den Mittelpunkt der Diagnostik stellt die zytomorphologische Untersuchung des Knochenmarks dar, gewonnen durch Punktion des Beckenkammes inklusive Peroxidase-, PAS-, Esterase- und Eisenfärbung, um dysplastische Zellreihen zu identifizieren und monozytäre Zellen, Blasten und Ringsideroblasten zu bestimmen. Die histologische Untersuchung des Knochenmarks gibt Hinweise auf die Zellularität und ggf. bestehende fibrotische Umbauten in diesem.

Parallel sollten Erkrankungen, welche einzelne Symptome oder zytomorphologische Zeichen eines MDS imitieren können, ausgeschlossen werden. Dazu gehört der Ausschluss megaloblastärer Anämien, akuter Leukämien, toxischer KM-Schäden, reaktiver KM-Veränderungen, z.B. unter Infektionen und viele weitere mehr (Germinig et al. 2009).

Neben der klassischen Zytogenetik ist aktuell der Einfluss submikroskopischer Genomveränderungen, sogenannter somatischer Mutationen oder Biomarker, zur Unterstützung der Diagnostik und Prognose von wissenschaftlichem Interesse. Diese wurden bereits im Ansatz in die WHO-Klassifikation von 2016 eingeflegt (Bejar et al. 2011; Arber et al. 2016).

### 1.1.7 MDS-Klassifikation

Bei den myelodysplastischen Syndromen wird zwischen primären MDS (90%) mit unklarer Genese und sekundären MDS (10%), welche sich meist als Folge langjähriger Exposition zu Benzol oder vorausgegangener Strahlen- oder Zytostatikatherapie manifestieren, unterschieden.

Die heterogene Gruppe der MDS wurde nach unterschiedlichen Einteilungskriterien und dem sich kontinuierlich erweiternden Wissensstand im Laufe der Zeit in verschiedene Klassifikationen eingeteilt.

#### 1.1.7.1 French-American-British Klassifikation

In den 80er Jahren wurde durch die *French-American & British Cooperative Group* die FAB-Klassifikation der myelodysplastischen Syndrome installiert (Tab.1). Die FAB-Klassifikation ermöglichte trotz vorhandener Subjektivität standardisierte Diagnosen und die Ableitung prognostisch relevanter Informationen. Die Einteilung erfolgte nach der Zytomorphologie der Zellen im peripheren Blut und im Knochenmark. Im Blut stellen die Blastenzahl sowie die absolute Monozytenzahl die Einteilungskriterien dar. Im Knochenmark stellen die Anzahl an Blasten, der Nachweis von Ringsideroblasten und Auer-Stäbchen die Einteilungskriterien dar (Bennett et al. 1982).

FAB-Klassifikation	Blutbildkriterien	Knochenmarkkriterien
RA	≤ 1% Blasten	< 5% Blasten
RARS	≤ 1% Blasten	< 5% Blasten; ≥ 15% Ringsideroblasten
RAEB	< 5% Blasten	5 – 20% Blasten
RAEB-T	≥ 5% Blasten	20 – 30 % Blasten oder Auer-Stäbchen
CMML	< 5% Blasten; >1000 Monozyten/μl	0-20% Blasten

**Tabelle 1: FAB-Klassifikation der MDS (Bennett et al. 1982).**

#### 1.1.7.2 WHO-Klassifikation 2016

Im Jahr 2016 wurde durch die Arbeitsgruppe der WHO die bis dato bestehende WHO-Klassifikation erneut modifiziert.

In dieser werden die MDS wieder in zwei Gruppen unterteilt: in die Gruppe der rein myelodysplastischen Syndrome und in eine Gruppe von gemischt myelodysplastisch-myeloproliferativen Neoplasien (Tab. 2, 3). So wird die chronische myelomonozytäre Leukämie anhand der Häufigkeit der Blasten im peripheren Blut sowie im Knochenmark in drei Untergruppen unterteilt: CMML0, CMML1 und CMML2. Zudem wurden Änderungen der Nomenklatur vorgenommen: RCUD = MDS-SLD (MDS mit single lineage dysplasia), RCMD = MDS-MDL (MDS mit multilineage dysplasia), RAEB = MDS-EB (MDS mit excess blasts).

Zytopenien werden durch Angabe der Anzahl und exakteren Definition stärker gewichtet.

MDS mit Vorkommen von Ringsideroblasten werden in MDS-RS-SLD und MDS-RS-MLD unterteilt und durch den prozentualen Anteil an Ringsideroblasten (RS) und SF3B1-positivem Mutationsstatus definiert. Eine weitere Veränderung besteht in der Hinzunahme einer möglichen weiteren chromosomalen Aberration bei Patienten mit einem MDS del(5q), außer einer Anomalie des Chromosom 7 betreffend (Arber et al. 2016).



Kategorie	Dysplastische Reihen	Zytopenien <sup>1</sup>	RS-Blasten (% der erythroiden Zellen)	Blasten KM / Blasten PB	Karyotyp
<b>MDS with single lineage dysplasia (MDS-SLD)</b>	1	1 oder 2	<15 % / <5 % <sup>2</sup>	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer-Stäbchen	Alle, außer del(5q) +- 1 andere non-Chr 7 Aberration
<b>MDS with multilineage dysplasia (MDS-MLD)</b>	2 oder 3	1-3	<15 % / <5 % <sup>2</sup>	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer-Stäbchen	Alle, außer del(5q) +- 1 andere non-Chr 7 Aberration
<b>MDS with ring sideroblasts (MDS-RS)</b>					
<b>MDS-RS with single lineage dysplasia (MDS-RS-SLD)</b>	1	1 oder 2	≥15 % / ≥5 % <sup>2</sup>	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer-Stäbchen	Alle, außer del(5q) +- 1 andere non-Chr. 7 Aberration 5q
<b>MDS-RS with multilineage dysplasia (MDS-RS-MLD)</b>	2 oder 3	1-3	≥15 % / ≥5 % <sup>2</sup>	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer-Stäbchen	Alle, außer del(5q) +- 1 andere non-Chr. 7 Aberration
<b>MDS with del(5q)</b>	1-3	1-2	irrelevant	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer-Stäbchen	del(5q) isoliert oder mit 1 anderen non-Chr. 7 Aberration
<b>MDS with excess blasts (MDS-EB)</b>					
<b>MDS-EB1</b>	0-3	1-3	irrelevant	KM 5-9 % oder PB 2-4 %, keine Auer-Stäbchen	irrelevant
<b>MDS-EB2</b>	0-3	1-3	irrelevant	KM 10-19 % oder PB 5-19 % oder Auer-Stäbchen	irrelevant
<b>MDS, unclassifiable (MDS-U)</b>					
<b>with 1 % blood blasts<sup>3</sup></b>	1-3	1-3	irrelevant	KM <5 %, PB =1 %, keine Auer-Stäbchen	irrelevant
<b>with single lineage dysplasia and pancytopenia</b>	1	3	irrelevant	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer-Stäbchen	irrelevant
<b>based on defining cytogenetic abnormality</b>	0	1-3	<15 % <sup>4</sup>	KM <5 %, PB <1 %, keine Auer-Stäbchen	MDS-definierende Abnormalität

**Tabelle 2: WHO-Klassifikation (2016) myelodysplastischer Neoplasien.**

<sup>1</sup>Zytopenien definiert als Hämoglobin <10 g/dl, Thrombozyten <100 x 10<sup>9</sup>/L, ANC <1.8 x 10<sup>9</sup>/L

<sup>2</sup>Bei bestehender SF3B1 Mutation

<sup>3</sup>1 % periphere Blasten müssen zu 2 verschiedenen Zeitpunkten beurteilt worden sein.

<sup>4</sup>In Fällen mit ≥15 % Ringsideroblasten besteht per Definition eine signifikante Dyserythropoese. Diese sind aufgrund dessen als MDS-RS-SLD zu klassifizieren.

Typ	Blut	KM
CMML 0	<2 % Blasten Uni- oder Bizytopenie Monozyten >1000/ $\mu$ l, Monozyten >10 % der Leukozytenzahl, keine Auerstäbchen	<5 % Blasten, Dysplasien in >10 % der Zellen in 1-3 Reihen, keine Auerstäbchen kein BCR-ABL, PDGFR a oder b, FGFR1, PCM1-JAK2
CMML 1	<5 % Blasten Uni- oder Bizytopenie Monozyten >1000/ $\mu$ l, Monozyten >10 % der Leukozytenzahl, keine Auerstäbchen	<10 % Blasten, Dysplasien in >10 % der Zellen in 1-3 Reihen, keine Auerstäbchen kein BCR-ABL, PDGFR a oder b, FGFR1, PCM1-JAK2
CMML 2	<20 % Blasten Uni- oder Bizytopenie Monozyten >1000/ $\mu$ l Auerstäbchen möglich	<20 % Blasten, Dysplasien in >10 % der Zellen in 1-3 Reihen, Auerstäbchen möglich kein BCR-ABL, PDGFR a oder b, FGFR1, PCM1-JAK2
MDS/MPN mit Ringsideroblasten und Thrombozytose (RARS-T)	$\leq$ 1 % Blasten Zytopenie(n), Thrombozyten >450.000/ $\mu$ l	<5 % Blasten, >15 % Ringsideroblasten innerhalb der Erythropoiese, Dyplasien in >10 % der Zellen in 1-3 Reihen, keine Auerstäbchen, oft JAK-2 und SF3B1 Mutationen

**Tabelle 3: WHO-Klassifikation (2016) myelodysplastisch/ myeloproliferativer Neoplasien.**

Zur Übersicht und zum besseren Verständnis der in der Arbeit verwendeten Klassifikationen dient Tabelle 4.

FAB	WHO 2016
RA	MDS-SLD
	MDS-MLD
	MDS del(5q)
	MDS-U
RARS	MDS RS SLD
	MDS RS MLD
RAEB	MDS EB1
	MDS EB2
RAEB-T	AML
CMML	CMML0
	CMML1
	CMML2
	MDS / MPN

**Tabelle 4: Übersicht der verschiedenen MDS-Klassifikationssysteme.**

## 1.1.8 Prognose

Die Prognose bei Patienten mit MDS ist häufig trotz ähnlicher klinischer wie genetischer Grundvoraussetzungen sehr heterogen.

Patientenbezogene Faktoren wie Alter, Komorbiditäten und Geschlecht gehen genauso in die Prognose mit ein wie krankheitsbiologische.

Mit dem WPSS, IPSS und IPSS-R sind drei validierte Instrumentarien entwickelt worden, um das individuelle Risiko des Patienten einzustufen und entsprechende Therapiemaßnahmen ableiten zu können (Germing et al. 2013; Greenberg et al. 1997).

Aktuell liegen vor allem molekulargenetische Faktoren im Fokus der MDS-Forschung, welche die Prognose der Patienten womöglich beeinflussen und ggf. therapeutische Wegfindungen ableiten lassen.

### 1.1.8.1 Das internationale Prognostic Scoring System (IPSS)

Das internationale Prognostic Scoring System (IPSS) wurde 1997 veröffentlicht und dient der Risikostratifikation im klinischen Alltag sowie als Grundlage für die Erstellung homogener Patientengruppen, so z.B. in klinischen Studien (Greenberg et al. 1997).

Score	0	0,5	1	1,5	2
Blasten KM %	<5	5-10	-	11-20	21-30
Karyotyp	günstig	intermediär	schlecht	-	-
Anzahl Zytopenien	0-1	2-3	-	-	-

**Tabelle 5: International Prognostic Scoring System (Greenberg et al. 1997).**

Karyotypen: günstig: normal, -Y, del(5q), del(20q); schlecht: komplex ( $\geq 3$  Anomalien) oder Aberrationen auf Chromosom 7; intermediär: andere.

Zytopenien: Hämoglobin <10 g/dl, ANC <1,8 /nl, Thrombozyten <100/nl.

Score	Risikogruppe	Mediane Überlebenszeit (J)	Zeit bis AML Transformation (J)
0	niedrig	5,7	9,4
0,5-1	intermediär 1	3,5	3,3
1,5-2	intermediär 2	1,2	1,1
$\geq 2,5$	hoch	0,4	0,2

**Tabelle 6: International Prognostic Scoring System - IPSS-prognostic risk categories and clinical outcomes (Greenberg et al. 1997).**

### 1.1.8.2 Das Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R)

Im Jahr 2012 wurde der aktuellste Prognose-Score für MDS-Patienten veröffentlicht: das *Revised International Prognostic Scoring System* (Tab.7) (Greenberg et al. 2012). Zytogenetische Befunde wurden schwerer gewichtet. Es wurden Subgruppen der Zytogenetiken erstellt, welche sich in Gesamtüberleben und im Risiko des Übergangs in eine AML unterscheiden (Schanz et al. 2012). Des Weiteren wurde eine genauere Abstufung des Blastenanteils im Knochenmark und der Zytopenien im peripheren Blut integriert.

Score	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Karyotyp	sehr günstig	-	günstig	-	Intermediär	schlecht	sehr schlecht
Blasten %	≤2	-	>2-<5	-	5-10	>10	-
Hb g/dl	≥10	-	8-<10	<8	-	-	-
Thrombozyten (/μl)	≥100	50-≤100	<50	-	-	-	-
Neutrophile (/μl)	>0,8	<0,8	-	-	-	-	-

**Tabelle 7: International Prognostic Scoring System Revised (Greenberg et al. 2012).**

Es bestehen fünf zytogenetische Risikogruppen. Die erste Risikogruppe „sehr günstig“ beinhaltet als Einzelaberration eine del(11q) und -Y. In der günstigen Risikogruppe befindet sich der normale Karyotyp, del(20q), del(5q), del(12p) allein oder mit einer anderen Anomalie. In der intermediären Risikogruppe befindet sich als Einzelanomalie eine del(7q), +8, i(17q), +19 sowie jede andere Einzel- oder Doppelanomalie. In der schlechten zytogenetischen Risikogruppe finden sich 3q-Anomalien, -7, sowie Doppelanomalien inkl. -7/7q bis hin zu max. drei Anomalien. Die sehr schlechte Risikogruppe stellen die komplexen Karyotypen mit mehr als drei Anomalien dar (Schanz et al. 2012). Tabelle 8 gibt das mediane Überleben und die Zeit bis zum Leukämieübergang anhand der erhobenen Scoring-Punkte nach IPSS-R wieder.

Score	Risikogruppe	Medianes Überleben (J)	Zeit bis zur AML-Transformation (J)
0-1,5	sehr niedrig	8,8	nicht erreicht
1,5-3	niedrig	5,3	10,8
>3-4,5	intermediär	3	3,2
4,5-6	hoch	1,6	1,4
>6	sehr hoch	0,8	0,7

**Tabelle 8: Medianes Überleben und Zeit bis zum Leukämieübergang nach IPSS-R Risikostratifizierung (Greenberg et al. 2012).**

Aktuell sind nur chromosomale Aberrationen Bestandteil von Prognose-Scoring-Systemen innerhalb der MDS. Bei Patienten mit CMML besteht bereits ein Scoring-System, welches Biomarker inkludiert. Der *CPSS-molecular (CPSS-Mol)*. Dies hilft die Aussagekraft des Scorings zu verbessern und Therapien individueller ableiten zu können (Elena et al. 2016). Um molekularbiologische Veränderungen weiterhin entsprechenden Scoring-Systemen zuzuführen und um das Verständnis zur Pathogenese der MDS weiter auszubauen, bedarf es weiterer Forschung. Eine gute Grundlage dafür wurde bereits geschaffen und viele Veröffentlichungen empfehlen bereits die Integration von patientenindividuellen molekularbiologischen Landkarten in Prognose-Systeme sowie zur Diagnostik und um individuell angepasste Therapiestrategien ableiten zu können (Tremblay et al. 2018; Kobbe et al. 2019). In den kommenden 5-10 Jahren wird sicherlich eine weitere Integration von Biomarkern erfolgen, um weitere zielgerichtete Therapien für myelodysplastische Erkrankungen ableiten und anbieten zu können.

### 1.1.9 Therapie

Die Behandlung von Patienten mit myelodysplastischen Syndromen erfolgt nach einem Algorithmus, welcher die Patienten in die zwei Subgruppen Niedrigrisiko- und Hochrisiko-MDS unterteilt. Es besteht die Empfehlung, Patienten zur bestmöglichen Therapie in Studien zu behandeln, sofern keine Standardtherapien zur Verfügung stehen. Ziel einer Behandlung ist der Erhalt der Lebensqualität durch Linderung der Symptome sowie ein Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen. Die einzige kurative Therapieoption ist die allogene Stammzelltransplantation für Hochrisikopatienten (Germing et al. 2013; Hofmann et al. 2015).

Bei Patienten mit asymptomatischen Zytopenien ist eine „*watch and wait*“ Strategie der entsprechende Therapiefad. Sobald bei einem Patienten Lebensqualität einschränkende Symptome auftreten, stellt die **supportive Therapie** den wichtigsten Pfeiler der Therapie dar. Diese beinhaltet die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten sowie die Transfusion von Thrombozyten. Bei schweren Thrombozytopenien können  $\epsilon$ -Aminocarbonsäure-Derivate wie beispielsweise Tranexamsäure verwendet werden. Agonisten des Thrombopoetin-Rezeptors (Romiplostim, Eltrombopag) sind aktuell in klinischer Erprobung. Antibiotika sollten im Falle von Infektionen großzügig erfolgen, besonders bei neutropenen Patienten. Eine generelle Antibiotika-Prophylaxe wird nicht empfohlen. Nach STIKO ist die Impfung gegen Influenza sowie die Impfung gegen Pneumokokken ab dem 65. Lebensjahr zu empfehlen. Obligat ist die adäquate Behandlung von Komorbiditäten.

Auch hämatopoetische Wachstumsfaktoren sind Bestandteil der supportiven Therapie. G-CSF, der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor, findet bei schwerer Neutropenie Verwendung. Die Gabe von Erythropoetin erfolgt nach dem „*Nordic Score*“, ein Instrument für die Ansprechwahrscheinlichkeit. Um eine sekundäre Hämochromatose mit der potentiellen Folge einer Kardiomyopathie oder Hepatopathie zu vermeiden, ist die Gabe von Eisenchelatoren wie Deferasirox oder Deferoxamin bei Patienten mit einem Serum-Ferritinspiegel von  $>1000\text{ng/ml}$  bzw. bei absehbarer langfristiger Transfusionsbedürftigkeit möglich (Germing et al. 2013; Hofmann et al. 2015).

Die **immunsuppressive Therapie** mit z.B. Antithymozytenglobulin kann für Patienten mit hypozellulärem Knochenmark, IPSS low und intermediate-1 sowie für Patienten mit geringer Transfusionsbedürftigkeit in Erwägung gezogen werden (Hofmann et al. 2015).

Valproinsäure als **Histon-Deacetylase-Inhibitor** führt bei bis zu 50% der behandelten Niedrigrisiko-MDS-Patienten zu einem Ansprechen der Erythropoese. Valproinsäure (Valproic Acid, VPA) führt zur Ablösung der DNA von Histonen und somit zu einer Freilegung von DNA-Abschnitten, welche wieder abgelesen und somit Gene wieder aktiviert werden können (Bacher 2014).

**Immunmodulatorische Substanzen** wie Lenalidomid als Thalidomidabkömmling führen bei Patienten mit isolierter  $\text{del}(5q)$  und Transfusionsabhängigkeit mit IPSS-Risiko low oder intermediate-1 in 60% zu einer Transfusionsunabhängigkeit (Bacher 2014). Bei gleichzeitigem Vorliegen einer TP53-Mutation sollte diese regelmäßig kontrolliert werden, um ein klonales Fortschreiten frühzeitig erkennen zu können (Hofmann et al. 2015).

Bei der **Therapie der Hochrisiko-MDS** Patienten (IPSS int-2 und high) sollte die Option einer allogenen Stammzelltransplantation geprüft werden. Neben einer supportiven Therapie kommt eine Chemotherapie oder eine epigenetische Therapie in Betracht (Germing et al. 2013).

Eine intensive **Chemotherapie** außerhalb einer geplanten SCT ist aktuell keine etablierte Therapieoption für Hochrisiko-MDS-Patienten mehr, da sich mit der epigenetischen Therapie wesentliche Erfolge erzielen lassen (Bacher 2014).

Aufgrund einer Hypermethylierung der DNA bei MDS-Patienten wurde Azacitidin als **epigenetisches Therapeutikum** bei ungünstigem Risikoprofil zugelassen. Der Wirkmechanismus ist über eine Hemmung der DNA-Methyltransferase zu erklären, was zu einer Demethylierung von Genen führt, welche daraufhin wieder aktiv exprimiert werden können (Bacher 2014). Die Hemmung der DNA-Methylierung ist ein langsam zunehmender Vorgang, aufgrund dessen eine größere Wirksamkeit mit

steigender Anzahl an Applikationen zu verzeichnen ist. Dies ist der Grund weshalb mindestens sechs Zyklen verabreicht werden sollten. Zudem wirkt Azacitidin als Pyrimidin-Analogon direkt zytotoxisch auf proliferierende Zellen. Behandelt werden können MDS-Patienten mit intermediate-2- oder high-risk nach IPSS sowie Patienten mit einer CMML mit <13.000/µl Leukozyten. 50% der Patienten sprechen auf die Behandlung an. Bei einem Wirkungsverlust kann auf Decitabin umgestellt werden. Bislang sind in Deutschland nur Eisenchelatoren, Epoetin- $\alpha$ , Lenalidomid und Azacitidin zugelassen (Hofmann et al. 2015).

## 1.2 Molekulargenetische Veränderungen (Biomarker) bei MDS

Zytogenetische Aberrationen lassen sich in nur 50%-60% aller MDS-Patienten nachweisen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch Veränderungen auf Genebene eine Funktion in der Pathogenese der myelodysplastischen Syndrome übernehmen. Punktmutationen scheinen zur Initiierung und Progression dieser Erkrankung beizutragen und zytogenetisch sichtbare Karyotyp Anomalien sich erst im späteren Verlauf der Pathogenese der MDS zu präsentieren (Bacher 2014). Bejar et al. beschrieben 2011 in einer grundlegenden Arbeit Punktmutationen in verschiedenen Genen, welche teils klinischen, diagnostischen und prognostischen Parametern der MDS zugeordnet werden konnten (Bejar et al. 2011).

In einer Arbeit von Kulasekararaj et al. aus dem Jahr 2013 wurde ein Überblick über die häufigsten mutierten Gene bei MDS gegeben (Kulasekararaj et al. 2013a). Gene, welche die Signaltransduktion, Transkriptionsfaktoren oder Bestandteile von Spleißosomen betreffen sowie Gene, welche in die epigenetische Modifikation involviert sind, sind am häufigsten betroffen (Tabelle 9).

Kategorie nach Funktion	Gen	Chrom. Lokalisation	Häufigkeit	Prognose	Klinische Bedeutung
DNA-Methylierung	TET2	4q24	15-27%	unklar	häufig bei CMML
	IDH1	2q34	5-10%	unklar	nicht mit TET2 Mut.
	IDH2	15q26	5-10%	unklar	mit norm. Karyotyp ass.
	DNMT3A	2p23	3-13%	schlecht	mit AML Übergang ass.
Histon-Modifikatoren	ASXL1	20q11	10-21%	schlecht	↑Blasten, ↑AML Risiko
	EZH2	7q36	6-8%	schlecht	↓Prog. bei low-risk MDS
Transkriptionsfaktoren	TP53	17p13	5-10%	schlecht	ass. komplexen Karyotyp
	RUNX1	21q22	10-20%	schlecht	↓Thromb., ↑AML Risiko
	ETV6	12p13	1-3%	schlecht	
Splicingfaktoren	SF3B1	2q33	10-20%	günstig	oft bei RARS/ RARS-T
	SRSF2	25q27	10-13%	schlecht	häufig bei CMML
	ZRSR2	Xp22	3-11%	schlecht	ass. TET2, ↓ Neutroph.
	U2AF1	21q22	5-12%	schlecht	oft high-risk MDS, del20q
Signaltransduktion	NRAS	1p13	6-17%	schlecht	oft bei CMML, ↑ Risiko für leukämische Transf.
	KRAS	12p12	2%	unklar	
	JAK2	9p24	<5%	unklar	häufig bei RARS-T, CMML
	FLT3	13q21	1-3%	unklar	oft bei MDS-AML Überg.
	CBL	11q23	1-3%	unklar	häufig bei CMML

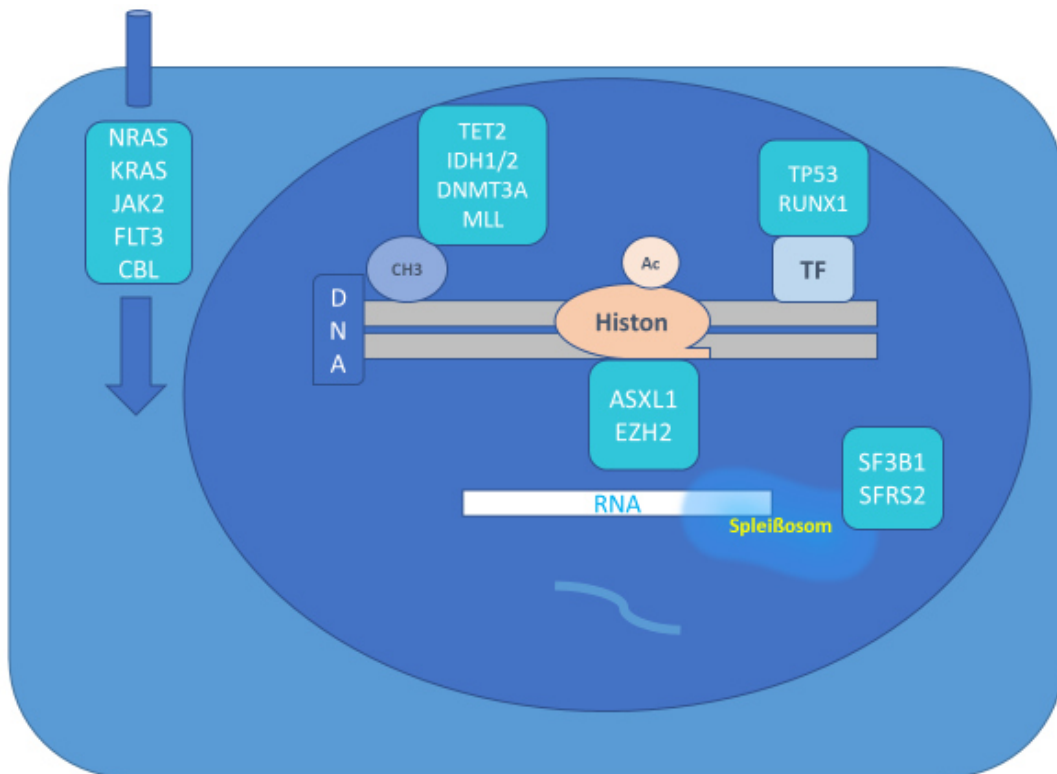
**Tabelle 9: Häufige Genmutationen der myelodysplastischen Syndrome, adaptiert nach (Kulasekararaj et al. 2013a)(Haider et al. 2017).**

Kinder leiden im Gegensatz zu Erwachsenen sehr selten an MDS und haben insgesamt eine schlechte Prognose. Es können somatische wie auch Keimbahnmutationen zur Entstehung beitragen. Die bei Erwachsenen typischen somatischen Mutationen sind bei Kindern selten.

Keimbahn- sowie somatische Mutationen des Ras-MAPK Signalwegs (insbesondere PTPN11 und NRAS) sind bei Kindern häufig und eher bei Patienten mit einer fortgeschritteneren Erkrankung wie der RAEB zu finden. Mutationen der *RNA-Splicing* Maschinerie sind selten. Keimbahnmutationen der Tumorsuppressorgene SAMD9 oder SAMD9L des Chromosom 7 sind ebenfalls häufig und assoziiert mit Deletionen des Chromosom 7.

Insgesamt handelt es sich bei MDS im Kindes- und Erwachsenenalter um zwei eigenständige Erkrankungen, welche sich nicht nur durch eine jeweils eigene Pathogenese, sondern auch durch unterschiedliche Klinik und Morphologie (hypozelluläres KM bei Kindern) präsentieren (Schwartz et al. 2017).

Die Gene des angefertigten Panels verteilen sich auf die verschiedensten Zellkompartimente. Einen Überblick gibt Abbildung 1.



**Abbildung 1: Überblick über das in vorliegender Arbeit angefertigte Gen-Panel innerhalb der Zelle. CH3= Methylgruppe, Ac= Acetylgruppe, TF= Transkriptionsfaktor.**

### 1.2.1 Epigenetik & Krebs

Epigenetik beschreibt die Vererbung von Merkmalen bzw. reversiblen biochemischen Modifikationen, die nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz bedingt sind. Die verschiedenen epigenetischen Veränderungen haben Einfluss auf den Phänotyp, nicht aber auf die DNA-Sequenz. Epigenetische Mechanismen regulieren alle biologischen Prozesse von der Konzeption (*Imprinting* oder X-Inaktivierung) bis zum Tod. Diese epigenetischen Modifikationen steuern die Differenzierung von Zellen, indem durch bestimmte Methylierungsmuster in Zellreihen spezifische Gene aktiviert bzw. inaktiviert werden und sich Zellen trotz gleicher DNA zu uniformen gewebetypischen Zellen entwickeln können. Epigenetische Veränderungen können langfristige Wirkungen haben, zum Beispiel beim Lernen oder bei der Gedächtnisbildung. Sie können reversibel sein, wo epigenetische Therapien wie Azacitidin ansetzen.

Einige Erkrankungen sind epigenetischen Ursprungs, z.B. das Fragile X-, Prader-Willi- und das Angelman-Syndrom oder sie unterstützen die Entstehung von Krebserkrankungen sowie Erkrankungen aus dem psychiatrischen Formenkreis.

Die Hauptmechanismen der Epigenetik sind die direkte DNA-Methylierung, die Modifikation der Histone und die Beteiligung nicht kodierender-RNA, welche die Genexpression verändern (Delcuve et al. 2009; Lim et al. 2010).

Epigenetische Veränderungen sind häufig in Krebszellen zu finden (Lim et al. 2010).

Das Genom von Tumorzellen ist meist hypomethyliert bei hypermethylierten Promotorregionen (Dawson et al. 2012). Diese Hypomethylierungen erhöhen die genetische Instabilität. Hypermethylierungen der Promotoren von Tumorsuppressorgenen führen zu einer Stilllegung (*Silencing*) des entsprechenden Gens bzw. verändern dessen Proteinprodukte. Zudem ist hypermethyliertes Cytosin eine instabile Base, welche zu Mutationen prädisponiert, da sie häufig deaminiert und in die Base Thymin konvertiert (Lim et al. 2010; Feinberg et al. 1983).

Aberrante DNA-Hypermethylierung findet sich vor allem bei MDS-Formen, die bereits eine Blastenvermehrung aufweisen, was einen wichtigen Schritt in der Pathogenese der AML vermuten lässt (Bacher 2014). Hypermethylierungen stellen den Angriffspunkt demethylierender Substanzen wie Decitabin und 5-Azacitidin dar, indem sie DNA-Methyltransferasen hemmen und die stumm geschalteten Gene wieder ablesbar machen (Lim et al. 2010).

### 1.2.2 DNA-Methylierung

Die Methylierung der DNA – eine biochemische Modifikation – ist ein wichtiger epigenetischer Mechanismus. Eine Methylgruppe wird durch DNA-Methyltransferasen kovalent an das 5'-C-Atom des Cytosins eines 5'-CpG-3' Dinukleotides gebunden. CpG bedeutet, dass Cytosin über ein Phosphat an ein Guanin innerhalb der DNA-Sequenz gebunden ist.

Die meisten CpG-Dinukleotide im humanen Genom sind methyliert. Unmethylierte CpG-Regionen findet man hauptsächlich in Promotorregionen, welche der Steuerung der Transkription des jeweiligen Gens dienen.

Aufgrund der Gegebenheit, dass die CpG-Inseln der sogenannten *housekeeping-genes* hauptsächlich unmethyliert vorliegen und dass die Methylierung von CpG-Inseln in Krebszellen dazu führt, dass die Genexpression reprimiert wird, führte zu der Annahme, dass der DNA-Methylierung eine wichtige Rolle bei der Genregulation zukommt. Meistens führt die Methylierung zum Verlust der Genexpression durch Kondensierung der Chromatinstruktur.

Damit Gene transkribiert werden können, müssen sie für Transkriptionsfaktoren zugänglich sein, was durch eine Methylierung verhindert wird. Zusätzlich werden Proteine aktiviert, welche an die methylierten Abschnitte binden und sog. Repressorkomplexe rekrutieren, welche zu einer Modifikation der Histone führen. Diese Modifikation führt weiterhin zu einer erhöhten Kondensierung der DNA (Heterochromatin) und macht ein Abschreiben der Gene unmöglich (Lim et al. 2010).

In vorliegender Arbeit wurden das TET2-, IDH1- & IDH2- sowie das DNMT3A-Gen mit Einfluss auf die DNA-Methylierung untersucht.



### 1.2.2.1 TET2-Gen (Ten-Eleven-Translocation2-Gen)

Das TET2-Gen und sein Produkt sind grundlegende epigenetische Regulatoren der Hämatopoese. Das TET2-Gen ist in 20% der Patienten mit MDS mutiert und findet sich in noch größerer Häufigkeit (30-69%) bei Patienten mit einer CMML (Gill et al. 2016). Bei anderen myeloischen Neoplasien ist die Häufigkeit deutlich geringer.

Das TET2-Gen befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 4q24. Zur TET-Proteinfamilie gehören die Proteine TET1-3. Innerhalb der TET-Protein-Familie gibt es strukturelle Gemeinsamkeiten. Am c-terminalen Ende befindet sich bei allen drei Proteinen eine katalytisch aktive Dioxygenase-Domäne mit Bindungsstellen für alpha-Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) und zweiwertiges Eisen ( $Fe^{2+}$ ), welche essentiell für die enzymatische Aktivität benötigt werden. Bei den Proteinen TET1 und TET3 sitzt aminoterminal eine CXXC-Domäne, welche der Bindung an unmethyliertes Cytosin in der DNA dient. Dieses findet sich bei TET2 nicht. Es wird vermutet, dass es während der Evolution separiert wurde und als eigenständiges Gen, genannt IDAX (=Cxxc4), die TET2-Aktivität bei direkter Bindung reguliert.

Die Hauptaufgabe der TET-Proteine besteht in der Demethylierung der DNA, einer wichtigen epigenetischen Modifikation. Durch die Demethylierung wird 5-Methylcytosin in 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) überführt. Dieser Schritt ist abhängig von alpha-Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) und zweiwertigem Eisen ( $Fe^{2+}$ ). Der Schlüsselmetabolit 5hmC wird über diverse Schritte in Cytosin überführt (Abbildung 2).

In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass TET2-Mutationen hämatopoetische Stammzellen zu einer erhöhten Selbsterneuerung und Amplifikation der multipotenten Progenitoren befähigten, wodurch TET2 eine Funktion in der Homöostase der hämatopoetischen Stammzelle zugesprochen werden kann.

Aus den Versuchen war abzuleiten, dass es sich bei TET2 um einen Tumorsuppressor handeln könnte und dass dessen Mutationen alleine nicht ausreichen, um das volle Bild einer hämatologischen Erkrankung zu schaffen, sondern es zusätzlicher Mutationen bedarf. Eine weitere Regulation der Gentranskription durch TET2 ist die Modifikation des Chromatins durch Histon2B (H2B) O-GlcNAcylierung oder H3K4-Trimethylierung (Nakajima et al. 2014).

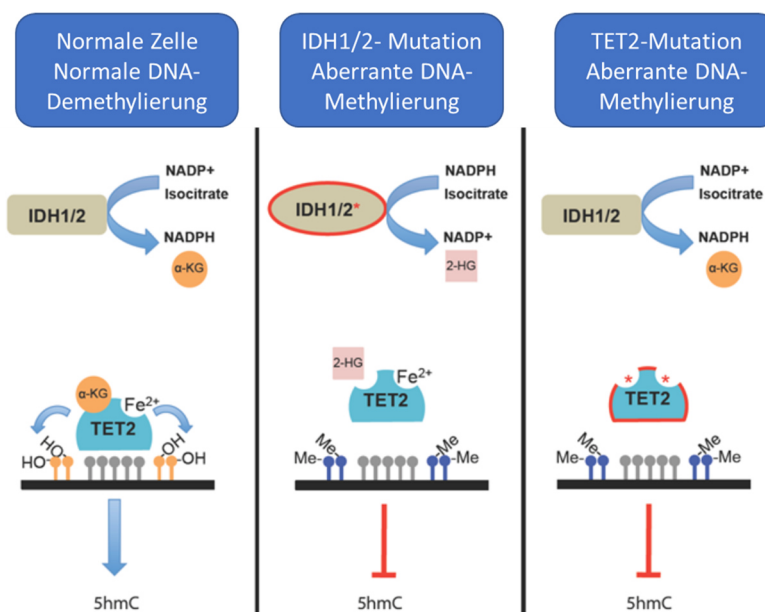


Abbildung 2: Übersicht über die biochemischen Auswirkungen von TET2- und /oder IDH1/2-Mutationen in Bezug auf den Methylierungsstatus der DNA, adaptiert nach (Cimmino et al. 2011). Me = Methylgruppe, OH = Hydroxylgruppe, 5hmC = 5-Hydroxymethylcytosin.

Bei TET2-Mutationen handelt es sich meist um erworbene Deletionen, Missense- und Nonsense-Mutationen, welche innerhalb diverser Differenzierungsreihen, u.a. auch innerhalb CD34<sup>+</sup> Zellen auftraten und somit auf einen frühen Schritt innerhalb der Pathogenese schließen lassen (Langemeijer

et al. 2009). Meist handelt es sich um *Missense-Mutationen* im Bereich der katalytischen Region, aufgrund derer die katalytische Aktivität gestört wird (Cimmino et al. 2011).

Die Funktion von TET2 kann auch indirekt durch Mutationen der Enzyme des Citratzyklus gestört werden. Häufig sind bei diversen hämatologischen Erkrankungen die Isocitratdehydrogenase 1 und 2 (IDH1/2) betroffen. Diese Enzyme katalysieren die Umsetzung von Isocitrat zu alpha-Ketoglutarat, dem essentiellen Kofaktor von TET2. Die meisten Mutationen, die bei diesen Enzymen zu beobachten sind, sind *Gain-of-function-Mutationen*, die dazu führen, dass sich ein neues Onkometabolit bildet: 2-Hydroxyglutarat (2-HG), welches mit alpha-Ketoglutarat um die katalytische Bindestelle kompetiert (Xu et al. 2011). Dies ist ebenfalls in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

### 1.2.2.2 IDH1 & IDH2-Gen (Isocitrat-Dehydrogenase1 & 2-Gen)

Isocitrat-Dehydrogenasen sind Enzyme und essentieller Bestandteil des Citratzyklus. Mutationen des IDH1- oder IDH2-Gens finden sich bei diversen Krebsarten wie den Gliomen (70%), der AML (8%), den MDS und MPN sowie beim Cholangiosarkom oder dem Chondrosarkom. Innerhalb der MDS beträgt der Anteil ca. 4-12% und ist mit einem schlechten Outcome assoziiert (Kulasekararaj et al. 2013a).

Das IDH1-Gen befindet sich auf Chromosom 2 (2q33.3), das IDH2-Gen auf Chromosom 15 (15q26.1) (Pellagatti et al. 2015). Es existieren drei menschliche IDH-Isoenzyme. Punktmutationen, welche einzelne Aminosäuren – zum Beispiel bei IDH1 Arginin 132, bei IDH2 Arginin 172 oder 140 – betreffen, sind häufig. Bei diesen IDH-Mutationen handelt es sich meist um *Gain-of-Function* Mutationen, welche dazu führen, dass vermehrt  $\alpha$ -Ketoglutarat unter Verwendung des Cofaktors NADPH zu dessen Homolog D-2-Hydroxyglutarat überführt wird (Fujii et al. 2016; Kulasekararaj et al. 2013a) (Abbildung 2).

Diese abnormale Produktion des Onkometaboliten 2-HG hemmt die normale Zelldifferenzierung und begünstigt die Krebsentstehung (Fujii et al. 2016) durch eine Hypermethylierung von DNA und Histonen. Enzyme wie TET2 und die Cytochrom-C-Oxidase werden durch 2-HG inhibiert und führen zu Störungen der epigenetischen Regulation (Fujii et al. 2016; Gill et al. 2016). Durch diese epigenetische Modifikation kommt es letztendlich zu einem Differenzierungsblock, welcher zu einer Tumorentstehung sowie –progression führen könnte (Dang et al. 2016).

Zusätzlich bildet mutiertes IDH1 mit dem WT-IDH1 ein Heterodimer, welches dazu führt, dass die ursprüngliche Funktion der IDH herabgesetzt wird und weniger  $\alpha$ -Ketoglutarat gebildet wird. Dieser geringe Spiegel stabilisiert den Hypoxie-induzierten Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), was wiederum die Angiogenese und Krebsentstehung fördert (Fujii et al. 2016).

Ein weiterer ursächlicher Mechanismus könnte die NADPH-Reduktion in der Zelle sein. Alle drei Isoenzyme setzen Isocitrat zu  $\alpha$ -KG in verschiedenen Zellkompartimenten um. IDH1 ist im Zytosol und Peroxisomen lokalisiert, IDH2 und IDH3 in den Mitochondrien. IDH1 und IDH2 verwenden NADP<sup>+</sup> als Kofaktor, IDH3 verwendet NAD<sup>+</sup>. Neben der Bereitstellung von  $\alpha$ -KG für den Citratzyklus, ist eine wichtige Funktion die Erzeugung von NADPH, zusammen mit dem Pentosephosphatweg. NADPH übernimmt durch die Reduktion von Glutathion eine wichtige Funktion in der Abwehr von oxidativem Stress. Diese fehlende Funktion könnte somit zu einer Schädigung der DNA und zu genomischer Instabilität führen (Dang et al. 2016).

### 1.2.2.3 DNMT3A-Gen (DNA-Methyltransferase3-Alpha-Gen)

DNA-Methyltransferasen bestehen aus einer Familie von vier Enzymen: DNMT1, DNMT2, DNMT3A und DNMT3B. DNMT's besitzen wichtige Funktionen bei Prozessen des Imprinting, X-Chromosom Inaktivierung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose.

DNMT3A-Mutationen finden sich in ca. 30-35% bei AML-Patienten mit normalem Karyotyp sowie in ca. 10% bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen und sind dort mit einem verkürzten Gesamtüberleben sowie einem höheren Risiko eines Krankheitsprogresses vergesellschaftet (Gill et al. 2016).

Das DNMT3A-Gen befindet sich auf Chromosom 2p23.2 und besteht aus 26 Exons (*expressed regions*) und 25 Introns (*intragenic regions*), welche zusammen 110kb umfassen. Am häufigsten werden Missense-Mutationen im katalytischen Abschnitt gefunden. Diese führen zu einer Substitution von Arginin 882 durch Histidin, Cystein, Prolin oder Serin und sind in allen MDS Untergruppen zu finden. Letztendlich wird dadurch die Fähigkeit zur Methylierung reduziert (Walter et al. 2011; Larsson et al. 2013).

DNMT3A wird in großer Menge in HSCs, neutrophilen Granulozyten sowie T-Lymphozyten exprimiert, während DNMT3B im Laufe der hämatopoetischen Differenzierung herunterreguliert wird (Gill et al. 2016; Harada 2015).

Die Proteine der DNMT-Familie sind aus verschiedenen Domänen aufgebaut. Man unterscheidet einen regulatorischen und einen katalytischen Abschnitt. DNMT3A besitzt als einzige Isoform eine N-terminale Domäne, welche DNA-Bindungs-kapazität besitzt und in embryonalen Stammzellen mit TF interagieren kann.

Eine PWWP-Domäne besitzt sowohl DNA- als auch Histonbindungspotential. Eine ADD-Domäne bindet die Histondeacetylase1 sowie weitere Histone. Zudem interagiert die ADD-Domäne mit EZH2, welcher letztendlich für die Methylierung von dem Histon H3K27 zuständig ist.

DNMT3A besitzt seine Hauptfunktion in der de-novo Methylierung der DNA. Es katalysiert den Transfer von Methylgruppen in 5' Position von Cytosinresten in der DNA des Menschen und ist für Methylierungsmuster in der Säugetierentwicklung zuständig. Cytosin-Basen werden dann methyliert, wenn sie in 5' Position zu einem Guanosin in einem CpG Dinukleotid lokalisiert sind.

Das Kohlenstoffatom des Cytosins in Position 5 innerhalb der DNA ist wenig reaktionsfreudig, weshalb sich eine Methylierung durch DNMT's als biochemisch aufwendig erweist. Die Reaktion ist vergleichbar mit der der Thymidylat-Synthetase. Über ein Thiolat wird das Enzym kovalent an die Position 6 des Cytosins gebunden. Durch diesen Vorgang werden Elektronen in Position 5 verschoben, was zur Bildung eines Carbanion führt, welches die Methylgruppe des Methylgruppendonors S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) angreift. Nach der Übertragung der Methylgruppe bildet sich durch Entfernung eines Protons in Position 5 eine Doppelbindung zwischen C5 und C6 aus und das Enzym wird durch  $\beta$ -Elimination gelöst (Bestor 2000). Eine schematische Darstellung dieses Vorgangs zeigt Abbildung 3.

