

Aus der III. Medizinischen Klinik (Hämatologie und Onkologie)
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann)

R-Loops und replikativer Stress als Angriffspunkt für eine zielgerichtete
Therapie beim Myelodysplastischen Syndrom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Antje Jean Knaflic

aus
Saarbrücken
2021

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Daniel Nowak

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

| | |
|---|----|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 1 |
| 1 EINLEITUNG..... | 4 |
| 1.1 Myelodysplastische Syndrome | 4 |
| 1.2 Spleißen und Spleißfaktor-Mutationen beim MDS..... | 8 |
| 1.3 R-loops und replikativer Stress..... | 9 |
| 1.4 ATR-Signalweg | 10 |
| 1.5 Synthetische Letalität | 11 |
| 1.6 Zielsetzung/Fragestellung | 12 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN..... | 13 |
| 2.1 Materialien..... | 13 |
| 2.2 Methoden | 16 |
| 3 ERGEBNISSE: | 23 |
| 3.1 Etablierung einer auf Immunfluoreszenz basierenden Methode zur Darstellung von R-Loops und dem ATR-Signalweg in Zelllinien und aus NSB isolierten CD34 ⁺ Zellen..... | 23 |
| 3.2 Übertragung des Versuchsmodells auf CD34 ⁺ hämatopoetische Stammzellen von MDS Patienten | 27 |
| 3.3 Etablierung eines <i>in vitro</i> Modells zur Untersuchung verschiedener Substanzen zur zielgerichteten Therapie des MDS..... | 32 |
| 3.4 Übertragung des Versuchsmodells auf CD34 ⁺ hämatopoetische Stammzellen von MDS Patienten | 39 |
| 3.5 Einfluss von <i>TP53</i> -Mutationen auf die Zell-Sensibilität auf AZD6738..... | 50 |
| 3.6 Korrelation zwischen detektierter R-Loops Menge und Zell-Sensibilität auf AZD6738 und PladB..... | 50 |
| 4 DISKUSSION | 57 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.1 | SF-Mutationen und die Aktivierung der ATR-vermittelten DNA-Schadensantwort..... | 57 |
| 4.2 | R-Loops Quantität und Zellsensibilität auf AZD6738 und PladB | 57 |
| 4.3 | Veränderungen der R-Loops Mengen | 58 |
| 4.4 | ATR-Inhibitoren und synthetische Letalität – „Sola dosis facit venenum“ ... | 59 |
| 4.5 | Einfluss von MDS-assoziierten Co-Mutationen auf das Ansprechen auf ATR Inhibitoren..... | 60 |
| 4.6 | Unterschiede zwischen den verschiedenen SF-Mutationen..... | 61 |
| 4.7 | Ausblick..... | 62 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 64 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 64 |
| 7 | TABELLENVERZEICHNIS | 69 |
| 8 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 70 |
| 9 | LEBENS LAUF | 72 |
| 10 | DANKSAGUNG..... | 73 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------|---|
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| AS | Auerstäbchen |
| ASXL1 | Additional sex combs like 1, transkriptionaler Regulator |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATR | Ataxia teleangiectasia and Rad3-related protein kinase |
| ATR-IP | ATR-Interacting protein |
| AZD6738 | Ceralasertib |
| BCOR | BCL6 Corepressor |
| BRCA1/2 | Breast Cancer 1/2 |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CD34 ⁺ | Oberflächenantigen CD34 |
| CBL | Casitas B-lineage Lymphoma |
| CMML | Chronische myelomonozytäre Leukämie |
| CTG | CellTiterGlo |
| D | Deutschland |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNMT3A | DNA-Methyltransferase 3A |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| ETV6 | ETS Variant Transcription Factor 6 |
| ESE | Exonic splicing enhancer |
| EZH2 | Enhancer of zeste homolog 2 |
| FBS | Fetales Kälberserum |
| FISH | Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung |
| Hb | Hämoglobin (-wert) |
| HLA | Humanes Leukozyten Antigen |
| IC ₅₀ | 50% der inhibitorischen Konzentration |
| IDH1/2 | Isocitrate dehydrogenase 1 |
| IPSS (-R) | Internationales Prognose Scoring System ((Revised) International Prognostic scoring system) |
| JAK2 | Janus Kinase 2 |

| | |
|----------------|---|
| KM | Knochenmark |
| MDS | Myelodysplastisches Syndrom |
| MFI | mittlere Fluoreszenz Intensität |
| MLD | Mehrliniendysplasie |
| MLL | Münchener Leukämie Labor |
| MNC | Mononukleäre Zellen |
| mRNA | messenger RNA |
| <i>NRAS</i> | Mitglied der Ras-Gen Familie; Onkoprotein (Rat sarcoma) |
| NSB | Nabelschnurblut |
| NSFM | Nicht Spleißfaktor-mutiert |
| PB | Peripheres Blut |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PladB | PladienolideB |
| p-RPA | Phosphoryliertes RPA |
| RAD1/9/17 | Cohesin Complex Komponenten |
| rcf | Relative Zentrifugalbeschleunigung |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAP | RNA-Polymerase |
| RNAseH1 | Ribonuklease H1 |
| RPA | Replikationsprotein A |
| RPM | Rounds per Minute (Runden/Minute) |
| RSi | Ringsideroblasten |
| RS | Replikativer Stress |
| RRM | RNA recognition motif domain |
| RT | Raumtemperatur |
| <i>RUNX1</i> | Runt-related transcription factor 1 |
| sAML | Sekundäre akute myeloische Leukämie |
| SF | Spleißfaktor |
| SFM | Spleißfaktor-mutiert |
| <i>SF3B1</i> | Splicing factor 3B subunit 1 |
| snRNP | Small nuclear ribosomal protein |
| SLD | Einliniendysplasie (single lineage dysplasia) |
| <i>SRSF2</i> | Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 2 |
| ss-DNA | Einzelstrang-DNA (single-stranded DNA) |
| <i>STAG1/2</i> | Stromales Antigen 1 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| <i>TET2</i> | Tet methylcytosin Dioxygenase 2 |
| TopBP1 | DNA topoisomerase 2-binding protein |
| <i>TP53</i> | Tumorsupressorprotein 53 |
| UE | Untereinheit |
| <i>U2AF1</i> | U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 |
| VAF | Variant allele frequency |
| WES | Gesamt Exom Sequenzierung (Whole Exome Sequencing) |
| WHO | Weltgesundheitsbehörde (World Health Organisation) |
| <i>ZRSR2</i> | zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich |

2

1 EINLEITUNG

1.1 Myelodysplastische Syndrome

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind heterogene maligne Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Mit einer Inzidenz von 4-5/100.000 pro Jahr gehören sie zu den häufigsten malignen hämatologischen Erkrankungen [1-3]. MDS sind durch eine ineffektive, dysplastische Hämatopoese mit peripheren Zytopenien einer oder mehrerer Zellreihen und einem stark erhöhten Risiko zur Transformation in eine sekundäre akute myeloische Leukämie (AML) gekennzeichnet [4]. MDS werden in primäre „de novo“ (ca. 90%) und sekundäre bzw. therapieassoziierte (ca. 10%), zum Beispiel durch Strahlen- oder Chemotherapie ausgelöste Erscheinungsformen unterteilt. Es gibt zwar auch juvenile Formen des MDS, größtenteils betreffen sie jedoch ältere Patienten [5-7]. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei ca. 70 Jahren [8]. Im Rahmen der demographischen Entwicklung gewinnt die Erkrankung daher immer mehr an Bedeutung. MDS nehmen ihren Ursprung in einer CD34⁺ hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark (KM), welche durch Akkumulation von chromosomalen Aberrationen und Mutationen in meist mehreren Genen in ihrer normalen Funktion verändert wurde [9]. Umfangreiche genetische Charakterisierungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass bei MDS häufig Gene betroffen sind, die an der epigenetischen Regulation (*TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*), der DNA-Reparatur (*TP53*), der transkriptionellen Regulation (*RUNX1*, *BCOR*, *ETV6*) und an der Signaltransduktion (*CBL*, *NRAS*, *JAK2*) beteiligt sind [10, 11]. Während Mutationen in diesen Genen gleichermaßen auch bei anderen hämatologischen und soliden Tumoren vorkommen, scheinen dagegen Mutationen in Genen für das RNA-Spleißen (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*) in besonders hohem Maße explizit mit myeloischen Neoplasien, insbesondere bei MDS, angereichert zu sein (Abb.1) [12].

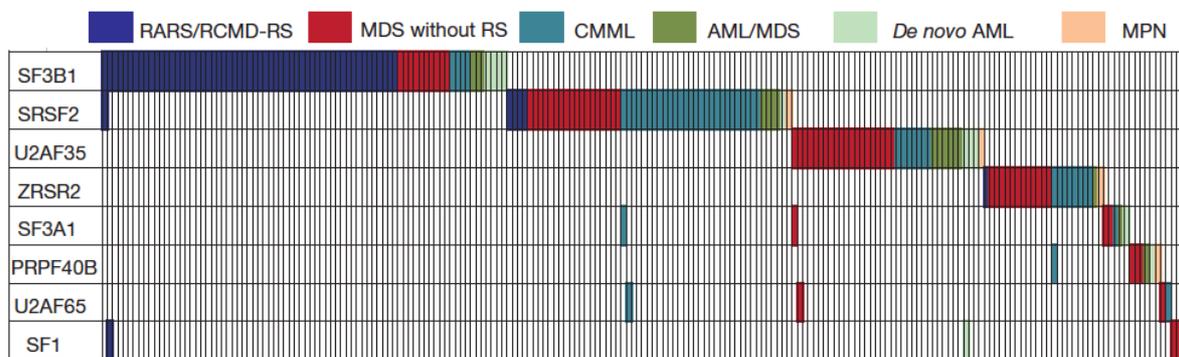


Abbildung 1: Verteilung von Mutationen in acht Spleißfaktor-Genen bei verschiedenen hämatologischen Krankheitsbildern.

Entnommen aus: [12]

1.1.1 Klinik

MDS sind klinisch häufig inapparent und werden daher zum Teil als Zufallsbefund diagnostiziert. Durch die dysplastische Hämatopoese kommt es zu peripheren Zytopenien, dabei in 70-80% zu Anämien, aber auch Bi- oder Panzytopenien sind möglich. Diese äußern sich z.B. durch Leistungsknick, Fatigue, Blässe und Dyspnoe bei Anämie, erhöhte Blutungsneigung mit Petechien und Zahnfleisch- oder Nasenbluten bei Thrombozytopenie und erhöhter Infektanfälligkeit bei Leukozytopenie. Selten kommt

es im Rahmen des sogenannten „Sweet Syndroms“ zu einer akuten febrilen neutrophilen Dermatitis, welche aber häufiger mit einer CMML assoziiert ist. Auch autoimmunologische Phänomene, wie zum Beispiel Arthritis, Osteochondritis oder Vasculitis sind mögliche Manifestationsformen des MDS [5, 13].

1.1.2 Diagnostik

Die MDS-Diagnostik beinhaltet vor allem die Diagnostik aus dem peripheren Blut (Blutbild, Retikulozyten, Differentialblutbild, LDH, Ferritin, Erythropoetin, Folsäure, Vitamin B12 und ggf. HLA-Typisierung), die zytomorphologische KM-Diagnostik (Eisen- und Esterasefärbung) in Kombination mit der Zytogenetik (ggf. Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH)), sowie der neuerdings zunehmenden molekulargenetischen Charakterisierung (Genmutationen) [5, 6].

1.1.3 Klassifikation von MDS

WHO-Klassifikation (2016)

Die WHO-Klassifikation zur Einteilung von MDS richtet sich nach fünf verschiedenen Kategorien (Tabelle 1) [14].

1.1.4 Prognose

MDS werden anhand moderner diagnostischer Prognosescores klassifiziert. Diese werden dazu verwendet, das Gesamtüberleben von MDS-Patienten abzuschätzen, das Risiko einer Progression in eine AML zu beurteilen und über die Art der Therapie zu entscheiden. Wichtige Prognoseparameter stellen - wie auch bei anderen Erkrankungen - Alter, Geschlecht und Komorbiditäten dar. Es gibt jedoch wichtige zusätzliche Parameter, wie zum Beispiel die Zytogenetik oder der Blastenanteil im KM, denen beim MDS eine besondere Bedeutung zukommt. Zur Einteilung dieser Parameter gibt es zwei verschiedene Scoring-Systeme, das „International Prognostic Scoring System“ (IPSS) und den „revidierten IPSS“ (IPSS-R) (Tabelle 2,3) [15-17].

1.1.5 Therapie

Bei einer Vielzahl der Patienten wird anfangs nach einer „watch and wait“- Strategie verfahren, also einer regelmäßigen Kontrolle der klinischen Werte und Symptome des Patienten ohne Einleitung einer Therapie. Bei symptomatischen Patienten beginnen die Optionen bei rein supportiven Therapien und beinhalten bspw. die Gabe von Erythrozytenkonzentraten mit Eisenchelatoren oder Antibiotikatherapien. In Fällen von erhöhter Infektanfälligkeit kommen DNA-demethylierende Substanzen wie Azacitidin und/oder Immunmodulatoren zum Einsatz. Bisher stellt die allogene Stammzelltransplantation die einzige kurative Therapieoption des MDS dar, ist allerdings aufgrund der vielen Risiken und Nebenwirkungen nicht jedem Patienten zuzumuten [18]. Diese und alle weiteren supportiven Therapieoptionen können zwar die Lebensqualität und Überlebenszeit der Patienten verbessern, stellen jedoch keine zielgerichteten Therapien dar, da sie nicht auf krankheitsverursachende Veränderungen abzielen und somit kaum Einfluss auf die Progression der Erkrankung nehmen.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation (2016) [6]

Legende: RSI: Ringsideroblasten, AS: Auer-Stäbchen, PB: Peripheres Blut, KM: Knochenmark, ¹falls SF3B1 mutiert, ²1% periphere Blasten müssen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten beurteilt werden, ³Fälle mit $\geq 15\%$ RSI haben definitionsgemäß eine signifikante Dyserythropoese und sind daher MDS mit RSI und Einliniendysplasie

| Kategorien | Dysplastische Reihen | Zytopenien | Ringsideroblasten (% d. erythroiden Zellen) | Blasten KM/ PB | Karyotyp |
|---|----------------------|------------|---|--|---|
| MDS mit Einlinien-dysplasie (SLD) | 1 | 1-2 | $<15\%$ / $<5\%$ ¹ | KM $<5\%$, PB $<1\%$, keine AS | Alle, außer del(5q) +/- 1 andere Nicht-Chr. 7 Aberration |
| MDS mit Mehrliniendysplasie (MLD) | 2-3 | 1-3 | $<15\%$ / $<5\%$ ¹ | KM $<5\%$, PB $<1\%$, keine AS | Alle außer del(5q) +/- 1 andere Nicht-Chr. 7 Aberration |
| MDS mit del (5q) | 1-2 | 1-3 | Nicht relevant | | del(5q) isoliert oder mit 1 anderen Nicht-Chr. 7 Aberration |
| MDS mit Blastenexzess (EB1/2) | 0-3 | 1-3 | Nicht relevant | KM 5-9 % oder PB 2-4 %, keine AS (MDS-EB-1) / KM 10-19 % oder PB 5-19 % oder AS (MDS-EB-2) | Nicht relevant |
| MDS mit Ringsideroblasten (RSI) | | | | | |
| MDS mit RSI und SLD | 1 | 1-2 | 15% / $\geq 5\%$ ¹ | KM $<5\%$, PB $<1\%$, keine AS | Alle außer del(5q) +/- 1 andere Nicht-Chr. 7 Aberration 5q |
| MDS mit RSI und MLD | 2-3 | 1-3 | $\geq 15\%$ / $\geq 5\%$ ¹ | KM $<5\%$, PB $<1\%$, keine AS | Alle, außer del(5q) +/- 1 andere Nicht-Chr. 7 Aberration |
| Unklassifizierbare MDS | | | | | |
| 1% peripheren Blasten | 1-3 | 1-3 | Nicht relevant | KM $<5\%$, PB=1 % ² , keine AS | Nicht relevant |
| Einliniendysplasie und Panzytopenie | 1 | 3 | Nicht relevant | KM $<5\%$, PB $<1\%$, keine AS | Alle außer del(5q) +/- 1 andere Nicht-Chr. 7 Aberration |
| Auf Grundlage definierter zytogenetischer Veränderungen | 0 | 1-3 | $<15\%$ ³ | KM $<5\%$, PB $<1\%$, keine AS | MDS-definierende Abnormalität |

Tabelle 2: IPSS-Score Punkte Verteilung [7, 8]

| IPSS Score-Punkte | | | | | |
|--|---------|-------------|----------|-------|-------|
| | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 |
| Blasten im KM % | < 0,5 | 5-10 | - | 11-20 | 21-29 |
| Karyotyp¹ | günstig | intermediär | schlecht | - | - |
| Anzahl Zellreihen mit Zytopenie² | 0/1 | 2/3 | - | - | - |
| Risiko-Score | | | Punkte | | |
| Low-risk | | | 0 | | |
| Intermediate-I risk | | | 0,5-1 | | |
| Intermediate-II risk | | | 1,5-2 | | |
| High-risk | | | ≥2,5 | | |

Legende:

¹günstig: normal, -Y, del(5q), del(20q)

schlecht: komplex (≥ 3 Anomalien) oder Aberrationen auf Chromosom 7.

intermediär: andere.

² Zählt als Zytopenie bei: Hämoglobin <10g/dL, Neutrophile <1,8/nL, Thrombozyten <100/nL.

Tabelle 3: IPSS-R Score Punkte Verteilung [9]

| IPSS-R Score Punkte | | | | | | | |
|---------------------------|----------|------|---------|--------------------------|-------------|----------|---------------|
| | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 4 |
| Zytogenetik | Sehr gut | - | Gut | - | Intermediär | Schlecht | Sehr schlecht |
| Blasten im KM (%) | ≤2 | - | <2-<5 | - | 5-10 | >10 | - |
| Hämoglobin (g/dL) | ≥10 | - | 8-<10 | <8 | - | - | - |
| Thrombozyten (/nL) | ≥100 | - | 50-<100 | <50 | - | - | - |
| Neutrophile (/nL) | ≥800 | <800 | - | - | - | - | - |
| Risiko-Kategorie | | | | Punkte nach Score System | | | |
| Very low | | | | ≤1,5 | | | |
| Low | | | | 2-3 | | | |
| Intermediate | | | | 3,5-4,5 | | | |
| High | | | | 5-6 | | | |
| Very high | | | | >6 | | | |

Legende: Prognose bei MDS:

Sehr gut: (-Y,del(11q));

Gut: (Normal, del(5q), del(12p), del(20q), Doppel-Klon mit del(5q) außer chr7);

Intermediär: (del(7q), +8, +19, i(17q), andere Einzel- oder Doppel-Klone);

Schlecht: (-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), Doppel-Klon mit -7/del(7q), komplex (3 Aberrationen); Sehr

schlecht: (komplex >3 Aberrationen)

1.2 Spleißen und Spleißfaktor-Mutationen beim MDS

Als Spleißen wird das Herausschneiden von Introns zur Weiterverarbeitung der Ribonukleinsäure bezeichnet; bei diesem Vorgang entsteht reife mRNA aus prä-mRNA. Mutationen in Genen der Spleißfaktoren (SF) kommen bei etwa 50% der MDS Patienten vor, wobei sie sich gegenseitig ausschließen [10, 11, 19]. Die Spleißfaktor-Mutationen sind also größtenteils „mutually exclusive“ und können nicht nebeneinander Coexistieren. Auch liegen SF-Mutationen in den erkrankten Zellen meist heterozygot vor und betreffen aufgrund ihrer hohen Allellast meist den krankheitsinitiierenden Klon [14]. Aus diesem Grund stellen sie ein besonders attraktives therapeutisches Ziel dar. Ihre prognostische Relevanz war lange Zeit ungeklärt. Neuere Analysen deuten allerdings darauf hin, dass Mutationen in *SRSF2* und *U2AF1* mit einem hohen Transformationspotential verbunden sind [15, 16], während Mutationen in *SF3B1* mit einer eher guten Prognose assoziiert sind [17]. Mutationen in SF-Genen führen dabei, im Gegensatz zu vielen anderen Mutationen bei MDS, nicht zu einem Funktionsverlust der Genprodukte. Aufgrund ganz spezifischer Aminosäure-Austausche, z.B. *SRSF2(P95H)* oder *U2AF1(S34F)* verursachen sie eine fehlerhafte RNA-Prozessierung wie Exon-Skipping, Intron-Retention oder die Verwendung alternativer 3'- oder 5'- Spleißstellen [12, 20, 21].

