

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der  
Universität Tübingen

Institut für Pathologie und Neuropathologie

Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und  
Pathologische Anatomie

**Myelodysplastisches Syndrom oder reaktive  
Zytopenie? Einsatz des targeted Next Generation  
Sequencing für ein häufiges diagnostisches Dilemma**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Meca, Vanessa Julia**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Vogel

Tag der Disputation: 17.05.2022

Meinen Eltern

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>10</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>11</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Myelodysplastische Syndrome .....</b>	<b>13</b>
1.1.1 Definition und Epidemiologie Myelodysplastischer Syndrome .....	13
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren Myelodysplastischer Syndrome .....	14
1.1.3 Diagnostik Myelodysplastischer Syndrome .....	14
1.1.4 Einteilung Myelodysplastischer Syndrome .....	18
1.1.5 Idiopathische Zytopenie und Dysplasie unbestimmter Signifikanz .....	20
1.1.6 Prognose und Therapie Myelodysplastischer Syndrome .....	21
<b>1.2 Molekulare Pathogenese Myelodysplastischer Syndrome .....</b>	<b>22</b>
1.2.1 Pathogenesemodell zur Entstehung Myelodysplastischer Syndrome ...	22
1.2.2 Molekulargenetische Veränderungen bei Myelodysplastischen Syndromen .....	23
1.2.3 Klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potenzial .....	26
<b>1.3 Neue Analyseverfahren zur Identifizierung von genomischen     Aberrationen und die Methode des Next Generation Sequencing mit     der Ion Torrent PGM Plattform .....</b>	<b>27</b>
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>29</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Geräte .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2 Auswahl der Patientenfälle mit Zytopenien zur Analyse von     von Mutationen im Knochenmark .....</b>	<b>37</b>
<b>2.3 Gewinnung von DNA aus archiviertem FFPE-Knochenmarkmaterial</b>	<b>38</b>
2.3.1 DNA-Extraktion aus FFPE-Knochenmarkmaterial .....	38
2.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Qubit Fluorometer .....	38

2.3.3 Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA mit einer Multiplex-PCR ..	39
<b>2.4 Übersicht über das Verfahren des Next Generation Sequencing mit der Ion Torrent PGM Plattform .....</b>	<b>41</b>
<b>2.5 Designen des MDS-Panels zur Mutationsanalyse mittels Next Generation Sequencing .....</b>	<b>42</b>
<b>2.6 Generierung von Libraries zur Sequenzierung von bestimmten DNA-Abschnitten .....</b>	<b>42</b>
2.6.1 Amplifikation der DNA mit dem entsprechendem Primer Pool .....	42
2.6.2 Partieller Verdau der Primer .....	43
2.6.3 Ligation der Adapter an die partiell verdauten Primer .....	44
2.6.4 Aufreinigung der Libraries .....	45
2.6.5 Quantifizierung der generierten Libraries mit dem LightCycler .....	46
<b>2.7 Ablauf der Sequenzierung und Auswertung der Ergebnisse der Sequenzierung .....</b>	<b>47</b>
2.7.1 Pooling der Libraries .....	47
2.7.2 Emulsions-PCR am Ion One Touch .....	48
2.7.3 Anreicherung der Template-positiven ISPs durch Aufreinigung .....	48
2.7.4 Qualitätsmessung der Template-positiven ISPs .....	48
2.7.5 Sequenzierungsreaktion mit der Sequenzierplattform Ion Torrent PGM .....	49
2.7.6 Auswertung der Ergebnisse der Sequenzierung mit der Sequenzierplattform Ion Torrent PGM .....	49
<b>2.8 Validieren der Ergebnisse der Sequenzierung mittels Einzelamplikonanalyse .....</b>	<b>50</b>
2.8.1 Designen von Primern zum Validieren der Varianten mittels Einzelamplikonanalyse .....	50
2.8.2 Erstellung und Sequenzierung von Einzelamplikons zum Validieren der Varianten .....	51

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Übersicht über die Charakterisierung des Patientenkollektivs</b>	<b>53</b>
3.1.1	Charakterisierung von Patienten mit reaktiver Zytopenie, ICUS und ICUS mit Zeichen einer Dysplasie	54
3.1.2	Charakterisierung der Studienfälle mit MDS	57
<b>3.2</b>	<b>Bestimmung der DNA-Menge und DNA-Amplifizierbarkeit aus dem FFPE-Knochenmarkmaterial</b>	<b>62</b>
<b>3.3</b>	<b>Auswertung der DNA-Sequenzierung</b>	<b>64</b>
3.3.1	Qualität der Sequenzierung	64
3.3.2	Detektierte Varianten mittels targeted Next Generation Sequencing bei Patienten mit Zytopenien und Validierung der Ergebnisse mittels Einzelamplikonanalyse	66
3.3.3	Untersuchung von Kolon-, Lymphknoten- und Magengewebe zur Detektion von Keimbahnmutationen	68
<b>3.4</b>	<b>Finale Ergebnisse der Mutationsanalyse mittels tNGS am Knochenmarkgewebe bei Patienten mit Zytopenien</b>	<b>69</b>
<b>3.5</b>	<b>Zusammenfassende Darstellung der detektierten Mutationen bei Patienten mit Zytopenien</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>Methode des tNGS nach Ion Torrent am FFPE-Gewebe</b>	<b>76</b>
<b>4.2</b>	<b>Detektierte Mutationen mittels tNGS</b>	<b>78</b>
4.2.1	Detektierte Mutationen bei Patienten mit reaktiver Zytopenie und bei Patienten mit ICUS	78
4.2.2	Detektierte Mutationen bei MDS-Patienten	81
4.2.3	Assoziation der detektierten Mutationen bei MDS-Patienten mit MDS- Subtypen und klinisch-pathologischen Parametern	81
<b>4.3</b>	<b>Erläuterung der Pathogenese der MDS mit den in dieser Studie detektierten Ergebnissen in der Mutationsanalyse</b>	<b>85</b>

<b>4.4</b>	<b>Fazit .....</b>	<b>87</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>102</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>103</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Klonale Evolution der MDS durch Founder- und Subklonale-Mutationen und Progression in eine AML .....	23
Abb. 2: Darstellung der Halbleitersequenzierung, die bei der Ion Torrent Plattform zum Einsatz kommt .....	28
Abb. 3: Binden der P1-Adapter und der A-Adapter mit den Barcodes an die Primer .....	45
Abb. 4: Knochenmarkhistologie des Studienfalls 4 .....	55
Abb. 5: Knochenmarkhistologie des Studienfalls 4 in 400-facher Vergrößerung .....	55
Abb. 6: Knochenmarkhistologie von Studienfall 14 in 400-facher Vergrößerung .....	56
Abb. 7: Knochenmarkhistologie von Studienfall 14 in 400-facher Vergrößerung .....	56
Abb. 8: Knochenmarkhistologie des Studienfalls 17 in 400-facher Vergrößerung .....	59
Abb. 9: Knochenmarkhistologie von Studienfall 30 in 400-facher Vergrößerung .....	60
Abb. 10: Knochenmarkhistologie des Studienfalls 33 in 400-facher Vergrößerung .....	61
Abb. 11: Darstellung von Blasten mit dem Oberflächenmarker CD34 mittels immunhistochemischer Färbung .....	61
Abb.12: Exemplarische Darstellung der Gelelektrophorese der PCR-Produkte von vier DNA-Proben .....	62
Abb. 13: Exemplarische Darstellung einer Punktmutation in der IGV-Software .....	71
Abb. 14: Exemplarische Darstellung einer Deletion in der IGV-Software .....	72
Abb. 15: Übersicht über den prozentualen Anteil der Fälle in einer Studiengruppe mit angegebener Anzahl an Mutationen .....	74

Abb. 16: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus der NGS-Analyse .....	74
Abb. 17: Gene, in denen Mutationen mit der Sequenzanalyse in den einzelnen Gruppen gefunden wurden .....	75

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Morphologische Merkmale, die für dysplastische Veränderungen in der Hämatopoese sprechen .....	16
Tab. 2: Einteilung Myelodysplastischer Syndrome nach der WHO-Klassifikation von 2016 .....	19
Tab. 3: PCR-Ansatz zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA .....	40
Tab. 4: Einstellung des Thermocyclers für die PCR.....	40
Tab. 5: Gene und deren Exons, die mit dem MDS-Panel abgedeckt wurden ...	42
Tab. 6: Ansatz AmpliSeq-PCR .....	43
Tab. 7: Einstellungen des Thermocycler für die Ampliseq-PCR .....	43
Tab. 8: Einstellung des Thermocycler für die Generierung der Einzelamplikons .....	51
Tab. 9: Klinisch-pathologische Parameter der Studiengruppen reaktive Zytopenie, ICUS, ICUS+D und MDS.....	54
Tab. 10: Klinische Parameter der MDS-Studiengruppe .....	57
Tab. 11: Klinisch-pathologische Parameter der Studiengruppen low grade MDS, MDS-EB und MDS mit Übergang in eine AML.....	58
Tab. 12: Konzentration und Amplifizierbarkeit der für diese Studie extrahierten DNAs .....	63
Tab. 13: Qualität der Sequenzierung .....	65
Tab. 14: Detektion von Varianten mittels tNGS bei Patienten mit Zytopenien...66	
Tab. 15: Untersuchung von Kolon-, Lymphknoten- und Magengewebe der Studienfälle 1, 12, 27 zur Detektion von Keimbahnmutationen .....	69
Tab. 16: Finale Ergebnisse der Mutationsanalyse mittels tNGS nach Validierung der detektierten Varianten .....	70

## Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AML	akute myeloische Leukämie
alloSZT	allogene Stammzelltransplantation
bp	Basenpaar
CCUS	clonal cytopenia of undetermined significance
CHIP	clonal hematopoiesis of indeterminate potential
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
dl	Deziliter
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxynukleotide
dsDNA	doppelsträngige DNA
emPCR	Emulsions-PCR
FACS	fluorescence activated cell sorting
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded tissue
fl	Femtoliter
g	Gramm
ICUS	idiopathic cytopenia of undetermined significance
IDUS	idiopathic dysplasia of uncertain significance
IGV	integrative genomics viewer
IPSS-R	revised international prognostic scoring system
ISPs	ion sphere particels
M	molare Masse
MDS	Myelodysplastisches Syndrom, Myelodysplastische Syndrome
MDS-EB	MDS with excess blasts
MDS-MLD	MDS with multilineage dysplasia
MDS-RS	MDS with ring sideroblasts
MDS-RS-SLD	MDS-RS with single lineage dysplasia
MDS-RS-MLD	MDS-RS with multilineage dysplasia
MDS-SLD	MDS with single lineage dysplasia
MDS-U	MDS, unclassifiable
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mio.	Million
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
NGS	next generation sequencing
nM	Nanomolar

<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PGM</b>	personal genome machine
<b>pM</b>	Pikomolar
<b>sAML</b>	sekundäre akute myeloische Leukämie
<b>sec</b>	Sekunde
<b>SNPs</b>	single nucleotide polymorphisms
<b>TBE</b>	TRIS-Borat-EDTA
<b>tNGS</b>	targeted next generation sequencing
<b>WHO</b>	world health organization

# 1 Einleitung

## 1.1 Myelodysplastische Syndrome

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie Myelodysplastischer Syndrome

Unter den Myelodysplastischen Syndromen (MDS) versteht man eine heterogene Gruppe von klonalen Erkrankungen, die das Knochenmark betreffen. Durch Veränderungen in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen kommt es zu einer ineffektiven Hämatopoese [1] [2].

Charakterisiert wird ein MDS durch eine periphere Zytopenie, eine Knochenmarkinsuffizienz, eine Dysplasie in mindestens einer der drei hämatopoetischen Zellreihen und einem Risiko in eine sekundäre akute myeloische Leukämie (sAML) überzugehen. In 30% der Fälle zeigt ein MDS eine Progression in eine sAML. Die Patienten weisen bei einem MDS Symptome einer Knochenmarkinsuffizienz auf. In Abhängigkeit der von der Dysplasie betroffenen Zellreihe kann es zu Infektionen, Blutungen, Dyspnoe oder Abgeschlagenheit kommen. Einige Patienten sind symptomlos, zeigen aber Zeichen einer Anämie, Thrombozytopenie, Leukopenie oder eine Kombination dieser Zytopenien in ihrem Blutbild auf [3] [4].

Die MDS stellen eine der häufigsten hämatologischen Erkrankungen in den westlichen Ländern dar. Allgemein wird die Inzidenz der MDS bei etwa 5 pro 100.000 Einwohnern pro Jahr angegeben. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer starken Zunahme der Inzidenz der MDS. So liegt bei über 70-Jährigen die Inzidenz der MDS bei etwa 20 pro 100.000 Einwohnern [5]. Die Prävalenz der MDS in Deutschland liegt bei etwa 7 pro 100.000 Einwohnern [6].

Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei 76 Jahren und 86% der Diagnosen eines MDS erfolgen bei Patienten, die 60 Jahre oder älter sind. Insgesamt sind Männer häufiger von einem MDS betroffen als Frauen und Menschen kaukasischer Abstammung häufiger als Menschen anderer ethnischer Zugehörigkeiten [7].

### **1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren Myelodysplastischer Syndrome**

Familien mit einer hereditären genetischen Prädisposition ein MDS und daraus eine akute myeloische Leukämie (AML) zu entwickeln wurden bereits in der Literatur beschrieben, sind aber selten [8]. Insgesamt ist die Ätiologie der MDS weitgehend unbekannt. Es wurden aber Risikofaktoren beschrieben, die bei einem MDS häufiger anzutreffen sind. Allgemein wird ein primäres, de novo MDS, von einem sekundären MDS, welches nach einem mutagenen Ereignis wie einer Chemo- oder Strahlentherapie entstanden ist, unterschieden [1].

Bei den primären MDS ist die Ursache für die Erkrankung nicht bekannt. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer zunehmenden Inzidenz der MDS, so dass das Alter als größter Risikofaktor angesehen werden kann.

15% der MDS-Patienten sind von einem sekundären MDS betroffen [9]. Vor allem Alkylantien aber auch die Behandlung mit Topoisomerase-II-Inhibitoren, die in der Chemotherapie eingesetzt werden, stehen in einem großen Zusammenhang ein MDS zu verursachen [10] [11].

Ein weiterer Risikofaktor ein MDS zu entwickeln stellt eine Hochdosischemotherapie mit anschließend autologer Stammzelltransplantation, wie sie beispielsweise bei der Therapie von Lymphomen durchgeführt wird, dar. 0,9% der Patienten mit einem Hodgkin-Lymphom entwickelten innerhalb von 72 Monaten und 10% der Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom entwickelten innerhalb von 10 Jahren nach der Therapie ein MDS oder eine AML [12] [13]. In geringerem Maße gelten als weiterer Risikofaktor eine Exposition gegenüber chemischen Lösungsmitteln wie Benzolen [14].

### **1.1.3 Diagnostik Myelodysplastischer Syndrome**

Bei einem MDS kommt es zu qualitativen und quantitativen Veränderungen in den Knochenmark- und Blutzellen, so dass zur Diagnosesicherung eine Blutanalyse und Untersuchung des Knochenmarks hinzugezogen wird. Durch eine Knochenmarkaspiration und –biopsie kann unter dem Mikroskop die Zytologie und Histologie der Zellen beurteilt werden [15].

Für die Diagnose eines MDS müssen folgende beide Kriterien erfüllt werden: das Vorliegen einer konstanten Zytopenie in mindestens einer der drei hämatopoetischen Zellreihen für mindestens sechs Monate und ein Ausschluss einer anderen Ursache für eine Zytopenie oder Dysplasie. Wenn ein MDS-typischer Karyotyp vorliegt, kann in Ausnahmefällen die Diagnose eines MDS auch bei mildereren Werten einer Zytopenie gestellt werden [1]. Die Grenzwerte der WHO (World Health Organization)-Klassifikation von 2016 für eine relevante Zytopenie für ein MDS sind ein Hämoglobinwert  $\leq 10$  g/dl, ein Thrombozytenwert  $\leq 100.000/\mu\text{l}$  und ein absoluter Neutrophilenwert  $\leq 1800/\mu\text{l}$  [16]. Zu diesen Kriterien muss zusätzlich mindestens eins der folgenden drei Kriterien erfüllt werden: das Vorliegen von  $\geq 10\%$  an Dysplasie in einer der drei hämatopoetischen Zellreihen, ein Blastengehalt von 5-19% im Blut- oder Knochenmarkausstrich oder das Vorliegen eines MDS-assoziierten Karyotyps [1] [4].

Zur Beurteilung von Dysplasiezeichen werden die Blut- und Knochenmarkzellen aus einem peripheren Blut- und Knochenmarkausstrich auf zytomorphologische Veränderungen der Zellform, des Zytoplasmas und des Zellkerns untersucht. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über dysplastische Veränderungen in der Erythropoese, Granulopoese und Megakaryopoese sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark. Im Knochenmarkausstrich erkennt man eine Dysplasie der Knochenmarkzellen beispielsweise an zytoplasmatischen Einschlüssen in der erythrozytären Zelllinie, an einer nukleären Hypobulierung oder Hyposegmentierung in der granulozytären Zelllinie oder am Vorhandensein von Mikromegakaryozyten in der thrombozytären Zelllinie. Im peripheren Blut sprechen eine Anisozytose, Poikilozytose oder eine basophile Tüpfelung der Erythrozyten für dysplastische Veränderungen [17] [18]. Ein weiteres Charakteristikum für das Vorhandensein einer Dysplasie in der erythrozytären Zelllinie sind Ringsideroblasten. Unter Ringsideroblasten versteht man Erythroblasten, die perinukleär mindestens fünf Eisengranula aufzeigen [19].

Die Identifizierung von Dysplasien vor allem in der erythrozytären Zelllinie können aber dem erfahrenen Untersucher oft Schwierigkeiten bereiten, da beispielsweise eine gestörte Hämatopoese bei einer reaktiven Anämie als

Dysplasie fehlinterpretiert werden kann. Ebenso sind keine der in der Tabelle aufgelisteten morphologischen Merkmale spezifisch für ein MDS, weshalb ein MDS in manchen Fällen eine Ausschlussdiagnose darstellt [20].

**Tabelle 1. Morphologische Merkmale, die für dysplastische Veränderungen in der Hämatopoese sprechen.** Dargestellt sind dysplastische Veränderungen in der Erythropoese, Granulopoese und Megakaryopoese im peripheren Blut und im Knochenmark.

<b>peripheres Blut</b>	<b>Knochenmark</b>
<b>Erythropoese</b>	
Anisozytose	<i>Zellkern</i>
Poikilozytose	Kernknospung
basophile Tüpfelung	Kernbrücken
	Mehrkernigkeit
	nukleäre Hyperlobulierung
	megaloblastische Veränderungen
	<i>Zytoplasma</i>
	Ringsideroblasten
	Vakuolenbildung
	Einschlüsse
	verminderte Hämoglobinisierung
<b>Granulopoese</b>	
degranulierte Vorstufen	Anisozytose
Linksverschiebung	Linksverschiebung
Pseudo-Pelger-Zellen	Hypogranulation
Blastennachweis	Pseudo-Pelger-Zellen
	Hypersegmentierung
	Auer-Stäbchen
<b>Megakaryopoese</b>	
Anisozytose	Mikromegakaryozyten
Riesenplättchen	mononukleäre Formen
Mikrothrombozyten	Degranulation
	kleine Einzelkerne
	Kern-Hypersegmentierung

Zur Ergänzung der Diagnostik wird zusätzlich eine Knochenmarkhistologie durchgeführt. In dieser lässt sich eine Dysplasie in einer der drei hämatopoetischen Zelllinien ebenfalls beurteilen. Anhand der Histologie lässt sich zusätzlich eine Aussage über die Zellularität, den Fibrosegehalt und die Zellarchitektur im Knochenmark treffen. In den meisten Fällen zeigt sich ein normo- oder hyperzelluläres Knochenmark, gelegentlich findet sich auch ein hypozelluläres Knochenmark bei MDS [15]. Eine Fibrosierung des Knochenmarks kommt bei 10-20% der MDS-Patienten vor und geht mit einem vermehrtem Transfusionsbedarf einher [21].

Zur Bestimmung des Blastengehalts wird die Auszählung im Blut- und Knochenmarkausstrich von mindestens 500 Zellen unter dem Mikroskop empfohlen [1]. Blasten zeichnen sich im Ausstrich durch eine erhöhte Kern-Plasma-Relation, mehrere sichtbare Nukleoli und feines Kernchromatin aus [19]. Bei einem Blastengehalt von mehr als 20% im peripheren Blut oder im Knochenmark wird die Diagnose einer AML gestellt [22].

Die morphologische Untersuchung des Bluts und Knochenmarks zur Identifizierung von Dysplasiezeichen stellt einen Hauptbestandteil der Diagnostik dar. Dysplasiezeichen in der erythrozytären Zellreihe zu erkennen oder den genauen Blastengehalt zu quantifizieren, können aber oft Schwierigkeiten bereiten. Ebenso können Dysplasien in den Knochenmarkszellen Gesunder auftreten [23] [24]. Daher kann man zur zusätzlichen Hilfestellung eine Durchflusszytometrie (engl.: fluorescence activated cell sorting, FACS) des Knochenmarkspirats und Bluts und eine immunhistochemische Anfärbung des Knochenmarks durchführen.

Mit der FACS lassen sich aberrante Antigenexpressionsmuster zur Identifizierung von Dysplasien in hämatopoetischen Zellen darstellen. Zusätzlich lässt sich mit der FACS der Blastengehalt genauer quantifizieren [25].

Eine immunhistochemische Färbung des Knochenmarks wird bei allen Patienten mit vermutetem MDS empfohlen. Das empfohlene Minimalpanel enthält CD34 zur Detektion von Vorläuferzellen, einen Megakaryozytenmarker (CD31, CD42 oder CD61) und Tryptase zur Detektion von Mastzellen. In schwierigen Fällen sollten abhängig von der Differentialdiagnose zusätzlich linienspezifische Antikörper wie CD3, CD20, CD25 oder CD117 Anwendung finden [1].

Die Identifizierung aberranter Chromosomen erfolgt mit einer Karyotypisierung, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder einer Microarray-Diagnostik [26]. Etwa 40% der Patienten mit einem primären MDS zeigen zytogenetische Veränderungen im Karyogramm untersuchter Knochenmark- oder Blutzellen auf. Chromosomenveränderungen, die häufig bei einem MDS anzutreffen sind, sind: del(5q), Trisomie 8, -7/del(7q), -Y, del(11q), Inversion 9, Trisomie 19 und del(20q) [27].

Zytogenetische Veränderungen bei MDS können bei nicht ausreichenden morphologischen Kriterien für ein MDS bei Patienten mit Zytopenien die Diagnose MDS sichern. -Y, Trisomie 8 oder del(20q) sind aber ohne diagnostische Spezifität für ein MDS [16].

Mit etwa 15% ist der del(5q)-Karyotyp, die am häufigsten vorkommende Chromosomenaberration bei MDS [28] [29].

Ein isolierter del(5q)-Karyotyp zeigt bei MDS eine gute Prognose und ein geringeres Risiko für ein Fortschreiten des MDS in eine AML auf [30].

Ein normaler Karyotyp, -Y, del(11q), del(12p) und del(20q) sind ebenfalls mit einer guten Prognose assoziiert. Dagegen sind ein komplexer Karyotyp mit drei Aberrationen, -7 / del(7q) und i(17q) mit einer schlechten Prognose assoziiert [31].

#### **1.1.4 Einteilung Myelodysplastischer Syndrome**

Die MDS lassen sich in verschiedene Untergruppen einteilen. Kriterien für die Einteilung in eine Untergruppe sind die Anzahl der hämatopoetischen Zelllinien, die von einer Dysplasie und Zytopenie betroffen sind, der prozentuale Anteil an Ringsideroblasten im Knochenmark, der prozentuale Anteil an Blasten im Knochenmark und im peripheren Blut und der zytogenetische Befund der Knochenmark- und Blutzellen [16].

Nach der aktuellen WHO-Klassifikation von 2016 werden die MDS in die Hauptgruppen MDS mit uniliniärer Dysplasie (engl.: MDS with single lineage dysplasia, MDS-SLD), MDS mit multiliniärer Dysplasie (engl.: MDS with multilineage dysplasia, MDS-MLD), MDS mit Ringsideroblasten (engl.: MDS with ring sideroblasts, MDS-RS), MDS mit isoliertem del(5q), MDS mit Blastenexzess (engl.: MDS with excess blasts, MDS-EB) und nicht klassifizierbares MDS (engl.: MDS, unclassifiable, MDS-U) eingeteilt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen MDS-Gruppen und ihre diagnostischen Kriterien.

**Tabelle 2. Einteilung Myelodysplastischer Syndrome nach der WHO-Klassifikation von 2016.** (in Anlehnung an Arber et al., 2016). KM, Knochenmark. PB, peripheres Blut.

Name	Zelllinie mit Dysplasie	Zelllinie mit Zytopenie	Ringsideroblasten im KM	Blasten im KM und PB	Karyotyp
<b>MDS-SLD</b>	1	1 / 2	<15%/<5% bei <i>SF3B1</i> Mutation	KM <5%, PB <1% keine Auer-Stäbchen	beliebig
<b>MDS-MLD</b>	2 / 3	1 - 3	<15%/<5% bei <i>SF3B1</i> Mutation	KM <5%, PB <1% keine Auer-Stäbchen	beliebig
<b>MDS-RS</b>					
MDS-RS-SLD	1	1 / 2	≥15%/≥5% bei <i>SF3B1</i> Mutation	KM <5%, PB <1% keine Auer-Stäbchen	beliebig
MDS-RS-MLD	2 / 3	1 - 3	≥15%/≥5% bei <i>SF3B1</i> Mutation	KM <5%, PB <1% keine Auer-Stäbchen	beliebig
<b>MDS mit isoliertem del(5q)</b>	1 - 3	1 - 2	keine oder beliebig	KM <5%, PB <1%, keine Auer-Stäbchen	del(5q)
<b>MDS-EB</b>					
MDS-EB-1	0 - 3	1 - 3	keine oder beliebig	KM 5-9% oder PB 2-4%, keine Auer-Stäbchen	beliebig
MDS-EB-2	0 - 3	1 - 3	keine oder beliebig	KM 10-19% oder PB 5-19%, oder Auer-Stäbchen	beliebig
<b>MDS-U</b>					
mit 1% Blastenanteil im PB	1 - 3	1 - 3	keine oder beliebig	KM <5%, PB =1% keine Auer-Stäbchen	beliebig
mit Dysplasie in einer Zelllinie und Panzytopenie	1	3	keine oder beliebig	KM <5%, PB <1% keine Auer-Stäbchen	beliebig
mit zytogenetischen Veränderungen	0	1 - 3	<15%	KM <5%, PB <1% keine Auer-Stäbchen	MDS typischer Karyotyp
Refraktäre Zytopenie bei Kindern	1 - 3	1 - 3	keine	KM <5%, PB <2%	beliebig

### **1.1.5 Idiopathische Zytopenie und Dysplasie unbestimmter Signifikanz**

Kann die Diagnose eines MDS nicht gestellt werden, da qualitative oder quantitative Kriterien nicht erfüllt werden, sollte die Diagnose einer idiopathischen Zytopenie unbestimmter Signifikanz (engl.: idiopathic cytopenia of undetermined significance, ICUS) oder einer idiopathischen Dysplasie unbestimmter Signifikanz (engl.: idiopathic dysplasia of uncertain significance, IDUS) in Betracht gezogen werden [32] [33].

Bei Patienten, die eine konstante Zytopenie (Hämoglobin < 11 g/dl, Neutrophile < 1500/µl, Thrombozyten < 100.000/µl) über mindestens sechs Monate aufweisen, aber weniger als 10% an dysplastischen Veränderungen in einer hämatopoetischen Zelllinie und keinen MDS-assoziierten Karyotyp, kann die Diagnose eines MDS nicht gestellt werden. Bei diesen Patienten sollte, bei Ausschluss anderer Ursachen einer Zytopenie, die Diagnose einer ICUS gestellt werden [1] [34] [35].

