

Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie
(Prof. Dr. med. L. Trümper)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Zusammenhänge zwischen
TP53-Mutationsstatus, genetischer
Instabilität und Prognose bei MDS und
sekundärer AML mit komplex
aberrantem Karyotyp**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Roxana Magdalena Schaab

aus

Schotten

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Referent: Prof. Dr. med. D. Haase

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. S. Pauli

Drittreferent/in: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 18. März 2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Zusammenhänge zwischen *TP53*-Mutationsstatus, genetischer Instabilität und Prognose bei MDS und sekundärer AML mit komplex aberrantem Karyotyp" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 14. August 2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Myelodysplastische Syndrome (MDS)	1
1.2 MDS mit komplex aberrantem Karyotyp.....	6
1.3 Mutationen von <i>TP53</i> bei MDS.....	7
1.3.1 Rolle von Mutationen bei MDS.....	7
1.3.2 <i>TP53</i> und dessen Rolle bei Neoplasien.....	7
1.3.3 <i>TP53</i> -Mutationen bei MDS	8
1.4 Aufgabenstellung.....	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Material.....	11
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	11
2.1.2 Reagenzien.....	12
2.1.3 Primer.....	14
2.1.4 Geräte und Software	15
2.1.5 Patienten und Einschlusskriterien	16
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Chromosomenbänderungsanalyse (CBA)	20
2.2.2 Interphase-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	21
2.2.3 Multiplex-Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (mFISH)	21
2.2.4 Mutationsanalyse von <i>TP53</i>	22
2.2.5 Molekulare Karyotypisierung durch SNP-Array-Analyse (SNP-A)	31
2.2.6 Statistische Auswertung.....	32
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Zytogenetische und molekulare <i>TP53</i> -Veränderungen.....	34
3.1.1 Angaben zum Patientenkollektiv mit und ohne molekulare <i>TP53</i> -Mutation.....	35
3.1.2 Angaben zum Patientenkollektiv mit und ohne zytogenetische <i>TP53</i> -Mutation (del(17p)/CN-LOH).....	37
3.1.3 Angaben zum Patientenkollektiv mit kombinierten <i>TP53</i> -Veränderungen.....	38
3.2 Mutationsanalyse	42
3.3 Ausmaß der genetischen Instabilität.....	43
3.3.1 Anzahl der CA	43
3.3.2 Anzahl der Fusionen.....	47
3.3.3 Größe der TGA.....	50
3.3.4 Zusammenfassung.....	53

3.4	Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier.....	54
3.4.1	Gesamtüberleben der Kohorte	54
3.4.2	Gesamtüberleben von Patienten in Abhängigkeit von molekularen <i>TP53</i> -Mutationen.....	55
3.4.3	Gesamtüberleben von Patienten in Abhängigkeit von zytogenetischen <i>TP53</i> -Veränderungen (del(17p)/CN-LOH)	56
3.4.4	Gesamtüberleben von Patienten in Abhängigkeit von kombinierten Veränderungen des <i>TP53</i>	57
3.4.5	Gesamtüberleben von Patienten in Abhängigkeit von der Anzahl der CA.....	60
3.4.6	Gesamtüberleben von Patienten in Abhängigkeit vom monosomalen Karyotyp (mK).....	65
3.4.7	Gesamtüberleben von Patienten in Abhängigkeit von der Therapie mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren	74
3.4.8	Zusammenfassung.....	79
3.5	Cox-Regressionsanalyse.....	80
3.5.1	Entwicklung eines Prognosesystems für Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp	91
4	Diskussion.....	93
4.1	Häufigkeit der <i>TP53</i> -Veränderungen bei MDS, CMML und sAML nach MDS mit komplex aberrantem Karyotyp.....	93
4.1.1	Analyse der molekularen <i>TP53</i> -Mutationen.....	95
4.2	Vergleich der Patientengruppen.....	96
4.3	<i>TP53</i> -Veränderungen und das Ausmaß der genetischen Instabilität.....	97
4.4	<i>TP53</i> -Veränderungen und Anzahl der CA als Prognoseparameter.....	98
4.5	Monosomaler Karyotyp vs. Anzahl der CA.....	99
4.6	Einfluss der DMTI-Therapie bei Patienten mit <i>TP53</i> -Veränderungen.....	100
4.7	Molekulare <i>TP53</i> -Mutation – (k)ein unabhängiger prognostischer Parameter?	101
4.8	Limitationen der Untersuchung.....	102
4.9	Ausblick: Weitere Zielgene im <i>TP53</i> -Signalweg.....	103
4.9.1	Weitere Veränderungen von <i>TP53</i>	103
4.9.2	Regulatoren von <i>TP53</i>	104
4.9.3	Effektoren von <i>TP53</i>	108
5	Zusammenfassung.....	111
6	Literaturverzeichnis	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CBA einer Patientin mit komplex aberrantem Karyotyp.....	20
Abbildung 2: mFISH eines Patienten mit komplexen Anomalien und multiplen chromosomalen Bruchereignissen und Fusionen.....	22
Abbildung 3: Messung der DNA-Konzentration (Spalte ng/ μ l) mithilfe des Nanodrop.....	24
Abbildung 4: Extinktionsplot einer Probe.....	24
Abbildung 5: 0,8 %-Agarosegel mit DNA-Banden.....	26
Abbildung 6: 1,5 %-Agarosegel mit stichprobenartiger Überprüfung der PCR-Produkte.....	29
Abbildung 7: Darstellung von Elektropherogrammen im Pogramm SeqPilot.....	31
Abbildung 8: Darstellung eines kopiezahlneutralen Heterozygotieverlustes in Chromosom 17 im Bereich von <i>TP53</i>	32
Abbildung 9: Anzahl der kombinierten <i>TP53</i> -Veränderungen in der Kohorte.....	34
Abbildung 10: Verteilung der Mutationen im <i>TP53</i> -Gen.....	42
Abbildung 11: Verteilung der Anzahl der CA in der Patientenkohorte.....	43
Abbildung 12: Anzahl der CA bei Patienten mit und ohne molekulare <i>TP53</i> -Mutation.....	44
Abbildung 13: Anzahl der CA bei Patienten mit und ohne zytogenetische <i>TP53</i> -Veränderung (del(17p)/CN-LOH).....	45
Abbildung 14: Anzahl der CA im Vergleich von Patienten mit und ohne Veränderung des <i>TP53</i>	45
Abbildung 15: Anzahl der CA bei Patienten mit kombinierten Veränderungen des <i>TP53</i>	46
Abbildung 16: Anzahl der Fusionen bei Patienten mit und ohne molekulare <i>TP53</i> -Mutation.....	47
Abbildung 17: Anzahl der Fusionen bei Patienten mit und ohne zytogenetische <i>TP53</i> -Veränderung.....	48
Abbildung 18: Anzahl der Fusionen bei Patienten mit und ohne <i>TP53</i> -Veränderung.....	48
Abbildung 19: Anzahl der Fusionen bei Patienten mit kombinierten Veränderungen des <i>TP53</i>	49
Abbildung 20: Größe der TGA bei Patienten mit und ohne molekulare <i>TP53</i> -Mutation.....	50
Abbildung 21: Größe der TGA bei Patienten mit und ohne zytogenetische <i>TP53</i> -Veränderung.....	51
Abbildung 22: Größe der TGA bei Patienten mit und ohne <i>TP53</i> -Veränderung.....	52
Abbildung 23: Größe der TGA bei Patienten mit kombinierten Veränderungen des <i>TP53</i>	53
Abbildung 24: Med. OS für die gesamte Kohorte: 14 Monate [KI: 8 - 17].....	54
Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit von einer molekularen <i>TP53</i> -Mutation.....	55
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit von einer zytogenetischen <i>TP53</i> -Veränderung.....	56
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve bei Patienten mit und ohne <i>TP53</i> -Veränderung.....	57
Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit von kombinierten <i>TP53</i> -Veränderungen.....	58
Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurven mit Vergleich der einzelnen Gruppen mit und ohne <i>TP53</i> -Veränderungen.....	59
Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve bei zunehmender Anzahl der CA.....	60
Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve mit einem Grenzwert von fünf CA.....	61
Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurven mit einem Grenzwert von vier und sechs CA.....	61
Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit von einer molekularen <i>TP53</i> -Mutation und einem Grenzwert von fünf CA.....	62
Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurven von einzelnen Gruppen in Abhängigkeit von einer molekularen <i>TP53</i> -Mutation und einem Grenzwert von fünf CA.....	63

Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit von kombinierten <i>TP53</i> -Veränderungen und einem Grenzwert von fünf CA.....	64
Abbildung 36: Anzahl der CA in Abhängigkeit vom mK.....	65
Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten in Abhängigkeit vom mK.	66
Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten in Abhängigkeit vom mK und molekularer <i>TP53</i> -Mutation.	67
Abbildung 39: Anzahl der CA in Abhängigkeit vom mK und molekularer <i>TP53</i> -Mutation.	68
Abbildung 40: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne molekulare <i>TP53</i> -Mutation in Abhängigkeit vom mK.....	69
Abbildung 41: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne mK in Abhängigkeit vom molekularen <i>TP53</i> -Mutationsstatus.	70
Abbildung 42: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten in Abhängigkeit vom mK und <i>TP53</i> -Veränderungen.	71
Abbildung 43: Anzahl der CA in Abhängigkeit vom mK und allen <i>TP53</i> -Veränderungen.....	71
Abbildung 44: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne <i>TP53</i> -Veränderung in Abhängigkeit vom mK.....	72
Abbildung 45: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne mK in Abhängigkeit von den <i>TP53</i> -Veränderungen.	73
Abbildung 46: Vergleich der klinischen Parameter bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps bei Patienten mit und ohne DMTI-Therapie.	74
Abbildung 47: Kaplan-Meier-Kurve der Patienten in Abhängigkeit von der Therapie mit DMTI.....	75
Abbildung 48: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne molekulare <i>TP53</i> -Mutation in Abhängigkeit von der DMTI-Therapie.....	76
Abbildung 49: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne DMTI-Therapie in Abhängigkeit von molekularen <i>TP53</i> -Mutationen.	77
Abbildung 50: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne Veränderung im <i>TP53</i> in Abhängigkeit von der DMTI-Therapie.....	78
Abbildung 51: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne DMTI-Therapie in Abhängigkeit von <i>TP53</i> -Veränderungen.....	79
Abbildung 52: Darstellung des ersten Regressionsmodells als Forest Plot.....	85
Abbildung 53: Darstellung des zweiten Regressionsmodells als Forest Plot.....	87
Abbildung 54: Darstellung des dritten Regressionsmodells als Forest Plot.....	89
Abbildung 55: Darstellung des vierten Regressionsmodells als Forest Plot.	90
Abbildung 56: Med. OS in Abhängigkeit von der Punktzahl des Prognosesystems.	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation 2008 der MDS (modifiziert nach Vardiman et al. 2009).....	3
Tabelle 2: Zytogenetische Risikogruppen im IPSS-R.....	5
Tabelle 3: Erhebung des IPSS-R mithilfe der Punktwerte in den einzelnen Kategorien.....	5
Tabelle 4: Prognoseabschätzung anhand des IPSS-R (modifiziert nach Greenberg et al. (2012)).....	5
Tabelle 5: Patientencharakteristika.....	18
Tabelle 6: Menge der abgemessenen Agarose in Abhängigkeit von der Gelkonzentration und dem Gelvolumen	25
Tabelle 7: Zusammensetzung der Proben für die Elektrophorese.....	25
Tabelle 8: PCR-Programm des Thermocyclers.....	28
Tabelle 9: ExoSap-Programm des Thermocyclers.....	29
Tabelle 10: Verwendetes Sequenzierungsprogramm	30
Tabelle 11: Anzahl der <i>TP53</i> -Veränderungen bei Patienten mit MDS/CMML im Vergleich zu Patienten mit sAML nach MDS.....	35
Tabelle 12: Charakteristika bei Patienten mit und ohne molekulare <i>TP53</i> -Mutation.....	35
Tabelle 13: Patientencharakteristika bei Patienten mit und ohne zytogenetische <i>TP53</i> -Mutation.	37
Tabelle 14: Patientencharakteristika bei Patienten mit und ohne <i>TP53</i> -Veränderungen.....	38
Tabelle 15: Patientencharakteristika bei Patienten mit kombinierten <i>TP53</i> -Veränderungen.....	40
Tabelle 16: Ergebnisse der univariaten Regressionsanalyse.....	81
Tabelle 17: Modell 1: Multivariates Regressionsmodell unter Beachtung der molekularen und zytogenetischen <i>TP53</i> -Veränderungen.....	85
Tabelle 18: Modell 2: Multivariates Regressionsmodell unter Beachtung der kombinierten <i>TP53</i> -Veränderungen.	86
Tabelle 19: Modell 3: Multivariates Regressionsmodell unter Beachtung der kombinierten <i>TP53</i> -Veränderungen und der Einteilung der Blasten nach IPSS.....	88
Tabelle 20: Modell 4: Multivariates Regressionsmodell unter Beachtung der kombinierten <i>TP53</i> -Veränderungen und einem Grenzwert der Blasten im KM > 20 % zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps.	90
Tabelle 21: Med. OS in Abhängigkeit von der Punktzahl des Prognosesystems.....	92

Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
ANC	<i>absolute neutrophile count</i>
bp	Basenpaare
CA	zytogenetische Aberrationen
CBA	Chromosomenbänderungsanalyse
CdK	cyclin-abhängige Kinase
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CN-LOH	kopiezahlneutraler Heterozygotieverlust
ddH ₂ O	bi-distilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
del	Deletion
DMTI	DNA-Methyltransferase-Inhibitor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
HR	<i>hazard ratio</i>
IARC	International Agency for Research on Cancer
IPSS	International Prognostic Scoring System
IPSS-R	Revised International Prognostic Scoring System
KI	Konfidenzintervall
Mb	Megabasenpaare
MDS	myelodysplastische Syndrome
med. OS	medianes Gesamtüberleben
mFISH	Multiplex-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
mK	monosomaler Karyotyp
MPN	myeloproliferative Neoplasien
NA	<i>not available</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
RA	refraktäre Anämie
RAEB I	refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung I
RAEB II	refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung II
RARS	refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RARS-T	refraktären Anämie mit Ringsideroblasten und Thrombopenie
RCMD	refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie

RCUD	refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie
RN	refraktäre Neutropenie
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	refraktäre Thrombopenie
sAML	sekundäre AML
SNP-A	SNP-Array-Analyse
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGA	<i>total genomic aberrations</i>
VAF	<i>variant allele frequency</i>
WGA	<i>whole genome amplification</i>
WPSS	WHO-adapted Prognostic Scoring System

1 Einleitung

Myelodysplastische Syndrome (MDS) bilden eine Gruppe von hämatologischen Neoplasien, deren Diagnosestellung im Verlauf der letzten drei Dekaden zugenommen hat (Aul et al. 1992). Sie zeichnen sich durch periphere Zytopenien aus, allen voran eine Anämie, sowie durch eine ineffektive und dysplastische Hämatopoese im Knochenmark (Cazzola und Malcovati 2005).

Prognostischen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankungen hat unter anderem die Anzahl der zytogenetischen Aberrationen (CA) im Karyotyp. So zeichnen sich Patienten mit einem komplex aberrantem Karyotyp mit drei oder mehr voneinander unabhängigen zytogenetischen Anomalien durch eine signifikant schlechtere Prognose aus (Haase et al. 2007). Ebenso zeigen neuere Untersuchungen, dass bestimmte molekulare Mutationen einen Einfluss auf die Prognose der Patienten haben (Bejar et al. 2011; Papaemmanuil et al. 2013; Haferlach et al. 2014). Eine Mutation von *TP53* gilt z.B. als unabhängiger negativer prognostischer Parameter (Bejar et al. 2011).

Insbesondere in der Gruppe der Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp wird aufgrund der zu erwartenden schlechten Prognose intensiv nach prognoseverbessernden Therapieansätzen und prognostischen Parametern für das Überleben sowie prädiktiven Faktoren für das Ansprechen auf Therapien gesucht. Bejar et al. (2011) fanden ein signifikant schlechteres medianes Gesamtüberleben (med. OS) bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp, wenn gleichzeitig eine *TP53*-Mutation vorlag. Das mediane OS der Patienten mit komplexen Anomalien ohne *TP53*-Mutation war vergleichbar mit dem einer Kohorte ohne komplexe Aberrationen, weshalb Bejar et al. (2011) die Hypothese formulierten, dass das Vorhandensein einer *TP53*-Mutation die Prognose der Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp determiniert und nicht das Vorliegen komplexer Anomalien per se.

Diese Arbeit untersucht daher in der zytogenetischen Hochrisikogruppe der Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp den Einfluss von *TP53*-Mutationen und -Deletionen auf die Prognose der Patienten sowie die Rolle der zytogenetischen Instabilität innerhalb der Gruppen mit und ohne *TP53*-Veränderungen.

1.1 Myelodysplastische Syndrome (MDS)

Bei myelodysplastischen Syndromen handelt es sich um eine Gruppe von Erkrankungen, der eine klonale Störung der hämatopoetischen Stammzelle zugrunde liegt. Typische Charakteristika sind Zytopenien, Dysplasien der Zellmorphologie, eine ineffektive Hämatopoese und ein erhöhtes Progressionsrisiko in eine akute myeloische Leukämie (AML) (Swerdlow et al. 2008). MDS treten gehäuft im höheren Lebensalter auf und stellen

eine der häufigsten hämatologischen Neoplasien dar. Es erkranken pro Jahr etwa 5/100000 Patienten, bei über 60-Jährigen ist die Inzidenz mit 20 - 50/100000 deutlich höher (Neukirchen et al. 2011). Neben primären Formen gibt es sekundäre Formen der MDS, welche therapeutisch assoziiert nach einer immunsuppressiven oder zytostatischen Therapie auftreten (Kantarjian et al. 1986) oder nach Exposition gegenüber Risikofaktoren wie Lösungsmitteln, Zigarettenrauch oder ionisierender Strahlung (Strom et al. 2005).

Die Patienten zeigen Symptome, welche durch Zytopenien bedingt sind: Eine Anämie, die häufigste Manifestationsform der MDS (Gangat et al. 2016), führt zur Leistungsminderung und Abgeschlagenheit. Eine Thrombozytopenie kann eine Blutungsneigung und die Ausbildung von Petechien bedingen. Eine Neutropenie äußert sich durch vermehrte Infekte. Gelegentlich findet sich bei bestimmten Unterformen der MDS (CMML, MDS/MPN-Overlap-Syndrom) eine Splenomegalie. Obwohl periphere Zytopenien vorliegen, ist das Knochenmark meist zellreich. Dem zugrunde liegt eine ineffektive Hämatopoese durch eine maligne transformierte dominante Stammzelle. Durch diese ist die Ausreifung hämatopoetischer Vorläuferzellen gestört und es kommt einerseits zur vermehrten Apoptose mit daraus resultierenden peripheren Zytopenien und andererseits zu einer kompensatorischen aber ineffektiven vermehrten Proliferation myeloischer Vorläuferzellen (Cazzola et al. 2013).

Die Diagnosestellung eines MDS erfolgt nach Ausschluss anderer Ursachen einer Zytopenie. Blutbild, Differentialblutbild und die mikroskopische Beurteilung von Blutausstrichen sind - ebenso wie eine Knochenmarkszytologie, möglichst ergänzt durch eine Knochenmarkshistologie - grundlegende Untersuchungen. Im Knochenmark müssen Dysplasien in $\geq 10\%$ der Zellen in mindestens einer Zellreihe vorhanden sein und die Anzahl der Blasten muss bestimmt werden, wobei eine Erhöhung der Blastenzahl ($> 2\%$) für die Diagnosestellung eines (Niedrigrisiko-) MDS nicht notwendig ist. Der zytomorphologische Nachweis eines MDS sollte durch eine zytogenetische Analyse ggf. mit zusätzlicher Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) ergänzt werden. (Cazzola und Malcovati 2005; Arber et al. 2016). Zur weiteren Diagnostik und zur prognostischen Einschätzung kann darüber hinaus eine molekulargenetische Analyse erfolgen (Bejar et al. 2011).

Die Einteilung der MDS erfolgt seit 1999 anhand der Klassifikation der WHO (World Health Organization), welche 2008 und 2017 erneut modifiziert wurde (Arber et al. 2016). In der Klassifikation von 2008, welche in dieser Studie Verwendung fand, werden sieben Subtypen der MDS unterschieden (Tabelle 1). Bei allen Subtypen findet sich eine Blastenzahl von weniger als 20% im Knochenmark, da es sich sonst definitionsgemäß um eine AML handelt. Die ehemals zur MDS gezählte chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) wird mit der refraktären Anämie mit Ringsideroblasten und Thrombozytose (RARS-T) und anderen hämatologischen Neoplasien seit 2008 zur Kategorie der myelodysplastisch/myeloproliferativen Neoplasien (MDS/MPN) gezählt, da

sie sowohl Merkmale der MDS als auch der myeloproliferativen Neoplasien aufweisen kann (Vardiman et al. 2009).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation 2008 der MDS (modifiziert nach Vardiman et al. 2009)

MDS-Subtyp	Blut	Knochenmark
Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie (RCUD) Refraktäre Anämie (RA) Refraktäre Neutropenie (RN) Refraktäre Thrombopenie (RT)	Mono- oder Biozytopenie < 1 % Blasten	≥ 10 % dysplastische Zellen eine Reihe < 5 % Blasten < 15 % der erythroiden Vorläuferzellen sind Ringsideroblasten
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	Anämie, keine Blasten	< 5 % Blasten erythroide Dysplasie ≥ 15 % Ringsideroblasten
Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD) mit und ohne Ringsideroblasten	Zytopenien < 1 % Blasten keine Auer-Stäbchen < 1000 Monozyten/ μ l	Dyplasien in ≥ 10 % der Zellen in ≥ 2 Zellreihen < 5 % Blasten keine Auer-Stäbchen ± 15 % Ringsideroblasten
Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung I (RAEB I)	Zytopenien < 5 % Blasten keine Auer-Stäbchen < 1000 Monozyten/ μ l	Uni- /multilineäre Dysplasie 5 - 9 % Blasten keine Auer-Stäbchen
Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung II (RAEB II)	Zytopenien 5 - 19 % Blasten keine Auer-Stäbchen < 1000 Monozyten/ μ l	Uni- /multilineäre Dysplasie 10 - 19 % Blasten ± Auer-Stäbchen

MDS-Subtyp	Blut	Knochenmark
Unklassifiziertes MDS (U-MDS)	Zytopenien < 1 % Blasten	Dysplasien in < 10 % einer oder mehreren Zellreihen verknüpft mit einer MDS typischen zytogenetischen Veränderung < 5 % Blasten
MDS mit isolierter Deletion 5q (del(5q))	Anämie < 1 % Blasten Thrombozyten erhöht/normal	< 5 % Blasten isolierte del(5q) keine Auer-Stäbchen

Prognostische Informationen liefert als ein mögliches Modell das IPSS (International Prognostic Scoring System), welches von Greenberg et al. (1997) basierend auf einer Kohorte von 816 MDS-Erkrankten entwickelt wurde. In die Berechnung des Scores fließen die Anzahl der Blasten im Knochenmark, die Anzahl der Zytopenien und der Karyotyp ein. Die Patienten werden je nach erreichtem Punktwert in vier unterschiedliche Risikogruppen (*low*, *intermediate-1*, *intermediate-2*, *high*) eingeteilt, anhand derer eine prognostische Abschätzung des Überlebens und der Transformationsrate in eine AML erfolgen kann. Ein weiteres Modell zur prognostischen Einschätzung ist das WPSS (WHO-adapted Prognostic Scoring System) (Malcovati et al. 2007), das zusätzlich den Transfusionsbedarf für Erythrozytenkonzentrate berücksichtigt.

Da das IPSS das prognostische Gewicht des Karyotyps im Vergleich zu der Blastenzahl allerdings unterschätzte (Schanz et al. 2011), wurde 2012 eine überarbeitete Version, das IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System), vorgestellt. Im IPSS-R werden fünf zytogenetische Risikogruppen (Tabelle 2) statt der ehemals drei unterschieden, und es erfolgt eine genauere Differenzierung der Blastenzahl sowie der Zytopenien (Tabelle 3). Die Patienten werden schließlich in fünf Risikogruppen mit entsprechender Überlebensprognose und Transformationsrate in eine AML eingeteilt (Tabelle 4) (Greenberg et al. 2012). Aufgrund der zunehmenden Bedeutung von molekulargenetischen Parametern (Bejar et al. 2011; Papaemmanuil et al. 2013) wird zur Zeit mithilfe eines internationalen Forschungsprojekts unter Federführung der MDS-Foundation die Einbeziehung von molekularen Markern in ein prognostisches Modell geprüft (Cazzola et al. 2013).

Tabelle 2: Zytogenetische Risikogruppen im IPSS-R

sehr gut	-Y, del(11q)
gut	normaler Karyotyp, del(5q), del(12q), del(20q), Doppel-Anomalie mit del(5q) außer Chr7
intermediär	del(7q), +8, +19, i(17q), andere Einzel- oder Doppel-Anomalien
schlecht	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), Doppel-Anomalie mit -7/del(7q), komplexer Karyotyp mit drei CA
sehr schlecht	komplexer Karyotyp mit mehr als drei CA

Tabelle 3: Erhebung des IPSS-R mithilfe der Punktwerte in den einzelnen Kategorien

	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Zytogenetik	sehr gut	-	gut		intermediär	schlecht	sehr schlecht
Blasten im Knochenmark	≤ 2 %	-	2 - 5 %	-	5 - 10 %	> 10 %	-
Hämoglobin (g/dl)	≥ 10	-	8 - 10	< 8	-	-	-
Thrombozyten (x10³/μl)	≥ 100	50 - 100	< 50	-	-	-	-
ANC (<i>absolute neutrophile count</i>)	≥ 0,8	< 0,8	-	-	-	-	-

Tabelle 4: Prognoseabschätzung anhand des IPSS-R (modifiziert nach Greenberg et al. (2012))

Risikogruppe	Punktwert	Medianes Überleben in Jahren	Mediane Zeit in Jahren bis zur AML-Transformation bei 25 % der Patienten
sehr geringes Risiko	≤ 1,5	8,8	nicht erreicht
geringes Risiko	1,5 - 3	5,3	10,8
intermediäres Risiko	3 - 4,5	3,0	3,2
hohes Risiko	4,5 - 6	1,6	1,4
sehr hohes Risiko	> 6	0,8	0,73

Die einzig kurative Therapie der MDS stellt die allogene Stammzelltransplantation dar. Diese wird allerdings aufgrund der hohen Risiken nur bei Hochrisikopatienten erwogen. Zudem sollte eine Selektion der Patienten anhand klinischer und prognostischer Parameter wie z. B. des Alters und der Komorbiditäten erfolgen (Mishra und Anasetti 2016). Kommt die allogene Stammzelltransplantation nicht in Frage, können bei Patienten mit Hochrisiko-MDS demethylierende Substanzen wie Azacytidin und Decitabine eingesetzt werden, die das Outcome der Patienten zu verbessern vermögen, aber nicht kurativ sind (Fenaux et al. 2009). Patienten mit Niedrigrisiko-MDS werden supportiv mit Transfusionen von Blutbestandteilen behandelt. Dabei sollte bei Bedarf eine Therapie einer sekundären Eisenüberladung durchgeführt werden, da es Hinweise darauf gibt, dass diese sich prognostisch ungünstig auswirkt (Malcovati et al. 2005). Zusätzlich kann die Therapie mit Erythropoetin ggf. in Kombination mit G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) sinnvoll sein (Jädersten et al. 2008). Eine Ausnahme von der rein supportiven Therapie bei Niedrigrisiko-MDS bilden Patienten mit einer Deletion 5q. Sie profitieren signifikant von einer Behandlung mit Lenalidomid (List et al. 2006). In einigen Fällen kommt eine Therapie mit immunsuppressiven Medikamenten, Histon-Deacetylase-Inhibitoren oder immunmodulatorischen Substanzen infrage (Onkopedia — Myelodysplastische Syndrome (MDS) 2016). Trotz dieser Therapieviefalt und vorübergehend positiver Effekte der Therapie, ist die Remission der Patienten meist nicht dauerhaft. Deshalb wird weiterhin nach langfristig effektiven Therapieoptionen gesucht.

1.2 MDS mit komplex aberrantem Karyotyp

Zytogenetische Aberrationen im Sinne von chromosomalen Veränderungen finden sich bei ca. 50 % der Patienten mit MDS (Sole et al. 2005; Haase 2008). Bei sekundären Formen des MDS nach Therapie mit Zytostatika, Immunsuppressiva oder Radiotherapie ist der Anteil der Patienten mit chromosomalen Veränderung im Karyotyp mit bis zu 80 % noch größer (Le Beau et al. 1986; Mauritzson et al. 2002; Haase et al. 2007). Häufig zu findende Anomalien bei Patienten mit MDS sind eine Deletion 5q oder Monosomie 5, eine Deletion 7q oder Monosomie 7, eine Trisomie 8, eine Deletion 20q und ein Y-Verlust (Haase et al. 2007). Patienten mit einer isolierten 5q-Deletion zeigen eine gute Prognose und eine geringe Transformationsrate zur AML (Giagounidis et al. 2004). Ein Verlust des gesamten Chromosoms 7 dagegen gilt als ungünstiger prognostischer Parameter (Schanz et al. 2012) und ist häufig bei Patienten nach Therapie eines Primärmalignoms mit Alkylanzien zu finden (Christiansen et al. 2004). Eine Trisomie 8 wird gemäß dem IPSS-R der intermediären zytogenetischen Risikokategorie zugeordnet, ein Verlust des Y-Chromosoms und eine Deletion 20q den Risikokategorien mit geringem und sehr geringem Risiko (Greenberg et al. 2012). Der Y-Verlust ist einerseits als MDS-typische Veränderung zu

werten, insbesondere wenn ein großer Klon mit Y-Verlust vorliegt (Ganster et al. 2015), er kann aber auch als altersbedingte, nicht-klonale Veränderung auftreten (Wong et al. 2008).

Ein komplexer aberranter Karyotyp liegt vor, wenn mindestens drei CA im Karyotyp von blutbildenden Zellen des Patienten zu finden sind. Dies ist bei 15 - 20 % der Patienten mit MDS der Fall (Haase 2008; Schanz et al. 2011). Prognostisch sind komplexe Anomalien des Karyotyps als ungünstig einzustufen und gehen mit einer höheren Transformationsrate zur AML einher (Greenberg et al. 1997). Eine zunehmende Anzahl der CA ist mit einer schlechteren Prognose verknüpft: So zeigte sich bei Haase et al. (2007) ein signifikant kürzeres med. OS für Patienten mit drei CA im Vergleich zu Patienten mit einer und zwei CA (med. OS: 17,1 Monate vs. 35 und 38 Monate). In einer Gruppe mit vier und fünf Anomalien war das mediane OS noch stärker verkürzt (med. OS: 9 Monate), gefolgt von Patienten mit sechs oder mehr Anomalien mit nur fünf Monaten med. OS. Die ungünstige Prognose des komplexen Karyotyp zeigte sich auch in einer Gruppe von Patienten mit einer 5q-Deletion, die als isolierte Anomalie ein günstiges Outcome hat. Bei Assoziation dieser mit einem komplex aberranten Karyotyp war das med. OS hochsignifikant verkürzt.

Deshalb finden sich Patienten mit einem komplex aberranten Karyotyp im IPSS in der ungünstigen zytogenetischen Risikogruppe wieder (Greenberg et al. 1997). Im IPSS-R wird unterschieden zwischen Patienten mit genau drei Anomalien, welche der zytogenetischen Risikogruppe mit hohem Risiko zugeordnet werden. Patienten mit mehr als drei Anomalien dagegen werden der zytogenetischen Gruppe mit einem sehr hohen Risiko zugeordnet (Schanz et al. 2011; Greenberg et al. 2012; Schanz et al. 2012).

1.3 Mutationen von *TP53* bei MDS

1.3.1 Rolle von Mutationen bei MDS

Auch bei Patienten mit MDS spielen Mutationen in der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle. So finden sich bei bis zu 90 % der Patienten generell Mutationen, wenige distinkte davon bei jeweils 10 % oder mehr der Patienten. Dabei wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt, dass diese eine prognostische Bedeutung haben können. Neben *TP53* wurden in diesen Untersuchungen Mutationen in *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1*, *ASXL1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *DNMT3A*, *ETV6*, *NRAS*, *CBL* und *SF3B1* als prognostisch relevant beschrieben, wobei nur *SF3B1* Mutationen als prognostisch günstig charakterisiert wurden (Bejar et al. 2011; Papaemmanuil et al. 2013; Haferlach et al. 2014).

1.3.2 *TP53* und dessen Rolle bei Neoplasien

Das Gen für *TP53* liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 an der Position 13.1 (Isobe et al. 1986). Es handelt sich um ein Tumorsuppressorgen, dessen Produkt Funktionen in vielfältigen Zellprozessen besitzt: Es spielt eine Rolle in der

Zellzykluskontrolle, bei der Apoptose und der DNA-Reparatur, aber auch bei der Angiogenese, der Seneszenz und Stoffwechselprozessen (Vogelstein et al. 2000; Vousden und Lane 2007).

TP53 ist bei soliden Tumoren in mehr als 50 % der Fälle mutiert und spielt in vielen Neoplasien eine tragende Rolle in der Tumorgenese (Hollstein et al. 1991; Vogelstein et al. 2000). Bei den detektierten Mutationen handelt es sich überwiegend um Punktmutationen (Muller und Vousden 2013), wobei die meisten der Mutationen in der DNA-Bindedomäne zu finden sind (Hainaut et al. 1998). Innerhalb dieser wurden sechs Hotspots beschrieben, in denen sich etwa 25 % der Mutationen finden: p.R175, p.G245, p.R248, p.R249, p.R273 und p.R282 (Greenblatt et al. 1994).

Auch bei hämatologischen Neoplasien werden Mutationen des *TP53* gefunden. Neben den Mutationen spielen auch Deletionen des *TP53* und kopiezahlneutrale Heterozygotieverluste (*copy neutral loss of heterozygosity*, CN-LOH) eine Rolle. Allerdings sind *TP53*-Veränderungen bei hämatologischen Neoplasien mit 5 - 20 % deutlich seltener als bei soliden Tumoren (Preudhomme und Fenaux 1997; Stengel et al. 2016). Dennoch haben sie auch hier eine entscheidende Rolle im Krankheitsverlauf und sind mit einer schlechten Prognose der Patienten und schlechtem Therapieansprechen assoziiert (Wattel et al. 1994; Stengel et al. 2016). Bei Patienten mit AML finden sich *TP53*-Veränderungen gehäuft bei älteren Patienten und bei Vorliegen eines komplex aberranten Karyotyps (40 - 70 % der Fälle). Sie behalten allerdings auch als isolierte Veränderung des Karyotyps ihren prognostischen Wert. Diese Fälle sind allerdings sehr selten. *TP53*-Veränderungen sind in vielen Fällen biallelisch (Haferlach et al. 2008; Jasek et al. 2010; Rücker et al. 2012).

In Mausmodellen wurden die Funktionen von *TP53* in hämatopoetischen Stammzellen untersucht. Hierzu zählen die Regulierung der Selbsterneuerung und der Seneszenz der Stammzellen. So nimmt bei einem *TP53*-Funktionsverlust die Stammzellerneuerung zu (Liu et al. 2009) und ohne *TP53*-abhängige Apoptose bzw. Reperaturmechanismen können Mutationen akkumulieren (Pant et al. 2012). *TP53*-Induktion dagegen führt zu einer vermehrten Apoptose innerhalb der Hämatopoese. Wird *TP53* dauerhaft induziert, resultiert hieraus eine Depletion von hämatologischen Stammzellen (Liu et al. 2010).

1.3.3 *TP53*-Mutationen bei MDS

Patienten mit MDS weisen in 5 - 15 % der Fälle *TP53*-Mutationen auf (Wattel et al. 1994; Kulasekararaj et al. 2013; Bejar 2014). Vermehrt liegen diese bei sekundärem MDS nach Therapie mit Alkylanzien oder Radiotherapie vor (Christiansen et al. 2001). Das Vorhandensein der Mutation ist eng assoziiert mit zytogenetischer Instabilität in Form komplexer Chromosomenanomalien und fortgeschrittener Krankheit. Patienten mit *TP53*-Mutation haben ein schlechteres Outcome und eine höhere AML-Transformationsrate (Kaneko et al. 1995; Bejar et al. 2011). Zudem sprechen diese Patienten schlechter auf Therapien an: Sowohl bei niedrigdosierter als auch hochdosierter

Chemotherapie, die mit dem Schema bei AML vergleichbar ist, als auch bei Therapie mit demethylierenden Substanzen und nach allogener Stammzelltransplantation zeigt sich ein schlechteres Outcome der Patienten mit *TP53*-Mutationen im Vergleich zu Patienten mit *TP53*-Wildtyp (Wattel et al. 1994; Bejar et al. 2014; Takahashi et al. 2016). Aufgrund dieser und zahlreicher anderer Untersuchungen gilt das Vorhandensein einer *TP53*-Mutation als unabhängiger ungünstiger prognostischer Parameter.

TP53-Mutationen bei MDS sind eng mit zytogenetischen Deletionen im Bereich der Chromosomenbande 17p13 und CN-LOH von *TP53* assoziiert, sodass in vielen Fällen von einem biallelischen Verlust des *TP53* ausgegangen werden kann (Lai et al. 1995; Jasek et al. 2010; Svobodova et al. 2016). Zytogenetische Deletionen des *TP53* kommen als 17p-Verlust oder als Verlust des gesamten Chromosom 17 in ca. 5 % der Patienten mit MDS vor (Haase et al. 2007). Es gibt Hinweise darauf, dass die Mutationslast im Sinne der VAF (*variant allele frequency*) beim NGS (*next generation sequencing*) für die Prognose der Patienten wichtig ist (Sallman et al. 2016).

In einigen Patientengruppen mit MDS kommen *TP53*-Mutationen relativ häufig vor: Jädersten et al. (2011) fanden in der Analyse einer Patientengruppe mit 5q-Deletionen eine Häufigkeit der Mutation von 18 % in frühen Krankheitsstadien. Die Patienten mit Mutation zeigten eine höhere Transformationsrate in eine AML und ein schlechteres Therapieansprechen auf Lenalidomid. Jädersten et al. (2011) schlossen daraus, dass das frühe Vorliegen einer *TP53*-Mutation innerhalb von Subklonen eine Rolle bei der Entwicklung von genetischen Instabilität und dem Fortschreiten der Erkrankung spielen könnte. Saft et al. (2014) zeigten in Patienten mit 5q-Deletionen, dass die erhöhte Proteinexpression von *TP53* in der Immunohistochemie mit *TP53*-Mutationen, schlechter Prognose und höherer AML-Transformationsrate korreliert ist. Es besteht demnach ein Zusammenhang zwischen *TP53*-Mutationen und erhöhter Proteinexpression.

Ebenso findet sich bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp eine höhere Frequenz der Mutation: Kulasekararaj et al. (2013) fanden bei ca. 50 % der Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp eine *TP53*-Mutation. Auch der prognostische Einfluss konnte für diese Gruppe gezeigt werden: Bejar et al. (2011) fanden ein deutlich geringeres med. OS bei Patienten mit komplexem Karyotyp mit mutiertem *TP53* (med. OS: ca. 6 Monate) im Vergleich zu Patienten mit komplexem Karyotyp ohne eine *TP53*-Mutation (med. OS: ca. 36 Monate). Das mediane OS der Gruppe ohne *TP53*-Mutation war sogar vergleichbar mit einer Gruppe von Patienten mit MDS ohne komplex aberranten Karyotyp.

1.4 Aufgabenstellung

Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp zeigen eine schlechte Prognose. Bejar et al. (2011) formulierten anhand ihrer Beobachtung in einer Patientengruppe mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp die Hypothese, dass eine *TP53*-Mutation innerhalb dieser Gruppe den entscheidenden prognostischen Parameter darstellt und die

Prognose bei vorliegender *TP53*-Mutation weitgehend unabhängig von der genetischen Instabilität gemessen an der Anzahl und dem Ausmaß der Chromosomenanomalien ist. In Bezug darauf wurde bei Patienten mit AML von Rücker et al. (2012) gezeigt, dass *TP53*-Mutationen bei Patienten mit AML mit komplex aberrantem Karyotyp einerseits mit einer schlechteren Prognose verknüpft sind, bei diesen Patienten andererseits aber auch ein höheres Ausmaß der Komplexität genomischer Aberrationen vorliegt, gemessen an der Anzahl der CA und der Anzahl der Verluste und Zugewinne in der SNP-Array-Analyse (SNP-A). Für Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp existieren diese Daten bisher nicht, weshalb ein Einfluss des Ausmaßes der genomischen Imbalancen auf die Prognose der Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp mit *TP53*-Aberrationen noch nicht untersucht wurde.

Deshalb zielt diese Arbeit darauf ab in einer gut charakterisierten Kohorte von Patienten mit MDS, CMML und sekundärer AML nach MDS mit komplex aberrantem Karyotyp, weitere Erkenntnisse hinsichtlich der *TP53*-Veränderungen bei MDS mit komplex aberrantem Karyotyp zu erlangen, wobei einerseits die Häufigkeiten und die Art von molekularen *TP53*-Mutationen, andererseits von zytogenetischen *TP53*-Mutationen in Form von *TP53*-Deletionen und CN-LOH im Locus von *TP53* erhoben werden. Hierzu wurden in einer retrospektiven Analyse von Patienten mit MDS, CMML und sekundärer AML nach MDS mit komplex aberrantem Karyotyp FISH-Analysen, SNP-A und Mutationsanalysen mit Sanger-Sequenzierung ausgewertet.

Um einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von *TP53*-Aberrationen und dem Ausmaß der genetischen Instabilität zu untersuchen, welcher in bisherigen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen nur unzureichend erfasst wurde, wurde innerhalb der unterschiedlichen Kohorten mit *TP53*-Veränderungen das Ausmaß der genetischen Instabilität mit unterschiedlichen Verfahren in bisher nicht publizierter Breite und Konsequenz erfasst und zudem ein Vergleich der Gruppen durchgeführt. Als Messparameter wurden hierzu nicht nur die Anzahl der zytogenetischen Aberrationen anhand des Karyotyps herangezogen, sondern auch die Anzahl der chromosomalen Fusionen, im Sinne von Bruchereignissen in der in der Multiplex-Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (mFISH), und die Größe der TGA (*total genomic aberrations*) als Summe der Zugewinne und Verlust aus der SNP-A (Cluzeau et al. 2013). Diese Verfahren gewährleisten eine systematische und objektive Erfassung der genomischen Komplexität, welche bisher in anderen Untersuchungen nicht ausreichend betrachtet wurde.

Zuletzt wurde der Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen *TP53*-Veränderungen und dem Überleben der Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp durch Analyse der klinischen *follow-up*-Daten geprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma und Firmensitz	Bestellnummer
Natural, Graduated Filter Tip 1000µl XL	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland	S1182-1830
Bevelled Filter Tips 1-100 µl	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland	S1120-1840
Filter Tips 0,5-10 µl	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland	S1121-4810
Filter Tips FT 200	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	739288
SafeSeal Gefäß, 1,5 ml	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland	72.706
Röhre 50 ml Steril	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland	62.547.254
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland	72.699
Multiply-µStrip 8er Kette	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland	72.991.002
Eppendorf Pipette Research Plus, 8 Kanal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	5421557
Eppendorf Multipette M4	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	4982.000.012
<i>Sealing tape, optically clear</i>	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland	95.1994
96 PCR-Plate Halbrand	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland	72.1979.202
96 Fast PCR-Plate Halbrand	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland	72.1981.202
Plate Septa 96-Well	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA	4315933
Performa [®] DTR V3 96-Well Short Plate Kit	EdgeBio, Gaithersburg, Maryland, USA	89939

2.1.2 Reagenzien

Produkt	Firma und Firmensitz	Bestellnummer
<i>Genra Puregene Blood Kit:</i> <i>RBC lysis solution</i> <i>Cell lysis solution</i> <i>Protein precipitation solution</i> <i>RNase A solution</i>	Qiagen, N.V., Venlo, Niederlande	158467
100 % Isopropanol	Fluka, Sigma-Aldrich, St. Loius, USA	59310
<i>Ethanol absolute pro analysis</i> 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.00983.2500
Glycogen	Qiagen, N.V., Venlo, Niederlande	158930
GlycoBlue Coprecipitant	Invitrogen, Ambion, Thermo Scientific, Waltham, Massachusett, USA	1023614
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Loius, Missouri, USA	P6556-10MG
Wasser für Chromatographie	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.15333.2500
EDTA reduzierter TE- Puffer	Affymetrix, Santa Clara, California, USA	901607
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.04095.0250
Orange G	Sigma-Aldrich, St. Loius, Missouri, USA	O3756-25G
<i>DNA Stain G</i>	Serva Electrophresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	39809
100 bp DNA Längenstandard	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	25-2010
50x und 1x TAE Puffer		
Tris Base	Sigma-Aldrich, St. Loius, Missouri, USA	T6066-5kg
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt,	1.00063.1000

	Deutschland	
0,5 M EDTA Lösung (pH 8,0)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	E5134
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	2269.340766.00.00
Ampuwa	Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland	766.00.00
Ammoniumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.01145.0500
Kaliumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.04854.0500
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	E5134
Natronlauge	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.09137
<i>REPLI-g Mini Kit</i>	Qiagen, N.V., Venlo, Niederlande	150023
<i>Reconstituted buffer DLB</i>		
<i>Stop solution</i>		
<i>Mini reaction buffer</i>		
<i>Mini DNA polymerase</i>		
<i>InnuPREP PCRpure kit</i>	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland	845-KS-5010260
<i>100mM dNTP set PCR grade</i>	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA	10297-018
HotStarTaq Plus DNA Polymerase (1000)	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande	203605
PCR Buffer 10x	Qiagen, N.V., Venlo, Niederlande	1005479
MgCl ₂	Qiagen, N.V., Venlo, Niederlande	1005482
ExoSAP it	Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA	78201
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA	4311320

<i>POP-7™ Polymer for 3500/3500 xL genetic analyzers</i>	Applied Biosystems , Foster City, Kalifornien, USA	4393714
<i>3130 POP 7 Performance optimized polymer</i>	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA	4363785
<i>BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit</i>	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA	4337456
<i>BigDye terminator v1.1, 3.1 5x sequencing buffer</i>	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA	4336697
<i>24XCyte human multicolor FISH probe kit</i>	Metasystems, Altlußheim, Deutschland	D-0125-120-DI
<i>CytoScan HD array and reagent kit</i>	Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA	901835

2.1.3 Primer

Exon von TP53 F: <i>forward</i> R: <i>reverse</i>	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Fragmentgröße der Produkte (bp)
Exon 4 F	TP53-4F	ACAACGTTCTGGTAAGGACAAGGG	497
Exon 4 R	TP53-4R	GGGTGAAGAGGAATCCCAAAGTTC	497
Exon 5/6 F	TP53-5-6F	CTCCTGAGGTGTAGACGCCAACTC	621
Exon 5/6 R	TP53-5-6R	CAGCAGGAGAAAGCCCCCTACTGC	621
Exon 7 F	TP53-7F	CCTCCCCCTGCTTGCCACAGGTCTCC	427
Exon 7 R	TP53-7R	CCCTTGTCCTTCTGGAGCCTAAGC	427
Exon 8/9 F	TP53-8-9F	GGTTGGGAGTAGATGGAGCCTGG	501
Exon 8/9 R	TP53-8-9R	GATGGCAAATGCCCAATTGCAGG	501
Exon 10 F	TP53-10F	GCTGTATAGGTACTTGAAGTGCAG	380
Exon 10 R	TP53-10R	GCAGGGCTGGGACCCAATGAGATG G	380

2.1.4 Geräte und Software

Gerät/Software	Firma und Firmensitz	Bestellnummer
Kühlzentrifuge Fresco 17	Heraeus, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	40895863
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	5426 000.018
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	75003280
Tischzentrifuge Sroust	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, USA	HAS 16383
Pipette verstellbar		
100 - 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	4920000083
20 - 200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	4920000067
0,5 - 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	4920000024
10 - 100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	4920000059
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	535030696
Function Line Brutschrank	Heraeus, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	50042307
Elektrophorese Power Supply ST 304	Gibco, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	260993
Gel-Fotodokumentationsanlage Biometra TI 3	Biometra, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland	2744228
REAX top Vortex	Heidolph, Schwabach, Deutschland	090005185
Thermocycler T-Professional	Biometra, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland	2611211
Spectrophotometer NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	91-ND-2000
Genetic Analyzer 3500	Life Technologies/ Applied Biosystems	17307-020
SeqPilot	JSI Medical Systems	

2.1.5 Patienten und Einschlusskriterien

Die Patientenkohorte setzt sich aus 125 Patienten mit MDS, CMML und sekundärer AML (sAML) aus MDS zusammen. Das Blut und Knochenmark der meisten Patienten wurde im zytogenetischen Labor der Universitätsmedizin Göttingen im Zeitraum von Juli 2007 – Februar 2017 analysiert. Diese Patienten wurden in folgenden Zentren behandelt:

Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie der 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 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
Onkologische Schwerpunktpraxis, Dannenberg
MVZ Strahlentherapie, 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
Asklepios Harzlinik Goslar

Evangelisches Krankenhaus Göttingen-Weende
Hämatologisch-onkologische Praxisgemeinschaft München Pasing
Klinik für Innere Medizin I, Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Freiburg
Klinik für Hämatologie und Onkologie, Medizinische Klinik III, Klinikum Braunschweig
Ambulante Onkologie, MVZ Cloppenburg am St. Josefs-Hospital Cloppenburg

Zusätzlich dazu wurden in Kooperation mit anderen Zentren Daten weiterer Patienten mit z. T. extern durchgeführten Analysen eingeschlossen. Die Daten stammen aus den folgenden Zentren:

MDS Research Group, Josep Carreras Leukaemia Research Institute, ICO-Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain
Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Daten stammen aus den Patientenakten. Zusätzliche Analysen wurden an Restmaterial von Routineanalysen durchgeführt. Die betroffenen Patienten hatten der Verwendung dieses Materials für Forschungsprojekte zugestimmt.

