

Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie  
(Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. G. Wulf)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Genetische Varianten von *PPM1D* und  
*TP53* bei Patienten mit  
myelodysplastischen Syndromen und  
komplex-aberranten Karyotypen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Lea Naomi Eder

aus

Frankfurt am Main

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

**Betreuungsausschuss**

Betreuer: Prof. Dr. med. D. Haase

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. P. Ströbel

**Prüfungskommission**

Referent: Prof. Dr. med. D. Haase

Ko-Referent: .....

Drittreferent: .....

Datum der mündlichen Prüfung: .....

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Genetische Varianten von *PPM1D* und *TP53* bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen und komplex-aberrantem Karyotyp" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Myelodysplastische Syndrome.....	2
1.1.1 Grundlagen.....	2
1.1.2 Symptome.....	2
1.1.3 Diagnose und Klassifikation.....	3
1.1.4 Genetik bei MDS.....	6
1.2 Klonale Hämatopoese .....	9
1.3 Aufgabenstellung.....	10
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Material.....	12
2.1.1 Verbrauchsmaterialien .....	12
2.1.2 Reagenzien.....	12
2.1.3 Primer.....	13
2.1.4 Geräte.....	15
2.2 Patienten und Einschlusskriterien .....	16
2.3 Methoden.....	18
2.3.1 Chromosomenbänderungsanalysen (CBA).....	18
2.3.2 Interphase Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) .....	19
2.3.3 Multicolour Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (mFISH).....	19
2.3.4 Mutationsanalysen von <i>PPM1D</i> und <i>TP53</i> .....	21
2.4 Statistische Auswertung.....	28
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
3.1 Patientencharakteristika.....	30
3.1.1 Geschlecht .....	35
3.1.2 Therapieassoziierte Erkrankungsformen.....	36
3.1.3 Einteilung nach IPSS-R.....	37
3.1.4 Periphere Zytopenien .....	38
3.1.5 Blutwerte und Knochenmarks-Blasten.....	39
3.1.6 Unterschiede komplexer Karyotyp und nicht-komplexer Karyotyp.....	44
3.1.7 Zahl zytogenetischer Aberrationen .....	45
3.1.8 Therapie mit demethylierenden Substanzen .....	46
3.2 Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung von <i>PPM1D</i> .....	47
3.3 Unterschiede <i>PPM1D</i> und <i>TP53</i> .....	51
3.3.1 Überleben .....	52
3.3.2 Blutwerte und Knochenmarks-Blasten.....	52

---

3.3.3	Zahl zytogenetischer Aberrationen .....	55
3.3.4	Komutationen.....	56
3.4	<i>TP53</i> -Mutationen.....	58
3.4.1	Art der <i>TP53</i> -Veränderung.....	59
3.4.2	Variante Allelfrequenz der <i>TP53</i> -Mutationen.....	65
3.5	5q-Veränderungen.....	71
3.5.1	5q-Deletionen .....	72
3.5.2	5q-Deletionen in Verbindung mit <i>TP53</i> -Mutationen.....	76
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>83</b>
4.1	Risikofaktoren bei Patienten mit MDS.....	83
4.2	Molekulargenetische Veränderungen von <i>PPM1D</i> .....	89
4.3	Molekular- und zytogenetische Veränderungen von <i>TP53</i> .....	92
4.4	5q-Deletionen als Teil des komplexen Karyotyps.....	94
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zytogenetische Anomalien bei MDS .....	7
Abbildung 2: Molekulargenetische Anomalien bei MDS.....	8
Abbildung 3: Konventionelle Chromosomen-Bänderungsanalyse eines Patienten mit normalem Karyotypen .....	18
Abbildung 4: Konventionelle Chromosomen-Bänderungsanalyse eines Patienten mit komplexem Karyotypen.....	19
Abbildung 5: Interphase FISH mit p53-Sonde.....	20
Abbildung 6: mFISH eines männlichen Patienten mit normalem Karyotypen.....	20
Abbildung 7: mFISH eines männlichen Patienten mit komplex aberrantem Karyotypen.....	20
Abbildung 8: Gelelektrophorese durch den Fragment Analyzer der amplifizierten Exons 1-3 des Gens <i>PPM1D</i> .....	24
Abbildung 9: Gelelektrophorese durch den Fragment Analyzer der amplifizierten Exons 4-6 des Gens <i>PPM1D</i> .....	24
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve für das mediane OS der Patienten mit und ohne komplex-aberranten Karyotyp.....	34
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurven nach Geschlecht.....	35
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Therapieassoziation	36
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Gesamtkohorte nach Einteilung in IPSS-R-Risikogruppen.....	37
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Zytopenien .....	38
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Hämoglobin-Wert in drei Gruppen .....	39
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Hämoglobin-Wert in zwei Gruppen .....	40
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Thrombozyten-Wert in zwei Gruppen..	41
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Neutrophilen-Wert in zwei Gruppen.....	42
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach KM-Blasten a: Gesamtkohorte in vier Gruppen .....	43
Abbildung 20: Boxplots zum Vergleich der Blutwerte und KM-Blasten zwischen Patienten mit und ohne cA .....	44
Abbildung 21: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten nach Aberrationszahlen.....	45
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von einer Therapie mit DMA .....	46
Abbildung 23: Lollipop-Plot zur Darstellung der nachgewiesenen Veränderungen von <i>PPM1D</i> .....	51
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten mit und ohne Veränderung von <i>PPM1D</i> .....	52
Abbildung 25: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten mit und ohne Veränderung von <i>TP53</i> .....	52
Abbildung 26: Boxplot zum Vergleich der Hämoglobin-Werte zwischen <i>PPM1D</i> -Veränderten und <i>PPM1D</i> -Wildtypen sowie <i>TP53</i> -Veränderten und <i>TP53</i> -Wildtypen .....	53
Abbildung 27: Boxplot zum Vergleich der Thrombozyten-Zahlen zwischen <i>PPM1D</i> -Veränderten und <i>PPM1D</i> -Wildtypen sowie <i>TP53</i> -Veränderten und <i>TP53</i> -Wildtypen	53
Abbildung 28: Boxplot zum Vergleich des ANC zwischen <i>PPM1D</i> -Veränderten und <i>PPM1D</i> -Wildtypen sowie <i>TP53</i> -Veränderten und <i>TP53</i> -Wildtypen.....	54
Abbildung 29: Boxplot zum Vergleich des Anteils der Blasten am Knochenmark zwischen <i>PPM1D</i> -Veränderten und <i>PPM1D</i> -Wildtypen sowie <i>TP53</i> -Veränderten und <i>TP53</i> -Wildtypen .....	54

Abbildung 30: Boxplot zum Vergleich der zytogenetischen Aberrationszahlen zwischen <i>PPM1D</i> -Veränderten und <i>PPM1D</i> -Wildtypen sowie <i>TP53</i> -Veränderten und <i>TP53</i> -Wildtypen .....	55
Abbildung 31: Boxplot zum Vergleich der Zahl parallel vorliegender Mutationen zwischen <i>PPM1D</i> -Veränderten und <i>PPM1D</i> -Wildtypen sowie <i>TP53</i> -Veränderten und <i>TP53</i> -Wildtypen .....	56
Abbildung 32: Boxplot zum Vergleich der Zahl parallel vorliegender Mutationen zwischen Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp und solchen ohne .....	57
Abbildung 33: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten mit komplexem Karyotyp nach Form der <i>TP53</i> -Veränderung .....	59
Abbildung 34: Boxplot zum Vergleich der Hämoglobin-Werte der Patienten mit cA nach Form der <i>TP53</i> -Veränderung .....	60
Abbildung 35: Boxplot zum Vergleich der Thrombozyten-Zahl der Patienten nach Form der <i>TP53</i> -Veränderung .....	61
Abbildung 36: Boxplot zum Vergleich der Neutrophilen-Zahl der Patienten nach Form der <i>TP53</i> -Veränderung .....	62
Abbildung 37: Boxplot zum Vergleich des Anteils myeloischer Blasten im Knochenmark der Patienten nach Form der <i>TP53</i> -Veränderung .....	62
Abbildung 38: Boxplot zum Vergleich der Zahl zytogenetischer Aberrationen der Patienten nach Form der <i>TP53</i> -Veränderung.....	63
Abbildung 39: Boxplot zum Vergleich der Zahl zytogenetischer Aberrationen der Patienten nach Form der <i>TP53</i> -Veränderung.....	64
Abbildung 40: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten mit komplexem Karyotyp nach Größe der <i>TP53</i> -mutierten Zellklone.....	65
Abbildung 41: Boxplot zum Vergleich der Hämoglobin-Werte der Patienten mit cA nach Klongröße (VAF) der <i>TP53</i> -Mutationen.....	66
Abbildung 42: Boxplot zum Vergleich der Thrombozyten-Zahlen der Patienten nach Klongröße (VAF) der <i>TP53</i> -Mutationen.....	67
Abbildung 43: Boxplot zum Vergleich der Neutrophilen-Zahlen der Patienten nach Klongröße (VAF) der <i>TP53</i> -Mutationen.....	68
Abbildung 44: Boxplot zum Vergleich des Blasten-Anteils am Knochenmark der Patienten nach Klongröße (VAF) der <i>TP53</i> -Mutationen.....	69
Abbildung 45: Boxplot zum Vergleich der Zahl zytogenetischer Aberrationen der Patienten nach Klongröße (VAF) der <i>TP53</i> -Mutationen.....	70
Abbildung 46: Scatter Plot zur Korrelation zwischen der Klongröße der <i>TP53</i> -Mutationen und der Zahl zytogenetischer Aberrationen.....	70
Abbildung 47: Boxplot zum Vergleich der parallel vorliegenden somatischen Mutationen der Patienten nach Klongröße (VAF) der <i>TP53</i> -Mutationen.....	71
Abbildung 48: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten nach 5q-Deletions-Status .....	72
Abbildung 49: Boxplot zum Vergleich der Blutwerte der Patienten nach 5q-Deletions-Status	73
Abbildung 50: Boxplot zum Vergleich des Anteils myeloischer Blasten am Knochenmark der Patienten nach 5q-Deletions-Status .....	74
Abbildung 51: Boxplot zum Vergleich der Zahl zytogenetischer Aberrationen der Patienten nach 5q-Deletions-Status.....	75
Abbildung 52: Boxplot zum Vergleich der Zahl somatischer Komutationen und Gesamtmutationen der Patienten nach 5q-Deletions-Status.....	75
Abbildung 53: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten mit komplexen Karyotypen nach <i>TP53</i> - und 5q-Deletions-Status .....	77
Abbildung 54: Boxplot zum Vergleich der Hämoglobin-Werte der Patienten nach <i>TP53</i> - und 5q-Deletions-Status .....	77

---

Abbildung 55: Boxplot zum Vergleich der Thrombozyten-Zahlen der Patienten nach <i>TP53</i> - und 5q-Deletions-Status .....	78
Abbildung 56: Boxplot zum Vergleich der Neutrophilen-Zahlen der Patienten nach <i>TP53</i> - und 5q-Deletions-Status .....	79
Abbildung 57: Boxplot zum Vergleich des Anteils myeloischer Blasten am Knochenmark der Patienten nach <i>TP53</i> - und 5q-Deletions-Status .....	80
Abbildung 58: Boxplot zum Vergleich der Zahl zytogenetischer Aberrationen der Patienten nach <i>TP53</i> - und 5q-Deletions-Status.....	81
Abbildung 59: Boxplot zum Vergleich der Zahl parallel vorliegenden somatischen Mutationen der Patienten nach <i>TP53</i> - und 5q-Deletions-Status .....	82
Abbildung 60: Forest-Plot zur Darstellung der acht stärksten Einflussfaktoren auf das Überleben der Gesamtkohorte .....	85
Abbildung 61: Forest-Plot zur Darstellung der acht stärksten Einflussfaktoren auf das Überleben der Kohorte mit cA .....	88



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation MDS 2016.....	3
Tabelle 2: IPSS-R Erhebung anhand bestimmter Parameter und entsprechender Punktzahl.....	5
Tabelle 3: Einteilung der zytogenetischen Befunde in Gruppen.....	5
Tabelle 4: Einteilung in Risikogruppen anhand der Punktwerte aus Tabelle 2.....	6
Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	12
Tabelle 6: Verwendete Reagenzien .....	12
Tabelle 7: Verwendete Primer .....	13
Tabelle 8: Verwendete Geräte .....	15
Tabelle 9: Ablauf des Taq-HotStar-PCR-Programms des Thermocyclers.....	22
Tabelle 10: Myeloisches Panel des INDIGHO-Labors der Universitätsmedizin Göttingen Stand Februar 2020.....	26
Tabelle 11: Patientencharakteristika der Gruppe mit cA .....	30
Tabelle 12: Patientencharakteristika der Gruppe ohne cA .....	32
Tabelle 13: Beschreibung der detektierten <i>PPM1D</i> Veränderungen der 14 betroffenen Patienten.....	48
Tabelle 14: Charakterisierung der Patienten mit <i>PPM1D</i> Veränderungen.....	50
Tabelle 15: Analysierte Faktoren auf ihren Einfluss auf das Überleben der Patienten der Gesamtkohorte.....	83
Tabelle 16: Analysierte Faktoren auf ihren Einfluss auf das Überleben der Patienten der Kohorte mit cA .....	86

## Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
ANC	<i>absolute neutrophile count</i> , absolute Neutrophilen-Zahl
bp	Basenpaar(e)
cA	<i>complex aberrations</i> , komplexe Aberrationen
CBA	Chromosomenbänderungsanalyse
CCUS	<i>clonal cytopenia of unknown significance</i> , klonale Zytopenie unklarer Signifikanz
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen bestimmter Oberflächenproteine
CHIP	<i>clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i> , klonale Hämatopoese unbestimmten Potentials
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
del	Deletion
del(5q)	Deletion des langen Arms von Chromosom 5
DMA	<i>demethylating agents</i> , demethylierende Substanzen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
EB-1	<i>excess of blasts 1</i> , Blasten-Exzess Stufe 1
EB-2	<i>excess of blasts 2</i> , Blasten-Exzess Stufe 2
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	<i>forward</i> , vorwärts
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Hb	Hämoglobin
HR	Hazard-Ratio
INDIGHO	Individuelle Genomdiagnostik für Hämatologie und Onkologie
IPSS	International Prognostic Scoring System
IPSS-R	Revised International Prognostic Scoring System
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
KM	Knochenmark
m	männlich
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mFISH	<i>multicolour</i> -Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

---

MLD	<i>multi lineage dysplasia</i> , Mehrliniendysplasie
mut	mutiert
NA	<i>not available</i> , nicht verfügbar
NGS	<i>next generation sequencing</i> , Sequenzierung der nächsten Generation
OS	<i>overall survival</i> , Gesamtüberleben
pB	Peripheries Blut
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
R	<i>reverse</i> , rückwärts
RBC	<i>red blood cell</i> , rote Blutzellen/Erythrozyten
RNA	Ribodesoxynukleinsäure
RS	Ringsideroblasten
sAML	sekundäre akute myeloische Leukämie
SLD	<i>single lineage dysplasia</i> , Einliniendysplasie
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i> , Einzelnukleoid-Polymorphismen
TE	Tris-Ethylendiamintetraacetat
U	unklassifizierbar
VAF	variante Allelfrequenz
w	weiblich
WGA	<i>whole genome amplification</i> , Amplifikation des ganzen Genoms
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

Bei den myelodysplastischen Syndromen (MDS) handelt es sich um eine heterogene Gruppe von klonalen Erkrankungen, bei denen die Stammzellen einer oder mehrerer Reihen des blutbildenden Systems im Knochenmark dysplastisch verändert sind und so in der Folge zu einer gestörten Blutbildung führen können. Diese ineffektive Hämatopoese führt bei Patienten mit MDS typischerweise zu Zytopenien im peripheren Blut, führend ist dabei in der Regel die Anämie. Betroffen sind vor allem ältere Patienten, das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei ca. 75 Jahren (Greenberg et al. 2017; Hofmann et al. 2020).

In den letzten Jahren und Jahrzehnten haben für die Diagnostik und Prognoseabschätzung bei MDS zyto- und molekulargenetische Untersuchungen zunehmend an Bedeutung gewonnen (Schanz et al. 2011; Greenberg et al. 2012; Sperling et al. 2017). Während zytogenetische Methoden wie die konventionelle Bänderungsanalyse und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) schon seit über 20 Jahren fester Bestandteil der Diagnostik sind (Haase et al. 1997) und sogar Einzug in die gängigen Risiko-Scores wie dem Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) genommen haben (Greenberg et al. 2012), rücken molekulargenetische Untersuchungen mit der immer größer werdenden Verfügbarkeit des *next generation sequencings* (NGS) zunehmend mehr in den Fokus der Forschung. Diverse Gene wurden schon als krankheitstypisch und zum Teil prognoserelevant eingestuft und werden in der Therapieplanung und Risikoabschätzung berücksichtigt (Greenberg 2013).

Zu den bereits fest etablierten Prognosefaktoren zählt die zytogenetische Untersuchung und Analyse des Karyotyps. Von besonders großer Bedeutung sind dabei die sogenannten komplex-aberranten Karyotypen (cA), bei denen in den hämatopoetischen Stammzellen der Patienten drei oder mehr chromosomale Veränderungen nachgewiesen werden können. Diese Karyotypen gehen mit einer besonders schlechten Prognose und einem erhöhten Risiko für einen Übergang in die akute myeloische Leukämie (AML) einher (Greenberg et al. 1997). Besonders in eben dieser Gruppe der Patienten mit komplexen Karyotypen wird intensiv nach Parametern und Faktoren gesucht, anhand derer man das Risiko und die Prognose der Patienten weiter unterteilen und einschätzen oder sogar Therapieentscheidungen beeinflussen kann. Als ein bedeutender Risikofaktor haben sich Mutationen im Gen *TP53* herausgestellt, die sich in ungefähr der Hälfte der Patienten mit MDS und cA finden lassen (Schaab et al. 2016; Greenberg et al. 2017). Neuere Ergebnisse zeigen, dass vor allem biallelische Veränderungen von *TP53* mit einer signifikant schlechteren Prognose einhergehen (Bernard et al. 2020).

Weitere Gene, die in den *TP53*-Signalweg eingeschaltet sind, wurden in der Vergangenheit auf ihre Bedeutung in Bezug auf die Entwicklung eines komplexen Karyotyps untersucht. Dabei fiel das Gen *PPM1D* (Protein-Phosphatase Mn<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-abhängig 1D) auf, welches

gehäuft bei Patienten mit klonaler Hämatopoese ungeklärten Potentials (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*, CHIP) verändert ist und welches als direkter Inhibitor von p53 in dessen Signalweg eingeschaltet ist (Genovese et al. 2014; Hsu et al. 2018).

In dieser Arbeit soll die Prävalenz und die Bedeutung für das Gesamtüberleben und den Krankheitsverlauf von Veränderungen des Gens *PPM1D* in der Hochrisiko-Gruppe der MDS-Patienten mit cA untersucht werden.

## 1.1 Myelodysplastische Syndrome

### 1.1.1 Grundlagen

Myelodysplastische Syndrome (MDS) wurde erstmals 1949 durch den Pathologen Hamilton-Paterson beschrieben und sind eine Gruppe klonaler hämatopoetischer Stammzellerkrankungen, die zu einer sowohl qualitativen als auch quantitativen Veränderung der Blutbildung im Knochenmark führen können. Häufig findet sich bei Patienten mit MDS ein hyperzelluläres Knochenmark mit dysplastisch veränderten Zellen. Diese Dysplasien können eine oder mehrere Zellreihen der Hämatopoese betreffen. Auch hypozelluläre Formen des MDS sind möglich (Giagounidis et al. 2004). Insgesamt führen die dysplastischen Veränderungen der blutbildenden Zellen zu einem Ungleichgewicht zwischen Zellteilung und Apoptose, was zu einer ineffektiven Hämatopoese und in der Folge oft zu Zytopenien im peripheren Blut führen kann.

Erkrankungsrisiko und Inzidenz steigen mit dem Alter an, das mediane Erkrankungsalter liegt bei 75 Jahren, die Inzidenz beträgt 5-20/100.000 Patienten pro Jahr. Myelodysplastische Syndrome sind eine der häufigsten hämatologische Erkrankungen neoplastischer Natur (Greenberg et al. 2017; Hofmann et al. 2020).

Es wird zwischen primären und sekundären Formen des MDS unterschieden: Bei den sekundären Formen lässt sich ein krankheitsinduzierender Risikofaktor wie zum Beispiel eine Chemotherapie, Bestrahlung oder Gefahrenstoffexposition in der Vergangenheit identifizieren, bei primären Formen ist dies nicht möglich. Die Ätiologie der primären MDS-Formen ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings scheinen diverse zyto- und molekulargenetische Faktoren hierbei eine Rolle zu spielen (Strom et al. 2005).

### 1.1.2 Symptome

Patienten mit MDS weisen in der Regel Symptome auf, die sich auf die ineffektive Hämatopoese und den darauf resultierenden Zytopenien zurückführen lassen. Am häufigsten berichten Patienten von den Symptomen der Anämie, welche sich am häufigsten finden lässt (Haase et al. 2007), zu denen Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Dyspnoe und Kopfschmerzen gehören. Des Weiteren kann es zu einer erhöhten Infektanfälligkeit im Zuge einer verminderten Zahl von neutrophilen Granulozyten kommen. Als Symptom der

Störungen der dritten Reihe, der Thrombozyten, kann es zu Blutungsneigungen kommen. In 20-30% der Patienten kann es außerdem zu einer Vergrößerung von Milz und/oder Leber kommen, was wiederum zu Schmerzen im Oberbauch führen kann (Herold 2018).

### 1.1.3 Diagnose und Klassifikation

Die Diagnose des MDS wird in Zusammenschau mehrerer Faktoren gestellt. Hierzu werden sowohl die klinische Erscheinung, Laborergebnisse, Knochenmarksuntersuchungen, Blutausstriche als auch genetische Analysen betrachtet.

Im Knochenmark spielt vor allem die Morphologie eine große Rolle: Es zeigen sich dysplastische Veränderungen in reifen oder Vorläuferzellen der verschiedenen hämatopoetischen Zellreihen, wobei eine oder mehrere Reihen betroffen sein können. Außerdem kann es zu einer Erhöhung der Blastenzahl kommen, allerdings dürfen diese die 20%-Marke nicht übersteigen, da man sonst definitionsgemäß von einer akuten myeloischen Leukämie sprechen müsste. Zur weiteren Diagnostik werden zusätzlich eine konventionelle Bänderungsanalyse, eine FISH-Untersuchung (Cazzola and Malcovati 2005; Arber et al. 2016) und seit kurzem auch molekulargenetische Untersuchung der am häufigsten betroffenen Gene empfohlen (Bejar et al. 2011). Anhand des Knochenmarkbefundes, des Blutbildes und weiterführender Untersuchungen wird die Erkrankung entsprechend der Klassifikation der World Health Organization (WHO) in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die aktuelle Einteilung erfolgt nach der WHO-Klassifikation von 2016 (Tabelle 1).

**Tabelle 1: WHO-Klassifikation MDS 2016 (modifiziert nach Abert et al. (2016))**

MDS-Subtyp	Zytopenie-Zahlen	Dysplastische Reihen	Ringsideroblasten	Blasten	Zytogenetik
MDS mit Einliniendysplasie ( <i>single lineage dysplasia</i> , MDS-SLD)	1 oder 2	1	< 15% bzw. 5% bei <i>SF3B1</i> Mutation	Im KM < 5% Im pB < 1% keine Auer-Stäbchen	Alle außer del(5q) +/- 1
MDS mit Mehrliniendysplasie ( <i>multi lineage dysplasia</i> , MDS-MLD)	1-3	2 oder 3	< 15% bzw. 5% bei <i>SF3B1</i> Mutation	Im KM < 5% Im pB < 1% keine Auer-Stäbchen	Alle außer del(5q) +/- 1
MDS-SLD mit Ringsideroblastem (MDS-RS-SLD)	1 oder 2	1	≥ 15% bzw. ≥ 5% bei <i>SF3B1</i> Mutation	Im KM < 5% Im pB < 1% keine Auer-Stäbchen	Alle außer del(5q) +/- 1

MDS-Subtyp	Zytopenie-Zahlen	Dysplastische Reihen	Ringsideroblasten	Blasten	Zytogenetik
MDS-MLD mit Ringsideroblasten (MDS-RS-MLD)	1-3	2 oder 3	≥ 15% bzw. ≥ 5% bei <i>SF3B1</i> Mutation	Im KM < 5% Im pB < 1% keine Auer-Stäbchen	Alle außer del(5q) +/- 1
MDS mit isolierter 5q-Deletion	1 oder 2	1-3	Nicht relevant	Im KM < 5% Im pB < 1% keine Auer-Stäbchen	del(5q) isoliert oder mit einer weiteren Anomalie außer -7 oder del(7q)
MDS mit Blasten-Exzess 1 (MDS-EB1)	1-3	0-3	Nicht relevant	Im KM 5-9% oder im pB 2-4% keine Auer-Stäbchen	Nicht relevant
MDS mit Blasten-Exzess 2 (MDS-EB2)	1-3	0-3	Nicht relevant	Im KM 10-19% oder im pB 5-19% oder Auer-Stäbchen	Nicht relevant
Unklassifizierbares MDS (MDS-U)	1-3	0-3	unterschiedlich	Im KM < 5% Im pB < 1% keine Auer-Stäbchen	Unterschiedlich, u.a. MDS-definierende Anomalien

KM: Knochenmark; pB: peripheres Blut

Neben der morphologischen Klassifizierung gemäß der WHO-Klassifikation existieren noch weitere Klassifizierungs-Systeme zur Einteilung verschiedener Untergruppen der Myelodysplastischen Syndrome. Ein weiteres System ist die Einteilung nach Risikofaktoren, die durch das International Prognostic Scoring System (IPSS) bzw. seine revidierte Form, das Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R), abgedeckt wird. In diesem System werden Patienten aufgrund verschiedener Faktoren in Risikogruppen eingeteilt. Im IPSS-R (Tabelle 2), welcher von Greenberg et al. (2012) etabliert wurde, wurde im Gegensatz zum IPSS die bis dahin in Ihrer Bedeutung unterschätzte Zytogenetik (Schanz et al. 2011) als stärker gewichteter Risikofaktor in fünf statt ehemals drei Gruppen eingeführt (Tabelle 3) und außerdem die Zahl der Risikogruppen von drei (geringes Risiko, intermediäres Risiko, hohes Risiko) auf fünf (sehr geringes Risiko, geringes Risiko, intermediäres Risiko, hohes

Risiko, sehr hohes Risiko) erhöht (Tabelle 4), um eine noch genauere Einteilung zu ermöglichen (Greenberg et al. 2012). Anhand dieser Risikogruppen ist eine grobe Prognoseschätzung anhand des medianen Überlebens und der Zeit bis zum Übergang in eine AML der Patienten in den jeweiligen Gruppen möglich.

**Tabelle 2: IPSS-R Erhebung anhand bestimmter Parameter und entsprechender Punktzahl**

	0 Pkt.	0,5 Pkt.	1 Pkt.	1,5 Pkt.	2 Pkt.	3 Pkt.	4 Pkt.
Zytogenetik	Sehr günstig		Günstig		Intermediär	Ungünstig	Sehr ungünstig
Blasten im Knochenmark	≤ 2%		> 2% - < 5%		5%-10%	> 10%	
Hämoglobinwert (g/dl)	≥ 10		8- < 10	< 8			
Thrombozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	> 100	50- < 100	< 50				
Absolute Zahl neutrophiler Granulozyten (ANC)	≥ 0,8	< 0,8					

**Tabelle 3: Einteilung der zytogenetischen Befunde in Gruppen**

Sehr günstig	Isoliert: -Y, del(11q)
Günstig	normaler Karyotyp isoliert: del(5q), del(12p), del(20q) Doppelanomalien mit del(5q)
Intermediär	isoliert: del(7q), +8, i(17q), +19 andere unabhängige Klone und Doppelanomalien
Ungünstig	isoliert: inv(3)/t(3q)/del(3q), -7 Doppelanomalien mit -7 oder del(7q) komplex: 3 Anomalien
Sehr ungünstig	komplex: mehr als 3 Anomalien



**Tabelle 4: Einteilung in Risikogruppen anhand der Punktwerte aus Tabelle 2 (modifiziert nach Greenberg et al. (2012))**

Risikogruppe	Punktwerte	Medianes Überleben in Jahren	Mediane Zeit bis 25% AML Transformation in Jahren
Sehr geringes Risiko ( <i>very low risk</i> )	$\leq 1,5$	8,8	nicht erreicht
Geringes Risiko ( <i>low risk</i> )	$> 1,5 - 3$	5,3	10,8
Intermediäres Risiko ( <i>intermediate risk</i> )	$> 3 - 4,5$	3,0	3,2
Hohes Risiko ( <i>high risk</i> )	$> 4,5 - 6$	1,6	1,4
Sehr hohes Risiko ( <i>very high risk</i> )	$> 6$	0,8	0,7

#### 1.1.4 Genetik bei MDS

Genetische Faktoren sind bei der Entstehung und Entwicklung von Myelodysplastischen Syndromen von großer Bedeutung: in bis zu 70% der MDS-Patienten finden sich zytogenetische Aberrationen, die einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung und die Prognose haben (Giagounidis and Haase 2013). Dabei gibt es allerdings nicht eine krankheitsdefinierende Veränderung wie die t(9;22) bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML), sondern eine große Gruppe verschiedener Aberrationen. Häufig handelt es sich bei diesen zytogenetischen Veränderungen um unbalancierte Anomalien wie Deletionen, Trisomien oder Monosomien. Die häufigste zytogenetische Veränderung ist die Deletion des langen Arms des Chromosoms 5, del(5q). Diese Veränderung ist auch die Einzige, die in ihrer isolierten Form einen eigenen Subtyp definiert (s. Tabelle 1, MDS mit 5q-). Dieser Subtyp ist mit einer verhältnismäßig guten Prognose assoziiert (Haase et al. 2007; Greenberg et al. 2017). Außerdem zeigen Patienten mit einem isolierten 5q-Syndrom ein relativ gutes Ansprechen auf den Immunmodulator Lenalidomid (Fenaux et al. 2011). Weitere häufig betroffene Chromosomen sind die Chromosomen 7, 8, 17, 20 und das Y-Chromosom (Abbildung 1). Eine Monosomie 7 ist zum Beispiel mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Schanz et al. 2012), während Patienten mit einem Y-Verlust oft einen guten Verlauf zeigen. Der Verlust des Y-Chromosoms, besonders in großen Klonen, ist als MDS-typische Veränderung zu werten, kann aber auch altersassoziiert ohne klonalen Charakter auftreten (Ganster et al. 2015; Giagounidis and Haase 2020). Einen besonderen Stellenwert haben sogenannte komplexe Karyotypen, bei denen definitionsgemäß drei oder mehr zytogenetische chromosomale Veränderungen in einem Klon zu finden sind. Diese Konstellation ist bei 15-20% der MDS-Patienten zu finden und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Haase et al. 2007; Schanz et al. 2011). Diese Patienten weisen ein

erhöhtes Risiko für eine Transformation in eine AML auf (Greenberg et al. 1997). Auch innerhalb der Gruppe der komplexen Karyotypen zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit drei Aberrationen und solchen mit mehr Veränderungen: Haase und Kollegen (2007) konnten ein signifikant kürzeres medianes Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) für Patienten mit sechs Aberrationen (5 Monate) im Vergleich mit solchen mit vier oder fünf Aberrationen (9 Monate) und komplexen Karyotypen mit drei Veränderungen (17 Monate) nachweisen. Aufgrund dieser Erkenntnisse werden komplexe Karyotypen mit drei Anomalien im IPSS-R in die zytogenetische Risikogruppe „ungünstig“ eingestuft, während solche mit mehr als drei Aberrationen als einzige Konstellation in die Kategorie „sehr ungünstig“ fallen und somit den ungünstigsten Prognosefaktor darstellen (s. Tabelle 2) (Schanz et al. 2011; Greenberg et al. 2012; Schanz et al. 2012).

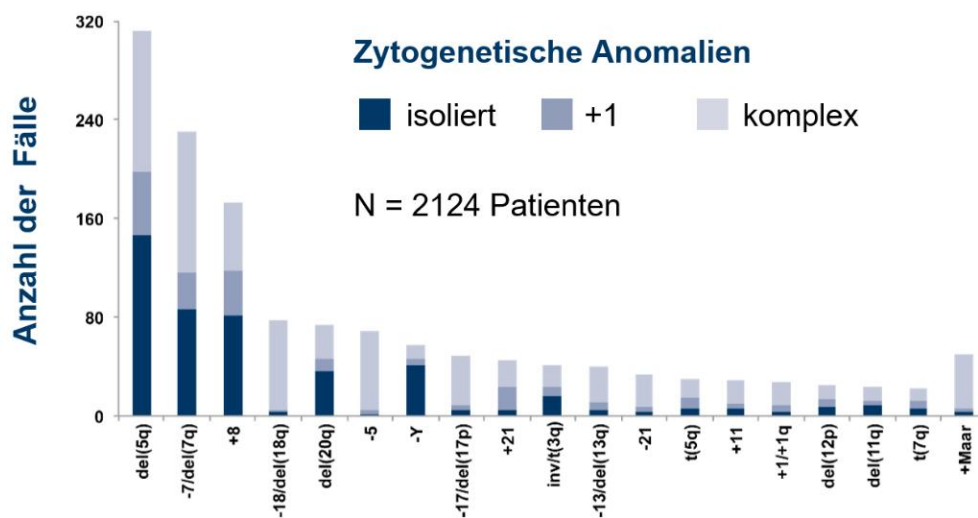
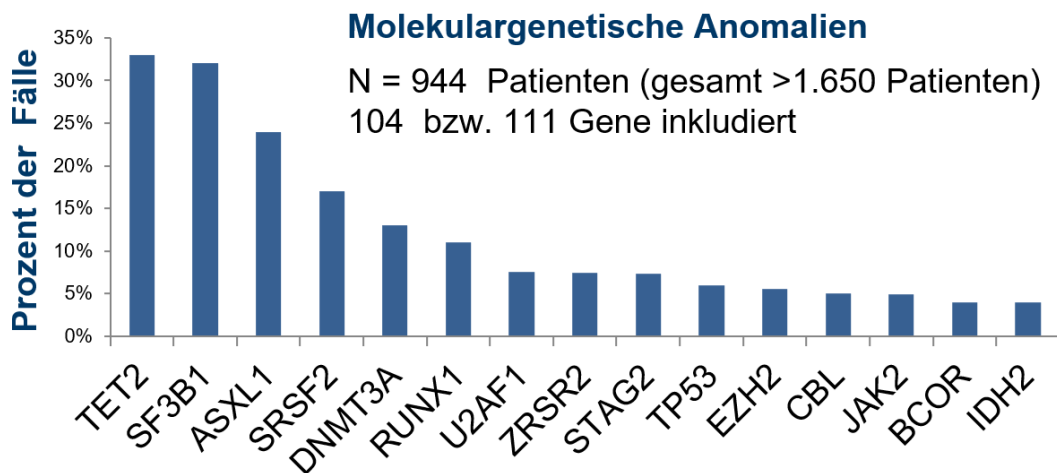


Abbildung 1: Zytogenetische Anomalien bei MDS (nach Haase et al. (2007))

Im Bereich der molekulargenetischen Veränderungen zeigen neuere Arbeiten, dass in 78% der Patienten mit MDS mindestens eine Mutation mit onkogenetischem Potential zu finden ist (Papaemmanuil et al. 2013). Große Sequenzierungs-Studien haben einen Katalog der am häufigsten mutierten Gene erstellt, die vor allem im Bereich der DNA-Methylierung, des RNA-Splittings oder der DNA-Reparaturmechanismen angesiedelt sind (Abbildung 2). Als besonders häufig betroffene Gene sind *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *SRSF2*, *SF3B1*, *EZH2* und *TP53* zu nennen, von denen lediglich Mutationen in *SF3B1*, welche zu den mit Abstand häufigsten Mutationen gehören, mit einer guten Prognose in Verbindung gebracht werden (Bejar et al. 2011; Papaemmanuil et al. 2013; Haferlach et al. 2014).



**Abbildung 2: Molekulargenetische Anomalien bei MDS** (nach Haferlach et al. (2014); Papaemmanuil et al. (2013))

Eine Mutation, die mit einer schlechteren Prognose und einem signifikant verkürzten Überleben einhergeht, ist die des Gens *TP53*. *TP53* liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 und kodiert für das Tumorsuppressor-Protein p53, das als „Wächter des Genoms“ die Aktivierung der Apoptose nach DNA-Schädigungen reguliert. Bei MDS Patienten ist *TP53* in ungefähr 8% der Fälle mutiert (Bejar et al. 2014) und führt neben einem verkürzten Gesamtüberleben auch zu einer schnelleren Transformation in eine AML. Außerdem sind *TP53* Mutationen signifikant mit dem Auftreten komplexer Karyotypen assoziiert: Ca. 44% der Patienten mit komplexen Karyotypen weisen mindestens eine Mutation von *TP53* auf (Schaab et al. 2016). Für diese Gruppe der Patienten mit komplexem Karyotypen und *TP53*-Mutationen konnten Bejar et al. (2011) auch ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben im Vergleich zu solchen ohne *TP53* Mutation feststellen (6 Monate vs. 36 Monate), wobei die Prognose der Patienten ohne Mutation vergleichbar mit der der Patienten mit unauffälligerer Zytogenetik war.

Des Weiteren sprechen *TP53*-mutierte Patienten schlechter auf diverse Therapien an, wie zum Beispiel Hoch- und Niedrigdosis-Chemotherapien oder den Einsatz von demethylierenden Substanzen wie Azacitidin (Welch 2018). Auch nach einer allogenen Stammzelltransplantation, die die einzige kurative Therapieoption für MDS-Patienten darstellt, zeigen Patienten mit solchen Mutationen schlechtere Verläufe und ein erhöhtes Risiko für Rezidive (Lindsley et al. 2017). *TP53* Mutation sind aufgrund dieser Gründe als prognostisch besonders ungünstiger Risikofaktor anzusehen.

## 1.2 Klonale Hämatopoese

Mit der zunehmenden Verfügbarkeit von molekulargenetischer Diagnostik kommt es zu stetig neuen Erkenntnisgewinnen im Bereich der genetischen Grundlage in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen. Große Sequenzierungsstudien konnten 2014 zeigen, dass Mutationen in Genen, die mit verschiedenen neoplastischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, auch in Menschen höheren Alters ohne manifeste Diagnose zu finden sind (Genovese et al. 2014; Jaiswal et al. 2014). Genovese et al. (2014) fanden klonale genetische Veränderungen in 10% ihrer über 65-Jährigen gesunden Probanden, bei Jaiswal et al. (2014) waren es in der Gruppe der 70 bis 79 Jährigen 9,5% und bei den über 90-Jährigen sogar 18,4%. Steensma et al. (2015) führten daraufhin den Ausdruck der „*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*“ (kurz „CHIP“), übersetzt mit „klonale Hämatopoese unbestimmten Potentials“, für dieses Phänomen ein. Die am häufigsten betroffenen Gene sind dabei *DNMT3A*, *TET2* und *ASXL1*, welche schon länger mit MDS assoziiert werden, aber auch das bis dahin noch wenig im Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen untersuchte *PPM1D* und *TP53* (Genovese et al. 2014; Jaiswal et al. 2014; Sperling et al. 2017). Patienten mit CHIP haben ein erhöhtes Risiko, an einer hämatologischen Neoplasie wie MDS oder AML zu erkranken, allerdings beträgt dieses Risiko nur 0,5-1% pro Jahr (Steensma et al. 2015). Außerdem fand sich bei betroffenen Patienten ein signifikant erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten und ischämische Schlaganfälle und eine damit verbundene erhöhte Gesamt-Mortalität (Jaiswal et al. 2014).

Die Diagnosekriterien für CHIP unterscheiden sich insofern von denen des MDS, dass keinerlei weitere Erkrankungshinweise vorliegen dürfen. Während zur Diagnose eines MDS noch Dysplasien, Zytopenien und zyto- oder molekulargenetische Veränderungen vorhanden sein müssen, wird CHIP dann diagnostiziert, wenn außer der klonalen Veränderung in einem der beschriebenen Gene keine Zeichen einer hämatologischen Systemerkrankung zu finden sind. In der schwedischen Kohorte von Genovese et al. waren Mutationen im Gen *PPM1D* besonders häufig, welches bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht im Zusammenhang mit Erkrankungen des blutbildenden Systems untersucht worden war (Genovese et al. 2014).

Das Gen *PPM1D* liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 17, genauer an Position 17q23. Es codiert für das Protein Wip1, welches in den p53-Signalweg eingeschaltet ist. Es hemmt sowohl auf direktem als auch auf indirektem Weg p53, indem es dieses dephosphoryliert, sodass es durch Ubiquitinierung dem Proteasom zum Abbau zugeführt werden kann. Dies führt zu einer Inhibition der apoptoseinduzierenden Wirkung von p53 und somit zu einer abgeschwächten Zellprotektion. Mutationen in *PPM1D* sind schon länger bekannt im Zusammenhang mit Mamma- und Ovarialkarzinomen sowie bei Hirnstamm-Glioblastomen (Steensma et al. 2015). Die in diesen Entitäten beschriebenen Mutationen liegen häufig im Exon 6, dem letzten Exon des Gens, und führen zu einer Steigerung der Aktivität von Wip1 (Akbari et al. 2014; Hsu et al. 2018). Durch diese *Gain-of-Function*-Mutationen kommt es zu

einer pathologisch gesteigerten Inhibition von p53, sodass es zum Ausfall wichtiger Schutzfunktionen bei Mutationen und DNA-Schäden kommt. Mutationen dieser Art sind auch bei CHIP-Patienten zu finden, ohne dass sie zum Ausbruch einer manifesten hämatologischen Systemerkrankung führen.

### 1.3 Aufgabenstellung

Mit den Arbeiten von Genovese et al. (2014) und Jaiswal et al. (2014) rückten klonale Veränderungen in hämatopoetischen Stammzellen, die in ansonsten gesunden Patienten zu finden sind, in den Fokus der Forschung. *PPM1D* war bis dahin noch nicht im Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen untersucht worden. Panagiotta et al. (2018) fanden 2018 5% *PPM1D*-Mutation in einer Kohorte von MDS-Patienten mit 5q-Syndrom. Lindsley et al. (2017) konnten nachweisen, dass solche *PPM1D*-Mutationen vermehrt in Patienten mit sekundären, therapieassoziierten Neoplasien zu finden sind, nämlich in ca. 15%. Vor allem nach Exposition durch platinhaltige Zytostatika und Etoposid sowie nach Bestrahlung lässt sich eine erhöhte Rate an *PPM1D*-Mutation feststellen (Hsu et al. 2018).

In einer Kohorte komplex aberranter MDS-Patienten mit oder ohne *TP53*-Veränderung wurde zusätzlich eine Analyse auf Einzelnukleoid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNP), eine sogenannte SNP-Array-Untersuchung durchgeführt, die auffällig häufig eine Affektion des langen Arms des Chromosoms 17 zeigte. Da solche Patienten mit komplex aberranten Karyotypen eine bedeutend schlechtere Prognose und ein erhöhtes Risiko zur Transformation in eine AML zeigen (Greenberg et al. 1997), ist es von großem Interesse, die Pathogenese dieser Ansammlung von Anomalien zu verstehen. In fast 50% der Patienten mit solchen Karyotypen kann man Mutationen in *TP53* finden (Schaab et al. 2016; Greenberg et al. 2017). In Verbindung mit den Daten aus den CHIP-Studien, die *PPM1D* als häufig mutiertes Gen aufzeigen, werfen die erhobenen SNP-Array-Daten die Frage auf, ob Mutationen von *PPM1D* eine mögliche Alternative zu *TP53* als potentiellm Driver in der Entwicklung von komplexen Karyotypen darstellt. Bislang ist über *PPM1D*-Varianten bei MDS-Patienten mit diesem Subtyp noch nichts bekannt.

Auch *TP53* ist weiterhin ein wichtiges Thema in der aktuellen hämatologischen Forschung. So wurde von Bernard et al. (2020) veröffentlicht, dass der Status der *TP53*-Mutation, wie das Vorliegen einer einzelnen oder mehrerer *TP53*-Mutationen, einen Einfluss auf die Prognose der Patienten hat. Auch die Klongröße von nachgewiesenen *TP53*-Mutationen scheint nach Sallmann et al. (2016) sowie Haase et al. (2019) für den Verlauf der Erkrankung bei MDS-Patienten mit komplexen zytogenetischen Veränderungen relevant zu sein. Über diese Faktoren ist abgesehen von den beiden genannten Veröffentlichungen noch nicht viel erforscht. Auch ein Zusammenhang zwischen *TP53*- und *PPM1D*-Mutationen ist noch nicht abschließend geklärt.

In dieser Arbeit soll der Stellenwert von *PPM1D*-Mutationen bei MDS-Patienten mit komplex aberranten Karyotypen festgestellt werden. Dazu wird eine gut charakterisierte Kohorte von Patienten mit MDS, chronisch myelomonozytärer Leukämie (CMML) und sekundärer AML (sAML) auf Veränderungen in *PPM1D* untersucht. Es soll die Prävalenz solcher Veränderungen in dieser Kohorte festgestellt werden, sowie die Auswirkung dieser auf den Krankheitsverlauf und das Überleben der Patienten. Um Erkenntnisse über die Auswirkung eventueller Veränderungen auf komplexe Karyotypen gewinnen zu können, wird außerdem ein kleineres Vergleichskollektiv ohne komplex aberrante Chromosomenanomalien untersucht. Des Weiteren soll der Einfluss von *TP53*-Mutationen genauer betrachtet werden, um innerhalb der Gruppe der Patienten mit verändertem *TP53* Unterschiede zu finden, die Auswirkungen auf das Überleben und den Krankheitsverlauf der Patienten haben und eine genauere Prognoseabschätzung erlauben könnten. Dazu soll auch ein eventuell bestehender Zusammenhang zwischen *PPM1D*- und *TP53*-Mutationen speziell bei Patienten mit komplexem Karyotyp untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Eine Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien findet sich in Tabelle 5.

**Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Material	Bezeichnung	Firma und Firmensitz
Filter Tips, 1-10 µl	Filterspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Filter Tips, 10-100 µl	Filterspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Filter Tips, 10-200 µl	Filterspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Filter Tips, 100-1000 µl	Filterspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
SafeSeal Gefäß, 1,5 ml	Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nürnbrecht
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nürnbrecht
Sapphire Microplate 96W	96 Well PCR Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Adhäsive qPCR Folie	96 Well PCR Platten Folie	Sarstedt, Nürnbrecht
Multiply-µStrip 8er Kette	Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nürnbrecht

#### 2.1.2 Reagenzien

Die eingesetzten Reagenzien sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 6: Verwendete Reagenzien**

Produkt	Bezeichnung	Firma und Firmensitz
QIAseq Targeted DNA Custom Panel	Reagenzien-Kit	QIAGEN, Hilden
QIAseq 96-Index 1 set A	Reagenzien-Kit	QIAGEN, Hilden
MiniSeq High Output Reagent Cartridge	Kartusche	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
MiniSeq Mid Output Reagent Cartridge	Kartusche	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA

Produkt	Bezeichnung	Firma und Firmensitz
PhiX Control Kit v3	Qualitätskontrolle	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
HotStarTaq Plus DNA Polymerase (1000)	Polymerase	QIAGEN, Hilden
PCR Buffer 10x	PCR-Puffer	QIAGEN, Hilden
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid	QIAGEN, Hilden
dNTP mixture	Nukleotid-Mischung	
Nuclease-free Water	Nukleasefreies Wasser	
Ethanol Absolut	Ethanol	Th. Geyer, Renningen

### 2.1.3 Primer

Die eingesetzten Primer und ihre Sequenzen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7: Verwendete Primer**

Bezeichnung (F: <i>forward</i> , R: <i>reverse</i> )	Sequenz (5'-3')	Fragmentgröße der Produkte (bp)
TP53 Exon 4 F (TP53-4F)	ACAACGTTCCTGGTAAGGACAAGGG	497
TP53 Exon 4 R (TP53-4R)	GGGTGAAGAGGAATCCCAAAGTTC	497
TP53 Exon 5/6 F (TP53-5-6F)	CTCCTGAGGTGTAGACGCCAACTC	621
TP53 Exon 5/6 R (TP53-5-6R)	CAGCAGGAGAAAGCCCCCTACTGC	621
TP53 Exon 7 F (TP53-7F)	CCTCCCCTGCTTGCCACAGGTCTCC	427
TP53 Exon 7 R (TP53-7R)	CCCTTGTCCTTCTGGAGCCTAAGC	427
TP53 Exon 8/9 F (TP53-8-9F)	GGTTGGGAGTAGATGGAGCCTGG	501
TP53 Exon 8/9 R (TP53-8-9R)	GATGGCAAATGCCCAATTGCAGG	501



<b>Bezeichnung (F: <i>forward</i>; R: <i>reverse</i>)</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Fragmentgröße der Produkte (bp)</b>
<i>TP53</i> Exon 10 F ( <i>TP53-10F</i> )	GCTGTATAGGTACTTGAAGTGCAG	380
<i>TP53</i> Exon 10 R ( <i>TP53-10R</i> )	GCAGGGCTGGGACCCAATGAGATG G	380
<i>PPM1D</i> Exon 1-1 F ( <i>PPM1D-1-1F</i> )	GACAAGTCCAGACATCGCGC	365
<i>PPM1D</i> Exon 1-1 R ( <i>PPM1D-1-1R</i> )	GGCCTTTCCCCGAGACTTC	365
<i>PPM1D</i> Exon 1-2 F ( <i>PPM1D-1-2F</i> )	CGAACCGACGGCTGAAGAAA	433
<i>PPM1D</i> Exon 1-2 R ( <i>PPM1D-1-2R</i> )	AGCCCTGAACTGCCTGAAAA	433
<i>PPM1D</i> Exon 2 F ( <i>PPM1D-2F</i> )	TGCCATTTGTATCCTGACAGTGT	394
<i>PPM1D</i> Exon 2 R ( <i>PPM1D-2R</i> )	CAGTAAAAGGGACAGTAGTAGGT	394
<i>PPM1D</i> Exon 3 F ( <i>PPM1D-3F</i> )	CTCTCTGAACAGGAATTTTGGCT	375
<i>PPM1D</i> Exon 3 R ( <i>PPM1D-3R</i> )	AGGGTTT <sup>1</sup> AGT <sup>1</sup> TCTGTCTCCTCT	375
<i>PPM1D</i> Exon 4 F ( <i>PPM1D-4F</i> )	CTGTTGCTGTTGTACTATTAGCTTCC	363
<i>PPM1D</i> Exon 4 R ( <i>PPM1D-4R</i> )	TGCAAAAATCTACCCAAGGTCAATG	363
<i>PPM1D</i> Exon 5 F ( <i>PPM1D-5F</i> )	GAGCTTT <sup>1</sup> GTTTGGGCCACAG	425
<i>PPM1D</i> Exon 5 R ( <i>PPM1D-5R</i> )	TGTTTCCAGGTGACGCTAAC	425

<b>Bezeichnung (F: <i>forward</i>; R: <i>reverse</i>)</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Fragmentgröße der Produkte (bp)</b>
<i>PPM1D</i> Exon 6-1 F ( <i>PPM1D</i> -6-1-F)	AGTGAATGCATACCCCGTTT	421
<i>PPM1D</i> Exon 6-1 R ( <i>PPM1D</i> -6-1R)	GGCCAGGAGTTGACATCTTCA	421
<i>PPM1D</i> Exon 6-2 F ( <i>PPM1D</i> -6-2F)	ACCACTTGAAGAAAATTGCGCT	349
<i>PPM1D</i> Exon 6-2 R ( <i>PPM1D</i> -6-2R)	CITCTGGCCCCTAAGTCTGC	349
<i>PPM1D</i> Exon 6-3 F ( <i>PPM1D</i> -6-3F)	GTCTCCCCACAACCTCACAG	284
<i>PPM1D</i> Exon 6-3 R ( <i>PPM1D</i> -6-3R)	AAGCAAGTACAAGGCCAGGA	284

#### 2.1.4 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 8 gelistet.

**Tabelle 8: Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma und Firmensitz</b>
Rotixa 50RS	Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Heraeus Fresco 17	Tischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
UVT-B-AR	Werkbank	Grant Instruments, Shepreth, UK
Phoenix SR-VA10	Vortexer	Rettberg, Göttingen
Thermocycler Veriti	PCR-Cycler	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
Qubit	DNA-Messgerät	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MiniSeq	Sequenzierer	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
QIASymphony	DNA-Aufbereiter	QIAGEN, Hilden

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma und Firmensitz</b>
Fragment Analyzer	Elektrophorese-Gerät	Advanced Analytical, Heidelberg
Eppendorf Research Plus Pipette, Einkanal, 0,5-10 µl	Pipette	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research Plus Pipette, Einkanal, 10-100 µl	Pipette	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research Plus Pipette, Einkanal, 20-200 µl	Pipette	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research Plus Pipette, Einkanal, 100-1000 µl	Pipette	Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Patienten und Einschlusskriterien

Die Patientenkohorte setzt sich aus zwei Gruppen zusammen: Die eine Gruppe besteht aus 115 Patienten mit MDS, CMML oder sekundärer AML aus MDS, die alle einen komplexen Karyotypen aufweisen. Die zweite Gruppe ist zusammengesetzt aus 40 Patienten mit denselben Erkrankungen, allerdings mit normalem oder nicht komplex verändertem Karyotypen. Als Untersuchungsmaterial diente entweder peripheres Blut oder Knochenmark der Patienten, das zwischen 2007 und Februar 2020 im Labor für Individuelle Genomdiagnostik für Hämatologie und Onkologie (INDIGHO-Labor) der Universitätsmedizin Göttingen untersucht wurde. Die klinische Behandlung und weiterführende Betreuung der Patienten erfolgten in folgenden Zentren:

Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Universitätsmedizin Göttingen;

Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden;

Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf;

Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin, Marien Hospital Düsseldorf

Klinik für Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg;

Onkologische Gemeinschaftspraxis, Kassel;

Klinik für Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf;

Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Ulm;

Hufeland Klinikum, Mühlhausen;

Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Universitätsklinikum Frankfurt;

MVZ Hämatologie und Onkologie Northeim;  
Facharztzentrum für Onkologie und Rheumatologie Alsfeld;  
Onkologische Schwerpunktpraxis, Hildesheim;  
III. Medizinische Klinik, Hämatologie und Internistische Onkologie, Universitätsklinikum Mannheim;  
Klinik für Innere Medizin III, Hämatologie und Onkologie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München;  
MVZ Hämatologie und Onkologie, Katholische Hospitalvereinigung Weser-Egge, Höxter  
Medizinische Klinik II, Klinikum Wolfsburg;  
Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie, Universitätsklinikum Leipzig;  
Klinik für Innere Medizin 5, Schwerpunkt Onkologie / Hämatologie, Klinikum Nürnberg;  
Ambulante Onkologie Ostsachsen, Zittau;  
Klinik für Hämatologie und Onkologie, Pius-Hospital Oldenburg;  
Evangelisches Krankenhaus Göttingen-Weende;  
Ambulante Onkologie, MVZ Cloppenburg am St. Josefs-Hospital Cloppenburg;  
Klinik für Hämatologie und Onkologie, Palliativmedizin, Klinikum Bad Hersfeld;  
Klinik für Hämatologie und Stammzelltransplantation, Helios Klinikum Berlin-Buch;  
Medizinische Klinik I, Klinikum Bremen-Mitte;  
Onkologische Schwerpunktpraxis, Göttingen;  
Lungenfachklinik Immenhausen;  
Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Universitätsklinikum Halle;  
Abteilung für Innere Medizin, Eichsfeld Klinikum Heiligenstadt;  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Regensburg.

Die Patienten ohne komplex-aberrante zytogenetische Veränderungen wurden aufgrund besserer Nachverfolgungs- und Charakterisierungsmöglichkeiten zum größten Teil aus der Universitätsmedizin Göttingen akquiriert.

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Patientendaten stammen aus den jeweiligen Patientenakten. Wurde die genetische Analyse nicht im Rahmen der Patientenversorgung durchgeführt, wurde als Material zur Durchführung der Untersuchung Restmaterial genutzt, das von Routineuntersuchungen übriggeblieben war. Die Patienten wurden über die Verwendung ihrer Proben für wissenschaftliche Zwecke aufgeklärt und haben darin schriftlich eingewilligt.

Die Sicherung der Diagnosen MDS, CMML oder sAML aus MDS erfolgte klinisch morphologisch und zytogenetisch. Wichtigstes Einschlusskriterium war neben der Diagnose einer der genannten Erkrankungen das Vorliegen einer Chromosomenbänderungsanalyse (CBA), aus dem ein verwertbarer Karyotyp ausgelesen werden konnte. Zeigten sich drei oder mehr Veränderungen, wurde der Patient in die Gruppe der komplexen Karyotypen eingeteilt. War dies nicht der Fall und es fand sich ein normaler Karyotyp oder einer mit weniger als drei Anomalien, wurde der Patient in die Kontrollgruppe ohne komplexe Aberrationen eingegliedert. Zum Teil wurde zur Kontrolle und Verifizierung des Karyotyps eine *multicolour*-Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung (mFISH) durchgeführt.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Chromosomenbänderungsanalysen

Das wichtigste Einschlusskriterium für die Studie war das Vorhandensein einer vollständigen und verwertbaren Chromosomenbänderungsanalyse (CBA). Durch diese Untersuchung wurde der Karyotyp der Patienten bestimmt und die zytogenetischen Anomalien analysiert. Als Untersuchungsmaterial dienten Knochenmarkskulturen der jeweiligen Patienten, aus denen Metaphase-Chromosomen gewonnen wurde. Diese wurden mittels Giemsa-Färbung gefärbt. Das Vorgehen richtet sich hierbei nach der durch Haase et al. (1995) beschriebenen Methode.

Die Ergebnisse der CBA diente als Grundlage zur Erstellung der Karyotyp-Formel gemäß den 2016 aktualisierten Richtlinien des Internationalen Standing Committee of Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN) (McGowan-Jordan und Schmid 2016). Die Festlegung der Formel erfolgte durch erfahrene Zytogenetiker. Darstellungen von beispielhaft ausgewählten CBA-Untersuchungen finden sich in den Abbildungen 3 und 4.

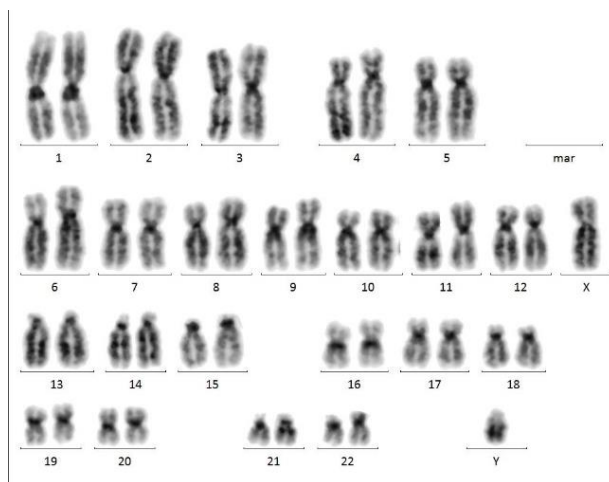
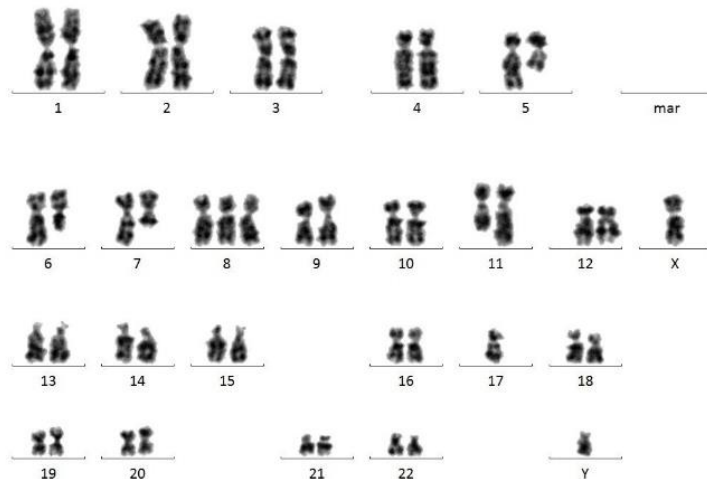


Abbildung 3: Konventionelle Chromosomen-Bänderungsanalyse eines Patienten mit normalem Karyotypen (46, XY)



**Abbildung 4: Konventionelle Chromosomen-Bänderungsanalyse eines Patienten mit komplexem Karyotypen (46,XY,der(5;17)(p10;q10),t(6;11)(q12;q22),del(7)(q21q35),+8)**

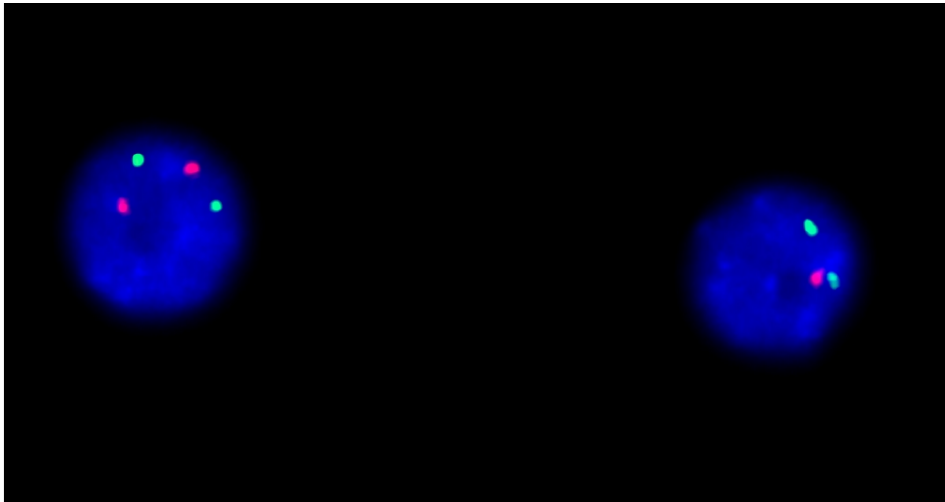
### 2.3.2 Interphase Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) handelt es sich um ein Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins bestimmter Genloci. Dabei werden bestimmte fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden eingesetzt, die an den zu untersuchenden Interphase-Chromosomen komplementär binden. Die Bindung dieser Sonden können mit einem Fluoreszenz-Mikroskop beurteilt werden. Die KM- oder pB-Zellen wurden mit einem Sondenpanel, das speziell für myeloische Neoplasien zusammengestellt wurde, untersucht. Dieses Panel umfasst unter anderem auch Sonden, die den Gen-Locus von *TP53* auf Chromosom 17p13 und den des Gens *EGR1*, welches als Marker für Deletionen von 5q eingesetzt wird, beurteilbar machen. Die FISH-Untersuchung wurde gemäß Braulke et al. (2010; 2013; 2015) durchgeführt. Ein Beispiel für eine Interphase-FISH-Untersuchung ist in Abbildung 5 dargestellt.

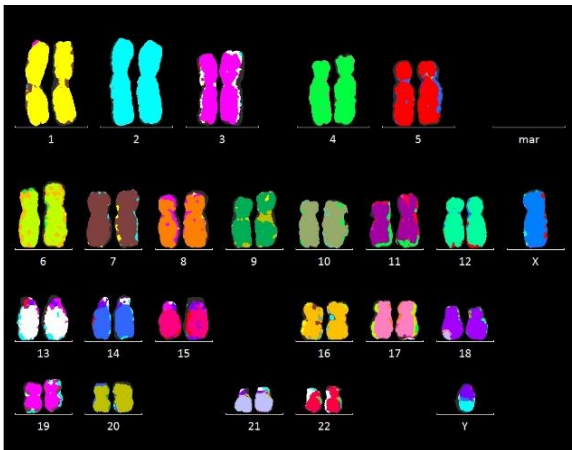
### 2.3.3 Multicolour-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Bei uneindeutigen Ergebnissen oder weitergehender Untersuchung der Zytogenetik des Patienten erfolgte eine Analyse mittels *multicolour*-FISH (mFISH). Dabei erfolgt die Vorgehensweise analog zur konventionellen FISH-Untersuchung, allerdings werden hierbei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden gleichzeitig hybridisiert. Beim 24-Farben-mFISH werden Sonden für jedes der Chromosomen eingesetzt, sodass Chromosomen und einzelne Segmente besser unterschieden und nach ihrem Ursprung beurteilt werden können. Durch die so mögliche Aufschlüsselung des Ursprungs von zum Teil balancierten Translokationen und Fusionen oder Chromosomenfragmenten kann die in der CBA festgestellte Karyotyp-Formel überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden.

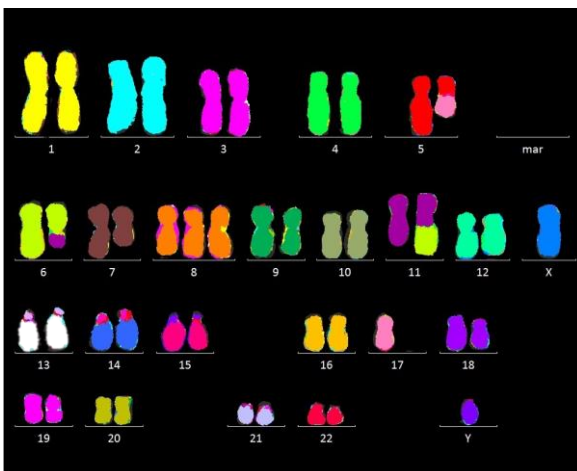
Beispiele für die mFISH-Analysen sind in den Abbildungen 6 und 7 zu sehen.



**Abbildung 5: Interphase FISH mit p53-Sonde** Links im Bild eine normale Zelle, rechts eine mit Verlust von 17p13 (p53-Allelverlust); rot: TP53, grün: NF1, Kontrollsonde



**Abbildung 6: mFISH eines männlichen Patienten mit normalem Karyotypen (46, XY)**



**Abbildung 7: mFISH eines männlichen Patienten mit komplex aberrantem Karyotypen (46,XY,der(5;17)(p10;q10),t(6;11)(q12;q22),del(7)(q21q35),+8)**

### 2.3.4 Mutationsanalysen von *PPM1D* und *TP53*

Zur Analyse der Mutationsstatus der Gene *TP53* und *PPM1D* wurde entweder aus Knochenmark oder aus CD34+-Zellen, die immunomagnetisch aus peripherem Blut isoliert und angereichert wurden, mittels Standardmethoden DNA isoliert (Martin et al. 2018). Verwendet wurden Knochenmarkszellen, fixierte Knochenmarkskulturen (Restmaterial der Zytogenetik), Knochenmarksausstriche (Restmaterial der Morphologie) oder immunomagnetisch angereicherte CD34+-Zellen aus pB. Bei Proben mit geringer DNA-Konzentration wurde eine Amplifikation des gesamten Genoms, eine sogenannte *whole genome amplification* (WGA) durchgeführt. Durch dieses Verfahren wird das genetische Material der Probe unspezifisch und repräsentativ vervielfältigt. Die Durchführung der WGA erfolgte unter Zuhilfenahme des REPLI-g genomic Amplification Kits von QIAGEN. Untersucht wurden die Exons 1 bis 6 des Gens *PPM1D* und die Exons 4 bis 10 des Gens *TP53*. Nach Amplifikation der relevanten Genorte wurde eine DNA-Bibliothek hergestellt. Diese wurde auf einem Hochdurchsatzinstrument der Firma Illumina sequenziert. Anschließend erfolgten eine bioinformatische Datenauswertung und molekularbiologische Bewertung der Varianten.

#### 2.3.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die zu untersuchenden Gene wurden mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Für die Etablierung dieser Methode wurden verschiedene Multiplex-PCR-Ansätze überprüft, um die Gene *PPM1D* und *TP53* in möglichst wenigen Ansätzen gleichzeitig zu amplifizieren. Allgemein wird bei einer PCR eine Probe erst auf über 90°C erhitzt, um die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen zu zerstören. Diese Phase wird Denaturierungsphase genannt. In der anschließenden Phase der Primerhybridisierung (*annealing*) wird die Temperatur auf ca. 55-65°C gesenkt, um den vorher zugefügten spezifischen Primern ein Binden an den DNA-Strang zu ermöglichen. In der darauffolgenden Elongations-Phase wird die DNA ausgehend von den bereits gebundenen Primern durch eine Polymerase amplifiziert. Dabei wird die Temperatur auf das Optimum der Polymerase angepasst, das meistens um ca. 70°C liegt. Diese drei Phasen werden in mehreren Zyklen wiederholt und dadurch die gewünschten DNA-Bereiche vervielfältigt.

Im Folgenden ist die Amplifizierung für *PPM1D* im Detail dargestellt. Für die Multiplex-PCR zur Amplifizierung der Exons 1-6 des Gens *PPM1D* hat sich die Herstellung von zwei Mastermixen als optimal herausgestellt. Der eine Mastermix deckte die Exons 1-3 ab, der andere die Exons 4-6. Die Primer wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt und in zwei Reaktionsgefäße überführt, eines für jeden Mastermix. Die Zusammensetzung des Mastermixes errechnete sich an der Zahl der im jeweiligen Lauf zu amplifizierenden Proben. Im Folgenden wird beispielhaft das Schema für einen Ansatz mit zehn Patientenproben, einer Positiv- und einer Negativkontrolle dargestellt.



Für jeden Lauf werden zwei Reaktionsgefäße für die zwei Mastermixe mit den jeweiligen Primersätzen bereitgestellt. In beide werden je 254 µl Nuklease-freies Wasser, 32 µl PCR-Puffer mit MgCl<sub>2</sub> und 6,4 µl 10 mM Desoxynukleotidtriphosphat(dNTP)-Mix pipettiert. Anschließend wurden 20,5 µl der Primer-Mixe, die sowohl die forward- als auch die *reverse*-Primer enthielten, zugefügt. In einen der Ansätze wurde der Primer-Mix mit den Primern für die Exons 1-3, in den anderen der Mix mit den Primern für die Exons 4-6 gegeben. In einem letzten Schritt wurden noch 1,6 µl hitzesensitive Taq DNA Polymerase hinzugefügt. Die fertigen Mastermixe wurden nach kurzem Vortexen in eine 96-Well-PCR-Platte überführt, je 26 µl pro Well. Für die Amplifizierung von *TP53* wurde analog vorgegangen, lediglich die Primer wurden angepasst.

Zur Amplifizierung der Gen-Sequenzen wurden pro Patient zweimal 50 ng DNA benötigt. Wenn möglich wurden die Proben auf eine Konzentration von 50 ng/µl eingestellt, wobei sich die Berechnung nach der Formel  $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$  richtete. In dieser Gleichung stellt  $c_1$  die Ausgangskonzentration und  $V_1$  das Ausgangsvolumen dar. Für  $c_2$  wurde die gewünschte Konzentration von 50 ng/µl eingesetzt, sodass das noch hinzuzufügende Volumen  $V_2$  berechnet werden konnte. Betrug die DNA-Konzentration weniger als 50 ng/µl, wurde entweder mehr Volumen der Probe eingesetzt oder eine WGA durchgeführt. Die je 50 ng DNA pro Patient und Mastermix wurde anschließend in die bereits vorbereiteten Wells pipettiert. Es wurde genau dokumentiert, welche Probe sich in welchem Well befand. Als Positivkontrolle wurde eine auf 50 ng/µl eingestellte Referenz-Probe eingesetzt, in die Negativkontrolle wurde keine DNA pipettiert. Anschließend wurde die PCR-Platte mit einer Spezialfolie sorgfältig abgeklebt. Nach einer kurzen Zentrifugation, um etwaige Luftblasen vom Boden der Wells zu lösen, wurde die Platte in den Thermocycler gestellt und das Programm gestartet. Der Ablauf des verwendeten Programms ist Tabelle 9 zu entnehmen. Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurde im Anschluss eine Elektrophorese durchgeführt.

**Tabelle 9: Ablauf des Taq-HotStar-PCR-Programms des Thermocyclers**

	Temperatur	Inkubationszeit	Zyklen
Vorlauf	96 °C	5 Minuten	
Denaturierung	96 °C	30 Sekunden	35-malige Wiederholung der Schritte 2-4
<i>Annealing</i>	58 °C	30 Sekunden	
Elongation	72 °C	60 Sekunden	
Nachlauf	72 °C	10 Minuten	
Kühlung	4 °C	unbegrenzt	

#### 2.3.4.2 Überprüfung der PCR-Produkte

Zur Qualitätssicherung erfolgte die Überprüfung der PCR-Produkte durch den Fragment Analyser der Firma Advanced Analytical. Dazu wurde das DNF-910 dsDNA Reagenz-Kit genutzt, das auf DNA-Fragmente zwischen 35 und 1500 Basenpaare ausgelegt ist. Je 2 µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 22 µl Dilution Buffer 1X TE vermischt und in eine 96-Well-Platte überführt. Auf diese Platte wurde auch 20 µl eines Basenpaar-Maßstabes, eines sogenannten Ladder, aufgetragen, anhand dessen man nach abgeschlossener Analyse die Größe der DNA-Fragmente ablesen konnte. Anschließend wurde die Platte in das Gerät gestellt, welches vollautomatisiert eine Gelelektrophorese durchführte. Dazu werden die Proben auf ein Gel aufgetragen, an welches elektrische Spannung angelegt wird. Durch diese Spannung wandern die negativ-geladenen DNA-Fragmente in Richtung des Pluspols durch das Gel und bleiben je nach Größe in diesem an verschiedenen Stellen hängen. Durch den zugefügten Fluoreszenz-Farbstoff können diese DNA-Fragmente im Gel detektiert und beurteilt werden. Zur Überprüfung der PCR-Produkte aus der Amplifizierung von *PPM1D* wurden die zwei Ansätze pro Patient einzeln überprüft. Ein beispielhaftes Ergebnis der Fragment-Analysen ist in den Abbildungen 8 und 9 zu sehen.

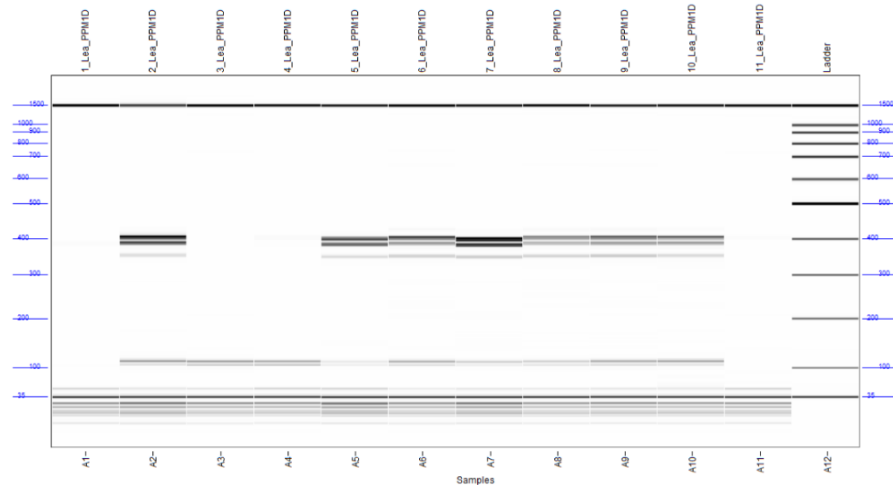


Abbildung 8: Gelelektrophorese durch den Fragment Analyzer der amplifizierten Exons 1-3 des Gens *PPM1D* Am rechten Rand ist der Maßstab in bp (Ladder) zu sehen

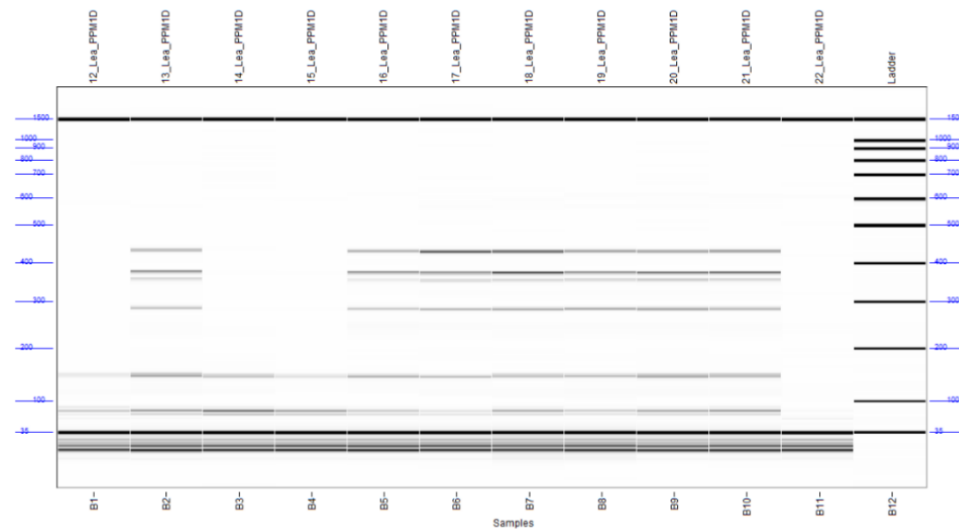


Abbildung 9: Gelelektrophorese durch den Fragment Analyzer der amplifizierten Exons 4-6 des Gens *PPM1D* Am rechten Rand ist der Maßstab in bp (Ladder) zu sehen

#### 2.3.4.3 Next generation sequencing

Nach erfolgreicher Amplifizierung und Überprüfung der PCR-Produkte durch die Fragmentsanalyse wurde eine DNA-Library wie von Martin et al beschrieben hergestellt (Martin et al. 2018). Die Probenvorbereitung erfolgte bei allen bis Juni 2019 analysierten Proben mithilfe des Nextera XT DNA Sample Preparation Kit der Firma Illumina. Bei später analysierte Proben erfolgte die Herstellung der Library mittels Custom Panel von QIAGEN. Dazu wurden die Proben mit dem QIAseq Targeted DNA Custom Panel der Firma vorbereitet.

Für die an die Library-Herstellung anschließende Sequenzierung wurde die Technik des *next generation sequencing* (NGS) durch den MiniSeq der Firma Illumina genutzt. Beim NGS handelt es sich um eine Methode zur Gensequenzierung mit einem sehr hohen Durchsatzpotential. Das System von Illumina funktioniert dabei nach dem Prinzip *sequencing by synthesis*. Dafür werden zuerst die Proben mit einem speziellen Index-Marker markiert. Durch diesen Index-Marker ist es möglich, die Sequenzierung wieder einem bestimmten Patienten zuzuordnen. Dies ist notwendig, weil beim NGS viele Proben gleichzeitig in einem Ansatz sequenziert werden können. Den markierten Proben werden bestimmte Adapter angehängt, die komplementär an vorangebrachte Oligonukleotide auf den sogenannten Flowcells binden, auf denen die Analyse stattfindet. Nachdem die Proben auf diese Weise vorbereitet wurden, werden sie auf die Flowcells gegeben, auf denen etliche der bereits erwähnten Oligonukleotide verankert sind. Von diesen gibt es zwei Varianten, eine für den *forward*-Strang der DNA und eine für den *reverse*-Strang. Die zugefügten DNA-Einzelstränge binden durch die anhängten Adapter komplementär an die Oligonukleotide auf der Flowcell. Durch eine Polymerase wird der Strang komplementär an dem gebundenen Einzelstrang synthetisiert, sodass der komplementäre Einzelstrang fixiert vorliegt. Der Originalstrang wird von dem neu synthetisierten Strang durch Denaturierung abgelöst und ausgewaschen. Der neue Einzelstrang faltet sich daraufhin um und bindet an die jeweils andere Variante der Oligonukleotide auf der Flowcell, dessen komplementäres Gegenstück mit synthetisiert wurde, sodass der Strang binden kann. Eine Polymerase synthetisiert daraufhin einen neuen komplementären Strang. Nach Lösen der Wasserstoffbrückenbindung zwischen diesen zwei Strängen liegen zwei Arten von Einzelsträngen der ursprünglichen DNA vor, ein *forward*- und ein *reverse*-Strang, die fest am Boden der Flowcell verankert sind. Durch Wiederholung dieses Vorgangs wird eine große Zahl an Kopien eines DNA-Fragments am Boden der Flowcell erstellt. Diese Ansammlung von Kopien einer Probe nennt man Cluster. Dieser Prozess läuft parallel und wiederholt etliche Male für verschiedene DNA-Proben ab, sodass am Ende dieses Schritts viele verschiedene Sequenzen in mehrfacher Ausführung und in beiden Leserichtungen an die Oligonukleotide als Cluster auf der Flowcell gebunden sind (Illumina 2020).

In einem nächsten Schritt werden die *reverse*-Stränge abgelöst und ausgewaschen. Das 3'-Ende der *forward*-Stränge wird blockiert, um ungewolltes Binden von Primern zu verhindern. Dann werden die Startprimer hinzugegeben, die komplementär an das 5'-Ende eines Stranges binden. Ausgehend von diesem Primer startet der erste Sequenzierungsdurchlauf. Dazu werden freie Nukleotide zugefügt, die fluoreszenz-markiert sind, jede Base mit einer bestimmten Farbe. Diese Nukleotide binden eine nach der anderen an den zu sequenzierenden Strang und synthetisieren so das komplementäre Gegenstück. Jedes Mal, wenn ein passendes Nukleotid bindet, wird ein basenspezifisches Fluoreszenzsignal freigesetzt, das aufgezeichnet wird. Die Reihenfolge dieser Signale kann dann in die Sequenz des DNA-Fragments umgerechnet werden. Die Sequenzierung anhand von Fluoreszenzsignalen, die bei der Synthese eines komplementären Strangs freigesetzt werden,

nennt sich *sequencing by synthesis*. Der Sequenzierungsprozess läuft bei allen Clustern einer Flowcell gleichzeitig ab. Nach diesem ersten Durchlauf wird das neu-synthetisierte DNA-Fragment abgelöst und ausgewaschen. Danach wird ein bestimmter Index-Primer eingesetzt, der eine Zuordnung der zuvor erfolgten Sequenzierung zu einer bestimmten Patienten-Probe ermöglicht. Anschließend wird das 3'-Ende entblockt und der Strang wieder an ein freies Adaptermolekül an der Oberfläche der Flowcell gebunden, gefolgt von der Synthese des Gegenstrangs durch eine Polymerase. Die zwei Stränge werden wieder durch Denaturierung voneinander gelöst und diesmal der *forward*-Strang abgelöst und ausgewaschen. Das 3'-Ende des übrig gebliebenen *reverse*-Strangs wird wiederum geblockt und der Prozess des *sequencing by synthesis* nun an diesem Strang durchgeführt: Ein Primer bindet an die Startsequenz, fluoreszenz-markierte Nukleotide binden sequenz-spezifisch und die dabei freigesetzten Signale werden registriert und in die Sequenz des Stranges umgesetzt. Diese Sequenzierungsphase wird in mehreren Durchläufen, sogenannten Reads, wiederholt, sodass alle gebundenen Proben-Fragmente mehrere Male und in beide Leserichtungen analysiert werden (Illumina 2020). Die Zahl der Analysen eines Genabschnittes und somit die Abdeckung dieses Bereichs wird als Coverage bezeichnet. So generierte Daten werden durch ein lokales und hauseigenes Pipeline-System in Darstellung gebracht und können so beurteilt werden.

Die Vorbereitung der Proben und die Initiierung der Sequenzierung durch das MiniSeq-System der Firma Illumina wurde gemäß der Verfahrensanweisungen der jeweiligen Hersteller durch erfahrene Mitarbeiter des INDIGHO-Labors der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

Bei der Etablierung der Multiplex-PCR zur Herstellung der verschiedenen Exons von *PPM1D* wurde die mittels Nextera hergestellte Library sequenziert und die Coverage der Zielregion überprüft. Diese lag zwischen 300 und 1500 Reads.

Die Analyse von *TP53* ist fester Bestandteil der Routine-Diagnostik im INDIGHO-Labor der Universitätsmedizin Göttingen. Die meisten der untersuchten Patienten durchliefen bereits vor Aufnahme in die Studie eine routinemäßig durchgeführte Sequenzierung verschiedener Gene, die als sogenanntes myeloisches Panel zusammengefasst sind. Die untersuchten Gene zum Zeitpunkt Februar 2020 sind Tabelle 10 zu entnehmen. *PPM1D* wurde dem Panel im Juli 2019 hinzugefügt.

**Tabelle 10: Myeloisches Panel des INDIGHO-Labors der Universitätsmedizin Göttingen Stand Februar 2020**

Nummer	Gen	Exons
1	<i>ABL1</i>	3-6
2	<i>ASXL1</i>	13
3	<i>BCOR</i>	2-15

<b>Nummer</b>	<b>Gen</b>	<b>Exons</b>
4	<i>BCORL1</i>	1-12
5	<i>BRAF</i>	15
6	<i>CALR</i>	9
7	<i>CBL</i>	8-9
8	<i>CDKN2A</i>	1-3
9	<i>CEBPA</i>	1
10	<i>CSF3R</i>	14-17
11	<i>CUX1</i>	1-24
12	<i>DNMT3A</i>	1-19
13	<i>EPOR</i>	8
14	<i>ETNK1</i>	3
15	<i>ETV6</i>	1-8
16	<i>EZH2</i>	2-20
17	<i>FLT3</i>	14, 15, 20
18	<i>GATA1</i>	2
19	<i>GATA2</i>	2-6
20	<i>GNAS</i>	8-9
21	<i>HRAS</i>	2-3
22	<i>IDH1</i>	4-6
23	<i>IDH2</i>	4-6
24	<i>IKZF1</i>	1-7
25	<i>JAK2</i>	12, 14
26	<i>JAK3</i>	13
27	<i>KIT</i>	2-18
28	<i>KMTA2</i>	5-8
29	<i>KRAS</i>	2-3
30	<i>MPL</i>	10
31	<i>MYD88</i>	3-5
32	<i>NOTCH1</i>	34
33	<i>NPM1</i>	11

Nummer	Gen	Exons
34	<i>NRAS</i>	2-3
35	<i>PDGFR4</i>	12, 14, 18
36	<i>PHF6</i>	1-10
37	<i>PPM1D</i>	1-6
38	<i>PTPN11</i>	3, 13
39	<i>RAD21</i>	1-14
40	<i>RUNX1</i>	1-9
41	<i>SETBP1</i>	4
42	<i>SF3B1</i>	13-16
43	<i>SRFS2</i>	1
44	<i>STAG2</i>	1-33
45	<i>TET2</i>	3-11
46	<i>TP53</i>	2-11
47	<i>U2AF1</i>	7, 9
48	<i>WT1</i>	9
49	<i>ZRSR2</i>	1-11

Die Beurteilung der Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit den Bioinformatikern und Molekularbiologen des Labors. Die Auswertung erfolgte mittels der von Martin et al. (2018) beschriebenen *in-house*-Pipeline.

## 2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der generierten Daten erfolgte mithilfe des *open source* Statistikprogramms „R Studio“ (RStudio Inc., Boston, MA, USA) und Microsoft Excel (Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA). Als Programmiersprache wurde „R“ verwendet (R Core Team 2018). Zur Berechnung und Erstellung der Graphen wurden über „R“ die Erweiterungspakete „Survival“ (Therneau and Grambsch 2001; Therneau 2020), „Survminer“ (Kassambara 2019, 2020), „ggplot2“ (Wickham 2016) und „ggpubr“ (Kassambara 2020) genutzt.

Die Signifikanz-Überprüfung der Patientencharakteristika wurde mit verschiedenen Tests durchgeführt. Für kategoriale Faktoren wie das Geschlecht wurde der Exakte Fisher-Test verwendet, bei metrischen Parametern wurde ein Wilcoxon-Paarvergleichstest angewandt.

Beim Vergleich mehrerer Gruppen gegeneinander fand ein Kruskal-Wallis-Test Verwendung. Vor Anwendung der jeweiligen Tests wurde ein Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung durchgeführt. Da diese bei den getesteten Faktoren nicht vorlag, wurden Tests für nicht-parametrische Vergleiche angewandt. Eine Korrektur der p-Werte für mehrfache Vergleiche wurde nicht durchgeführt.

Das mediane Überleben der Patienten wurde bei Patienten mit komplexem Karyotyp vom Zeitpunkt der Erstdiagnose der cA, bei Patienten ohne cA vom Zeitpunkt der Erkrankungs-Erstdiagnose bis zum Todesdatum berechnet, unabhängig von der Todesursache. Patienten, die zum Zeitpunkt der Auswertung und des letzten Kontakts noch am Leben waren, wurden zensuriert. Im Falle einer erfolgten allogenen Stammzelltransplantation wurde ebenfalls eine Zensur vorgenommen, bei Rezidiv und zweiter Transplantation wurde das Datum der ersten Transplantation als Zensurdatum verwendet.

Zur graphischen Darstellung des medianen OS wurden nach den Methoden von Kaplan und Meier Überlebenskurven erstellt. Einzelne Gruppen wurden mithilfe eines Log-Rank-Tests verglichen.

Um den Einfluss einzelner Faktoren auf das Überleben und ihre Rolle als unabhängiger Risikofaktor zu überprüfen, wurde eine Cox-Regressionsanalyse angewandt. In zwei Schritten wurden erst Einzelparameter auf Signifikanz getestet, bevor diese einer univariaten Analyse zugeführt wurden. Eine Korrektur der p-Werte auf mehrmaliges Testen wurde nicht durchgeführt. Anhand der aus den Analysen resultierenden Hazard Ratios (HR) und ihren Konfidenzintervalle (KI) konnte der Einfluss der einzelnen Parameter auf das mediane OS abgeschätzt werden, was als Hinweis dient, um diese Faktoren als unabhängige Risikofaktoren bewerten zu können. Genauere Ausführungen dazu sind in der Diskussion (Kapitel 4.1) nachzulesen.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientencharakteristika

Insgesamt wurden 155 Patienten identifiziert und charakterisiert, davon 115/155 mit komplexen zytogenetischen Aberrationen und 40/155 ohne solche. Bei sieben dieser Patienten lagen keine Informationen über das Überleben und den letzten Kontakt vor, weshalb 148 Patienten in die Überlebensanalysen eingeschlossen wurden.

Die Altersspanne in der Gruppe der Patienten mit komplexen Anomalien (cA) lag bei 29 bis 90 Jahren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der Erkrankung mit komplexem Karyotypen, das mediane Alter lag hier bei 72 Jahren. 69 Patienten waren männlich (60%) und 46 Patienten weiblich (40%). Bei 73/115 Patienten wurde ein MDS diagnostiziert (63,5%). Die Aufschlüsselung der Subtypen gemäß der WHO-Klassifikation findet sich in Tabelle 11. Die Diagnose CMML erhielten 3/115 Patienten (2,61%), die der sAML aus MDS 39/115 Patienten (33,91%). Gemäß IPSS-R wurden 87/115 Patienten in die höchste Risikogruppe „sehr hohes Risiko“ eingeteilt (75,65%), 7/115 in die Gruppe „hohes Risiko“ (6,09%) und 4/115 erhielten die Einteilung „intermediäres Risiko“ (3,48%). Eine Therapie mit demethylierenden Substanzen wie Azacytidin erhielten 39/115 Patienten (33,91%). 23/115 (20%) Patienten wurden im Verlauf ihrer Erkrankung dem Prozedere einer allogenen Stammzelltransplantation zugeführt. Die mediane Anzahl der Aberrationen in dieser Gruppe lag bei acht zytogenetischen Veränderungen mit einer Spannweite von drei bis 50 Anomalien. Das mediane OS lag bei 162 Tagen bzw. 5,4 Monaten (Range: 0–1463 Tage). Die zusammengefassten Charakteristika dieser Patientengruppe finden sich in Tabelle 11.