Sind hiervon Gene betroffen, die Onkogene kodieren, kann das weitreichende pathophysiologische Konsequenzen haben. So wird beispielsweise aufgrund der *SRSF2(P95H)* Mutation ein toxisches Exon in das Onkogen *EZH2* eingeschlossen [22]. Allerdings lässt sich durch diese fehlerhafte RNA-Prozessierung nur ein Teil der Pathophysiologie der MDS-Erkrankung erklären. Obwohl sie alle bei MDS vorkommen, führen unterschiedliche SF-Mutationen zu unterschiedlich veränderten Spleiß-Mustern. Dieselbe Mutation kann, je nach Zelltyp, sogar verschiedene Spleiß-Veränderungen verursachen [23]. Im Folgenden sind die bei MDS am häufigsten mutierten SF-Gene beschrieben.

1.2.1 *SF3B1* (splicing factor 3b subunit 1)

Das *SF3B1* Gen codiert für die Untereinheit (UE) 1 des SF Protein Komplex 3b (SF3B). SF3B bildet zusammen mit der UE 3a und einer 12S RNA Einheit das U2 snRNP (small nuclear ribosomal protein). Der Komplex aus SF 3b/3a bindet prä-mRNA (precursor messenger RNA) oberhalb der „intron branch site“ und verankert somit die U2 snRNP an die prä-mRNA. *SF3B1* nimmt somit eine essentielle Funktion bei der Umwandlung von pre-mRNA zu reifer mRNA ein [24-26].

Ungefähr 20-30% der MDS Patienten weisen eine *SF3B1* Genmutation auf. Assoziiert wird die *SF3B1*-Mutation vor allem mit MDS mit Ringsideroblasten (MDS-RS) [10, 11, 17].

1.2.2 *SRSF2* (serine and arginine rich splicing factor 2)

SRSF2 sorgt beim Spleißen für die Wiedererkennung des Exons, indem es mit seiner RNA Erkennungsdomäne („RNA recognition motif domain“ RRM) an die exonische Spleißverstärker-Sequenz („exonic splicing enhancer“ ESE) der mRNA bindet. Dies fördert wiederum die Bindung von *U2AF* und *U1* snRNP an die 3' Spleißstelle [27-30]. 15-20% aller MDS Patienten weisen eine *SRSF2*-Genmutation auf, bei CMML Patienten kommen sie sogar zu 40-50% der Fälle vor [10, 11, 31, 32].

1.2.3 U2AF1 (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1)

U2AF1 ist ein Mitglied der SR-Protein Familie und eine Untereinheit von U2 snRNP. U2AF1 sorgt für die Bindung von U2 snRNP an die prä-mRNA 3' Spleißstelle [33, 34]. U2AF1-Mutationen tauchen bei ca. 7-11% aller MDS-Patienten auf. Einige Studien zeigen, dass U2AF1-Genmutationen mit einer erhöhten Transformation von MDS in eine sekundäre AML (sAML) sowie mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind [10-12, 16].

1.2.4 ZRSR2 (zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2)

Das ZRSR2-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und stellt somit eine Ausnahme dar. Es kodiert für Untereinheiten der kleinen U2 und großen U12 Spleißeinheiten [35, 36]. ZRSR2-Genmutationen kommen bei ca. 3-11% aller MDS Patienten vor, außerdem sind sie fast nur bei Männern aufzufinden. Auch ZRSR2 Mutationen werden mit einem erhöhten Risiko einer sAML-Transformation assoziiert [10-12, 19].

1.3 R-loops und replikativer Stress

In neueren Studien an genomeditierten Zelllinien, in welche die entsprechenden SF-Mutationen eingebracht wurden, konnte eine hohe Assoziation der Mutationen mit dem Nachweis von sogenannten R-loops beobachtet werden [37, 38].

R-loops sind DNA:RNA Hybridstrukturen, die in geringem Umfang physiologischerweise während der Transkription auftreten, wo sie durch RNaseH1 wieder aufgelöst werden (Abb. 2) [39].

Persistierende R-loops verursachen in der S-Phase des Zellzyklus replikativen Stress (RS), da sie eine Barriere für die Replikationsgabel darstellen [40]. Somit stellen sie eine Gefahr für das Genom dar. RS wird als einer der Hauptrisiken für die Entstehung von Mutationen und genetische Instabilität angesehen und spielt bei der Entstehung und Progression von Krebserkrankungen eine wichtige Rolle [41]. Zellen reagieren auf die Akkumulation von R-Loops und den damit verbundenen RS, indem sie ATR-vermittelte DNA-Reparaturmechanismen in Gang setzen [41].

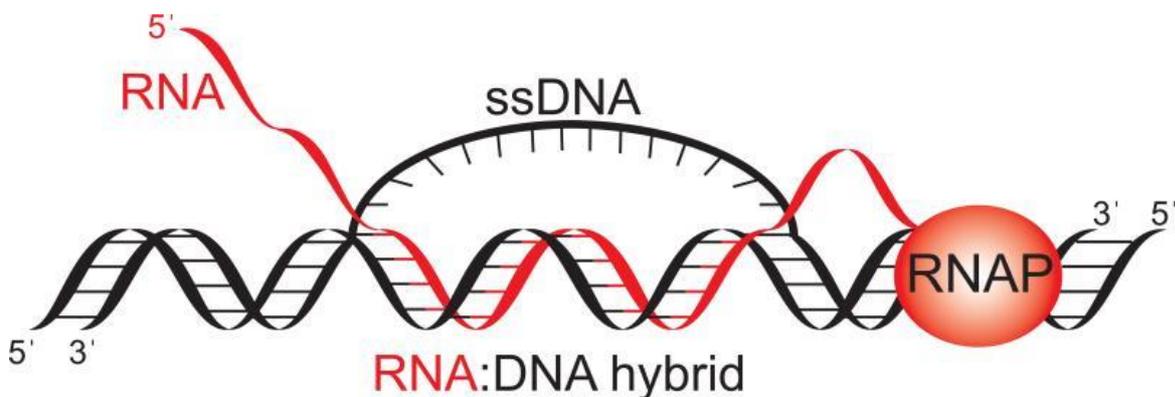


Abbildung 2: Darstellung einer RNA:DNA Hybridstruktur in der Replikations-/Transkriptionsgabel.

Abkürzungen: ssDNA = Single-Stranded DNA, RNAP = RNA-Polymerase; Entnommen aus: [42]

1.4 ATR-Signalweg

Der ATR-Signalweg dient zur Reparatur von geschädigter DNA, zum Beispiel bei RS oder Doppelstrangbrüchen [43, 44]. Wenn das Spleißen der RNA gestört wird, kommt es vermehrt zu R-Loops und der Vorgang der Transkription kann nicht fortgeführt werden [45-47].

Das Replikationsprotein A (RPA) ist ein ssDNA-bindender Proteinkomplex, der im Falle von R-Loops an den alleinstehenden DNA-Strang bindet. An den von RPA bedeckten ssDNA-Strang der R-Loops bindet wiederum ATRIP (ATR-interacting Protein), welches der regulierende Partner eines ATR-ATRIP-Komplexes ist, und dabei hilft, den Schaden zu lokalisieren. Durch zusätzliche ATR-Regulatoren wie RAD17, RAD9, RAD1 und HUS1 (auch 9-1-1 Komplex genannt) und TopBP1 (DNA topoisomerase 2-binding protein) wird ATR selbst aktiviert und der Reparaturmechanismus eingeleitet. RPA wird im Verlauf von ATR phosphoryliert und somit aktiviert. In diesem Zustand rekrutiert p-RPA (phosphoryliertes RPA) RNaseH1, welches die Hybridstruktur der R-Loops auflöst (Abb. 4) [43, 48, 49].

Wird dieser Signalweg behindert, kann keine Reparatur von geschädigter DNA stattfinden. Es kommt folglich zum Zellzyklusarrest bzw. zur Apoptose der geschädigten Zelle.

Um die Aktivität des ATR-Signalweg darzustellen, kann man einen Antikörper benutzen, der an RPA2 (S33) bindet und dank dessen essentieller Aufgabe somit repräsentativ für den ATR-Signalweg ist.

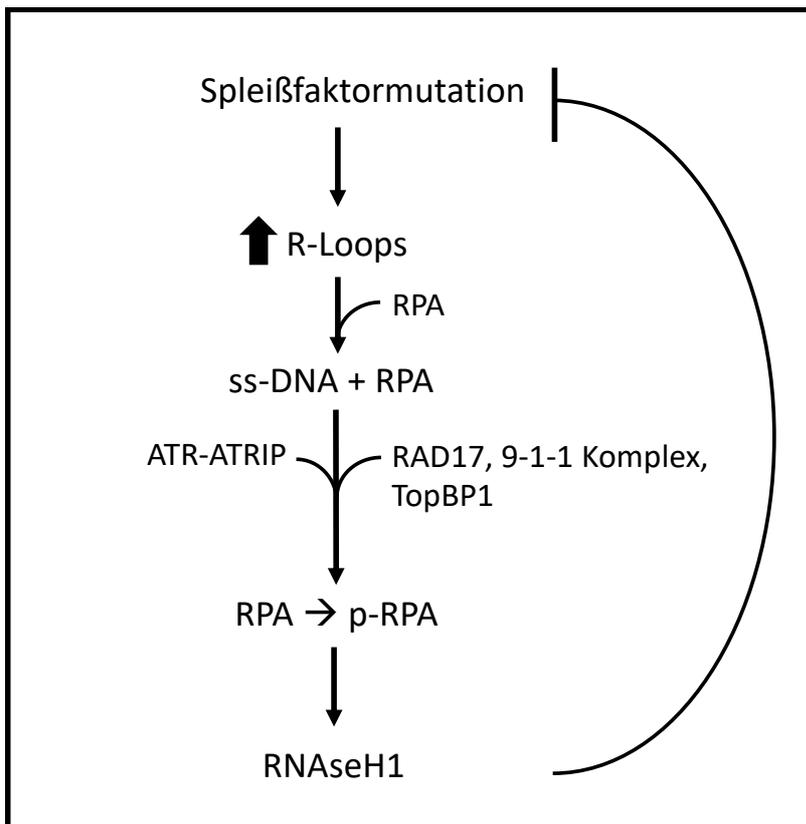


Abbildung 3: Schematische und vereinfachte Darstellung des ATR-Signalweges bei vermehrten R-Loops induziert durch SF-Mutationen
Darstellung in Anlehnung an [43, 48, 49]

1.5 Synthetische Letalität

Solange die ATR-vermittelte DNA-Reparatur funktioniert, hat RS keine schwerwiegenden Folgen für die Zelle. Problematisch wird es jedoch, wenn die Zelle aufgrund einer Vorschädigung auf eine funktionierende DNA-Reparatur angewiesen ist oder in anderer Weise vorgeschädigt ist. In diesem Fall führt eine nur geringe Anhäufung von DNA-Schäden bei gleichzeitig nicht richtig funktionierendem bzw. inhibiertem ATR-Weg zu vermehrtem RS. Durch diesen ist die Zelle in ihrem Zellzyklus gestört und kann sich nicht weiter teilen. Es werden Mechanismen in Gang gesetzt, die zu Seneszenz oder Apoptose führen. Dies führte in der Forschung zur Entwicklung einer Vielzahl von SF-Inhibitoren, gegenüber denen mutierte Zellen eine besonders hohe Sensitivität zeigen, wohingegen gesunde Zellen nur geringfügig beeinträchtigt werden (Abb. 3) [50]. Dieses als „synthetische Letalität“ bekannte Konzept macht man sich in der Krebstherapie zu Nutze. Ein klassisches Beispiel hierfür ist der Einsatz von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) Inhibitoren bei Vorliegen einer *BRCA1* oder *BRCA2* Mutation [51].

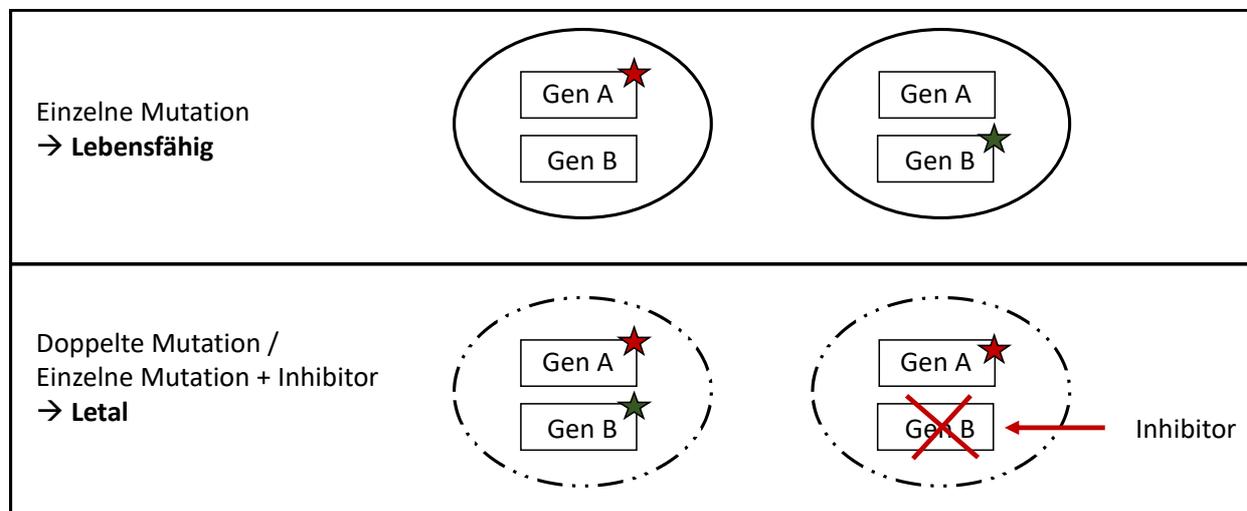


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Mechanismus der synthetischen Letalität.
Darstellung in Anlehnung an [52]

1.6 Zielsetzung/Fragestellung

Etwa 50% aller MDS-Patienten weisen eine SF-Mutation auf. Diese Mutationen will man sich - ganz im Sinne der synthetischen Letalität - zu Nutze machen, um gezielt die krankheitsinitiierenden Zellen zu bekämpfen. Kürzlich wurde in Studien an genom-editierten Zelllinien, in welche die entsprechenden SF-Mutationen eingebracht wurden, eine hohe Assoziation der Mutationen mit dem Nachweis von R-loops beschrieben [37, 38]. Die Hypothese ist, dass KM-Zellen von MDS Patienten, die eine SF-Mutation vorweisen, auch vermehrt R-Loops bilden. Des Weiteren geht man davon aus, dass SF-Modulatoren/-Inhibitoren einen ähnlichen, ggf. additiven Effekt auf den Spleiß-Mechanismus und somit auf die Quantität der R-Loops ausüben. Durch die erhöhte Menge an R-Loops benötigen die Zellen einen Reparaturmechanismus, welcher über den ATR-Signalweg ausgeübt wird. Wird nun auch dieser ATR-Signalweg gehemmt, zum Beispiel mit ATR-Inhibitoren wie AZD6738, wird die Auflösung der R-Loops verhindert. Der Zellzyklus kann nicht fortschreiten, es kommt zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose. Die Zellen sind folglich nicht mehr lebensfähig. Weisen Zellen schon vor der Behandlung Mutationen in den SF-Genen *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1* oder *ZRSR2* auf, so geht man davon aus, dass die Behandlung mit SF-Modulatoren und ATR-Inhibitoren einen stärkeren Effekt hat, als bei Zellen, die keine dieser Mutationen aufweisen. Durch die doppelte Störung der Spleiß-Mechanismus und die gleichzeitige Inhibition der Reparatur kommt es - dem Prinzip der synthetischen Letalität folgend - zu einer Verminderung der Lebensfähigkeit der Zellen. Somit kann man von einer zielgerichteten Therapie oder auch „targeted therapy“ reden.

Ziel der Arbeit ist die Beantwortung folgender Fragen:

1. Weisen CD34⁺ Zellen von Patienten mit SF-Mutationen vermehrt R-Loops auf bzw. zeigt sich ein Unterschied, wenn man die einzelnen SF-Mutationen gesondert betrachtet?
2. Nutzen CD34⁺ Zellen von Patienten mit SF-Mutationen vermehrt den ATR-Reparatursignalweg, um entstandene R-Loops aufzulösen?
3. Wird die Anzahl der R-Loops durch die Zugabe eines SF-Inhibitors/Modulators verstärkt?
 - a. Bei Zelllinien
 - b. Bei Nabelschnurblut (NSB)
 - c. Bei CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen von MDS-Patienten mit und ohne SF-Mutationen
4. Entsteht durch eine erhöhte Anzahl an R-Loops eine verstärkte Aktivierung des ATR-Signalweges?
 - a. Bei Zelllinien
 - b. Bei NSB
 - c. Bei CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen von MDS-Patienten mit und ohne SF-Mutationen
5. Wird durch die Inhibition des ATR-Signalweg z.B. mit AZD6738 die Lebensfähigkeit der Zellen vermindert, da der benötigte Reparaturmechanismus inhibiert wird?
6. Ruft die Kombinationsgabe von SF-Inhibitor/-Modulator und ATR-Inhibitoren eine stärkere Reaktion hervor als die Einzelgabe der Substanzen? Kann man hier von einem additiven Effekt reden?
7. Reagieren Zellen von MDS-Patienten mit SF-Mutation sensitiver auf die einzelnen Substanzen wie auch auf deren Kombinationen, als Zellen von MDS-Erkrankten ohne SF-Mutationen?
8. Kann man bei den verschiedenen SF-Mutationen einen Unterschied hinsichtlich der Zellreaktionen auf SF-Modulatoren/ ATR-Inhibitoren bemerken?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden von dem DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen.

2.1.1.1 SKM1-1

Die SKM-1 Zelllinie stammt aus dem peripheren Blut eines 76-jährigen Japaners mit einer sAML (M5), die sich aus einem MDS entwickelt hat. Es handelt sich dementsprechend um eine humane Zelllinie mit AML aus dem Jahr 1989 [53, 54].