Die Diagnose MDS, CMML bzw. sekundäre AML aus MDS wurde klinisch und zytomorphologisch gesichert. Das Haupteinschlusskriterium für die Untersuchung stellte das Vorhandensein einer Chromosomenbänderungsanalyse (CBA) dar mit vorhandenem und auswertbarem Karyotyp, in dem sich drei oder mehr zytogenetische Aberrationen zeigten. Sofern vorhanden, wurde zur Kontrolle der hochkomplexen Karyotypen ein mFISH herangezogen. Dieses Kriterium konnte bei 94/125 der Patienten (75,2 %) sichergestellt werden, wobei 7/31 Patienten (22,6 %) ohne mFISH nur drei Anomalien vorwiesen und 16/31 Patienten (51,6 %) < 6 Anomalien.

Es wurden insgesamt 125 Patienten identifiziert im Alter von 30 bis 95 Jahren mit einem medianen Alter von 72 Jahren. 68/125 Patienten (54,4 %) waren männlich, 57/125 (45,6 %) weiblich. Die Diagnose MDS erhielten 91/125 Patienten (72,8 %) Eine genaue Aufschlüsselung in die Subtypen nach WHO 2008 findet sich in Tabelle 5. Für 12/125 Patienten (9,6 %) wurde keine nähere Angabe zum Subtyp des MDS nach WHO 2008 gemacht. Bei 30/125 Patienten (24,0 %) lag die Diagnose sekundäre AML aus MDS vor, bei 4/125 Patienten (3,2 %) die Diagnose CMML. Mehr als zwei Drittel der Patienten (85/125; 68,0 %) konnten der höchsten Risikokategorie nach IPSS-R (*very high risk*)

zugeordnet werden und etwa die Hälfte der Patienten (64/125; 51,2 %) der zweithöchsten Risikokategorie nach IPSS (*high risk*). Eine Transfusionsabhängigkeit bestand bei 60/125 der Patienten (48,0 %). Eine Therapie mit demethylierenden Substanzen erhielten 69/125 der Patienten (55,2 %). Die mediane Anzahl der zytogenetischen Aberrationen betrug 8 [range: 3-46]. Das mediane Gesamtüberleben in der Kohorte betrug 14 Monate. Weitere Angaben zur Patientenkohorte finden sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Patientencharakteristika

Alter (Jahre), Median [Range]	72 [30 - 95]
Geschlecht	
Männlich	68/125 (54,4 %)
Weiblich	57/125 (45,6 %)
Subtyp, modifiziert nach WHO-Klassifikation 2008	
RA/-RS	1/125 (0,8 %)
RCMD/-RS	26/125 (20,8 %)
RAEB I	15/125 (12,0 %)
RAEB II	41/125 (32,8 %)
CMML	3/125 (2,4 %)
MDS; nicht näher bezeichnet	9/125 (7,2 %)
sekundäre AML nach MDS	30/125 (24,0 %)
Blutparameter	
Hämoglobin (g/dl)	Median: 8,7 [range: 4,1 - 15,2]
< 8	29/125 (23,2 %)
8 - <10	53/125 (42,4 %)
≥ 10	26/125 (20,8 %)
NA	17/125 (13,6 %)
Thrombozyten (x 10 ³ /μl)	Median: 59,5 [range: 3 - 558]
< 50	44/125 (35,2 %)
50 - <100	31/125 (24,8 %)
≥ 100	31/125 (24,8 %)
NA	19/125 (15,2 %)

ANC (x 10 ³ /μl)	Median 0,902 [range: 0,009 - 13,5]
< 0,8	33/125 (26,8 %)
≥ 0,8	42/125 (33,6 %)
NA	50/125 (40,0 %)
Blasten im Knochenmark (%)	Median: 13,5 [range: 0 - 90]
≤ 2	7/125 (5,6 %)
> 2 - <5	13/125 (10,4 %)
5 - 10	13/125 (10,4 %)
> 10	53/125 (42,4 %)
NA	39/125 (31,2 %)
IPSS-R Risikokategorie	
Intermediär	5/125 (4,0 %)
Intermediär/hoch	3/125 (2,4 %)
Hoch	17/125 (13,6 %)
Sehr hoch	85/125 (68,0 %)
NA	15/125 (12,0 %)
IPSS Risikokategorie	
Intermediär 1	8/125 (6,4 %)
Intermediär 2	35/125 (28,0 %)
Intermediär 2/hoch	4/125 (3,2 %)
Hoch	64/125 (51,2 %)
NA	14/125 (11,2 %)
Transfusionsabhängigkeit	
Ja	60/125 (48,0 %)
Nein	24/125 (19,2 %)
NA	41/125 (32,8 %)
Therapie mit demethylierenden Substanzen	
Ja	69/125 (55,2 %)
Nein	44/125 (35,2 %)
NA	12/125 (9,6 %)

CA, Median [Range]	8 [3 - 46]
Med. OS (Monate)	14 [8 - 17]

2.2 Methoden

2.2.1 Chromosomenbänderungsanalyse (CBA)

Als Grundlage für den Einschluss von Patienten diente die CBA, anhand derer die komplexen Anomalien objektiviert werden konnten. Für die Aufarbeitung für die CBA wurden aus Knochenmarkskulturen Metaphasechromosomen gewonnen, welche nach Bänderung mittels SSC-Puffer mit der Giemsa-Färbung gefärbt wurden. Die Vorgehensweise war analog zu der bei Haase et al. (1995) beschrieben.

Anhand der CBA konnte die Karyotypformel bestimmt werden. Diese wurde gemäß den aktuellen ISCN-Kriterien (McGowan-Jordan et al. 2016) durch erfahrene Zytogenetiker festgelegt. Eine beispielhafte Darstellung eines Giemsa-gefärbten Karyogramms mit komplex aberranten Anomalien findet sich in Abbildung 1.

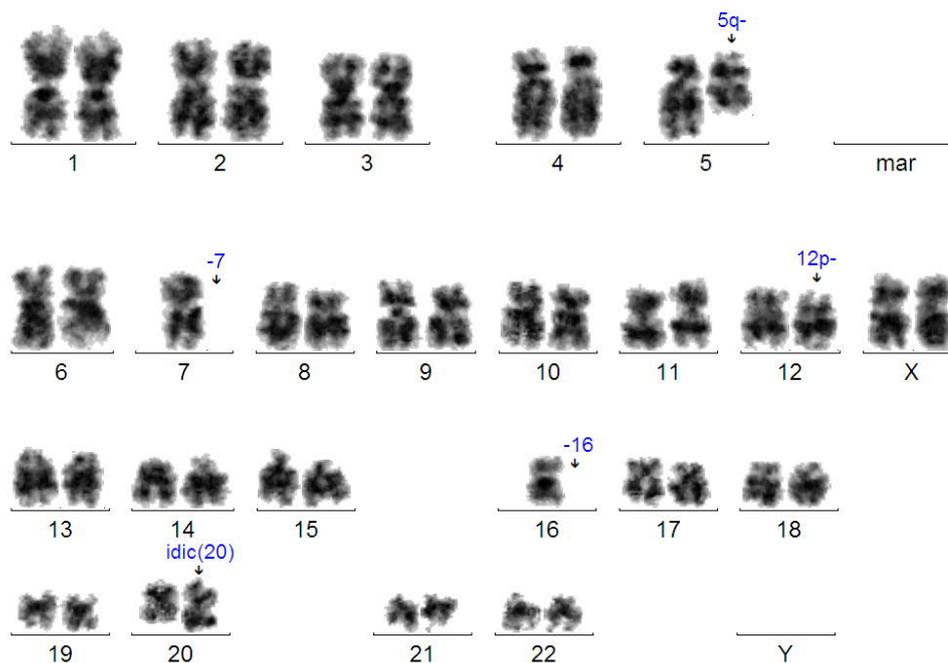


Abbildung 1: CBA einer Patientin mit komplex aberrantem Karyotyp

ISCN-Karyotypformel: 44,XX,del(5)(q14q34),-7,del(12)(p12p13),-16,idic(20)(q11.2)[23]/46,XX[2]

2.2.1.1 Anzahl der zytogenetischen Aberrationen (CA)

Als ein Indikator für die genetische Instabilität diente die Anzahl der CA. Die zytogenetischen Aberrationen wurde gemäß der Konvention von Chun et al. (2010) mit leichter Modifikation an der Karyotypformel abgezählt (Haase et al. 2019): Zusätzlich zu den Regeln der Konvention von Chun et al. (2010) wurden unbalancierte Zweiweg-Translokationen als zwei CA gewertet, da es hierbei zusätzlich zu einem Verlust und/oder Hinzugewinn von genetischer Information kommt. Die Zählung wurde von Frau Dr. Shirneshan und mir unabhängig voneinander, gemäß den publizierten Regeln zur Zählung durchgeführt. Bei fehlender Übereinstimmung der Zählergebnisse wurde das Ergebnis abschließend durch Prof. Dr. Haase überprüft.

2.2.1.2 Monosomaler Karyotyp

Als Einflussfaktor auf die Prognose von Patienten wurde auch der monosomale Karyotyp (mK) geprüft. Ein mK lag vor, wenn mindestens zwei oder mehr autosomale Monosomien vorhanden waren oder eine autosomale Monosomie und eine strukturelle Chromosomenanomalie (Breems et al. 2008).

2.2.2 Interphase-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Bei der FISH Analyse binden fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden spezifisch an ihre komplementäre Sequenz in Chromosomen aus Interphase- oder Metaphasekernen. Die gebundenen DNA-Sonden können mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden, wodurch das Fehlen oder Vorhandensein spezifischer DNA Sequenzen detektiert werden kann. Hierzu wurden CD34⁺-Zellen immunomagenetisch aus peripherem Blut angereichert und diese mit einem MDS-spezifischen FISH-Sondenpanel untersucht, welches unter anderem eine Sonde für den *TP53*-Locus in der Region 17p13 umfasste (ABBOTT LSI *TP53 Spectrum Orange Probe* (CE) (172 kb) oder MetaSystems XL *TP53/NF1* (167 kb)) (Braulke et al. 2010; Braulke et al. 2013; Braulke et al. 2015).

2.2.3 Multiplex-Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (mFISH)

Zur weiteren Überprüfung der komplexen Anomalien, die sich in der CBA zeigten, wurde eine multiplex-Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (mFISH) mit dem mFISH-Kit von Metasystems (24xCyte *Human Multicolor FISH Probe Kit* D-0125-120DI) durchgeführt. Die Vorgehensweise dabei ist analog zu der der FISH-Analyse, wobei bei der mFISH unterschiedlich markierte DNA-Sonden und unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig hybridisiert werden und so unter Fluoreszenz Chromosomen und Chromosomensegmente besser sichtbar gemacht und unterschieden werden können.

2.2.3.1 Anzahl der Fusionen

Um auch Bruchereignisse innerhalb der Chromosomen bei der Analyse der genetischen Instabilität zu erfassen, wurde mithilfe der Bilder des mFISH in Anlehnung an die Karyotypformel die Anzahl der Fusionen als Anzahl der interchromosomalen Bruchereignisse gezählt. Ein Beispiel findet sich in Abbildung 2. Auch in diesem Falle wurde die Zählung unabhängig voneinander von Frau Dr. Shirneshan und mir durchgeführt. Bei fehlender Übereinstimmung wurde eine erneute Zählung durchgeführt.

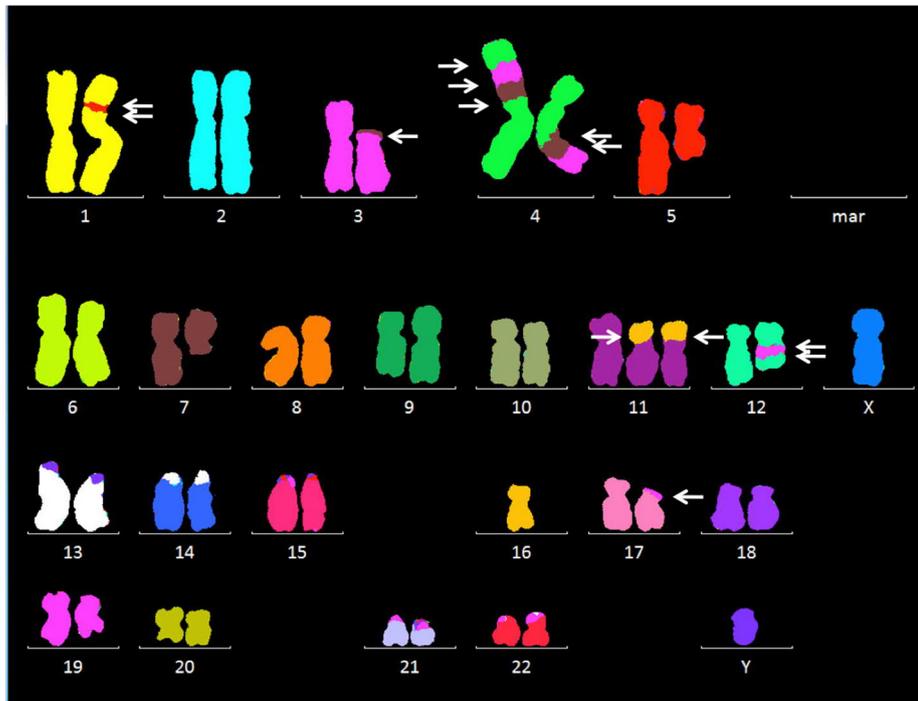


Abbildung 2: mFISH eines Patienten mit komplexen Anomalien und multiplen chromosomalen Bruchereignissen und Fusionen.

Jeder Pfeil zeigt auf ein chromosomales Bruchereignis/eine Fusion.

2.2.4 Mutationsanalyse von *TP53*

Aus asserviertem Knochenmark der Patienten wurde DNA gewonnen. Die Exons 4 bis 10 von *TP53* wurden in einer PCR amplifiziert und mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert.

2.2.4.1 DNA-Isolierung aus Knochenmarksllysaten

Zur Isolierung der genomischen DNA standen asservierte Knochenmarksllysate in PBS zur Verfügung, die durch eine Fällung mit dem Gentra Puregene Blood Kit aufbereitet wurden. Dazu wurden die Zellen im Lysat durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm (*revolutions per minute*) über drei Minuten sedimentiert und durch Verwerfen des Überstandes isoliert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 300 µl der *cell lysis solution* (anionisches Detergens mit DNA-Stabilisator) und die Freisetzung der Nukleinsäuren durch Zugabe von 1,5 µl Proteinase K mit anschließender Inkubation im Thermoblock bei 55 °C mit 330 rpm über Nacht.

Vorhandene RNA in der Probe wurde durch Zugabe einer RNase und vorhandene Proteine durch eine Salzfällung entfernt. Hierzu wurde die Proben zuerst mit 1,5 µl RNase versetzt und für 15 - 60 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, anschließend wurden die auf Eis gekühlten Proben mit einer *protein precipitation solution* versetzt und die Proteine durch Zentrifugation über zwei Minuten bei 13.000 rpm gefällt. Der Überstand wurde mit 300 µl Isopropanol und 0,5 µl Glycogen Blue versetzt. Durch diese alkoholische Fällung fiel die DNA aus und konnte bei einer Zentrifugation über zwei Minuten bei 13.000 rpm sedimentiert werden. Das Pellet wurde mit 300 µl Ethanol (70 %) gewaschen und nach Trocknung je nach Größe des Pellets in 10-30 µl EDTA-reduziertem-TE-Puffer (Tris-Ethylendiamintetraacetat) oder bi-distilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst.

2.2.4.2 DNA-Isolierung von fixierten Knochenmarkskulturen und Knochenmarksausstrichen

Fixierte Zellen aus einer Knochenmarks-Kultur mussten vor der Verarbeitung vom Fixans getrennt werden. Durch eine Zentrifugation der Probe über drei Minuten bei 13.000 rpm wurden die Zellen sedimentiert und der Überstand verworfen. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach Zugabe von 300 µl der *cell lysis solution* wie oben genannt.

Zur Gewinnung von Zellen aus Knochenmarksausstrichen wurde der Objektträger mit 50 - 100 µl *RBC (red blood cell) lysis solution* beträufelt und das ausgestrichene Material mithilfe eines Deckglases in ein Eppendorfgefäß überführt. Die weitere Verarbeitung erfolgt auch hier nach Zugabe von 300 µl der *cell lysis solution* wie oben genannt.

2.2.4.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten DNA wurde am NanoDrop durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein UV-VIS Spektralphotometer, welches die Abschwächung des durch eine Probe fallenden Lichtes misst (Densitometrie). Über die Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes wurde durch ein Computerprogramm daraus die DNA-Konzentration der Probe berechnet.

Für die Messung wurden 1,5 µl der Probe zur Analyse auf den Nanodrop aufgetragen. Als Referenz für die Messung diente destilliertes Wasser, mit welchem der Nanodrop vor der Messung der ersten Probe kalibriert wurde.

Neben der Berechnung der DNA-Konzentration in der Probe (Absorption bei 260 nm) wurden vom Nanodrop zwei weitere Werte für die Reinheit der Probe berechnet. Aus der Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm wurde das 260/280 Verhältnis bestimmt, welches nach allgemeingültigen Standards bei guter Qualität der DNA bei 1,8 liegen sollte. Ein geringeres 260/280 Verhältnis deutete auf eine Verunreinigung der DNA hin durch Materialien, die eine starke Absorption bei 280 nm aufwiesen wie z.B. Proteine und Phenole. Analog dazu konnte das 260/230 Verhältnis errechnet werden, welches bei 1,8 - 2 liegen sollte. Bei geringeren Werten war auch hier von einer

Verunreinigung auszugehen. In der folgenden Abbildung 3 und auch Abbildung 4 finden sich Beispiele der Messung.

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
	Default	29.07.2015	08:57	1790.42	35.808	19.303	1,86	2,05	50,00	230	17,506	0,266
	Default	29.07.2015	09:01	302.29	6,046	3,309	1,83	1,23	50,00	230	4,932	-0,106
	Default	29.07.2015	09:03	547,06	10,941	6,006	1,82	1,65	50,00	230	6,628	-0,253
	Default	29.07.2015	09:05	-592,36	-11,847	-6,532	1,81	1,90	50,00	230	-6,250	-1,409
	Default	29.07.2015	09:07	2175,23	43,505	24,001	1,81	1,83	50,00	230	23,780	7,413
	Default	29.07.2015	09:09	2663,68	53,274	28,885	1,84	2,10	50,00	230	25,319	0,892
	Default	29.07.2015	09:10	2589,18	51,784	27,937	1,85	2,13	50,00	230	24,292	0,083
	Default	29.07.2015	09:11	153,79	3,076	1,646	1,87	1,19	50,00	230	2,583	-0,250
	Default	29.07.2015	09:13	1057,47	21,149	11,364	1,86	1,79	50,00	230	11,833	0,115
	Default	29.07.2015	09:15	785,55	15,711	8,359	1,88	1,71	50,00	230	9,195	0,415
	Default	29.07.2015	09:16	453,86	9,077	4,932	1,84	1,71	50,00	230	5,299	-0,457
	Default	29.07.2015	09:20	3558,57	71,171	39,438	1,80	2,02	50,00	230	35,310	1,578
	Default	29.07.2015	09:22	1903,84	38,077	20,473	1,86	2,13	50,00	230	17,850	0,029
	Default	29.07.2015	09:23	706,85	14,137	7,541	1,87	1,85	50,00	230	7,640	0,149
	Default	29.07.2015	09:24	28,98	0,580	0,285	2,03	0,29	50,00	230	2,020	-0,586

Abbildung 3: Messung der DNA-Konzentration (Spalte ng/μl) mithilfe des Nanodrop

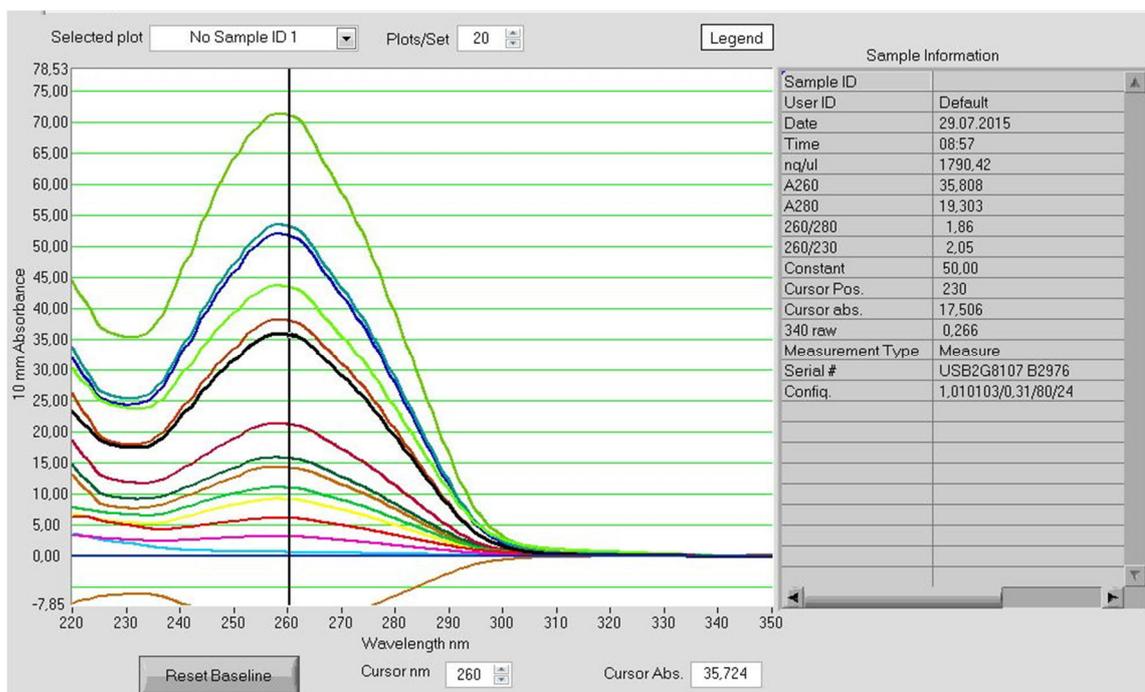


Abbildung 4: Extinktionsplot einer Probe

2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Qualität der aufgereinigten genomischen DNA zu überprüfen, wurde die genomische DNA auf ein 0,8 %-Agarosegel aufgebracht und ihr Laufverhalten bei Anlegen einer Spannung überprüft. Je nach Größe der DNA-Fragmente wandern diese unter angelegter Spannung unterschiedlich schnell zum Pluspol, wobei stark fragmentierte DNA mit vielen kleinen Banden geringen Molekulargewichts im Agarosegel einer schlechteren Qualität entspricht (siehe Abbildung 5).

Auch das Funktionieren der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde auf diese Art und Weise überprüft. Es wurden stichprobenartig PCR-Produkte auf ein 1,5 %-Agarosegel

aufgetragen und überprüft, ob eine Bande entsprechender Größe im Gel, korrespondierend zu einem vervielfältigten Exon, vorhanden war.

Zur Herstellung des Gels für die Elektrophorese wurde je nach Größe des Gelhalters die entsprechende Menge Agarose abgewogen (siehe Tabelle 6), in einem Erlenmeyerkolben mit 50 ml oder 100 ml 1x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) versetzt und so lange erwärmt, bis die Agarose sich aufgelöst hatte.

Tabelle 6: Menge der abgemessenen Agarose in Abhängigkeit von der Gelkonzentration und dem Gelvolumen

	0,8 %-Agarosegel	1,5 %-Agarosegel
kleines Gel , 50 ml	0,4 g Agarose	0,75 g Agarose
großes Gel , 100 ml	0,8 g Agarose	1,5 g Agarose

Die Flüssigkeit im Erlenmeyerkolben wurde auf 50 - 60 °C abgekühlt und mit 1 µl DNA Stain G versetzt, welches zur Detektion von Nukleinsäuren im Agarosegel diente. Durch Einlagerung des DNA Stain G in die doppelsträngige DNA wurde die DNA nach Exposition mit UV-Licht sichtbar. Das Gel wurde nun in den vorbereiteten Gelhalter gegossen und härtete innerhalb einer Stunde aus. Es wurde nach Aushärtung in eine Elektrophoresekammer gestellt, welche vollständig mit 1x TAE Puffer gefüllt war, und die Taschen des Gels mit den vorbereiteten Proben (siehe Tabelle 7) befüllt. In die jeweils erste Tasche wurde ein 100 Basenpaare (bp) Längenstandard pipettiert.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Proben für die Elektrophorese.

Als *loading dye* diente Orange G.

Längenstandard	DNA-Aufreinigung	PCR-Produkt
9 µl destilliertes Wasser	9 µl destilliertes Wasser	10 µl PCR-Produkt
1 µl 100 bp Längenstandard	1 µl vorverdünnte DNA (ca. 50 ng/µl)	2 µl <i>loading dye</i>
2 µl <i>loading dye</i>	2 µl <i>loading dye</i>	

Die Gelkammer wurde an den Trafo angeschlossen und eine Spannung von 100 V und eine Stromstärke von 100 mA über 30 - 45 Minuten angelegt. Abschließend wurden die DNA-Banden im Gel in der Gel-Fotodokumentationsanlage unter UV-Licht sichtbar gemacht und für die Dokumentation ein Foto erstellt (Abbildung 5).

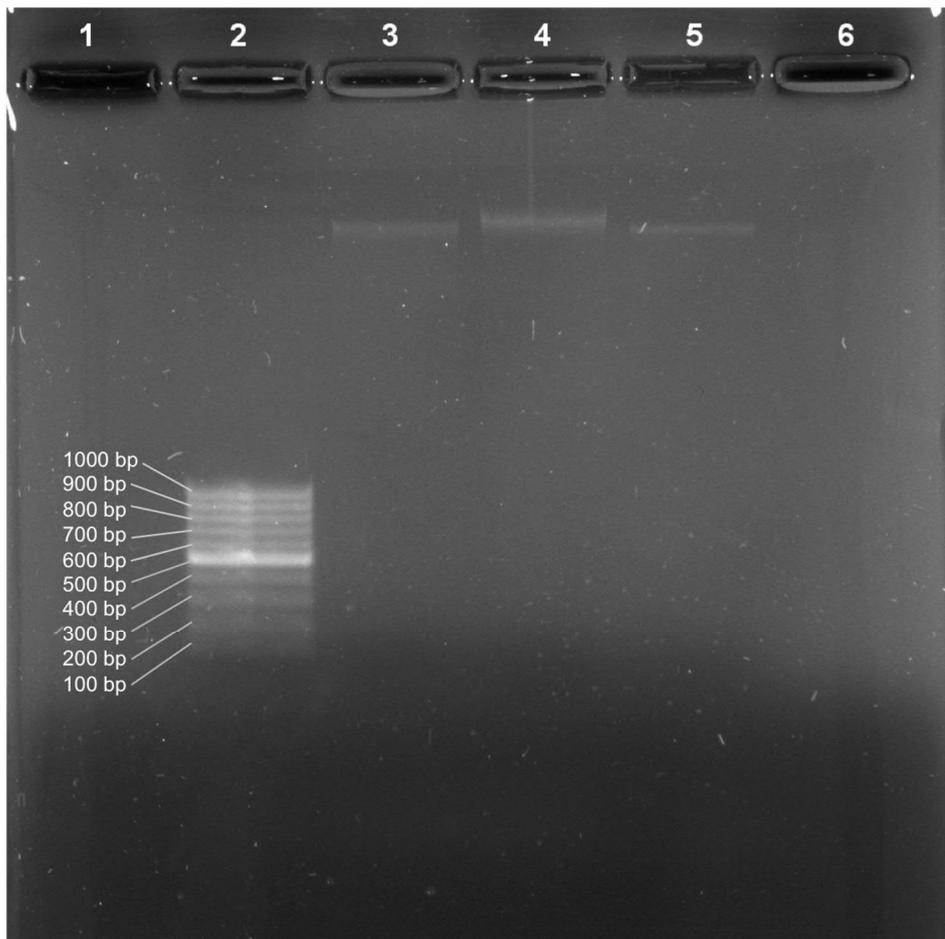


Abbildung 5: 0,8 %-Agarosegel mit DNA-Banden.

Längenstandard in Tasche 2, unfragmentierte DNA in Tasche 3, 4 und 5, Tasche 1 und 6 leer. Fragmentierte DNA wäre im Bereich des Längenstandards zu finden.

2.2.4.5 *Whole genome amplification* (WGA)

Falls bei der DNA-Isolierung nur eine geringe Menge genomischer DNA gewonnen werden konnte ($< 25 \text{ ng}/\mu\text{l}$), wurde eine Vervielfältigung des gesamten Genoms vorgenommen. Hierzu wurde das REPLI-g genomic Amplification Kit von Qiagen verwendet. $2,5 \mu\text{l}$ der Probe mit einer DNA-Konzentration von $10 - 15 \text{ ng}/\mu\text{l}$ wurden mit $2,5 \mu\text{l}$ Denaturierungspuffer D1 versetzt und für drei Minuten inkubiert. Hierdurch wurden die vorhandenen DNA-Stränge denaturiert. Anschließend wurden $5 \mu\text{l}$ des Puffer N1 zum Stoppen der Denaturierungsreaktion zugesetzt. Nach Vorbereitung eines Mastermixes aus Nuklease-freiem Wasser, Reaktionspuffer und einer hitzesensitiven DNA-Polymerase wurden zu $10 \mu\text{l}$ der denaturierten DNA $40 \mu\text{l}$ Mastermix zugegeben und über 16 Stunden im Thermocycler bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Inaktivierung der DNA-Polymerase fand danach durch eine Erhitzung der Proben auf $65 \text{ }^\circ\text{C}$ im Cycler über drei Minuten statt. Die Proben mit der vervielfältigten DNA wurden schließlich durch eine Festphasenextraktion mit dem innuPREP PCRpure Kit von der Analytik Jena AG aufgereinigt, wobei kleinste Fragmente und einzelne Nukleotide in einem ersten Schritt herausgefiltert und verworfen wurden und

nur die größeren DNA-Fragmente an einen Filter gebunden wurden. In einem zweiten Schritt wurde die DNA mit 20 - 30 µl bi-distilliertem Wasser eluiert. Die DNA-Konzentration konnte nun gemessen werden und eine Qualitätskontrolle der DNA im Agarosegel wie nach einer DNA-Isolierung (siehe Kapitel 2.2.4.4) durchgeführt werden.

2.2.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der einzelnen Exons des *TP53*-Gens erfolgte durch PCR. Es wurden die Exons 4, 5/6, 7, 8/9 und 10 vervielfältigt, um eine Mutationsanalyse dieser Segmente mittels Sanger-Sequenzierung anzuschließen. Für jeden Patienten ergab sich eine Anzahl von 5 Reaktionsansätzen für die Vervielfältigung der oben genannten Exons. Die Analyse von mehreren Patientenproben wurde auf einer 96-Well-Platte zusammengefasst. Waren einzelne Exons noch nicht analysiert, wurde nur das entsprechende Exon in einem Reaktionsansatz vervielfältigt.

Die DNA-Konzentration der Proben wurde für die Analyse auf 50 ng/µl eingestellt. Die Berechnung erfolgte nach der Formel $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$, wobei c_1 die Ausgangskonzentration der gewonnenen DNA darstellte, V_1 das eingesetzte Volumen der Ausgangslösung, c_2 die Endkonzentration von 50 ng/µl und V_2 das gesuchte Volumen, das hinzugesetzt werden musste, um die entsprechende Endkonzentration zu erreichen. Lag eine DNA-Konzentration von weniger als 50 ng/µl, wurde entweder eine WGA durchgeführt oder ein größeres Volumen der Probe für den jeweiligen PCR-Reaktionsansatz verwendet. Für die Amplifikation der DNA wurde das HotStarTaq Plus PCR Kit der Firma Qiagen verwendet.

Es wurde ein Mastermix vorbereitet, der sich pro Ansatz wie folgt zusammensetzte:

2,67 µl 10x PCR Puffer mit MgCl₂

0,53 µl 10 mM dNTP (Desoxynukleotidtriphosphat)-Mix

0,13 µl hitzestabile taq DNA-Polymerase

21,16 µl bi-distilliertes Wasser

In jedes Well der Platte wurden 24,5 µl vorgelegt. Die DNA und die entsprechenden Primer wurden den einzelnen Reaktionsansätzen zugesetzt. In jedem Reaktionsansatz sollte eine Menge von 25 ng DNA enthalten sein, sodass 0,5 µl der vorverdünnten DNA des jeweiligen Patienten in die Reaktionsansätze pipettiert wurden. Für die Stammlösungen mit geringerer Konzentration wurde dementsprechend mehr Volumen eingesetzt (0,75 - 2 µl der DNA-Stammlösung). In jeden der fünf zu einem Patienten gehörigen Ansätze wurden 1,71 µl des Primermix hinzugefügt bestehend aus *forward*- und *reverse*-Primern der Exons 4 bis 10 von *TP53* in einer Konzentration von 10 µM.

Die fertige Platte wurde mit einem *sealing tape* versiegelt und die Reaktionsansätze herab zentrifugiert. Anschließend erfolgte die PCR anhand eines vorgegebenen Programms (siehe

Tabelle 8) im Thermocycler T-Professional. Zuerst fand eine initiale Denaturierung der doppelsträngigen DNA und eine Aktivierung der Taq DNA-Polymerase bei 96 °C für fünf Minuten statt. Ein PCR-Zyklus begann mit einer Erhitzung der Reaktion auf 96 °C für 30 sec zur Denaturierung (*melting*) der doppelsträngigen DNA. Danach erfolgte eine schnelle Abkühlung der Reaktionsansätze auf 58 °C, um eine Primerhybridisierung (*annealing*) zu ermöglichen. Für diesen Prozess wurde die Temperatur für 30 sec konstant gehalten. Gefolgt wurde dieser Schritt von einer Erhitzung der Ansätze auf 72 °C über 60 sec. In dieser Zeit fand, katalysiert durch die DNA-Polymerase, die Elongation der DNA-Stränge durch Anlagerung freier Nukleotide an das 3'-Ende der Primer statt. Nach diesem Schritt erfolgte eine Wiederholung der beschriebenen Schritte, sodass in 35 Zyklen eine exponentielle Amplifikation der einzelnen Exons von *TP53* erfolgen konnte. Zum Schluss wurden die Reaktionsprodukte bis zur Weiterverarbeitung auf 4 °C herunter gekühlt.

Tabelle 8: PCR-Programm des Thermocyclers

	Temperatur	Inkubationszeit	Zyklen
Vorlauf	96 °C	5 min	
Denaturierung	96 °C	30 sec	Gehe zu 2 35x
Annealing	58 °C	30 sec	
Extension	72 °C	60 sec	
Nachlauf	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurde wie in Kapitel 2.2.4.4 beschrieben stichprobenartig eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Abbildung 6).

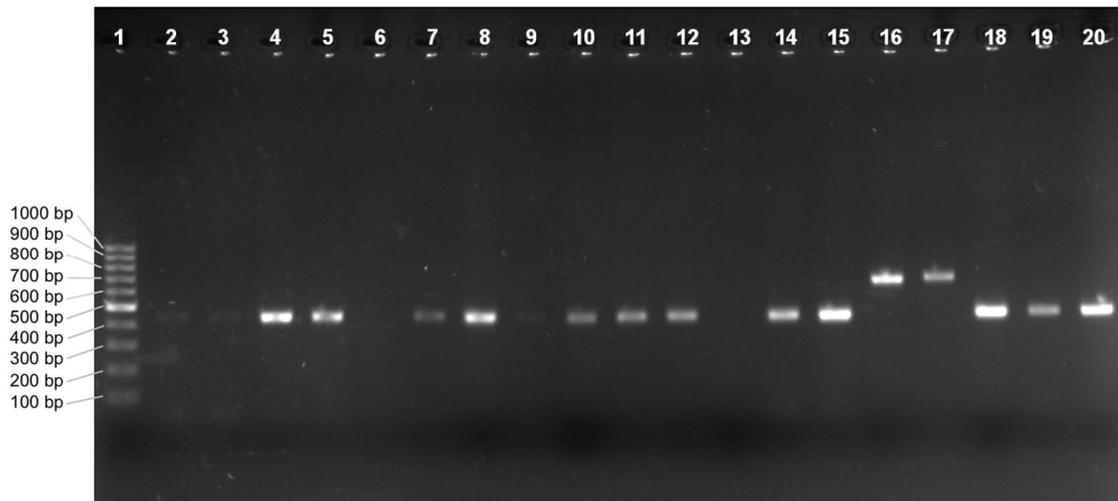


Abbildung 6: 1,5 %-Agarosegel mit stichprobenartiger Überprüfung der PCR-Produkte. In Tasche 16 und 17 wurden Exon 5/6 überprüft, in allen anderen Taschen Exon 7. Längenstandard in Tasche 1, keine PCR Produkte erkennbar in Tasche 6 und 13

Vor Weiterverarbeitung der Produkte erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Produkte durch Versetzung von 10 µl des PCR-Produktes mit 1 µl ExoSap und Inkubation dieses Ansatzes im Thermocycler über eine halbe Stunde (siehe Tabelle 9). Bei dieser Reaktion wurden überflüssige Primer und dNTPs enzymatisch abgebaut, um die weitere Analyse nicht zu beeinflussen.

Tabelle 9: ExoSap-Programm des Thermocyclers

Nr.	Temperatur	Inkubationszeit
1	37 °C	15 min
2	80 °C	15 min
3	4 °C	∞

2.2.4.7 Sanger-Sequenzierung

Bei der Sanger-Sequenzierung handelt es sich um eine Kettenabbruchsynthese mithilfe derer Mutationen über einer Detektionsgrenze von 20 % detektiert werden können. Das Prinzip ist dabei ähnlich wie bei einer PCR. Allerdings werden der Reaktion zusätzlich zu dNTPs Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) zugesetzt, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und bei Einbau in die wachsende DNA-Sequenz einen Kettenabbruch bewirken. Diese Kettenabbruchprodukte unterschiedlicher Länge können mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und zur Fluoreszenz angeregt werden, wodurch die Sequenz der DNA in einem Elektropherogramm sichtbar gemacht werden kann.

Zuerst wurde ein Mastermix erstellt, der sich pro Ansatz wie folgt zusammensetzte:

- 6 μ l bi-destilliertes nukleasefreies Wasser
- 1 μ l 5x Sequenzierungspuffer
- 1 μ l Big Dye Terminator v3.1 Cycle

In vorbereitete 96-Well-Platten wurden jeweils 8 μ l des Mastermixes vorgelegt. Die Anzahl der Ansätze entsprach der doppelten Anzahl der PCR-Produkte, da *forward*- und *reverse*-Sequenzen einzeln analysiert werden mussten. Dies entsprach zehn Ansätzen pro Patient. Zu 8 μ l Mastermix wurde 1 μ l des aufgereinigten PCR-Produktes zugefügt und 1 μ l des jeweiligen 5 μ M *forward*- oder *reverse*-Primers (Exons 4 bis 10), welcher dem amplifizierten Exon im PCR-Produkt entsprach. Die fertigen Platten wurden mit einem *sealing tape* verschlossen und die Ansätze abzentrifugiert, bevor die Sequenzierungsreaktion im Thermocycler erfolgte (verwendetes Programm siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Verwendetes Sequenzierungsprogramm

Reaktionsschritt	Temperatur	Inkubationszeit	Zyklen
Denaturierung	96 °C	30 sec	gehe zu 1 26x
Annealing	50 °C	15 sec	
Extension	60 °C	120 sec	
Kühlung	4 °C	∞	

Zur weiteren Analyse wurden die Sequenzierungsprodukte mithilfe einer Gelfiltration (Gel-Permeations-Chromatographie) mit den Aufreinigungsplatten PERFORMA DTR V3 96-Well von Edge Bio aufgereinigt. Die Säulenplatte wurde dazu auf eine Abfallplatte gesetzt und für drei Minuten bei 800 g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. 2 μ l des Sequenzierungsprodukts wurden auf die Säulenplatte aufgetragen und es wurde erneut für fünf Minuten bei 800 g zentrifugiert. Als Eluatplatte diente dabei eine Sequenzierungsplatte, in die vorher 10 μ l Formamid vorgelegt wurde. Die Sequenzierungsplatte wurde schließlich mit Gummisepten abgedeckt und die Analyse der Kettenabbruchprodukte der Sequenzierung erfolgte im Genetic Analyzer 3500.

Die Auswertung der erzeugten Elektropherogramme auf Mutationen hin erfolgte mithilfe des Programms SeqPilot (JSI Medical Systems, siehe Abbildung 7). Gefundene Mutationen wurden mit der Datenbank der IARC (International Agency for Research on Cancer) abgeglichen.

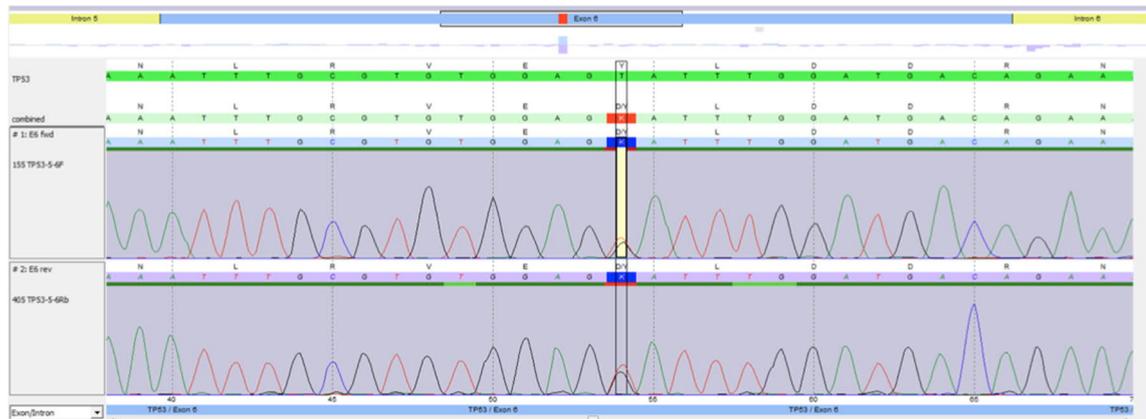


Abbildung 7: Darstellung von Elektropherogrammen im Pogram SeqPilot. Hier liegt eine Mutation c.613T>G, p.Y54D im Exon 6 vor.

Waren in der Analyse einzelne Exons nicht auswertbar, wurde die PCR und Sequenzierung der entsprechenden Exons wiederholt. Waren diese nach mehrfacher Wiederholung immer noch nicht auswertbar, wurde das Fehlen der Analyse eines einzelnen Exons oder einzelner *forward*- oder *reverse*-Stränge als Vorliegen keiner Mutation im entsprechenden Exon gewertet. Dies war für Analysen von fünf Patienten der Fall.

2.2.5 Molekulare Karyotypisierung durch SNP-Array-Analyse (SNP-A)

Für die molekulare Karyotypisierung durch SNP-A wurde das CytoScan HD Array von Affymetrix genutzt. Bei diesem Verfahren wurde fluoreszenzmarkierte DNA des Patienten auf ein Array mit Oligonukleotidfragmenten gegeben. Diese Fragmente waren komplementär zum Genom, sodass die DNA kompetitiv hybridisieren konnte und ein Fluoreszenzsignal gemessen werden konnte. Durch Vergleich des Fluoreszenzmusters des Arrays mit einer Referenz in der geeigneten Software (Chromosome Analysis Suite (Version 3.0)) konnten Zugewinne, Verluste und CN-LOH (siehe Abbildung 8) im Genom des Patienten nachgewiesen werden (Iafate et al. 2004). Es wurden DNA-Segmente ab 50 kb mit mindestens 10 veränderten SNP-Markern identifiziert.

Ein CN-LOH entsteht, wenn ein DNA-Doppelstrangbruch unter Zuhilfenahme des anderen komplementären Chromosoms repariert wird, auf welchem eine Mutation vorliegt, oder wenn eine *nondisjunction* des verdoppelten Chromosoms mit Mutation in der Mitose stattfindet. Ein Vorhandensein eines CN-LOH in 17p ist dann einer homozygoten Mutation von *TP53* gleichzusetzen (Svobodova et al. 2016).



Abbildung 8: Darstellung eines kopiezahlneutralen Heterozygotieverlustes in Chromosom 17 im Bereich von *TP53*.