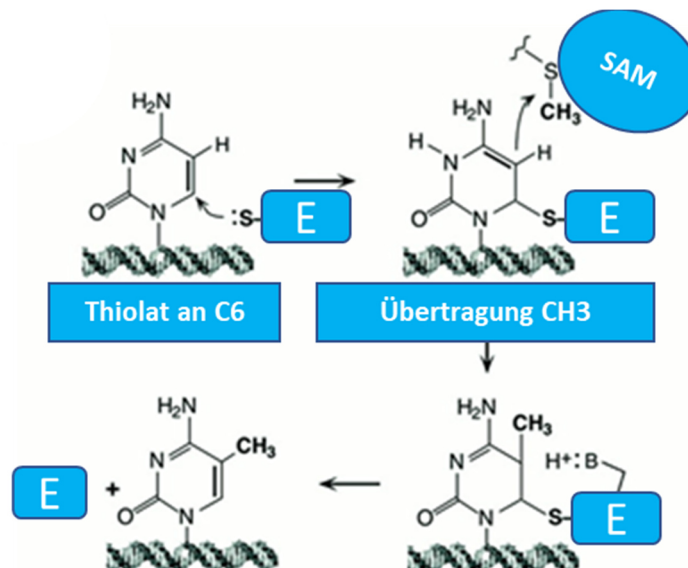


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Methylierung von Cytosin durch DNMT3A, adaptiert nach (Bestor et al. 2000). E = Enzym, SAM = S-Adenosyl-L-Methionin.

### 1.2.3 Histonmodifikation

Um das Genom in eukaryoten Zellen unterzubringen, ist die DNA auf basische Proteine, sog. Histone, gewickelt. Durch Acetylierung von Lysinresten innerhalb der Histone durch Histon-Acetyltransferasen kommt es zur Neutralisierung der positiven Ladung der basischen Lysine. Das Chromatin kann sich lockern und gibt Stellen zur Transkription frei. Dieser Vorgang kann durch Histon-Deacetylasen umgekehrt erfolgen, so dass das Chromatin kompakter wird und die DNA bzw. bestimmte Gene nicht mehr abgeschrieben werden können. Dies stellt die Wirkgrundlage für Histon-Deacetylase-Inhibitoren wie Valproinsäure dar (Kouzarides 2007).

#### 1.2.3.1 ASXL1-Gen (Additional sex combs like 1- Gen)

Das Gen, welches für das ASXL1-Protein kodiert, befindet sich auf Chromosom 20 und ist nach TET2 das am häufigsten mutierte Gen innerhalb der MDS. Das ASXL1-Protein ist zuständig für die Modifikation von Histonen. Mutationen dieses Gens stellen bei den MDS einen Anteil von ca. 20% und sind mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert. Innerhalb der CMML sind ASXL1-Mutationen in bis zu 43% vertreten (Gill et al. 2016).

Das ASXL1-Gen befindet sich in der Nähe zum DNMT3B-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 20 (20q11.21), besteht aus 12 Exons und wird in den meisten hämatopoetischen Zellen exprimiert. Der Mensch besitzt drei homologe ASXL-Proteine: ASXL1, ASXL2 und ASXL3. Diese haben alle eine Funktion in der Genregulation inne und liegen bei menschlichen Tumoren häufig verändert vor. Veränderungen des ASXL1-Proteins sind assoziiert mit MDS, AML, CML, CMML sowie dem Böhring-Opitz-Syndrom.

Das ASXL1-Gen kodiert für ein Protein, welches an Histone bindet und dadurch die Chromatinstruktur und somit letztendlich die Genexpression beeinflusst. Beim Menschen bildet ASXL1 zusammen mit dem Protein BAP1 einen Komplex, welcher zusammen mit einer *polycomb-associated deubiquitinase* (PaD) K119 des Histon H2A deubiquitiniert, welches zu einer Genrepression führt (Gelsi-Boyer et al. 2012) (Abbildung 4).

Bei den meisten Mutationen handelt es sich um Frameshift-, Missense- und Nonsense-Mutationen in Exon 12. In über 50% der Fälle besteht eine Guaninnukleotid-Duplikation (c.1934dupG), welche einen *Frameshift* zur Folge hat (Gelsi-Boyer et al. 2012). Patienten mit einer ASXL1-Mutation, *Frameshift*- oder Punktmutationen exprimieren weniger ASXL1 als Patienten mit dem Wildtyp. Zwischen Patienten mit einer normalen oder verringerten ASXL1-Expression besteht in Bezug auf klinische Parameter kein Unterschied, jedoch konnten bei Patienten mit einer geringen Expression vermehrt IDH1-Mutationen nachgewiesen werden (Thol et al. 2011).

#### 1.2.3.2 EZH2-Gen (Enhancer of zeste homolog 2-Gen)

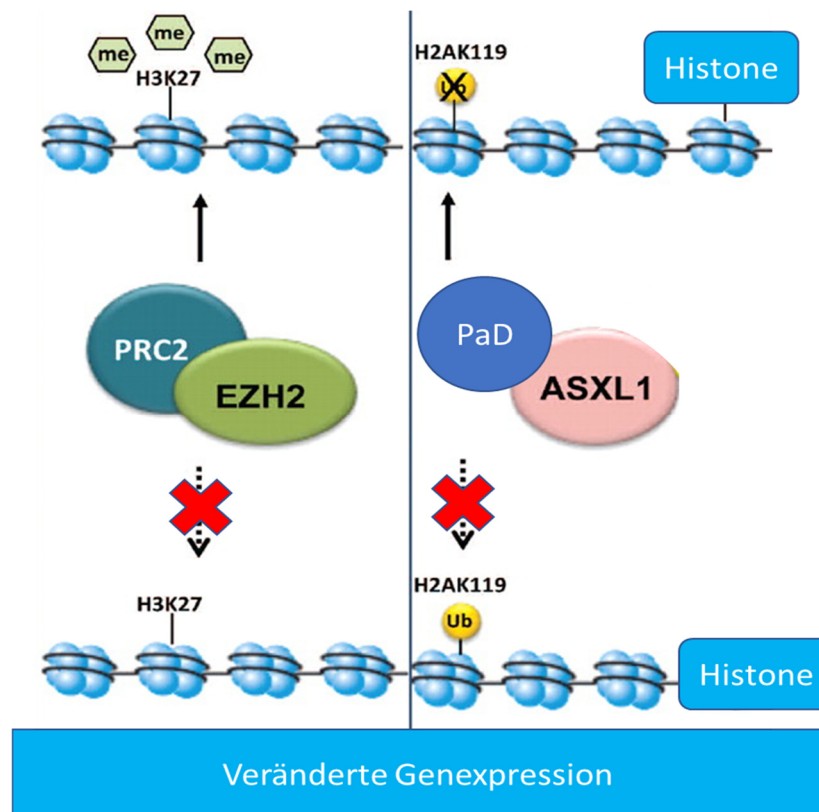
Das *Enhancer of zeste homolog 2-Gen* kodiert für eine Histon-Methyltransferase und ist ebenfalls ein epigenetischer Regulator. Rund 6-8% aller MDS-Patienten weisen Mutationen in diesem Gen auf (Kulasekararaj et al. 2013a).

Das EZH2-Gen befindet sich auf Chromosom 7q36.1 und wird als Tumorsuppressor beschrieben (Pellagatti et al. 2015).

Bei Patienten mit MDS finden sich meist *Missense- oder Truncating-Mutationen* des EZH2-Gens, welche die katalytische SET-Domäne verändern oder eliminieren, wodurch das Histon H3 an Lysin 27 verringert methyliert wird. In einer Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine bialellische Deletion von EZH2 in HSZ eine T-ALL hervorrufen konnte.

Bei dem Produkt des EZH2-Gens handelt es sich um eine Histon-Lysin-N-Methyltransferase, welche das Ziel hat, das Histon H3 an Lysin 27 dreifach zu methylieren (H3K27me3) und dadurch die Transkription durch verstärkte Bildung von Heterochromatin zu reprimieren. Kofaktor ist S-Adenosyl-L-Methionin (Larsson et al. 2013).

Das Produkt des EZH2-Gens bildet gemeinsam mit weiteren Proteinen den *polycomb repressive complex 2 (PRC2)*, wobei die Methyltransferase die katalytische Funktion übernimmt. PRC-Proteine haben eine wichtige Funktion in der Regulation von HOX-Genen, wodurch eine Verbindung zwischen EZH2-Mutationen und der Funktion von HOX-Genen besteht (Larsson et al. 2013). Genauer bedeutet dies, dass eine *Loss-of-Function Mutation* wie bei EZH2 und ASXL1 über diesen Mechanismus die Repression von HOX-Genen verhindern, welche mitverantwortlich sind für Selbsterneuerung und leukämische Progression (Heuser et al. 2018). Bestimmte HOX-Proteine werden bei Patienten mit AML vermehrt exprimiert. Zudem ist die Trimethylierung von H3K27 essentiell für die Bindung von DNMT3A (Larsson et al. 2013) (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Funktion im physiologischen sowie mutierten Zustand der Gene *EZH2* und *ASXL1*, adaptiert nach (Vannucchi et al. 2011). *me*= Methylgruppe, *Ub*= Ubiquitin, *PRC2*= Polycomb Repressive Complex 2, *PaD*= Polycomb-Associated Deubiquitinase.

### 1.2.3.3 MLL-Gen (Mixed Lineage Leukemia-Gen)

Das *Mixed Lineage Leukemia (MLL)*-Gen befindet sich auf Chromosom 11q23 und kodiert für eine Histonmethyltransferase, welche die Transkription verschiedener Gene inkl. HOX-Gene positiv reguliert und somit in die Gruppe der epigenetischen Modifikatoren fällt. Die Auftretenswahrscheinlichkeit bei MDS liegt bei ca. 6-7%, ähnlich zur AML mit 5-10% (Choi et al. 2018).

Die etwas größere Häufigkeit für MLL-PTD in sAML zu MDS mag zwei Ursachen haben: 1. MDS-Patienten mit entsprechender Mutation von Krankheitsbeginn haben durch diese ein größeres Risiko für einen Progress, oder 2. Entsprechende Mutation tritt später im Krankheitsverlauf auf und führt auf dem Boden weitere Mutationen zu einem AML-Übergang. Gesellen sich MLL-PTD oder FLT3-ITD zu einer RUNX1-Mutation hinzu, komme es sehr schnell zu einer leukämischen Transformation (Dicker et al. 2010).

## 1.2.4 Transkriptionsfaktoren

Bei Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Proteine, welche die Übertragung der Information der DNA zu mRNA u.a. durch Aktivierung der RNA-Polymerase mitregulieren (Löffler 2003).

### 1.2.4.1 TP53-Gen (Tumor-Protein p53-Gen)

Tumorsuppressorgene spielen eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation, so zum Beispiel das kernständige Protein p53. Es trägt eine wichtige Funktion im Übergang der G1 zur S-Phase, indem es bei einer Schädigung des Genoms den Übergang in die S-Phase verhindert.

Das *Tumor-Protein p53-Gen* kodiert für ein 2,8 kb langes Transkript und folglich für ein 393 Aminosäuren langes Protein einen Transkriptionsfaktor, welcher aufgrund seiner Masse von 53kDa als p53 bezeichnet wurde und unter physiologischen Umständen schwach exprimiert wird. Aufgrund seiner Funktion in der Zelle bezeichnet man es auch als „Wächter des Genoms“ (Löffler 2003; Ganten et al. 2001). In etwa der Hälfte aller menschlichen Tumore ist *TP53* mutiert (Kim 2015).

Das *TP53*-Tumorsuppressorgen ist auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert, besitzt 11 Exons (Ganten et al. 2001) und kodiert theoretisch neun p53 Isoformen. Möglich ist dies aufgrund alternativen Spleißens von Intron 9 sowie durch die Verwendung eines alternativen Promotors in Intron 4. Alle diese Isoformen werden in normalen Geweben exprimiert, jedoch ist ihr Expressionsmuster in einzelnen Geweben spezifisch, was darauf schließen lässt, dass ihre Expression selektiv reguliert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Tumorentitäten diese Isoformen abnorm exprimiert werden und die Vermutung liegt nahe, dass sie damit zur malignen Transformation beitragen.

Das p53 Protein des Menschen besteht aus 393 Aminosäuren, welche sich in einzelne Abschnitte mit jeweils eigenen Funktionen unterteilen lassen. P53 verfügt N-terminal über zwei Transaktivierungsdomänen TAD1 und TAD2 zur Interaktion mit dem Transkriptionsapparat. Zentral liegt eine spezifische DNA-Bindungsdomäne, in welcher bei menschlichen Tumoren die entsprechenden Mutationen zu finden sind, gefolgt von einer Signalsequenz für die Zellkernlokalisation. C-terminal besteht eine Sequenz mit hauptsächlich basischen Aminosäuren, die eine Oligomerisierung von p53 ermöglicht (Khoury et al. 2010).

Da die Oligomerisierungsdomäne nicht von Mutationen betroffen ist, führt dies dazu, dass mutierte p53 Proteine und Wildtyp p53 Proteine miteinander oligomerisieren können. Die Bindung an die DNA ist dadurch gestört, weshalb bereits die monoallelische Mutation zu einem vollständigen Funktionsverlust von p53 führt (Wagener et al. 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Krebsarten Isoformen exprimieren. Die ungewöhnliche Expression der p53 Isoformen in den verschiedenen Krebstypen Brustkrebs, AML, Kolonkarzinomen oder Kopf-, Halstumoren lassen darauf schließen, dass ebendiese ungleiche Expression die normale p53 Reaktion stört und eine Tumortransformation begünstigen könnte.

Bei Patienten mit AML konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine untypische Expression von p53 Isoformen vorliegen kann. Eine Veränderung der Expression von p53 Proteinen wurde ein paar Stunden nach einer Chemotherapie verzeichnet. Bei Patienten, welche nicht auf eine Chemotherapie ansprachen, blieb die Zusammensetzung an p53 Isoformen konstant (Khoury et al. 2010).

P53 erfüllt als Tumorsuppressor die Funktion als „Wächter des Genoms“, welche durch direkte Mutationen oder Störungen des Signaltransduktionswegs inaktiviert werden kann und häufig in Tumorzellen zu finden ist (Oren 2003). Seine physiologische Funktion besteht darin, auf Zellstress zu reagieren und zu vermeiden, dass sich genetisch geschädigte Zellen weiter verdoppeln, wodurch eine Krebsentstehung verhindert wird. P53 wird abhängig vom Gewebe und Ausmaß des Schadens aktiviert und leitet entsprechende Zellantworten wie Zellzyklusarrest oder Apoptose durch Regulation der Genexpression ein (Vousden et al. 2007). Dies veranschaulicht Abbildung 5.

Diverse intrinsische und extrinsische Stresssignale sind in der Lage, die Signalkette zu aktivieren. Ein Aktivierungssignal ist die chemische oder physikalische Schädigung der DNA durch ROS, UV-Strahlung, Gammastrahlung, *DNA-cross-linking* oder Depurination. Zudem kann Hypoxie, Schädigungen des Spindelapparates oder NO, welches gehäuft bei Infektionen und Entzündungen anfällt, Hitze- oder Kälteschocks oder Substratmangel über Mediatoren zu einer Aktivierung des p53 führen. Als Reaktion auf diese Aktivierungssignale wird die Konzentration an p53 intrazellulär erhöht.

Aktiviertes p53 ist nun in der Lage, an entsprechende p53 responsive DNA-Elemente zu binden und notwendige Gene zu aktivieren. Die aktivierten Gene können ihrer Funktion nach in verschiedene Kategorien einsortiert werden. Einige Gene führen zum Zellzyklusarrest, andere über intrinsische oder extrinsische Aktivierung zur Apoptose. Zudem kommt es zur Aktivierung von Genen, welche für DNA-Reparatur, Hemmung der Angiogenese und Metastasierung, Hemmung des m-TOR Signalweges oder für die negative p53 Rückkopplung verantwortlich sind (Levine et al. 2006).

Die Inaktivierung von p53 ist ein häufiges Vorkommnis in der Karzinogenese. In den meisten Fällen ist das *TP53-Gen* mutiert. Mutierte p53-Proteine verlieren nicht nur ihre Tumorsuppressor-Eigenschaft, sondern entwickeln auch eine karzinogene Funktion, welche Zellen einen Wachstums- und Überlebensvorteil einräumt. Die besondere Funktion des p53 in der Verhinderung einer Tumorentwicklung wird beim Li-Fraumeni-Syndrom deutlich, einem Syndrom, das durch *TP53* Keimbahnmutationen für diverse Krebsarten prädisponiert.

Mutationen des *TP53*-Gens können in allen Phasen der Tumorentwicklung entstehen. Bislang konnte in fast jeder Tumorentität eine TP53-Mutation nachgewiesen werden. Die prozentuale Verteilung schwankt zwischen 10% bei den malignen hämatopoetischen Erkrankungen bis zu fast 100 % beim serösen *high-grade* Karzinom der Ovarien. Bei den meisten *TP53*-Mutationen handelt es sich um *Missense-Mutationen*, meist in den Exons 4-9 (Rivlin et al. 2011).

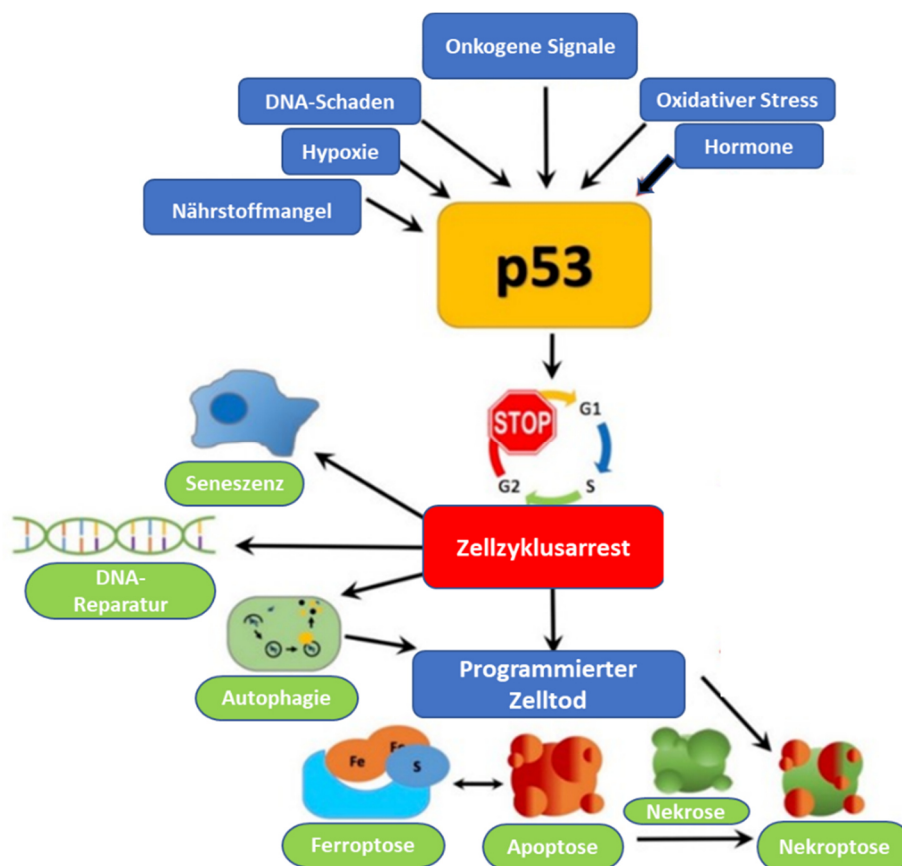


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionen von p53 als „Wächter des Genoms“ in der Zelle, adaptiert nach (Moulder et al. 2018).

### 1.2.4.2 RUNX1-Gen (Runt-related transcription factor1-Gen)

Mutationen des *Runt-related transcription factor1* – auch AML1 (*acute myeloid leukemia1*) oder CBFA2 (*core-binding factor subunit alpha-2*) -Gen genannt – tragen sehr wahrscheinlich zur Entwicklung myeloischer Neoplasien bei und sind häufig bei MDS, MDS/ MPN und AML zu finden. Es handelt sich bei dem Genprodukt um einen Transkriptionsfaktor, welcher die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in reife Blutzellen reguliert.

Das RUNX1-Gen ist 261kb lang und befindet sich auf Chromosom 21q22. Durch alternatives Spleißen sind drei Isoformen möglich (Sood et al. 2017). Das RUNX1-Gen kodiert für eine von zwei Untereinheiten, welche den heterodimeren Transkriptionsfaktor CBF (*core-binding factor*) bilden. Das RUNX1-Protein beinhaltet eine hochkonservierte N-terminale Domäne (*Runt-Domäne*), die für die Heterodimerisierung sowie die Bindung an die DNA zuständig ist. Die C-terminale Domäne dient der Rekrutierung von Kofaktoren (Kulasekararaj et al. 2013a).

RUNX1 ist essentiell für eine normale hämatopoetische Entwicklung. Es fungiert als Aktivator der Transkription von wichtigen hämatopoetischen Genen wie z.B. Il-3 oder GM-CSF. Zudem interagiert RUNX1 mit weiteren aktivierenden Kofaktoren wie z.B. p300, CBP (*Creb Binding Protein*) oder Histonacetyltransferasen sowie mit hemmenden Kofaktoren wie SUV39H1, einer Histonmethyltransferase. RUNX1 trägt jedoch nicht nur zur direkten Genaktivierung bei, sondern scheint auch epigenetisch aktiv zu sein, indem es mit epigenetisch aktiven Enzymen interagiert (Suzuki et al. 2017).

RUNX1-Genmutationen sind häufig bei malignen hämatopoetischen Erkrankungen zu finden. Keimbahnmutationen führen zur familiären Plättchenerkrankung mit Neigung zu myeloischen Neoplasien, wohingegen somatische Mutationen und chromosomale Veränderungen gehäuft bei MDS und Leukämien auftreten (Sood et al. 2017). Bei einigen Patienten mit MDS oder MDS / MPN besteht ein Ungleichgewicht der Isoformen in CD34+ Zellen. RUNX1a wird in diesen vermehrt exprimiert und steigt im Krankheitsprogress weiter an. Diesbezüglich wird ein Zusammenhang mit Mutationen von verschiedenen Splicingfaktoren vermutet (Sakurai et al. 2017).

Mutationen des RUNX1-Gens finden sich in primären MDS Erkrankungen (eher high-risk), therapieassoziiertem MDS und der sAML. RUNX1-Mutationen treten in 20% aller Fanconi-Anämie Patienten sowie bis zu 60% aller Patienten mit kongenitaler Neutropenie auf, welche ein MDS entwickeln. Die Mutationen verteilen sich über das gesamte Gen und betreffen beide funktional wichtigen Domänen (Sood et al. 2017). RUNX1-Mutationen machen einen Anteil von 10-15% bei Patienten mit MDS aus und sind mit einer höheren Anzahl an Blasten im Knochenmark sowie einer Neigung zu Thrombozytopenien assoziiert, zudem können sie das Überleben der Patienten sowie den Zeitraum des Übergangs in eine AML verkürzen. RUNX1-Mutationen sind Indikatoren für eine schlechte Prognose bei MDS (Bejar et al. 2011; Bejar 2015). Die genaue Pathogenese des Übergangs von MDS zu AML aufgrund Mutationen im RUNX1-Gen ist bislang nicht bekannt. Sehr wahrscheinlich führen zusätzliche chromosomale Veränderungen des Chromosom 7 (-7/7q-) und aktivierende Mutationen des RTK-RAS Signalwegs zu einer leukämischen Transformation. Ebenfalls unterstützend für einen leukämischen Übergang seien Mutationen der Gene FLT3, MLL und JAK2 (Sood et al. 2017).

### 1.2.5 Splicing-Faktoren

Der Prozess des RNA-Spleißens ist ein hoch regulierter molekularer Prozess unter Leitung des Spleißosoms. Ziel dieses hochkomplexen Vorgangs ist die Entfernung von nicht kodierenden Bereichen, den *Introns* aus der prä-mRNA und eine Aneinanderreihung von *Exons*, den kodierenden Bereichen, zur Herstellung einer reifen mRNA (Löffler 2003).

Die Herstellung verschiedener mRNAs durch Abschrift eines einzigen Gens ist durch alternatives Spleißen möglich und befähigt Zellen zur Produktion diverser Proteine.



Eine Fehlregulation des *RNA-Splittings* konnte bei verschiedenen Erkrankungen sowie der Tumorentstehung und der Entstehung von Therapieresistenzen als ursächlich erachtet werden (Gill et al. 2016).

Das SF3B1-Gen ist das am häufigsten mutierte *Splicing-Gen* bei z.B. den MDS, der CLL, dem Aderhautmelanom, dem malignen Melanom sowie bei Brustkrebs (Maguire et al. 2015).

### 1.2.5.1 SF3B1-Gen (Splicing factor 3B, subunit 1-Gen)

Als Spleißen wird die Prozessierung von prä-mRNA bezeichnet, aus welcher durch das Entfernen von *Introns* und dem Aneinanderreihen von *Exons* – dem Spleißen – reife mRNA entsteht. Genmutationen, die an diesem Vorgang beteiligt sind, finden sich in ca. 50% aller MDS-Patienten (Gill et al. 2016).

SF3B1-Mutationen sind mit ca. 20% am häufigsten innerhalb der MDS zu finden und stellen einen Anteil von bis zu 70% bei RARS und RCMD-RS. Es ist die bislang einzige Genmutation, welche mit einer bestimmten Morphologie, nämlich den Ringsideroblasten, assoziiert werden kann (Dolatshad et al. 2015). SF3B1-Mutationen sind mit einer Thrombozytose, Ringsideroblasten, weniger Zytopenien sowie einem geringeren Blastenanteil vergesellschaftet und haben eine bessere Prognose als Patienten mit SF3B1-Wildtyp (Gill et al. 2016).

Das SF3B1-Gen ist ein Gen, welches für ein Protein (*spliceosome factor 3b*) als essentiellen Bestandteil des Spleißens kodiert und sich auf Chromosom 2q33.1 befindet (Pellagatti et al. 2015). Da neben Mutationen im SF3B1-Gen weitere somatische Mutationen in anderen Komponenten des Spleißosoms gefunden wurden, vermögen diese generell Einfluss auf die Pathogenese der MDS zu haben.

In einer Arbeit von Papaemmanuil et al. konnten hauptsächlich *Missense-Mutationen* in verschiedenen Codons des SF3B1-Gens nachgewiesen werden, wobei in den meisten Fällen – und zwar in bis zu 60% – das Codon 700 betroffen war, gefolgt von Codon 666 und 662 mit einer Häufigkeit von 10% (Papaemmanuil et al. 2013). Eine Auswirkung dieser verschiedenen Mutationen auf klinische, prognostische oder Unterklassifizierungen der MDS konnte bislang nicht dargestellt werden (Malcovati et al. 2011b).

SF3B1 ist zudem ein essentieller Bestandteil von U2 snRNP, *small nuclear ribonucleo proteins*. Zu diesem gehören die U2 *small nuclear RNA* sowie ca. 20 Proteine, welche einen hoch organisierten Komplex bilden. SF3B1 interagiert mit der *branch point sequence* (BPS), der Verzweigungsstelle des *Introns*, die es zu entfernen gilt. Bei diesem Vorgang bindet SF3B1 direkt auch an andere Proteine wie dem Spleißfaktor U2AF2. C-terminal gelegene *HEAT-repeats* des Splicingfaktors scheinen eine Konformationsänderung während der Formierung des Spleißosoms zu durchlaufen, welche zugleich Mutations *hot spots* darstellen und dadurch die Interaktion zwischen SF3B1, RNA und Kofaktoren beeinflussen (Wan et al. 2013) (Abbildung 6).

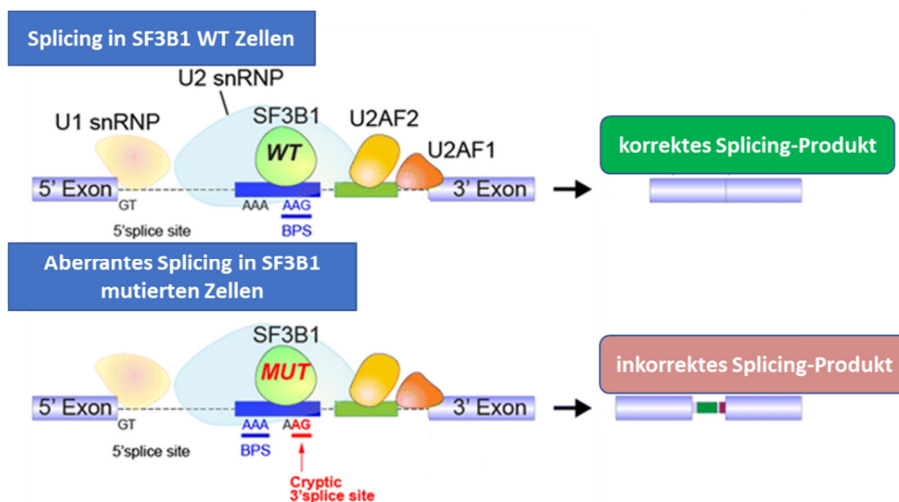


Abbildung 6: Schematische Darstellung von SF3B1 innerhalb des Splicing-Prozesses, adaptiert nach (Yoshimi et al. 2017).

RARS mit einem positiven SF3B1-Status führen zu einem veränderten *Splicing* des ABCB7-Gens innerhalb der Mitochondrien. Es resultiert eine Funktionseinschränkung des ABCB7-Proteins. Die Konsequenz ist eine Eisenüberladung innerhalb der Mitochondrien, eine reduzierte Häm-synthese und ineffektive Erythropoese (Gill et al. 2016).

### 1.2.5.2 SRSF2-Gen (Serine/arginine-rich splicing factor 2-Gen)

Mutationen des Spleiß-Apparates wie SF3B1, SRSF2, ZRSR2 und U2AF1 treten bei MDS-Patienten in > 50% der Fälle auf (Madan et al. 2019).

Das SRSF2-Gen kodiert für den *serine/arginine-rich splicing factor2*, zuständig für das Auffinden der *splice-site* beim konstitutiven und alternativen Spleißen (Gill et al. 2016).

Mutationen dieses Gens sind bei CMML-Patienten in ca. 28-47% sowie bei *de novo* MDS in 10-13% der Patienten zu finden (Kulasekararaj et al. 2013a).

Das SRSF2-Gen befindet sich auf Chromosom 17q25.1 (Pellagatti et al. 2015). Bei den Mutationen handelt es sich typischerweise um heterozygote Missense-Mutationen an spezifischen *hotspots*, häufig P95H, welches die Bindungskapazität des SRSF2-Proteins an die entsprechende RNA reduziert (Wu et al. 2012). Der Aufbau des *Splicing*-Apparates, bestehend aus ca. 5 *small nuclear RNA*'s und um die 150 Proteine für den Vorgang des Spleißens, ist für SRSF2 in Abbildung 7 dargestellt. Auffällig ist die enge Zusammenarbeit mit den Splicingfaktoren U2AF1 oder ZRSR2, welche für MDS ebenfalls beschrieben werden.



Abbildung 7: Schematische Darstellung des Splicing-Prozesses durch den Splicing-Apparat, welcher SRSF2 inkludiert, adaptiert nach (Visconte et al. 2019).

## 1.2.6 Signaltransduktion

Um eine Kommunikation zwischen Zellen zu ermöglichen, werden Signalmoleküle benötigt, welche mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren wechselwirken und eine Signalkaskade anstoßen, damit die Information weitergetragen werden kann. Innerhalb dieser Kaskade ist es möglich, dass Mutationen auftreten, welche eine kontinuierliche Aktivierung oder Inaktivierung der Kaskade zur Folge haben können. Dies kann am Ende mit einem Proliferationsvorteil verbunden sein (Löffler 2003).

### 1.2.6.1 RAS-Gen (Rat sarcoma-Gen)

RAS ist ein Akronym für *rat sarcoma*, da die ersten RAS-Gene in den 1960ern in Ratten nachgewiesen wurden. Es handelt sich um Protoonkogene, welche für eine Familie aus kleinen monomeren G-Proteinen, den RAS-Proteinen, kodieren. Folgende drei Mitglieder der RAS-Protein-Familie sind oft in menschlichen Tumoren mutiert: NRAS (*Neuroblastoma RAS*), KRAS (*Kirsten RAS*) und HRAS (*Harvey RAS*) (Johnson et al. 2014).

RAS-Proteine sind eingebettet in Signalwege, welche über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) aktiviert werden. Durch Bindung entsprechender Liganden – z.B. Insulin oder den epidermalen Wachstumsfaktor

– werden RTK aktiviert und die RAS-MAP-Kinase- und die RAS/PI3K/AKT-Signalwege angestoßen. Diese Signalwege spielen eine wichtige Rolle in der Regulation, der Proliferation und der Differenzierung im menschlichen Organismus. Konstitutive und aberrante Aktivierungen von Komponenten dieser Signalwege führen durch erhöhte Proliferation und einem Überlebensvorteil zur Entstehung von Krebserkrankungen und Metastasierung (Regad 2015).

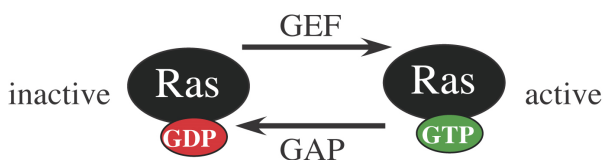
Mutationen im RAS-Gen werden in 20-30% der menschlichen Tumore beschrieben und unterstreichen somit deren Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus. Durch ein konstitutiv aktives RAS-Gen wird ein kontinuierliches Signal in Richtung Zellwachstum gegeben (Johnson et al. 2014). Aktuell sind Bestandteile dieser Signalkaskaden Ziele moderner Krebstherapien, der *targeted therapies*.

Das NRAS-Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 1p13.2 und besitzt 4 Exons. Das KRAS-Gen befindet sich auf Chromosom 12p12.1 und beinhaltet ebenfalls 4 Exons, wobei es zwei alternative Exons besitzt, so dass zwei KRAS-Genprodukte entstehen können (Wagener et al. 2010; Pellagatti et al. 2015).

Bei RAS-Mutationen handelt es sich hauptsächlich um Punktmutationen im 12., 13. und 61. Codon. Mutationen im 61. Codon induzieren die RAS-Aktivierung durch Störung der GTPase-Aktivität und folgender Fixierung von RAS in seiner aktiven Konformation. Mutationen im Codon 12 und 13 sind typisch für KRAS und HRAS und führen zu einer reduzierten Sensitivität gegenüber GTPase-aktivierenden Proteinen. Letztendlich kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung mit der Folge der Dauerstimulation des darauffolgenden Signalwegs (Regad 2015).

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) sind eine Familie von Zelloberflächenrezeptoren für Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine und andere extrazelluläre Signalmoleküle. RTK aktivieren Signalkaskaden, welche in Zellproliferationen, Differenzierungen und Zellmigrationen involviert sind. Hormone, die mit Rezeptor-Tyrosinkinasen interagieren, sind das Insulin über den IR (*insulin receptor*), der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 über den IGFR (*insulin-like growth factor receptor*), der Epidermale Wachstumsfaktor über den EGFR (*epidermal growth factor receptor*), der Fibroblasten-Wachstumsfaktor über den FGFR (*fibroblast growth factor receptor*), der Plättchen-Wachstumsfaktor über den PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) sowie der Stammzellfaktor über c-KIT.

RTK-Monomere bestehen aus einer extrazellulären (N-terminalen) und einer transmembranären Domäne sowie einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne. Die Bindung des Liganden führt zur Dimerisierung des Rezeptors sowie zu einer Autophosphorylierung von eigenen Tyrosinresten und weiteren Proteinen. An die Phosphotyrosinreste binden Adapterproteine, welche das Signal weitergeben. Die Signaltransduktion kann durch die Aktivierung von RAS, PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen) oder PLC (Phospholipase C) fortgesetzt werden. Die weiteren Signaltransduktionswege haben letztendlich Einfluss auf Proliferation, Differenzierung, Überleben und Zellmigration. Mutationen, welche die Signalweiterleitung von RTK betreffen, sind für viele Tumorerkrankungen bekannt (Regad 2015) (Abbildung 9).



**Abbildung 8: Mögliche Aktivierungszustände für RAS-Proteine.**

Die RAS-Proteine gehören zu der Familie der G-Proteine. Es handelt sich um kleine monomer vorkommende G-Proteine, welche mit GTP beladen aktiv sind und weitere Zielproteine aktivieren können. Sind sie mit GDP beladen, sind sie inaktiv. Die Aktivierung erfolgt somit über den Austausch von GDP zu GTP durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren wie GEF (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*) und GAP (*GTPase Activating Proteins*) (Regad 2015). Siehe Abbildung 8.

Das RAS-Protein ähnelt einem Schalter auf molekularer Ebene, GTP gebunden ist der Schalter „an“ und das Signal wird weitergeleitet, GDP gebunden ist der Schalter „im Ruhezustand“ und das Signal wird nicht fortgeleitet.

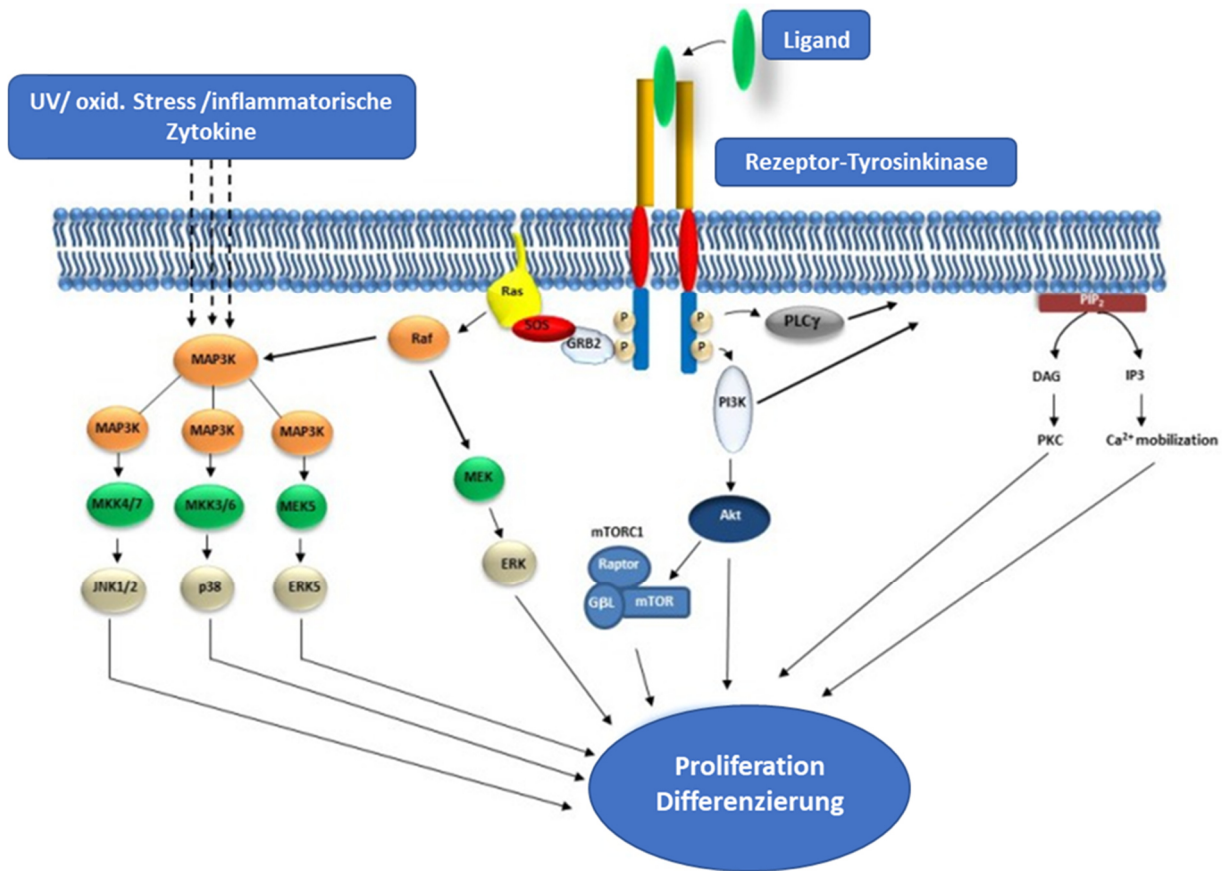


Abbildung 9: Dargestellt sind die durch Rezeptor-Tyrosinkinasen bzw. RAS-Proteine möglichen Signalkaskaden, adaptiert nach (Regad 2015).

### 1.2.6.2 JAK2-Gen (Januskinase 2-Gen)

Ein weiterer Mechanismus der Signaltransduktion in Zellen sind Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen. Es werden zwei Typen von Rezeptoren aufgrund konservierter Strukturmerkmale unterschieden: Typ1 und Typ2 Zytokin-Rezeptoren. Diese Rezeptoren besitzen keine eigene enzymatische Aktivität wie die Rezeptor-Tyrosinkinasen, sondern benötigen sog. Janus-Kinasen= JAK (*just another kinase*) im Zytoplasma, um die intrazelluläre Signalkaskade zu aktivieren. Es gibt vier Typen an Janus-Kinasen: Typ1 (Jak1), Typ2 (Jak2), Typ3 (Jak3) und die Tyrosinkinase2 (Rassow 2008).

Das Gen für die Janus-Kinase1 befindet sich beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p31.3). Das Gen für die Janus-Kinase Typ2 befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 9 (9p24) und besitzt eine Anzahl von 25 Exons. Janus-Kinase 3 und Tyrosinkinase 2 befinden sich auf Chromosom 19p13.1 bzw. 19p13.2 (Yamaoka et al. 2004).

Janus-Kinasen sind relativ große Proteine aus über 1000 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 120-140kDa. C-terminal befindet sich die JH1-Domäne mit der Funktion einer eukaryoten Tyrosinkinase. Neben der JH1-Domäne liegt in N-terminaler Richtung eine inaktive Pseudokinase oder auch als Kinase ähnliche Domäne, JH2 bezeichnet. Aufgrund dieser Anordnung der Kinasen erhielt die Janus-Kinase ihren Namen, vom römischen Gott Janus, einem Gott mit einem Kopf und zwei Gesichtern: Der Gott der Tore, des Anfangs und des Endes, der sowohl nach vorne als auch nach hinten blicken kann und die Dualität in den ewigen Gesetzen symbolisiert. Der N-Terminus von Janus-Kinasen

enthält eine SH2-Domäne (Yamaoka et al. 2004), welche der Interaktion mit Signalmolekülen dient. SH bedeutet *src homology domain* (*src = sarcoma*), eine Domäne innerhalb von Signalproteinen mit einer Homologie zu einer sog. Src-Kinase. Dieses Motiv bindet hochaffin und spezifisch an Substratproteine, z.B. PI3-Kinase, welche eine SH2-Bindestelle aus einem phosphorylierten Tyrosinrest besitzt (Wagener et al. 2010). Weiterhin befindet sich am N-terminus eine sog. FERM-Domäne (Band-4.1-, Ezrin-, Radixin-, Moesin-Domäne) aus ca. 300 Aminosäuren. Ihre Aufgabe besteht in der Herstellung einer Verbindung zu Transmembranproteinen z.B. dem Zytokinrezeptor (Yamaoka et al. 2004).

Der Signaltransduktionsweg über JAK-STAT-Proteine wird von vielen Zytokinen, wie den Interleukinen, Interferonen, Erythropoetin oder auch Hormonen, wie dem Wachstumshormon, Prolaktin oder Leptin verwendet.

Nachdem der entsprechende Ligand gebunden wurde, kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors. Durch eine selbstständige Phosphorylierung werden die Janus-Kinasen aktiviert. Sie phosphorylieren herausragende Enden eines Tyrosins am Rezeptor und bilden so Bindestellen für Proteine mit SH2-Domänen. Sog. STAT-Proteine (*signal transducer and activator of transcription*) binden an die SH2-Domänen an den cytosolischen Anteil des Rezeptors und werden durch Janus-Kinasen an einem Tyrosinrest phosphoryliert. Es kommt zu einer Wechselwirkung zwischen dem Phosphotyrosinrest eines STAT-Proteins und der SH2-Domäne des zweiten STAT-Proteins und es bildet sich ein STAT-Dimer. Dieses diffundiert in den Kern, wo es als Transkriptionsfaktor über Bindung an ein *response-element* die Gentranskription reguliert (Rassow 2008). Auf diesem Weg wird die Transkription von Genen, verantwortlich für Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose, reguliert (Quintás-Cardama et al. 2013). Dies veranschaulicht die Abbildung 10.

JAK2 kooperieren mit Il-3, Il-5, GM-CSF, EPO, GH, Prolaktin oder Thrombopoietin. Zudem ist JAK2 wichtig für Zytokine, welche Gp 130 als Rezeptor verwenden und für einige Interferone. In Versuchen mit *Knockout*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass JAK2 *Knockout*-Mäuse in der embryonalen Phase aufgrund eines Defekts in der Erythropoese auf Stammzellebene versterben (Yamaoka et al. 2004).

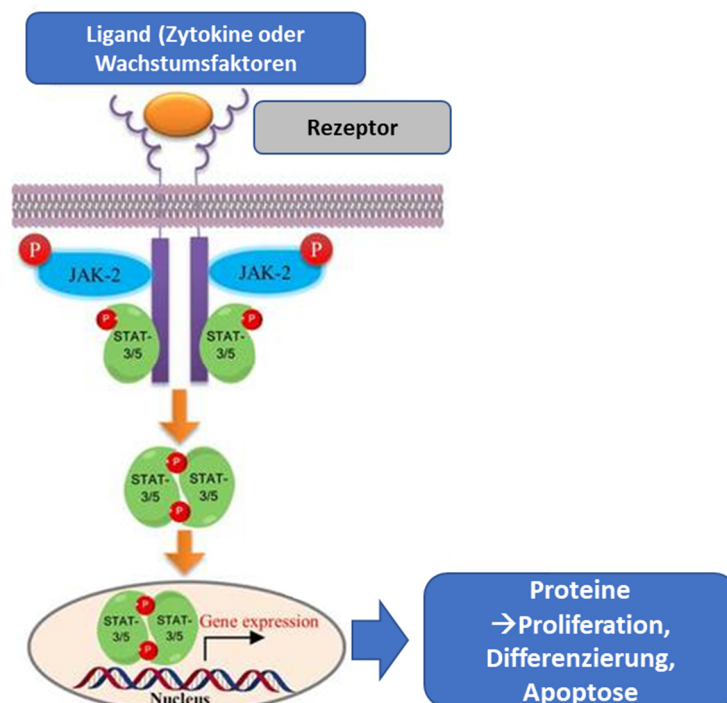


Abbildung 10: Schematische Darstellung der JAK2-Signalkaskade, adaptiert nach (Zhao et al. 2016).