2.1.1.2 MOLM-13

MOLM-13 ist eine humane Zelllinie. Sie wurde 1995 aus dem peripheren Blut eines 20-jährigen Mann mit einer sAML FAB M5a – entwickelt aus einem MDS - isoliert. Die Zelllinie weist eine interne Tandemduplikation des *FLT3*-Gens (ITD) auf, das FLT3 Protein wird nicht exprimiert. [53, 55]

2.1.1.3 HEL

HEL ist eine humane Zelllinie, die 1980 aus dem peripheren Blut eines 30-jährigen Mannes mit AML M6 isoliert wurde. In der Literatur wird beschrieben, dass die Zellen zu einer spontanen und induzierten Globinsynthese fähig sind und eine *JAK2*-Mutation tragen. [56]

2.1.1.4 HL60

HL60 ist eine humane Zelllinie, die 1976 aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen Frau mit AML FAB M2 isoliert wurde. [57]

2.1.2 Antikörper

Tabelle 4: Auflistung der benutzten Antikörper

| Antikörper | Bezugsfirma |
|---|--------------------------|
| Anti-DNA-RNA Hybrid [S9.6] Antibody | Kerafast |
| RPA2 [p Ser33] Antibody | Novus Biologicals |
| Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) | Thermo Fisher Scientific |
| Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 555) | Thermo Fisher Scientific |
| Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) | Thermo Fisher Scientific |

2.1.3 Medikamente/Chemikalien

Tabelle 5: Auflistung benutzter Substanzen zur ATR-Inhibition und SF-Modulation

| Substanz | Bezugsfirma |
|---------------|-------------|
| PladienolideB | R&D Systems |
| AZD6738 | Selleckchem |
| VE-821 | TargetMol |
| BAY 1895344 | Selleckchem |

2.1.3.1 PladienolideB

PladienolideB (PladB) ist ein natürliches Produkt, das aus einem 12-teiligen Makrolidring mit verlängerter Epoxid-beinhaltender Seitenkette besteht (Abb. 5). PladB fungiert als SF-Inhibitor, indem es SF3B1 und die Interaktion zwischen U2 snRNP und der prä-mRNA hemmt. Es kommt zu einem Zellzyklusarrest in der G1 und G2/M-Phase [58, 59]. In *in vivo* und *in vitro* Modellen von SF-mutierten myeloischen Erkrankungen konnten sowohl bei PladB wie auch bei seinem Abkömmling E7107 zytotoxische Aktivitäten nachgewiesen werden [60, 61]. Ein anderes Derivat von PladB, H3B-8800, wird aktuell in der ersten Phase einer klinischen Studie Phase I bei MDS und anderen myeloischen Erkrankungen untersucht (NCT02841540) [62, 63].

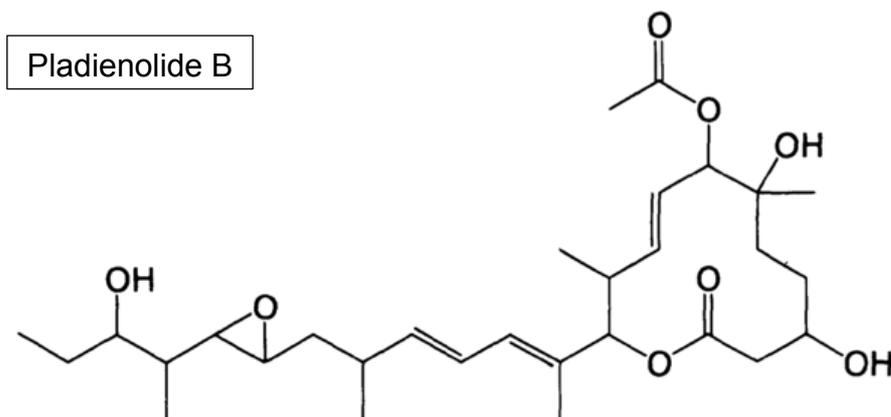


Abbildung 5: Strukturformel des SF-Modulators PladB; Entnommen aus: [47]

2.1.3.2 ATR-Inhibitoren

ATR-Inhibitoren werden in klinischen Studien eingesetzt, v.a. bei soliden Tumoren. Wir haben die Auswirkungen der Hemmung des ATR-Signalweges bei MDS-Patienten genauer untersucht, um herauszufinden, ob sie ein potentiell therapeutisches Ziel darstellen und spezifisch bei SF-mutierten CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen aus dem KM wirken.

Wir haben dafür drei verschiedene ATR-Inhibitoren getestet: AZD6738, VE-821 und Bay 1895344. Für den größten Teil der Versuche haben wir AZD6738 benutzt (Abb. 6).

AZD6738 ist ein oral bioverfügbarer Inhibitor der Serine/Threonin Proteinkinase "Ataxia Teleangiectasia and Rad3 related" (ATR) [49, 64, 65]. Eine kürzlich gestartete klinische Studie in der Phase 1b untersucht gezielt den Einfluss von AZD6738 auf die Therapie von MDS- und CMML-Patienten, bei welchen die Erstlinientherapie versagt hat (NCT03770429).

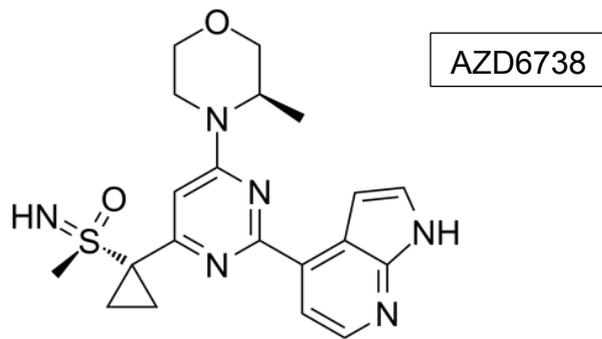


Abbildung 6: Strukturformel des ATR-Inhibitors AZD6738

2.2 Methoden

2.2.1 Auftauen kryokonservierter Zellen

Zum Auftauen der vorher in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen, wurden die Zellen in auf 37°C vorgewärmtes Medium aufgenommen. Nach 7-minütiger Zentrifugation bei 400 RPM (rounds per minute) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Zur Weiterverarbeitung wurden sie in eine Zellkulturflasche oder in Wellplatten überführt und bei 37°C gelagert.

2.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden mit RPMI1640 Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS) (Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) sowie 1% Penicillin-Streptomycin (Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert.

2.2.3 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurde ein spezielles Einfriermedium hergestellt, das zu 60% aus RPMI1640, zu 30% aus FKS und zu 10% aus Dimethylsulfoxid Hybri-Max™ (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) besteht.

Ca. 5×10^6 Zellen wurden in einem Milliliter resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Vor der Dauerkonservierung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen über Nacht in einem Einfrierbehältnis mit Isopropanol bei -80°C gelagert, um eine schonende Temperaturabsenkung durch lineare Abkühlung zu erreichen und die Vitalität der Zellen nicht zu gefährden.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl haben wir mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden man 10µL Zellsuspension unter das Deckblatt auf die Zählkammer pipettiert. Um besser beurteilen zu können, welche Zellen tot sind, haben wir die Zellsuspension mit Trypan-Blau (Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) verdünnt. Trypan-Blau oder auch Benzaminblau genannt ist ein anionischer Diazofarbstoff, dessen Grundgerüst o-Tolidin ist [66, 67]. Da abgestorbene Zellen eine perforierte Membran besitzen, kann Trypan-Blau ins Innere der Zelle gelangen. So erscheinen tote Zellen nach Färbung unter dem Mikroskop dunkelblau und sind gut von den hell leuchtenden vitalen Zellen zu unterscheiden. Nach dem Auftragen der Zellsuspension auf den Objektträger wurden alle vitalen Zellen in den Quadranten der Kammer unter dem Mikroskop gezählt. Anschließend wurde die Zellzahl pro Milliliter mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl (x Verdünnungsfaktor)}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} \times \text{Kammerfaktor (10}^4\text{)}/\text{mL}$$

2.2.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie kann die An- oder Abwesenheit verschiedener Strukturen, meistens Proteine, nachgewiesen werden. Anhand der gemessenen Intensität kann die Anzahl dieser Strukturen in verschiedenen Zellen verglichen werden. Hierzu werden primäre Antikörper eingesetzt, die spezifisch an Strukturen binden. Zur Darstellung des primären Antikörpers wird ein sekundärer, unspezifisch bindender, mit Fluoreszenzfarbstoff markierter Antikörper benötigt.

In unseren Versuchen haben wir dafür zwei verschiedene Primär- und Sekundärantikörper benutzt. Zur Darstellung der R-Loops wurden die Zellen mit dem anti-S9.6 Antikörper (Kerafast), der spezifisch an RNA-DNA Hybridstrukturen bindet, behandelt. Da der anti-S9.6 Antikörper ein hochspezifischer monoklonaler Mausantikörper ist, benötigt man für ihn einen mausspezifischen sekundären Antikörper. Dafür haben wir den Antikörper Goat Anti-Mouse IgG H&L (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Um das phosphorylierte Replikations Protein A2 (RPA2) darzustellen, und damit die Beanspruchung des Reparatursystems der Zellen nachzuweisen, haben wir einen anti-RPA2 (S33) Antikörper benutzt. Als Sekundärantikörper für diesen polyklonalen Kaninchenantikörper haben wir einen kaninchenspezifischen Sekundärantikörper benutzt: Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Thermo Fisher Scientific).

Für den Versuch wurden jeweils 100µL Zellsuspension mit ca. 1×10^6 Zellen/mL auf Objektträger pipettiert. Zur Fixierung wurden sie mit 4% Paraformaldehyd (Alfa Aesar) für 10 Minuten inkubiert und anschließend mit 0,15% TritonX100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 2 Minuten bei Raumtemperatur (RT) permeabilisiert. Nach einem 3x3-minütigen Waschvorgang mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurden die Zellen mit PBS/3% Bovines Serumalbumin (BSA) (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D) für eine Stunde bei RT geblockt. Zur Darstellung der R-Loops und des Reparaturweges wurden die Zellen nun mit den vorher genannten Primärantikörpern behandelt und über Nacht bei -4°C gelagert. Es erfolgte ein weiterer Waschvorgang und die Behandlung mit den Zweitantikörpern. Nach weiteren zwei Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur und einem dritten Waschvorgang wurde Vectashield mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, USA) auf die Objektträger aufgetragen, um die Zellen selbst im Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Anschließend wurden die behandelten Zellen mit einem Deckblatt auf dem Objektträger fixiert.

2.2.6 Auswertung der indirekten Immunfluoreszenzmessung

Am Leica Immunfluoreszenzmikroskop (100x Objektiv) wurden mit der Software LasX (Leica) Bilder der Zellen mit Exposure 250 und Gain 10 aufgenommen (Abb. 7). Mittels der Software ImageJ wurde die Intensität der Sekundärantikörper gemessen, um die Menge an R-Loops im Zellkern und die Beanspruchung des Reparatursystems der Zellen zu detektieren und quantifizieren.

2.2.7 Behandlung von Zellen mit PladB vor indirekter Immunfluoreszenzmessung

Um den Einfluss von PladB auf die Entwicklung und Vermehrung von R-Loops nachzuweisen, haben wir Versuche durchgeführt, in denen Zelllinien, Nabelschnurblut (NSB) oder auch $\text{CD}34^+$ hämatopoetische Stammzellen von MDS-Patienten mit PladB behandelt wurden. Die Zellen wurden vor und nach Behandlung mittels indirekter Immunfluoreszenz auf S9.6- und RPA2 (S33)-Intensitäten verglichen. Zur Kontrollprobe wurde jeweils DMSO hinzugefügt. Für die Versuche mit Zellen der

Zelllinien MOLM13, SKM-1, HL60 und HEL wurden jeweils 5mL der jeweiligen Zelllinie in zwei Wells einer 6-Well Platte gegeben. In das erste Well wurde so viel PladB hinzugegeben, dass eine Konzentration von 5 μ M erreicht wurde, in das Zweite (Kontroll-) Well die entsprechende Menge an DMSO. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C wurde der Inhalt der Wells in zwei 1.5 mL Röhrcchen überführt und runterzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in ca. 200 μ L Restüberstand resuspendiert und wie in Kapitel 2.2.5. beschrieben, weiterverarbeitet.

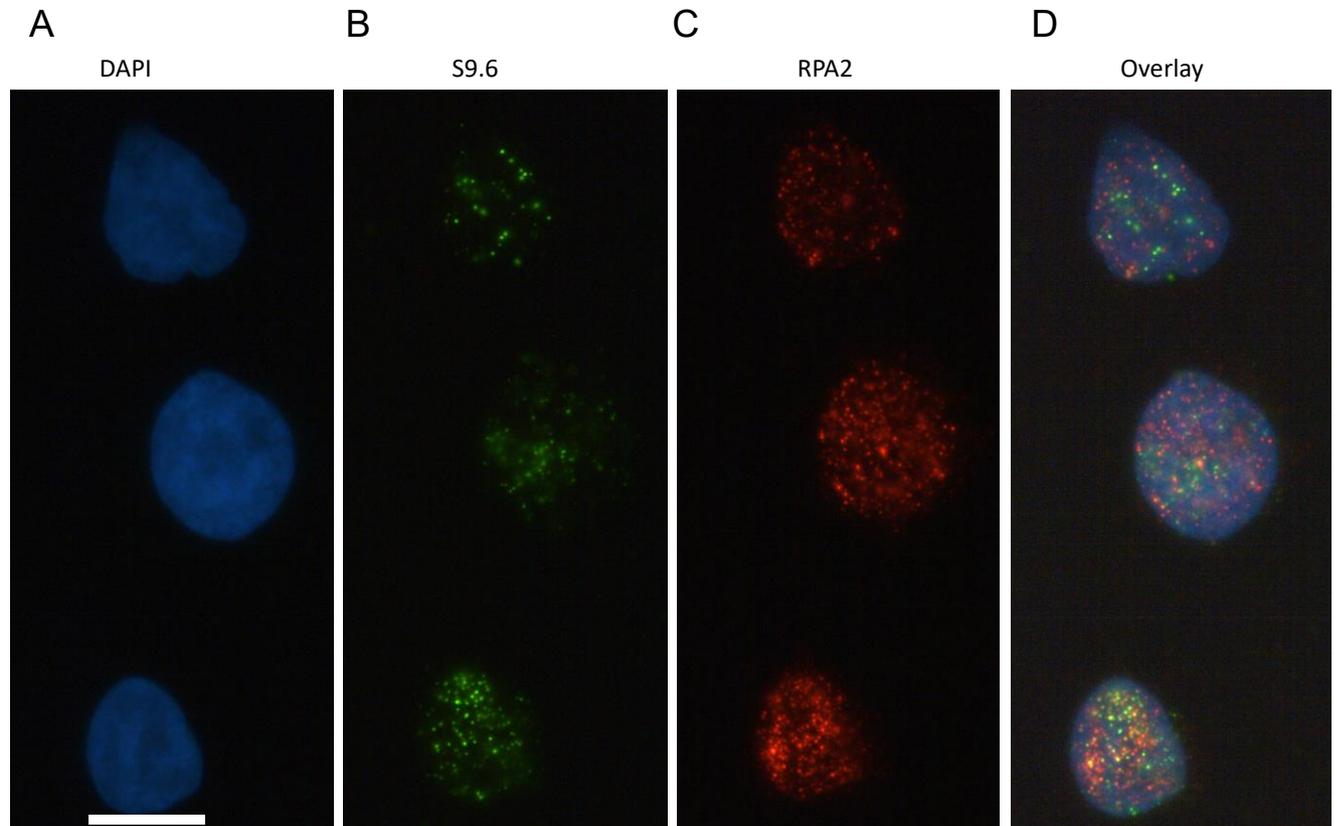


Abbildung 7: Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, Darstellung der Zellen, der S9.6- und RPA2 (S33)-Quantität

Zu sehen sind Zellen, welche zur Detektierung und Quantifizierung von R-Loops und dem ATR-Signalweg mit Primär- und Sekundärantikörpern behandelt wurden.

(A) Zellen gefärbt und dargestellt mit DAPI

(B) R-Loops „foci“ in grün dargestellt mit Anti-S9.6 und sekundärem Antikörper

(C) In rot sieht man die Antikörper, die sich an RPA2 (S33) binden

(D) Alle Schichten übereinander als „Overlay“ dargestellt

Maßstab: 5 μ M

2.2.8 Versuche mit CD34⁺ Stammzellen aus NSB oder KM von an MDS-erkrankten Patienten

2.2.8.1 Aufarbeitung primärer Zellen aus humanem NSB/ KM

Um primäre CD34⁺ Zellen aus NSB oder KM von Patienten zu gewinnen, waren verschiedene Schritte notwendig.

Zunächst wurden Leucosep-Röhrchen vorbereitet. Das Besondere an Leucosep-Röhrchen ist eine poröse Trennscheibe aus Polyethylen, unter die 15mL Ficoll (Ficoll-Paque™ Premium, GE Healthcare Europe, Freiburg, Germany) eine Minute lang bei Raumtemperatur und 1000rcf zentrifugiert wird. Ficoll ist ein synthetisch hergestelltes Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, welches bei der Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von mononukleären Zellen als Separationsmedium eingesetzt wird. Nun wurde das NSB/KM 1:1 verdünnt mit PBS auf die Trennscheibe pipettiert. Als nächstes wurden die Zellen mittels 30-minütiger Zentrifugation ohne Bremse bei RT und 400rcf separiert. Der Überstand wurde abgenommen, die gewünschte Zellfraktion in ein neues Falcon überführt und bei 4°C und 400rcf (relative Zentrifugalbeschleunigung) sieben Minuten lang zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zur Lyse in Red Cell Lysis Buffer (RCLB, Thermo Fisher Scientific) aufgenommen. Die Zellen wurden für ca. fünf Minuten auf Eis inkubiert und die Reaktion mit PBS abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation für sieben Minuten bei 4°C und 400rcf wurden die Zellen in genau definiertem Volumen PBS aufgenommen und gezählt. Um nun CD34⁺ Zellen zu isolieren, wurden die Zellen mit MACS Buffer und CD34 Beads (CD34 MicroBead Kit, human, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) nach Protokoll behandelt.

2.2.8.2 CD34⁺ Stammzellen aus NSB

Um den Einfluss von PladB und AZD6738 auf die Anzahl von R-Loops bei CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen von MDS-Patienten zu detektieren, wurden zunächst CD34⁺ Zellen benutzt, die zuvor aus NSB isoliert wurden. Das NSB wurde vom DRK Blutspendedienst (Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie der Medizinischen Fakultät Mannheim) nach Einwilligung der Mutter bezogen. Der Vorteil von NSB ist zum einen die Quantität der Zellen, die es leichter macht, Titrierungsversuche mit verschiedenen Substanzen durchzuführen, wie auch die niedrige Mutationslast von NSB-Zellen. Die Methode der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde ansonsten wie oben beschrieben - gleich den Versuchen an Zelllinien - durchgeführt.

2.2.8.3 CD34⁺ Stammzellen von MDS Patienten

Die an Zelllinien und NSB ausgearbeiteten Experimente wurden in einem nächsten Schritt an CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen von insgesamt 20 Patienten durchgeführt. Dafür wurden CD34⁺ Zellen aus KM-Proben isoliert.

2.2.8.4 Sequenzierung der Patientenproben:

Um den Mutationsstatus der Proben zum jeweiligen Zeitpunkt zu kennen, wurde DNA aus mononukleären Zellen (MNCs) der Patienten isoliert. Die SF-Mutationen wurden teilweise durch eine diagnostische Myeloid-Panel Sequenzierung des Münchner Leukämie Labors (MLL, München, Deutschland) untersucht. Waren die Sequenzierungsdaten zu den jeweiligen Proben unvollständig, wurde ein „whole exome sequencing“ (WES) nach folgendem Protokoll durchgeführt. Die WES und die

Analyse der Daten wurden von Dr. Johann-Christoph Jann mit Hilfe von Herrn A. Streuer durchgeführt.