In manchen Fällen kann eine ICUS in ein MDS übergehen, so dass diese Patienten einer gründlichen Nachsorge bedürfen. Um ein MDS auszuschließen oder zu diagnostizieren, sollten regelmäßig Blutkontrollen bei diesen Patienten erfolgen. Bei klinischer Verschlechterung sollte eine Untersuchung des Knochenmarks wiederholt werden [1] [34].

Bei Patienten, die eine Dysplasie in mindestens 10% einer hämatopoetischen Zelllinie aufweisen, mit oder ohne einem MDS-assoziierten Karyotyp, aber nur eine milde Zytopenie, sollte die Diagnose einer IDUS gestellt werden. Wie bei Patienten mit einer ICUS sollte auch bei Patienten mit einer IDUS eine engmaschige Kontrolle erfolgen, da auch ein IDUS in ein MDS übergehen kann [32].

Allgemein können Patienten mit einer ICUS oder einer IDUS in ein MDS oder eine andere hämatologische Erkrankung wie eine AML oder eine Myeloproliferative Neoplasie transformieren. Diese Patienten können aber ebenfalls über mehrere Jahre stabil bleiben und müssen nicht an einer hämatologischen Neoplasie erkranken [32] [33] [35].

### 1.1.6 Prognose und Therapie Myelodysplastischer Syndrome

Zur Einschätzung der Prognose eines Patienten mit einem MDS steht das Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) zur Verfügung. Dieser Prognosescore gibt eine Information über das mediane Überleben eines Patienten mit einem primären MDS und über die mediane Krankheitsdauer bis zur Transformation eines MDS in eine AML. Wichtige Prognoseparameter, die herangezogen werden, sind der medulläre Blastenanteil, der zytogenetische Befund der Knochenmarkzellen und das Ausmaß der Zytopenie. In dem Risikoscore zeigen Patienten mit einem niedrigen Risiko eine mediane Überlebenswahrscheinlichkeit von 5,3 Jahren und eine mittlere Dauer des Übergangs des MDS in eine AML von 10,8 Jahren auf. Im Vergleich dazu liegt die mediane Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit einem hohen Risiko bei 1,6 Jahren, und die mittlere Dauer des Fortschreitens des MDS in eine AML bei 1,4 Jahren [30] [36].

Bei der Therapie der MDS wird zwischen Niedrigrisiko- und Hochrisikopatienten unterschieden.

Bei Niedrigrisikopatienten (IPSS-R sehr niedrig, niedrig, intermediär) steht vor allem die supportive Therapie mit Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten im Vordergrund [37]. Bei drohender Siderose infolge von zu häufigen Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten können Eisenchelatoren zum Einsatz kommen [38]. Die Gabe von Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin oder G-CSF kann bei Niedrigrisikopatienten ebenfalls in Erwägung gezogen werden. Bei transfusionsbedürftigen Patienten, die einen isolierten del(5q)-Karyotyp aufweisen, kann eine Therapie mit dem Immunmodulator Lenalidomid zur Transfusionsfreiheit führen [39].

Bei Hochrisiko-Patienten (IPSS-R hoch, sehr hoch) sollte zunächst eine allogene Stammzelltransplantation (alloSZT), welche die einzige kurative Therapieoption der MDS darstellt, erwogen werden.

Hochrisiko-Patienten, die für eine alloSZT nicht infrage kommen, oder als Überbrückung bis zur alloSZT, profitieren, neben einer supportiven Therapie, von demethylierenden Substanzen wie Azacitidin oder Decitabin [40].

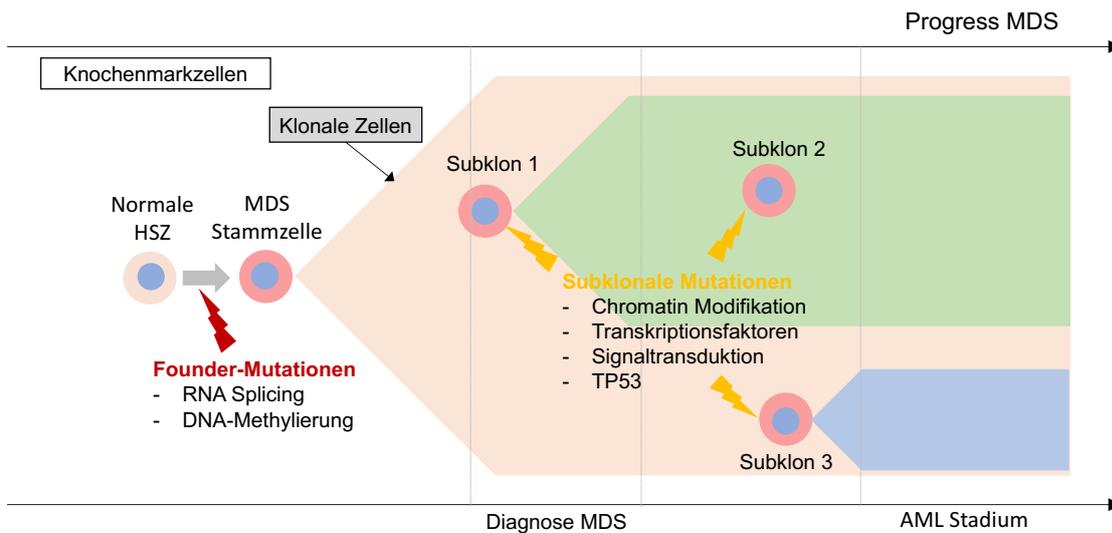
## **1.2 Molekulare Pathogenese Myelodysplastischer Syndrome**

### **1.2.1 Pathogenesemodell zur Entstehung Myelodysplastischer Syndrome**

Bei den MDS handelt es sich um klonale Erkrankungen des Knochenmarks. Die MDS entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, die durch Hinzugewinnen von sogenannten Driver-Mutationen einen Zellklon ausbilden [41]. Diese unreifen mutierten Stammzellen weisen gegenüber anderen Stammzellen im Knochenmark eine klonale Dominanz auf und führen so zur Unterdrückung der regulären Hämatopoese. Aus diesem veränderten Zellklon entsteht dann die Mehrheit, der im Blut zirkulierenden Blutzellen. Dies hat aber zur Folge, dass die Zellen Zeichen einer nicht vollständigen Ausreifung und somit Dysplasien aufzeigen und weniger funktionsfähig sind [42].

Das Spektrum an Driver-Mutationen, die an der klonalen Evolution eines MDS beteiligt sind, konnte durch Hochdurchsatzsequenzierungs-Studien an Knochenmarkproben, die ein MDS zeigten, erfasst werden. Die durchschnittliche Anzahl an genetischen Veränderungen scheint bei Patienten, die von einem Hochrisiko-MDS betroffen sind, höher zu sein, so dass man davon ausgehen kann, dass durch Hinzugewinnen von neuen Mutationen, es zu einer klonalen Expansion einer Zellpopulation und somit zu einem Fortschreiten der Erkrankung kommt [43].

Mutationen in Genen, die für das RNA-Spleißosom oder die DNA-Methylierung codieren, stellen früh erworbene Mutationen dar, so dass diese auch als Founder-Mutationen bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu sind Mutationen in Genen, die für die Chromatin-Modifizierung und Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen, häufig erst spät erworbene Mutationen. Diese spät erworbenen Mutationen werden auch Subklonale-Mutationen genannt, da sie in einer Subpopulation des Zellklons auftreten. Sie können durch klonale Expansion des Subklons zu einer Progression des MDS mit einem Anstieg der Blasten und so zu einem Übergang des MDS in eine AML führen (Abbildung 1) [44] [45].



**Abbildung 1. Klonale Evolution der MDS durch Founder- und Subklonale-Mutationen und Progression in eine AML** (in Anlehnung an Harada et al., 2015). HSZ, Hämatopoetische Stammzelle.

### 1.2.2 Molekulargenetische Veränderungen bei Myelodysplastischen Syndromen

Etwa 70-90% der Patienten mit einem MDS zeigen mindestens eine Mutation in der DNA ihrer Knochenmarkszellen auf [43] [44] [46].

40-80% der Mutationen in Abhängigkeit des jeweiligen MDS-Subtyps betreffen Gene, die für das RNA-Spleißosom codieren. Das RNA-Spleißosom führt durch Entfernen von Introns aus der prä-mRNA zur Bildung der reifen mRNA. Mutationen in diesen Genen bei MDS führen zu einem alternativen Spleißen und zum unpassenden Zusammenführen der Exons. So wird die Fähigkeit der Zelle sich zu einer reifen Blutzelle zu differenzieren gestört, was den dysplastischen Phänotyp der MDS-Zellen erklärt.

Gene, die für das RNA-Spleißosom codieren und bei MDS-Patienten häufig mutiert sind, sind: *SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2* und *ZRSR2* [47].

Mutationen in *SF3B1* finden sich bei 20-30% der MDS-Patienten und 65-85% der Patienten mit dem Subtyp MDS-RS, dessen zytologischer Befund von einem hohen Gehalt an Ringsideroblasten dominiert wird. Mutationen in diesem Gen sind mit einem verlängerten Überleben und einem niedrigeren Blastengehalt assoziiert [48] [49].

Mutationen in *SRSF2*, *U2AF1* und *ZRSR2* kommen zu etwa 12-15%, 7-19% und 3-11% der MDS-Patienten vor. In *SRSF2* ist vor allem das Codon P95, lokalisiert im Exon 1, von einer Mutation betroffen, was zu einem Austausch der Aminosäure Prolin gegen Leucin, Arginin oder Histidin führt [50] [51].

40-50% der Gene, die bei einem MDS mutiert sind, betreffen die DNA-Methylierung [43]. Durch Mutationen in Genen wie *TET2*, *IDH1*, *IDH2* und *DNMT3A*, kommt es zur Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen mit Stilllegung von Tumorsuppressorgenen und Genen, die für die Differenzierung einer Zelle zuständig sind [52].

Mutationen in *TET2* gehören zu den häufigsten Mutationen, die bei einem MDS beschrieben wurden. Sie finden sich bei bis zu 25-35% der MDS-Patienten [43] [53]. Mutationen in diesem Gen können aber auch bei gesunden älteren Individuen ohne eine hämatologische Erkrankung detektiert werden [54]. Eine verminderte Funktion von *TET2* führt zu einer vermehrten Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzelle mit der Möglichkeit einer klonalen Dominanz [55]. Mutationen in *IDH1* oder *IDH2* finden sich zu etwa 5% bei einem MDS und führen durch Hemmung des Proteins *TET2* zu einer gestörten Zelldifferenzierung [56] [57].

8% der Mutationen bei MDS finden sich im Gen, welches für die Methyltransferase *DNMT3A* codiert. Mutationen in diesem Gen zeigen einen schnelleren Progress des MDS in eine AML auf. Im Vergleich dazu konnte diese Mutation bei 22% der Patienten mit einer de novo AML gefunden werden [58].

Ebenfalls zeigen sich beim MDS Mutationen in Genen wie *EZH2* und *ASXL1*. Die Gene codieren für Enzyme, die bei der posttranslationalen Modifikation von Histon-Proteinen eine wichtige Rolle spielen. Durch Veränderung der Struktur der Histone nehmen sie so Einfluss auf die Transkription von Genen [59] [60].

6-12% der Patienten mit einem de novo MDS zeigen eine Mutation in *EZH2*. Diese Mutation findet sich auch bei anderen hämatologischen Neoplasien und ist insgesamt mit einer schlechteren Prognose assoziiert [61] [62] [63].

Mutationen in *ASXL1* kommen zu 14-20% bei MDS vor und stellen somit eine der häufigsten Mutationen bei MDS dar. Vor allem ist diese Mutation häufig bei

Patienten mit einem fortgeschrittenen MDS wie einem MDS-EB oder einem MDS mit Übergang in eine AML zu finden [64] [65] [66].

Genmutationen in Transkriptionsfaktoren, die in der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen eine wichtige Rolle spielen, können ebenfalls beim MDS detektiert werden [67]. Mutationen im Transkriptionsfaktor *RUNX1* stellen eher Subklonale-Mutationen als Founder-Mutationen dar [42] [44]. Sie kommen bei etwa 10-20% der MDS-Patienten vor und sind mit einem Hochrisiko-MDS und einer schlechten Prognose assoziiert [63] [68] [69].

Weitere molekulargenetische Veränderungen zeigen sich in Genen, die für Proteine der Signaltransduktion codieren. Durch Mutationen in diesen Genen kommt es zu einer gesteigerten Reaktion auf äußere Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder Zytokine, was eine gesteigerte Zellproliferation zur Folge hat [70].

Im Vergleich zur AML und den Myeloproliferativen Neoplasien sind Mutationen in diesen Genen eher selten. Mutationen im Gen, welches für die Rezeptortyrosinkinase FLT3 codiert, finden sich zu etwa 30% bei einer AML und zu 2-3% bei einem MDS [71]. Im Vergleich dazu zeigen 12% der Patienten mit einer sekundären AML aus einem MDS eine Mutation in diesem Gen [72].

Mutationen im Protoonkogen *RAS*, welches in der Regulation des Zellwachstums eine wichtige Rolle spielt, finden sich bei einem MDS zu 4-10% in *NRAS* und zu 1-2% in *KRAS* [68] [72]. Diese Mutationen sind mit einer schlechteren Prognose und einem frühen Progress des MDS in eine AML assoziiert [73].

Mutationen im Gen *CBL* sind sehr selten bei einem MDS und finden sich vor allem bei Patienten mit Myelodysplastischen/Myeloproliferativen Neoplasien [74]. TP53 ist ein Tumorsuppressor, der durch zahlreiche Mechanismen eine Apoptose der Zelle induzieren kann. Mutationen in *TP53* finden sich bei etwa 10% der MDS-Patienten. Eine *TP53*-Mutation ist mit einem Hochrisiko-MDS assoziiert und stellt einen unabhängigen negativen Prognosefaktor dar [75] [76]. Eine weitere subklonale Mutation bei MDS findet sich in *SETBP1*. Das Gen codiert für ein Protein, welches in der DNA-Replikation eine wichtige Rolle einnimmt [42]. Bei 2-4% der MDS-Patienten findet sich eine Mutation in diesem

Gen [46] [77]. Sie tritt vor allem bei einem Progress des MDS oder einem Übergang des MDS in eine AML mit einem Anstieg an Blasten auf [78].

### **1.2.3 Klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potenzial**

Mutationen in hämatopoetischen Stammzellen und somit Zeichen einer klonalen Hämatopoese konnten auch in Blut- und Knochenmarkzellen gesunder Individuen nachgewiesen werden. Durchschnittlich werden innerhalb von zehn Jahren ein bis zwei somatische Mutationen in den Exons einer hämatopoetischen Stammzelle erworben [79]. Etwa 10% der über 65-Jährigen, die gesund sind und an keiner hämatologischen Erkrankung leiden, zeigten in ihren peripheren Blutzellen Zeichen einer klonalen Hämatopoese mit Mutationen auf. Bei gesunden Personen unter 50 Jahren konnte nur bei 1% eine klonale Hämatopoese nachgewiesen werden [80] [81].

Am häufigsten konnten bei gesunden Individuen Mutationen in den Genen *DNMT3A*, *TET2* und *ASXL1* detektiert werden. Diese Mutationen sind mit einer erhöhten Gesamtsterblichkeitsrate und einem erhöhten Risiko an einer hämatologischen Neoplasie zu erkranken assoziiert. Das Transformationsrisiko einer hämatologischen Erkrankung bei Vorliegen von Zeichen einer klonalen Hämatopoese liegt bei 0,5-1% jährlich [82].

Das Vorhandensein von somatischen Mutationen in Blut- oder Knochenmarkzellen mit einer Allelfrequenz von mindestens 2%, die mit hämatologischen Erkrankungen assoziiert sind, bei denen aber Kriterien für eine solche Erkrankung nicht erfüllt werden, führte zur Einführung der Entität Klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potenzial (engl.: clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP). Die Entität CHIP kann durch ein geringes Transformationsrisiko als Vorstufe eines MDS oder einer anderen hämatologischen Erkrankung angesehen werden, analog zur monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz, wie sie als Vorstufe für Multiple Myelome gesehen wird. Liegt bei einer CHIP eine Zytopenie vor, sollte man von einer klonalen Zytopenie unbestimmter Bedeutung sprechen (engl.: clonal cytopenia of undeterminate significance, CCUS) [3] [83].

Generell wird es nicht empfohlen gesunde Personen mit Blutwerten im Normbereich auf eine CHIP zu screenen, da das Risiko einer Transformation gering ist und keine therapeutischen Möglichkeiten vorliegen. Bei zufälliger Detektion einer CHIP sind regelmäßige Blutkontrollen indiziert. Bei einer zunehmenden Zytopenie bei Patienten mit CHIP sollte zum Ausschluss einer hämatologischen Neoplasie zusätzlich eine Knochenmarkpunktion in Erwägung gezogen werden [84].

### **1.3 Neue Analyseverfahren zur Identifizierung von genomischen Aberrationen und die Methode des Next Generation Sequencing mit der Ion Torrent PGM Plattform**

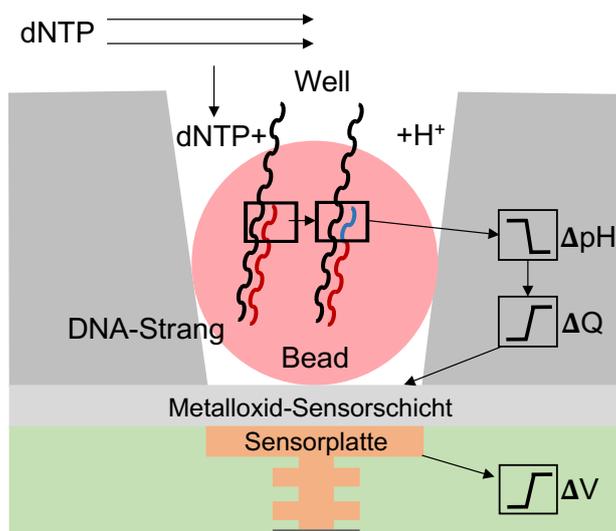
Nachdem die Struktur der DNA aufgeklärt wurde, entwickelte Frederick Sanger 1977 eine Methode um die Basenabfolge in der DNA zu bestimmen.

Nach ihm benannt basiert die Sanger-Sequenzierung auf einer Kettenabbruch-Synthese. Sie zählt zur ersten Generation der Technologien der DNA-Sequenzierung [85]. Im Rahmen des Humangenomprojekts zur Entschlüsselung des menschlichen Genoms wurden schnellere und kostengünstigere Verfahren benötigt, so dass neuere Methoden für die Hochdurchsatz-Sequenzierung entwickelt wurden. Diese Verfahren, die auch als Next Generation Sequencing (NGS) bezeichnet werden, stellen eine kostengünstigere und schnellere Methode zur Sanger-Sequenzierung dar. Auch bieten sie durch ihre hohe Durchsatzrate eine parallele Sequenzierung von bis zu Millionen von DNA-Fragmenten gleichzeitig an [86]. Immer mehr gewinnt die Methode des NGS durch Identifizierung von Mutationen mit gezielter oder genomweiter Sequenzierung in der Erforschung und Diagnostik von Krankheiten an Bedeutung [87].

Ein Beispiel für ein NGS-Verfahren ist die Methode, die bei der Ion Torrent PGM Plattform zum Einsatz kommt und von der Firma Life Technologies entwickelt und für diese Arbeit verwendet wurde. In einem ersten Schritt werden aus isolierter DNA sogenannte Libraries (engl. library: DNA-Bibliothek) generiert, die aus DNA-Fragmenten bestehen, die gen- oder panel-spezifisch angereichert werden und mit Adaptoren versehen sind. In einer Emulsions-PCR (emPCR)

werden die DNA-Fragmente mit ihren Adaptoren an sogenannte Beads (engl. bead: Kügelchen) gekoppelt und klonal amplifiziert. Die Beads werden dann anschließend auf einen Chip geladen, der sich aus mehreren Wells (engl. well: Vertiefung) zusammensetzt. Ziel für die Sequenzierungsreaktion ist, dass ein Bead in ein Well gelangt [www.iontorrent.com].

Die Methode, die bei der Ion Torrent Plattform zum Einsatz kommt, beruht im Vergleich zu anderen Technologien nicht auf der Detektion eines Lichtsignals, sondern auf einer Halbleitersequenzierung (Abbildung 2). Der Chip wird abwechselnd mit allen vier Basen überflutet. Kommt es bei der Sequenzierungsreaktion zum Einbau eines komplementären Nukleotids in den DNA-Strang wird bei der Ausbildung einer Phosphodiesterbindung ein  $H^+$ -Ion freigesetzt. Dieses Proton führt zu einer pH-Wert-Änderung (0,02 pH-Einheiten für jede eingebaute Base), die wiederum in eine Spannungsänderung von Sensoren am Boden eines Wells konvertiert wird. Diese Spannungsänderung wird von Elektroden registriert und in ein digitales Signal umgewandelt. Die Generierung und Detektion eines Signals dauert etwa vier Sekunden. Mit der Ion Torrent Plattform lassen sich DNA-Fragmente mit einer Länge von bis zu 200 bp sequenzieren [88].



**Abbildung 2. Darstellung der Halbleitersequenzierung, die bei der Ion Torrent Plattform zum Einsatz kommt** (in Anlehnung an Rothberg et al., 2011 [88]).

Um, im Vergleich zur whole-genome Sequenzierung, in der das ganze Genom sequenziert wird, DNA auf Mutationen nur in gezielten Genabschnitten zu untersuchen, bietet sich das targeted NGS (tNGS) an, wie es auch für diese Studie verwendet wurde. Durch Gen-Panels, die bestimmte Primer enthalten, können DNA-Bibliotheken generiert werden, die zur Sequenzierung von gezielten Genregionen dienen [89] [90].

## **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Die MDS stellen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, die das Knochenmark betreffen und auf einer gestörten Hämatopoese beruhen [2]. Durch Mutationen in einer hämatopoetischen Stammzelle kommt es zur Transformation dieser Zelle mit Ausbildung eines Zellklons, was zur fehlenden Ausreifung dieser Blutzellen führt und eine periphere Zytopenie zur Folge hat [41] [42].

Die Diagnosestellung der MDS stellt in der Klinik für den erfahrenen Untersucher oft eine Herausforderung dar, da quantitative Kriterien wie eine Dysplasie von 10% in mindestens einer hämatopoetischen Zelllinie oder ein Blastengehalt von 5% zu erkennen sein müssen [91]. Vor allem die Abgrenzung eines noch nicht weit fortgeschrittenen MDS gegenüber einer reaktiven Zytopenie ist schwierig [20]. Ebenso zeigen ältere gesunde Probanden ohne MDS häufig ebenfalls Zeichen einer klonalen Hämatopoese auf [41].

Ziel der vorliegenden Studie war es primär die Mutationsanalyse mittels tNGS nach der Methode von Ion Torrent am paraffineingebetteten Knochenmarkbiopsat bei Patienten mit Zytopenien zu etablieren.

Zudem wurde in dieser Studie untersucht ob eine Mutationsanalyse in schwierigen Fällen die Diagnose eines MDS unterstützen kann.

Ein weiteres Ziel war es mittels der Mutationsanalyse Risikomutationen bei einem MDS zu identifizieren um ggf. eine bessere Einschätzung über die Prognose des MDS treffen zu können.

Dafür wurden 39 Knochenmarkbiopsien, die in Paraffin eingebettet und Formalin fixiert (engl.: formalin-fixed paraffin-embedded tissue, FFPE) zur Verfügung standen, mit dem neu designten Panel auf bekannte MDS-assoziierte Mutationen untersucht. Das Patientenkollektiv setzte sich aus Patienten zusammen, die alle

eine periphere Zytopenie aufgewiesen haben, und wurde in sechs Diagnosegruppen aufgeteilt: Patienten mit einer reaktiv bedingten Zytopenie, Patienten mit einer ICUS ohne und mit Zeichen einer Dysplasie, Patienten mit einem low grade MDS, Patienten mit einem MDS-EB und Patienten mit einem MDS und Übergang in eine AML.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Geräte

#### Primer:

Alle Primer wurden bei Sigma-Aldrich, München, Deutschland bestellt.

