



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

**Separase-Aktivität und genetische Instabilität beim
myelodysplastischen Syndrom**

Autor: Sabrina Ruppenthal
Institut / Klinik: III. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. W. Seifarth

Das myelodysplastische Syndrom (MDS) ist eine klonale hämatopoietische Stammzellerkrankung, die durch eine ineffektive Hämatopoese und die Tendenz, im Verlauf in eine akute myeloische Leukämie (sekundäre AML, sAML) zu transformieren, gekennzeichnet ist. Etwa 30% aller Patienten entwickeln im Verlauf eine sAML, was mit einem schlechten Gesamtüberleben einhergeht. Obwohl zentrosomale und zytogenetische Aberrationen sowie somatische Genmutationen mit dem Risiko einer Transformation assoziiert sind, besteht weiterhin Bedarf an molekularen Markern, mit denen für den individuellen Patienten eine Transformation zuverlässig vorhergesagt werden kann. *ESPL1*/Separase, eine intrazelluläre Cystein-Endopeptidase, ist ein Schlüsselenzym der Zellteilung und der Zentrosomenverdopplung. Überexpression oder eine vom Zellzyklus entkoppelte Separase-Überaktivität sind als Ursachen für Zentrosomenamplifikation, mitotische Spindeldefekte, Aneuploidie und Krebsentstehung bekannt. Da diese molekularen Wirkmechanismen beim MDS bislang unerforscht waren, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Separase-Aktivität bei Patienten mit MDS und assoziierten hämatologischen Neoplasien zu analysieren und auf ihre potentielle Verwendbarkeit als prognostischer Marker zu überprüfen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 71 humane Knochenmarkproben (37 MDS, 8 sAML, 9 *de novo* AML, 10 Stammzelltransplantierte, 7 gesunde Spender) untersucht. Mit Hilfe eines durchflusszytometrischen „smart peptide“ Assays, mit dem eine fluorometrische Quantifizierung von Separase-Aktivität in einzelnen lebenden Tumorzellen möglich ist, wurde die Aktivitätsverteilung der Separase-Aktivität im Knochenmark der Patienten analysiert. Der daraus resultierende SAD-Wert, ein Maß für das Auftreten von Zellen mit erhöhter Separase-Aktivität, wurde mit dem Zentrosomen- und Genmutationsstatus sowie klinischen Daten verglichen. Die Zentrosomenanalyse ergab in 12% der CD34⁺ Knochenmarkzellen von Patienten mit sAML aberrante Zentrosomenzahlen ($n>2$) verglichen mit 6% in der MDS- und 4% in der Kontrollgruppe. Diese Werte korrelierten mit der Separase-Aktivitätsverteilung ($r=0,8314$). So waren für die Gruppe der sAML-Patienten signifikant erhöhte SAD-Werte ($13,91 \pm 0,98$) zu verzeichnen, verglichen mit denen der Kontrollgruppe ($11,53 \pm 0,29$, $p=0,0463$) sowie der MDS- ($9,851 \pm 0,49$, $p=0,0011$) und AML-Gruppe ($8,26 \pm 0,73$, $p=0,0003$). Keine Korrelation bestand zwischen hohen SAD-Werten und dem Auftreten aberranter Karyotypen sowie der Inzidenz somatischer MDS-spezifischer Genmutationen. *In vitro*-Inhibitionsexperimente an der MDS-L Zelllinie zeigten, dass Therapeutika, wie z.B. Rigosertib, bekannt für G2/M-Arrest, zur Abnahme des SAD-Wertes führen können. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Anstieg der Separase-Aktivität in einer kleinen Subgruppe hämatopoietischer Zellen von Patienten mit MDS entweder eine Begleiterscheinung oder ein Auslöser für eine Zentrosomenamplifikation, Chromosomenfehlverteilung und klonale Evolution sein könnte. Erhöhte SAD-Werte und aberrante Zentrosomenzahlen in transformierenden Knochenmarkzellen von Patienten scheinen die zunehmende Malignität des Transformationsprozesses widerzuspiegeln. Die Bestimmung der Separase-Aktivitätsverteilung als neuartiger Prognosemarker im Rahmen der klinischen Diagnostik könnte daher einen messbaren Hinweis auf das proliferative Potential von erkranktem Knochenmark bei MDS und anderen hämatologischen Neoplasien geben.