Die Genom-Sequenzierung wurde entweder mit DNA aus CD34⁺ Zellen oder aus MNCs des KMs durchgeführt. Als Keimbahnkontrolle diente genomische DNA aus mesenchymalen Stromazellen (MSCs, mesenchymal stroma cells), welche aus *in vitro* expandiertem KM gewonnen wurde.

250ng hochmolekularer gDNA wurden mit dem Nextera DNA Flex Kit (Illumina) nach Protokoll aufgearbeitet und anschließend mittels Hybrid-Capture mit dem xGen Exome Research Panel (IDT) gemäß dem Protokoll behandelt. Die endgültigen library pools wurden auf einer S4 NovaSeq flow cell mit 150bp PE sequenziert (Illumina). Für die Mutationsuntersuchungen wurden die Rohdateien der Sequenzierung an eine bioinformatische Exom-Sequenzierungs-Pipeline einschließlich fastq-trimming (trimmomatic v0.39), Alignment (bwa v.0.7.9) und PCR-Deduplizierung (picard MarkDuplicates v2.20.5) weitergeleitet. BAM-Dateien wurden neu ausgerichtet und mit dem gatk-Bundle (v.3.8) neu kalibriert.

Potenzielle Überlappungen wurden von bamUtil clipOverlap (v1.0.14) softclipped.

Somatische Mutationen wurden von gatk Mutect2 (gatk v4.1.3.0) genannt. Nur Varianten, die FilterMutectCalls bestanden, wurden mit Annovar weiter notiert.

Im Durchschnitt wurde eine 84,7-fache Medianabdeckung für MNC/CD34 und Keimbahnproben erreicht.

2.2.8.5 Kultivierung von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen

Nach der Isolierung von CD34⁺ Zellen aus humanem KM, bzw. nach dem Auftauen dieser Zellen aus dem Stickstofftank, wurden die Zellen in spezielles Medium, bestehend aus StemSpan, 1% Myeloid Expansion Supplement (SCF, TPO, G-SF und GM-CSF, Stemcell Technologies) und 1% Penicillin/Streptomycin gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Um den optimalen Zeitpunkt für die Durchführung der Versuche abzugleichen, haben wir die Zellen täglich gezählt, bis sie sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden bzw. die benötigte Zellzahl erreicht wurde (Abb. 8). Dann wurden die Versuche *in vitro* begonnen.

2.2.9 Titrierungsversuche mit SF-Modulatoren und ATR-Inhibitoren

Die Titrierungsversuche wurden zuerst an Zelllinien durchgeführt, um eine Einschätzung für die angemessenen Konzentrationen und den richtigen Versuchsaufbau zu bekommen. Als nächstes haben wir die Versuche an CD34⁺ Zellen aus NSB durchgeführt, um die richtigen Konzentrationen der Substanzen und das Versuchsmodell für CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen von MDS Patienten zu spezifizieren.

Um ein gutes Wachstum der Zellen zu gewährleisten, wurden sie regelmäßig unter dem Mikroskop begutachtet und alle zwei bis drei Tage das Medium mit frischem ergänzt beziehungsweise komplett ausgetauscht. Pro getesteter Konzentration wurden jeweils 2mL der jeweiligen Zellsuspension in drei Wells einer 6-Well Platte überführt. Um die Reproduzierbarkeit des Versuchsaufbaus zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass eine einheitliche Zelldichte von 6×10^6 Zellen/Well eingehalten wurde.

Für die Versuche mit CD34⁺ Stammzellen haben wir 24 Well Platten benutzt. Pro Well 300µL mit 6×10^4 (NSB) bzw. 4×10^4 (CD34⁺) Zellen. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 24h wurden die Konzentrationen der Substanzen (ATR-Inhibitoren / PladB) hergestellt und zu den Zellsuspensionen hinzugegeben. Im optimalen Fall pro Konzentration drei Wells. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Vitalität der Zellen mittels CellTiterGlo® (CTG, Promega) gemessen.

2.2.10 CellTiterGlow®

Der CTG Assay ist eine Methode zur Messung der Zellvitalität mittels Adenosin triphosphat (ATP) Bestimmung (Abb. 9).

Es wurde eine definierte Menge Zellsuspension pro Probe entnommen und in eine weiße blickdichte 96-Well Platte pipettiert. Nun wurde pro Well die gleiche Menge CTG-Reagenz hinzugefügt. Die Platte wurde in den Tecan Reader eingelegt, der nach 2-minütigem Schütteln und 10-minütiger Inkubationszeit das von den Zellen produzierte ATP gemessen hat. Anhand der gemessenen Lumineszenz kann man Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen ziehen und somit rückverfolgen, wie stark die unterschiedlichen Substanzkonzentrationen zum gegebenen Zeitpunkt auf die Zellen wirken. Zellen, die sich im Status der Seneszenz befinden oder apoptotisch sind, produzieren kein ATP mehr und wurden somit auch nicht gemessen.

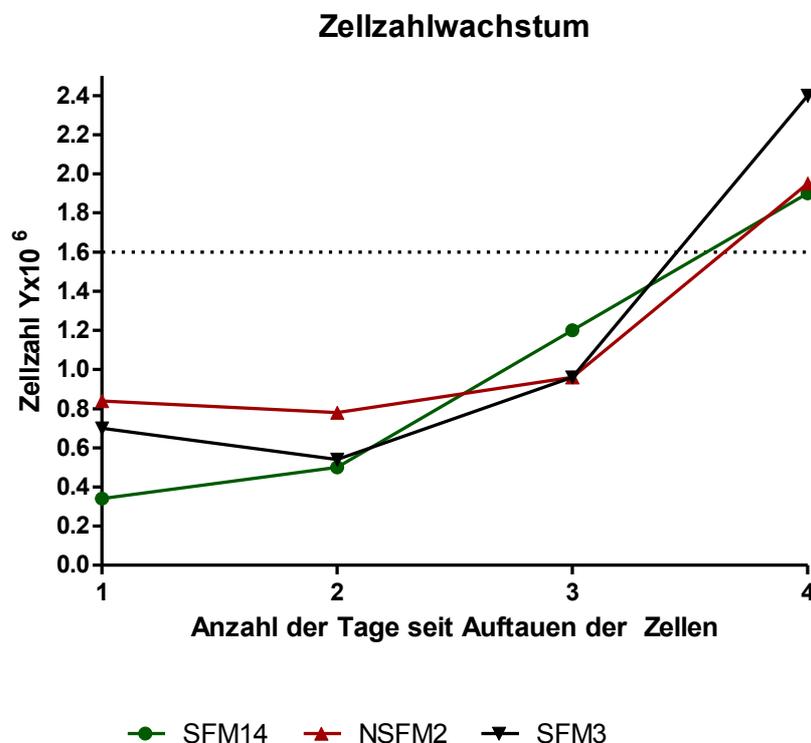


Abbildung 8: Wachstumskurven von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen von 3 MDS-Patienten nach Auftauen.

Die Y-Achse gibt die Zellzahl an, die X-Achse die Tage, die nach dem Auftauen vergangen sind. Die gestrichelte Linie markiert eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen, welches die erforderliche Menge an CD34⁺ Stammzellen für den Versuch waren.

SFM3/14: SF-mutierter Patient 3/14, NSFM2: Nicht SF-mutierter Patient 2.

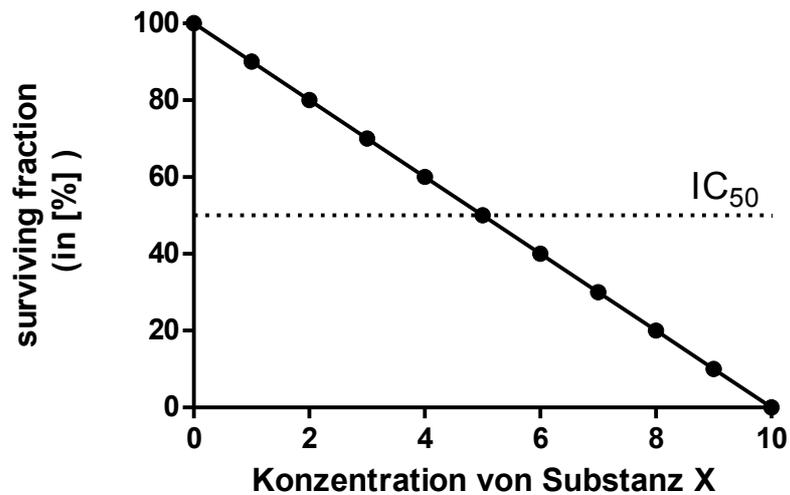


Abbildung 9: Darstellung der Auswertung der Zell-Vitalität mittels CTG.

Die X-Achse gibt an, wie viel man von einer bestimmten Substanz zu den Zellen hinzugegeben hat, die Y-Achse zeigt zu den jeweiligen Konzentrationen, wie viel Prozent der Zellen noch vital sind. Bei $X=0$ also keiner zusätzlichen Substanz ist die Vitalität der Zellen bei 100%, umso stärker die Konzentration der hinzugegebenen Substanz ist, umso mehr sinkt die Vitalität. Die gestrichelte Linie gibt die inhibitorische Konzentration „ IC_{50} “ an, also die Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird.

3 ERGEBNISSE

3.1 Etablierung einer auf Immunfluoreszenz basierenden Methode zur Darstellung von R-Loops und dem ATR-Signalweg in Zelllinien und aus NSB isolierten CD34⁺ Zellen

3.1.1 Darstellung von R-Loops und ATR-Signalweg-Aktivität mittels spezifischer Antikörper und Immunfluoreszenzmikroskopie

In Zellen der Zelllinien MOLM-13, SKM1, HL60 und HEL konnten R-Loops mittels anti-S9.6 Antikörper und der ATR-Signalweg mittels anti-RPA2 (S33)-Antikörpern und verschiedenen fluoreszierenden Sekundärantikörpern am Immunfluoreszenzmikroskop dargestellt werden (Abb. 10,11).

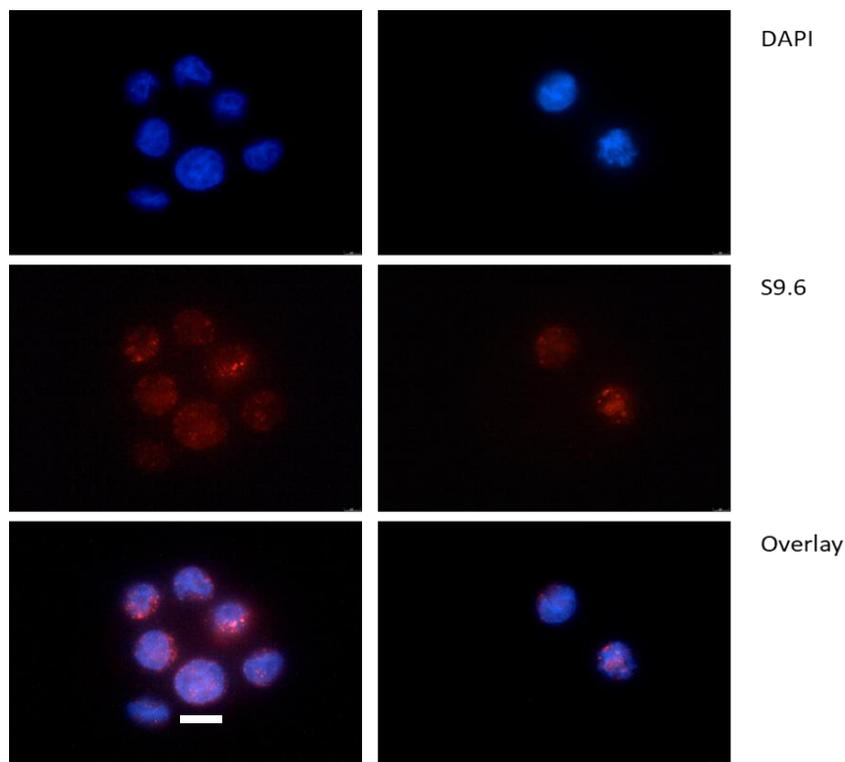


Abbildung 10: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Zellen der Zelllinie SKM1 mit DAPI, S9.6 + Sekundärantikörper 555 und Overlay; Maßstab: 5µM.

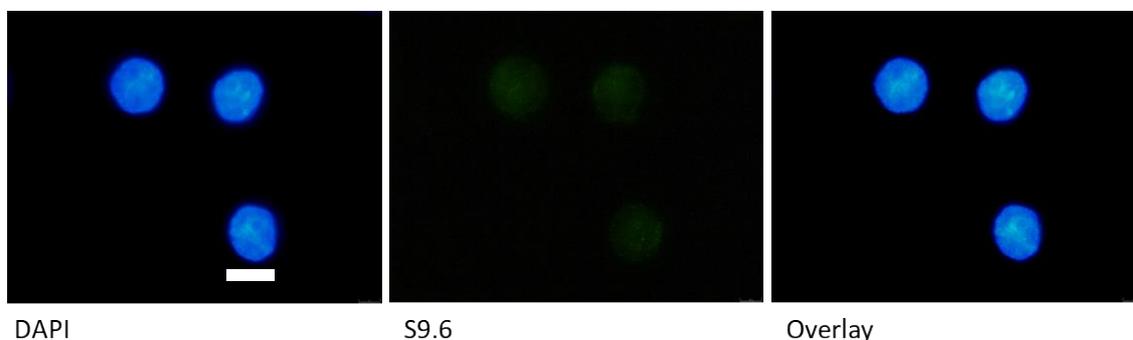
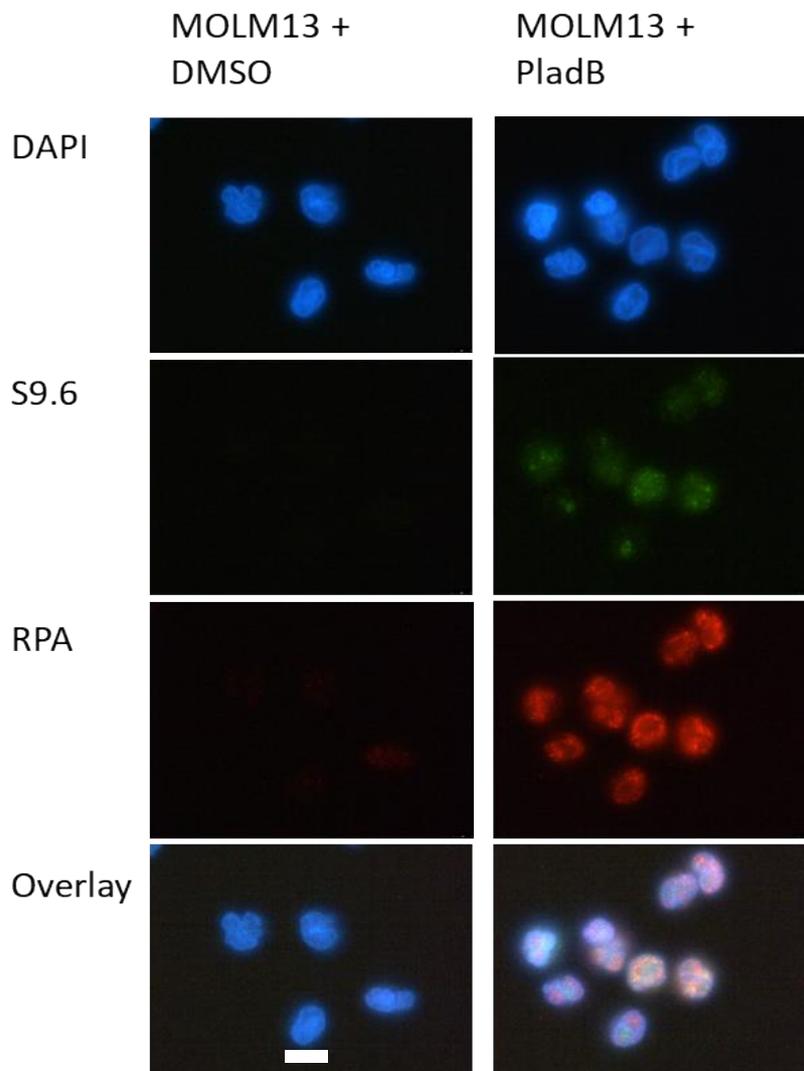


Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Zellen der Zelllinie SKM1 mit DAPI, S9.6 + Sekundärantikörper 488 und Overlay; Maßstab: 5µM.

3.1.2 Signifikante Erhöhung von S9.6 und RPA2 (S33) in Zellkulturen nach Behandlung mit SF-Modulator PladB

Um die Wirkung von SF-Modulatoren wie PladB auf die R-Loops Quantität und den ATR-Signalweg beurteilen zu können, haben wir Zellkulturen vor und nach der Behandlung mit PladB untersucht. Die Zellen wurden mit Antikörpern behandelt, welche an S9.6 (zur R-Loop Detektierung) und an Serin 33 phosphoryliertes RPA2 (RPA2 (S33), zur Detektierung des ATR-Signalweges) binden. Danach wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop angeschaut und die Quantität an S9.6 und RPA2 (S33) mit und ohne PladB verglichen. Es zeigte sich bei beiden Zelllinien nach der Behandlung mit PladB sowohl eine signifikante Erhöhung der R-Loops, wie auch eine signifikant erhöhte Aktivierung des ATR-Signalweges (Abb. 12). Daraus lässt sich schließen, dass die Behandlung von Zellen - zumindest aus Zelllinien - mit SF-Modulatoren wie z.B. PladB eine signifikante Steigerung der Bildung von R-Loops und der Aktivierung des ATR-Signalweges bedingt. Um dieses Resultat zu untermauern, haben wir die gleichen Versuche mit CD34⁺ Zellen aus NSB durchgeführt.