Vertikaler violetter Balken: Lokalisation von *TP53*, Pfeil: CN-LOH

2.2.5.1 *Total genomic aberrations* (TGA)

Die Größe der TGA wurde als Summe der Zugewinne und Verluste, welche bei der molekularen Karyotypisierung gefunden wurden, berechnet und in Megabasenpaaren (Mb) angegeben (Cluzeau et al. 2013). Dieser Parameter diene als weiterer Indikator für die genetische Instabilität und zur objektiven Beurteilung genomischer Imbalancen.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Open Source Statistikprogramm „R“ (R Core Team 2015) und mit Microsoft Excel durchgeführt. Für die Analysen im Statistikprogramm „R“ wurden die Erweiterungspakete *Survival* (Therneau und Grambsch 2000; Therneau 2015), *Coin* (Hothorn et al. 2006; Hothorn et al. 2008), *Mice* (Buuren und Groothuis-Oudshoorn 2011), *VIM* (Kowarik und Templ 2016) und *MASS* (Venables und Ripley 2002) genutzt.

Die Patientencharakteristika in den unterschiedlichen Gruppen wurden mithilfe folgender Signifikanztests verglichen: das Geschlecht mithilfe des Fisher's Exact Tests, metrische klinische Parameter wie z. B. das Alter und das Blutbild mithilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (Wilcoxon-Rangsummentest), kategoriale Parameter wie WHO und IPSS/-R-Risikokategorien mithilfe des χ^2 -Tests. Die genetische Instabilität wurde bei zwei Gruppen anhand des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests verglichen, zum Vergleich mehrerer Gruppen diene der Kruskal-Wallis-Rangsummentest. Bevor die nicht-parametrischen Tests verwendet wurden, wurde für die klinischen Parameter sowie für die Parameter der

genetischen Instabilität mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests getestet, ob eine Normalverteilung vorlag. Dies war ausschließlich für die Größe der TGA der Fall, weshalb die nicht-parametrischen Tests verwendet wurden. Es wurde keine Korrektur der p-Werte bei mehrfachen Vergleichen durchgeführt.

Das med. OS der Patienten wurde von der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps bis zum Tod der Patienten ohne Unterscheidung der Ursache berechnet. Patienten, die beim letzten Kontakt noch am Leben waren, wurden zensiert. Ebenso fand eine Zensur am Tag einer Stammzelltransplantation statt, sofern eine solche durchgeführt wurde.

Die Grafiken zur Überlebensanalyse wurden anhand der Methode nach Kaplan und Meier gezeichnet und die einzelnen Gruppen mithilfe des Log-Rank-Tests verglichen.

Um die Wichtigkeit einzelner Einflussfaktoren und ihre Aussagekraft als unabhängige Risikofaktoren zu prüfen, wurde eine Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Das Regressionsmodell wurde stufenweise entwickelt. Dabei diente in einem ersten Schritt die univariate Regressionsanalyse zur Detektion signifikanter Variablen für die multivariate Analyse (zweiter Schritt). Es wurde dabei keine Korrektur der p-Werte durchgeführt. Die berechneten *hazard ratios* (HR) der multivariaten Analyse mit ihren Konfidenzintervallen (KI) gaben einen Hinweis auf die Wichtigkeit eines Einflussfaktors im Sinne eines unabhängigen Risikofaktors. Weitere Informationen dazu finden sich im Ergebnisteil 3.5.

3 Ergebnisse

3.1 Zytogenetische und molekulare *TP53*-Veränderungen

Anhand der Sanger-Sequenzierung, des FISH mit einer Sonde in 17p13 und der molekularen Karyotypisierung mittels SNP-A ergaben sich folgende Daten:

Eine molekulare Mutation des *TP53* fand sich bei 61/125 Patienten (48,8 %). Eine zytogenetische Mutation des *TP53* im Sinne einer Deletion des kurzen Arms von Chromosom 17 (del(17p)) fand sich bei 47/125 Patienten (37,6 %). Bei 33/125 Patienten (26,4 %) wurde eine SNP-Analyse durchgeführt. Eine CN-LOH fand sich bei 5/33 Patienten (15,2 %) und wurde als zytogenetische Mutation des *TP53* gewertet.

Bei allen Patienten lag eine Mutationsanalyse und eine Analyse einer zytogenetischen Deletion des *TP53* als 17p-FISH bzw. SNP-A vor, sodass auch eine Analyse von kombinierten Veränderungen des *TP53* möglich war: Mindestens eine Veränderung des *TP53* fand sich bei 78/125 Patienten (62,4 %), wobei eine einzelne molekulare Mutation in 26/125 der Fälle (20,8 %) gefunden wurde. Eine einzelne zytogenetische Mutation (del(17p)/CN-LOH) des *TP53* lag in 17/125 der Fälle (13,6 %) vor. Kombinierte Veränderungen des *TP53* (del(17p)/CN-LOH und Mutation) bei 35/125 der Fälle (28,0 %). Keine Veränderung des *TP53*, im Folgenden als „*TP53*-Wildtyp“ bezeichnet, fand sich in 47/125 der Fälle (37,6 %) (siehe Abbildung 9). Da allerdings nur bei 26,4 % der Patienten eine SNP-A durchgeführt wurde, ist es möglich, dass einige CN-LOH im Locus von *TP53* nicht detektiert wurden.

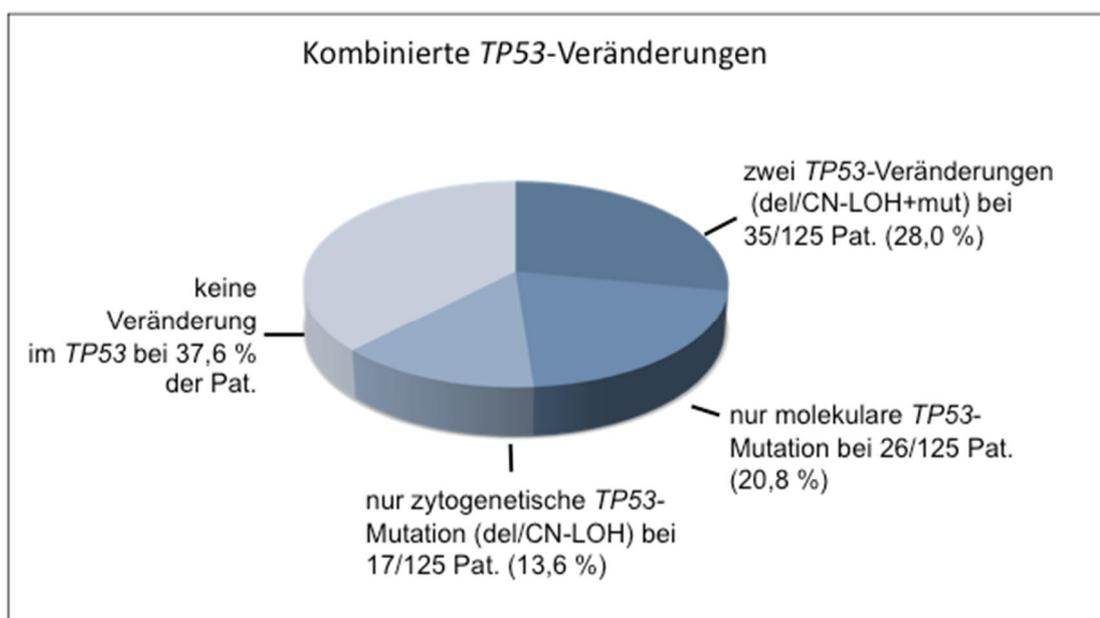


Abbildung 9: Anzahl der kombinierten *TP53*-Veränderungen in der Kohorte

Wurden Patienten mit MDS oder CMML und Patienten mit sekundärer AML nach MDS hinsichtlich der kombinierten *TP53*-Veränderungen verglichen, fand sich ein signifikant höherer Anteil von Patienten ohne jegliche Veränderung des *TP53* in der Gruppe der Patienten mit MDS/CMML. Die Anteile der einzelnen *TP53*-Veränderungen unterschieden sich zwischen Patienten mit MDS/CMML und Patienten mit sekundärer AML nach MDS dagegen nicht signifikant (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Anzahl der *TP53*-Veränderungen bei Patienten mit MDS/CMML im Vergleich zu Patienten mit sAML nach MDS.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

	MDS/CMML	sAML nach MDS	p-Wert (χ^2 -Test)
<i>TP53</i>-Wildtyp	40/95 (42,1 %)	7/30 (23,3 %)	0,020 *
<i>TP53</i>-Mutation	19/95 (20,0 %)	7/30 (23,3 %)	0,616
Nur del(17p)/CN-LOH	11/95 (11,6 %)	6/30 (20,0 %)	0,135
Del(17p)/CN-LOH und <i>TP53</i> Mutation	25/95 (26,3 %)	10/30 (33,3 %)	0,365

3.1.1 Angaben zum Patientenkollektiv mit und ohne molekulare *TP53*-Mutation

Die Patienten mit und ohne molekulare *TP53*-Mutation unterschieden sich signifikant in einigen Parametern: Der Anteil der Frauen war signifikant höher und der Hämoglobinwert signifikant niedriger bei Patienten mit molekularer *TP53*-Mutation. Näheres dazu findet sich in Tabelle 12.

Tabelle 12: Charakteristika bei Patienten mit und ohne molekulare *TP53*-Mutation.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

	Keine <i>TP53</i> -Mutation	<i>TP53</i> -Mutation	p-Wert
Alter (Jahre), Median [Range]	69,5 [46 - 88]	73 [30 - 95]	0,272 (Wilcoxon-Rangsummentest)
Geschlecht:			0,032 * (Fisher's-Exact-Test)
Männlich	41/64 (64,1 %)	27/61 (44,3 %)	
Weiblich	23/64 (35,9 %)	34/61 (55,7 %)	

	Keine <i>TP53</i>- Mutation	<i>TP53</i>- Mutation	p-Wert
Subtyp, modifiziert nach WHO-Klassifikation 2008			0,130 (χ^2 -Test)
RA/-RS	1/64 (1,6 %)	0	
RCMD/-RS	17/64 (26,6 %)	9/61 (14,8 %)	
RAEB I	6/64 (9,4 %)	9/61 (14,8 %)	
RAEB II	19/64 (29,7 %)	22/61 (36,1 %)	
CMML	2/64 (3,1 %)	1/61 (1,6 %)	
MDS; nicht näher bezeichnet	6/64 (9,4 %)	3/61 (4,9 %)	
sAML nach MDS	13/64 (20,3 %)	17/61 (27,9 %)	
Blutparameter, Median [Range]			(Wilcoxon-Rangsummentest)
Hämoglobin (g/dl)	9,15 [4,1 - 15,2]	8,55 [4,1 - 11,8]	0,023 *
Thrombozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	58,45 [3,0 - 558]	59,5 [10 - 354]	0,664
ANC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1,01 [0,009 - 13,5]	0,85 [0,08 - 11,8]	0,578
Blasten im KM (%)	12 [0 - 90]	15 [0 - 85]	0,511
IPSS-Risikokategorie			0,537 (χ^2 -Test)
Intermediär 1	5/64 (7,8 %)	3/61 (4,9 %)	
Intermediär 2	20/64 (31,3 %)	15/61 (24,6 %)	
Intermediär 2/hoch	2/64 (3,1 %)	2/61 (3,3 %)	
Hoch	29/64 (45,3 %)	35/61 (57,4 %)	
NA	8/64 (12,5 %)	6/61 (9,8 %)	
IPSS-R-Risikokategorie			0,421 (χ^2 -Test)
Intermediär	4/64 (6,3 %)	1/61 (1,6 %)	
Intermediär/hoch	1/64 (1,6 %)	2/61 (3,3 %)	
Hoch	10/64 (15,6 %)	7/61 (11,5 %)	
Sehr hoch	42/64 (65,6 %)	43/61 (60,6 %)	
NA	7/64 (10,9 %)	8/61 (13,1 %)	

3.1.2 Angaben zum Patientenkollektiv mit und ohne zytogenetische *TP53*-Mutation (del(17p)/CN-LOH)

Patienten mit und ohne zytogenetische *TP53*-Mutation unterschieden sich signifikant in der Verteilung der Geschlechter, im Subtyp nach WHO und in der IPSS-R-Risikokategorie. Näheres dazu findet sich in Tabelle 13.

Tabelle 13: Patientencharakteristika bei Patienten mit und ohne zytogenetische *TP53*-Mutation.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

	Keine del(17p)/ CN-LOH	Del(17p)/ CN-LOH	p-Wert
Alter (Jahre), Median [Range]	71 [30 - 95]	73 [48 - 85]	0,192 (Wilcoxon- Rangsummentest)
Geschlecht:			0,011 * (Fisher's- Exact-Test)
Männlich	47/73 (64,4 %)	21/52 (40,4 %)	
Weiblich	26/73 (35,6 %)	31/52 (59,6 %)	
Subtyp, modifiziert nach WHO-Klassifikation 2008			< 0,001 * (χ^2 -Test)
RA/-RS	1/73 (1,4 %)	0	
RCMD/-RS	21/73 (28,8 %)	5/52 (9,6 %)	
RAEB I	7/73 (9,6 %)	8/52 (15,4 %)	
RAEB II	20/73 (27,4 %)	21/52 (40,4 %)	
CMML	2/73 (2,7 %)	1/52 (1,9 %)	
MDS; nicht näher bezeichnet	8/73 (11,0 %)	1/52 (1,9 %)	
sAML nach MDS	14/73 (19,2%)	16/52 (30,8%)	
Blutparameter, Median [Range]			(Wilcoxon- Rangsummentest)
Hämoglobin (g/dl)	8,95 [4,1 - 15,2]	8,25 [4,1 - 13,8]	0,066
Thrombozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	65 [3 - 558]	52 [18 - 391]	0,406
ANC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,9 [0,08 - 13,5]	1,17 [0,009 - 12,2]	0,300
Blasten im KM (%)	11 [0 - 90]	17 [0 - 80]	0,047 *

	Keine del(17p)/ CN-LOH	Del(17p)/ CN-LOH	p-Wert
IPSS-Risikokategorie			0,012 * (χ^2 -Test)
Intermediär 1	7/73 (9,6 %)	1/52 (1,9 %)	
Intermediär 2	23/73 (31,5 %)	12/52 (23,1 %)	
Intermediär 2/hoch	3/73 (4,1 %)	1/52 (1,9 %)	
Hoch	31/73 (42,5 %)	33/52 (63,5 %)	
NA	9/73 (12,3 %)	5/52 (9,6 %)	
IPSS-R-Risikokategorie			0,001 * (χ^2 -Test)
Intermediär	5/73 (6,8 %)	0	
Intermediär/hoch	2/73 (2,7 %)	1/52 (1,9 %)	
Hoch	15/73 (20,5 %)	2/52 (3,8 %)	
Sehr hoch	40/73 (54,8 %)	45/52 (86,5 %)	
NA	11/73 (15,1 %)	4/52 (7,7 %)	

3.1.3 Angaben zum Patientenkollektiv mit kombinierten *TP53*-Veränderungen

Patienten mit jeglicher *TP53*-Veränderung zeigten ein signifikant höheres Alter, einen signifikant höheren Anteil an Frauen, aber auch einen signifikant höheren Anteil an Patienten mit Subtypen des höheren Risikos und ein signifikant niedrigeres Hämoglobinlevel bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps als Patienten ohne *TP53*-Veränderung (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Patientencharakteristika bei Patienten mit und ohne *TP53*-Veränderungen.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

	<i>TP53</i>-Wildtyp	<i>TP53</i> verändert	p-Wert
Alter (Jahre), Median [Range]	65 [46 - 88]	73 [30 - 95]	0,034 (Wilcoxon-Rangsummentest)
Geschlecht:			0,003 * (Fisher's-Exact-Test)
Männlich	34/47 (72,3 %)	34/78 (43,6 %)	
Weiblich	13/47 (27,7 %)	44/78 (56,4 %)	

	<i>TP53</i>-Wildtyp	<i>TP53</i> verändert	p-Wert
Subtyp, modifiziert nach WHO-Klassifikation 2008			0,003 * (χ^2 -Test)
RA/-RS	1/47 (2,1 %)	0	
RCMD/-RS	15/47 (31,9 %)	11/78 (14,1 %)	
RAEB I	4/47 (8,5 %)	11/78 (14,1 %)	
RAEB II	13/47 (27,7 %)	28/78 (35,9 %)	
CMML	2/47 (4,3 %)	1/78 (1,3 %)	
MDS; nicht näher bezeichnet	5/47 (10,6 %)	4/78 (5,1 %)	
sAML nach MDS	7/47 (14,9 %)	23/78 (29,5%)	
Blutparameter, Median [Range]			(Wilcoxon-Rangsummentest)
Hämoglobin (g/dl)	9,3 [4,1 - 15,2]	8,5 [4,1 - 12,8]	0,020 *
Thrombozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	75 [3 - 558]	56,9 [10 - 391]	0,552
ANC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1,01 [0,08 - 13,5]	0,85 [0,009 - 12,2]	0,966
Blasten im KM (%)	11 [0 - 90]	15 [0 - 85]	0,080
IPSS-Risikokategorie			0,007 * (χ^2 -Test)
Intermediär 1	5/47 (10,6 %)	3/78 (3,8 %)	
Intermediär 2	16/47 (34,0 %)	19/78 (24,4 %)	
Intermediär 2/hoch	2/47 (4,3 %)	2/78 (2,6 %)	
Hoch	17/47 (36,2 %)	47/78 (60,3 %)	
NA	7/47 (14,9 %)	7/78 (9,0 %)	
IPSS-R-Risikokategorie			0,035 * (χ^2 -Test)
Intermediär	4/47 (8,5 %)	1/78 (1,3 %)	
Intermediär/hoch	1/47 (2,1 %)	2/78 (2,6 %)	
Hoch	9/47 (19,1 %)	8/78 (10,3 %)	
Sehr hoch	26/47 (55,3 %)	59/78 (75,6 %)	
NA	7/47 (14,9 %)	8/78 (10,3 %)	

Wurden die *TP53*-Veränderungen in drei Gruppen aufgeschlüsselt, fand sich weiterhin eine signifikante Unterscheidung der Gruppen hinsichtlich der Geschlechterverteilung und hinsichtlich der Subtypen nach WHO-Klassifikation 2008, IPSS und IPSS-R (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Patientencharakteristika bei Patienten mit kombinierten *TP53*-Veränderungen. Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

	<i>TP53</i>- Wildtyp	Nur <i>TP53</i>- Mutation	Nur del(17p)/ CN-LOH	Del(17p)/ CN-LOH und <i>TP53</i>- Mutation	p-Wert
Alter (Jahre), Median [Range]	65 [46 - 88]	73,5 [30 - 95]	76 [54 - 85]	73 [48 - 85]	0,150 (Kruskal- Wallis- Test)
Geschlecht:					0,014 * (Fisher's- Exact- Test)
Männlich	34/47 (72,3 %)	13/26 (50,0 %)	7/17 (41,2 %)	14/35 (40,0 %)	
Weiblich	13/47 (27,7 %)	13/26 (50,0 %)	10/17 (58,8 %)	21/35 (60,0 %)	
Subtyp, modifiziert nach WHO- Klassifikation 2008					< 0,001 * (χ^2 -Test)
RA/-RS	1/47 (2,1 %)	0	0	0	
RCMD/-RS	15/47 (31,9 %)	6/26 (23,1 %)	2/17 (11,8 %)	3/35 (8,6 %)	
RAEB I	4/47 (8,5 %)	3/26 (11,5 %)	2/17 (11,8 %)	6/35 (17,1 %)	
RAEB II	13/47 (27,7 %)	7/26 (26,9 %)	6/17 (35,3 %)	15/35 (42,9 %)	
CMML	2/47 (4,3 %)	0	0	1/35 (2,9 %)	
MDS; nicht näher bezeichnet	5/47 (10,6 %)	3/26 (11,5 %)	1/17 (5,9 %)	0	
sAML nach MDS	7/47 (14,9 %)	7/26 (26,9 %)	6/17 (35,3 %)	10/35 (28,6 %)	

	<i>TP53</i>- Wildtyp	Nur <i>TP53</i>- Mutation	Nur del(17p)/ CN-LOH	Del(17p)/ CN-LOH und <i>TP53</i>- Mutation	p-Wert
Blutparameter, Median [Range]					(Kruskal- Wallis- Test)
Hämoglobin (g/dl)	9,3 [4,1 - 15,2]	8,7 [5,8 - 11,8]	8,3 [7 - 12,8]	8,1 [4,1 - 11,8]	0,080
Thrombozyten (10 ³ /μl)	75 [3 - 558]	62 [10 - 262]	52 [28 - 391]	44,7 [18 - 354]	0,758
ANC (10 ³ /μl)	1,01 [0,08 - 13,5]	0,73 [0,09 - 8,8]	0,95 [0,009 - 12,2]	1,49 [0,08 - 11,8]	0,279
Blasten im KM (%)	11 [0 - 90]	12 [0 - 85]	17,5 [0 - 70]	15 [2,3 - 80]	0,201
IPSS- Risikokategorie					0,001 * (χ^2 -Test)
Intermediär 1	5/47 (10,6 %)	2/26 (7,7 %)	0	1/35 (2,9 %)	
Intermediär 2	16/47 (34,0 %)	7/26 (26,9 %)	4/17 (23,5 %)	8/35 (22,9 %)	
Intermediär 2/ hoch	2/47 (4,3 %)	1/26 (3,8 %)	0	1/35 (2,9 %)	
Hoch	17/47 (36,2 %)	14/26 (53,8 %)	12/17 (70,6 %)	21/35 (60,0 %)	
NA	7/47 (14,9 %)	2/26 (7,7 %)	1/17 (5,9 %)	4/35 (11,4 %)	

	<i>TP53</i> - Wildtyp	Nur <i>TP53</i> - Mutation	Nur del(17p)/ CN-LOH	Del(17p)/ CN-LOH und <i>TP53</i> - Mutation	p-Wert
IPSS-R- Risikokategorie					0,001 * (χ^2 -Test)
Intermediär	4/47 (8,5 %)	1/26 (3,8%)	0	0	
Intermediär/ hoch	1/47 (2,1 %)	1/26 (3,8%)	0	1/35 (2,9 %)	
Hoch	9/47 (19,1 %)	6/26 (23,1 %)	1/17 (5,9 %)	1/35 (2,9 %)	
Sehr hoch	26/47 (55,3 %)	14/26 (53,8 %)	16/17 (94,1 %)	29/35 (82,9 %)	
NA	7/47 (14,9 %)	4/26 (15,4 %)	0	4/35 (11,4 %)	

3.2 Mutationsanalyse

Bei insgesamt 48/61 Patienten lagen Daten über die Lokalisation der *TP53*-Mutation vor. Bei 48 Patienten fanden sich insgesamt 59 Mutationen, bei elf Patienten wurden zwei Mutationen gefunden. Übereinstimmend mit Ergebnissen aus der Literatur befand sich die überwiegende Mehrheit der Mutationen (53/59; 89,8 %) in dem für die DNA-Bindedomäne kodierenden Abschnitt des *TP53*-Gens (siehe Abbildung 10, Referenzgenom GRCh37). Ebenso handelte es sich in der Mehrheit der Fälle (47/59; 79,7 %) um Missense-Mutationen.

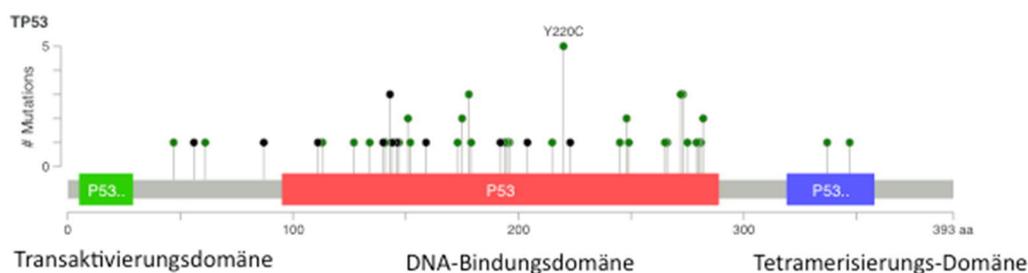


Abbildung 10: Verteilung der Mutationen im *TP53*-Gen

Die häufigste Mutation stellte p.Y220C dar, welche fünfmal vorkam (8,5 %). Eine Mutation an Aminosäureposition 143, 178 sowie 272 und 273 kam jeweils dreimal vor. An

Aminosäureposition 151, 175, 248 und 282 (R282W) fanden sich jeweils zwei Mutationen. Insgesamt 11/59 (18,6 %) Mutationen lagen innerhalb der sechs bekannten Hotspots (siehe Kapitel 1.3.2.).

3.3 Ausmaß der genetischen Instabilität

Ein wichtiges Anliegen dieser Dissertation war es, das Ausmaß der genetischen Instabilität möglichst umfassend und damit über die hierzu bisher publizierten Daten weit hinausgehend zu objektivieren. Daher dienten als Parameter für die Erfassung der genetischen Instabilität nicht nur wie oben beschrieben die Anzahl der CA, welche sich anhand der Karyotypformel ergab, sondern auch die Anzahl der Fusionen, die durch mFISH erfasst wurde, und die Größe der TGA, welche sich durch Aufsummierung der Zugewinne, Verluste und CN-LOH in Megabasenpaaren aus der molekularen Karyotypisierung ergab. Der Vergleich der genetischen Instabilität wurde bei zwei Gruppen anhand des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests durchgeführt. Zum Vergleich mehrerer Gruppen diente der Kruskal-Wallis-Rangsummentest. Es wurde keine Korrektur der p-Werte bei mehrfachen Vergleichen durchgeführt.

3.3.1 Anzahl der CA

Die mediane Anzahl der CA in der gesamten Kohorte betrug 8 [range: 3 - 46]. Die Verteilung der Anzahl der CA ist in Abbildung 11 gezeigt.

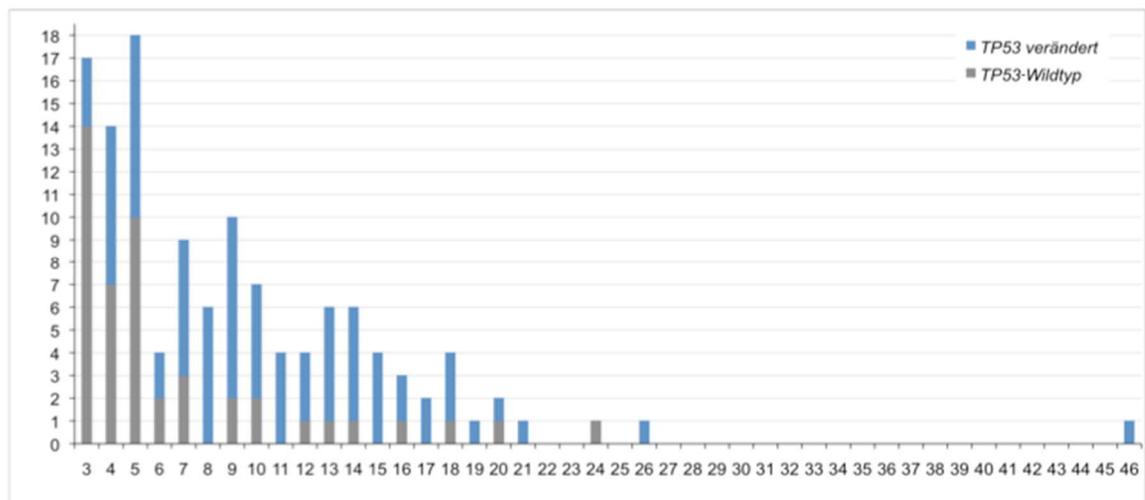


Abbildung 11: Verteilung der Anzahl der CA in der Patientenkohorte

3.3.1.1 Anzahl der CA bei Patienten mit und ohne molekulare *TP53*-Mutation

Patienten, die eine *TP53*-Mutation vorwiesen, zeigten eine hochsignifikant höhere Anzahl an CA (Median: 9 [range: 3 - 46]; N = 61) als Patienten ohne eine *TP53*-Mutation (5 [range: 3 - 24]; N = 64; $p = 0,001$) (siehe Abbildung 12).

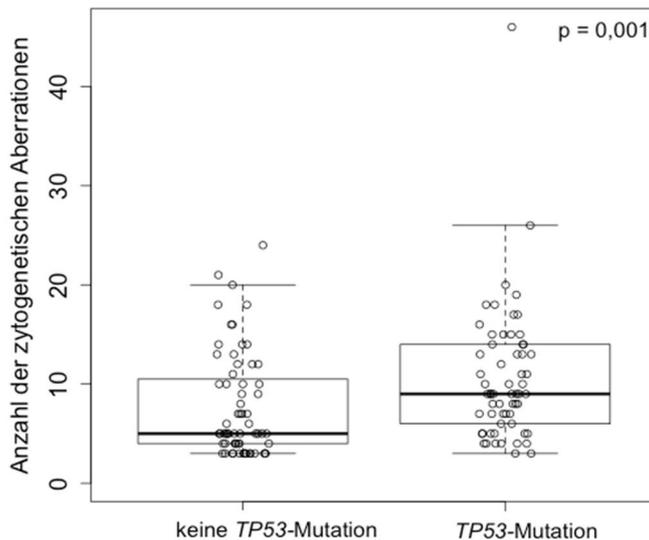


Abbildung 12: Anzahl der CA bei Patienten mit und ohne molekulare *TP53*-Mutation.

Molekulare *TP53*-Mutation: Median: 9 [range: 3 - 46]; N = 61 vs. keine molekulare *TP53*-Mutation: 5 [3 - 24]; N = 64; $p = 0,001$

3.3.1.2 Anzahl der CA bei Patienten mit und ohne zytogenetische *TP53*-Veränderung (del(17p)/CN-LOH)

Patienten, die eine zytogenetische *TP53*-Veränderung vorwiesen, zeigten eine hochsignifikant höhere Anzahl an CA (Median: 10,5 [range: 3 - 46]; N = 52) als Patienten ohne eine zytogenetische *TP53*-Veränderung (5 [3 - 26]; N = 73; $p < 0,001$) (siehe Abbildung 13).

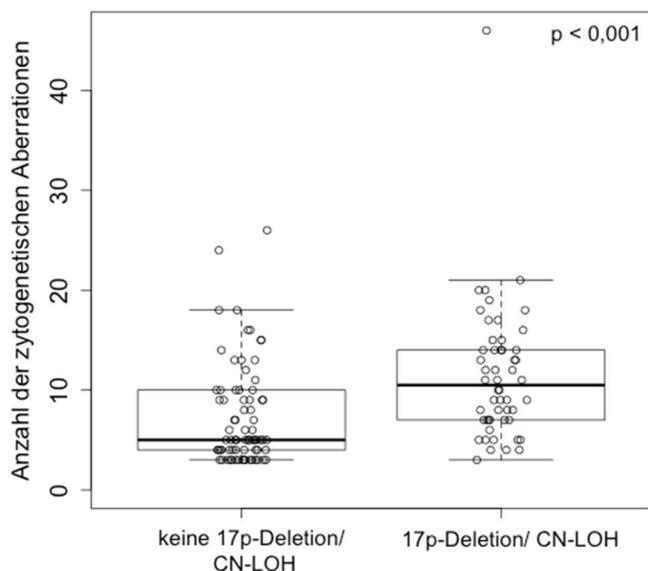


Abbildung 13: Anzahl der CA bei Patienten mit und ohne zytogenetische *TP53*-Veränderung (del(17p)/CN-LOH).

Del(17p)/CN-LOH: Median: 10,5 [range: 3 - 46]; N = 52 vs. keine zytogenetische *TP53*-Veränderung: 5 [3 - 26]; N = 73; $p < 0,001$

3.3.1.3 Anzahl der CA bei Patienten mit kombinierten Veränderungen des *TP53*

Die Anzahl der CA war im Vergleich von Patienten ohne jegliche Veränderung des *TP53* zu Patienten mit mindestens einer *TP53*-Veränderung hochsignifikant erhöht (Median: 5 [range: 3 - 24], N = 47 vs. 9 [3 - 46]; N = 78; $p < 0,001$) (siehe Abbildung 14).

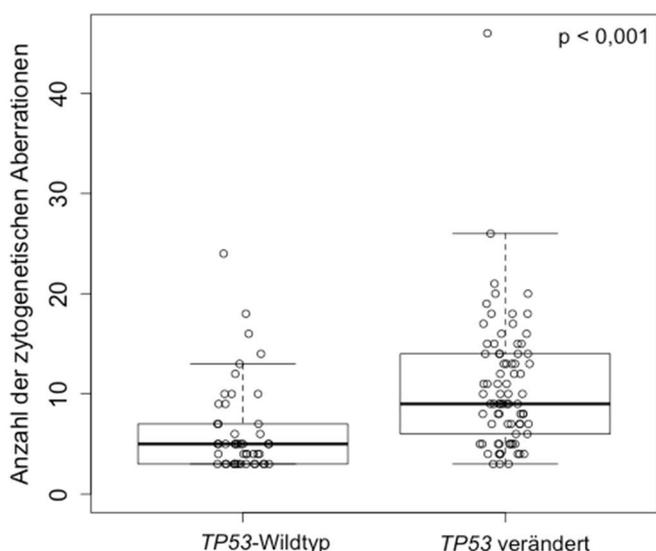


Abbildung 14: Anzahl der CA im Vergleich von Patienten mit und ohne Veränderung des *TP53*.

TP53-Wildtyp: Median: 5 [range: 3 - 24], N = 47 vs. *TP53* verändert: 9 [3 - 46]; N = 78; $p < 0,001$

Es fand sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied, bei Betrachtung der einzelnen Untergruppen mit verändertem *TP53* im Vergleich zu Patienten mit *TP53*-Wildtyp: Die mediane Anzahl der CA betrug bei Patienten ohne irgendeine *TP53*-Veränderung wie oben genannt 5 [3 - 24]; N = 47. Patienten mit molekularer *TP53*-Mutation zeigten eine hochsignifikant höhere mediane Anzahl der CA von 9 [3 - 26]; N = 26; $p = 0,007$. Ähnlich verhielt sich dies für Patienten mit einer zytogenetischen Veränderung des *TP53* mit einer medianen Anzahl der CA von 12 [3 - 21]; N = 17; $p < 0,001$ und für Patienten mit gleichzeitig vorliegender zytogenetischer und molekularer *TP53*-Mutation mit medianer Anzahl der CA von 9 [4 - 46]; N = 35; $p < 0,001$. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der CA zwischen den einzelnen Gruppen mit *TP53*-Veränderung gefunden (siehe Abbildung 15).

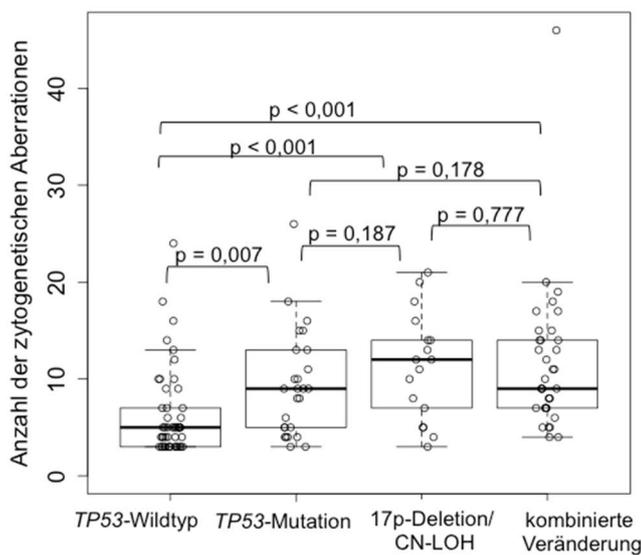


Abbildung 15: Anzahl der CA bei Patienten mit kombinierten Veränderungen des *TP53*. *TP53*-Wildtyp: Median 5 [range: 3 - 24], N = 47 vs. molekulare *TP53*-Mutation 9 [3 - 26]; N = 26 vs. zytogenetische Veränderung des *TP53* 12 [3 - 21]; N = 17 vs. zytogenetische und molekulare *TP53*-Mutation 9 [4 - 46]; N = 35

3.3.2 Anzahl der Fusionen

Die Anzahl der Fusionen wurde als weiterer Marker der genetischen Instabilität herangezogen, um auch strukturelle Veränderungen der Chromosomen zu berücksichtigen, welche bei der Anzahl der CA nicht betrachtet wurden. Hierzu wurden im mFISH die Anzahl der Bruchereignisse gezählt wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben.

3.3.2.1 Anzahl der Fusionen bei Patienten mit und ohne molekulare *TP53*-Mutation

Wie für die Anzahl der CA beobachtet, zeigte sich auch für die Anzahl der Fusionen eine signifikant höhere Anzahl bei Patienten mit einer *TP53*-Mutation: Median 4,5 [range: 1 - 13], N = 40 vs. 2 [0 - 15], N = 54; $p = 0,027$ (siehe Abbildung 16).

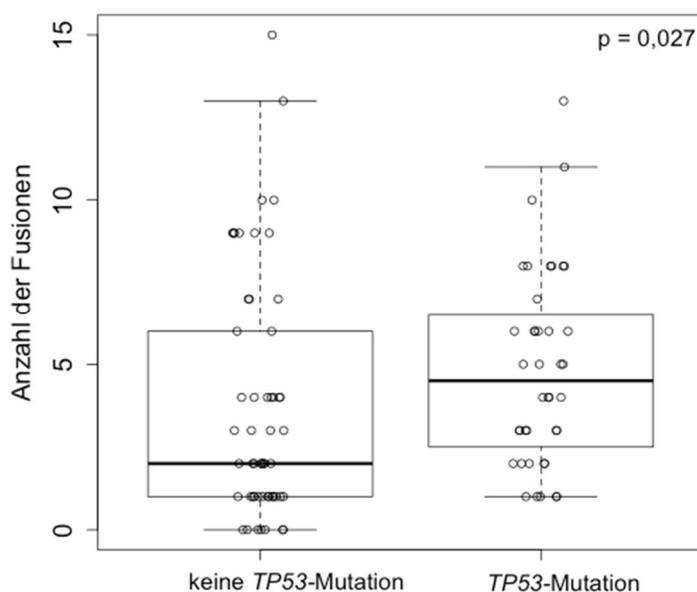


Abbildung 16: Anzahl der Fusionen bei Patienten mit und ohne molekulare *TP53*-Mutation.

Keine molekulare *TP53*-Mutation: Median 2 [range: 0 - 15], N = 54 vs. molekulare *TP53*-Mutation: 4,5 [1 - 13], N = 40; $p = 0,027$

3.3.2.2 Anzahl der Fusionen bei Patienten mit und ohne zytogenetische *TP53*-Veränderung (del(17p)/CN-LOH)

Es zeigte sich ebenso eine signifikant höhere Anzahl der Fusionen bei Patienten mit zytogenetischen *TP53*-Veränderungen (Median: 6 [range: 1 - 15], N = 37) im Vergleich zu Patienten ohne zytogenetische *TP53*-Veränderungen (2 [0 - 10], N = 57 ; $p < 0,001$) (siehe Abbildung 17).

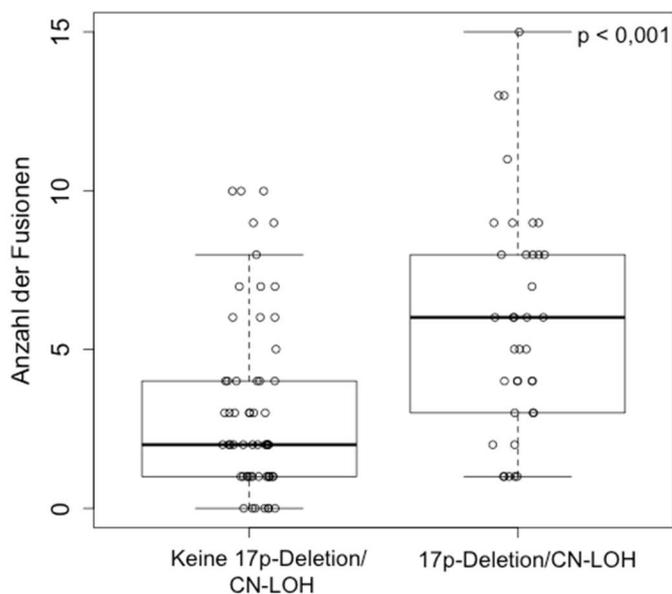


Abbildung 17: Anzahl der Fusionen bei Patienten mit und ohne zytogenetische *TP53*-Veränderung.

Keine zytogenetische *TP53*-Veränderung: Median 2 [range: 0 - 10], N = 57 vs. 17p-Deletion/CN-LOH: 6 [1 - 15], N = 37; $p < 0,001$

3.3.2.3 Anzahl der Fusionen bei Patienten mit kombinierten Veränderungen des *TP53*

Die Anzahl der Fusionen war bei Patienten mit *TP53*-Veränderungen hochsignifikant höher als bei Patienten ohne *TP53*-Veränderung: Median: 5 [range: 1 - 15]; N = 55 vs. 2 [0 - 10]; N = 39; $p < 0,001$ (siehe Abbildung 18).

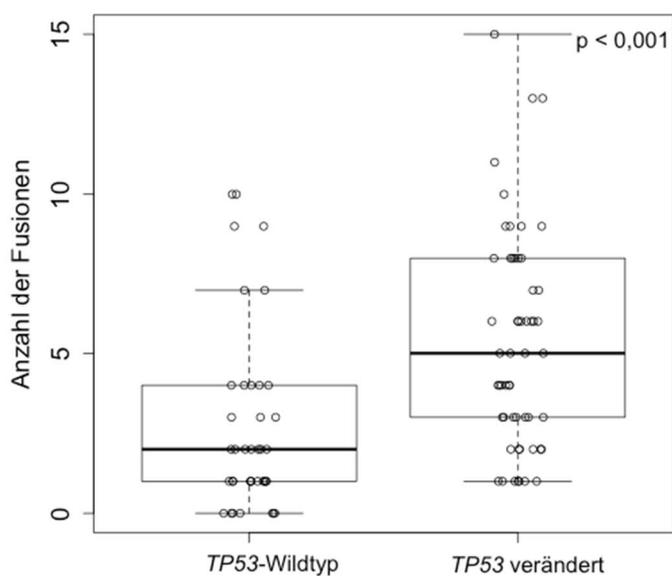


Abbildung 18: Anzahl der Fusionen bei Patienten mit und ohne *TP53*-Veränderung.

TP53-Wildtyp: Median: 2 [range: 0 - 10]; N = 39 vs. *TP53* verändert: 5 [1 - 15]; N = 55; $p < 0,001$

Dies zeigte sich auch für die einzelnen Gruppen der Patienten mit *TP53*-Veränderung im Vergleich zu Patienten ohne *TP53*-Veränderung: Die mediane Anzahl der Fusionen war bei Patienten molekularer *TP53*-Mutation signifikant höher (3 [1 - 10], N = 18, p = 0,019). Dies zeigte sich ebenso für Patienten mit einer zytogenetischen Veränderung des *TP53* mit einer medianen Anzahl der Fusionen von 6 [1 - 15]; N = 15; p = 0,001 und für Patienten mit kombinierten Veränderungen des *TP53* mit medianer Anzahl der Fusionen von 5 [1 - 13], N = 22; p < 0,001. Im Vergleich der einzelnen Gruppen mit *TP53*-Veränderung untereinander zeigte sich dagegen kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 19).

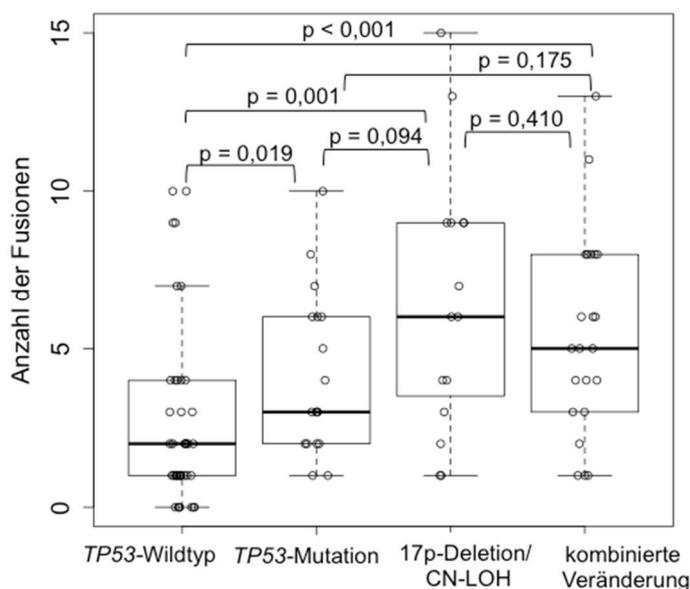


Abbildung 19: Anzahl der Fusionen bei Patienten mit kombinierten Veränderungen des *TP53*.

TP53-Wildtyp: Median: 2 [range: 0 - 10]; N = 39 vs. molekulare *TP53*-Mutation: 3 [1 - 10], N = 18 vs. zytogenetische Veränderung des *TP53*: 6 [1 - 15]; N = 15 vs. kombinierte Veränderungen des *TP53*: 5 [1 - 13], N = 22

3.3.3 Größe der TGA

Die Größe der TGA wurde als letzte Variable zur Erfassung der genetischen Instabilität gewählt. Zur objektiven Erfassung der Instabilität wurden hierzu die Größe der Zugewinne, Verluste und CN-LOH in Mb, welche sich in der SNP-A zeigten, zur Größe der TGA aufsummiert.

3.3.3.1 Größe der TGA bei Patienten mit und ohne molekulare *TP53*-Mutation

Es zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied der Größe der TGA zwischen Patienten mit und ohne *TP53*-Mutation, wobei bei Patienten mit molekularer *TP53*-Mutation eine größere mediane TGA gefunden wurde: 328 Mb [range: 97 - 523]; N = 22 vs. 191 Mb [33 - 364]; N = 14; $p < 0,001$ (siehe Abbildung 20).

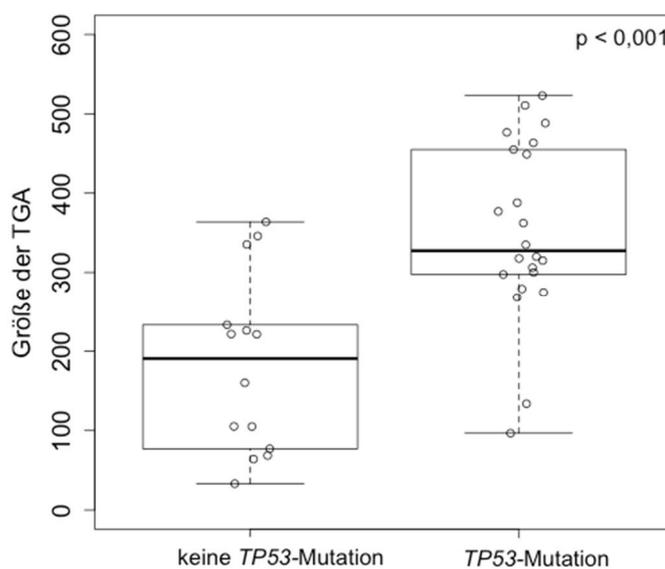


Abbildung 20: Größe der TGA bei Patienten mit und ohne molekulare *TP53*-Mutation.