Primer zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA (5'-3'):

Primer	Primer-Sequenz 5' → 3'
AF4/X3U	GGAGCAGCATTCCATCCAGC
AF4/X3L	CATCCATGGGCCGGACATAA
AF4/X11U	CCGCAGCAAGCAACGCAACC
AF4/X11L	GCTTTCCTCTGGCGGCTCC
PLZF/X1U	TGCGATGTGGTCATCATGGTG
PLZF/X1L	CGTGTCATTGTCTGTCTGAGGC
RAG1/X2U	TGTTGACTCGATCCACCCCA
RAG1/X2L	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA
TBXAS1/X9U	GCCCGACATTCTGCAAGTCC
TBXAS1/X9L	GGTGTGCGCGGAAGGGTT

Primer zur Validierung der Varianten mittels Einzelamplikonanalyse (inklusive Adapter und Barcodes) (5'-3'):

Primer	Primer-Sequenz 5' → 3'
DNMT3A_p592-A-60_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGCTCTTCGATGTGGAGTGTGGACCTCTT
DNMT3A_p592-A-60_R	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGCTCTTCGATCCTGGTCGTGGTTATTAGCG
DNMT3A_p592-trP1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTGGAGTGTGTGGACCTCTT
DNMT3A_p592-trP1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCTGGTCGTGGTTATTAGCG
DNMT3A_p326-A-64_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGAGTTCCGACGATCTTTGGCATTGGGGAGCTG
DNMT3A_p326-A-64_R	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGAGTTCCGACGATACCCCACTTACCACTGA
DNMT3A_p326-trP1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTTTGGCATTGGGGAGCTG
DNMT3A_p326-trP1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATACCCCACTTACCACTGA
DNMT3A_p732-A-65_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGACATCGATATGGCTTTCTCTCCGACCT

DNMT3A\_p732- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTGGCACATCG  
 A-65\_R ATCTTGTCACTAACGCCCATGG  
 DNMT3A\_p732- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATATGGCTTTCTCTTCCGACCT  
 trP1\_F  
 DNMT3A\_p732- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTTGTCACTAACGCCCATGG  
 trP1\_R  
 ASXL1\_p1320- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACTCGGATCGA  
 A-61\_F TGCAATGTTACAGGCCAAGGG  
 ASXL1\_p1320- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACTCGGATCGA  
 A-61\_R TTCTGTACCCACCAGACATG  
 ASXL1\_p1320- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGCAATGTTACAGGCCAAGGG  
 trP1\_F  
 ASXL1\_p1320- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCTGTACCCACCAGACATG  
 trP1\_R  
 ASXL1\_p546-A- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCTGCTTCACGA  
 62\_F TGTGGATCAGGAACCCAAGGA  
 ASXL1\_p546-A- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCTGCTTCACGA  
 62\_R TTTGGGCTCCTCTTTAGTGGG  
 ASXL1\_p546- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTGGATCAGGAACCCAAGGA  
 trP1\_F  
 ASXL1\_p546- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTGGGCTCCTCTTTAGTGGG  
 trP1\_R  
 ASXL1\_p920- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACTCGGATCGAT  
 930-A-61\_F GTGAAACAGCCCAAACCAGA  
 ASXL1\_p920- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACTCGGATCGAT  
 930-A61\_R GTCACTGCCTCCTCGAGATG  
 ASXL1\_p920- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTGAAACAGCCCAAACCAGA  
 930-trP1\_F  
 ASXL1\_p920- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTCACTGCCTCCTCGAGATG  
 930-trP1\_R  
 ASXL1\_p823\_A- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCTGCTTCACGA  
 -62\_F TAGTGATGATGAGGAGCAAGGA  
 ASXL1\_p823\_A- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCTGCTTCACGA  
 -62\_R TATTCAGGTGTGGAAGTGGGG  
 ASXL1\_p823- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAGTGATGATGAGGAGCAAGG  
 trP1\_F A  
 ASXL1\_p823- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATATTAGGTGTGGAAGTGGGG  
 trP1\_R  
 ASXL1\_p1161\_ CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTTCGAT  
 A-63\_F AGAATCCCCACAAGTACCACT  
 ASXL1\_p1161\_ CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTTCGAT  
 A-63\_R CAAGACCAGTGCCTGTTTCA  
 ASXL1\_p1161- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAGAATCCCCACAAGTACCACT  
 trP1\_F  
 ASXL1\_p1161- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCAAGACCAGTGCCTGTTTCA  
 trP1\_R  
 ASXL1\_p640- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACTCGGATCGAT  
 659\_A-61\_F CAGGACCCTCGCAGACATTA  
 ASXL1\_p640- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACTCGGATCGAT  
 659\_A-61\_R GACGTACACTTTCCAGGGGT  
 ASXL1\_p640- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCAGGACCCTCGCAGACATTA  
 659-trP1\_F  
 ASXL1\_p640- CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGACGTACACTTTCCAGGGGT  
 659-trP1\_R  
 ASXL1\_p775- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACTCGGATCGAT  
 A61\_F AGGGCTACAGTTGGACTCAC  
 ASXL1\_p775- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACTCGGATCGAT  
 A61\_R GGGTCCTTGCTCCTCATCAT

ASXL1_p775-trp1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAGGGCTACAGTTGGACTCAC
ASXL1_p775-trp1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGGTCCTTGCTCCTCATCAT
RUNX1_p270-A63_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTTCGAT AAATCCCACCCCACTTTACAT
RUNX1_p270-A63_R	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTTCGAT TTCTGCAGAGAGGGTTGTCA
RUNX1_p270-trp1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAAATCCCACCCCACTTTACAT
RUNX1_p270-trp1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCTGCAGAGAGGGTTGTCA
RUNX1_p296-A-66_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGCAATCATCGAT CAGATCCAACCATCCCCACC
RUNX1_p296-A-66_R	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGCAATCATCGAT GAGTCGACTGGAAAGTTCTGC
RUNX1_p296-trP1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCAGATCCAACCATCCCCACC
RUNX1_p296-trP1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGAGTCGACTGGAAAGTTCTGC
RUNX1_p149_A-64_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGAGTTCCGACGA TGACTGGTGTGTTAGGTGGTGG
RUNX1_p149_A-64_R	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGAGTTCCGACGA TTCTTCCACTTCGACCGACAA
RUNX1_p149-trP1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGACTGGTGTGTTAGGTGGTGG
RUNX1_p149-trP1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCTTCCACTTCGACCGACAA
ZRSR2_p213-A-63_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTTCGAT CCCAACATCCAGTCCTACCC
ZRSR2_p213-A-63_R	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTTCGAT CGTTCTTGAACCTCGGGCAAC
ZRSR2_p213-trP1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCCAACATCCAGTCCTACCC
ZRSR2_p213-trP1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCGTTCTTGAACCTCGGGCAAC
ZRSR2_p295-299_A-61_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACTCGGATCGAT CCAAGCAGCCCTTTCTCTG
ZRSR2_p295-299_A-61_R	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACTCGGATCGAT AAAAGCTATGCCTCACCCT
ZRSR2_p295-299-trP1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCAAGCAGCCCTTTCTCTG
ZRSR2_p295-299-trP1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAAAAGCTATGCCTCACCCT
Kras_p146-A60_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGCTCTTCGAT GGACTCTGAAGATGTACCTATGG
Kras_p146-A60_R	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGCTCTTCGAT TCAGTGTTACTTACCTGTCTTGT
Kras_p146-trp1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGACTCTGAAGATGTACCTAT GG
Kras_p146-trp1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT TCAGTGTTACTTACCTGTCTT GT
SETBP1_p870-A62_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCTGCTTCACGA TGAACCTGGAAGCTGTCTCCA
SETBP1_p870-A62_R	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCTGCTTCACGA TTGTCCAGGGAGCAGAAATCA
SETBP1_p870-trp1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGAACCTGGAAGCTGTCTCCA

SETBP1_p870- trp1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTGTCCAGGGAGCAGAAATCA
IDH1_p121- A63_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTTCGAT GCGTCAAATGTGCCACTATCA
IDH1_p121- A63_R	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTTCGAT AAGCATGACGACCTATGATGAT
IDH1_p121- trp1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGCGTCAAATGTGCCACTATCA
IDH1_p121- trp1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAAGCATGACGACCTATGATGA T
SRSF2_p75- A63_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTTCGAT GACAACCTGACCTACCGCA
SRSF2_p75- A63_R	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTTCGAT CTGTGGTGTGAGTCCGGG
SRSF2_p75- trp1_F	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGACAACCTGACCTACCGCA
SRSF2_p75- trp1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTGTGGTGTGAGTCCGGG

---

### Verwendete Puffer:

#### TE-Puffer:

50 mM Tris	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
0,1 mM EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

#### 1x TBE-Puffer:

89 M Tris	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
0,89 M Borsäure	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
0,02 M EDTA-Na <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### Verwendete Chemikalien und Reagenzien:

Magnesiumchlorid	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
AmpliTaq Gold DNA- Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
LE-Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Gel-Red Biotium	Hayward, CA, USA
Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GeneRuler 100bp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
AMPure Reagenz	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Agencourt® AMPure® XP	
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### Verwendete Kits:

Maxwell 16 FFPE Tissue	Promega, Mannheim, Deutschland
LEV DNA Purification Kit	

Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ion AmpliSeq-Custom MDS Panel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ion AmpliSeq Library Kit 2.0-96 LV	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ion Xpress Barcode Adapters 33-48 Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ion PGM Hi-Q OT2 Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ion Sphere Quality Control Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

### **Verbrauchsmaterialien:**

0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gelkammer	VWR, Darmstadt, Deutschland
96-Well Magnetplatte	Fisher Scientific, Leicestershire, England
PCR-Platte	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
96 well Sampleplate	
Falcon™ 15mL Conical Chip Ion 318 Chip Kit v2	Fisher Scientific, Leicestershire, England Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

### **Verwendete Geräte:**

Pipetten	Research plus, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland Pipetman, Gilson, Middleton, WI, USA
Heizblock	Thriller-Thermoinkubationsmischer, VWR, Darmstadt, Deutschland
Nukleinsäureaufreiniger	Automatisierter Maxwell® 16 MDx Research, Promega, Mannheim, Deutschland
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortexer	Combispin FVL-2400N, VWR, Darmstadt, Deutschland Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA VTX-3000L Mixer Uzusio, LMS Laboratory & Medical Supplies, Tokyo, Japan
Zentrifuge	Labor-Minizentrifuge, LabNet, Edison, NJ, USA Sprout™ Minizentrifuge, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland Heraeus Multifuge 1 L-R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler	Gentouch Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

	Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrowelle	Microwave 800, SEVERIN, Sundern, Deutschland
UV-Gerät	VWR, Darmstadt, Deutschland
Geldokumentations- system	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
LightCycler- 480 Instrument II	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Qubit 3.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ion OneTouch 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ion Torrent PGM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

### **Verwendete EDV-Programme:**

Nexus-Beauskunftungs- software	nexus ag, Villingen-Schwellingen, Deutschland
SAP-Software	SAP Logon 7200.2.6.1064, Walldorf, Deutschland
Lauris	Roche, Basel, Schweiz
Ion AmpliSeq Designer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ion Reporter 5.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
H+-Torrent Browser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
IGV 2.3 Software	Broad Institute Cambridge, Waltham, MA, USA
Exome Variant Server	National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, MD, USA
dbSNP	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
Ensembl genome browser 85	The European Bioinformatics Institute, Hinxton, UK
Cosmic	Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK
Software Primer3 web 4.0.0	Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, US
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
EndNote X7	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA

## **2.2 Auswahl der Patientenfälle mit Zytopenien zur Analyse von Mutationen im Knochenmark**

Für die Mutationsanalyse mittels tNGS wurden aus 107 Knochenmarkbiopsien, die am Institut der Pathologie in Tübingen auf die Fragestellung eines MDS untersucht worden waren, 39 Studienfälle ausgewählt. Dabei wurden alle Fälle aus dem Zeitraum Januar 1994 bis September 2015 berücksichtigt.

Die Knochenmarkproben lagen dabei in Paraffin eingebettet und Formalin fixiert im Archiv der Pathologie in Tübingen vor. Kriterien für die Auswahl waren ausreichend verfügbares Knochenmarkmaterial und das Vorhandensein von ausreichenden Daten zu klinischen Verläufen, laborchemischen Parametern, zytologischen, histologischen und zytogenetischen Befunden. Ebenfalls wurden Patientenfälle bevorzugt, bei denen mehrere Knochenmarkbiopsien vorlagen. Sechs der untersuchten 39 Fälle stellten Verlaufsbiopsien einzelner Knochenmarkproben dar.

Um Varianten, die bei drei Studienfällen mit einer Allelfrequenz von 50% vorlagen, bezüglich Keimbahn- oder somatischer Variante einzuordnen, wurden zusätzlich eine Magen-, Lymphknoten- und Kolonprobe aus dem Archiv der Pathologie entnommen.

Die pathologischen und klinischen Befunde der Patienten wurden mithilfe der Nexus-Beauskunftungs-, Lauris- und SAP-Software zusammengestellt. Hinzugezogen wurden, soweit diese vorhanden waren, Laborwerte der Blutanalysen, Befunde zur Zytologie und Histologie der Knochenmarkproben, Ergebnisse immunhistochemischer Färbungen der Knochenmarkbiopsate, Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie, zytogenetische Befunde der Blut- und Knochenmarkzellen und Krankheitsverläufe aus Arztbriefen.

Die zugehörigen Knochenmarkproben der 39 Fälle wurden nochmals von Herrn Prof. Dr. Fend und Frau Dr. Federmann histologisch und zytologisch reevaluiert. Anhand der klinischen Daten und der histologischen und zytologischen Beurteilung der Knochenmarkproben wurden die Patienten verschiedenen Diagnosegruppen zugeteilt. Es fand eine Zuteilung in die Gruppe reaktive Zytopenie, ICUS ohne Dysplasiezeichen, ICUS mit Dysplasiezeichen, low grade

MDS, MDS-EB und MDS mit Übergang in eine AML statt. Dabei erfolgte die Diagnose eines MDS und die Einteilung in seinen Subtypen nach den aktuellen diagnostischen Kriterien der WHO-Klassifikation von 2008 und 2016.

Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen hat zugestimmt, dass die archivierten in Paraffin eingebetteten Knochenmarkproben auf Mutationen untersucht werden dürfen (Ethikantragsnummer: 106/2013 BO2).

## **2.3 Gewinnung von DNA aus archiviertem FFPE-Knochenmarkmaterial**

### **2.3.1 DNA-Extraktion aus FFPE-Knochenmarkmaterial**

Für die DNA-Extraktion aus dem FFPE-Gewebe wurden die Paraffinblöcke mit dem enthaltenen Gewebe in 5 µm dicke Röllchen geschnitten. Fünf dieser Geweberöllchen einer Probe wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 180 µl Inkubationspuffer und 20 µl Proteinase K zu den Gewebeschnitten hinzupipettiert. Die Proben wurden bei 70 °C über Nacht im Heizblock inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden 400 µl Lysis Buffer zu den Proben hinzugegeben. Die Proben wurden im Anschluss mit dem Vortexer gemischt.

Die DNA-Extraktion wurde mit dem Maxwell 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit nach Protokoll des Herstellers automatisiert mit der Maxwell® 16 MDx Research Plattform durchgeführt.

### **2.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Qubit Fluorometer**

Die Konzentration der isolierten Knochenmark-DNA wurde mit dem Qubit Fluorometer bestimmt. Im Qubit dsDNA HS Reagenz ist ein Fluoreszenzfarbstoff enthalten der, wenn er in die doppelsträngige DNA interkaliert, ein Signal emittiert. Der Qubit Fluorometer bestimmt durch Detektion dieses Signals die DNA-Konzentration.

Für die zu messenden Proben und zwei Standards als Referenz wurde eine Qubit Working Solution hergestellt. Dabei wurde das Qubit dsDNA HS Reagenz mit dem Qubit dsDNA HS Puffer im Verhältnis 1:200 in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß

verdünnt. Für die Standards wurden 190 µl der Working Solution in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden jeweils 10 µl von dem Standard 1 und 2 hinzupipettiert.

Für die Proben wurden 199 µl der Working Solution entnommen und ebenfalls in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt. 1 µl der extrahierten DNA wurde jeweils zu der Working Solution hinzugefügt. Die Standards und Proben wurden mit dem Vortexer gemischt und zentrifugiert. Die Inkubationszeit für die Proben betrug 2 min. Vor der Messung der DNA-Konzentration wurde das Qubit Fluorometer mit den beiden Standards kalibriert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration der Proben bestimmt.

### **2.3.3 Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA mit einer Multiplex-PCR**

Da die Fixierung des Knochenmarks in Formalin zur DNA-Fragmentierung führt, wurde zuvor die Länge der DNA-Fragmente der isolierten DNA bestimmt. Dafür wurden verschieden lange Genabschnitte amplifiziert. Es wurden Primer verwendet, deren Produkte eine Länge von 100 bp, 200 bp, 300 bp und 400 bp aufweisen [92].

Für die Mutationsanalyse mittels tNGS an der Sequenzierplattform Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) wurde eine Amplifizierbarkeit von DNA-Produktlängen mit mindestens 300 Basenpaarlänge als Voraussetzung für die NGS-Analyse festgelegt, da mit dem NGS-Panel 75-150 bp lange Produkte generiert werden sollten.

Für einen Primer-Mix von 200 µl wurden 2 x 5 µl der 2,5 pmol AF4/X3-Primer-Lösung, 8 x 2,5 µl der restlichen 1,25 pmol Primer-Lösungen und 170 µl ddH<sub>2</sub>O in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Für die PCR wurden 2 µl aus dem Primer-Mix entnommen.

Zunächst wurde die isolierte DNA auf 5 ng/µl verdünnt. 2 µl der verdünnten DNA wurden mit 23 µl der vorgemischten PCR-Reagenzien (Tabelle 3) in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße überführt.

**Tabelle 3. PCR-Ansatz zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA.**

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O	15,8 µl	
10x Puffer II (ohne MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl	2 mM
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	0,2 mM
Primer-Mix	2 µl	AF4/X3L 0,25 µM AF4/X3U 0,25 µM andere 0,15 µM
AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5U/µl)	0,2 µl	0,04 U/µl
DNA (5 ng/µl)	2 µl	
Endvolumen: 25 µl		

Die PCR erfolgte in 35 Zyklen im Thermocycler bei folgenden Einstellungen:

**Tabelle 4. Einstellung des Thermocyclers für die PCR.**

	Zeit	Temperatur	
Denaturierung	7 min	35 °C	
Binden der Primer	45 sec	60 °C	} 35 Zyklen
Elongation	1 min	72 °C	
Inkubation	4 min	72 °C	
Kühlung		16 °C	

Die PCR-Produkte wurden nach der Amplifikation entweder bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert oder für die Gelelektrophorese direkt weiterverwendet. In der Gelelektrophorese wandert die DNA dann aufgrund ihrer negativen Ladung in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich weit durch das Gel. Um 2%iges Agarosegel herzustellen, wurden 5 g LE-Agarose mit 1xTBE auf 250 ml aufgefüllt und für 4 min aufgekocht. Die Flüssigkeit wurde abgekühlt und mit 17,5 µl Gel-Red versetzt, ein Farbstoff, der in die DNA interkaliert und somit die DNA-Produkte unter UV-Licht sichtbar macht.

Anschließend wurde das Gel in eine Vorrichtung gegossen und für 30 min ausgehärtet. Danach wurde das Gel in eine Gelkammer gelegt und die Gelkammer mit Puffer befüllt. In die erste Gel-Tasche wurden 10 µl von dem Längenmarker hineinpipettiert. Dieser enthält unterschiedlich lange DNA-Produkte bekannter Größe, die als Referenz dienen und so einen Rückschluss

auf die Größe der PCR-Produkte zulassen. In die weiteren Taschen wurden 10 µl der PCR-Produkte, die jeweils mit 2 µl Loading Dye versetzt wurden, pipettiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung fand bei 140 mV für 35 min statt. Anschließend wurden die PCR-Produkte unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Geldokumentationssystem fotografisch aufgenommen.

## **2.4 Übersicht über das Verfahren des Next Generation Sequencing mit der Ion Torrent PGM Plattform**

Für die Sequenzierungsreaktion mittels der Ion Torrent PGM Plattform werden in einem ersten Schritt aus einer DNA sogenannte Libraries generiert. Die Libraries bestehen aus DNA-Fragmenten, die panel-spezifisch angereichert wurden.

Anschließend werden die Primer-Sequenzen der DNA-Fragmente partiell verdaut, damit in einem nächsten Schritt Adapter und Barcodes an die Enden binden können.

In einer Emulsions-PCR werden die DNA-Fragmente mit ihren Adaptoren an kleine Kügelchen sogenannte Ion Sphere Particles (ISPs) gekoppelt und klonal in einer Emulsions-PCR amplifiziert.

Dafür befindet sich an den ISPs eine Sequenz, die komplementär zu den Adaptoren ist, und ausgehend von der die Neusynthese des DNA-Strangs stattfinden kann. Nach der Denaturierung bindet die Ausgangs-DNA an einer anderen Stelle am gleichen ISP, so dass eine erneute DNA-Synthese stattfinden kann.

Am Ende einer Emulsions-PCR liegen dann vielfache ISPs vor, die ein bestimmtes DNA-Fragment in mehreren Kopien gebunden haben. Anschließend werden durch eine Aufreinigung die ISPs, an die ein DNA-Fragment binden konnte, von den ISPs, an denen keine klonale Amplifikation stattfinden konnte, getrennt.

Für die Sequenzierungsreaktion werden die positiven ISPs in einem nächsten Schritt auf einen Chip geladen, der sich aus mehreren Wells (engl. well: Vertiefung) zusammensetzt. Ziel ist es, dass ein ISP in ein Well gelangt. Anschließend wird der Chip für die Sequenzierungsreaktion mehrfach mit Nukleotiden einer Base überflutet und anschließend gewaschen. Kommt es zum

Einbau eines komplementären Nukleotids, wird ein H<sup>+</sup>-Ion freigesetzt. Über die Umwandlung in eine Spannungsänderung wird ein digitales Signal registriert.

## 2.5 Designen des MDS-Panels zur Mutationsanalyse mittels Next Generation Sequencing

Für das Paneldesign wurden die Genregionen häufig beschriebener Mutationen bei einem MDS in der Literatur zusammengestellt. Zu diesen Genregionen wurden mithilfe des Ion AmpliSeq Designers Primer-Paare designt, an die in einem späteren Schritt Adapter und Barcodes binden konnten. Für das MDS-Panel wurden Primer-Paare designt, die die gesamte kodierende Sequenz der Gene in *ZRSR2*, *TP53* und *RUNX1* abdeckten. Für *SRSF2*, *ASXL1*, *U2AF1*, *DNMT3A*, *KRAS*, *IDH2*, *SF3B1*, *SETBP1*, *FLT3*, *IDH1*, *CBL*, und *NRAS* wurden Primer-Paare so designt, dass die bekannten Mutations-Hotspotregionen der Gene abgedeckt wurden (Tabelle 5). Die Abdeckung des MDS-Panels betrug für die ausgewählten Genregionen 94,79%.

**Tabelle 5. Gene und deren Exons, die mit dem MDS-Panel abgedeckt wurden.**

Gen	Exon	Gen	Exon	Gen	Exon
<i>ZRSR2</i>	1 - 11	<i>U2AF1</i>	2, 6	<i>FLT3</i>	14, 20
<i>TP53</i>	1 - 11	<i>KRAS</i>	2 - 4	<i>IDH1</i>	4
<i>RUNX1</i>	1 - 9	<i>DNMT3A</i>	3 - 23	<i>IDH2</i>	4
<i>SRSF2</i>	1	<i>SF3B1</i>	14, 15	<i>CBL</i>	7 - 9
<i>ASXL1</i>	11, 12	<i>SETBP1</i>	4	<i>NRAS</i>	2 - 4

## 2.6 Generierung von Libraries zur Sequenzierung von bestimmten DNA-Abschnitten

### 2.6.1 Amplifikation der DNA mit dem entsprechendem Primer Pool

Zur Herstellung der Libraries, die für das NGS eingesetzt wurden, wurden die zu sequenzierenden DNA-Abschnitte in einer PCR vervielfacht.

Das MDS-Panel bestand aus zwei Primer Pools mit 91 Primer-Paaren für den ersten und 88 Primer-Paaren für den zweiten Pool. Dementsprechend wurden

für jede DNA-Probe zwei DNA-Libraries hergestellt. Die Reagenzien wurden wie in Tabelle 6 angegeben in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt.

**Tabelle 6. Ansatz AmpliSeq-PCR.**

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen 1 Ansatz</b>
5X Ion AmpliSeq HiFi Mix	4 µl
2X Ion AmpliSeq Primer Pool	10 µl
ddH <sub>2</sub> O	4 µl

Die Proben wurden mit dem Vortexer gemischt und anschließend zentrifugiert. Zu jedem PCR-Mix des jeweiligen Primer Pools wurden 2 µl der auf 5 ng/µl verdünnten DNA pipettiert. Das Endvolumen betrug 20 µl. Die Proben wurden anschließend gevortext und zentrifugiert.

Die Zyklenanzahl für die PCR richtete sich nach der Anzahl der Primerpaare in einem Primer-Pool. Bei einer Anzahl zwischen 49 und 96 Primer-Paaren für einen Pool und dem Einsatz von FFPE-Material erfolgte die PCR mit 24 Zyklen. Die Amplifikation der DNA wurde im Thermocycler bei folgenden Einstellungen durchgeführt:

**Tabelle 7. Einstellungen des Thermocycler für die Ampliseq-PCR.**

<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>	
2 min	99 °C	} 24 Zyklen
15 sec	99 °C	
4 min	60 °C	
unendlich	10 °C	

Die Proben wurden entweder direkt weiterverwendet oder bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

### **2.6.2 Partiieller Verdau der Primer**

Nach der PCR-Reaktion wurde die amplifizierte DNA an den beiden Primer-Enden zu einem gewissen Teil verdaut, damit in einem späteren Schritt Adapter und Barcodes an diese Enden binden konnten. Für den enzymatischen

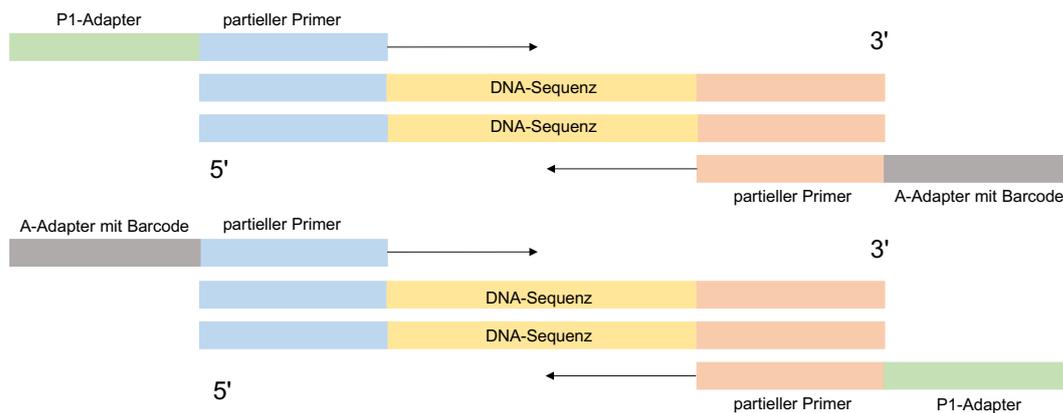
Primerverdau wurden zu jedem Ansatz 2 µl von dem im Kit enthaltenen FuPa-Reagenz hinzupipettiert. Das Endvolumen betrug 22 µl. Der Verdau erfolgte im Thermocycler für 10 min bei 50 °C, für 10 min bei 55 °C, für 20 min bei 60 °C und für 22 min bei 10 °C.

### **2.6.3 Ligation der Adapter an die partiell verdauten Primer**

Damit die DNA-Fragmente in der emPCR klonal amplifiziert und später sequenziert werden können, müssen an die beiden Primer-Enden Adapter und Barcodes binden. Dabei bindet an das eine Primerstück ein sogenannter P1-Adapter und an das andere Primerstück ein Barcode mit einem sogenannten A-Adapter (Abbildung 3). Barcodes bestehen aus einer bestimmten Nukleotidabfolge, so dass über diese nach der Sequenzierung auf die jeweilige DNA-Probe rückgeschlossen werden kann. So können mehrere DNA-Proben gleichzeitig sequenziert werden.

Für diese Ligation wurde für jede Probe zunächst ein P1 Adapter Mix in einer 1:4 Verdünnung hergestellt. Der Mix bestand aus 2 µl Ion P1 Adapter, 2 µl des jeweiligen Ion XpPress Barcodes und 2 µl ddH<sub>2</sub>O. Für die in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden für die NGS-Analyse Barcodes mit der Nummer 41, 42, 43 und 44 verwendet. Alle Amplikons einer Patientenprobe wurden mit dem gleichen Barcode versehen, so dass die Ergebnisse der Sequenzierung der jeweiligen Patientenprobe später zugeordnet werden konnten.

Zu den verdauten Amplikons wurden 2 µl Barcodemix, 4 µl Switch Solution und 2 µl DNA-Ligase hinzugegeben. Die Ligations-Reaktion erfolgte für 30 min bei 22 °C und für 10 min bei 72 °C im Thermocycler. Die Proben wurden auf 10 °C im Thermocycler heruntergekühlt und danach bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert oder direkt in der Ampureaufreinigung weiterverwendet.



**Abbildung 3. Binden der P1-Adapter und der A-Adapter mit den Barcodes an die Primer** (verändert nach [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied\\_markets\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_094273.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocuments/cms_094273.pdf)).

## 2.6.4 Aufreinigung der Libraries

Um von den Libraries überschüssige Primer und Desoxynukleotide zu entfernen, wurden diese mithilfe des AMPure Reagenz aufgereinigt. In dem Reagenz waren Magnetbeads enthalten, die mit Carboxylgruppen bedeckt waren. Über die Carboxylgruppen konnten DNA-Fragmente mit einer Länge von mindestens 100 bp an die Magnetbeads binden. Dafür wurden zu 30 µl jeder Library 45 µl AMPure Beads hinzugegeben. Die Ansätze wurden anschließend für 30 sec mit dem Vortexer gemischt, kurz zentrifugiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße für 2 min auf eine 96-Well Magnetplatte gestellt. Dabei sammelten sich die Beads mit der gebundenen DNA am Rand der Gefäße an dem Magneten, sodass man den Überstand ohne die Beads zu entnehmen verwerfen konnte. Um die Libraries zu reinigen, wurden 150 µl von 70%igem Ethanol, das frisch angesetzt worden war, zu jedem Reaktionsgefäß hinzugegeben. Die Proben wurden während des Waschschriffs auf der Magnetplatte für 30 sec hin und her bewegt, damit die Beads durch das Ethanol wandern und dieses so die an den Beads gebundene DNA aufreinigen konnte. Danach wurde das Ethanol mit einer Pipette entfernt. Der Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt und schließlich wurde das Ethanol komplett entfernt. Die Beads mit den gebundenen Libraries wurden für ungefähr 5 min bei

Raumtemperatur getrocknet bis alle Flüssigkeit verdunstet war. Zu den trockenen Beads wurden 35 µl Low-Te-Puffer hinzupipettiert. Die in den Reaktionsgefäßen enthaltene Mischung wurde mit dem Vortexer gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um den Überstand mit den aufgereinigten Libraries zu entnehmen, wurden diese für 2 min auf die Magnetplatte gestellt. Der Überstand wurde, ohne die Beads mitzunehmen in neue 0,2 ml Reaktionsgefäße überführt. Der ganze Waschvorgang wurde ein zweites Mal durchgeführt, um sicher zu gehen, dass die Primer und Desoxynukleotide komplett aus den Libraries entfernt worden waren. Anschließend wurden 247,5 µl ddH<sub>2</sub>O in 0,2 ml Reaktionsgefäße überführt und 2,5 µl der aufgereinigten Libraries hinzugefügt. Diese 1:100 Verdünnung wurde für die Libraryquantifizierung benötigt. Die aufgereinigten Libraries wurden im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

#### **2.6.5 Quantifizierung der generierten Libraries mit dem LightCycler**

Da die generierten Libraries für das Pooling der Libraries für die NGS-Analyse auf die gleiche Konzentration verdünnt wurden, wurde zuvor die Konzentration jeder Library mittels Real-Time-PCR mit dem LightCycler bestimmt. Bei der Real-Time-PCR mit dem LightCycler wird die Ausgangs-DNA in einer PCR vervielfacht. Zusätzlich wird ein Fluoreszenzfarbstoff zugegeben, der in die DNA interkaliert. Das Fluoreszenzsignal pro PCR-Zyklus wird in Form einer Kurve aufgezeichnet. Der Ct-Wert der Kurve gibt an, wie viele PCR-Zyklen benötigt werden, bis der Wendepunkt der Kurve erreicht wird. Der Ct-Wert ist proportional zum Logarithmus der Ausgangs-DNA. Um die Ausgangsmenge der DNA quantitativ zu bestimmen wurde zusätzlich eine Standardkurve generiert. Diese wurden aus drei verschiedenen Verdünnungen einer *E. coli* Lösung hergestellt. Aus den Ct-Werten der drei *E. coli* Ansätze und der bekannten DNA-Konzentration der *E. coli* Lösung wurde mit Excel eine Regressionsgerade gezeichnet. Aus dieser Regressionsgerade und den ermittelten Ct-Werten der Library-Verdünnungen konnte somit die Konzentration der Libraries berechnet werden.