**Tabelle 11: Patientencharakteristika der Gruppe mit cA**

Alter bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps (Jahre), Median [Range]	72 [29-90]
Geschlecht	
männlich	69/115 (60%)
weiblich	46/115 (40%)
Subtyp, klassifiziert nach WHO 2016	
MDS-SLD	1/115 (0,87%)
MDS-MLD	9/115 (7,83%)
MDS-RS-SLD	0/115 (0%)
MDS-RS-MLD	0/115 (0%)
MDS-EB1	11/115 (9,57%)
MDS-EB2	23/115 (20%)

MDS mit 5q-	2/115 (1,73%)
MDS-U	1/115 (0,87%)
CMML	3/115 (2,61%)
sAML aus MDS	39/115 (33,91%)
NA	26/115 (22,61%)
Hämoglobin-Wert	Median: 9g/dl [Range: 4,2-14,9]
< 8 g/dl	33/115 (28,7%)
8-10 g/dl	51/115 (44,35%)
> 10 g/dl	30/115 (26,09%)
NA	1/115 (0,87%)
Thrombozyten	Median: 56,5/nl [Range: 5-418]
≤ 50/nl	51/115 (44,35%)
50-100/nl	35/115 (30,43%)
≥ 100/nl	26/115 (22,61%)
NA	3/115 (2,61%)
ANC	Median: 0,954/nl [Range: 0,009-12,7]
< 0,8/nl	21/115 (18,26%)
0,8-1,7	19/115 (16,52%)
≥ 1,8/nl	17/115 (14,78%)
NA	58/115 (50,43%)
Blasten im Knochenmark	Median: 15% [Range 0-83]
≤ 2%	6/115 (5,22%)
2-5%	8/115 (6,96%)
5-9%	13/115 (11,3%)
10-19%	27/115 (23,48%)
≥ 20%	25/115 (21,74%)
NA	36/115 (31,3%)
IPSS-R Risikogruppe	
sehr geringeres Risiko	0/115 (0%)
geringes Risiko	0/115 (0%)
intermediäres Risiko	4/115 (3,48%)

hohes Risiko	7/115 (6,09%)
sehr hohes Risiko	87/115 (75,65%)
NA	17/115 (14,78%)
Therapie mit demethylierenden Substanzen	
Ja	39/115 (33,91%)
Nein	60/115 (52,17%)
NA	16/115 (13,91%)
Zahl der zytogenetischen Anomalien, Median [Range]	8 [3-50]
Medianes OS in Tagen (in Monaten)	162 Tage (5,4 Monate)

In der Kontrollgruppe ohne cA erstreckte sich die Altersspanne von 40 bis 84 Jahren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, das mediane Alter waren 68 Jahre. In dieser Gruppe waren 29/40 Patienten männlich (72,5%) und 11/40 weiblich (27,5%). 34/40 Patienten erhielten die Diagnose MDS (85%), die Aufschlüsselung in die WHO-Subtypen ist Tabelle 12 zu entnehmen. Die Diagnose einer sAML aus MDS erhielten 4/40 Patienten (10%), bei einem Patienten (1/40, 2,5%) wurde eine CMML diagnostiziert. Zum Zeitpunkt der Auswertung wurde bei einem Patienten von einer *clinical cytopenia of unknown significance* (CCUS, (Hartmann and Metzler 2019)), also einer klonalen Zytopenie ohne manifeste hämatologische Systemerkrankung ausgegangen (1/40, 2,5%). 6/40 Patienten wurden der IPSS-R-Risikogruppe „hohes Risiko“ zugeteilt (15%), 5/40 der Gruppe „hohes Risiko“ (12,5%) und 21/40 den niedrigeren Risikogruppen, die in Tabelle 12 genauer aufgeschlüsselt sind. 7/40 wurden mit demethylierenden Substanzen behandelt. 6 der 40 Patienten wurden allogenen stammzelltransplantiert. Das mediane OS in der Gruppe der Patienten ohne komplexen Karyotyp lag bei 404 Tagen bzw. 13,5 Monaten (Range: 0 – 2333 Tage). Eine genaue Charakterisierung der Kontrollgruppe ist in Tabelle 12 zu sehen.

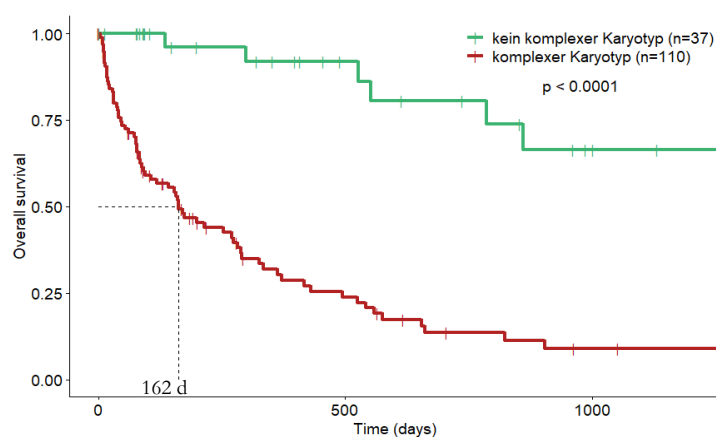
**Tabelle 12: Patientencharakteristika der Gruppe ohne cA**

Alter bei Erstdiagnose (Jahre), Median [Range]	68 [40-84]
Geschlecht	
männlich	29/40 (72,5%)
weiblich	11/40 (27,5%)
Subtyp, klassifiziert nach WHO 2016	
MDS-SLD	2/40 (5%)
MDS-MLD	13/40 (32,5%)
MDS-RS-SLD	1/40 (2,5%)

MDS-RS-MLD	1/40 (2,5%)
MDS-EB1	2/40 (5%)
MDS-EB2	6/40 (15%)
MDS mit 5q-	1/40 (2,5%)
MDS-U	2/40 (5%)
CMML	1/40 (2,5%)
sAML aus MDS	4/40 (10%)
CCUS	1(40 (2,5%)
NA	6/40 (15%)
Hämoglobin-Wert	Median: 8,8 g/dl [Range: 5,1-13,1]
< 8 g/dl	11/40 (27,5%)
8-10 g/dl	11/40 (27,5%)
> 10 g/dl	16/40 (40%)
NA	2/40 (5%)
Thrombozyten	Median: 78/nl [Range: 14-509]
≤ 50/nl	13/40 (32,5%)
50-100/nl	10/40 (25%)
≥ 100/nl	14/40 (35%)
NA	3/40 (7,5%)
ANC	Median: 1,84 [Range: 0,07-13,17]
< 0,8/nl	3/40 (7,5%)
0,8-1,7/nl	14/40 (35%)
≥ 1,8/nl	18/40 (45%)
NA	5/40 (12,5%)
Blasten im Knochenmark	Median: 3% [Range 0-80]
≤ 2%	11/40 (27,5%)
2-5%	11/40 (27,5%)
5-9%	4/40 (10%)
10-19%	6/40 (15%)
≥ 20%	3/40 (7,5%)
NA	5/40 (12,5%)

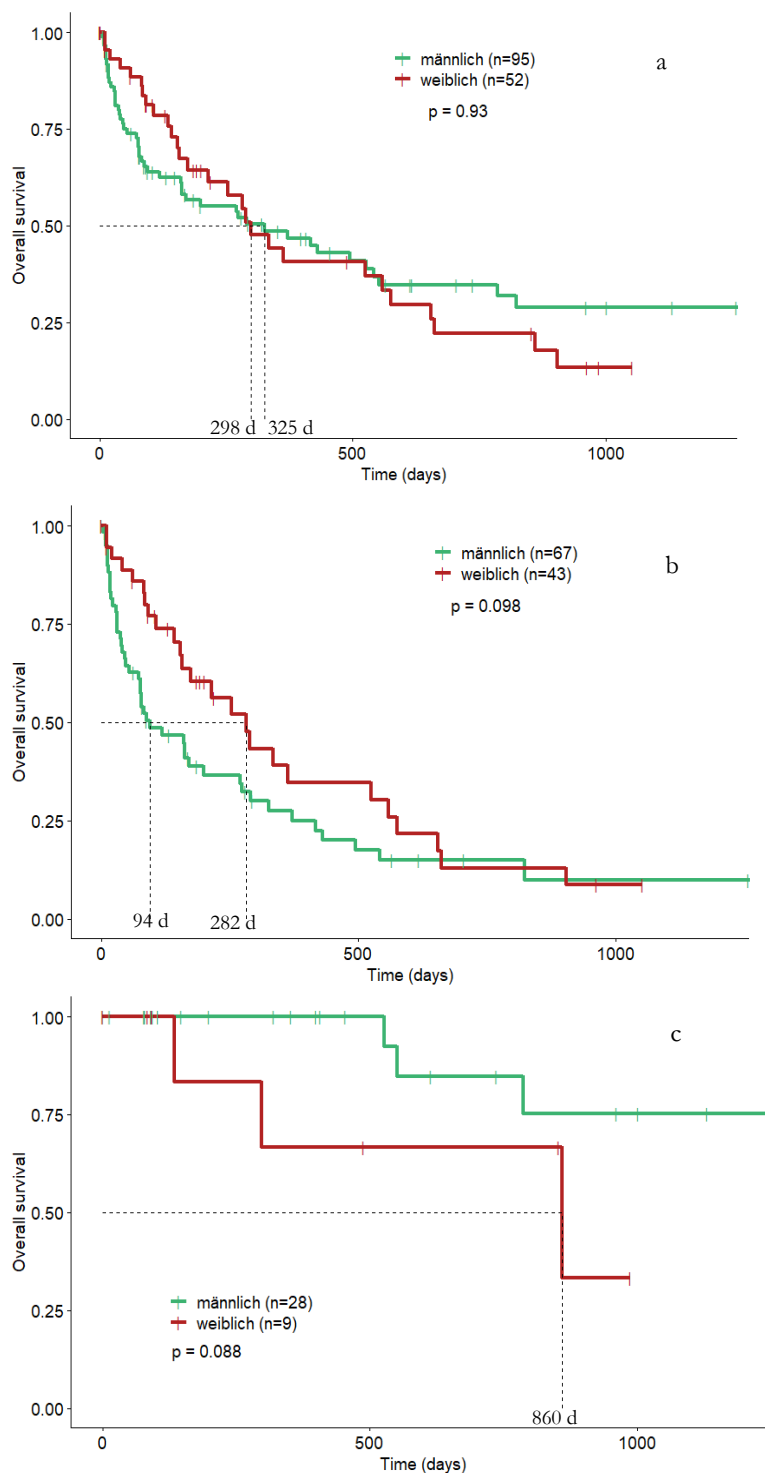
IPSS-R Risikogruppe	
sehr geringeres Risiko	6/40 (15%)
geringes Risiko	9/40 (22,5%)
intermediäres Risiko	6/40 (15%)
hohes Risiko	5/40 (12,5%)
sehr hohes Risiko	6/40 (15%)
NA	8/40 (20%)
Therapie mit demethylierenden Substanzen	
Ja	7/40 (17,5%)
Nein	4/40 (10%)
NA	29/40 (72,5%)
Zahl der zytogenetischen Anomalien, Median [Range]	0 [0-2]
Medianes OS in Tagen (Monate)	404 Tage (13,5 Monate)

Das unterschiedliche mediane OS ist in Abbildung 10 dargestellt. Nach Zensur der Stammzelltransplantationen und des letzten Kontakts bei noch nicht verstorbenen Patienten beträgt das mediane OS für komplex-aberrante Patienten 162 Tage (5,4 Monate), für Patienten ohne cA wurde das mediane OS nicht erreicht.



**Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve für das mediane OS der Patienten mit und ohne komplex-aberranten Karyotyp**

### 3.1.1 Geschlecht



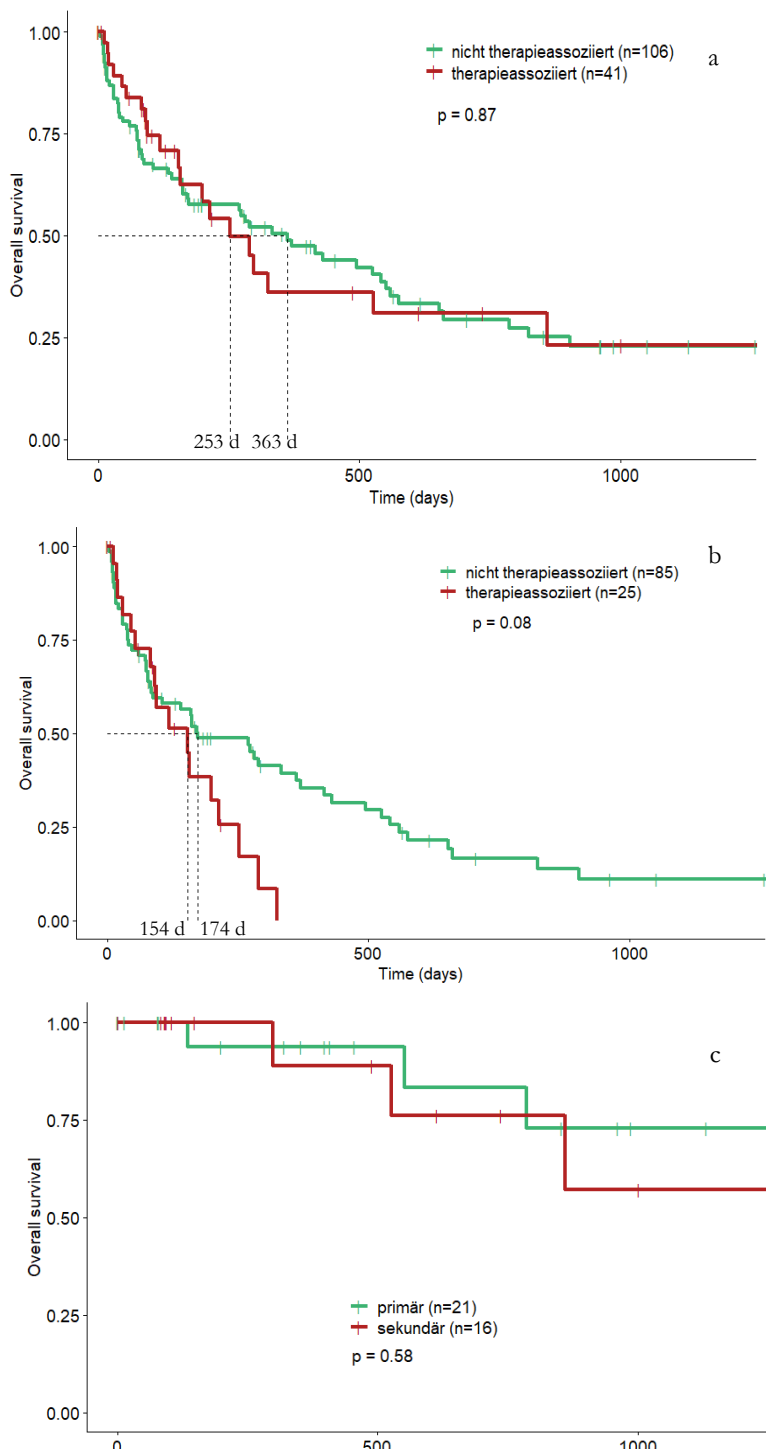
**Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurven nach Geschlecht**

a: Gesamtkohorte, b: Patienten mit cA, c: Patienten ohne cA

umgekehrter Trend – das mediane OS der Männer wurde hier nicht erreicht, während das der Frauen bei 860 Tagen lag (p-Wert 0,088), allerdings ist dieses Ergebnis aufgrund der geringen Gruppengröße wenig aussagekräftig. Die Ergebnisse der Überlebensanalyse der unterschiedlichen Kohorten sind in Abbildung 11 dargestellt.

Bei der Analyse des medianen Überlebens der unterschiedlichen Gruppen wurde auch eine Unterscheidung nach Geschlecht vorgenommen. Dabei konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden: In der Gesamtkohorte lag das mediane OS für Männer bei 325 Tagen, das für Frauen bei 298 Tagen (p-Wert 0,93). Bei der Auftrennung in die komplexe bzw. nicht-komplexe Kohorte zeigte sich ein ähnliches Bild. Bei den Patienten mit cA zeigte sich zwar mit einem medianen OS der Männer von 94 Tagen im Gegensatz zu 282 Tagen bei den Frauen ein deutlicherer Unterschied, jedoch blieb dieser oberhalb des Signifikanzniveaus (p-Wert 0,098). In der Gruppe der nicht-komplexen Patienten zeigte sich ein

### 3.1.2 Therapieassoziierte Erkrankungsformen



**Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Therapieassoziation** a: Gesamtkohorte, b: Patienten mit cA, c: Patienten ohne cA

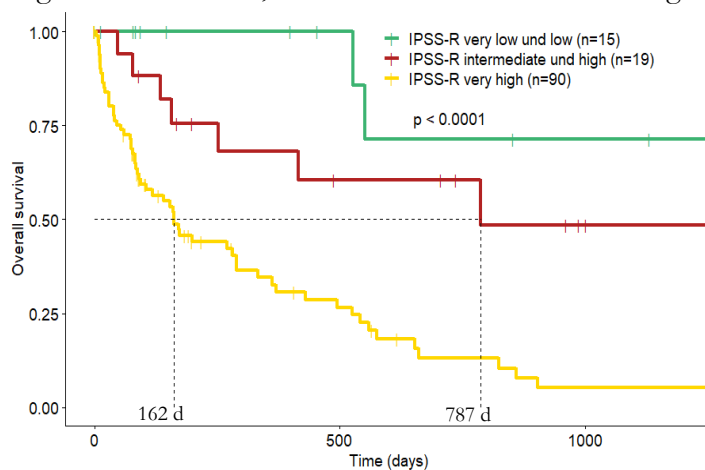
beobachten. Das mediane OS bei den primären Erkrankungen lag in dieser Subgruppe bei 174 Tagen, das der therapieassoziierten bei 154 Tagen (p-Wert 0,08), jedoch zeigt sich ein abweichender Kurven-Verlauf (Abb. 12b). In der Kohorte der Patienten ohne komplexe zytogenetische Anomalien zeige sich kein Unterschied, ein medianes OS wurde nicht erreicht. Die Überlebenskurven aller drei Kohorten sind in Abbildung 12 zu sehen.

Bei therapieassoziierten Formen der Erkrankungen handelt es sich um die Fälle, bei der die Störung der Hämatopoese auf eine in der Vergangenheit erfolgte Therapie zurückzuführen ist. Meistens handelt es sich dabei um zurückliegende Systemtherapien wie Chemo- und/oder Strahlentherapien oder Immunsuppression (Strom et al. 2005).

In der Gesamtkohorte (Abb. 12a) konnte kein Unterschied im medianen OS zwischen therapieassoziierten und primären Erkrankungen festgestellt werden: bei den primären Formen lag das mediane OS bei 363 Tagen, bei den therapieassoziierten bei 253 Tagen (p-Wert 0,87). In der Subgruppe der Patienten mit komplexem Karyotypen konnte auch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, dennoch ließ sich hier ein Trend für ein schlechteres Überleben bei Therapieassoziation

### 3.1.3 Einteilung nach IPSS-R

Die revidierte Form des International Prognostic Scoring System (IPSS-R) wurde 2012 von Greenberg et al. (2012) publiziert. Damit löste dieses Scoring-System seinen Vorgänger, den IPSS, ab. Der IPSS-R soll zur Abschätzung der Prognose eines Patienten dienen und wird einmalig bei Erstdiagnose angewandt. Faktoren, die in die Berechnung mit einbezogen werden, sind die Zytogenetik, Knochenmarks-Blasten, der Hb-Wert, Thrombozyten- und Neutrophilen-Zahl (siehe Einleitung, Kapitel 1.1.3, Tabellen 2-4). Eine Überlebensanalyse nach IPSS-R-Stadien wurde an der Gesamtkohorte durchgeführt, da die Patienten mit komplexen Karyotypen aufgrund der Wichtigkeit der Zytogenetik nahezu vollständig in die Kategorie „*very high risk*“ eingestuft wurden. Außerdem wurden wegen geringer Fallzahlen die Kategorien „*very low risk*“ und „*low risk*“ sowie „*intermediate*“ und „*high*“ zusammengefasst. Die daraus resultierenden drei Gruppen wurden auf ihr medianes Überleben untersucht und verglichen. Patienten, die nach IPSS-R in die Risikogruppen „*very low*“ oder „*low*“ fielen,

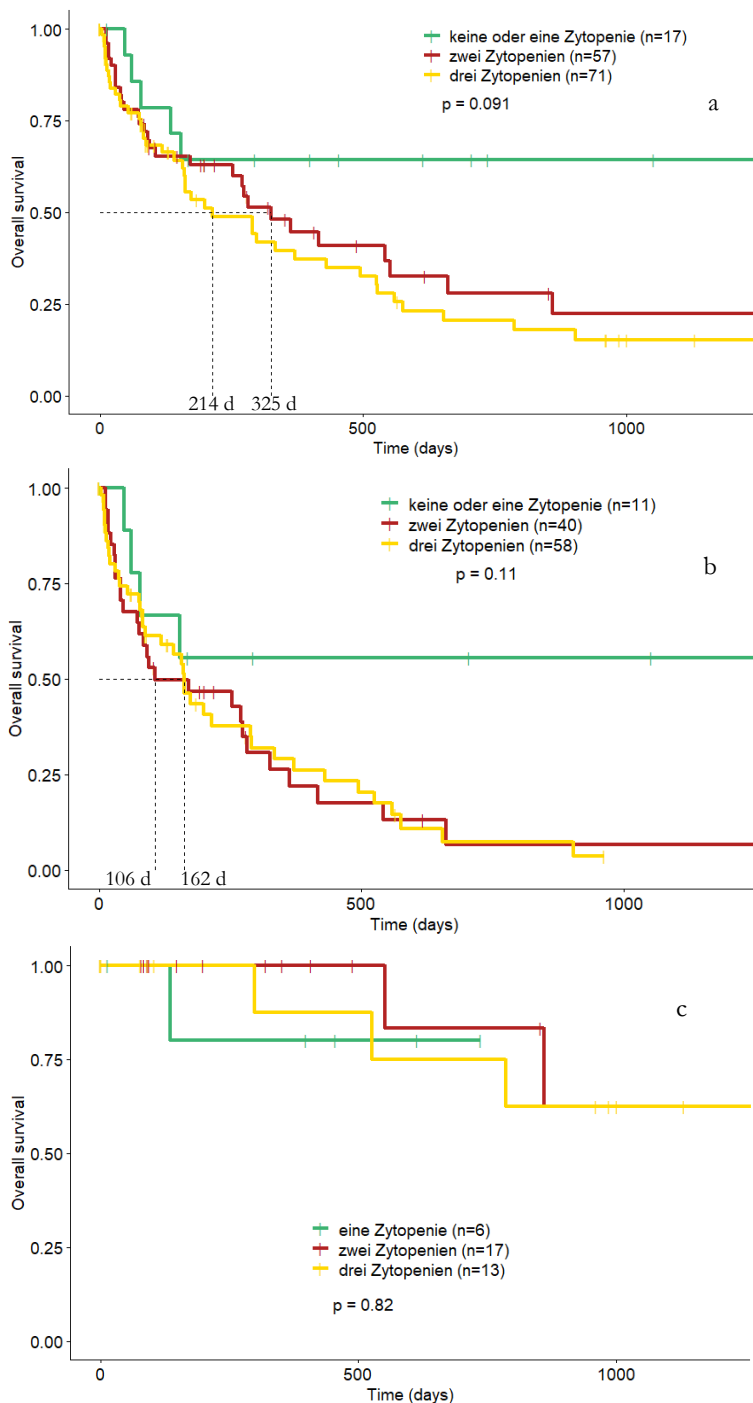


**Abbildung 13: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Gesamtkohorte nach Einteilung in IPSS-R-Risikogruppen** Die Gruppen „*very low risk*“ und „*low risk*“ sowie „*intermediate*“ und „*high*“ wurden hier zusammengefasst

erreichten in unserer Analyse das mediane OS nicht. Die Patienten, die den Gruppen „*intermediate*“ oder „*high*“ zugeordnet wurden, erreichten ein medianes OS bei 787 Tagen. Die meisten Patienten in dieser Analyse erreichten die Risikostufe „*very high*“ und wiesen ein medianes OS von nur 162 Tagen auf ( $p$ -Wert  $< 0,0001$ ). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.



### 3.1.4 Periphere Zytopenien



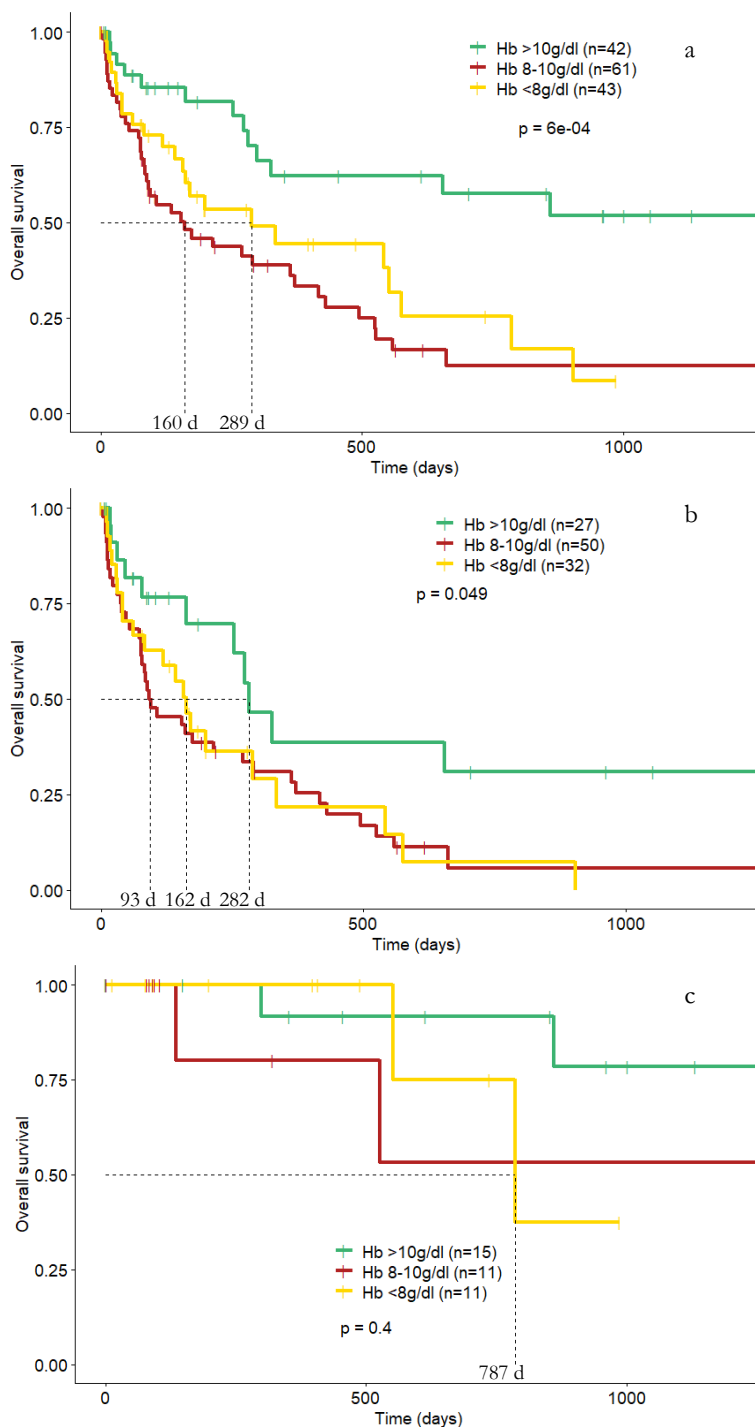
**Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Zytopenien**

a: Gesamtkohorte, b: Patienten mit cA, c: Patienten ohne cA

keiner Zytopenie erreichten kein medianes OS, solche mit zwei Zytopenien zeigten ein medianes OS von 325 Tagen und Patienten mit drei Zytopenien eines von 214 Tagen ( $p$ -Wert 0,091). Bei Patienten mit cA wurde mit weniger als zwei Zytopenien auch kein medianes OS erreicht, während es bei bitytopenen Patienten bei 106 Tagen und bei trizytopenen bei 162 Tagen liegt ( $p$ -Wert 0,11). Bei den Patienten ohne cA wurde bei keiner der drei Gruppen ein medianes OS erreicht. Die Ergebnisse der Analyse finden sich in Abbildung 14.

Eine Analyse des medianen Überlebens wurde bei allen drei Gruppen auch nach Anzahl der Zytopenien im peripheren Blut durchgeführt. Dabei wurden als Grenzwerte klinische Werte angewandt: Für den Hämoglobin-Wert wurde die Grenze bei Frauen bei 12 g/dl und bei Männern bei 13 g/dl angesetzt, für die Thrombozyten bei 100/nl. Bei den Leukozyten wurde eine Gesamtleukozytenzahl von 4.000/ $\mu$ l als Grenze gewählt. Aufgrund geringer Fallzahlen wurden Patienten ohne und mit nur einer Zytopenie zusammengefasst. In der Gesamtkohorte zeigte die Kurve für Patienten mit maximal einer Zytopenie einen günstigeren Verlauf als für die beiden anderen Gruppen, ein signifikanter Unterschied im Überleben konnte allerdings nicht festgestellt werden. Patienten mit einer oder

### 3.1.5 Blutwerte und Knochenmarks-Blasten

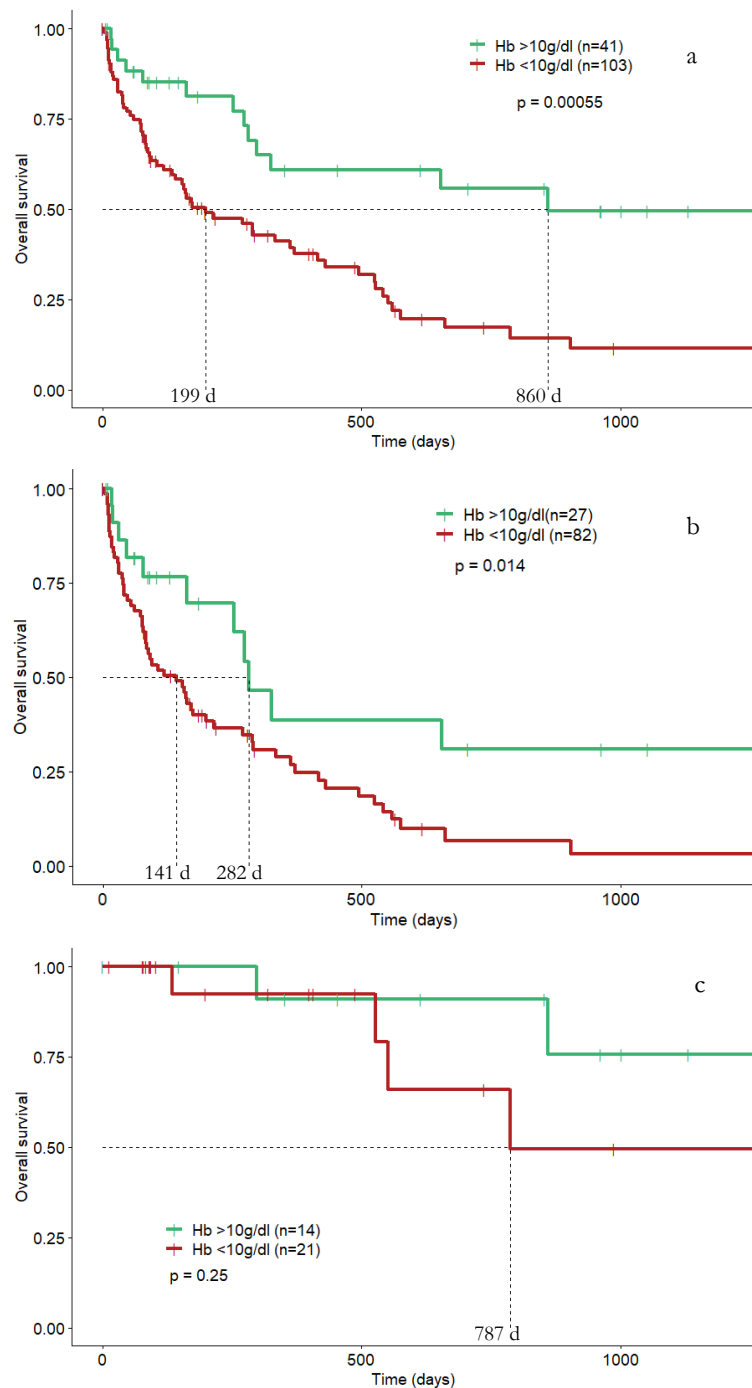


**Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Hämoglobin-Wert in drei Gruppen (>10 g/dl, 8-10 g/dl, <8 g/dl)**

a: Gesamtkohorte, b: Patienten mit cA, c: Patienten ohne cA

von 0,049. In der Gruppe der Patienten ohne multiple zytogenetischer Anomalien wurde für die Gruppen 1 und 2 kein medianes OS erreicht, nur für Patienten mit einem Hb-Wert <8 g/dl lag es bei 787 Tagen (p-Wert 0,4). Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven für diese Analyse in drei Gruppen pro Kohorte sind in Abbildung 15 zu sehen.

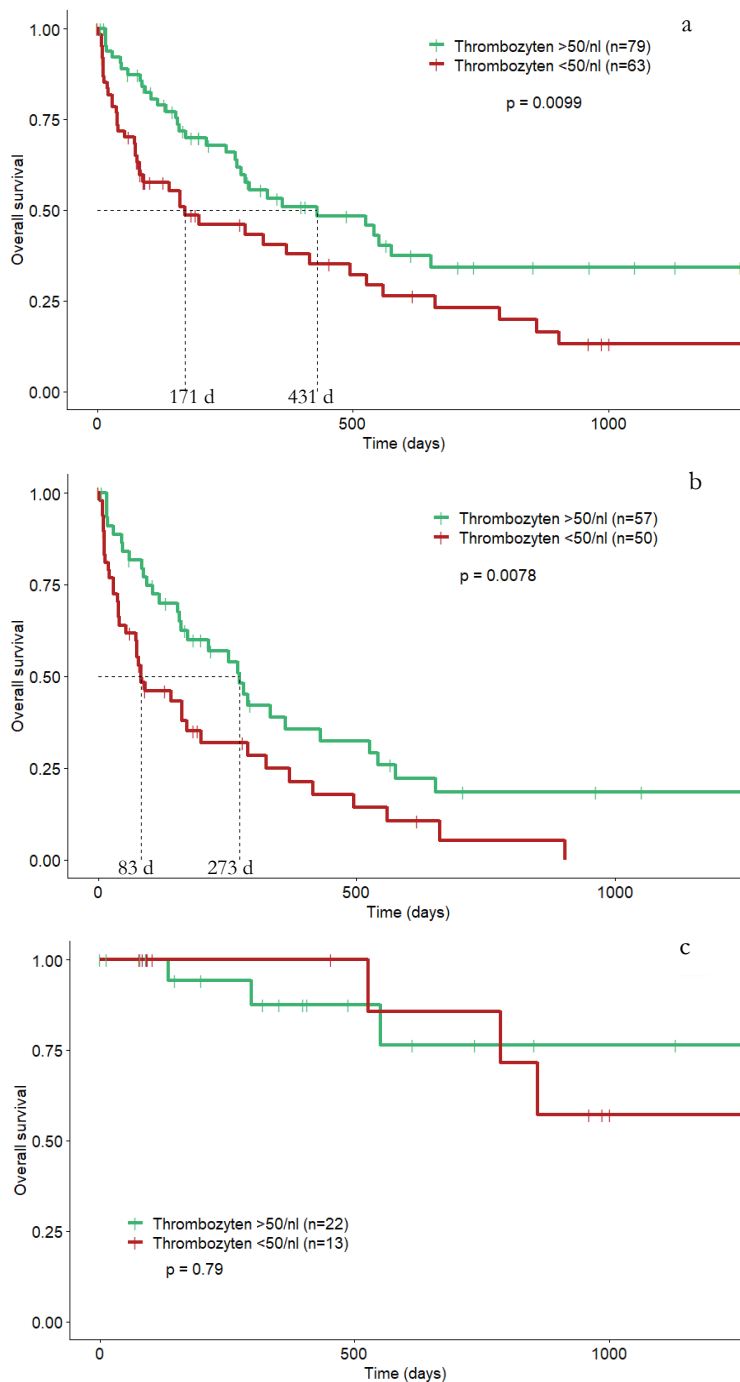
Auch eine Untersuchung einzelner Blutwerte wurde durchgeführt. Als erster Parameter wurde der Hämoglobin-Wert (Hb-Wert) betrachtet. Dazu wurden zwei unterschiedliche Analysen durchgeführt. Als erstes wurden die Kohorten nach ihrem Hb-Wert gemäß der Unterscheidung des IPSS-R in drei Gruppen eingeteilt: In der ersten Gruppe lag der Hb-Wert über 10 g/dl, in der zweiten lag er zwischen 8 und 10 g/dl, die dritte Gruppe wies Hb-Werte von unter 8 g/dl auf. In dieser Aufteilung ließen sich in der Gesamtkohorte deutliche Unterschiede feststellen: Gruppe 1 erreichte kein medianes OS, in Gruppe 2 lag es bei 160 Tagen und in Gruppe 3 bei 289 Tagen (p-Wert 0,0006). Bei einzelner Betrachtung der komplex-aberranten Patienten zeigte sich ein medianes OS von 282 Tagen (Hb >10 g/dl) bzw. 162 Tagen (Hb 8-10 g/dl) und 93 Tagen (Hb <8 g/dl) mit einem p-Wert



**Abbildung 16: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Hämoglobin-Wert in zwei Gruppen (>10 g/dl und <10 g/dl) a: Gesamtkohorte, b: Patienten mit cA, c: Patienten ohne cA**

erreichen, während des der Patienten mit einem niedrigeren Hb-Wert bei 787 Tagen lag (p-Wert 0,25). Die Kurven zu dieser Analyse sind Abbildung 16 zu entnehmen.

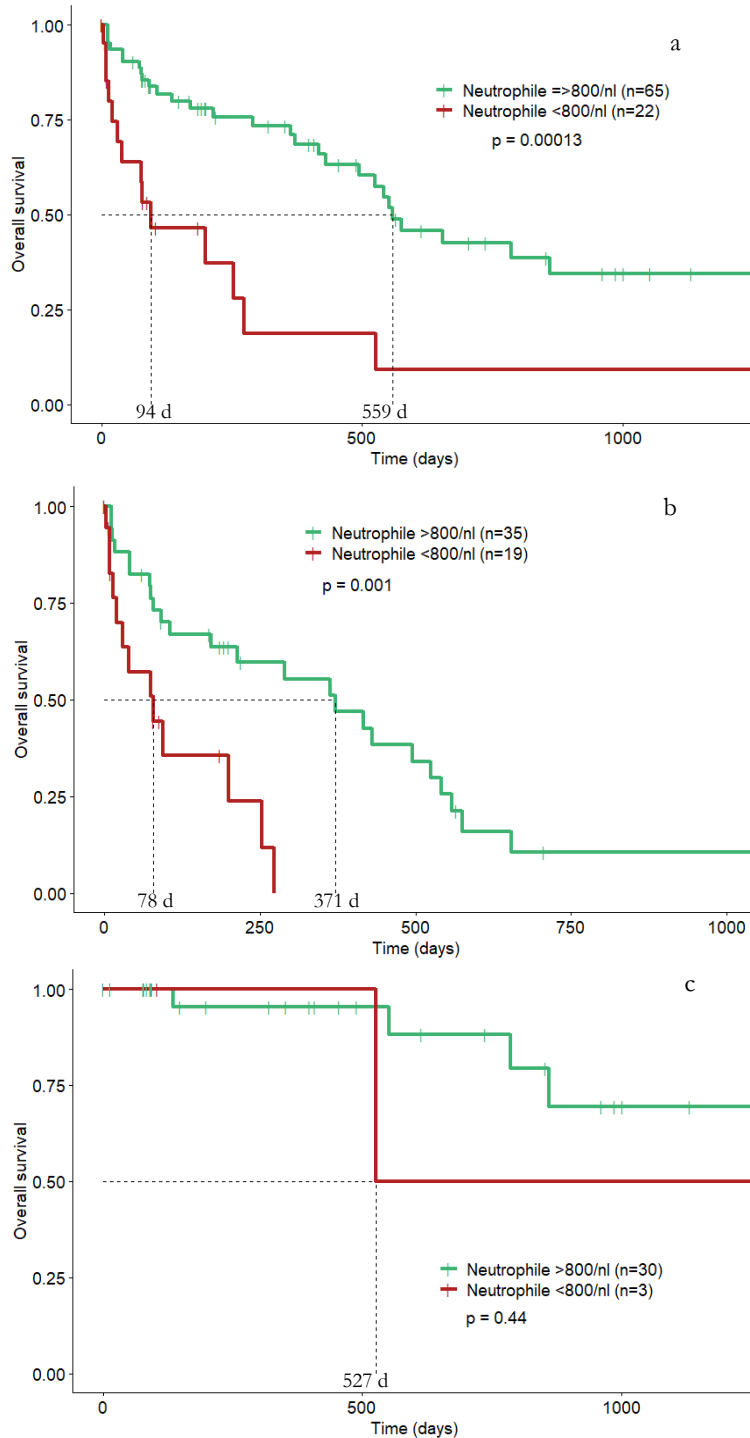
Aufgrund der ähnlichen Verläufe der Gruppen 2 und 3 wurden diese für eine zweite Analyse zusammengefasst, sodass zwischen Patienten mit einem Hb-Wert größer und kleiner als 10 g/dl unterschieden wurde. Bei dieser dichotomen Unterscheidung konnte in der Gesamtkohorte ein signifikanter Unterschied im medianen OS festgestellt werden, welches bei Patienten mit einem Hb-Wert >10 g/dl bei 860 Tagen und bei einem Hb-Wert <10 g/dl bei 199 Tagen lag (p-Wert 0,00055). Auch in der Kohorte der komplex-aberranten Karyotypen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen einem medianen OS von 141 bzw. 282 Tagen (p-Wert 0,014). Kein signifikanter Unterschied zeigte sich in der kleinen Gruppe der Patienten ohne cA, allerdings ist ein Trend zugunsten der Patienten mit einem Hb-Wert >10 g/dl zu erkennen, die kein medianes OS



**Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Thrombozyten-Wert in zwei Gruppen ( $\geq 50/\text{nl}$  und  $< 50/\text{nl}$ )**  
a: Gesamtkohorte, b: Patienten mit cA, c: Patienten ohne cA

(0,0078). In der Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp oder maximal zwei Aberrationen wurde das mediane OS nicht erreicht. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 17 graphisch dargestellt.

Des Weiteren wurde das Überleben der Patienten in Abhängigkeit ihrer Thrombozyten-Werte untersucht. Hierbei wurde das mediane OS der Patient mit einer Thrombozyten-Zahl über  $50/\text{nl}$  mit dem der Patienten verglichen, deren Thrombozyten-Konzentration unter  $50/\text{nl}$  lag. In der Gesamtkohorte ergab sich dabei ein signifikanter Unterschied: während das mediane OS der Patienten mit Thrombozyten  $> 50/\text{nl}$  bei 431 Tagen lag, betrug das der Patienten mit Thrombozyten-Werten  $< 50/\text{nl}$  lediglich 171 Tage (p-Wert 0,0099). Auch in der Kohorte der Patienten mit komplexen zytogenetischen Aberrationen war ein signifikanter Unterschied festzustellen. Hier lag das mediane OS der Patienten mit mehr Thrombozyten bei 273 Tagen, das der Patienten mit Thrombozyten  $< 50/\text{nl}$  nur bei 83 Tagen (p-Wert



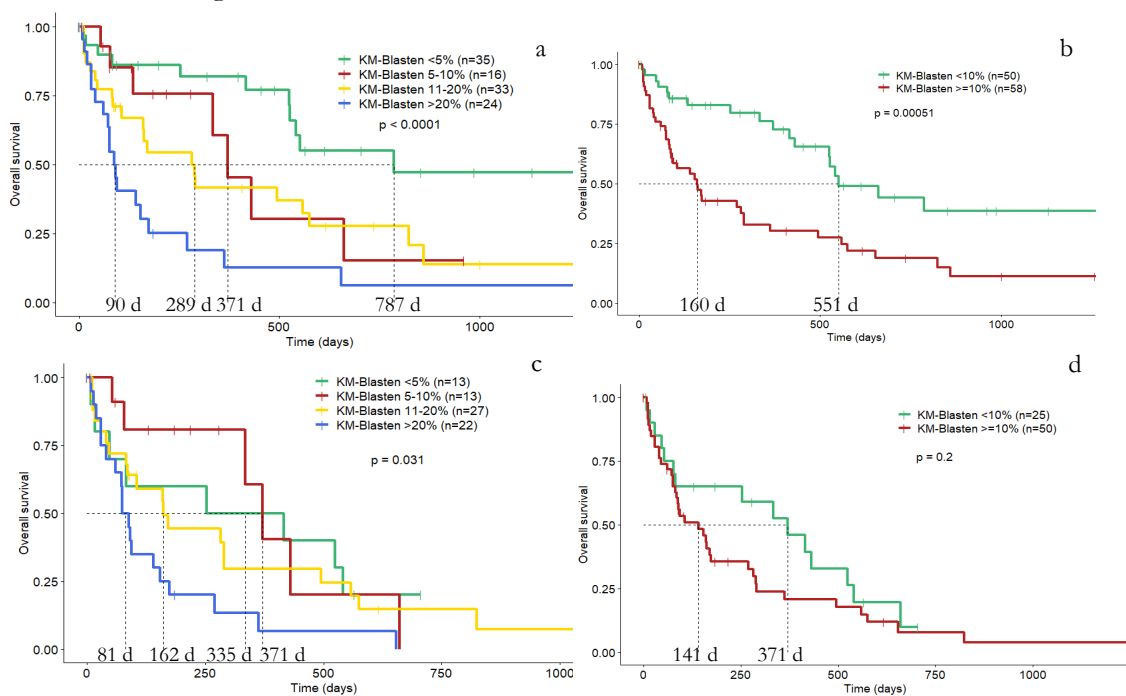
**Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Neutrophilen-Wert in zwei Gruppen ( $\geq 800/\text{nl}$  und  $< 800/\text{nl}$ ) a: Gesamtkohorte, b: Patienten mit cA, c: Patienten ohne cA**

bei 78 Tagen lag (p-Wert 0,001). In der Kohorte ohne cA konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (p-Wert 0,44), allerdings fanden sich der Kohorte auch nur drei Patienten mit weniger als 800 Neutrophilen/nl, sodass das hier festgestellte mediane OS von 527 Tagen kein repräsentatives Ergebnis darstellt. Bei Patienten, die mehr Neutrophile

Als letzter Parameter im peripheren Blut wurden die Gruppen und ihr medianes Überleben in Abhängigkeit ihrer Werte der neutrophilen Granulozyten untersucht. Dabei wurde, orientiert am IPSS-R, eine Grenze bei 800 neutrophilen Granulozyten pro Nanoliter gezogen und die Patienten, deren Werte darunter lagen, mit denen, die eine höhere Neutrophilen-Zahl aufwiesen, verglichen. Dabei zeigte sich in der Gesamtkohorte ein signifikanter Unterschied zwischen dem medianen OS der Patienten mit  $> 800$  Neutrophilen/nl (559 Tage) und dem der Patienten, bei denen  $< 800$  Neutrophile/nl festzustellen waren (94 Tage). Der p-Wert hier betrug 0,00013. In der cA-Kohorte zeigte sich ein ähnliches Bild: Bei Patienten mit hoher Neutrophilen-Zahl lag das mediane OS bei 371 Tagen, während das der Patienten mit weniger Neutrophilen

aufwiesen, wurde kein medianes OS erreicht. Die entsprechenden Überlebenskurven nach Kaplan-Meier finden sind in Abbildung 18.