Wie beschrieben, ist JAK-2 Bestandteil einer Signaltransduktionskette, welche z.B. durch Il-3, einem Cytokin, initiiert werden kann. Il-3 ist in der Lage, den JAK-STAT, Raf/MEK/ERK und den PI3K/Akt Weg zu aktivieren um somit Wachstum und Differenzierung in pluripotenten hämatopoetischen Zellen zu regulieren (Steelman et al. 2004).

Bei der JAK2 V617F Mutation handelt es sich um eine Punktmutation, wodurch die Nukleinbase Guanin durch Thymin ersetzt wird, und zwar an Position 1849 im Exon 14, welches für die inhibierende Pseudokinasedomäne (JH2) des JAK2-Gens kodiert. Die Folge ist eine Substitution von Valin durch Phenylalanin an der Position 617 der Aminosäureabfolge des Polypeptids. Die Konsequenz ist eine konstitutiv aktive Kinase (JH1) und dadurch eine kontinuierliche Aktivierung der JAK-STAT Signaltransduktion und somit ein ständiger Reiz zur Proliferation und Wachstum (Baxter et al. 2005; Steensma et al. 2005). Hämatopoetische Zellen mit dieser Mutation entwickeln ein Cytokin-unabhängiges Wachstumsverhalten (Quintás-Cardama et al. 2013).

JAK2-Mutationen mit aberranter Aktivierung des JAK-STAT Signalwegs sind in entzündlichen Erkrankungen, hämatopoetischen Erkrankungen und soliden Tumoren beschrieben worden.

Bei einer großen Anzahl an Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen kann diese erworbene somatische *gain-of-function* JAK2-Mutation gefunden werden. Eine unkontrollierte Zellproliferation ist charakteristisch für die Gruppe der myeloproliferativen Erkrankungen wie der Polyzythämia vera, der essentiellen Thrombozythämie und der primären Myelofibrose, klonale Erkrankungen mit dem Ursprung der Störung auf Stammzell- oder Progenitorzellebene. Bislang konnten JAK2-Mutationen in NHL nicht gefunden werden, jedoch in einer kleineren Anzahl in Morbus Hodgkin Patienten. Ein Therapieansatz bei der Myelofibrose ist Ruxolitinib – ein Tyrosinkinaseinhibitor, welcher die Phosphorylierung von JAK1 und JAK2 inhibiert (Quintás-Cardama et al. 2013).

### 1.2.6.3 FLT3-Gen (FMS related tyrosine kinase 3-Gen)

FLT3 ist ein Protein, ein Enzym, welches durch das FLT3-Gen kodiert wird und der Gruppe 3 der Rezeptor-Tyrosinkinasen angehört. Eine andere Bezeichnung ist STK-1, *stem cell tyrosine kinase 1* oder CD 135. Ligand ist ein Protein, der FLT3-Ligand. Die Funktion von FLT3 ist die Beteiligung an der Regulation der Hämatopoese (Grafone et al. 2012). Verschiedene aktivierende Mutationen wie z.B. eine *internal tandem duplication (ITD)* oder eine Mutation der *tyrosine kinase domain (TKD)* sind häufig bei AML- Patienten, jedoch nur in bis zu 5 % bei Patienten mit MDS beschrieben (Pellagatti et al. 2015).

Ein besseres Verständnis der molekularbiologischen Pathogenese der myelodysplastischen Syndrome und deren Integration in den klinischen Alltag stellt für viele Patienten eine sinnvolle Maßnahme aufgrund einer besseren Risikostratifizierung und Prognosestellung sowie Entwicklung pharmakologischer Ansätze dar. Bei der AML ist dies durch z.B. Midostaurin für Patienten mit einer FLT3-Mutation bereits implementiert.

Das FLT3-Gen befindet sich auf Chromosom 13q12.2, besitzt 24 Exons und ist 96 kb groß. Das Genprodukt fungiert als transmembranärer Rezeptor, bestehend aus 933 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von 155kDa und gehört der Gruppe 3 der Rezeptor-Tyrosinkinasen an. Die Proteinstruktur lässt vier Regionen erkennen. Eine N-terminale extrazelluläre Region, welche aus fünf Immunglobulin ähnlichen Domänen besteht, dient der Ligandenbindung sowie Dimerisierung des Rezeptors. Dieser extrazellulären Region folgt eine transmembranäre Region. Die Verbindung zwischen dieser und der intrazellulären C-terminalen Region mit Kinaseaktivität stellt die juxtamembranäre Region dar (Grafone et al. 2012).

FLT3 wird im Knochenmark auf CD34+ hämatopoetischen Stammzellen und auf unreifen hämatopoetischen Progenitoren exprimiert und besitzt eine Funktion in der frühen Regulation der Hämatopoese. Zudem wird FLT3 in Organen wie Leber, Milz, Thymus, Lymphknoten und Plazenta sowie Gonaden und Gehirn exprimiert.

In inaktiver Form, FLT3-WT (Wildtyp), liegt der Rezeptor als Monomer vor. Durch Binden des FLT3-Liganden kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und zur Phosphorylierung der Tyrosinkinase-Domäne welches letztendlich zur Aktivierung des Rezeptors mit Aktivierung einer Signalkaskade führt. Der FLT3-Ligand gehört einer Familie von Wachstumsfaktoren an, welcher Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen stimuliert und von den blutbildenden Organen, Prostata,

Ovarien, Nieren, Lunge, Kolon, Dünndarm, Hoden, Herz und Plazenta gebildet wird. Im Verhältnis zu der weiten Verbreitung des Liganden, werden FLT3-Rezeptoren begrenzt exprimiert. Bei AML-Patienten wird über Stimulierung des FLT3-Rezeptors durch den FLT3-Liganden die Proliferation von leukämischen Blasten, welche diesen Rezeptor exprimieren, gefördert. Hämatopoetische Progenitoren können durch lokale Sekretion des FLT3-Liganden oder durch direkten Kontakt mit dem Liganden auf der Oberfläche von mononukleären Zellen stimuliert werden (Grafone et al. 2012).

Der aktivierte FLT3-Rezeptor ist an GRB2 (*growth factor receptor bound protein-2*) gebunden, einem Verbindungsprotein, welches über seine SHC-Domäne (*Src homology 2 containing protein*) mittels SH2-Domäne an verschiedene Signalproteine bindet. Das Adapterprotein GRB2 besitzt eine SH3-Domäne, womit es prolinreiche Proteine wie SOS (*Son of Sevenless = guanin nucleotide exchange factor*) binden kann, welches GDP gegen GTP an RAS austauscht. RAS aktiviert die RAF/MAPK/ERK Kinase und RSK (*90-kDa ribosomal protein S6 kinase*) mit dem Ziel, Transkriptionsfaktoren (STAT und CREB) zu aktivieren, um Gene, welche in die Proliferation involviert sind, zu transkribieren. Abbildung 11 zeigt grob schematisch den Ablauf der Aktivierung des Rezeptors und der Initiierung der Signalkaskade.

Über den aktivierten FLT3-Rezeptor kann das Signal zudem über Phosphorylierung weiterer Plasmaproteine wie PLC $\gamma$ 1 (*phospholipase C $\gamma$ 1*) weitergeleitet werden. Die Aktivität der PI3K wird sehr wahrscheinlich durch FLT3 mittels SHC und ein oder mehreren SHIP Proteinen reguliert. Die p85-Untereinheit der PI3K ist mit den Proteinen GAB2 (*GRB2-associated binder 2*), CBL (*casitas B-Lineage lymphoma*) und CBL-b verbunden. Über die Aktivierung des FLT3-Rezeptors kommt es zur Phosphorylierung von SHC und CBL sowie zu einer Komplexbildung mit der p85-UE. Zudem kommt es zu einer Phosphorylierung von GAB1 und GAB2 und Bindung derer an SHP2 und GRB2.

PI3K aktiviert u.a. die PDK1 (*protein kinase 1 dependent phosphoinositol-3*) und AKT, was wiederum mTOR (*mammalian target of rapamycin*) aktiviert und somit die Transkription reguliert. Die Aktivierung von AKT führt zu einer Hemmung der Apoptose durch die Inaktivierung des proapoptotisch wirkenden BAD sowie durch Induktion des antiapoptotischen BCL-2 Proteins. FLT3 aktiviert über PI3K antiapoptotische Signale in hämatopoetischen Vorläuferzellen (Grafone et al. 2012).

ITD-Mutationen sowie weitere aktivierende Mutationen des FLT3-Gen sind mit bis zu 5% innerhalb der MDS vertreten und bis zu 30% bei AML-Patienten (Pellagatti et al. 2015). ITD's sind Verdopplungen von einer unbestimmten Anzahl von Basen die einen Platz im *reading frame* einnehmen. Im Fall von FLT3 geschieht dies in den Exons 14 und 15, welche für die juxtamembranäre Domäne kodieren. ITD's entstehen, wenn ein Teil der kodierenden Sequenz der JM-Domäne verdoppelt und *head-to-tail* orientiert wieder eingesetzt wird. Zudem sind bei AML-Patienten auch aktivierende Punktmutationen innerhalb der JM-Domäne beschrieben worden.

ITD's führen zu einer Liganden unabhängigen Dimerisierung und Phosphorylierung sowie Phosphorylierung des WT-Rezeptors der gleichen Zelle. Letztendlich ist der FLT3-Rezeptor konstitutiv aktiv, was zu einer Liganden unabhängigen Proliferation und einem Differenzierungs-Stopp bei hämatopoetischen Vorläuferzellen führt. Die Signalkaskade ist bei FLT3-ITD Rezeptoren und FLT3-WT unterschiedlich. Die Aktivierung von RAS und PI3K ist bei beiden Rezeptoren gleich. Der Unterschied ist im STAT5 Signalweg zu finden. Wird STAT5 über den FLT3 WT-Rezeptor aktiviert, bindet dieser nicht an die DNA. Bei Aktivierung über den FLT3-ITD-Rezeptor hingegen bindet der TF an die DNA, was letztendlich zu einer antiapoptotischen Funktion führt und somit einen Proliferationsvorteil darstellt.

Den zweiten Anteil an FLT3-Mutationen stellen *Missense*-Mutationen in der Tyrosin-Kinase-Domäne. Diese finden sich hauptsächlich im Codon 835 und 836 und führen zur Substitution einer Aminosäure. TKD-Mutationen führen ebenfalls zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinase-Domäne und der nachfolgenden Signalkaskade (Grafone et al. 2012).

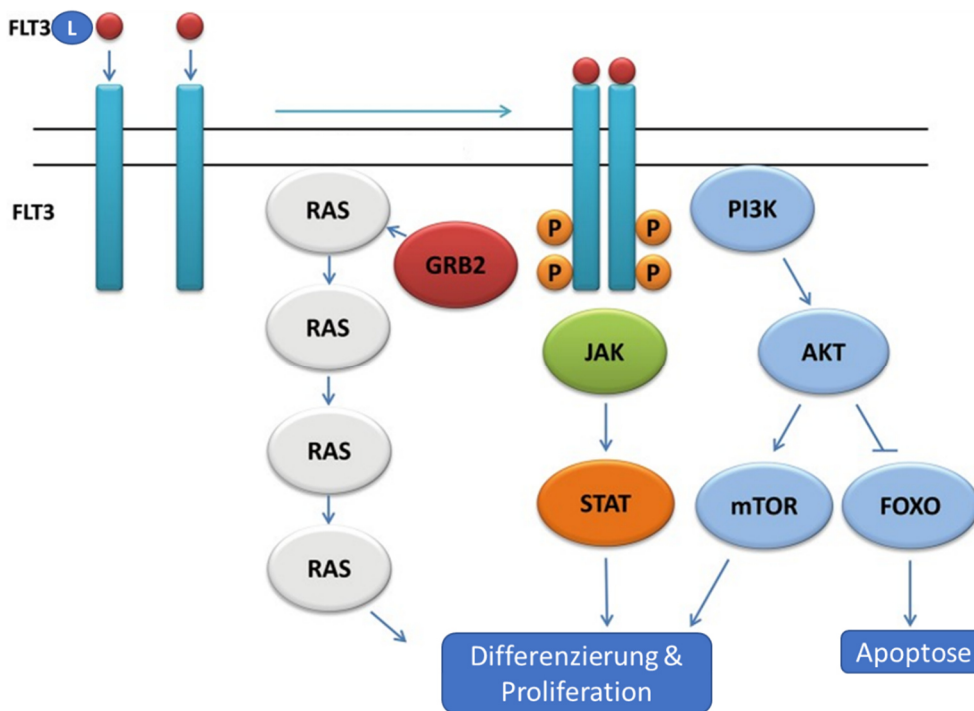


Abbildung 11: Signaltransduktion durch Aktivierung des FLT3-Rezeptors, adaptiert nach (Chen et al. 2017).

#### 1.2.6.4 CBL-Gen (Casitas B-cell lymphoma-Gen)

Das CBL (*Casitas B-cell lymphoma*)-Gen (=c-Cbl) ist ein Protoonkogen, dessen Transkript – ein Protein – die E3 Ubiquitin-Protein-Ligase, Signaltransduktionswege reguliert. Es handelt sich um ein Enzym, welches Proteine ubiquitiniert, die daraufhin abgebaut werden. So reguliert die E3-Ligase durch Abbau von Signalmolekülen oder Rezeptor-Tyrosinkinasen beispielsweise den FTL3-(RAS-MAP) Signalweg herunter. Zusätzlich fungieren sie als Adapterproteine, welche die Signaltransduktion positiv verstärken. Durch Mutationen in diesem Gen wird die Hemmung aufgehoben und der Rezeptor ist weiterhin aktiv und ermöglicht eine Transformation (Gill et al. 2016; Schnittger et al. 2012).

Mutationen des CBL-Gens sind zu 1-3% innerhalb der MDS zu finden und eher in fortgeschrittenen Stadien sowie bis zu 10% bei MDS/MPN und bis zu 20 % bei CMML nachweisbar (Gill et al. 2016).

Beim CBL-Gen handelt es sich um ein Protoonkogen, welches sich auf dem langen Arm von Chromosom 11 (11q23.3) befindet. Exon 8 und 9 kodieren für eine *linker*- und *RING*-Finger-Region und sind aufgrund der Vermittlung einer Bindung von *E2 (ubiquitin conjugating enzymes)* essentiell für die Funktion der E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität der CBL-Proteine.

Mitglieder der CBL-Protein-Familie sind evolutionär hochkonservierte Regulatoren von Signaltransduktionen. Bei Säugetieren besteht diese Familie aus Cbl (=c-Cbl), Cbl-b und Cbl-c (Cbl-3 oder Cbl-SL). Ihre Aufgabe ist eine Abschwächung von Signaltransduktionswegen, indem sie als E3-Ubiquitin-Ligase diverse Protein-Tyrosin-Kinase Signalwege herunterregulieren.

Die N-terminale Region, welche die *tyrosine kinase binding (TKB) domain*, die *RING-finger domain* und die *short linker region* umfasst, ist bei allen Mitgliedern der Cbl-Protein-Familie hoch konserviert. Die *TKB-domain* besteht aus einem *four-helical bundle*, einer *calcium-binding EF hand* und einer *SH2-domain*. Dieser Aufbau der *TKB-domain* ermöglicht eine spezifische Erkennung von Strukturen, welche Phospho-Tyrosin enthalten, wie man sie in aktivierter PTK findet. Die Ringfinger-Domäne und die Linker-Region vermitteln die Bindung von *E2-ubiquitin-conjugating enzymes* und sind essentiell für die E3-Ubiquitin Ligase Aktivität. Das C-terminale Ende der Proteine ist im Aufbau variabler. CBL enthält prolinreiche Regionen, welche an SH3-Domänen diverser Signalproteine – wie Kinasen der Src-Familie und Grb2-Adapterproteine – binden können (Naramura et al. 2011).



Die Proteine der CBL-Familie dienen als molekulare Bremse auf von Tyrosinkinasen unterhaltenen Signalkaskaden z.B. FLT3, c-kit und M-CSF. Durch ihre Fähigkeit Proteine zu ubiquitinieren, kommt es zu einem Abbau von Tyrosinkinasen sowie Bestandteilen der weiteren Signalkaskase. Da eine aberrante Aktivierung von Tyrosinkinasen onkogenetisches Potential besitzt, liegt die Vermutung nahe, dass eine unzureichende Funktion der CBL-Proteine und somit ein fehlender hemmender Einfluss zu einer Transformation der entsprechenden Zelle führen kann (Naramura et al. 2011; Makishima et al. 2009). Abbildung 12 zeigt schematisch die intrazellulären Konsequenzen bei Mutation von c-CBL und den daraus resultierenden fehlenden Hemmungen an.

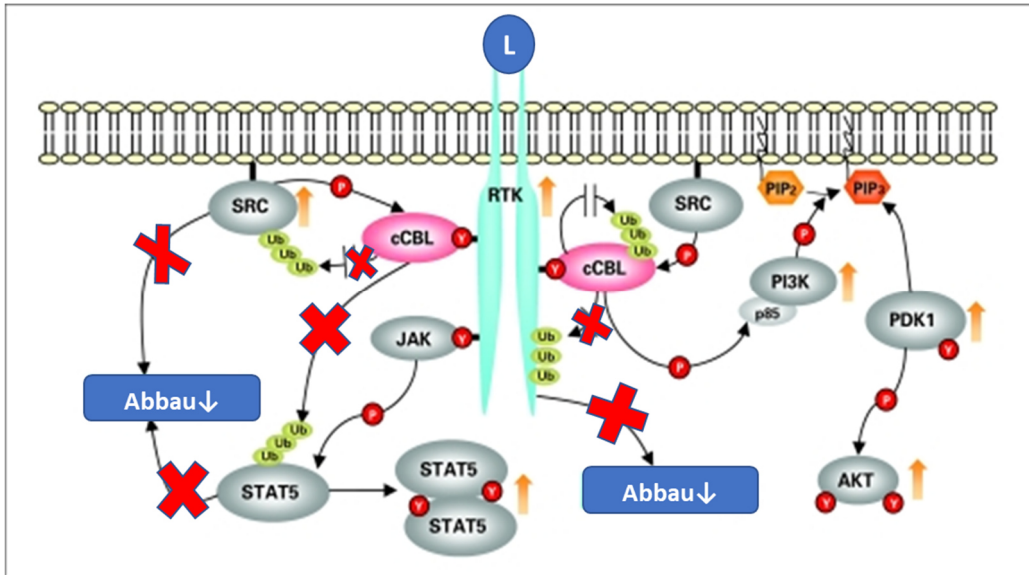


Abbildung 12: Darstellung möglicher Auswirkungen von c-CBL Mutationen auf die Signalkaskade, adaptiert nach (Makishima et al. 2009).

### 1.3 Komorbiditäten bei MDS

The right treatment for the right person at the right time.

Die Inzidenz der MDS steigt mit zunehmendem Alter an. Jene Patienten haben häufig aufgrund ihres Alters weitere Erkrankungen, welche bislang nicht von den gängigen Risiko-Stratifizierungssystemen erfasst werden. Komorbiditäten beeinflussen als unabhängige prognostische Faktoren das Gesamtüberleben von MDS-Patienten und einige Patienten versterben eher an diesen zusätzlichen Erkrankungen, bevor es zu einem Progress des MDS kommen kann (Zipperer et al. 2014; Della Porta et al. 2011).

Um maßgeschneiderte Diagnostik und Therapie von Patienten zu ermöglichen und weiterhin zu verbessern, ist eine Erweiterung der personalisierten Medizin sinnvoll. Patientenindividuelle Parameter wie Geschlecht und Alter, Wünsche und Bedürfnisse sowie das Wissen um molekulare Prozesse (*personalized genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, pharmacogenomics*) und individuelle Komorbiditäten haben einen Einfluss auf die Prognose von Patienten und bedürfen weiterer Erforschung und Integration in den klinischen Alltag.

Das Interesse dieser Arbeit gilt den molekularen Veränderungen der Patienten, den somatischen Mutationen ebenso wie den Komorbiditäten im Wechselspiel mit den untersuchten Biomarkern.

### 1.4 Ziel der Arbeit - Fragestellung

Folgende Fragen wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht:

- Bestimmung der Inzidenzen somatischer Genmutationen für das vorliegende MDS-Patientenkollektiv,
- Ermittlung der prognostischen Bedeutung der untersuchten Genmutationen,
- Erfassen der prognostischen Bedeutung von klinischen und patientenindividuellen Parametern,
- Aufdecken möglicher Zusammenhänge zwischen den untersuchten somatischen Genmutationen und Komorbiditäten der Patienten.

Insgesamt hat die Arbeit zum Ziel, die molekularbiologische Pathogenese der myelodysplastischen Syndrome in Zusammenschau mit individuellen Komorbiditäten zu beleuchten um die Diagnostik, Prognoseerstellung und weitere therapeutische Planung bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen zu verfeinern und in den klinischen Alltag integrieren zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Datenrecherche

Die vorliegende Arbeit inkludiert 166 Patienten, welche in der Zeit von 1986-2012 an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf aufgrund ihres MDS diagnostiziert und behandelt wurden. Es handelt sich um erwachsene Patienten im Alter von 16-87 Jahren (medianes Alter 68 Jahre), welche nach Aufklärung schriftlich, in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki, in die Genanalysen einwilligten. Die Studiennummern der positiven Ethikvoten, welche im Rahmen der ethischen und rechtlichen Beratung durch die medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vergeben wurden, lauteten 4004, 3008, 3269 und 3134.

Die Daten wurden zum größten Teil prospektiv sowie zu einem kleinen Teil retrospektiv während notwendiger Routinediagnostik erhoben. Bei den Patienten, bei welchen die Erstdiagnose (ED) bereits bestand und zu untersuchende Biomarker erhoben wurden, wurden fehlenden Daten aus dem Düsseldorfer MDS-Register mit über 5000 standardisiert eingepflegten Fällen vervollständigt. Bei Patienten, welche dem MDS-Register zugehörig sind, wird in regelmäßigen Abständen der Gesundheitszustand durch ein „*follow-up*“ kontrolliert und festgehalten. Für die vorliegende Arbeit wurde ein „*last follow-up*“, Stand September 2017, datiert. Neben den Patientenakten aus dem Zentralarchiv, stand das Krankenhausinformations- und Kommunikationssystem Medico der Firma Cerner zur Verfügung.

Durch oben genannte Datenquellen konnten im Verlauf fast alle beschriebenen Parameter erhoben werden. Während des Untersuchungszeitraums standen fortlaufend weitere Biomarker zur Verfügung, welche das bereits bestehende Basis-Panel komplementierten. Zum Zeitpunkt des Abschlusses konnten nicht bei allen Patienten alle Marker analysiert werden.

Folgende Patientendaten wurden in einen Datensatz zur Bearbeitung gesammelt: Patienten-ID, Geburtsdatum, Sterbedatum, „*last follow-up*“, Alter bei ED, Geschlecht, FAB und WHO2016-Klassifikation bei ED, Diagnosedatum, 16 untersuchte Gene, Zytogenetik, absolute Zahl neutrophiler Granulozyten bei ED, Blasten im KM bei ED, Hb bei ED, Thrombozyten und Leukozyten bei ED, IPSS-R und IPSS-Punkte sowie Kategorie, Kategorie der Genetik nach IPSS und IPSS-R sowie die Komorbiditäten.

### 2.2 Untersuchungsmaterial & Materialanalyse

Die verwendeten Patientenproben wurden während der routinemäßigen Vorstellung in der hämatologischen Ambulanz oder bei Erstdiagnose in der Klinik für Hämatologie und Onkologie des UKD erhoben. Somit waren keine zusätzlichen Untersuchungen oder Blutentnahmen notwendig. Bei unvollständigem Markerpanel wurden im Verlauf die molekularbiologischen Untersuchungen (peripheres Blut) mit in die Verlaufskontrollen integriert. Fehlende Patientendaten wurden ergänzt.

#### 2.2.1 Blutbild und Differentialblutbild

Zum einen wurde über das Zentrallabor des UKD ein Blutbild sowie für die zytomorphologische Untersuchung des Differentialblutbildes, ca. 5ml EDTA antikoaguliertes peripheres Blut, in das hämatologische Labor des UKD zur Beurteilung eingereicht. Erfolgte die Erstdiagnose nicht am UKD, wurden die extern erstellten Befunde überprüft, ggf. korrigiert oder ergänzt.

Der Fokus lag auf dem Nachweis von Dysplasiezeichen der drei Zellreihen sowie auf dem Nachweis von unreifen Blasten. Verwendet wurde eine panoptische Färbung nach Pappenheim.

### 2.2.2 Zytologische Untersuchung

Eine zentrale Stellung bei der Diagnostik der MDS nimmt die zytomorphologische Untersuchung des Knochenmarkes ein. Ca. 3-5ml Citrat-antikoaguliertes Knochenmark wurden ebenfalls in das hämatologische Labor des UKD zur Befundung geliefert. Erfolgte die Erstdiagnose nicht am UKD, wurden die extern erstellten Befunde ergänzt.

Der Fokus der Beurteilung der Knochenmarkuntersuchung lag in der Befundung der Knochenmarkszellularität sowie der Erfassung der Dysplasiekriterien und der Angabe des Blastenanteils.

Nach panoptischer Färbung nach Pappenheim erfolgt die Überprüfung der Dysplasiekriterien, wobei mindestens 400 Zellen der Erythro- und Granulopoese und 25 Zellen der Megakaryopoese auf Dysplasiezeichen geprüft werden. Wenn mindestens 10% der untersuchten Zellen einer Zellreihe dysplastische Veränderungen aufweisen, kann diese Zellreihe als dysplastisch verändert bezeichnet werden. Zur Bestimmung des medullären Blastenanteils, werden mindestens 500 kernhaltige Zellen des Knochenmarks ausgewertet.

Berliner-Blau-Färbung wurde zum Nachweis einer sideroblastischen Störung der Erythrozyten verwendet. Peroxidase-Färbung diente dem Nachweis eines Myeloperoxidase-Mangels in Granulozyten sowie Auerstäbchen. Die Esterase-Färbung (nach Löffler) diente dem Nachweis der Esterase in Monozyten. Um atypische Vorstufen der Erythropoese nachzuweisen, wurde die PAS-Färbung (Perjodsäure-Schiff-Färbung) verwendet.

### 2.2.3 Zytogenetik

Die Erstellung der Chromosomenanalyse, der sog. Karyotypisierung, bei Erstdiagnose erfolgte in dem Institut für Humangenetik, Institutsleitung Univ.-Prof. Dr. Wieczorek an der Uniklinik in Düsseldorf. Bei Patienten, bei welchen die Erstdiagnose nicht in hiesiger Klinik gestellt wurde, erfolgte die Zytogenetik extern. Fehlte eine zytogenetische Untersuchung bei ED, so wurde diese bei Verlaufskontrolle komplementiert.

Eine Chromosomenanalyse ist obligater Bestandteil der Diagnostik hämatopoetischer Erkrankungen. Ein aberranter Karyotyp zeigt den klonalen Charakter der Erkrankung an und ist somit ein zentraler Pfeiler der Diagnostik. Zudem kann mittels Kategorisierung des Karyotyps die Risikogruppe ermittelt und die Prognose besser eingeschätzt und Therapiestrategien abgeleitet werden (Haase et al. 2007).

Für die Analyse wurden 5-10ml heparinisiertes Knochenmark oder bei fehlendem Befund peripheres Blut (3-10ml Heparinblut) entnommen und innerhalb 24 Stunden in das zytogenetisches Labor gebracht, um vitale Zellen auswerten zu können. Nach ISCN (*International System of Cytogenetic Nomenclature*) sollen 20-25 Metaphasen analysiert werden, was nicht immer garantiert werden konnte.

Die eingesandten Zellen werden durch Colcemid, einem Colchicin-Derivat, in der Metaphase arretiert. Bei wenigen sich in Teilung befindlichen Zellen im Material kann deren Ausbeute durch Stimulation erhöht werden. Die Zellen werden durch Methanol-Eisessig-Lösung fixiert (Schaaf et al. 2013). Danach folgt eine Bänderungstechnik, um die einzelnen Chromosomen eindeutig zu identifizieren. Dazu wird mit der Giemsa-, Quinacrin- und Reverse-Bandentechnik gearbeitet. Nach der ISCN, welche internationale Gültigkeit besitzt, wird eine Karyotyp-Formel erstellt. Zuerst erfolgt die Angabe der

Anzahl an Chromosomen, danach die Angabe der Geschlechtschromosomen. Ebenfalls werden Chromosomenaberrationen durch die Karyotypformel durch die ISCN international beschrieben.

Die Veränderungen der Chromosomen werden eingeteilt in numerische und strukturelle Veränderungen. In einer gesunden Körperzelle herrscht ein doppelter Satz an Chromosomen, jede Abweichung der Anzahl durch Zugewinn oder Verlust zählt zu den numerischen Aberrationen. Auch die Struktur eines Chromosoms kann betroffen sein. Dies wäre beispielsweise ein Verlust an genetischem Material, einer Deletion, ein Austausch zwischen Chromosomen, eine Translokation, eine Drehung um 180° eines Chromosomenabschnitts, eine Inversion oder die Ausbildung eines Isochromosoms durch Quer- statt Längsteilung. Für beide Aberrationsklassen gibt es eine durch die ISCN vorgegebene Nomenklatur (An international system for human cytogenetic nomenclature (1978) ISCN (1978). Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature 1978).

#### 2.2.4 Genmutationsanalyse

Für die vorliegende Arbeit wurde 5-10ml antikoaguliertes Knochenmark oder 5-10ml antikoaguliertes peripheres Blut für die Erhebung der molekularbiologischen Untersuchung gewonnen. Diese Untersuchung erfolgte in Kooperation mit dem Münchner Leukämielabor (MLL) (GmbH), unter Leitung von Prof. Dr. med. Claudia Haferlach, Prof. Dr. med. Dr. phil. Torsten Haferlach sowie Prof. Dr. med. Wolfgang Kern.

Bei allen inkludierten Patienten wurden die Biomarker RUNX1, TET2, JAK2, FLT3-TKD / FLT3-ITD, MLL-PTD, KRAS, NRAS, CBL, ASXL1, IDH1, IDH2, TP53, EZH2, SF3B1, SRSF2, DNMT3A mittels *Next-Generation-Sequencing (NGS)* in Form eines Panels analysiert.

Für diese Untersuchung werden Leukozyten des pathologischen Klons durch eine Erythrozytenlyse aus dem Knochenmark oder peripheren Blut, bei Ausschwemmung dieser, extrahiert und durch Lyse der weißen Blutkörperchen die entsprechende zu analysierende (ausschließlich) DNA gewonnen. Durch das NGS können parallel in kurzer Zeit hunderttausende Genombereiche analysiert werden und individuelle Genprofile der Patienten erstellt werden. Sofern in einem Gen Hotspotbereiche bestehen, werden diese sequenziert, ansonsten wird der gesamte kodierende Bereich analysiert. Entsprechend untersuchte Exon-Bereiche sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Einzeln nachgemeldete Gene wurden nicht über ein Panel sequenziert.

Für das NGS, einer Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethode stehen mehrere Plattformen von verschiedenen Anbietern zur Verfügung, beispielsweise von Illumina oder Thermo Fisher Scientific. Beauftragte Panel wurden durch das MLL mittels Illumina-Plattform (Illumina, San Diego, CA, USA) analysiert (Delic et al. 2016). Die Illumina NGS Abläufe beinhalten vier Schritte: 1. *Library Preparation*, 2. *Cluster Generation*, 3. *Sequencing*, 4. *Data Analysis* (An introduction to Next-Generation Sequencing Technology 2020).

Der erste Schritt, welcher die Vorbereitung der DNA-Proben, dessen Fragmentierung und Assemblierung mit Adaptoren beinhaltet, wird durch ein ThunderStorm instrument (RainDance Technologies, Billerica, MA, USA) initiiert. Im Schritt „*Cluster Generation*“ erfolgt die Amplifikation der erstellten DNA-Fragmente, die sog. *bridge amplification*. Der Schritt des *Sequencing* erfolgt durch *sequencing-by-synthesis* mit einem MiSeq-System nach Herstellerempfehlung (Illumina, San Diego, CA, USA). Nach den Laboruntersuchungen folgt der letzte Schritt, die Datenanalyse (Delic et al. 2016; An introduction to Next-Generation Sequencing Technology 2020).

Gen-Panel
• RUNX1: komplett
• TET2: komplett
• JAK2: E12, E14
• FLT3: E20 für TKD, die FLT3-ITD läuft mit einer Fragmentlängenanalyse
• MLL-PTD: keine Sequenzierung, sondern eine RQ-PCR
• KRAS: E02-E03
• NRAS: E02-E03
• CBL: E08-E09
• ASXL1: E13
• IDH1: E04
• IDH2: E04
• TP53: E04-E10
• EZH2: komplett
• SF3B1: E13-E16
• SRSF2: E01, Hotspot um Aminosäure Pro95
• DNMT3A: E07-E23

*Tabella10: Übersicht der in vorliegender Arbeit untersuchten Gene.*

### 2.3 Statistische Methoden

Die erhobenen Daten wurden in einer Microsoft Excel-Tabelle Version 97-2003 standardisiert erhoben und für die anschließenden Berechnungen in eine SPSS-Statistics 24.0 Datei konvertiert. Mittels der Statistik- und Analyse-Software SPSS-Statistics 24.0 der Softwarefirma IBM erfolgte die graphische und statistische Auswertung der gesammelten Daten. Durch Anwendung der Kaplan-Meier-Methode wurden die Überlebenswahrscheinlichkeiten geschätzt.

Die in der univariaten Analyse als signifikant auf die Überlebenszeit berechneten Parameter, wurden durch die multivariate Analyse auf deren Gewichtung mittels Cox-Modell oder proportionales Hazard-Modell überprüft.

Um einen grundlegenden Zusammenhang zwischen Variablen darzustellen, sind Korrelationsanalysen hilfreich, wenn die zu untersuchenden Variablen sich auf metrischem oder ordinalem Niveau befinden. Im Falle von kategorialen und nominalen Variablen, sind Kreuztabellen mit Hilfe von SPSS-Statistics 24.0 eine Alternative, um einen Zusammenhang zwischen jenen Variablen zu prüfen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit durch SPSS mittels Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest nach Pearson auf Signifikanz zu prüfen.

Das Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$  wurde dem Signifikanztest zugrunde gelegt. Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $p \leq 0,001$  sind dabei statistisch höchst signifikant bzw. mit  $p \leq 0,01$  sehr signifikant, mit  $p \leq 0,05$  signifikant und mit  $p > 0,05$  als nicht statistisch signifikant dargestellt.

Um geschlechtsspezifische Unterschiede darzustellen, wurden die Kreuztabellen nach Geschlecht geschichtet und ebenfalls mittels Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest nach Pearson auf Signifikanz geprüft.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientenkollektiv

In die vorliegende Arbeit wurden Daten von 166 Patienten integriert, welche die Diagnose eines myelodysplastischen Syndroms in dem Zeitraum zwischen 1986 bis 2012 erhalten haben. Die Erhebung der retro- sowie prospektiven Daten erfolgte im Zeitraum von 2012 bis 2017. Eine letzte Nachverfolgung des Patientenstatus, ein sog. „*follow-up*“, fand im September 2017 statt. Zu diesem Zeitpunkt waren 74 Patienten verstorben (44,6%) und 92 Patienten (55,4%) lebend.

#### 3.1.1 Alter und Geschlecht

Von den 166 Patienten betrug der Anteil an Frauen 47% und somit 78 Patientinnen. Der Anteil der Männer am Gesamtkollektiv lag mit 53% höher, was 88 Patienten entsprach.

Das mediane Alter des Gesamtkollektivs bei Erstdiagnose betrug 68 Jahre, wobei das Alter des jüngsten Patienten 16 Jahre und das des ältesten Patienten 87 Jahre betrug.

#### 3.1.2 Klassifikationsverteilungen

##### 3.1.2.1 FAB- Klassifikation 1982

Das gesamte Patientenkollektiv von 166 Patienten konnte nach der FAB-Klassifikation von 1982 klassifiziert werden (Abb.13).

- Danach waren Patienten mit einer refraktären Anämie (RA = refractory anaemia) mit 93 Patienten (56%) des Gesamtkollektivs am stärksten vertreten.
- Die refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung (RAEB = refractory anaemia with excess blasts) stellte mit 16,9% und 28 Patienten die zweithäufigste Gruppe dar.
- Die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML = chronic myelomonocytic leukemia), welche innerhalb der FAB-Klassifikation noch den MDS zugerechnet wurde, wurde bei 19 Patienten (11,4%) diagnostiziert.
- Mit 10,8 % und somit 18 Patienten war die Entität der refraktären Anämie mit Ringsideroblasten (RARS = refractory anemia with ringed sideroblasts) vertreten.
- Eine weitere Entität, welche in der späteren WHO-Klassifikation von 2008 der AML zugerechnet wurde, ist die refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation (RAEB-T = refractory anemia with excess blasts in transformation). Sie war mit 3 Patienten (1,8%) vertreten.

Da teilweise Patienten des Patientenkollektivs durch WHO2008 oder WHO2016 diagnostiziert wurden, ergeben sich 3 Patienten (1,8%) rückstufend ohne klare FAB-Klassifizierung, weil sie in die Gruppe der MDS/MPN overlap Entität fielen.

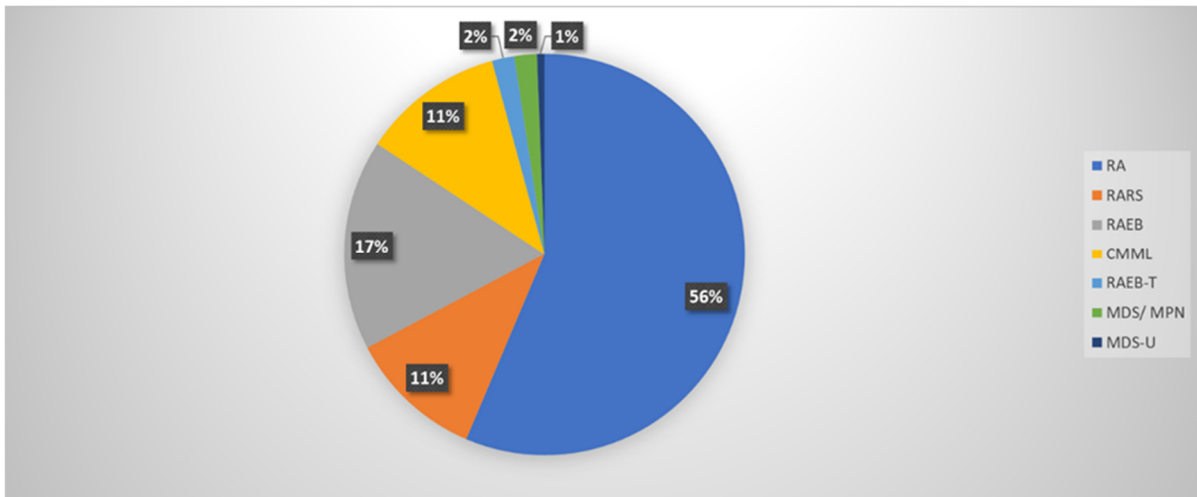


Abbildung 13: Verteilung der FAB-Subtypen im Gesamtkollektiv.

### 3.1.2.2 WHO-Klassifikation 2016

Das gesamte Patientenkollektiv von 166 Patienten konnte nach der WHO-Klassifikation von 2016 klassifiziert werden. Die Klassifikation von 2016 beinhaltet nicht nur neue Termini der einzelnen Entitäten, sondern auch drei wesentliche Änderungen der Kriterien für die Definitionen der Subklassen.

- Den größten Anteil stellten Patienten mit einem MDS mit Mehrliniendysplasie (MDS-MLD = MDS with multilineage dysplasia), früher RCMD mit 51,2% was 85 Patienten entsprach.
- MDS mit Blastenvermehrung 1 (MDS EB1 = MDS with excess blasts), früher RAEB 1, war ebenso wie MDS mit Blastenvermehrung 2, früher RAEB2, mit jeweils vierzehn Patienten (jeweils 8,4%) vertreten.
- Die MDS mit Einliniendysplasie (MDS-SLD = MDS with single lineage dysplasia), früher RA, RN und RT, lag bei 14 Patienten (8,4%) vor.
- MDS mit Ringsideroblasten und Einliniendysplasie (MDS-RS-SLD = MDS with single lineage dysplasia und Ringsideroblasten), (früher RARS) konnte bei 8 Patienten (4,8%) diagnostiziert werden.
- MDS, unklassifizierbar betraf drei Patienten (1,8%).
- Änderung: MDS mit Ringsideroblasten und Mehrliniendysplasie (MDS-RS-MLD = MDS with multilineage dysplasia und Ringsideroblasten), früher RCMD-RS, wurde wieder als eigene Entität in die WHO16 Klassifikation mit aufgenommen und stellte einen Anteil von nur 1,2%, was zwei Patienten entsprach.
- Änderung: MDS mit Deletion des Chromosom 5 (MDS del(5q)) war ebenfalls bei nur zwei Patienten vertreten (1,2%). Diese Entität inkludiert aktuell auch Patienten, welche eine zusätzliche chromosomale Aberration tragen, außer sie betrifft das Chromosom 7.



Die WHO-Klassifikation 2016 der myelodysplastisch-myeloproliferativer Neoplasien teilt die Gruppe der CMML nach peripheren und medullären Blastenanteil in drei Gruppen ein.

- Änderung: Die chronische myelomonozytäre Leukämie 0 (CMML 0 = chronic myelomonocytic leukemia 0) betraf elf Patienten und machte einen Anteil von 6,6% an der Gesamtpopulation aus. Die Diagnose der CMML1 und CMML2 wurde bei jeweils vier Patienten (jeweils 2,4%) gestellt.
- Bei drei Patienten (1,8%) bestand ein MDS/MPD overlap als Diagnose.
- Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten und Thrombozytose (RARS-T = refractory anemia with ring sideroblasts with thrombocytosis) betraf, ebenso wie die refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation (RAEB-T = refractory anemia with excess blasts in transformation), jeweils einen Patienten (0,6%).

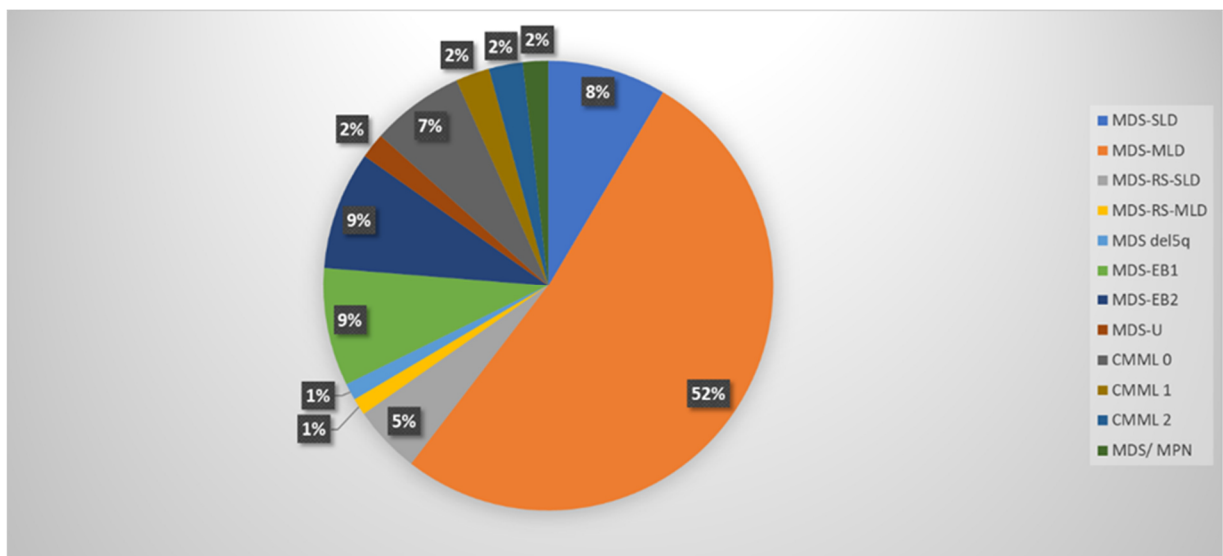


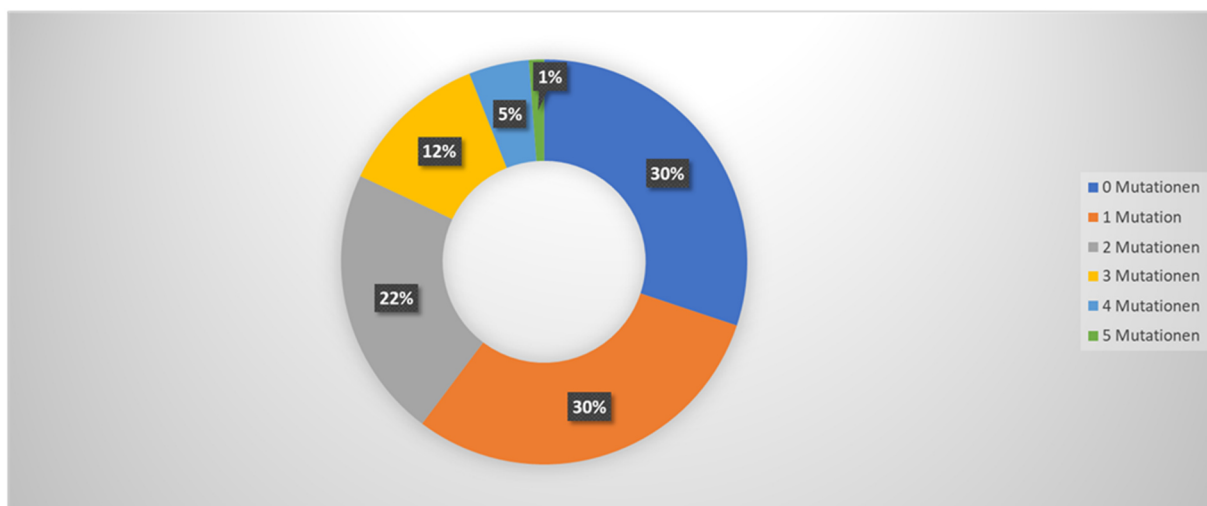
Abbildung 14: Verteilung der WHO 2016-Subtypen im Gesamtkollektiv.