Für die *E. coli* Standardreihe wurden in das erste 1,5 ml Reaktionsgefäß 22,5 µl Wasser und 2,5 µl der 68 pM *E. coli* Stammlösung pipettiert. Aus dieser 6,8 pM

*E. coli* Lösungen wurden durch Verdünnung mit Wasser eine 0,68 pM und eine 0,068 pM *E. coli* Lösung in neuen 1,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt. Die Lösungen wurden mit dem Vortexer gemischt und zentrifugiert. Im Anschluss wurde ein PCR-Mix hergestellt, der sich für einen Ansatz aus 5 µl 2X TaqMan MasterMix und 0,5 µl 2X Ion TaqMan Assay zusammensetzte. In eine 96-Well-Platte wurden 5,5 µl des PCR-Mixes in jedes benötigte Well hineinpipettiert. Anschließend wurden jeweils 4,5 µl der *E. coli* Verdünnungsreihe, der Libraryverdünnung oder ddH<sub>2</sub>O als Negativkontrolle in das jeweilige Well pipettiert. Die Quantifizierung erfolgte in Duplikaten. Bevor die PCR gestartet wurde, wurde die PCR-Platte für 5 sec zentrifugiert. Die PCR wurde im LightCycler bei 40 Zyklen unter folgenden Einstellungen durchgeführt: für 2 min bei 50 °C, für 3 sec bei 95 °C und für 30 sec bei 60 °C.

## **2.7 Ablauf der Sequenzierung und Auswertung der Ergebnisse der Sequenzierung**

Das Pooling der Libraries, die emPCR am Ion One Touch, die Anreicherung der Template-positiven Ion Sphere Particels (ISPs) und die Sequenzierungsreaktion mit der Sequenzierplattform Ion Torrent PGM wurden nach Angaben des Herstellers durch die Mitarbeiter des Diagnostiklabors der Molekularen Pathologie durchgeführt.

### **2.7.1 Pooling der Libraries**

Alle Libraries, die gemeinsam in einem NGS-Lauf sequenziert wurden, wurden auf eine Konzentration von 100 pM verdünnt. Von dem Librarypool wurden 2 µl entnommen und zu 23 µl ddH<sub>2</sub>O hinzupipettiert. Lag die Konzentration einer Library unter 100 pM, wurden die Libraries auf die gleiche Konzentration verdünnt wie die Library, die die geringste Konzentration aufwies.

### **2.7.2 Emulsions-PCR am Ion One Touch**

In einer Öl-emPCR werden die generierten PCR-Produkte an kleine Kügelchen, die sogenannten ISPs gebunden und millionenfach kopiert, entsprechend einer klonalen Amplifikation. Dabei befindet sich an den ISPs eine kurze Sequenz, die komplementär zu der Sequenz der P1-Adapter der Amplikons ist, was die Bindung der Amplikons an die ISPs gewährleistet. In der PCR wird an der kurzen Sequenz des ISPs ein komplementärer Strang generiert. Während der Denaturierung kommt es zur Ablösung des Ausgangs-DNA-Strangs und zur erneuten Bindung an einer anderen Stelle am gleichen ISP. Die Synthese wird erneut gestartet und gleichzeitig kann durch Rückwärts-Primer, die komplementär zu der Sequenz des A-Adapters des neuen DNA-Strangs sind, ebenfalls eine Synthese an diesem stattfinden.

Für die emPCR wurde der Ion OneTouch 2 und die Amplifikationslösung mit den ISPs nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Die gesamte Amplifikationslösung mit den ISPs wurde in den Proben Port des Reaktionsfilters pipettiert und der Ion OneTouch 2 wurde nach Angaben des Herstellers gestartet, die Laufzeit betrug 4,5 h.

### **2.7.3 Anreicherung der Template-positiven ISPs durch Aufreinigung**

Die ISPs, an die ein PCR-Produkt gebunden wurde und somit klonal amplifiziert werden konnte (Template-positiv), wurden von den ISPs, an die kein DNA-Strang gebunden wurde und somit keine PCR stattfinden konnte (Template-negativ), aufgereinigt.

Die Aufreinigung wurde in einem automatisierten Prozess in einem 8-Well-Streifen am Ion OneTouch ES durchgeführt. Dafür wurde der Ion OneTouch ES nach Angaben des Herstellers vorbereitet.

### **2.7.4 Qualitätsmessung der Template-positiven ISPs**

Die Qualitätsmessung erfolgte am Qubit 3.0. Zuerst erfolgte die Messung mit einer Negativkontrolle. Danach erfolgte die Messung der Template-positiven

ISPs. Durch Detektion des Fluoreszenzsignals der Sonde konnte die Konzentration der positiven ISPs ermittelt werden. Mit einer Excel-Tabelle wurde der prozentuale Anteil der positiv beladenen ISPs berechnet.

### **2.7.5 Sequenzierungsreaktion mit der Sequenzierplattform Ion Torrent PGM**

Für die Sequenzierung wurden die Template-positiven ISPs auf einen Chip geladen. Dieser Chip enthielt 11,1 Mio. Wells. Die Menge an ISPs war so gewählt worden, dass jeweils ein ISP in ein Well gelangte.

Die Sequenzierplattform Ion Torrent PGM wurde nach Angaben des Herstellers mit einer Dekontamination und Initialisierung für die Sequenzierungsreaktion vorbereitet.

Zu den ISPs wurden Sequenzierungsprimer zugegeben. Das Anbinden der Primer wurde im Thermocycler durchgeführt. Im Anschluss wurde die Sequenzierungs-Polymerase zu den ISPs hinzupipettiert. Der Chip wurde nach Angaben des Herstellers vorbereitet und mit den Template-positiven ISPs beladen. Im Anschluss wurde der Chip in die Sequenzierplattform Ion Torrent PGM gelegt und die Sequenzierung gestartet. Während der Sequenzierung wurde der Chip abwechselnd mit Nukleotiden einer Base überflutet und anschließend gewaschen. Dies wurde in 200 Zyklen mit allen vier Basen wiederholt.

### **2.7.6 Auswertung der Ergebnisse der Sequenzierung mit der Sequenzierplattform Ion Torrent PGM**

Nach der Sequenzierungsreaktion der Amplikons mit der Sequenzierplattform Ion Torrent PGM wurden Varianten im Vergleich zum humanen Referenzgenom hg19 mit der Torrent Suite ermittelt. Deren Annotation erfolgte mit der Ion Reporter Software. Die Varianten der jeweiligen Patientenprobe wurden aus der Ion Reporter 5.0 Software als Excel-Tabelle heruntergeladen. Es wurden Varianten mit einer Allelfrequenz unter 5% und synonyme Varianten herausgefiltert.

Ebenso wurden bekannte Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl.: single nucleotide polymorphisms, SNPs), also Polymorphismen, die mit mehr als einer Prävalenz von 1% in der Bevölkerung vorkommen und ohne klinischen Wert sind, nicht berücksichtigt. Hierfür wurden bestimmte Varianten mit Datenbanken wie dem Exome Variant Server, dbSNP und dem Ensembl genome browser 85 auf SNPs untersucht. Auch wurden für diese Studie nur Varianten berücksichtigt, die mindestens eine Abdeckung von 50 Reads aufgewiesen haben. Varianten, die eine Mutation darstellen könnten, wurden mit der Datenbank Cosmic, welche einen Katalog an bereits beschriebenen unterschiedlichen somatischen Mutationen bei verschiedenen Krebsentitäten darstellt, verglichen.

Die Eigenschaften des NGS-Laufs für die jeweilige Probe, wie die Abdeckung der Amplikons oder die durchschnittliche Anzahl an Reads, wurden durch die Analyse mit der Torrent Suite ermittelt.

Für die Visualisierung der Daten wurden die BAM- und BAI-Datei aus der Torrent Suite heruntergeladen. Die BAM-Datei wurde in die Integrative Genomics Viewer (IGV) 2.3 Software geladen. Die gefundenen Varianten wurden dort auf das Vorkommen in unterschiedlichen Readlängen und den beiden Leserichtungen beurteilt und die Positionen auch mit anderen Fällen verglichen, um panel-spezifische oder sequenzierungsbedingte Artefakte auszuschließen.

## **2.8 Validieren der Ergebnisse der Sequenzierung mittels Einzelamplikonanalyse**

### **2.8.1 Designen von Primern zum Validieren der Varianten mittels Einzelamplikonanalyse**

Um die gefundenen Varianten als Mutationen zu bestätigen, wurden diese mithilfe von Einzelamplikons nach der Ion Amplicon Library Preparation (Fusion Method) (Thermo Fisher Scientific) validiert. Es wurden alle Varianten, die detektiert werden konnten, validiert, bis auf Varianten, die eine Veränderung im Gen *SRSF2* in der Aminosäure p.Pro95 zeigten. Bei dieser Variante handelt es sich um eine Mutation, die zuvor bei einem MDS sehr häufig beschrieben wurde. Die Einzelamplikons deckten dabei nur den DNA-Abschnitt, in dem die Variante

lag, ab. Zunächst wurden für die Validierung mittels Einzelamplikons Primer designt. Mithilfe der IGV-Software und dem Ensembl genome browser 85 wurde die Genregion ermittelt, in dem die Variante lag. Mithilfe der Software Primer3 web 4.0.0 wurden zu dieser Sequenz sowohl Rückwärts- als auch Vorwärtsprimer designt. An die Primersequenzen wurden Adapter und Barcodes nach der Ion Amplicon Library Preparation (Fusion Method) angehängt. Es wurden Ion Xpress Barcode-Sequenzen von 60 bis 65 verwendet, die der jeweiligen Patientenprobe zugeteilt wurden.

### 2.8.2 Erstellung und Sequenzierung von Einzelamplikons zum Validieren der Varianten

Für das Lösen der designten lyophilisierten Primer wurde zu den jeweiligen Primern die Menge an Wasser hinzupipettiert, die vom Hersteller angegeben wurde, um eine Konzentration von 100 µM zu erhalten.

Damit beide DNA-Stränge mit Primern für die Einzelamplikonanalyse abgedeckt wurden, wurden zwei Primer-Mixe erstellt. Es wurden jeweils 20 µl der auf 10 µM verdünnten Primer entnommen und die Mixe 1 (Forward-Primer mit Barcode-Adapter + Reverse-trP1-Primer im Verhältnis 1:1) und 2 (Reverse-Primer mit Barcode-Adapter + Forward-trP1-Primer im Verhältnis 1:1) hergestellt. Für die PCR wurden 22,5 µl von dem Platinum PCR SuperMix High Fidelity in 0,2 ml Reaktionsgefäße überführt und 0,5 µl von dem jeweiligen Primer-Mix hinzupipettiert. Anschließend wurden 4 µl von der auf 5 ng/µl verdünnten DNA hinzugefügt. Die Amplifizierung wurde im Thermocycler durchgeführt (Tabelle 8).

**Tabelle 8. Einstellung des Thermocycler für die Generierung der Einzelamplikons.**

<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>	
3 min	94 °C	} 40 Zyklen
30 sec	94 °C	
30 sec	58 °C	
1 min	68 °C	
unendlich	4 °C	

Die Proben wurden entweder bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert oder für die

Aufreinigung direkt weiterverwendet. Diese wurde analog zur Aufreinigung der Libraries durchgeführt (siehe 2.6.4) ohne Wiederholung des Waschvorgangs. Mit dem Qubit Fluorometer wurde die Bestimmung der Konzentration der Einzelamplikons in ng/µl analog zur Bestimmung der DNA-Konzentration (siehe 2.3.2) durchgeführt. Um die Konzentration in nM zu berechnen, wurde folgende Formel angewendet:  $(\text{Konzentration} \times 106) / (660 \times \text{durchschnittliche Länge des Einzelamplikons (bp)}) = y$  (Konzentration in nM). Daraus ließ sich auf die Konzentration der Einzelamplikons in pM schließen. Für das NGS wurden Einzelamplikons in einer 5 pM Verdünnung im Pool eingesetzt. Die Einzelamplikons wurden analog zu den Libraries mit der Sequenzierplattform Ion Torrent PGM sequenziert und mit der IGV Software ausgewertet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Übersicht über die Charakterisierung des Patientenkollektivs**

Eines der primären Ziele dieser Arbeit war es, Unterschiede von Patienten mit Zytopenien auf molekulargenetischer Ebene mit der Mutationsanalyse mittels tNGS zu finden. Es wurden die Parameter, die bis jetzt in der Diagnostik eingesetzt werden, um Patienten mit Zytopenien in ihre Diagnosegruppen einzuteilen, evaluiert. Dazu wurden die Ergebnisse der zytologischen und histologischen Untersuchungen der Knochenmarkbiopsien, die Blutwerte und zytogenetischen Befunde hinzugezogen. Die Einteilung in die jeweilige Entität fand in Anlehnung an die WHO-Klassifikation von 2008 und 2016 der MDS statt. Die Patienten wurden in folgende Diagnosegruppen eingeteilt: Gruppe 1: Patienten mit reaktiver Zytopenie, Gruppe 2: Patienten mit einer ICUS ohne Zeichen einer Dysplasie, Gruppe 3: Patienten mit einer ICUS und Zeichen einer Dysplasie, Gruppe 4: Patienten mit einem low grade MDS, Gruppe 5: Patienten mit einem MDS-EB und Gruppe 6: Patienten mit einem MDS mit Übergang in eine AML.

Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit vorhandenen Studiengruppen und deren klinisch-pathologische Parameter.

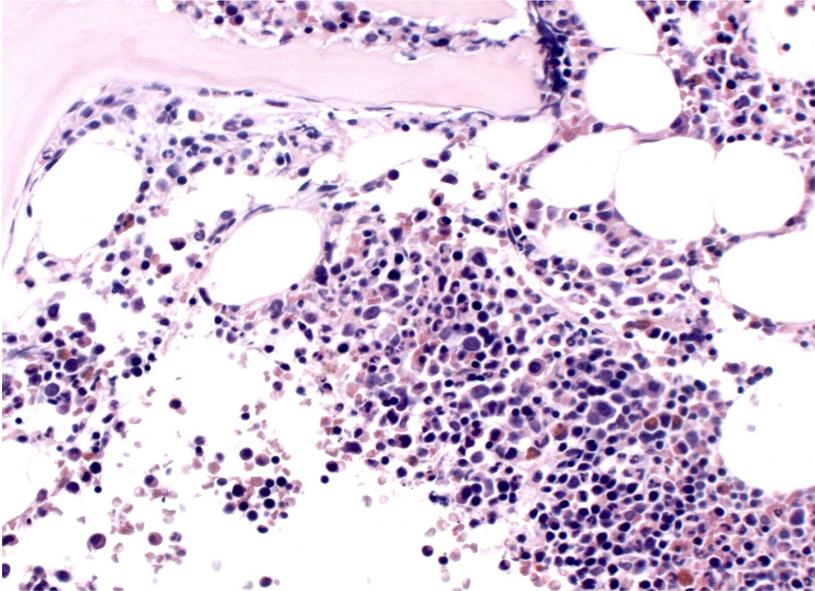
Im Anhang befinden sich Tabellen mit den einzelnen Studienfällen, ihren genauen Laborparametern und Ergebnissen der zytologischen, histologischen und zytogenetischen Untersuchungen, soweit diese vorhanden waren.

**Tabelle 9. Klinisch-pathologische Parameter der Studiengruppen reaktive Zytopenie, ICUS, ICUS+D und MDS. ICUS + D, ICUS mit Dysplasiezeichen. M=männlich. W=weiblich.**

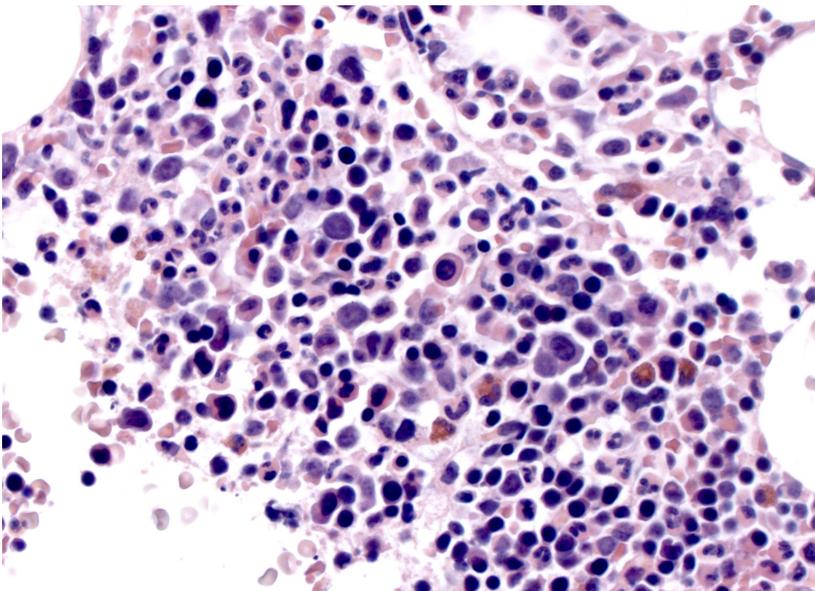
	<b>reaktive Zytopenie</b>	<b>ICUS</b>	<b>ICUS + D</b>	<b>MDS</b>
Fälle	6	7	1	25
Alter, Mittelwert (range)	65 (50-75)	56,7 (48-82)	81	70,3 (46-87)
Geschlecht, M/W	4/2	4/3	1 (M)	16/9
Hämoglobin, Mittelwert (range), g/dl	10,4 (7,2-13,2)	11,4 (8,6-14,9)	10,8	9,9 (6,3-14,9)
MCV, Mittelwert (range), fL	97,8 (87,2-109,6)	91,2 (78,3-104,5)	101,6	96 (80,1-118,9)
Leukozyten, Mittelwert (range), / $\mu$ L	9302 (5230-16990)	7190 (2740-16680)	3450	5034,5 (1170-14820)
Absolute Neutrophilenzahl, Mittelwert (range), / $\mu$ L	7150 (3620-12530)	5778,3 (1040-14520)	1690	5613,9 (260-12010)
Thrombozyten, Mittelwert (range), 1000/ $\mu$ L	178,4 (77-334)	184,7 (70-321)	151	164,1 (12-481)
Zytogenetische Aberrationen	-	1	1	9
Blasten im Knochenmark, Mittelwert (range), %	1,5 (0-3,5)	0,9 (0,5-1,5)	1	7 (0-30)
Blasten im peripheren Blut, Mittelwert (range), %	0	0	-	3 (0-17)

### 3.1.1 Charakterisierung von Patienten mit reaktiver Zytopenie, ICUS und ICUS mit Zeichen einer Dysplasie

Der Studiengruppe 1 (reaktive Zytopenie) wurden Fälle von sechs Patienten zugeordnet, wovon zwei weiblich und vier männlich waren. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme betrug 65 (range, 50-75). Bei den Fällen 1, 3, 5 und 6 zeigten sich Zeichen einer Dysplasie in den einzelnen Knochenmarkausstrichen, betrafen aber weniger als 10% der Zellen einer Zelllinie. Eine relevante Anämie zeigte sich bei Hämoglobinwerten bis zu 7,2 g/dl und eine relevante Thrombopenie bei Thrombozytenwerten bis zu 77.000/ $\mu$ l. In dieser Patientengruppe konnte ein Blastengehalt von 0–3,5% im Knochenmark bzw. im peripheren Blut detektiert werden. Zytogenetische Befunde lagen bei diesen Patienten nicht vor. Bei allen Patienten war die Ursache der Zytopenie reaktiver Genese. Abbildung 4 und 5 zeigen die Knochenmarkhistologie von Fall 4, bei dem eine medikamentenassoziierte Anämie und Thrombozytopenie vorlag. Es zeigt sich eine regulär ausreifende Hämatopoese in allen drei Zellreihen.



**Abbildung 4. Knochenmarkhistologie des Studienfalls 4.** Es zeigt sich ein normozelluläres Knochenmark mit unauffälliger Erythropoese, Granulopoese und Megakaryopoese in 200-facher Vergrößerung.

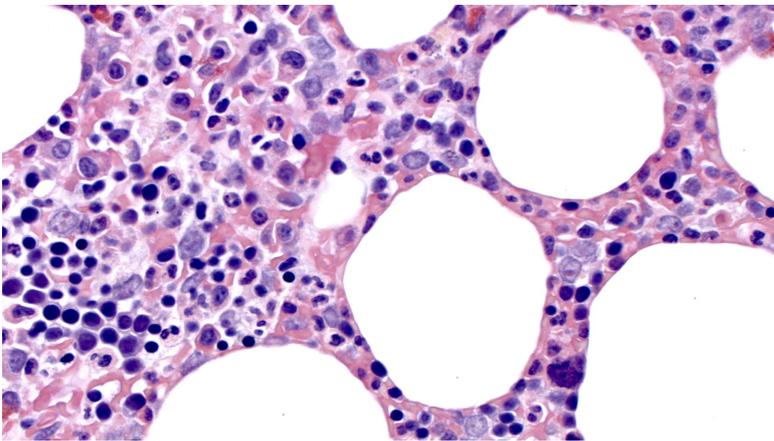


**Abbildung 5. Knochenmarkhistologie des Studienfalls 4 in 400-facher Vergrößerung.**

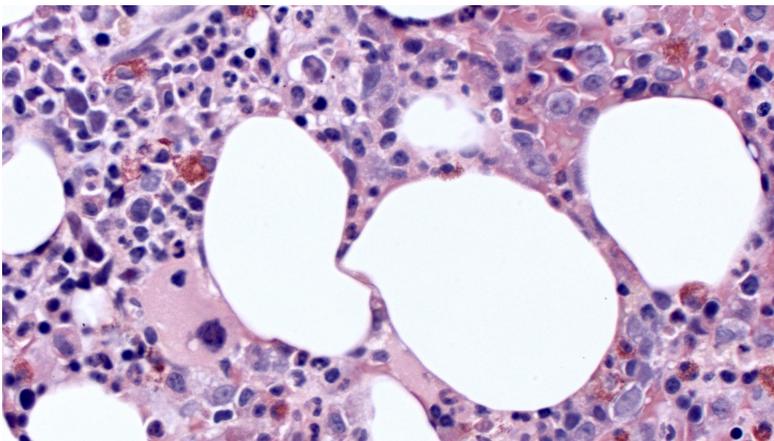
In der Studiengruppe 2 (ICUS ohne Dysplasiezeichen) fanden sich 7 der 39 Studienfälle. In dieser Gruppe lag das mittlere Alter bei 56,7 und vier Patienten waren männlich und drei weiblich. In dieser Gruppe fand sich eine relevante Anämie bei Hämoglobinwerten bis zu 8,6 g/dl, eine Thrombopenie bis zu 70.000/ $\mu$ l und eine relevante Neutropenie bis zu 1040/ $\mu$ l. Der Blastengehalt im

Knochenmark lag zwischen 0,5 und 1,5%. Ein Studienfall zeigte zytogenetische Aberrationen auf.

In der Gruppe 3 (ICUS mit Zeichen einer Dysplasie) wurde ein Patient eingeschlossen. Es zeigten sich in der Zytologie der Knochenmarkzellen Zeichen einer Dysplasie in allen drei Zelllinien, die aber weniger als 10% betrug, so dass die Diagnose eines MDS nicht gestellt werden konnte. Der Blastengehalt lag bei 1% und es lag ein auffälliger Karyotyp vor, der aber ohne Spezifität für ein MDS war. Abbildung 6 und 7 zeigen die Histologie aus dem Knochenmark von Fall 14. Im Vergleich zu der obigen Abbildung lassen sich hier geringe Dyshämatopoesezeichen finden.



**Abbildung 6. Knochenmarkshistologie von Studienfall 14 in 400-facher Vergrößerung.** Dargestellt sind eine Kerngrößenvarianz in der Erythropoese.



**Abbildung 7. Knochenmarkshistologie von Studienfall 14 in 400-facher Vergrößerung.** Sichtbar sind hier Megakaryozyten mit hypolobulierten, hyperchromatischen Kernen.

### 3.1.2 Charakterisierung der Studienfälle mit MDS

Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die MDS-Kohorte und die prozentuale Verteilung der Studienfälle auf die MDS-Subtypen wieder. In der MDS-Kohorte fanden sich 25 der 39 Studienfälle mit einem Altersdurchschnitt von 70 Jahren. In dieser Kohorte waren fast doppelt so viele männliche wie weibliche Patienten eingeschlossen. Acht Studienfälle wiesen die Diagnose eines MDS-MLD (32%), sechs eines MDS-EB-1 (24%), vier eines MDS del(5q) (16%), drei eines MDS mit Übergang in eine AML (12%), und zwei eines MDS-RS (8%) und eines MDS-EB-2 (8%) auf. Es waren zu 19 Studienfällen Daten zur zytogenetischen Untersuchungen vorhanden.

**Tabelle 10. Klinische Parameter der MDS-Studiengruppe.** Demographische Merkmale, MDS-Subtypen, zytogenetische Befunde und Einteilung in die IPSS-R Risikogruppe der MDS-Studiengruppe mit Darstellung der prozentualen Verteilung.

<b>Parameter</b>	<b>MDS-Kohorte (n=25) Patientenanzahl</b>
Demographische Merkmale	25
Männlich:weiblich (ratio)	16:9 (1,8)
Mittleres Alter	70,3 (46-87)
≤60	2
60-<70	8
70-<80	13
≥80	2
<i>MDS-Subtypen (WHO, 2016)</i>	
MDS-SLD	0 (0%)
MDS-MLD	8 (32%)
MDS del(5q)	4 (16%)
MDS-RS	2 (8%)
MDS-EB-1	6 (24%)
MDS-EB-2	2 (8%)
sAML	3 (12%)
<i>Zytogenetik</i>	19
Normaler Karyotyp	10 (53%)
Aberranter Karyotyp	9 (47%)
<i>IPSS-R Risikogruppe</i>	15
Sehr niedrig	3 (20%)
Niedrig	5 (33%)
Intermediäres Risiko	3 (20%)
Hoch	4 (27%)
Sehr hoch	0 (0%)

Neun dieser Studienfälle zeigten einen aberranten Karyotypen. 20% wurden nach dem IPSS-R der Risikogruppe sehr niedriges Risiko, 33% niedriges, 20% intermediäres und 27% hohes Risiko zugeteilt.