A



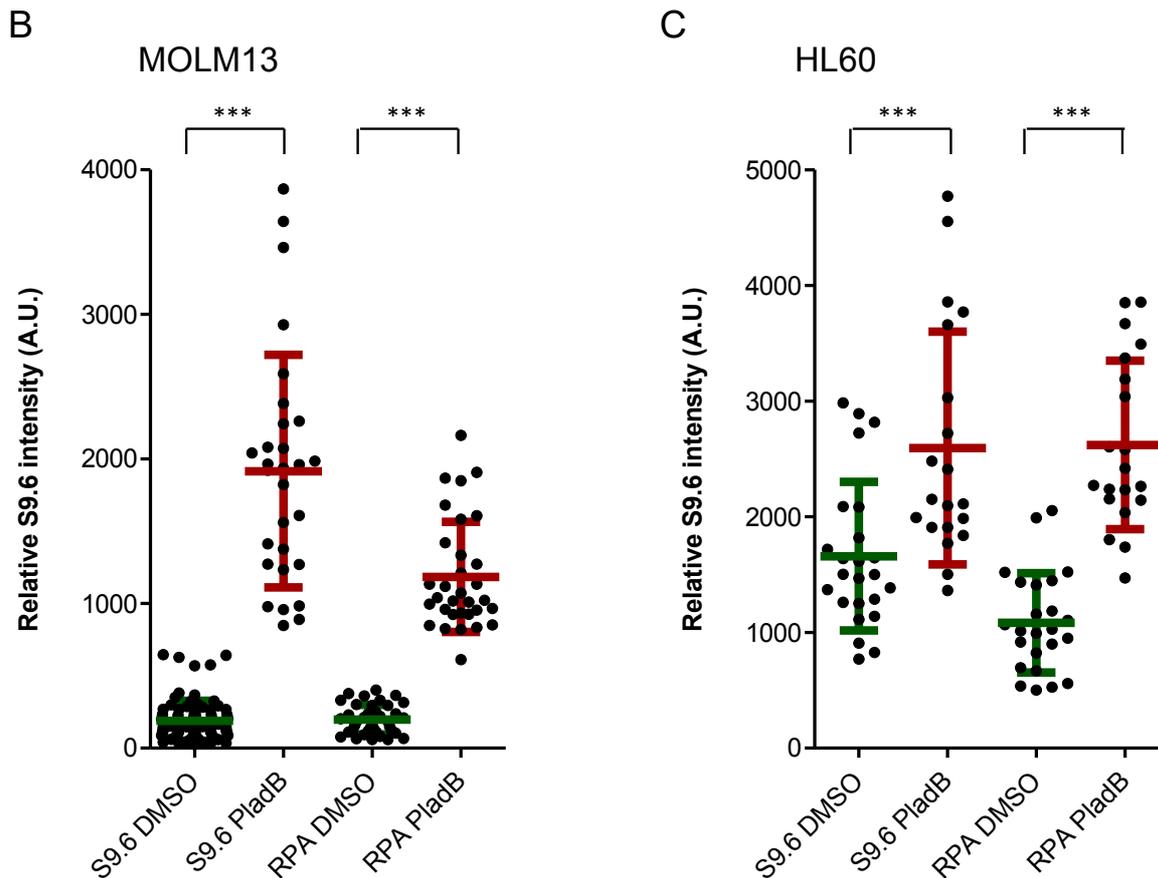


Abbildung 12: Vergleich Quantität von S9.6 und RPA2 (S33) mittels Immunfluoreszenz-mikroskopie bei zwei Zelllinien, vor und nach Behandlung mit SF-Modulator PladB

(A) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von R-Loops und dem ATR-Signalweg. Genutzt wurde der Antikörper S9.6 für die Darstellung der R-Loops und ein anti-RPA2(S33)-Antikörper zur Detektierung des ATR-Weges. Es handelt sich um Zellen der Zelllinie MOLM13, vor und nach Behandlung mit PladB; Maßstab: 5µM.

(B) Quantifizierung der mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von S9.6 an der Zelllinie MOLM13 (S9.6 DMSO: 84 Zellen, S9.6 PladB: 29 Zellen) und RPA2 (S33) (RPA2 (S33) DMSO: 39 Zellen, RPA2 (S33) PladB: 32 Zellen)

(C) Quantifizierung der MFI an der Zelllinie HL60 von S9.6 und RPA2 (S9.6/RPA2 DMSO 24 Zellen; S9.6/RPA2 (S33) PladB 20 Zellen)

Daten sind in Mittelwerten +/- Standardabweichung angegeben. *** $p \leq 0.001$

3.1.3 Signifikante Veränderungen von S9.6 und RPA2 (S33) bei CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut nach Behandlung mit SF-Modulator PladB

Um die Wirkung von PladB auf die R-Loops Quantität und den ATR-Signalweg noch besser zu verstehen, haben wir als nächstes CD34⁺ Zellen aus drei verschiedenen NSB mit PladB behandelt. Vor und nach Behandlung wurde die Intensität von S9.6 und RPA2 (S33) gemessen und verglichen (Abb. 13). Es zeigte sich bei allen dreien, dass die S9.6 Intensität steigt, der Unterschied erwies sich nur bei NSB0 signifikant. Die RPA2 (S33)-Intensität sank bei allen drei NSB nach Behandlung mit PladB, bei NSB2 ist diese Veränderung nicht signifikant. Die erhöhte Intensität von S9.6 nach Behandlung mit SF-Modulator PladB bestätigt die Hypothese, dass R-Loops durch verändertes Spleißen vermehrt gebildet werden. Die verminderte Aktivierung des ATR-Signalweges - gemessen an der RPA2 (S33)-Intensität - entspricht weder unserer Hypothese, noch den vorherigen Ergebnissen an Zellkulturen. Unsere Vermutung ist

Ergebnisse

hier, dass NSB möglicherweise durch andere Mechanismen auf PladB anderes reagiert, bzw. die Behandlung mit PladB zu stark für die Zellen war, und der größte Teil apoptotisch wurde.

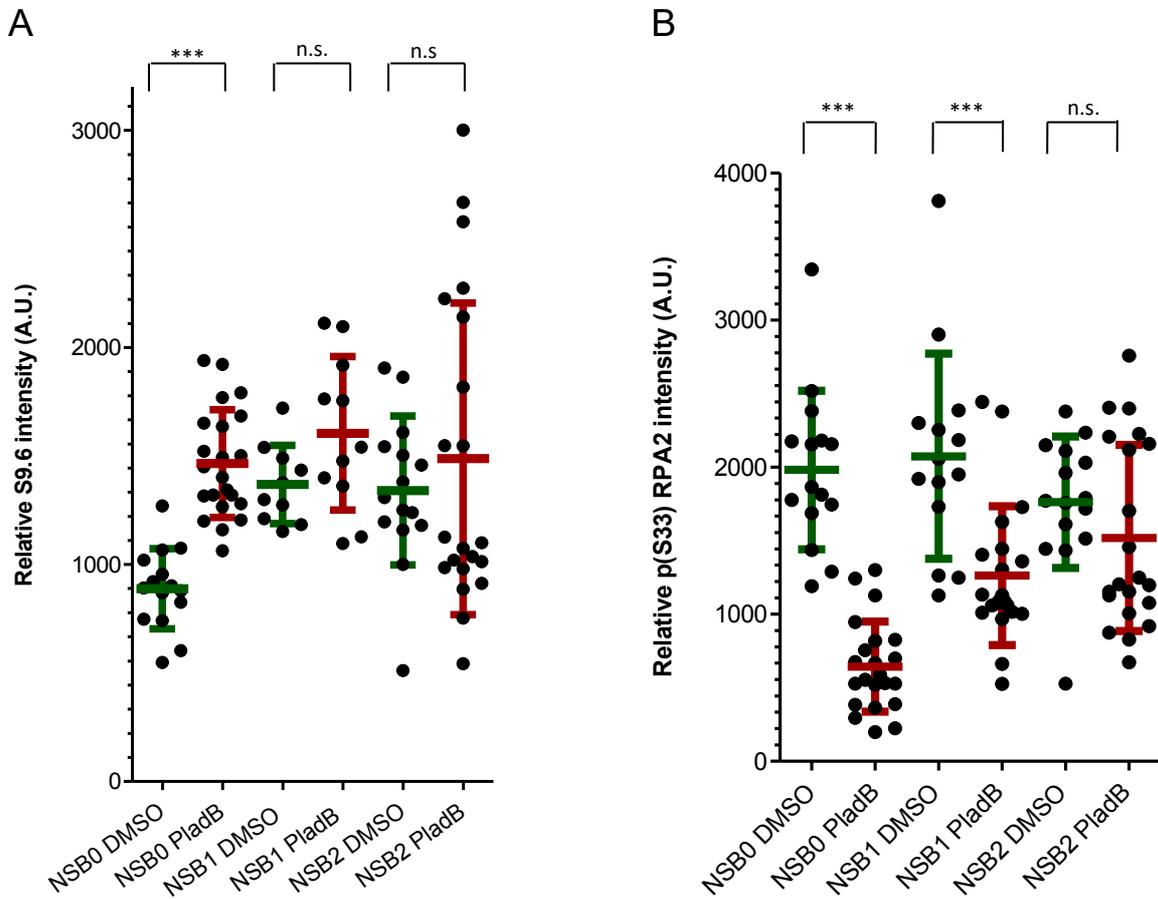


Abbildung 13: Vergleich Quantität von S9.6 und RPA2 (S33) bei Nabelschnurblut-Zellen vor und nach Behandlung mit PladB.

(A) Quantifizierung der mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von S9.6

(B) Quantifizierung der MFI von RPA2(S33)

Daten sind in Mittelwerten +/- Standardabweichung angegeben. *** $p \leq 0.001$; n.s.= nicht signifikant; NSB0/1/2 = Nabelschnurblut 0/1/2

3.2 Übertragung des Versuchsmodells auf CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen von MDS Patienten

3.2.1 Erhöhte Mengen an R-Loops bei SF-mutierten CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen von MDS Patienten

Erhöhte R-Loops Quantitäten werden mit MDS-spezifischen Mutationen in SF-kodierenden Genen assoziiert [38, 68]. Um die R-Loops Quantität bei CD34⁺ hämatopoetischen Zellen von SF-mutierten (SFM) und nicht SFM (NSFM) Patienten vergleichen zu können, haben wir die R-Loops mittels Antikörper (S9.6) detektiert, dargestellt und quantifiziert (Abb. 14). Wir haben die R-Loops Quantität von 17 MDS-Patienten (n=11 SFM, n=6 NSFM) verglichen. Die Patienten und ihre Charakteristika sind in Tabelle 1 dargestellt. Es zeigte sich, dass bei der Patientengruppe mit SF-Mutationen (n=11) im Vergleich zu den NSFM (n=6) eine signifikant höhere Menge an R-Loops detektiert werden konnte (Abb. 15A).

Um einen Vergleich zu nicht an MDS erkrankten älteren Menschen stellen zu können, haben wir auch von diesen (n=2) CD34⁺ Zellen auf R-Loops untersucht. Es zeigte sich bezüglich der R-Loops Quantität kein signifikanter Unterschied zwischen NSFM-Zellen von an MDS Erkrankten Patienten und Zellen von gesunden Älteren. Zwischen gesunden Älteren und SFM-Zellen von MDS-Patienten zeigte sich ein signifikanter Unterschied.

3.2.2 Erhöhte ATR-Signalweg Aktivität bedingt durch erhöhte R-Loops Quantität bei CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen von Patienten mit SF-Mutationen

Um die Auswirkungen von R-Loops induzierten Replikationsstress auf den ATR-Reparatursignalweg zu beurteilen, haben wir bei 17 Patienten die Aktivität des Signalweges in CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen quantifiziert. Zur Detektion und Quantifizierung des ATR-Signalweges haben wir phosphoryliertes RPA2 mittels eines Antikörpers dargestellt. RPA2 wird nach Aktivierung von ATR durch dieses u.a. an Serin 33 phosphoryliert, gegen welches der Antikörper gerichtet ist (Abb. 4).

Zellen von MDS Patienten mit SFM zeigten eine signifikant erhöhte Aktivität des ATR-Signalweges im Vergleich zu NSFM Patienten bzw. gesunden Älteren.

Zwischen Gesunden und nicht SF-mutierten MDS Patienten Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 15B). Die Notwendigkeit eines intakten, gut funktionierendem ATR-Signalweg, um den durch Replikationsstress induzierten DNA-Schaden zu reparieren, repräsentiert die erhöhte Verwundbarkeit von SF-mutierten Zellen im Sinne der synthetischen Letalität. ATR-inhibitoren, im besonderen AZD6738, befinden sich – vor allem zur Behandlung solider Tumoren - in frühen klinischen Phasen. Aus diesem Grund haben wir weiterhin untersucht, ob die Hemmung des ATR-Signalweges in MDS Patienten ein mögliches therapeutisches Ziel darstellt, um zielgerichtet SF-mutierte CD34⁺ hämatopoetische Zellen aus KM zu beeinflussen.

3.2.3 Unterschiedliche SF-Mutationen führen zu unterschiedlichen S9.6- und RPA2 (S33)-Intensitäten

Um die einzelnen SF-Mutationen und ihren Einfluss auf die Entstehung von R-Loops genauer untersuchen zu können, haben wir die SFM-Fraktion nach den unterschiedlichen Mutationen (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* und *ZRSR2*) aufgeteilt. Jede SF-Mutation einzeln zeigte hierbei einen signifikanten Unterschied der R-Loops Quantität im Vergleich zu den NSFM-Zellen, wobei in Zellen von Patienten mit *SRSF2*- Mutationen am meisten R-Loops detektiert werden konnten (Abb. 15C).

Ergebnisse

Anders verhielt es sich mit dem ATR-Signalweg. Hier zeigten lediglich die Zellen von Patienten mit *SRSF2*, *U2AF2* und *ZRSR2* Genmutation eine signifikante Erhöhung der RPA2 (S33)-Antikörper Messungen, der Unterschied zwischen *SF3B1* und NSFM-Zellen zeigte sich nicht signifikant. Die RPA2 (S33)-Intensitäten der *SF3B1*-Zellen wiesen hierbei eine starke Streuung auf (Abb. 15D).

MDS CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen

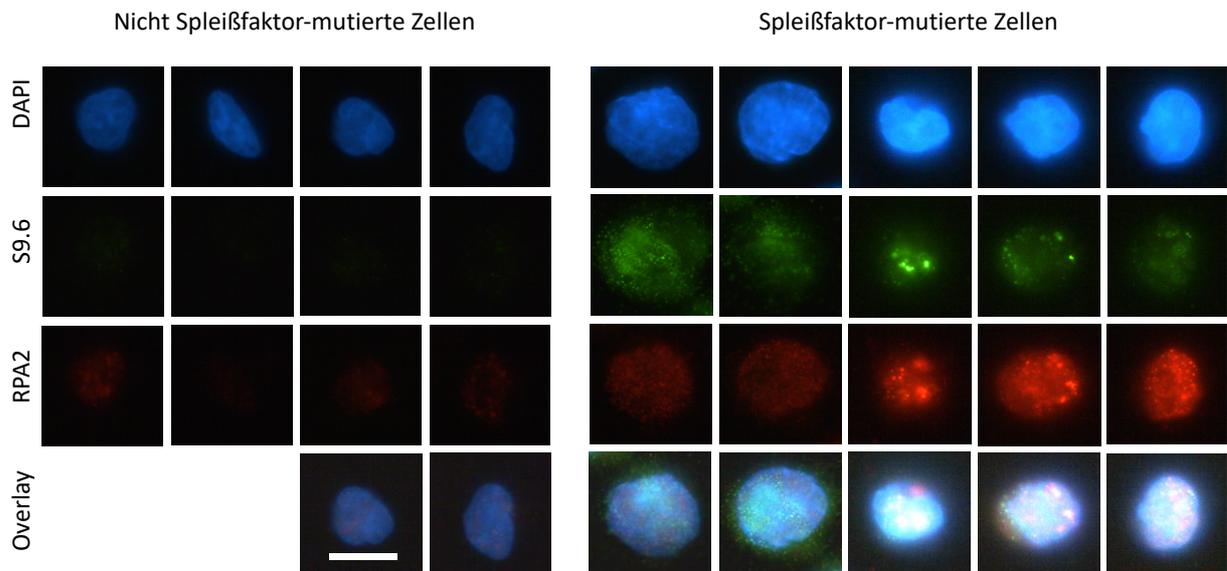


Abbildung 14: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von R-Loops und dem ATR-Signalweg in SFM und NSFM CD34⁺ hämatopoetischen Zellen von MDS-Patienten.

Genutzt wurde der Antikörper S9.6 für die Darstellung der R-Loops und ein anti-RPA2 (S33)-Antikörper zur Detektion des ATR-Weges. Es handelt sich um CD34⁺ Zellen, die aus dem KM von MDS Patienten mit und ohne SF-Mutationen isoliert wurden; Maßstab: 5µm.

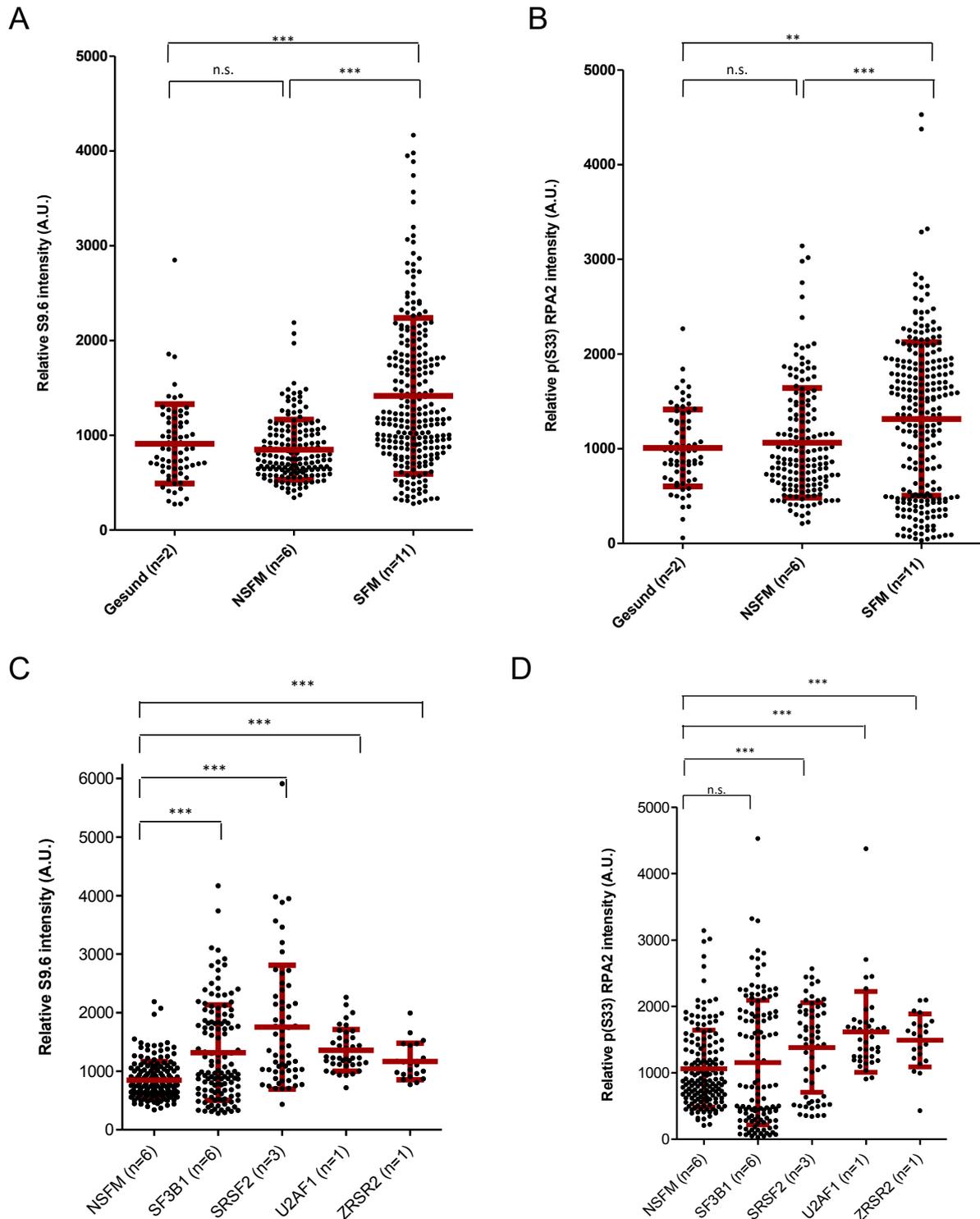


Abbildung 15: Vergleich Quantität von S9.6 (A,C) und RPA2 (S33) (B,D) bei Patienten mit und ohne SF Mutationen und Proben von „gesunden“ Älteren.