Der Anteil der myeloischen Blasten im Knochenmark ist neben den drei Blutwerten und der zytogenetischen Eigenschaften der fünfte Faktor, der in die Errechnung des Risiko-Profiles nach IPSS-R einfließt. Deswegen wurde das mediane OS der Gruppen auch in Abhängigkeit ihres Blastenanteils analysiert. Dazu wurde nach einer Analyse, die die Patienten in vier Gruppen unterteilte (<5%, 5-9%, 10-19% und  $\geq 20\%$ ), ein Grenzwert bei einem Knochenmarks-Blastenanteil von 10% gesetzt. Anhand dieser Grenze wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt und dichotom analysiert. In der Gesamtkohorte zeigte sich bei der Analyse der vier Gruppen mediane OS von 90, 289, 371 und 787 Tagen (KM-Blasten <5%, 5-9%, 10-19% und  $\geq 20\%$ , p-Wert <0,0001). Bei der dichotomen Auswertung zeigte sich für Patienten mit <10% Blasten ein medianes OS von 551 Tagen, während das der Patienten mit  $\geq 10\%$  lediglich 160 Tage betrug (p-Wert 0,00051). In der Kohorte der Patienten mit komplexen zytogenetischen Aberrationen fiel der Unterschied deutlich geringer aus: Bei der Analyse in vier Gruppen betrug die medianen OS 81, 162, 335 und 371 Tage bei einem p-Wert von 0,031. Bei der Auswertung des Überlebens mit einem Blasten-Grenzwert von 10% ließ sich hier kein signifikanter Unterschied mehr feststellen. Das mediane OS der Gruppe mit <10% Blasten lag bei 141 Tagen, das der Patienten mit  $\geq 10\%$  bei 371 Tagen (p-Wert 0,2). In der Kurve lässt sich dennoch ein Trend zugunsten der Patienten mit geringerem Blastenanteil feststellen. Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 19 zu finden. Auf die Darstellung der Ergebnisse der nicht-cA Patienten wurde hier verzichtet, da aufgrund einer sehr geringen Gruppengröße keine verwertbaren Ergebnisse zustande kamen.

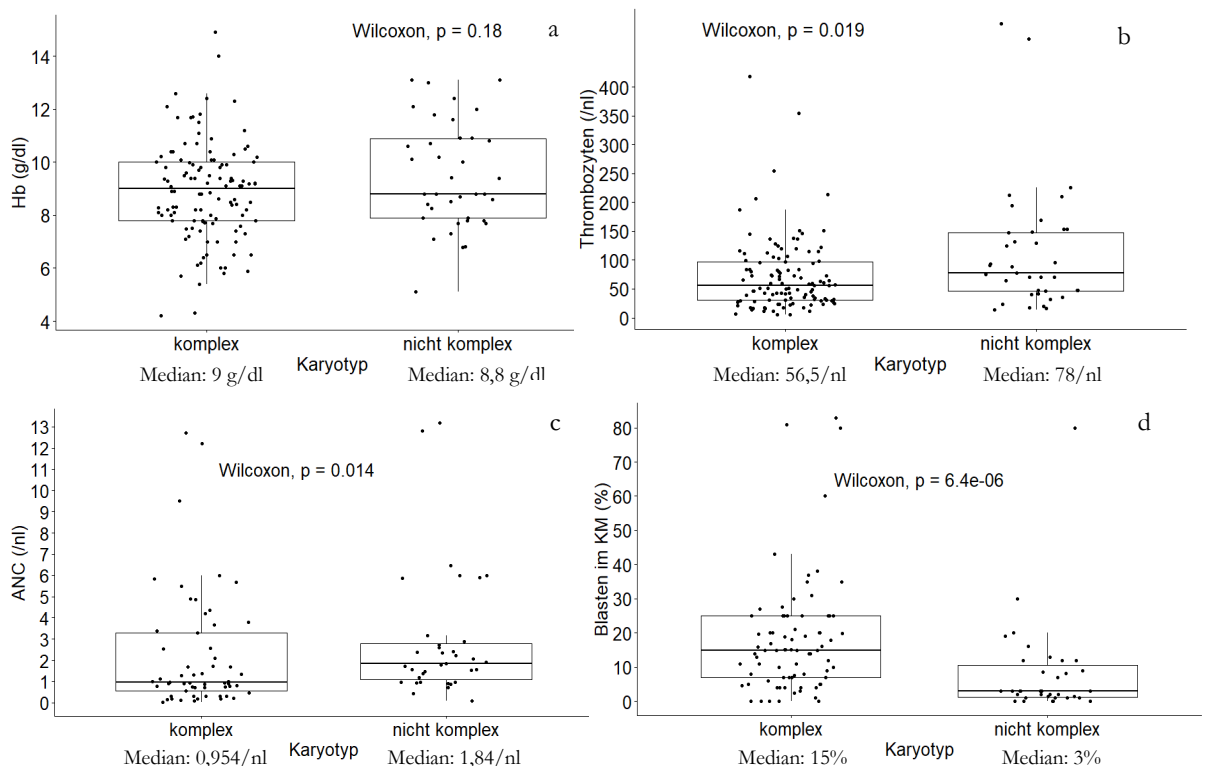


**Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach KM-Blasten** a: Gesamtkohorte in vier Gruppen (<5%, 5-9%, 10-19% und  $\geq 20\%$ ), b: Gesamtkohorte in zwei Gruppen (</> 10%), c: Patienten mit cA in vier Gruppen (<5%, 5-9%, 10-19% und  $\geq 20\%$ ), d: Patienten mit cA in zwei Gruppen (</> 10%)

### 3.1.6 Unterschiede komplexer Karyotyp und nicht-komplexer Karyotyp

Die Kohorte der Patienten mit cA wurde in dieser Studie in verschiedenen Aspekten mit einer Kontrollkohorte ohne cA verglichen. Diese Unterscheidung wird für verschiedene Faktoren an späterer Stelle noch einmal vorgenommen. Bei der grundlegenden Charakterisierung der Kohorten wurden Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Blutwerte überprüft. Analysiert wurden die Faktoren Hämoglobin-Wert, Thrombozyten-Zahl, die Zahl der neutrophilen Granulozyten und der Knochenmarksanteil myeloischer Blasten.

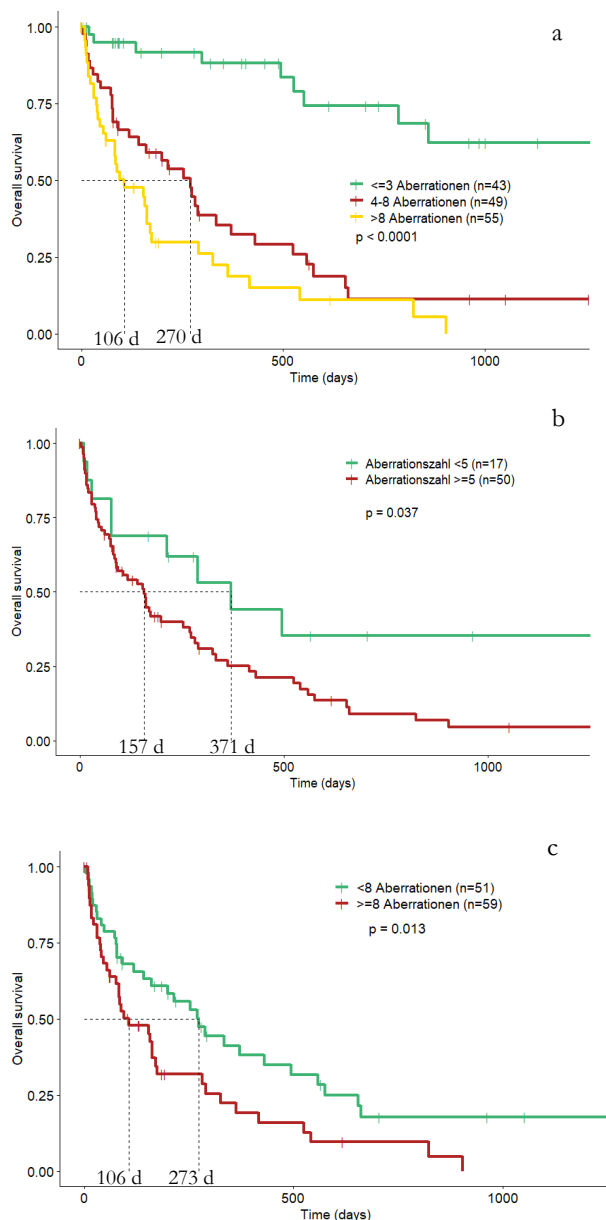
Bei dem Vergleich der Hb-Werte der Patienten mit und ohne cA zeigte sich kein signifikanter Unterschied: Der mediane Wert bei Patienten mit komplexem Karyotyp lag bei 9 g/dl, bei den Patienten ohne komplexe Aberrationen lag dieser Wert bei 8,8 g/dl ( $p$ -Wert 0,18, Abb. 20a). Ein deutlicher Unterschied zeigte sich hingegen bei der Thrombozyten-Zahl. Während diese im Median bei den cA-Patienten bei 56,5/nl lag, wiesen die Patienten der Kontrollkohorte einen medianen Wert von 78/nl auf ( $p$ -Wert 0,019, Abb. 20b). Auch bei der Zahl neutrophiler Granulozyten (*absolute neutrophil count*, ANC) zeigte sich ein Unterschied zwischen einem Median von 0,954/nl bei Patienten mit und 1,84/nl bei Patienten ohne cA ( $p$ -Wert 0,014, Abb. 20c). Der deutlichste Unterschied war im Anteil der Blasten im Knochenmark zu beobachten: Bei den komplexen Patienten lag dieser im Median bei 15%, bei den Patienten mit maximal zwei zytogenetischen Aberrationen bei 3% ( $p$ -Wert  $<0,0001$ , Abb. 20d). Eine graphische Darstellung dieser Analyse findet sich in Abbildung 20.



**Abbildung 20: Boxplots zum Vergleich der Blutwerte und KM-Blasten zwischen Patienten mit und ohne cA** a: Hämoglobin-Wert, b: Thrombozyten-Zahl, c: ANC, d: Knochenmarks-Blasten jeweils mit Medianen

### 3.1.7 Zahl zytogenetischer Aberrationen

Die Zahl der zytogenetischen Aberrationen hat sich in der Vergangenheit als wichtiger Risikofaktor herausgestellt: Eine höhere Zahl von chromosomalen Veränderungen geht mit einer ungünstigeren Prognose einher (Haase et al. 2007). Die Unterschiede im medianen OS zwischen Patienten mit und ohne komplexen Karyotyp wurden bereits berichtet, allerdings wurde auch innerhalb der Patienten mit cA die Unterschiede in der Aberrationszahl untersucht. Greenberg et al. (2012) zeigten bei der Entwicklung des IPSS-R, dass sich auch



**Abbildung 21: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten nach Aberrationszahlen** a: Gesamtkohorte, aufgeteilt in drei oder weniger, vier bis acht oder mehr als acht Aberrationen, b: Patienten mit cA aufgeteilt in weniger als fünf und fünf oder mehr Aberrationen, c: Patienten mit cA aufgeteilt in weniger als acht und acht oder mehr Aberrationen

Patienten mit exakt drei Aberrationen von denen mit mehr Veränderungen im medianen OS unterscheiden. Bei der Untersuchung der Gesamtkohorte zeigte sich das erwartete Ergebnis: Patienten mit drei Aberrationen oder weniger erreichten kein medianes OS, Patienten mit vier bis acht Aberrationen wiesen ein medianes OS von 270 Tagen auf und solche mit mehr als acht chromosomalen Veränderungen zeigten ein medianes OS von lediglich 106 Tagen ( $p$ -Wert  $< 0,0001$ , Abb. 21a).

Die Kohorte der komplexen Karyotypen wurde gesondert mit zwei verschiedenen Grenzen untersucht. Bei fünf oder mehr Aberrationen sprechen Haase et al. (2019) von einem hochkomplexen Karyotypen, deshalb wurde eine Untersuchung mit der Grenze von fünf Aberrationen durchgeführt. Dabei zeigte sich ein Unterschied im medianen OS zwischen 371 Tagen bei Patienten mit weniger als fünf Aberrationen und 157 Tagen bei denen mit hochkomplexem Karyotypen ( $p$ -Wert 0,037, Abb. 21b). Da der Median der Aberrationszahlen in dieser Kohorte bei acht Aberrationen lag, wurde eine zweite Grenze bei dieser Aberrationszahl gesetzt. Auch hierbei wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt: Das mediane OS der

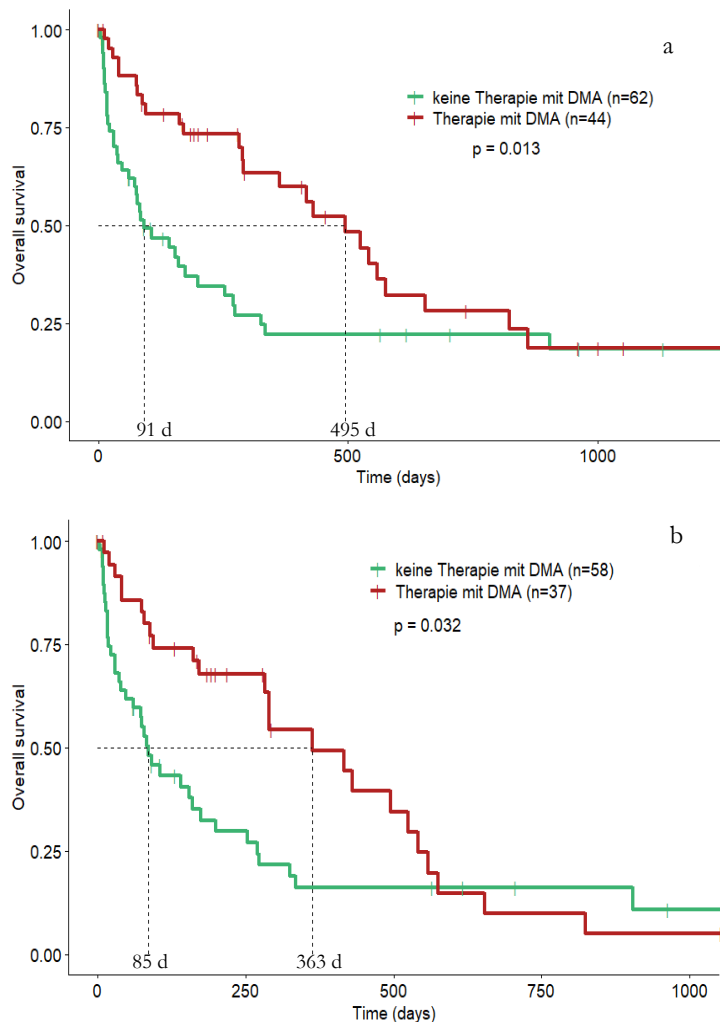


Patienten mit weniger als acht Aberrationen betrug 273 Tage, das der Patienten mit mehr als acht Aberrationen nur 106 Tage ( $p$ -Wert 0,013, Abb. 21c).

### 3.1.8 Therapie mit demethylierenden Substanzen

Der Einsatz von demethylierenden Substanzen (*demethylating agents*, DMA) ist fester Bestandteil der Therapie der Hochrisiko myelodysplastischen Syndrome. Bereits 2002 konnte ein verbessertes OS für Patienten, die eine Therapie mit der Substanz Azacytidin erhalten haben, festgestellt werden (Silverman et al. 2002; Sperling et al. 2017). Auch die in dieser Arbeit untersuchte Kohorte wurde auf ihr Ansprechen auf DMA betrachtet.

Zu 106 der 155 Patienten lagen Daten über den Therapie- und Krankheitsverlauf vor, davon sind 95 Patienten der Kohorte der komplexen Karyotypen zuzuordnen, weshalb auf die Analyse verbleibenden elf Patienten ohne komplexe Aberrationen verzichtet wurde. In der



**Abbildung 22: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von einer Therapie mit DMA** a: Gesamtkohorte, b: Patienten mit cA

Gesamtkohorte lag das mediane OS der Patienten, die mit DMA behandelt wurden, bei 495 Tagen, das der Patienten, die keine DMA-Therapie erhielten, bei lediglich 91 Tagen ( $p$ -Wert 0,013). In der Kohorte der cA-Patienten zeigte sich ein ähnliches Bild: Das mediane OS der therapierten Patienten betrug 363 Tage, während das der Patienten, die keine DMA erhielten, bei 85 Tagen lag ( $p$ -Wert 0,032). In beiden Kohorten zeigt sich ein ähnlicher Verlauf der Kaplan-Meier-Überlebenskurve, die nahelegt, dass das Ansprechen auf die Therapie zu einer deutlichen Verbesserung des medianen OS führt, dieser Effekt allerdings im Verlauf der Therapie nachlässt, sodass sich im längeren Krankheitsverlauf beide

Kurven wieder annähern. Die beschriebenen Kaplan-Meier-Kurven sind in Abbildung 22 dargestellt.

### 3.2 Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung von *PPM1D*

Veränderungen im Gen *PPM1D* wurden mittels NGS untersucht. Dabei fanden sich insgesamt 14 Patienten mit Veränderungen mit einer varianten Allelfrequenz (VAF) >5%. Die VAF liegt bei diesen 14 Patienten zwischen 6,9% und 45,3%. Eine genauere Charakterisierung dieser betroffenen Patienten und deren Mutationen findet sich in den Tabellen 13 und 14.

Nach einem Abgleich der detektierten Veränderungen mit den gängigen Datenbanken für molekulargenetische Veränderungen wurden neun dieser 14 Veränderungen als seltene benignen Varianten (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) eingestuft. Bei drei dieser neun Patienten lagen CD3+ T-Zellen vor, sodass sich die Annahme, dass es sich um einen SNP handelt, durch Nachweis des SNP in dieser Zellpopulation bestätigen ließ. Drei der neun als SNP identifizierten Veränderungen fanden sich bei Patienten ohne cA, die übrigen sechs wurden bei Patienten mit cA detektiert. Einer dieser Patienten hat ein therapieassoziiertes MDS. Vier der Patienten mit einem SNP zeigten keine zusätzliche Beeinträchtigung von *TP53*, die anderen fünf wiesen neben der *PPM1D*-Veränderung auch *TP53*-Alterationen auf, davon ein Patient eine Deletion von 17p, einer eine einfache *TP53*-Mutation und drei sowohl Mutation als auch Deletion.

Die fünf übrigen Veränderungen in *PPM1D* wurden als potenzielle Mutationen eingestuft. Zwei dieser Patienten sind aus der Gruppe mit cA, die übrigen drei aus der ohne cA. Zwei Patienten mit Mutation erhielten systemische Therapien in der Vergangenheit, beide ohne cA. Von diesen fünf Patienten mit potenziellen Mutationen wurde bei vier ein *TP53*-Wildtyp nachgewiesen, der fünfte Patient wies sowohl eine Deletion von 17p als auch eine *TP53*-Mutation auf. Bei den beiden Patienten mit *PPM1D*-Mutation und cA lassen sich bei genauerer Betrachtung der Patientendaten wenig Übereinstimmungen finden. Während Patient 6 weder eine Affektion von 5q noch eine *TP53*-Veränderung aufweist, wurde bei Patient 8 sowohl eine 5q-Deletion als auch die bereits genannte Multihit-*TP53*-Affektion festgestellt. Des Weiteren unterscheiden sich die beiden Patienten in Geschlecht und OS: Bei Patient 6 handelt es sich um eine Frau, die 662 Tage nach der Erstdiagnose (ED) des cA verstarb, Patient 8 ist männlich und nur 37 Tage nach Diagnosestellung gestorben. Ein weiterer Unterschied zeigt sich in der VAF, die bei Patientin 6 33,6% und bei Patient 8 6,9% beträgt. Die Mutationen finden sich zudem an verschiedenen Positionen in der Sequenz von *PPM1D*. Die Mutation von Patientin 6 findet sich im ersten Exon, es kommt durch den Austausch der Base Cytosin durch Tyrosin zum Aminosäureaustausch von Prolin zu Threonin (Mutation 1 in Abb. 23, S. 50). Die Mutation von Patient 8 liegt im Exon 6, hier erfolgt der Basenaustausch von Adenosin zu Tyrosin. Durch diese Änderung der Basenabfolge kommt es durch ein so entstandenes Stoppcodon zum vorzeitigen Abbruch

der Proteinsynthese (Mutation 5 in Abb. 23, S. 50). Auch die Zahl der zytogenetischen Aberrationen unterscheidet sich deutlich mit fünf Aberrationen bei Patient 6 im Vergleich zu zwölf Aberrationen bei Patient 8. Ähnlichkeiten finden sich im Alter bei ED (75 und 81 Jahre), dem Vorhandensein einer zytogenetischen Veränderung, die in irgendeiner Form das Chromosom 7 betrifft, und den Blutwerten (Hb 8,6 g/dl und 8,2 g/dl, Thrombozyten 49/nl und 33/nl, Leukozyten 4,17/nl und 3,1/nl). Der Blastenanteil ist mit 8% nur bei Patientin 6 bekannt.

Die Patienten mit *PPM1D*-Mutation ohne cA haben alle keinerlei Veränderung von *TP53* oder 5q, allerdings zeigt Patient 9 eine Trisomie 8 in 15 von 27 untersuchten Metaphasen. Dieser Patient weist mit 45,3% auch eine auffallend hohe VAF auf. Die beiden anderen Patienten, Patient 10 und 11, zeigen mit 8,1% und 7,8% deutliche geringe Klongrößen. Auch zytogenetisch stellen sie sich unauffälliger da: Die Patientin 10 weist einen Normal-Karyotyp auf, Patient 11 einen Y-Verlust. Die Patienten 9 und 10 erhielten in ihrer Vergangenheit bereits Systemtherapien, sodass von einer therapieassoziierten Erkrankung ausgegangen wird. Patient 9 erkrankte an einem Hodgkin-Lymphom, sodass eine Polychemotherapie durchgeführt werden musste. Die Patientin 10 wurde mit Methotrexat behandelt. Alle drei Mutationen befinden sich im sechsten Exon von *PPM1D*. Bei Patient 9 wird die Base Cytosin durch Guanin ersetzt, sodass in der Aminosäureabfolge ein Stoppcodon entsteht und die Proteinsynthese abbricht. (Mutation 5 in Abb. 23, S. 50). Die Mutation von Patient 10 führt zu einem Basenaustausch von Cytosin zu Tyrosin, was wiederum durch ein Stoppcodon zum vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese führt (Mutation 3 in Abb. 23, S. 50). Bei Patient 11 handelt es sich um eine Insertion (Mutation 2 in Abb. 23, S. 50)

Die Mutationen der Patienten 8-10 sind in der Datenbank „OncoKB“ bereits als „*likely oncogenic*“ beschrieben (Chakravarty et al. 2017; OncoKB 2020). Außerdem werden diese drei Mutationen dort als vermutliche *Gain-of-Function*-Veränderungen eingestuft, also als Mutationen, durch die es zu einer erhöhten Proteinaktivität kommt. Bei der Mutation des Patienten 11 handelt es sich um eine *Frameshift*-Mutation.

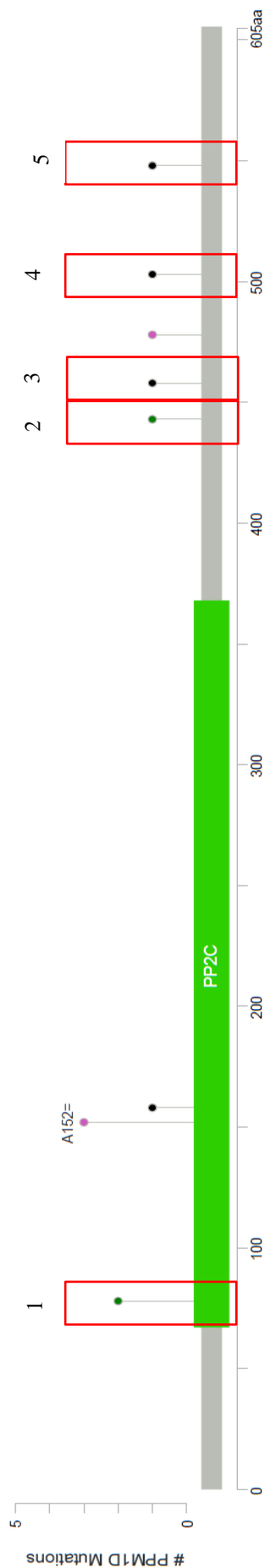
**Tabelle 13: Beschreibung der detektierten *PPM1D*Veränderungen der 14 betroffenen Patienten**

Patient	VAF (%)	Position der Veränderung	Bezeichnung nach HGVS	SNP
1	38,2	58678009	c.234T>A p.P78P	Ja
2	30,1	58678231	c.456C>T p.A152A	Ja
3	39,1	58741035	3'UTR	Ja

Patient	VAF (%)	Position der Veränderung	Bezeichnung nach HGVS	SNP
4	45	58678231	c.456C>T p.A152A	Ja
5	40,7	58740950	3'UTR	Ja
6	33,6	58678007	c.232C>A p.P78T	Nein
7	31,8	58741035	NM_003620 c.*122T>C	Ja
8	6,9	58740737	c.1642A>T p.K548X	Nein
9	45,3	58740603	c.1508C>G;p.S503X	Nein
10	8,1	58740467	c.1372C>T;p.R458X	Nein
11	7,8	58740422	c.1327_1328insATGCC;p.N443fs	Nein
12	14,9	58740529	c.1434C>T;p.C478C	Ja
13	26,6	58700883	c.474G>A;p.A158A	Ja
14	45	58678231	c.456C>T p.A152A	Ja

Tabelle 14: Charakterisierung der Patienten mit *PPMID* Veränderungen

Patient	Geschlecht	<i>TP53</i> Status	Therapie in Vergangenheit	Karyotyp	Aberrationszahl	5q Status	OS in Tagen
1	W	mut und del	Nein	Komplex	8	del	282
2	M	del	Nein	Komplex	6	Wildtyp	11
3	M	mut	Nein	Komplex	8	del	75
4	M	mut und del	Ja	Komplex	13	del	290
5	M	mut und del	Nein	Komplex	15	del	17
6	W	Wildtyp	Nein	Komplex	5	Wildtyp	661
7	W	Wildtyp	Nein	Komplex	5	del	334
8	M	mut und del	Nein	Komplex	12	del	37
9	M	Wildtyp	Ja	Nicht komplex	1	Wildtyp	1
10	W	Wildtyp	Ja	Nicht komplex	0	Wildtyp	1
11	M	Wildtyp	Nein	Nicht komplex	1	Wildtyp	1
12	M	Wildtyp	Nein	Nicht komplex	0	Wildtyp	1
13	M	Wildtyp	Nein	Nicht komplex	1	Wildtyp	2199
14	M	Wildtyp	Ja	Nicht komplex	1	Wildtyp	738



Eine graphische Darstellung der Mutationslokalisationen findet sich in Abbildung 23. Im Format eines Lollipop-Plots sind dort die verschiedenen *PPM1D*-Veränderungen dargestellt. Die Veränderungen, die als Mutationen gewertet werden, sind mit einem roten Kasten markiert. Dabei ist auffällig, dass vier dieser Mutationen (2-5) wie bisher am häufigsten beschrieben in den letzten Abschnitten des Proteins liegen. Lediglich eine der Mutationen (1) findet sich im ersten Exon. An dieser Position konnte noch eine zweite Veränderung festgestellt werden, allerdings führte diese zu keinem Aminosäuren-Austausch, sodass es sich dabei um eine stumme Veränderung handelt. Bei Mutation 2 handelt es sich um eine Insertion. Dort ist die Basenabfolge ATGCC in den genetischen Code eingefügt, was zu einer Verschiebung des Leserasters führt. Die Mutationen 3-5 sind Nonsense-Mutationen, das bedeutet, dass sie ein vorzeitiges Stopp-Codon generieren, sodass die Synthetisierung des RNA-Strangs zu früh abbricht, was wiederum zu einer unvollständigen Synthese des Proteins führt.

Auffällig ist des Weiteren, dass die Veränderung, die hier mit A152= gekennzeichnet ist, bei drei Patienten in genauer gleicher Form beobachtet wurde. Hierbei handelt es sich wohl um einen etwas häufiger vorkommenden SNP.

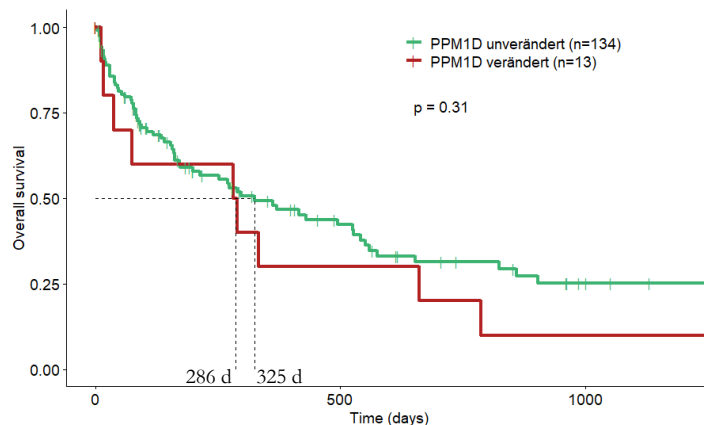
### 3.3 Unterschiede *PPM1D* und *TP53*

Aufgrund der formulierten Aufgabenstellung wurde auch eine genaue Analyse auf Mutationen in *TP53* durchgeführt. Als direkter Inhibitor von p53 ist Wip1, das von *PPM1D* codiert wird, direkt in dessen Signalweg eingeschaltet. Im Folgenden sollen einige Ergebnisse der Untersuchung auf Zusammenhänge und Unterschieden zwischen Patienten mit *PPM1D* und/oder *TP53* Veränderungen aufgeführt werden.

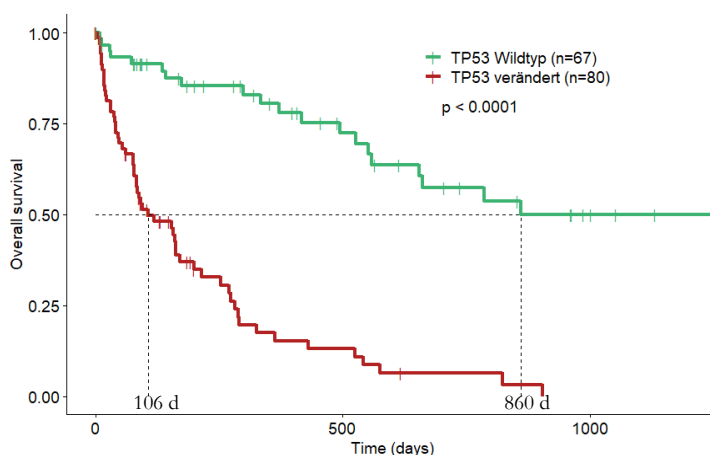
**Abbildung 23: Lollipop-Plot zur Darstellung der nachgewiesenen Veränderungen von *PPM1D*** Die Veränderungen 1-5, die mit einem roten Kasten markiert sind, werden als Mutationen gewertet

### 3.3.1 Überleben

Von den fünf Patienten, die *PPM1D*-Mutationen aufweisen, sind zum Zeitpunkt dieser



**Abbildung 24: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten mit und ohne Veränderung von *PPM1D***



**Abbildung 25: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten mit und ohne Veränderung von *TP53***

im Vergleich zu Patienten ohne *TP53*-Affektion verglichen. Hierbei zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied: Das mediane OS der Patienten mit einem *TP53*-Wildtyp betrug 860 Tage, während das der Patienten mit betroffenem *TP53* bei lediglich 106 Tagen lag ( $p$ -Wert  $< 0,0001$ ). Die Überlebenskurve ist Abbildung 25 zu entnehmen.

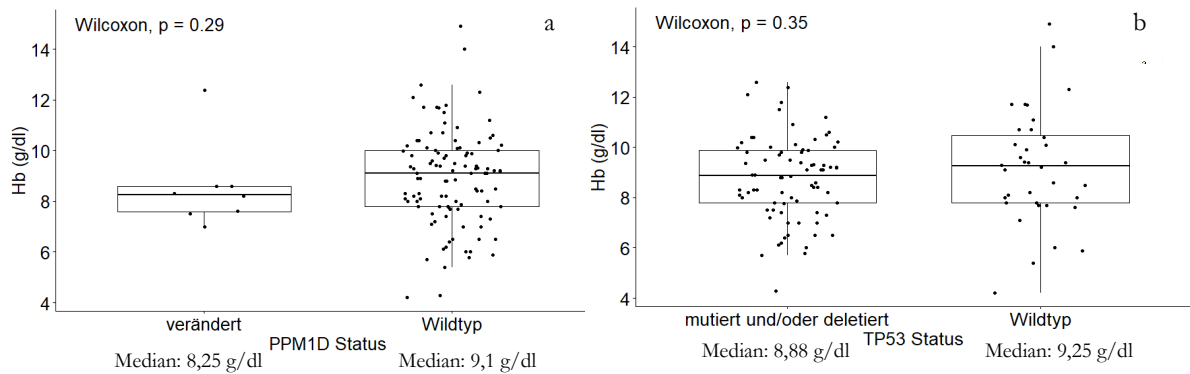
### 3.3.2 Blutwerte und Knochenmarks-Blasten

Innerhalb der Kohorte der Patienten mit cA wurden die Blutwerte der *PPM1D*-veränderten mit denen der *PPM1D*-Wildtypen und die der *TP53*-betroffenen mit denen der jeweiligen Wildtypen verglichen.

Auswertung lediglich zwei Patienten verstorben, beide mit komplexem Karyotyp. Das mediane OS wurde an dieser Stelle für alle 14 Patienten mit *PPM1D*-Veränderungen berechnet (Abbildung 24). Dieses unterschied sich nicht von dem der Patienten ohne *PPM1D*-Veränderungen: Das mediane OS der Patienten mit betroffenem *PPM1D* betrug 286 Tage, das der Patienten ohne Affektion des Gens 325 Tage ( $p$ -Wert 0,31).

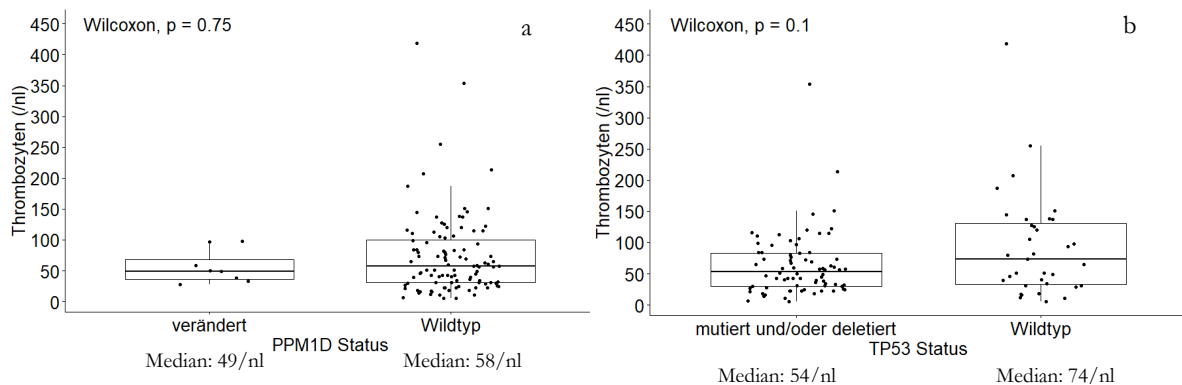
*TP53* Veränderungen konnten bei 81 der 155 Patienten festgestellt werden, davon allein 79 aus der Kohorte der 115 Patienten mit komplexem Karyotyp. Nur zwei Patienten ohne cA wiesen eine *TP53*-Veränderung auf. Die Patienten mit *TP53*-Affektion wurden an dieser Stelle unabhängig der Art der Veränderung untersucht. Ihr medianes Überleben wurde

Beim zuerst betrachteten Hämoglobin-Wert zeigte sich in beiden Gruppen kein Unterschied. Bei der Analyse nach *PPM1D*-Veränderungen zeigte sich bei Betroffenen ein medianer Hb von 8,25 g/dl und bei den Patienten mit Wildtyp-*PPM1D* ein Median von 9,1 g/dl (p-Wert 0,29). Bei den *TP53*-Patienten zeigte sich ein ähnliches Bild: Hier lag der mediane Hb bei den Patienten mit affektiertem *TP53* bei 8,88 g/dl und der der Wildtyp-Patienten bei 9,25 g/dl (p-Wert 0,35). Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 26: Boxplot zum Vergleich der Hämoglobin-Werte zwischen *PPM1D*-Veränderten und *PPM1D*-Wildtypen sowie *TP53*-Veränderten und *TP53*-Wildtypen a: *PPM1D*-verändert vs. Wildtyp, b: *TP53*-verändert vs. Wildtyp**

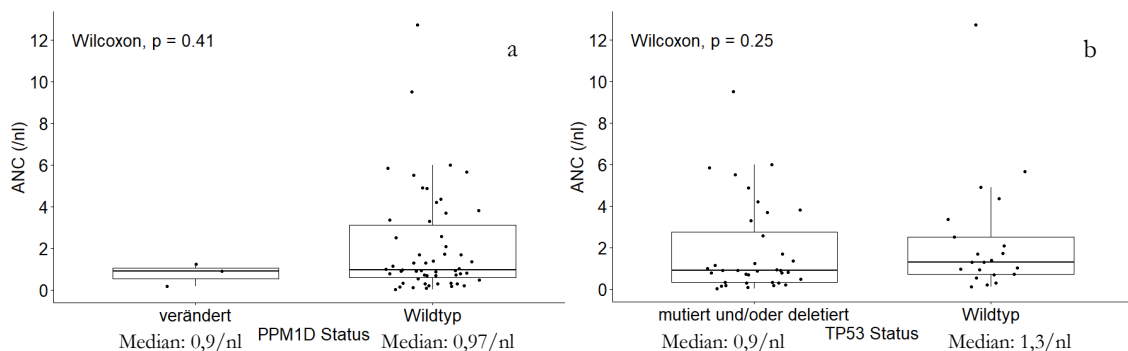
Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Untersuchung der Thrombozyten-Zahlen in den entsprechenden Gruppen. Beim Vergleich in der *PPM1D*-Gruppe zeigte sich bei Patienten mit betroffenem *PPM1D* eine mediane Thrombozyten-Zahl von 49/nl, während dieser bei Patienten mit *PPM1D*-Wildtyp bei 58/nl lag (p-Wert 0,75). Bei Unterscheidung nach *TP53*-Status zeigte sich ein größerer Unterschied, allerdings wurde auch hier kein Signifikanz-Level erreicht. Bei Patienten mit verändertem *TP53* betrug die mediane Thrombozyten-Zahl 54/nl, bei solchen mit *TP53*-Wildtyp 74/nl (p-Wert 0,1). Die Verteilung der Thrombozyten-Zahlen und der Mediane findet sich in Abbildung 27.



**Abbildung 27: Boxplot zum Vergleich der Thrombozyten-Zahlen zwischen *PPM1D*-Veränderten und *PPM1D*-Wildtypen sowie *TP53*-Veränderten und *TP53*-Wildtypen a: *PPM1D*-verändert vs. Wildtyp, b: *TP53*-verändert vs. Wildtyp**

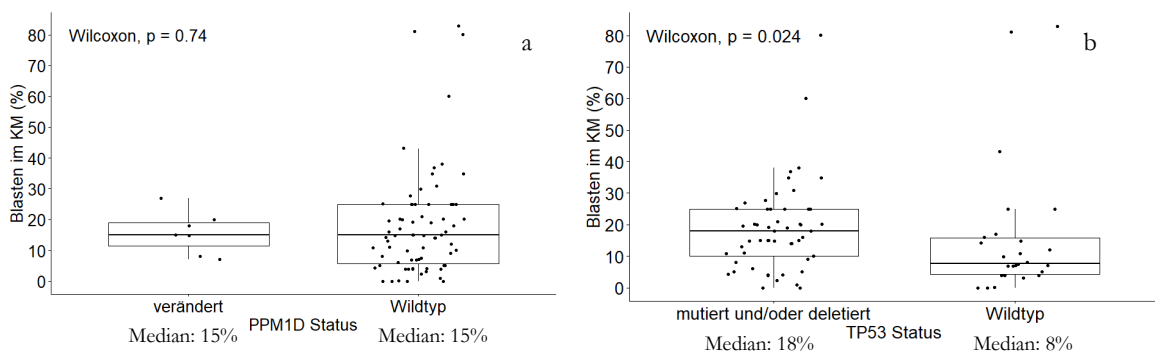


Der Vergleich der absoluten Neutrophilen-Werte brachte etwas weniger gut verwertbare Ergebnisse hervor, da für nicht alle Patienten ANC-Werte vorlagen. Dennoch wurde ein Vergleich analog zu den anderen Blutwerten durchgeführt. In der Gruppe der *PPM1D*-Untersuchung zeigte sich bei den Patienten mit *PPM1D*-Veränderungen ein medianer ANC-Wert von 0,9/nl, allerdings konnten hier auch nur drei Patienten betrachtet werden. Die Patienten mit *PPM1D*-Wildtyp wiesen einen Median von 0,97/nl auf (p-Wert 0,41, Abb. 28a). Wie auch schon bei den Thrombozyten zeigte sich bei der Unterscheidung nach *TP53*-Status eine größere Differenz, aber wiederum ohne signifikanten Unterschied: Bei Patienten mit verändertem *TP53* betrug der ANC-Median 0,9/nl, bei denen mit *TP53*-Wildtyp lag dieser Median bei 1,3/nl (p-Wert 0,25, Abb. 28b).



**Abbildung 28:** Boxplot zum Vergleich des ANC zwischen *PPM1D*-Veränderten und *PPM1D*-Wildtypen sowie *TP53*-Veränderten und *TP53*-Wildtypen a: *PPM1D*-verändert vs. Wildtyp, b: *TP53*-verändert vs. Wildtyp

Des Weiteren wurde der Anteil der myeloischen Blasten im Knochenmark betrachtet. Auch hier erfolgte der Vergleich zwischen *PPM1D*-Veränderten und -Wildtypen sowie zwischen *TP53*-Affektion und -Wildtyp. Bei den Patienten in der *PPM1D*-Gruppe zeigte sich zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied: Der mediane Blastenanteil lag sowohl bei den Patienten mit *PPM1D*-Veränderung als auch bei denen mit *PPM1D*-Wildtyp bei 15% (p-Wert 0,74). In der *TP53*-Gruppe hingegen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Medianen. Bei Patienten mit *TP53*-Affektion lag der mediane Blastenanteil bei 18%,



**Abbildung 29:** Boxplot zum Vergleich des Anteils der Blasten am Knochenmark zwischen *PPM1D*-Veränderten und *PPM1D*-Wildtypen sowie *TP53*-Veränderten und *TP53*-Wildtypen a: *PPM1D*-verändert vs. Wildtyp, b: *TP53*-verändert vs. Wildtyp

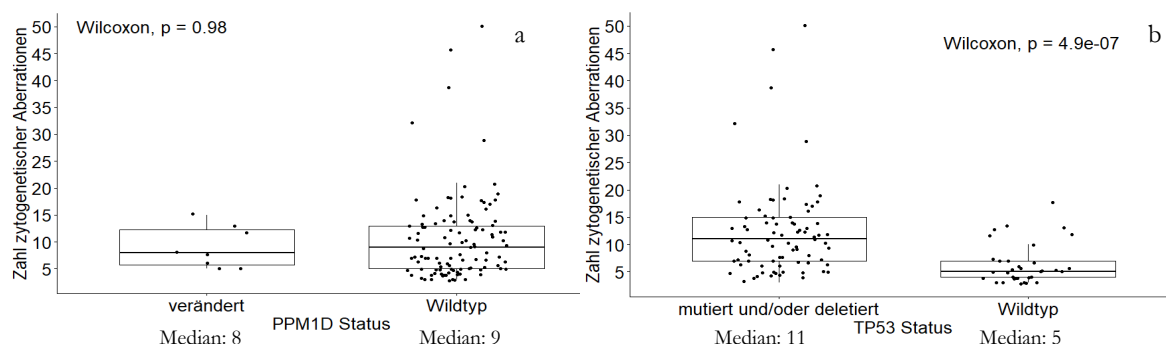
während er bei Patienten mit *TP53*-Wildtyp lediglich bei 8% lag ( $p$ -Wert 0,024). Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.