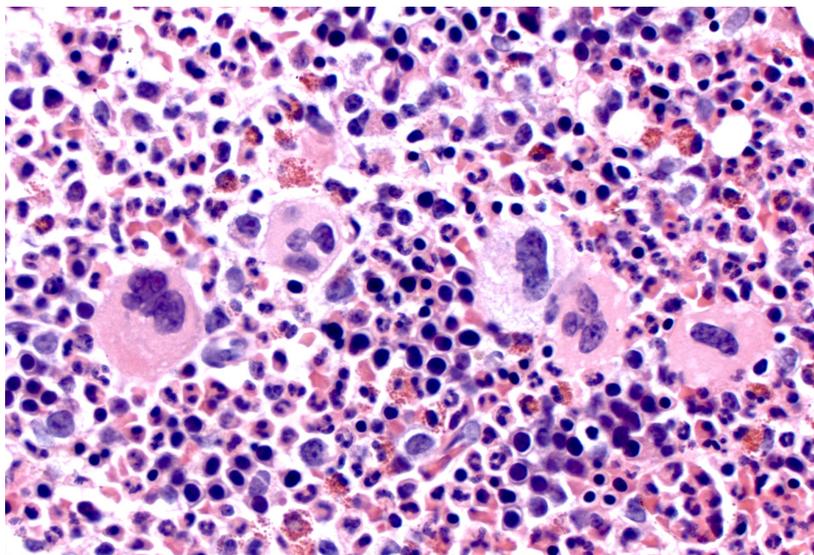
Die Studiengruppe der MDS-Patienten wurde nochmals unterteilt in die Gruppe 4 (low grade MDS), 5 (MDS-EB) und 6 (MDS mit Übergang in eine AML) (Tabelle 11).

**Tabelle 11. Klinisch-pathologische Parameter der Studiengruppen low grade MDS, MDS-EB und MDS mit Übergang in eine AML.** Risiko nach dem IPSS-R: 1 = sehr niedrig, 2 = niedrig, 3 = intermediär, 4 = hoch, 5 = sehr hoch.

	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Fälle	14	8	3
Alter, Mittelwert (range)	68,2 (46-79)	74,5 (68-87)	68,7 (61-74)
Geschlecht, M/W	8:6	6:3	3:0
Hämoglobin, Mittelwert (range), g/dl	10,5 (7-12,4)	9,5 (6,3-14,9)	9,1 (8-9,7)
MCV, Mittelwert (range), fL	99,2 (79,6-118,9)	95,8 (82,6-110,6)	84,9 (80,1-92,8)
Leukozyten, Mittelwert (range), / $\mu$ L	4170 (1710-6550)	4582,5 (1370-14820)	9410 (7390-12330)
Absolute Neutrophilenzahl, Mittelwert (range), / $\mu$ L	2807,6 (340-5350)	3120 (260-12010)	2095 (790-3400)
Thrombozyten, Mittelwert (range), 1000/ $\mu$ L	197 (12-386)	159 (42-481)	57 (21-105)
Zytogenetische Aberrationen	6	3	0
Blasten im Knochenmark, Mittelwert (range), %	1,5 (0-3)	7,4 (5-16)	24,8 (21-30)
Blasten im peripheren Blut, Mittelwert (range), %	0	2 (0-11)	16 (14-17)
IPSS-R-Risikogruppe	1,6	3,2	4

In der Gruppe 4 fanden sich in dieser Studie 14 Fälle, der die Subtypen MDS-MLD, MDS-RS und MDS del(5q) zugeteilt waren. Das mittlere Alter betrug 68 Jahre und es waren acht männliche und sechs weibliche Patienten in dieser Gruppe. Es fand sich eine relevante Anämie bei Hämoglobinwerten bis zu 7 g/dl mit einem MCV bis zu 118,9 fl, eine Thrombopenie bis zu 12.000/ $\mu$ l und eine relevante Neutropenie bis zu 340/ $\mu$ l. Der Blastengehalt im Knochenmark lag zwischen 0 und 3% und im peripheren Blut bei 0%. Sechs Studienfälle zeigten zytogenetische Aberrationen auf. Vier Fälle in dieser Gruppe stellten Verlaufsbiospien dar. Im Durchschnitt zeigten die Studienfälle nach dem IPSS-R ein sehr niedriges bis niedriges Risiko prognostisch auf.

Abbildung 8 zeigt den histologischen Befund des Studienfalls 17 bei dem dysplastische Veränderungen mit einem Anteil von über 10% in der Erythropoese und der Megakaryopoese zu finden waren und der dem Subtyp MDS-MLD zugeteilt wurde.



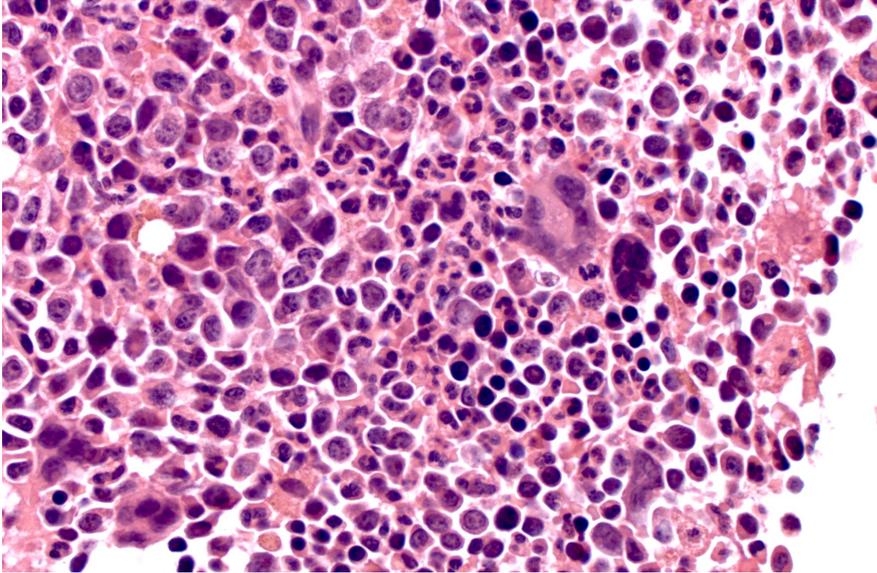
**Abbildung 8. Knochenmarkhistologie des Studienfalls 17 in 400-facher Vergrößerung.** Es zeigt sich ein hyperzelluläres Knochenmark mit einer gesteigerten, linksverschobenen, makrozytären Erythropoese und einer ausreifenden Granulopoese. Es sind vermehrt Megakaryozyten zu finden mit zum Teil hypolobulierten Formen.

In der Studiengruppe 5 fanden sich acht Patienten mit einem Altersdurchschnitt von 75 Jahren. Es waren doppelt so viele männliche wie weibliche Studienfälle in dieser Gruppe enthalten. Die Hämoglobinwerte lagen zwischen 6,3 und 14,9 g/dl. Eine Thrombopenie konnte bei Werten bis zu 42.000/  $\mu$ l und eine Neutropenie bei Werten bis zu 260/ $\mu$ l detektiert werden. Der Blastengehalt im Knochenmark dieser Patientengruppe lag zwischen 5 und 16%. Bei drei Fällen zeigten sich zytogenetische Aberrationen. Studienfall 26 zeigte zwar einen del(5q) Karyotypen, wurde aber aufgrund seines Blastengehalts von 5% dem Subtyp MDS-EB zugeteilt.

Nach dem IPSS-R zeigten die Patienten in der Gruppe MDS-EB durchschnittlich ein intermediäres Risiko auf.

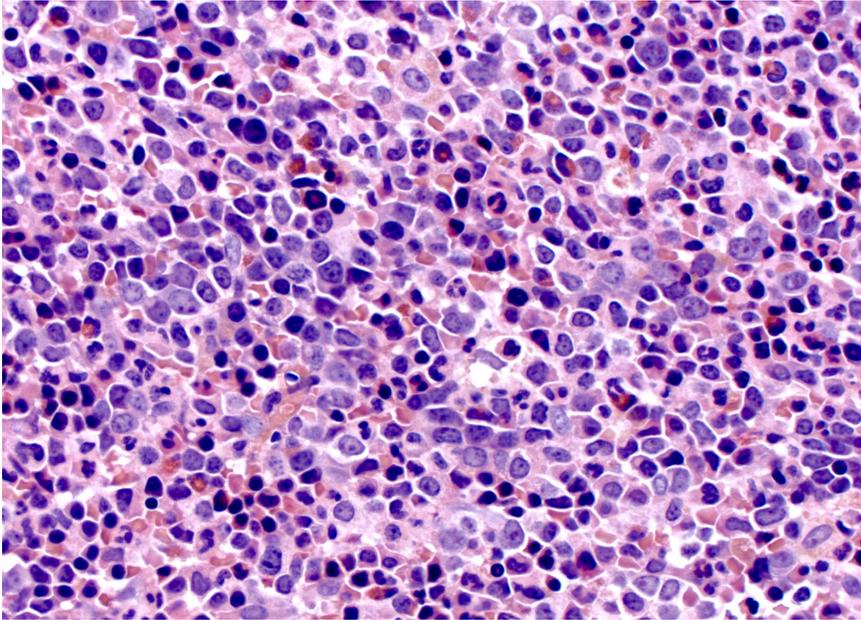
Abbildung 9 zeigt den histologischen Befund des Studienfalls 30 bei dem dysplastische Veränderungen in der Erythropoese und Megakaryopoese zu

finden waren und der einen Blastengehalt von 6% im Knochenmark und 11% im peripheren Blut gezeigt hat.

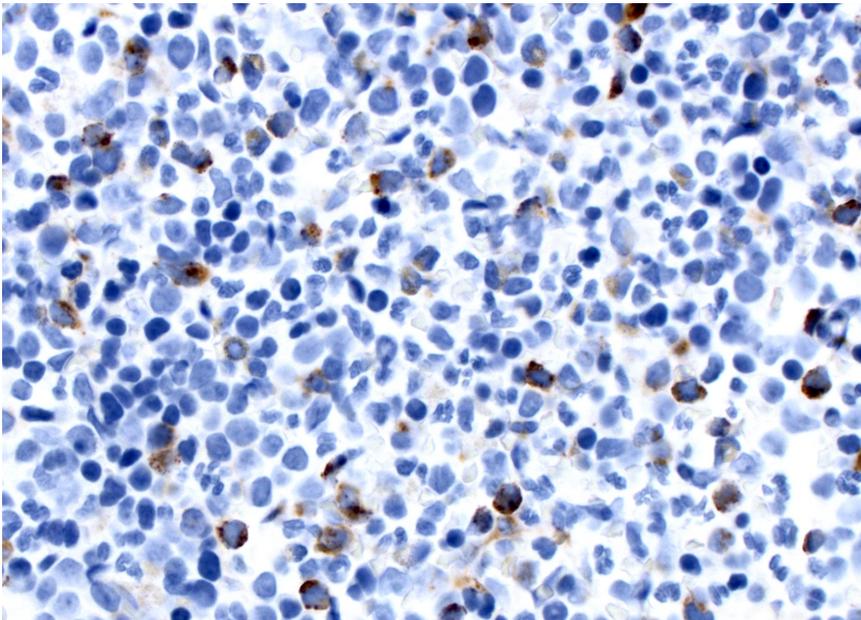


**Abbildung 9. Knochenmarkshistologie von Studienfall 30 in 400-facher Vergrößerung.** Es ist ein hyperzelluläres Knochenmark zu sehen. Die Megakaryozyten sind zum Teil hypolobuliert. Die Granulopoese ist vermehrt und linksverschoben. Die Erythropoese ist reduziert, es finden sich vermehrte, dysplastische und verkleinerte Megaloblasten.

In der letzten Studiengruppe 6 wurden nur Fälle eingeschlossen, die zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme eine AML aus einem MDS entwickelt haben. Es waren insgesamt drei Fälle eingeschlossen, die alle männlich waren, zwei dieser Fälle stellten Verlaufsbiospien von Fällen aus der Gruppe MDS-EB dar. Das Alter zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme betrug im Durchschnitt 69. Es fanden sich Anämiewerte bis zu 8 g/dl, Thrombopeniewerte bis zu 21.000/ $\mu$ l und Neutropeniewerte bis zu 790/ $\mu$ l. Im Knochenmark fand sich ein mittlerer Blastengehalt von 24,8% und im peripheren Blut von 16%. Bei zwei der drei Studienfälle lag ein Karyotyp-Befund vor, der unauffällig war. Die Fälle zeigten nach dem IPSS-R prognostisch ein hohes Risiko auf. Abbildung 10 und 11 zeigen den histologischen Befund des Studienfalls 33, bei dem eine sAML aus einem MDS diagnostiziert wurde mit einem Blastengehalt von 23,5% im Knochenmark.



**Abbildung 10. Knochenmarkhistologie des Studienfalls 33 in 400-facher Vergrößerung.** Zu sehen ist ein hyperzelluläres Knochenmark mit vermehrter megaloblastischer Erythropoese. Die Granulopoese ist ebenfalls vermehrt und linksverschoben. Die Megakaryopoese ist reduziert. Es finden sich Blasten im hyperzellulären Knochenmark.



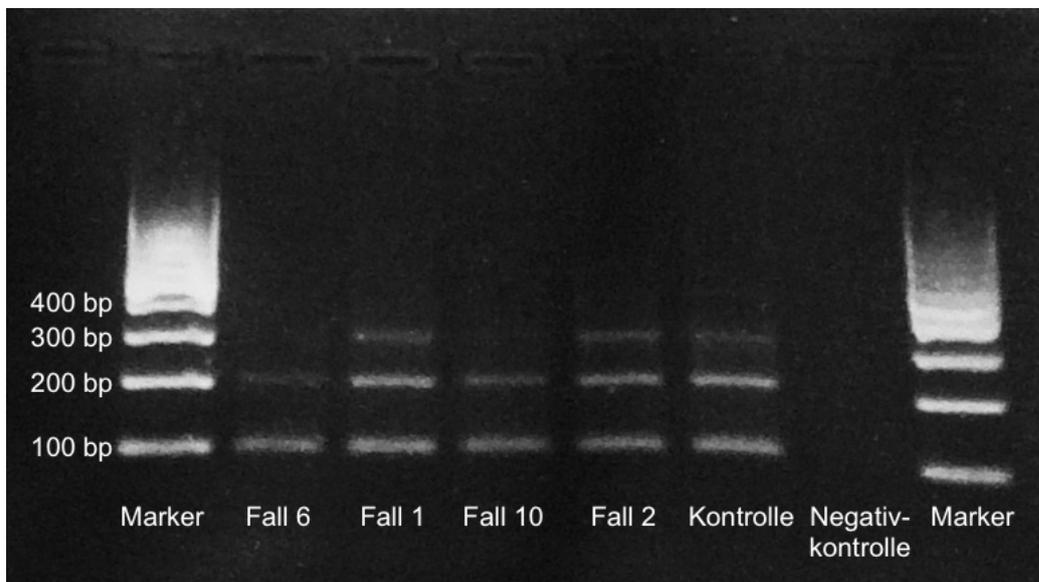
**Abbildung 11. Darstellung von Blasten mit dem Oberflächenmarker CD34 mittels immunohistochemischer Färbung.** Es zeigen sich im Knochenmark des Studienfalls 33 zahlreiche CD34-positive Zellen.

### 3.2 Bestimmung der DNA-Menge und DNA-Amplifizierbarkeit aus dem FFPE-Knochenmarkmaterial

Wie im vorangegangenen Kapitel dargestellt, wies eine erste klinische Diagnostik Variationen in der Zytologie und Histologie der Knochenmarkproben, im Blastengehalt und im zytogenetischen Befund in den einzelnen Studiengruppen auf. Um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Studiengruppen näher zu spezifizieren, wurde die DNA aus den Knochenmarkbiopsien mittels tNGS auf Mutationen untersucht.

Die DNA-Konzentrationen lagen zwischen 1,91 ng/ $\mu$ l und 258 ng/ $\mu$ l. Zur Analyse der DNA-Qualität wurde die maximal amplifizierbare Produktlänge der DNA in allen 39 Fällen mit einer PCR bestimmt.

Abbildung 12 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Gelelektrophorese der PCR-Produkte von drei DNA-Proben und einer Positivkontrolle mit bekannter Amplifizierbarkeit.



**Abbildung 12. Exemplarische Darstellung der Gelelektrophorese der PCR-Produkte von vier DNA-Proben.** Angegeben sind die Basenpaarlängen des Größenmarkers und die Beschriftungen der einzelnen Proben. Bei Fall 1 und 2 finden sich maximale PCR-Produkte mit 300 bp. Fall 6 und 10 zeigen maximale PCR-Produkte von 200 bp. Die Negativkontrolle zeigt, dass keine DNA-Kontamination stattgefunden hat. Die Positivkontrolle, bei der bekannt ist, dass sie DNA-Amplifikate von bis zu 300 bp aufweist, zeigt, dass die PCR funktioniert hat.

Die Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA konnte zeigen, dass fünf Studienfälle (13%) des Patientenkollektivs (5, 6, 10, 15 und 16) eine Amplifizierbarkeit der DNA von 200 Basenpaaren oder weniger aufgewiesen haben. Diese Fälle wurden aus der Studie ausgeschlossen. Alle anderen Fälle zeigten Produktlängen von 300 oder 400 Basenpaaren auf. Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die DNA-Konzentration und die Amplifizierbarkeit der DNA der Studienfälle.

**Tabelle 12. Konzentration und Amplifizierbarkeit der für diese Studie extrahierten DNAs.** Bei der Nummerierung mit x.1 handelt es sich um Vorläuferbiopsien und bei x.2 um Verlaufsbiopsien.

Fall	DNA-Konzentration [ng/μl]	Q-PCR [bp]	Fall	DNA-Konzentration [ng/μl]	Q-PCR [bp]
<b>Gruppe 1</b>			<b>Gruppe 4</b>		
1	26	300	19.2	12	300
2	29,2	300	20.1	8,4	300
3	17,9	300	20.2	7,5	400
4	1,9	300	21.1	91,6	300
5	5,5	200	21.2	2,2	300
6	27,6	200	22.1	47,4	300
<b>Gruppe 2</b>			22.2	39	300
7	59,6	300	23	25,6	300
8	15,7	300	24	14,7	300
9	20,8	300	<b>Gruppe 5</b>		
10	22,6	200	25	22,6	300
11	8,9	300	26	14,2	300
12	23,2	400	27	17,6	300
13	4,5	300	28	156	300
<b>Gruppe 3</b>			29	92	300
14	10,1	300	30.1	72,8	300
<b>Gruppe 4</b>			31	4,8	300
15	6,8	200	32.1	15,4	300
16	5	100	<b>Gruppe 6</b>		
17	19,6	300	30.2	30,6	400
18	20,4	300	32.2	68,6	400
19.1	29,6	300	33	258	300

12% der Studienfälle wurden der Studiengruppe 1, 18% der Gruppe 2 und 3% der Gruppe 3 zugeteilt. Die restlichen Patienten bildeten die MDS-Kohorte, davon fanden sich 35% der Studienfälle in der Studiengruppe 4, 24% in der Gruppe 5 und 9% in der Gruppe 6.

### **3.3 Auswertung der DNA-Sequenzierung**

Für 87% der ausgewählten Studienfälle wurden aus der isolierten Knochenmark-DNA mit dem MDS-Panel Libraries generiert.

Es erfolgte die Quantifizierung der Libraries. Die Librarykonzentration eines Pools lag zwischen 12,37 pM und 4929,07 pM. Für die ausgewählten Studienfälle konnten mit der extrahierten DNA aus dem FFPE-Knochenmarkmaterial mit den beiden Pools des MDS-Panels somit Libraries generiert werden.

#### **3.3.1 Qualität der Sequenzierung**

Um die Qualität der Daten der Mutationsanalyse mittels NGS zu beurteilen, wurden die durchschnittliche Coverage, die Anzahl der Amplikons, die mit weniger als 50 und 200 Reads abgedeckt wurden, und die uniformity of amplicon coverage mit der Torrent Suite ermittelt. Tabelle 13 zeigt eine Übersicht der Sequenzierungsdaten für jeden Fall mit denen die Qualität der Sequenzierung mit dem Ion Torrent PGM bestimmt wurde.

Die durchschnittliche Coverage entspricht der durchschnittlichen Anzahl an Reads mit dem ein Nukleotid durch die Sequenzierung abgedeckt wurde. Die durchschnittliche Coverage für diese Studie lag zwischen 522 und 4795 und im Durchschnitt bei 2824 Reads pro Nukleotid.

Zusätzlich wurden mit der Torrent Suite die Anzahl der Amplikons, die mit weniger als 50 und mit weniger als 200 Reads abgedeckt wurden, bestimmt. Insgesamt umfasste das für diese Studie verwendete Panel 179 Amplikons. Die Anzahl der Amplikons mit weniger als 50 Reads für einen Fall lag zwischen 0 und 24 und betrug im Durchschnitt 5. Mit weniger als 200 Reads wurden zwischen 2 und 47 Amplikons abgedeckt und im Durchschnitt 14.

Ein weiteres Qualitätskriterium zur Beurteilung der Sequenzierung einer Library ist die uniformiy of amplicon coverage. Unter der uniformity of amplicon coverage versteht man den prozentualen Wert an Basen in allen untersuchten DNA-Abschnitten eines Falls, die mit mindestens 20% der durchschnittlich generierten Reads abgedeckt wurden.

**Tabelle 13. Qualität der Sequenzierung.** Kriterien zur Beurteilung der Qualität waren die durchschnittliche Coverage, die Anzahl der Amplikons mit <50 und <200 Reads von insgesamt 179 Amplikons, die für einen Fall generiert wurden, und die uniformiy of amplicon coverage.

<b>Fall</b>	<b>durchschnittliche Coverage</b>	<b>Anzahl der Amplikons &lt; 50 Reads</b>	<b>Anzahl der Amplikons &lt; 200 Reads</b>	<b>uniformiy of amplicon coverage</b>
1	2123	3	12	88,83%
2	2738	13	23	81,01%
3	3966	2	3	95,53%
4	2047	8	26	77,65%
7	3509	1	3	92,74%
8	522	24	78	73,57%
9	2854	4	19	82,68%
11	3030	2	10	83,24%
12	3352	2	6	91,06%
13	1807	18	47	65,36%
14	2773	2	6	91,06%
17	2921	4	8	91,62%
18	3480	4	6	80,45%
19.1	3829	2	7	85,47%
19.2	2303	3	9	94,41%
20.1	3647	1	2	92,18%
20.2	559	6	26	93,85%
21.1	4617	0	3	92,18%
21.2	3098	3	10	84,92%
22.1	3885	3	5	94,97%
22.2	4238	2	4	96,09%
23	4795	1	2	92,18%
24	4262	7	26	60,34%
25	2950	1	4	94,41%
26	1951	13	26	77,52%
27	1232	3	11	93,85%
28	3263	3	4	93,85%
29	2977	1	2	94,97%
30.1	2175	6	27	77,65%
31	2376	2	7	89,39%
32.1	3236	3	7	87,71%
30.2	2583	4	14	89,72%
32.2	634	6	27	89,39%
33	2269	2	5	92,74%
<b>Mittelwert</b>	<b>2824</b>	<b>5</b>	<b>14</b>	<b>87,14%</b>

Die uniformity of amplicon coverage für einen Fall lag zwischen 60,34% und 96,09%. In dieser Studie wurde durchschnittlich eine uniformity of amplicon coverage von 87,14% erreicht.

### 3.3.2 Detektierte Varianten mittels targeted Next Generation Sequencing bei Patienten mit Zytopenien und Validierung der Ergebnisse mittels Einzelamplikonanalyse

Die mit dem MDS-Panel generierten Libraries wurden zur Detektion von Mutationen im Knochenmark von Patienten mit Zytopenien mit der Sequenzierplattform Ion Torrent PGM untersucht.

Tabelle 14 gibt die Ergebnisse der Sequenzierung mit der Sequenzierplattform Ion Torrent PGM für die sechs Diagnosegruppen wieder und deren Validierung mittels Einzelamplikonanalyse.

In der Mutationsanalyse mit dem tNGS wurden in 21 von 34 Fällen Varianten detektiert, wobei insgesamt 36 Varianten gefunden wurden.

Von den 26 Varianten, die mit der Einzelamplikonanalyse validiert wurden, konnten 70% (18/26) bestätigt werden. Es konnten bei 19 von 21 Fällen die Varianten bestätigt und somit als Mutationen detektiert werden.

Die Varianten, die bei den Studienfällen 20.1 und 24 mit dem MDS-Panel gefunden wurden, wurden in der Einzelamplikonanalyse nicht bestätigt. Bei dem Studienfall 20.1 lagen die Varianten mit einer niedrigen Allelfrequenz von 5-14% vor. Studienfall 24 zeigte eine schlechte Qualität der Sequenzierung mit einer uniformity of amplicon coverage von nur 60,34% auf.

**Tabelle 14. Detektion von Varianten mittels tNGS bei Patienten mit Zytopenien.** Die Variante ist auf Proteinebene und auf cDNA-Ebene dargestellt. Die Abdeckung der Variante zeigt, in wie vielen Reads, die Variante gefunden wurde. Die Frequenz der Variante gibt den prozentualen Anteil an Reads an, die diese Variante aufgezeigt hat. Es sind jeweils die Ergebnisse der Frequenz und der Abdeckung der Varianten sowohl in der Librarysequenzierung als auch in der Einzelamplikonanalyse dargestellt.

Fall	Variante	Variante Protein-ebene	Variante cDNA-Ebene	Frequenz Abdeckung		Frequenz Abdeckung	
				Librarysequenzierung		Einzelamplikonanalyse	
<b>Gruppe 1</b>							
1	ASXL1	p.A1320V	c.3959C>T	43%	1033	52%	5612
2	Wildtyp						
3	Wildtyp						

<b>4</b>	Wildtyp						
<b>Gruppe 2</b>							
<b>7</b>	Wildtyp						
<b>8</b>	ZRSR2	p.M7I	c.21G>A	66%	116		
				77%	290		
<b>9</b>	Wildtyp						
<b>11</b>	Wildtyp						
<b>12</b>	DNMT3A	p.Y592fs	c.1773_1773delC	53%	1128	55,1%	11266
<b>13</b>	Wildtyp						
<b>Gruppe 3</b>							
<b>14</b>	ZRSR2	p.Q213*	c.637C>T	74%	1971	78%	6064
<b>Gruppe 4</b>							
<b>17</b>	Wildtyp						
<b>18</b>	ASXL1	p.Q546*	c.1636C>T	41%	2426	39%	9353
<b>19.1</b>	Wildtyp						
<b>19.2</b>	Wildtyp						
<b>20.1</b>	ASXL1	p.G659S	c.1975G>A	14%	918	0%	6975
	ASXL1	p.P920L	c.2759C>T	6%	2886	0%	10335
	ASXL1	p.E931K	c.2791G>A	6%	2780	0%	10189
	ZRSR2	p.C299Y	c.896G>A	5%	2615	0%	17739
<b>20.2</b>	ASXL1	p.L775*	c.2324T>G	7%	698	7%	12625
<b>21.1</b>	ASXL1	p.E823fs	c.2467_2467delT	67,6%	2239	70,5%	8258
<b>21.2</b>	ASXL1	p.E823fs	c.2467_2467delT	58,6%	5566		
<b>22.1</b>	DNMT3A	p.R326H	c.977G>A	11%	4840	45%	11091
	SF3B1	p.K700E	c.2098A>G	33%	3973	44%	20582
<b>22.2</b>	DNMT3A	p.R326H	c.977G>A	11%	5636		
	SF3B1	p.K700E	c.2098A>G	40%	5630		
<b>23</b>	Wildtyp						
<b>24</b>	ASXL1	p.M1161I	c.3483G>A	11%	323	0%	11685
	IDH1	p.V121A	c.362T>C	5%	678	0%	8825
	RUNX1	p.T270I	c.809C>T	33%	330	0%	5101
	SRSF2	p.M75I	c.225G>A	8%	257	0%	9349
<b>Gruppe 5</b>							
<b>25</b>	Wildtyp						
<b>26</b>	Wildtyp						
<b>27</b>	DNMT3A	p.F732del	c.2193_2195 delCTT	52,3%	666	30,9%	22393
<b>28</b>	RUNX1	p.V296fs	c.884_885 insC	42,1%	4694	44,8%	45355
	ZRSR2	p.R295*	c.883C>T	81%	933	81%	12803
<b>29</b>	SRSF2	p.P95H	c.284C>A	46%	658		
	ASXL1	p.A640fs	c.1918_1928 delGCCATCGGAGG	54%	651	53,7%	11067
	RUNX1	p.R162Ser	c.486G>T	39%	3486	40%	23540
<b>30.1</b>	IDH2	p.R140Q	c.419G>A	44%	6024	40%	29847
	SRSF2	p.P95L	c.284C>T	42%	111		
<b>31</b>	IDH2	p.R172K	c.515G>A	7%	957	13%	23609
<b>32.1</b>	SRSF2	p.P95L	c.284C>T	33%	1057		
<b>Gruppe 6</b>							
<b>30.2</b>	IDH2	p.R140Q	c.419G>A	47%	808		
	SRSF2	p.P95L	c.284C>T	37%	5014		
	KRAS	p.A146T	c.436G>A	6%	22624	8%	6691
<b>32.2</b>	SRSF2	p.P95L	c.284C>T	24%	100		
	SETBP1	p.G870S	c.2608G>A	41%	2312	41%	11227
<b>33</b>	RUNX1	p.A149*	c.444_445 insTGAGAAATG CTACC	28,7%	909	27%	22282

Alle übrigen detektierten Varianten konnten als Mutationen bestätigt werden. Wie in der Tabelle zu sehen, wurden die Varianten in der Einzelamplikonanalyse mit mindestens 5.101 Reads und mit maximal 45.355 Reads abgedeckt. Die Frequenz der Varianten in der Einzelamplikonanalyse ähnelte zum größten Teil der Frequenz der Varianten, die bei der Librarysequenzierung detektiert wurde. Es wurden alle detektierten Varianten mittels Einzelamplikonanalyse validiert bis auf die Varianten p.P95H bei Fall 29 und p.P95L bei den Fällen 30 und 32 in *SRSF2*. Bei diesen Varianten handelt es sich, zum einen um Mutationen in der Hotspot-Region, die bereits mehrfach in der Datenbank Cosmic und bei Patienten mit einem MDS beschrieben wurden [50] [51]. Zum anderen wurden diese Varianten mit einer hohen Frequenz detektiert: die Variante p.P95H zu 46% bei Fall 29 und die Variante p.P95L zu 42% bei Fall 30 und zu 33% bei Fall 32. Ebenso haben sich diese Varianten bei den Studienfällen 30 und 32 in den Verlaufsbiopsien bestätigt. Daher wurde darauf verzichtet diese Varianten mittels Einzelamplikonanalyse zu validieren.