(A) Quantifizierung der mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von S9.6; n=2 (71 Zellen, Gesund), n=6 (166 Zellen, nicht SF-mutiert), n=11 (250 Zellen, SF-mutiert).
 (B) Quantifizierung der MFI von RPA2 (S33); n=2 (71 Zellen, Gesund), n=6 (163 Zellen, nicht SF-mutiert), n=11 (249 Zellen, SF-mutiert).
 (C) Quantifizierung der MFI von S9.6 in CD34⁺ Zellen aufgeteilt nach SF-Mutation; n=6 (166 Zellen, nicht SF-mutiert), n=6 (128 Zellen, SF3B1-mutiert), n=3 (61 Zellen, SRSF2-mutiert), n=1 (39 Zellen, U2AF1-mutiert), n=1 (22 Zellen, ZRSR2-mutiert)

(D) Quantifizierung der MFI von RPA2 (S33) in CD34⁺ Zellen aufgeteilt nach SF-Mutation; n=6 (166 Zellen, nicht SF-mutiert), n=6 (126 Zellen, SF3B1-mutiert), n=3 (61 Zellen, SRSF2-mutiert), n=1 (40 Zellen, U2AF1-mutiert), n=1 (22 Zellen, ZRSR2-mutiert)
Daten sind in Mittelwerten +/- Standardabweichung angegeben. ***p ≤ 0.001; n.s. = nicht signifikant

3.2.4 Veränderung der R-Loops Quantität und ATR-Signalweg-Aktivität bei CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen von MDS Patienten mit und ohne SF-Mutation

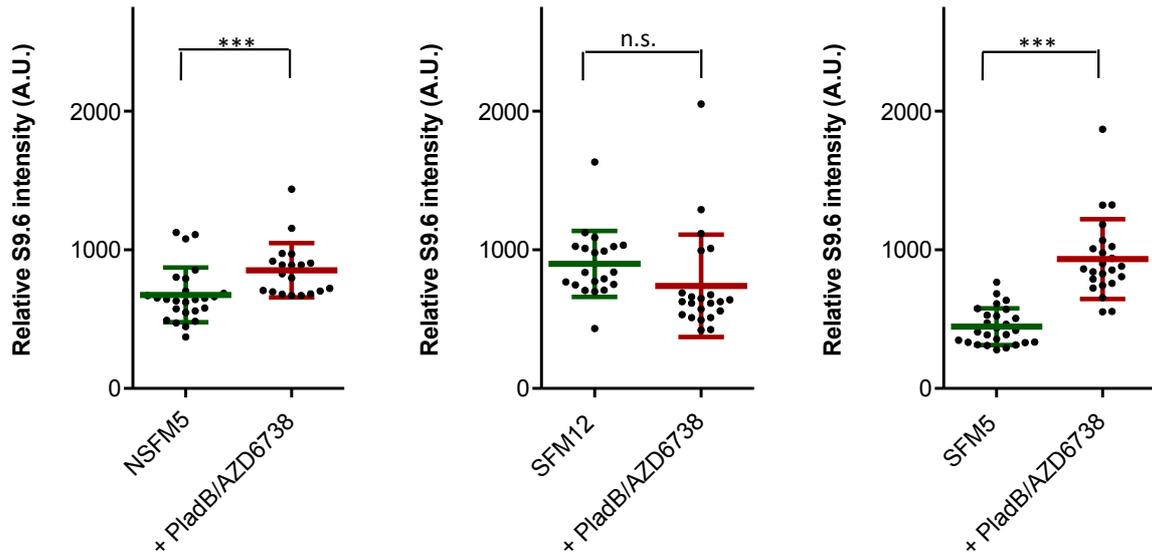
In vorherigen Versuchen an Zellen aus Zellkulturen bzw. aus Nabelschnurblut wurde gezeigt, dass die R-Loops Quantität durch die Behandlung mit PladB erhöht wird. Darauf basierend stellt sich die Frage, welchen Einfluss PladB auf die R-Loops Quantität bei Zellen von MDS-Patienten hat. Um dies genauer zu untersuchen, haben wir die Zellen von 3 Patienten vor und nach Behandlung mit Pladienolide B und AZD6738 auf R-Loops untersucht (Abb. 16).

Patient NSFM5 hat keine der vier hier relevanten SF-Mutationen. Nach der Behandlung mit PladB und AZD6738 wurde eine signifikant höhere Menge an R-Loops detektiert als zuvor. Die über RPA2 (S33)-Antikörper nachgewiesene ATR-Aktivität ist jedoch signifikant gesunken.

Patient SFM12 hat eine SRSF2-Mutation und schon vor Behandlung vergleichsmäßig hohe R-Loops Mengen. Nach der Behandlung mit PladB und AZD6738 zeigt er weniger R-Loops als zuvor, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Die RPA2 (S33)-Intensität ist signifikant gesunken.

Der hier als SFM5 bezeichnete Patient hat eine SF3B1 Mutation, zeigt aber schon vor der Behandlung relativ wenig R-Loops. Er hat von allen untersuchten Patienten – egal ob SFM oder NSFM – am wenigsten R-Loops (Abb. 30). Nach der Behandlung mit PladB und AZD6738 über 48 Stunden zeigen die Zellen signifikant höhere Mengen an R-Loops, als zuvor. Auch die RPA2 (S33)-Intensität ist nach der Behandlung signifikant erhöht.

A



B

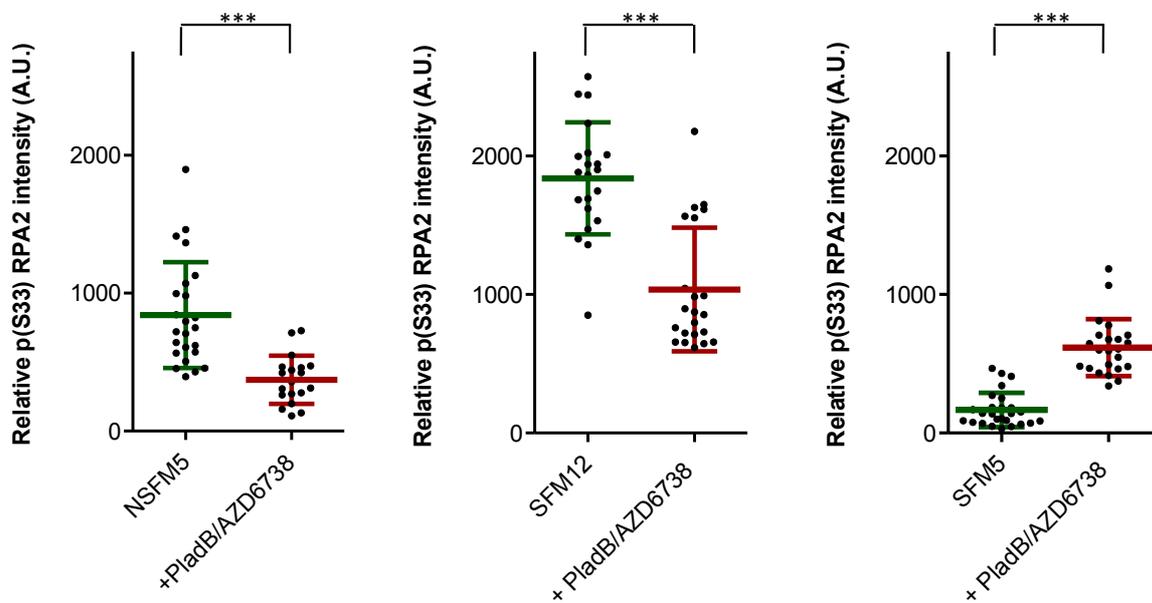


Abbildung 16: Vergleich S9.6 und RPA2 (S33) Intensitäten vor und nach Behandlung mit PladB und AZD6738 bei CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen von drei MDS-Patienten

(A) Quantifizierung der mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von S9.6; (NSFM5: 25 Zellen, +PladB/AZD6738: 19 Zellen; SFM12: 21 Zellen, +PladB/AZD6738: 22 Zellen; SFM5: 26 Zellen, +PladB/AZD6738: 23 Zellen)

(B) Quantifizierung der MFI von RPA2 (S33); (NSFM5: 24 Zellen, +PladB/AZD: 19 Zellen; SFM12: 21 Zellen, +PladB/AZD6738: 22 Zellen; SFM5: 26 Zellen, +PladB/AZD6738: 23 Zellen)

Daten sind in Mittelwerten +/- Standardabweichung angegeben. *** $p \leq 0.001$; n.s. = nicht signifikant; NSFM5 = nicht SF-mutierter Patient 5; SFM5/12 = SF-mutierter Patient 5/12

3.3 Etablierung eines *in vitro* Modells zur Untersuchung verschiedener Substanzen zur zielgerichteten Therapie des MDS

Um die optimalen Verhältnisse und Versuchsabläufe für Experimente mit CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen von MDS-Patienten zu bestimmen, haben wir zunächst Versuche an Zellkulturen durchgeführt.

Zunächst mussten die passenden Substanzen zur ATR-Inhibierung (Vergleich AZD6738, VE-821 und Bay1895344) und die Konzentrationen an AZD6738 und PladB herausgefunden werden. Außerdem wurden die besten Zeitpunkte und Methoden, um die Reaktion der Zellen auf die verschiedenen Substanzen beurteilen zu können, bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den folgenden Unterpunkten genauer beschrieben.

3.3.1 Celltiter-Glow® „cell viability assay“ als geeignete Bewertungsmethode der Lebensfähigkeit von Zellen

Der Celltiter-Glow® wertet nur die Zellen, die noch ATP produzieren, folglich also zu einem eigenen Stoffwechsel in der Lage sind. Zellen, die tot sind oder sich im Status der Seneszenz befinden, werden nicht gezählt. Somit sind Messungen mittels CTG im Vergleich zum einfachen „Zellzählen“ mittels Vi-Cell oder Neubauer-Zählkammer exakter.

3.3.2 AZD6738 als geeigneter ATR-Inhibitor für den Versuchsaufbau

Um das Ansprechen von Zellen auf verschiedene ATR-Inhibitoren zu testen, und um die geeignete Substanz für unseren Versuchsaufbau zu finden, haben wir drei verschiedene ATR-Inhibitoren getestet: AZD6738, VE-821 und BAY1895344 (Abb. 17). AZD6738 ließ sich bei unseren Versuchen am besten steuern und zeigte bei wiederholten Versuchen die konstantesten Ergebnisse und das größte therapeutische Fenster *in vitro*, sodass wir uns dazu entschieden, diese Substanz in den darauffolgenden Experimenten zu benutzen.

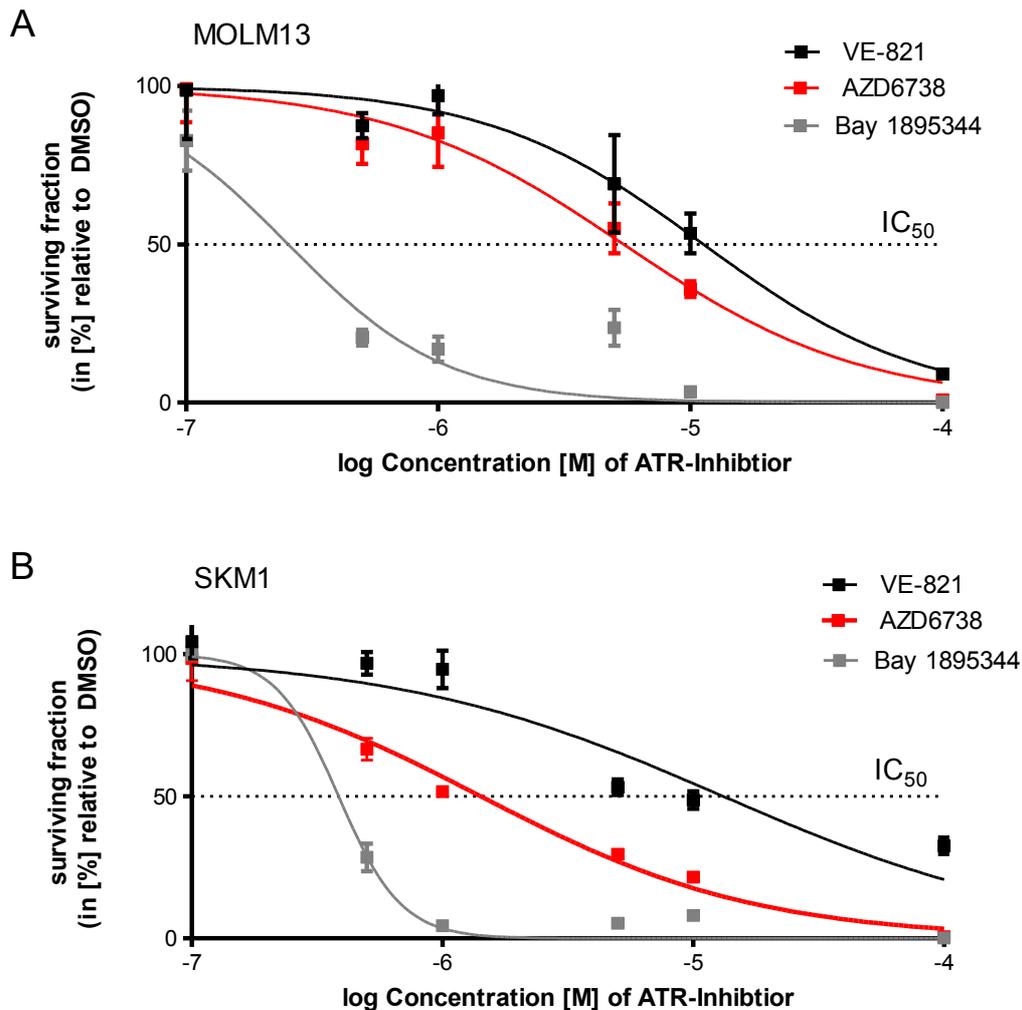


Abbildung 17: Dosis-Wirkungs-Kurven an den Zelllinien MOLM13 und SKM1 nach kontinuierlicher in vitro Behandlung mit drei verschiedenen ATR-Inhibitoren.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 72h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition in vitro bestimmt.

(A) Zellen der MOLM13-Zelllinie wurden mit den ATR-Inhibitoren AZD6738, VE-821 und Bay1895344 in 6 verschiedenen Konzentrationen (100nM, 500nM, 1µM, 5µM, 10µM, 100µM) behandelt.

(B) Zellen der SKM1-Zelllinie wurden mit den ATR-Inhibitoren AZD6738, VE-821 und Bay1895344 in 6 verschiedenen Konzentrationen (100nM, 500nM, 1µM, 5µM, 10µM, 100µM) behandelt.

3.3.3 Der Effekt von AZD6738 und PladB auf die Lebensfähigkeit von Zellen

Bei den ersten Experimenten mit AZD6738 und PladB an vier verschiedenen Zelllinien (MOLM13, HEL, HL60 und SKM1) konnten wir feststellen, dass AZD6738, wie auch PladB, einen signifikanten Effekt auf die Lebensfähigkeit von Zellen haben (Abb. 18). In den lichtmikroskopischen Aufnahmen lässt sich erkennen, dass die Zelldichte deutlich abnahm, wurden die Zellen über 48h mit PladB oder AZD6738 behandelt. Der Effekt der Substanzen auf die Lebensfähigkeit von Zellen zeigte sich beeinflussbar durch die Dosis wie auch durch die Dauer der Behandlung mit AZD6738 bzw. PladB (Abb. 19-21).

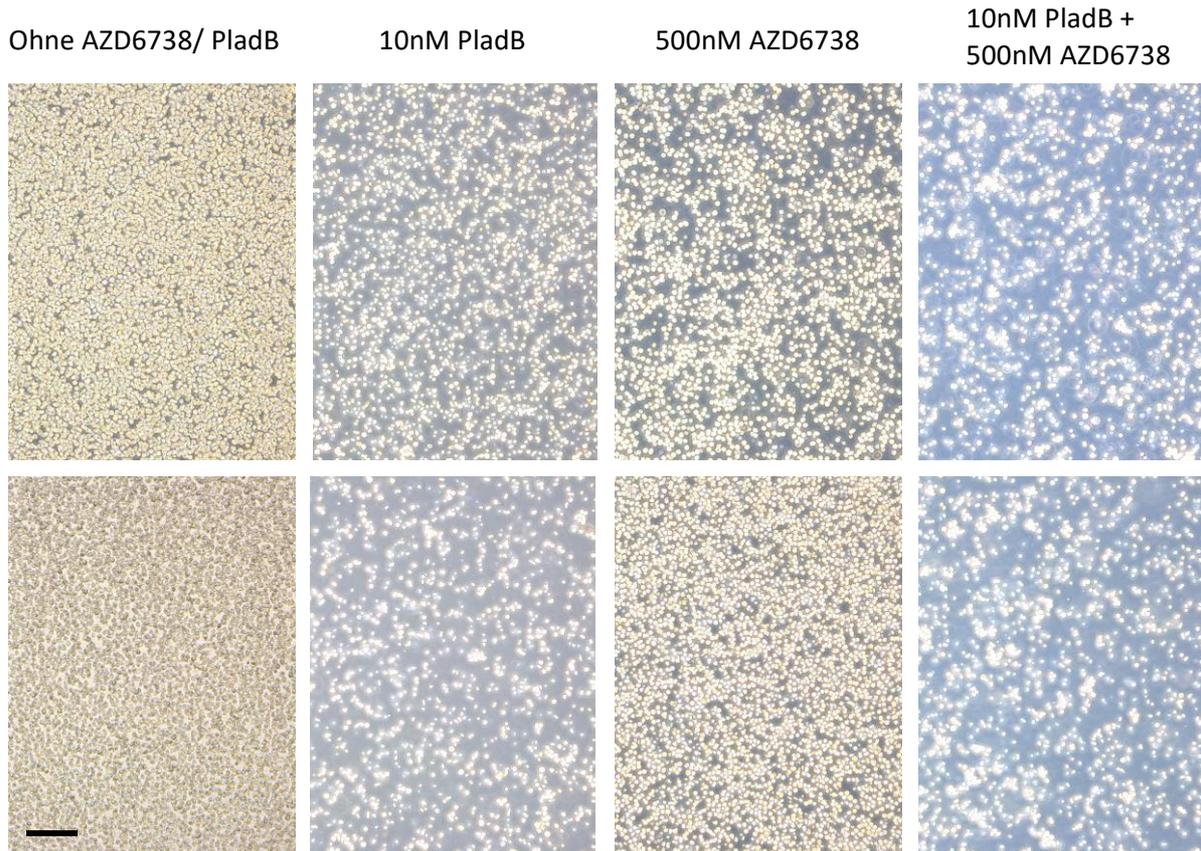


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MOLM13-Zellen 48 Stunden nach Behandlung mit PladB und/oder AZD6738

Die Aufnahmen wurden mit einem Lichtmikroskop gemacht, die Zellen befinden sich in 6-Well Platten und wurden über 48 Stunden mit 10nM PladB, 500nM AZD6738 oder einer Kombination aus beidem behandelt, Maßstab: 50µM

Ergebnisse

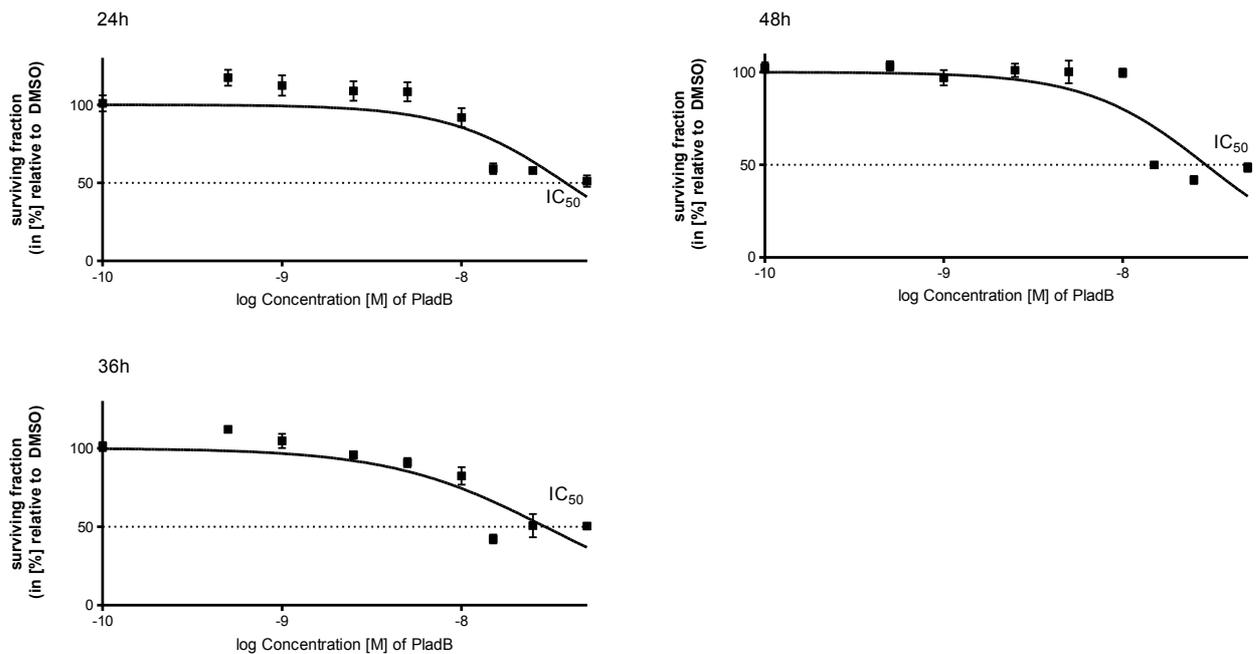


Abbildung 19: Reaktion von Zellen der HL60 Zelllinie auf PladB in den Konzentrationen 0.1nM, 0.5nM, 1nM, 2.5nM, 5nM, 10nM, 15nM, 25nM, 50nM.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 24, 36 und 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition *in vitro* bestimmt.