### 3.1.3 Mutationsstatus

#### 3.1.3.1 Gen-Panel

Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv wurde ein Gen-Panel von insgesamt 16 Genen, sog. Biomarkern zur Analyse somatischer Mutationen angefertigt. Das Gen-Panel wurde bei den meisten Patienten bei Erstdiagnose erstellt. Bestand die Diagnose bereits, erfolgte die Erstellung bei einer Verlaufskontrolle. Bei einigen Patienten wurden bereits bestehende Marker im klinischen Alltag komplementiert. Hingewiesen sei auf das Fehlen eines Wangenschleimhautabstriches, um eine vorliegende Mutation als Keimbahnmutation ausschließen zu können. Bei einigen wenigen Patienten konnten im Verlauf der Untersuchungszeit nicht alle Biomarker vervollständigt werden.

Analysiert wurden die bei MDS am häufigsten mutierten Gene (Bejar et al. 2011) aus den Bereichen Signaltransduktion, epigenetischer Modifikation sowie Transkriptionsfaktoren oder Komponenten des Spleißosomen-Systems.



**Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung der Mutationen im untersuchten Kollektiv.**

Bei den vorliegenden Patienten konnte bei 50 Patienten (30,1%) keine Mutation in dem angelegten Gen-Panel gefunden werden. Bei dem restlichen Kollektiv (69,9%) wurden mindestens eine und maximal fünf Mutationen nachgewiesen (Abb.15).

Mit ebenfalls 30,1% und somit 50 Patienten wurde eine Mutation in einem der gelisteten Gene als mutiert beschrieben. Folgend nimmt mit steigender Anzahl an Mutationen die Anzahl an Patienten ab.

Bei 21,7% der Patienten (36 Patienten) konnten zwei Mutationen innerhalb des Panels nachgewiesen werden. Zwanzig Patienten (12%) trugen drei Mutationen, acht Patienten (4,8%) trugen vier Mutationen und bei zwei Patienten (1,2%) konnten fünf Gene als mutiert innerhalb des Panels nachgewiesen werden. Abbildung 15 veranschaulicht die Häufigkeitsverteilung der Mutationen im Kollektiv.

### 3.1.3.2 Häufigkeitsverteilung der einzelnen Mutationen

#### **RUNX1**

Eine Mutationsanalyse erfolgte in 152 Fällen (91,6%). Bei 14 Patienten (8,4%) konnte keine Analyse erfolgen. Im vorliegenden Patientenkollektiv konnte bei 32 Patienten (21,1%) eine Mutation im RUNX1-Gen nachgewiesen werden.

#### **TET2**

Mit 163 Mutationsanalysen des TET2-Gens konnte fast das gesamte Patientenkollektiv (98,2%) untersucht werden. Dabei zeigte sich bei 30,7% der Patienten ein positiver Mutationsnachweis und bei 69,3% ein unauffälliger Befund. Drei Patienten (1,8%) wurden nicht getestet.

#### **JAK2**

Die Mutationsanalyse konnte bei 79 Patienten (47,6%) erfolgen und verblieb bei 96,2% der Patienten unauffällig. Bei 3,8% der Patienten konnte ein positiver Mutationsnachweis erbracht werden.

#### **FLT3**

Eine Analyse war für 135 Patienten des Gesamtkollektivs möglich. Bei 3,7% der Patienten konnte eine Mutation des Gens nachgewiesen werden, somit waren 96,3% der Patienten frei von somatischen Mutationen im FLT3-Gen.

## **MLL-PTD**

Eine Mutationsanalyse erfolgte in 143 Fällen (86,1%). Bei 23 Patienten (13,9%) konnte keine Analyse erfolgen. Im vorliegenden Patientenkollektiv wurde bei 6 Patienten (4,2%) eine Mutation im Gen nachgewiesen werden.

## **KRAS**

Eine Mutation im KRAS-Gen trugen 4 (2,5%) der 160 untersuchten Patienten (96,4%).

## **NRAS**

Die Mutationsrate für NRAS stellte sich annähernd gleich dar. Bei sechs Patienten (3,9%) der 154 getesteten Patienten (92,8%) konnte eine somatische Mutation nachgewiesen werden, womit 96,1% keine Mutationsträger waren.

## **CBL**

Eine Mutation des CBL-Gens wurde bei drei (2,2%) von 137 (82,5%) getesteten Patienten gefunden.

## **ASXL1**

Die Rate an ASXL1 Mutationen betrug 23,5% und betraf somit 36 von 153 (92,2%) getesteten Patienten.

## **IDH1**

Bei vier (3,1%) von 128 getesteten Patienten (77,1%) zeigte sich ein positiver Mutationsstatus.

## **IDH2**

Bei 129 Patienten (77,7%) wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt und bei vier Patienten (3,1%) konnte ein positiver Mutationsstatus gefunden werden. Bei 37 Patienten (22,3%) konnte keine Mutationsanalyse durchgeführt werden.

## **TP53**

Von 135 Patienten (81,3% des Patientenkollektivs) konnte bei neun Patienten (6,7%) eine TP53 Mutation nachgewiesen werden. 93,3% Patienten verblieben unauffällig. Bei 31 Patienten des Gesamtkollektivs konnte keine Analyse erfolgen.

## **EZH2**

Eine Mutationsanalyse erfolgte bei 117 Patienten (70,5%). Bei 8,5% der Patienten (10 Patienten) wurde eine Mutation des EZH2-Gens nachgewiesen.

## **SF3B1**

Von 166 Patienten wurden 80 Patienten getestet (48,2%). Bei 22 Patienten (27,5%) konnte eine SF3B1-Mutation nachgewiesen werden. 58 Patienten (72,5%) trugen keine Mutation.

## **SRSF2**

Eine Mutation des SRSF2-Gens konnte bei 15 Patienten (19,5%) von 77 getesteten Patienten (46,4%) nachgewiesen werden.

## **DNMT3A**

Bei 13,9% (15 Patienten) der 108 getesteten Patienten konnte eine Mutation nachgewiesen werden. 93 Patienten trugen keine DNMT3A Mutation. 58 Patienten wurden nicht getestet.



Abbildung 16: Häufigkeiten der einzelnen Mutationen im Kollektiv.

### **3.1.4 Häufigkeiten & Verteilung der klinischen Parameter**

Die klinischen Parameter des gesamten Patientenkollektivs – Hämoglobin, Thrombozyten, Leukozyten, neutrophile Granulozyten, Blasten im Knochenmark sowie die zytogenetische Untersuchung – wurden bei Erstdiagnose erhoben.

#### **3.1.4.1 Hämoglobin**

Für 146 Patienten des Kollektivs konnte der Hämoglobingehalt bei Erstdiagnose ermittelt werden. Bei zwanzig Patienten lag dieser Parameter bei Erstdiagnose nicht vor. Das Minimum lag bei 4,7 g/dl, das Maximum bei 16,3 g/dl. Der Hämoglobin-Mittelwert lag bei 9,9 g/dl, der Median lag bei 9,95 g/dl.

#### **3.1.4.2 Thrombozyten**

Die Thrombozyten verteilten sich bei Erstdiagnose zwischen 4,000-717,000/ $\mu$ l. Daraus ergab sich ein Mittelwert von 156,468/ $\mu$ l. Der Median lag bei 111,000/ $\mu$ l. Für 145 der 166 Patienten konnte der Thrombozytenwert bei Erstdiagnose ermittelt werden. Bei 21 Patienten war er zum Zeitpunkt der Erstdiagnose fehlend.

#### **3.1.4.3 Leukozyten**

Für 146 Patienten konnten die Leukozytenwerte bei Erstdiagnose ermittelt werden. Bei einem Mittelwert von 5,421/ $\mu$ l lag das Minimum bei 900/ $\mu$ l und das Maximum bei 46,000/ $\mu$ l. Der Median für die Leukozyten lag bei 3,450/ $\mu$ l.

#### **3.1.4.4 Neutrophile Granulozyten**

Mit einem Mittelwert von 2924/ $\mu$ l und einem Median von 1620/ $\mu$ l, konnten die neutrophilen Granulozyten bei 135 Patienten bei ED ermittelt werden. Das Minimum lag bei 30/ $\mu$ l und das Maximum bei 32,200/ $\mu$ l.

#### **3.1.4.5 Blasten im Knochenmark**

Bei Erstdiagnose konnten bei 138 Patienten des Kollektivs Blasten im Knochenmark bestimmt werden. Bei 28 der 166 Patienten lagen keine Befunde bei Erstdiagnose vor. Der Mittelwert lag bei 5,17%. Das Minimum lag bei 0% und das Maximum bei 28% Blasten im Knochenmark. Der Median betrug 4%.

### 3.1.4.6 Zytogenetik

Eine Zytogenetik konnte bei 153 Patienten (92,2%) bestimmt werden. Bei 37,3% der Patienten zeigte sich eine auffällige Zytogenetik, bei 62,7% verblieb die zytogenetische Untersuchung ohne pathologischen Befund. Lediglich bei 7,8% lag keine zytogenetische Untersuchung bei Erstdiagnose vor.

### 3.1.5 Häufigkeiten Prognose-Scores

Für das gesamte Patientenkollektiv wurde bei Erstdiagnose mit Hilfe des International Prognostic Scoring System (Greenberg et al. 1997) sowie mit Hilfe des Revised International Prognostic Scoring System (Greenberg et al. 2012) die Prognose der Patienten geschätzt.

#### 3.1.5.1 IPSS

Die Risikostratifizierung nach IPSS konnte für 110 Patienten (66,3% des Gesamtkollektivs) erfolgen. Bei 56 war aufgrund des Fehlens einer der notwendigen Parameter bei Erstdiagnose keine Berechnung möglich. Das Punkteminimum lag bei 0 Punkten, das Maximum bei 3,5 Punkten. Der Mittelwert betrug 0,6 Punkte, der Median 0,5 Punkte.

31,8% der Patienten (35 Patienten) fielen in die low-risk Kategorie. Die Mehrheit belegte die Kategorie intermediate-risk I mit 47,3% (52 Patienten). Die Kriterien für die Intermediate-risk II Kategorie belegten 15,5% des Kollektivs. Der High-risk Kategorie wurden 5,5% der Patienten (6 Patienten) zugeordnet (Abb.17).

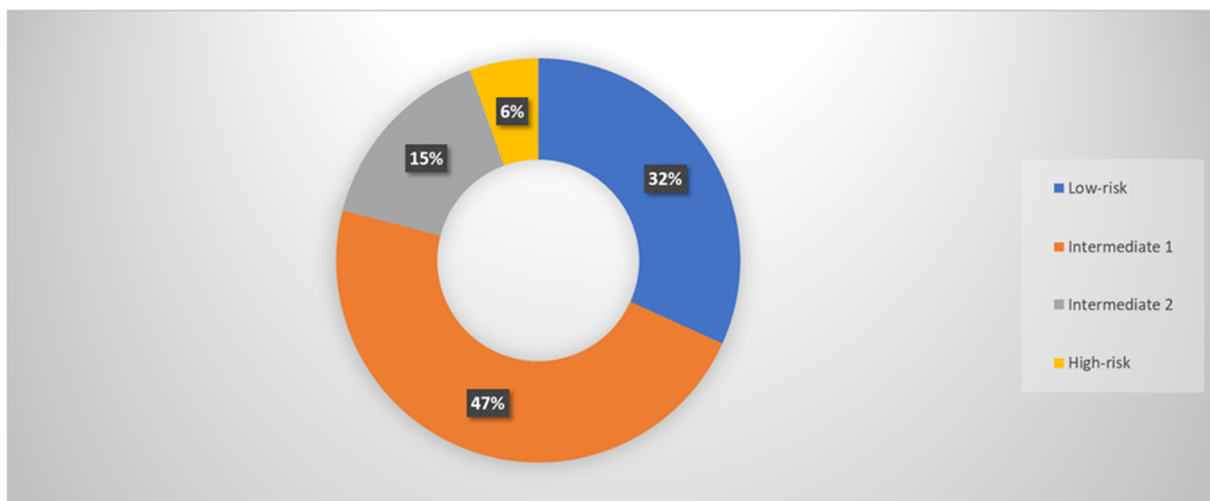


Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der IPSS-Kategorie im Kollektiv.

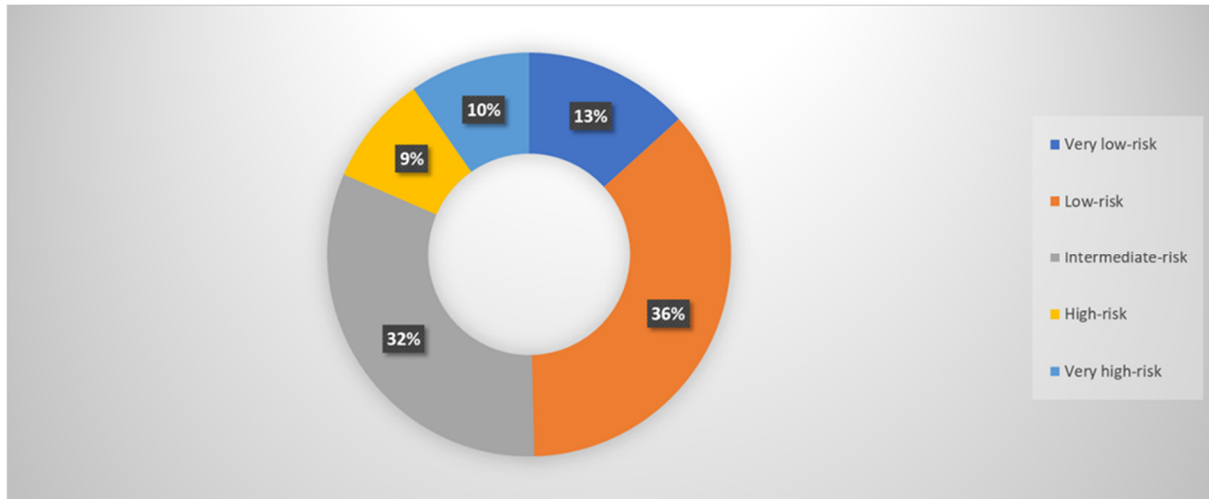
### 3.1.5.2 IPSS-R

Für 113 Patienten (68,1% des Kollektivs) konnte eine Risikostratifizierung nach IPSS-R erfolgen.

Das Punkteminimum lag bei 0 Punkten, das Maximum bei 8,5 Punkten. Der Mittelwert betrug 3,4 Punkte, der Median lag bei 3,5 Punkten.

13,3% des Patientenkollektivs (15 Patienten) fielen nach Score in die very-low-risk Kategorie. In die low-risk Kategorie fielen 41 Patienten, 36,3% (Abb.18).

In die Kategorien intermediate, high-risk und very high-risk fielen jeweils 31,9% (36 Patienten), 8,8% (10 Patienten) und 9,7% (11 Patienten) der Patienten.



*Abbildung 18: Prozentuale Verteilung der IPSS-R Kategorie im Kollektiv.*

## 3.2 Prognose

### 3.2.1 Überleben des gesamten Patientenkollektivs

Von den 166 inkludierten Patienten verstarben bis zum Ende des Beobachtungszeitraums 74 Personen. Die mediane Überlebenszeit (ÜZ) betrug 5,7 Jahre (95% CI 3,5-7,8). Dies stellt die Kaplan-Meier-Kurve (Abbildung 19) dar.

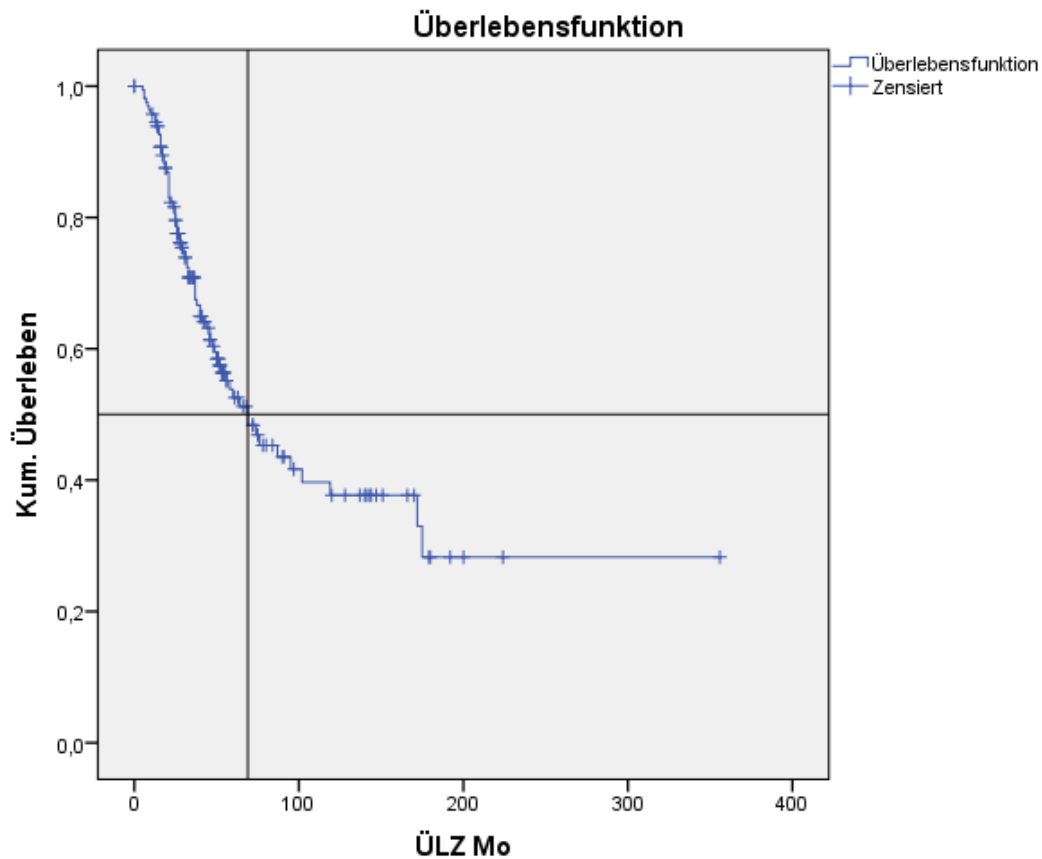


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben des untersuchten Patientenkollektivs. ÜLZ Mo= Überlebenszeit in Monaten, Kum. Überleben = kumulatives Überleben.



### 3.2.2 Überleben nach Mutationsstatus

#### 3.2.2.1 Überleben nach Anzahl an Mutationen

Innerhalb des Kollektivs zeigte sich, dass die Anzahl an vorhandenen Mutationen der untersuchten Gene mit einer Reduktion der medianen Überlebenszeit korrelierte.

Von den untersuchten 166 Patienten trugen 69,9% mindestens eine Mutation.

Die mediane Überlebenszeit für Patienten ohne Mutationsnachweis wurde auf 14,5 Jahre geschätzt (95% CI 0,9-28). Für Patienten welche eine Mutation trugen, konnte eine mediane Überlebenszeit von 5,7 Jahren geschätzt werden (95% CI 3,6-7,75), welche sich bis auf 0,4 Jahre reduzierte, bei Trägern der maximalen Anzahl von fünf Mutationen.

Die Anzahl an mutierten Genen pro Patient, zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit an ( $p < 0,001$ ). Dies stellt die Kaplan-Meier-Kurve (Abbildung 20) dar.

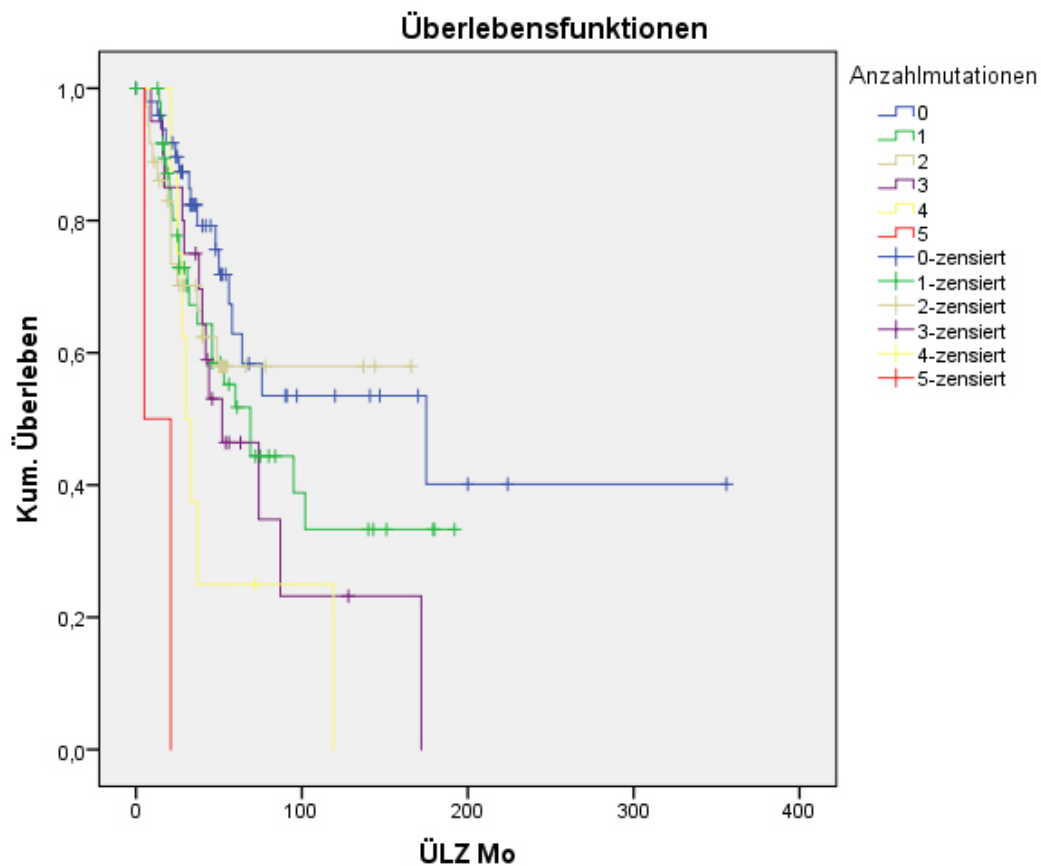


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf die Anzahl an mutierten Genen im Patientenkollektiv. ÜLZ Mo = Überlebenszeit in Monaten, Kum. Überleben = kumulatives Überleben.

### 3.2.2.2 RUNX1

Ein **signifikanter** Einfluss auf die Überlebenszeit konnte für einen positiven RUNX1-Mutationsstatus ( $p=0,006$ ) demonstriert werden. Die mediane Überlebenszeit für RUNX1-Mutationsträger betrug 3,16 Jahre (95% CI 2,49-3,84) versus 6,3 Jahre für Patienten mit RUNX1-WT (95% CI 3,89-8,76).

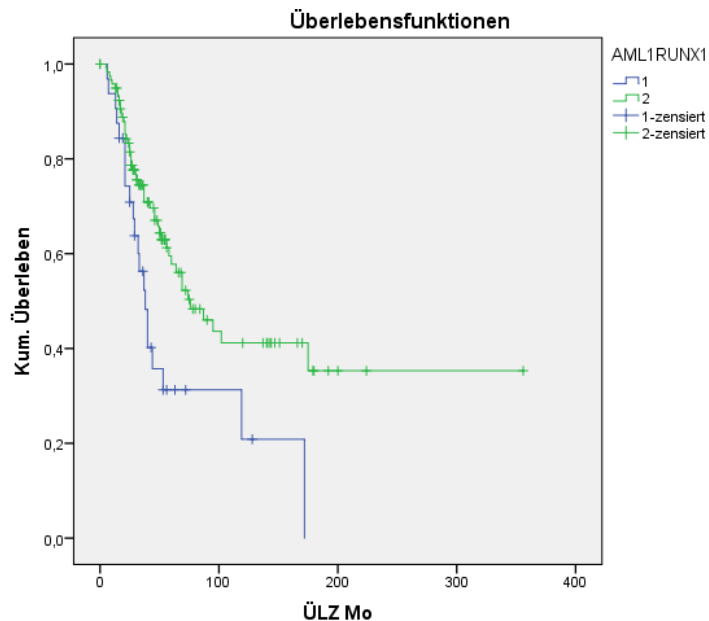


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den RUNX1-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.3 TET2

Die mediane Überlebenszeit für Träger einer TET2-Mutation lag bei 7,2 Jahren (95% CI 4,36-10,13) versus 4,8 Jahre für Patienten mit TET2-WT (95% CI 2,82-6,84). Ein signifikanter Einfluss konnte nicht demonstriert werden ( $p=0,430$ ).

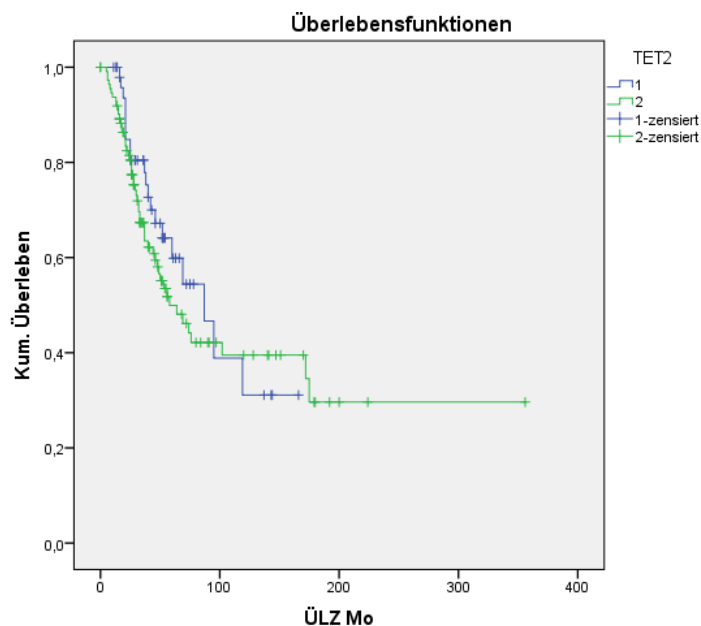


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den TET2-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.4 JAK2

Ein positiver Mutationsnachweis konnte nur bei 3,8% der untersuchten Patienten erfolgen. Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte nicht demonstriert werden ( $p=0,774$ ). Die mediane Überlebenszeit für Träger einer JAK2-Mutation lag bei 6,1 Jahren (95% CI nicht angegeben) versus 4,8 Jahre für Patienten mit JAK2-WT (95% CI 3,76-5,90).

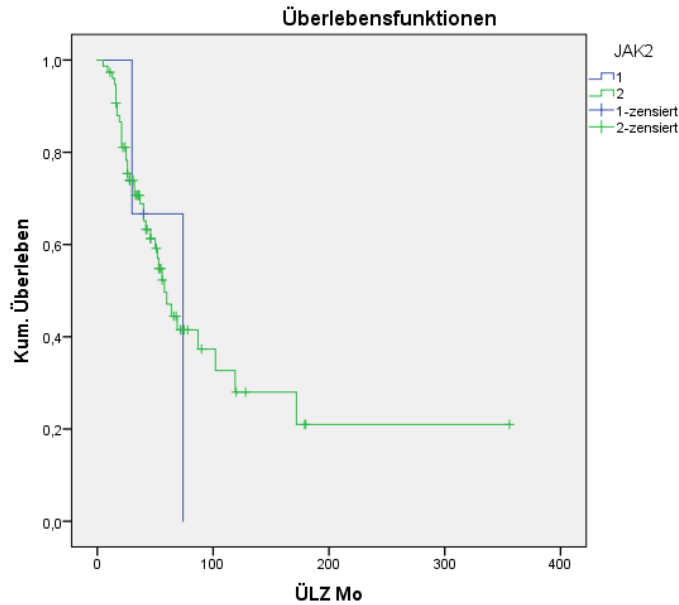


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den JAK2-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.5 FLT3

Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte nicht demonstriert werden ( $p=0,312$ ). Die mediane Überlebenszeit für Träger einer FLT3-Mutation lag bei 2,4 Jahren (95% CI 0,98-3,84) versus 5,3 Jahre für Patienten mit FLT3-WT (95% CI 3,79-6,87).

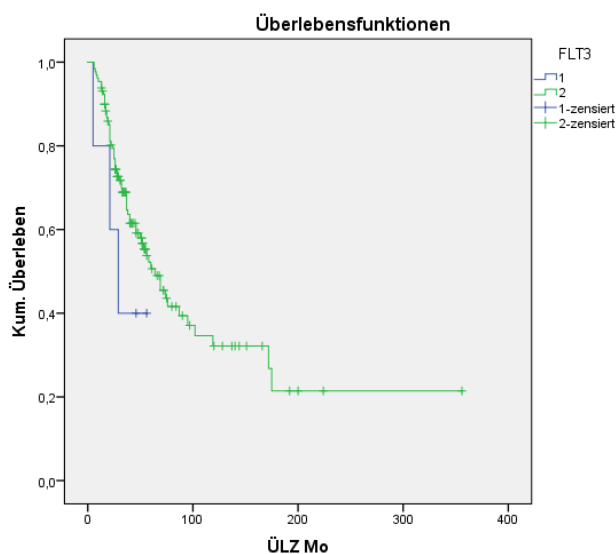


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den FLT3-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.6 MLL-PTD

4,2% der untersuchten Patienten trugen eine MLL-PTD-Mutation, welche sich nicht signifikant auf die Überlebenszeit auswirkte ( $p=0,250$ ). Die mediane Überlebenszeit für Träger einer MLL-PTD-Mutation lag bei 2,3 Jahren (95% CI 0,00-5,41) versus 6,16 Jahre für Patienten mit MLL-WT (95% CI 3,11-9,21).

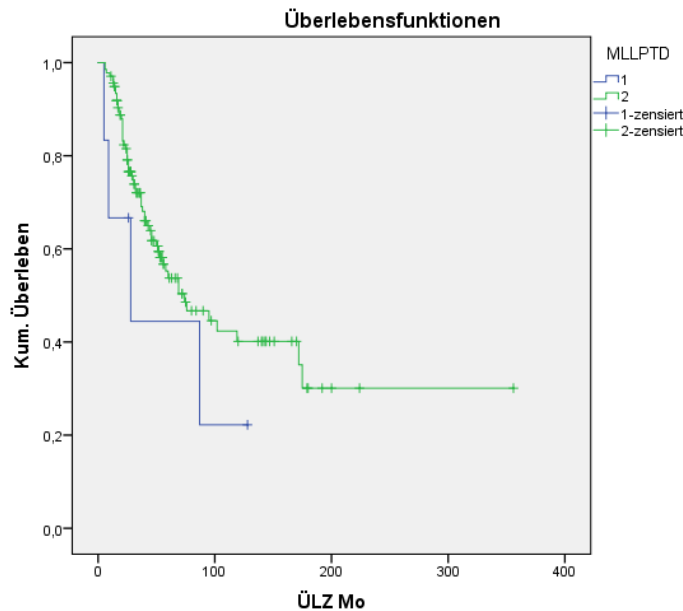


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den MLL-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.7 KRAS

Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte nicht demonstriert werden ( $p=0,418$ ). Die mediane Überlebenszeit für Träger einer KRAS-Mutation lag bei 3,5 Jahren (95% CI 0,88-6,11) versus 5,7 Jahre für Patienten mit KRAS-WT (95% CI 3,40-8,09).

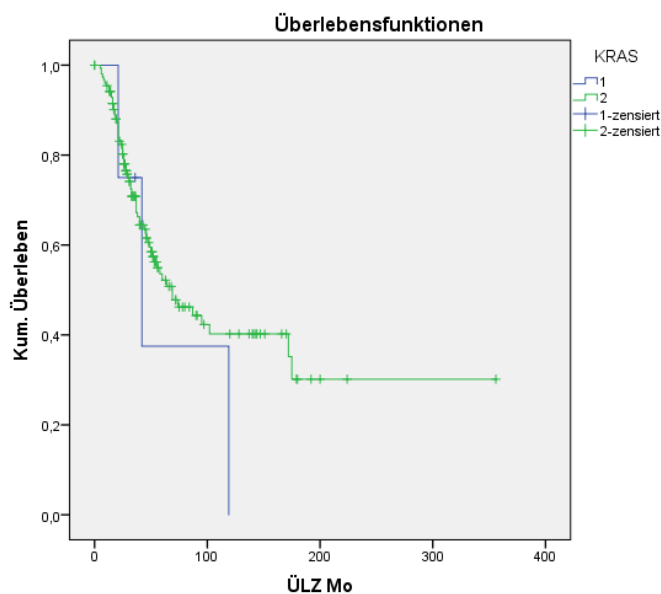


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den KRAS-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.8 NRAS

Ein **signifikanter** Einfluss auf die Überlebenszeit konnte auch für einen positiven NRAS-Mutationsstatus ( $p=0,022$ ) demonstriert werden. Die mediane Überlebenszeit für NRAS-Mutationsträger betrug 2,5 Jahre (95% CI 0,69-4,3) versus 5,7 Jahre für Patienten mit NRAS-WT (95% CI 3,72-7,77).

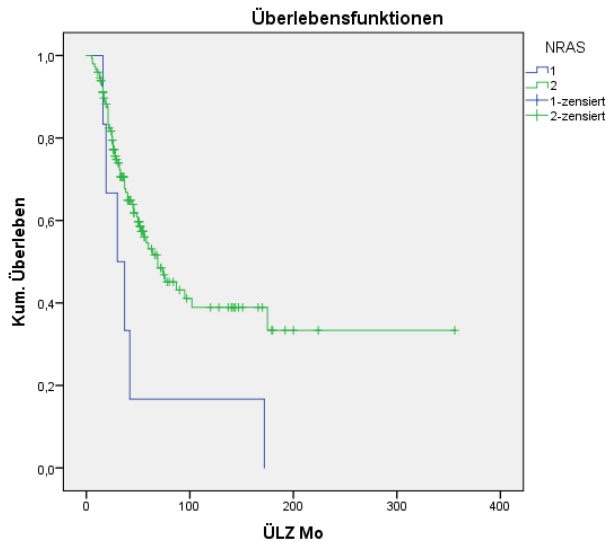


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den NRAS-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.9 CBL

CBL-Mutationen gehören zu den seltenen Mutationen bei den MDS. In dem vorliegenden Kollektiv betrug die Häufigkeit 2,2%. Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte nicht demonstriert werden ( $p=0,898$ ). Die mediane Überlebenszeit für Träger einer CBL-Mutation konnte nicht berechnet werden. Die mediane ÜZ für Patienten mit CBL-WT betrug 7,25 Jahre (95% CI 4,01-10,48).

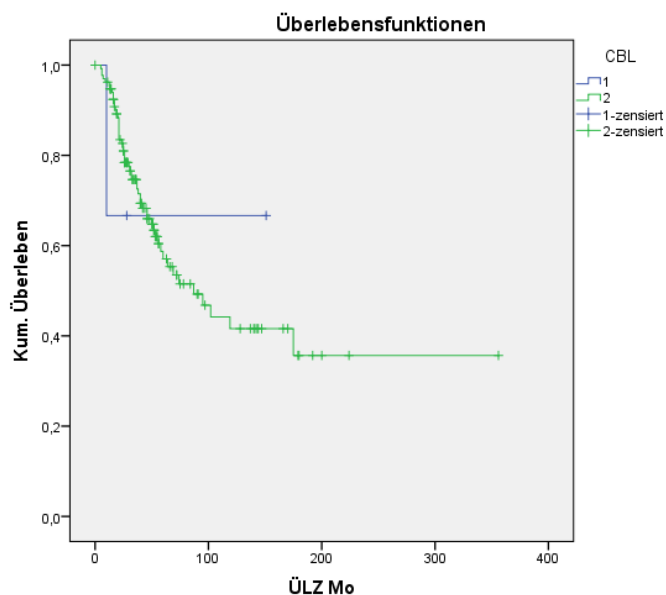


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den CBL-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.10 ASXL1

Ein **signifikanter** Einfluss auf die Überlebenszeit konnte auch für einen positiven ASXL1-Mutationsstatus ( $p=0,001$ ) demonstriert werden. Die mediane Überlebenszeit für ASXL1-Mutationsträger betrug 3,16 Jahre (95% CI 1,80-4,52) versus 7,9 Jahre für Patienten mit ASXL-WT (95% CI 0,00-16,16).

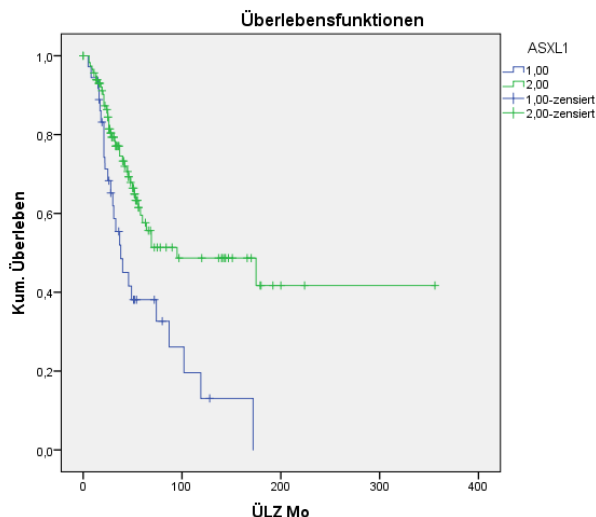


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den ASXL1-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.11 IDH1

IDH1-Mutationen gehören ebenfalls zu den seltenen Mutationen innerhalb der MDS. In dem vorliegenden Kollektiv betrug die Häufigkeit nur 3,1%. Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte nicht demonstriert werden ( $p=0,370$ ). Die mediane Überlebenszeit für Träger einer IDH1-Mutation lag bei 2,3 Jahren (95% CI nicht angegeben) versus 5,75 Jahre für Patienten mit IDH1-WT (95% CI 2,83-8,58).

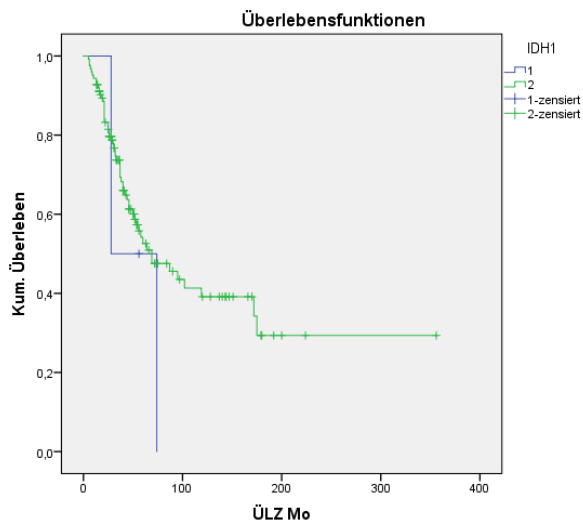


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den IDH1-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.12 IDH2

Mutationen des IDH2-Gens wurde im vorliegenden Patientenkollektiv nur bei 3,1% der Patienten nachgewiesen. Ein **signifikanter** Einfluss auf die Überlebenszeit konnte demonstriert werden ( $p=0,031$ ). Die mediane Überlebenszeit für Träger einer IDH2-Mutation lag bei 0,75 Jahren (95% CI 0,00-3,03) versus 5,75 Jahre für Patienten mit IDH2-WT (95% CI 3,38-8,11).

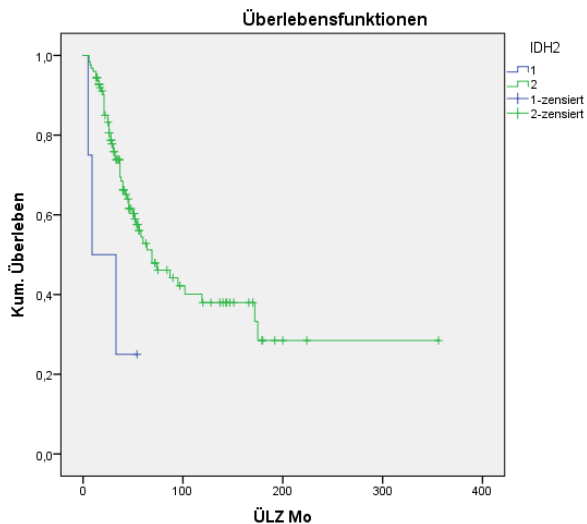


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den IDH2-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.13 TP53

Ein klar **signifikanter** Einfluss auf die Überlebenszeit konnte für einen positiven TP53-Mutationsstatus ( $p<0,001$ ) demonstriert werden. Die mediane Überlebenszeit für TP53-Mutationsträger betrug 1,6 Jahre (95% CI 0,93-2,39) versus 5,57 Jahre für Patienten mit TP53-WT (95% CI 3,58-7,91).

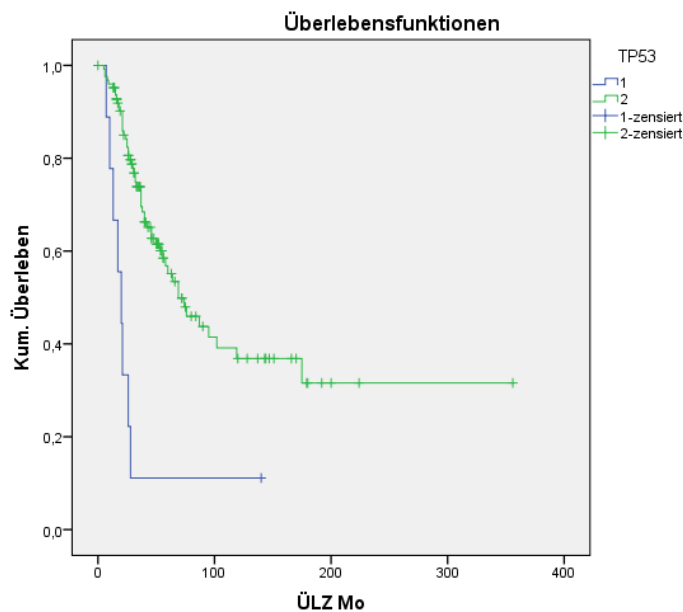


Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den TP53-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.14 EZH2

Einen ebenfalls **signifikanten** Einfluss hatte ein positiver EZH2-Mutationsstatus auf die Überlebenszeit ( $p= 0,011$ ). Die mediane Überlebenszeit für EZH2-Mutationsträger betrug 1,75 Jahre (95% CI 0,02-3,47) versus 6,16 Jahre für Patienten mit EZH2-WT (95% CI 3,5-8,75).

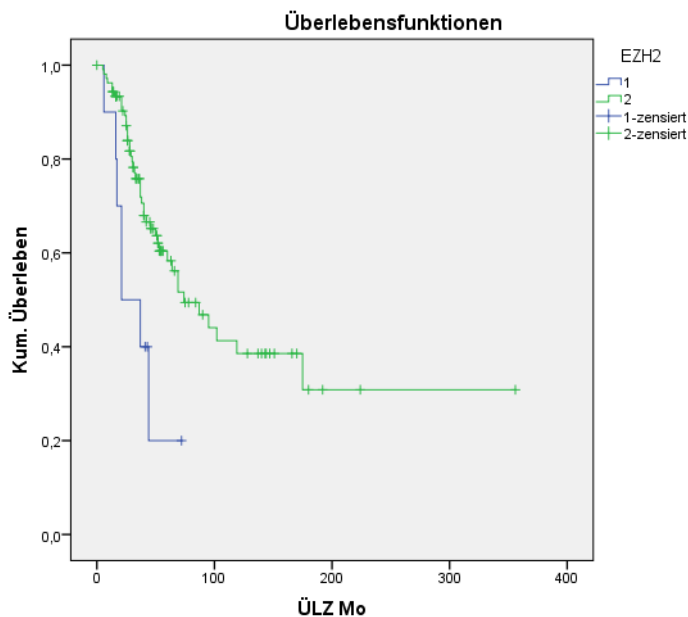


Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den EZH2-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.15 SF3B1

Eine SF3B1-Mutation konnten bei 27,5% des Patientenkollektivs nachgewiesen werden. Auch SF3B1 zeigt einen **signifikanten** Einfluss auf die Überlebenszeit ( $p=0,014$ ). Die mediane Überlebenszeit konnte für SF3B1 mutierte Patienten nicht berechnet werden, da diese noch nicht erreicht wurde. Ein Schätzer und ein CI wurden somit nicht angegeben. Patienten mit einem SF3B1-WT hatten eine deutlich schlechtere Prognose.

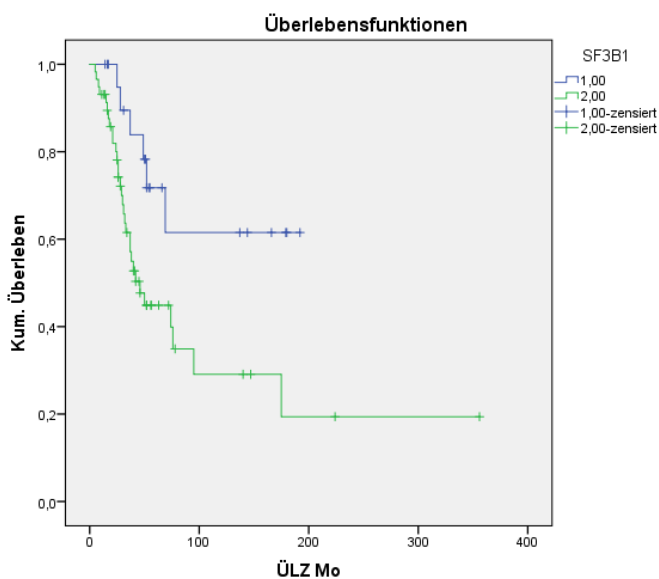


Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den SF3B1-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.



### 3.2.2.16 SRSF2

Mutationen wurden im vorliegenden Patientenkollektiv bei 19,5% der Patienten nachgewiesen. Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte nicht demonstriert werden ( $p=0,223$ ). Die mediane Überlebenszeit lag bei 2,75 Jahren (95% CI 1,33-4,16) versus 6,1 Jahre für Patienten mit SRSF2-WT (95% CI 2,5-9,75).