Die Variante, die bei Fall 8 in *ZRSR2* detektiert wurde, wurde auch nicht mittels Einzelamplikonanalyse validiert, sondern hier wurde nochmals eine Librarysequenzierung durchgeführt. In der zweiten Librarysequenzierung hat sich diese Variante ebenfalls bestätigt.

Auch wurde darauf verzichtet die Varianten p.E823fs in *ASXL1* bei 21.2, p.R326H in *DNMT3A* und p.K700E in *SF3B1* bei 22.2 und p.R140Q in *IDH2* bei 30.2 zu validieren. Diese Varianten in den Verlaufsbiopsien haben die gleichen Varianten wie in der jeweiligen Vorläuferbiopsie gezeigt, die sich bereits in der Einzelamplikonanalyse bestätigt haben.

### **3.3.3 Untersuchung von Kolon-, Lymphknoten- und Magengewebe zur Detektion von Keimbahnmutationen**

Bei Mutationen, die zu einem Anteil von etwa 50% vorliegen, kann es sich um somatische Mutationen, um Keimbahnmutationen oder seltene SNPs handeln. Bei den Fällen 1, 12, und 27 wurde zusätzliches Gewebe ohne maligne Zellen auf die gleiche Mutation untersucht, die in der Knochenmark-DNA gefunden wurde, um auszuschließen, dass eine Keimbahnmutation vorliegt. Dafür wurde

zunächst untersucht, ob zusätzliches Gewebe aus anderen Organen der Studienfälle vorlag. Aus Kolon-, Lymphknoten- und Magengewebe wurde DNA extrahiert und mittels Einzelamplikonanalyse auf die gleiche Mutation wie in der Knochenmark-DNA untersucht.

Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung von Kolon-, Lymphknoten- und Magengewebe auf Keimbahnmutationen der drei Studienfälle.

**Tabelle 15. Untersuchung von Kolon-, Lymphknoten- und Magengewebe der Studienfälle 1, 12, 27 zur Detektion von Keimbahnmutationen.**

Fall	Gewebe	Gen	Variante Proteinebene	Variante cDNA-Ebene	Frequenz	Abdeckung
1	Knochenmark	<i>ASXL1</i>	p.A1320V	c.3959C>T	43%	1033
	Kolon	<i>ASXL1</i>	p.A1320V	c.3959C>T	53%	24087
12	Knochenmark	<i>DNMT3A</i>	p.Y592fs	c.1773_1773delC	53%	1128
	Lymphknoten	<i>DNMT3A</i>	p.Y592fs	c.1773_1773delC	0%	32029
27	Knochenmark	<i>DNMT3A</i>	p.F732del	c.2193_2195delCTT	52,3%	666
	Magen	<i>DNMT3A</i>	p.F732del	c.2193_2195delCTT	0%	28898

Die DNA im Kolongewebe der Fallnummer 1 zeigte die gleiche Variante in *ASXL1*, die in der Knochenmark-DNA gefunden wurde, so dass darauf geschlossen werden kann, dass es sich um eine Keimbahnvariante handelt. Im Lymphknotengewebe der Fallnummer 12 und im Magengewebe der Fallnummer 27 konnte die Mutation aus der Knochenmark-DNA nicht nachgewiesen werden, so dass man darauf schließen kann, dass es sich bei diesen Fällen um somatische Mutationen in der Knochenmark-DNA handelt.

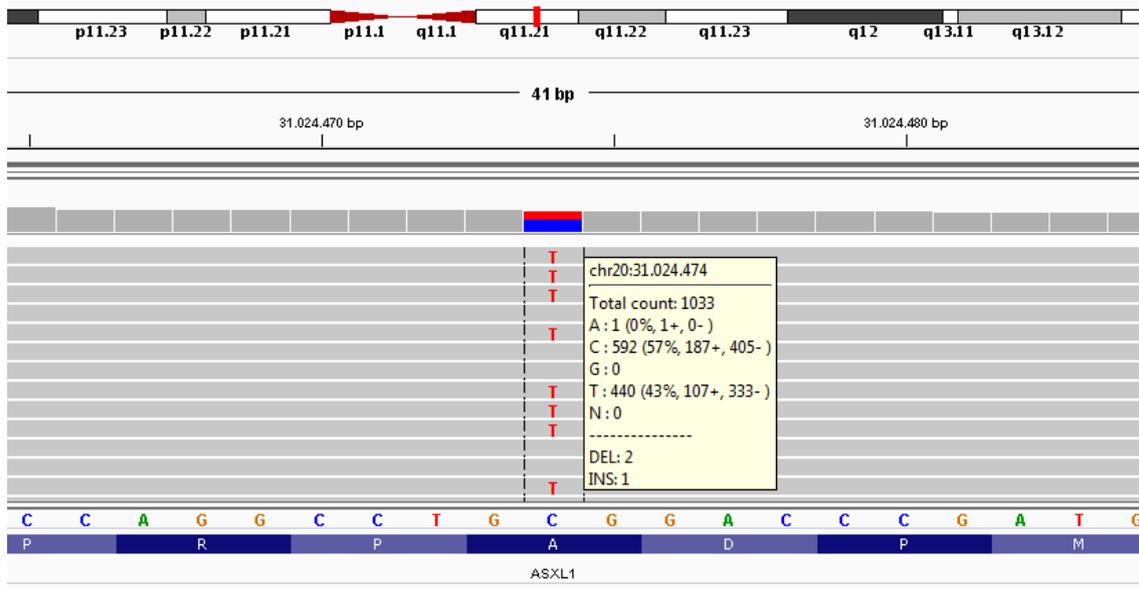
### 3.4 Finale Ergebnisse der Mutationsanalyse mittels tNGS am Knochenmarkgewebe bei Patienten mit Zytopenien

Tabelle 16 zeigt die finalen Ergebnisse der Mutationsanalyse mittels tNGS, nachdem die detektierten Varianten mittels Einzelamplikonanalyse auf das Vorliegen von Artefakten, Keimbahnmutationen sowie somatische Mutationen überprüft wurden.

**Tabelle 16. Finale Ergebnisse der Mutationsanalyse mittels tNGS nach Validierung der detektierten Varianten.** Dargestellt sind die Mutationen mit ihrer Frequenz und Abdeckung aus der Librarysequenzierung. In der letzten Spalte ist dargestellt, wie oft die Variante in der Datenbank Cosmic beschrieben wurde (Stand: 21.12.2020).

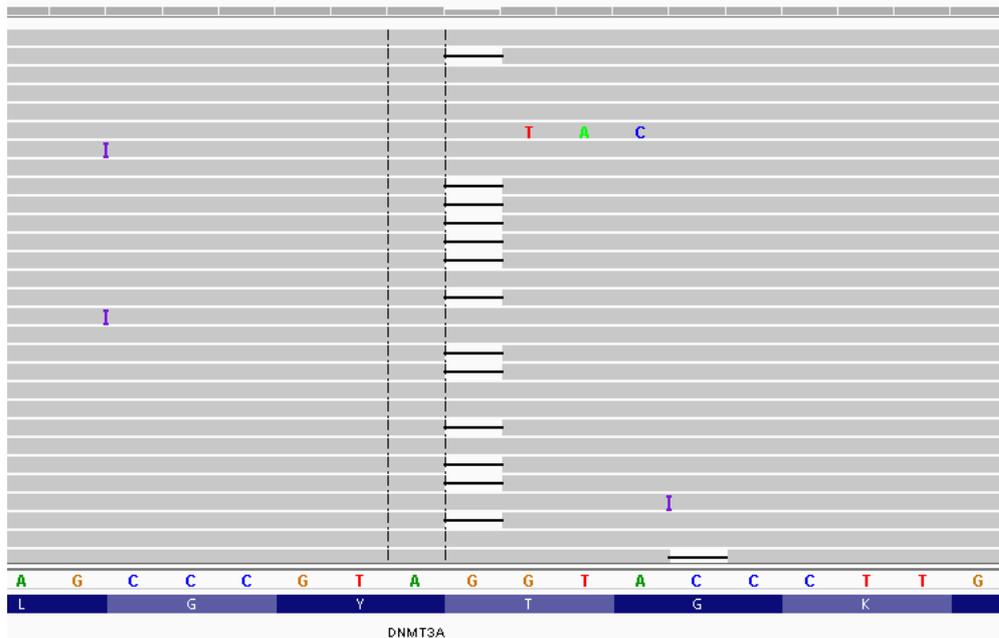
Fall	Variante	Variante Proteinebene	Variante cDNA-Ebene	Frequenz	Abdeckung	Cosmic
<b>Gruppe 1</b>						
1	Wildtyp					
2	Wildtyp					
3	Wildtyp					
4	Wildtyp					
<b>Gruppe 2</b>						
7	Wildtyp					
8	ZRSR2	p.M7I	c.21G>A	66%	116	
9	Wildtyp					
11	Wildtyp					
12	DNMT3A	p.Y592fs	c.1773_1773delC	53%	1128	
13	Wildtyp					
<b>Gruppe 3</b>						
14	ZRSR2	p.Q213*	c.637C>T	74%	1971	2
<b>Gruppe 4</b>						
17	Wildtyp					
18	ASXL1	p.Q546*	c.1636C>T	41%	2426	1
19.1	Wildtyp					
19.2	Wildtyp					
20.1	Wildtyp					
20.2	ASXL1	p.L775*	c.2324T>G	7%	698	5
21.1	ASXL1	p.E823fs	c.2467_2467delT	67,6%	2239	
21.2	ASXL1	p.E824fs	c.2467_2467delT	58,6%	5566	
22.1	DNMT3A	p.R326H	c.977G>A	11%	4840	5
	SF3B1	p.K700E	c.2098A>G	33%	3973	640
22.2	DNMT3A	p.R326H	c.977G>A	11%	5636	5
	SF3B1	p.K700E	c.2098A>G	40%	5630	640
23	Wildtyp					
24	Wildtyp					
<b>Gruppe 5</b>						
25	Wildtyp					
26	Wildtyp					
27	DNMT3A	p.F732del	c.2193_2195delCTT	52,3%	666	16
28	RUNX1	p.V296fs	c.884_885insC	42,1%	4694	
	ZRSR2	p.R295*	c.883C>T	81%	933	4
29	SRSF2	p.P95H	c.284C>A	46%	658	363
	ASXL1	p.A640fs	c.1918_1928 delGCCATCGGAGG	54%	651	
	RUNX1	p.R162Ser	c.486G>T	39%	3486	
30.1	IDH2	p.R140Q	c.419G>A	44%	6024	817
	SRSF2	p.P95L	c.284C>T	42%	111	200
31	IDH2	p.R172K	c.515G>A	7%	957	387
32.1	SRSF2	p.P95L	c.284C>T	33%	1057	200
<b>Gruppe 6</b>						
30.2	IDH2	p.R140Q	c.419G>A	47%	808	817
	SRSF2	p.P95L	c.284C>T	37%	5014	200
	KRAS	p.A146T	c.436G>A	6%	22624	290
32.2	SRSF2	p.P95L	c.284C>T	24%	100	200
	SETBP1	p.G870S	c.2608G>A	41%	2312	70
33	RUNX1	p.A149*	c.444_445 insTGAGAAATGCTACC	28,7%	909	

In der Studiengruppe 1 konnte bei keinem der vier Studienfälle eine Mutation detektiert werden. Die Variante im Gen *ASXL1*, die mit einer Frequenz von 43% detektiert wurde (Abbildung 13), hat sich als eine Keimbahnmutation herausgestellt (s. Kap. 3.3.3).



**Abbildung 13. Exemplarische Darstellung einer Punktmutation in der IGV-Software.** Fall 1 zeigt in 1033 Reads einen Austausch der Base Cytosin mit Thymin im *ASXL1*-Gen mit einer Frequenz von 43%.

In der Studiengruppe 2 konnte bei jeweils zwei der sechs Fälle (33%) eine Mutation in der Mutationsanalyse mit dem untersuchten MDS-Panel gefunden werden, so dass diese Fälle als CCUS (s. Kap. 1.2.3) zu klassifizieren sind. Bei Fall 8 zeigte sich eine Mutation im *ZRSR2*-Gen mit einer Allelfrequenz von 66%. Fall 12 zeigte in 53% der Reads eine Deletion im Gen, das für die Methyltransferase *DNMT3A* kodiert. Die Deletion führte zu einem Frameshift, wodurch ein vorzeitiges Stopcodon entstand (Abbildung 14). Durch Überprüfen von Lymphknotengewebe desselben Studienfalls wurde ausgeschlossen, dass es sich bei dieser Art von Mutation um eine Keimbahnmutation handelt (s. Kap. 3.3.3).



**Abbildung 14. Exemplarische Darstellung einer Deletion in der IGV-Software.** Die Deletion bei Fall 12 führte zu einer Frameshiftmutation.

In der Studiengruppe 3 wurde bei Fall 14 im *ZRSR2*-Gen eine Mutation mit einer Frequenz von 74% detektiert.

Bei den Studienfällen der Gruppe 4 zeigten 50% (6/12) mindestens eine Mutation in der Mutationsanalyse. Bei den Fallnummern 21 und 22 bestätigten sich die Mutationen in den Verlaufsbiopsien. Bei der Mutation in *SF3B1*, die bei der Fallnummer 22 detektiert wurde, handelt es sich um eine Mutation, die bereits 640-mal in der Datenbank Cosmic beschrieben wurde.

Bei sechs von acht Studienfällen der Studiengruppe 5 (75%) konnten mit der Sequenzanalyse mittels tNGS Mutationen gefunden werden. Es handelte sich dabei vor allem um Punktmutationen. Bei Fall 28 wurde zusätzlich eine Insertion in *RUNX1*, bei Fall 27 eine Deletion in *DNMT3A* und bei Fall 29 eine Deletion in *ASXL1* detektiert.

Bei den beiden Mutationen im *SRSF2*-Gen, handelt es sich um sogenannte Hotspot-Mutationen, die bereits zuvor häufig in der Datenbank Cosmic beschrieben wurden. Die Varianten kamen als p.P95H Variante bei Fall 29 und als p.P95L Variante bei Fall 30 vor.

In der Studiengruppe 6 konnte in allen Fällen (3/3) mindestens eine Mutation mit dem MDS-Panel detektiert werden. Bei Fall 30 konnten dieselben Mutationen wie

bei der Vorläuferbiopsie detektiert werden und zusätzlich wurde eine neue Mutation im Gen *KRAS* gefunden. Bei der Verlaufsbiopsie der Fallnummer 32 zeigte sich die gleiche Mutation im Gen *SRSF2* wie in der Vorläuferbiopsie und zusätzlich wurde eine neue Mutation in *SETBP1* gefunden.

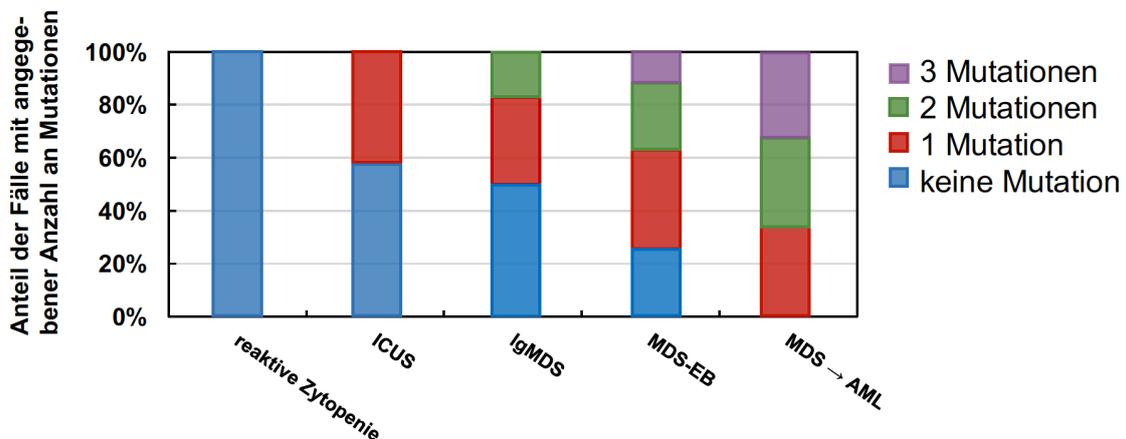
Insgesamt konnten in fünf der sechs Studiengruppen mit dem MDS-Panel Mutationen in der Knochenmark-DNA der Studienfälle detektiert werden. Es zeigten sich vermehrt Mutationen bei Fällen mit einem MDS und es konnten häufiger Mutationen detektiert werden, je weiter fortgeschritten das MDS war. Die Verlaufsbiopsien wiesen ebenfalls die Mutationen der Vorläuferbiopsien auf und zeigten zum Teil neue Mutationen.

### **3.5 Zusammenfassende Darstellung der detektierten Mutationen bei Patienten mit Zytopenien**

Um Patienten mit Zytopenien näher zu charakterisieren wurde untersucht, ob neben den klinisch-pathologischen Merkmalen eine Mutationsanalyse der Knochenmark-DNA von Genen, die bei einem MDS häufig mutiert sind, wegweisend für die Frage ist, ob es sich bei der Ursache der Zytopenie um ein MDS handelt oder nicht. Mit der Sequenzierung der Libraries konnten verschiedene Varianten in den einzelnen Patientengruppen identifiziert werden. Die Validierung mittels Einzelamplikonanalyse konnte die meisten der gefundenen Varianten als Mutationen bestätigen.

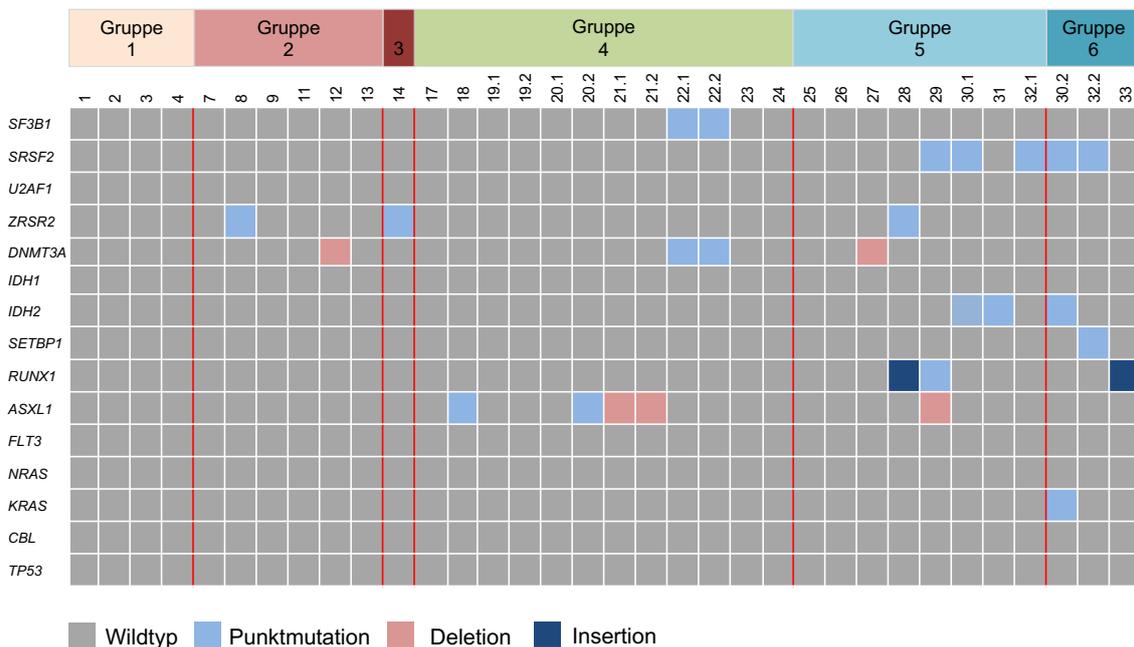
Wie in Abbildung 15 zu sehen, konnten in der Gruppe 1 keine neu erworbenen Mutationen in der Knochenmark-DNA identifiziert werden. 43% (3/7) der Patienten mit ICUS wiesen Mutationen auf. Diese Fälle sind aufgrund dem Vorliegen einer Zytopenie und dem zusätzlichen Vorhandensein einer Mutation als CCUS zu klassifizieren. Im Vergleich dazu wiesen 50% (6/12) der Studienfälle der Gruppe 4, 75% der Studienfälle der Gruppe 5 (6/8) und 100% (3/3) der Gruppe 6 mindestens eine Mutation in der Knochenmark-DNA mit dem neu designten MDS-Panel auf.

Mindestens zwei Mutationen fanden sich bei 17% (2/12) der Fälle der Studiengruppe 4, bei 38% (3/8) der Fälle der Gruppe 5 und bei 67% (2/3) der Fälle der Gruppe 6.



**Abbildung 15. Übersicht über den prozentualen Anteil der Fälle in einer Studiengruppe mit angegebener Anzahl an Mutationen.** Auf der x-Achse sind die einzelnen Studiengruppen aufgetragen und auf der y-Achse der prozentuale Anteil der Fälle in einer Gruppe mit keiner, einer, zwei oder drei Mutationen.

Abbildung 16 zeigt eine Gesamtübersicht über die Gruppen und Fälle, deren Knochenmark-DNA mit der Methode des tNGS auf Mutationen untersucht wurde.

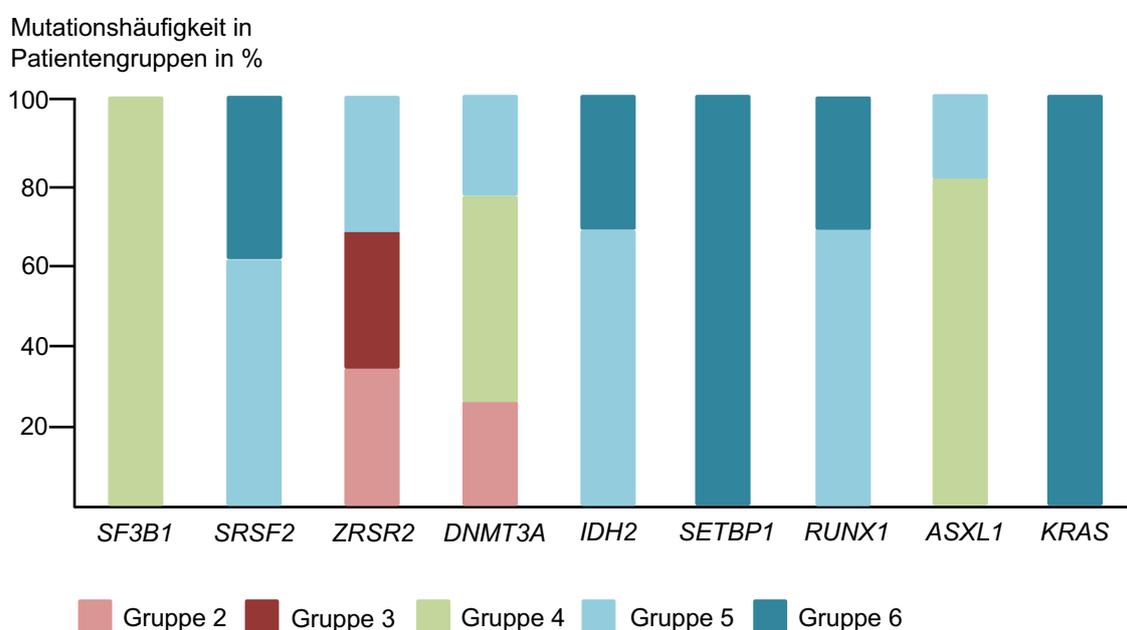


**Abbildung 16. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus der NGS-Analyse.** Die Heatmap zeigt die Mutationen, die mit der NGS-Analyse gefunden wurden und sich in der Einzelamplikonanalyse bestätigt haben. Jede Spalte stellt einen Fall dar, geordnet nach den Studiengruppen. Jede Zeile repräsentiert ein Gen. Die Farbe der Fläche gibt den Typ der Mutation wieder.

Wie in der Übersicht dargestellt, konnten vor allem Mutationen bei Patienten mit einem MDS detektiert werden. Bei Fällen, die von einem fortgeschrittenen MDS betroffen waren, fanden sich oft mehrere Mutationen.

Bei den meisten Mutationen handelte es sich um Punktmutationen. Es konnten in den Genen *SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *DNMT3A*, *IDH2*, *SETBP1*, *RUNX1*, *ASXL1* und *KRAS* Mutationen detektiert werden. Keine Mutationen wurden in den Genen *U2AF1*, *IDH1*, *FLT3*, *NRAS*, *CBL* und *TP53*, die ebenfalls im MDS-Panel enthalten waren, gefunden. In den Genen *SRSF2* und *ASXL1* fanden sich die meisten Mutationen. Es konnten jeweils fünf detektiert werden.

Abbildung 17 zeigt eine Übersicht über die Mutationshäufigkeit der Gene in den einzelnen Studiengruppen. Mutationen in *SF3B1*, *DNMT3A* und *ASXL1* wurden vor allem bei Patienten mit einem low grade MDS gefunden. Mutationen in *ZRSR2* und *DNMT3A* wiesen auch Studienfälle der Patientengruppe ICUS auf. Mutationen in *SRSF2*, *IDH2*, *SETBP1*, *RUNX1* und *KRAS* wurden in dieser Studie nur bei Patienten, die ein fortgeschrittenes Stadium eines MDS zeigten, gefunden.



**Abbildung 17. Gene, in denen Mutationen mit der Sequenzanalyse in den einzelnen Gruppen gefunden wurden.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil einer Gruppe, in der eine Mutation in diesem Gen gefunden wurde.