Keine molekulare *TP53*-Mutation: Median: 191 Mb [range: 33 - 364]; N = 14 vs. molekulare *TP53*-Mutation: 328 Mb [range: 97 - 523]; N = 22 ; $p < 0,001$

3.3.3.2 Größe der TGA bei Patienten mit und ohne zytogenetische *TP53*-Veränderung (del(17p)/CN-LOH)

Die mediane Größe der genomischen Imbalancen, gemessen an der TGA, war bei Patienten mit zytogenetischer *TP53*-Veränderung (del(17p)/CN-LOH) (346 Mb [160 - 523]; N = 21) hochsignifikant größer als bei Patienten ohne zytogenetische *TP53*-Veränderung (134 Mb [33 - 449]; N = 15; $p < 0,001$) (siehe Abbildung 21).

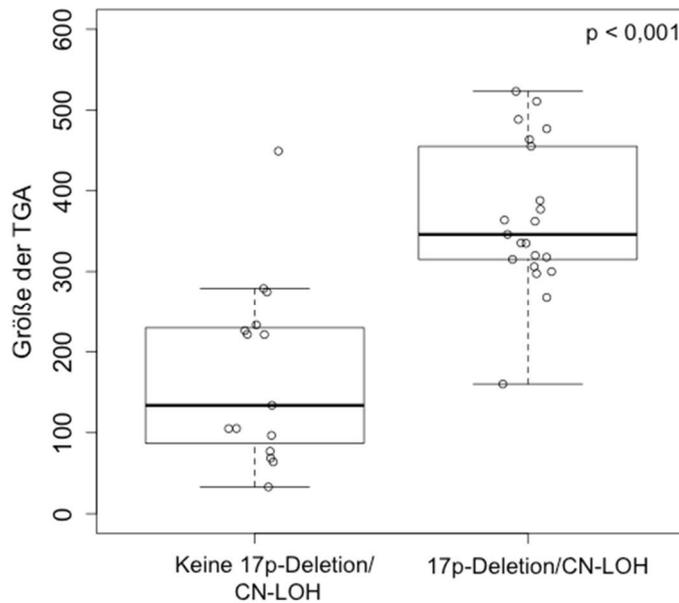


Abbildung 21: Größe der TGA bei Patienten mit und ohne zytogenetische *TP53*-Veränderung.

Keine zytogenetische *TP53*-Veränderung: Median: 134 Mb [range: 33 - 449]; N = 15 vs. del(17p)/CN-LOH 346 Mb [160 - 523]; N = 21; $p < 0,001$

3.3.3.3 Größe der TGA bei Patienten mit kombinierten Veränderungen des *TP53*

Die mediane Größe der genomischen Imbalancen, gemessen an der TGA, war bei Patienten mit mindestens einer Veränderung des *TP53* (Median: 336 Mb [range: 97 - 523]; N = 26) signifikant höher als Patienten ohne *TP53*-Veränderung (105 Mb [33 - 233]; N = 10; $p < 0,001$) (siehe Abbildung 22).

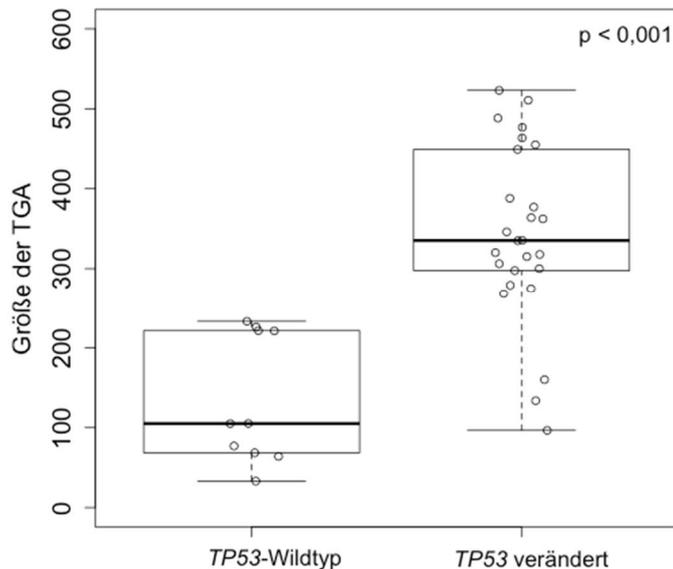


Abbildung 22: Größe der TGA bei Patienten mit und ohne *TP53*-Veränderung.

TP53-Wildtyp: Median: 105 Mb [range: 33 - 233]; N = 10 vs. *TP53* verändert: 336 Mb [97 - 523]; N = 26 vs.; $p < 0,001$

Eine größere mediane TGA im Vergleich zu Patienten ohne *TP53*-Veränderung zeigte sich auch für die einzelnen Typen der *TP53*-Veränderungen: Bei Vorhandensein einer molekularen Mutation zeigte sich eine höhere, allerdings nicht signifikant differente mediane TGA von 275 Mb [97 - 449]; N = 5; $p = 0,075$. Bei Vorhandensein einer zytogenetischen *TP53*-Veränderung lag eine signifikant höhere TGA vor (341 Mb [160 - 364]; N = 4; $p = 0,024$). Bei Vorliegen von kombinierten *TP53*-Veränderungen zeigte sich eine hochsignifikant höhere TGA im Vergleich zu Patienten ohne *TP53*-Veränderung (363 Mb [268 - 523]; N = 17; $p < 0,001$). Im Vergleich der einzelnen Gruppen mit *TP53*-Veränderungen untereinander zeigte sich dagegen nur ein signifikanter Unterschied für Patienten mit molekularer Mutation im Vergleich zu Patienten mit kombinierter *TP53*-Veränderung: 275 Mb [97 - 449]; N = 5 vs. 363 Mb [268 - 523]; N = 17; $p = 0,019$ (siehe Abbildung 23).

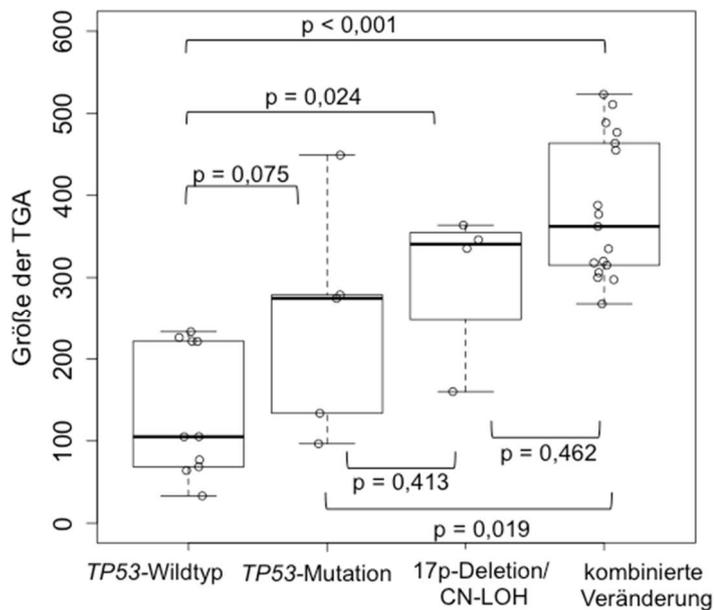


Abbildung 23: Größe der TGA bei Patienten mit kombinierten Veränderungen des *TP53*. *TP53*-Wildtyp: Median: 105 Mb [range: 33 - 233]; N = 10 vs. molekulare *TP53*-Mutation: 275 Mb [97 - 449]; N = 5 vs. zytogenetische *TP53*-Veränderung: 341 Mb [160 - 364]; N = 4; p = 0,024 vs. kombinierte *TP53*-Veränderung: 363 Mb [268 - 523]; N = 17

3.3.4 Zusammenfassung

Insgesamt zeigte sich in der Kohorte, dass die genetische Instabilität bei Vorhandensein einer molekularen *TP53*-Mutation, einer zytogenetischen *TP53*-Veränderung, aber auch bei kombinierten *TP53*-Veränderungen signifikant höher war als bei Patienten ohne *TP53*-Veränderungen. Dies galt nicht nur für die Anzahl der zytogenetischen Aberrationen, sondern auch für die Anzahl der Fusionen und die Größe der TGA. Die einzige Ausnahme, bei der sich keine Signifikanz ergab, stellte der Vergleich der Größe der TGA bei Patienten mit vorliegender molekularer *TP53*-Mutation mit Patienten ohne *TP53*-Veränderung dar (siehe Abbildung 23). Es fand sich dagegen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der genetischen Instabilität zwischen den einzelnen Gruppen mit *TP53*-Veränderung. Auch hier gab es eine Ausnahme, bei der der Vergleich von Patienten mit molekularer *TP53*-Mutation und Patienten mit kombinierten Veränderungen des *TP53* eine Signifikanz erreichte (siehe Abbildung 23).

3.4 Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier

Das Gesamtüberleben der einzelnen Gruppen bis zum Tod der Patienten wurde mithilfe der Kaplan-Meier Methode dargestellt. Patienten wurden bei *loss of follow-up* am Tag des letzten Kontaktes und bei stattgehabter Stammzelltransplantation am Tag der Transplantation zensiert. Gruppenvergleiche wurden mithilfe des Log-Rank-Tests durchgeführt.

3.4.1 Gesamtüberleben der Kohorte

Das mediane Gesamtüberleben der gesamten Kohorte betrug 14 Monate [KI: 8 - 17] (siehe Abbildung 24).

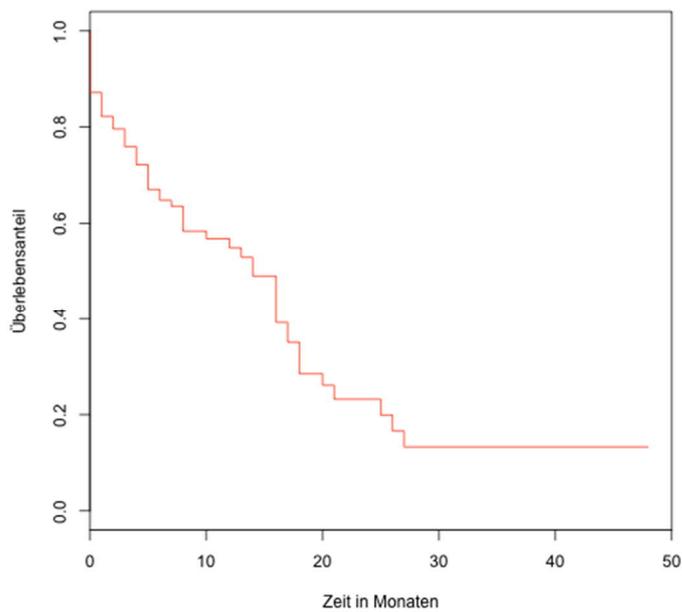


Abbildung 24: Med. OS für die gesamte Kohorte: 14 Monate [KI: 8 - 17]

3.4.2 Gesamtüberleben von Patienten in Abhängigkeit von molekularen *TP53*-Mutationen

Das med. OS der Patienten war bei Vorhandensein einer molekularen *TP53*-Mutation mit acht Monaten ([KI: 6 - 16]; N = 61) signifikant kürzer als bei Patienten ohne *TP53*-Mutation (18 Monate [KI: 14 - NA]; N = 64; p = 0,014) (siehe Abbildung 25).

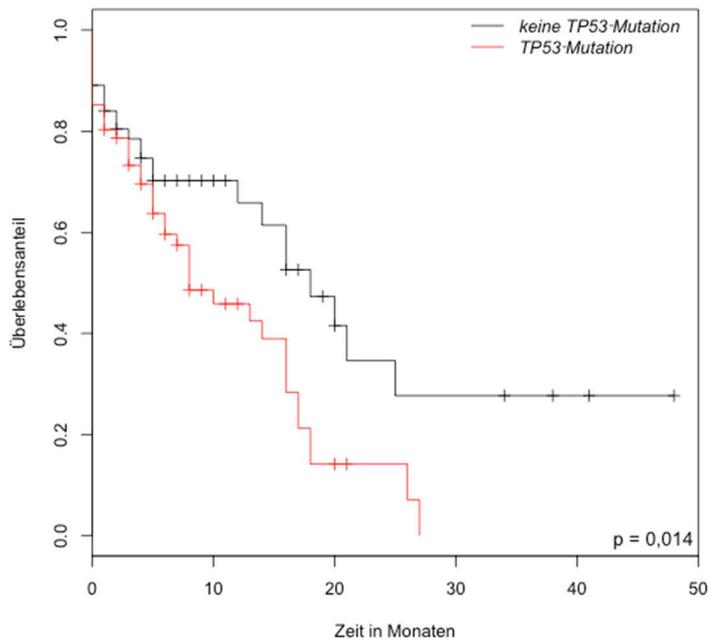


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit von einer molekularen *TP53*-Mutation.

Med. OS: mutiert: 8 Monate; ([KI: 6 - 16]; N = 61) vs. nicht mutiert: 18 Monate; ([KI: 14 - NA]; N = 64; p = 0,014)

3.4.3 Gesamtüberleben von Patienten in Abhängigkeit von zytogenetischen *TP53*-Veränderungen (del(17p)/CN-LOH)

Wie in Abbildung 26 dargestellt, zeigte sich auch bei Patienten mit vorhandener zytogenetischer *TP53*-Veränderung (del(17p)/CN-LOH) ein kürzeres medianes Gesamtüberleben (8 Monate [KI: 4 - 16]; N = 52) als bei Patienten ohne zytogenetische *TP53*-Veränderung (16 Monate [KI: 12 - 25]; N = 73; p = 0,008).

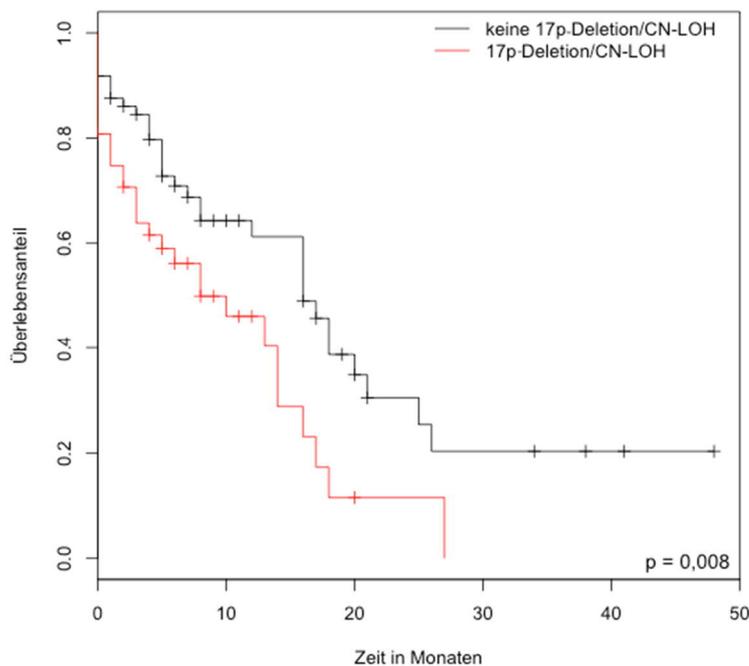


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit von einer zytogenetischen *TP53*-Veränderung.

Med. OS: zytogenetische *TP53*-Veränderung: 8 Monate [KI: 4 - 16]; N = 52 vs. zytogenetische *TP53*-Veränderung: 16 Monate [KI: 12 - 25]; N = 73; p = 0,008

3.4.4 Gesamtüberleben von Patienten in Abhängigkeit von kombinierten Veränderungen des *TP53*

Das mediane Gesamtüberleben bei Patienten mit *TP53*-Veränderung (molekulare Mutation und/oder del(17p)/CN-LOH) war mit acht Monaten ([KI: 5 - 16]; N = 78) hochsignifikant kürzer als das von Patienten ohne *TP53*-Veränderung (21 Monate; [KI: 16 - NA]; N = 47; $p < 0,001$) (siehe Abbildung 27).

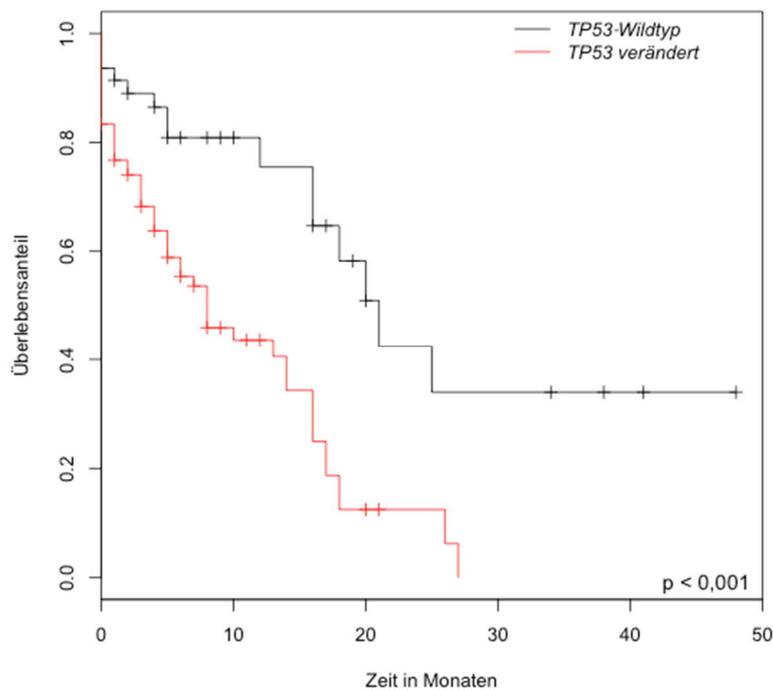


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve bei Patienten mit und ohne *TP53*-Veränderung.

Med. OS: *TP53* verändert: 8 Monate [KI: 5 - 16]; N = 78 vs. *TP53*-Wildtyp: 21 Monate [KI: 16 - NA]; N = 47; $p < 0,001$

Nach Aufteilung der Patienten in vier Gruppen abhängig vom *TP53*-Mutationsstatus zeigte sich, dass das mediane Gesamtüberleben bei Patienten mit einer zytogenetischen Veränderung des *TP53* auf drei Monate ([KI: 1 - NA]; N = 17) verkürzt war. Patienten mit molekularer *TP53*-Mutation zeigten ein verkürztes medianes Gesamtüberleben von acht Monaten ([KI: 5 - 18]; N = 26) und Patienten mit kombinierter *TP53*-Veränderung von 13 Monaten ([KI: 6 - 28]; N = 35). Bei Vorliegen keinerlei Veränderungen des *TP53* betrug das mediane Gesamtüberleben 21 Monate ([KI: 16 - NA]; N = 47) (siehe Abbildung 28).

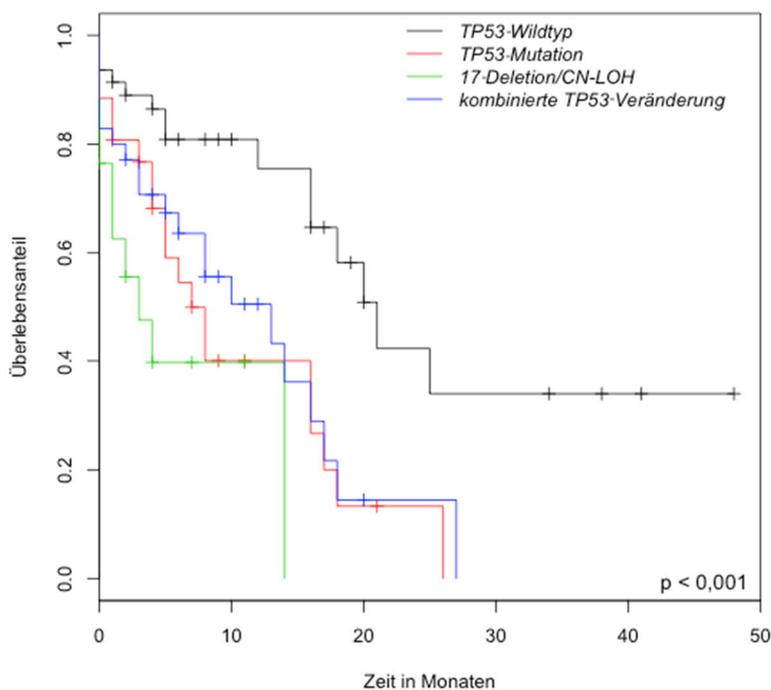


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit von kombinierten *TP53*-Veränderungen.

Med. OS: *TP53*-Wildtyp: 21 Monate [KI: 16 - NA]; N = 47 vs. *TP53*-Mutation: 8 Monate [KI: 5 - 18], N = 26 vs. zytogenetische *TP53*-Veränderung: 3 Monate [KI: 1 - NA], N = 17 vs. kombinierte *TP53*-Veränderung: 13 Monate [KI: 6 - 28], N=35

Auch in den einzelnen Gruppen zeigte sich ein signifikant kürzeres medianes Gesamtüberleben von Patienten mit *TP53*-Veränderungen im Vergleich zu Patienten ohne *TP53*-Veränderung (siehe Abbildung 29 A, B, C). Zwischen den Gruppen mit *TP53*-Veränderungen dagegen unterschied sich das mediane Gesamtüberleben nicht signifikant (siehe Abbildung 29 D, E, F).

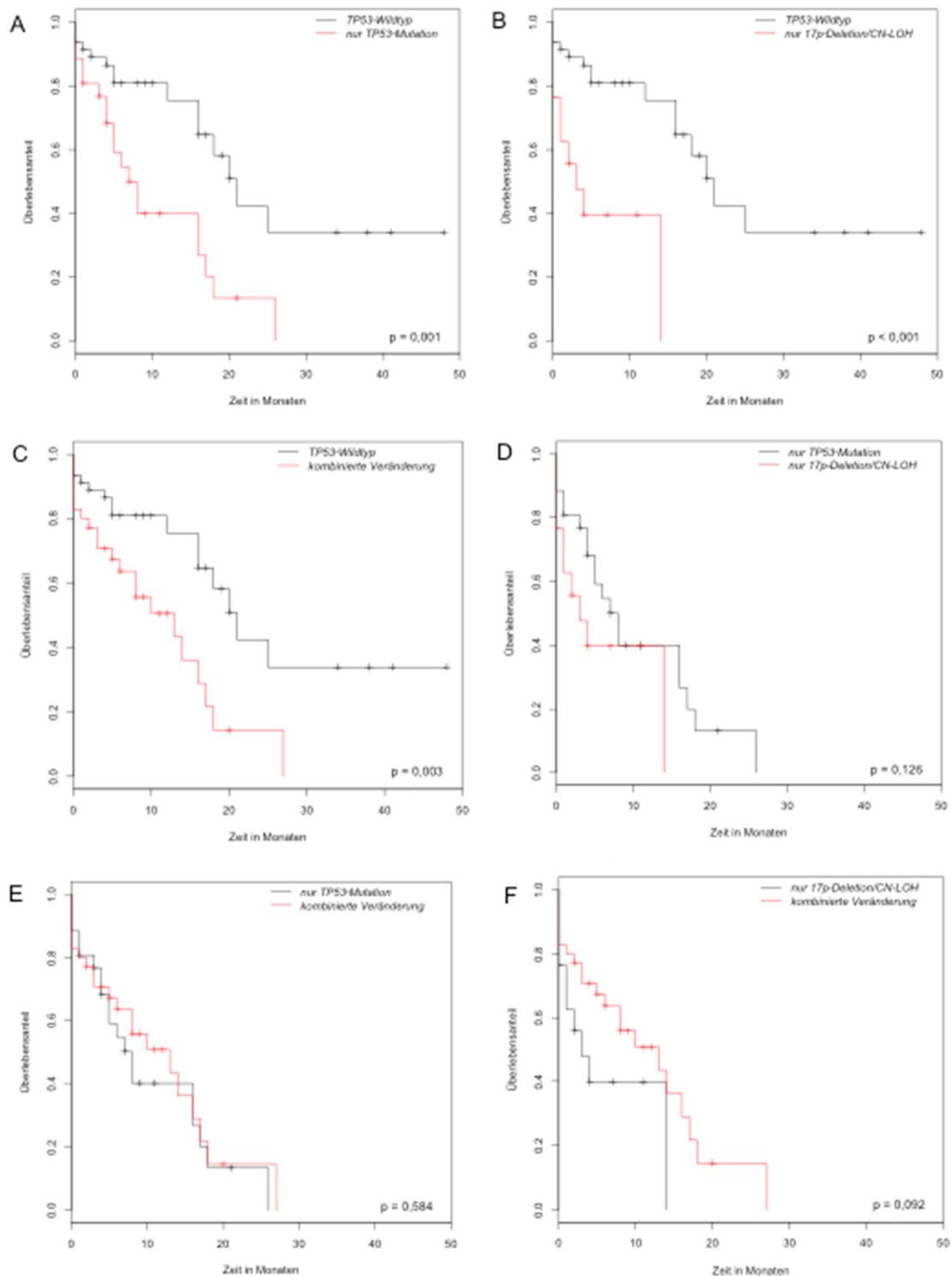


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurven mit Vergleich der einzelnen Gruppen mit und ohne *TP53*-Veränderungen.

A: *TP53*-Wildtyp vs. *TP53*-Mutation, $p = 0,001$; B: *TP53*-Wildtyp vs. 17p-Deletion/CN-LOH, $p < 0,001$; C: *TP53*-Wildtyp vs. kombinierte Veränderung des *TP53*, $p = 0,003$; D: *TP53*-Mutation vs. 17p-Deletion/CN-LOH, $p = 0,126$; E: *TP53*-Mutation vs. kombinierte Veränderung, $p = 0,584$; F: 17p-Deletion/CN-LOH vs. kombinierte Veränderung, $p = 0,092$

3.4.5 Gesamtüberleben von Patienten in Abhängigkeit von der Anzahl der CA

Mit zunehmender Anzahl der CA zeigte sich ein signifikant kürzeres med. OS der Patienten: Von Patienten mit drei CA wurde das med. OS nicht erreicht [KI: 16 - NA], N = 17. Patienten mit vier CA dagegen hatten ein med. OS von 16 Monaten [KI: 12 - NA], N = 14. Bei Patienten mit fünf CA war das med. OS kürzer mit 14 Monaten [KI: 5 - NA], N = 18. Patienten mit sechs oder mehr CA hatten das kürzeste med. OS mit acht Monaten ([KI: 6 - 17], N = 76; $p = 0,036$, siehe Abbildung 30).

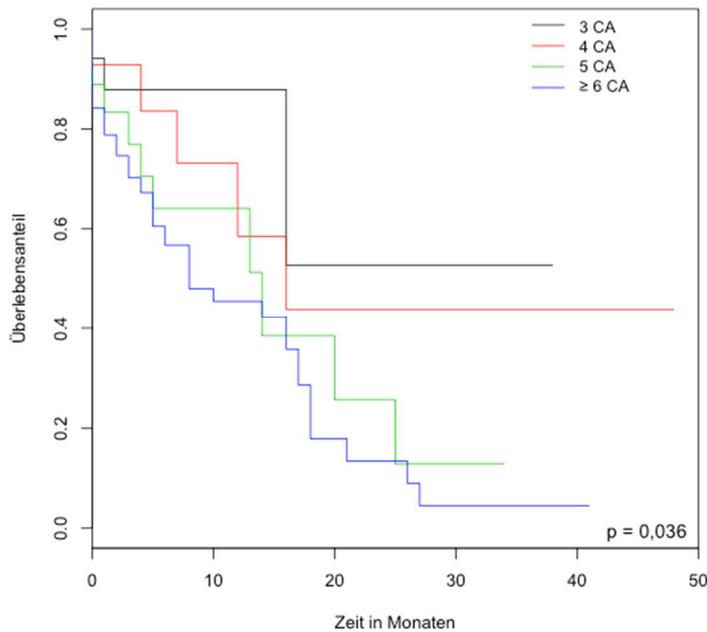


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve bei zunehmender Anzahl der CA.

Med. OS: 3 CA: nicht erreicht [KI: 16 - NA], N = 17 vs. 4 CA: 16 Monate [KI: 12 - NA], N = 14 vs. 5 CA: 14 Monate [KI: 5 - NA], N = 18 vs. ≥ 6 CA: 8 Monate [KI: 6 - 17], N = 76; $p = 0,036$

Wurden zwei Patientengruppen mit einem Grenzwert von fünf CA gebildet, zeigte sich bei Patienten mit fünf oder mehr CA ein hochsignifikant kürzeres med. OS (10 Monate [KI: 6 - 17], N = 91) im Vergleich zu Patienten mit weniger als fünf CA (25 Monate [KI: 16 - NA], N = 34; $p = 0,005$, siehe Abbildung 31)

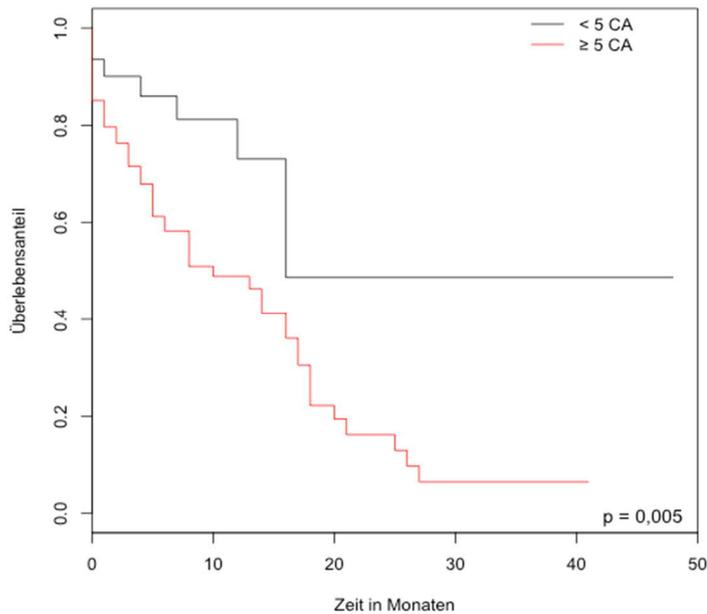


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve mit einem Grenzwert von fünf CA.

Med. OS: ≥ 5 CA: 10 Monate [KI: 6 - 17], N = 91 vs. < 5 CA: 25 Monate [KI: 16 - NA], N=34; $p = 0,005$

Wurde ein Grenzwert von vier oder von sechs CA gewählt, zeigte sich ebenso ein signifikant kürzeres med. OS der Patienten mit einer höheren Anzahl der CA. Allerdings ergab sich für einen Grenzwert von fünf CA eine deutlichere Auftrennung der beiden Kurven, verbunden mit der größten Differenz im medianen Überleben und einem höheren p-Wert (siehe Abbildung 32), weshalb im Folgenden der Grenzwert von fünf CA verwendet wurde.

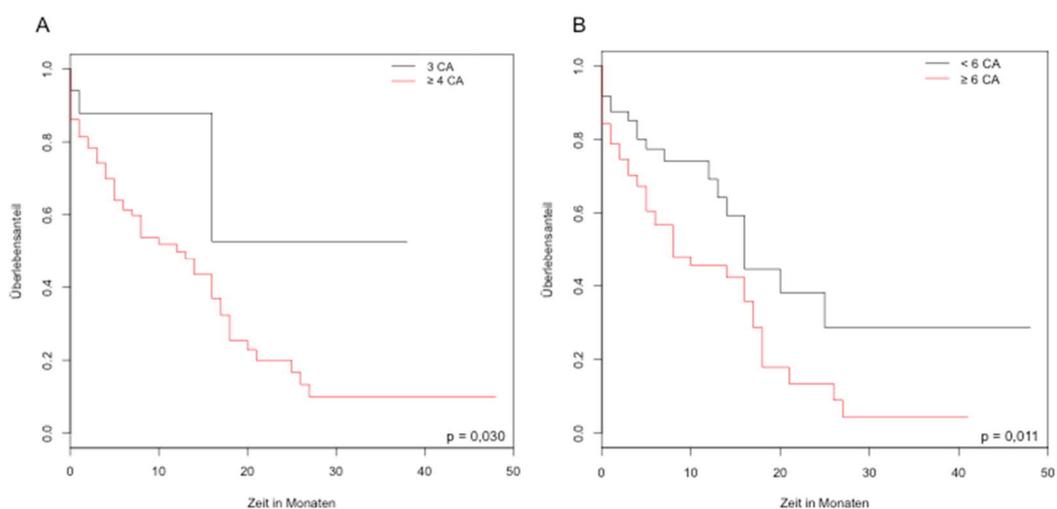


Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurven mit einem Grenzwert von vier und sechs CA.

A. med. OS: ≥ 4 CA: 12 Monate [KI: 8 - 17], N = 108 vs. < 4 CA: NA [KI: 16 - NA], N = 17; $p = 0,030$ B. med. OS: ≥ 6 CA: 8 Monate [KI: 6 - 17], N = 76 vs. < 6 CA: 16 Monate [KI: 13 - NA], N = 49; $p = 0,011$

Wurden die Patienten zusätzlich zur Anzahl der CA nach Vorhandensein einer molekularen *TP53*-Mutation aufgeteilt, zeigte sich das längste med. OS für die Patienten mit einer geringen Anzahl der Aberrationen ($CA < 5$) und ohne Vorliegen einer *TP53*-Mutation (med. OS: nicht erreicht [KI: 5 - NA], $N = 23$), gefolgt von den Patienten mit hoher Anzahl der CA ($CA \geq 5$) und keiner Mutation des *TP53* mit 18 Monaten ([KI: 5 - NA], $N = 41$) und Patienten mit niedriger Anzahl der CA ($CA < 5$) und molekularer *TP53*-Mutation mit 16 Monaten ([KI: 4 - NA], $N = 8$). Die schlechteste Prognose hatten Patienten mit hoher Anzahl der CA ($CA \geq 5$) und einer *TP53*-Mutation mit nur 8 Monaten med. OS ([KI: 6 - 16], $N = 53$; $p = 0,013$, siehe Abbildung 33). Obwohl das med. OS der Patienten mit fünf oder mehr CA und einer molekularen *TP53*-Mutation damit nur halb so lang wie das der Patienten mit weniger als fünf CA und molekularer *TP53*-Mutation, zeigte sich im Vergleich der Gruppen keine Signifikanz ($p = 0,444$, siehe Abbildung 34A). Allerdings war die Gruppe der Patienten mit weniger als fünf CA und molekularer *TP53*-Mutation sehr klein ($N = 8$). Es ergab sich ebenso kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit fünf und mehr CA in Abhängigkeit vom *TP53*-Mutationsstatus trotz eines deutlich längerem med. OS der Patienten mit fünf oder mehr CA ohne Mutation des *TP53* mit 18 Monaten ($p = 0,196$, siehe Abbildung 34B).

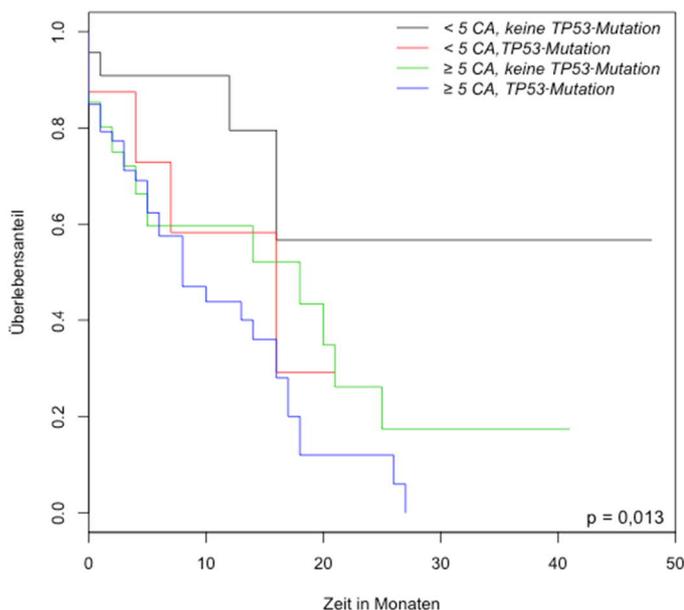


Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit von einer molekularen *TP53*-Mutation und einem Grenzwert von fünf CA.

Med. OS: $CA < 5$, keine *TP53*-Mutation: nicht erreicht [KI: 5 - NA], $N = 23$ vs. $CA < 5$, molekulare *TP53*-Mutation: 16 Monate [KI: 4 - NA], $N = 8$ vs. $CA \geq 5$, keine *TP53*-Mutation: 18 Monate [KI: 5 - NA], $N = 41$ vs. $CA \geq 5$, molekulare *TP53*-Mutation: 8 Monate [KI: 6 - 16], $N = 53$; $p = 0,013$

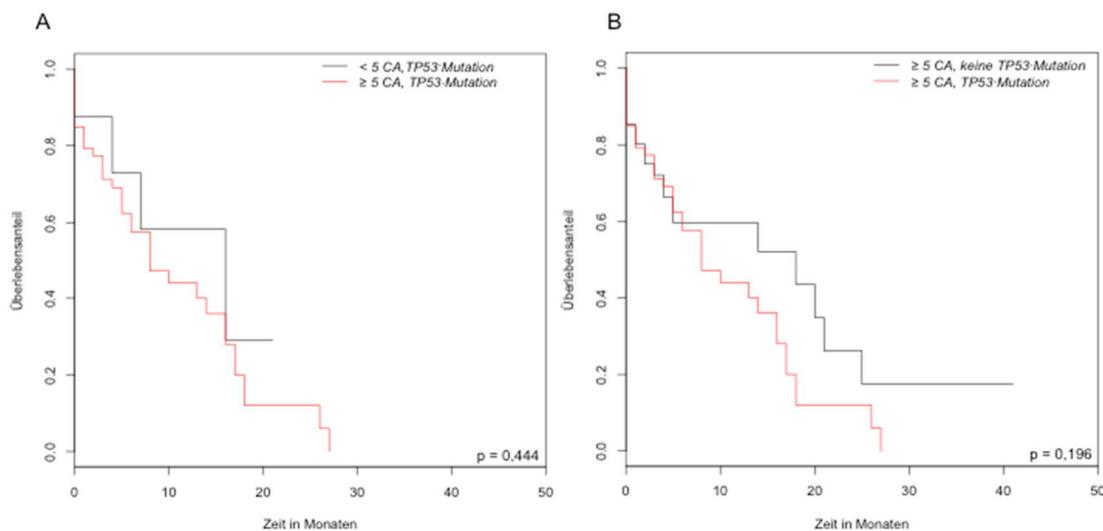


Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurven von einzelnen Gruppen in Abhängigkeit von einer molekularen *TP53*-Mutation und einem Grenzwert von fünf CA.

A. Patienten mit molekularer *TP53*-Mutation und ≥ 5 CA vs. < 5 CA; $p = 0,444$, B. Patienten mit ≥ 5 CA und molekularer *TP53*-Mutation vs. keine *TP53*-Mutation; $p = 0,196$

Wurden alle Veränderungen des *TP53* einbezogen, zeigte sich ein ähnliches Bild: Patienten mit weniger als fünf CA und ohne *TP53*-Veränderung hatten die beste Prognose mit einem med. OS, das nicht erreicht wurde ([KI: 16 - NA], $N = 21$). Die schlechteste Prognose zeigten Patienten mit fünf oder mehr CA und einer Veränderung im *TP53* mit einem med. OS von acht Monaten ([KI: 5 - 14], $N = 68$). Patienten mit *TP53*-Veränderung und fünf oder mehr CA hatten zwar ein kürzeres med. OS im Vergleich zu Patienten mit weniger als fünf CA (≥ 5 CA, *TP53* verändert: 8 Monate [KI: 5 - 14], $N = 68$ vs. < 5 CA, *TP53* verändert: 16 Monate [KI: 7 - NA], $N = 10$), allerdings erreichte dieser Unterschied keine Signifikanz ($p = 0,184$, siehe Abbildung 35B). Ein Grund dafür könnte die geringe Größe der Gruppe mit *TP53*-Veränderung und weniger als fünf CA sein ($N = 10$). Dagegen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit hoher Anzahl der CA ($CA \geq 5$) in Abhängigkeit von den *TP53*-Veränderungen (med. OS: ≥ 5 CA, *TP53*-Wildtyp: 20 Monate [KI: 18 - NA], $N = 26$ vs. ≥ 5 CA, *TP53* verändert: 8 Monate [KI: 5 - 14], $N = 68$; $p = 0,003$; siehe Abbildung 35C). Für Patienten mit geringer Anzahl der CA ($CA < 5$) ergab sich kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von den *TP53*-Veränderungen: med. OS: < 5 CA, *TP53*-Wildtyp: NA [KI: 16 - NA], $N = 21$ vs. < 5 CA, *TP53* verändert: 16 Monate [KI: 7 - NA], $N = 10$; $p = 0,226$, siehe Abbildung 35D). Allerdings waren auch hier die Gruppengrößen sehr klein.

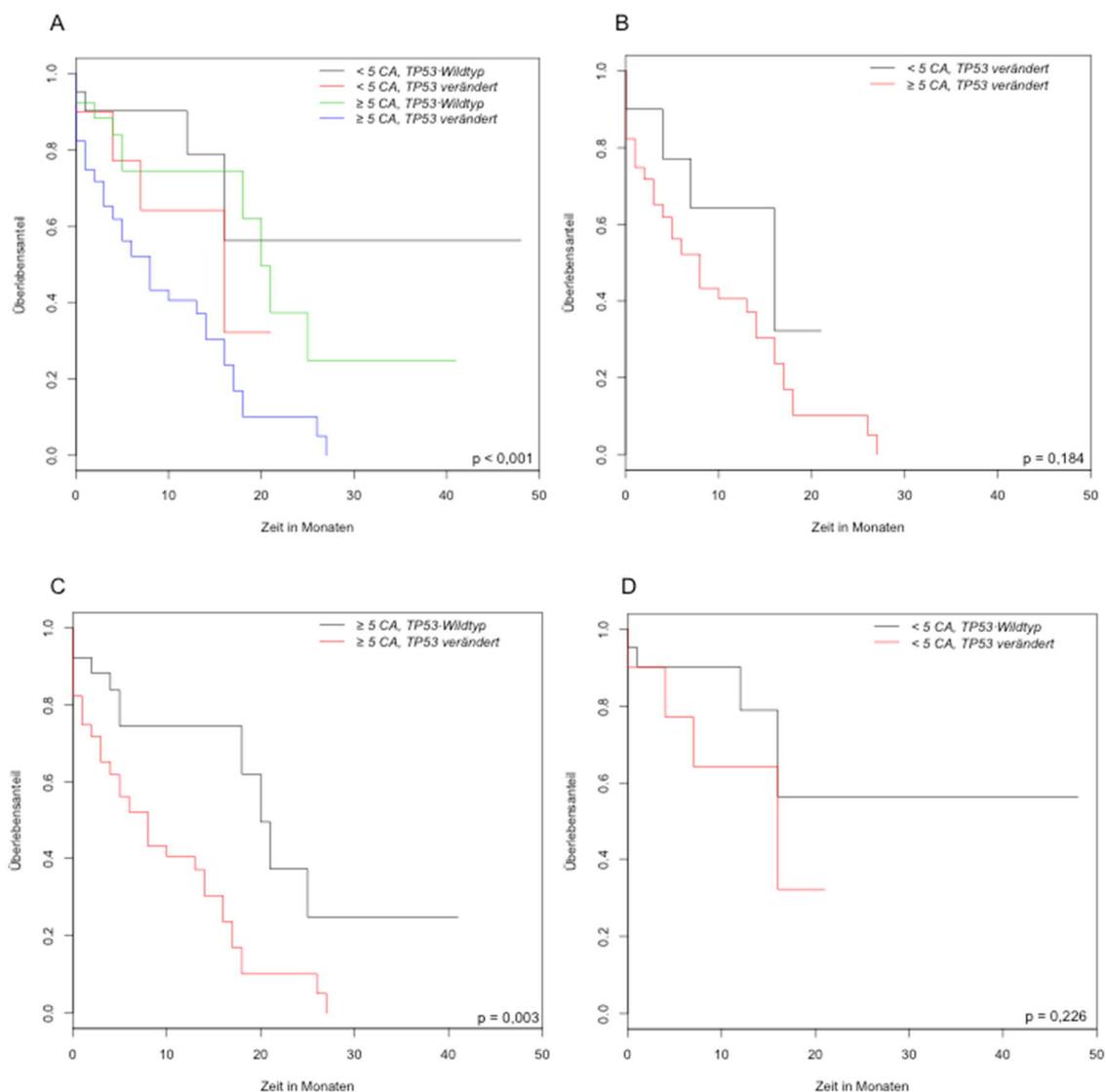


Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit von kombinierten *TP53*-Veränderungen und einem Grenzwert von fünf CA.

A. alle Gruppen, med. OS: < 5 CA, *TP53*-Wildtyp: NA [KI: 16 - NA], N = 21 vs. < 5 CA, *TP53* verändert: 16 Monate [KI: 7 - NA], N = 10 vs. ≥ 5 CA, *TP53*-Wildtyp: 20 Monate [KI: 18 - NA], N = 26 vs. ≥ 5 CA, *TP53* verändert: 8 Monate [KI: 5 - 14], N = 68; B. *TP53* verändert, < 5 CA vs. ≥ 5 CA; $p = 0,184$; C. ≥ 5 CA, *TP53* verändert vs. *TP53*-Wildtyp; $p = 0,003$; D. < 5 CA, *TP53* verändert vs. *TP53*-Wildtyp; $p = 0,226$

3.4.6 Gesamtüberleben von Patienten in Abhängigkeit vom monosomalen Karyotyp (mK)

Ein mK (siehe 2.2.1.2) wurde bei 80/125 Patienten (64,0 %) gefunden. Bei Patienten mit mK lag eine signifikant höhere Anzahl der CA vor als bei Patienten ohne mK: Median: 10 [range: 3 - 26], N = 80 vs. 5 [3 - 46], N = 45; $p = 0,001$ (siehe Abbildung 36).

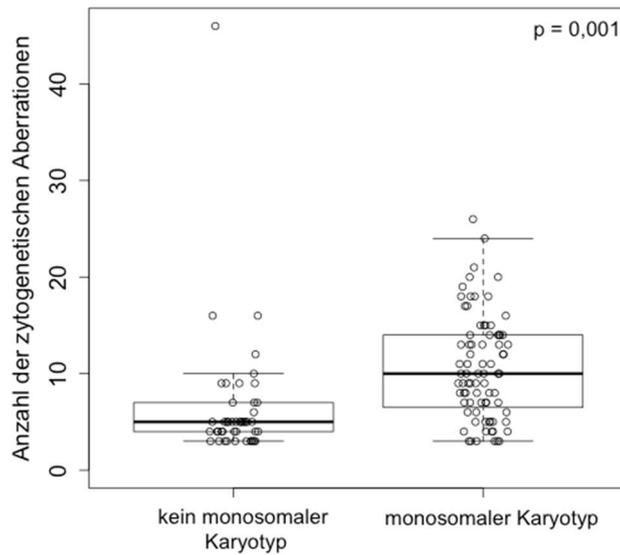


Abbildung 36: Anzahl der CA in Abhängigkeit vom mK.

MK: Median: 10 [range: 3 - 26], N = 80 vs. kein mK: 5 [3 - 46], N = 45; $p = 0,001$

Weiterhin hatten Patienten mit einem mK ein signifikant kürzeres med. OS mit 8 Monaten, [KI: 5 - 17], (N = 80) im Vergleich zu Patienten ohne mK (16 Monate, [KI: 14 - NA], N = 45) (siehe Abbildung 37).