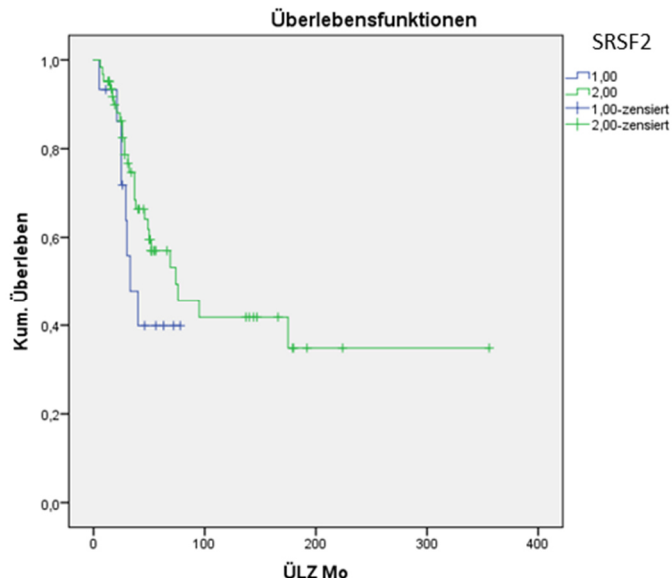


Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den SRSF2-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.2.17 DNMT3A

Mutationen des DNMT3A-Gens wurden bei 13,9% der Patienten nachgewiesen. Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte nicht demonstriert werden ( $p=0,719$ ). Die mediane Überlebenszeit lag bei 4,3 Jahren (95% CI 2,84-5,82) versus 6,3 Jahre für Patienten mit DNMT3A-WT (95% CI 3,23-9,41).

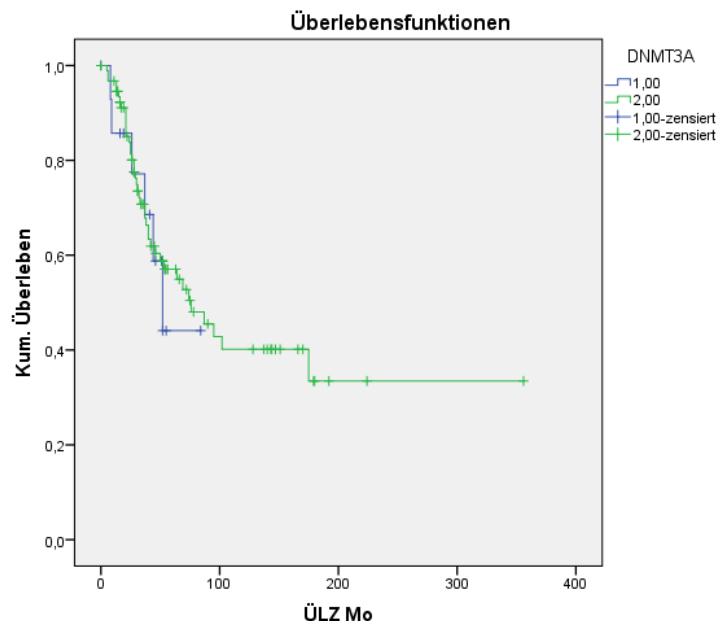


Abbildung 36: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den DNMT3A-Mutationsstatus. Die Zahl „1“ kodiert für eine Mutation, die Zahl „2“ für den Wildtyp.

### 3.2.3 Überleben nach klinischen Parametern

#### 3.2.3.1 Hämoglobin

Für das Patientenkollektiv wurde die Prognose nach IPSS und IPSS-R abgeschätzt, welche jeweils den Hämoglobinwert der Patienten berücksichtigten.

Für die Erstellung der Überlebenskurven wurden die Patienten nach den vorgegebenen Hb-Grenzwerten der Prognose-Scores eingeteilt.

Nach IPSS wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt: 73 Patienten wiesen einen Hb <10 g/dl auf und 73 Patienten einen Hb >10 g/dl. Die mediane ÜZ bei Patienten mit einem Hb <10 g/dl betrug 3,3 Jahre (95% CI 1,83-4,75), wohingegen die mediane ÜZ bei einem Hb >10 g/dl bei 7,9 Jahren (95% CI konnte nicht berechnet werden) lag.

Der Hb-Wert nach IPSS bei ED zeigte sich als statistisch **signifikant** ( $p=0,002$ ).

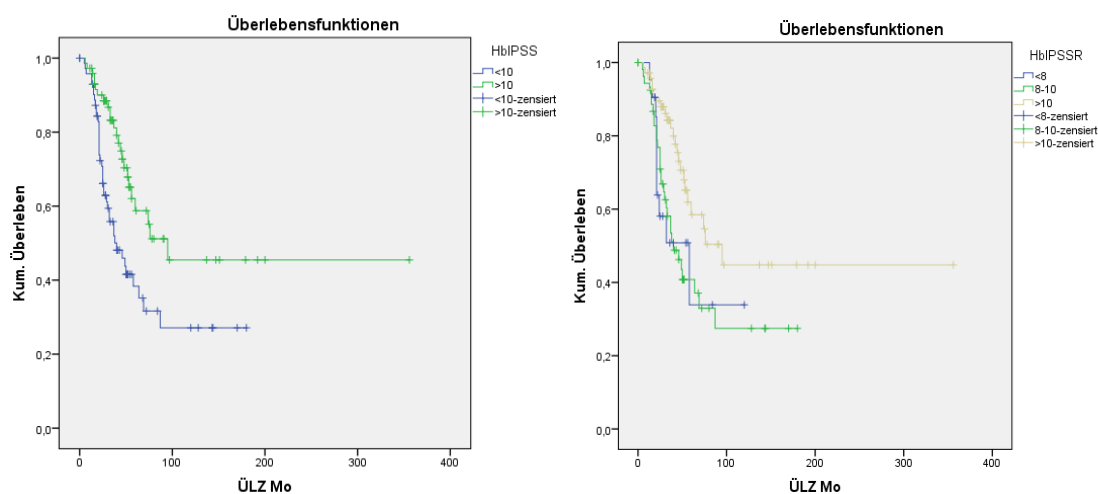


Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurven für den Hb nach IPSS und den Hb nach IPSSR.

Nach IPSS-R wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt: <8 g/dl, 8-10 g/dl und >10 g/dl.

Die mediane ÜZ bei einem Hb <8 g/dl betrug 4,8 Jahre (95% CI 6,96-8,50) bei einem Hb zwischen 8 und 10 g/dl 3,3 Jahren (95% CI 2,02-4,63) und bei einem Hb >10 g/dl 7,9 Jahre (95% CI 4,06-11,76). Die Einteilung der Hb-Werte nach IPSS-R bei ED zeigte sich ebenfalls statistisch **signifikant** ( $p=0,015$ ).

#### 3.2.3.2 Thrombozyten

Nach IPSS wurden die Patienten für die Auswertung der Thrombozyten in zwei Gruppen (</>100,000/ $\mu$ l) eingeteilt.

Bei 66 Patienten lag der Wert der Thrombozyten <100,000/ $\mu$ l und war mit einer medianen ÜZ von 3,3 Jahren (95% CI 2,26-4,40) assoziiert. Bei 79 Patienten lagen die Thrombozyten über 100,000/ $\mu$ l und waren mit einer medianen ÜZ von 5,7 Jahren (95% CI 2,91-8,52) vergesellschaftet. Auch hier war das Ergebnis statistisch **signifikant** ( $p=0,006$ ).

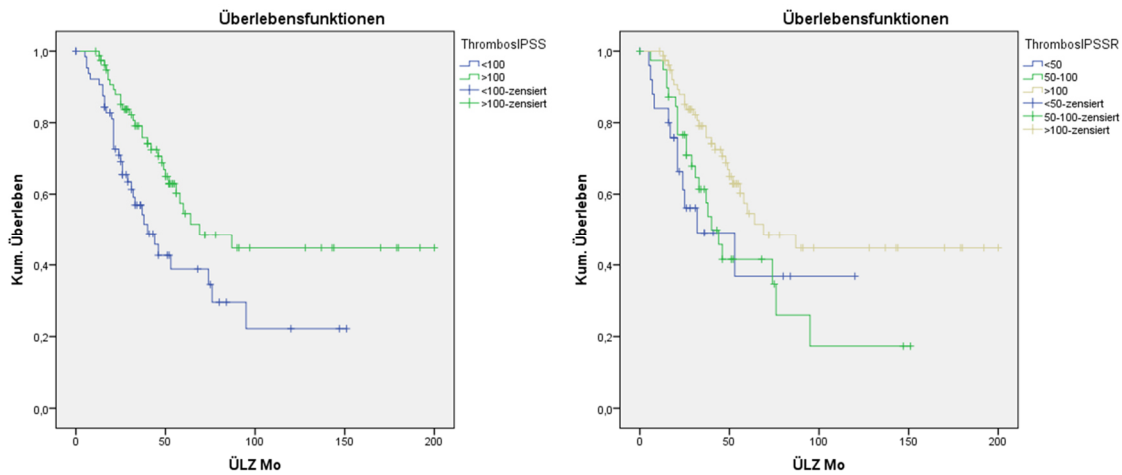


Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurven für die Thrombozytenwerte nach IPSS und IPSSR.

Nach IPSS-R erfolgte die Einteilung der Thrombozyten in <50 / 50-100 / >100.000/  $\mu$ l. Sechszwanzig Patienten wiesen weniger als 50.000 Thrombozyten/ $\mu$ l auf und eine mediane ÜZ von 2,6 Jahren (95% CI 0,00-5,33) auf. Vierzig Patienten zeigten Thrombozytenwerte zwischen 50.000-100.000/  $\mu$ l und eine mediane ÜZ von 3,3 Jahren (95% CI 2,50-4,15). Bei 79 Patienten mit über 100.000 Thrombozyten/ $\mu$ l bestand eine mediane ÜZ von 5,7 Jahren (95% CI 3,39-8,52). Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls statistisch **signifikant** ( $p=0,019$ ).

### 3.2.3.3 Leukozyten

Da der Einfluss der Leukozytenzahl nicht in den IPSS oder IPSS-R einfließt, wurden die bestehenden Werte in 5000er Schritten von <5.000/ $\mu$ l bis >20.000/ $\mu$ l eingeteilt (Abbildung 39). Insgesamt zeigt sich kein signifikanter Einfluss auf das Überleben ( $p=0,944$ ).

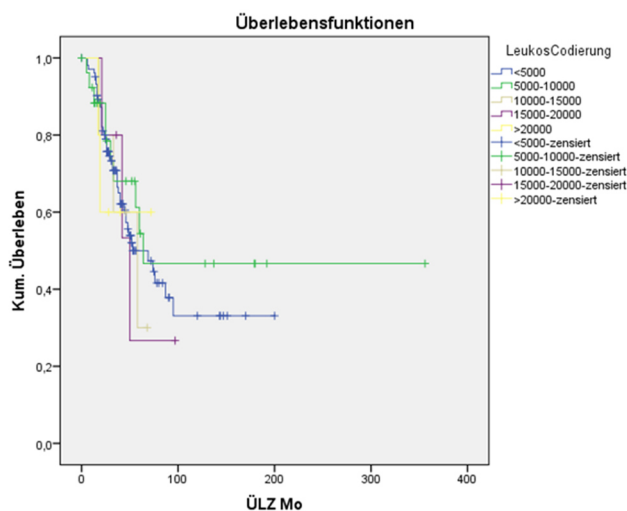


Abbildung 39: Kaplan-Meier-Kurve für die Leukozytenwerte nach Schichtung.

### 3.2.3.4 Neutrophile Granulozyten

Nach IPSS wurden 77 Patienten in die Gruppe  $<1.800$  ANC/ $\mu\text{l}$  und 58 Patienten in die Gruppe  $>1.800$  ANC/ $\mu\text{l}$  eingeteilt, wodurch für die erste Gruppe eine mediane ÜZ von 4 Jahren (95% CI 3,27-4,66) und für die zweite Gruppe eine mediane ÜZ von 5,7 Jahren (95% CI 3,69-7,45) ermittelt werden konnte. Insgesamt war das Ergebnis nicht signifikant ( $p=0,102$ ).

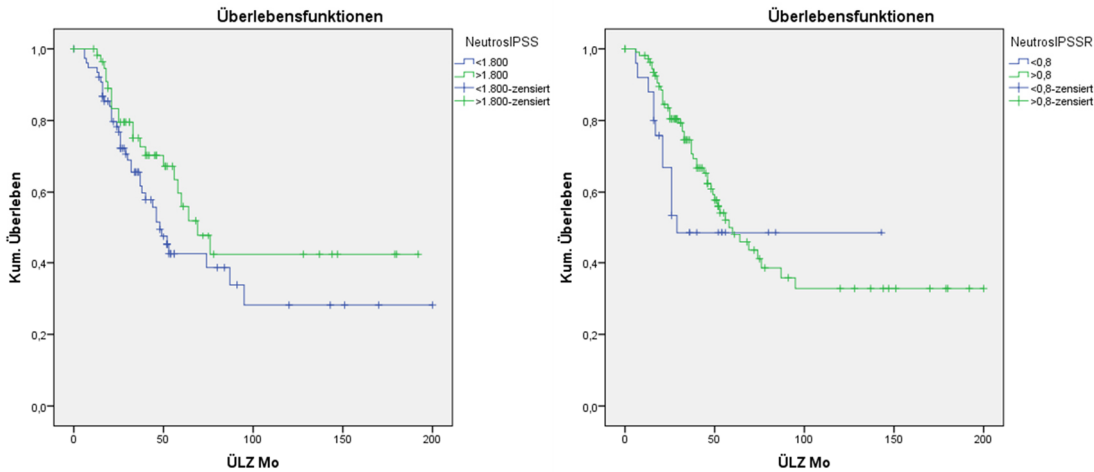


Abbildung 40: Kaplan-Meier-Kurven für die Neutrophilenwerte nach IPSS und IPSS-R.

Für die Einteilung nach IPSS-R zeigte sich ein ähnliches, nicht signifikantes Ergebnis ( $p=0,271$ ). Fünfundzwanzig Patienten wurden in die Gruppe ANC  $<0,8/\mu\text{l}$  und 110 in die Gruppe  $>0,8/\mu\text{l}$  eingeteilt. Für die Patienten mit einer deutlich erniedrigten Neutrophilenzahl betrug die mediane ÜZ 2,4 Jahre (95% CI nicht angegeben), für die Patienten mit einer ANC  $>0,8/\mu\text{l}$  betrug diese 5 Jahre (95% CI 3,41-6,19).

### 3.2.3.5 Blastenanteil im Knochenmark

Ebenfalls wurden die Blasten im KM bei ED in die entsprechenden IPSS und IPSS-R Gruppierungen eingeteilt und die ÜZ nach Kaplan-Meier geschätzt.

Nach IPSS zeigte sich ein **signifikanter** Einfluss auf das Überleben ( $p=0,006$ ).

Patienten mit 0-4% Blasten im KM wiesen eine mediane ÜZ von 5,7 Jahren auf (95% CI 4,02-7,47). Bei einem Anteil von 5-10% Blasten im KM betrug die mediane ÜZ 4,8 Jahre (95% CI 2,76-6,89). Bei 11-20% Blasten 2,7 Jahre (95% CI 0,00-7,36). Innerhalb der Gruppe von Patienten mit 21-29% Blasten im KM betrug die mediane ÜZ 2,1 Jahren (95% CI 0,68-3,65).

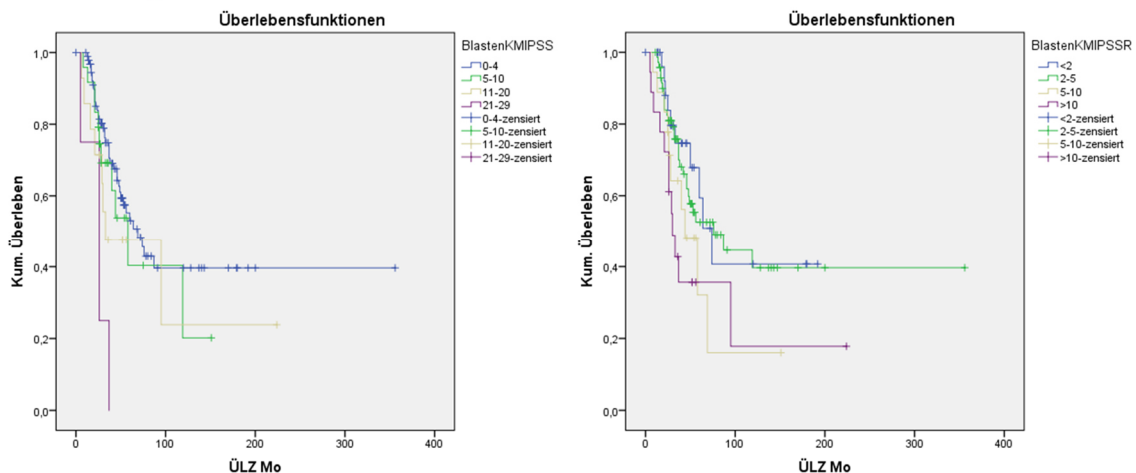


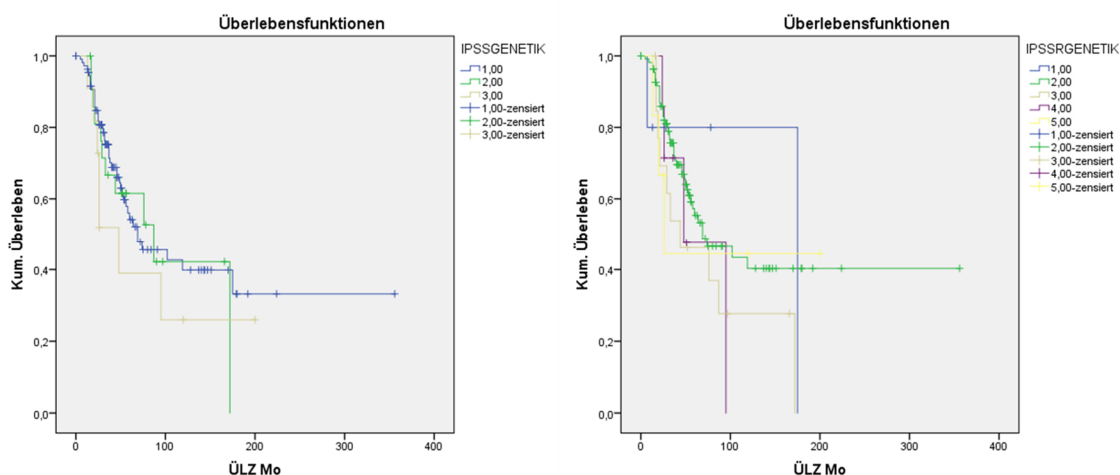
Abbildung 41: Kaplan-Meier-Kurven für den Blastenanteil im KM nach IPSS und IPSS-R.

Das Ergebnis nach IPSS-R zeigt jedoch keinen signifikanten Einfluss ( $p=0,064$ ).

Patienten mit einem Anteil  $< 2\%$  Blasten bei ED zeigten eine mediane ÜZ von 6,1 Jahren (95% CI 4,47-7,86). Bei einem Anteil von 2-5% Blasten lag die mediane ÜZ bei 6,3 Jahren (95% CI 2,53-10,13), bei 5-10% Blasten bei 3,6 Jahren (95% CI 2,12-5,29), bei  $>10\%$  Blasten 2,5 Jahre (95% CI 1,85-3,14).

### 3.2.3.6 Zytogenetik

Nach IPSS werden die zytogenetischen Befunde in low, intermediate und high risk eingeteilt. Der Einfluss der Zytogenetik auf die Überlebenszeit war nicht statistisch signifikant ( $p=0,518$ ). Bei Patienten mit einer „günstigen“ Zytogenetik betrug die mediane ÜZ 5,7 Jahre (95% CI 2,41-9,07), bei einer „intermediären“ Zytogenetik 7,2 Jahre (95% CI 2,25-12,16) und 4 Jahre bei einer „schlechten“ Zytogenetik (95% CI 2,08-5,58).



**Abbildung 42: Kaplan-Meier-Kurven für die Genetik nach IPSS und IPSS-R.**  
(IPSSGENETIK 1= low risk - 3= high risk. IPSSRGENETIK: 1= good - 5 = very poor)

Nach IPSS-R werden zytogenetische Befunde in fünf Kategorien eingeteilt. Der Einfluss der Zytogenetik nach IPSS-R war ebenfalls nicht statistisch signifikant ( $p=0,535$ ). Patienten mit einer „sehr günstigen“ Zytogenetik wiesen eine mediane ÜZ von 14,5 Jahren auf (95% CI: nicht angegeben). Bei Patienten mit einer „günstigen“ Zytogenetik betrug die mediane ÜZ 5,75 Jahre (95% CI 2,20-9,29), bei einer „intermediären“ Zytogenetik 3,6 Jahre (95% CI 0,00-7,97), bei einer „ungünstigen“ Zytogenetik 4 Jahre (95% CI 0,44-7,55) und bei einer „sehr ungünstigen“ Zytogenetik betrug die mediane ÜZ 2,16 Jahre (95% CI 1,16-3,14).

### 3.2.4 Überleben nach patientenindividuellen Parametern

#### 3.2.4.1 Geschlecht

In dem vorliegenden Patientenkollektiv konnte ein **signifikanter** Einfluss des Geschlechts auf die Überlebenszeit ( $p=0,018$ ) demonstriert werden.

Die mediane Überlebenszeit für Frauen wurde während des Untersuchungszeitraums nicht erreicht. Die mediane Überlebenszeit für Männer betrug 4,41 Jahre (95% CI 3,17-5,65).

#### 3.2.4.2 Alter

Die mediane Überlebenszeit bei Patienten <70 Jahre bei ED betrug 9,9 Jahre (95% CI 3,18-16,64), die mediane Überlebenszeit bei Patienten >70 Jahre bei ED betrug noch 4,1 Jahre (95% CI 3,39-4,93).

Das Alter bei Erstdiagnose zeigte sich somit als statistisch **signifikant** ( $p=0,014$ ).

#### 3.2.4.3 Diagnose

Die Klassifikationen nach FAB ( $p=0,011$ ) und WHO2016 ( $p=<0,001$ ), konnten ebenfalls einen **signifikanten** Einfluss auf die Überlebenszeit darstellen.

Die FAB-Diagnosen wurden wie folgt kodiert: 0= keine FAB-Zuordnung möglich, 1= CMML, 2= MDS-U, 3= RA, 4= RAEB, 5= RAEB-T, 6= RARS, 7= Verdacht auf MDS.

Die WHO2016-Diagnosen wurden wie folgt kodiert: 1= CMML0/1, 2= CMML2, 3= MDS(del5q), 4= MDS/MPD overlap, 5= MDS-U, 6= MDS-SLD, 7= MDS-EB1, 8= MDS-EB2, 9= MDS-RS-SLD, 10= RARS-T, 11= MDS-MLD, 12= MDS-RS-MLD, 13= MDS-SLD, 14= MDL-MLD.

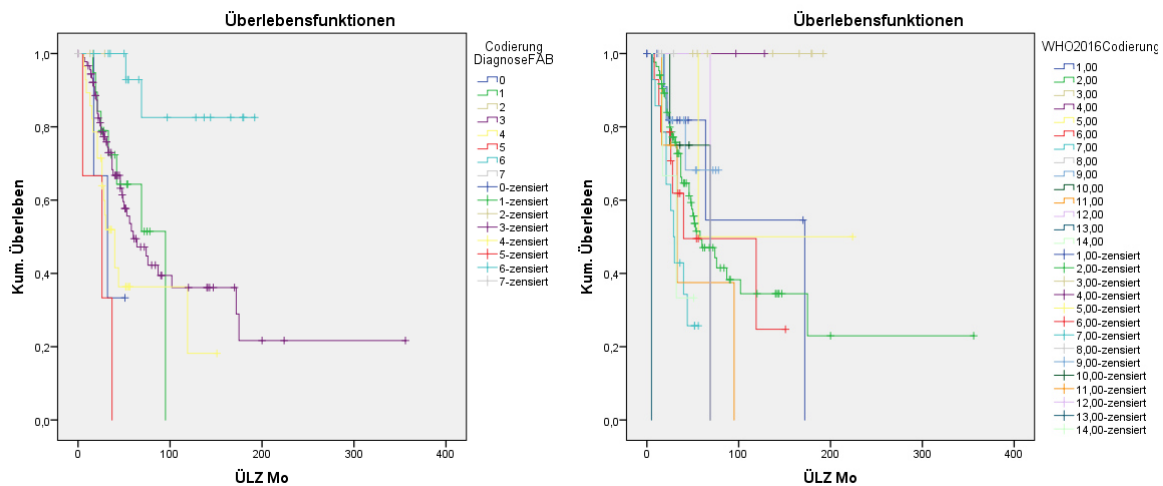


Abbildung 43: Kaplan-Meier-Kurven für die Klassifikationen nach FAB und WHO2016.

### 3.2.5 Überleben nach Prognosescore

#### IPSS

Patienten welche der „low-risk“-Kategorie zugehörten, wiesen eine mediane ÜZ von 5,7 Jahren auf (95% CI wurde nicht berechnet). Innerhalb der „intermediate-risk1“-Kategorie betrug die mediane ÜZ 6,1 Jahre (95% CI 3,78-8,55), welche sich innerhalb der „intermediate-risk2“-Kategorie auf eine mediane ÜZ von 2,75 reduzierte (95%CI 1,86-3,63). Die mediane ÜZ betrug in der „high-risk“-Kategorie nur noch 2,4 Jahre (95% CI 0,00-5,86). Insgesamt war das Ergebnis knapp nicht statistisch signifikant ( $p=0,054$ ).

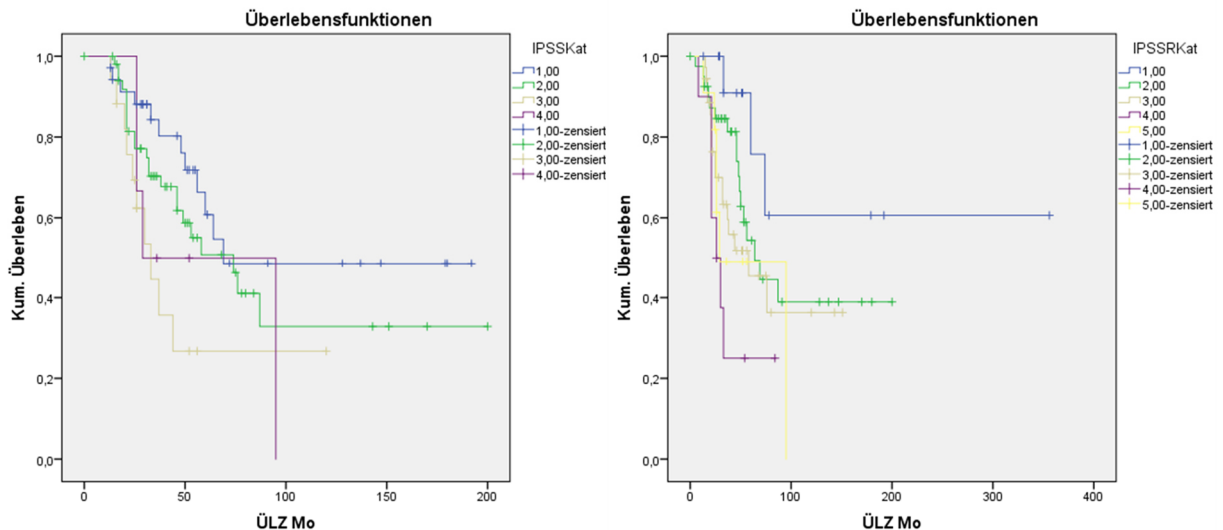


Abbildung 44: Kaplan-Meier-Kurven für die Kategorien nach IPSS und IPSS-R.

IPSS-Kat: 1= low-risk, 2= int.risk 1, 3= int.risk 2, 4= high risk.

IPSSR-Kat: 1= very low risk, 2= low risk, 3= int. risk, 4= high risk, 5= very high risk.

#### IPSS-R

Für Patienten der „very low risk“-Kategorie konnte die mediane ÜZ nicht berechnet werden, da diese im Beobachtungszeitraum nicht erreicht wurde. Für Patienten der „low risk“-Kategorie konnte eine mediane ÜZ von 5,3 Jahren (95% CI 3,55-7,10) errechnet werden, welche sich innerhalb der „intermediate risk“-Gruppe auf 4,8 Jahre (95% CI 1,63-8,03) reduzierte. Bei Patienten mit einem hohen Risikoscore reduzierte sich die ÜZ deutlich. Für Patienten der „high-risk“-Kategorie konnte eine mediane ÜZ von 2,16 (95% CI 1,13-3,19) und für Patienten der „very high risk“-Kategorie von 2,4 Jahre (95% CI 0,00-5,42) ermittelt werden. Insgesamt war die IPSS-R Kategorie für die ÜZ **signifikant** ( $p=0,033$ ).

### 3.3 Zusammenhang zwischen Komorbiditäten und Biomarkern

Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv wurden die Komorbiditäten der Patienten analog des MDS-CI (*comorbidity index*) (Zipperer et al. 2014) mit zusätzlicher Angabe von Autoimmunerkrankungen und Diabeteserkrankungen zu den Biomarkern erfasst.

Jedes der 16 Gene wurde den Komorbiditäten gegenübergestellt.

Es wurden acht Komorbiditätsgruppen erfasst:

Komorbiditätsgruppen	Inkludierte Erkrankungen
Herzkrankungen	HRST, KHK, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, Herzklappenerkrankungen, art. Hypertonie
Lungenerkrankungen	COPD, pulmonale Hypertonie, Lungenemphysem
Lebererkrankungen	Hepatitis A, B, C, Cholangitis, Choledocholithiasis
Nierenerkrankungen	Niereninsuffizienz, Nierenversagen
Solide Tumoren	Colon Ca, Rektum Ca, Malignes Melanom, Mamma Ca, CCC, Teratom, Watkin TU, Harnblasen Ca, Prostata Ca, SD-Ca
Schilddrüsenkrankungen	SD-Adenome, SD-Ca, Hyperthyreose, Hypothyreose, Struma nodosa, Morbus Basedow, Hashimoto Thyreoiditis
Autoimmunerkrankungen	ITP, Morbus Basedow, Hashimoto Thyreoiditis, Rheumatoide Arthritis, Myasthenia gravis, Psoriasis, Lupus erythematosus, Sarkoidose, DM Typ1
Diabetes Mellitus	DM Typ1, DM Typ 2

**Tabelle 11: Komorbiditätsgruppen mit inkludierten Erkrankungen.**

Um einen grundlegenden Zusammenhang zwischen den Variablen darzustellen, wurden Kreuztabellen erstellt. Danach wurde mittels Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest nach Pearson auf Signifikanz geprüft.

Einen Überblick für das gesamte Patientenkollektiv gibt Tabelle 12.

Um geschlechtsspezifische Unterschiede darzustellen, wurden die Kreuztabellen nach Geschlecht geschichtet und ebenfalls mittels Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest nach Pearson auf Signifikanz geprüft. Hierüber geben Tabelle 13 für die männlichen Patienten und Tabelle 14 für die weiblichen Patienten Auskunft.



	AE	Herz	Leber	Niere	SD	DM	Lunge	TU
RUNX1	0,526	0,796	0,458	0,406	0,336	0,272	0,237	0,551
TET2	0,622	0,452	0,963	0,137	0,850	0,590	0,386	0,870
JAK2	0,488	0,110	0,663	0,005	0,154	0,593	0,622	0,459
FLT3	0,050	0,068	0,625	0,430	0,336	0,086	0,471	0,565
MILL	0,174	0,571	0,111	0,430	0,336	0,684	0,471	0,411
KRAS	0,437	0,153	0,680	0,525	0,412	0,436	0,596	0,278
NRAS	0,430	0,505	0,636	0,438	0,320	0,097	0,487	0,409
CBL	0,401	0,971	0,681	0,565	0,400	0,408	0,608	0,321
ASXL1	0,431	0,864	0,687	0,074	0,535	0,630	0,716	0,509
IDH1	0,597	0,301	0,765	0,029	0,076	0,554	0,726	0,612
IDH2	0,309	0,970	0,675	0,211	0,425	0,408	0,623	0,477
TP53	0,649	0,294	0,484	0,944	0,648	0,884	0,332	0,351
EZH2	0,847	0,667	0,267	0,899	0,745	0,719	0,392	0,303
SF3B1	0,047	0,214	0,375	0,530	0,912	0,580	0,313	0,915
SRSF2	0,007	0,598	0,403	0,128	0,182	0,118	0,096	0,226
DNMT3A	0,357	0,419	0,421	0,662	0,477	0,437	0,285	0,381

*Tabelle 12: Übersicht über die p-Werte für das gesamte Patientenkollektiv. Signifikante Werte sind farblich markiert. AE= Autoimmunerkrankung, Herz= Herzerkrankungen, Leber= Lebererkrankungen, Niere= Nierenerkrankungen, SD= Schilddrüsenerkrankungen, DM= Diabetes mellitus, Lunge= Lungenerkrankungen, TU= solide Tumorerkrankungen.*

m	AE	Herz	Leber	Niere	SD	DM	Lunge	TU
RUNX1	0,268	0,611	0,421	0,834	0,534	0,209	0,279	0,925
TET2	0,161	0,322	0,692	<b>0,041</b>	0,614	1,000	0,339	0,963
JAK2	/	/	/	/	/	/	/	/
FLT3	0,613	0,280	0,749	0,688	0,688	0,058	0,660	0,660
MILL	0,377	0,312	<b>0,001</b>	0,692	0,664	0,594	0,664	0,692
KRAS	0,417	0,149	0,667	0,556	0,551	0,380	0,590	0,238
NRAS	/	0,332	0,792	0,672	0,668	0,560	0,672	0,699
CBL	0,390	1,000	0,643	0,560	0,139	0,403	0,599	0,301
ASXL1	0,523	0,956	0,296	0,330	0,352	0,422	0,739	0,672
IDH1	/	/	/	/	/	/	/	/
IDH2	/	/	/	/	/	/	/	/
TP53	0,205	0,713	0,256	0,398	0,398	0,784	0,398	<b>0,029</b>
EZH2	0,822	0,446	0,109	0,436	0,455	0,287	0,460	0,515
SF3B1	0,114	0,678	0,484	0,958	0,317	0,186	0,668	0,484
SRSF2	<b>0,017</b>	0,409	0,102	0,826	0,586	0,819	0,119	0,102
DNMT3A	0,503	0,219	0,793	<b>0,018</b>	0,618	0,078	<b>0,018</b>	0,744

Tabelle 13: Übersicht über die p-Werte für das männliche Patientenkollektiv. Signifikante Werte sind farblich markiert. AE= Autoimmunerkrankung, Herz= Herzerkrankungen, Leber= Lebererkrankungen, Niere= Nierenerkrankungen, SD= Schilddrüsenerkrankungen, DM= Diabetes mellitus, Lunge= Lungenerkrankungen, TU= solide Tumorerkrankungen. (/) = Statistik konnte nicht berechnet werden.

w	AE	Herz	Leber	Niere	SD	DM	Lunge	TU
RUNX1	0,567	0,579	0,675	0,360	0,168	0,837	0,489	0,090
TET2	0,313	1,000	0,688	0,930	0,311	0,359	0,831	0,900
JAK2	0,531	0,136	0,732	0,023	0,515	0,881	0,619	0,456
FLT3	0,007	0,147	0,739	0,277	0,305	0,465	0,583	0,402
MILL	0,289	0,970	0,675	0,289	0,324	0,418	0,578	0,426
KRAS	/	/	/	/	/	/	/	/
NRAS	0,449	0,129	0,688	0,253	0,296	0,015	0,594	0,418
CBL	/	/	/	/	/	/	/	/
ASXL1	0,614	0,679	0,421	0,079	0,179	0,067	0,287	0,130
IDH1	0,598	0,295	0,796	0,050	0,179	0,534	0,748	0,534
IDH2	0,289	1,000	0,716	0,289	0,282	0,437	0,650	0,382
TP53	0,261	0,169	0,661	0,331	0,698	0,470	0,607	0,401
EZH2	0,483	0,854	0,706	0,483	0,278	0,477	0,639	0,440
SF3B1	0,179	0,134	0,596	0,330	0,261	0,245	0,228	0,570
SRSF2	0,226	0,055	0,596	0,035	0,160	0,003	0,440	0,570
DNMT3A	0,631	0,927	0,408	0,121	0,649	0,947	0,694	0,554

Tabelle 14: Übersicht über die p-Werte für das weibliche Patientenkollektiv. Signifikante Werte sind farblich markiert. AE= Autoimmunerkrankung, Herz= Herzerkrankungen, Leber= Lebererkrankungen, Niere= Nierenerkrankungen, SD= Schilddrüsenerkrankungen, DM= Diabetes mellitus, Lunge= Lungenerkrankungen, TU= solide Tumorerkrankungen. (/) = Statistik konnte nicht berechnet werden.

### 3.3.1 Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankungen und MDS-typischen Biomarkern

Von allen Biomarkern des 16 Gen starken Panels war in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen SRSF2 signifikant für das gesamte Kollektiv sowie in der Schichtung nach Geschlecht. Für SF3B1 konnte ein Zusammenhang zum gesamten Kollektiv aufgezeigt werden und für FLT3 ein möglicher Zusammenhang zum weiblichen Geschlecht. Sie werden aufgrund dessen in der folgenden Erläuterung ausführlicher beschrieben.

#### SRSF2

Bei insgesamt 45 Patienten (27,1%) lagen Angaben zum Vorliegen von Autoimmunerkrankungen sowie eines SRSF2-Status vor (Tab.15).

Der Chi-Quadrat Tests fällt für das Gesamtkollektiv **signifikant** aus:  $\chi^2=7,186$ ;  $p=0,007$ . Es gibt einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen und dem SRSF2-Status im Gesamtkollektiv. Die Hälfte aller Patienten mit Autoimmunerkrankungen trugen eine SRSF2-Mutation. Zudem zeigte sich für das männliche Geschlecht im Chi-Quadrat Test  $\chi^2=5,736$ ;  $p=0,017$  ein ebenfalls **signifikanter** Zusammenhang. Sie trugen signifikant häufiger SRSF2-Mutationen, bei gleichzeitig bestehenden autoimmunen Erkrankungen.

Geschlecht				Mut	WT	Gesamt
♂	Autoimmunerkrankung	ja	Anzahl	5	4	9
			% der Gesamtzahl	19,2%	15,4%	34,6%
	nein	Anzahl	2	15	17	
		% der Gesamtzahl	7,7%	57,7%	65,4%	
	Gesamt	Anzahl	7	19	26	
		% der Gesamtzahl	26,9%	73,1%	100,0%	
♀	Autoimmunerkrankung	ja	Anzahl	2	3	5
			% der Gesamtzahl	10,5%	15,8%	26,3%
	nein	Anzahl	2	12	14	
		% der Gesamtzahl	10,5%	63,2%	73,7%	
	Gesamt	Anzahl	4	15	19	
		% der Gesamtzahl	21,1%	78,9%	100,0%	
Gesamt	Autoimmunerkrankung	ja	Anzahl	7	7	14
			% der Gesamtzahl	15,6%	15,6%	31,1%
	nein	Anzahl	4	27	31	
		% der Gesamtzahl	8,9%	60,0%	68,9%	
	Gesamt	Anzahl	11	34	45	
		% der Gesamtzahl	24,4%	75,6%	100,0%	

**Tabelle 15: Kreuztabelle für SRSF2 und Autoimmunerkrankungen inkl. Geschlechterschichtung.**

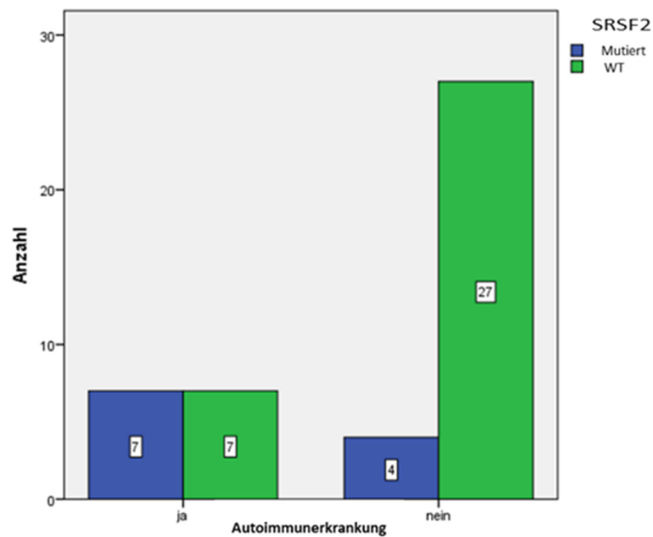


Abbildung 45: Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang mit dem SRSF2-Mutationsstatus für das gesamte Patientenkollektiv.

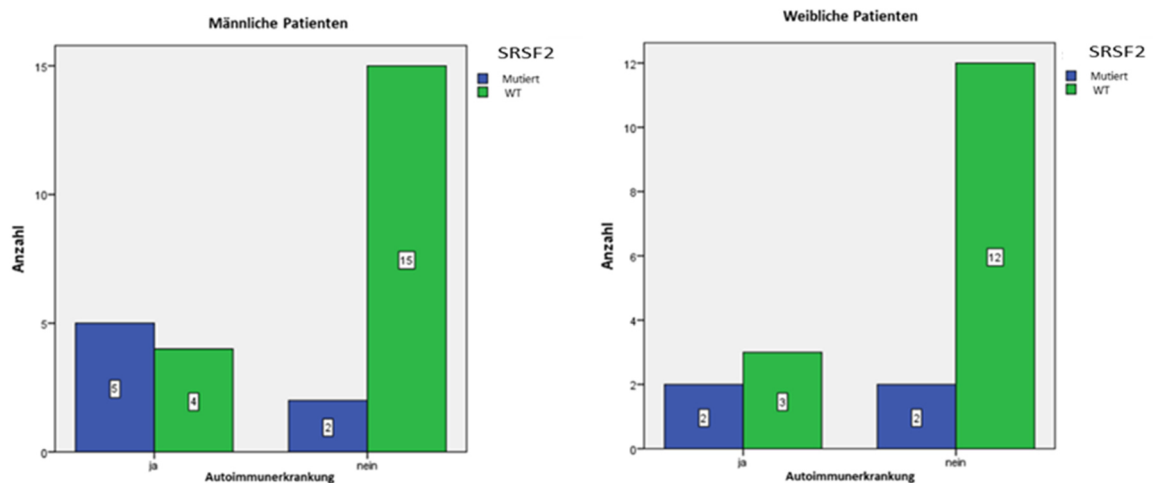
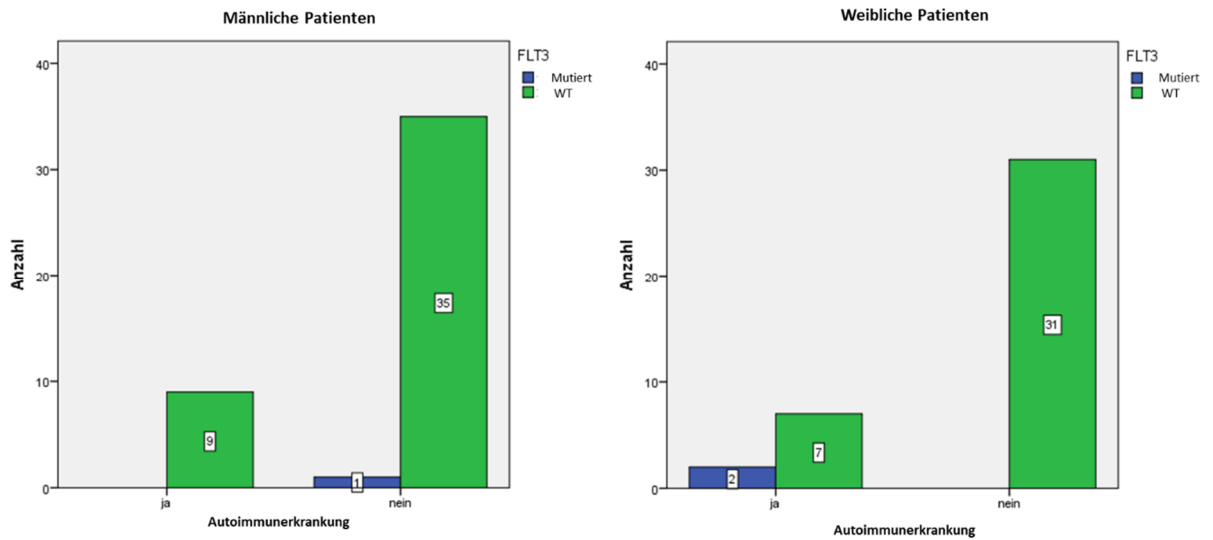


Abbildung 46: Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang mit dem SRSF2-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.

### FLT3

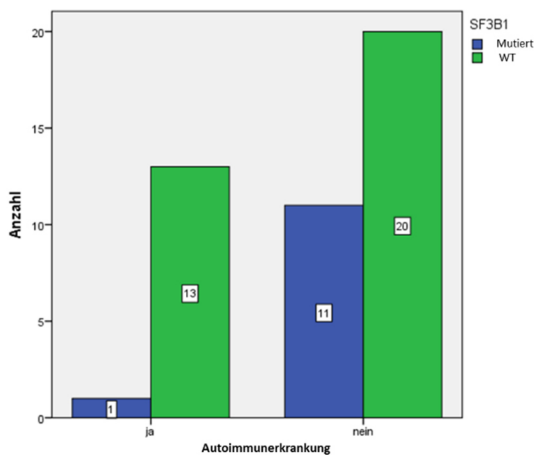
Bei insgesamt 85 Patienten (51,2%) lagen Angaben zum Vorliegen von Autoimmunerkrankungen sowie eines FLT3-Status vor. Für diese Daten wurde eine Kreuztabelle mittels SPSS erstellt und nach Geschlecht geschichtet sowie ein Chi-Quadrat-Test angefordert. Der Chi-Quadrat-Test fiel für das gesamte Kollektiv ( $\chi^2=3,855$ ;  $p=0,050$ ) **nicht signifikant** aus, in der Geschlechterschichtung zeigte sich ein möglicher **signifikanter** Zusammenhang zum weiblichen Geschlecht ( $\chi^2=7,251$ ;  $p=0,007$ ) im Gegensatz zum männlichen Kollektiv ( $\chi^2=0,256$ ;  $p=0,613$ ). MDS-Patientinnen mit Autoimmunerkrankungen trugen signifikant häufiger FLT3-Mutationen. Patientinnen ohne AE wiesen keine Mutationen auf. Bei männlichen Patienten mit AE hingegen waren keine Mutationen des FLT3-Gens nachzuweisen.