## 4 Diskussion

In dieser Studie wurden mittels des tNGS Knochenmarkbiopsien von Patienten mit einer peripheren Zytopenie auf Mutationen untersucht. Die Studiengruppe setzte sich zusammen aus Patienten ohne MDS und Patienten mit unterschiedlichen Stadien eines MDS. Die Diagnose eines MDS kann im klinischen Alltag oft eine Herausforderung darstellen, da bestimmte zytologische und histologische Kriterien erfüllt sein müssen und dysplastische Veränderungen in Knochenmarkzellen gesunder Individuen auftreten können. Ziel der Studie war es die Methode des tNGS nach Ion Torrent am FFPE-Knochenmarkmaterial zu etablieren und Mutationen zu identifizieren, die mit einem MDS assoziiert sind und diese von Mutationen abzugrenzen, die bei Patienten ohne MDS vorkommen.

### 4.1 Methode des tNGS nach Ion Torrent am FFPE-Gewebe

Für die Analyse in dieser Studie stand für das tNGS kein Frischgewebe zur Verfügung, sondern Knochenmarkgewebe, welches in Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet im Archiv der Pathologie vorlag. Mit der Zeit kommt es im FFPE-Gewebe zu einer Degradierung der DNA, so dass nicht die gesamte DNA oder größere Genabschnitte mit mehreren Exons untersucht werden können. So wurde in dieser Studie das *targeted* NGS eingesetzt, in dem DNA-Amplifikate von 100-200 bp generiert wurden und gezielte Hotspot-Regionen untersucht werden konnten. Es wurde zuvor getestet, ob die DNA-Qualität der Studienfälle ausreichend war und DNA-Amplifikate von mindestens 300 bp vorlagen. Fünf Studienfälle wurden aus dieser Studie ausgeschlossen, da sie nur DNA-Amplifikate von 200 bp oder weniger aufgewiesen haben. So eignet sich nicht jedes FFPE-Gewebe für den Einsatz des tNGS. Hat eine zu starke DNA-Degradierung stattgefunden, können mittels tNGS nicht ausreichend Amplikons generiert werden.

In der Mutationsanalyse mittels tNGS wurden in dieser Studie bei 21 Patientenfällen Varianten gefunden, wovon sich in der Einzelamplikonanalyse

bei 19 Fällen die Varianten bestätigt haben. Bei den Studienfällen 20.1 und 24 konnten die detektierten Varianten nicht bestätigt werden.

Fall 20.1 zeigte eine sehr gute Qualität der Sequenzierung. Es konnten durchschnittlich 3647 Reads generiert werden und es wurde nur ein Amplikon mit weniger als 50 und zwei Amplikons mit weniger als 200 Reads abgedeckt. Es zeigte sich auch eine sehr gute uniformity of amplicon coverage von 92,18%. Trotzdem wurden vier Varianten in den Genen *ASXL1* und *ZRSR2* detektiert, die sich in der Einzelamplikonanalyse nicht als Mutationen bestätigt haben. Bei diesem Studienfall lagen die Varianten aber nur mit einer niedrigen Allelfrequenz von 5-14% vor. So kann eine niedrige Allelfrequenz einen Hinweis dafür liefern, dass es sich bei den detektierten Varianten um Artefakte handeln könnte und, dass diese Varianten mittels Einzelamplikons nochmals analysiert werden sollten.

Bei Fall 24 haben sich ebenfalls die Varianten in *ASXL1*, *IDH1*, *RUNX1* und *SRSF2* nicht bestätigt. Im Vergleich zum Studienfall 20.1 wurden die Varianten mit einer Frequenz zwischen 5-33% identifiziert bei schlechterer Qualität der Sequenzierung. Die durchschnittliche Coverage an Reads von 4262 lag zwar über der durchschnittlich generierten Coverage in dieser Studie, aber die uniformity of amplicon coverage betrug nur 60,34%. Die Anzahl an Amplikons, die mit weniger als 50 Reads abgedeckt wurden betrug 7 und die Anzahl der Amplikons mit weniger als 200 Reads betrug 26. Auch wurden die Varianten nur mit einer niedrigen Rate an Reads abgedeckt. Diese lag zwischen 257 und 678.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die Methode der Einzelamplikonanalyse dazu eignet, um detektierte Varianten auf Echtheit zu überprüfen. Dies kann vor allem notwendig sein, wenn Varianten nur mit einer niedrigen Allelfrequenz identifiziert werden konnten, wie beispielsweise bei Fall 20.1, oder wenn die Sequenzierung eine schlechte Qualität aufgewiesen hat wie zum Beispiel bei Fall 24.

Die Methode der Einzelamplikonsequenzierung eignet sich nicht nur dazu, um detektierte Varianten als Mutationen zu bestätigen, sondern auch, um zusätzliches Gewebe auf Keimbahnmutationen zu untersuchen, was erforderlich sein kann, wenn eine Mutation mit einer Allelfrequenz von 50% vorliegt. So

konnte die Mutation in *ASXL1* bei dem Studienfall 1 als Keimbahnmutation identifiziert werden und nicht als erworbene Mutation im Knochenmark.

Insgesamt aber konnte gezeigt werden, dass sich die Methode des tGNS dafür eignet, um Gewebeproben gezielt auf Mutationen zu untersuchen und dass diese Methode am FFPE-Knochenmarkmaterial durchgeführt werden kann. Die Qualität der Sequenzierung zeigte zufriedenstellende Ergebnisse mit einer durchschnittlich generierten coverage von 2824 und einer uniformity of amplicon coverage von 87,14%.

## **4.2 Detektierte Mutationen mittels tNGS**

### **4.2.1 Detektierte Mutationen bei Patienten mit reaktiver Zytopenie und bei Patienten mit ICUS**

In der hier durchgeführten Studie zeigte sich in der Studiengruppe 1 bei Fall 1 eine Mutation in *ASXL1*, die sich in der Einzelamplikonanalyse der DNA aus dem Kolongewebe als Keimbahnmutation und nicht als erworbene Mutation herausgestellt hat. Der Anteil an Mutationen mit dem in dieser Studie verwendeten Panel lag in dieser Gruppe somit bei 0%. Kein Patient in dieser Gruppe zeigte damit eine CHIP, was zu erwarten war, da sich eine CHIP bei gesunden Personen über 70 Jahren nur bei etwa 10% finden lässt und in dieser Studie nur vier Fälle in der Studiengruppe reaktive Zytopenie eingeschlossen worden waren. Auch war *TET2*, welches neben *DNMT3A* und *ASXL1* am häufigsten bei Personen mit einer CHIP von einer Mutation betroffen ist, nicht im Mutationspanel enthalten [80] [82].

In der Gruppe ICUS zeigten 43% der untersuchten Fälle eine Mutation. Diese Fälle erfüllen aufgrund dem Vorhandensein einer Mutation und dem Vorliegen von keinen oder weniger als 10% an Dysplasiezeichen die diagnostischen Vorgaben für das Vorliegen einer CCUS. Somit sind diese Fälle als eine CCUS zu reklassifizieren.

Der Mutationsanteil in der Studiengruppe 2 lag bei 33% und in der Studiengruppe 3 bei 100%. Diese Mutationshäufigkeit liegt über der beschriebenen Häufigkeit

von 28% bei Patienten mit ICUS ohne Zeichen einer Dysplasie und 62% bei Patienten mit ICUS und Zeichen einer Dysplasie [93].

In dieser Studie war nur Fall 14, der eine Mutation im Gen *ZRSR2* mit einer Allelfrequenz von 74% zeigte, in der Studiengruppe 3 eingeschlossen, was den hohen Mutationsanteil in dieser Gruppe erklärt. Ein Grund für die detektierte hohe Allelfrequenz ist, dass das Gen *ZRSR2* auf dem X-Chromosom liegt und es sich bei dem Studienfall 14 um einen männlichen Patienten handelte. Im Verlauf wurde bei diesem Patienten die Diagnose einer refraktären Zytopenie mit multilineärer Dysplasie gestellt, welche nach der WHO-Klassifikation von 2016 dem Subtyp MDS-MLD entspricht. Steensma et al. und Valent et al. empfehlen, dass bei Patienten mit ICUS und MDS-ähnlichen molekularen Aberrationen die Diagnose einer CCUS, als Unterform einer CHIP, gestellt werden sollte [3] [83]. In einer Studie von Malcovati et al. hatten Patienten mit einer CCUS und Mutationen in Genen, die für das Spleißosom codieren wie *ZRSR2*, einen hohen positiven prädiktiven Wert für die Entwicklung einer hämatologischen Neoplasie wie ein MDS [94].

So könnte das Vorhandensein einer Mutation wie bei Fall 14 das diagnostische Dilemma, welches dem Untersucher widerfährt, um die Diagnose eines MDS zu stellen, klären. Für die Diagnose eines MDS lagen zum Zeitpunkt der Biopsie nicht ausreichend Kriterien vor. Es konnten Dysplasiezeichen in allen drei Zelllinien gefunden werden, diese lagen aber unter 10%. Die beiden detektierten zytogenetischen Aberrationen del(20q) und -Y bei Fall 14 sind mit einem MDS assoziiert aber ohne diagnostische Spezifität [16]. Das Vorhandensein einer Mutation mit einem hohen positiven prädiktiven Wert bei Patienten mit ICUS könnte den Grenzwert von mindestens 10% an dysplastischen Zellen in einer Zelllinie für die Diagnose eines MDS senken und eine frühere Diagnose eines MDS und damit ein früheres therapeutisches Eingreifen ermöglichen.

Fall 8 der Studiengruppe 2 zeigte ebenfalls einen MDS-typischen Karyotypen (X-Y) ohne diagnostische Spezifität und eine Mutation im Gen *ZRSR2* mit einer Allelfrequenz von 66%. Im Gegensatz zu Fall 14 transformierte Fall 8 im Verlauf nicht in ein MDS, zeigte aber auch zum Zeitpunkt der Knochenmarkbiopsie keine Zeichen einer Dysplasie in einer Zelllinie. Fall 8 hätte durch seine Mutation ein

erhöhtes Risiko an einer hämatologischen Neoplasie zu erkranken [83] [93]. Man könnte in der klinischen Diagnostik bei Patienten mit einer ICUS und einer Mutation in Genen, die das Spleißosom betreffen, wie bei Fall 8, engmaschige Kontrollen durchführen, um rechtzeitig ein MDS zu diagnostizieren.

Fall 12 zeigte eine Mutation im Gen *DNMT3A* mit einer Frequenz von 53%, das auch bei Gesunden von einer Mutation betroffen sein kann. 30%-50% der Mutationen, die bei Gesunden ohne eine hämatologische Erkrankung gefunden werden, betreffen das Gen *DNMT3A* [82] [95]. Allein vorkommende Mutationen in *ASXL1*, *TET2* und *DNMT3A* zeigten in der Studie von Malcovati et al. bei Patienten mit CCUS einen niedrigen positiven prädiktiven Wert für die Entwicklung einer hämatologischen Neoplasie [94]. So könnte man bei Fall 12 auch regelmäßige klinische Kontrollen durchführen aber mit einem größeren zeitlichen Intervall als bei Fall 8, um eine hämatologische Erkrankung frühzeitig zu diagnostizieren.

Das Vorhandensein einer somatischen Mutation bei einem Patienten mit einer ICUS kann ein zufälliger Befund sein, der nicht mit einem MDS zusammenhängt. Eine Mutation kann aber bei Patienten mit ICUS und dysplastischen Veränderungen auf ein frühes MDS-Stadium hinweisen.

So könnte man sich überlegen, ob man in der Diagnostik eines MDS den Schwellenwert von 10% an Dysplasiezeichen in einer Zelllinie senkt bei zusätzlichem Vorhandensein einer Mutation mit einem hohen positiven prädiktiven Wert für die Entwicklung einer hämatologischen Neoplasie.

Es hat sich aber auch in dieser Studie gezeigt, dass eine Mutation allein nicht ausreicht, um die Diagnose eines MDS stellen zu können. So zeigten Fall 8 und Fall 12 Mutationen, die mit dem MDS-Panel detektiert wurden. Die Ursache der Zytopenie war aber nicht ein MDS sondern blieb unbekannt. Im Verlauf zeigte sich bei diesen Fällen auch kein Fortschreiten der ICUS in ein MDS. So bleibt die Zytologie und die Histologie Hauptbestandteil der Diagnostik, um die Diagnose eines MDS stellen zu können.

#### **4.2.2 Detektierte Mutationen bei MDS-Patienten**

Diese Studie konnte mit 71% die Mutationsfrequenz von 70-90%, die für MDS-Patienten in der Literatur für mindestens eine Mutation angegeben wird, bestätigen. Am häufigsten wird in der Literatur eine Mutation in *TET2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *SRSF2*, *DNMT3A* und *RUNX1* bei MDS-Patienten angegeben [43] [44] [46]. In dieser Studie zeigten sich ebenfalls die meisten Mutationen in *ASXL1*, *RUNX1*, *SRSF2* und *DNMT3A*.

Das Gen *TET2* war aufgrund seiner Größe nicht im Mutationspanel enthalten, so dass keine Mutationen in dieser Studie darin detektiert werden konnten. Die niedrige Detektionsrate von 5% für Mutationen in *SF3B1* bei MDS-Patienten in dieser Studie, im Vergleich zu 20-30% bei MDS-Patienten in der Literatur, kann man damit erklären, dass nur zwei Fälle mit dem Subtyp MDS-RS in dieser Studie eingeschlossen worden waren, der mit Mutationen in *SF3B1* assoziiert ist [48] [49].

Die Liste der detektierten somatischen Mutationen enthielt somit die meisten bekannten Genziele bei MDS mit ähnlichen Mutationshäufigkeiten, wie die zuvor in der Literatur beschriebenen, was auf eine akzeptable Sensitivität der aktuellen Studie hinweist.

Auch konnte die Studie ebenfalls zeigen, dass die Anzahl an Mutationen zunimmt, je weiter das MDS fortschreitet [43] [44] [46].

Dieses Mutationspanel muss jedoch mit größeren Stichproben weiter validiert werden, um seine Effizienz zu bestimmen.

#### **4.2.3 Assoziation der detektierten Mutationen bei MDS-Patienten mit MDS-Subtypen und klinisch-pathologischen Parametern**

In dieser Studie wurde bei einem MDS-Patienten eine Mutation im *SF3B1*-Gen gefunden, der dem Subtypen MDS-RS zugeteilt wurde und einen Ringsideroblastengehalt von 78% und einen Blastengehalt von 1,5% in der Verlaufsbiopsie gezeigt hat. Dies zeigt exemplarisch, dass Mutationen in *SF3B1* mit einem niedrigen Blastengehalt und einem erhöhten Gehalt an Ringsideroblasten assoziiert sind. Etwa 60% der Mutationen im Gen *SF3B1* bei

MDS-Patienten betreffen das Codon 700. In dieser Studie wurde ebenfalls eine Mutation im Codon 700 im Gen *SF3B1* gefunden, die bereits zuvor 640-mal in der Datenbank Cosmic beschrieben wurde [48] [96].

Mutationen im *SRSF2*-Gen in der Hotspot-Region p.P95 wurden in dieser Studie bei 18% der MDS-Patienten gefunden, was der Häufigkeit dieser Mutation bei MDS-Patienten in der Literatur entspricht [43] [51].

In einer Studie von Thol et al. hatten MDS-Patienten mit einer *SRSF2*-Mutation ein deutlich kürzeres Gesamtüberleben und zeigten ein schnelleres und häufigeres Fortschreiten des MDS in eine AML auf [51].

In dieser Studie wurde bei den Fällen 29, 30 und 32, die einem fortgeschrittenem MDS-Stadium zugeteilt waren, eine Mutation in *SRSF2* gefunden. Die Fälle 30 und 32 zeigten im Verlauf zusätzlich eine Transformation des MDS in eine AML. Diese Studie zeigt damit ebenfalls, dass eine *SRSF2*-Mutation bei MDS-Patienten mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist.

Mutationen in *DNMT3A* wurden bei 12% (2/17) der MDS-Patienten gefunden, welches der Mutationshäufigkeit in *DNMT3A* von 8-13% bei MDS-Patienten in der Literatur entspricht [43] [58]. Bei Walter et al. waren *DNMT3A*-Mutationen bei MDS-Patienten mit einem kürzeren Überleben und einem schnelleren Progress des MDS in eine AML assoziiert [58]. Fall 22, der dem Subtyp MDS-RS zugeteilt wurde und zusätzlich eine *SF3B1*-Mutation zeigte, wies in unserem Beobachtungszeitraum keinen Progress des MDS auf. Als Ursache kann man hier die *SF3B1*-Mutation sehen, die mit einer guten Prognose assoziiert ist und mit einer Mutationsfrequenz von 33% im Vergleich zur Mutationsfrequenz von *DNMT3A* mit 11% vorlag. Bei Fall 27 lag eine Deletion in *DNMT3A* mit einer Allelfrequenz von 52% vor. Der Fall war bereits in der Gruppe eines fortgeschrittenen MDS (MDS-EB-1) und wies im Verlauf ein Fortschreiten in ein MDS-EB-2 auf, was zeigt, dass Mutationen in *DNMT3A* mit einem schnelleren Progress des MDS assoziiert sind.

In dieser Arbeit fanden sich bei 24% (4/17) der MDS-Patienten Mutationen in *ASXL1*, was etwa den Ergebnissen von 14-20% in der Literatur entspricht [64]. In einer Studie von Bejar et al. und Boulwood et al. zeigten Patienten mit einem MDS und einer Mutation in *ASXL1* vor allem ein fortgeschrittenes MDS mit einem

verminderten Gesamtüberleben [64] [68]. In dieser Studie zeigte der Studienfall 29, der einem fortgeschrittenem MDS zugeteilt war (MDS-EB-1) und einen Blastengehalt von 7% im Knochenmark aufwies, eine Deletion in *ASXL1* mit einer Allelfrequenz von 54%. Die anderen Studienfälle, in denen sich eine Mutation in *ASXL1* gezeigt hat, waren der Studiengruppe low grade MDS zugeteilt. Fall 20 zeigte nur in der Verlaufsbiopsie eine Mutation in diesem Gen mit einer Frequenz von 7%. Fall 21 wies eine Deletion in *ASXL1* in der Vorläufer- und Verlaufsbiopsie mit einer Detektionshäufigkeit von etwa 60% auf. Obwohl eine Mutation in *ASXL1* in beiden Verlaufsbiopsien vorhanden war, kam es zu keinem relevanten Anstieg an Blasten, der zu einer Zuteilung in den MDS-Subtyp MDS-EB geführt hätte. Studienfall 18, der ebenfalls der Gruppe low grade MDS zugeteilt war, zeigte auch eine Mutation in *ASXL1* mit einer Häufigkeit von 41%.

Somit kann diese Studie nicht die These stützen, dass sich Mutationen in *ASXL1* vor allem bei Patienten mit einem fortgeschrittenen MDS finden und dass diese Mutation allein einen negativen Prognosefaktor darstellt. Hier werden aber auch die Grenzen dieser Arbeit deutlich. Um eine definitive Aussage über eine Assoziation einer Mutation zu einem Subtyp und einer Prognose treffen zu können, müsste man die Fallzahl von MDS-Patienten in dieser Studie erhöhen und es müssten mehr Langzeitdaten vorliegen, um den Verlauf der Erkrankung bei MDS-Patienten mit Mutationen besser beurteilen zu können.

Bei 18% (3/17) der MDS-Patientenfälle konnten Mutationen im Transkriptionsfaktor *RUNX1* detektiert werden. In einer Studie von Chen et al. lag die Häufigkeit von Mutationen in *RUNX1* bei 12%. Die Studie zeigte, dass vor allem Subtypen mit einem fortgeschrittenen MDS Mutationen in *RUNX1* zeigen und dass *RUNX1* eine Rolle bei der Entwicklung und dem Fortschreiten eines MDS spielt [69]. In dieser Studie sieht man ebenfalls, dass sich Mutationen in *RUNX1* vor allem bei Patienten finden, die ein fortgeschrittenes MDS zeigen, wie die Fälle 28, 29 und 33. Fall 33 zeigte zum Zeitpunkt der Biopsie eine Transformation des MDS in eine AML. Fall 29 zeigte neben der *RUNX1*-Mutation eine Mutation in *ASXL1* und *SRSF2* und Fall 28 zusätzlich eine *ZRSR2*-Mutation. Mutationen in *ZRSR2* konnten in dieser Studie mit einer Allelfrequenz von 81% nur bei diesem MDS-Patienten gefunden werden. In einer Studie von Thol et al.

zeigten 3% der MDS-Patienten eine Mutation in *ZRSR2*, was dem Ergebnis dieser Studie (6%) nahekommt. Bei Thol et al. zeigten MDS-Patienten mit Mutationen, die das Spleißosom betreffen, wie in *ZRSR2*, eine höhere Transformationsrate in eine AML und eine schlechtere Prognose auf [51]. Bei dem Studienfall 28 fehlen Daten zum Langzeitverlauf, aber durch einen Blastengehalt von 6,5% im Knochenmark wurde dieser Fall bereits einem fortgeschrittenem MDS zugeteilt.

Mutationen in *IDH2* fanden sich bei 12% der MDS-Fälle. Dieser Anteil liegt oberhalb dem Anteil, der in der Literatur bei MDS für *IDH2*-Mutationen angegeben wird (5%) [56]. DiNardo et al. und Makishima et al. zeigten, dass Mutationen in *IDH2* vor allem bei einem Hochrisiko-MDS und bei einer Transformation des MDS in eine sAML vorhanden sind [97] [98]. Dies konnte in dieser Studie bestätigt werden. Die Fälle 30 und 31, die eine Mutation in *IDH2* mit einer Frequenz von 44% und 7% zeigten, waren zum Zeitpunkt der Biopsie der Studiengruppe MDS-EB zugeteilt mit einem Blastengehalt von 6 und 16% im Knochenmark. Beide Fälle transformierten im Verlauf in eine sekundäre AML.

Fall 30 zeigte im Stadium der sAML zusätzlich zur *SRSF2*- und *IDH2*-Mutation eine Mutation in *KRAS* mit einer Mutationshäufigkeit von 6%. In einer Studie von Meggendorfer et al. lag der Anteil an Mutationen in *KRAS* bei Patienten mit einer sekundären AML aus einem MDS (16%) über dem Anteil an Mutationen in diesem Gen bei Patienten im MDS-Stadium (3%) [99]. Diese Studie zeigt ebenfalls, dass *KRAS*-Mutationen mit einer sAML assoziiert sind.

Mutationen in *SETBP1* wurden bei einem MDS-Patienten detektiert (6%). Fall 32.2 zeigte zum Zeitpunkt der Transformation des MDS in eine sAML in der Verlaufsbiopsie zusätzlich zur *SRSF2*-Mutation eine Mutation in *SETBP1* mit einer Allelfrequenz von 41%. *SETBP1*-Mutationen werden häufig zum Zeitpunkt der Leukämieentwicklung bei MDS erworben, was sich auch in dieser Studie gezeigt hat [77] [78].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in dieser Studie die in der Literatur bei MDS-Patienten häufig beschriebenen Mutationen mittels tNGS finden ließen. Mutationen in *SF3B1* lassen sich eindeutig mit klinischen Parametern assoziieren, was sich auch in dieser Studie anhand eines erhöhten Gehalts an

Ringsideroblasten gezeigt hat. Es konnten ähnliche Assoziationen zwischen einer vorhandenen Mutation und dem Stadium des MDS gefunden werden. Man kann sagen, dass Mutationen bei einem MDS dazu dienen können, um den Verlauf der Erkrankung besser beurteilen zu können. Zum Beispiel stellten in dieser Studie Mutationen in *SRSF2*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *IDH2* und *KRAS* einen negativen Prognosefaktor dar. So könnte man ein früheres therapeutisches Eingreifen zum Beispiel mittels einer aSZT erwägen, bei Vorhandensein einer Mutation in diesen Genen. Spezifisch sind diese Mutationen aber nicht für einen bestimmten Verlauf, da auch Patienten mit einem fortgeschrittenem MDS in dieser Studie keine Mutationen in diesen Genen aufgezeigt haben (Fall 25 und 26).

#### **4.3 Erläuterung der Pathogenese der MDS mit den in dieser Studie detektierten Ergebnissen in der Mutationsanalyse**

Diese Studie stützt das Pathogenesemodell, welches in der Literatur zur Entstehung der MDS beschrieben wurde [43] [44] [45]. Der Studienfall 30 zeigt sehr gut exemplarisch die Pathogenese eines MDS auf. Zum Zeitpunkt der Biopsie lag ein MDS-EB vor und es fanden sich Mutationen mit einer Frequenz von 42% in *SRSF2* und 44% in *IDH2*. Mutationen im RNA-Spleißosom und in der DNA-Methylierung stellen Founder-Mutationen in der Literatur da, diese Mutationen stellen somit frühe Ereignisse in der Pathogenese eines MDS dar. So lag bei diesem Fall zu etwa 40% ein Zellklon im Knochenmark vor, der Mutationen in diesen beiden Genen zeigte. Im Stadium der sAML zeigte die Verlaufsbiopsie zusätzlich eine Mutation in *KRAS* mit einer Frequenz von 6%. Mutationen in der Signaltransduktion stellen dagegen subklonale Mutationen dar. Aus dem MDS-Klon hat sich ein Tochterklon durch eine erworbene Mutation in *KRAS* ausgebildet. Dieser Tochterklon hat die Dominanz über die Hämatopoese gewonnen. Zum Zeitpunkt der Leukämietransformation blieb der vorangegangene MDS-Klon bestehen, wurde jedoch von dem aggressiveren Subklon verdrängt, der die Entwicklung einer AML vorantrieb, was sich klinisch anhand des Blastenanstiegs gezeigt hat.

Fall 32 zeigte im Stadium des MDS-EB eine Founder-Mutation in *SRSF2* mit einer Mutationsfrequenz von 33% auf. In der Verlaufsbiopsie im Stadium der sAML zeigte sich die *SRSF2*-Mutation nur noch mit einem Anteil von 24% und es konnte eine neue Mutation in *SETBP1* zu einem Anteil von 41% detektiert werden. Entweder lag der Anteil der *SRSF2*-Mutation in der Verlaufsbiopsie in Wirklichkeit höher und er wurde zu niedrig detektiert, dafür würde auch die niedrige Abdeckung an Reads sprechen. Dann wäre zur *SRSF2*-Mutation als subklonale Mutation die *SETBP1*-Mutation hinzugekommen und hätte zu einer Evolution des MDS in eine AML geführt. Es kann aber auch sein, dass sich die *SETBP1*-Mutation unabhängig von der *SRSF2*-Mutation ausgebildet hat und zu einem neuen Zellklon geführt hat, der aggressiver war und direkt zur Ausbildung einer AML geführt hat.

Neu erworbene Mutationen können bei einem MDS zu einem weiteren Fortschreiten der Erkrankung führen. Auf der anderen Seite hat sich in dieser Studie gezeigt, dass keine neu erworbenen Mutationen zu keinem Progress der Erkrankung führen. Bei den Studienfällen 19, 21 und 22 konnten in den Verlaufsbiopsien keine neuen Mutationen detektiert werden. Es wurden entweder keine (Fall 19) oder die Mutationen aus den Vorläuferbiopsien bestätigt (Fall 21 und 22). Auch zeigten die Verlaufsbiopsien kein Fortschreiten des MDS. Nur bei Fall 20 hat die Verlaufsbiopsie eine neue Mutation in *ASXL1* gezeigt, und zu keinem Progress der Erkrankung geführt. Diese Mutation zeigte aber eine niedrige Detektionsrate von 7% auf. Die niedrige Allelfrequenz kann ein Grund dafür sein, warum es zu keinem Fortschreiten des MDS trotz der neu erworbenen Mutation kam.

Es zeigt sich insgesamt, dass unterschiedliche Signalwege an der Entwicklung der MDS beteiligt sind und, dass eine Schlüsselmutation ausreichen kann, um einen Progress des MDS mit der Möglichkeit der Transformation in eine sAML auszulösen.

Um die Pathogenese der MDS aber besser verstehen zu können und um Mutationen mit einem bestimmten Progressionsrisiko zu werten, müsste man die Fallzahl dieser Studie und das Mutationspanel vergrößern.

## 4.4 Fazit

Mithilfe des neu designten Mutationspanels mit 15 Zielgenen konnte mindestens eine Genmutation bei über 71% der MDS-Studienfälle nachgewiesen werden. Dieses Design ist einfach und effektiv und kann uns wertvolle Informationen zur Pathogenese und prognostischen Bewertung der MDS sowie zu klinischen Interventionen bei MDS liefern.