Insgesamt konnte bei den Blutwerten kein Unterschied zwischen den Gruppen mit verändertem Gen und den jeweiligen Wildtypen festgestellt werden. Nur der Anteil der Blasten am Knochenmark unterschied sich bei den Patienten mit *TP53*-Veränderung signifikant von den *TP53*-Wildtyp-Patienten. Auch bei Betrachtung der potenziellen Mutationen unabhängig vom Karyotyp zeigte sich zwischen *PPM1D*-Mutierten und *PPM1D*-Wildtypen kein Unterschied in Blutwerten oder Blastenanteil (Hb-Median: 8,7 g/dl vs. 9,0 g/dl,  $p$ -Wert 0,79; mediane Thrombozyten-Zahl: 60/nl vs. 61/nl,  $p$ -Wert 0,78; medianer Blastenanteil: 4% vs. 12%,  $p$ -Wert 0,064; ANC nicht auswertbar).

### 3.3.3 Zahl zytogenetischer Aberrationen

Bei Mutationen in *TP53* ist bereits bekannt, dass es oft zu einem vermehrten Auftreten zytogenetischer Aberrationen kommt. So kommen *TP53*-Mutation auch vermehrt in Assoziation mit komplexen Karyotypen vor (Sallman et al. 2016). Im Zuge der Betrachtung der Unterschiede zwischen *TP53*- und *PPM1D*-Veränderungen wurden auch die unterschiedlichen Aberrations-Zahlen analysiert. Dazu wurden analog zu den Blutwerten innerhalb der Kohorte mit komplexem Karyotyp Patienten mit verändertem *PPM1D* mit denen mit *PPM1D*-Wildtyp verglichen. Ebenso wurden in dieser Kohorte Patienten mit betroffenem *TP53* im Vergleich zu denen ohne *TP53*-Affektion analysiert.

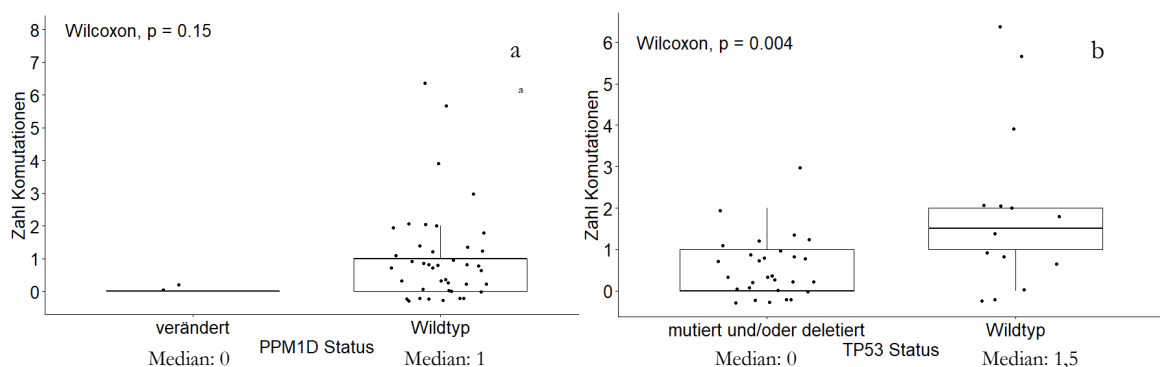
Bei den Patienten mit *PPM1D*-Veränderung wurde eine mediane Aberrationszahl von acht beobachtet. Es zeigte sich kein Unterschied zu dem Median der Wildtyp-Gruppe, welcher bei neun zytogenetischen Veränderungen lag ( $p$ -Wert 0,98). In der *TP53*-Gruppe hingegen zeigte sich wie auf Grundlage der bereits bekannten Daten erwartet ein hochsignifikanter Unterschied: Während bei Patienten, die eine *TP53*-Affektion aufwiesen, im Median eine Aberrationszahl elf chromosomalen Veränderungen festgestellt wurde, zeigten sich bei Patienten mit *TP53*-Wildtypen im Median nur fünf Aberrationen ( $p$ -Wert  $<0,0001$ ). Eine graphische Darstellung dieser Ergebnisse ist Abbildung 30 zu entnehmen.



**Abbildung 30: Boxplot zum Vergleich der zytogenetischen Aberrationszahlen zwischen *PPM1D*-Veränderten und *PPM1D*-Wildtypen sowie *TP53*-Veränderten und *TP53*-Wildtypen a: *PPM1D*-verändert vs. Wildtyp, b: *TP53*-verändert vs. Wildtyp**

### 3.3.4 Komutationen

Neben der Zahl der zu beobachtenden zytogenetischen Aberrationen wurden auch die molekulargenetischen Profile der Patienten betrachtet. Zu einigen Patienten lagen umfassende molekulargenetische Analysen vor, da diese im Rahmen der Routinediagnostik mithilfe des vorher bereits erwähnten Panels sequenziert wurden. Zu diesen Patienten liegen uns genaue Ergebnisse über die Mutationen verschiedener Gene, die typischerweise bei hämatologischen Neoplasien betroffen sind, und die entsprechenden Klongrößen vor. Die mediane Zahl der vorliegenden Komutationen wurde in der Kohorte der Patienten mit *cA* sowohl bei den Patienten mit *PPM1D*-Veränderungen im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen als auch bei *TP53*-Betroffenen im Vergleich zu *TP53*-Wildtypen untersucht. In der Gruppe der komplexen *PPM1D*-Veränderten wurden allerdings nur zwei Patienten mit dem myeloischen Panel des Labors für Individuelle Genomdiagnostik für Hämatologie und Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen untersucht. Von diesen beiden zeigte keiner eine andere Mutation, während der Median bei den Patienten mit *PPM1D*-Wildtypen bei einer anderen Mutation lag (p-Wert 0,15, Abb. 31a). Bei den Patienten mit *TP53*-Veränderung lagen deutlich mehr Daten aus durchgeführten NGS-Analysen vor. Allerdings lag auch bei dieser Gruppe Patienten der Median für die Zahl parallel vorliegender Mutationen bei null. Patienten mit *TP53*-Wildtyp wiesen hingegen eine mediane Komutationszahl von 1,5 auf (p-Wert 0,004, Abb. 31b).



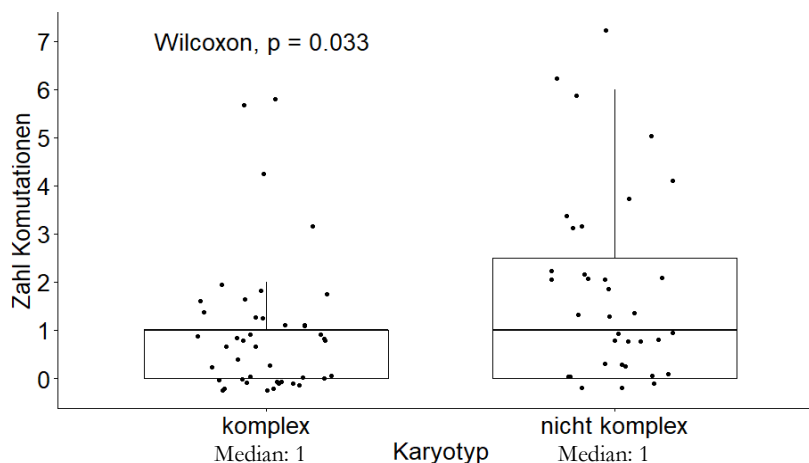
**Abbildung 31: Boxplot zum Vergleich der Zahl parallel vorliegender Mutationen zwischen *PPM1D*-Veränderten und *PPM1D*-Wildtypen sowie *TP53*-Veränderten und *TP53*-Wildtypen a: *PPM1D*-verändert vs. Wildtyp, b: *TP53*-verändert vs. Wildtyp**

Bei Betrachtung aller Patienten mit *PPM1D*-Veränderung unabhängig von ihrer Zytogenetik zeigen sich auch nur zwei Patienten, bei denen Komutationen festgestellt werden konnten. Dabei handelt es sich um eine *DNMT3A*-Mutation bei *PPM1D*-Patient 11 und eine zweifache *TET2*-Mutation bei *PPM1D*-Patient 12. Dennoch bleibt der Median der Komutationszahl in der Gruppe der *PPM1D*-Veränderten auch bei Untersuchung der Gesamtkohorte bei null, während er bei den Wildtyp-Patienten bei eins liegt (p-Wert 0,11).

Bei den *TP53*-Patienten wurden diverse parallel vorliegende Mutationen festgestellt. In unserer Kohorte wurden bei den 30 Patienten, die einer umfassenden molekulargenetischen Analyse unterzogen wurden, zwei Mutationen in *RUNX1*, eine in *ASXL1*, eine *SRFS2*-

Mutation, zwei *DNMT3A*-Mutationen, drei mutierte *TET2*-Gene, zwei *EZH2*-Mutationen, eine *CEBPA*-Mutation, zwei Mutationen in *PHF6* und je eine Mutation in *IDH2*, *NOTCH1*, *ZRSR2* und *NRAS* festgestellt. Diese 18 Mutationen tragen in 14 Patienten auf, von denen zwölf nur eine Mutation aufwiesen. Ein Patient zeigte zwei Mutationen, ein weiterer drei. Von den Patienten ohne *PPM1D*- oder *TP53*-Mutation wurden 13 mittels NGS-Panel analysiert. Dabei wurden 27 Mutationen bei zehn Patienten festgestellt, davon drei in *RUNX1*, zwei in *ASXL1*, zwei in *SF3B1*, zwei in *SRSF2*, fünf in *TET2*, zwei in *EZH2*, zwei in *ETV6*, zwei in *U2AF1*, zwei in *NRAS* und je eine in *CEBPA*, *IDH2*, *BCOR*, *STAG2* und *GATA2*. Von diesen 13 Patienten hatten nur drei keine Komutationen, drei nur eine andere Mutation, vier Patienten wiesen zwei Komutationen auf, ein Patient vier und bei zwei Patienten konnten sechs Mutationen festgestellt werden.

In der Vergleichskohorte ohne komplexen Karyotyp lagen zu 35 Patienten umfassende molekulargenetische Analyse-Daten vor. Bei den zwei Patienten, die auch eine *TP53*-Affektion aufwiesen, wurden fünf verschiedene Komutationen festgestellt. Bei einem dieser beiden lag eine *GNAS*-Mutation vor, der andere wies sowohl eine *SF3B1*- als auch eine *TET2*-, eine *JAK2*- und eine *IDH1*-Mutation auf. Bei den 33 analysierten Patienten mit *TP53*-Wildtyp wurden insgesamt 60 Mutationen in 23 Patienten beobachtet, davon fünf in *RUNX1*, fünf in *ASXL1*, vier in *SF3B1*, vier in *SRSF2*, vier in *DNMT3A*, 13 in *TET2*, drei in *EZH2*, drei in *PHF6*, zwei in *NRAS*, drei in *U2AF1*, zwei in *CUX1*, zwei in *ZRSR2*, zwei in *IDH2*, zwei in *SETBP1* und je eine in *GATA2*, *STAG2*, *KIT*, *IDH1*, *CBL* und *RAD21*.



**Abbildung 32: Boxplot zum Vergleich der Zahl parallel vorliegender Mutationen zwischen Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp und solchen ohne**

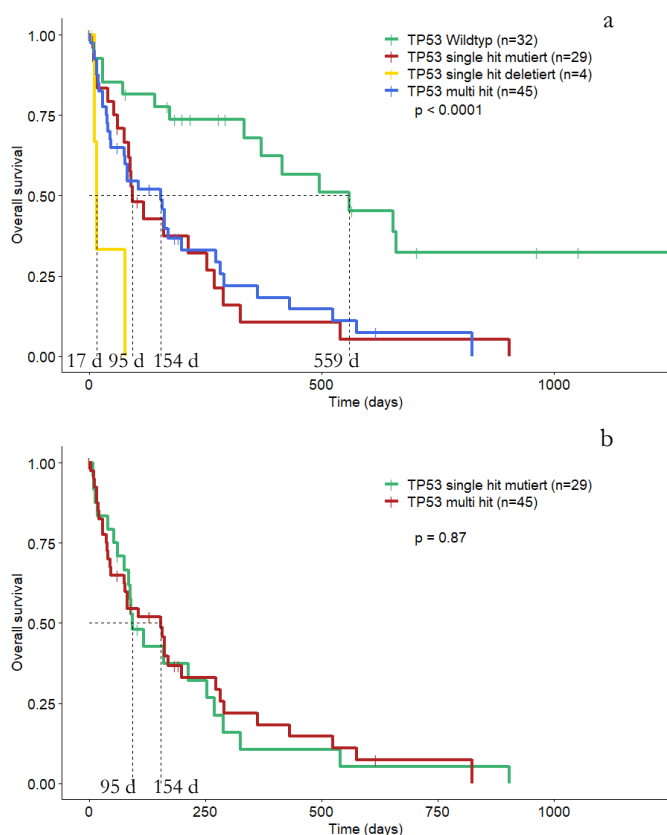
Dennoch unterscheidet sich der Median der Komutations-Zahl zwischen Patienten mit komplexen Karyotypen und solchen ohne nicht. In beiden Gruppen liegt dieser Median bei einer Komutation (p-Wert 0,033). Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 32 zu sehen.

### 3.4 *TP53*-Mutationen

80 der 115 untersuchten MDS-Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp wiesen irgendeine Art der *TP53*-Veränderung auf: 31 Patienten zeigten eine einfache Mutation, neun eine doppelte Mutation, 34 eine einfache Mutation und eine Deletion von 17p13, zwei sowohl eine doppelte Mutation als auch eine Deletion und vier Patienten zeigten eine Deletion ohne detektierbare Mutation. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben, zeigten Patienten mit *TP53*-Affektion mehr zytogenetische Aberrationen, weniger parallel vorliegende Komutationen und einen höheren Anteil myeloischer Blasten im Knochenmark. Wie bereits bei Bernard et al. (2020) wurde auch hier untersucht, inwiefern sich die verschiedenen Arten der *TP53*-Veränderungen voneinander unterscheiden. Dazu teilten wir innerhalb der Kohorte der Patienten mit komplexem Karyotyp vier Gruppen ein: Gruppe 1 bildeten die Patienten mit *TP53*-Wildtyp, Gruppe 2 die Patienten, die eine einzelne *TP53*-Mutation trugen (*single-bit*-Mutation). Gruppe 3 bestand aus den nur vier Patienten, die eine 17p-Deletion ohne Mutation in der Sequenzierung aufwiesen (*single-bit*-Deletion). Gruppe 4 bestand aus den Patienten, bei denen *TP53* mehrmals betroffen war, entweder durch mehrere Mutations-Klone oder durch eine Kombination von Mutation und Deletion (*multi bit*). Diese vier Gruppen wurden miteinander verglichen. Des Weiteren wurde eine Untersuchung durchgeführt, welchen Einfluss die Klongröße der *TP53*-Mutationen hat. Dazu wurde wiederum in der komplexen Kohorte eine Analyse anhand der verschiedenen „*variant allele frequencies*“ (VAF) durchgeführt. Da diese nicht für alle Patienten bekannt war, konnten hier 49 der 80 Patienten mit *TP53*-Veränderungen im Vergleich zu denen mit Wildtyp oder untereinander analysiert werden.

### 3.4.1 Art der *TP53*-Veränderung

#### 3.4.1.1 Überleben



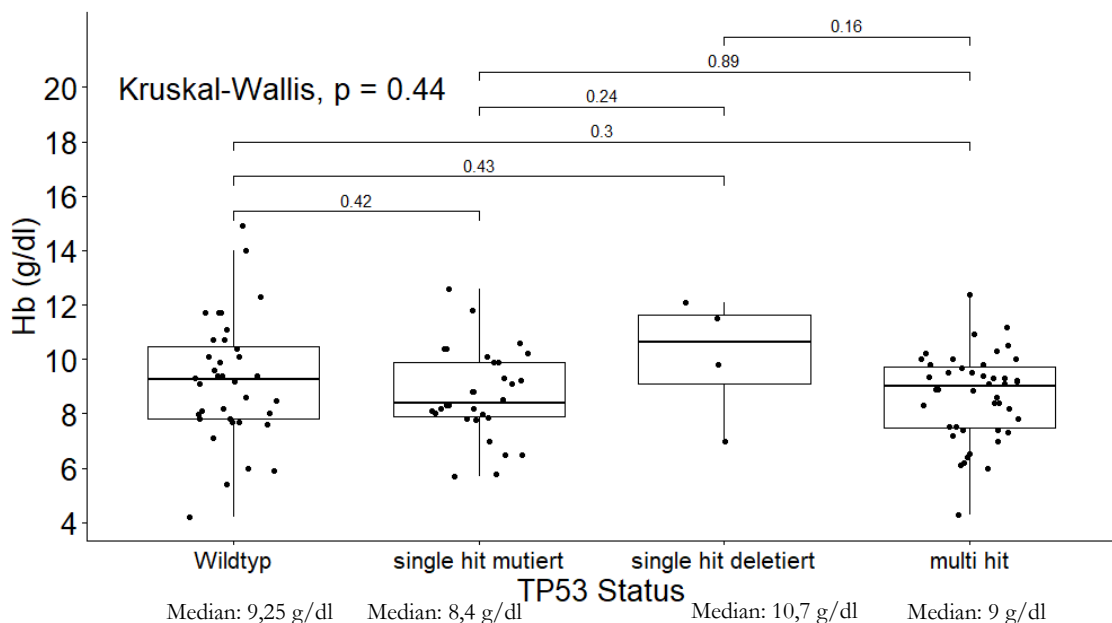
**Abbildung 33: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten mit komplexem Karyotyp nach Form der *TP53*-Veränderung** a: Wildtyp vs. *single-bit*-Mutation vs. *single-bit*-Deletion vs. *multi-bit*-Veränderung; b: *single-bit*-Mutation vs. *multi-bit*-Veränderung

quantifizieren, wurde die Überlebensanalyse noch einmal im isolierten Vergleich dieser zwei Gruppen durchführt. Hierbei zeigte sich kein Unterschied im medianen OS (p-Wert 0,87, Abb. 33b).

Wie bereits beschrieben, wurden die Patienten mit cA je nach *TP53*-Veränderung in vier verschiedene Gruppen eingeteilt (Wildtyp, *single-bit*-Mutation, *single-bit*-Deletion und *multi bit*). Diese vier Gruppen wurden einer Überlebens-Analyse zugeführt: Patienten mit einem *TP53*-Wildtyp erreichten ein medianes OS von 559 Tagen, solche mit einer *single-bit*-Mutation von 95 Tagen. Die vier Patienten mit *single-bit*-Deletion wiesen ein medianes OS von 17 Tagen auf, während das der Patienten mit *multi-bit-TP53*-Veränderungen 154 Tage betrug (p-Wert  $< 0,0001$ , Abb. 33a). Schon aus der Kaplan-Meier-Kurve dieser Analyse ließ sich ableiten, dass sich bei cA-Patienten mit *single-bit*-Mutation und *multi-bit*-Veränderung nicht wesentlich unterscheiden. Um diese Ähnlichkeit genauer zu

### 3.4.1.2 Blutwerte und Knochenmarks-Blasten

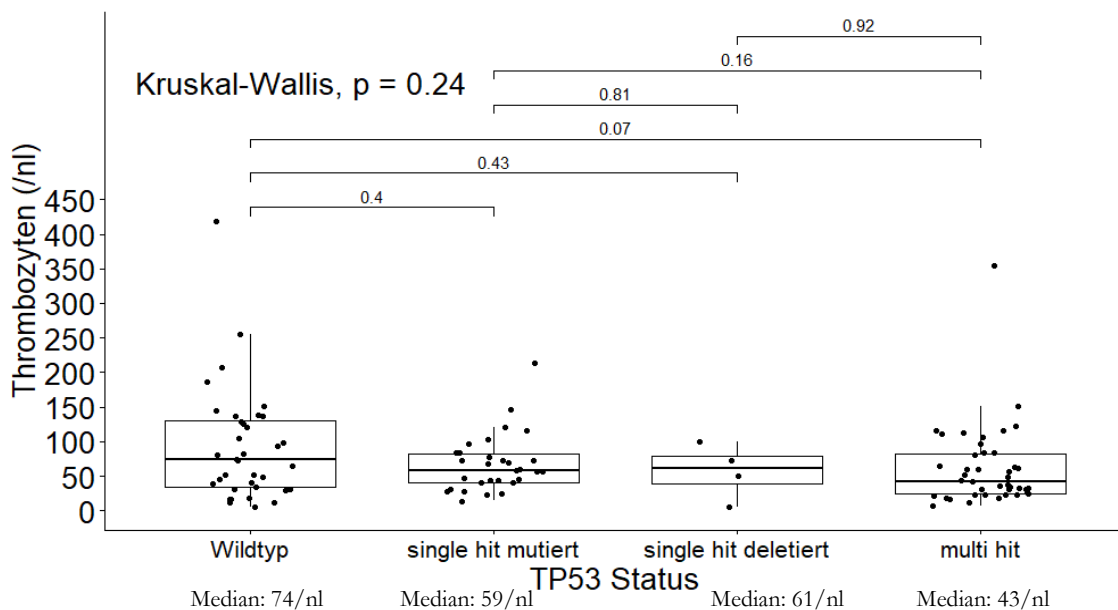
Wie bereits im generellen Vergleich der *TP53*-veränderten Patienten gegen die mit Wildtypen wurde auch der Hämoglobin-Wert der Patienten in den vier Gruppen miteinander verglichen. Auch in dieser Einteilung ließ sich kein signifikanter Unterschied in den Hb-Werten der unterschiedlichen Gruppen feststellen. Die Patienten mit *TP53*-Wildtyp wiesen einen medianen Hb-Wert von 9,25 g/dl auf, solche mit *single-hit*-Mutation einen von 8,4 g/dl. Patienten mit einer *single-hit*-Deletion zeigten einen Hb-Median von 10,7 g/dl und *multi-hit*-Patienten einen von 9 g/dl (p-Wert nach Kruskal-Wallis 0,44). Beim paarweisen Vergleich der vier Gruppen ließ sich bei keinem der sechs Vergleiche ein signifikanter Unterschied feststellen. Lediglich der mediane Hb-Wert der *single-hit*-deletierten Patienten ist etwas höher als die anderen, aufgrund der sehr geringen Gruppengröße ist dieses Ergebnis aber wenig aussagekräftig und erreicht auch im Vergleich zu keiner anderen Gruppe ein Signifikanzniveau. In Abbildung 34 sind diese Ergebnisse in Form eines Boxplots dargestellt.



**Abbildung 34: Boxplot zum Vergleich der Hämoglobin-Werte der Patienten mit cA nach Form der *TP53*-Veränderung**

Auch die Zahl der Blutplättchen wurde zwischen den Patienten mit verschiedenen Formen der *TP53*-Affektion untersucht. Dazu wurden analog zum Vergleich der Hämoglobin-Werte eine Untersuchung und ein Vergleich der Thrombozyten-Zahlen und den jeweiligen Medianen durchgeführt. Patienten mit *TP53*-Wildtyp wiesen einen Thrombozyten-Median von 74/nl auf, die mit *single-hit*-Mutation einen von 59/nl, Patienten mit *single-hit*-Deletion zeigten einen medianen Wert von 61/nl und solche mit mehrfach betroffenem *TP53* einen von 43/nl (p-Wert nach Kruskal-Wallis 0,24). Es wurde erneut auch ein paarweiser Vergleich der einzelnen Gruppen durchgeführt. Auch dabei ließ sich bei keinem der sechs Vergleiche ein signifikanter Unterschied feststellen. Der einzige Vergleich, der einen recht deutlichen Unterschied zeigt, ist der zwischen Wildtyp-Patienten und Patienten mit *multi hit*, dennoch

erreicht auch dieser mit einem p-Wert von 0,07 kein Signifikanzniveau. Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse ist Abb. 35 zu entnehmen.



**Abbildung 35: Boxplot zum Vergleich der Thrombozyten-Zahl der Patienten nach Form der *TP53*-Veränderung**

Zur Analyse der Unterschiede in der dritten Blutreihe wurden die Werte der neutrophilen Granulozyten zwischen den Gruppen mit den verschiedenen Formen der *TP53*-Veränderung verglichen. Dabei wurde vorgegangen wie bereits bei den anderen zwei Blutreihen. Der mediane ANC-Wert bei Wildtyp-Patienten lag bei 1,3/nl, der der Patienten mit *single-hit*-Mutation bei 0,7/nl. In der Gruppe mit *single-hit*-Deletion lag der Median bei 0,76/nl, in der mit *multi-hit*-Veränderung bei 0,9/nl (p-Wert nach Kruskal-Wallis 0,25). Nach paarweisem Vergleich der Werte in den Gruppen zeigte sich bei keinem der sechs durchgeführten Vergleiche ein signifikanter Unterschied. Der größte Unterschied ließ sich zwischen Wildtyp-Patienten und *single-hit*-Mutierten feststellen, jedoch betrug der p-Wert beim Vergleich dieser beiden Mediane auch nur 0,076. Bei den übrigen Paaren konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Die beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt.

Ein weiterer Vergleich zwischen den Gruppen mit verschiedenen Formen der *TP53*-Veränderung wurde zur Feststellung etwaiger Unterschied im Anteil myeloischer Blasten im Knochenmark durchgeführt. Dabei wurden für alle vier Gruppen mediane Werte errechnet und diese miteinander verglichen. Dabei ergab sich für Patienten mit Wildtyp-*TP53* ein medianer Wert von 8%, für solche mit *single-hit*-Mutation ein Median von 20%, für die Patienten mit *single-hit*-Deletion ein Wert von 8% und für die mit *multi-hit*-Veränderung ein



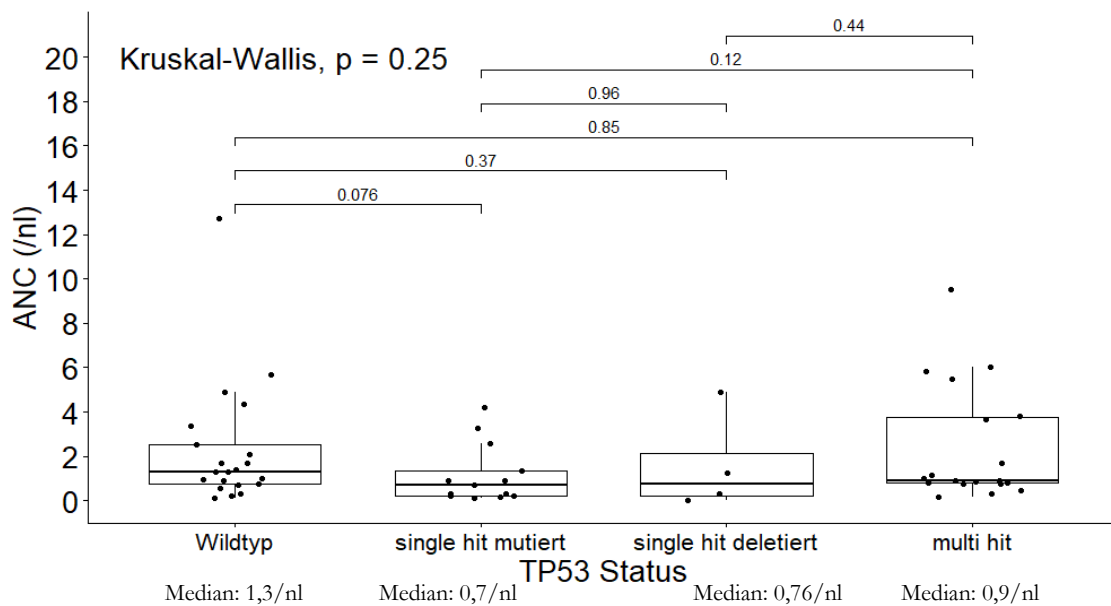


Abbildung 36: Boxplot zum Vergleich der Neutrophilen-Zahl der Patienten nach Form der *TP53*-Veränderung

medianer Blasten-Anteil von 16%. Dieser Vergleich verfehlte das Signifikanzniveau mit einem p-Wert nach Kruskal-Wallis von 0,06 nur knapp. Im erneut durchgeführten paarweisen Vergleich der medianen Blasten-Anteile zeigte sich im direkten Vergleich zwischen Wildtyp-Patienten und solchen mit *single-hit*-Mutation ein signifikanter Unterschied (p-Wert 0,026). Alle anderen Paare erreichten keinen signifikanten Unterschied, auch wenn beim Vergleich zwischen Wildtyp-*TP53* und *multi-hit*-Veränderung mit einem p-Wert von 0,061 zumindest einen Trend in Richtung ungünstigere Blasten-Anteile bei *multi-hit*-Patienten erahnen lässt. Die graphische Darstellung der hier berichteten Ergebnisse ist Abbildung 37 zu entnehmen.

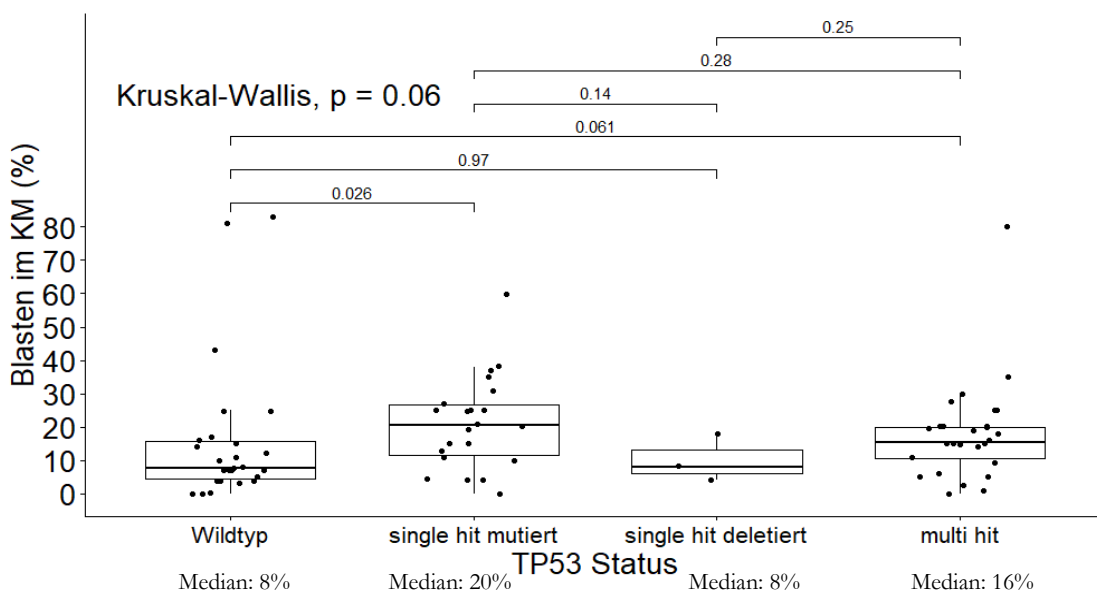
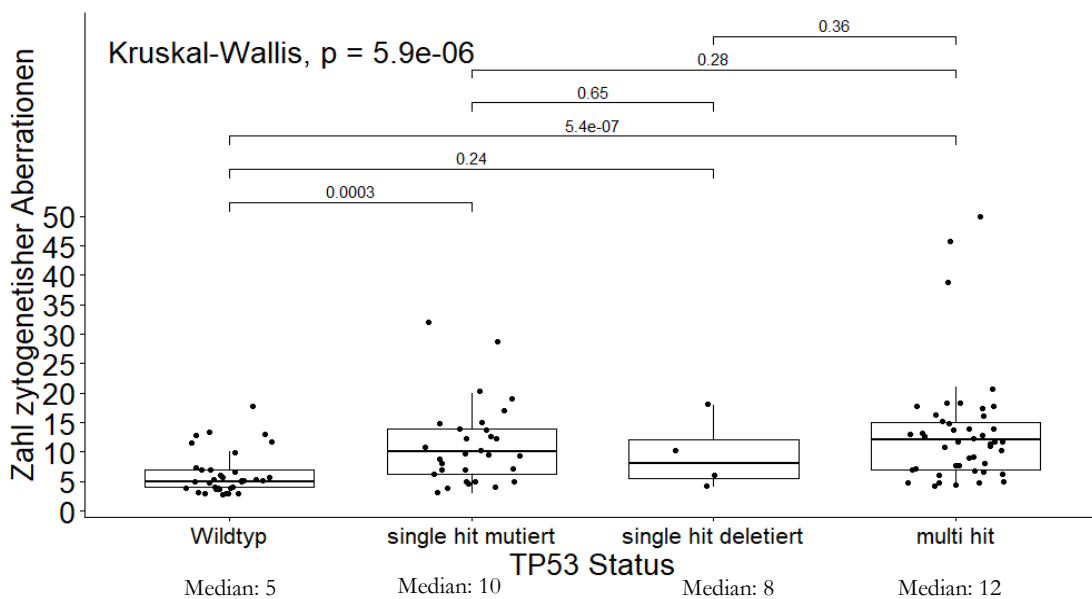


Abbildung 37: Boxplot zum Vergleich des Anteils myeloischer Blasten im Knochenmark der Patienten nach Form der *TP53*-Veränderung

### 3.4.1.3 Zahl zytogenetischer Aberrationen

Bereits in Kapitel 3.2.3 wurde eine Untersuchung der Kohorte mit komplexem Karyotyp und *TP53*-Veränderung im Vergleich zu Wildtyp-Patienten auf die Zahl der vorliegenden zytogenetischen Aberrationen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass Patienten mit betroffenem *TP53* mehr chromosomale Veränderungen aufwiesen als solche mit Wildtyp-*TP53*. In einer weiteren Analyse soll nun auch zwischen den unterschiedlichen Formen der *TP53*-Affektion unterschieden werden. Dazu wurde ein Vergleich der Zahl der Aberrationen zwischen den vier Gruppen durchgeführt. Hierbei wurde bei Patienten ohne *TP53*-Affektion eine mediane Aberrationszahl von fünf Veränderungen festgestellt, bei den Patienten mit *single-hit*-Mutation waren es zehn. Bei *single-hit*-Deletierten lag der Median bei acht Aberrationen und bei *multi-hit-TP53*-Veränderung sogar bei zwölf Aberrationen. Der p-Wert für diese Gesamtuntersuchung lag nach Kruskal-Wallis bei  $<0,0001$ . Im paarweisen Vergleich zwischen den vier Gruppen zeigten sich signifikante Unterschiede im Vergleich zwischen den Wildtyp-Patienten und denen mit *single-hit*-Mutation (p-Wert 0,0003) oder *multi-hit*-Affektion (p-Wert  $<0,0001$ ). Im Vergleich Wildtyp gegen *single-hit*-Deletion wurde kein Signifikanzniveau erreicht, was aber vor allem der Gruppengröße von nur vier Patienten mit *single-hit*-Deletion zuzuschreiben ist. Im Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen mit *TP53*-Veränderungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 38 dargestellt.

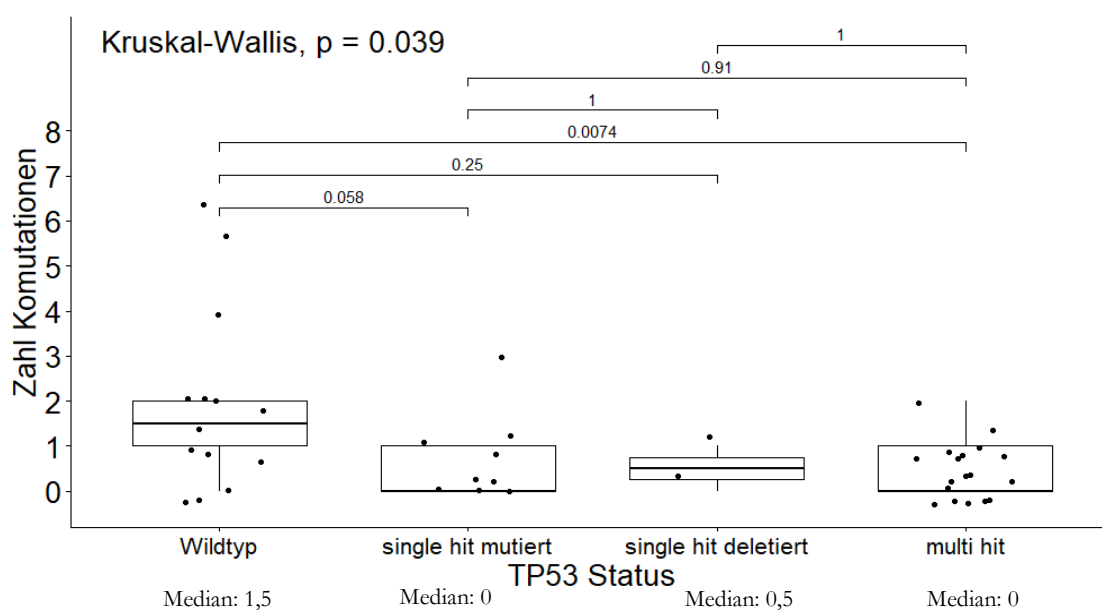


**Abbildung 38:** Boxplot zum Vergleich der Zahl zytogenetischer Aberrationen der Patienten nach Form der *TP53*-Veränderung

### 3.4.1.4 Komutationen

Nachdem in Kapitel 3.2.4 bereits festgestellt wurde, dass die Zahl der parallel vorliegenden somatischen Mutationen bei Patienten mit auf irgendeine Weise verändertem *TP53* geringer war als bei Wildtyp-Patienten, wurde die Zahl und die Art der Komutationen noch einmal in

Abhängigkeit von der Art der *TP53*-Affektion untersucht. Dazu wurde eine Untersuchung der festgestellten Mutationen bei den Patienten, bei denen eine umfangreiche molekulargenetischer Analyse vorlag, aufgetrennt in die vier Gruppen der *TP53*-Veränderungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, wie bereits in der Untersuchung in Kapitel 3.2.4, eine mediane Zahl parallel vorliegender somatischer Mutationen von 1,5 in der Gruppe der Wildtyp-Patienten. Sowohl bei *single-hit*-Mutation als auch bei *multi-hit*-Veränderung lag dieser Median bei null Mutationen. Bei Patienten mit *single-hit*-Deletion wurde eine mediane Komutationszahl von 0,5 festgestellt, allerdings gingen hier auch nur zwei Patienten in die Analyse mit ein. Der p-Wert nach Kruskal-Wallis lag für diesen Vier-Gruppen-Vergleich bei 0,039 und ist damit als signifikanter Unterschied zu werten. Bei Betrachtung der paarweisen Vergleiche zeigt sich nur beim direkten Vergleich von Wildtypen und *multi-hit*-Betroffenen ein signifikanter Unterschied (p-Wert 0,0074), der Vergleich zwischen Wildtypen und *single-hit*-Mutierten verfehlt das festgelegte Signifikanzniveau mit einem p-Wert von 0,058 knapp. Dennoch lässt sich wohl zumindest ein Trend in Richtung weniger somatische Komutationen bei mutiertem *TP53* erkennen. Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt.



**Abbildung 39: Boxplot zum Vergleich der Zahl zytogenetischer Aberrationen der Patienten nach Form der *TP53*-Veränderung**

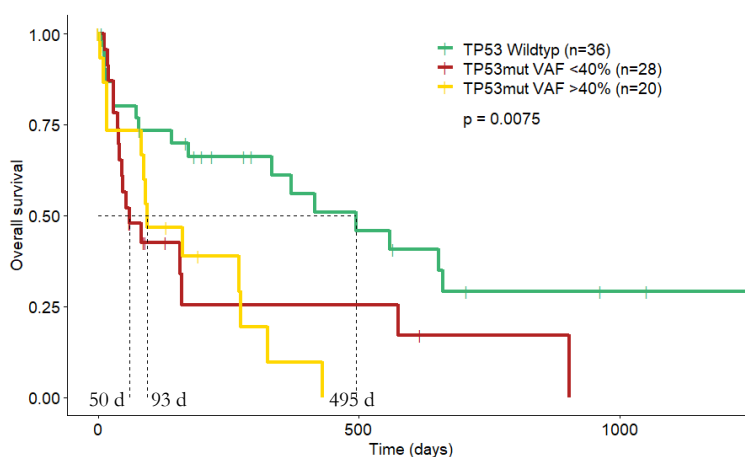
Die Art der Mutationen in der Gruppe der Wildtyp-Patienten ist Kapitel 3.2.4 zu entnehmen. Eine Untersuchung und Aufteilung in die einzelnen Formen der *TP53*-Affektion wurde durchgeführt. Dabei ließen sich in der Gruppe mit *single-hit*-Mutation, in der für zehn der 31 Patienten eine umfangreiche NGS-Analyse durchgeführt wurde, insgesamt sieben Mutationen aufgeteilt auf fünf Patienten feststellen. Von diesen fünf Patienten wiesen vier nur eine einzelne somatische Komutation auf, bei einem fünften wurden drei Mutationen beobachtet. Bei diesen sieben Mutationen handelt es sich um zwei Mutationen in *TET2*, eine

in *SRSF2*, eine in *DNMT3A*, eine in *EZH2*, eine in *PFH6* und eine in *IDH2*. In der Gruppe der *single-bit*-Deletierten lag für zwei der vier Patienten ein Ergebnis aus dem NGS-Panel vor, welches lediglich eine Mutation in *RUNX1* nachwies. In der Gruppe mit *multi-bit*-verändertem *TP53* lagen für 17 der 45 Patienten umfassende molekulargenetische Analysen vor. Dabei wurden neun Mutationen in acht Patienten festgestellt, von denen nur einer zwei Mutationen aufwies. Diese neun Mutationen gliedern sich auf in zwei Mutationen in *PFH6*, und je eine in *RUNX1*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *TET2*, *EZH2*, *NOTCH1* und *NRAS*.

### 3.4.2 Variante Allelfrequenz der *TP53*-Mutationen

#### 3.4.2.1 Überleben

Welchen Einfluss die Klonegröße der *TP53*-mutierten Zellklone (*TP53*mut-Klone) auf das Überleben der Patienten hat, diskutierten auch schon Sallman et al. (2016) sowie Haase et al. (2019). Um den Einfluss der VAF auf die hier analysierte Kohorte von Patienten mit komplexen Karyotypen zu untersuchen, wurden anhand der Klonegröße drei Gruppen gebildet. Eine Gruppe umfasste die Patienten ohne *TP53*-Mutation. In dieser Gruppe finden sich auch die Patienten mit einer reinen 17p-Deletion, aber ohne nachweisbare *TP53*-Mutation. Diese Gruppe wird im Weiteren als Wildtyp-Gruppe bezeichnet, da hier nur der molekulargenetische *TP53*-Status betrachtet wird. Eine zweite Gruppe bildeten *TP53*-Mutierte mit einer VAF <40%, die dritte Gruppe Patienten mit einer *TP53*mut-VAF von  $\geq 40\%$ . Die Grenze von 40% orientierte sich an den Ergebnisse von Sallman et al. (2016). Diese drei Gruppen wurden hinsichtlich ihres medianen Überlebens untersucht und verglichen. Nicht für alle Patienten war eine VAF verfügbar, da vor der Etablierung der NGS-Analyse in unserem Labor analysierte und eingeschlossene Patienten nach Sanger sequenziert wurden. Die hier betrachteten Fallzahlen sind also niedriger als in den vorangegangenen Analysen



**Abbildung 40: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten mit komplexem Karyotyp nach Größe der *TP53*-mutierten Zellklone**

Bei den Patienten mit molekulargenetischem *TP53*-Wildtyp wurde ein medianes OS von 495 Tagen beobachtet. Patienten mit einer VAF <40% erreichten ein medianes OS von 40 Tagen, solche mit einer VAF  $\geq 40\%$  von 93 Tagen (p-Wert 0,0075). Zwischen den Gruppen mit einer VAF von mehr oder weniger als 40% ließ sich kein signifikanter

Unterschied im medianen Überleben feststellen, dennoch sind die Kurvenverläufe in ihrer Dynamik unterschiedlich. Während der Verlauf sich bis zum Erreichen des Medians bei beiden Gruppen ähnlich ist, flachte die Kurve der Patienten mit geringerer VAF im Verlauf etwas ab, während die der Patienten mit hoher VAF kontinuierlich fiel. Daher lässt sich zumindest ein Trend der ungünstigeren Prognose bei höherer VAF ablesen. Die beschriebenen Kurven finden sich in Abbildung 40.

#### 3.4.2.2 Blutwerte und Knochenmarks-Blasten

Zur Analyse auf etwaige Unterschiede in den Blut- und Blasten-Werten sowie Aberrations- und Komutations-Zahl wurde die Kohorte der Patienten mit cA entsprechend ihrer VAF in vier Gruppen unterteilt. Wie bereits in der Überlebensanalyse bildeten die Patienten, die keine molekulargenetische *TP53*-Mutation aufwiesen, Gruppe 1. Gruppe 2 bestand aus Patienten mit einer *TP53*mut-VAF von <20%, Gruppe 3 aus Patienten mit einer Klongröße von 20-39%. Die letzte Gruppe bildeten erneut die Patienten, bei denen eine VAF von  $\geq 40\%$  festgestellt werden konnte.