**Abbildung 47: Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang mit dem FLT3-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.**

### SF3B1

Bei insgesamt 45 Patienten (27,1%) lagen Angaben zum Vorliegen von Autoimmunerkrankungen sowie eines SF3B1-Status vor. Für diese Daten wurde eine Kreuztabelle mittels SPSS erstellt und nach Geschlecht geschichtet sowie ein Chi-Quadrat-Test angefordert. Der Chi-Quadrat-Test fiel für das gesamte Kollektiv ( $\chi^2=3,961$ ;  $p=0,047$ ) **signifikant** aus. SF3B1-Mutationen traten signifikant häufiger bei Patienten ohne AE auf. Es zeigte sich keine Signifikanz in der Geschlechterschichtung.



**Abbildung 48: Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang mit dem SF3B1 -Mutationsstatus für das gesamte Patientenkollektiv.**

### 3.3.2 Zusammenhang zwischen Herzerkrankungen und MDS-typischen Biomarkern

Für das vorliegende Patientenkollektiv konnte zu keinem der untersuchten Gene ein Zusammenhang zu Erkrankungen des kardiovaskulären Systems herausgestellt werden.

### 3.3.3 Zusammenhang zwischen Lebererkrankungen und MDS-typischen Biomarkern

Für das vorliegende Kollektiv konnte ein möglicher Zusammenhang von Mutationen des MLL-Gens und hepatischen Erkrankungen bei männlichen MDS-Patienten herausgestellt werden. Für die restlichen Gene konnte kein Zusammenhang berechnet werden.

#### MLL

Bei insgesamt 84 Patienten (50,6%) lagen Angaben zum Vorliegen von Lebererkrankungen sowie eines MLL-Status vor. Für diese Daten wurde eine Kreuztabelle mittels SPSS erstellt und nach Geschlecht geschichtet sowie ein Chi-Quadrat-Test angefordert. Der Chi-Quadrat-Test fiel für das gesamte Kollektiv ( $\chi^2=2,545$ ;  $p=0,111$ ) **nicht signifikant** aus. In der Geschlechterschichtung zeigte sich für das männliche Geschlecht im Chi-Quadrat Test  $\chi^2=10,483$ ;  $p=0,001$  ein **signifikanter** Zusammenhang. Männliche Patienten mit einer MLL-Mutation wiesen signifikant häufiger eine Erkrankung der Leber auf, wobei die Mutationshäufigkeit insgesamt sehr gering war. Patientinnen mit Lebererkrankungen trugen keine MLL-Mutationen.

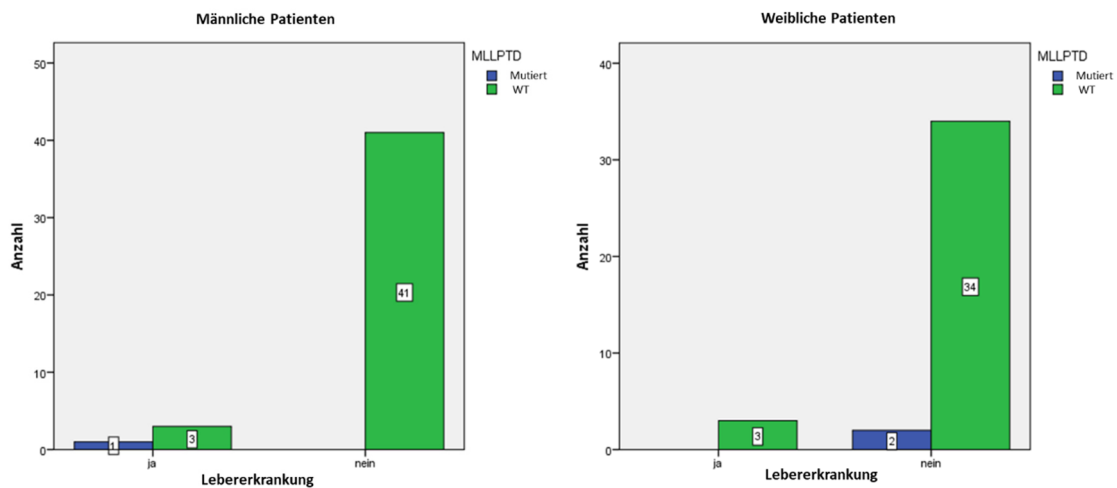


Abbildung 49: Lebererkrankungen in Zusammenhang mit dem MLL-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.

### 3.3.4 Zusammenhang zwischen Nierenerkrankungen und MDS-typischen Biomarkern

Signifikant im Zusammenhang mit Erkrankungen der Niere bei MDS-Patienten zeigten sich JAK2-Mutationen, IDH1-Mutationen, SRSF2-, TET2- und DNMT3A-Mutationen.

#### JAK2

Bei insgesamt 48 Patienten (28,9%) lagen Angaben zum Vorliegen von Nierenerkrankungen sowie eines JAK2-Status vor. Für diese Daten wurde eine Kreuztabelle mittels SPSS erstellt und nach Geschlecht geschichtet sowie ein Chi-Quadrat-Test angefordert. Der Chi-Quadrat-Test fiel für das gesamte Kollektiv ( $\chi^2=7,930$ ;  $p=0,005$ ) **signifikant** aus. Patienten mit JAK2-Mutationen wiesen signifikant häufiger Erkrankungen der Niere auf, wobei die Anzahl an Mutationen insgesamt gering ausfiel. Patienten ohne diese Komorbidität trugen keine Mutationen. In der Schichtung nach Geschlecht zeigte sich ( $\chi^2=5,185$ ;  $p=0,023$ ) ein möglicher Zusammenhang zum weiblichen Geschlecht. MDS-Patientinnen trugen signifikant häufiger JAK2-Mutationen bei bestehenden Nierenerkrankungen. Patientinnen ohne diese Komorbidität wiesen keine Mutationen auf. Bei den männlichen Patienten fanden sich Nierenerkrankungen, jedoch keine JAK2-Mutationen.

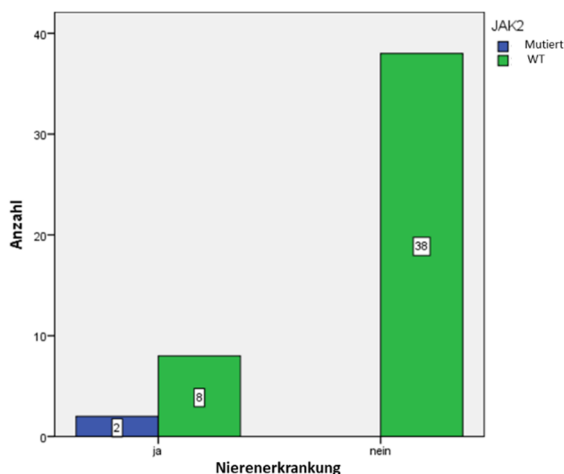


Abbildung 50: Erkrankungen der Niere in Zusammenhang mit dem JAK2-Mutationsstatus für das gesamte Patientenkollektiv.

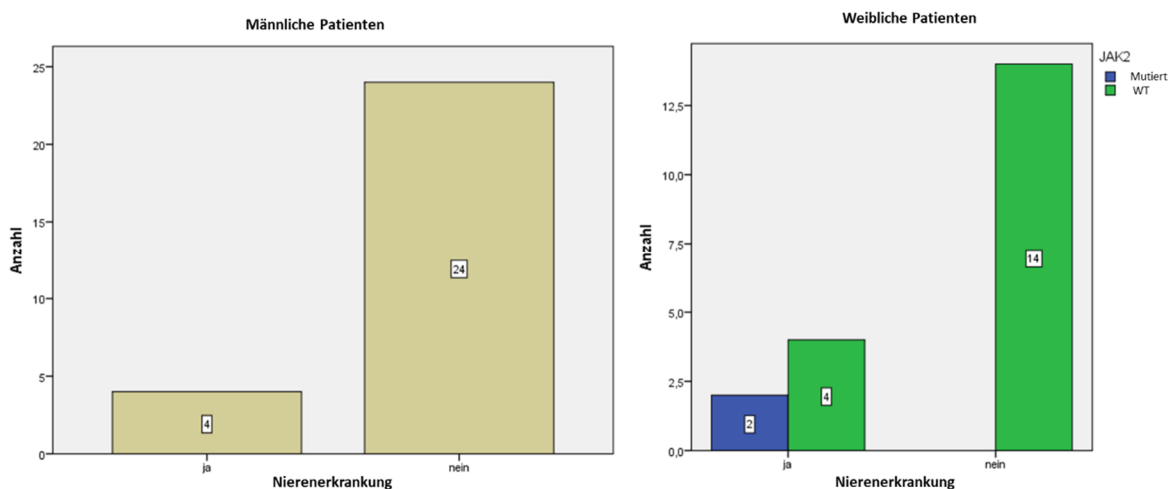


Abbildung 51: Nierenerkrankungen in Zusammenhang mit dem JAK2-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.



## IDH1

Bei insgesamt 74 Patienten (44,6%) lagen Angaben zum Vorliegen von Nierenerkrankungen sowie eines IDH1-Status vor. Für diese Daten wurde eine Kreuztabelle mittels SPSS erstellt und nach Geschlecht geschichtet sowie ein Chi-Quadrat-Test angefordert. Der Chi-Quadrat-Test fiel für das gesamte Kollektiv ( $\chi^2=4,757$ ;  $p=0,029$ ) **signifikant** aus. Patienten mit einer IDH1-Mutation hatten signifikant häufiger Nierenerkrankungen, bei gleichzeitig niedriger Mutationshäufigkeit. Patienten ohne Nierenerkrankungen wiesen keine Mutationen auf. In der Geschlechterschichtung zeigte sich kein Zusammenhang.

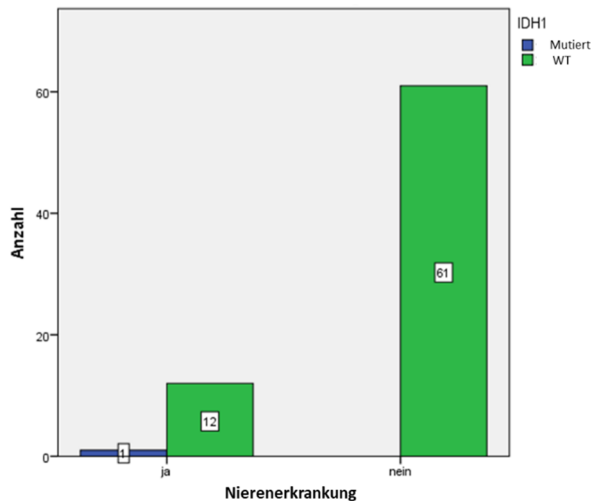


Abbildung 52: Erkrankungen der Niere in Zusammenhang mit dem IDH1-Mutationsstatus für das gesamte Patientenkollektiv.

## SRSF2

Bei insgesamt 44 Patienten (26,5%) lagen Angaben zum Vorliegen von Nierenerkrankungen sowie eines SRSF2-Status vor. Für diese Daten wurde eine Kreuztabelle mittels SPSS erstellt und nach Geschlecht geschichtet sowie ein Chi-Quadrat-Test angefordert. Der Chi-Quadrat-Test fiel für das gesamte Kollektiv ( $\chi^2=2,316$ ;  $p=0,128$ ) **nicht signifikant** aus. In der Geschlechterschichtung zeigte sich ein **signifikanter** Zusammenhang zum weiblichen Geschlecht ( $\chi^2=4,460$ ;  $p=0,035$ ). MDS-Patientinnen mit Nierenerkrankungen trugen signifikant häufiger SRSF2-Mutationen.

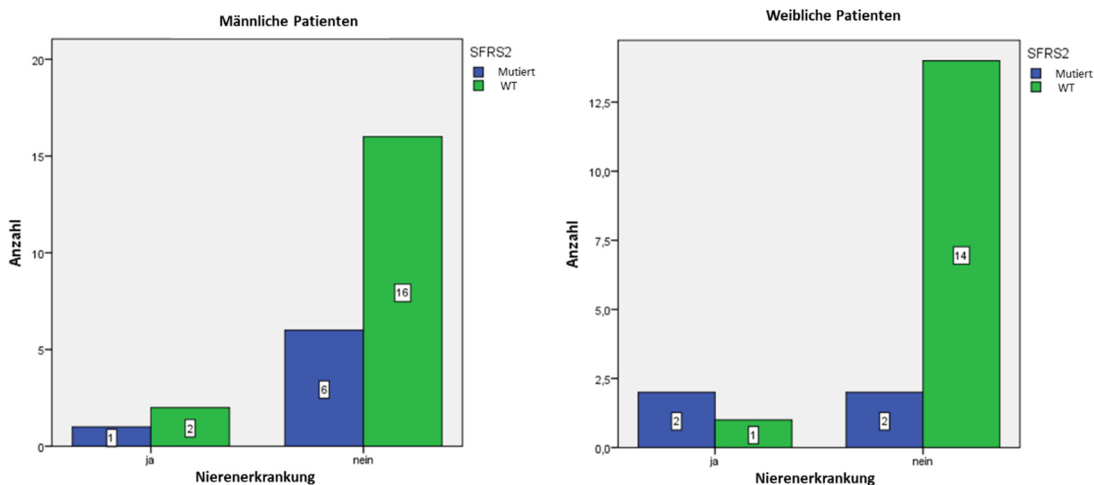


Abbildung 53: Nierenerkrankungen in Zusammenhang mit dem SRSF2-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.

## DNMT3A

Bei insgesamt 61 Patienten (36,7%) lagen Angaben zum Vorliegen von Nierenerkrankungen sowie eines DNMT3A-Status vor. Für diese Daten wurde eine Kreuztabelle mittels SPSS erstellt und nach Geschlecht geschichtet sowie ein Chi-Quadrat-Test angefordert. Der Chi-Quadrat-Test fiel für das gesamte Kollektiv ( $\chi^2=0,191$ ;  $p=0,662$ ) **nicht signifikant** aus. In der Geschlechterschichtung zeigte sich ein **signifikanter** Zusammenhang zum männlichen Geschlecht ( $\chi^2=5,574$ ;  $p=0,018$ ). DNMT3A-Mutationen bestanden bei männlichen Patienten mit Erkrankungen der Niere, jedoch nicht bei Patienten ohne diese Komorbidität.

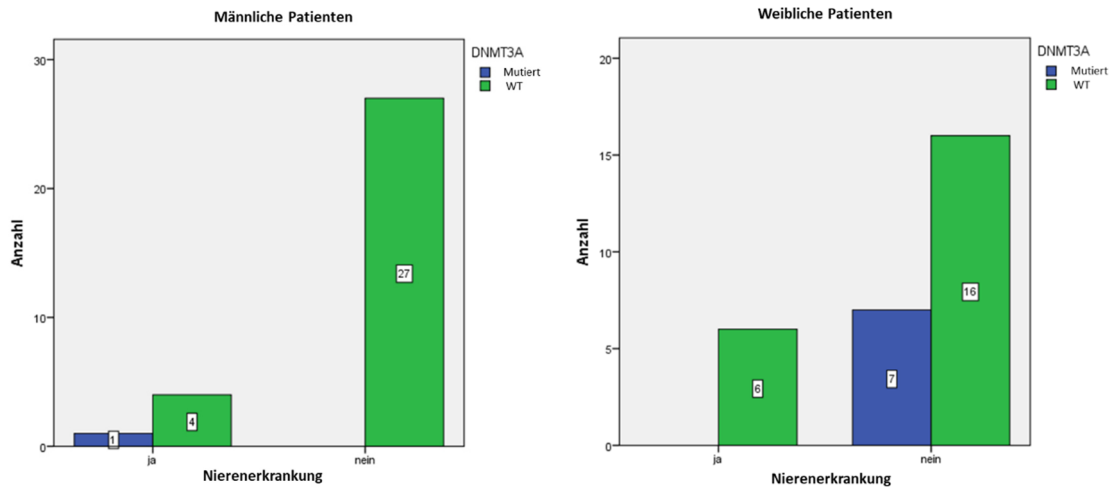


Abbildung 54: Nierenerkrankungen in Zusammenhang mit dem DNMT3A-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.

## TET2

Bei insgesamt 92 Patienten (55,4%) lagen Angaben zum Vorliegen von Nierenerkrankungen sowie eines TET2-Status vor. Für diese Daten wurde eine Kreuztabelle mittels SPSS erstellt und nach Geschlecht geschichtet sowie ein Chi-Quadrat-Test angefordert. Der Chi-Quadrat-Test fiel für das gesamte Kollektiv ( $\chi^2=2,217$ ;  $p=0,137$ ) **nicht signifikant** aus. In der Geschlechterschichtung zeigte sich ein Zusammenhang zum männlichen Geschlecht ( $\chi^2=4,193$ ;  $p=0,041$ ). Kein MDS-Patient wies bei bestehender Nierenerkrankung eine Mutation des TET2-Gens auf.

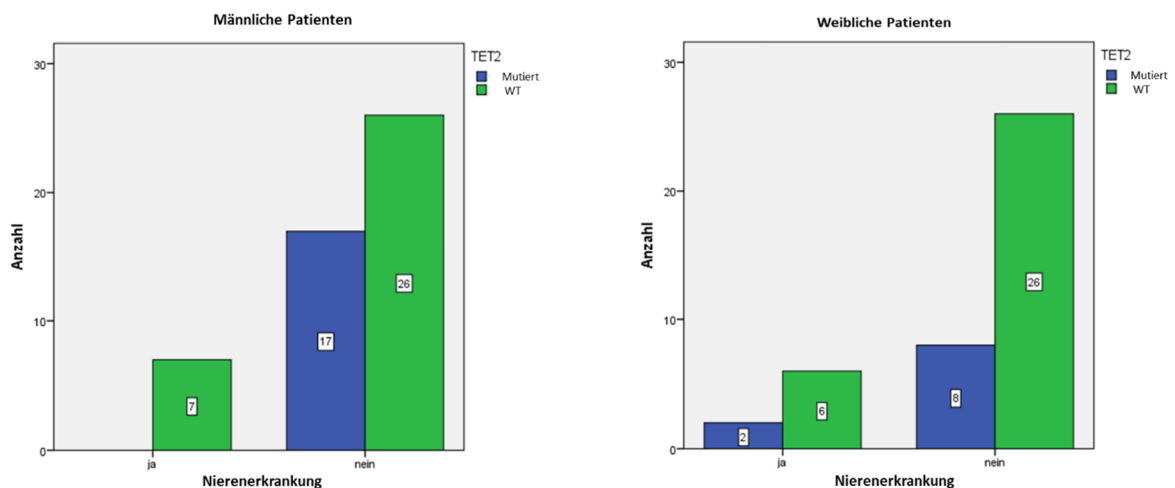


Abbildung 55: Nierenerkrankungen in Zusammenhang mit dem TET2-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.

### 3.3.5 Zusammenhang zwischen Schilddrüsenerkrankungen und MDS-typischen Biomarkern

Für das vorliegende Patientenkollektiv konnte zu keinem der untersuchten Gene ein Zusammenhang zu Erkrankungen der Schilddrüse herausgestellt werden.

### 3.3.6 Zusammenhang zwischen Diabetes Typ 1 und Typ 2 und MDS-typischen Biomarkern

Von allen Biomarkern des 16 Gen starken Panels waren in Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2, SRSF2 und NRAS signifikant für das Kollektiv in der Schichtung nach Geschlecht.

#### NRAS

Bei insgesamt 90 Patienten (54,2%) lagen Angaben zum Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 1 oder Typ 2 sowie eines NRAS-Status vor. Für diese Daten wurde eine Kreuztabelle mittels SPSS erstellt und nach Geschlecht geschichtet sowie ein Chi-Quadrat-Test angefordert. Der Chi-Quadrat-Test fiel für das gesamte Kollektiv ( $\chi^2=2,757$ ;  $p=0,097$ ) **nicht signifikant** aus. In der Schichtung nach Geschlecht zeigte sich ein möglicher Zusammenhang zum weiblichen Geschlecht. Dies war mit  $\chi^2=5,918$ ;  $p=0,015$  **signifikant**. NRAS-Mutationen traten nur bei Patientinnen mit Diabetes mellitus auf.

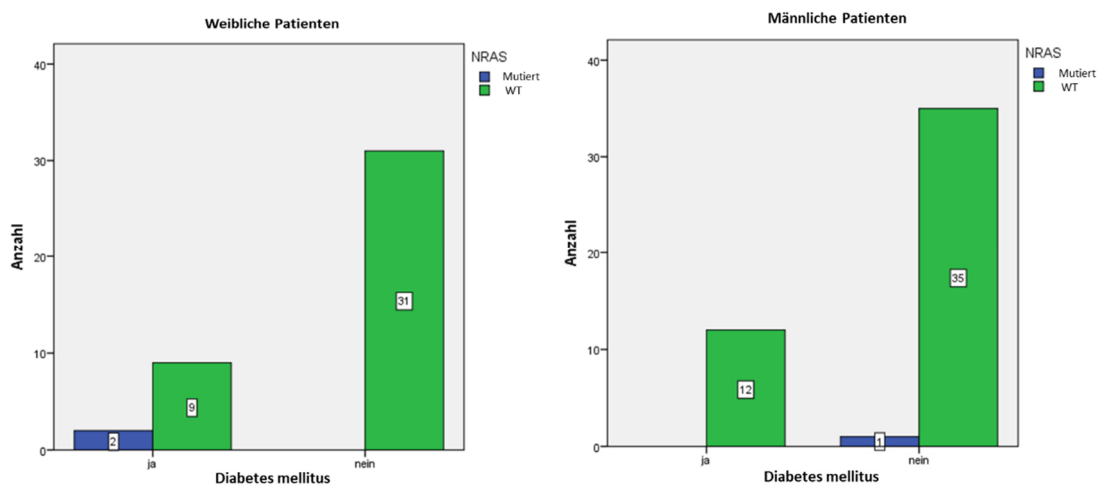


Abbildung 56: Diabeteserkrankungen in Zusammenhang mit dem NRAS-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.

#### SRSF2

Bei insgesamt 44 Patienten (26,5%) lagen Angaben zum Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 1 oder Typ 2 sowie eines SRSF2-Status vor. Für diese Daten wurde eine Kreuztabelle mittels SPSS erstellt und nach Geschlecht geschichtet sowie ein Chi-Quadrat-Test angefordert. Der Chi-Quadrat-Test fiel für das gesamte Kollektiv ( $\chi^2=2,444$ ;  $p=0,118$ ) **nicht signifikant** aus. In der Schichtung nach Geschlecht zeigte sich eine **Signifikanz** ( $\chi^2=8,872$   $p=0,003$ ) für das weibliche Geschlecht. MDS-Patientinnen wiesen bei bestehendem Diabetes mellitus signifikant häufiger SRSF2-Mutationen auf.

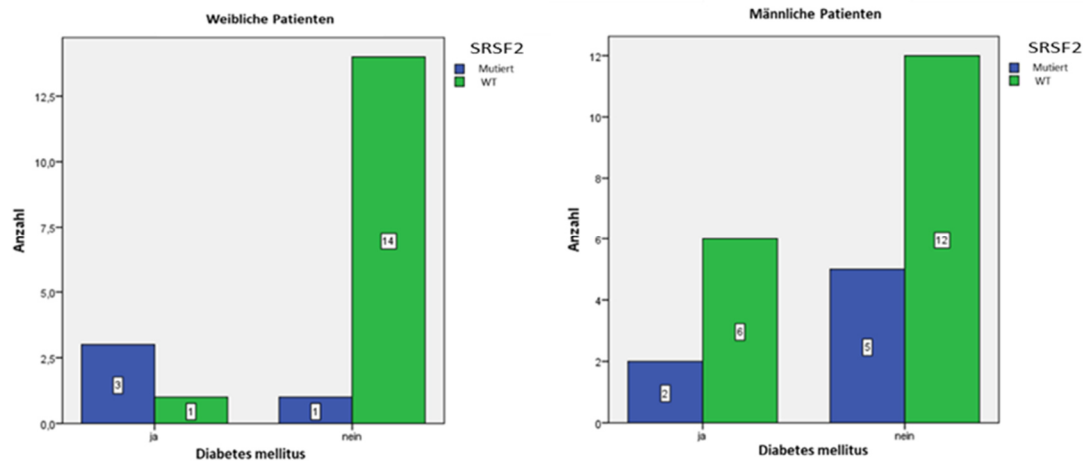


Abbildung 57: Diabeteserkrankungen in Zusammenhang mit dem SRSF2-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.

### 3.3.7 Zusammenhang zwischen Lungenerkrankungen und MDS-typischen Biomarkern

Für das Kollektiv konnte für DNMT3A ein möglicher Zusammenhang zu Erkrankungen der Lunge bei Patienten mit MDS berechnet werden. Für alle anderen untersuchten Mutationen des Panels konnten keine Zusammenhänge dargestellt werden.

#### DNMT3A

Bei insgesamt 61 Patienten (36,7%) lagen Angaben zum Vorliegen einer Lungenerkrankung sowie eines DNMT3A-Status vor. Für diese Daten wurde eine Kreuztabelle mittels SPSS erstellt und nach Geschlecht geschichtet sowie ein Chi-Quadrat-Test angefordert. Der Chi-Quadrat-Test fiel für das gesamte Kollektiv ( $\chi^2=1,141$ ;  $p=0,285$ ) **nicht signifikant** aus. In der Geschlechterschichtung zeigte sich ein möglicher Zusammenhang zum männlichen Geschlecht, welcher sich mit einem  $\chi^2=5,574$  und  $p=0,018$  als **signifikant** darstellte. Männliche MDS-Patienten trugen signifikant häufiger DNMT3A-Mutationen bei bestehenden Erkrankungen der Lunge, bei gleichzeitig geringer Mutationshäufigkeit. Bei MDS-Patienten ohne Erkrankungen der Lunge traten keine DNMT3A-Mutationen auf.

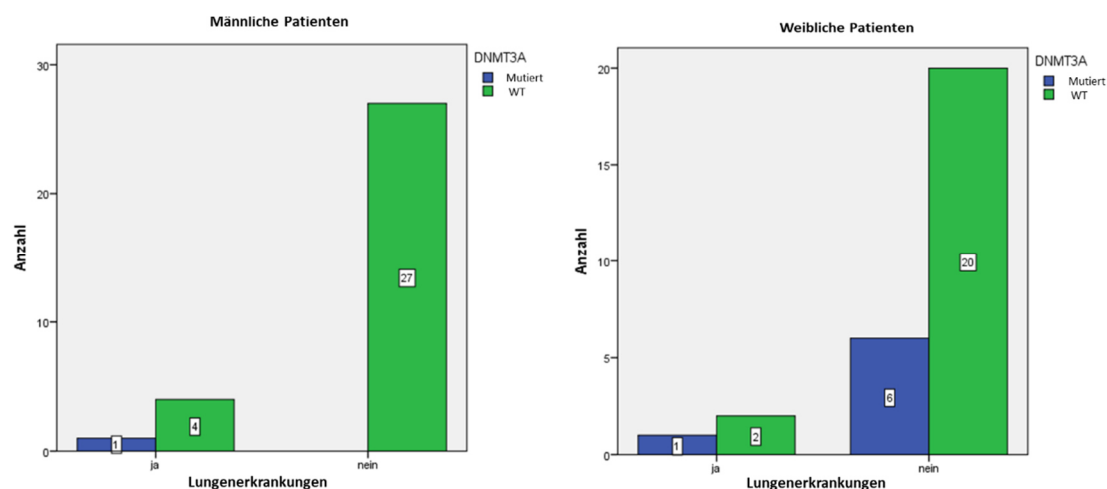
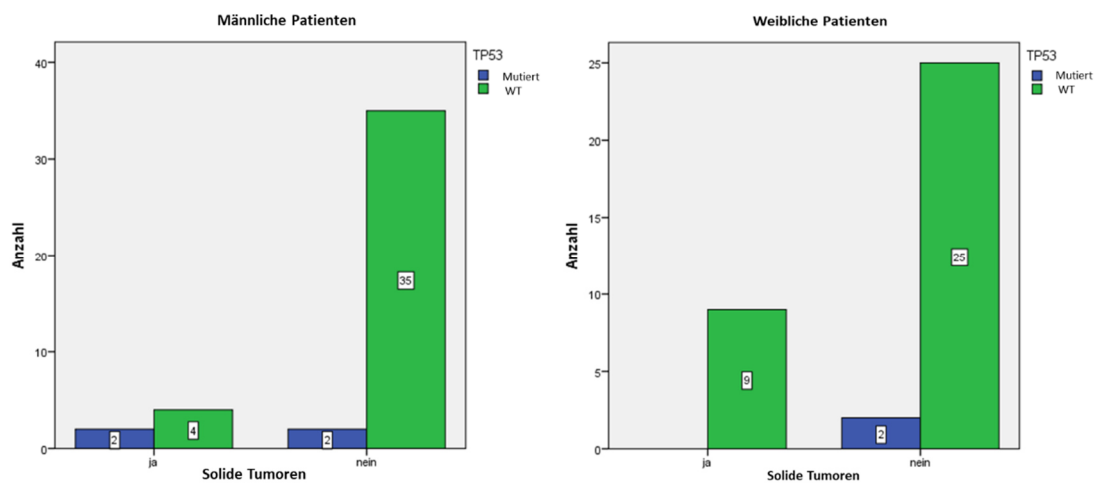


Abbildung 58: Lungenerkrankungen in Zusammenhang mit dem DNMT3A-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.

### 3.3.8 Zusammenhang zwischen soliden Tumoren und MDS-typischen Biomarkern

#### TP53

Bei insgesamt 79 Patienten (47,6%) lagen Angaben zum Vorliegen einer soliden Tumorerkrankung sowie eines TP53-Status vor. Für diese Daten wurde eine Kreuztabelle mittels SPSS erstellt und nach Geschlecht geschichtet sowie ein Chi-Quadrat-Test angefordert. Der Chi-Quadrat-Test fiel für das gesamte Kollektiv ( $\chi^2=0,869$ ;  $p=0,351$ ) **nicht signifikant** aus. In der Geschlechterschichtung zeigte sich ein möglicher Zusammenhang zum männlichen Geschlecht, welcher sich mit einem  $\chi^2=4,773$  und  $p=0,029$  als **signifikant** darstellte. TP53-Mutationen konnten nur und signifikant häufiger bei männlichen MDS-Patienten mit soliden Tumoren in der Anamnese nachgewiesen werden. Bei MDS-Patientinnen traten TP53-Mutationen nur bei Nichtvorhandensein von soliden Tumoren in der Anamnese auf.



**Abbildung 59: Tumorerkrankungen in Zusammenhang mit dem TP53-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.**

### 3.4 Multivariate Analyse

Das Cox-Modell (proportionales Hazard Modell) wurde eingesetzt, um den Effekt der bisher univariat untersuchten Variablen auf die Zielvariable Überlebenszeit zu untersuchen. Mit Hilfe der multivariaten Regressionsanalyse konnten Variablen definiert werden, welche einen unabhängigen prognostischen Einfluss auf die Überlebenszeit besitzen.

In das multivariate Modell wurden in einem letzten Schritt nur die prognostisch relevanten Mutationen sowie die Genetik nach IPSS-R in die Analyse miteinbezogen. Die Genetik nach IPSS-R, ASXL1 sowie KRAS zeigten sich als unabhängige Prognoseparameter, wobei die Genetik nach IPSS-R die größte prognostische Relevanz aufwies. Tabelle 16 zeigt die dazugehörigen Signifikanzwerte der Regressionsanalyse.

Parameter	$\chi^2$ (Wald)	p (Signifikanz)
IPSSRGENETIK (sehr schlecht)	13,55	<b>0,009</b>
IPSSRGENETIK (günstig)	11,93	<b>0,001</b>
ASXL1	7,33	<b>0,007</b>
KRAS	5,97	<b>0,014</b>
IPSSRGENETIK (intermediär)	5,32	<b>0,021</b>
IPSSRGENETIK (schlecht)	5,15	<b>0,023</b>
IPSSRGENETIK (sehr günstig)	3,62	0,057

*Tabelle 16: Multivariates Modell: Parameter und Ergebnisse.*

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse & kritische Betrachtung der eigenen Untersuchungsmethoden und Materialien

In vorliegender Arbeit wurden DNA-Proben von 166 MDS-Patienten auf das Vorliegen von MDS-typischen Mutationen sowie deren prognostische Auswirkungen untersucht und ein möglicher Zusammenhang zwischen den individuellen Komorbiditäten und den molekulargenetischen Veränderungen beleuchtet. Die Analysen erbrachten folgende wesentliche Ergebnisse:

- In 70% der Patienten des vorliegenden Kollektivs wurde mindestens eine Mutation des Gen-Panels nachgewiesen. Die maximale Anzahl an Mutationen pro Patient lag bei fünf. 30% der Patienten trugen eine Mutation, in abnehmender Häufigkeit, bis runter auf 1,2% bei Patienten mit fünf Mutationen. Die häufigste Mutation war TET2 (30,7%), gefolgt von SF3B1 (27,5%), ASXL1 (23,5%) und RUNX1 mit 21,1%.
- Mit steigender Anzahl an nachgewiesenen Mutationen konnte eine verkürzte mediane ÜZ verzeichnet werden. Ohne Mutationsnachweis betrug die mediane ÜZ 14,5 Jahre und sank auf 0,4 Jahre bei Trägern mit der maximalen Anzahl von fünf Mutationen.
- Mutationen von ASXL1 und KRAS sowie die zytogenetischen Befunde nach IPSS-R zeigten sich als unabhängige Prognoseparameter bei MDS-Patienten. Die mediane ÜZ betrug bei bestehender ASXL1-Mutation 3,16 Jahre vs. 7,9 Jahre beim WT, für KRAS-Mutationen 3,5 Jahre vs. 5,7 Jahre (WT). Die Empfehlung einer Hinzunahme von Genmutationen zu bestehenden Prognose-Assessments erscheint sinnvoll.  
Patienten mit einer Zytogenetik der Kategorie „sehr günstig“ nach IPSS-R zeigten eine mediane ÜZ von 14,5 Jahren, Patienten mit einer „sehr ungünstigen“ Zytogenetik nach IPSS-R eine mediane ÜZ von 2,1 Jahren.
- Einige Genmutationen zeigten Zusammenhänge zu Komorbiditäten der Patienten, welche mit Auswirkungen auf die Prognose durch die Literatur vorbeschrieben sind.  
Im Gesamtkollektiv konnte beispielsweise ein Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankungen und SF3B1- und SRSF2-Mutationen sowie Erkrankungen der Niere und JAK2- und IDH1-Mutationen dargestellt werden.

Untersucht wurden die Patienten mit MDS in der Ambulanz der Klinik für Hämatologie und Onkologie an der Uniklinik Düsseldorf. Es handelte sich um eine klassische MDS-Patientenkohorte, wie sie in verschiedenen Arbeiten aus der Düsseldorfer MDS-Gruppe beschrieben wurde (Neukirchen et al. 2014).

Von den 166 Patienten betrug der Anteil an Männern am Gesamtkollektiv 53%. Das mediane Alter des Gesamtkollektivs bei Erstdiagnose betrug 68 Jahre, wobei das Alter des jüngsten Patienten 16 Jahre und das des ältesten Patienten 87 Jahre betrug, welches eine leicht unterdurchschnittliche Verteilung zu bereits publizierten Kollektivdaten zur prognostischen Bedeutung der somatischen Mutationen zeigt (Papaemmanuil et al. 2013).

Zum Nachweis der Genmutationen erfolgte entweder eine DNA-Gewinnung aus dem Knochenmark oder aus dem peripheren Blut. Aus dem Blut insbesondere dann, wenn das Gen-Panel nicht vollständig war, um dieses entsprechend zu komplementieren. Dies ist zu beachten, da somit nachgeforderte Biomarker nicht immer zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bestimmt wurden und sich dadurch auf die Auftretenshäufigkeit der Mutationen auswirken könnten, da es zu Akkumulation von somatischen Mutationen im Krankheitsverlauf kommen kann. Bei Patienten, bei welchen die Erstdiagnose länger zurück lag, wurden die Marker-Panel während der klinischen Verlaufskontrollen erhoben. Inwieweit

sich die Mutations-Analysen aus KM oder peripheren Blut auf die Häufigkeit der Mutationen, insbesondere durch Größenunterschiede des Klons peripher vs. zentral auswirken, sollte perspektivisch ebenfalls Beachtung erfahren, wurde in der Literatur bislang jedoch als unkritisch beurteilt (Papaemmanuil et al. 2013).

Untersucht wurden folgende 16 Gene: RUNX1: komplett, TET2: komplett, JAK2: E12, E14, FLT3: E20 für die TKD, FLT3-ITD mittels Fragmentlängenanalyse, MLL-PTD: mittels RQ-PCR, KRAS: E02-E03, NRAS: E02-E03, CBL: E08-E09, ASXL1: E13, IDH1: E04, IDH2: E04, TP53: E04-E10, EZH2: komplett, SF3B1: E13-E16, SRSF2: E01, Hotspot um Aminosäure Pro95, DNMT3A: E07-E23.

Wenn bei einem Gen Hotspotbereiche bestanden, wurden diese sequenziert, ansonsten die komplette kodierende Region. Im Vergleich zu großen publizierten Studien (Papaemmanuil et al. 2013; Haferlach et al. 2014) wurde in vorliegender Arbeit mit einem kleinen Gen-Panel von 16 Biomarkern gearbeitet, wohingegen durch die Verwendung von *Next Generation Sequencing (NGS)* im Gegensatz zur z.B. Sequenzierung nach Sanger eine höhere Sensitivität gegeben war, somatische Mutationen nachzuweisen. Aufgrund dessen zeigten sich die Inzidenzen der Mutationen annähernd deckungsgleich zu den bislang großen publizierten Studien.

In 70% der Patienten des vorliegenden Kollektivs wurden mindestens eine bis maximal fünf Mutationen des Gen-Panels nachgewiesen, welches trotz der überschaubaren Größe des Patientenkollektivs in etwa den bislang publizierten Größen entspricht, jedoch unter den bislang beschriebenen ca. 80% (Haferlach et al. 2014). Dies könnte an dem Schwerpunkt der Risikoklassifikationsverteilung des vorliegenden Kollektivs und auch in der kleinen Größe des Panels begründet liegen. Die Mehrheit der Patienten des Kollektivs verteilte sich in die günstiger gestellten Prognosekategorien, die eher weniger häufig somatische Mutationen zeigen.

Kritisch anzumerken ist das Fehlen von beispielsweise Wangenschleimhautabstrichen, um die gefundenen somatischen Mutationen von Keimbahnmutationen abgrenzen zu können (Bejar et al. 2011). Inwieweit ethnische Unterschiede eine Rolle spielen in Bezug auf Mutationsart und -häufigkeit, kann durch die vorliegende Arbeit nicht beantwortet werden, da der Hauptteil des untersuchten Kollektivs kaukasischer Herkunft war.

Informationen zu Komorbiditäten der Patienten wurden aus den Klinikdokumentationen und Arztbriefen entnommen. Anzumerken sei in diesem Zusammenhang eine fehlende Angabe zur Dauer und Medikation der Komorbiditäten, insbesondere bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (beispielsweise Methotrexat, Azathioprin, Cyclosporin A, Cyclophosphamid und Biologika), welche ggf. Auswirkungen auf die untersuchten Biomarker haben könnten.



## 4.2 Biomarker

70% der Patienten des Kollektivs waren Träger mindestens einer Mutation. Die mediane Überlebenszeit der Patienten verkürzte sich mit der Anzahl an Mutationen. Trugen Patienten die maximale Anzahl von fünf Mutationen, betrug die mediane Überlebenszeit nur noch 0,4 Jahre (4,8 Monate). ASXL1, KRAS und die Zytogenetik nach IPSS-R zeigten sich in vorliegender Arbeit als unabhängige Prognoseparameter bei MDS-Patienten. Inwieweit die prognostisch relevanten Mutationen oder deren Kombinationen therapeutische Regime ableiten lassen, ist weiterhin Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Weiter fortgeschritten ist dagegen die Integration in diagnostische Prozesse (Hong et al. 2017) und Prognose-Scores (Haase et al. 2019).

### RUNX1

Mutationen des RUNX1-Gens finden sich bei primären, fortgeschritteneren MDS-Erkrankungen, therapieassoziiertem MDS und der sAML. RUNX1-Mutationen treten in 20% aller Fanconi-Anämie Patienten sowie in bis zu 60% aller Patienten mit kongenitaler Neutropenie auf, welche im Verlauf ein MDS entwickeln können. Die Mutationen verteilen sich über das gesamte Gen und betreffen beide funktional wichtigen Domänen (Sood et al. 2017). RUNX1-Mutationen machen einen Anteil von 10-15% bei Patienten mit MDS aus und sind mit einer höheren Anzahl an Blasten im Knochenmark sowie einer Neigung zu Thrombozytopenien assoziiert. Zudem können sie das Überleben der Patienten sowie den Zeitraum des Übergangs in eine AML verkürzen. RUNX1-Mutationen wurden als Indikatoren für eine schlechte Prognose bei MDS beschrieben (Bejar et al. 2011; Bejar 2015). Die genaue Pathogenese des Übergangs von MDS zu AML aufgrund Mutationen im RUNX1-Gen ist bislang nicht bekannt. Sehr wahrscheinlich führen zusätzliche chromosomale Veränderungen des Chromosom 7 (-7/7q-) und aktivierende Mutationen des RTK-RAS-Signalwegs zu einer leukämischen Transformation. Ebenfalls unterstützend für einen leukämischen Übergang seien Mutationen der Gene FLT3, MLL und JAK2 (Sood et al. 2017).

In der vorliegenden Kohorte konnte bei 21,1% der untersuchten Patienten eine RUNX1-Mutation nachgewiesen werden. Dies entspricht dem oberen Häufigkeitsbereich der bislang dazu publizierten Daten, welche einen Bereich zwischen 10-20% angeben (Kulasekararaj et al. 2013a; Greenberg et al. 2015). Aufgrund dessen, dass Patienten mit myelodysplastisch-myeloproliferativen Neoplasien miteingeschlossen waren, ist eine entsprechend hohe Auftretenshäufigkeit am ehesten zu erklären. Zudem wurde das RUNX1-Gen komplett mittels *NGS* analysiert. RUNX1-Mutationen treten mit einer Häufigkeit von 7,9% bei Patienten mit CMML auf, haben einen unabhängigen Einfluss auf die Prognose und sind aufgrund dessen in das Prognose-Scoring-System bei CMML, dem CMML-Mol mit aufgenommen worden (Elena et al. 2016).

In der univariaten Analyse stellte sich ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit dar, mit einer medianen Überlebenszeit von 3,1 Jahren für Mutationsträger. Eine Beobachtung, welche bereits vorbeschrieben ist (Bejar et al. 2011; Bejar 2019). Die mediane Überlebenszeit wurde mit 11 anstatt 28 Monat als verkürzt publiziert sowie mit einem schnelleren Übergang und größeren Risiko der Transformation in eine AML (Chen et al. 2007; Tsai et al. 2015).

### TET2

TET2-Mutationen sind die häufigsten Mutationen bei MDS und oft mit einem normalen Karyotyp assoziiert. TET2 sei ein Mitinitiator der klonalen Hämatopoese (Heuser et al. 2016) und häufiger innerhalb der low-risk als high-risk WHO-Klassifikationen zu finden (Heuser et al. 2018). Phänotypische Auffälligkeiten sind nicht im Zusammenhang mit TET2-Mutationen beschrieben worden. Therapeutisch kann bei Vorliegen einer Mutation des TET2-Gen auf ein etwas höheres Ansprechen von demethylierenden Substanzen ausgegangen werden, bei gleichzeitigem Fehlen einer

ASXL1-Mutation (Bejar et al. 2011; Bejar et al. 2014a). Patienten mit TET2-Mutationen haben nach allogener Stammzelltransplantation eine schlechtere Prognose (Bejar et al. 2014). TET2-Mutationen lassen innerhalb der MDS keine klare prognostische Auswirkung verzeichnen (Heuser et al. 2018).

TET2-Mutationen lagen in vorliegender Arbeit bei 30% der Patienten vor, waren somit sehr häufig vertreten und lagen im oberen bislang publizierten Häufigkeitsbereich (Kulasekararaj et al. 2013a), was mit einer Inklusion von CMML-Patienten in vorliegende Kohorte vereinbar ist, wo TET2-Mutationen mit am häufigsten zu finden sind (Elena et al. 2016). Auch das TET2- Gen wurde komplett analysiert.

Mit einer medianen Überlebenszeit von 7,2 Jahren stellte sich in der univariaten Analyse kein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit für die vorliegende Kohorte dar. Der Einfluss von TET2-Mutationen wird weiterhin kontrovers diskutiert. In einer Metastudie von 2017 konnte der TET2-Mutationsstatus nicht als prognostischer Marker, aufgrund fehlenden Einflusses auf das Überleben, identifiziert werden (Guo et al. 2017). TET2-Mutationen sind bei CMML und AML mit einer schlechten Prognose assoziiert (Feng et al. 2019).

## **JAK2**

Innerhalb der Gruppe der myelodysplastischen Syndrome sind JAK2-Mutationen mit 5 % und mit einem Anteil von 50 % bei Patienten mit einer RARS-T vertreten. Insgesamt sind diese Mutationen bei MDS nicht häufig (Pellagatti und Boulwood 2015). Zudem kann eine RARS-T auf dem Boden einer initialen SF3B1-Mutation durch eine *Driver-Mutation* im JAK2- oder MPL-Gen aus einer RARS hervorgehen (Cazzola et al. 2013).