3.3.4 Dosisfindung von AZD6738 und PladB durch Behandlung von Zelllinien

Durch mehrere Titrierungsversuche konnten wir die passenden Konzentrationen von PladB von 0.1nM bis 50nM einschränken. AZD6738 zeigte in den Bereichen von 10nM bis 5µM die besten Effekte. Jeweils niedrigere Konzentrationen zeigten im Durchschnitt so gut wie keinen Effekt, während höhere Konzentrationen fast alle Zellen abtöteten (Abb. 20).

3.3.5 Bestimmung des richtigen Messzeitpunktes mittels CellTiter-Glo® (CTG) „cell viability assay“

Um den richtigen Messzeitpunkt herauszufinden, haben wir anfangs nach 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden einen „cell viability assay“, mittels Celltiter-Glow® durchgeführt. Bei unseren Experimenten mit Zelllinien und NSB konnten wir eruieren, dass die Messungen nach 24h und 48h am besten die Wirkung der Medikamente widerspiegeln (Abb. 20). Frühere Messungen durch den CTG „Cell Viability Assay“ zeigten noch nicht die vollständige Wirkung von AZD6738 und PladB, während es zu späteren Zeitpunkten keine Veränderungen mehr gab. Wartet man jedoch zu lange, könnte es durch Medien- und somit Nährstoffmangel zu natürlichem Sterben der Zellen kommen, was die Ergebnisse verzerren würde.

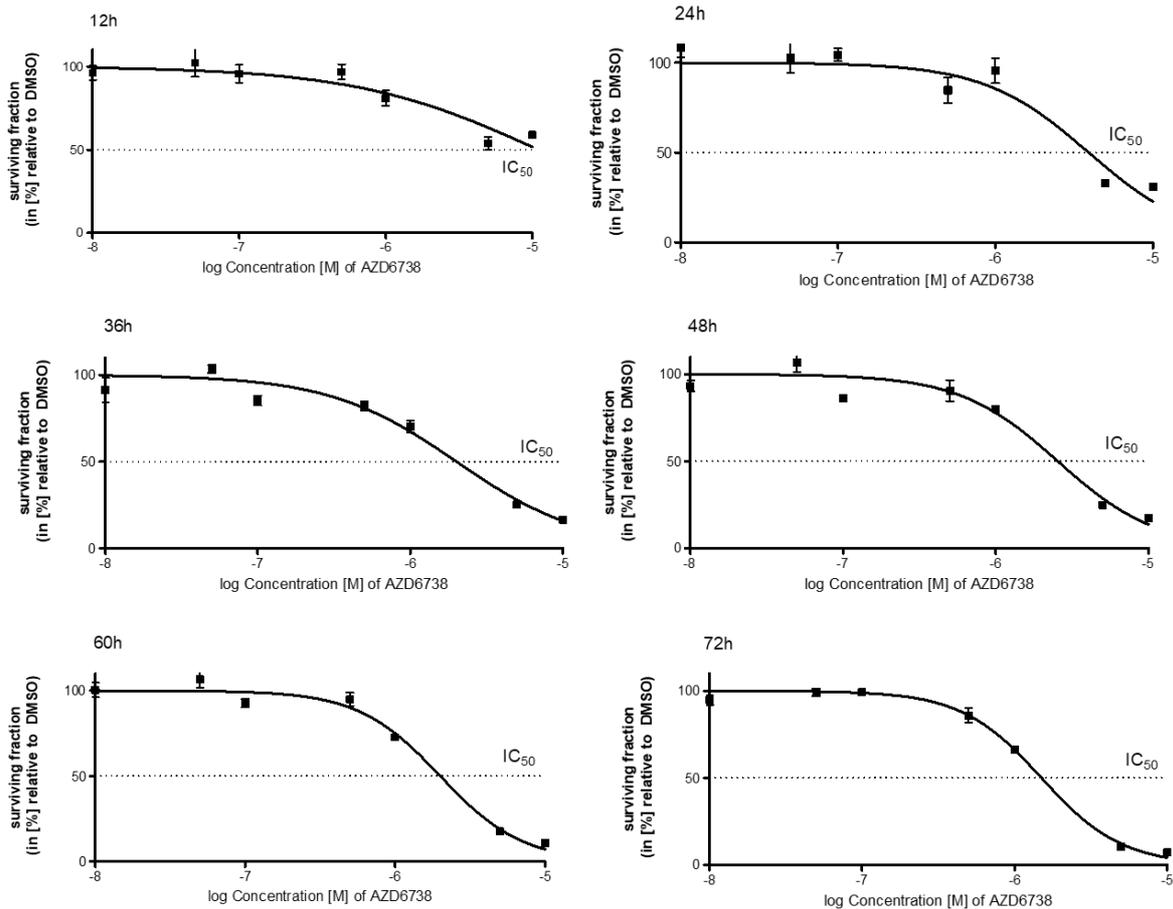


Abbildung 20: Messung der Lebensfähigkeit von Zellen der HL60 Zelllinie nach Behandlung mit AZD6738 in den Konzentrationen 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 500nM, 100nM, 50nM und 10nM zu verschiedenen Zeitpunkten.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 12, 24, 36, 48, 60 und 72h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition *in vitro* bestimmt.

3.3.6 Dosisanpassung und Versuchsoptimierung durch Behandlung von NSB mit AZD6738 und PladB

Der nächste Schritt zur Etablierung unseres Versuchsmodells wurde an CD34⁺ Zellen aus NSB durchgeführt. Diese haben den Vorteil, dass sie dem gewünschten Versuchsmodell mit CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen unserer Patientenproben am nächsten kommen. Außerdem gibt es hier genug Zellen, um Versuche zu wiederholen und verschiedene Konzentrationen zu testen, ohne wertvolle Patientenzellen zu verbrauchen. Wir konnten die Vorarbeiten mit NSB-Zellen nutzen, um unseren Versuchsaufbau mit CD34⁺ Stammzellen zu optimieren (Abb. 21,22).

Die Versuche mit NSB halfen uns dabei, einzugrenzen, welche Konzentrationen von AZD6738 und PladB wir für die Versuche mit CD34⁺ Stammzellen von Patienten brauchen. Außerdem konnten wir so herausfinden, welche Zeitpunkte für die Messungen mittels CTG für den „cell viability assay“ am sinnvollsten sind. Bei dem ersten Versuch mit NSB bemerkten wir, dass die von uns benutzten Konzentrationen an PladB eher zu stark waren (Abb. 21A). In dem darauffolgenden Versuch ließen wir die stärkste Konzentration (50nM) und fügten eine Zwischenstufe mit 12.5nM hinzu (Abb. 22A). Unsere Konzentrationen an AZD6738 zeigten sich dagegen im ersten Versuch mit

Ergebnisse

NSB zu schwach, wir fügten im nächsten Versuch die Konzentrationen 1 und $2\mu\text{M}$ hinzu (Abb. 21B, 22B).

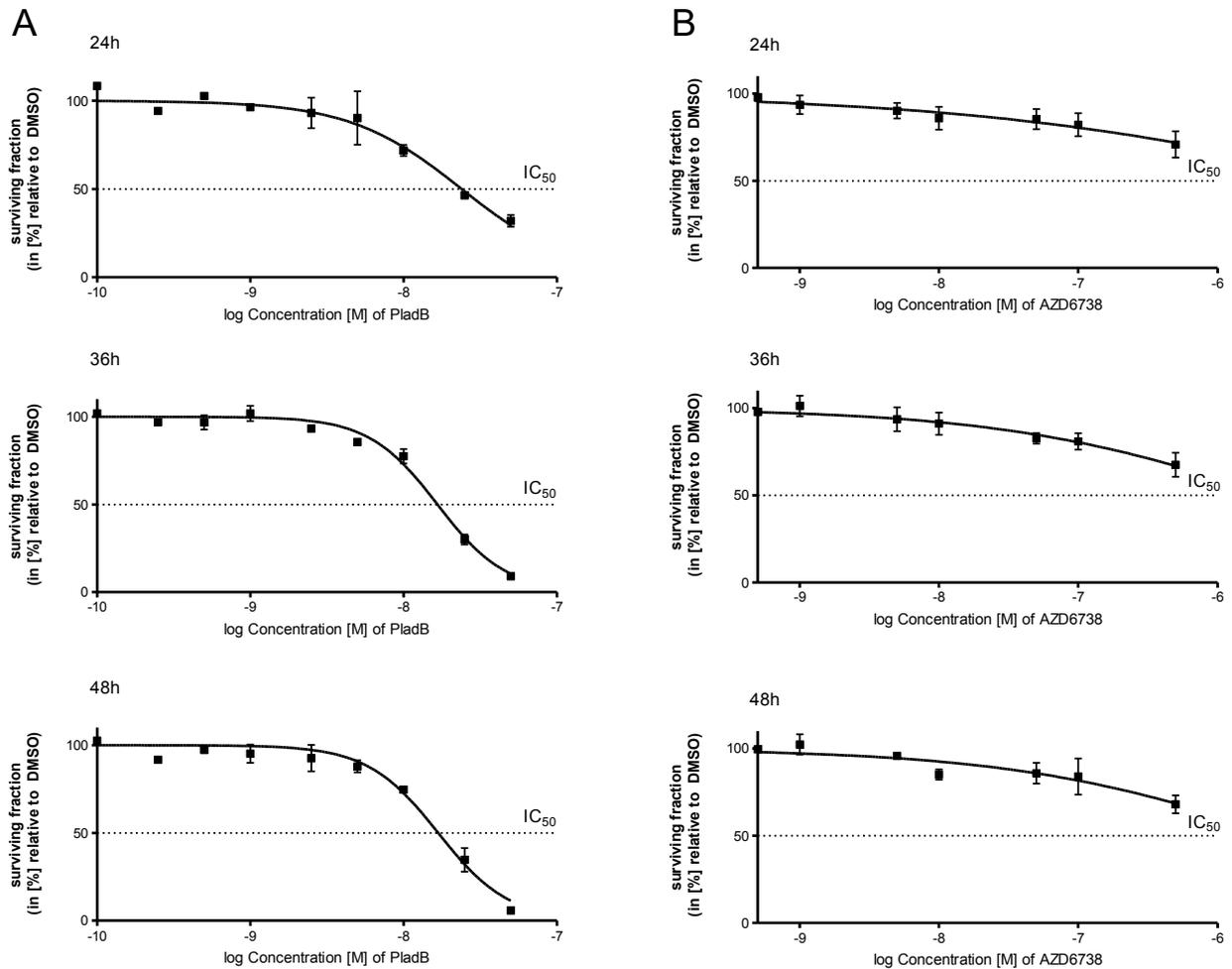


Abbildung 21: Messung der Lebensfähigkeit von CD34^+ Zellen aus Nabelschnurblut nach Behandlung mit PladB oder AZD6738.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 24, 36 und 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition *in vitro* bestimmt.

(A) Die Zellen wurden mit PladB in 9 verschiedene Konzentrationen (50nM, 25nM, 10nM, 5nM, 2.5nM, 1nM, 0.5nM, 0.25nM und 0.1nM) behandelt.

(B) Die Zellen wurden mit AZD6738 in 7 verschiedenen Konzentrationen (500nM, 100nM, 50nM, 10nM, 5nM, 1nM und 0.5nM) behandelt.

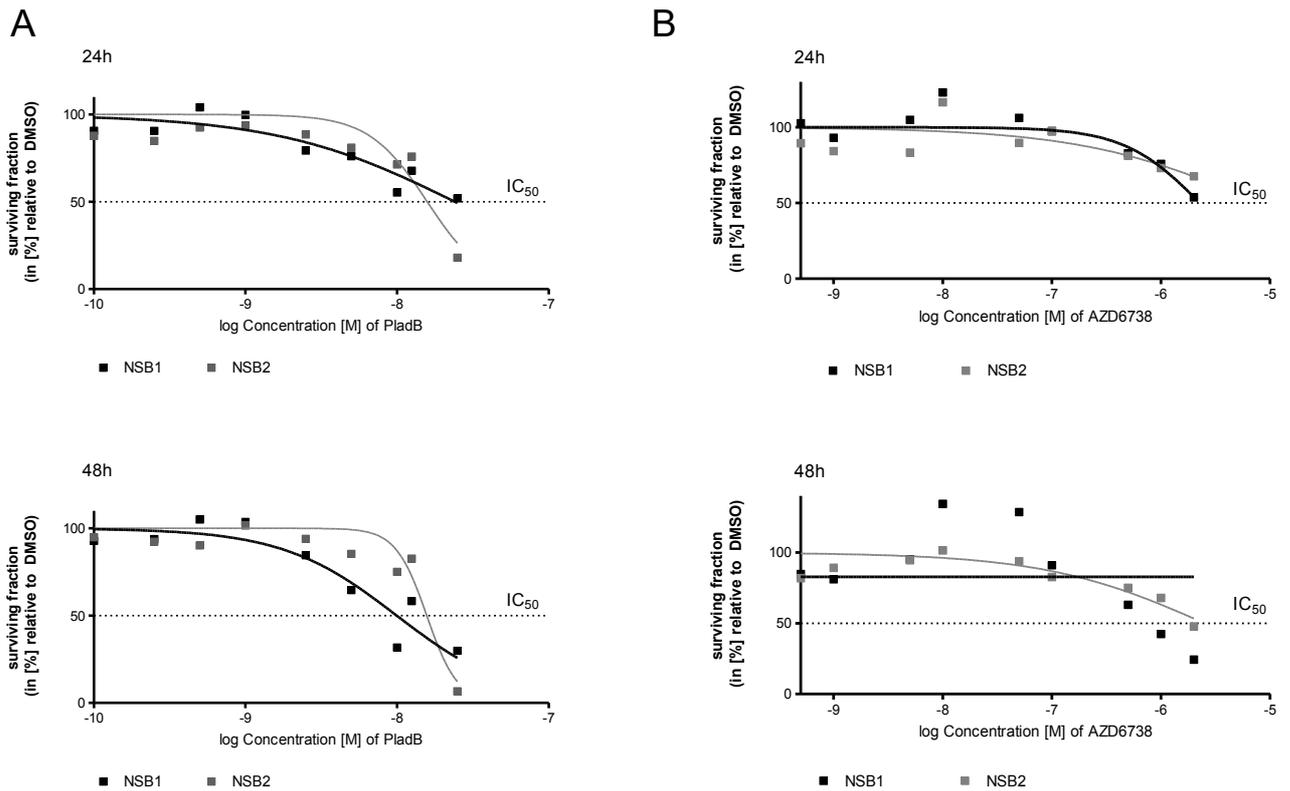


Abbildung 22: Messung der Lebensfähigkeit von CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut nach Behandlung mit PladB oder AZD6738.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 24 und 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition *in vitro* bestimmt.

(A) Die Zellen wurden mit PladB in 9 verschiedene Konzentrationen (25nM, 12.5nM, 10nM, 5nM, 2.5nM, 1nM, 0.5nM, 0.25nM und 0.1nM) behandelt.

(B) Die Zellen wurden mit AZD6738 in 9 verschiedenen Konzentrationen (2µM, 1µM, 500nM, 100nM, 50nM, 10nM, 5nM, 1nM und 0.5nM) behandelt

3.4 Übertragung des Versuchsmodells auf CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen von MDS Patienten

3.4.1 CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen des KM als geeignete Zellen für unseren Versuchsaufbau

Um zu demonstrieren, dass R-Loops vor allem in CD34⁺ Stammzellen des KM vorzufinden sind, wurden verschiedene Zellpopulationen (CD34⁺, CD34⁺CD38⁻, CD33⁺ und CD19⁺) von n=3 Patienten mit SF-Mutationen verglichen. Die Ergebnisse sind in dem folgenden Graphen abgebildet (Abb. 23). Es ist deutlich zu erkennen, dass die CD34⁺ Zellpopulation mehr R-Loops aufweist, als alle anderen untersuchten Zellpopulationen. Auf Basis dieser Ergebnisse begründen wir unsere darauffolgenden Versuche an CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen.

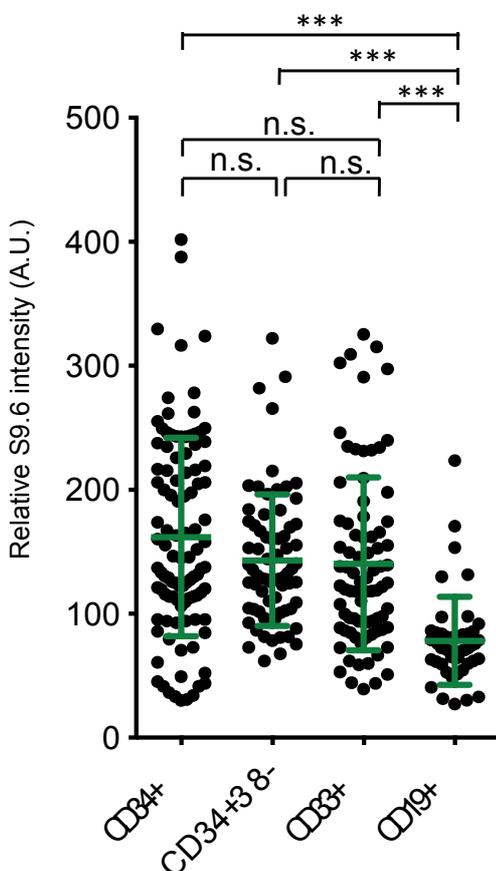


Abbildung 23: R-Loops Quantifizierung bei CD34⁺, CD34⁺CD38⁻, CD33⁺ und CD19⁺ Zellpopulationen im Vergleich.