Wie dysplastische Veränderungen in der Zytologie oder MDS-assoziierte zytogenetische Anomalien weisen auch somatische Mutationen in der Knochenmark-DNA eine bekannte Assoziation mit MDS auf.

Der Nachweis einer MDS-assoziierten Mutation kann in Fällen, in denen das klinische Erscheinungsbild und die Zellmorphologie nicht eindeutig sind, zusätzliche diagnostische Unterstützung bieten. So sollten Mutationen bei klinisch bedeutsamen Zytopenien zusammen mit der Mikroskopie bei der MDS-Diagnose berücksichtigt werden.

Eine kritische Frage ist, ob bei Patienten mit Zytopenien und MDS-assoziierten somatischen Mutationen, bei denen jedoch nicht ausreichend dysplastische Veränderungen vorliegen oder ein MDS-definierender Karyotyp, MDS diagnostiziert werden sollte. Wenn man solche Patienten in die MDS-Kategorie aufnehmen würde, würde dies eine wesentliche Neudefinition der MDS darstellen, die die Inzidenz von MDS erhöhen würde. Einige der Mutationen, die bei MDS vorkommen, kommen auch bei gesunden Individuen vor. Mutationen in Genen, die einen hohen positiven prädiktiven Wert für die Entwicklung einer hämatopoetischen Neoplasie wie MDS haben, wie in *ZRSR2*, müssen dabei von Mutationen wie in *DNMT3A*, die einen niedrigen prädiktiven Wert haben, abgegrenzt werden. Liegen bei einem Patienten dysplastische Veränderungen in einer oder mehrerer hämatopoetischer Zellreihen vor, die aber unter 10% liegen, sollte man die Diagnose eines MDS erwägen bei zusätzlichem Vorhandensein einer Mutation mit einem hohen prädiktiven Wert für die Entwicklung eines MDS. Es gibt aber keine MDS-spezifischen Mutationen und es müssen nicht immer Mutationen bei Patienten mit MDS detektiert werden. Identifizierte Mutationen können aber die Diagnosestellung erleichtern und dazu dienen den klinischen Verlauf eines Patienten mit MDS besser beurteilen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Unter den MDS versteht man eine Gruppe von heterogenen klonalen Knochenmarkerkrankungen, die durch eine periphere Zytopenie charakterisiert sind. Für die Diagnose eines MDS müssen zytologische Kriterien wie eine Dysplasie in einer hämatopoetischen Zelllinie von mindestens 10% vorhanden sein. Dies stellt für den erfahrenen Untersucher oft eine Herausforderung dar, da dysplastische Veränderungen auch bei einer reaktiven Anämie oder bei gesunden älteren Individuen auftreten können.

Ziel der durchgeführten Studie war es daher, Mutationen mittels des tNGS zu identifizieren, die mit einem MDS assoziiert sind und diese von Mutationen abzugrenzen, die bei Patienten mit einer peripheren Zytopenie ohne ein MDS auftreten. Auch sollte in dieser Studie untersucht werden, ob bestimmte Mutationen mit einem Progress des MDS assoziiert sind. Des Weiteren sollte die Methode des tNGS nach Ion Torrent am FFPE-Knochenmarkgewebe etabliert werden.

Hierfür wurden 39 Knochenmarkproben, die im Archiv der Pathologie als FFPE-Material vorlagen und auf die Fragestellung eines MDS untersucht worden waren, ausgewählt. Die Probanden wurden in die Studiengruppen reaktive Zytopenie, ICUS, ICUS mit Dysplasiezeichen, low grade MDS, MDS-EB und MDS mit Übergang in eine AML eingeteilt. Nach der DNA-Extraktion mit dem Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit und Überprüfung der DNA auf ihre Amplifizierbarkeit wurden mit dem neu designten MDS-Panel Libraries generiert. Das MDS-Panel enthielt Primer zur Vervielfachung von DNA-Abschnitten in *SETBP1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *RUNX1*, *FLT3*, *TP53*, *CBL*, *N-RAS* und *K-RAS*. Die Libraries wurden nach der Methode von Ion Torrent mit dem Ion Torrent PGM sequenziert. Die Datenanalyse erfolgte mit der Torrent Suite, dem Ion Reporter und der IGV-Software. Die identifizierten Varianten wurden mittels Einzelamplikonanalyse auf Mutationen überprüft.

Eine Validierung der detektierten Varianten mittels Einzelamplikonanalyse kann notwendig sein, wenn die Varianten mit einer niedrigen Allelfrequenz identifiziert

werden oder, wenn eine niedrige uniformity of amplicon coverage der Sequenzierung vorliegt.

Insgesamt konnten in der Gruppe ICUS bei zwei von sechs Studienfällen, in der Gruppe ICUS mit Dysplasiezeichen bei einem Studienfall, in der Gruppe low grade MDS bei sechs von zwölf Studienfällen, in der Gruppe MDS-EB bei sechs von acht Studienfällen und in der Gruppe MDS mit Übergang in eine AML bei allen drei Fällen Mutationen identifiziert werden. Keine Mutation wurde in der Studiengruppe reaktive Zytopenie gefunden. Mutationen in *DNMT3A* und *ZRSR2* konnten nicht nur bei MDS-Patienten, sondern auch bei Patienten mit einer ICUS detektiert werden.

In der hier durchgeführten Mutationsanalyse waren Mutationen in *SRSF2*, *SETBP1*, *RUNX1*, *IDH2* und *KRAS* mit einem erhöhten Progressionsrisiko eines MDS assoziiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Methode des tNGS nach Ion Torrent dafür eignet, um FFPE-Gewebe auf Mutationen zu überprüfen. Das in dieser Studie eingesetzte MDS-Panel kann eine Hilfestellung darstellen, bei der Fragestellung nach einem MDS, und um den Verlauf eines MDS besser beurteilen zu können. Da Mutationen in *DNMT3A* oder *ZRSR2*, aber auch bei Patienten mit einer Zytopenie ohne ein MDS vorliegen können, müssen die identifizierten Mutationen immer gemeinsam mit den klinischen Befunden und der Zytologie und Histologie des Patienten bewertet werden. Es bedarf weiterer Studien mit größeren Fallzahlen und einem längeren Beobachtungszeitraum, um bei Patienten mit peripherer Zytopenie und Vorhandensein von Mutationen eine genaue Aussage über das Vorliegen eines MDS oder die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines MDS treffen zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Valent, P., et al., Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res*, 2007. 31(6): p. 727-736.
2. Pang, W.W., et al., Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(8): p. 3011-3016.
3. Valent, P., et al., Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget*, 2017. 8(43): p. 73483-73500.
4. Greenberg, P.L., et al., Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2017. 15(1): p. 60-87.
5. Rollison, D.E., et al., Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*, 2008. 112(1): p. 45-52.
6. Neukirchen, J., et al., Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry. *Leuk Res*, 2011. 35(12): p. 1591-1596.
7. Ma, X., et al., Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer*, 2007. 109(8): p. 1536-1542.
8. Churpek, J.E., Familial myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2017. 30(4): p. 287-289.
9. Mauritzson, N., et al., 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*, 2002. 16(12): p. 2366-2378.
10. McNerney, M.E., L.A. Godley, and M.M. Le Beau, Therapy-related myeloid neoplasms: when genetics and environment collide. *Nature Reviews Cancer*, 2017. 17(9): p. 513-527.

11. Morton, L.M., et al., Association of Chemotherapy for Solid Tumors With Development of Therapy-Related Myelodysplastic Syndrome or Acute Myeloid Leukemia in the Modern Era. *JAMA Oncology*, 2019. 5(3): p. 318-325.
12. Armitage JO, C.P., Connors JM, Levine A, Bennett JM, Kroll S, Treatment-Related Myelodysplasia and Acute Leukemia in Non-Hodgkin's Lymphoma Patients. *Journal of Clinical Oncology* 2003. 21(5): p. 897-906.
13. Eichenauer DA, T.I., Haverkamp H, Franklin J, Behringer K, Halbsguth T, Klimm B, Diehl V, Sasse S, Rothe A, Fuchs M, Böll B, von Tresckow B, Borchmann P, Engert A, Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in patients with Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Study Group. *Blood*, 2014. 123(11): p. 1658-1664.
14. Bird, M.G., et al., Benzene 2009--Health effects and mechanisms of bone marrow toxicity: implications for t-AML and the mode of action framework. *Chem Biol Interact*, 2010. 184(1-2): p. 3-6.
15. Zini, G., Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes. *Ann Lab Med*, 2017. 37(6): p. 465-474.
16. Arber, D.A., et al., The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 2016. 127(20): p. 2391-2405.
17. Wang, S.A., Diagnosis of Myelodysplastic Syndromes in Cytopenic Patients. *Hematol Oncol Clin N Am*, 2011. 25(5): p. 1085-1110.
18. Giagounidis, A. and D. Haase, Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best Practice Res Clin Haematol*, 2013. 26(4): p. 337-353.
19. Mufti, G.J., et al., Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*, 2008. 93(11): p. 1712-1717.
20. Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 2002. 100(7): p. 2292-2302.
21. Della Porta, M.G., et al., Clinical Relevance of Bone Marrow Fibrosis and CD34-Positive Cell Clusters in Primary Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology* 2009. 27(5): p. 754-762.

22. Vardiman, J.W., et al., The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 2009. 114(5): p. 937-951.
23. Parmentier, S., et al., Assessment of dysplastic hematopoiesis: lessons from healthy bone marrow donors. *Haematologica*, 2012. 97(5): p. 723-730.
24. Senent, L., et al., Reproducibility of the World Health Organization 2008 criteria for myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 2013. 98(4): p. 568-575.
25. Porwit, A., et al., Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes—proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia*, 2014. 28(9): p. 1793-1798.
26. Marian Stevens-Kroef, A.S., Katrina Rack, Rosalind J. Hastings, *Cytogenetic Nomenclature and Reporting. Methods in Molecular Biology*, 2017. 1541: p. 303-309.
27. Rashid, A., et al., Chromosomal abnormalities in primary myelodysplastic syndrome. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2014. 24(9): p. 632-635.
28. Solé, E., Sanz, Cervera, Calasanz, Luño, Prieto, Granada, Hernández, Cigudosa, Diez, Bureo, Marqués, Arranz, Ríos, Martínez, Climent, Vallespí, Florensa, Woessner, Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*, 2001. 108(2): p. 346-356.
29. Haase, D., et al., New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*, 2007. 110(13): p. 4385-4395.
30. Greenberg, P., et al., International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 1997. 89(6): p. 2079-2088.
31. Schanz, J., et al., New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge. *Journal of Clinical Oncology*, 2012. 30(8): p. 820-829.
32. Valent, P., et al., Idiopathic bone marrow dysplasia of unknown significance (IDUS): definition, pathogenesis, follow up, and prognosis. *Am J Cancer Res*, 2011. 1(4): p. 531-541.

33. Valent, P., et al., Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leuk Res*, 2012. 36(1): p. 1-5.
34. Wimazal, F., et al., Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) versus low risk MDS: the diagnostic interface. *Leuk Res*, 2007. 31(11): p. 1461-1468.
35. Valent, P., ICUS, IDUS, CHIP and CCUS: Diagnostic Criteria, Separation from MDS and Clinical Implications. *Pathobiology*, 2019. 86(1): p. 30-38.
36. Greenberg, P.L., et al., Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2012. 120(12): p. 2454-2465.
37. Greenberg, P.L., Current therapeutic approaches for patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 2010. 150(2): p. 131-143.
38. List, A.F., et al., Deferasirox Reduces Serum Ferritin and Labile Plasma Iron in RBC Transfusion-Dependent Patients With Myelodysplastic Syndrome. *Journal of Clinical Oncology*, 2012. 30(17): p. 2134-2139.
39. Fenaux, P., et al., A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood*, 2011. 118(14): p. 3765-3776.
40. Steensma, D.P., Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood Cancer Journal*, 2018. 8(5): p. 1-7.
41. Woll, P.S., et al., Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer Cell*, 2014. 25(6): p. 794-808.
42. Cazzola, M., M.G. Della Porta, and L. Malcovati, The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*, 2013. 122(25): p. 4021-4034.
43. Haferlach, T., et al., Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 2014. 28(2): p. 241-247.
44. Papaemmanuil, E., et al., Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2013. 122(22): p. 3616-3627.
45. Walter, M.J., et al., Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2012. 366(12): p. 1090-1098.

46. Xu, F., et al., Exploration of the role of gene mutations in myelodysplastic syndromes through a sequencing design involving a small number of target genes. *Sci Rep*, 2017. 7: p.1-10.
47. Saez, B., M.J. Walter, and T.A. Graubert, Splicing factor gene mutations in hematologic malignancies. *Blood*, 2017. 129(10): p. 1260–1269.
48. Papaemmanuil, E., et al., Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*, 2011. 365(15): p. 1384-1395.
49. Malcovati, L., et al., SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*, 2015. 126(2): p. 233-241.
50. Yoshida, K., et al., Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 2011. 478(7367): p. 64-69.
51. Thol, F., et al., Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2012. 119(15): p. 3578-3784.
52. Ogawa, S., Genetics of MDS. *Blood*, 2019. 133(10): p. 1049-1059.
53. Langemeijer, S.M., et al., Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*, 2009. 41(7): p. 838-842.
54. Busque, L., et al., Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet*, 2012. 44(11): p. 1179-1181.
55. Moran-Crusio, K., et al., Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*, 2011. 20(1): p. 11-24.
56. Kosmider, O., et al., Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 2010. 24(5): p. 1094-1096.
57. Figueroa, M.E., et al., Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 2010. 18(6): p. 553-567.
58. Walter, M.J., et al., Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 2011. 25(7): p. 1153-1158.
59. Abdel-Wahab, O. and M.E. Figueroa, Interpreting new molecular genetics in myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012. 2012: p. 56-64.

60. Issa, J.P., Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2010. 24(2): p. 317-330.
61. Ernst, T., et al., Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*, 2010. 42(8): p. 722-726.
62. Nikoloski, G., et al., Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*, 2010. 42(8): p. 665-667.
63. Bejar, R., et al., Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*, 2012. 30(27): p. 3376-3382.
64. Boultonwood, J., et al., Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2010. 24(5): p. 1062-1065.
65. Thol, F., et al., Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*, 2011. 29(18): p. 2499-2506.
66. Jiang, L., et al., Mutation status and burden can improve prognostic prediction of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer Science*, 2019. 111(2): p. 580-591.
67. Harada, H. and Y. Harada, Recent advances in myelodysplastic syndromes: Molecular pathogenesis and its implications for targeted therapies. *Cancer Sci*, 2015. 106(4): p. 329-336.
68. Bejar, R., et al., Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*, 2011. 364(26): p. 2496-2506.
69. He, W., C. Zhao, and H. Hu, Prognostic effect of RUNX1 mutations in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. *Hematology*, 2020. 25(1): p. 494-501.
70. Lindsley, R.C. and B.L. Ebert, Molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Annu Rev Pathol*, 2013. 8: p. 21-47.
71. Bains, A., et al., FLT3 and NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes: Frequency and potential value for predicting progression to acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol*, 2011. 135(1): p. 62-69.
72. Bacher, U., et al., A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 2007. 92(6): p. 744-752.

73. Meggendorfer, M., et al., Karyotype evolution and acquisition of FLT3 or RAS pathway alterations drive progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 2015. 100(12): p. 487-490.
74. Makishima, H., et al., CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2 mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 2011. 117(21): p. 198-206.
75. Kulasekararaj, A.G., et al., TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol*, 2013. 160(5): p. 660-672.
76. Tefferi, A., et al., Targeted next-generation sequencing in myelodysplastic syndromes and prognostic interaction between mutations and IPSS-R. *American Journal of Hematology*, 2017. 92(12): p. 1311-1317.
77. Damm, F., et al., SETBP1 mutations in 658 patients with myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia and secondary acute myeloid leukemias. *Leukemia*, 2013. 27(6): p. 1401-1403.
78. Fernandez-Mercado, M., et al., Mutations in SETBP1 are recurrent in myelodysplastic syndromes and often coexist with cytogenetic markers associated with disease progression. *Br J Haematol*, 2013. 163(2): p. 235-239.
79. Welch, J.S., et al., The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*, 2012. 150(2): p. 264-278.
80. Genovese, G., et al., Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*, 2014. 371(26): p. 2477-2487.
81. Jaiswal, S. and B.L. Ebert, Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science*, 2019. 366(6465): p. 1-20.
82. Jaiswal, S., et al., Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*, 2014. 371(26): p. 2488-2498.
83. Steensma, D.P., et al., Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2015. 126(1): p. 9-16.
84. Heuser, M., F. Thol, and A. Ganser, Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential. *Dtsch Arztebl Int*, 2016. 113(18): p. 317-322.
85. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. 74(12): p. 5463-5467.

86. van Dijk, E.L., et al., Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*, 2014. 30(9): p. 418-426.
87. Mardis, E.R., The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*, 2008. 24(3): p. 133-141.
88. Rothberg, J.M., et al., An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 2011. 475(7356): p. 348-352.
89. Meldrum, C., M.A. Doyle, and R.W. Tothill, Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev*, 2011. 32(4): p. 177-195.
90. Hadd, A.G., et al., Targeted, high-depth, next-generation sequencing of cancer genes in formalin-fixed, paraffin-embedded and fine-needle aspiration tumor specimens. *J Mol Diagn*, 2013. 15(2): p. 234-247.
91. Greenberg, P.L., et al., Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017. 15(1): p. 60-87.
92. van Dongen, J.J.M., et al., Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 2003. 17(12): p. 2257-2317.
93. Kwok, B., et al., MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood*, 2015. 126(21): p. 2355-2361.
94. Malcovati, L., et al., Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood*, 2017. 129(25): p. 3371-3378.
95. Xie, M., et al., Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*, 2014. 20(12): p. 1472-1478.
96. Malcovati, L., et al., Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2011. 118(24): p. 6239-6246.
97. DiNardo, C.D., et al., IDH1 and IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes and role in disease progression. *Leukemia*, 2016. 30(4): p. 980-984.
98. Makishima, H., et al., Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*, 2017. 49(2): p. 204-212.

99. Meggendorfer, M., et al., Karyotype evolution and acquisition of FLT3 or RAS pathway alterations drive progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 2015. 100(12): p. 487-490.

## 7 Anhang

**Tabelle 1. Patientenfälle mit reaktiver Zytopenie, ICUS und ICUS mit Zeichen von Dysplasien.** Dargestellt ist die Fallnummer, das Geschlecht, das Alter bei Biopsieentnahme, die Zelllinie, die von einer Dysplasie im zytologischen und histologischen Befund betroffen war, relevante Blutwerte, der Blastengehalt im KM und im PB, der Karyotyp-Befund, die klinische Diagnose bzw. der Verlauf und die detektierte Mutation mittels tNGS.

Fall	reaktive Zytopenie						ICUS							ICUS+D
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
m/w	w	m	m	w	m	m	m	m	m	w	w	m	w	m
Alter	75	68	72	56	50	68	69	50	75	48	72	82	78	81
Hämoglobin g/dl		9.8	7.2	10.7	11.3	13.2	9.8	14.9	12.8	11.6	11.4	8.6	10.6	10.8
MCV fL		91.3	94.6	109.6	87.2	106.5	83.1	99.3	95.8	87.7	104.5	78.3	89.5	101.6
Leukozyten / $\mu$ L		6110	5230	16990	12450	5730	11420	2840	7340	2740	4720	16680	4590	3450
Absolute Neutrophilenzahl / $\mu$ L			3510	12530		3620	9520	1350	5030	1040		14520	3210	1690
Thrombozyten 1000/ $\mu$ L		77	334	115	225	141	270	70	321	175	141	187	129	151
<b>Dysplasie</b>														
Erythropoese in %	<10	0	<10	0	<10	<10	0	0	0	0	0	0	0	<10
Granulopoese in %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<10
Megakaryopoese in %	<10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<10
<b>Karyotyp</b>								46 XY, 45 X-Y	46 XY				46 XX	46 del(20q), 47 +17del(20q), 45 X-Y
Blasten im Knochenmark, %	2.5		1	1.5	3.5	1.5	0.5	1.5	1.5	1	0.5	0.5	0.5	1
Blasten im peripheren Blut, %	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Diagnose/Verlauf</b>	Vit. B12- Mangel	Nieren- insuffizienz	Medikamen- tenassoziiert	Medikamen- tenassoziiert	Blei- vergiftung	reaktiv								→MDS-MLD
<b>Mutation</b>								ZRSR2 66%				DNMT3A 53%		ZRSR2 74%

**Tabelle 2. Patientenfälle mit low grade MDS.** Zusätzlich zu Tabelle 2 ist die Einteilung in die jeweilige IPSS-R-Gruppe zur Prognoseeinschätzung eines MDS dargestellt. 1 = sehr niedriges Risiko, 2 = niedriges Risiko, 3 = intermediäres Risiko, 4 = hohes Risiko, 5 = sehr hohes Risiko. Bei Zahlen mit x.1 handelt es sich um die Vorläuferbiopsie, bei Zahlen mit x.2 um die Verlaufsbiopsie.

	low grade MDS													
Fall	15	16	17	18	19.1	19.2	20.1	20.2	21.1	21.2	22.1	22.2	23	24
m/w	m	w	w	m	m	m	m	m	m	m	w	w	w	w
Alter	47	46	66	75	63	68	72	75	75	77	71	73	79	68
Hämoglobin g/dl		12.4			12.1	9.3	10.9	11.4	11.8	8.6	10.3	7	10.1	11.1
MCV fL		97.5			98.5	113.8	95.8	100.9	95.9	79.6	97.5	91.3	101.5	118.9
Leukozyten / $\mu$ L		6550			5240	4710	3480	1710	3590	3030	4650	5740	3720	3450
Absolute Neutrophilenzahl / $\mu$ L		3880			2440	4239	1320	340	2341		4046	5350	2360	1760
Thrombozyten 1000/ $\mu$ L		278			186	81	47	105	41	12	353	336	342	386
<b>Dysplasie</b>														
Erythropoese in %	>10	<10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Granulopoese in %	>10	0	0	0	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0	0	0	>10
Megakaryopoese in %	>10	<10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0	0	>10	>10
<b>Karyotyp</b>	46 del(5q)	46 del(5q)	46 XX	46 XY	46 XY	46 XY	46 XY, 47 XY + 21	46 XY, 47 XY + 21					46 del(20q), del(5q)	46 del(20q), del(5q)
<b>Blasten im Knochenmark, %</b>	2	0.5	1		3	2	1	0	1			1.5	2.5	2
<b>Blasten im peripheren Blut, %</b>		0			0	0	0	0	0			0	0	0
<b>Diagnose/Verlauf</b>	MDS del(5q)	MDS del(5q)	MDS-MLD	MDS-MLD	MDS-MLD	MDS-MLD	MDS-MLD	MDS-MLD	MDS-MLD	MDS-MLD	MDS-MLD	MDS-RS-SLD, 78% Ringsidero- blasten	MDS del(5q)	MDS del(5q), → sAML
<b>IPSS-R</b>		1			2	2	2	2					1	1
<b>Mutation</b>				ASXL1 41%				ASXL1 7%	ASXL1 68%	ASXL1 59%	DNMT3A 11% SF3B1 33%	DNMT3A 11% SF3B1 40%		

**Tabelle 3. Patientenfälle mit einem MDS-EB und einem MDS mit Übergang in eine AML.**

	MDS-EB									sAML		
<b>Fall</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30.1</b>	<b>31</b>	<b>32.1</b>		<b>30.2</b>	<b>32.2</b>	<b>33</b>
<b>m/w</b>	w	w	w	m	m	m	m	m		m	m	m
<b>Alter</b>	77	81	69	73	87	72	69	68		74	71	61
<b>Hämoglobin g/dl</b>	6.3	10.5	9.9	9	9.4	7.6	14.9	8.3		9.7	9.5	8
<b>MCV fL</b>		106.1	99.7	95.5	93.2	82.6	95	110.6		80.1	81.8	92.8
<b>Leukozyten /µL</b>		5500	2190	5110	1170	14820	2080	4420		7390	8510	12330
<b>Absolute Neutrophilenzahl /µL</b>	260	3510	1190		570	12010	1250	3050		3400	790	
<b>Thrombozyten 1000/µL</b>	45	481	101	42	127	117	132	227		105	45	21
<b>Dysplasie</b>												
<b>Erythropoese in %</b>	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10		>10	>10	>10
<b>Granulopoese in %</b>	>10	<10	>10	<10	>10	>10	>10	>10		>10	>10	>10
<b>Megakaryopoese in %</b>	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10		>10	>10	>10
<b>Karyotyp</b>		del (5q)	46 XX	Trisomie 8, 21	46 XY	46 XY	Trisomie 11			46 XY		46 XY
<b>Blasten im Knochenmark, %</b>	6	5	5	6.5	7	6	16	7.1		30	21	23.5
<b>Blasten im peripheren Blut, %</b>	1	0	0	4	0	11	0	1		14	17	16
<b>IPSS-R</b>		2	3	4	3	3	4			4		4
<b>Diagnose/Verlauf</b>	MDS-EB-1	MDS-EB-1	MDS-EB-1	MDS-EB-1	MDS-EB-1	MDS-EB-2; → sAML	MDS-EB-2; → sAML	MDS-EB-1; → sAML		sAML	sAML	sAML
<b>Mutation</b>			DNMT3A 52%	RUNX1 42% ZRSR2 81%	SRSF2 46% ASXL1 54% RUNX1 39%	IDH2 44% SRSF2 42%	IDH2 7%	SRSF2 33%		IDH2 47% SRSF2 37% KRAS 6%	SRSF2 24% SETBP1 41%	RUNX1 29%

## 8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in dem Institut für Pathologie und Neuropathologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Fend (Ärztlicher Direktor des Instituts für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen) durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Fend in Zusammenarbeit mit Dr. Federmann (Ärztin, Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen) und Dr. Bonzheim (Leitung Molekularpathologische Diagnostik, Institut für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen).

Die Patientendaten wurden von Prof. Dr. Fend zur Verfügung gestellt.

Die für diese Studie verwendeten Gewebeproben wurden von Prof. Dr. Fend zur Verfügung gestellt und von Prof. Dr. Fend und Dr. Federmann histopathologisch überprüft. Die Datenrecherche erfolgte durch Dr. Federmann und mich, Vanessa Meca.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (S.Baisch, J. Baturin, A. Rau) von mir eigenständig durchgeführt. Das Pooling der Libraries, die emPCR am Ion One Touch, die Anreicherung der Template-positiven Ion Sphere Particels und die Sequenzierungsreaktion mit der Sequenzierplattform Ion Torrent PGM wurden durch die Mitarbeiter des Diagnostiklabors der Molekularen Pathologie durchgeführt. Die Analyse der Daten der Sequenzierung wurden nach Einarbeitung von Dr. J. Schmidt und Dr. J. Steinhilber von mir durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Die statistische Auswertung aller erhobenen Daten erfolgte durch mich. Betreuer dieser Arbeit waren Dr. Federmann, Dr. Bonzheim und Dr. Steinhilber.

Tübingen, den

## 9 Danksagung

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei allen, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit auf vielfältige Weise unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Fend für die Möglichkeit meine Dissertation an seinem Institut durchzuführen und für die Annahme als Doktorandin in seiner Arbeitsgruppe. Auch danke ich Herrn Prof. Dr. Fend für die Bereitstellung des interessanten Themas dieser Promotion und für die stets freundliche Unterstützung während der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Irina Bonzheim, Frau Dr. Birgit Federmann und Frau Dr. Julia Steinhilber für die außerordentlich gute Betreuung während dieser Arbeit. Vielen Dank für die kompetente Unterstützung und die freundliche Hilfsbereitschaft.

Frau Sieglinde Baisch, Herrn Achim Rau und Frau Julia Baturin möchte ich für die Sequenzierung der DNA-Proben danken. Ihnen und den anderen Mitarbeitern, insbesondere Frau Dr. Janine Schmidt und Frau Dr. Yvonne Aidee Montes Mojarro danke ich für die freundliche Unterstützung im Labor und das überaus angenehme Arbeitsklima.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet und unterstützt haben.