Bei Patienten mit RARS-T sind JAK2-Mutationen unabhängige Faktoren für eine gute Prognose und können eine Hilfe zur Unterscheidung von RARS und RARS-T darstellen (Zipperer et al. 2008) (Broséus et al. 2013). Bejar et al. konnten JAK2-Mutationen bei MDS keine negative prognostische Bedeutung zuweisen oder mit MDS typischen Symptomen in Verbindung bringen (Bejar et al. 2011).

Lediglich 3,8% der Patienten trugen im vorliegenden Kollektiv eine JAK2-Mutation. Diese Häufigkeit ist deckungsgleich mit bislang publizierten Daten (Bejar et al. 2011). Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte für die vorliegende Kohorte nicht demonstriert werden. JAK2-Mutationen treten gehäuft bei MDS/MPN-Patienten auf und sind bei Patienten mit MDS mit einem geringeren Risiko für einen leukämischen Übergang sowie mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert (Renzis et al. 2013).

## **FLT3**

Im Gegensatz zur AML, wo FLT3-Mutationen bei 30% der Patienten zu finden sind und sich negativ auf die Prognose auswirken, ist über die Häufigkeit und die Auswirkung bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen wenig bekannt (Daver et al. 2013). Eine Auftretenshäufigkeit bei MDS von 1-5 % wurde beschrieben (Pellagatti et al. 2015).

Bei Patienten mit einer AML werden hauptsächlich ITD (interne Tandemduplikation) zwischen 17-34% und Mutationen der TKD (Tyrosinkinase-Domäne), bei ca. 7%, gefunden. Diese Mutationen tragen zu einem Überlebens- und Proliferationsvorteil der leukämischen Blasten bei. FLT3-ITD-Mutationen haben bei der AML einen negativen prognostischen Wert, insbesondere bei zusätzlichem Verlust des FLT3-WT Allels und können den positiven Einfluss einer NPM1-Mutation negieren, wohingegen TKD-Mutationen noch keine prognostische Aussage zulassen (Daver et al. 2013). FLT3-ITD wurden doppelt so häufig zusammen mit NPM1-Mutationen bei AML gefunden als zusammen mit WT-NPM1 (Meggendorfer et al. 2015).

FLT3-Mutationen sind beim MDS eher bei fortgeschrittenen Formen im Übergang zur AML zu finden und mit einem reduzierten *event-free survival* und OS assoziiert. Zudem zeigen Patienten mit einer FLT3-Mutation eine schnellere leukämische Transformation als der FLT3-WT. Daver et al. konnten keinen Einfluss auf das OS herausstellen, jedoch bestätigen, dass FLT3-Mutationen in der Gruppe der

RAEB häufiger zu finden sind. Zudem traten FLT3-Mutationen ähnlich der AML häufiger mit einem komplex veränderten Karyotyp sowie NPM1-Mutationen auf, als mit dessen WT (Daver et al. 2013). Eine alleinige FLT3-Mutation, eine FLT3-Mutation zusammen mit einer NPM1-Mutation oder einer komplexen Zytogenetik hatten einen signifikant negativen Einfluss auf das *progression-free survival*. In der Arbeit von Bains et al. entwickelten alle Patienten mit Mutationen im FLT3 und NPM1-Gen eine AML, jedoch keiner mit einer NPM1-Mutation allein (Bains et al. 2011).

Mutationen in den Signaltransduktionsgenen FLT3, KRAS oder NRAS scheinen einen Übergang in eine sAML zu einem bestimmten Zeitpunkt der Transformation zu beschleunigen und können somit eine wichtige Information im Behandlungsverlauf darstellen. In einer Verlaufsbeobachtung an Patienten, welche nach einem MDS eine sAML entwickelten, konnten FLT3-ITD und FLT3-TKD-Mutationen nur zum Zeitpunkt des Progresses gefunden werden (Meggendorfer et al. 2015).

Für den klinischen Alltag erscheint eine Bestimmung dieser zwar seltenen (FLT3, NPM1) doch prognostisch wichtigen molekularen Marker zu Beginn und während des Krankheitsverlaufes zur Risikostratifizierung sowie vor dem Hintergrund eines in Zukunft möglichen pharmakologischen Behandlungsansatzes ein zu implementierendes Vorgehen.

Die Häufigkeit für eine FLT3-Mutation innerhalb des vorliegenden Kollektivs lag bei nur 3,7% und damit im vorbeschriebenen Bereich von 0,6-6% bei Patienten mit MDS (Gill et al. 2016). Mutationen, welche die Signaltransduktion betreffen wie FLT3, KRAS und NRAS, scheinen den Progress des MDS zu einer sAML zu begünstigen und könnten, im Verlauf der Erkrankung weiterhin kontrolliert, zusätzliche Informationen zur individuellen Therapie und Prognose des Patienten liefern (Meggendorfer et al. 2015). Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte in der vorliegenden Arbeit nicht demonstriert werden. Die mediane Überlebenszeit für Träger einer FLT3-Mutation lag bei 2,4 Jahren. Innerhalb der AML sind FLT3-Mutationen häufig und mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert. Ein Zusammenhang zwischen einem positivem FLT3-Mutationsstatus und einer ungünstigen Prognose ist bei MDS-Patienten bislang nicht beschrieben. Daver et al. konnten keinen signifikanten Unterschied bei MDS und CMML-Patienten in Bezug auf den FLT3-Mutationsstatus und das Überleben herausstellen wie bei AML-Patienten. Anzumerken sind jedoch die kleinen Fallzahlen jener Arbeit (Daver et al. 2013).

## **MLL-PTD**

Innerhalb der MDS finden sich MLL-PTD meist bei fortgeschrittenen Erkrankungsstadien (high-grade disease with excess blasts) und sind eher mit einem unauffälligen Karyotyp assoziiert. MLL-PTD-Mutationen seien bei MDS-Patienten mit einer schlechten prognostischen Wertigkeit vergesellschaftet (Choi et al. 2018). Im vorliegenden Patientenkollektiv konnte bei 6 Patienten (4,2%) eine MLL-PTD-Mutation nachgewiesen werden, welches bislang publizierte Häufigkeiten bestätigt (Dicker et al. 2010). Der Einfluss von MLL-PTD-Mutationen auf die Überlebenszeit war für die vorliegende Kohorte nicht signifikant. MLL-PTD wurde bislang jedoch bei MDS-Patienten als eine Mutation angesehen, welche in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung auftritt und mit einem schnelleren Übergang in eine AML zusammenhängen kann, aufgrund dessen Choi et al. sich für eine Routinetestung bei MDS-Patienten aussprachen und die Empfehlung einer frühzeitigen SCT ableiteten (Choi et al. 2018).

## **RAS**

RAS-Gene sind die am häufigsten in menschlichen Tumoren mutierten Gene und in soliden sowie hämatopoetischen Tumoren zu finden. RAS-Mutationen sind bei über 75% aller Pankreaskarzinome, 50% aller Schilddrüsenkarzinome und in >40% aller kolorektalen Karzinome zu finden (Bos 1989).

RAS-Mutationen stellen insgesamt nur einen kleinen Anteil an Mutationen bei MDS und scheinen keinen prognostischen Wert für MDS-Patienten zu haben (Al-Kali et al. 2013), werden jedoch bei Patienten in Transformation zur sAML als prognostisch ungünstig beschrieben (Badar et al. 2015). Bei CMML-Patienten sind RAS-Mutationen jedoch häufig (bis zu 30%), insbesondere bei MPN-CMML

(Patnaik et al. 2018) und wurden aufgrund ihrer unabhängigen Wertigkeit zum CPSS in den CPSS-molekular integriert (Elena et al. 2016).

Bei verschiedenen Krebsarten kann diese Signalkaskade spezifisch gehemmt werden. Durch das Binden von monoklonalen Antikörpern wie z.B. Trastuzumab zur Therapie des Mammakarzinoms wird das Andocken von Liganden und dadurch die Weiterleitung des Signals verhindert. Tyrosinkinaseinhibitoren wie z.B. Imatinib zur Therapie der CML verhindern die Autophosphorylierung der Tyrosinkinasedomäne und unterbrechen so die Signaltransduktion. Es ist auch möglich, gezielt weitere Strukturen der Signalkaskade zu hemmen.

RAS-Proteine werden durch Farnesylierung, also das posttranslationale Anhängen eines Farnesylrests (C15) über eine Thioetherbindung an einen Cytosinrest, aktiviert. RAS erhält dadurch einen Plasmamembrananker und ist somit membranständig und aktiv. Angeheftet wird dieser lipophile Anker über eine Farnesyltransferase (Löffler 2003). Dieser Mechanismus stellt ebenfalls einen therapeutischen Angriffspunkt dar. Inhibitoren dieses Prozesses wie Tipifarnib und Lonafarnib sind aktuell nicht für die Behandlung der MDS zugelassen, konnten aber in einer Phase II Studie bei 1/3 der Hochrisiko-MDS-Patienten ein hämatologisches Ansprechen erreichen (Fenaux et al. 2007).

Zudem ist es bereits möglich, einige Komponenten des MAP-Kinase und PI3K/AKT-Signalwegs zu inhibieren. Ziele der Inhibitoren sind z.B. RAF, MEK, PI3K/ mTOR u.a. (Regad 2015).

## **NRAS**

Speziell NRAS-Mutationen sind in bis zu 20% bei malignen Melanomen, zu 2% beim kolorektalen Karzinom und bis zu 10% bei Schilddrüsenkarzinomen zu finden. Bei den bösartigen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems machen sie bei der AML bis zu 10%, bei ALL 11%, beim Multiplen Myelom 18%, bei den MDS 5-15% und bei der CML bis zu 19% aus.

NRAS-Mutationen sind assoziiert mit einer ausgeprägten Thrombozytopenie sowie einer erhöhten Anzahl an Knochenmarkblasten (Bejar et al. 2011).

Die Mutationsrate für NRAS stellte sich mit 3,9% im vorliegenden Kollektiv dar und befand sich somit ebenfalls im deckungsgleichen bislang angenommenen Häufigkeitsbereich für Patienten mit MDS (Bejar 2015). Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte für einen positiven NRAS-Mutationsstatus in der univariaten Analyse demonstriert werden, mit einer medianen Überlebenszeit von 2,5 Jahren. Dies wurde ebenso vorbeschrieben und zwar insbesondere bei MDS-Patienten der niedrigeren Risikogruppen. NRAS-Mutationen sind noch etwas häufiger bei CMML und JMML Patienten (15%) zu finden und gehen in den *CPSS-Mol*, dem Prognosescore für CMML-Patienten, mit ein (Greenberg et al. 2015; Such et al. 2013).

## **KRAS**

KRAS-Mutationen sind insgesamt selten bei MDS (Pellagatti et al. 2015). Eine Mutation im KRAS-Gen trugen im vorliegenden untersuchten Kollektiv nur vier Patienten, somit 2,5%, was sich ebenfalls mit bislang publizierten Daten deckt (Pellagatti et al. 2015; Bejar et al. 2011). Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte in der univariaten Analyse in vorliegender Arbeit nicht demonstriert werden, jedoch in der multivariaten Analyse. Die mediane Überlebenszeit für Träger einer KRAS-Mutation lag bei 3,5 Jahren. Dies, wie auch die Beobachtung, dass RAS-Mutationen mit einer hohen peripheren Leukozytenzahl sowie erhöhten Knochenmarkblasten assoziiert sind wurde von Al-Kali et al. beschrieben (Al-Kali et al. 2013). Es bestehen Publikationen, welche KRAS-Mutationen mit einem verkürzten Gesamtüberleben assoziieren (Xu et al. 2017b). Prognostisch ebenfalls relevant sind RAS-Mutationen nach einer allogenen Stammzelltransplantation, da mit einer kürzeren Zeit bis zum Rezidiv gerechnet werden kann (Lindsley et al. 2017). Insgesamt ist die Datenlage zu KRAS-Mutationen bei MDS advers.

## CBL

CBL-Mutationen sind bei MDS selten. Innerhalb der myeloischen Erkrankungen findet man CBL-Mutationen am häufigsten innerhalb der MDS/MPN, wie der CMML, der atypischen CML und der JMML (Naramura et al. 2011). Innerhalb der MDS sind sie insgesamt mit nur 1-3% vertreten (Kulasekararaj et al. 2013a). Einfluss auf das Überleben konnte für CBL innerhalb der CMML nicht nachgewiesen werden. Gänzlich fehlen sie bei den klassischen myeloproliferativen Erkrankungen (Schnittger et al. 2012).

Im Jahr 2007 konnten verschiedene Arbeitsgruppen CBL-Mutationen auch bei AML-Patienten nachweisen. Bei den meisten CBL-Mutationen handelt es sich um Missens-Mutationen oder um kleine Deletionen innerhalb der *Linker*- oder der RING-Finger-Region, welche die E3-Ligase-Aktivität außer Kraft setzen. Deletionen des gesamten CBL-Gens sowie Mutationen außerhalb der Linker- oder RING-Finger-Regionen sind sehr selten. Bei Patienten mit CBL-Mutationen kommt es oft zu einem zusätzlichen Verlust des WT-CBL Allels bei leukämischer Transformation (Naramura et al. 2011).

Beim Fortschreiten der high-risk MDS hin zur sAML konnte eine Zunahme der Häufigkeit an CBL-Mutationen von 1-3% auf über 10 % sowie eine erhöhte Anzahl an Knochenmarkblasten bei bestehender CBL-Mutation und ein geringeres Gesamtüberleben beschrieben werden. Bislang besteht keine Option der zielgerichteten Therapie bei Patienten mit Mutationen des CBL-Gens (Pellagatti et al. 2015; Greenberg et al. 2015; Gill et al. 2016).

Eine Mutation des CBL-Gens (Exon 8 und 9) wurde in vorliegender Arbeit bei 2,2% der Patienten gefunden, ebenfalls deckungsgleich mit der Häufigkeit von 2,3%, in einer grundlegenden Arbeit von Bejar et al. aus dem Jahr 2011. Innerhalb der CMML und JMML sind CBL-Mutationen in bis zu 15-20% der Patienten zu finden (Greenberg et al. 2015).

Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte in vorliegender Arbeit nicht demonstriert werden. CBL-Mutationen treten vermehrt bei Patienten mit high-risk MDS im Übergang zur sAML auf, aufgrund dessen ein Pathomechanismus bei der Progression vermutet werden kann (Kao et al. 2011). Hou et al. beschreiben ein reduziertes Gesamtüberleben für Mutationsträger, da Patienten in gleicher IPSS-R-Risikokasse sich durch eine CBL-Mutation soweit verschlechtern, dass sie vom Risiko in die nächst höhere IPSS-R-Klasse eingeordnet werden könnten, worauf hin sich das Therapieregime ggf. entsprechend ändern würde (Hou et al. 2018).

## ASXL1

ASXL1-Mutationen sind mit 15-20% eine der häufigsten Mutationen innerhalb der MDS und auch bei Patienten mit AML, CML sowie CMML zu finden (Thol et al. 2011). ASXL1-Mutationen sind innerhalb der high-risk MDS häufiger vertreten, als innerhalb der low-risk MDS und assoziiert mit einem intermediate-risk Karyotyp. Eine Assoziation zu klinischen Parametern konnte bislang nicht beschrieben werden (Heuser et al. 2018). ASXL1-Mutationen haben einen negativen Einfluss auf die Prognose innerhalb der MDS. Patienten mit einer Frameshift-Mutation, nicht jedoch Punktmutation, zeigen einen schnelleren Übergang zu einer AML und weisen ein verringertes Gesamtüberleben auf. Dies ist ein, insbesondere bei Patienten mit IPSS low-risk, beschriebener Effekt. Dem Ausmaß der Genexpression konnte bislang kein prognostisches oder klinisches Charakteristikum zugeordnet werden (Thol et al. 2011). Zu ASXL1-Mutationen und der Prognose nach allogener Stammzelltransplantation gibt es bislang widersprüchliche Aussagen (Heuser et al. 2018). ASXL1-Mutationen seien gemeinsam mit DNMT3A und TET2-Mutationen an der Entstehung von CHIP beteiligt, welche die Grundlage für eine hämatologische Neoplasie bilden kann (Heuser et al. 2016).

Die Rate an ASXL1-Mutationen in vorliegender Arbeit betrug 23,5%, ebenfalls deckungsgleich mit bislang publizierten Häufigkeiten von 15-25%. Zu beachten gilt auch hier die Integration von CMML-Patienten in die Kohorte. Die Häufigkeit von ASXL1-Mutationen kann in dieser Gruppe mit 40-50% deutlich höher liegen (Greenberg et al. 2015). Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte für einen positiven ASXL1- Mutationsstatus in der uni- wie auch multivariaten Analyse ( $p=0,001$ ) demonstriert werden. Die mediane Überlebenszeit für ASXL1-Mutationsträger betrug 3,16 Jahre. ASXL1-Mutationen sind mehrfach mit einem verringerten Gesamtüberleben sowie mit einer

vermehrten Häufigkeit eines Progresses bei Patienten mit MDS und CMML assoziiert worden (Bejar et al. 2011; Pellagatti et al. 2015).

## **IDH-Gene**

Mutationen der IDH-Gene finden sich innerhalb der MDS in 2-12% der Patienten und sind häufiger bei fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung, beispielsweise RAEB-2, als innerhalb der low-grade MDS zu finden und steigern sich zu einem Anteil von bis zu 20% bei der sAML. Zudem gibt es eine Assoziation zu einem normalen oder intermediate-risk Karyotyp (Visconte et al. 2014). Die Aussagen über den Einfluss beider Mutationen auf das Überleben sind in der Literatur widersprüchlich. In einer Arbeit von DiNardo et al. wurde kein negativer prognostischer Einfluss auf die Überlebenszeit oder einen leukämischen Progress gefunden (DiNardo et al. 2016). Pharmakologisch sind diese, durch Mutationen veränderten Enzyme, potentiell direkt zu blockieren. Das Ansprechen auf eine Therapie mit Decitabine scheint bei IDH positivem Mutationsstatus vorteilhaft zu sein (Jin et al. 2014).

Diverse IDH1/2 Inhibitoren zur *targeted therapy*, sowie Glutaminase- und NADPH-Inhibitoren sind aktuell in Entwicklung (Gill et al. 2016; Aleshin et al. 2018). Ivosidenib wurde 2018 zur Behandlung von IDH1-positiven refraktären AML-Patienten in den USA zugelassen. Angriffspunkt ist ein Stoffwechselweg, um die Akkumulation von 2-HG zu verhindern. Enasidenib wurde 2017 in den USA zur Behandlung von IDH2-positiven AML-Patienten zugelassen (Kim 2017).

## **IDH1**

IDH1-Mutationen, insbesondere das Codon 132 betreffend, sind mit einem reduzierten Gesamtüberleben vergesellschaftet. IDH-Mutationen innerhalb der intermediate-1-Risikogruppe nach IPSS sind ebenfalls mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert (Jin et al. 2014).

Bei 3,1% der Patienten zeigte sich ein positiver Mutationsstatus, vereinbar mit bislang publizierten Häufigkeiten (Bejar et al. 2011). Innerhalb vorliegender Kohorte sind somit nur vier Patienten betroffen. Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte nicht demonstriert werden. In einer Arbeit von Jin et al., inklusive einer Metastudie, wurden IDH1-Mutationen mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert, insbesondere Patienten der intermediate-1-Risikogruppe nach IPSS, woraus sie die Empfehlung ableiten, Patienten für eine bessere Risikostratifizierung gezielt auf diese Mutation hin zu untersuchen (Jin et al. 2014).

## **IDH2**

IDH2-Mutationen treten gehäuft zusammen mit DNMT3A, ASXL1 sowie SRSF2-Mutationen auf und sind ebenfalls mit einem reduzierten Gesamtüberleben vergesellschaftet, insbesondere bei Mutationen des Codon 172 (Gill et al. 2016).

Die Häufigkeit von IDH2-Mutationen betrug ebenfalls 3,1% und lag somit ebenfalls unter den in der Literatur angegebenen 5% (Greenberg et al. 2015). Ein prognostischer Einfluss konnte für das vorliegende Kollektiv nur in der univariaten Analyse, als signifikant lebensverkürzend, berechnet werden und entspricht somit der Aussage von Jin et al. (Jin et al. 2014).

## **TP53**

Mutationen des TP53-Gens sind in bis zu 10% aller de novo MDS und AML-Fälle nachzuweisen, mit einem Anstieg auf bis zu 25% bei therapieassoziiertem MDS und therapieassoziierter AML (Larsson et al. 2013). TP53-Mutationen sind verbunden mit einem erhöhten Risiko eines Übergangs in eine AML, schweren Thrombozytopenien, einem komplexen Karyotyp, einem höheren Anteil an Knochenmarkblasten und stellen einen unabhängigen negativen Prädiktor für das Gesamtüberleben dar. In der Risikogruppe intermediate-2 und high-risk nach IPSS waren Mutationen des TP53-Gens am häufigsten vertreten (Bejar et al. 2011).

Häufig sind TP53-Mutationen mit einer Deletion 5q assoziiert. Kulasekararaj et al. konnten in 10% aller untersuchter MDS-Patienten TP53-Mutationen finden. Knapp 20% der Mutationen waren mit einer Deletion 5q assoziiert und über 70% mit einem komplex veränderten Karyotyp inklusive -5/5q- (Kulasekararaj et al. 2013b). TP53-Mutationen in Kombination mit einer del(5q), verzeichnen ein schlechteres Ansprechen auf Lenalidomid und ein verkürztes Überleben (Hosono 2019).

Jedoch sind nicht nur TP53-Mutationen relevant für die Prognose, auch der Aktivitätszustand innerhalb der Zelle spielt eine Rolle. Patienten mit monoallelischer Expression, also mit einem aktiven TP53-WT-Gen und einem mutierten Gen, scheinen im Gegensatz zu Patienten mit Mutationen in beiden Genen (Punktmutationen, Deletionen oder cnLOH) im klinischen sowie prognostischen Vorteil zu sein. Patienten mit monoallelischer Expression haben im Vergleich zu *multi-hit TP53* Patienten weniger Zytopenien, einen geringeren Blastenanteil im KM und sind häufiger in low-risk WHO-Klassifikationen vertreten. Insgesamt bestehe zwischen dem WT und nur einem mutierten TP53-Gen kein großer Unterschied in Bezug auf das Überleben (Bernard et al. 2019). Bally et al. konnten in einer Untersuchung mit 62 high-risk MDS und AML-Patienten feststellen, dass TP53-Mutationen keinen nennenswerten Einfluss auf das Therapieansprechen mit Azacitidin bei high-risk MDS-Patienten haben, wohingegen gute Ansprechraten durch Decitabin beschrieben wurden (Bally et al. 2014; Welch et al. 2016).

TP53-Mutationen wurden als nicht geeignet beschrieben, um ein Ansprechen auf eine Therapie mit *hypomethylating agents* (HMA) vorauszusagen (Kuendgen et al. 2018).

Insgesamt wurde bei 6,7% der untersuchten Patienten eine TP53-Mutation nachgewiesen, welches somit knapp unterhalb den vorbeschriebenen 8-12% liegt (Greenberg et al. 2015). Ein klar signifikanter Einfluss in der univariaten Analyse auf die Überlebenszeit konnte für einen positiven TP53-Mutationsstatus demonstriert werden, welche sich als verkürzt für Mutationsträger darstellte, sich jedoch nicht in der multivariaten Regressionsanalyse halten konnte. Der Zusammenhang zu einer schlechteren Prognose sowie eine Assoziation zu komplex veränderten Karyotypen und einer Deletion 5q sind ebenso vorbeschrieben wie ein mögliches Versagen einer Lenalidomid-Therapie bei Mutationsträgern (Greenberg et al. 2015). Insbesondere bei Patienten nach einer Stammzelltransplantation ist ein positiver TP53-Status als prognostisch schlecht anzusehen (Haider et al. 2017).

## **EZH2**

EZH2-Mutationen finden sich mit einem Anteil von 6% bei Patienten mit MDS und verschlechtern das Gesamtüberleben im Vergleich zum Wildtyp. Zytogenetische Veränderungen des Chromosom 7, auf welchem das EZH2-Gen lokalisiert ist, sind ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert. EZH2-Mutationen sind häufig mit TET2-Mutationen vergesellschaftet und neigen zu einem Progress der Erkrankung. Folglich werden diese Mutationen häufig bei high-grade MDS-Patienten gefunden und erhöhen das Risiko der Entstehung einer AML bei gleichzeitiger Verschlechterung des Gesamtüberlebens (Larsson et al. 2013). Bei Vorkommen innerhalb der low-risk-MDS ist die Prognose ebenfalls schlecht (Kulasekararaj et al. 2013a). Ein spezifischer Inhibitor, GSK-126, ist aktuell Bestandteil einer targeted-therapy bei EZH2-positiven Lymphomen (Gill et al. 2016). Die immunmodulatorischen Eigenschaften aberranter EZH2-Expressionen in malignen Zellen ist aktuell ebenfalls ein Forschungsschwerpunkt und lässt perspektivisch evtl. neue Therapieoptionen ableiten (Gan et al. 2018).

Bei 8,5% der Patienten konnte in vorliegender Arbeit eine EZH2-Mutation nachgewiesen werden. Mit 5-10% wird die Häufigkeit für EZH2-Mutationen durch Bejar et al. beschrieben mit dem Verweis, dass bis zu 12% der Patienten mit CMML, welche ebenfalls in vorliegender Kohorte mit integriert sind, betroffen sein können. Einen signifikanten Einfluss hatte ein positiver EZH2-Mutationsstatus auf die Überlebenszeit in der univariaten Analyse ergeben (1,7 Jahre vs. 6,1 Jahre), welcher durch Bejar et al. als unabhängiger Faktor für eine schlechte Prognose beschrieben wurde (Bejar et al. 2012).

## SF3B1

Somatische SF3B1-Mutationen machen 30% bei Patienten mit MDS und bis zu 20% bei Patienten mit MDS/MPN wie der CMML, RARS-T und CLL aus. Signifikant höher, nämlich bei bis zu 70%, liegt der Mutationsanteil bei Patienten mit Ringsideroblasten, RARS oder RCMD-RS. Patienten mit SF3B1 positivem Mutationenstatus haben eine geringere Inzidenz multilineärer Dysplasien, eine höhere Anzahl an absoluten Neutrophilen und Thrombozyten sowie im Knochenmark befindlicher Ringsideroblasten. Zudem besteht ein höherer Serum-Ferritinspiegel und ein geringerer Anteil an Blasten im Knochenmark. Chromosomale Veränderungen treten bei Patienten mit positivem SF3B1-Status weniger häufig auf als beim SF3B1-WT.

Bezogen auf MDS mit RS kann ein positiver SF3B1-Status eine homogene Subgruppe mit isolierter erythroider Dysplasie sowie guter Prognose definieren. Dahingegen findet sich bei MDS mit RS und wild-type SF3B1 häufiger eine Mehrliniendysplasie sowie eine im Vergleich schlechtere Prognose (Malcovati et al. 2015). Insgesamt ist ein positiver SF3B1-Mutationsstatus mit einer guten Prognose bei MDS vergesellschaftet. Aktuell besteht noch keine Möglichkeit für eine *targeted-therapy* bei positivem SF3B1-Status (Gill et al. 2016).

Bei 22 Patienten (27,5%) des vorliegenden untersuchten Kollektivs konnte eine SF3B1-Mutation nachgewiesen werden, welche mit einer Häufigkeit von 18-30% und einer Assoziation zu Ringsideroblasten vorbeschrieben sind und gehäuft bei Patienten mit RARS (in bis zu 80%) auftreten (Greenberg et al. 2015). Auch SF3B1 zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit in der univariaten Analyse im Sinne eines Überlebensvorteils, ebenso vorbeschrieben in einer Arbeit von Malcovati et al. von 2011 (Malcovati et al. 2011a). Zudem sei das Risiko eines Übergangs in eine AML reduziert. Eine Aufnahme in ein prognostisches Bewertungssystem wurde empfohlen (Malcovati et al. 2011b).

## SRSF2

SRSF2-Mutationen treten bei MDS-Patienten selten alleine auf. Innerhalb der CMML finden sie sich häufig gemeinsam mit TET-2-Mutationen und bei einer AML mit RUNX1, IDH2 und ASXL1-Mutationen (Visconte et al. 2019).

Die Inzidenz an SRSF2-Mutationen ist bei low-risk Patienten und high-risk Patienten in etwa gleich hoch. Es besteht eine Korrelation zum männlichen Geschlecht sowie zu höherem Alter. Ein Einfluss von SRSF2-Mutationen auf das Blutbild oder LDH-Werte konnte bislang nicht herausgestellt werden. Ebenso wenig besteht ein Zusammenhang zu einem positiven SRSF2-Status und der IPSS-Gruppe oder ist eine Zuordnung zu zytogenetischen Aberrationen bislang möglich. Es besteht ein negativer Einfluss bei positivem Mutationsstatus auf das Gesamtüberleben, besonders innerhalb der low-risk Risikogruppe der MDS. Bei CMML-Patienten konnte kein Einfluss auf das Gesamtüberleben bei bestehender SRSF2-Mutation nachgewiesen werden. SRSF2-Mutationen werden als stabil während des Fortschreitens der MDS beschrieben (Wu et al. 2012).

Eine Mutation des SRSF2-Gens, Exon 01 im *Hotspot*-Bereich Pro95, konnte bei 19,5% der Patienten in vorliegendem Kollektiv nachgewiesen werden. Diese werden mit 10-15% bei MDS-Patienten angegeben, mit einer höheren Inzidenz bei CMML-Patienten, welches die leicht überdurchschnittliche Häufigkeit im vorliegenden Kollektiv erklären kann, da CMML-Patienten mit ins Kollektiv aufgenommen wurden (Greenberg et al. 2015). Ein signifikanter Einfluss auf die Prognose durch SRSF2-Mutationen konnte für das vorliegende Kollektiv nicht nachgewiesen werden. In einer Publikation von Thol et al. konnten SRSF2-Mutationen mit einem verkürzten Überleben und einem häufigeren Progress in eine AML assoziiert werden. Sie leiteten die Empfehlung ab, diese ebenfalls zukünftig in prognostische Bewertungssysteme mit aufzunehmen (Thol et al. 2012).



## DNMT3A

DNMT3A-Mutationen finden sich mit einer Häufigkeit von bis zu 10% bei Patienten mit MDS und mit einem Anteil von bis zu 20% bei Patienten mit AML. Bei HSC mit einer DNMT3A-Mutation sei ein Proliferationsvorteil sowie eine Prädisposition für eine maligne Entartung vorhanden. Zudem sei eine DNMT3A-Mutation die häufigste Mutation bei einer klonalen Hämatopoese von unbestimmtem Potential (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP*) (Heuser et al. 2018). Bei mehr als der Hälfte aller DNMT3A-Mutationen besteht meist zusätzlich eine SF3B1-Mutation, was auf einen Synergismus in der Pathogenese bei MDS schließen lassen könnte.

Zudem besitzt DNMT3A die Funktion einer Dehydroxymethylase, aufgrund dessen von einer epigenetischen Modulationsfähigkeit der CpG-Inseln und Histonen an bestimmten Loci ausgegangen werden kann (Kulasekararaj et al. 2013a). DNMT3A-Mutationen sind bei Patienten mit MDS mit einem reduzierten Gesamtüberleben sowie mit einem höheren Risiko eines Übergangs in eine AML vergesellschaftet (Pellagatti et al. 2015). Zudem zeigen Patienten mit Mutationen im DNMT3A-Gen ein besseres Ansprechen auf demethylierende Pharmaka. Azacitidin und Decitabin führen nach Einbau in die DNA zu einem Abbau der DNMT's über Proteasomen (Gill et al. 2016).

Somatische Mutationen in den Genen TP53, TET2 sowie DNMT3A sind Indikatormutationen für ein kürzeres Gesamtüberleben nach allogener SCT, welches bei diesen Patientengruppen andere Therapieoptionen in Erwägung ziehen lassen könnte (Kulasekararaj et al. 2013a).

13,9% der Patienten trugen in vorliegendem Kollektiv eine DNMT3A-Mutation – ebenfalls deckungsgleich mit bislang publizierten Häufigkeiten. Auch hier begründbar durch die hohe Sensitivität des NGS sowie des großen untersuchten Exons-Bereichs (E07-E23). Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit konnte für DNMT3A trotz ähnlicher Häufigkeiten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, anders als bislang häufig publiziert (Greenberg et al. 2015; Walter et al. 2011). Ursächlich mag das im Verhältnis zu anderen Studien kleine Patientenkollektiv sowie die zufällige Verteilung der Mehrheit der Patienten in günstige Risikogruppen, die im Verhältnis überdurchschnittliche Gesamtüberlebenszeit und der geringere Altersdurchschnitt (68 Jahre) sein. Walter et al. beschrieben einen negativen Einfluss von DNMT3A-Mutationen auf die Überlebenszeit von MDS-Patienten sowie einen schnelleren Übergang in eine AML und sprachen sich für die Zuhilfenahme des Mutationsstatus für die Prognoseerstellung aus (Walter et al. 2011).

### 4.3 Patientenindividuelle Prognoseparameter

Das Alter bei Erstdiagnose, das Geschlecht sowie die Diagnose nach FAB und WHO2016 zeigten sich in der univariaten Analyse wie bislang häufig vorbeschrieben als Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben (Wang et al. 2019; Aul et al. 1992; Neukirchen et al. 2014). Es handelt sich um bislang sehr gut erforschte Faktoren für Patienten mit MDS. Dies zeigt eindrücklich die Relevanz individueller Faktoren auf die Prognose.

### 4.4 Klinische Prognoseparameter

Bei allen Patienten wurden ein Blutbild und Differentialblutbild bei ED erhoben. Der Hb-Median in dieser Arbeit betrug 9,9g/dl und zeigte nach IPSS und Geschlechterschichtung einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit an. Gleiches konnte für den Hb-Wert nach IPSS-R und Geschlechterschichtung dargestellt werden. Zu erwähnen ist eine höhere mediane ÜZ von 4,8 Jahren bei einem Hb <8g/dl im Vergleich zu einem Hb zwischen 8-10g/dl mit einer medianen ÜZ von 3,3 Jahren nach IPSS-R. Einen entsprechenden Zusammenhang fanden Malcovati et al. jedoch mit einer anderen Hb-Schichtung (<9d/dl bei Männern und <8g/dl bei Frauen). Sie konnten zeigen, dass entsprechend niedrige Hb-Werte mit einem reduzierten Gesamtüberleben und einem höheren Risiko an

einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben assoziiert sind (Malcovati et al. 2011a). Für die Thrombozyten konnte für die gesamte Kohorte ein Median von 111,000 / $\mu$ l berechnet werden. Die Höhe der Thrombozyten bei ED zeigte sich nach IPSS und IPSS-R in der univariaten Analyse als signifikanter Faktor für die ÜZ. Thrombozytopenien als Prädiktor für ein verkürztes Überleben sind für MDS bereits gut beschrieben (Neukirchen et al. 2009).

Die neutrophilen Granulozyten zeigten einen Median von 1620/ $\mu$ l bei ED und erwiesen sich nach IPSS und IPSS-R als nicht signifikanter prognostischer Faktor, welches in der Literatur jedoch als prognostisch bedeutsam beschrieben und bereits etablierter Bestand der Scoring-Systeme für die Prognose ist (Greenberg et al. 2012; Cordoba et al. 2012). Der Median für den Blastenanteil im KM lag bei 4%. Ein signifikanter Einfluss in der univariaten Analyse konnte für den Anteil an Blasten im KM für die IPSS-Risikostratifizierung berechnet werden, jedoch nicht für den IPSS-R. Als unabhängiger prognostischer Faktor wurden Blasten im KM jedoch für den IPSS sowie den IPSS-R beschrieben und haben Bestand in beiden Scoring-Systemen zur Risikostratifizierung (Greenberg et al. 2012).

Bei 37,3% der Patienten zeigte sich eine auffällige Zytogenetik, bei 62,7% verblieb die zytogenetische Untersuchung ohne pathologischen Befund. Dies ist etwas unterdurchschnittlich zu den in der Literatur abgegeben 50% an chromosomalen Aberrationen bei MDS. Die Ursache mag in der vorliegenden Kohorte die Erstellung der Zytogenetik bei ED sein, das Durchschnittsalter von 68 Jahren, einem hohen Anteil an Patienten mit niedrig Risiko-Formen des MDS sowie an einem geringen Anteil an therapieassoziierten MDS liegen. In der univariaten Analyse stellte sich die Zytogenetik nach IPSS und IPSS-R als nicht signifikant in Bezug auf die ÜZ dar, welches ebenfalls in der Literatur anders beschrieben ist (Greenberg et al. 2012). In der multivariaten Analyse jedoch zeigte sich die Genetik nach IPSS-R als unabhängiger prognostischer Faktor. Zusammenfassend ist der prognostische Einfluss der klinischen Parameter bei MDS sehr gut erforscht und fester Bestandteil der Goldstandards zur Risikostratifizierung.

## **4.5 Biomarker und Komorbiditäten**

### **MDS und Komorbiditäten**

Von vielen soliden und hämatologischen Tumoren werden molekulare Tumorprofile erstellt, in Prognose-Scores integriert und Therapiestrategien entsprechend abgeleitet. MDS, eine Erkrankung vornehmlich des älteren Menschen, betrifft aufgrund dessen häufig Patienten mit Komorbiditäten, welche ebenfalls wie mancher Biomarker einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben darstellen können (Sperr et al. 2010). Um die Prognose und Therapie von Patienten noch individueller planen und besser abschätzen zu können, stehen patientenindividuelle Daten wie die Komorbiditäten ebenfalls im Fokus der Forschung (Zipperer et al. 2014). Perspektivisch erscheint es erstrebenswert patientenindividuelle Parameter weiterhin und großzügiger in Prognose-Scores zu integrieren.

In einer Arbeit von Naqvi et al. konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit MDS das Vorliegen von CHIP-typischen Mutationen wie ASXL1, DNMT3A, JAK2 und TP53 mit bestimmten Komorbiditäten assoziiert ist. DNMT3A und JAK2 seien mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines myokardialen oder thrombotischen Geschehens assoziiert, TP53-Mutationen mit Tumorerkrankungen in der Anamnese (Naqvi et al. 2019). In vorliegender Arbeit wurden acht Komorbiditäten Einheiten gebildet und gegen das 16 Biomarker umfassende myeloische Panel gesetzt, um mögliche Zusammenhänge aufzeigen zu können.

## Autoimmunerkrankungen und Biomarker

Autoimmunerkrankungen (AE) sind bei 10-30% der MDS-Patienten vertreten, insbesondere bei CMML Patienten. Häufig sind eine Vaskulitis, eine seronegative Polyarthritits oder die neutrophile Dermatose. Die seltene rezidivierende Polychondritis ist besonders stark mit MDS assoziiert. Zudem sind antinukleäre Antikörper (ANA's) häufig bei MDS Patienten zu finden, auch ohne Manifestation einer Autoimmunerkrankung. Teilweise sprechen einige Zytopenien bei MDS-Patienten auf eine immunsuppressive Therapie an, was eine autoimmune Genese nahelegt. MDS-Patienten mit AE sind meist männlich und zwischen 78-83 Jahre alt, wohingegen sonst meist junge Frauen von AE betroffen sind (Braun et al. 2013; Komrokji et al. 2016). Zusammenfassend kann vermutet werden, dass manche AE mit MDS vergesellschaftet sein könnten. Grundlage vermag eine Schädigung der Zellen des KM durch autoimmune Reaktionen, typische Pharmaka in der Behandlung von AE oder genetische Prädispositionen bei AE, wie Träger des B27-Antigens oder Patienten mit Polymorphismen des Il-1 Rezeptor-Antagonisten sein (Anderson et al. 2009). Bislang gibt es nur wenige Studien, welche sich mit dem Zusammenhang von Komorbiditäten z.B. AE und MDS bzw. molekulargenetischen Veränderungen bei MDS auseinandersetzen.

Wie bereits beschrieben, kodiert das SRSF2-Gen für ein Protein als Bestandteil des Spleißosoms. Mutationen dieses Gens finden sich gehäuft bei CMML-Patienten sowie bei *de novo* MDS. Bislang ist die Funktion von SRSF2 bei onkologischen Erkrankungen mit Einfluss auf Transkription, Spleißen, Translation und Genomstabilität gut beschrieben. Über immunmodulatorische Funktionen ist bislang wenig bekannt (Aujla et al. 2018). Ein Auftreten von SRSF2-Mutationen innerhalb von autoimmunologischen Erkrankungen ist bislang nicht ausreichend untersucht. In einer Falldarstellung wurde ein möglicher Zusammenhang von generalisierter palisadenförmiger neutrophiler und granulomatöser Dermatitis zu SRSF2-Mutationen und MDS, speziell CMML, beschrieben, welche als mögliche kutane Manifestation der CMML eingeschätzt wird und insgesamt häufig von AE begleitet wird (Federmann et al. 2017).

In vorliegender Arbeit konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen SRSF2-Mutationen und MDS mit einer Signifikanz von  $p=0,007$  berechnet werden. Nach Geschlechterschichtung zeigte sich ein möglicher Zusammenhang zum männlichen Geschlecht ( $p=0,017$ ). Insgesamt lag jedoch nur bei 45 Patienten (27%) die Angabe zu einer AE sowie zum SRSF2-Status vor, so dass es weiterer Untersuchungen mit größeren Fallzahlen bedarf.

SRSF2 kann mit CDC5L (*cell division cycle 5-like*) oder SRSF1 (*Serine/arginine-rich splicing factor 1*) interagieren. Über diese beiden Proteine könnte eine autoimmunologische bzw. karzinogene Interaktion bestehen. CDC5L ist ein Protein, welches den G2-M Übergang des Zellzyklus mitreguliert und eine Funktion innerhalb des Splicing-Prozesses sowie der DNA-Reparatur innehat. Es habe die Funktion eines Onkogens beim Osteosarkom und Gebärmutterhalskrebs. Bei Gliomen wird eine hohe Expression von DCD5L beschrieben, dessen Höhe mit dem Differenzierungsgrad korreliert und als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert wurde (Chen et al. 2016). Für SRSF1 wurde ein Zusammenhang zum Immunsystem und potentiell zu Autoimmunerkrankungen über Il-2 und der T-Zell Aktivität hergestellt (Moulton et al. 2013). In einer weiteren Arbeit konnte ein Zusammenhang zu SRSF1 und SLE hergestellt werden, durch Regulation der Expression von CD3 $\zeta$  in T-Zellen bei SLE (Moulton et al. 2015). SF3B1 zeigte sich mit ( $\chi^2=3,961$ ;  $p=0,047$ ) grenzwertig signifikant. In der Literatur finden sich keine weiteren Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen SF3B1-Mutationen und AE.

In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen AE und FLT3-Mutationen nicht beschrieben. Der Chi-Quadrat Test ( $\chi^2=3,855$ ) fällt für die gesamte vorliegende Kohorte nicht signifikant aus ( $p=0,05$ ), in der Geschlechterschichtung ist jedoch ein signifikanter ( $p=0,007$ ) Zusammenhang zwischen dem weiblichen Geschlecht und dem FLT3-Mutationstatus zu vermuten.

Zu Mutationen des RUNX1-Gens in Zusammenhang mit AE ist ebenfalls wenig beschrieben. In einer Arbeit von 2004 wurde ein Zusammenhang von RUNX1-Mutationen und der Genese von Psoriasis, RA,

LE und M. Crohn, bei Patienten mit ITP beschrieben (Zhong et al. 2016). In vorliegendem Kollektiv konnte kein Zusammenhang vermutet werden.

Eine erhöhte Rate an AE innerhalb der MDS sowie ein signifikant erhöhtes Risiko einer AE durch eine Mutation des TET2-Gens konnten Oh et al. nachweisen. Ein Nachteil dieser Studie mag die kleine Kohorte sowie das Fehlen der chronologischen Angabe von Mutation und AE sein (Oh et al. 2019). In vivo ist TET2 zuständig für die Demethylierung und Aktivierung von Cytokin-regulierenden Genen in T-Zellen bei Patienten mit AE (Ichiyama et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen AE und TET2-Mutationen nachgewiesen werden ( $\chi^2 = 1,962$ ,  $p > 0,05$ ) ebenso wie bei Naqvi et al. (Naqvi et al. 2019).

Mit der Idee, dass eine klonale Hämatopoese chronische Entzündungen bei rheumatoider Arthritis beeinflusst, haben Savola et al. in einer Studie somatische Mutationen bei Patienten mit RA und AA oder MDS nachgewiesen und zeigen können, dass DNMT3A-Mutationen gefolgt von TET2-Mutationen am häufigsten zu finden waren. AE und DNMT3A zeigten in vorliegender Arbeit keinen Zusammenhang (Savola et al. 2018). DNMT3A waren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines myokardialen oder thrombotischen Geschehens vorbeschrieben (Naqvi et al. 2019).

Für JAK2-Mutationen konnte in vorliegender Arbeit kein Zusammenhang zu AE berechnet werden, ebenso wenig finden sich dazu bislang Publikationen. Wenig untersucht sind ebenfalls MLL, EZH2, TP53, ASXL1, IDH1 und IDH2 sowie CBL-Mutationen im Zusammenhang mit AE. Das vorliegende Kollektiv zeigte keinen Zusammenhang zwischen diesen Mutationen und AE bei Patienten mit MDS. Aktivierende KRAS- sowie NRAS-Mutationen stehen in Zusammenhang mit einer *RAS-associated autoimmune leukoproliferative disease* (RALD) (Niemela et al. 2011). Im vorliegenden Kollektiv konnte jedoch kein Zusammenhang zu AE festgestellt werden.