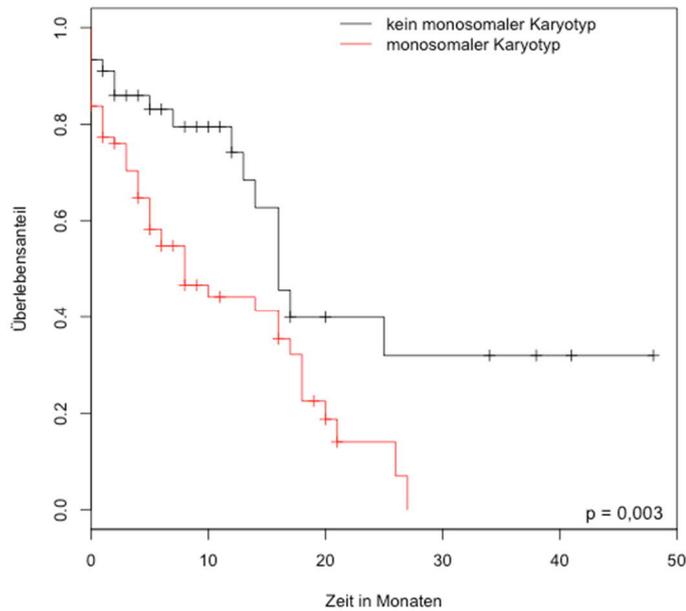


Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten in Abhängigkeit vom mK.

MK: med. OS: 8 Monate [KI: 5 - 17], N = 80 vs. kein mK 16 Monate [KI: 14 - NA], N = 45; $p = 0,003$

Insgesamt wiesen 80/125 Patienten (64 %) der gesamten Kohorte einen mK auf. In der Gruppe der Patienten mit molekularer *TP53*-Mutation fand sich ein mK bei 47/61 Patienten (77,0 %). Bei Patienten ohne molekulare *TP53*-Mutation war dieser Anteil mit 33/64 Patienten (51,6 %) signifikant geringer ($p = 0,003$). Das mediane Gesamtüberleben für Patienten, die keine *TP53*-Mutation und auch keinen mK aufwiesen, betrug 25 Monate und war signifikant länger als das der anderen Gruppen ($p < 0,001$ für alle) (siehe Abbildung 38).

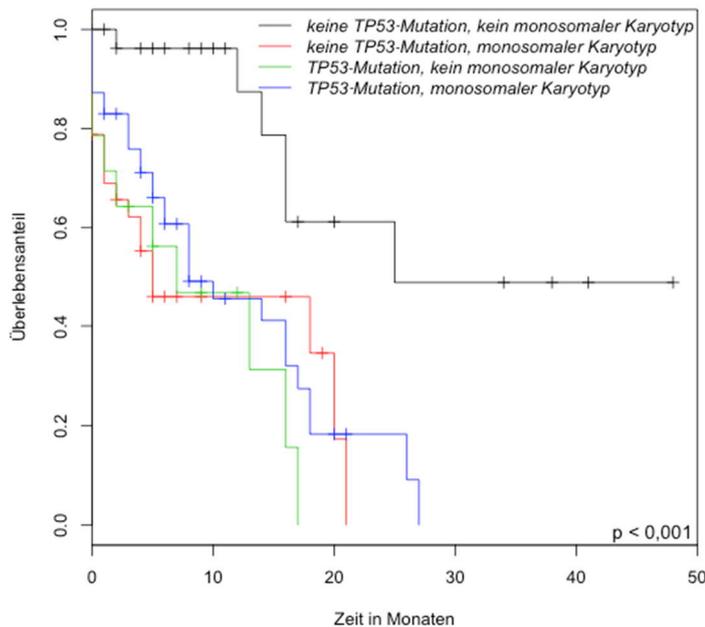


Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten in Abhängigkeit vom mK und molekularer *TP53*-Mutation.

Keine *TP53*-Mutation, kein mK: med. OS: 25 Monate [KI: 16 - NA], N = 31 vs. keine *TP53*-Mutation, mK: 5 Monate [KI: 3 - NA], N = 33 vs. *TP53*-Mutation, kein mK: 7 Monate [KI: 2 - NA], N = 14 vs. *TP53*-Mutation, mK: 8 Monaten [KI: 6 - 18], N = 47; $p < 0,001$

Die einzelnen Gruppen unterschieden sich auch hinsichtlich der Anzahl der CA, wobei bei Patienten mit mK signifikant mehr CA vorlagen als bei Patienten ohne mK, unabhängig von der molekularen *TP53*-Mutation (siehe Abbildung 39).

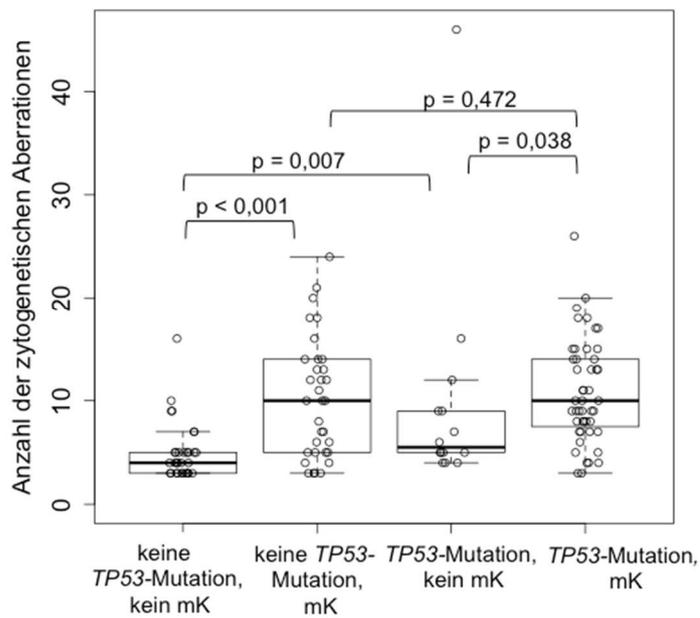


Abbildung 39: Anzahl der CA in Abhängigkeit vom mK und molekularer *TP53*-Mutation. Keine *TP53*-Mutation, kein mK: Median: 4 [range: 3 - 16] vs. keine *TP53*-Mutation, mK: 10 [3 - 24] vs. *TP53*-Mutation, kein mK 5,5 [4 - 46] vs. *TP53*-Mutation, mK: 10 [3 - 26]

Bei Patienten ohne molekulare *TP53*-Mutation zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil, wenn kein mK vorhanden war, mit einem med. OS von 25 Monate ([KI: 16 - NA], N = 31) vs. 5 Monate ([KI: 3 - NA], N = 33, $p < 0,001$) (siehe Abbildung 40A). Anders war dies bei Patienten, bei denen eine *TP53*-Mutation vorlag: med. OS 7 Monate ([KI: 2 - NA], N = 14) ohne Vorhandensein eines mK und 8 Monaten ([KI: 6 - 18], N = 47) bei Vorhandensein eines mK ($p = 0,256$) (siehe Abbildung 40B).

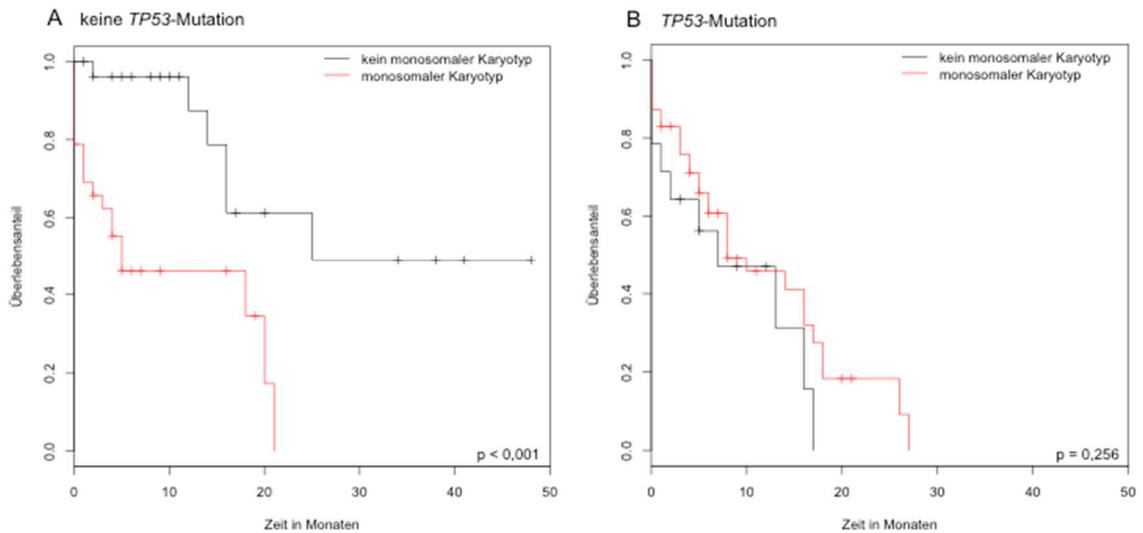


Abbildung 40: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne molekulare *TP53*-Mutation in Abhängigkeit vom mK.

A. keine *TP53*-Mutation, kein mK: med. OS: 25 Monate [KI: 16 - NA], N = 31 vs. mK: 5 Monate [KI: 3 - NA], N=33; $p < 0,001$ B. *TP53*-Mutation, kein mK: 7 Monate [KI: 2 - NA], N = 14 vs. mK: 8 Monate [KI: 6 - 18], N = 47; $p = 0,256$

Lag kein mK bei Patienten vor, ergab sich ein Überlebensvorteil für Patienten ohne *TP53*-Mutation mit einem med. OS von 25 Monaten ([KI: 16 - NA], N = 31) gegenüber einem med. OS von 7 Monaten ([KI: 2 - NA], N = 14) bei Vorliegen einer *TP53*-Mutation ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 41A). Bei Vorliegen eines mK zeigte sich dieser Überlebensvorteil nicht (nicht mutiert: med. OS 5 Monate [KI: 3 - NA], N = 33 vs. mutiert: 8 Monate [KI: 6 - 18], N = 47; $p = 0,416$) (siehe Abbildung 41B).

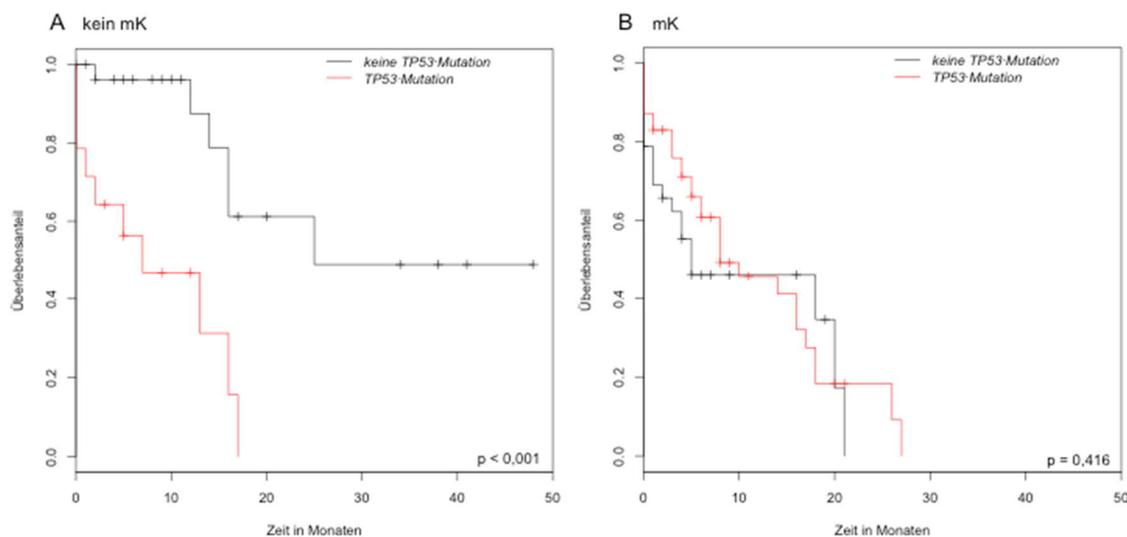


Abbildung 41: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne mK in Abhängigkeit vom molekularen *TP53*-Mutationsstatus.

A. kein mK, nicht mutiert: med. OS: 25 Monate [KI: 16- NA], N = 31 vs. nicht mutiert: 7 Monate [KI: 2 - NA], N = 14; $p < 0,001$ B. mK, nicht mutiert: med. OS: 5 Monate [KI: 3 - NA], N = 33 vs. mutiert: 8 Monate [KI: 6 - 18], N = 47; $p = 0,416$

Ebenso war der Anteil von Patienten mit mK in der Patientengruppe ohne jegliche *TP53*-Veränderung (19/47 Patienten, 40,4 %) signifikant geringer im Vergleich zu der Patientengruppe mit *TP53*-Veränderung (61/78 Patienten, 78,2 %, $p < 0,001$), wenn alle *TP53*-Veränderungen (molekulare *TP53*-Mutation und/oder del(17p)/CN-LOH) betrachtet wurden.

Das med. OS für Patienten ohne *TP53*-Veränderung und ohne mK wurde nicht erreicht und war hochsignifikant länger als das aller anderen Gruppen ($p < 0,001$ für alle) (siehe Abbildung 42).

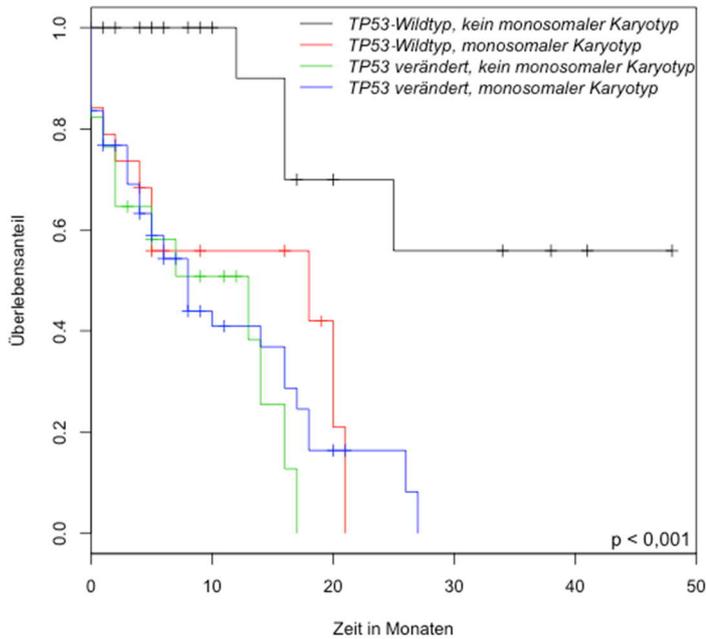


Abbildung 42: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten in Abhängigkeit vom mK und *TP53*-Veränderungen.

TP53-Wildtyp, kein mK: med. OS: NA [KI: 16 - NA], N = 28 vs. *TP53*-Wildtyp, mK: 18 Monate [KI: 5 - NA], N = 19 vs. *TP53* verändert, kein mK: 13 Monate [KI: 2 - NA], N = 17 vs. *TP53* verändert, mK: 8 Monaten [KI: 5 - 16], N = 61; $p < 0,001$

Auch hier zeigte sich eine signifikant geringere mediane Anzahl der CA in den Gruppen ohne mK im Vergleich zu Patienten mit mK unabhängig von *TP53*-Veränderungen (siehe Abbildung 43).

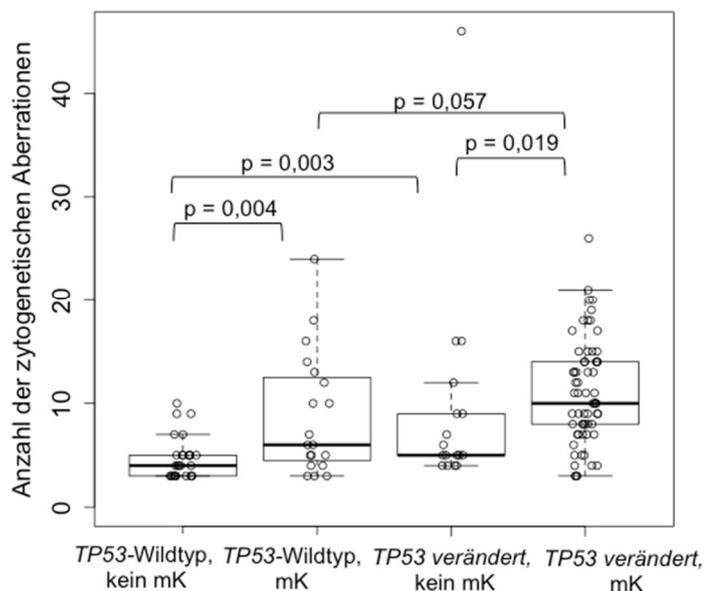


Abbildung 43: Anzahl der CA in Abhängigkeit vom mK und allen *TP53*-Veränderungen.

TP53-Wildtyp, kein mK: Median: 4 [range: 3 - 10] vs. *TP53*-Wildtyp, mK: 6 [3 - 24] vs. *TP53* verändert, kein mK 5 [4 - 46] vs. *TP53* verändert mK: 10 [3 - 26]

Für Patienten ohne mK ergab sich ein signifikant längeres med. OS (nicht erreicht [KI: 16 - NA], N = 28) als für Patienten mit mK bei gleichzeitigem Vorliegen eines *TP53*-Wildtyps (18 Monate [KI: 5 - NA], N = 19; $p < 0,001$) (siehe Abbildung 44A). Analog dazu fand sich kein längeres med. OS bei Patienten mit Veränderung des *TP53* in Abhängigkeit vom mK: *TP53* verändert, kein mK: 13 Monate [KI: 2 - NA], N = 17 vs. *TP53* verändert, mK: 8 Monate [KI: 5 - 16], N = 61; $p = 0,515$ (siehe Abbildung 44B).

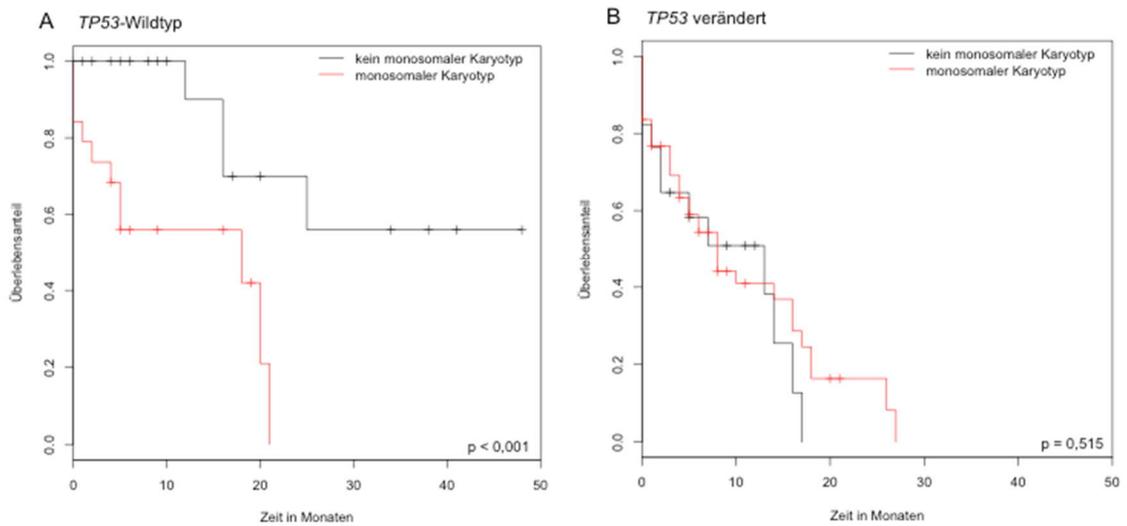


Abbildung 44: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne *TP53*-Veränderung in Abhängigkeit vom mK.

A. *TP53*-Wildtyp, kein mK: med. OS: nicht erreicht [KI: 16 - NA], N = 28 vs. mK: 18 Monate [KI: 5 - NA], N = 19; $p < 0,001$ B. *TP53* verändert, kein mK: 13 Monate [KI: 2 - NA], N = 17 vs. mK: 8 Monate [KI: 5 - 16], N = 61; $p = 0,515$

Weiterhin zeigte sich ein Überlebensvorteil in der Gruppe von Patienten ohne mK und ohne Veränderung des *TP53*. Das med. OS wurde nicht erreicht ([KI: 16 - NA], N = 19). Dies war im Vergleich zu Patienten ohne mK und mit Veränderung des *TP53* signifikant länger: 13 Monate [KI: 2 - NA], N = 17; $p < 0,001$ (siehe Abbildung 45A). Lag ein mK vor, ergab sich zwar ein längeres med. OS mit 18 Monaten ([KI: 5 - NA], N = 19) bei Vorliegen eines *TP53*-Wildtyps im Vergleich zu 8 Monaten ([KI: 5 - 16], N = 61) bei verändertem *TP53*, allerdings ergab sich hier keine Signifikanz (siehe Abbildung 45B).

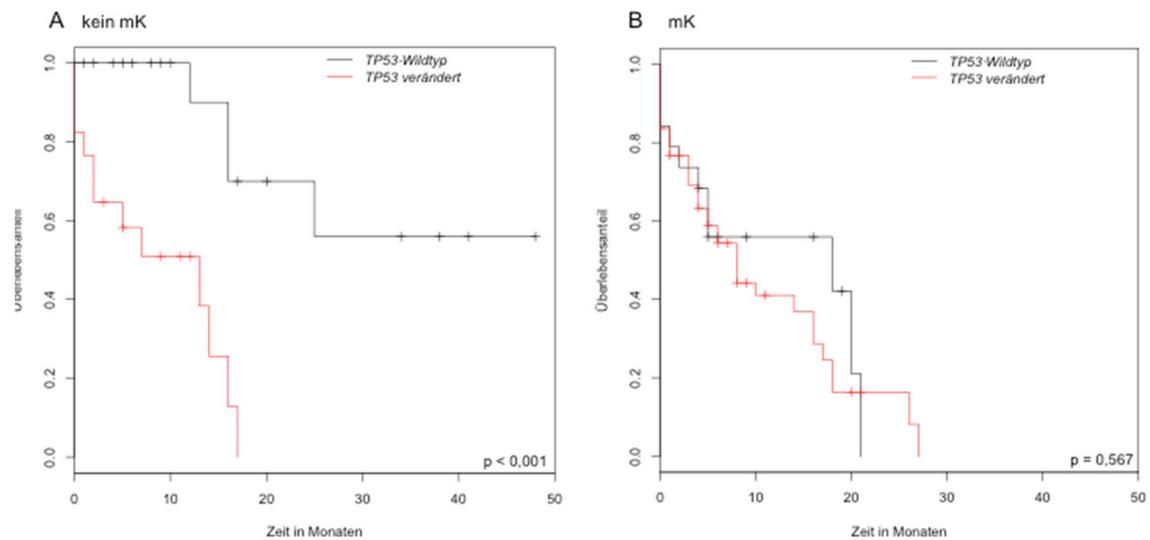


Abbildung 45: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne mK in Abhängigkeit von den *TP53*-Veränderungen.

A. kein mK, *TP53*-Wildtyp: med. OS nicht erreicht [KI: 16 - NA], N = 28 vs. *TP53* verändert: 13 Monate [KI: 2 - NA], N = 17; $p < 0,001$ B. mK, *TP53*-Wildtyp: med. OS 18 Monate [KI: 5 - NA], N=19 vs. *TP53* verändert: 8 Monate [KI: 5 - 16], N = 61; $p = 0,567$

3.4.7 Gesamtüberleben von Patienten in Abhängigkeit von der Therapie mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren

In unserer Kohorte konnte für 113 Patienten eruiert werden, ob sie eine Therapie mit DNA-Methyltransferase-Inhibitor (DMTI, Azacitidin) erhalten hatten. Für 69/113 Patienten (61,1 %) war dies der Fall. Patienten, die eine Therapie mit einem DMTI erhalten hatten, unterschieden sich nicht hinsichtlich der klinischen Parameter, welche bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps erhoben wurden, im Vergleich zu Patienten, die keine Therapie mit DMTI erhalten hatten (siehe Abbildung 46). Leider lagen diese Informationen nicht für alle Patienten vor.

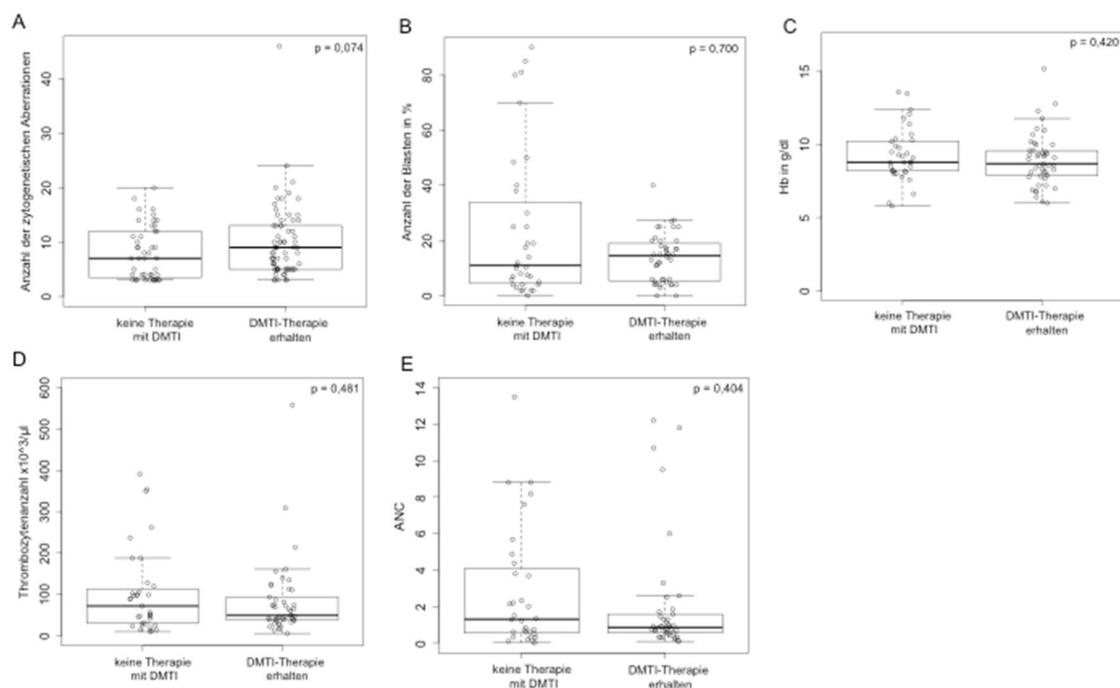


Abbildung 46: Vergleich der klinischen Parameter bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps bei Patienten mit und ohne DMTI-Therapie.

A. Anzahl der CA: keine Therapie mit DMTI: Median: 7 [range: 3 - 20], N = 44 vs. DMTI-Therapie 9 [3 - 46], N = 69; $p = 0,074$; B. Anzahl der Blasten im Knochenmark: keine Therapie mit DMTI: 11 % [0-90], N = 35 vs. DMTI-Therapie 14,5 % [0 - 40], N = 44; $p = 0,700$; C. Hämoglobinlevel: keine Therapie mit DMTI: 8,8 g/dl [5,8 - 13,6], N = 37 vs. DMTI-Therapie 8,9g/dl [6 - 15,2], N = 48; $p = 0,420$; D. Thrombozytenanzahl: keine Therapie mit DMTI: $72,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ [10 - 391], N = 35 vs. DMTI-Therapie $49,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ [5,7 - 558], N = 46; $p = 0,481$; E. Absolute Neutrophilenzahl (ANC): keine Therapie mit DMTI: 1,3 [0 - 13,5], N = 27 vs. DMTI-Therapie 0,9 [0,1 - 12,2], N = 36; $p = 0,404$

Das med. OS für Patienten, die mit einem DMTI behandelt wurden, zeigte sich in der Überlebensanalyse mit 16 Monaten [KI: 14 - 18] dreifach so lang wie dies der Patienten, die keinen DMTI erhalten hatten (5 Monate [KI: 2 - NA]). Allerdings wurde hier keine Signifikanz erreicht: $p = 0,098$ (siehe Abbildung 47).

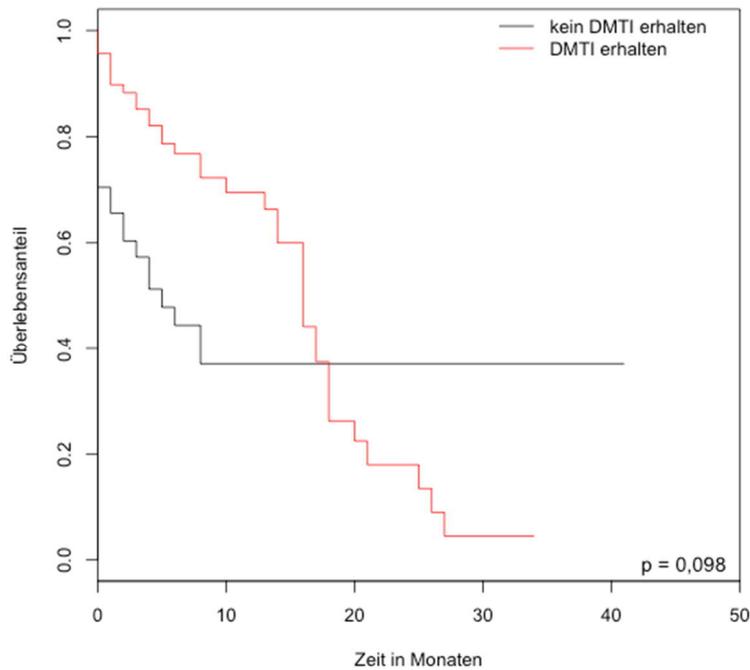


Abbildung 47: Kaplan-Meier-Kurve der Patienten in Abhängigkeit von der Therapie mit DMTI.

Therapie mit DMTI: med. OS 16 Monate [KI: 14 - 18], $N = 69$ vs. keine Therapie mit DMTI: 5 Monate [KI: 2 - NA], $N = 44$; $p = 0,098$

Wurden molekulare *TP53*-Mutationen bei der Analyse berücksichtigt, zeigte sich ein signifikant besseres Überleben für Patienten mit *TP53*-Mutation, welche auch mit DMTI behandelt wurden mit einem med. OS von 16 Monaten ([KI: 13 - 18], N = 36) im Vergleich zu Patienten ohne Therapie mit DMTI mit einem med. OS von 3 Monaten ([KI: 0 - NA], N = 20; $p = 0,001$) (siehe Abbildung 48A). Patienten ohne *TP53*-Mutation dagegen zeigten keinen signifikanten Überlebensvorteil, wenn auch eine Therapie mit DMTI durchgeführt wurde: 18 Monate [KI: 14 - NA], N = 33 vs. nicht erreicht [KI: 2 - NA], N = 24; $p = 0,91$ (siehe Abbildung 48B).

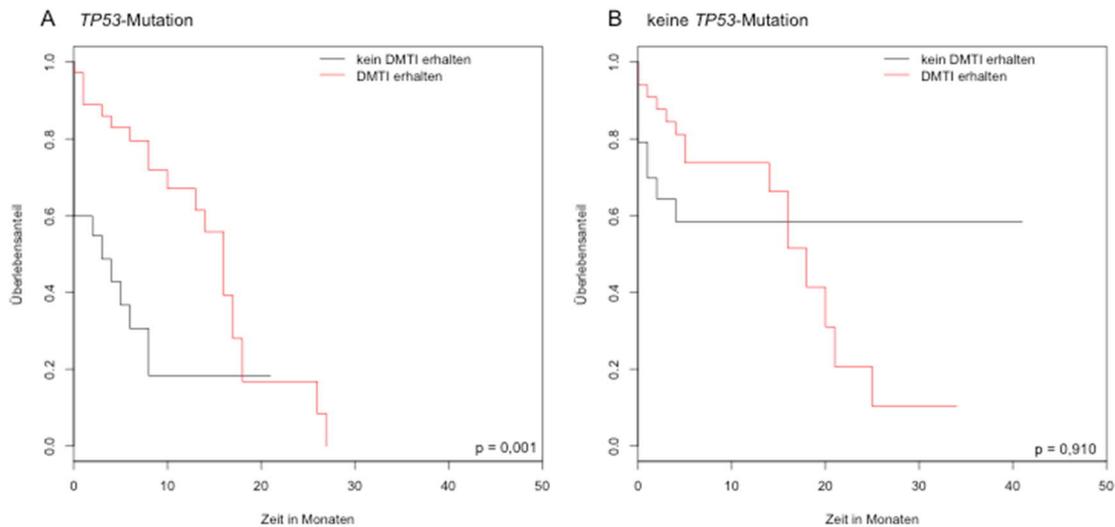


Abbildung 48: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne molekulare *TP53*-Mutation in Abhängigkeit von der DMTI-Therapie.

A. molekulare *TP53*-Mutation, DMTI erhalten: med. OS 16 Monate [KI: 13 - 18], N = 36 vs. kein DMTI erhalten: 3 Monate [KI: 0 - NA], N = 20; $p = 0,001$; B. keine molekulare *TP53*-Mutation mit und ohne DMTI-Therapie, ohne DMTI-Therapie: med. OS 18 Monate [KI: 14 - NA], N = 33 vs. mit DMTI-Therapie: nicht erreicht [KI: 2 - NA], N = 24; $p = 0,910$

Patienten, die mit DMTI behandelt wurden, zeigten kein signifikant kürzeres med. OS bei Vorhandensein einer *TP53*-Mutation: 16 Monate [KI: 13 - 18], N = 36 vs. 18 Monate [KI: 14 - NA], N = 33; $p = 0,510$ (siehe Abbildung 49A). Patienten dagegen, welche keine Therapie mit DMTI erhielten, unterschieden sich anhand des *TP53*-Mutationsstatus: Patienten mit *TP53*-Mutation hatten ein kürzeres, aber nicht signifikant kürzeres med. OS (3 Monate [KI: 0 - NA], N = 20) im Vergleich zu Patienten ohne *TP53*-Mutation (med. OS nicht erreicht [KI: 2 - NA], N = 24; $p = 0,053$; siehe Abbildung 49B).

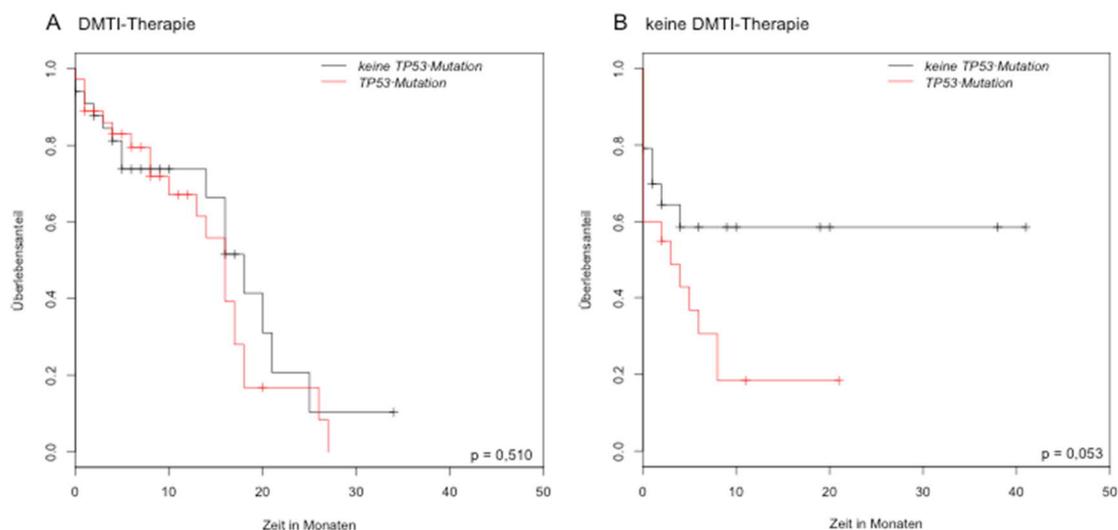


Abbildung 49: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne DMTI-Therapie in Abhängigkeit von molekularen *TP53*-Mutationen.

A. DMTI-Therapie erhalten, *TP53*-Mutation: med. OS 16 Monate [KI: 13 - 18], N = 36 vs. keine *TP53*-Mutation: 18 Monate [KI: 14 - NA], N = 33; $p = 0,510$; B. keine DMTI-Therapie erhalten, *TP53*-Mutation: med. OS 3 Monate [KI: 0 - NA], N = 20 vs. keine *TP53*-Mutation: NA [KI: 2 - NA], N = 24; $p = 0,053$

Wurden alle Veränderungen des *TP53* (molekulare *TP53*-Mutation und/oder del(17p)/CN-LOH) einbezogen, ergab sich, wie für die molekulare *TP53*-Mutation allein, ein signifikant längeres med. OS für Patienten, welche eine Veränderung des *TP53* vorwiesen und mit DMTI behandelt wurden: 14 Monate [KI: 10 - 17], N = 44 vs. 3 Monate [KI: 0 - 8], N = 28; $p = 0,002$ (siehe Abbildung 50A). Patienten ohne verändertes *TP53* dagegen zeigten auch hier keinen signifikanten Überlebensvorteil, wenn eine Therapie mit DMTI durchgeführt wurde: 20 Monate [KI: 16 - NA], N = 25 vs. nicht erreicht [KI: 4 - NA], N = 16; $p = 0,96$.

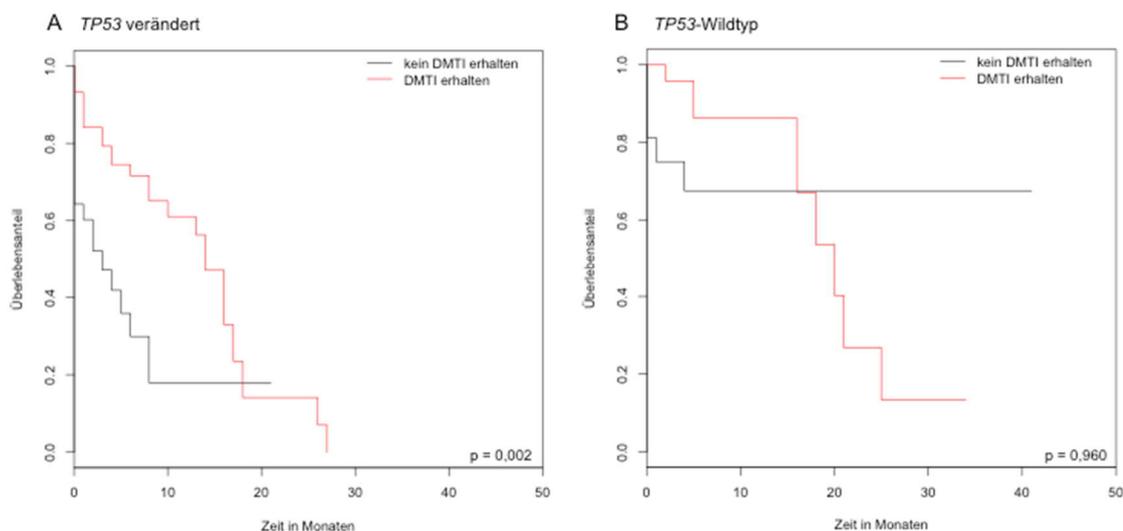


Abbildung 50: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne Veränderung im *TP53* in Abhängigkeit von der DMTI-Therapie.

A. *TP53* verändert, mit DMTI-Therapie: med. OS 14 Monate [KI: 10 - 17], N = 44 vs. ohne DMTI-Therapie: 3 Monate [KI: 0 - 8], N = 28; $p = 0,002$; B. *TP53*-Wildtyp: mit DMTI-Therapie: med. OS 20 Monate [KI: 16 - NA], N = 25 vs. ohne DMTI-Therapie: nicht erreicht [KI: 4 - NA], N = 16; $p = 0,960$

Im Gegensatz zum molekularen *TP53*-Mutationsstatus zeigten mit DMTI behandelte Patienten einen signifikanten Überlebensvorteil, wenn keine Veränderung des *TP53* vorhanden war: med. OS 20 Monate [KI: 16 - NA], N = 25 vs. 14 Monate [KI: 10 - 17], N = 44; $p = 0,024$ (siehe Abbildung 51A). Auch bei Patienten ohne Therapie mit DMTI ergab sich dieser signifikante Überlebensvorteil bei Vorliegen eines *TP53*-Wildtyps: med. OS nicht erreicht [KI: 4 - NA], N = 16 vs. 3 Monate [KI: 0 - 8], N = 28; $p = 0,016$ (siehe Abbildung 51B).

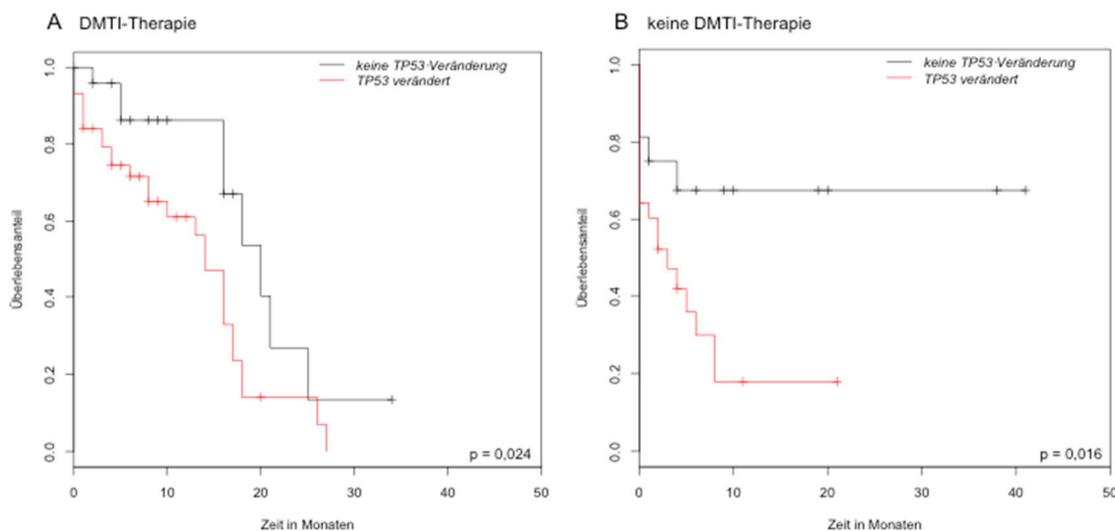


Abbildung 51: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit und ohne DMTI-Therapie in Abhängigkeit von *TP53*-Veränderungen.

A. mit DMTI-Therapie, *TP53*-Wildtyp: med. OS 20 Monate [KI: 16 - NA], N = 25 vs. *TP53* verändert: 14 Monate [KI: 10 - 17], N = 44; $p = 0,024$ B. ohne DMTI-Therapie, *TP53*-Wildtyp: med. OS nicht erreicht [KI: 4 - NA], N = 16 vs. *TP53* verändert: 3 Monate [KI: 0 - 8], N = 28; $p = 0,016$

3.4.8 Zusammenfassung

In der gesamten Kohorte zeigte sich ein med. OS von 14 Monaten [KI: 8 - 17]. Das med. OS war signifikant kürzer bei Vorhandensein einer Veränderung des *TP53*, unabhängig vom Typ der Veränderung (molekulare Mutation, zytogenetische Veränderung). Wurden die kombinierten *TP53*-Veränderungen betrachtet, fand sich zwar ein signifikant kürzeres med. OS der Patienten mit *TP53*-Veränderungen im Vergleich zu Patienten ohne jegliche Veränderung, aber kein verkürztes med. OS im Vergleich der Gruppen mit *TP53*-Veränderungen untereinander. Das med. OS sank mit zunehmender Anzahl der CA und bei hoher Anzahl der CA ($CA \geq 5$) zeigte sich ein signifikant kürzeres med. OS der Patienten mit *TP53*-Veränderung, nicht aber bei einer einzelnen molekularen *TP53*-Mutation. Patienten mit monosomalem Karyotyp hatten ein kürzeres med. OS, aber auch eine signifikant höhere mediane Anzahl der CA. Nur bei Patienten ohne monosomalen Karyotyp ergab sich ein signifikant kürzeres med. OS für Patienten mit *TP53*-Veränderung. Patienten, die mit DMTI behandelt wurden, unterschieden sich hinsichtlich klinischer Parameter nicht von Patienten, die keine Therapie mit DMTI erhalten hatten. Patienten mit *TP53*-Veränderung zeigten ein signifikant längeres med. OS, wenn sie eine Therapie mit DMTI erhalten hatten. Dies ergab sich nicht für Patienten ohne *TP53*-Veränderung.

3.5 Cox-Regressionsanalyse

Das Regressionsmodell wurde stufenweise entwickelt. Dabei wurden zunächst anhand einer univariaten Regressionsanalyse die Variablen für eine multivariate Cox-Regression ausgewählt. Nicht signifikante Parameter der univariaten Analyse wurden in der multivariaten Analyse nicht berücksichtigt. Aus den ausgewählten Parametern wurden mehrere Modelle entwickelt.

In der univariaten Analyse wurden alle in Tabelle 16 aufgeführten Parameter geprüft. Neben dem absoluten Alter wurde ein Grenzwert von 72 Jahren angenommen, weil dies dem medianen Alter der gesamten Kohorte entsprach. Die Blastenzahl und die Anzahl der Zytopenien wurden anhand unterschiedlicher Grenzwerte auf einen signifikanten Einfluss überprüft. Wegen fehlender Daten wurde die Anzahl der Blasten für 39 Patienten anhand des uns vorliegenden Subtyps nach WHO-Klassifikation 2008 abgeschätzt. Hierbei wurde für den Subtyp RCMD ein Wert von 2,5 % Blasten im Knochenmark bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps angenommen, 7,5 % für Patienten mit RAEB I, 15 % für Patienten mit RAEB II, und 27,5 % für Patienten mit sekundärer AML nach MDS. Dies entsprach dem Median der Blastenzahl aller Patienten mit sekundärer AML nach MDS. Aufgrund fehlender Angaben zum Subtyp nach WHO-Klassifikation 2008 konnte in vier Fällen keine Annäherung der Blastenzahl im KM bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps nach dieser Methode vorgenommen werden, weshalb diese Fälle in der multivariaten Analyse ausgeschlossen wurden. Das Hämoglobinlevel in g/dl bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps war für 17 Patienten unbekannt, sodass auch diese Patienten aus der multivariaten Analyse ausgeschlossen wurden.

