



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Entschlüsselung der dynamischen Evolution oligoklonaler  
Mutationshierarchien von Patienten mit myelodysplastischem  
Syndrom unter Therapie und bei Krankheitsprogression**

Autor: Maximilian Markus Wolf Moses Mossner  
Institut / Klinik: III. Medizinische Klinik  
Doktorvater: Prof. Dr. K. Hofmann

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind maligne Erkrankungen des Knochenmarks, die mit einer ineffektiven Produktion reifer Blutzellen assoziiert sind und häufig in eine akute myeloische Leukämie transformieren. In den letzten Jahren konnte durch „Next Generation Sequencing“ (NGS) basierte Techniken eine große Vielzahl neuer krankheitspezifischer Mutationen im MDS entdeckt werden. Dabei stellt sich die Frage nach dem Stellenwert und der Relevanz einzelner Mutationen. Insbesondere eine patienten-spezifische Aufschlüsselung der Chronologie an erworbenen Mutationen könnte hierbei neue therapeutische Targets identifizieren, um gezielt klinisch pathogene oder frühe Gründerklone zu eliminieren mit dem Ziel einer anhaltenden Verbesserung des klinischen Verlaufs. Ziel dieser Arbeit war es daher, unter Verwendung quantitativer Messmethoden eine präzise Charakterisierung der hierarchischen Abfolge von Punkt-, Insertions-/Deletions-Mutationen sowie chromosomalen Läsionen hinsichtlich gemeinsamer Muster in der zugrunde liegenden Evolution des MDS vorzunehmen.

Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit wurde für eine optimierte Quantifizierung chromosomaler Deletionen am Beispiel des Chromosoms 5q (del(5q)) zunächst ein kostengünstiger Multiplex-PCR Assay für geringste Mengen genomischer DNA etabliert. Anhand der allelischen Imbalanz an 12 „Short Tandem Repeat“ (STR) Loci im Bereich der del(5q) konnte eine präzise Bestimmung der del(5q) Last vorgenommen werden. Die Anwendung dieser Methode auf 1142 Proben von 260 Individuen erzielte eine hohe Inter-Marker Konkordanz ( $R^2=0,77-0,97$ ) und Reproduzierbarkeit (Standardabweichung: 1,7%). Die STR-basierte del(5q) Quantifizierung erzielte zudem eine hohe Messgenauigkeit, wie anhand von Standardkurvenbestimmung ( $R^2>0,99$ ) und gepaarten Interphase-FISH Analysen ( $R^2=0,92$ ) demonstriert wurde. In gepaarten Blut/Knochenmark Aspirationen konnte eine robuste Korrelation der del(5q) Frequenzen ermittelt werden ( $R^2=0,79$ ). Somit stellt eine del(5q) Bestimmung im Blut mittels STR-Analytik eine attraktive Alternative zur zytogenetischen Analyse dar, für die Material aus - für den Patienten sehr belastenden - Knochenmarkaspirationen benötigt wird.

Im zweiten Teilprojekt erfolgte die Rekonstruktion komplexer Mutationshierarchien im MDS, die ausschließlich mittels simultaner Charakterisierung einer Vielzahl von primären und xenotransplantierten Zellfraktionen möglich wurde. Durch NGS basiertes Screening in 54 MDS Patienten und anschließender quantitativen Validierung mittels Pyrosequencing, NGS sowie der neu etablierten STR-Analytik war es möglich, die chronologische Akquisition von Mutationen in 39 Fällen zu rekapitulieren. Dabei konnten lineare aber auch verzweigte Evolutionspfade detektiert und somatische Mutationen in epigenetischen Regulatoren sowie RNA Splicing Genen als die häufigsten Gründerläsionen ermittelt werden. Mit Hilfe einer kombinierten „Whole Exome“ und „Deep Sequencing“ Strategie wurden zudem 103 chronologisch akquirierte Proben von 22 Patienten untersucht, die eine Beobachtungszeit von 75 Jahren MDS Progression abdeckten. Anhand dieser Daten konnte eine dynamische Remodellierung komplexer oligoklonaler Architekturen in Folge therapeutischer Interventionen mit Lenalidomid und weiteren Medikamenten identifiziert werden. Trotz initialen klinischen Ansprechens blieb das Knochenmark größtenteils klonal mit Gründer-, Sub- oder völlig unabhängigen Klonen durchsetzt. Veränderungen in der klonalen Dynamik solch spezifischer Klone korrelierten dabei unmittelbar mit Fluktuationen in klinischen Parametern. Zudem gingen zunehmend komplexere Mutationsarchitekturen häufig mit klinischer Progression im Laufe der Erkrankung einher. Zusammengefasst betrachten diese Ergebnisse den Bedarf für ein regelmäßiges und breit angelegtes molekulares Screening von MDS Patienten, um best-mögliche klinische Therapieentscheidungen auf patienten-spezifischer Basis zu unterstützen.