Zuerst wurden diese vier Gruppen auf ihre medianen Hb-Werte untersucht und verglichen. Dabei zeigte sich in der Wildtyp-Gruppe ein Median bei 9,25 g/dl, in Gruppe 2 bei 10 g/dl. Patienten mit einer VAF  $\geq 20\%$ -<40% zeigten einen medianen Hb-Wert von 8,4 g/dl, während der der Patienten mit  $\geq 40\%$  einen bei 9,15 g/dl lag. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den medianen Hb-Werten festgestellt werden (p-Wert nach Kruskal-Wallis 0,59). Auch in den sechs paarweisen Vergleichen konnte bei keinem ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Abbildung 41 zeigt die hier geschilderten Ergebnisse.

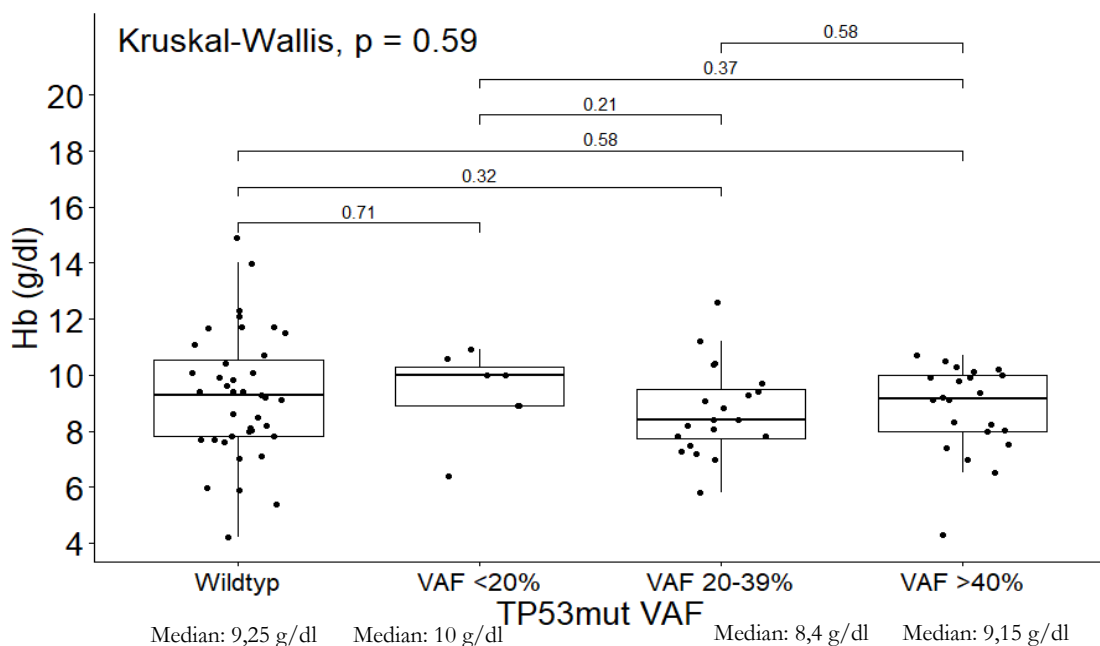
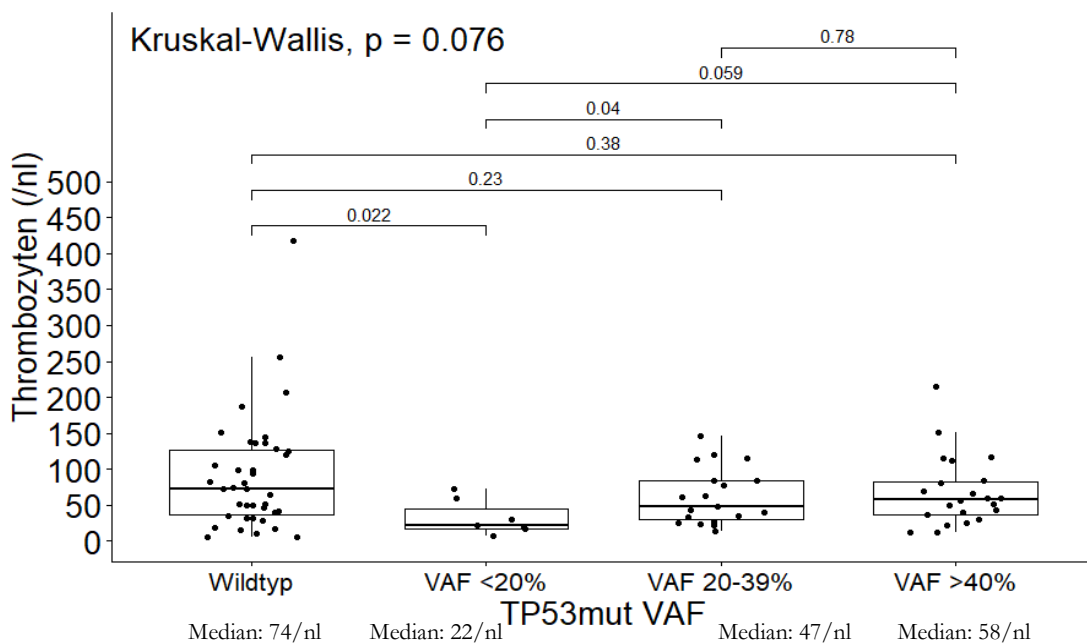


Abbildung 41: Boxplot zum Vergleich der Hämoglobin-Werte der Patienten mit cA nach Klongröße (VAF) der *TP53*-Mutationen

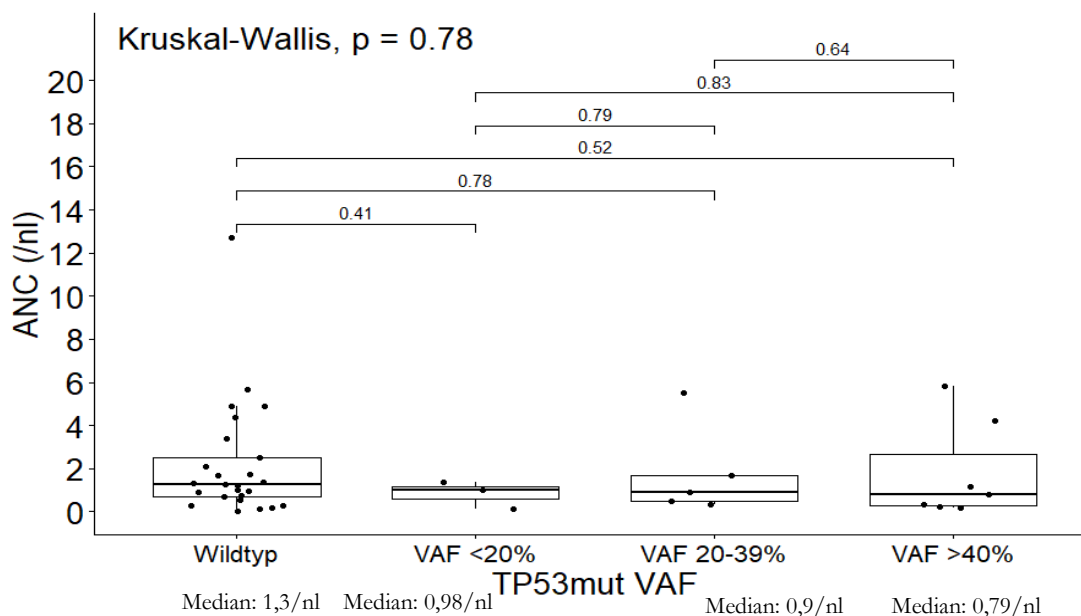
Zur Untersuchung der zweiten Blutreihe wurde die Zahl der Thrombozyten der Patienten mit den unterschiedlichen Klongrößen verglichen. Dieser Vergleich wurde analog zu dem der Hämoglobin-Werte in vier Gruppen durchgeführt. Dabei zeigte sich bei Patienten ohne *TP53*-Mutation ein medianer Thrombozyten-Wert von 74/nl, der Median bei Patienten mit einer VAF <20% lag bei 22/nl. In der dritten Gruppe mit einer VAF von 20-39% wurde ein medianer Wert von 47/nl beobachtet, während der der Patienten mit einer Klonggröße  $\geq 40\%$  bei 58/nl lag (p-Wert nach Kruskal-Wallis 0,076). In den paarweise durchgeführten Vergleichen der medianen Thrombozyten-Werte der Gruppen zeigte sich nur in einem der sechs Vergleiche ein signifikanter Unterschied: Beim Vergleich der Mediane ergab sich zwischen Wildtyp-Patienten und solchen mit einer VAF <20% ein p-Wert von 0,022. Da die Gruppe der Patienten mit Klongrößen <20% allerdings nur aus sieben Patienten bestand, muss dieser Unterschied bezüglich seiner Aussagekraft kritisch betrachtet werden. Beim Vergleich der übrigen Paare zeigte sich kein weiterer signifikanter Unterschied, obwohl der Unterschied zwischen einer VAF <20% und  $\geq 40\%$  mit einem p-Wert von 0,059 das Signifikanzniveau nur knapp verfehlte. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abbildung 42.



**Abbildung 42: Boxplot zum Vergleich der Thrombozyten-Zahlen der Patienten nach Klonggröße (VAF) der *TP53*-Mutationen**

Als dritter und letzter Blutwert wurde die Zahl der neutrophilen Granulozyten untersucht. Dabei erfolgte der Vergleich erneut in den vier zuvor beschriebenen Gruppen. In der Gruppe mit Patienten ohne somatische *TP53*-Mutation zeigte sich bei der Zahl der Neutrophilen ein Median von 1,3/nl. Dieser Mediane betrug bei Patienten mit einer VAF <20% 0,98/nl. Patienten, die eine *TP53*-Mutation mit einer Klonggröße von 20-39% aufwiesen, zeigten einen medianen Neutrophilen-Wert von 0,9/nl und die mit einer VAF  $\geq 40\%$  wiesen einen medianen Wert von 0,79/nl auf (p-Wert nach Kruskal-Wallis 0,78). In dieser Untersuchung

konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch im paarweisen Vergleich wurde bei keiner der sechs Analysen das Signifikanzniveau erreicht. In Abbildung 43 sind diese Ergebnisse dargestellt.



**Abbildung 43: Boxplot zum Vergleich der Neutrophilen-Zahlen der Patienten nach Klongröße (VAF) der *TP53*-Mutationen**

Eine weitere Untersuchung wurde durchgeführt, um den Anteil der myeloischen Blasten am Knochenmark in Abhängigkeit von der *TP53*-Klongröße zu analysieren. Dazu erfolgte ein Vergleich des Blasten-Anteils am Knochenmark in den vier Gruppen, die auch schon in den vorangegangenen Analysen angewandt wurden. In der Gruppe der Patienten ohne *TP53*-Mutation betrug dieser Anteil im Median 8%. In den Gruppen mit einer VAF <20%, 20-<40% und  $\geq$ 40% betrug die medianen Blasten-Anteile 11%, 16% und 17% (p-Wert 0,38). Dieser fehlende Unterschied zwischen den Gruppen steht im Kontrast zu der Beobachtung, dass Patienten mit *TP53*-Veränderung tendenziell einen größeren Anteil an Knochenmarks-Blasten aufweisen (s. Kapitel 3.2.2). Auch im paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der größte Unterschied zwischen den medianen Blasten-Anteilen bestand mit einem p-Wert von 0,084 zwischen Patienten ohne und solchen mit einer Mutation mit einer Klongröße von 20-<40%. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 44 zu finden.

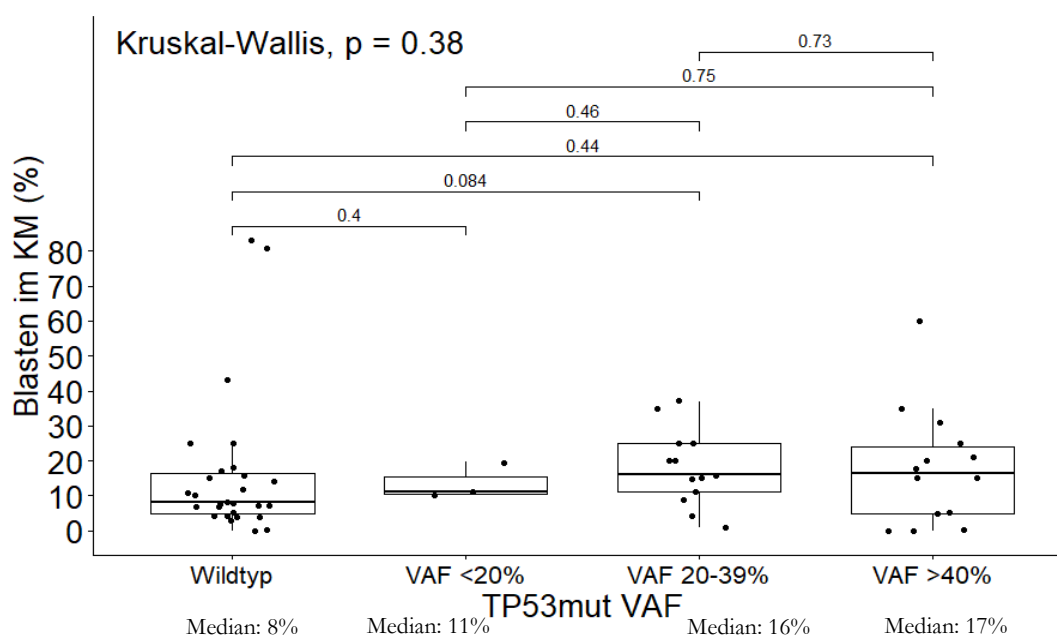


Abbildung 44: Boxplot zum Vergleich des Blasten-Anteils am Knochenmark der Patienten nach Klongröße (VAF) der *TP53*-Mutationen

#### 3.4.2.3 Zahl zytogenetischer Aberrationen

Die Aufteilung der Patienten in die vier Gruppen je nach Klongröße der *TP53*-Mutation wurde auch für den Vergleich der Zahl der chromosomalen Veränderungen beibehalten. Für diese vier Gruppen wurde die mediane Zahl der zytogenetischen Aberrationen bestimmt und miteinander verglichen. Patienten, bei denen keine *TP53*-Mutation festgestellt werden konnte, zeigten eine mediane Aberrationszahl von fünf chromosomalen Veränderungen. Bei Patienten mit einer VAF <20% lag dieser Median bei 13 Veränderungen, bei einer VAF von 20-39% bei elf Aberrationen. Patienten mit einer VAF  $\geq 40\%$  wiesen eine mediane Aberrationszahl von 14 auf ( $p$ -Wert nach Kruskal-Wallis  $< 0,0001$ ). Im paarweisen Vergleich der Gruppen ließen sich zwischen Wildtypen und jeder Größe der *TP53*-Mutationen signifikante Unterschiede feststellen: beim Vergleich Wildtyp gegen VAF <20% betrug der  $p$ -Wert 0,002, beim Vergleich Wildtyp gegen VAF 20-40% 0,00038 und beim Vergleich Wildtyp gegen VAF  $\geq 40\%$   $< 0,0001$ . Beim Vergleich der Gruppen mit verschiedenen großen *TP53*-mut-Klonen untereinander konnte bei keinem der drei Vergleiche ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 45 dargestellt.

Des Weiteren führten wir eine Analyse zur Korrelation zwischen der Größe des *TP53*-mutierten Zellklons und der Zahl der zytogenetischen Aberrationen durch. Dabei konnte eine positive Korrelation festgestellt werden, sodass in unserer Kohorte Patienten mit größerer VAF tendenziell eine höhere Zahl chromosomaler Veränderungen zeigten (Abbildung 46).



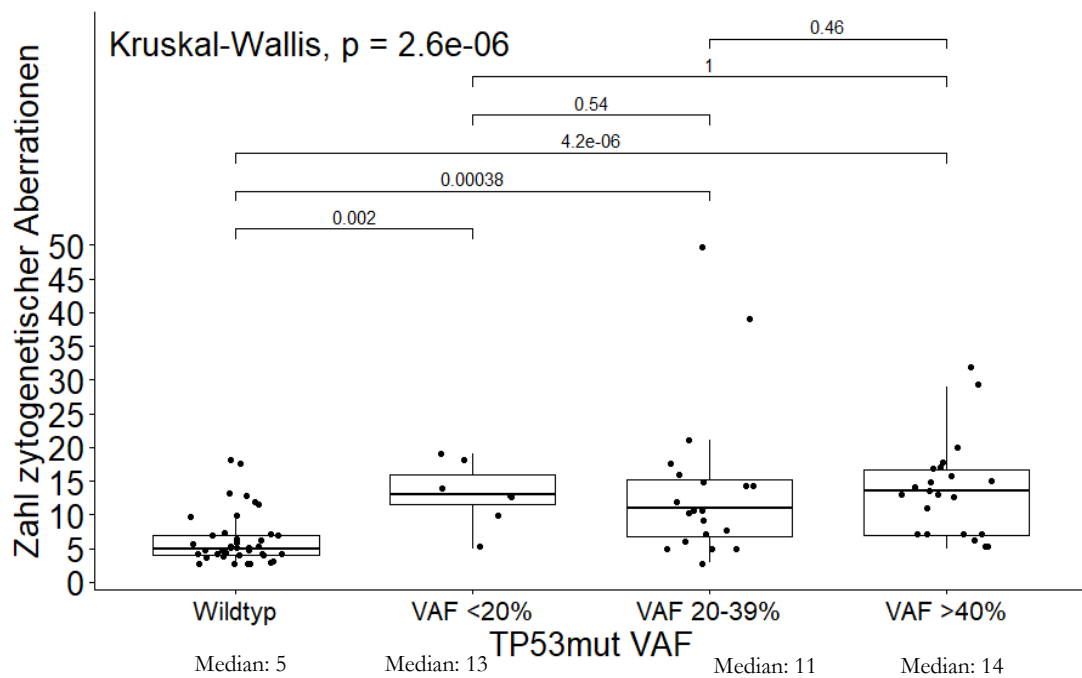


Abbildung 45: Boxplot zum Vergleich der Zahl zytogenetischer Aberrationen der Patienten nach Klonegröße (VAF) der *TP53*-Mutationen

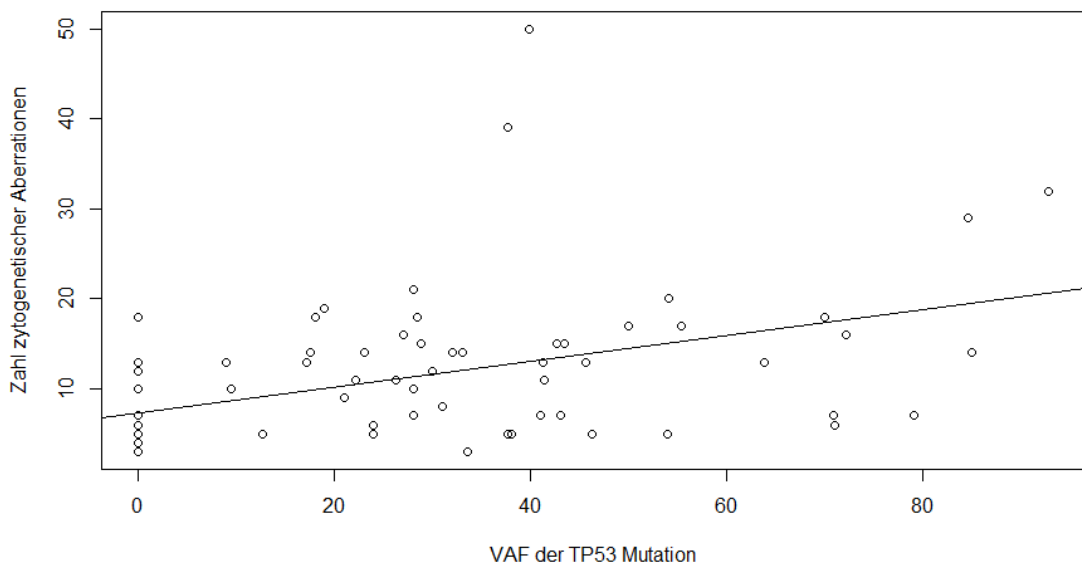
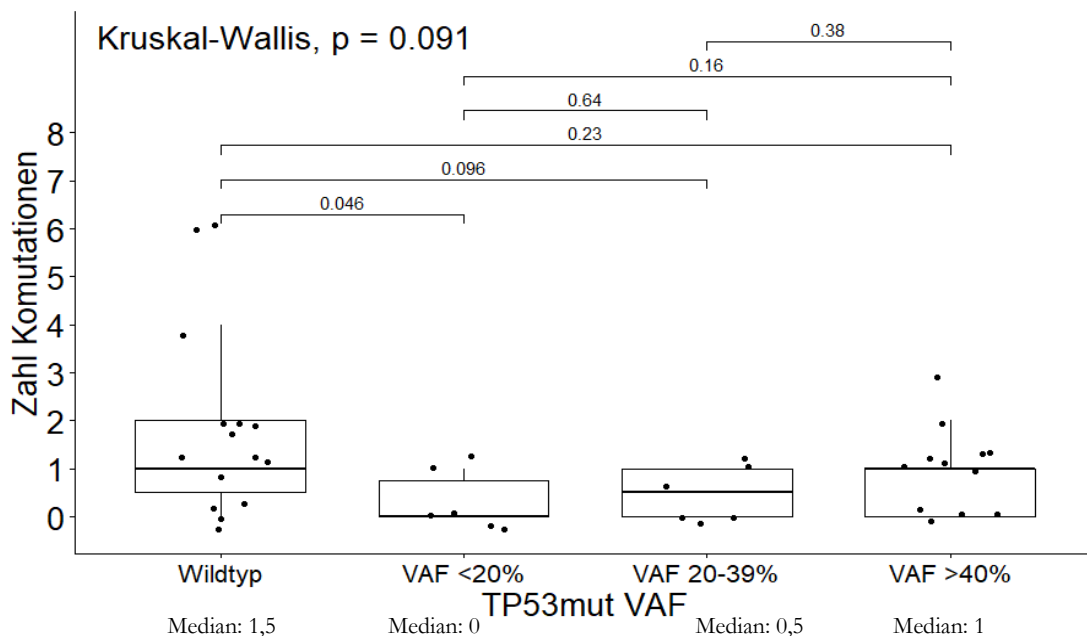


Abbildung 46: Scatter Plot zur Korrelation zwischen der Klonegröße der *TP53*-Mutationen und der Zahl zytogenetischer Aberrationen x-Achse: Klonegröße der *TP53*-Mutation, y-Achse: Zahl zytogenetischer Aberrationen

#### 3.4.2.4 Komutationen

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Zahl der parallel vorliegenden somatischen Mutationen mit steigender VAF des *TP53*mut-Klons verändert. Dazu wurden die bereits

etablierten vier Gruppen auf das Vorliegen von Komutationen untersucht und verglichen. Dabei zeigte sich für Patienten ohne nachweisbare Mutation eine mediane Komutationszahl von 1,5. Bei Patienten mit einer Klrongröße ihrer *TP53*-Mutation  $<20\%$  lag der Median bei null, bei einer VAF von 20-39% bei 0,5. Patienten, deren VAF  $\geq 40\%$  war, wiesen im Median eine Komutation auf (p-Wert nach Kruskal-Wallis 0,091). Im paarweisen Vergleich erreichte nur einer der sechs Vergleiche das Signifikanzniveau. Dabei handelte es sich um den Vergleich zwischen Wildtyp-Patienten und solchen mit einer VAF  $<20\%$  (p-Wert 0,046). Die p-Werte in den Vergleichen der Wildtypen mit Patienten mit einer VAF von 20-39% und mit denen mit einer VAF  $\geq 40\%$  betragen 0,096 und 0,23, sodass der Eindruck entsteht, als würde der Unterschied mit steigender VAF geringer. Auch in den Vergleichen der Gruppen mit *TP53*-Mutation untereinander konnte kein Unterschied nachgewiesen werden. Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist Abbildung 47 zu entnehmen.



**Abbildung 47: Boxplot zum Vergleich der parallel vorliegenden somatischen Mutationen der Patienten nach Klrongröße (VAF) der *TP53*-Mutationen**

Neben der Zahl parallel vorliegender Komutationen wurde auch die Zahl der verschiedenen *TP53*-mutierten Klone betrachtet. Dabei ließ sich feststellen, dass in der Gruppe der Patienten mit einer VAF  $<20\%$  drei der sieben analysierten Patienten (42,9%) nicht nur einen, sondern zwei *TP53*-mutierte Klone aufwiesen. In der Gruppe der Patienten mit einer VAF von 20- $<40\%$  konnte bei sechs der 20 untersuchten Patienten (30%) eine zweite *TP53*-Mutation festgestellt werden. Bei den Patienten mit einer VAF  $\geq 40\%$  wurde eine zweite Mutation bei nur zwei von 22 Patienten (9%) beobachtet.

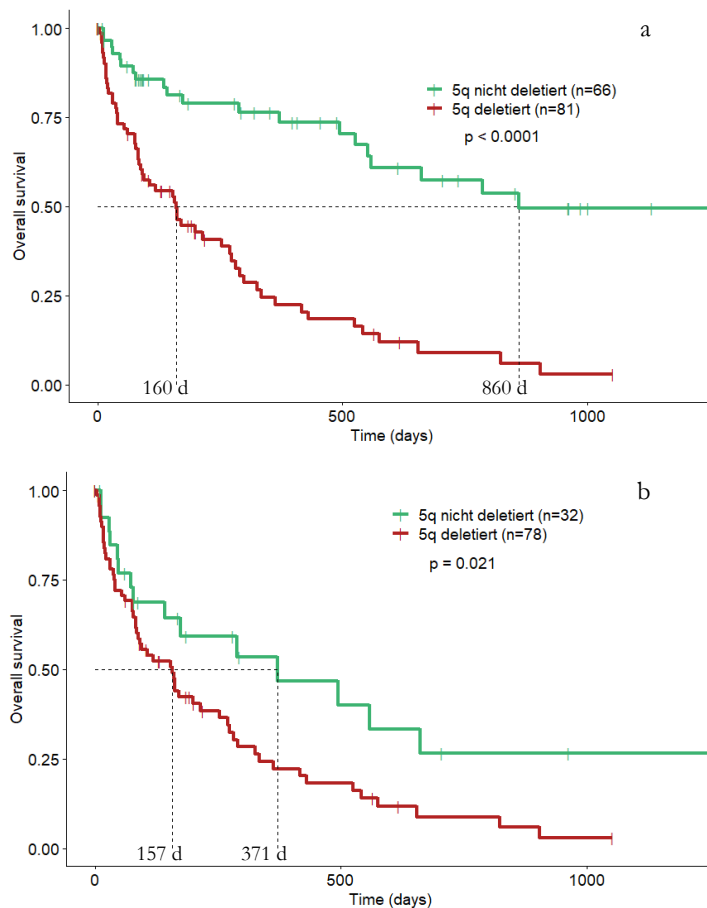
### 3.5 5q-Veränderungen

Eine Deletion im langen Arm von Chromosom 5 (del(5q)) ist die häufigste zytogenetische Veränderung, die bei Patienten mit MDS beobachtet werden kann. In seiner isolierten Form

ist die Veränderung oft mit einer günstigen Prognose assoziiert (Adema and Bejar 2013), als Teil eines komplexen Karyotyps ist seine Rolle allerdings noch nicht abschließend geklärt.

### 3.5.1 5q-Deletionen

#### 3.5.1.1 Überleben



**Abbildung 48: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten nach 5q-Deletions-Status** a: Gesamtkohorte, b: Kohorte mit komplexem Karyotyp

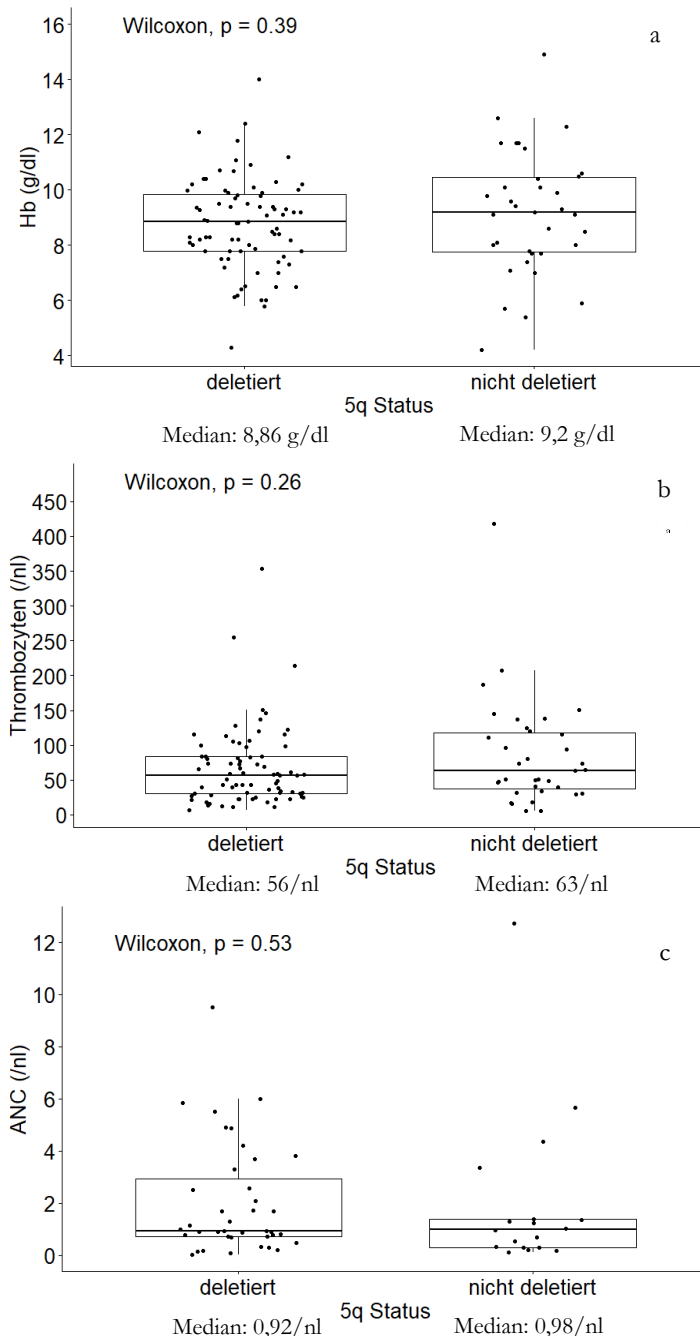
medianes OS von 860 Tagen, während Patienten mit Deletion das mediane OS bereits nach 160 Tagen erreichten ( $p$ -Wert  $< 0,0001$ , Abb. 48a). Da der größte Teil der Patienten mit Deletion einen komplexen Karyotyp aufwies, wurde auch die reine cA-Kohorte analysiert, in der sich wiederum deutlich weniger Patienten ohne 5q-Deletion fanden. Hier wurde bei Patienten ohne Deletion ein medianes OS von 371 Tagen erreicht, während das der Patienten mit  $\text{del}(5q)$  bei 157 Tagen lag ( $p$ -Wert  $0,021$ , Abb. 48b). Auch hier blieb der Unterschied signifikant.

Da eine Deletion von 5q auch bei Patienten mit komplexen Karyotypen einen Einfluss auf das Überleben zu haben scheint und deshalb einen möglichen zusätzlichen Risikofaktor darstellt, wurden weitere Untersuchungen zum Einfluss der  $\text{del}(5q)$  auf verschiedene

Es wurde eine Analyse des medianen Überlebens der Gesamtkohorte und der Kohorte mit cA abhängig vom 5q-Status durchgeführt. Dabei wurden Patienten, die irgendeine Form der 5q-Deletion aufwiesen, von solchen unterschieden, in denen 5q nicht von zytogenetischen Veränderungen betroffen war bzw. es zu keiner Deletion gekommen war. In der Gesamtkohorte waren für 66 Patienten mit nicht deletiertem 5q und 81 Patienten mit 5q-Deletion Überlebensanalysen möglich, in der Kohorte mit cA wurde die Analyse an 32 Patienten ohne und 78 Patienten mit Deletion durchgeführt. Dabei zeigte sich in der Gesamtkohorte bei Patienten ohne Deletion ein

Faktoren untersucht. Diese Analyse, die alle an der Kohorte der Patienten mit cA durchgeführt wurden, sind im Folgenden dargestellt.

### 3.5.1.2 Blutwerte und Knochenmarks-Blasten



**Abbildung 49: Boxplot zum Vergleich der Blutwerte der Patienten nach 5q-Deletions-Status** a: Hämoglobin-Werte, b: Thrombozytenzahlen, c: Zahl der Neutrophilen

zwischen den medianen Thrombozyten-Zahlen festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind in Abb. 49b zu sehen.

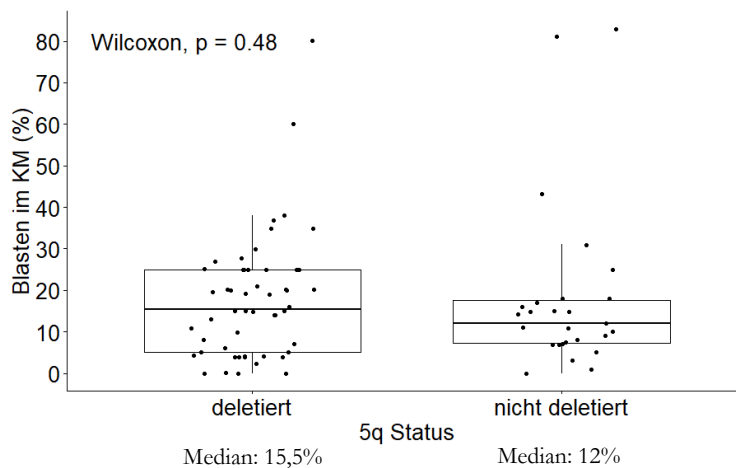
Analog zu der Untersuchung der Patienten mit und ohne *PPM1D*- bzw. *TP53*-Mutation wurden auch an dieser Stelle zuerst Unterschiede in den Blutwerten betrachtet. Als erster Parameter erfolgte die Analyse der Hb-Werte. Bei Patienten mit *del(5q)* lag der mediane Hb-Wert bei 8,86 g/dl, bei Patienten, bei denen eine *del(5q)* kein Teil des Aberrationsmusters war, lag dieser Median bei 9,2 g/dl (p-Wert nach Wilcoxon 0,39). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den medianen Werten festgestellt werden. Die Verteilung der verschiedenen Hb-Werte ist in Abbildung 49a dargestellt.

Als nächster Parameter wurden die unterschiedlichen Zahlen der Blutplättchen verglichen. Dabei zeigte sich bei Patienten, bei denen eine Deletion von 5q nachgewiesen werden konnte, ein medianer Thrombozyten-Wert von 56/nl. Dieser mediane Wert lag bei Patienten, bei denen keine 5q-Deletion festgestellt werden konnte, bei 63/nl (p-Wert nach Wilcoxon 0,26). Auch hier konnte kein Unterschied

Als dritter und letzter Vergleich der Parameter aus dem peripheren Blut wurden die Zahlen der neutrophilen Granulozyten verglichen. Dabei lag der mediane Wert bei Patienten mit del(5q) bei 0,92/nl, der der Patienten ohne del(5q) bei 0,98/nl (p-Wert nach Wilcoxon 0,53). Die Verteilung der ANC-Werte ist Abbildung 49c zu entnehmen.

Bei allen drei Vergleichen lagen die Werte der Patienten mit del(5q) etwas unterhalb der der Patienten ohne Deletion, dennoch konnte in keiner der drei Reihen ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne del(5q) festgestellt werden.

Weiterhin wurde ein Vergleich des Anteils der myeloischen Blasten am Knochenmark



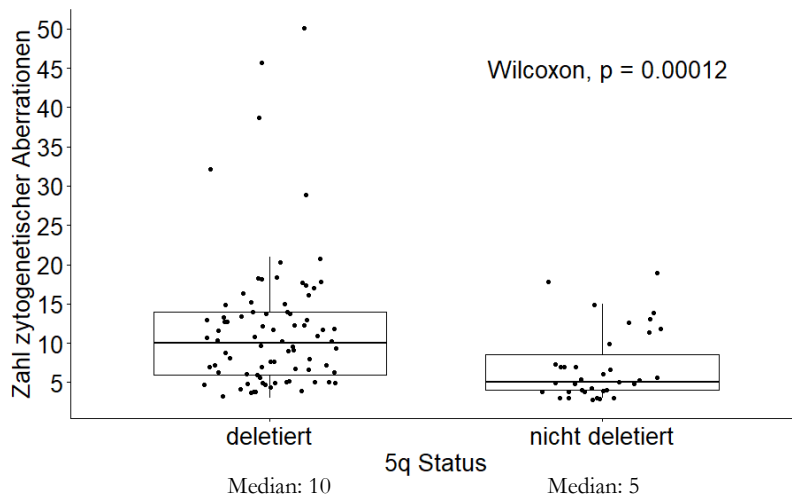
**Abbildung 50: Boxplot zum Vergleich des Anteils myeloischer Blasten am Knochenmark der Patienten nach 5q-Deletions-Status**

durchgeführt. Dazu wurden die medianen KM-Blasten-Werte für Patienten mit und ohne del(5q) ermittelt und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich bei den Patienten, bei denen eine del(5q) nachweisbar war, ein medianer Blasten-Anteil von 15,5%. Patienten ohne 5q-Deletion wiesen einen medianen Wert von 12% auf (p-Wert nach Wilcoxon 0,48). Wie auch

schon bei den Blutwerten weisen Patienten mit del(5q) minimal ungünstigere Werte auf, allerdings ist dieser Unterschied auch bei den KM-Blasten nicht groß genug, um ein Signifikanzniveau zu erreichen. Eine graphische Darstellung der Blasten-Werte ist in Abbildung 50 zu sehen.

### 3.5.1.3 Zahl zytogenetischer Aberrationen

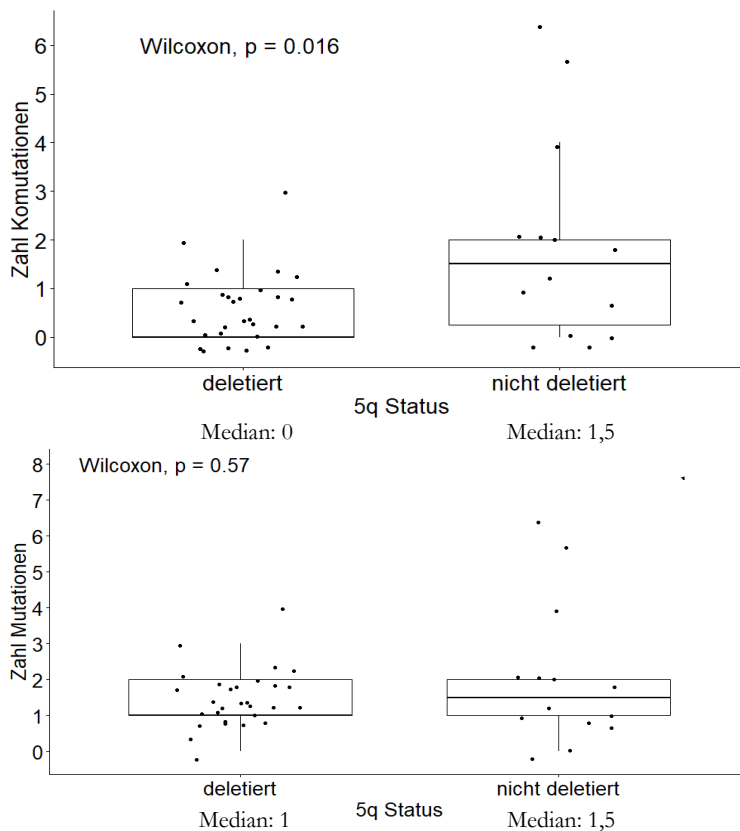
5q-Deletionen sind bei Patienten mit MDS die einzigen zytogenetischen Veränderungen, die gemäß der WHO-Klassifikation von 2016 einen eigenen Subtyp definiert (Arber et al. 2016). Dafür muss die del(5q) entweder isoliert oder in Kombination einer weiteren Veränderung, die nicht das Chromosom 7 betreffen darf, auftreten (s. Kapitel 1.1.3, Tabelle 1). Die meisten 5q-Deletionen treten in dieser Form auf, nur ein geringerer Teil ist Bestandteil eines komplex-aberranten Karyotyps. Um mehr über die Rolle der del(5q) als Teil eines komplexen Karyotyps herauszufinden, wurde in der hier untersuchten Kohorte mit cA die Zahl der vorliegenden zytogenetischen Veränderungen in Abhängigkeit des 5q-Deletions-Status analysiert. Dabei zeigte sich, dass bei Patienten mit del(5q) der Median der festgestellten



**Abbildung 51: Boxplot zum Vergleich der Zahl zytogenetischer Aberrationen der Patienten nach 5q-Deletions-Status**

also signifikant mehr parallel vorliegende chromosomale Veränderungen als Patienten, bei denen das komplex-aberrante Aberrationsmuster keine del(5q) beinhaltet. Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 51 zu sehen.

#### 3.5.1.4 Molekulargenetische Veränderungen



**Abbildung 52: Boxplot zum Vergleich der Zahl somatischer Komutationen und Gesamtmutationen der Patienten nach 5q-Deletions-Status a: ohne *TP53* und *PPM1D*, b: mit *TP53* und *PPM1D***

chromosomalen Veränderungen bei 10 Aberrationen lag. Bei Patienten, bei denen keine del(5q) nachgewiesen werden konnte, lag diese mediane Aberrationszahl bei fünf Veränderungen (p-Wert nach Wilcoxon 0,00012). Bei Patienten mit del(5q) zeigten sich

Nach der Analyse der Zytogenetik wurden auch die molekulargenetischen Untersuchungsbefunde der Patienten mit und ohne del(5q) betrachtet und verglichen. Dabei wurden zwei Vergleiche durchgeführt. Bei einem ersten wurden, wie auch schon in den vorangegangenen Kapiteln, die parallel vorliegenden Komutationen verglichen, bei denen Mutationen in *TP53* und *PPM1D* nicht miteingeschlossen wurden. In einer zweiten Analyse wurden Mutationen in diesen beiden Genen mitbetrachtet und die Gesamtzahl aller

vorliegenden somatischen Mutationen verglichen.

Bei der Untersuchung der Mutationen ohne *TP53* und *PPM1D* zeigte sich bei Patienten mit deletiertem 5q eine mediane Mutationszahl von null Mutationen. Bei Patienten ohne del(5q) lag dieser Median bei 1,5 Mutationen (p-Wert nach Wilcoxon 0,016, Abb. 52a). Patienten mit nicht deletiertem 5q wiesen also signifikant mehr parallel vorliegende somatische Mutationen auf, wenn *TP53* und *PPM1D* nicht mitbetrachtet werden. In der zweiten Untersuchung, bei der Mutationen in diesen beiden Genen miteinbezogen werden, ergibt sich, dass die mediane Mutationszahl bei Patienten mit del(5q) bei eins und bei Patienten ohne del(5q) weiterhin bei 1,5 liegt (p-Wert nach Wilcoxon 0,57, Abb. 52b). Hier ließ sich also kein Unterschied mehr zwischen Patienten mit unterschiedlichem 5q-Deletions-Status. In Abbildung 52 sind diese Ergebnisse in Form eines Boxplots dargestellt.

### 3.5.2 5q-Deletionen in Verbindung mit *TP53*-Mutationen

In der untersuchten Kohorte konnte bei 80 der 115 Patienten mit cA (69,57%) eine del(5q) festgestellt werden. Bei 69 dieser 80 Patienten (86,25%) konnte zusätzlich eine Affektion von *TP53* (Mutation und/oder Deletion) festgestellt werden, die übrigen elf der 80 Patienten mit del(5q) (13,75%) wiesen einen *TP53*-Wildtyp auf. Um genauer zu untersuchen, wie del(5q) und *TP53*-Affektion das Überleben und unterschiedliche Parameter wie Blutwerte oder Blastenanteil beeinflussen, wurde die Kohorte der Patienten mit cA in vier Gruppen aufgeteilt: Gruppe 1 umfasste die Patienten, bei denen sowohl *TP53* als auch auf 5q unverändert waren. Gruppe 2 wurde von den Patienten gebildet, die zwar eine *TP53*-Veränderung, aber keine del(5q) aufwiesen. Gruppe 3 bestand aus den Patienten, bei denen ein *TP53*-Wildtyp aber ein deletiertes 5q nachgewiesen wurde. Gruppe 4 umfasste schließlich die Patienten, die sowohl *TP53*-Affektion als auch ein deletiertes 5q zeigten. Gruppe 1 umfasste 24 (20,87%), Gruppe 2 zwölf (10,43%), Gruppe 3 elf (9,57%) und Gruppe 4 68 (59,13%) der 115 Patienten mit komplexem Karyotyp.

#### 3.5.2.1 Überleben

Als erstes wurde das mediane OS der vier Gruppen untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass Patienten, bei denen weder *TP53* noch 5q verändert waren, ein medianes OS von 559 Tagen erreichten. Bei Patienten, die eine *TP53*-Mutation ohne del(5q) aufwiesen, lag dieser Median bei 78 Tagen, während sich bei Patienten, die eine del(5q) oder *TP53*-Mutation aufwiesen, ein medianes OS von 654 Tagen zeigte. Patienten, bei denen sowohl eine *TP53*-Veränderung als auch ein del(5q) nachgewiesen werden konnte, erreichten ein medianes OS von 106 Tagen (p-Wert 0,00036). Zwischen den Gruppen mit oder ohne *TP53*-Veränderung zeigt sich ein deutlicher Unterschied im medianen OS, während zwischen den Gruppen 1

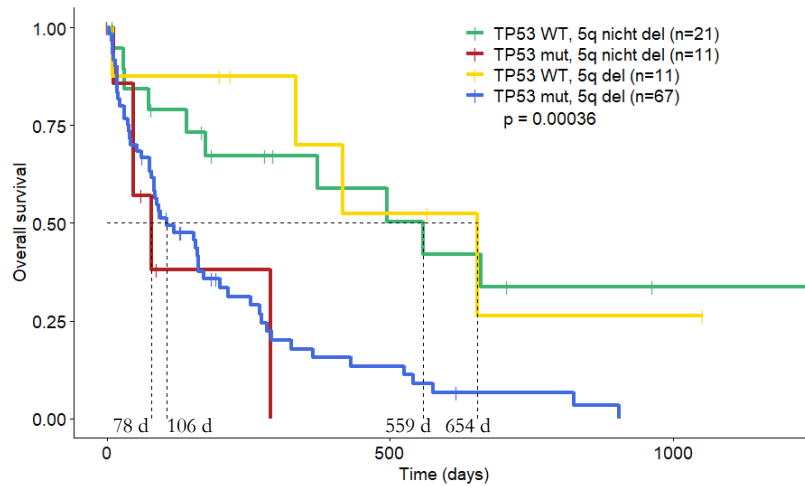


Abbildung 53: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten mit komplexen Karyotypen nach *TP53*- und 5q-Deletions-Status

und 3 bzw. zwischen den Gruppen 2 und 4 kein signifikanter Unterschied im medianen Überleben zu beobachten ist. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve zu dieser Untersuchung ist in Abbildung 53 zu sehen.