Tabelle 16: Ergebnisse der univariaten Regressionsanalyse.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet. HR: *hazard ratio*, KI: 95 % Konfidenzintervall

	HR	KI	p-Wert
≥ 6 CA vs. < 6 CA	2,06	1,20 - 3,53	0,008 *; N = 125
≥ 5 CA vs. < 5 CA	2,76	1,36 - 5,60	0,005 *; N = 125
≥ 4 CA vs. < 4 CA	2,84	1,16 - 8,82	0,025 *; N = 125
Monosomaler Karyotyp	2,41	1,36 - 4,28	0,003 *; N = 125
Alter bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps	1,05	1,02 - 1,08	0,002 *; N = 125
Alter ≥ 72 Jahre (Median der Kohorte)	2,18	1,27 - 3,75	0,005 *; N = 125
Männliches Geschlecht	0,99	0,61 - 1,62	0,971; N = 125
Therapie mit DMTI: ja vs. nein	0,68	0,41 - 1,15	0,153; N = 113
<i>TP53</i> verändert (<i>TP53</i> -Mutation und/oder 17p-Deletion/ CN-LOH)	3,23	1,79 - 5,82	0,0001 *; N = 125
17p-Deletion/CN-LOH	1,99	1,21 - 3,28	0,007 *; N=125
<i>TP53</i> -Mutation	1,93	1,16 - 3,19	0,011 *; N = 125
Anzahl der Zytopenien nach Definition des IPSS (Hb < 10 g/dl; Thrombozyten < 100.000/ μ l; ANC < 1800/ μ l)	1,68	1,21 - 2,32	0,002 *; N = 109
Anzahl der absoluten Zytopenien (Hb ♂ < 13,5 g/dl, ♀ < 12 g/dl ; Thrombozyten < 150.000/ μ l, ANC < 1800/ μ l)	1,22	0,85 - 1,75	0,276; N = 109

	HR	KI	p-Wert
Zytopenien nach Definition des IPSS vorhanden: ja vs. nein	3,77	0,52 - 27,39	0,19; N = 109
Absolute Zytopenien vorhanden: ja vs. nein	1	1 - 1	NA; N = 109
Anämie gemäß der Definition des IPSS (Hb < 10 g/dl vs. ≥ 10g/dl)	3,23	1,57 - 6,66	0,001 *; N = 108
Hämoglobinlevel in g/dl zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps	0,84	0,75 - 0,95	0,005 *; N = 108
Anzahl der Blasten in % im KM zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps	1,02	1,00 - 1,03	0,016 *; N = 121
Blasten im KM > 5 % zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps	2,22	1,20 - 4,11	0,011 *; N = 121
Blasten im KM > 10 % zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps	1,83	1,07 - 3,11	0,026 *; N = 121
Blasten im KM > 20 % zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps	1,96	1,07 - 3,59	0,030 *; N = 121
Blasten im KM in % zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps eingeteilt in Gruppen nach IPSS (< 5; 5 - 10; 11 - 20; > 20)			N = 121
< 5 % vs. 5 - 10 % Blasten	2,68	1,13 - 6,38	0,026 *
< 5 % vs. 11 - 20 % Blasten	1,82	0,94 - 3,54	0,077
< 5 % vs. > 20 % Blasten	3,39	1,58 - 7,28	0,002 *

Parameter, die keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben in der univariaten Analyse zeigten, wurden bei der Auswahl für die multivariate Regressionsanalyse nicht berücksichtigt. Einen signifikanten Einfluss und ein hohes *hazard ratio* (HR) in der univariaten Regressionsanalyse hatten die Anzahl der zytogenetischen Aberrationen mit einem Grenzwert von vier, fünf und sechs zytogenetischen Aberrationen, das Vorliegen eines monosomalen Karyotyps, das Alter der Patienten bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps mit einem Grenzwert von 72 Jahren, die einzelnen Formen der *TP53*-Veränderungen sowie die Kombination der *TP53*-Veränderungen, die Anzahl der Zytopenien nach Definition des IPSS, die Anämie gemäß der Definition des IPSS

(Hb < 10 g/dl vs. \geq 10g/dl) und die Anzahl der Blasten im Knochenmark in % bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps mit unterschiedlichen Grenzwerten bzw. Gruppierungen. Die absolute Anzahl der Blasten im Knochenmark in % bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps sowie das Alter als absolute Zahl und das Hämoglobinlevel in g/dl bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps als absolute Zahl erlangten ebenso eine Signifikanz. Der Einfluss auf das Überleben der Patienten durch die Anzahl der Blasten im Knochenmark in % bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps sowie das Alter als absolute Zahl war mit den HR von 1,02 und 1,05 gering. Allerdings bezieht sich die Erhöhung des Sterberisikos auf die Zunahme des Alters um ein Jahr bzw. die Zunahme der Blastenzahl im Knochenmark um 1 % bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps. Dies gilt ebenso für das Hämoglobinlevel in g/dl zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps: Eine Zunahme um 1 g/dl war mit einer signifikanten Senkung des Sterberisikos verbunden (HR = 0,84). Dies gilt aber auch für die Gruppierung der Blastenzahl in % zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps anhand des IPSS oder IPSS-R. Eine Eingruppierung in die nächst höhere Gruppe mit höherer Blastenzahl ist mit einer signifikanten Zunahme des Sterberisikos verbunden (HR = 1,39 bzw. 1,38). Der Vergleich der einzelnen Gruppen mit höherer Blastenzahl jeweils zur Gruppe mit der niedrigsten Blastenzahl, im IPSS < 5 % Blasten entsprechend, zeigte ein deutlich höheres Sterberisiko bei höherer Blastenzahl. Es wurden zwei Werte für die Unterteilung nach dem IPSS signifikant. Eine entsprechende Einteilung nach dem IPSS-R wurde nicht vorgenommen, da es sich um überwiegend ältere Daten handelt, bei denen keine Angaben zur detaillierten Blastenzahl vorliegen, und daher eine Unterscheidung in die Gruppen \leq 2 % Blasten und $> 2 - < 5$ % Blasten nicht vorgenommen werden konnte.

Der Einfluss auf das Überleben durch die molekulare *TP53*-Mutation (HR = 1,93) und durch die zytogenetischen *TP53*-Veränderungen (HR = 1,99) waren deutlich geringer als der Einfluss durch die Kombination der *TP53*-Veränderungen (HR = 3,23).

In die multivariate Analyse wurden alle 105 Datensätze einbezogen, bei denen Daten zur Blastenzahl und zum Hämoglobinlevel bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps vorlagen. Folgende Parameter wurden in die Entwicklung des multivariaten Modells einbezogen:

- das Alter mit einem Grenzwert von 72 Jahren,
- die Anzahl der Blasten in % zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps, eingeteilt in Gruppen nach IPSS (< 5; 5 - 10; 11 - 20; > 20) bzw. mit einem Grenzwert von 20 %
- die Kombination der *TP53*-Veränderungen sowie die molekulare *TP53*-Mutation und die zytogenetische *TP53*-Veränderung einzeln,
- die Anzahl der CA mit einem Grenzwert von fünf CA
- und das Vorhandensein einer Anämie gemäß der Definition des IPSS

Bei der Auswahl der Variabel für das Alter und die Blastenzahl wurden die gruppierten Variablen vorgezogen, da sich hier ein größerer Einfluss auf das Überleben zeigte. Eine

Einteilung der Blastenzahl in Gruppen analog zur Einteilung beim IPSS/IPSS-R erschien zudem sinnvoll, um gängige Prognosesysteme zu berücksichtigen. Da in der univariaten Analyse der Einfluss auf das Überleben und die Signifikanz bei der Gruppeneinteilung nach IPSS etwas höher waren und das Konfidenzintervall etwas kleiner, wurde dieser Parameter ausgewählt (HR = 1,39; $p = 0,007$; KI: 1,10 - 1,77 vs. HR = 1,38; $p = 0,020$; KI: 1,05 - 1,80). Da die Anämie gemäß der Definition des IPSS unter den oben getesteten Parametern zum Vorliegen von Zytopenien den größten und einen signifikanten Einfluss zeigte, wurde sie als weiterer Parameter für die multivariate Analyse ausgewählt. Die unterschiedlichen *TP53*-Veränderungen sowie die Anzahl der CA zeigten in der univariaten Analyse jeweils einen großen und signifikanten Einfluss auf das Überleben und wurden daher ausgewählt. Der Grenzwert für die Anzahl der CA wurde mithilfe der Kaplan-Meier-Kurven (siehe 3.4.5) und der univariaten Regressionsanalyse ausgewählt: Die höchste Signifikanz in der univariaten Analyse wurde bei einem Grenzwert von fünf CA erreicht ($p = 0,005$). Zudem waren beide Gruppen ausreichend groß ($N_{<5} = 31$ vs. $N_{\geq 5} = 94$) im Gegensatz zu einem Grenzwert von vier CA ($N_{<4} = 17$ vs. $N_{\geq 4} = 108$). Der monosomale Karyotyp dagegen wurde als Parameter in der multivariaten Analyse trotz einer hohen HR (HR = 2,31) und eines signifikanten Ergebnisses in der univariaten Analyse vernachlässigt, da in Kapitel 3.4.6 gezeigt werden konnte, dass ein monosomaler Karyotyp eng assoziiert ist mit einer hohen Anzahl der CA und insofern kein unabhängiger Parameter ist.

Aus den ausgewählten Parametern wurden zunächst zwei Modelle erstellt, wobei neben den anderen genannten Parametern im ersten Modell molekulare und zytogenetische *TP53*-Veränderungen einzeln (siehe Tabelle 17 und Abbildung 52) und im zweiten Modell die Kombination der *TP53*-Veränderungen betrachtet wurden (siehe Tabelle 18 und Abbildung 53).

Im ersten Modell (siehe Tabelle 17) war das Sterberisiko bei Vorhandensein von ≥ 5 CA größer (HR = 1,69) als das Risiko durch die *TP53*-Mutation (HR = 1,21) und durch eine zytogenetische *TP53*-Veränderung (HR = 1,39). Auch das Alter ≥ 72 Jahre (HR = 1,32) und eine höhere Blastenzahl (HR = 1,23) zeigten einen negativen, aber nicht signifikanten Einfluss auf das Überleben. Allerdings war das Sterberisiko nur bei Vorliegen einer Anämie gemäß der Definition des IPSS signifikant höher und zeigte den größten Einfluss (HR = 2,21; $p = 0,04$).

Tabelle 17: Modell 1: Multivariates Regressionsmodell unter Beachtung der molekularen und zytogenetischen *TP53*-Veränderungen.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

	HR	KI	p-Wert
Anämie gemäß der Definition des IPSS (Hb < 10 g/dl vs. ≥ 10 g/dl)	2,21	1,04 - 4,70	0,040 *
≥ 5 CA vs. < 5 CA	1,69	0,75 - 3,80	0,203
zytogenetische <i>TP53</i> -Veränderung: ja vs. nein	1,39	0,76 - 2,53	0,290
Alter ≥ 72 Jahre bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps vs. < 72 Jahre	1,32	0,72 - 2,43	0,373
Anzahl der Blasten in % im KM zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps eingeteilt in Gruppen nach IPSS (< 5; 5 - 10; 11 - 20; > 20)	1,23	0,94 - 1,62	0,131
molekulare <i>TP53</i> -Mutation: ja vs. nein	1,21	0,66 - 2,21	0,532

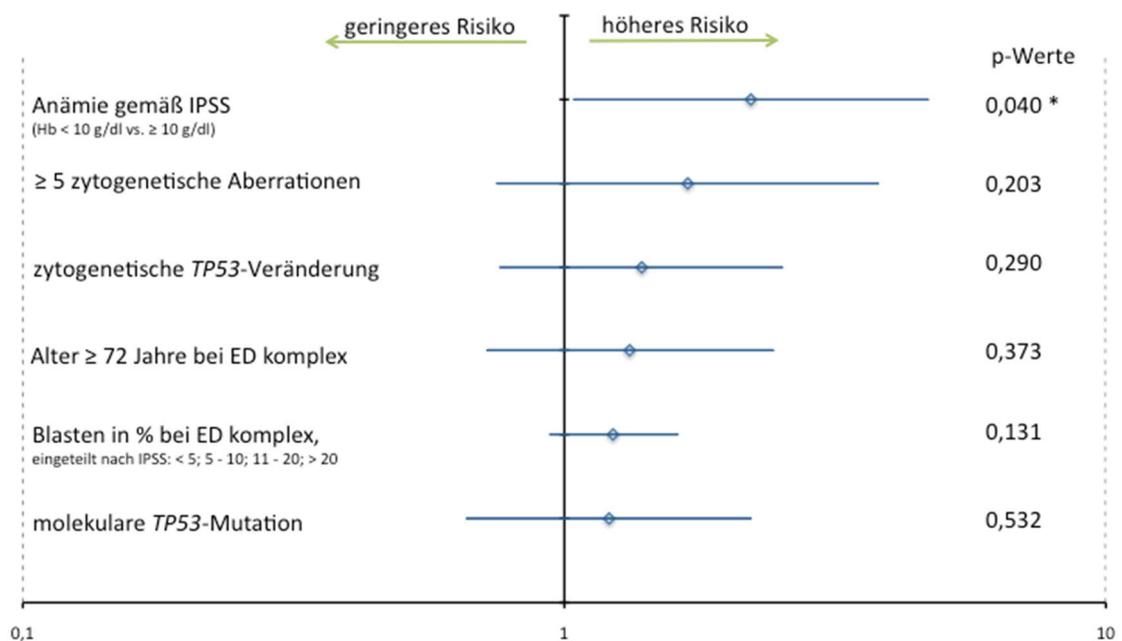


Abbildung 52: Darstellung des ersten Regressionsmodells als Forest Plot.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet. ED: Erstdiagnose

Im zweiten Modell (siehe Tabelle 18) war die Prognose durch das Vorhandensein einer *TP53*-Veränderung (HR = 2,23; $p = 0,017$) und einer Anämie gemäß der Definition des IPSS (HR = 2,18; $p = 0,046$) signifikant eingeschränkt. Auch die Anzahl der CA zeigte einen großen Einfluss auf das Überleben (HR = 1,44), das Ergebnis erlangte aber keine Signifikanz. Ähnlich wie im ersten Modell hatten auch das Alter ≥ 72 Jahre (HR = 1,22) und eine höhere Blastenzahl (HR = 1,24) einen negativen aber prognostischen Einfluss, ohne ein signifikantes Ergebnis zu erlangen.

Tabelle 18: Modell 2: Multivariates Regressionsmodell unter Beachtung der kombinierten *TP53*-Veränderungen.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

	HR	KI	p-Wert
<i>TP53</i> verändert (<i>TP53</i> -Mutation und/oder 17p-Deletion/ CN-LOH)	2,23	1,15 - 4,3	0,017 *
Anämie gemäß der Definition des IPSS (Hb < 10 g/dl vs. ≥ 10 g/dl)	2,18	1,01 - 4,68	0,046 *
≥ 5 CA vs. < 5 CA	1,44	0,65 - 3,18	0,375
Anzahl der Blasten in % im KM zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps eingeteilt in Gruppen nach IPSS (< 5; 5 - 10; 11 - 20; > 20)	1,24	0,95 - 1,63	0,113
Alter ≥ 72 Jahre bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps vs. < 72 Jahre	1,22	0,66 - 2,24	0,532

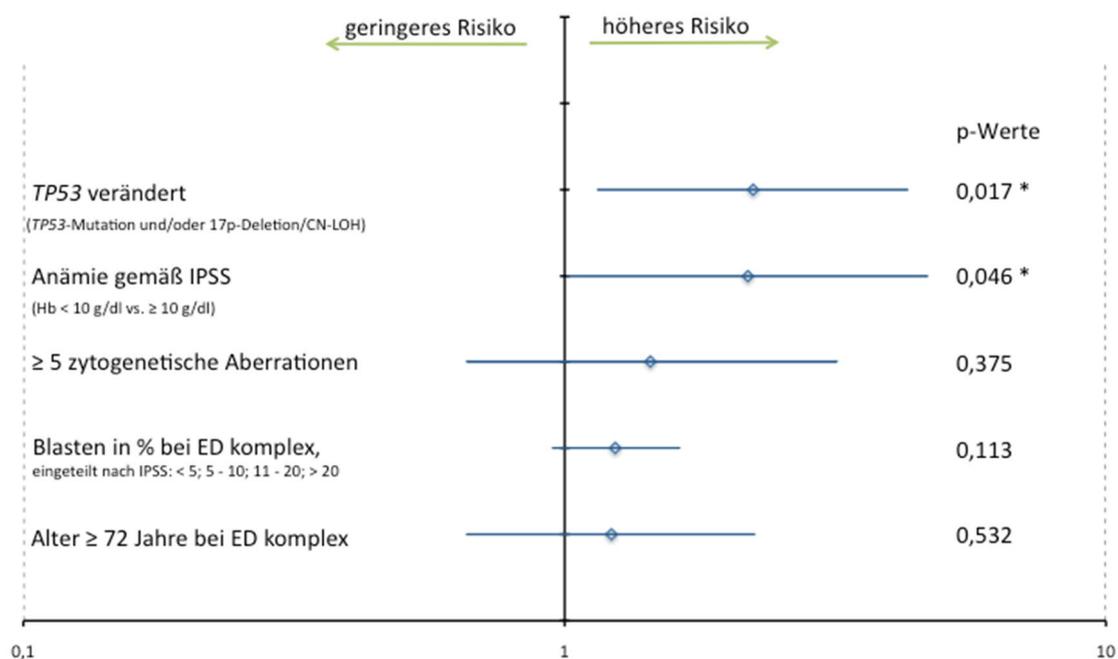


Abbildung 53: Darstellung des zweiten Regressionsmodells als Forest Plot.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet. ED: Erstdiagnose

In beiden Modellen konnte ein signifikanter Einfluss durch die Anämie nach Definition des IPSS gezeigt werden: Bei Vorhandensein einer Anämie gemäß der Definition des IPSS bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps war das Sterberisiko um 121 % bzw. 118 % erhöht (HR = 2,21/2,18). Es zeigte sich dagegen kein signifikanter Einfluss auf das Sterberisiko durch molekulare oder zytogenetische *TP53*-Veränderungen, wenn sie einzeln betrachtet wurden (Modell 1). Wurden die *TP53*-Veränderungen allerdings gemeinsam betrachtet und somit jegliche *TP53*-Anomalie berücksichtigt (Modell 2), war der Einfluss dieses Parameters signifikant und es ergab sich ein um 123 % erhöhtes Sterberisiko (HR = 2,23; $p = 0,017$) bei vorhandener Veränderung des *TP53*. Die Anzahl der CA hatte in beiden Modellen einen bedeutenden Einfluss auf das Überleben mit einem 1,69 bzw. 1,44-fachen Sterberisiko, wenn fünf oder mehr CA vorhanden waren. Allerdings waren diese Ergebnisse nicht signifikant.

Den geringsten negativen Einfluss auf das Überleben zeigten in beiden Modellen das Alter ≥ 72 Jahre mit einer Erhöhung des Sterberisikos um 32 % bzw. 22 % und eine höhere Blastenzahl eingeteilt in Gruppen nach IPSS mit einer Erhöhung des Sterberisikos um 23 % bzw. 24 %, wenn der Wert der Blastenzahl der nächst höheren Gruppe zugehörig war.

Um die einzelnen Untergruppen des IPSS genauer zu betrachten wurde aus dem zweiten Modell ein weiteres Regressionsmodell abgeleitet, in dem der Parameter der Blasten noch einmal in Untergruppen aufgeteilt wurde, indem das Risiko der höheren Risikokategorie

nach IPSS im Vergleich zu der niedrigsten Risikokategorie mit < 5 % Blasten im KM zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps gesetzt wurde (siehe Tabelle 19, Abbildung 54).

Hierbei ergab sich ein deutlich erhöhtes Sterberisiko für jeden Vergleich der höheren Risikokategorien im Vergleich zu < 5 % Blasten im KM zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps. Signifikant wurde allerdings nur der Vergleich der höchsten Risikokategorie nach IPSS (> 20 % Blasten) zu < 5 % Blasten im KM zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps (siehe Tabelle 19). Das Sterberisiko war hier im Vergleich der beiden Gruppen um 159 % höher.

Weitere unabhängige Prognosefaktoren waren in diesem Modell die *TP53*-Veränderungen und die Anämie gemäß der Definition des IPSS.

Tabelle 19: Modell 3: Multivariates Regressionsmodell unter Beachtung der kombinierten *TP53*-Veränderungen und der Einteilung der Blasten nach IPSS.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

	HR	KI	p-Wert
Anzahl der Blasten in % im KM zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps			
< 5 % vs. 5 - 10 % Blasten	2,17	0,84 - 5,58	0,108
< 5 % vs. 11 - 20 % Blasten	1,23	0,59 - 2,56	0,579
< 5 % vs. > 20 % Blasten	2,59	1,13 - 5,95	0,024 *
<i>TP53</i> verändert (<i>TP53</i> -Mutation und/oder 17p-Deletion/CN-LOH)	2,40	1,22 - 4,71	0,011 *
Anämie gemäß der Definition des IPSS (Hb < 10 g/dl vs. \geq 10 g/dl)	2,21	1,02 - 4,80	0,045 *
\geq 5 CA vs. < 5 CA	1,44	0,63 - 3,19	0,405
Alter \geq 72 Jahre bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps vs. < 72 Jahre	1,24	0,67 - 2,28	0,493

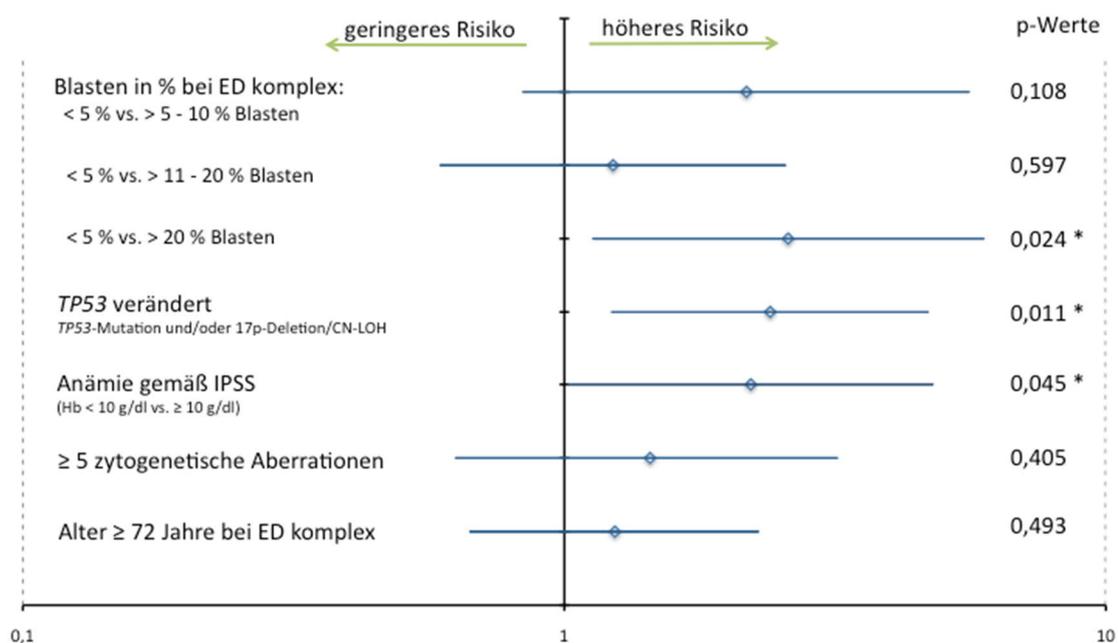


Abbildung 54: Darstellung des dritten Regressionsmodells als Forest Plot.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet. ED: Erstdiagnose

Um das dritte Modell zu vereinfachen, wurde ein weiteres Modell entwickelt, in dem für die Anzahl der Blasten ein Grenzwert von $> 20\%$ Blasten im KM zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps angenommen wurde (siehe Tabelle 20, Abbildung 55).

Hierbei ergaben sich schließlich drei unabhängige Prognosefaktoren: Neben dem Vorhandensein einer *TP53*-Veränderungen mit einem um 135 % erhöhtem Sterberisiko ($p = 0,013$), war dies weiterhin die Anämie < 10 g/dl mit einem um 133 % erhöhtem Sterberisiko ($p = 0,030$). Die Anzahl der Blasten mit einem Grenzwert von $> 20\%$ kam als neuer unabhängiger Prognosefaktor dazu mit einer Erhöhung des Sterberisikos um 101 % ($p = 0,033$). Eine höhere Anzahl der CA (≥ 5 CA) und ein höheres Alter (≥ 72 Jahre) hatten mit einem HR von 1,6 und 1,23 einen negativen Einfluss auf das Überleben, erlangten aber keine Signifikanz.

Tabelle 20: Modell 4: Multivariates Regressionsmodell unter Beachtung der kombinierten *TP53*-Veränderungen und einem Grenzwert der Blasten im KM > 20 % zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

	HR	KI	p-Wert
<i>TP53</i> verändert (<i>TP53</i> -Mutation und/oder 17p-Deletion/ CN-LOH)	2,35	1,20 - 4,60	0,013 *
Anämie gemäß der Definition des IPSS (Hb < 10 g/dl vs. \geq 10 g/dl)	2,33	1,08 - 5,01	0,030 *
Anzahl der Blasten > 20 % im KM zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps	2,01	1,06 - 3,80	0,033 *
\geq 5 CA vs. < 5 CA	1,60	0,74 - 3,49	0,235
Alter \geq 72 Jahre bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps vs. < 72 Jahre	1,23	0,67 - 2,26	0,504

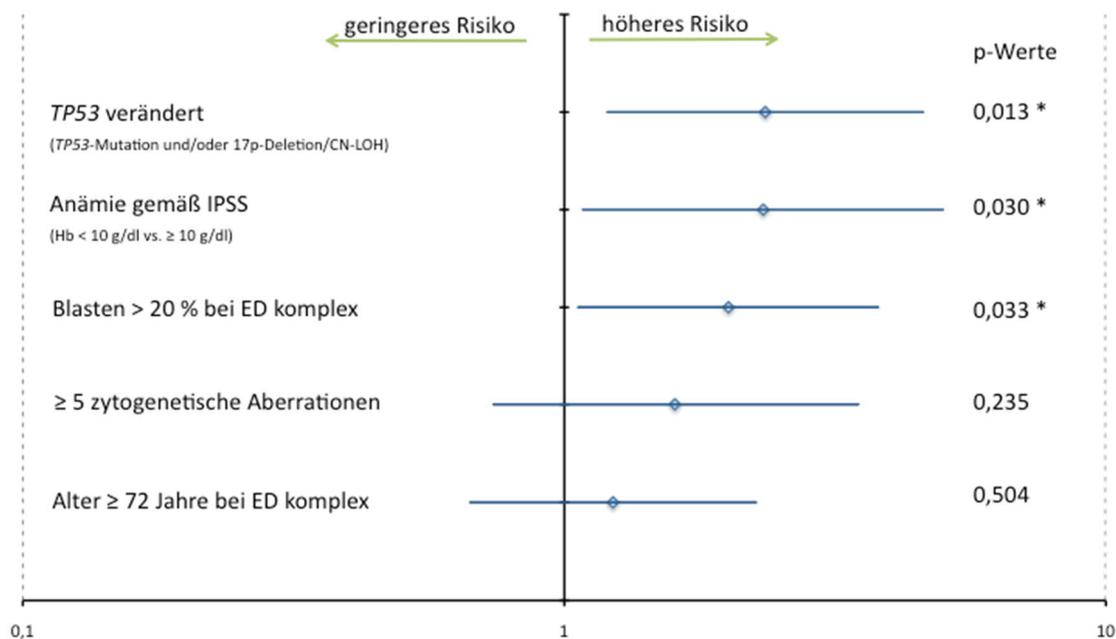


Abbildung 55: Darstellung des vierten Regressionsmodells als Forest Plot.

Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet. ED: Erstdiagnose

Das letzte der vier Modelle wurde für die Entwicklung eines Prognosesystems ausgewählt, da hier insgesamt drei Parameter mit einem hohen prognostischen Einfluss eine Signifikanz erlangten.

3.5.1 Entwicklung eines Prognosesystems für Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp

Anhand der drei Parameter mit dem größten Einfluss auf das Überleben aus der multivariaten Regressionsanalyse wurde ein einfaches Prognosesystem für die heterogene Gruppe von Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp erstellt: Bei Vorliegen einer *TP53*-Veränderung wurde ein Punkt vergeben, bei Vorliegen einer Anämie gemäß der Definition des IPSS ($Hb < 10 \text{ g/dl}$) sowie ebenfalls bei Vorliegen einer Blastenzahl $> 20 \%$ zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des komplexen Karyotyps. Daraus wurde die Gesamtpunktzahl (max. 3 Punkte) ermittelt und anhand dieser das med. OS der vier entstandenen Gruppen berechnet.

Das med. OS war mit 25 Monaten am längsten, wenn weder ein $Hb < 10 \text{ g/dl}$ noch eine *TP53*-Veränderung noch eine Blastenzahl $> 20 \%$ vorlagen (Punktzahl 0). Mit 17 Monaten war das med. OS kürzer, aber im Vergleich zur Gruppe mit null Punkten nicht signifikant kürzer, bei Vorliegen eines Punktes ($Hb < 10 \text{ g/dl}$ oder vorhandene *TP53*-Veränderung oder Blastenzahl $> 20 \%$; $p = 0,124$). Bei Vorliegen einer Punktzahl von zwei Punkten (zwei der drei Parameter bei ED des komplexen Karyotyps vorliegend) war das med. OS mit acht Monaten noch kürzer und signifikant kürzer als bei einer Punktzahl von null Punkten ($p = 0,002$) und einem Punkt ($p = 0,005$). Das kürzeste med. OS von nur einem Monat zeigten Patienten mit drei Punkten ($Hb < 10 \text{ g/dl}$ und vorhandene *TP53*-Veränderung und Blastenzahl $> 20 \%$) (siehe Abbildung 56 und Tabelle 21).

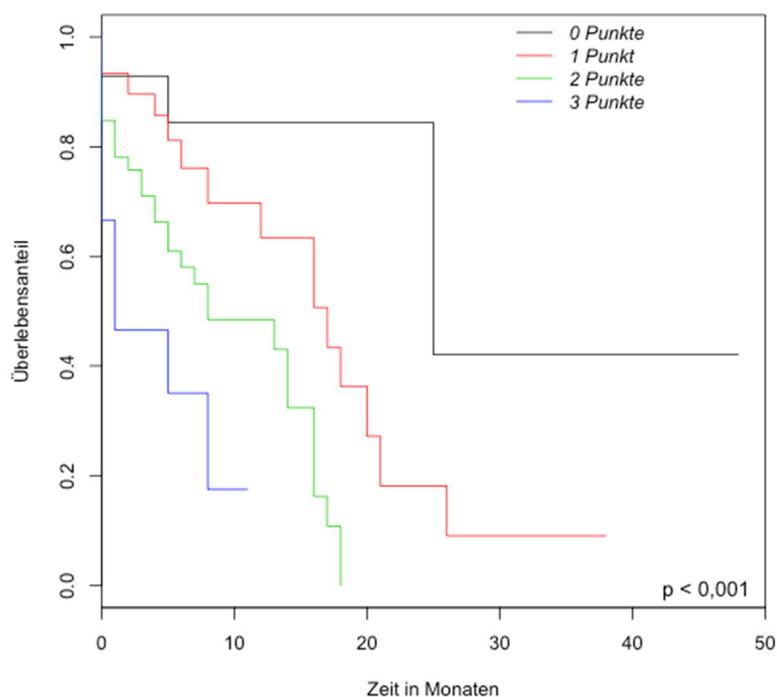


Abbildung 56: Med. OS in Abhängigkeit von der Punktzahl des Prognosesystems.

Med. OS der einzelnen Gruppen: 0 Punkte: 25 Monate [KI: 25 - NA], N = 14 vs. 1 Punkt: 17 Monate [KI: 12 - NA], N = 30 vs. 2 Punkte: 8 Monate [KI: 5 - 16], N = 46 vs. 3 Punkte: 1 Monat [KI: 0 - NA]; $p < 0,001$

Tabelle 21: Med. OS in Abhängigkeit von der Punktzahl des Prognosesystems

Vergabe jeweils eines Punktes bei Vorliegen einer *TP53*-Veränderung, bei Hb < 10 g/dl und Blastenzahl im KM > 20 % bei ED komplex. Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Punktzahl	Anzahl N	Med. OS in Monaten	p-Wert
0	14	25 [25 - NA]	$p_{0 \text{ vs. } 1} = 0,124$ $p_{0 \text{ vs. } 2} = 0,002 *$ $p_{0 \text{ vs. } 3} = 0,002 *$
1	30	17 [12 - NA]	$p_{1 \text{ vs. } 2} = 0,005 *$ $p_{1 \text{ vs. } 3} < 0,001 *$
2	46	8 [5 - 16]	$p_{2 \text{ vs. } 3} = 0,035 *$
3	15	1 [0 - NA]	

4 Diskussion

In bisher publizierten Daten wurde eine molekulare Mutation von *TP53* als unabhängiger negativer prognostischer Parameter bei Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp beschrieben (Bejar et al. 2011). Dabei wurde es bisher vernachlässigt die Komplexität genomischer Aberrationen in diesem Kontext genauer zu betrachten und mit dem *TP53*-Mutationsstatus zu korrelieren. Für Patienten mit AML und komplex aberrantem Karyotyp zeigten Rücker et al. (2012), dass bei vorliegender *TP53*-Aberration ein höheres Ausmaß der Komplexität genomischer Aberrationen vorhanden ist. Gemessen wurde dies an der Anzahl der CA und der Anzahl der Verluste und Zugewinne in der SNP-A. Da für MDS mit komplex aberrantem Karyotyp eine solche Untersuchung noch nicht existiert, wurde in dieser Arbeit das Ausmaß der genomischen Imbalancen anhand unterschiedlicher Parameter genau beurteilt und somit sehr viel genauer und umfassender objektiviert, als bisher geschehen. Dazu wurde als Messparameter einerseits die Anzahl der zytogenetischen Aberrationen herangezogen. Andererseits dienten die Anzahl der chromosomalen Fusionen im Sinne von Bruchereignissen im mFISH - eine noch nicht publizierte Methode - und die Größe der TGA (*total genomic aberrations*) als Summe der Zugewinne und Verlust aus der SNP-A (Cluzeau et al. 2013) als weitere Parameter zur Erfassung der Komplexität genomischer Aberrationen. Anhand dieser Parameter wurden Patienten mit und ohne Veränderungen des *TP53* verglichen, wobei nicht nur molekulare *TP53*-Mutationen, sondern auch zytogenetische Aberrationen des *TP53*, also 17p-Deletionen und CN-LOH im *TP53*, berücksichtigt wurden. Hierdurch wurde eine differenzierte Betrachtung der genetischen Instabilität möglich, aber auch ein Vergleich der unterschiedlichen Kohorten mit und ohne *TP53*-Aberrationen über die isolierte Betrachtung der molekularen *TP53*-Mutation hinaus. Neben der Erfassung des Ausmaßes der genomischen Imbalancen wurde der Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen erfassten *TP53*-Veränderungen und dem Überleben der Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp durch Analyse der klinischen *follow-up*-Daten geprüft. So konnte insgesamt mithilfe dieser Daten die Hypothese von Bejar et al. (2011) überprüft werden, dass molekulare *TP53*-Mutationen einen vom Ausmaß der chromosomalen Instabilität unabhängigen Prognosefaktor darstellen.

4.1 Häufigkeit der *TP53*-Veränderungen bei MDS, CMML und sAML nach MDS mit komplex aberrantem Karyotyp

Um Veränderungen des *TP53* möglichst umfassend zu dokumentieren, wurden 125 Patienten mit MDS, CMML und sekundärer AML nach MDS und komplex aberrantem Karyotyp mittels FISH-Analysen des *TP53*-Locus in der Region 17p13, SNP-A und

Mutationsanalysen des *TP53* mittels Sanger-Sequenzierung in einer retrospektiven Analyse untersucht.

Bei etwa der Hälfte der Patienten (48,8 %) wurde eine molekulare *TP53*-Mutation nachgewiesen. Eine mittels CBA oder FISH erfassbare Deletion des kurzen Arms von Chromosom 17 oder eine CN-LOH im Bereich von *TP53* fand sich bei 41,6 % der Patienten. Nur 37,6 % der Patienten zeigten gar keine Veränderung des *TP53* und bei insgesamt 62,4 % der Patienten wurde mindestens eine Veränderung des *TP53* gefunden. Dies stimmt mit Angaben aus der Literatur zu *TP53*-Veränderungen bei MDS und AML mit komplex aberrantem Karyotyp von 55 - 70 % überein (Haferlach et al. 2008; Jasek et al. 2010; Rucker et al. 2012; Kulasekararaj et al. 2013; Haase et al. 2019) und zeigt eine klare Assoziation der *TP53*-Veränderungen mit einem komplex aberranten Karyotyp.

Wie bereits von Jasek et al. (2010) beschrieben, kann von einer biallelischen Veränderung ausgegangen werden, wenn eine 17p-Deletion zusammen mit einer molekularen *TP53*-Mutation gefunden wird (hemizygoter Mutation) oder, wenn eine molekulare Mutation und ein CN-LOH des *TP53* gefunden werden (homozygoter Mutation). Diese kombinierten Veränderungen, welche hier bei 28,0 % der Patienten gefunden wurden, entsprechen gemäß der Hypothese von Knudson (1971) einem Verlust der Heterozygotie. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass beide *TP53*-Veränderungen in großen Klonen nachweisbar sind, um sicher sein zu können, dass die Veränderungen nicht in unterschiedlichen Klonen vorkommen. Eine einzelne Veränderung des *TP53* entspricht einer heterozygoten Veränderung. Dies wurde in der vorliegenden Kohorte bei 34,4 % der Patienten gefunden, wobei eine einzelne molekulare *TP53*-Mutation bei 20,8 % der Patienten auftrat und eine einzelne zytogenetische Mutation des *TP53* (del(17p)/CN-LOH) in 13,6 % der Fälle vorlag.

Patienten mit jeglicher *TP53*-Veränderungen zeigten ein kürzeres med. OS als Patienten ohne *TP53*-Veränderung (8 Monate vs. 21 Monate). Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen von Rucker et al. (2012) für Patienten mit AML und einem komplex aberranten Karyotyp. Ein signifikanter prognostischer Unterschied zwischen dem Vorliegen eines hemi-/homozygoten Mutationsstatus im Vergleich zum Vorliegen eines heterozygoten Mutationsstatus war in unserer Kohorte nicht vorhanden.

Da nur bei 26,4 % der Patienten eine SNP-A durchgeführt wurde, ist es denkbar, dass einige Fälle mit biallelischen Veränderungen - aufgrund eines CN-LOH im *TP53* - nicht detektiert wurden. Dies würde die geringere Anzahl biallelischer *TP53*-Verluste erklären im Vergleich zu Rucker et al. (2012), wo für 70 % der Patienten mit AML und komplex aberrantem Karyotyp eine biallelische Veränderung gefunden wurde. Allerdings wurden in unserer Kohorte nur bei 15,2 % und bei Svobodova et al. (2016) nur bei 18 % der Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp ein CN-LOH im Bereich des *TP53* gefunden, sodass es unwahrscheinlich erscheint, dass in einem größerem Anteil eine biallelische Veränderung aufgrund der fehlenden SNP-A nicht detektiert wurde. Da es sich

bei der Untersuchung von Rucker et al. (2012) ausschließlich um AML-Patienten handelte, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit eine noch weiter fortgeschrittene genetische Evolution im Vergleich zu unserer Patientenkohorte aufwiesen, könnte auch dies der Grund für die unterschiedlichen Frequenzen der biallelischen Veränderungen sein. Bei genauerer Betrachtung der Patienten mit sekundärer AML nach MDS in dieser Kohorte zeigte sich kein signifikanter höherer Anteil biallelischer Veränderungen bei Patienten mit sekundärer AML nach MDS verglichen mit Patienten mit MDS/CMML (33,3 % vs. 26,3 %; $p = 0,365$). Allerdings war unter den Patienten mit sekundärer AML nach MDS ein signifikant geringerer Anteil von Patienten ohne jegliche Veränderung des *TP53* (23,3 % vs. 42,1 %; $p = 0,020$). Dies wiederum könnte für die Theorie der weiter fortgeschrittenen genetischen Evolution bei Patienten mit sekundärer AML nach MDS sprechen, analog zu der Vermutung einer weiter fortgeschrittenen genetischen Evolution bei Patienten mit AML im Allgemeinen.

4.1.1 Analyse der molekularen *TP53*-Mutationen

Molekulare *TP53*-Mutationen werden in humanen Neoplasien häufig detektiert. Zumeist finden sich die Mutationen in der DNA-Bindedomäne. Es handelt sich überwiegend um Punktmutationen (Hainaut et al. 1998; Muller und Vousden 2013). Auch in dieser Kohorte waren die Mutationen zu 90 % in der DNA-Bindedomäne lokalisiert und es handelte sich in 80 % der Fälle um Missense-Mutationen. Greenblatt et al. (1994) fanden sechs Hotspots (p.R175, p.G245, p.R248, p.R249, p.R273 und p.R282), in denen sich etwa 25 % der *TP53*-Mutationen fanden. In der vorliegenden Kohorte wurden insgesamt 18,6 % der Mutationen in diesen sechs Hotspots nachgewiesen. Als weitere rekurrente Mutation zeigte sich die Mutation p.Y220C, welche bei 8,5 % der Patienten vorkam. Es handelt sich dabei um eine häufige Mutation des *TP53*, welche zur Destabilisierung des *TP53* führt (Soussi und Wiman 2015) und von Walker et al. (1999) zu einer erweiterten Gruppe von 32 Hotspotmutationen gezählt wurde.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Mutationslast der *TP53*-Mutation eine prognostische Bedeutung hat. Diese wird anhand der VAF beim NGS bestimmt. Sallman et al. (2016) zeigten, dass eine VAF > 40% in der multivariaten Analyse ein unabhängiger negativer Prognoseparameter war, wohingegen eine VAF < 20% nur einen geringen Einfluss auf das Überleben der Patienten hatte. Grund für die negative Prognose bei hoher VAF könnte eine fortgeschrittene klonale Evolution sein, die sich seit dem Bestehen des Klons mit der Mutation entwickelt hat. Dies wurde bereits für einige Fälle nachgewiesen (Genovese et al. 2014). Somit ist ein Zusammenhang der VAF mit der Zeitdauer seit dem Bestehen des Klons denkbar. Leider konnte die VAF hier nicht beurteilt werden, da die Proben mittels Sanger-Sequenzierung analysiert worden waren. Diese Fragestellung ist allerdings Gegenstand aktueller weiterführender Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Haase.

4.2 Vergleich der Patientengruppen

Die Patienten wurden anhand der nachgewiesenen *TP53*-Veränderungen in Untergruppen aufgeteilt und diese miteinander verglichen. Im Gegensatz zu den Patienten mit AML und komplex aberrantem Karyotyp von Rucker et al. (2012) lag bei Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp mit *TP53*-Veränderungen kein signifikant höheres Alter vor. Diese fehlende Abhängigkeit der *TP53*-Veränderungen vom Alter zeigte sich auch bei Stengel et al. (2016) für Patienten mit MDS und CLL. Dies lässt sich durch das insgesamt höhere mediane Alter der Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp erklären im Vergleich zu den beiden genannten Patientenkohorten mit AML.

In allen Gruppen mit *TP53*-Veränderungen (molekulare *TP53*-Mutation /zytogenetische *TP53*-Veränderung/ kombinierte *TP53*-Veränderung) fand sich allerdings ein größerer Anteil an Frauen. Dies steht im Gegensatz zu der bekannten Geschlechterverteilung bei MDS, da Männer häufiger von MDS betroffen sind als Frauen (Onkopedia — Myelodysplastische Syndrome (MDS) 2016).

Patienten mit zytogenetischer *TP53*-Veränderung (del(17p)/CN-LOH) und kombinierten *TP53*-Veränderungen gehörten zu einem signifikant höheren Anteil der Gruppe der Hochrisikopatienten nach WHO-Klassifikation 2008, IPSS und IPSS-R an. Eine Assoziation von *TP53*-Mutationen mit einer höheren Risikokategorie wurde auch bei Bejar et al. (2011) und Papaemmanuil et al. (2013) gefunden.

Ein Vergleich der klinischen Parameter zeigte zudem, dass das Hämoglobinlevel bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps in allen Gruppen mit *TP53*-Veränderung (molekulare *TP53*-Mutation/ zytogenetische *TP53*-Veränderung/ kombinierte *TP53*-Veränderung) niedriger war im Vergleich zu Patienten ohne eine *TP53*-Veränderung. Ein niedriger Hämoglobinwert, als die häufigste Zytopenie bei MDS, sowie die Transfusionsabhängigkeit, die aus einer starken Anämie resultiert, gelten als negative prognostische Faktoren (Greenberg et al. 1997; Malcovati et al. 2005). Ein Grund hierfür ist die transfusionsbedingte Eisenüberladung, welche zu einem erhöhtem Level des oxidativen Stresses beiträgt (Gattermann 2018). In einem Mausmodell für MDS konnte eine erhöhte Mutationsfrequenz bei Zunahme des oxidativen Stresses gezeigt werden (Chung et al. 2014). Und auch zwischen Eisenüberladung bei MDS-Patienten und zunehmender genetischer Instabilität konnte ein Zusammenhang nachgewiesen werden (Westhofen et al. 2015). Trotz vieler Studien blieb bisher unklar, ob eine Eisenchelattherapie zu einem Überlebensvorteil bei Patienten mit MDS führt (Killick 2017). Daher wurde diese Fragestellung mittels einer aktuellen kontrollierten randomisierten Studie erneut überprüft: Erste Ergebnisse zeigen, dass Patienten mit Niedrig-Risiko-MDS von einer Eisenchelattherapie im Vergleich zu einer Placebothherapie profitieren (Angelucci 2018).

Ein Einfluss dieser beiden Faktoren auf das schlechte Outcome von Patienten mit *TP53*-Veränderungen ist denkbar und wurde daher in der Regressionsanalyse

berücksichtigt: Die Anämie gemäß der Definition des IPSS hatte in der univariaten Analyse einen sehr großen Einfluss auf das Überleben und war auch in allen Modellen der multivariaten Analyse ein unabhängiger prognostischer Parameter, nicht jedoch Zytopenien der anderen beiden Zellreihen. Auch bei Haase et al. (2019) imponierte die Anämie in einer unabhängigen vergleichbaren Kohorte von Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp als unabhängiger Prognosefaktor.

4.3 *TP53*-Veränderungen und das Ausmaß der genetischen Instabilität

Dass auch *TP53*-Veränderungen gehäuft bei Patienten mit MDS und AML mit einem komplex aberrantem Karyotyp zu finden sind (Haferlach et al. 2008; Kulasekararaj et al. 2013), weist darauf hin, dass Patienten mit *TP53*-Veränderungen ein höheres Ausmaß genetischer Instabilität vorweisen. Dies zeigte sich auch bei Rücker et al. (2012) für Patienten mit AML und komplex aberrantem Karyotyp: Sie wiesen ein höheres Ausmaß der genetischen Instabilität bei Vorliegen einer Veränderung des *TP53* auf gemessen an der Anzahl der CA und an spezifischen Kopiezahlveränderungen. Dies konnte hier auch für Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp bestätigt werden. Zur genaueren und umfassenderen Aufschlüsselung der genetischen Instabilität wurde im Rahmen dieser Dissertation einerseits die Anzahl der CA am Karyotyp gezählt, aber auch die Anzahl der Fusionen aus dem mFISH ermittelt, um mehrfache chromosomale Bruchereignisse zu erfassen, welche sonst vernachlässigt werden würden und nur in wenigen der bisherigen Publikationen berücksichtigt wurden (siehe Kapitel 2.2.3.1.). Als weitere objektive Größe zur Erfassung der genetischen Instabilität wurde die Größe der TGA als Summe der Zugewinne und Verlust aus der SNP-A herangezogen (Cluzeau et al. 2013). Auch dieses sehr objektive Verfahren zur Ermittlung des Ausmaßes genomischer Imbalancen wurde im Zusammenhang mit *TP53*-Mutationen und komplexen Anomalien noch nie untersucht. Anhand dieser deutlich tiefer gehenden Analyse der genetischen Instabilität unterscheidet sich diese Arbeit von der Arbeit von Haase et al. (2019), in der als Parameter der Komplexität lediglich die Anzahl der CA berücksichtigt wurde, und liefert somit wichtige zusätzliche Daten, die so bisher noch nicht vorliegen.