### **Kardiale Komorbiditäten und Biomarker**

In dem vorliegenden MDS-Patientenkollektiv konnte keine Mutation des 16 Gene umfassenden Panel mit einer kardiovaskulären Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden. Naqvi et al. konnten bei MDS-Patienten mit Mutationen in den Genen DNMT3A und JAK2 ein höheres Risiko für einen Myokardinfarkt oder ein thrombotisches Geschehen in der Anamnese assoziieren als ohne diese *CHIP*-typischen Mutationen (Naqvi et al. 2019). Zudem konnte in einer anderen Arbeit ebenfalls ein erhöhtes Risiko für ein myokardiales Geschehen bei Patienten mit *CHIP*-typischen Mutationen (DNMT3A, TET2, ASXL1, and JAK2) sowie eine erhöhte Arteriosklerose Neigung bei Mäusen festgestellt werden (Jaiswal et al. 2017). Die Gruppe von Naqvi et al. beschrieb diese mögliche Korrelation nur für DNMT3A und JAK2, was sich mit einer anderen Arbeit deckt, welche zudem ASXL1 und TET2 in diesen Zusammenhang bringt und um ein Schlaganfallrisiko vergrößert, *CHIP*-typische Mutationen als einen neuen Risikofaktor für arteriosklerotische Erkrankungen und als perspektivisch potentiell therapeutisches Ziel beschreibt (Páramo Fernández 2018).

Keinen Zusammenhang für Mutationen und kardiovaskuläre Erkrankungen für Patienten mit oder ohne MDS fanden sich in der Literatur für folgende Gene: SRSF2, FLT3, RUNX1, MLL, KRAS, NRAS, CBL, IDH1, IDH2, TP53, EZH2, SF3B1.

### **Hepatische Komorbiditäten und Biomarker**

In dem vorliegenden MDS-Patientenkollektiv konnte nur eine MLL-Mutation des 16 Gene umfassenden Panels mit einer Erkrankung der Leber bei MDS-Patienten in Zusammenhang gebracht werden. Nach Geschlechterschichtung zeigte sich ein möglicher Zusammenhang zu männlichen MDS-Patienten und Erkrankungen der Leber. In der Literatur sind dazu bislang keine Zusammenhänge beschrieben worden.

Cheng et al. haben feststellen können, dass das Fehlen des Splicing-Faktors SRSF2 bei Mäusen zu schwerwiegenden Leber- sowie metabolischen Veränderungen führen kann, welche letztendlich in oxidativem Stress und Leberversagen münden können. Die Funktion von SRSF2 sei nicht nur auf das Splicing reduziert, sondern SRSF2 führe auch zu einer Aktivierung der Transkription von metabolisch relevanten Genen (Cheng et al. 2016). IDH1-Mutationen sind beim hepatozellulären Karzinom (HCC) und dem intrahepatischen Cholangiokarzinom (iCC) vertreten. Insgesamt liegt die Häufigkeit beim klarzelligen HCC höher als bei andern HCC Varianten (Lee et al. 2017). TP53-Mutationen sind mit einer Häufigkeit von 13-48% bei Patienten mit Krebserkrankungen der Leber angegeben (Khemlina et al. 2017).

Kein Zusammenhang für Mutationen und Erkrankungen der Leber für Patienten mit oder ohne MDS fanden sich in der Literatur für folgende Gene: FLT3, RUNX1, TET2, JAK2, MLL, KRAS, NRAS, CBL, ASXL1, IDH2, EZH2, SF3B1, DNMT3A.

### **Erkrankungen der Niere und Biomarker**

Für das vorliegende Kollektiv konnte für Mutationen des JAK-2-Gen ein Zusammenhang zu Erkrankungen der Niere beschrieben werden ( $\chi^2 = 7,930$ ,  $p=0,005$ ). In der Literatur werden JAK2-Mutationen mit verschiedenen chronisch progressiven Nierenerkrankungen wie der diabetischen Nephropathie oder der autosomal-dominanten polyzystischen Niere in Verbindung gebracht (Brosius et al. 2015). IDH1-Mutationen zeigen einen Zusammenhang zum Gesamtkollektiv, SRSF2-Mutationen zu weiblichen MDS-Patienten und DNMT3A-Mutationen zu männlichen MDS-Patienten mit Erkrankungen der Niere. Zu allen ist in der Literatur bislang kein Zusammenhang beschrieben worden. TET2-Mutationen wurden bei neuroendokrinen Tumoren der Niere beschrieben (Pivovarcikova et al. 2019). Eine EZH2-Mutation wird u.a. beim Nierenzellkarzinom als relevant für Initiation, Wachstum und Progression gewertet (Liu et al. 2017).

Für alle anderen Biomarker fand sich weder im vorliegenden Kollektiv noch in der Literatur ein beschriebener Zusammenhang.

### **Diabetes und Biomarker**

Im vorliegenden Kollektiv konnte für weibliche Patienten mit NRAS- oder SRSF2-Mutationen ein Zusammenhang zwischen Diabetes und Mutationen bei MDS-Patienten beschrieben werden. In der Literatur finden sich dazu keine Angaben. In der Arbeit von Lam et al. wurde eine erhöhte Expression von RUNX-1 mit einer aberranten retinalen Angiogenese beschrieben, welche die proliferative diabetische Retinopathie bei Typ1 und Typ2 Diabetes zur Folge hat (Lam et al. 2017). Diabetes erhöht das Risiko einer Krebserkrankung. Der mögliche Zusammenhang wurde 2018 in Nature durch das Zusammenspiel von TET2 und Hyperglykämien, welche den Tumorsuppressor TET2 destabilisieren und 5hmC Spiegel so verändern, dass eine Tumorentstehung begünstigt wird, erklärt. Ebenfalls ein Mechanismus, welcher nicht direkt auf eine TET2-Mutation zurückzuführen ist, jedoch einen Zusammenhang zwischen Metabolismus, Epigenetik und Krebs darstellt (Di Wu et al. 2018).

Keine Zusammenhänge wurden für Patienten mit oder ohne MDS für FLT3, SRSF2, JAK2, MLL, KRAS, NRAS, CBL, ASXL1, IDH1, IDH2, TP53, EZH2, SF3B1, DNMT3A in der Literatur beschrieben.

## **Erkrankungen der Schilddrüse und Biomarker**

Im vorliegenden Kollektiv konnte für keines der 16 Gene ein Zusammenhang beschrieben werden. DNMT3A-Mutationen sind relevant für die Pathogenese des papillären Schilddrüsenkarzinoms und stellen zugleich einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt dar (Siraj et al. 2019). Mutationen von TP53 und JAK2 konnten im anaplastischen Schilddrüsenkarzinom nachgewiesen werden (Pozdeyev et al. 2018). Einen Zusammenhang zur multiplen endokrinen Neoplasie Typ1 gibt es über MLL, welches zwar keine Mutation aufweist, jedoch mit einem Protein Menin, interagiert und zu einer Methylierung des Histon H3K4 führt, welches letztendlich die Zellproliferation hemmt (Thakker 2014).

Keine Zusammenhänge wurden für Patienten mit oder ohne MDS für SRSF2, FLT3, RUNX1, TET2, NRAS, KRAS, CBL, ASXL1, IDH1, IDH2, EZH2, SF3B1, DNMT3A in der Literatur beschrieben.

## **Pulmonale Erkrankungen und Biomarker**

Im vorliegenden Kollektiv konnte nur für männliche Patienten mit DNMT3A-Mutationen der insgesamt 16 Gene ein Zusammenhang beschrieben werden. In der Literatur wird dies bislang nicht ausgeführt.

SRSF2 konnte in neuroendokrinen Tumoren der Lunge als überexprimiert nachgewiesen und mit E2F1, einem TF, relevant für Zellzyklus und Apoptose in Verbindung gebracht werden (Edmond et al. 2013). JAK2 spielt eine Rolle bei der idiopathischen Lungenfibrose ebenso wie STAT3 (Milara et al. 2018). Zudem scheinen sie eine gewisse Relevanz beim Progress von Adenokarzinomen der Lunge zu haben (Xu et al. 2017a). KRAS-Mutationen spielen bei der Pathogenese des kleinzelligen Lungenkarzinoms eine Rolle und stellen ein therapeutisches Ziel dar (Román et al. 2018). Beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom sind TP53-Mutationen mit einem schlechteren Ansprechen auf eine Chemotherapie und Strahlentherapie sowie Prognose assoziiert (Mogi et al. 2011). Eine hohe DNMT3A-Expression in Adenokarzinomen der Lunge korreliert mit einer besseren Prognose als eine geringe Expression (Husni et al. 2016).

Keine Zusammenhänge wurden für Patienten mit oder ohne MDS für FLT3, RUNX1, TET2, MLL, CBL, ASXL1, IDH1, IDH2, EZH2, SF3B1, NRAS in der Literatur beschrieben.

## **Solide Tumoren und Biomarker**

Im vorliegenden Kollektiv konnte nur TP53 nach Geschlechterschichtung der 16 Mutationen mit einem soliden Tumor in der Anamnese oder als Begleiterkrankung zum MDS in Zusammenhang gebracht werden.

## 4.6 Schlussfolgerung

Durch vorliegende Arbeit konnten bisherige Ergebnisse zum Thema Inzidenzen und prognostische Aussagekraft von Biomarkern für das Krankheitsbild der myelodysplastischen Syndrome weiter untermauert werden sowie ein möglicher Zusammenhang zwischen den individuellen Komorbiditäten und den molekulargenetischen Veränderungen beleuchtet werden.

Mutationen in den Genen TP53, EZH2, RUNX1, ASXL1, NRAS, IDH2 sowie SF3B1-Mutationen konnten als prognostisch relevant herausgestellt werden. Letztendlich zeigten sich ASXL1 und KRAS (sowie die Zytogenetik nach IPSS-R) als unabhängige Prognoseparameter. Diese Ergebnisse unterstützen das Vorhaben einer Integration von Genmutationen in bestehende Prognose-Scores für MDS-Patienten. Bis heute gibt es keinen geschlossenen Konsens über die Art und Weise der Integration molekulargenetischer Auffälligkeiten in entsprechende Scores. Sehr wahrscheinlich trägt die Komplexität der Kombinationsmöglichkeiten sowie die individuelle Entwicklung innerhalb der unterschiedlichen Klone mit heterogenen klinischen Auswirkungen dazu bei, bislang noch keine zusammengefassten Strategien ableiten zu können (Haider et al. 2017).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Verständnis der fast alle MDS-Patienten (90%) betreffenden molekulargenetischen Auffälligkeiten relevant sein kann, ein MDS unterstützend zu diagnostizieren, die Risikostratifizierung zu verbessern und somit den Patienten passendere Therapien zukommen zu lassen. Zudem stellen entsprechende Mutationen potentielle Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien dar und erlauben evtl. ein Monitoring der Patienten. Die Anfertigung eines entsprechenden Biomarker-*Panels* bei Erstdiagnose oder auch im Verlauf eines MDS zu bisherigen Goldstandards erscheint insgesamt empfehlenswert. In den kommenden Jahren wird sicherlich eine weitere Integration von Biomarkern insbesondere in Prognose-Scores erfolgen, z.B. analog des bereits bestehenden *CPSS-molecular* für CMML-Patienten, erstellt durch die Arbeitsgruppe um Elena et al. (Elena et al. 2016), welcher ASXL1, NRAS, RUNX1 und SETBP-Mutationen bereits inkludiert (siehe dazu Kapitel 1.1.8.2).

Neben den 16 in dieser Arbeit analysierten Genen der 23.000 Gene einer Zelle, sollte das Augenmerk auf weitere mögliche Biomarker gerichtet werden sowie weiterhin deren Wechselwirkung untereinander, deren chronologische Abfolge während der klonalen Evolution und eine weitere Unterteilung / *Clusterung* nach prognostischer Schwere der Biomarker untersucht werden, um exaktere Profile erstellen zu können. Diesbezüglich kann *Whole Genome Sequencing* zielführend sein bei gleichzeitig bestehenden ethischen, infrastrukturellen sowie ökonomischen Herausforderungen. Das Wissen um molekulare Prozesse ist ein Baustein einer individualisierten Medizin, welche der Prävention, Diagnostik und Therapie von Erkrankungen jedem einzelnen Menschen zugutekommen kann.

Bislang konnte in nur sehr wenigen Publikationen ein Zusammenhang von Komorbiditäten zu MDS-typischen Mutationen beschrieben werden. Um diese Anhalte weiter auszubauen, bedarf es weiterer Untersuchungen mit größeren Fallzahlen. Den bislang in der Literatur beschriebenen Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und MDS-typischen Mutationen wie DNMT3A, TET2, ASXL1 und JAK2 konnte in vorliegender Arbeit nicht weiter unterstützt werden, wobei thrombotische Erkrankungen nicht gesondert untersucht wurden. Eine feinere Differenzierung der Komorbiditäten in Bezug auf MDS-typische Mutationen insbesondere in Hinblick auf Auswirkungen auf die Prognose, sollte in Erwägung gezogen werden. Patientenindividuelle Parameter wie Geschlecht und Alter, Wünsche und Bedürfnisse sowie molekulare Prozesse (*personalized genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, pharmacogenomics*) und individuelle Komorbiditäten haben einen Einfluss auf die Prognose von Patienten und bedürfen weiterer Forschung und Integration in den klinischen Alltag.

Die Düsseldorfer MDS-Arbeitsgruppe ist weiter aktiv in Bezug auf die Genotyp-Phänotyp-Korrelation. In Kooperation mit der Deutsch-Österreichisch-Schweizer MDS Gruppe, die von Düsseldorf aus geleitet

wird, werden für einige der untersuchten Gene höhere Fallzahlen angestrebt, um die hier vorliegenden Resultate zu validieren. Darüber hinaus bestehen Kooperationen mit der University of Chicago, um Keimbahnmutationen und ihre potentielle Bedeutung für die Pathophysiologie und Prognose der MDS Patienten zu untersuchen.



## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

(Zitationsstil: *Nature Medicine*)

1. An international system for human cytogenetic nomenclature (1978) ISCN (1978). Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. *Cytogenetics and cell genetics* **21**, 309–409 (1978).
2. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. Available at [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf) (2020).
3. Aleshin, A. *et al.* Molecular pathophysiology of the myelodysplastic syndromes: insights for targeted therapy. *Blood advances* **2**, 2787–2797 (2018).
4. Al-Kali, A. *et al.* Prognostic impact of RAS mutations in patients with myelodysplastic syndrome. *American journal of hematology* **88**, 365–369 (2013).
5. Anderson, L.A. *et al.* Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. *British journal of cancer* **100**, 822–828 (2009).
6. Arber, D.A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
7. Aujla, A. *et al.* SRSF2 mutations in myelodysplasia/myeloproliferative neoplasms. *Biomarker research* **6**, 29 (2018).
8. Aul, C. *et al.* Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **83**, 71–86 (1998).
9. Aul, C. *et al.* Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. *Leukemia* **6**, 52–59 (1992).
10. Bacher, U. *Myelodysplastische Syndrome von A bis Z. 16 Tab.* 3rd ed. (Thieme, Stuttgart, 2014).
11. Badar, T. *et al.* Detectable FLT3-ITD or RAS mutation at the time of transformation from MDS to AML predicts for very poor outcomes. *Leukemia research* **39**, 1367–1374 (2015).
12. Bains, A. *et al.* FLT3 and NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes: Frequency and potential value for predicting progression to acute myeloid leukemia. *American journal of clinical pathology* **135**, 62–69 (2011).
13. Bally, C. *et al.* Prognostic value of TP53 gene mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia treated with azacitidine. *Leukemia research* **38**, 751–755 (2014).
14. Baxter, E.J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet (London, England)* **365**, 1054–1061 (2005).
15. Bejar, R. Myelodysplastic Syndromes Diagnosis: What Is the Role of Molecular Testing? *Current hematologic malignancy reports* **10**, 282–291 (2015).
16. Bejar, R. Advances in Personalized Therapeutic Approaches in Myelodysplastic Syndromes. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* **17**, 1444–1447 (2019).
17. Bejar, R. *et al.* TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood* **124**, 2705–2712 (2014b).
18. Bejar, R. *et al.* Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood* **124**, 2793–2803 (2014a).
19. Bejar, R. *et al.* Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine* **364**, 2496–2506 (2011).
20. Bejar, R. *et al.* Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **32**, 2691–2698 (2014).
21. Bejar, R. *et al.* Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 3376–3382 (2012).
22. Bennett, J.M. *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology* **51**, 189–199 (1982).
23. Bernard, E. *et al.* TP53 State Dictates Genome Stability, Clinical Presentation and Outcomes in Myelodysplastic Syndromes. In: *Blood* 134 (Supplement\_1), S. 675. DOI: 10.1182/blood-2019-129392 (2019)
24. Bestor, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics* **9**, 2395–2402 (2000).
25. Bos, J.L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research* **49**, 4682–4689 (1989).
26. Braun, T. *et al.* Myelodysplastic Syndromes (MDS) and autoimmune disorders (AD): cause or consequence? *Best practice & research. Clinical haematology* **26**, 327–336 (2013).
27. Broséus, J. *et al.* Age, JAK2(V617F) and SF3B1 mutations are the main predicting factors for survival in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia* **27**, 1826–1831 (2013).
28. Brosius, F.C. *et al.* JAK inhibition and progressive kidney disease. *Current opinion in nephrology and hypertension* **24**, 88–95 (2015).

29. Cazzola, M. *et al.* The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood* **122**, 4021–4034 (2013).
30. Chen, C.-Y. *et al.* RUNX1 gene mutation in primary myelodysplastic syndrome--the mutation can be detected early at diagnosis or acquired during disease progression and is associated with poor outcome. *British journal of haematology* **139**, 405–414 (2007).
31. Chen, W. *et al.* Expression of CDC5L is associated with tumor progression in gliomas. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **37**, 4093–4103 (2016).
32. Chen, Y. *et al.* Tyrosine kinase inhibitors targeting FLT3 in the treatment of acute myeloid leukemia. *Stem cell investigation* **4**, 48 (2017).
33. Cheng, Y. *et al.* Liver-Specific Deletion of SRSF2 Caused Acute Liver Failure and Early Death in Mice. *Molecular and cellular biology* **36**, 1628–1638 (2016).
34. Choi, S.M. *et al.* Partial tandem duplication of KMT2A (MLL) may predict a subset of myelodysplastic syndrome with unique characteristics and poor outcome. *Haematologica* **103**, e131-e134 (2018).
35. Cimmino, L. *et al.* TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell stem cell* **9**, 193–204 (2011).
36. Cordoba, I. *et al.* The degree of neutropenia has a prognostic impact in low risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia research* **36**, 287–292 (2012).
37. Dang, L. *et al.* IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **27**, 599–608 (2016).
38. Daver, N. *et al.* FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *American journal of hematology* **88**, 56–59 (2013).
39. Dawson, M.A. *et al.* Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* **150**, 12–27 (2012).
40. Delcuve, G.P. *et al.* Epigenetic control. *Journal of cellular physiology* **219**, 243–250 (2009).
41. Delic, S. *et al.* Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera. *British journal of haematology* **175**, 419–426 (2016).
42. Della Porta, M.G. *et al.* Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica* **96**, 441–449 (2011).
43. Dhillon, S. Ivosidenib: First Global Approval. *Drugs* (2018).
44. Di Wu *et al.* Glucose-regulated phosphorylation of TET2 by AMPK reveals a pathway linking diabetes to cancer. *Nature* **559**, 637–641 (2018).
45. Dicker, F. *et al.* Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. *Leukemia* **24**, 1528–1532 (2010).
46. DiNardo, C.D. *et al.* IDH1 and IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes and role in disease progression. *Leukemia* **30**, 980–984 (2016).
47. Dolatshad, H. *et al.* Disruption of SF3B1 results in deregulated expression and splicing of key genes and pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem and progenitor cells. *Leukemia* **29**, 1092–1103 (2015).
48. Edmond, V. *et al.* A new function of the splicing factor SRSF2 in the control of E2F1-mediated cell cycle progression in neuroendocrine lung tumors. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **12**, 1267–1278 (2013).
49. Elena, C. *et al.* Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **128**, 1408–1417 (2016).
50. Federmann, B. *et al.* Generalized palisaded neutrophilic and granulomatous dermatitis—a cutaneous manifestation of chronic myelomonocytic leukemia? A clinical, histopathological, and molecular study of 3 cases. *Human pathology* **64**, 198–206 (2017).
51. Feinberg, A.P. *et al.* Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89–92 (1983).
52. Fenaux, P. *et al.* A multicenter phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in intermediate- to high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* **109**, 4158–4163 (2007).
53. Feng, Y. *et al.* TET2 Function in Hematopoietic Malignancies, Immune Regulation, and DNA Repair. *Frontiers in oncology* **9**, 210 (2019).
54. Fujii, T. *et al.* Targeting isocitrate dehydrogenase (IDH) in cancer. *Discovery medicine* **21**, 373–380 (2016).
55. Gan, L. *et al.* Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. *Biomarker research* **6**, 10 (2018).
56. Ganten, D. *et al.* *Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen* (Springer, Berlin, Heidelberg, 2001).
57. Gelsi-Boyer, V. *et al.* Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *Journal of hematology & oncology* **5**, 12 (2012).
58. Germing, U. *et al.* *Myelodysplastische Syndrome. Bilanz des aktuellen Wissens* (dup düsseldorf university press, Düsseldorf, 2009).

59. Germing, U. *et al.* Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis, and treatment. *Deutsches Arzteblatt international* **110**, 783–790 (2013).
60. Gill, H. *et al.* Molecular and Cellular Mechanisms of Myelodysplastic Syndrome: Implications on Targeted Therapy. *International journal of molecular sciences* **17**, 440 (2016).
61. Grafone, T. *et al.* An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncology reviews* **6**, e8 (2012).
62. Greenberg, P. *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* **89**, 2079–2088 (1997).
63. Greenberg, P.L. *et al.* Myelodysplastic syndromes, version 2.2015. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* **13**, 261–272 (2015).
64. Greenberg, P.L. *et al.* Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood* **120**, 2454–2465 (2012).
65. Guo, Z. *et al.* Prognostic significance of TET2 mutations in myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. *Leukemia research* **58**, 102–107 (2017).
66. Haase, D. *Untersuchungen zur Biologie von myelodysplastischen Syndromen und sekundären akuten myeloischen Leukämien. Bedeutung für Pathogenese und Erkrankungsverlauf.* 1st ed. (Cuvillier Verlag, Göttingen, 2005).
67. Haase, D. *et al.* New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* **110**, 4385–4395 (2007).
68. Haase, D. *et al.* TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia* **33**, 1747–1758 (2019).
69. Haferlach, T. *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **28**, 241–247 (2014).
70. Haider, M. *et al.* New Insight Into the Biology, Risk Stratification, and Targeted Treatment of Myelodysplastic Syndromes. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting* **37**, 480–494 (2017).
71. Harada, H. *et al.* Recent advances in myelodysplastic syndromes: Molecular pathogenesis and its implications for targeted therapies. *Cancer science* **106**, 329–336 (2015).
72. Heuser, M. *et al.* Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential. *Deutsches Arzteblatt international* **113**, 317–322 (2016).
73. Heuser, M. *et al.* Epigenetics in myelodysplastic syndromes. *Seminars in cancer biology* **51**, 170–179 (2018).
74. Hofman, W.-K. *et al.* *Facharzt Hämatologie Onkologie* (Elsevier2015), pp. 365–378.
75. Hong, M. *et al.* The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myelodysplastic Syndromes. *Journal of translational internal medicine* **5**, 139–143 (2017).
76. Hosono, N. Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. *International journal of clinical oncology* **24**, 885–892 (2019).
77. Hou, H.-A. *et al.* Incorporation of mutations in five genes in the revised International Prognostic Scoring System can improve risk stratification in the patients with myelodysplastic syndrome. *Blood cancer journal* **8**, 39 (2018).
78. Husni, R.E. *et al.* DNMT3a expression pattern and its prognostic value in lung adenocarcinoma. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* **97**, 59–65 (2016).
79. Ichiyama, K. *et al.* The methylcytosine dioxygenase Tet2 promotes DNA demethylation and activation of cytokine gene expression in T cells. *Immunity* **42**, 613–626 (2015).
80. Jaiswal, S. *et al.* Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *The New England journal of medicine* **377**, 111–121 (2017).
81. Jin, J. *et al.* Prognostic value of isocitrate dehydrogenase mutations in myelodysplastic syndromes: a retrospective cohort study and meta-analysis. *PloS one* **9**, e100206 (2014).
82. Johnson, D.B. *et al.* Molecular pathways: targeting NRAS in melanoma and acute myelogenous leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 4186–4192 (2014).
83. Kao, H.-W. *et al.* A high occurrence of acquisition and/or expansion of C-CBL mutant clones in the progression of high-risk myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **13**, 1035–1042 (2011).
84. Khemlina, G. *et al.* The biology of Hepatocellular carcinoma: implications for genomic and immune therapies. *Molecular cancer* **16**, 149 (2017).
85. Khoury, M.P. *et al.* The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a000927 (2010).
86. Kim, E.S. Enasidenib: First Global Approval. *Drugs* **77**, 1705–1711 (2017).
87. Kim, S. New and emerging factors in tumorigenesis: an overview. *Cancer management and research* **7**, 225–239 (2015).

88. Knudson, A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**, 820–823 (1971).
89. Knudson, A.G. Hereditary cancer: two hits revisited. *Journal of cancer research and clinical oncology* **122**, 135–140 (1996).
90. Kobbe, G. *et al.* Molecular genetics in allogeneic blood stem cell transplantation for myelodysplastic syndromes. *Expert review of hematology* **12**, 821–831 (2019).
91. Komrokji, R.S. *et al.* Autoimmune diseases and myelodysplastic syndromes. *American journal of hematology* **91**, E280-3 (2016).
92. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705 (2007).
93. Kuendgen, A. *et al.* Efficacy of azacitidine is independent of molecular and clinical characteristics - an analysis of 128 patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and a review of the literature. *Oncotarget* **9**, 27882–27894 (2018).
94. Kulasekararaj, A.G. *et al.* Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology* **162**, 587–605 (2013a).
95. Kulasekararaj, A.G. *et al.* TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *British journal of haematology* **160**, 660–672 (2013b).
96. Kunkel-Razum, K. *et al.* *Duden - die deutsche Rechtschreibung. Auf der Grundlage der aktuellen amtlichen Rechtschreibregeln* (Dudenverlag, Berlin, 2017).
97. Lam, J.D. *et al.* Identification of RUNX1 as a Mediator of Aberrant Retinal Angiogenesis. *Diabetes* **66**, 1950–1956 (2017).
98. Langemeijer, S.M.C. *et al.* Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics* **41**, 838–842 (2009).
99. Larsson, C.A. *et al.* The changing mutational landscape of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Molecular cancer research : MCR* **11**, 815–827 (2013).
100. Lee, J.H. *et al.* IDH1 R132C mutation is detected in clear cell hepatocellular carcinoma by pyrosequencing. *World journal of surgical oncology* **15**, 82 (2017).
101. Levine, A.J. *et al.* The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell death and differentiation* **13**, 1027–1036 (2006).
102. Lim, D.H.K. *et al.* DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. *The Obstetrician & Gynaecologist* **12**, 37–42 (2010).
103. Lindsley, R.C. *et al.* Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation. *The New England journal of medicine* **376**, 536–547 (2017).
104. Liu, X. *et al.* Functional and therapeutic significance of EZH2 in urological cancers. *Oncotarget* **8**, 38044–38055 (2017).
105. Löffler, G. *Basiswissen Biochemie* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2003).
106. Madan, V. *et al.* Distinct and convergent consequences of splice factor mutations in myelodysplastic syndromes. *American journal of hematology* (2019).
107. Maguire, S.L. *et al.* SF3B1 mutations constitute a novel therapeutic target in breast cancer. *The Journal of pathology* **235**, 571–580 (2015).
108. Makishima, H. *et al.* Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 6109–6116 (2009).
109. Malcovati, L. *et al.* Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica* **96**, 1433–1440 (2011a).
110. Malcovati, L. *et al.* SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood* **126**, 233–241 (2015).
111. Malcovati, L. *et al.* Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **118**, 6239–6246 (2011b).
112. Meggendorfer, M. *et al.* Karyotype evolution and acquisition of FLT3 or RAS pathway alterations drive progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Haematologica* **100**, e487-90 (2015).
113. Milara, J. *et al.* The JAK2 pathway is activated in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory research* **19**, 24 (2018).
114. Mogi, A. *et al.* TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 583929 (2011).
115. Moulder, D.E. *et al.* The Roles of p53 in Mitochondrial Dynamics and Cancer Metabolism: The Pendulum between Survival and Death in Breast Cancer? *Cancers* **10** (2018).
116. Moulton, V.R. *et al.* Serine Arginine-Rich Splicing Factor 1 (SRSF1) Contributes to the Transcriptional Activation of CD3ζ in Human T Cells. *PLoS one* **10**, e0131073 (2015).

117. Moulton, V.R. *et al.* Splicing factor SF2/ASF rescues IL-2 production in T cells from systemic lupus erythematosus patients by activating IL-2 transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 1845–1850 (2013).
118. Müller-Hermelink, H.K. *et al.* *Pathologie. Knochenmark, Lymphatisches System, Milz, Thymus* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2019).
119. Nakajima, H. *et al.* TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer science* **105**, 1093–1099 (2014).
120. Naqvi, K. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential-associated mutations and risk of comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer* (2019).
121. Naramura, M. *et al.* Mutant Cbl proteins as oncogenic drivers in myeloproliferative disorders. *Oncotarget* **2**, 245–250 (2011).
122. Neukirchen, J. *et al.* Platelet counts and haemorrhagic diathesis in patients with myelodysplastic syndromes. *European journal of haematology* **83**, 477–482 (2009).
123. Neukirchen, J. *et al.* Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with myelodysplastic syndrome: a multicenter study. *Leukemia research* **38**, 57–64 (2014).
124. Neukirchen, J. *et al.* Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leukemia research* **35**, 1591–1596 (2011).
125. Niemela, J.E. *et al.* Somatic KRAS mutations associated with a human nonmalignant syndrome of autoimmunity and abnormal leukocyte homeostasis. *Blood* **117**, 2883–2886 (2011).
126. Oh, Y.-J. *et al.* Mutation of ten-eleven translocation-2 is associated with increased risk of autoimmune disease in patients with myelodysplastic syndrome. *The Korean journal of internal medicine* (2019).
127. Oren, M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell death and differentiation* **10**, 431–442 (2003).
128. Papaemmanuil, E. *et al.* Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **122**, 3616–27; quiz 3699 (2013).
129. Páramo Fernández, J.A. Atherosclerosis y hematopoyesis clonal: un nuevo factor de riesgo. *Clinica e investigacion en arteriosclerosis : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Arteriosclerosis* **30**, 133–136 (2018).
130. Patnaik, M.M. *et al.* Chronic myelomonocytic leukemia: 2018 update on diagnosis, risk stratification and management. *American journal of hematology* **93**, 824–840 (2018).
131. Pellagatti, A. *et al.* Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia* **24**, 756–764 (2010).
132. Pellagatti, A. *et al.* The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *European journal of haematology* **95**, 3–15 (2015).
133. Pivovarcikova, K. *et al.* Primary renal well-differentiated neuroendocrine tumour (carcinoid): next-generation sequencing study of 11 cases. *Histopathology* **75**, 104–117 (2019).
134. Pozdeyev, N. *et al.* Genetic Analysis of 779 Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **24**, 3059–3068 (2018).
135. Quentin, S. *et al.* 260 Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes RUNX1/AML1 lesions. *Leukemia research* **35**, S102 (2011).
136. Quintás-Cardama, A. *et al.* Molecular pathways: Jak/STAT pathway: mutations, inhibitors, and resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 1933–1940 (2013).
137. Rassow, J. *Biochemie. 50 Tabellen*. 2nd ed. (Thieme, Stuttgart, 2008).
138. Regad, T. Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers* **7**, 1758–1784 (2015).
139. Reinhardt, D. *Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter*. 8th ed. (Springer-Verlag, s.l., 2007).
140. Renzis, B. *et al.* Prognostic impact of JAK2V617F mutation in myelodysplastic syndromes: A matched case control study. *Leukemia research reports* **2**, 64–66 (2013).
141. Rivlin, N. *et al.* Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes & cancer* **2**, 466–474 (2011).
142. Román, M. *et al.* KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. *Molecular cancer* **17**, 33 (2018).
143. Sakurai, H. *et al.* Overexpression of RUNX1 short isoform has an important role in the development of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood advances* **1**, 1382–1386 (2017).
144. Savola, P. *et al.* Clonal hematopoiesis in patients with rheumatoid arthritis. *Blood cancer journal* **8**, 69 (2018).
145. Schaaf C.P. *et al.* *Basiswissen Humangenetik* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013).
146. Schanz, J. *et al.* 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 : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 820–829 (2012).
147. Schnittger, S. *et al.* Use of CBL exon 8 and 9 mutations in diagnosis of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative disorders: an analysis of 636 cases. *Haematologica* **97**, 1890–1894 (2012).
  148. Schwartz, J.R. *et al.* The genomic landscape of pediatric myelodysplastic syndromes. *Nature communications* **8**, 1557 (2017).
  149. Siraj, A.K. *et al.* Prognostic significance of DNMT3A alterations in Middle Eastern papillary thyroid carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **117**, 133–144 (2019).
  150. Sood, R. *et al.* Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood* **129**, 2070–2082 (2017).
  151. Sperr, W.R. *et al.* Comorbidity as prognostic variable in MDS: comparative evaluation of the HCT-CI and CCI in a core dataset of 419 patients of the Austrian MDS Study Group. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **21**, 114–119 (2010).
  152. Steelman, L.S. *et al.* JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* **18**, 189–218 (2004).
  153. Steensma, D.P. *et al.* The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* **106**, 1207–1209 (2005).
  154. Such, E. *et al.* Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **121**, 3005–3015 (2013).
  155. Suzuki, T. *et al.* RUNX1 regulates site specificity of DNA demethylation by recruitment of DNA demethylation machineries in hematopoietic cells. *Blood advances* **1**, 1699–1711 (2017).
  156. Thakker, R.V. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Molecular and cellular endocrinology* **386**, 2–15 (2014).
  157. Thol, F. *et al.* Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 2499–2506 (2011).
  158. Thol, F. *et al.* Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* **119**, 3578–3584 (2012).
  159. Tremblay, D. *et al.* Implications of Mutation Profiling in Myeloid Malignancies-PART 1: Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **32**, e38-e44 (2018).
  160. Tsai, S.-C. *et al.* Biological Activities of RUNX1 Mutants Predict Secondary Acute Leukemia Transformation from Chronic Myelomonocytic Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **21**, 3541–3551 (2015).
  161. Vannucchi, A.M. *et al.* Epigenetics and mutations in chronic myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* **96**, 1398–1402 (2011).
  162. Visconte, V. *et al.* Mutations in Splicing Factor Genes in Myeloid Malignancies: Significance and Impact on Clinical Features. *Cancers* **11** (2019).
  163. Visconte, V. *et al.* Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. *Blood research* **49**, 216–227 (2014).
  164. Vousden, K.H. *et al.* p53 in health and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 275–283 (2007).
  165. Wagener, C. *et al.* *Molekulare Onkologie. Entstehung, Progression, klinische Aspekte; 95 Tabellen.* 3rd ed. (Thieme, s.l., 2010).
  166. Walter, M.J. *et al.* Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **25**, 1153–1158 (2011).
  167. Wan, Y. *et al.* SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 4627–4634 (2013).
  168. Wang, F. *et al.* Gender disparity in the survival of patients with primary myelodysplastic syndrome. *Journal of Cancer* **10**, 1325–1332 (2019).
  169. Welch, J.S. *et al.* TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *The New England journal of medicine* **375**, 2023–2036 (2016).
  170. Wu, S.-J. *et al.* The clinical implication of SRSF2 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution. *Blood* **120**, 3106–3111 (2012).
  171. Xu, W. *et al.* Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer cell* **19**, 17–30 (2011).
  172. Xu, Y. *et al.* JAK2 variations and functions in lung adenocarcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **39**, 1010428317711140 (2017a).
  173. Xu, Y. *et al.* Implications of mutational spectrum in myelodysplastic syndromes based on targeted next-generation sequencing. *Oncotarget* **8**, 82475–82490 (2017b).
  174. Yamaoka, K. *et al.* The Janus kinases (Jaks). *Genome biology* **5**, 253 (2004).
  175. Yoshimi, A. *et al.* Splicing factor mutations in MDS RARS and MDS/MPN-RS-T. *International journal of hematology* **105**, 720–731 (2017).

176. Zhao, C. *et al.* Insights into the Structural Features Essential for JAK2 Inhibition and Selectivity. *Current medicinal chemistry* **23**, 1331–1355 (2016).
177. Zhong, X. *et al.* Increased RUNX1 expression in patients with immune thrombocytopenia. *Human immunology* **77**, 687–691 (2016).
178. Zipperer, E. *et al.* MPL 515 and JAK2 mutation analysis in MDS presenting with a platelet count of more than  $500 \times 10^9/l$ . *Annals of hematology* **87**, 413–415 (2008).
179. Zipperer, E. *et al.* The myelodysplastic syndrome-comorbidity index provides additional prognostic information on patients stratified according to the revised international prognostic scoring system. *Haematologica* **99**, e31-2 (2014).

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Überblick über das in vorliegender Arbeit angefertigte Gen-Panel innerhalb der Zelle.

**Abbildung 2:** Übersicht über die biochemischen Auswirkungen von TET2- und /oder IDH1/2-Mutationen in Bezug auf den Methylierungsstatus der DNA adaptiert nach (Cimmino et al.2011).

**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Methylierung von Cytosin durch DNMT3A, adaptiert nach (Bestor et al. 2000).

**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Funktion im physiologischen sowie mutierten Zustand der Gene EZH2 und ASXL1, adaptiert nach (Vannucchi et al. 2011).

**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Funktionen von p53 als „Wächter des Genoms“ in der Zelle, adaptiert nach (Moulder et al. 2018).

**Abbildung 6:** Schematische Darstellung von SF3B1 innerhalb des Splicing-Prozesses, adaptiert nach (Yoshimi et al. 2017).

**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des Splicing-Prozesses durch den Splicing-Apparat, welcher SRSF2 inkludiert, adaptiert nach (Visconte et al. 2019).

**Abbildung 8:** Mögliche Aktivierungszustände für RAS-Proteine.

**Abbildung 9:** Dargestellt sind die durch Rezeptor-Tyrosinkinasen bzw. RAS-Proteine möglichen Signalkaskaden, adaptiert nach (Regad 2015).

**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der JAK2-Signalkaskade, adaptiert (Zhao et al. 2016).

**Abbildung 11:** Signaltransduktion durch Aktivierung des FLT3-Rezeptors, adaptiert (Chen et al. 2017).

**Abbildung 12:** Darstellung möglicher Auswirkungen von c-CBL Mutationen auf die Signalkaskade, adaptiert nach (Makishima et al. 2009).

**Abbildung 13:** Verteilung der FAB-Subtypen im Gesamtkollektiv.

**Abbildung 14:** Verteilung der WHO 2016-Subtypen im Gesamtkollektiv.

**Abbildung 15:** Häufigkeitsverteilung der Mutationen im untersuchten Kollektiv.

**Abbildung 16:** Häufigkeiten der einzelnen Mutationen im Kollektiv.

**Abbildung 17:** Prozentuale Verteilung der IPSS-Kategorie im Kollektiv.

**Abbildung 18:** Prozentuale Verteilung der IPSS-R Kategorie im Kollektiv.

**Abbildung 19:** Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben des untersuchten Patientenkollektiv.

**Abbildung 20:** Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf die Anzahl an mutierten Genen im Patientenkollektiv.

**Abbildung 21:** Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den RUNX1-Mutationsstatus.

**Abbildung 22:** Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den TET2-Mutationsstatus.

**Abbildung 23:** Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den JAK2-Mutationsstatus.

**Abbildung 24:** Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den FLT3-Mutationsstatus.



**Abbildung 25:** *Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den MLL-Mutationsstatus.*

**Abbildung 26:** *Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den KRAS-Mutationsstatus.*

**Abbildung 27:** *Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den NRAS-Mutationsstatus.*

**Abbildung 28:** *Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den CBL-Mutationsstatus.*

**Abbildung 29:** *Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den ASXL1-Mutationsstatus.*

**Abbildung 30:** *Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den IDH1-Mutationsstatus.*

**Abbildung 31:** *Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den IDH2-Mutationsstatus.*

**Abbildung 32:** *Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den TP53-Mutationsstatus.*

**Abbildung 33:** *Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den EZH2-Mutationsstatus.*

**Abbildung 34:** *Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den SF3B1-Mutationsstatus.*

**Abbildung 35:** *Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den SRSF2-Mutationsstatus.*

**Abbildung 36:** *Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den DNMT3A-Mutationsstatus.*

**Abbildung 37:** *Kaplan-Meier-Kurven für den Hb nach IPSS und den Hb nach IPSSR.*

**Abbildung 38:** *Kaplan-Meier-Kurven für die Thrombozytenwerte nach IPSS und IPSSR.*

**Abbildung 39:** *Kaplan-Meier-Kurve für die Leukozytenwerte nach Schichtung.*

**Abbildung 40:** *Kaplan-Meier-Kurven für die Neutrophilenwerte nach IPSS und IPSS-R.*

**Abbildung 41:** *Kaplan-Meier-Kurven für den Blastenanteil im KM nach IPSS und IPSS-R.*

**Abbildung 42:** *Kaplan-Meier-Kurven für die Genetik nach IPSS und IPSS-R.*

**Abbildung 43:** *Kaplan-Meier-Kurven für die Klassifikationen nach FAB und WHO2016.*

**Abbildung 44:** *Kaplan-Meier-Kurven für die Kategorien nach IPSS und IPSS-R.*

**Abbildung 45:** *Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang mit dem SRSF2-Mutationsstatus für das gesamte Patientenkollektiv.*

**Abbildung 46:** *Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang mit dem SRSF2-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.*

**Abbildung 47:** *Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang mit dem FLT3-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.*

**Abbildung 48:** *Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang mit dem SF3B1 -Mutationsstatus für das gesamte Patientenkollektiv.*

**Abbildung 49:** *Lebererkrankungen in Zusammenhang mit dem MLL-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.*

**Abbildung 50:** *Erkrankungen der Niere in Zusammenhang mit dem JAK2-Mutationsstatus für das gesamte Patientenkollektiv.*

**Abbildung 51:** *Nierenerkrankungen in Zusammenhang mit dem JAK2-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.*

**Abbildung 52:** *Erkrankungen der Niere in Zusammenhang mit dem IDH1-Mutationsstatus für das gesamte Patientenkollektiv.*

**Abbildung 53:** *Nierenerkrankungen in Zusammenhang mit dem SRSF2-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.*

**Abbildung 54:** *Nierenerkrankungen in Zusammenhang mit dem DNMT3A-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.*

**Abbildung 55:** *Nierenerkrankungen in Zusammenhang mit dem TET2-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.*

**Abbildung 56:** *Diabeteserkrankungen in Zusammenhang mit dem NRAS-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.*

**Abbildung 57:** *Diabeteserkrankungen in Zusammenhang mit dem SRSF2-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.*

**Abbildung 58:** *Lungenerkrankungen in Zusammenhang mit dem DNMT3A-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.*

**Abbildung 59:** *Tumorerkrankungen in Zusammenhang mit dem TP53-Mutationsstatus unter Schichtung nach Geschlecht.*

## 6.2 Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** *FAB-Klassifikation der MDS (Bennett et al. 1982).*

**Tabelle 2:** *WHO-Klassifikation (2016) myelodysplastischer Neoplasien.*

**Tabelle 3:** *WHO-Klassifikation (2016) myelodysplastisch/ myeloproliferativer Neoplasien.*

**Tabelle 4:** *Übersicht der verschiedenen MDS-Klassifikationssysteme.*

**Tabelle 5:** *International Prognostic Scoring System (Greenberg et al. 1997).*

**Tabelle 6:** *International Prognostic Scoring System - IPSS-prognostic risk categories and clinical outcomes (Greenberg et al. 1997).*

**Tabelle 7:** *International Prognostic Scoring System Revised (Greenberg et al. 2012).*

**Tabelle 8:** *Medianes Überleben und Zeit bis zum Leukämieübergang nach IPSS-R Risikostratifizierung (Greenberg et al. 2012).*

**Tabelle 9:** *Häufige Genmutationen der myelodysplastischen Syndrome, adaptiert nach (Kulasekararaj et al. 2013a)(Haider et al. 2017).*

**Tabelle 10:** *Übersicht der in vorliegender Arbeit untersuchten Gene.*

**Tabelle 11:** *Komorbiditätsgruppen mit inkludierten Erkrankungen.*

**Tabelle 12:** *Übersicht über die p-Werte für das gesamte Patientenkollektiv.*

**Tabelle 13:** *Übersicht über die p-Werte für das männliche Patientenkollektiv.*

**Tabelle 14:** *Übersicht über die p-Werte für das weibliche Patientenkollektiv.*

**Tabelle 15:** *Kreuztabelle für SRSF2 und Autoimmunerkrankungen inkl. Geschlechterschichtung.*

**Tabelle 16:** *Multivariates Modell: Parameter und Ergebnisse.*

## *Danksagung*

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Meinen herzlichen Dank gilt PD Dr. med. Andrea Kündgen für die Überlassung des Themas und das entgegengebrachte Vertrauen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Germing. Das Wecken des Interesses an der Hämatologie & Onkologie während des Studiums sowie die zahlreichen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene, auch in kritischen Lebenssituationen, werden mir immer in sehr guter Erinnerung bleiben. Vielen Dank für die wertvollen Ermutigungen, den Spaß und die Motivation. *Vacuus venter non studet libenter.*

Frau Prof. Dr. Wieczorek danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Frau Sonja Eschen und Kollegen einen großen Dank für das gute Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft.

Frau Coye des ULB-Citavi-Teams, Dr. rer. nat. Kessen und dem Team der Medical Research School Düsseldorf danke ich für die beratende und organisatorische Unterstützung.

Für die Durchsicht dieser Arbeit und den freundschaftlichen Austausch danke ich ganz herzlich der Germanistin Frau Eva-Maria Corvin sowie Frau Katrin Wermich und für den guten fachlichen Austausch Frau Dr. rer. nat. Meggendorfer.

Besonderer Dank gilt meinem Mann Alexander für seine Unterstützung und seinen allzeit vorbildhaften Mut. Meiner Familie, insbesondere meiner Schwester, für ihre inspirierenden Ideen, ihre langjährige Motivation und guten Zuspruch.

Ein letzter Dank an unseren Großvater Dipl.-Ing. Klaus Seidler († 2021).