### 3.5.2.2 Blutwerte und Knochenmarks-Blasten

In dieser Aufteilung in vier Gruppen je nach Betroffenheit von *TP53* und 5q erfolgte auch ein Vergleich der verschiedenen Blutwerte. Zuerst wurde für alle vier Gruppen ein medianer Hämoglobin-Wert ermittelt und anschließend verglichen. Dabei ergab sich für Gruppe 1 ein medianer Hb-Wert von 8,9 g/dl, für Gruppe 2 ein medianer Hb-Wert von 9,8 g/dl. Gruppe 3 wies einen Hb-Median bei 9,4 g/dl auf, während dieser Wert für Gruppe 4 bei 8,8 g/dl lag (p-Wert nach Kruskal-Wallis 0,37). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Hb-Medianen. Auch beim paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen ließ sich bei keiner der sechs durchgeführten Vergleiche ein signifikanter Unterschied feststellen. Eine Darstellung dieser Ergebnisse findet sich in Abbildung 54.

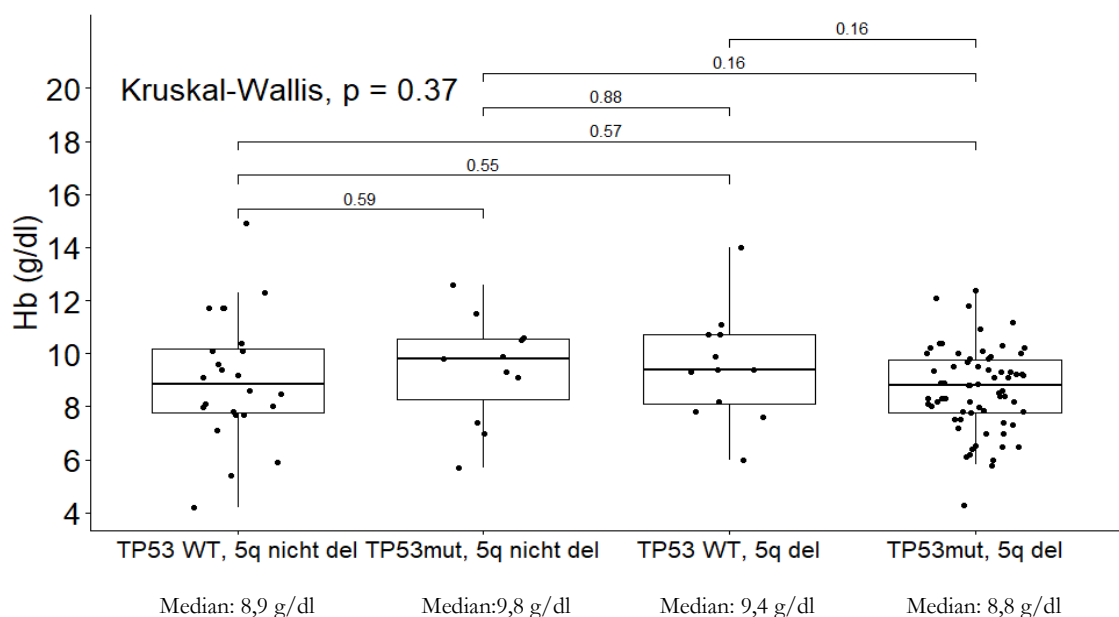
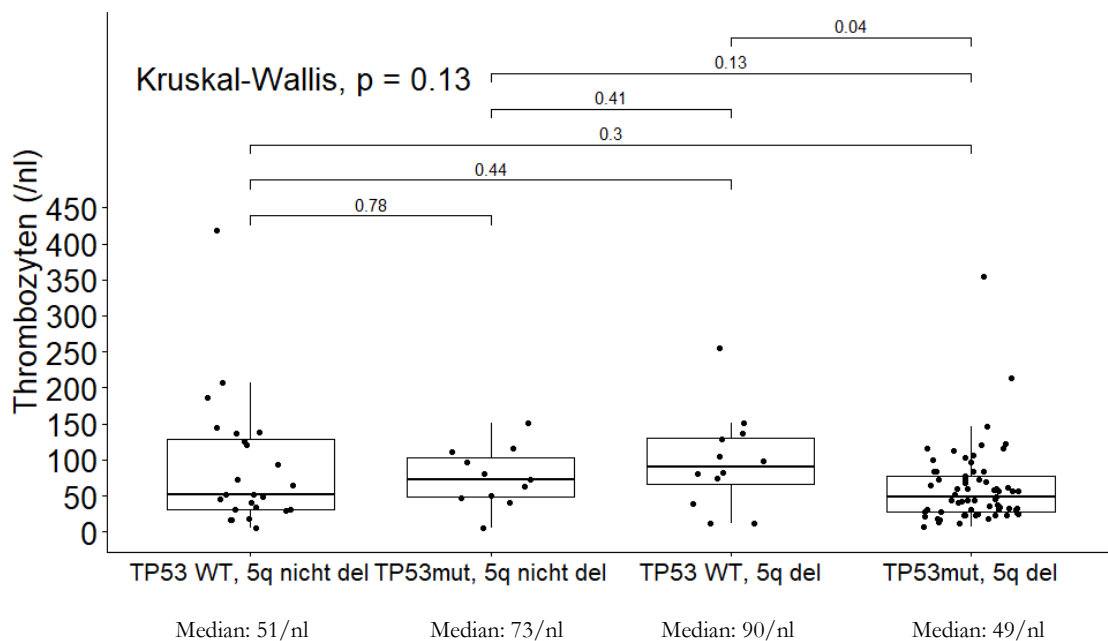


Abbildung 54: Boxplot zum Vergleich der Hämoglobin-Werte der Patienten nach *TP53*- und 5q-Deletions-Status



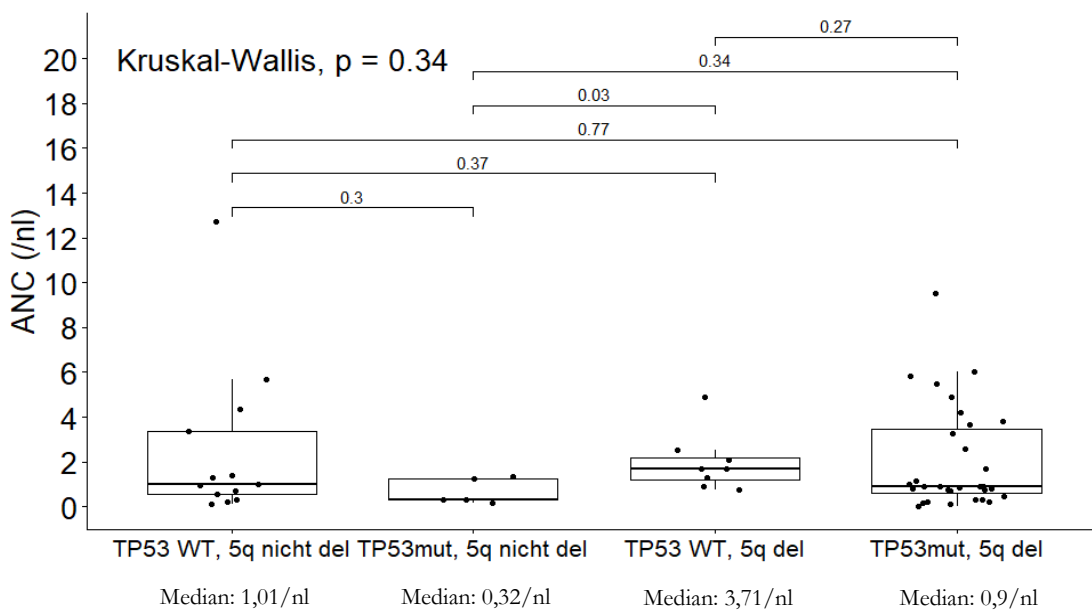
Des Weiteren wurden die vier Gruppen auf ihrer jeweiligen medianen Thrombozyten-Werte untersucht und miteinander verglichen. Für Patienten mit unverändertem *TP53* und undeletiertem 5q ergab sich dabei eine mediane Thrombozyten-Zahl von 51/nl, für Patienten mit *TP53*-Veränderung ohne del(5q) zeigte sich dieser Median bei 73/nl. Patienten, die bei *TP53*-Wildtyp eine del(5q) aufwiesen, wiesen eine mediane Thrombozyten-Zahl von 90/nl auf, während dieser Wert bei Patienten mit *TP53*-Veränderung und del(5q) bei 49/nl lag (p-Wert nach Kruskal-Wallis 0,13). In der Gesamtuntersuchung der Blutplättchen-Zahl konnte also kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Beim paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppe erreichte jedoch einer der p-Werte das Signifikanzniveau: Im Vergleich zwischen den Gruppen 3 und 4 ergab sich ein p-Wert von 0,04. Damit unterscheiden sich in dieser Untersuchung 5q-Deletions-Patienten ohne *TP53*-Veränderung signifikant von solchen mit verändertem *TP53*. In den übrigen fünf Paar-Vergleichen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In Abbildung 55 sind diese Ergebnisse zu dargestellt.



**Abbildung 55: Boxplot zum Vergleich der Thrombozyten-Zahlen der Patienten nach *TP53*- und 5q-Deletions-Status**

Stellvertretend für die weiße Blutreihe wurde auch eine Untersuchung der Zahl der neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Dazu wurde für die Gruppen auf Grundlage der verfügbaren Werte ein medianer Neutrophilen-Wert ermittelt und dann mit den anderen Gruppen verglichen. Dabei ergab sich für Gruppe 1 ein medianer ANC von 1,01/nl, für Gruppe 2 ein Median bei 0,32/nl und für Gruppe 3 ein medianer Wert von 3,71/nl. Für Gruppe 4 lag dieser mediane ANC bei 0,9/nl (p-Wert nach Kruskal-Wallis 0,34). Es konnte in der Gesamtuntersuchung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Beim paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander hingegen erreichte einer der sechs Vergleiche einen p-Wert von 0,03 und damit das Signifikanzniveau. Dabei handelte es

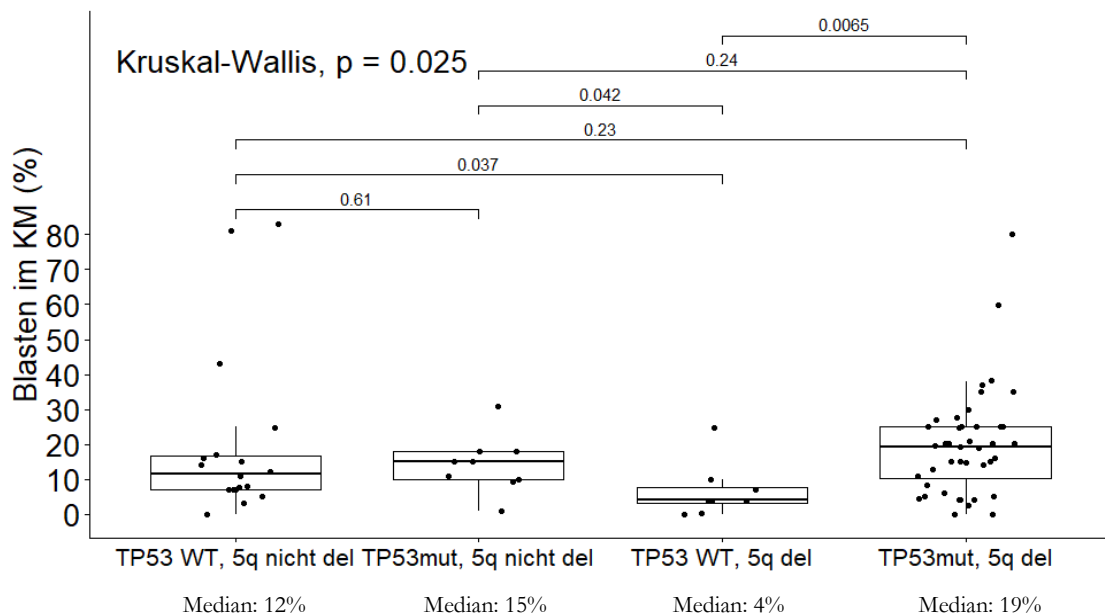
sich um den Vergleich zwischen den Gruppen 2 und 3, also zwischen Patienten, die eine *TP53*-Affektion, aber kein del(5q) aufwiesen, und solchen, bei denen umgekehrt bei *TP53*-Wildtyp ein deletiertes 5q festgestellt werden konnte. Diese beiden Gruppen liegen allerdings in ihrer Gruppengröße deutlich unter den beiden anderen. Da auch nicht für alle Patienten ANC-Werte vorlagen, erfolgte dieser Vergleich an lediglich fünf bzw. sieben Patienten, sodass der signifikante Unterschied kritisch zu hinterfragen ist. In den übrigen fünf Vergleichen zwischen den Gruppen konnte kein nennenswerter Unterschied festgestellt werden. Die Verteilung der ANC-Werte und die graphische Darstellung der Vergleiche ist Abbildung 56 zu entnehmen.



**Abbildung 56: Boxplot zum Vergleich der Neutrophilen-Zahlen der Patienten nach *TP53*- und 5q-Deletions-Status**

Auch der Anteil der myeloischen Blasten am Knochenmark wurde in den vier bereits ausführlich beschriebenen Gruppen untersucht. Dazu wurde der mediane Blastenanteil einer Gruppe ermittelt und anschließend mit den anderen verglichen. Dabei ergab sich für Patienten mit unverändertem *TP53* und 5q ein medianer Blastenanteil von 12%, für die Gruppe mit verändertem *TP53* aber normalem 5q lag dieser Median bei 15%. Patienten, die zwar einen *TP53*-Wildtypen, aber ein del(5q) aufwiesen, zeigten einen medianen Blastenwert von 4%, während dieser Wert bei Patienten, die sowohl *TP53*-Veränderung als auch del(5q) trugen, bei 19% lag ( $p$ -Wert nach Kruskal-Wallis 0,025). Bei dieser Untersuchung zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den medianen Blastenanteilen. In der genaueren Aufschlüsselung dieses Unterschieds durch einen paarweisen Vergleich wurde festgestellt, dass drei der sechs Vergleiche das Signifikanzniveau erreichten: Zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3, die sich bei *TP53*-Wildtyp nur durch ihren 5q-Deletions-Status unterscheiden, wurden in Gruppe 3, also Patienten mit deletiertem 5q, bei einem  $p$ -Wert von 0,037 signifikant weniger Blasten als in Gruppe 1, in der die Patienten keine Deletion aufwiesen. Auch zwischen Gruppe 2, die aus Patienten mit normalem 5q aber verändertem

*TP53* besteht, und Gruppe 3 ließ sich mit einem p-Wert von 0,042 ein signifikanter Unterschied zugunsten von Gruppe 3 feststellen. Der dritte p-Wert, der bei 0,0065 lag und damit den größten Unterschied bezeichnet, war der des Vergleichs zwischen Gruppe 3 und Gruppe 4, die sich bei del(5q) durch ihren *TP53*-Status unterscheiden. Patienten mit zusätzlich affektiertem *TP53* zeigen demnach signifikant mehr Blasten im Knochenmark als solche, bei denen nur die 5q-Deletion vorliegt. Die Vergleiche, die nicht Gruppe 3 betrafen, erreichten kein Signifikanzniveau. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 56 zu sehen.



**Abbildung 57: Boxplot zum Vergleich des Anteils myeloischer Blasten am Knochenmark der Patienten nach *TP53*- und 5q-Deletions-Status**

### 3.5.2.3 Zahl zytogenetischer Aberrationen

In einem nächsten Schritt wurde die Zahl der vorliegenden zytogenetischen Aberrationen untersucht und zwischen den verschiedenen Gruppen verglichen. In der Gruppe, die keine Beeinträchtigungen in *TP53* oder 5q aufwies, lag die mediane Zahl der chromosomalen Veränderungen bei fünf Aberrationen. Bei Patienten, die bei unverändertem 5q eine *TP53*-Mutation oder -Deletion aufwies, lag der Aberrations-Median bei elf Veränderungen und bei solchen, bei denen umgekehrt bei *TP53*-Wildtyp eine Deletion von 5q festgestellt wurde, bei sechs Aberrationen. Patienten, bei denen sowohl *TP53* als auch 5q von Veränderungen betroffen waren, zeigten wie Gruppe 1 eine mediane Aberrationszahl von elf Veränderungen (p-Wert nach Kruskal-Wallis <0,0001). Das Ausmaß dieses Unterschiedes wird im paarweisen Vergleich der verschiedenen Gruppen noch einmal verdeutlicht. Dabei zeigt sich in drei der sechs Einzelvergleiche ein p-Wert unter 0,05: Ein erster signifikanter p-Wert (0,0071) ergibt sich aus dem Vergleich zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2, die sich bei normalem 5q in ihrem *TP53*-Status unterscheiden. Patienten mit *TP53*-Veränderung zeigen demnach bei unverändertem 5q signifikant mehr zytogenetische Aberrationen. Der zweite signifikante Unterschied mit einem p-Wert von 0,025 lag zwischen Gruppe 3 und Gruppe 4,

die sich bei del(5q) in ihrem *TP53*-Status unterscheiden. Auch bei deletiertem 5q kam es bei *TP53*-Veränderung zu signifikant mehr chromosomalen Veränderungen. Die Gruppen 2 und 4, die sich bei verändertem *TP53* in ihrem 5q-Status unterschieden, zeigte sich hingegen keinerlei Unterschied in der Zahl zytogenetischer Aberrationen. Der dritte und größte Unterschied zeigte sich zwischen den Gruppen 1 und 4 ( $p$ -Wert  $<0,0001$ ): Dabei wurden Patienten, bei denen sowohl *TP53* als auch 5q im Wildtyp vorlag, mit denen verglichen, bei denen beide Faktoren verändert waren. Die Beobachtung, dass Patienten in Gruppe 4 deutlich mehr Aberrationen aufwiesen, ist mit den bisher gemachten Beobachtungen in Einklang zu finden. Die Vergleiche zwischen den Gruppen 1 und 3 sowie 2 und 3 wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Eine graphische Darstellung der Aberrationszahlen findet sich in Abbildung 57.

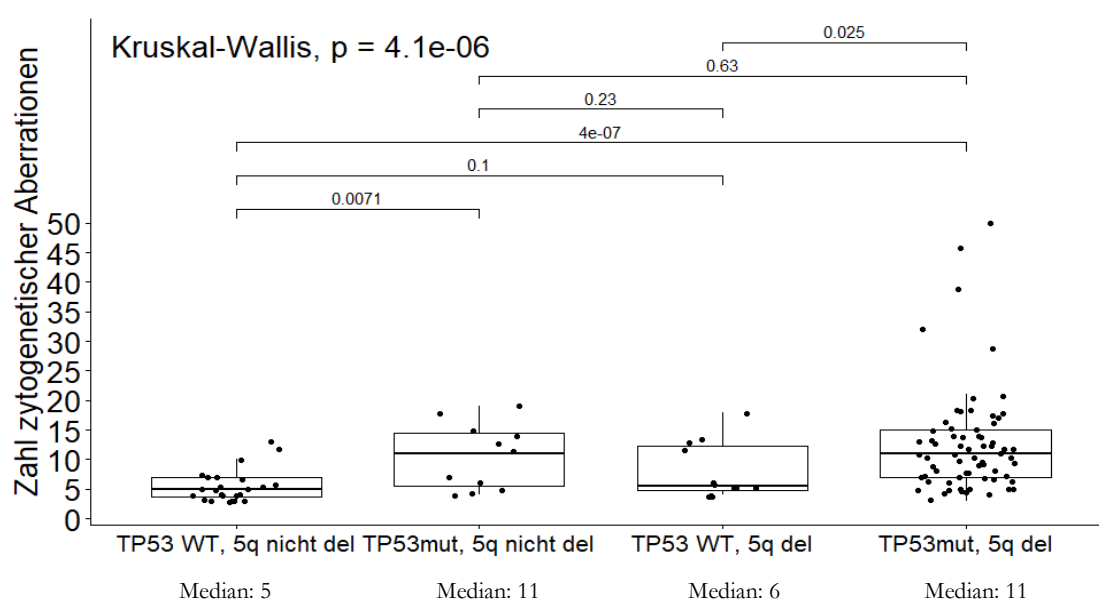


Abbildung 58: Boxplot zum Vergleich der Zahl zytogenetischer Aberrationen der Patienten nach *TP53*- und 5q-Deletions-Status

#### 3.5.2.4 Komutationen

Als letzter Faktor wurde der Einfluss des *TP53*- und 5q-Deletions-Status auf die Zahl der parallel vorliegenden somatischen Komutationen untersucht. Dazu wurden die Patienten, zu denen eine umfangreiche molekulargenetische Untersuchung vorlag, in den bereits beschriebenen vier Gruppen miteinander verglichen. Patienten, die weder eine Veränderung von *TP53* noch eine Deletion von 5q aufwiesen, zeigten im Median zwei Mutationen. War *TP53* verändert, 5q aber weiterhin nicht deletiert, verschob sich dieser Median auf null Mutationen. Patienten, bei denen bei *TP53*-Wildtyp eine Deletion von 5q auftrat, wiesen im Median eine somatische Mutation auf. In der Gruppe mit *TP53*- und 5q-Veränderung lag der Median wiederum bei null weiteren Mutationen ( $p$ -Wert nach Kruskal-Wallis 0,016). In der auch bei dieser Analyse durchgeführten paarweisen Untersuchung der Unterschiede zwischen den Gruppen ergab sich bei nur einem der sechs Vergleiche ein signifikanter

Unterschied zwischen den Medianen. Dieser lag zwischen der medianen Mutationszahl von Gruppe 1 und der der Gruppe 4 ( $p$ -Wert 0,0028). Demnach zeigten Patienten ohne Veränderung der zwei untersuchten Faktoren signifikant weniger Komutationen als Patienten, bei denen beide Faktoren ungünstig verändert waren. Zwischen Patienten mit und ohne *TP53*-Veränderung, die keine del(5q) aufwiesen, war der Unterschied nicht signifikant. Auch in den übrigen Vergleichen wurde kein Unterschied festgestellt, allerdings muss auch hier erwähnt sein, dass in den Gruppen 2 und 3 nur sehr wenige Patienten untersucht werden konnten. Die Ergebnisse dieser Analyse finden sich in Abbildung 58.

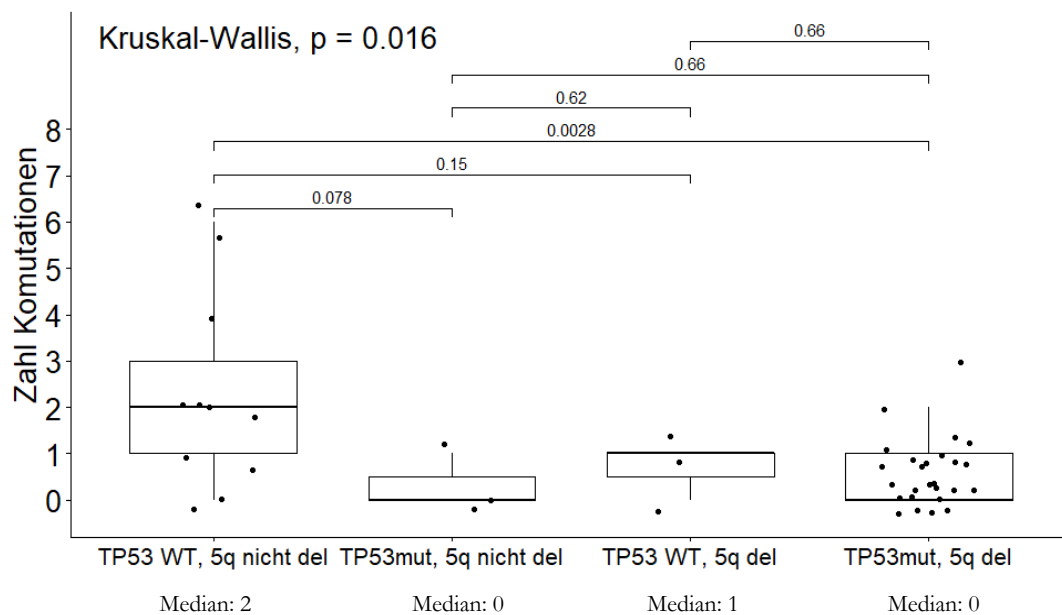


Abbildung 59: Boxplot zum Vergleich der Zahl parallel vorliegenden somatischen Mutationen der Patienten nach *TP53*- und 5q-Deletions-Status

## 4 Diskussion

### 4.1 Risikofaktoren bei Patienten mit MDS

Aus der Charakterisierung der hier untersuchten Kohorten konnten bestimmte Faktoren, die das Überleben der Patienten beeinflussten, festgestellt und in ihrem Einfluss auf den Krankheitsverlauf untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Parameter betrachtet und in Überlebensanalysen einbezogen, um anhand dieser Analysen den Einfluss auf die Prognose der Patienten festzustellen. Da aufgrund der geringen Gruppengröße und des zu einem großen Teil nicht erreichten medianen OS in der Kontrollkohorte ohne cA keine wirklich aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde der unterschiedlich starke Einfluss auf das Überleben der Patienten nur für die Gesamtkohorte und für die Patienten mit cA quantitativ ausgewertet.

In der Gesamtkohorte, die Patienten mit und ohne cA einschließt, wurden verschiedene Faktoren in ihrem Einfluss auf das Überleben der Patienten untersucht. Die Kaplan-Meier-Kurven finden sich in den jeweiligen Kapiteln im Ergebnis-Teil dieser Arbeit. Nach Betrachtung und Analyse aller untersuchten Faktoren wurde der Einfluss dieser quantifiziert, indem für die Parameter Hazard-Ratios (HR) und Konfidenzintervalle (KI) berechnet wurden. Eine Übersicht über diese Werte für die untersuchten Parameter ist in Tabelle 15 zu sehen. Dabei wurden die Werte in der Reihenfolge ihrer Abhandlung im Ergebnisteil gelistet.

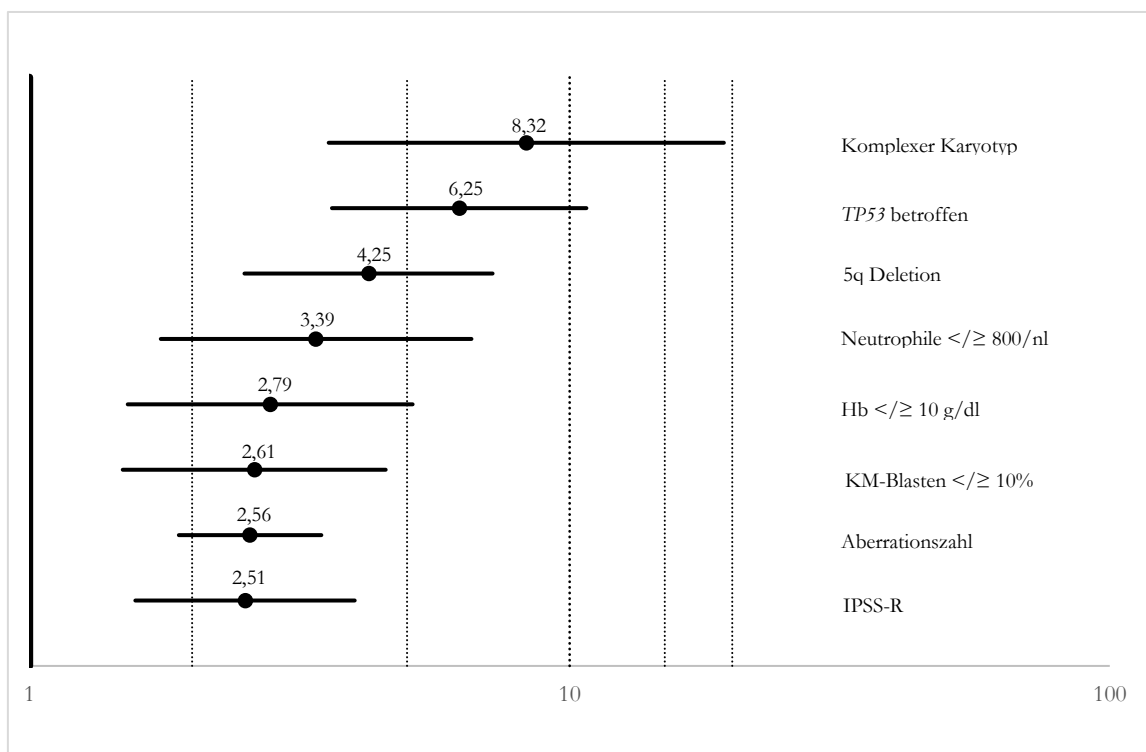
Nachdem die HRs für die verschiedenen Werte berechnet wurden, erfolgte ein Vergleich eben dieser. Dabei wurden für die Gesamtkohorte die acht Faktoren mit dem in den Einzelanalysen stärksten Einfluss auf das Überleben der Patienten definiert. Dabei handelt es sich um das Vorliegen eines komplexen Karyotyps (HR 8,32), ob eine *TP53*-Veränderung vorliegt (HR 6,25) und den Deletionsstatus von Chromosom 5q (HR 4,25). Weitere relevante Einflussfaktoren sind die Zahl der neutrophilen Granulozyten (HR 3,39), der Hämoglobinwert (HR 2,79), die Knochenmarks-Blasten (HR 2,61), die Zahl der zytogenetischen Aberrationen (HR 2,56) sowie die Einstufung nach IPSS-R (HR 2,51). Eine graphische Darstellung dieser Faktoren sowie der jeweiligen Konfidenzintervalle in Form eines Forest-Plots findet sich in Abbildung 59.

**Tabelle 15: Analytierte Faktoren und ihr Einfluss auf das Überleben der Patienten der Gesamtkohorte**

Faktoren	Medianes OS (in Tagen)	p-Wert	HR (p-Wert des HR)	Unteres Ende des KI	Oberes Ende des KI
Komplexer Karyotyp	NA (nicht komplex) vs. 160 (komplex)	< 0,0001	8,32 (< 0,0001)	3,58	19,3

Faktoren	Medianes OS (in Tagen)	p-Wert	HR (p-Wert des HR)	Unteres Ende des KI	Oberes Ende des KI
Geschlecht	325 (m) vs. 298 (w)	0,9	1,02 (0,93)	0,64	1,62
Therapieassoziation	363 (nicht assoziiert) vs. 253 (therapieassoziiert)	0,9	0,96 (0,86)	0,57	1,59
IPSS-R	NA (very low und low) vs. 787 (intermediate und high) vs. 162 (very high)	< 0,0001	2,51 (0,0001)	1,57	4,0
Periphere Zytopenien	NA (keine oder eine) vs. 325 (zwei) vs. 253 (drei)	0,091	1,45 (0,036)	1,024	2,044
Hb (> 10 g/dl, 8-10 g/dl, < 8 g/dl)	NA (> 10 g/dl) vs. 160 (8-10 g/dl) vs. 289 (< 8 g/dl)	< 0,0001	1,44 (0,012)	1,08	1,92
Hb (</> 10 g/dl)	860 (> 10 g/dl) vs. 199 (< 10 g/dl)	0,00055	2,79 (0,0009)	1,52	5,12
Thrombozyten (</> 50/nl)	431 (> 50/nl) vs. 171 (< 50/nl)	0,0099	1,82 (0,011)	1,45	2,88
ANC (</> 0,8/nl)	559 (> 0,8/nl) vs. 94 (< 0,8/nl)	< 0,0001	3,39 (< 0,0001)	1,75	6,58
KM-Blasten (< 5%, 5-9%, 10-19%, > 20%)	787 (< 5%) vs. 371 (5-9%) vs. 289 (10-19%) vs. 90 (> 20%)	< 0,0001	1,69 (< 0,0001)	1,32	2,17
KM-Blasten (</> 10%)	551 (< 10%) vs. 160 (> 10%)	< 0,0001	2,61 (0,0008)	1,488	4,57
Aberrationen (≤ 3, 4-8, > 8)	NA (≤ 3) vs. 270 (4-8) vs. 106 (> 8)	< 0,0001	2,56 (< 0,0001)	1,89	3,465
Therapie mit DMA	91 (keine DMA) vs. 495 (DMA)	0,01	0,53 (0,014)	0,32	0,88
TP53 betroffen	860 (Wildtyp) vs. 106 (betroffen)	< 0,0001	6,25 (< 0,0001)	3,634	10,74

Faktoren	Medianes OS (in Tagen)	p-Wert	HR (p-Wert des HR)	Unteres Ende des KI	Oberes Ende des KI
Form der <i>TP53</i> -Veränderung	860 (Wildtyp) vs. 91 (mut) vs. 78 (del) vs. 157 (multi hit)	< 0,0001	1,62 (< 0,0001)	1,367	1,922
del(5q)	860 (nicht del) vs. 160 (del)	< 0,0001	4,25 (< 0,0001)	2,5	7,2



**Abbildung 60: Forest-Plot zur Darstellung der acht stärksten Einflussfaktoren auf das Überleben der Gesamtkohorte**

Für Patienten mit myelodysplastischen Syndromen generell scheint das Vorhandensein eines komplexen Karyotyps der größte Risikofaktor zu sein. Diese Beobachtungen sind gut mit denen in Einklang zu bringen, die zur Entwicklung und Etablierung des IPSS-R geführt haben (Greenberg et al. 2012). Auch dort ist das zytogenetische Profil der Patienten der stärkste Einflussfaktor bei der Berechnung der Risikogruppe.

Eine analoge Analyse wurde weiterhin für die Kohorte der Patienten mit cA durchgeführt. Auch bei dieser Gruppe wurden die Überlebensanalysen quantifiziert und die entsprechenden statistischen Messgrößen berechnet. Die verschiedenen Faktoren mit ihren HR und KI-Werten sind in der Reihenfolge ihrer Ergebnis-Beschreibung in Tabelle 16 zu sehen.

Die errechneten Hazard-Ratios fielen aufgrund der geringeren Gruppengröße tendenziell geringer aus als bei der Gesamtkohorte, ließen aber dennoch Rückschlüsse auf die



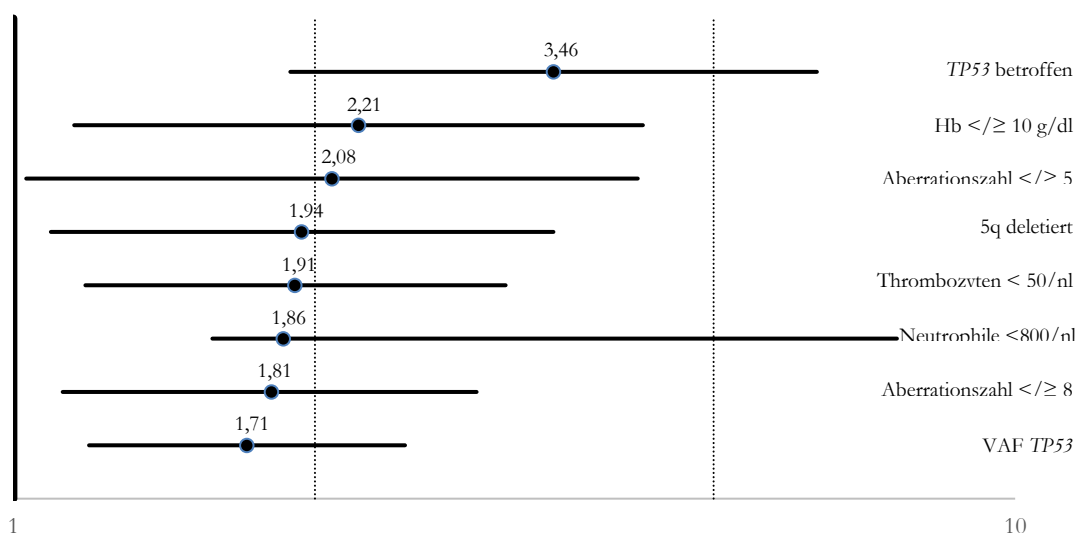
Einflussstärke verschiedener Parameter zu. Es ergaben sich für die Patienten mit komplexen zytogenetischen Aberrationen sieben Faktoren, die einen größeren Einfluss auf das Überleben der Patienten zu haben schienen als die übrigen. Dabei handelt es sich um das Vorhandensein einer *TP53*-Affektion (HR 3,46), den Hämoglobin-Wert (HR 2,21), den 5q-Deletionsstatus (HR 1,94), die Thrombozyten-Zahl (HR 1,91), den Wert der neutrophilen Granulozyten (HR 1,86), die Aberrations-Zahl (HR 2,08 bei  $\leq 5$ , HR 1,81 bei  $\leq 8$ ) sowie die Klonggröße der *TP53*-mutierten Zellklone (HR 1,71), wobei dieser letzte Faktor am ehesten einen Einfluss des generellen Vorhandenseins einer *TP53*-Veränderung widerspiegelt. Diese sieben Faktoren sind mit ihren KI noch einmal graphisch in Form eines Forest-Plots in Abbildung 61 dargestellt.

**Tabelle 16: Analyierte Faktoren auf ihren Einfluss auf das Überleben der Patienten der Kohorte mit cA**

Faktor	Medianes OS (in Tagen)	p-Wert	HR Wert (p- des HR)	Unteres Ende des KI	Oberes Ende des KI
Geschlecht	94 (m) vs. 282 (w)	0,1	0,662 (0,099)	0,41	1,08
Therapieassoziation	174 (nicht assoziiert) vs. 154 (assoziiert)	0,08	1,66 (0,085)	0,93	2,95
Periphere Zytopenien	NA (keine oder eine) vs. 106 (zwei) vs. 162 (drei)	0,11	1,33 (0,11)	0,93	1,9
Hb (> 10 g/dl, 8-10 g/dl, < 8 g/dl)	282 (> 10 g/dl) vs. 75 (8-10 g/dl) vs. 83 (< 8 g/dl)	0,049	1,38 (0,052)	1,0	1,9
Hb ( $\leq$ 10 g/dl)	282 (> 10 g/dl) vs. 141 (< 10 g/dl)	0,01	2,21 (0,002)	1,15	4,25
Thrombozyten ( $\leq$ 50/nl)	273 (> 50/nl) vs. 83 (< 50/nl)	0,0078	1,91 (0,0087)	1,18	3,1

Faktor	Medianes OS (in Tagen)	p-Wert	HR Wert (p-des HR)	Unteres Ende des KI	Oberes Ende des KI
ANC (</> 0,8/nl)	371 (> 0,8/nl) vs. 78 (< 0,8/nl)	0,001	1,86 (0,002)	1,58	7,62
KM-Blasten (< 5%, 5-9%, 10-19%, > 20%)	335 (< 5%) vs. 371 (5-9%) vs. 162 (10-19%) vs. 81 (> 20%)	0,03	1,41 (0,017)	1,053	1,9
KM-Blasten (</> 10%)	371 (< 10%) vs. 141 (> 10%)	0,2	1,48 (0,203)	0,809	2,72
Aberrationszahl (</> 5)	371 (< 5) vs. 157 (> 5)	0,04	2,078 (0,041)	1,029	4,2
Aberrationszahl (</> 8)	273 (< 8) vs. 106 (> 8)	0,01	1,81 (0,015)	1,12	2,9
Therapie mit DMA	85 (keine DMA) vs. 363 (DMA)	0,03	0,569 (0,031)	0,34	0,96
<i>TP53</i> betroffen	559 (Wildtyp) vs. 94 (betroffen)	< 0,0001	3,46 (< 0,0001)	1,89	6,34
Form der <i>TP53</i> -Veränderung	559 (Wildtyp) vs. 91 (mut) vs. 17 (del) vs. 157 (multi hit)	< 0,0001	1,32 (0,0029)	1,098	1,575
VAF des <i>TP53</i> mut-Klons	334 (Wildtyp) vs. 61 (< 40%) vs. 94 (> 40%)	0,008	1,71 (0,0035)	1,194	2,459
del(5q)	371 (nicht del) vs. 157 (del)	0,02	1,94 (0,024)	1,09	3,46

Faktor	Medianes OS (in Tagen)	p-Wert	HR Wert (p- des HR)	Unteres Ende des KI	Oberes Ende des KI
<i>TP53</i> - und 5q-Status	559 (beides Wildtyp) vs. 78 ( <i>TP53</i> mut, 5q nicht del) vs. 654 ( <i>TP53</i> Wildtyp und 5q del) vs. 106 (beides betroffen)	0,00036	1,42 (0,0017)	1,14	1,77



**Abbildung 61: Forest-Plot zur Darstellung der acht stärksten Einflussfaktoren auf das Überleben der Kohorte mit cA**

Innerhalb der Kohorte mit komplex aberrantem Karyotyp wurde in dieser Untersuchung das Vorhandensein einer *TP53*-Affektion zum größten Risikofaktor. Auch niedrige Blutwerte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hatten in diese Analyse einen ungünstigen Einfluss auf das Überleben der Patienten, was dem Ausmaß der klinischen Manifestation der Erkrankung, hier der hämatopoetischen Insuffizienz, als Prognosefaktor große Relevanz zuschreibt. Eine Deletion von 5q scheint auch bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp die Prognose zu verschlechtern. Auf die Bedeutung einer del(5q) wird noch genauer eingegangen. Eine weitere Beobachtung aus dieser Analyse ist, dass auch die Zahl der zytogenetischen Aberrationen innerhalb der Gruppe mit cA einen Einfluss auf die Prognose zu haben scheint: Sowohl die Unterscheidung in mehr oder weniger als fünf Aberrationen als auch die in mehr

oder weniger als acht Aberrationen, was dem Median dieser Kohorte entspricht, zeigte einen deutlich messbaren Einfluss auf das Überleben der Patienten.

## 4.2 Molekulargenetische Veränderungen von *PPM1D*

Das Protein Wip1, für das das hier speziell untersuchte Gen *PPM1D* kodiert, agiert unter anderem als direkter Inhibitor von p53. Aufgrund dieser Tatsache und der Beobachtung, dass Mutationen in *PPM1D* bei Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren durchaus schon bekannt sind (Ruark et al. 2013; Akbari et al. 2014), kam die Frage auf, ob dieses Gen nicht auch bei der Entstehung von komplexen Karyotypen in Patienten mit MDS eine Rolle spielen könnte, vor allem bei denen, die ein völlig unverändertes *TP53* zeigen. Die hier erhobenen Daten legen die Vermutung nahe, dass dies nicht der Fall ist oder nur sehr zutrifft. In der 115 Patienten großen Kohorte mit komplexem Karyotypen fanden sich lediglich zwei Patienten (1,7%) mit *PPM1D*-Veränderung, die als Mutation zu werten ist und pathogenetisches Potential haben könnte. Diese zwei Patienten zeigten allerdings völlig unterschiedliche Krankheitsverläufe und Begleiterscheinungen. Eine einzige Gemeinsamkeit ist, dass beide keine systemischen Therapien in der Vergangenheit erhalten haben. In allen anderen betrachteten Punkten unterscheiden sie sich. Einer der beiden wies einen *TP53*-Wildtypen auf, der andere eine *multi-bit*-Veränderung, sodass keine Aussagen darüber möglich sind, ob Veränderungen in *PPM1D* sich vermehrt bei Patienten mit oder ohne *TP53*-Affektion durchsetzen. Es lässt sich lediglich feststellen, dass der Patient mit *multi-bit-TP53* einen deutlich ungünstigeren Krankheitsverlauf aufwies: Schon 37 Tage nach der Diagnosestellung verstarb er, während der zweite Patient zwei Jahre überlebte. Ob dieser ungünstige Krankheitsverlauf auf den *TP53*-Status, auf die höhere Zahl zytogenetischer Aberrationen (12 vs. 5) oder tatsächlich die *PPM1D*-Mutation zurückzuführen ist, lässt sich nicht feststellen. Interessant ist allerdings, dass sich die Mutation dieses Patienten mit ungünstigem Krankheitsverlauf von der der Patientin mit längerem Verlauf auch in Position und Größe unterscheidet. Bei Patient 8, der nur kurz überlebte, befindet sich die *PPM1D*-Mutation, die in 6,9% der Zellen nachgewiesen werden konnte, in Exon 6 und ist in der Datenbank OncoKB als *likely oncogenic* eingestuft worden (Chakravarty et al. 2017; OncoKB 2020). Diese Mutation ist also bereits bekannt und passt gut ins Muster der bereits berichteten *PPM1D*-Mutationen, die zum größten Teil ebenfalls in Exon 6 liegen (Ruark et al. 2013; Akbari et al. 2014). Außerdem verweist OncoKB darauf, dass die hier vorliegende Mutation allem Anschein nach aktivitätssteigernd ist (Chakravarty et al. 2017; OncoKB 2020), was bedeuten würde, dass durch eine daraus resultierende erhöhte Proteinaktivität von Wip1 eine verstärkte Hemmung von p53 verursacht wird, was wiederum gut mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf in Einklang zu bringen wäre. Da bei Patient 8 allerdings eine *multi-bit-TP53*-Affektion in Form einer Mutation und einer Deletion von 17p vorliegt, kann nicht festgestellt werden, wie groß die Auswirkung einer gesteigerten Wip1-Aktivität tatsächlich wäre. Bei Patientin 6 hingegen, die einen außergewöhnlich milden Verlauf ihrer

Erkrankung vorweist, obwohl bei ihr der Subtyp MDS-EB1 diagnostiziert wurde, zeigte eine vollkommen andere Art der Mutation. Diese lag in Exon 1, an einer Stelle, über die bislang noch nicht berichtet wurde. An derselben Position zeigte auch ein weiterer Patient, Patient 1, eine *PPM1D*-Veränderung, allerdings ohne resultierenden Aminosäuren-Austausch. Bei Patientin 6 hingegen kam es an dieser Stelle zu einer Aminosäuren-Veränderung, sodass von einer potenziell pathogenen Mutation ausgegangen wird. Welche Auswirkungen eine Mutation an einer so weit vorne gelegenen Position haben könnte, ist noch nicht bekannt. Diese Mutation hat zwar mit 33,6% eine größere VAF, scheint aber trotzdem in diesem speziellen Fall keinen großen Einfluss auf das Überleben der Patienten ausgeübt zu haben, da diese überdurchschnittlich lange überlebte. Mit fünf festgestellten zytogenetischen Aberrationen und einem *TP53*-Wildtyp zeigte sie aber auch weniger allgemein bekannte Risikofaktoren als Patient 8.