Bei vorhandener molekularer *TP53*-Mutation, zytogenetischer *TP53*-Veränderung oder kombinierten *TP53*-Veränderungen war die Anzahl der zytogenetischen Aberrationen, aber auch die Anzahl der Fusionen und die Größe der TGA signifikant höher als bei Patienten ohne *TP53*-Veränderung. Lediglich der Vergleich der Größe der TGA bei Patienten mit alleiniger molekularer *TP53*-Mutation mit Patienten ohne jegliche *TP53*-Veränderung erlangte keine Signifikanz. Grund hierfür könnten die kleinen Gruppengrößen bei der Analyse der TGA sein.

Da sich eine größere genetische Instabilität bei Vorhandensein einer molekularen *TP53*-Mutation, einer zytogenetischen *TP53*-Veränderung, aber auch bei kombinierten

TP53-Veränderungen im Vergleich zu Patienten ohne *TP53*-Veränderungen findet, besteht eine klare Assoziation von Veränderungen des *TP53* nicht nur mit einer höheren Anzahl der CA, sondern auch mit einem höheren Ausmaß der genetischen Instabilität. **Es stellt sich daher die Frage, ob *TP53*-Veränderungen als unabhängiger prognostischer Parameter gewertet werden können, wie es von Bejar et al. (2011) und Haase et al. (2019) für Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp postuliert wurde, oder ob die Prognose dieser Patienten durch das höhere Ausmaß der genetischen Instabilität entscheidend mit beeinflusst wird.**

4.4 *TP53*-Veränderungen und Anzahl der CA als Prognoseparameter

Das med. OS der gesamten Kohorte betrug 14 Monate [KI: 8 - 17] und war damit länger als das med. OS von Patienten bei Greenberg et al. (2012). Dort betrug das med. OS für Patienten mit genau drei CA 1,5 Jahre (hier: med. OS nicht erreicht [KI: 16 - NA], N = 17) und für Patienten mit mehr als drei CA 0,7 Jahre (hier: 12 Monate [KI: 8 - 17], N = 108). Grund hierfür könnte eine verbesserte supportive Therapie, aber auch die Therapie mit z.B. DMTI sein, da bei Greenberg et al. (2012) lediglich eine supportive Therapie in den Einschlusskriterien erlaubt war und überwiegend Patienten mit Erstdiagnosen zwischen 1985 und 2005 in die Untersuchung eingeschlossen wurden. Die Erstdiagnose des MDS mit komplex aberrantem Karyotyp wurde in unserer Kohorte dagegen zwischen Juli 2007 und Februar 2017 gestellt, sodass hier von einem deutlichen Einfluss verbesserter Therapieoptionen ausgegangen werden kann.

TP53-Mutationen haben einen negativen Einfluss auf die Prognose von Patienten mit MDS (Bejar et al. 2011; Haase et al. 2019). Dass dies auch für andere Formen der *TP53*-Veränderung so ist, konnte hier gezeigt werden: Patienten mit jeglicher Form einer *TP53*-Veränderung zeigten ein signifikant kürzeres med. OS im Vergleich zu Patienten ohne *TP53*-Veränderungen. Wurden die unterschiedlichen Formen der *TP53*-Veränderungen zusammengefasst, ergab sich darüber hinaus ein negativer Einfluss durch das Vorhandensein einer oder mehrerer *TP53*-Veränderungen. Dies ist analog zu den Ergebnissen von Stengel et al. (2016) für Patienten mit MDS aus allen zytogenetischen Risikogruppen, steht allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen von Haase et al. (2019): Hier zeigte die zytogenetische *TP53*-Veränderung in Form einer 17p-Deletion in einer Analyse eines unabhängigen internationalen Datensatzes aus Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp keinen von der molekularen *TP53*-Mutation unabhängigen Einfluss auf das Überleben. Allerdings lagen dabei im Gegensatz zu unserer davon unabhängigen Kohorte keine FISH-Analysen des *TP53*-Locus in der Region 17p13 vor.

In der vorliegenden Kohorte ergab sich das kürzeste med. OS für Patienten mit einer einzelnen zytogenetischen *TP53*-Veränderung und nicht für Patienten mit kombinierten *TP53*-Veränderungen. Ein Grund hierfür könnte die relativ kleine Gruppengröße der Patienten mit zytogenetischen *TP53*-Veränderungen sein. Zudem muss beachtet werden,

dass der Unterschied der einzelnen Gruppen mit *TP53*-Veränderungen nicht signifikant war und die Kohorte sich nur aus Patienten mit MDS und sekundärer AML nach MDS mit komplex aberrantem Karyotyp zusammensetzte.

Die Anzahl der CA ist ein entscheidender prognostischer Parameter bei Patienten mit MDS (Haase et al. 2007). Dies wurde auch hier bestätigt: Patienten mit einer höheren Anzahl der CA zeigten ein kürzeres med. OS und ließen sich anhand einer steigenden Anzahl der CA klar auftrennen. Ein Grenzwert von fünf CA erlangte die höchste Signifikanz und wurde deshalb für die weiteren Analysen genutzt.

Neu in unserer Analyse war die Betrachtung von *TP53*-Veränderungen in Zusammenhang mit der Anzahl der CA: Molekulare *TP53*-Mutationen hatten nur einen geringen prognostischen Einfluss auf das Überleben von Patienten mit fünf oder mehr CA. Anders war dies, wenn alle Formen der *TP53*-Veränderungen betrachtet wurden. Patienten mit fünf oder mehr CA mit jeglicher *TP53*-Veränderung zeigten ein hochsignifikant kürzeres med. OS als Patienten ohne *TP53*-Veränderungen. Für Patienten mit weniger als fünf CA zeigte sich diese Auftrennung anhand des *TP53*-Mutationsstatus dagegen nicht. Allerdings waren hier die Gruppengrößen sehr klein ($N_{TP53\text{-Wildtyp}} = 21$; $N_{TP53\text{ verändert}} = 10$). Diese Ergebnisse sind ein Hinweis auf den prognostischen Einfluss aller *TP53*-Veränderungen innerhalb der Kohorte mit komplexen Chromosomenanomalien gemeinsam, nicht aber der molekularen *TP53*-Mutation alleine. Die Anzahl der CA mit einem Grenzwert von fünf CA dagegen hatte nur einen geringen Einfluss auf das Überleben von Patienten mit molekularer *TP53*-Mutation und Patienten mit kombinierten *TP53*-Veränderungen.

Auch in der multivariaten Analyse hatte die Anzahl der CA zwar einen negativen prognostischen Einfluss, wenn fünf oder mehr CA vorhanden waren (HR = 1,44; $p = 0,375$), konnte aber nicht als unabhängiger prognostischer Parameter bestätigt werden. Dies deutet darauf hin, dass eine weitere Einteilung von Patienten anhand der Anzahl der CA in einer Gruppe von Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp eine untergeordnete Rolle spielt. Dennoch konnte hier gezeigt werden, dass Patienten mit Veränderungen des *TP53* ein signifikant höheres Ausmaß der genetischen Instabilität aufweisen. Daher ist es denkbar, dass der Einfluss der Anzahl der CA in der multivariaten Analyse durch den großen Einfluss der Anämie und der *TP53*-Veränderungen überdeckt wird.

4.5 Monosomaler Karyotyp vs. Anzahl der CA

Zusätzlich zur Anzahl der CA wurde das von Breems et al. (2008) eingeführte Modell des monosomalen Karyotyps (mindestens zwei oder mehr autosomale Monosomien oder eine autosomale Monosomie und eine strukturelle Chromosomenanomalie) in der Analyse berücksichtigt. Schanz et al. (2013) zeigten, dass Patienten mit mK eine höhere Anzahl der CA aufwiesen und, dass bei Anzahl der CA ≥ 5 der mK keinen unabhängigen prognostischen Parameter darstellte. Diese Assoziation von mK und einer signifikant höheren Anzahl der CA wurde auch hier gefunden. Zudem war das med. OS von Patienten

mit mK signifikant kürzer als das von Patienten ohne mK. Dies ist am ehesten auf die höhere Anzahl der CA zurückzuführen.

Auch wenn der monosomale Karyotyp in Zusammenhang mit molekularen *TP53*-Mutationen/*TP53*-Veränderungen betrachtet wurde, zeigte sich eine Assoziation des monosomalen Karyotyps mit einer hohen Anzahl der CA. Die Anzahl der CA war am größten, wenn zusätzlich noch eine *TP53*-Mutation/-Veränderung vorhanden war. Neben dieser Assoziation von hoher Anzahl der CA mit einem monosomalem Karyotyp und *TP53*-Veränderungen zeigte sich keine negative Beeinflussung des Überlebens der Patienten durch eine *TP53*-Mutation/Veränderung, wenn ein monosomaler Karyotyp vorhanden war. Daraus geht hervor, dass der monosomale Karyotyp kein unabhängiger prognostischer Parameter ist, sondern vielmehr mit der Anzahl der CA assoziiert ist. Deshalb wurde er in der multivariaten Analyse nicht berücksichtigt. Ebenso scheint der negative Effekt der *TP53*-Veränderungen zumindest teilweise durch eine höhere Anzahl der CA vermittelt zu sein.

4.6 Einfluss der DMTI-Therapie bei Patienten mit *TP53*-Veränderungen

Die Rolle von *TP53*-Mutationen als Prognosefaktor in der Therapie mit DMTI wie Azacitidin und Decitabin ist umstritten: Während in einigen Untersuchungen *TP53*-Mutationen mit einem kürzeren oder schlechteren Therapieansprechen assoziiert waren (Takahashi et al. 2016), zeigte sich in anderen Untersuchungen ein positiver Effekt auf das Therapieansprechen bei vorhandener *TP53*-Mutation (Chang et al. 2016; Welch et al. 2016). Bally et al. (2014) zeigten wiederum in einer Kohorte von 62 MDS-Patienten mit 48,4 % Patienten mit komplexem Karyotyp, dass eine *TP53*-Mutation keinen Einfluss auf das Therapieansprechen bei einer Therapie mit Azacitidin hatte, trotzdem aber ein negativer Prognosefaktor für das Überleben der Patienten darstellte.

In der vorliegenden Kohorte mit 61,1 % mit DMTI behandelten Patienten zeigte sich, dass Patienten mit *TP53*-Mutation und *TP53*-Veränderungen insgesamt von der Therapie mit DMTI profitierten im Vergleich zu Patienten mit *TP53*-Aberrationen, die keine DMTI erhalten hatten. Die molekulare *TP53*-Mutation stellte im Gegensatz zu Bally et al. (2014) keinen negativen Prognosefaktor bei der Therapie mit DMTI dar. Dagegen war die Kombination aus *TP53*-Veränderungen mit einem signifikant schlechteren Outcome der Patienten bei durchgeführter DMTI-Therapie verknüpft. Nicht die molekulare *TP53*-Mutation allein, sondern die kombinierte Betrachtung molekularer und zytogenetischer *TP53*-Veränderungen ist hier deshalb als Prognosefaktor bei der DMTI-Therapie zu werten. Allerdings sollten diese Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden, obwohl sich die Patientengruppen mit und ohne DMTI-Therapie klinisch nicht unterschieden, da die Patienten nicht im Rahmen einer kontrollierten prospektiven Therapiestudie behandelt wurden und Details wie Therapiedauer, kumulative Dosis und

andere Daten nicht zur Verfügung standen. Die Patientenzahl in der Gruppe ohne DMTI-Therapie war gering und im Gegensatz zur Gruppe mit DMTI-Therapie starben einige Patienten sofort. Zudem wurde nicht das Ansprechen auf die Therapie mit DMTI untersucht, sondern nur das Überleben der Patienten. Zusammenfassend lässt sich durch unsere Daten zumindest feststellen, dass das Vorhandensein von *TP53*-Veränderungen nicht von vornherein gegen eine DMTI-Therapie spricht und sich somit mit bisher publizierten Daten zu dieser Fragestellung deckt.

4.7 Molekulare *TP53*-Mutation – (k)ein unabhängiger prognostischer Parameter?

Molekulare *TP53*-Mutationen sind in hämatologischen Neoplasien wie MDS und AML deutlich seltener als in soliden Neoplasien, gelten aber dennoch als unabhängiger negativer Prognoseparameter (Kita-Sasai et al. 2001; Horiike et al. 2003). Insbesondere für die Gruppe der Hochrisikopatienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp wurde von Bejar et al. (2011) und Haase et al. (2019) postuliert, dass molekulare *TP53*-Mutationen einen entscheidenden Einfluss auf das Überleben der Patienten haben. Wie hier gezeigt werden konnte, weisen Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp und molekularen *TP53*-Mutationen, aber auch mit zytogenetischen *TP53*-Aberrationen, eine signifikant höheres Ausmaß der genetischen Instabilität auf, gemessen an der Anzahl der CA, der Anzahl der Fusionen und der Größe der TGA. Haase et al. (2007) zeigten, dass sich mit zunehmender Anzahl der CA die Prognose der Patienten verschlechtert, was auch hier bestätigt werden konnte. Aufgrund dieser beiden Assoziationen stellt sich die Frage, ob das hohe Ausmaß der genetischen Instabilität zumindest teilweise den negativen prognostischen Effekt einer *TP53*-Mutation bzw. der Kombination aus *TP53*-Veränderungen bedingt und diese deshalb nicht als unabhängiger Prognosefaktor für Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp gesehen werden können. In einer multivariaten Analyse, in der mehrere Modelle verglichen wurden, ergab sich schließlich, dass der Einfluss der alleinigen molekularen *TP53*-Mutation (Modell 1) auf das Überleben der Patienten gering war (HR = 1,21; p = 0,532), die Kombination aller *TP53*-Veränderungen einschließlich der 17p-Deletion und CN-LOH des *TP53* in allen drei anderen Modellen dagegen ein signifikanter prognostischer Parameter war (HR = 2,23; p = 0,017 bzw. HR = 2,40; p = 0,011 bzw. HR = 2,35; p = 0,013). Mit dem letzten der entworfenen Modelle konnten innerhalb dieser Kohorte durch die multivariaten Analyse die Kombination aller *TP53*-Veränderungen, die Anämie gemäß der Definition des IPSS und die Blastenzahl im KM > 20 % als unabhängige Risikofaktoren identifiziert werden. Die molekulare *TP53*-Mutation alleine dagegen war kein unabhängiger prognostischer Parameter für Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp wie bei Bejar et al. (2011) und Haase et al. (2019) postuliert. Der Einfluss der alleinigen *TP53*-Mutation auf

das Sterberisiko war in Modell 1 zudem geringer (HR = 1,21; $p = 0,532$) als der Einfluss durch das Vorhandensein von ≥ 5 CA (HR = 1,69; $p = 0,203$).

Anhand der drei unabhängigen Prognosefaktoren „Anämie gemäß der Definition des IPSS (Hb > 10 g/dl)“, „jegliche *TP53*-Anomalie (Kopienzahl- und/oder molekulare Mutationen)“ und „Blastenanzahl im Knochenmark > 20 %“ lässt sich ein einfaches, aber gut auftrennendes Prognosesystem für Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp ableiten (siehe 3.5.1). Je mehr Parameter bei einem Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp zu finden sind, desto kürzer ist das med. OS.

Insgesamt lässt sich aus der Analyse schließen, dass neben der Erfassung des molekularen *TP53*-Mutationsstatus, die Erfassung von zytogenetischen *TP53*-Aberrationen nach wie vor eine große Rolle spielt. Die Erhebung von zytogenetischen Daten mittels CBA und Interphase-FISH sollte also keinesfalls vernachlässigt werden, da sie wichtige prognostische Informationen liefert.

4.8 Limitationen der Untersuchung

Zur Mutationsanalyse wurde die Sanger-Sequenzierung verwendet. Diese weist eine Nachweisgrenze bei einer Klongröße von ca. 20 % auf, weshalb die Möglichkeit besteht, dass nicht alle *TP53*-Mutationen detektiert wurden. Eine Sequenzierung mittels NGS erlaubt eine sensitivere Detektion von Mutationen. Zudem kann die Mutationslast (VAF) beurteilt werden, welche im Fall von *TP53* einen prognostischen Einfluss besitzt. Da der prognostische Einfluss allerdings in unterschiedlichen Untersuchungen erst bei einer höheren Mutationslast (VAF > 20 %) nachgewiesen werden konnte (Sallman et al. 2016; Wang et al. 2017), ist eine signifikante Einflussnahme durch bei uns nicht detektierte Mutationen mit sehr kleiner Klongröße weniger wahrscheinlich.

Die reine Erhebung von Mutations- und Deletionsdaten ist eine weitere Limitation der Untersuchung, da keine Aussage über die tatsächliche Menge des exprimierten *TP53* gemacht werden kann und auch keine Aussage über die Funktion des exprimierten Proteins. Bei Quintás-Cardama et al. (2016) spielte innerhalb einer Gruppe von AML-Patienten der *TP53*-Mutationsstatus eine geringere Rolle als prognostischer Parameter als das Expressionslevel. Patienten mit hohem *TP53*-Expressionslevel des Proteins zeigten ein signifikant kürzeres med. OS als Patienten mit geringen Expressionsniveaus, wohingegen die Gegenüberstellung von Patienten mit und ohne Mutation innerhalb der Gruppe mit hohen Expressionslevels keine Signifikanz erlangte. Auch für Niedrigrisiko-MDS-Patienten wurde gezeigt, dass das Expressionslevel einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten hatte. Bei hoher *TP53*-Expression war das med. OS verkürzt und die AML-Transformationsrate erhöht (Saft et al. 2014). Allerdings handelte es sich hierbei weitgehend um eine rein immunhistochemische Untersuchung ohne Untersuchung der *TP53*-Mutationslast. In beiden Untersuchungen lagen zudem keine zusätzlichen Informationen zu Deletionen des *TP53* und CN-LOH vor,

wie es in dieser Untersuchung der Fall ist, sodass nicht alle Formen der Mutationen des *TP53* erfasst wurden. Dies stellt einen wesentlichen Vorteil unserer Untersuchung dar.

4.9 Ausblick: Weitere Zielgene im *TP53*-Signalweg

Da sich nur bei 62,4 % unserer Patientenkohorte eine Veränderung des *TP53* im Sinne einer Mutation, einer Deletion oder eines CN-LOH zeigte, ist es in Betracht zu ziehen, dass neben *TP53* selbst ebenso Regulatoren oder Effektoren von *TP53* von Veränderungen betroffen sind, die eine Dysfunktion im *TP53*-Signalweg erzeugen und damit die klonale Expansion komplexer Anomalien begünstigen könnten. Dieser Mechanismus wurde bereits für einige andere Tumorerkrankungen gezeigt (Leach et al. 1993; Pettitt et al. 2001).

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass neben den Veränderungen im *TP53*-Signalweg Spleißvarianten und epigenetische Veränderung des *TP53* eine Rolle in der zellulären Regulation von Tumorerkrankungen spielen. Diese weiteren Veränderungen des *TP53* und potenzielle Zielgene werden im Folgenden anhand der vorhandenen Literatur diskutiert.

4.9.1 Weitere Veränderungen von *TP53*

Einen Einfluss auf die *TP53*-Expression und -Funktion könnten Polymorphismen im Gen haben. Der Polymorphismus R72P zum Beispiel führt zu einem verstärkten G1-Zellzyklus-Arrest und bedingt ein geringeres Apoptose-induzierendes Potenzial von *TP53* (Dumont et al. 2003), weshalb er im Verdacht steht, das Neoplasierisiko zu erhöhen. Für viele humane Neoplasien wurde ein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus R72P und dem Neoplasierisiko gefunden, welcher in Metaanalysen allerdings nicht bestätigt werden konnte (Dahabreh et al. 2010; Jiang et al. 2011; Wu et al. 2014; Tian et al. 2016). Der Zusammenhang erwies sich aber in weiteren Untersuchungen abhängig von einer asiatischen und südamerikanischen Herkunft (Liu und Bao 2013; Zhao et al. 2013a; Bezerra et al. 2017). In Bezug auf MDS fanden McGraw et al. (2015a) Hinweise darauf, dass Patienten mit 5q-Deletion durch den Polymorphismus R72P ein besseres Therapieansprechen auf Lenalidomid und ein verlängertes Gesamtüberleben haben. Patienten ohne 5q-Deletion dagegen zeigten ein geringeres Gesamtüberleben bei Vorliegen des Polymorphismus. Da in einer Studie 18 % der Patienten mit 5q-Deletion und Niedrigrisiko-MDS *TP53*-Mutationen aufwiesen (Jädersten et al. 2011), könnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der *TP53*-Mutation, dem Polymorphismus und dem besseren Gesamtüberleben von Patienten mit 5q-Deletion bestehen. Patienten ohne *TP53*-Mutation dagegen würden nicht von diesem Effekt profitieren, sodass die verminderte Induktion der Apoptose durch den Polymorphismus eine Progression der Erkrankung begünstigen könnte. Diese Hypothese bedarf weiterer Untersuchung.

Ebenso wäre es denkbar, dass eine Methylierung des Promotors von *TP53* zu einer Inaktivierung bzw. Funktionseinschränkung des Gens führt. Eine solche Methylierung des Promotors von *TP53* wurde bereits für einige solide Neoplasien beschrieben (Kang et al.

2001; Jha et al. 2012). Für Patienten mit hämatologischen Neoplasien finden sich dagegen widersprüchliche Daten: Einerseits fanden Bodoor et al. (2014) eine vermehrte Promotorhypermethylierung bei Patienten mit Leukämien. Andererseits fand sich bei Papaggeli et al. (2003) eine ausgedehnte Hypomethylierung des *TP53* bei MDS-Patienten, die als begünstigender Faktor für die weitere Akkumulation von Mutationen interpretiert wurde. Da die vorhandene Literatur zu diesem Thema noch nicht sehr zahlreich ist, bleibt fraglich, ob eine Hypermethylierung von *TP53* bei MDS-Patienten insbesondere in der Gruppe der Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp vermehrt vorliegen könnte und eine Inaktivierung von *TP53* bewirkt.

4.9.2 Regulatoren von *TP53*

MDM2 ist ein wichtiger negativer Regulator von *TP53* und ein denkbare Ziel für Veränderungen im *TP53*-Signalweg. *MDM2* liegt auf Chromosom 12q13.3-15 und besitzt einerseits eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, sodass die Level des aktiven *TP53* durch Ubiquitinierung gesenkt werden können (Honda et al. 1997). Dabei werden unterschiedliche Effekte erzielt: Eine Polyubiquitinierung führt zu einem proteosomalen Abbau des *TP53*. Eine Monoubiquitinierung bewirkt den Export von *TP53* aus dem Kern (Li et al. 2003) und die Ubiquitinierung des translationssteigernden Proteins RPL26 senkt die Translation von *TP53* (Takagi et al. 2005; Ofir-Rosenfeld et al. 2008). Andererseits kann *MDM2* durch direkte Bindung an *TP53* seine Aktivität mindern (Momand et al. 1992). Da *TP53* wiederum durch transkriptionelle Aktivierung die *MDM2*-Expression steigert, ergibt sich eine autoregulatorisches Feedback, durch welches die Aktivität von *TP53* eng reguliert wird (Juven et al. 1993; Wu et al. 1993). Liegt eine Mutation von *TP53* vor, ist die Aktivierung von *MDM2* und damit der Abbau von *TP53* vermindert (Willis et al. 2004). Für die Ubiquitinierung des mutierten *TP53* wurden allerdings auch *MDM2*-unabhängige Mechanismen gefunden (Lukashchuk und Vousden 2007). Neben einer *TP53*-Mutation kann ebenso eine verstärkte Aktivierung von *MDM2* den Feedbackmechanismus außer Kraft setzen: Bei einer Überexpression von *MDM2* wird eine beschleunigte Tumorentwicklung beobachtet (Jones et al. 1998), während ein *MDM2*-Verlust im Mausmodell zum frühzeitigen Tod in der Embryonalentwicklung durch *TP53*-abhängige Apoptose führt (Jones et al. 1995; Montes de Oca Luna et al. 1995). Sowohl in soliden als auch in hämatologischen Tumoren wurde bereits eine Überexpression von *MDM2* beobachtet, welche die *TP53*-Aktivität vermindert und somit die Krebsentwicklung fördern kann (Bond et al. 2004). Als Gründe für die Überexpression von *MDM2* wurde in vielen soliden Tumoren eine Amplifikation des Gens beschrieben (Momand et al. 1998). In hämatologischen Neoplasien gibt es dagegen nur eine geringe Frequenz von *MDM2*-Amplifikationen. Trotzdem fanden sich bei Studien ein deutlicher Anteil von hämatologischen Neoplasien mit einer *MDM2*-Überexpression (Bueso-Ramos et al. 1993). So auch bei Quintás-Cardama et al. (2016) in einer Gruppe von AML-Patienten, bei denen die Expressionsniveaus von unterschiedlichen Proteinen des *TP53*-Signalweges untersucht

wurden: In einem Drittel der Fälle lag eine Überexpression von *MDM2* vor, welche mit Vorliegen eines *TP53*-Wildtyps und einer geringen Expression des *TP53* einherging. Dies deutet darauf hin, dass auch in hämatologischen Tumoren eine Überexpression von *MDM2* ausreicht, um *TP53* zu supprimieren und einen dem *TP53*-Verlust ähnlichen Effekt auszulösen.

Als weiterer Grund für eine *MDM2*-Überexpression kann eine gesteigerte Transkription oder Translation genannt werden. In einigen Studien wurde der Polymorphismus SNP309T>G beschrieben, der bei hetero- oder homozygoter Ausprägung zur Bildung eines Genprodukts mit höherer Affinität zum transkriptionellen Aktivator von *MDM2* führt und somit das *MDM2*-Expressionslevel steigern kann (Bond et al. 2004). Patienten mit diesem Polymorphismus zeigen ein höheres Risiko Malignome zu entwickeln (Wan et al. 2011). Der Zusammenhang zwischen SNP309, *MDM2*-Expressionslevel und erhöhtem Malignomrisiko wurde von Post et al. (2010) im Mausmodell überprüft. Auch für Patienten mit Leukämien wurde ein Zusammenhang zwischen dem SNP309T>G und dem Erkrankungsrisiko untersucht: Für AML zeigte sich in Studien ein höheres Risiko für die Erkrankung bei Vorliegen des Polymorphismus (Ellis et al. 2008; Xiong et al. 2009; Phillips et al. 2010; Cingeetham et al. 2015; He et al. 2015), wohingegen sich für CML in einer Metaanalyse kein prognostischer Einfluss des Polymorphismus ergab (Benner et al. 2014). Bei Patienten mit MDS hatte der *MDM2*-SNP309T>G-Polymorphismus keinen prognostischen Einfluss auf Patienten und es zeigte sich kein Zusammenhang zu klinischen Parametern (Machado-Neto et al. 2012). Allerdings fanden McGraw et al. (2015b), dass der SNP309T>G-Polymorphismus in *MDM2* in Kombination mit dem Polymorphismus R72P in *TP53*, welcher ein geringeres Apoptose-induzierendes Potenzial nach sich zieht (Dumont et al. 2003), einen Einfluss auf das Überleben von Patienten ohne 5q-Deletion hatte. Diese Patienten weisen eine geringere Rate von *TP53*-Mutationen auf, welche in anderen Patientengruppen den Effekt der Polymorphismen verringern könnten. Es bliebe demnach in einer Gruppe von MDS-Patienten ohne *TP53*-Mutationen zu überprüfen, ob die beiden Polymorphismen SNP309T>G und R72P eine prognostische Rolle spielen.

Neben den genannten Mechanismen könnte ebenso eine Dysfunktion von Faktoren eine Rolle spielen, die *MDM2* positiv regulieren und damit eine Hemmung von *TP53* herbeiführen. Infrage kommen der Transkriptionsfaktor *NFAT1*, die Ubiquitin-Protease *USP7/HAUSP* und die Kinase *SGK1*, welche als positive Regulatoren von *MDM2* identifiziert wurden (Amato et al. 2009; Zhang et al. 2012). Aber obwohl für solide Tumoren bereits die Überexpression und Amplifikation der oben genannten Zielgene beschrieben wurde (Simon et al. 2007; Wasylishen und Lozano 2016), gibt es bisher keine Hinweise darauf bei hämatologischen Neoplasien. Aufgrund der weitreichenden Funktion der genannten Zielgene in zellulären Regulationsvorgängen (Kon et al. 2010; Mognol et al. 2016) stellt sich zudem die Frage, ob die Beeinflussung von humanen Neoplasien in erster Linie über die Dysfunktion des *TP53*-Signalweges geschieht oder aber andere zelluläre Mechanismen im Vordergrund stehen.

Weiterhin könnte auch der Verlust von negativen Regulatoren von *MDM2* eine Hemmung von *TP53* bewirken. Ein Beispiel dafür ist *ARF*: Das Genprodukt von *ARF* p19^{ARF} hemmt *MDM2* durch Bindung und Sequestration, wodurch *TP53* stabilisiert werden kann (Zhang et al. 1998; Honda und Yasuda 1999). Ein Verlust von *ARF* in vivo führt bei Mäusen zur beschleunigten Tumorigenese aufgrund einer geringeren *TP53*-Aktivität (Kamijo et al. 1997). Diese Verminderung der *TP53*-Aktivierung wurde bei vorhandener Deletion oder Mutation von *ARF* auch in humanen Zelllinien nachgewiesen (Zhang und Xiong 1999). Ebenso wurden Mutationen und Deletionen von *ARF* bereits in verschiedenen Tumoren gefunden (Brennan et al. 2013; Lee et al. 2014), so auch in einer Untergruppe des diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms (DLBCL), wo bei Vorliegen einer Deletion im Locus von *ARF* ein geringeres med. OS beobachtet wurde (Lenz et al. 2008). Für MDS und AML liegen noch keine Daten diesbezüglich vor.

Ein weiterer negativer Regulator von *MDM2* ist die Phosphorylase *ATM*: *ATM* liegt auf dem Chromosom 11q22-23 und kodiert für eine Kinase, die eine weitreichende Funktion in der Zellzykluskontrolle, der Regulation der DNA-Reparatur und der Apoptose besitzt (Stracker et al. 2013; Stagni et al. 2014), aber auch eine Rolle in der Regulation von *TP53* spielt: Einerseits wird durch *ATM*-abhängige Phosphorylierung von *MDM2* die Wechselwirkung von *MDM2* und *TP53* vermindert und andererseits in geringem Ausmaß der Abbau von *TP53* durch *ATM*-abhängige Phosphorylierung von *TP53* gesteuert (Maya et al. 2001; Gannon et al. 2012). Ein Funktionsverlust von *ATM* führte im Mausmodell zu einer verminderten Induktion von *TP53* und ging mit der Entwicklung von Tumoren einher (Barlow et al. 1997; Westphal et al. 1997). Auch bei humanen Neoplasien spielen *ATM*-Mutationen und -Deletionen eine Rolle (Stagni et al. 2014). So zum Beispiel bei Patienten mit CLL, wo eine Deletion der Chromosomenbande 11q22.3-23.1 mit einer Häufigkeit von ca. 20 % zu den häufigsten chromosomalen Aberrationen zählt und zudem einen entscheidenden negativen Prognoseparameter darstellt (Döhner et al. 1997; Döhner et al. 2000). Neben Deletionen werden bei Patienten mit CLL auch Mutationen von *ATM* (Schaffner et al. 1999; Guarini et al. 2012) und eine Verminderung des Proteinexpressionslevels (Starostik et al. 1998; Stankovic et al. 1999) gefunden. Pettitt et al. (2001) brachten diesen Funktionsverlust von *ATM* mit einer Dysfunktion von *TP53* in Verbindung. Bei MDS dagegen finden sich Deletionen des Chromosoms 11q nur selten (Haase et al. 2007) und haben, wenn sie isoliert auftreten, eine sehr günstige Prognose (Schanz et al. 2012). Es bleibt deshalb abzuwarten, ob eine Übertragbarkeit der Ergebnisse von lymphatischen Neoplasien auf myeloische Neoplasien möglich ist, zumal *ATM* in zahlreichen weiteren zellulären Regulationsmechanismen eine Rolle spielt

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass neben einer stärkeren *MDM2*-Aktivierung ebenso eine Alteration der *MDM2*-regulierenden Faktoren denkbar wäre, wobei negative Regulatoren von *MDM2* einen Funktionsverlust zeigen müssten und positive Regulatoren einen stärkere Aktivierung erfahren müssten, um *MDM2* zu aktivieren und somit die *TP53*-Aktivität herunter zu regulieren. Für verschiedene Tumoren wurden diese

Veränderungen bereits beschrieben und obwohl die Datenlage für hämatologische Neoplasien noch nicht ausreichend ist, wären einige dieser Veränderungen auch für hämatologische Tumoren und insbesondere für MDS denkbar.

Neben *MDM2* ist sein Homologon *MDMX* (oder *MDM4/HDMX*) ein wichtiger Regulator von *TP53*. *MDMX* liegt auf Chromosom 1q32.1 und hemmt *TP53* durch Bindung an seine Transaktivierungsdomäne (Shvarts et al. 1996; Toledo et al. 2006). Zusätzlich wirken *MDMX* und *MDM2* als Heterokomplex hemmend auf die *TP53*-Aktivität (Huang et al. 2011). In Studien wurde nachgewiesen, dass eine *MDMX*-Überexpression ebenso wie die *MDM2*-Überexpression zu einer Reduktion der *TP53*-Aktivität führt und bei verschiedenen Neoplasien, auch hämatologischen wie der AML, zu finden ist (Danovi et al. 2004; Tan et al. 2013). Als Ursache der Überexpression von *MDMX* fand sich in soliden und hämatologischen Neoplasien, wie z.B. auch Plasmozytomen, eine Amplifizierung der Chromosomenbande 1q32 (Riemenschneider et al. 2003; Fonseca et al. 2009; Harutyunyan et al. 2011; Herrero et al. 2016). Im Mausmodell führte die Überexpression von *MDMX* zur beschleunigten Entwicklung von Tumoren (Xiong et al. 2010) und auch in humanen Tumorzelllinien fanden Ramos et al. (2001) erhöhte Expressionsniveaus von *MDMX* bei normalem *TP53*-Status. Auch für AML-Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp konnte von Li et al. (2014) gezeigt werden, dass sie eine höhere Expression von *MDMX* bei verminderter Aktivität des *TP53*-Signalweges aufweisen. Diese Belege deuten darauf hin, dass eine *MDMX*-Überexpression auch bei MDS einen dem *TP53*-Verlust ähnlichen Effekt auslösen könnte. Dagegen spricht allerdings, dass bei Quintás-Cardama et al. (2016) hohe *MDMX*-Expressionslevel mit einem längeren med. OS für AML Patienten assoziiert waren im Vergleich zu Patienten mit hohen *MDM2*- und *TP53*-Expressionslevels. Wäre eine Dysfunktion im *TP53*-Signalweg vorhanden, wäre ein geringeres med. OS zu erwarten, es sei denn diese Patientengruppe zeigt ein besseres Therapieansprechen.

Ein weiteres Zielgen stellt *PPM1D*/WIP1 dar, welches auf Chromosom 17q23.2 für eine Phosphatase kodiert, die neben einer Aktivierung von Steroidhormonrezeptoren eine *TP53*-regulierende Funktion durch Dephosphorylierung ausübt (Lu et al. 2005; Proia et al. 2006; Chuman et al. 2008). Für Patienten mit soliden Tumoren wurden Veränderungen von *PPM1D* beschrieben, die durch eine höhere Aktivität der Phosphatase zu einer Inhibition von *TP53* führen und somit einen Zellzyklusarrest beenden und die Zellteilung begünstigen können (Lu et al. 2005). Die gesteigerte Aktivität des Proteins kann, wie für solide Tumore gezeigt, durch eine Amplifikation des Gens zustande kommen, welche das Expressionsniveau des Proteins steigert (Bulavin et al. 2002; Hu et al. 2010; Wasylshen und Lozano 2016), aber auch durch Mutationen von *PPM1D* im letzten Exon (Ruark et al. 2012; Akbari et al. 2014). Diese Mutationen führten zur Expression eines verkürzten Proteins mit einer gesteigerten Aktivität des *PPM1D*. *PPM1D*-Mutationen wurden von Genovese et al. (2014) in erhöhter Anzahl in einer Untersuchung zur klonalen Hämatopoese von unbestimmtem Potenzial (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*,

CHIP) nachgewiesen und einer Gruppe von Treibermutationen für die Entwicklung der klonalen Hämatopoese von unbestimmtem Potenzial zugeordnet. Auch bei Patienten mit MDS, insbesondere bei Patienten mit Therapie-assoziiertem MDS, wurden Mutationen von *PPM1D* gehäuft nachgewiesen (Lindsley et al. 2017). Als alleinige Mutation ohne gleichzeitige Mutation von *TP53* zeigten sie allerdings keinen negativen prognostischen Einfluss. Ob eine Assoziation zum Vorhandensein eines komplex aberranten Karyotyps besteht, ist noch unklar. Weitere Daten zu der Häufigkeit von *PPM1D*-Mutationen für Patienten mit MDS und komplex aberrantem Karyotyp sind nötig, um das Bild zu vervollständigen. Hierzu laufen aktuell Untersuchungen in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Haase (Eder et al. 2018).

CHK2 ist ein weiterer Regulator von *TP53*, der *TP53* durch Phosphorylierung und nachfolgende Auflösung von Komplexen mit *MDM2* stabilisiert und somit einen Zellzyklusarrest einleitet (Chehab et al. 2000; Shieh et al. 2000). *CHK2* liegt auf Chromosom 22q12.1 und wird durch DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung ATM-abhängig oder durch UV-Licht ATM-unabhängig aktiviert (Matsuoka et al. 1998; Brown et al. 1999). Shieh et al. (2000) zeigten, dass eine *CHK2* Überexpression zu einer *TP53*-Stabilisierung führt, wohingegen ein Verlust der Kinaseaktivität von *CHK2* eine geringere Expression von *TP53* bewirkt. Ein weiterer Hinweis darauf, dass ein *CHK2*-Verlust, einen ähnlichen Effekt wie ein *TP53*-Verlust haben kann, ist der Befund von Bell et al. (1999): Bei Patienten mit Li Fraumeni Syndrom ohne *TP53*-Mutation fanden sich stattdessen Mutationen von *CHK2*. Ebenso wurden in vielen humanen Tumoren Veränderungen von *CHK2* gefunden (Bartek und Lukas 2003; Antoni et al. 2007). Aktas et al. (2002) fanden auch bei Patienten mit MDS Mutationen von *CHK2*. Die Gruppe war mit 13 Patienten, von denen zwei Veränderungen im *CHK2* zeigten, allerdings sehr klein und der *TP53*-Mutationsstatus wurde bei Patienten mit *CHK2*-Veränderungen nicht überprüft, weshalb weitere Studien in diese Richtung nötig wären.

4.9.3 Effektoren von *TP53*

Es besteht ebenso die Möglichkeit, dass der *TP53*-Signalweg *downstream* von *TP53* von Veränderungen betroffen ist. Hier ist zum Beispiel *CDC20* nennen, welches sich auf Chromosom 1p34.1 befindet und für ein Protein kodiert, welches im *spindel assembly checkpoint* (SAC) in der Überleitung der Mitose zur Anaphase eine Rolle spielt. Es aktiviert den *anaphase promoting complex* (APC), welcher wiederum die Chromatidenspaltung in der Mitose ermöglicht. *TP53* hemmt *CDC20* transkriptionell und gewährleistet somit eine Verhinderung der Zellteilung z.B. bei DNA-Schäden (Banerjee et al. 2009; Wang et al. 2009). Eine Überexpression von *CDC20*, die bei soliden Tumoren gefunden wurde, führt zu vermehrter Zellteilung und ist mit einer chromosomalen Instabilität verknüpft (Mondal et al. 2007; Kidokoro et al. 2008; Kato et al. 2012; Choi et al. 2013; Wu et al. 2013; Gayyed et al. 2016). Von Genga et al. (2015) wurde gezeigt, dass auch bei MDS eine Überexpression von *CDC20* vorliegen kann. Eine vermehrte Expression des Gens war mit

einer höheren Anzahl der Dysplasien, einem komplex aberranten Karyotyp und schwerer Thrombozytopenie assoziiert. Das mediane Gesamtüberleben für Patienten mit einer starken Überexpression von *CDC20* war vermindert im Vergleich zu Patienten ohne oder mit geringer bis mittelstarker Überexpression. Eine vermehrte Expression liegt insbesondere bei normo- bis hyperzellulären Formen des MDS vor (Heredia et al. 2014). Aufgrund der *TP53*-abhängigen Regulation könnte *CDC20* ein weiteres Zielgen sein, dass durch Überexpression bei Patienten ohne *TP53*-Mutation einen ähnlichen Effekt wie ein *TP53*-Verlust auslösen könnte.

Ein weiteres Ziel der Induktion durch *TP53* ist *GADD45*. Es liegt auf Chromosom 1q31.1-2 (Hollander et al. 1993) und spielt in der Zellzykluskontrolle (Wang et al. 1999), der DNA-Reparatur (Smith et al. 1994) und der Apoptoseinduktion (Wang et al. 1999; Sheikh et al. 2000) eine Rolle. Eine Aktivierung erfolgt nach Einwirkung von ionisierender Strahlung *TP53*-abhängig (Papathanasiou et al. 1991; Carrier et al. 1994), aber auch *TP53*-unabhängig durch Induktoren, wie *BRC41* (Harkin et al. 1999). Im Mausmodell führte ein Knockout von *GADD45* zu genomischer Instabilität und verstärkter Tumorentwicklung nach Bestrahlung, ein Effekt, der sich auch bei einem *TP53*-Verlust findet (Hollander et al. 1999). In soliden Tumoren, aber auch in Leukämien führten unterschiedliche Veränderungen des *GADD45* zu einer geringeren Expression von *GADD45* (Wang et al. 2005; Higashi et al. 2006; Reddy et al. 2008; Liebermann et al. 2011), was darauf hinweist, dass eine verminderte Expression von *GADD45* die Tumorentwicklung fördern könnte. Dieser Mechanismus könnte aufgrund der *TP53*-abhängigen Induktion phänotypisch einen *TP53*-Verlust vortäuschen.

Auch bei p21, das durch das Gen *CDKN1A/WAF1/CIP1* kodiert wird, handelt es sich um ein unter anderem direkt durch *TP53* reguliertes Protein. Es kann durch die Induktion eines Zellzyklusstopps durch Inhibition von Cyclin-abhängigen Kinasen (CdK) die Proliferation von Zellen inhibieren (Harper et al. 1993; Xiong et al. 1993; Niculescu et al. 1998). Das kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 6p21.2 und ist in menschlichen Tumoren nur selten mutiert (Shiohara et al. 1994). Dagegen wurde bereits für viele solide Tumore eine verminderte Expression von p21 nachgewiesen, die mit einer schlechten Prognose einhergeht (Komiya et al. 1997; Lu et al. 1998; Zirbes et al. 2000; Mitomi et al. 2005). Auch bei Patienten mit MDS gibt es Hinweise darauf, dass das Expressionsniveau von p21 eine prognostische Rolle spielt: Zhao et al. (2013b) zeigten in einer Gruppe von MDS-Patienten ein geringeres Expressionslevel von p21 bei Hochrisikopatienten (IPSS $\geq 1,5$) als bei Niedrigrisikopatienten (IPSS $< 1,5$) und gesunden Kontrollen. Bei Patienten mit Veränderungen des Karyotyps zeigte sich ebenso eine geringere p21-Expression als bei Patienten mit normalem Karyotyp. Die geringere p21-Expression war mit einer höheren Transformationsrate zur AML und einem geringeren medianen Gesamtüberleben verknüpft. Dieser Einfluss auf die Prognose von MDS-Patienten ähnelt dem eines *TP53*-Verlustes. Es bleibt allerdings der Beweis zu erbringen, dass Patienten ohne

TP53-Mutation aber mit komplex aberranten Chromosomenanomalien eine geringere Expressionsrate von p21 aufweisen.

Statt einer *TP53*-Mutation könnte auch eine Deregulation der durch *TP53* regulierten Apoptose vorliegen. Diese wird durch das Zusammenspiel der Expression von proapoptotischen Faktoren wie *PUMA*, *Bax* und *Bak* und antiapoptotischen Faktoren wie *Bcl-2*, *Bcl-xL* und *Mcl-2* kontrolliert. Eine Deregulation wurde bereits bei soliden und hämatologischen Neoplasien gefunden (Reed 1996). So zeigte sich für verschiedene Lymphome eine verstärkte Expression des antiapoptotischen Faktors *Bcl-2* (Pezzella et al. 1990; Zutter et al. 1991). Bei Patienten mit AML war eine starke *Bcl-2*-Expression mit einem schlechteren Ansprechen auf eine Chemotherapie und einem kürzeren med. OS verknüpft (Campos et al. 1993; Bradbury et al. 1997). Bei Patienten mit MDS dagegen wird in frühen Stadien eine vermehrte Apoptose, in fortgeschrittenen Stadien eine verminderte Apoptose beobachtet (Yoshida und Mufti 1999; Span et al. 2007; Cazzola et al. 2013). Damit übereinstimmend fanden unterschiedliche Studien eine verstärkte Expression von antiapoptotischen Faktoren wie *Bcl-2* (Chromosom 18q21.3) und *Mcl-2* (Chromosom 1q21) in Knochenmarksstammzellen von Patienten mit fortgeschrittenem MDS (Boudard et al. 2002; Economopoulou et al. 2010). Dies deutet darauf hin, dass die Expression von Proteinen der *Bcl-2*-Familie in hämatologischen Neoplasien und auch in fortgeschrittenen Stadien des MDS zugunsten der antiapoptotischen Faktoren hin verschoben ist, wodurch ein längeres Überleben der malignen Zellen gewährleistet ist. Ob allerdings ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von *TP53*-Mutationen einerseits und den Expressionslevels von *Bcl-2* andererseits besteht, bleibt zu überprüfen.

5 Zusammenfassung

125 Patienten mit MDS, CMML und sekundärer AML nach MDS und komplex aberrantem Karyotyp wurden in einer retrospektiven Analyse umfassend anhand von FISH-Analysen des *TP53*-Locus in der Region 17p13, genomweiten SNP-A-Analysen und Mutationsanalysen der Exons 4 bis 10 von *TP53* mittels Sanger-Sequenzierung charakterisiert. Der komplex aberrante Karyotyp der Patienten wurde durch eine CBA nachgewiesen, wenn drei oder mehr zytogenetische Aberrationen vorlagen. In 75,2 % der Fälle wurde er durch mFISH bestätigt und weiter aufgeschlüsselt.