Sechs weitere Patienten (5,1%) wiesen *PPM1D*-Veränderungen auf, die unserer Analyse nach keine Auswirkung auf die Proteinbiosynthese haben oder als seltene SNPs zu werten sind. Bei diesen sechs Patienten lässt sich keine eindeutige Gemeinsamkeit in ihren Begleitmerkmalen feststellen: Einer von ihnen wurde in der Vergangenheit systemisch therapiert, die übrigen nicht; einer weist einen *TP53*-Wildtyp auf, die übrigen zeigen unterschiedliche Formen der *TP53*-Veränderungen; die Aberrationszahlen liegen zwischen fünf und 15 Veränderungen, das mediane OS in Tagen zwischen elf und 334 Tagen nach Diagnosestellung. Der lange Arm des Chromosom 5 war bei allen außer einem Patienten deletiert. Da sowohl *TP53*-Veränderungen als auch del(5q) in der Kohorte mit cA generell gehäuft vorkommen, lässt sich kein Muster erkennen, das speziell auf ein verändertes *PPM1D* zurückzuführen wäre.

In der Kohorte der Patienten mit komplex-aberrantem Karyotyp zeigen sich also in lediglich 1,7% der Fälle *PPM1D*-Mutationen, die eine pathogenetische Relevanz aufweisen könnten. Damit liegt diese Quote deutlich unter der aller anderer Kollektive, die auf *PPM1D*-Mutationen untersucht wurden: In einer gut charakterisierten Kohorte mit Fokus auf 5q-deletierte Patienten konnten in 5% der Fälle Mutationen beobachtet werden (Panagiota et al. 2018), in einer therapieassoziierten Kohorte waren es sogar 15% (Lindsley et al. 2017). Ein Grund dafür könnte sein, dass *PPM1D*-Mutationen möglicherweise nicht gehäuft zusammen mit *TP53*-Mutationen auftreten, und in der hier untersuchten Kohorte ein großer Teil der Patienten einen veränderten *TP53*-Status aufweisen. Um genauere Aussagen zur Anzahl und zum Verlauf der *PPM1D*-mutierten MDS-Patienten mit komplexen Karyotyp treffen zu können, muss bei der geringen Mutationsquote eine bedeutend größere Kohorte untersucht werden.

Um eine Vergleichsgröße zu haben, wurde auch eine Kohorte ohne komplex-aberranten Karyotyp untersucht. Bei diesen 40 Patienten konnten *PPM1D*-Veränderungen in sechs Patienten festgestellt werden (15%). Davon wiesen drei (7,5%) Veränderungen auf, die zu keinem Aminosäuren-Austausch führten und als SNPs zu werten sind. Die übrigen drei

Patienten (7,5%) zeigten Veränderungen, die als Mutationen gewertet wurden. Die Patienten mit normalem oder nur leicht verändertem Karyotypen und *PPM1D*-Mutation wiesen alle einen *TP53*-Wildtypen auf. Des Weiteren konnte keine Deletion von 5q beobachtet werden. Zwei der drei Patienten erhielten in der Vergangenheit Therapien, die zu der Diagnose einer therapieassoziierten Erkrankung führten. Zum Verlauf der Erkrankung kann für diese drei Patienten keine Aussage getroffen werden, da sie zum Zeitpunkt der Auswertung dieser Arbeit noch kein zweites Mal wieder vorstellig wurden, nachdem sie zum Zeitpunkt der Diagnose alle einen guten Allgemeinzustand und eine stabile Erkrankung aufwiesen.

Die drei Patienten, deren *PPM1D*-Veränderung als SNP zu werten waren, zeigten alle weder Veränderungen in *TP53* noch in 5q. Alle drei Patienten sind männlich. Einer von ihnen erhielt in der Vergangenheit eine systemische Therapie. Zwei der drei Patienten überlebten weit über zwei Jahre, der dritte wurde noch kein zweites Mal vorstellig. Insgesamt lässt sich auch hier weder bei den Patienten mit Mutationen noch bei denen mit SNPs von *PPM1D* ein gemeinsamer Verlauf oder gemeinsame Risikofaktoren feststellen. Allerdings kommt die Häufigkeit, in der Mutationen auftreten, der der beiden vorher genannten Studien deutlich näher, sodass *PPM1D*-Mutation bei MDS-Patienten mit komplex-aberrant veränderter Zytogenetik tatsächlich seltener betroffen zu sein scheinen.

Eine weitere Auffälligkeit ist, dass von den neun Patienten mit *PPM1D*-SNP drei die exakt gleiche Veränderung tragen (c.456C>T p.A152A). Dies scheint ein relativ häufig vorkommender SNP zu sein, der sich in beiden Kohorten finden lässt. Allerdings zeigen auch diese drei Patienten keine wesentlichen Gemeinsamkeiten, sodass keine Aussage über den Effekt dieser Beobachtung gemacht werden kann.

Auch hinsichtlich der Blutwerte unterscheiden sich weder *PPM1D*-mutierte noch generell *PPM1D*-veränderte Patienten von denen ohne Affektion des Gens. In keinem der in Kapitel 3.2 geschilderten Vergleiche zwischen Wildtypen und genveränderten Patienten konnte irgendein Unterschied festgestellt werden. Auch die Aberrationszahl unterschied sich nicht zwischen den untersuchten Gruppen. Lediglich die Zahl parallel vorliegender somatischer Komutationen war bei Patienten mit verändertem *PPM1D* niedriger, was aber aufgrund der geringen Gruppengröße einer Kontrolle in einer größeren Kohorte bedarf. Bis auf die den knapp signifikanten Unterschied in eben dieser Zahl der Komutationen konnte weder bei den Patienten mit cA noch bei der Gesamtkohorte in einem anderen Faktor irgendein Unterschied festgestellt werden. Zumindest in der hier untersuchten Kohorte scheinen *PPM1D*-Mutationen oder -SNPs also keine spezifischen Veränderungen oder Verläufe mit sich zu bringen.

Generell konnten *PPM1D*-Mutationen seltener als erwartet festgestellt werden. Bei insgesamt 155 gescreenten Patienten wurden bei fünf Patienten Mutationen gefunden, damit ergab sich in der Gesamtkohorte eine Mutationsrate von 3,2%. Bei den Patienten mit komplexen Aberrationen waren es sogar nur 1,7% der Kohorte, während es bei den

Patienten mit nur minimal veränderter Zytogenetik immerhin 7,5% waren. Mutationen fanden sich vermehrt im Exon 6, was auch bereits in anderen Studien beobachtet wurde (Ruark et al. 2013; Akbari et al. 2014), dennoch wurde auch eine Position in Exon 1 gefunden, an der zwei Veränderungen auftraten, von der zumindest eine als Mutation gewertet wird. Die Exons 1-4 mit in die Untersuchung einzuschließen und nicht nur die Exons 5 und 6 zu betrachten erscheint sinnvoll und gewährleistet, die selteneren Mutationen im vorderen Bereich des Gens nicht zu übersehen. Die betroffenen Patienten zeigten keine spezifischen Auffälligkeiten, die speziell auf die *PPM1D*-Mutation zurückzuführen wären. Bei den Patienten mit drei oder mehr chromosomalen Veränderungen traten mehr *TP53*- und 5q-Affektionen auf als bei den Mutations-Trägern ohne komplexe Veränderungen, dies entspricht aber in erster Linie dem Profil der jeweiligen Kohorte und kann zumindest in dieser Studie nicht auf das Vorhandensein einer *PPM1D*-Mutation zurückgeführt werden. Um die Krankheitsverläufe und damit die Prognose von Patienten mit komplexen Anomalien und *PPM1D*-Mutationen genauer bewerten zu können, bedarf es einer deutlich größeren Kohorte, um trotz der geringen Mutationsquote eine beurteilbare Gruppe an Mutations-Trägern zu analysieren.

### 4.3 Molekular- und zytogenetische Veränderungen von *TP53*

Neben der Untersuchung auf Mutationen in *PPM1D* wurde auch der *TP53*-Status der Patienten untersucht. Während die Analysen zu *PPM1D* ausschließlich per NGS durchgeführt wurden, wurde der *TP53*-Mutationsstatus zum Teil per Sanger-Sequenzierung und zum Teil per NGS-Analyse untersucht. Auch lagen dank routinemäßig durchgeführter FISH-Diagnostik Daten zur zytogenetischen Beeinträchtigung des auf 17p13 gelegenen *TP53* vor.

Nach Auswertung dieser Daten konnten wir in der hier untersuchten Kohorte Beobachtungen, die bereits durch andere Studien gemacht wurden, bestätigen: *TP53*-Mutationen bzw. -Deletionen waren deutlich häufiger bei Patienten mit komplexen Karyotypen als bei solchen mit weniger als drei zytogenetischen Aberrationen zu beobachten, Patienten mit *TP53*-Affektion wiesen höhere Blasten- und Aberrationszahlen als Patienten mit Wildtyp-*TP53* auf, während die Zahl parallel vorliegender somatischer Komutationen im Vergleich zu Wildtyp-Patienten geringer ausfiel (Sallman et al. 2016; Haase et al. 2019). Außerdem stellt das Vorhandensein einer *TP53*-Veränderung einen stark negativen Einflussfaktor auf das Überleben der Patienten dar, bei Patienten mit komplexem Karyotyp ist es in dieser Studie sogar der stärkste Einflussfaktor und geht mit der ungünstigsten Prognose einher. Diese Beobachtungen sind nicht neu, *TP53* ist fester Bestandteil der Routine-Diagnostik bei Patienten mit MDS und als ungünstiger Prognosefaktor bereits etabliert. Seit Bernard et al. (2020) allerdings veröffentlicht haben, dass in der von ihnen untersuchten Kohorte Patienten mit *single-hit*-Beeinträchtigung von *TP53* einen ähnlichen Verlauf wie Wildtyp-Patienten aufweisen, während *multi-hit*-Betroffene

ein deutlich ungünstigeres medianes OS zeigen, rückt auch der *TP53*-Mutationsstatus zunehmend in den Fokus. Aus diesem Grund wurde auch in der hier untersuchten Kohorte von Patienten mit komplex-aberrantem Karyotyp der Unterschied zwischen Patienten mit Wildtyp-*TP53*, *single-bit*-Mutation, *single-bit*-Deletion und *multi-bit*-Beeinträchtigung, also entweder sowohl Mutation als auch Deletion oder mehrere *TP53*-mutierte Klone, eingehend untersucht.

In unserer Analyse fiel als erstes auf, dass *single-bit*-Mutationen und *multi-bit*-Veränderungen ungefähr gleich häufig auftreten, während *single-bit*-Deletionen zumindest in dieser Studie sehr selten, nämlich in nur vier von 115 Patienten, auftraten. Zu der Gruppe mit ausschließlich *single-bit*-deletiertem 17p kann also keine Aussage getroffen werden, da vier Patienten keine verwertbaren Ergebnisse ermöglichten. Im Vergleich der übrigen Gruppen untereinander konnten hingegen aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden. Aus denen geht zum einen hervor, dass, wie bereits beschrieben, Patienten mit *TP53*-Wildtyp signifikant weniger Blasten im Knochenmark sowie zytogenetische Aberrationen, dafür aber mehr Komutationen aufweisen. Auch erreichten sie ein deutlich besseres medianes OS. Zwischen Patienten mit *single-bit*-Mutation und solchen mit mehrfach betroffenem *TP53* konnte hingegen kein Unterschied festgestellt werden. Weder im Gesamtüberleben noch in Blutwerten, Aberrations- oder Mutationszahlen zeigte sich ein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Formen der *TP53*-Beeinträchtigung. In keiner der in Kapitel 3.3 dargestellten Vergleiche konnte zwischen der Gruppe mit *single-bit*-Mutation und der mit *multi-bit*-Veränderung ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zwischen Patienten mit *single-bit*-Mutation und Wildtyp-*TP53* hingegen wurden bei den Faktoren, bei denen ein Unterschied bereits bekannt ist wie Blasten, Aberrationszahl und Komutationszahl, in jeder der Untersuchungen ein signifikanter p-Wert im Unterschied zwischen den errechneten Medianen festgestellt.

Ein weiterer Fokus lag auf der Klongröße der *TP53*-mutierten Zellklone. Sallman et al. (2016) warfen die Frage nach dem Einfluss der VAF auf den Krankheitsverlauf und das Überleben der Patienten auf, welche hier aufgegriffen und weiter untersucht wurde. Dafür wurden unter anderem die bereits in den vorangegangenen Analysen durchgeführten Vergleiche der Blutwerte sowie der Aberrations- und Komutations-Zahlen in vier Gruppen je nach Größe der *TP53*-Mutation durchgeführt. Dabei konnte in keiner der Untersuchungen ein Unterschied festgestellt werden, der über die bereits bekannte Differenz zwischen Wildtyp- und mutiertem *TP53* hinausging. Auch bei der Analyse der medianen OS der Patienten mit Wildtyp-*TP53*, derer mit einer VAF <40% und derer mit einer VAF >40% ergab sich ein signifikanter Unterschied, der allerdings erneut in erster Linie zwischen Wildtypen und Mutierten vorlag.

Die genauere Analyse der hier untersuchten Kohorte der Patienten mit komplex-aberranten Karyotypen, die mit 115 Patienten auch eine repräsentative Größe aufweist, ergab in dieser Studie, dass eine Veränderung von *TP53* ohne Frage einen der ungünstigsten



Prognosefaktoren für Patienten mit MDS darstellt, in diesem Fall sogar den Parameter mit dem stärksten Einfluss auf das Überleben der Patienten. Dennoch konnten wir, anders als in den Studien von Bernard et al. (2020), Sallmann et al. (2016) und Haase et al. (2019) keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Formen der *TP53*-Veränderung bzw. der Größe des *TP53*-mutierten Zellklons feststellen. In der hier durchgeführten Untersuchung zeigt sich lediglich, dass das bloße Vorhandensein einer *TP53*-Veränderung, ungeachtet ihrer Form, Ausprägung oder VAF, einen ungünstigen Prognosefaktor bei cA darstellt und das mediane OS der Patienten stärker als andere hier untersuchte Faktoren beeinflusst. Damit bestätigt sich auch durch diese Studie, dass eine routinemäßige Untersuchung von *TP53* für den Patienten von großer Bedeutung ist und weiterhin Standard in der MDS-Diagnostik bleiben muss.

Aufgrund seiner prognostischen Bedeutung ist *TP53* als potenzielles Target für zielgerichtete Therapien untersucht worden. Dabei ist ein vielversprechender Ansatz in den Fokus der Forschung gerückt: In diversen Studien wird aktuell die Wirkung des Wirkstoffs APR-246 getestet, der ersten Daten zufolge den Wildtyp-Zustand von p53 in mutierten Klonen wiederherstellen und so die reguläre Apoptose-Einleitung reaktivieren könnte (Sallmann 2020). Besonders in Kombination mit 5-Azacytidin scheint diese Therapie erfolgsversprechend bei Patienten mit MDS und *TP53*-Mutationen (Maslah et al. 2020). Diese Entwicklungen könnten in der Therapie der Patienten die, wie bereits festgestellt, eine ausgesprochen ungünstige Prognose haben, neue Optionen eröffnen und die Prognose dieser Patienten evtl. nachhaltig verbessern.

#### 4.4 5q-Deletionen als Teil des komplexen Karyotyps

Bei der Untersuchung verschiedener Parameter auf ihren Einfluss auf das Überleben der Patienten fiel vor allem eine Deletion des langen Arms von Chromosom 5 als Risikofaktor auf. Sowohl in der Gesamtkohorte als auch bei den isolierten Patienten mit komplexen zytogenetischen Aberrationen zeigten Patienten mit del(5q) einen ungünstigeren Krankheitsverlauf. Schon viele MDS-Kohorten mit del(5q) wurden eingehend untersucht und ausgewertet, oft stellte dabei das Vorliegen eines komplexen Karyotyps einen Risikofaktor dar (Haase et al. 2007). Allerdings wird meistens eine del(5q)-Kohorte untersucht, bei denen Patienten mit cA eine kleine Untergruppe darstellen. Dass eine größere Kohorte von MDS-Patienten speziell mit komplex-aberranten zytogenetischen Befunden explizit auf ihren 5q-Deletions-Status und dessen Auswirkung auf das Überleben und den Krankheitsverlauf untersucht wurde, ist zum Zeitpunkt der Auswertung dieser Studie nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde dieser ursprüngliche Nebenbefund genauer untersucht.

Dabei konnte festgestellt werden, dass bei Patienten mit cA eine Deletion von 5q nach *TP53*-Veränderungen, dem Hämoglobin-Wert und der Aberrationszahl als vierstärkster Risikofaktor für einen ungünstigen Krankheitsverlauf identifiziert werden konnte. Patienten mit 5q-Deletion hatten außerdem signifikant mehr zytogenetische Aberrationen als solche,

bei denen 5q nicht deletiert war. Die Zahl der vorliegenden Komutationen ohne Betrachtung von *TP53* war hingegen signifikant geringer, wenn 5q deletiert war. Dieser Effekt war nicht mehr nachweisbar, sobald Mutationen von *TP53* miteingeschlossen wurden. Von den 80/115 Patienten (69,5%), bei denen eine del(5q) nachgewiesen werden konnte, hatten nur elf Patienten (13,75% der 80 Patienten) ein vollkommen unverändertes *TP53*. Die übrigen 69 wiesen irgendeine Form der *TP53*-Affektion auf. Umgekehrt hatten von den 80/115 Patienten (69,5%) mit verändertem *TP53* auch wieder nur elf ein undeletiertes 5q (23,75% der 80 Patienten). *TP53*-Veränderungen und 5q-Deletionen scheinen also zumindest in dieser Untersuchung bei Patienten mit cA vermehrt kombiniert aufzutreten. Aufgrund dieser Beobachtung wurde untersucht, ob die beiden Faktoren in den verschiedenen Kombinationen unterschiedliche Auswirkungen auf Überleben, Blutwerte und Aberrations- bzw. Komutationszahlen haben. Bei den Überlebensanalysen zeigte del(5q) keinen wesentlichen Einfluss: Dabei konnte nur erneut beobachtet werden, dass *TP53* als eindeutig signifikanter Faktor das Überleben der Patienten nachteilig beeinflusst. Zwischen Patienten mit *TP53*-Wildtyp mit oder ohne del(5q) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, ebenso wenig für Patienten mit verändertem *TP53* mit oder ohne del(5q). Generell zeigten die durchgeführten Vergleiche, die in Kapitel 3.5.2 zu sehen sind, keinen wirklichen Unterschied zwischen den verschiedenen Kombinationen von *TP53*- und 5q-Deletions-Status. Beide Faktoren scheinen als unabhängige Risikofaktoren zu wirken, in ihrer Kombination zeigt sich allerdings kein signifikanter Unterschied. Der Effekt von *TP53* auf das Überleben und die untersuchten Parameter scheint zu überwiegen, sodass die Überlegung naheliegt, dass der Einfluss von del(5q), der in den Analysen isoliert zu diesem Faktor nachgewiesen werden konnte, eher darauf zurückzuführen ist, dass 5q-Deletionen verstärkt in Verbindung mit *TP53*-Mutationen bzw. -Deletionen auftreten. Was allerdings der Grund für dieses gehäufte gemeinsame Auftreten ist, ist noch nicht vollständig verstanden. Generell ist eine Veränderung von *TP53* mit einer höheren zytogenetischen Aberrationszahl assoziiert (Sallman et al. 2016). Es scheint nicht ausgeschlossen, dass allein aufgrund dieser Assoziation und der Tatsache, dass 5q-Deletionen die häufigste zytogenetische Veränderungen bei MDS-Patienten sind (Adema and Bejar 2013), die statistische Wahrscheinlichkeit für ein kombinierten Auftreten diese Beobachtung erklären würde. Allerdings muss auch in Erwägung gezogen werden, ob eine *TP53*-Mutation das Auftreten von 5q-Deletionen begünstigen könnte, da durch fehlende Apoptose-Induktion mehr zytogenetisch veränderte Zellen einem Zellzyklus-Arrest entgehen und sich dadurch klonal vermehren können. Ob umgekehrt eine del(5q) das Auftreten einer *TP53*-Mutation begünstigen könnte, ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Theorie ist, dass durch die Therapie mit Lenalidomid kleinere Klone mit *TP53*-Mutation einen Selektionsvorteil haben könnten, sodass die Therapie, die bei Patienten mit 5q-Deletion durchaus etabliert ist, eine Ausbreitung des *TP53*mut-Klons begünstigt (Greenberg et al. 2017; Greenberg et al. 2012; Haase et al. 1995). Eine neuere Hypothese zu dieser Assoziation formulierten Hsu et al. 2019: Ihren Daten zufolge könnte das Vorliegen einer Deletion von 5q bei gleichzeitig

vorliegendem, evtl. noch sehr kleinen, *TP53*-mutierten Klon die Genominstabilität und den Verlust der Heterozygotie begünstigen, sodass durch den Verlust der regulären p53-Wirkung die Expansion des mutierten Klons begünstigt würde. Außerdem könnte eine erhöhte Genom-Instabilität zur Akkumulation von DNA-Veränderungen nach genotoxischem Stress und somit zur Entstehung komplexer Karyotypen beitragen (Hsu et al. 2019). Diese Hypothese liefert eine schlüssige Erklärung für das vermehrt gemeinsame Auftreten von 5q-Deletionen und *TP53*-Mutationen bei MDS-Patienten mit cA und wird weiterhin überprüft.

Welchen Einfluss ein gemeinsames oder isoliertes Auftreten von del(5q) und *TP53*-Veränderungen auf das Überleben oder andere relevante Patienten-Faktoren hat, muss in einer größeren Kohorte genauer untersucht werden. In der hier durchgeführten Untersuchung ließ sich kein Unterschied zwischen *TP53*-mutierten Patienten mit oder ohne del(5q) und umgekehrt feststellen, allerdings waren auch die meisten Patienten von beiden Veränderungen betroffen, sodass die Gruppengröße der Gruppen, die nur entweder del(5q) oder eine *TP53*-Veränderung aufwiesen, zu klein war, um endgültig aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können. Es ließ sich aber beobachten, dass beide Faktoren gehäuft gemeinsam auftreten. Außerdem unterscheidet sich bei Patienten mit cA das mediane OS signifikant zwischen den Patienten mit del(5q) und denen ohne Deletion, sodass Patienten mit del(5q) eine deutlich ungünstigere Prognose aufweisen. Bei Patienten ohne cA sind MDS-Patienten mit isoliertem 5q-Syndrom solche mit einem günstigeren Krankheitsverlauf, sodass allein schon aufgrund des Ansprechens auf Lenalidomid ein 5q-Syndrom als günstiger Prognosefaktor betrachtet wird. In einer Kohorte mit Patienten mit komplexen Aberrationen kann diese Beobachtung hingegen nicht gemacht werden, das Vorhandensein einer del(5q) ist dabei sogar ein äußerst ungünstiger Faktor. Ob dieser ungünstige Einfluss auf den Krankheitsverlauf tatsächlich der Deletion des langen Arms von Chromosom 5 oder dem gehäuften Auftreten von *TP53* zuzuschreiben ist, bedarf weiterer Klärung. Auch wie sich das Vorhandensein von *TP53*-Mutationen und del(5q) gegenseitig beeinflussen und was die Ursache für das beobachtete gemeinsame Auftreten ist, muss in weiteren Studien genauer untersucht werden. Insgesamt konnte eine Deletion von 5q aber als Risikofaktor für Patienten mit cA identifiziert werden, sodass die regelmäßige Untersuchung auf diese zytogenetische Veränderung auch bei Patienten mit komplex-aberranten Karyotypen weiterhin gerechtfertigt bleibt.

## 5 Zusammenfassung

115 Patienten mit myelodysplastischen Syndromen und komplexem Karyotyp sowie ein 40 Patienten großes Vergleichskollektiv ohne solchen wurden in dieser Studie genau charakterisiert, zytogenetisch analysiert und mittels *next generation sequencing* auf eventuelle *PPM1D*-Mutationen untersucht. Außerdem wurde der *TP53*-Status mittels zytogenetischer Analyse und *next generation sequencing* oder Sanger-Sequenzierung erhoben. Ziel der Studien war es, einen möglichen alternativen Mechanismus bei der Entstehung komplexer Karyotypen zu suchen, der die Akkumulation zytogenetischer Veränderungen auch ohne *TP53*-Mutation erklären könnte. Aufgrund gehäufte 17q-Deletionen in vorangegangenen Untersuchungen und der Prävalenz bei klonalen Mutationen unklaren Potentials sowie therapieassoziierten myeloischen Erkrankungen wurden Mutationen in *PPM1D*, das für den p53-Inhibitor Wip1 kodiert, als alternative Mutationen in Betracht gezogen. Es sollte die Prävalenz und der Einfluss von *PPM1D*-Mutationen sowie die Unterschiede zwischen verschiedenen Formen von *TP53*-Mutationen untersucht werden.

Dabei konnten wir entgegen der Erwartungen in nur 1,7% der 115 Patienten mit komplexen Aberrationen eine *PPM1D*-Mutation nachweisen. Die Patienten, die diese Mutationen trugen, zeigten sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe, sodass über den Einfluss der Mutation auf die Erkrankung zum aktuellen Zeitpunkt keine Aussage gemacht werden konnte. Es ließ sich aber feststellen, dass die Mutations-Prävalenz in einer Kohorte aus Patienten mit komplexen Karyotypen geringer ist als in bereits analysierten Kohorten mit de novo oder therapieassoziiertes Erkrankung mit del(5q).

Wir konnten *TP53*-Mutationen bzw. -Deletionen in 69,5% der Patienten nachweisen. Diese stellten bei Patienten mit komplexen Karyotypen den ungünstigsten Prognosefaktor dar: Das mediane Überleben der Patienten mit jeglicher Art von *TP53*-Veränderung (mut und/oder del) war signifikant geringer als das der Wildtyp-Patienten. Bei der Untersuchung des Einflusses der Form der *TP53*-Veränderung konnte allerdings basierend auf dem medianen Überleben oder anderen krankheitsspezifischen Merkmalen kein Unterschied zwischen *single-bit*-Mutationen und *multi-bit*-Veränderungen festgestellt werden. Auch bei der Analyse des Einflusses der Klongröße der *TP53*-mutierten Zellklone konnte kein Unterschied zwischen Patienten mit einer größeren oder kleineren varianten Allelfrequenz festgestellt werden, was aber der geringen Gruppengrößen in den jeweiligen Subgruppen geschuldet sein könnte. Insgesamt muss bei der Beurteilung unserer Befunde berücksichtigt werden, dass die Untersuchungen im Wesentlichen, anders als bei den bisher publizierten *TP53*-Studien bei MDS, an einer MDS-Patientenkohorte mit ausschließlich komplexen Chromosomenanomalien erfolgt sind.

Eine wichtige Beobachtung der Studie war, dass Patienten, die eine Deletion von 5q als Teil ihres komplexen Karyotypen aufwiesen, ein signifikant schlechteres Überleben zeigten als solche, bei denen 5q unbeeinträchtigt war. Außerdem zeigten sie eine höhere Zahl zytogenetischer Aberrationen und damit einhergehend eine höhere Komplexität des

Rearrangements ihres Genoms und damit eine erhöhte genetische Instabilität, was das verkürzte Überleben erklären könnte. In diesem Zusammenhang wurde außerdem eine starke Assoziation zu *TP53* festgestellt, die auch andere Arbeitsgruppen bereits beobachten konnten und eine Begünstigung einer *TP53*-Veränderung durch del(5q) als mögliche Erklärung formulierten.

Insgesamt konnte in der hier durchgeführten Studie festgestellt werden, dass *PPM1D*-Mutationen als alternativer Mechanismus bei der Entstehung komplex-aberranter Karyotypen keine relevante Rolle spielen. Außerdem legt die geringe Prävalenz nahe, dass diese Mutationen bei Patienten mit cA nicht prognoseentscheidend sind. Ein Einfluss auf das Überleben der Patienten, bei denen eine Mutation nachgewiesen worden konnte, konnte aufgrund der geringen Patientenzahl nicht ermittelt werden. *TP53* hingegen ist auch in unserer Studie ein deutlicher Risikofaktor, allerdings scheint dabei den hier generierten Daten zufolge die Art der *TP53*-Veränderung und die Größe der mutierten Klone keinen direkten Einfluss auf das Überleben der Patienten zu haben, wobei hier die relativ geringe Kohortengröße zu beachten bleibt. Um diesem starken Risikofaktor therapeutisch besser entgegenwirken zu können, ist die Entwicklung und weitere Testung von gezielten Therapien wie mit APR-246 von großer Relevanz für die Prognose der Patienten mit *TP53*-Mutationen.

Nach Auswertung dieser Studie kann festgehalten werden, dass *PPM1D* nicht das Gen ist, das als Alternative zu *TP53* bei der Frage nach dem Zustandekommen und der Expansion komplex-aberrant veränderter Zellklone betrachtet werden könnte. Um die Entstehung der komplexen Karyotypen bei MDS-Patienten weiterhin zu ergründen, müssen andere Gene oder Faktoren untersucht werden, die möglicherweise eine Akkumulation zytogenetischer Aberrationen begünstigen und die Expansion einer komplex aberranten Karyotypen tolerieren könnten, wenn keine *TP53*-Veränderung vorliegt. Diese Fragestellung, die große Relevanz für die Einschätzung der Prognose von Patienten mit MDS und komplexen Aberrationen und möglicher Therapietargets hat, wird Inhalt weiterer noch folgender Studien sein, um die Versorgung dieser Patientengruppe weiterhin zu optimieren.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adema V, Bejar R (2013): What lies beyond del(5q) in myelodysplastic syndrome? *Haematologica* 98, 1819–1821
- Akbari MR, Lepage P, Rosen B, McLaughlin J, Risch H, Minden M, Narod SA (2014): PPM1D mutations in circulating white blood cells and the risk for ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 106, djt323
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW (2016): The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391–2405
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D et al. (2011): Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 364, 2496–2506
- Bejar R, Stevenson KE, Caughey B, Lindsley RC, Mar BG, Stojanov P, Getz G, Steensma DP, Ritz J, Soiffer R et al. (2014): Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 32, 2691–2698
- Bernard E, Nannya Y, Hasserjian RP, Devlin SM, Tuechler H, Medina-Martinez JS, Yoshizato T, Shiozawa Y, Saiki R, Malcovati L et al. (2020): Implications of TP53 Allelic State for Genome Stability, Clinical Presentation and Outcomes in Myelodysplastic Syndromes. *Nat Med* 10, 1549-1556
- Braulke F, Jung K, Schanz J, Götze K, Müller-Thomas C, Platzbecker U, Germing U, Brümmendorf TH, Bug G, Ottmann O et al. (2013): Molecular cytogenetic monitoring from CD34+ peripheral blood cells in myelodysplastic syndromes: first results from a prospective multicenter German diagnostic study. *Leuk Res* 37, 900–906
- Braulke F, Platzbecker U, Müller-Thomas C, Götze K, Germing U, Brümmendorf TH, Nolte F, Hofmann W-K, Giagounidis AAN, Lübbert M et al. (2015): Validation of cytogenetic risk groups according to International Prognostic Scoring Systems by peripheral blood CD34+FISH: results from a German diagnostic study in comparison with an international control group. *Haematologica* 100, 205–213
- Braulke F, Schanz J, Jung K, Shirneshan K, Schulte K, Schuetze C, Steffens R, Trümper L, Haase D (2010): FISH analysis of circulating CD34+ cells as a new tool for genetic monitoring in MDS: verification of the method and application to 27 MDS patients. *Leuk Res* 34, 1296–1301
- Cazzola M, Malcovati L (2005): Myelodysplastic syndromes--coping with ineffective hematopoiesis. *N Engl J Med* 352, 536–538
- Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, Kundra R, Zhang H, Wang J, Rudolph JE, Yaeger R, Soumerai T, Nissan MH et al. (2017): OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol* 2017
- Fenaux P, Giagounidis A, Selleslag D, Beyne-Rauzy O, Mufti G, Mittelman M, Muus P, Te Boekhorst P, Sanz G, Del Cañizo C et al. (2011): A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood* 118, 3765–3776
- Ganster C, Kämpfe D, Jung K, Braulke F, Shirneshan K, Machherndl-Spandl S, Suessner S, Bramlage CP, Legler TJ, Koziolok MJ et al. (2015): New data shed light on Y-loss-related pathogenesis in myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes Cancer* 54, 717–724

- Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M et al. (2014): Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* 371, 2477–2487
- Giagounidis A, Haase D (2013): Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol* 26, 337–353
- Giagounidis A, Haase S (2020): Where Does Morphology Fit in Myelodysplastic Syndrome Diagnosis in the Era of Molecular Testing? *Hematol Oncol Clin North Am* 34, 321–331
- Giagounidis AAN, Germing U, Haase S, Hildebrandt B, Schlegelberger B, Schoch C, Wilkens L, Heinsch M, Willems H, Aivado M et al. (2004): Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia* 18, 113–119
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D et al. (1997): International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89, 2079–2088
- Greenberg PL (2013): The multifaceted nature of myelodysplastic syndromes: clinical, molecular, and biological prognostic features. *J Natl Compr Canc Netw* 11, 877-84; quiz 885
- Greenberg PL, Stone RM, Al-Kali A, Barta SK, Bejar R, Bennett JM, Carraway H, Castro CM de, Deeg HJ, DeZern AE et al. (2017): Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 15, 60–87
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F et al. (2012): Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120, 2454–2465
- Haase D, Feuring-Buske M, Könemann S, Fonatsch C, Troff C, Verbeek W, Pekrun A, Hiddemann W, Wörmann B (1995): Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations. *Blood* 86, 2906–2912
- Haase D, Feuring-Buske M, Schäfer C, Schoch C, Troff C, Gahn B, Hiddemann W, Wörmann B (1997): Cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations in AML and MDS characterized by the expression of CD38 and CD117. *Leukemia* 11, 674–679
- Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis AAN et al. (2007): 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
- Haase D, Stevenson KE, Neuberg D, Maciejewski JP, Nazha A, Sekeres MA, Ebert BL, Garcia-Manero G, Haferlach C, Haferlach T et al. (2019): TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia* 33, 1747–1758
- Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T et al. (2014): Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28, 241–247
- Hartmann L, Metzeler KH (2019): Clonal hematopoiesis and preleukemia-Genetics, biology, and clinical implications. *Genes Chromosomes Cancer* 58, 828–838
- Herold, G. (Hrsg.) (2018): Innere Medizin 2018: Eine vorlesungsorientierte Darstellung unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis; Gerd Herold, Köln 2018

- Hofmann W-K, Platzbecker U, Götze K, Haase D, Thol F, Stauder R, Passweg J, Germing U (2020): onkopedia Leitlinie - Myelodysplastische Syndrome (MDS). <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/myelodysplastische-syndrome-mds/> (05.04.2020)
- Hsu J, Reilly A, Hayes BJ, Clough CA, Konnick EQ, Torok-Storb B, Gulsuner S, Wu D, Becker PS, Keel SB et al. (2019): Reprogramming identifies functionally distinct stages of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Blood* **134**, 186–198
- Hsu JI, Dayaram T, Tovy A, Braekeleer E de, Jeong M, Wang F, Zhang J, Heffernan TP, Gera S, Kovacs JJ et al. (2018): PPM1D Mutations Drive Clonal Hematopoiesis in Response to Cytotoxic Chemotherapy. *Cell Stem Cell* **23**, 700-713.e6
- Illumina (2020): illumina. <https://emea.illumina.com/techniques/sequencing.html> (29.04.2020)
- Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A et al. (2014): Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* **371**, 2488–2498
- Kassambara A (2019): survminer: Survival Analysis and Visualization: R package Version 0.4.6. <https://cran.r-project.org/web/packages/survminer/> (27.04.2020)
- Kassambara A (2020): ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots: R package Version 0.2.5. <https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/> (27.04.2020)
- Lindsley RC, Saber W, Mar BG, Redd R, Wang T, Haagenson MD, Grauman PV, Hu Z-H, Spellman SR, Lee SJ et al. (2017): Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med* **376**, 536–547
- Martin R, Acha P, Ganster C, Palomo L, Dierks S, Fuster-Tormo F, Mallo M, Ademà V, Gómez-Marzo P, Haro N de et al. (2018): Targeted deep sequencing of CD34+ cells from peripheral blood can reproduce bone marrow molecular profile in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* **93**, E152-E154
- Maslah N, Salomao N, Drevon L, Verger E, Partouche N, Ly P, Aubin P, Naoui N, Schlageter M-H, Bally C et al. (2020): Synergistic effects of PRIMA-1Met (APR-246) and 5-azacitidine in TP53-mutated myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Haematologica* **105**, 1539–1551
- McGowan-Jordan J, Schmid M (eds.) (2016): ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016). Reprint of: Cytogenetic and Genome Research 2016, Vol. 148, No. 1, 1. Auflage; Karger S, Freiburg im Breisgau, s.l. 2016
- OncoKB (2020): OncoKB. <https://www.oncokb.org/gene/PPM1D/> (28.04.2020)
- Panagiota V, Meggendorfer M, Kubasch AS, Gabdoulline R, Krönke J, Shahswar R, Mies A, Kandziora C, Klement P, Schiller J et al. (2018): The Role of PPM1D Mutations in Lenalidomide Resistance and Progression in Patients with MDS and Deletion of Chromosome 5q. *Blood* **132**, 4360
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, van Loo P, Yoon CJ, Ellis P, Wedge DC, Pellagatti A et al. (2013): Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **122**, 3616-27; quiz 3699
- R Core Team (2018): R: A language and environment for statistical computing. Available online at <https://www.R-project.org/> (27.04.2020)
- Ruark E, Snape K, Humburg P, Loveday C, Bajrami I, Brough R, Rodrigues DN, Renwick A, Seal S, Ramsay E et al. (2013): Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. *Nature* **493**, 406–410



- Sallman DA (2020): To target the untargetable: elucidation of synergy of APR-246 and azacitidine in TP53 mutant myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Haematologica* 105, 1470–1472
- Sallman DA, Komrokji R, Vaupel C, Cluzeau T, Geyer SM, McGraw KL, Al Ali NH, Lancet J, McGinniss MJ, Nahas S et al. (2016): Impact of TP53 mutation variant allele frequency on phenotype and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 30, 666–673
- Schaab R, Ganster C, Dierks S, Shirneshan K, Talló Parra M, Martin R, Germing U, Platzbecker U, Lange F, Kroeger N et al. (2016): Interdependency Between TP53 Mutations, Cytogenetics, Genetic Instability and Prognosis in MDS and Secondary AML. *Blood* 128, 2001
- Schanz J, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Tuechler H, Valent P, Hildebrandt B, Giagounidis A, Aul C et al. (2011): Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. *J Clin Oncol* 29, 1963–1970
- Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak ML, Ohyashiki K et al. (2012): New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 30, 820–829
- Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM et al. (2002): Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 20, 2429–2440
- Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL (2017): The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer* 17, 5–19
- Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, Ebert BL (2015): Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* 126, 9–16
- Strom SS, Gu Y, Gruschkus SK, Pierce SA, Estey EH (2005): Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia* 19, 1912–1918
- Therneau TM, Grambsch PM: Modeling survival data: Extending the Cox model (Statistics for biology and health), 2. ed; Springer, New York 2001
- Therneau TM (2020): A Package for Survival Analysis in R: R package version 3.1-12 (27.04.2020)
- Welch JS (2018): Patterns of mutations in TP53 mutated AML. *Best Pract Res Clin Haematol* 31, 379–383
- Wickham H: ggplot2: Elegant graphics for data analysis (Use R!); Springer, Cham 2016

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Möglichkeit nutzen, all denjenigen zu danken, die mich in den letzten Jahren auf dem Weg zu dieser Arbeit unterstützt, gefördert und motiviert haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Detlef Haase danken, der diese ganze Arbeit überhaupt ermöglicht hat. Neben der Betreuung und Bereitstellung aller nötigen Mittel durfte ich eine intensive Förderung und Einbindung in die Arbeitsgruppe erfahren. Prof. Dr. Haase motivierte mich dazu, immer wieder neue Gedanken und Ideen zu verfolgen und meine Beobachtungen auch auf diversen Kongressen vorzustellen. Durch seine Unterstützung und nicht zuletzt auch Finanzierung ermöglichte er mir unter anderem die Teilnahme am Jahreskongress der American Society of Hematology in Orlando, Florida, wofür ich wirklich dankbar bin. All diese Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten haben mich immer wieder motiviert, immer noch etwas genauer hinzuschauen und mich mit den Themen der Arbeitsgruppe zu beschäftigen. Auch bei der Gestaltung meines weiteren Berufsweges hat er mich sehr unterstützt und sich für mich eingesetzt. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Dr. Christina Ganster, die als meine direkte Betreuerin jederzeit für mich erreichbar war und mich durch etliche Probleme und Schwierigkeiten geführt hat. Alle meine vielen Fragen wurden innerhalb kürzester Zeit beantwortet und sämtliche Entwürfe schnell und konstruktiv korrigiert. Bei den verschiedensten Problemen konnte Dr. Ganster mir weiterhelfen und hat den Weg von der Anfrage nach einer Möglichkeit der Promotion bis zum Fertigstellen dieser Arbeit bedeutend einfacher und angenehmer gestaltet. Für die konstruktive Kritik, das offene Ohr und die Hilfe bei sämtlichen Problemen möchte ich ihr meinen Dank aussprechen.

Außerdem gilt mein Dank all den Mitarbeitenden des INDIGHO-Labors, die mir ständig bei fachlichen und praktischen Fragen weitergeholfen haben: Bei Dr. Sascha Dierks und Dr. Roman Martin für die Etablierung der Methodik, bei Dr. Katayoon Shirneshan bei der Unterstützung im Bereich zytogenetischer Fragen, bei Arkadiusz Kominowski für die Hilfe im IT-Bereich, Katharina Rittscher, Dr. Elzbieta Brzuszkiewicz, Dr. Maria Kamper, Paolo Mazzeo und bei allen Mitgliedern des Labor-Teams, die mich mit viel Geduld und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der experimentellen Abschnitte unterstützt haben. Abschließend gilt mein Dank auch Ute Windolph und Heidrun Fascher für die Administration im Hintergrund.

## Lebenslauf

Am 05. Januar 1995 wurde ich, Lea Naomi Eder, als Tochter von Brigitte Eder und Dr. med. Matthias Eder in Frankfurt am Main geboren. Gemeinsam mit meinem Bruder Tobias wuchs ich nach einem Umzug 1996 in Burgdorf (Region Hannover) auf.

Von 2001 bis 2004 besuchte ich die Astrid-Lindgren-Grundschule in Burgdorf. Anschließend besuchte ich für ein Jahr von 2005 bis 2006 das Gymnasium Burgdorf, ehe ich 2006 an das Kaiser-Wilhelm- und Ratsgymnasium Hannover wechselte. Dort legte ich schließlich 2013 mein Abitur ab. Im Anschluss daran absolvierte ich von 2013 bis 2014 einen Bundesfreiwilligendienst an der Medizinischen Hochschule Hannover.

Zum Wintersemester 2014/15 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Den vorklinischen Studienabschnitt konnte ich 2016 erfolgreich beenden, nachdem ich den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung abgelegt hatte.

Während des klinischen Studienabschnitts interessierte ich mich zunehmend für Erkrankungen aus dem immunologischen und hämatologischen Formenkreis, sodass ich mit Prof. Dr. Detlef Haase Kontakt aufnahm, um mich nach einer Möglichkeit zur Promotion in der Abteilung für Hämatologie und medizinische Onkologie an der Universitätsmedizin Göttingen zu erkundigen. Das Angebot, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Haase mitzuarbeiten und mich speziell mit genetischen Risikokonstellationen bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen zu beschäftigen, nahm ich dankend an und begann im Herbst 2017 mit meiner Arbeit.

Im Herbst 2019 habe ich die schriftliche Prüfung des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung abgelegt. Bis dahin habe ich semesterbegleitend meine Untersuchungen in der Arbeitsgruppe durchgeführt. Ich nutze die Möglichkeit, ein Freisemester einzulegen und widmete mich in diesem der Fertigstellung und Verschriftlichung meiner Arbeit.

Von Mai 2020 bis April 2021 absolvierte ich mein praktisches Jahr am Städtischen Klinikum Braunschweig und der Universitätsmedizin Göttingen. Nach Erlangen meiner Approbation im Juni 2021 habe ich im August 2021 eine Facharztausbildung im Fachbereich Innere Medizin mit dem Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie an der Universitätsmedizin Göttingen begonnen und strebe weiteres wissenschaftliches Arbeiten in diesem Forschungsbereich an.