Insgesamt zeigte sich in 62,4 % der Fälle mindestens eine *TP53*-Veränderung. Molekulare *TP53*-Mutationen wurden bei 48,8 % der Patienten gefunden, zytogenetische *TP53*-Aberrationen in Form von 17p-Deletionen und CN-LOH im Locus von *TP53* bei 41,6 % der Patienten. Zwei Veränderungen des *TP53* gleichzeitig lagen bei 28,0 % der Patienten vor, eine einzelne molekulare *TP53*-Mutation bei 20,8 % der Patienten und eine einzelne zytogenetische Aberration des *TP53* bei 13,6 % der Patienten.

Die Patienten wurden in unterschiedliche Subgruppen anhand des *TP53*-Mutationsstatus aufgeteilt und miteinander verglichen. Dabei zeigten sich ein signifikant höherer Anteil an Frauen und ein signifikant niedrigeres Hämoglobinlevel in allen Gruppen mit *TP53*-Veränderungen. Patienten mit zytogenetischen und kombinierten, vermutlich biallelischen *TP53*-Veränderungen gehörten zu einem höheren Anteil der Gruppe der Hochrisikopatienten nach WHO-Klassifikation 2008, IPSS und IPSS-R an.

Zudem lag in allen Gruppen mit *TP53*-Veränderungen ein signifikant höheres Ausmaß der genetischen Instabilität vor, wenn sie mit Gruppen ohne *TP53*-Veränderung aber mit komplexen Chromosomenanomalien verglichen wurden. Die genetische Instabilität wurde gemessen an der Anzahl der CA aus dem Karyotyp, der Anzahl der Fusionen im Sinne von Bruchereignissen im mFISH und der Größe der TGA als Summe der Zugewinne und Verlust aus der SNP-A. Eine derart umfassende Dokumentation genetischer Instabilität in einer MDS-Kohorte mit komplexen Karyotypveränderungen mit und ohne *TP53*-Mutationen ist bisher unseres Wissens noch nicht publiziert worden. Die Assoziation von Veränderungen des *TP53* nicht nur mit einer höheren Anzahl der CA, sondern auch mit einem höheren Ausmaß der genetischen Instabilität ist ein Hinweis darauf, dass die schlechte Prognose dieser Patienten durch das höhere Ausmaß der genetischen Instabilität wesentlich mit beeinflusst wird.

In der Überlebensanalyse nach Kaplan und Meier hatten Veränderungen des *TP53* einen negativen Einfluss auf das Überleben der Patienten, unabhängig vom Typ der Veränderung (molekulare Mutation, zytogenetische Veränderung, kombinierte Veränderungen). Der Vergleich der einzelnen Gruppen mit *TP53*-Veränderungen untereinander erlangte dagegen

keinen signifikanten Unterschied. Weiterhin führten auch eine zunehmende Anzahl der CA und ein monosomaler Karyotyp zu einem verkürztem med. OS. Dabei war der monosomale Karyotyp mit einer höheren medianen Anzahl der CA assoziiert und kann daher nicht als unabhängiger Risikofaktor gesehen werden. *TP53*-Veränderungen zeigten nur in Kombination einen negativen Einfluss auf das Überleben von Patienten mit fünf oder mehr CA, nicht aber die alleinige molekulare *TP53*-Mutation. Dies spricht gegen einen entscheidenden negativen prognostischen Einfluss der alleinigen molekularen *TP53*-Mutation bei Patienten mit MDS und hochkomplexen Anomalien. Weiterhin fand sich nur bei Patienten ohne monosomalen Karyotyp ein negativer Einfluss auf das Überleben bei Vorliegen kombinierter *TP53*-Veränderungen, aber auch bei Vorliegen einer einzelnen molekularen Mutation. Patienten mit *TP53*-Veränderungen profitierten von der Therapie mit DMTI verglichen mit Patienten, die keine Therapie mit DMTI erhalten hatten. Die Prognose der Patienten blieb trotz DMTI-Therapie allerdings signifikant schlechter als das von Patienten ohne *TP53*-Veränderung. Dagegen zeigte sich kein Unterschied im Überleben von Patienten nach DMTI-Therapie abhängig von einer molekularen *TP53*-Mutation, was wiederum darauf hinweist, dass die molekulare *TP53*-Mutation alleine kein unabhängiger prognostischer Parameter ist.

Zur Herausarbeitung unabhängiger Prognosefaktoren wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Hierbei wurden die *TP53*-Veränderungen, die Anzahl der CA mit einem Grenzwert von fünf CA, das Alter ≥ 72 Jahre und die Anzahl der Blasten im KM bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps eingeteilt in Gruppen gemäß dem IPSS sowie das Vorliegen einer Anämie gemäß der Definition des IPSS als Prognosefaktoren einbezogen. Die molekulare *TP53*-Mutation zeigte dabei schließlich keinen unabhängigen prognostischen Einfluss, da sich im multivariaten Modell keine Signifikanz und sich nur ein geringgradiger prognostischer Einfluss für die einzelne molekulare *TP53*-Mutation ergab. Die Kombination der *TP53*-Veränderungen (*TP53*-Mutation, del(17p), CN-LOH) dagegen war in einem zweiten Modell der multivariaten Analyse (und in den weiterentwickelten Modellen) der stärkste und ein signifikanter Prognosefaktor. Der Einfluss durch das Vorliegen einer Anämie gemäß der Definition des IPSS stellte den zweitstärksten prognostischen Faktor dar, gefolgt von einer Blastenzahl $> 20\%$ im KM bei Erstdiagnose des komplexen Karyotyps. Die Anzahl der CA als zytogenetischer Parameter hatte einen deutlichen Einfluss auf das Überleben der Patienten, erlangte aber keine Signifikanz. Somit lässt sich unter Berücksichtigung der drei signifikanten prognostischen Parameter „Anämie gemäß der Definition des IPSS (Hb < 10 g/dl)“, „jegliche *TP53*-Anomalie (Kopienzahl- und/oder molekulare Mutationen)“ und „Blastenzahl im KM $> 20\%$ bei ED komplex“ ein einfaches Prognosesystem zur Differenzierung prognostischer Subgruppen innerhalb der heterogenen Patientenkohorte mit komplexen Chromosomenanomalien etablieren.

Zusammenfassend lässt sich hieraus schließen, dass neben der molekulargenetischen Analyse die zytogenetische Analyse weiterhin eine entscheidende diagnostische Methode und ein wichtiges prognostisches Kriterium bleibt.

Um eine noch umfassendere Beurteilung der Rolle von *TP53* in hämatologischen Neoplasien zu erreichen, ist eine Beurteilung von Expressionslevels des *TP53*, Spleißvarianten und epigenetischen Veränderungen notwendig. Weiterhin ist es möglich, dass auf Ebene des *TP53*-Signalwegs Veränderungen vorkommen, die eine Dysfunktion des *TP53*-Signalwegs erzeugen. Hierfür wäre eine Analyse von Regulatoren des *TP53* wie *MDM2* und dessen Regulatoren, *PPM1D*/ *WIP1* und *CHK2*, aber auch von Effektoren des *TP53*, z.B. *CDC20*, *GADD45*, p21 und von Apoptose-regulierenden Faktoren nötig.

6 Literaturverzeichnis

- 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
- Aktas D, Arno MJ, Rassool F, Mufti GJ (2002): Analysis of CHK2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 26, 985–987
- Amato R, D'Antona L, Porciatti G, Agosti V, Menniti M, Rinaldo C, Costa N, Bellacchio E, Mattarocci S, Fuiano G, et al. (2009): Sgk1 activates MDM2-dependent p53 degradation and affects cell proliferation, survival, and differentiation. *J Mol Med* 87, 1221- 1239
- Angelucci E, Li J, Greenberg PL, Depei W, Hou M, Figueroa EM, Rodriguez G, Dong X, Ghosh J, Borntsein O, et al. (2018): Safety and Efficacy, Including Event-Free Survival, of Deferasirox Versus Placebo in Iron-Overloaded Patients with Low- and Int-1-Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS): Outcomes from the Randomized, Double-Blind Teleso Study. *Blood* 2018 132, 234
- Antoni L, Sodha N, Collins I, Garrett MD (2007): CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy – two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer* 7, 925–936
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Beau MML, 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
- Aul C, Gattermann N, Schneider W (1992): Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 82, 358–367
- Bally C, Adès L, Renneville A, Sebert M, Eclache V, Preudhomme C, Mozziconacci M-J, de The H, Lehmann-Che J, Fenaux P (2014): Prognostic value of TP53 gene mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia treated with azacitidine. *Leuk Res* 38, 751–755
- Banerjee T, Nath S, Roychoudhury S (2009): DNA damage induced p53 downregulates Cdc20 by direct binding to its promoter causing chromatin remodeling. *Nucleic Acids Res* 37, 2688–2698
- Barlow C, Brown KD, Deng C-X, Tagle DA, Wynshaw-Boris A (1997): Atm selectively regulates distinct p53-dependent cell-cycle checkpoint and apoptotic pathways. *Nat Genet* 17, 453–456
- Bartek J, Lukas J (2003): Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421–429
- Bejar R (2014): Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 99, 956–64
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, Ebert BL (2011): Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 364, 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
- Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DCR, Shannon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, et al. (1999): Heterozygous Germ Line *bCHK2* Mutations in Li-Fraumeni Syndrome. *Science* 286, 2528–2531
- Benner A, Mansouri L, Rossi D, Majid A, Willander K, Parker A, Bond G, Pavlova S, Nüchel H, Merkel O, et al. (2014): MDM2 promotor polymorphism and disease characteristics in chronic lymphocytic leukemia: results of an individual patient data-based meta-analysis. *Haematologica* 99, 1285–1291
- Bezerra MF, Coelho-Silva JL, Nascimento JC, Benicio MT, Rocha CR, Machado CG, Rego EM, Bezerra MA, Lucena-Araujo AR, Beltrão EI (2017): Association between the TP53 Arg72Pro polymorphism and clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 102, e43–e46
- Bodoor K, Haddad Y, Alkhateeb A, Al-Abbadi A, Dowairi M, Magableh A, Bsoul N, Ghabkari A (2014): DNA hypermethylation of cell cycle (p15 and p16) and apoptotic (p14, p53, DAPK and TMS1) genes in peripheral blood of leukemia patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 15, 75–84
- Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, et al. (2004): A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Promoter Attenuates the p53 Tumor Suppressor Pathway and Accelerates Tumor Formation in Humans. *Cell* 119, 591–602
- Boudard D, Vasselon C, Berthéas M-F, Jaubert J, Mounier C, Reynaud J, Viallet A, Chautard S, Guyotat D, Campos L (2002): Expression and prognostic significance of Bcl-2 family proteins in myelodysplastic syndromes: Bcl-2 Proteins in Myelodysplastic Syndromes. *Am J Hematol* 70, 115–125
- Bradbury DA, Zhu YM, Russell NH (1997): Bcl-2 Expression in Acute Myeloblastic Leukaemia: Relationship with Autonomous Growth and CD34 Antigen Expression. *Leuk Lymphoma* 24, 221–228
- 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
- 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
- Breems DA, Van Putten WLJ, De Greef GE, Van Zelderren-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KBJ, Mellink CHM, Nieuwint A, Jotterand M, Hagemeyer A, Beverloo HB, Löwenberg B (2008): Monosomal Karyotype in Acute Myeloid Leukemia: A Better Indicator of Poor Prognosis Than a Complex Karyotype. *J Clin Oncol* 26, 4791–4797

- Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, et al. (2013): The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* 155, 462–477
- Brown AL, Lee C-H, Schwarz JK, Mitiku N, Piwnica-Worms H, Chung JH (1999): A human Cds1-related kinase that functions downstream of ATM protein in the cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3745–3750
- Bueso-Ramos CE, Yang Y, deLeon E, McCown P, Stass SA, Albitar M (1993): The human MDM-2 oncogene is overexpressed in leukemias. *Blood* 82, 2617–2623
- Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, Kauraniemi P, Phillips C, Amundson SA, Ambrosino C, Sauter G, Nebreda AR, Anderson CW, et al. (2002): Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet* 31, 210–215
- Buuren S van, Groothuis-Oudshoorn K (2011): MICE : Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *J Stat Softw* 45, 1–67
- Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, Archimbaud E, Magaud JP, Guyotat D (1993): High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 81, 3091–3096
- Carrier F, Smith ML, Bae I, Kilpatrick KE, Lansing TJ, Chen CY, Engelstein M, Friend SH, Henner WD, Gilmer TM (1994): Characterization of human Gadd45, a p53-regulated protein. *J Biol Chem* 269, 32672–32677
- Cazzola M, Malcovati L (2005): Myelodysplastic syndromes—coping with ineffective hematopoiesis. *N Engl J Med* 352, 536–538
- Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L (2013): The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood* 122, 4021–4034
- Chang CK, Zhao YS, Xu F, Guo J, Zhang Z, He Q, Wu D, Wu LY, Su JY, Song LX, et al. (2016): TP53 mutations predict decitabine-induced complete responses in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 176, 600–608
- Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD (2000): Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53. *Genes Dev* 14, 278–288
- Choi J-W, Kim Y, Lee J-H, Kim Y-S (2013): High expression of spindle assembly checkpoint proteins CDC20 and MAD2 is associated with poor prognosis in urothelial bladder cancer. *Virchows Arch* 463, 681–687
- Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J (2001): Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 19, 1405–1413
- Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J (2004): Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood* 104, 1474–1481
- Chuman Y, Kurihashi W, Mizukami Y, Nashimoto T, Yagi H, Sakaguchi K (2008): PPM1D430, a Novel Alternative Splicing Variant of the Human PPM1D, can Dephosphorylate p53 and Exhibits Specific Tissue Expression. *J Biochem (Tokyo)* 145, 1–12

- Chun K, Hagemeijer A, Iqbal A, Slovak ML (2010): Implementation of standardized international karyotype scoring practices is needed to provide uniform and systematic evaluation for patients with myelodysplastic syndrome using IPSS criteria: An International Working Group on MDS Cytogenetics Study. *Leuk Res* **34**, 160–165
- Chung YJ, Robert C, Gough SM, Rassool FV, Aplan PD (2014): Oxidative stress leads to increased mutation frequency in a murine model of myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* **38**, 95–102
- Cingeetham A, Vuree S, Jiwatani S, Kagita S, Dunna NR, Meka PB, Gorre M, Annamaneni S, Digumarti R, Sinha S, Satti V (2015): Role of the MDM2 Promoter Polymorphism (-309T>G) in Acute Myeloid Leukemia Development. *Asian Pac J Cancer Prev* **16**, 2707–2712
- Cluzeau T, Moreilhon C, Mounier N, Karsenti JM, Gastaud L, Garnier G, Re D, Montagne N, Gutnecht J, Auberger P, et al. (2013): Total genomic alteration as measured by SNP-array-based molecular karyotyping is predictive of overall survival in a cohort of MDS or AML patients treated with azacitidine. *Blood Cancer J* **3**, e155
- Dahabreh IJ, Linardou H, Bouzika P, Varvarigou V, Murray S (2010): TP53 Arg72Pro polymorphism and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* **19**, 1840–1847
- Danovi D, Meulmeester E, Pasini D, Migliorini D, Capra M, Frenk R, de Graaf P, Francoz S, Gasparini P, Gobbi A, et al. (2004): Amplification of Mdmx (or Mdm4) Directly Contributes to Tumor Formation by Inhibiting p53 Tumor Suppressor Activity. *Mol Cell Biol* **24**, 5835–5843
- Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P (1997): 11q Deletions Identify a New Subset of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Characterized by Extensive Nodal Involvement and Inferior Prognosis. *Blood* **89**, 2516–2522
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P (2000): Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **343**, 1910–1916
- Dumont P, Leu JI-J, Della Pietra AC, George DL, Murphy M (2003): The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* **33**, 357–365
- Economopoulou C, Pappa V, Papageorgiou S, Kontsioti F, Economopoulou P, Charitidou E, Girkas K, Kapsimali V, Papasteriadi C, Tsirigotis P, et al. (2010): Cell cycle and apoptosis regulatory gene expression in the bone marrow of patients with de novo myelodysplastic syndromes (MDS). *Ann Hematol* **89**, 349–358
- Eder L, Ganster C, Shirneshan K, Schaab R, Martin R, Dierks S, Haase D (2018): Somatic mutations in PPM1D and TP53 in patients with myelodysplastic syndromes and complex aberrations. *Oncol Res Treat* **41**, 95–96
- Ellis NA, Huo D, Yildiz O, Worrillow LJ, Banerjee M, Le Beau MM, Larson RA, Allan JM, Onel K (2008): MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro interact to alter therapy-related acute myeloid leukemia susceptibility. *Blood* **112**, 741–749
- Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, et al. (2009): Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* **10**, 223–232

- Fonseca R, Bergsagel P, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart A, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S, et al. (2009): International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 23, 2210–2221
- Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A (2016): Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am J Hematol* 91, 76–89
- Gannon HS, Woda BA, Jones SN (2012): ATM phosphorylation of Mdm2 Ser394 regulates the amplitude and duration of the DNA damage response in mice. *Cancer Cell* 21, 668–679
- Ganster C, Kämpfe D, Jung K, Bräulke 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
- Gattermann N (2018): Iron overload in myelodysplastic syndromes (MDS). *Int J Hematol* 107, 55–63
- Gayyed MF, El-Mağsoud NMRA, Tawfik ER, Gelany SAAE, Rahman MFA (2016): A comprehensive analysis of CDC20 overexpression in common malignant tumors from multiple organs: its correlation with tumor grade and stage. *Tumor Biol* 37, 749–762
- Genga KR, Filho FD, Ferreira FV, de Sousa JC, Studart FS, Magalhães SM, Heredia FF, Pinheiro RF (2015): Proteins of the mitotic checkpoint and spindle are related to chromosomal instability and unfavourable prognosis in patients with myelodysplastic syndrome. *J Clin Pathol* 68, 381–387
- 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 AAN, Germing U, Haase S, Hildebrandt B, Schlegelberger B, Schoch C, Wilkens L, Heinsch M, Willems H, Aivado M, Aul C (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 P, 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
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994): Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Res* 54, 4855–4878
- Guarini A, Marinelli M, Tavolaro S, Bellacchio E, Magliozzi M, Chiaretti S, De Propriis MS, Peragine N, Santangelo S, Paoloni F, et al. (2012): ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica* 97, 47–55
- Haase D (2008): Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 87, 515–526
- 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, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis AA, 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 C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T (2008): Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 22, 1539–1541
- 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
- Hainaut P, Hernandez T, Robinson A, Rodriguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, Harris CC, Montesano R (1998): IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* 26, 205–213
- Harkin DP, Bean JM, Miklos D, Song Y-H, Truong VB, Englert C, Christians FC, Ellisen LW, Maheswaran S, Oliner JD, Haber DA (1999): Induction of GADD45 and JNK/SAPK-Dependent Apoptosis following Inducible Expression of BRCA1. *Cell* 97, 575–586
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805–816
- Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R (2011): p53 Lesions in Leukemic Transformation. *N Engl J Med* 364, 488–490
- He X, Chen P, Yang K, Liu B, Zhang Y, Wang F, Guo Z, Liu X, Lou J, Chen H (2015): Association of MDM2 Polymorphism with Risk and Prognosis of Leukemia: A Meta-Analysis. *Acta Haematol* 133, 365–371
- Heredia FF, de Sousa JC, Junior HLR, Carvalho AF, Magalhaes SMM, Pinheiro RF (2014): Proteins related to the spindle and checkpoint mitotic emphasize the different pathogenesis of hypoplastic MDS. *Leuk Res* 38, 218–224
- Herrero AB, Rojas EA, Misiewicz-Krzeminska I, Krzeminski P, Gutiérrez NC (2016): Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci* 17, 2003
- Higashi H, Vallböhmer D, Warnecke-Eberz U, Hokita S, Xi H, Brabender J, Metzger R, Baldus SE, Natsugoe S, Aikou T, et al. (2006): Down-regulation of Gadd45 Expression is associated with Tumor Differentiation in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res* 26, 2143–2147
- Hollander MC, Alamo I, Jackman J, Wang MG, McBride OW, Fornace AJ (1993): Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage. *J Biol Chem* 268, 24385–24393
- Hollander MC, Sheikh MS, Bulavin DV, Lundgren K, Augeri-Henmueller L, Shehee R, Molinaro TA, Kim KE, Tolosa E, Ashwell JD, et al. (1999): Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet* 23, 176–184
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991): p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49–53

- Honda R, Yasuda H (1999): Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J* 18, 22–27
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H (1997): Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420, 25–27
- Horiike S, Kita-Sasai Y, Nakao M, Taniwaki M (2003): Configuration of the TP53 gene as an independent prognostic parameter of myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 44, 915–22
- Hothorn T, Hornik K, Wiel MA van de, Zeileis A (2006): A Lego System for Conditional Inference. *Am Stat* 60, 257–263
- Hothorn T, Hornik K, Wiel MA van de, Zeileis A (2008): Implementing a Class of Permutation Tests: The COIN Package. *J Stat Softw* 28 (8), 1–23
- Hu W, Feng Z, Modica I, Klimstra DS, Song L, Allen PJ, Brennan MF, Levine AJ, Tang LH (2010): Gene Amplifications in Well-Differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumors Inactivate the p53 Pathway. *Genes Cancer* 1, 360–368
- Huang L, Yan Z, Liao X, Li Y, Yang J, Wang Z-G, Zuo Y, Kawai H, Shadfan M, Ganapathy S, Yuan Z-M (2011): The p53 inhibitors MDM2/MDMX complex is required for control of p53 activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12001–12006
- Iafraite AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C (2004): Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36, 949–951
- Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM (1986): Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320, 84–85
- Jädersten M, Malcovati L, Dybedal I, Giovanni Della Porta M, Invernizzi R, Montgomery SM, Pascutto C, Porwit A, Cazzola M, Hellström-Lindberg E (2008): Erythropoietin and Granulocyte-Colony Stimulating Factor Treatment Associated With Improved Survival in Myelodysplastic Syndrome. *J Clin Oncol* 26, 3607–3613
- Jädersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Göhring G, Hedlund A, Hast R, Schlegelberger B, Porwit A, et al. (2011): TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol* 29, 1971–9
- Jasek M, Gondek LP, Bejanyan N, Tiu R, Huh J, Theil KS, O’Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP (2010): TP53 mutations in myeloid malignancies are either homozygous or hemizygous due to copy number-neutral loss of heterozygosity or deletion of 17p. *Leukemia* 24, 216–219
- Jha AK, Nikbakht M, Jain V, Sehgal A, Capalash N, Kaur J (2012): Promoter hypermethylation of p73 and p53 genes in cervical cancer patients among north Indian population. *Mol Biol Rep* 39, 9145–9157
- Jiang D-K, Yao L, Ren W-H, Wang W-Z, Peng B, Yu L (2011): TP53 Arg72Pro polymorphism and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Med Oncol* 28, 1129–1135
- Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A (1995): Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206–208
- Jones SN, Hancock AR, Vogel H, Donehower LA, Bradley A (1998): Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15608–15612

- Juven T, Barak Y, Zauberman A, George DL, Oren M (1993): Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene* **8**, 3411–3416
- Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, Grosveld G, Sherr CJ (1997): Tumor Suppression at the Mouse INK4a Locus Mediated by the Alternative Reading Frame Product p19 ARF. *Cell* **91**, 649–659
- Kaneko H, Misawa S, Horiike S, Nakai H, Kashima K (1995): TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. *Blood* **85**, 2189–93
- Kang JH, Kim SJ, Noh DY, Park IA, Choe KJ, Yoo OJ, Kang HS (2001): Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab Invest* **81**, 573–579
- Kantarjian HM, Keating MJ, Walters RS, Smith TL, Cork A, McCredie KB, Freireich EJ (1986): Therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome: clinical, cytogenetic, and prognostic features. *J Clin Oncol* **4**, 1748–1757
- Kato T, Daigo Y, Aragaki M, Ishikawa K, Sato M, Kaji M (2012): Overexpression of CDC20 predicts poor prognosis in primary non-small cell lung cancer patients. *J Surg Oncol* **106**, 423–430
- Kidokoro T, Tanikawa C, Furukawa Y, Katagiri T, Nakamura Y, Matsuda K (2008): CDC20, a potential cancer therapeutic target, is negatively regulated by p53. *Oncogene* **27**, 1562–1571
- Killick SB (2017): Iron chelation therapy in low risk myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* **177**, 375–387
- Kita-Sasai Y, Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Kobayashi M, Nakao M, Nakagawa H, Fujii H, Taniwaki M (2001): International prognostic scoring system and TP53 mutations are independent prognostic indicators for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* **115**, 309–312
- Knudson AG (1971): Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 820–823
- Komiya T, Hosono Y, Hirashima T, Masuda N, Yasumitsu T, Nakagawa K, Kikui M, Ohno A, Fukuoka M, Kawase I (1997): p21 expression as a predictor for favorable prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* **3**, 1831–1835
- Kon N, Kobayashi Y, Li M, Brooks C, Ludwig T, Gu W (2010): Inactivation of HAUSP in vivo modulates p53 function. *Oncogene* **29**, 1270–1279
- Kowarik A, Templ M (2016): Imputation with the R Package VIM. *J Stat Softw* **74** (7), 1–16
- Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, Mohamedali AM, Krishnamurthy P, Lea NC, Gäken J, Pennaneach C, Ireland R, Czepulkowski B, et al. (2013): TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol* **160**, 660–72
- Lai JL, Preudhomme C, Zandecki M, Flactif M, Vanrumbeke M, Lepelley P, Wattel E, Fenaux P (1995): Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia* **9**, 370–381

- Le Beau MM, Albain KS, Larson RA, Vardiman JW, Davis EM, Blough RR, Golomb HM, Rowley JD (1986): Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol* **4**, 325–345
- Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B (1993): p53 Mutation and MDM2 Amplification in Human Soft Tissue Sarcomas. *Cancer Res* **53**, 2231–2234
- Lee W, Teckie S, Wiesner T, Ran L, Prieto Granada CN, Lin M, Zhu S, Cao Z, Liang Y, Sboner A, et al. (2014): PRC2 is recurrently inactivated through EED or SUZ12 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Nat Genet* **46**, 1227–1232
- Lenz G, Wright GW, Emre NCT, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, Carty S, Lam LT, Shaffer AL, Xiao W, et al. (2008): Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13520–13525
- Li L, Tan Y, Chen X, Xu Z, Yang S, Ren F, Guo H, Wang X, Chen Y, Li G, Wang H (2014): MDM4 Overexpressed in Acute Myeloid Leukemia Patients with Complex Karyotype and Wild-Type TP53. *PLoS ONE* **9** (11)
- Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W (2003): Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* **302**, 1972–1975
- Liebermann DA, Tront JS, Sha X, Mukherjee K, Alisha-Mohamed-Hadley, Hoffman B (2011): Gadd45 Stress Sensors in Malignancy and Leukemia. *Crit Rev Oncog* **16**, 129–140
- 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
- List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, Powell B, Greenberg P, Thomas D, Stone R, et al. (2006): Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* **355**, 1456–1465
- Liu D, Ou L, Clemenson GD, Chao C, Lutske ME, Zambetti GP, Gage FH, Xu Y (2010): Puma is required for p53-induced depletion of adult stem cells. *Nat Cell Biol* **12**, 993–998
- Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Liu Y, Huang G, Di Giandomenico S, Lee JM, Deblasio A, Menendez S, et al. (2009): p53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence. *Cell Stem Cell* **4**, 37–48
- Liu Z-H, Bao E-D (2013): Quantitative assessment of the association between TP53 Arg72Pro polymorphism and bladder cancer risk. *Mol Biol Rep* **40**, 2389–2395
- Lu X, Toki T, Konishi I, Nikaido T, Fujii S (1998): Expression of p21WAF1/CIP1 in adenocarcinoma of the uterine cervix: a possible immunohistochemical marker of a favorable prognosis. *Cancer* **82**, 2409–2417
- Lu X, Nguyen T-A, Donehower LA (2005): Reversal of the ATM/ATR-mediated DNA damage response by the oncogenic phosphatase PPM1D. *Cell Cycle* **4**, 1060–1064
- Lukashchuk N, Vousden KH (2007): Ubiquitination and Degradation of Mutant p53. *Mol Cell Biol* **27**, 8284–8295
- Machado-Neto JA, Traina F, De Melo Campos P, Andreoli-Risso MF, Costa FF, Olalla Saad ST (2012): Lack of association between MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro polymorphisms with clinical outcomes in myelodysplastic syndrome. *Neoplasma* **59**, 530–535

- Malcovati L, Porta MGD, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E, Passamonti F, Arcaini L, Maffioli M, Bernasconi P, et al. (2005): Prognostic Factors and Life Expectancy in Myelodysplastic Syndromes Classified According to WHO Criteria: A Basis for Clinical Decision Making. *J Clin Oncol* 23, 7594–7603
- Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S, et al. (2007): Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 25, 3503–3510
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ (1998): Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282, 1893–1897
- Mauritzson N, Albin M, Rylander L, Billström R, Ahlgren T, Mikoczy Z, Björk J, Strömberg U, Nilsson PG, Mitelman F, et al. (2002): Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. *Leukemia* 16, 2366–2378
- Maya R, Balass M, Kim S-T, Shkedy D, Leal J-FM, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, et al. (2001): ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* 15, 1067–1077
- McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (Hrsg.): *ISCN 2016: an international system for human cytogenomic nomenclature*, Karger, Basel 2016
- McGraw KL, Zhang LM, Rollison DE, Basiorka AA, Fulp W, Rawal B, Jerez A, Billingsley DL, Lin HY, Kurtin SE, et al. (2015a): The relationship of TP53 R72P polymorphism to disease outcome and TP53 mutation in myelodysplastic syndromes. *Blood Cancer J* 5, e291
- McGraw KL, Cluzeau T, Sallman DA, Basiorka AA, Irvine BA, Zhang L, Epling-Burnette PK, Rollison DE, Mallo M, Sokol L, et al. (2015b): TP53 and MDM2 single nucleotide polymorphisms influence survival in non-del(5q) myelodysplastic syndromes. *Oncotarget* 6, 34437–34445
- Mishra A, Anasetti C (2016): Selection of Patients With Myelodysplastic Syndrome for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 16, S49–S52
- Mitomi H, Mori A, Kanazawa H, Nishiyama Y, Ihara A, Otani Y, Sada M, Kobayashi K, Igarashi M (2005): Venous invasion and down-regulation of p21(WAF1/CIP1) are associated with metastasis in colorectal carcinomas. *Hepatogastroenterology* 52, 1421–1426
- Mognol GP, Carneiro FRG, Robbs BK, Faget DV, Viola JPB (2016): Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death Dis* 7, e2199
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992): The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237–1245
- Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J (1998): The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 26, 3453–3459
- Mondal G, Sengupta S, Panda CK, Gollin SM, Saunders WS, Roychoudhury S (2007): Overexpression of Cdc20 leads to impairment of the spindle assembly checkpoint and aneuploidization in oral cancer. *Carcinogenesis* 28, 81–92

- Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G (1995): Rescue of early embryonic lethality in *mdm2*-deficient mice by deletion of *p53*. *Nature* 378, 203–206
- Muller PAJ, Vousden KH (2013): *p53* mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 15, 2–8
- Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C, Gattermann N, Aul C, Haas R, Germing U (2011): Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk Res* 35, 1591–1596
- Niculescu AB, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI (1998): Effects of *p21Cip1/Waf1* at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: *pRb* is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 18, 629–643
- Ofir-Rosenfeld Y, Boggs K, Michael D, Kastan MB, Oren M (2008): Mdm2 Regulates *p53* mRNA Translation through Inhibitory Interactions with Ribosomal Protein L26. *Mol Cell* 32, 180–189
- Onkopedia — Myelodysplastische Syndrome (MDS). Hofmann WK, Platzbecker U, Götze K, Stauder R, Passweg J, Germing U, DGHO, o. O. 2016, <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/myelodysplastische-syndrome-mds>; Zugriff am 16.07.2017
- Pant V, Quintás-Cardama A, Lozano G (2012): The *p53* pathway in hematopoiesis: lessons from mouse models, implications for humans. *Blood* 120, 5118–5127
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, Yoon CJ, Ellis P, Wedge DC, Pellagatti A, others (2013): Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 122, 3616–3627
- Papageli PC, Kortsaris AC, Matsouka PT (2003): Aberrant methylation of *c-myc* and *c-fos* protooncogenes and *p53* tumor suppressor gene in myelodysplastic syndromes and acute non-lymphocytic leukemia. *J BUON* 8, 341–350
- Papathanasiou MA, Kerr NC, Robbins JH, McBride OW, Alamo I, Barrett SF, Hickson ID, Fornace AJ (1991): Induction by ionizing radiation of the *gadd45* gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C. *Mol Cell Biol* 11, 1009–1016
- Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, Cawley JC, Taylor AMR, Stankovic T (2001): *p53* dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of *ATM* as an alternative to *TP53* mutation. *Blood* 98, 814–822
- Pezzella F, Tse AG, Cordell JL, Pulford KA, Gatter KC, Mason DY (1990): Expression of the *bcl-2* oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 137, 225–232
- Phillips CL, Gerbing R, Alonzo T, Perentesis JP, Harley IT, Meshinchi S, Bhatla D, Radloff G, Davies SM (2010): MDM2 Polymorphism Increases Susceptibility to Childhood Acute Myeloid Leukemia: A Report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 55, 248–253
- Post SM, Quintás-Cardama A, Pant V, Iwakuma T, Hamir A, Jackson JG, Maccio DR, Bond GL, Johnson DG, Levine AJ, Lozano G (2010): A high-frequency regulatory polymorphism in the *p53* pathway accelerates tumor development. *Cancer Cell* 18, 220–230
- Preudhomme C, Fenaux P (1997): The clinical significance of mutations of the *P53* tumour suppressor gene in haematological malignancies. *Br J Haematol* 98, 502–511

- Proia DA, Nannenga BW, Donehower LA, Weigel NL (2006): Dual Roles for the Phosphatase PPM1D in Regulating Progesterone Receptor Function. *J Biol Chem* 281, 7089–7101
- Quintás-Cardama A, Hu C, Qutub A, Qiu YH, Zhang X, Post SM, Zhang N, Coombes K, Kornblau SM (2016): p53 pathway dysfunction is highly prevalent in acute myeloid leukemia independent of TP53 mutational status. *Leukemia*
- R Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna 2015 abgerufen von: <https://www.R-project.org>
- Ramos YFM, Stad R, Attema J, Peltenburg LTC, Eb AJ van der, Jochemsen AG (2001): Aberrant Expression of HDMX Proteins in Tumor Cells Correlates with Wild-Type p53. *Cancer Res* 61, 1839–1842
- Reddy SP, Britto R, Vinnakota K, Aparna H, Sreepathi HK, Thota B, Kumari A, Shilpa BM, Vrinda M, Umesh S, et al. (2008): Novel Glioblastoma Markers with Diagnostic and Prognostic Value Identified through Transcriptome Analysis. *Clin Cancer Res* 14, 2978–2987
- Reed JC (1996): Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst Mit* 97, 72–100
- Riemenschneider MJ, Knobbe CB, Reifenberger G (2003): Refined mapping of 1q32 amplicons in malignant gliomas confirms MDM4 as the main amplification target. *Int J Cancer* 104, 752–757
- Ruark E, Snape K, Humburg P, Loveday C, Bajrami I, Brough R, Rodrigues DN, Renwick A, Seal S, Ramsay E, et al. (2012): Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. *Nature* 493, 406–410
- Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, Habdank M, Kugler C-M, Holzmann K, Gaidzik VI, et al. (2012): TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood* 119, 2114–2121
- Saft L, Karimi M, Ghaderi M, Matolcsy A, Mufti GJ, Kulasekararaj A, Göhring G, Giagounidis A, Selleslag D, Muus P, et al. (2014): p53 protein expression independently predicts outcome in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes with del(5q). *Haematologica* 99, 1041–1049
- 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
- Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Döhner H, Lichter P (1999): Somatic *ATM* Mutations Indicate a Pathogenic Role of ATM in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 94, 748–753
- 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

- Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, Grau J, Hildebrandt B, Slovak ML, Ohyashiki K, et al. (2013): Monosomal karyotype in MDS: explaining the poor prognosis? *Leukemia* 27, 1988–1995
- Sheikh MS, Hollander MC, Fornace AJ (2000): Role of Gadd45 in apoptosis. *Biochem Pharmacol* 59, 43–45
- Shieh S-Y, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C (2000): The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14, 289–300
- Shiohara M, El-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, Chen DL, Vogelstein B, Koeffler HP (1994): Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 84, 3781–3784
- Shvarts A, Steegenga WT, Riteco N, van Laar T, Dekker P, Bazuine M, van Ham RC, van der Houven van Oordt W, Hateboer G, van der Eb AJ, Jochemsen AG (1996): MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J* 15, 5349–5357
- Simon P, Schneck M, Hochstetter T, Koutsouki E, Mittelbronn M, Merseburger A, Weigert C, Niess A, Lang F (2007): Differential Regulation of Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase 1 (SGK1) Splice Variants Based on Alternative Initiation of Transcription. *Cell Physiol Biochem* 20, 715–728
- Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ (1994): Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266, 1376–1380
- Sole F, Luno E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Milla F, Ribera JM, et al. (2005): Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 90, 1168–1178
- Soussi T, Wiman KG (2015): TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ* 22, 1239–1249
- Span LFR, Rutten E, Gemmink A, Boezeman JBM, Raymakers RAP, de Witte T (2007): Bone marrow mononuclear cells of MDS patients are characterized by in vitro proliferation and increased apoptosis independently of stromal interactions. *Leuk Res* 31, 1659–1667
- Stagni V, Oropallo V, Fianco G, Antonelli M, Cinà I, Barilà D (2014): Tug of War between Survival and Death: Exploring ATM Function in Cancer. *Int J Mol Sci* 15, 5388–5409
- Stankovic T, Weber P, Stewart G, Bedenham T, Murray J, Byrd PJ, Moss PA, Taylor AMR (1999): Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 353, 26–29
- Starostik P, Manshoury T, O'Brien S, Freireich E, Kantarjian H, Haidar M, Lerner S, Keating M, Albitar M (1998): Deficiency of the ATM Protein Expression Defines an Aggressive Subgroup of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res* 58, 4552–4557
- Stengel A, Kern W, Haferlach T, Meggendorfer M, Fasan A, Haferlach C (2016): The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases. *Leukemia* 31, 705–711
- Stracker TH, Roig I, Knobel PA, Marjanović M (2013): The ATM signaling network in development and disease. *Front Genet* 4, 37

- Strom SS, Gu Y, Gruschkus SK, Pierce SA, Estey EH (2005): Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia* 19, 1912–1918
- Svobodova K, Zemanova Z, Lhotska H, Novakova M, Podskalska L, Belickova M, Brezinova J, Sarova I, Izakova S, Lizcova L, et al. (2016): Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of TP53 are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 42, 7–12
- Swerdlow SH, Weltgesundheitsorganisation, International Agency for Research on Cancer (Hrsg.): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues: [... reflects the views of a working group that convened for an Editorial and Consensus Conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, October 25 - 27, 2007]. (World Health Organization classification of tumours 2 (der 4. ed.)), 4. ed; Internat. Agency for Research on Cancer, Lyon 2008
- Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB (2005): Regulation of p53 Translation and Induction after DNA Damage by Ribosomal Protein L26 and Nucleolin. *Cell* 123, 49–63
- Takahashi K, Patel K, Bueso-Ramos C, Zhang J, Gumbs C, Jabbour E, Kadia T, Andreff M, Konopleva M, DiNardo C, et al. (2016): Clinical implications of TP53 mutations in myelodysplastic syndromes treated with hypomethylating agents. *Oncotarget* 7, 14172–87
- Tan BX, Khoo KH, Lim TM, Lane DP (2013): High Mdm4 levels suppress p53 activity and enhance its half-life in acute myeloid leukaemia. *Oncotarget* 5, 933–943
- Therneau TM: A Package for Survival Analysis in S. version 2.38, <https://CRAN.R-project.org/package=survival>, o. O. 2015
- Therneau TM, Grambsch PM: Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. Springer-Verlag, New York 2000
- Tian X, Dai S, Sun J, Jiang S, Jiang Y (2016): Association between TP53 Arg72Pro polymorphism and leukemia risk: a meta-analysis of 14 case-control studies. *Sci Rep* 6, 24097
- Toledo F, Krummel KA, Lee CJ, Liu C-W, Rodewald L-W, Tang M, Wahl GM (2006): A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. *Cancer Cell* 9, 273–285
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937–951
- Venables WN, Ripley BD: Modern Applied Statistics with S. 4. Auflage; Springer-Verlag, New York 2002
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000): Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310
- Vousden KH, Lane DP (2007): p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 275–283
- Walker DR, Bond JP, Tarone RE, Harris CC, Makalowski W, Boguski MS, Greenblatt MS (1999): Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene* 18, 211–218
- Wan Y, Wu W, Yin Z, Guan P, Zhou B (2011): MDM2 SNP309, gene-gene interaction, and tumor susceptibility: an updated meta-analysis. *BMC Cancer* 11, 208

- Wang W, Huper G, Guo Y, Murphy SK, Olson JA, Marks JR (2005): Analysis of methylation-sensitive transcriptome identifies GADD45a as a frequently methylated gene in breast cancer. *Oncogene* 24, 2705–2714
- Wang W, Routbort MJ, Tang Z, Ok CY, Patel KP, Daver N, Garcia-Manero G, Medeiros LJ, Wang SA (2017): Characterization of TP53 mutations in low-grade myelodysplastic syndromes and myelodysplastic syndromes with a non-complex karyotype. *Eur J Haematol* 99, 536–543
- Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, Khan MA, Kontny HU, Yu L, Hollander MC, O'Connor PM, Fornace AJ, Harris CC (1999): GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3706–3711
- Wang Y, Ji P, Liu J, Broaddus RR, Xue F, Zhang W (2009): Centrosome-associated regulators of the G2/M checkpoint as targets for cancer therapy. *Mol Cancer* 8, 8
- Wasylishen AR, Lozano G (2016): Attenuating the p53 Pathway in Human Cancers: Many Means to the Same End. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a026211
- Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, Morel P, Fenaux P (1994): p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 84, 3148–3157
- Welch JS, Petti AA, Miller CA, Fronick CC, O'Laughlin M, Fulton RS, Wilson RK, Baty JD, Duncavage EJ, Tandon B, et al. (2016): TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 375, 2023–2036
- Westhofen G, Ganster C, Beier F, Rassaf T, Al-Ali HK, Stuhlmann R, Bacher U, Brümmendorf TH, Germing U, Gattermann N, Haase D (2015): Comprehensive Genomic Analysis Provides Further Evidence That Iron Overload Can Induce Genetic Instability in Myelodysplastic Syndromes. *Blood* 126, 2842–2842
- Westphal CH, Rowan S, Schmaltz C, Elson A, Fisher DE, Leder P (1997): atm and p53 cooperate in apoptosis and suppression of tumorigenesis, but not in resistance to acute radiation toxicity. *Nat Genet* 16, 397–401
- Willis A, Jung EJ, Wakefield T, Chen X (2004): Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* 23, 2330–2338
- Wong AK, Fang B, Zhang L, Guo X, Lee S, Schreck R (2008): Loss of the Y Chromosome. *Arch Pathol Lab Med* 132, 1329–1332
- Wu B, Guo D, Guo Y (2014): Association between p53 Arg72Pro polymorphism and thyroid cancer risk: a meta-analysis. *Tumour Biol* 35, 561–565
- Wu W, Hu K, Wang D, Zeng Z, Zhang D, Chen D, Bai L, Xu R (2013): CDC20 overexpression predicts a poor prognosis for patients with colorectal cancer. *J Transl Med* 11, 142
- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ (1993): The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7, 1126–1132
- Xiong S, Pant V, Suh Y-A, Van Pelt CS, Wang Y, Valentin-Vega YA, Post SM, Lozano G (2010): Spontaneous tumorigenesis in mice overexpressing the p53 negative regulator Mdm4. *Cancer Res* 70, 7148–7154

- Xiong X, Wang M, Wang L, Liu J, Zhao X, Tian Z, Wang J (2009): Risk of MDM2 SNP309 alone or in combination with the p53 codon 72 polymorphism in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 33, 1454–1458
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993): p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701–704
- Yoshida Y, Mufti GJ (1999): Apoptosis and its significance in MDS: controversies revisited. *Leuk Res* 23, 777–785
- Zhang X, Zhang Z, Cheng J, Li M, Wang W, Xu W, Wang H, Zhang R (2012): Transcription Factor NFAT1 Activates the mdm2 Oncogene Independent of p53. *J Biol Chem* 287, 30468–30476
- Zhang Y, Xiong Y (1999): Mutations in Human ARF Exon 2 Disrupt Its Nucleolar Localization and Impair Its Ability to Block Nuclear Export of MDM2 and p53. *Mol Cell* 3, 579–591
- Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG (1998): ARF Promotes MDM2 Degradation and Stabilizes p53: ARF-INK4a Locus Deletion Impairs Both the Rb and p53 Tumor Suppression Pathways. *Cell* 92, 725–734
- Zhao L, Zhao X, Wu X, Tang W (2013a): Association of p53 Arg72Pro polymorphism with esophageal cancer: a meta-analysis based on 14 case-control studies. *Genet Test Mol Biomark* 17, 721–726
- Zhao Y, Guo J, Zhang X, Zhang Z, Gu S, Fei C, Li X, Chang C (2013b): Downregulation of p21 in Myelodysplastic Syndrome Is Associated With p73 Promoter Hypermethylation and Indicates Poor Prognosis. *Am J Clin Pathol* 140, 819–827
- Zirbes TK, Baldus SE, Moenig SP, Nolden S, Kunze D, Shafizadeh ST, Schneider PM, Thiele J, Hoelscher AH, Dienes HP (2000): Prognostic impact of p21/waf1/cip1 in colorectal cancer. *Int J Cancer* 89, 14–18
- Zutter M, Hockenbery D, Silverman GA, Korsmeyer SJ (1991): Immunolocalization of the Bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms. *Blood* 78, 1062–1068

Danksagung

Mein Dank geht zuallererst an Prof. Dr. Detlef Haase, als Doktorvater, und Dr. Christina Ganster, als Betreuerin, für die Ermöglichung dieses Dissertationsprojektes, für die Hilfe in jedem Abschnitt dieser Dissertation, für alle Anregungen und kritischen Nachfragen und die Unterstützung jeglicher Art.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Haase und weiteren Kollegen aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie für die Hilfe bei Fragen zur Planung und Durchführung von Versuchsabläufen, Auswertungsverfahren, Fragen zur Statistik, zu Computerprogrammen etc. Insbesondere zu erwähnen sind hier Dr. Katayoon Shirneshan, Dr. Sascha Dierks, Dr. Roman Martin, Prof. Dr. Ulrike Bacher und Prof. Dr. Julie Schanz.

Ich danke zudem Prof. Dr. Lorenz Trümper als Direktor der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie sowie dem G-CCC für die finanzielle Unterstützung, durch welche mir Reisen zu Kongressen der DGHO, EHA und ASH ermöglicht wurden.

Weiterhin geht ein großer Dank an alle in der Arbeit genannten Kooperationspartner, ohne deren Zusammenarbeit dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank geht auch an alle Mitarbeiter der Statistischen Beratung, die mir mit Antworten und Anregungen auf meine Fragen zu statistischen Verfahren zur Seite standen.

Zuletzt bleibt es, meiner Familie und meinen Freunden zu danken für die kontinuierliche Unterstützung und Motivation bis hin zur Fertigstellung dieses Projektes.