Quantifizierung der mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von S9.6 in FACS-sortierten hämatopoetischen Subpopulationen isoliert aus KM von n=1 (SF3B1 K700) und n=2 (SRSF2 P95) Patienten (CD34⁺: 103 Zellen; CD34⁺CD38⁻: 71 Zellen; CD33⁺: 81 Zellen; CD19⁺: 47 Zellen) Daten sind in Mittelwerten +/- Standardabweichung angegeben. ***p ≤ 0.001; n.s. = nicht signifikant

3.4.2 Klinische Daten der untersuchten Patienten

Die untersuchten Patienten haben wir auf bestimmte Kriterien untersucht. Zum einen klinische Daten wie das Alter, Geschlecht und Einteilung nach Prognose-Scores. Zum anderen erfolgte eine Einteilung in Gruppen mit und ohne SF-Mutation. Bei den Patienten mit SF-Mutation ist des Weiteren zu unterscheiden, um welche der vier von uns hauptsächlich untersuchten Mutationen es sich handelt: *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* oder *ZRSR2*. Zusätzlich zu diesen Genen wurden 30 andere „common myeloid mutations“ untersucht und die Ergebnisse aufgelistet (Tabelle 7,8).

3.4.3 Sequenzierungsergebnisse

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden für jeden der 20 Patienten (Tabelle 6-8) auf eine der vier relevanten SF-Mutationen (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*) und die zusätzlichen 30 „common myeloid mutations“ (*ASXL1*, *BCOR*, *BCORL1*, *CALR*, *CBL*, *CEBPA*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *ETV6*, *EZH2*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *MPL*, *NF1*, *NPM1*, *NRAS*, *PHF6*, *PPM1D*, *PTPN11*, *RAD21*, *RUNX1*, *SETBP1*, *SMC3*, *STAG2*, *TET2*, *TP53*) überprüft.

Von den 20 Patienten wiesen 6 Patienten in der Sequenzierung keine SF-Mutation auf (Tabelle 6,7), bei 14 Patienten konnte man Mutationen der für SFen kodierenden Gene feststellen. Davon zeigten 7 Patienten eine Mutation im *SF3B1* Gen, 5 Patienten eine *SF3B1* Mutation und jeweils ein Patient zeigte eine Mutation im *U2AF1*- und *ZRSF2*-Gen (Tabelle 6,8).

Mutationen in den Genen *CALR*, *CBL*, *CEBPA*, *CSF3R*, *EZH2*, *KIT*, *KRAS*, *MPL*, *NPM1*, *NRAS*, *PHF6*, *RAD21* und *SMC3* wurden bei keinem der 20 Patienten festgestellt. Mutationen in den Genen *BCORL1*, *ETV6*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *PPM1D*, *PTPN11* und *SETBP1* ließen sich bei jeweils einem Patienten nachweisen. Genmutationen von *BCOR* und *DNMT3A* gab es bei jeweils zwei Patienten. *ASXL1*, *JAK2* und *TP53* waren bei jeweils 3 Patienten mutiert. Mutationen in den folgenden Genen kamen traten am häufigsten auf: *NF1* (4 Patienten), *RUNX1* (4 Patienten), *TET2* (5 Patienten) und *STAG2* (6 Patienten) (Tabelle 6-8).

Im Durchschnitt zeigten die Patienten mit SF-Mutationen auch mehr der anderen „common myeloid mutations“. Von den nicht SF-mutierten Patienten hatten 5 Patienten eine der anderen untersuchten Mutationen, Patient NSFM2 stellte mit zwei „cm-mutations“ eine Ausnahme dar, im Schnitt zeigten sich 1,1666 Mutationen der untersuchten Gene pro Patient. Die 14 SF-mutierten Patienten zeigten insgesamt 32 der „common myeloid“ Mutationen (3x0, 3x1, 2x2, 3x3, 1x4, 1x6, 1x8, im Schnitt 2,285 Mutationen pro Patienten).

Einige der Patienten wiesen nicht nur eine SF-Mutation auf, sondern – mit einer sehr geringen VAF – auch eine zweite. Dies lässt vermuten, dass die Mutationen sich auf verschiedenen Zellklonen befinden. Zwei SF-Mutationen auf demselben Zellklon würden durch synthetische Letalität zum Zelltod führen [10, 11].

3.4.4 Stärker Reaktionen auf PladB bei MDS Patientenzellen mit SF-Mutation im Vergleich zu Patientenzellen ohne SF-Mutationen

Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) beschreibt die Konzentration an PladenolideB/AZD6738, die nötig ist, um die Lebensfähigkeit der Zellen um 50% zu reduzieren.

Bei der Gabe von PladB in den Konzentrationen 20nM, 10nM, 5nM, 2.5nM zeigte sich, dass die CD34⁺ Zellen von Patienten mit SF-Mutationen stärker reagierten als die Zellen von Patienten, bei denen keine der genannten Mutationen nachgewiesen werden konnte. Die IC₅₀ von PladB bei SFM Zellen liegt zwischen 5nM und 10nM PladB, während die IC₅₀ von PladB bei NSF_M Zellen bei höheren Konzentrationen, nämlich zwischen 10nM und 20nM PladB liegt (Abb. 24 A,B).

Wenn man hierbei nochmal die *SF3B1* und *SRSF2* mutierten Patientenproben gesondert untersucht, zeigt sich, dass die IC₅₀ von Zellen mit *SF3B1* Mutation eher im höheren Konzentrationsbereich liegt, näher an 10nM PladB als an den 5nM (Abb. 24 C).

Bei Zellen mit *SRSF2* Mutation liegt die IC₅₀ näher an 5nM als an 10nM PladB, sie scheinen also schon auf niedrigere Konzentrationen zu reagieren und somit sensibler auf die Behandlung mit PladB zu reagieren (Abb. 24 D).

Bei Zellen des Patienten mit *U2AF1* Mutation liegt die IC₅₀ zwischen 5nM und 10nM PladB (Abb. 24 E).

Zusammenfassend kann man hier erkennen, dass die IC₅₀ bei allen SF-Mutationen außer *ZRSR2* zwischen 5 und 10nM liegt.

Die Zellen des Patienten mit *ZRSR2* Mutation stellen eine Ausnahme dar, sie reagieren nur sehr leicht auf die Behandlung mit PladB und die IC₅₀ wird hier erst bei einer Konzentration von mehr als 10nM PladB erreicht (Abb. 24 F).

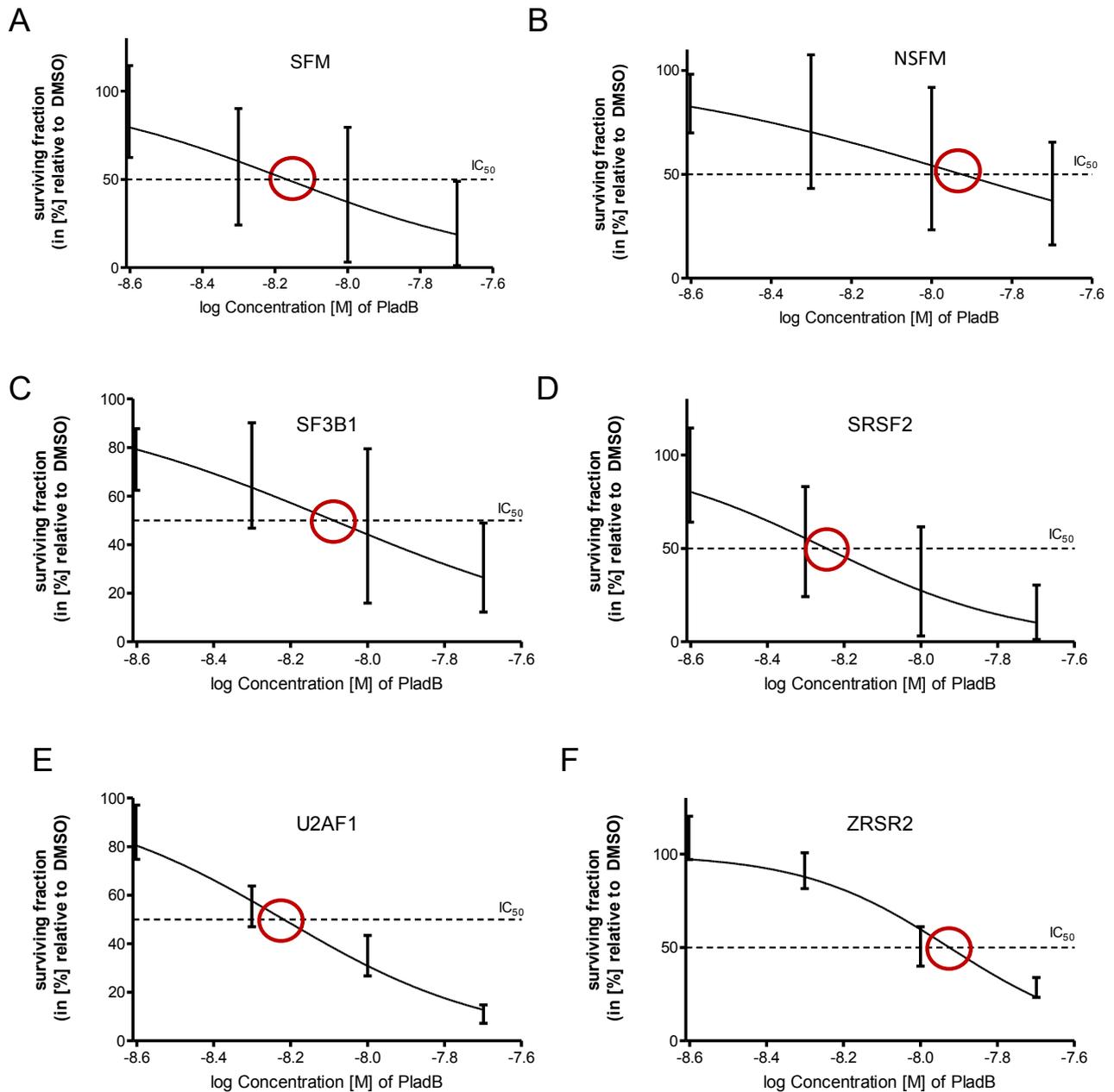


Abbildung 24: Reaktion von SF-mutierten und nicht mutierten CD34+ Zellen auf Pladienolide B in den Konzentrationen 2.5nM, 5nM, 10nM und 20nM.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition *in vitro* bestimmt.

- A) Reaktion von SF-mutierten Zellen auf die Behandlung mit PladB.
- B) Reaktion von nicht SF-mutierten Zellen auf die Behandlung mit PladB.
- C) Reaktion von SF3B1-mutierten Zellen auf die Behandlung mit PladB.
- D) Reaktion von SRSF2-mutierten Zellen auf die Behandlung mit PladB.
- E) Reaktion von U2AF1-mutierten Zellen auf die Behandlung mit PladB.
- F) Reaktion von ZRSR2-mutierten Zellen auf die Behandlung mit PladB.

3.4.5 Stärkere Reaktionen auf AZD6738 bei MDS Patientenzellen mit SF-Mutation im Vergleich zu Patientenzellen ohne SF-Mutationen

Bei der Gabe von AZD6738 in den Konzentrationen 2 μ M, 1 μ M, 500nM, 50nM zeigte sich, dass die CD34⁺ Zellen von Patienten mit SF-Mutationen stärker reagierten als die Zellen von Patienten, bei denen keine der genannten Mutationen nachgewiesen werden konnte. Die IC₅₀ von AZD6738 wird bei SFM Zellen bei Konzentrationen um 500nM AZD6738 erreicht, während sie bei NSFM Zellen bei 1 μ M lag (Abb. 25A,B)

3.4.6 Unterschiedlich stark ausgeprägte Reaktionen auf AZD6738 je nach SF-Mutation

Verglichen wir hier die einzelnen Mutationen miteinander, stellten wir fest, dass die IC₅₀ bei *SRSF2* Mutationen im Vergleich zu *SF3B1* Mutationen bei einer etwas niedrigeren Konzentration an AZD6738 lag (Abb. 25C,D). *SRSF2*-mutierte Zellen schienen besonders sensibel auf AZD6738 zu reagieren.

U2AF1 mutierte Zellen zeigten sich noch sensibler auf AZD6738, die IC₅₀ lag hier knapp unter 500nM (Abb. 25E).

Die Zellen des Patienten mit *ZRSR2* Mutation stellten eine Ausnahme dar, sie reagierten nur sehr schwach auf die Behandlung mit AZD6738, die IC₅₀ wurde hier erst bei einer Konzentration von fast 2 μ M erreicht (Abb. 25F).

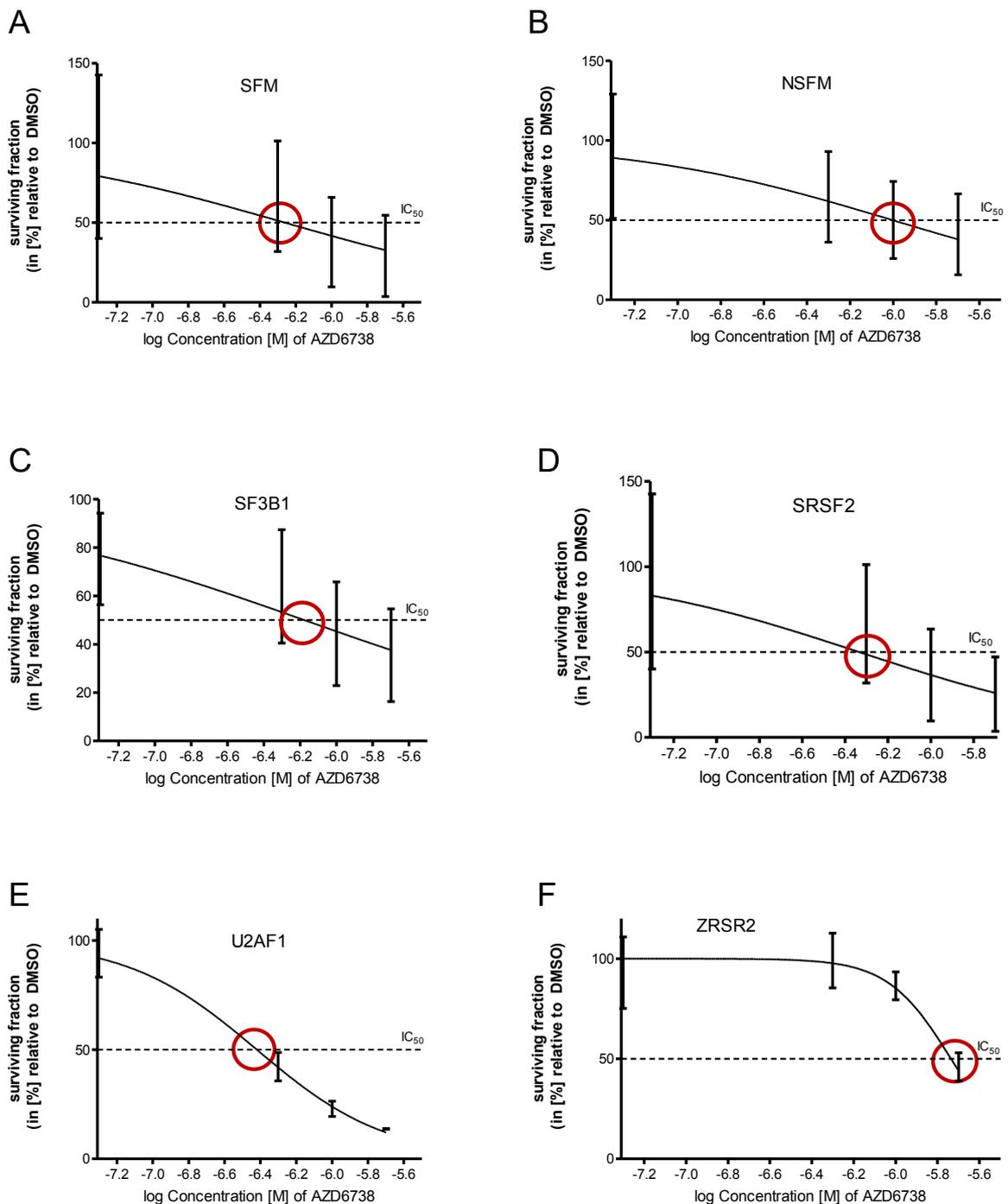


Abbildung 25: Reaktion von SF-mutierten und nicht mutierten CD34+ Zellen auf AZD6738 in den Konzentrationen 100nM, 500nM, 1µM und 2µM.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition *in vitro* bestimmt.

- A) Reaktion von SF-mutierten Zellen auf die Behandlung mit AZD6738.
- B) Reaktion von nicht SF-mutierten Zellen auf die Behandlung mit AZD6738.
- C) Reaktion von SF3B1-mutierten Zellen auf die Behandlung mit AZD6738.
- D) Reaktion von SRSF2-mutierten Zellen auf die Behandlung mit AZD6738.
- E) Reaktion von U2AF1-mutierten Zellen auf die Behandlung mit AZD6738.
- F) Reaktion von ZRSR2-mutierten Zellen auf die Behandlung mit AZD6738.

3.4.7 Vergleich verschiedener Konzentrationen von AZD6738 und PladB wie auch deren Kombination auf CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen

48h nach der Gabe von PladB und AZD6738 in verschiedenen Konzentrationen auf CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen zeigte sich, dass die Zellen bei schwachen Konzentrationen (Abb. 26A) so gut wie gar nicht auf die Behandlung reagierten. Die Behandlung mit 5nM PladB und 500nM AZD6738 zeigte die gewünschte Wirkung (Abb. 26B). Eine Substanz alleine senkte zwar die Überlebensfähigkeit der Zellen, aber erst beide Substanzen zusammen erreichten eine Verminderung der Lebensfähigkeit der Zellen um mehr als 50%. Die stärksten Konzentrationen waren mit 10/20nM PladB und 1/2µM AZD6738 teilweise zu stark und töteten mehr Zellen ab, als gewünscht war (Abb. 26C,D).

3.4.8 Schwächere Reaktion von CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen mit ZRSR2-Mutation auf PladB und AZD6738 als Patienten mit anderen SF-Mutationen

Um die Reaktion des ZRSR2 mutierten Patienten genauer zu analysieren, wurden hier alle Reaktionen der Zellen auf die vier verschiedenen Konzentrationen von PladB und AZD6738 und deren Kombinationen graphisch dargestellt. Die Gabe der Substanzen in den Konzentrationen 2.5nM und 5nM PladB und 50nM und 500nM AZD6738 löste nur eine kaum merkliche Reaktion aus, selbst mit der drittstärksten Konzentration (10nM PladB, 1µM AZD6738) wurde die IC₅₀ noch nicht erreicht. Erst ab den Konzentrationen 20nM PladB und 2µM AZD6738 wurde eine sichtbare Reaktion auf die Behandlung erreicht (Abb. 27).

3.4.9 Kombinatorischer Effekt von AZD6738 und PladB auf CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen Zellen mit und ohne SF-Mutationen

Bei der Behandlung von CD34⁺ Zellen entweder einzeln mit PladB und AZD6738 oder in Kombination zeigte sich ein Unterschied zwischen Patienten mit und ohne SF-Mutationen (Abb. 28). Zellen von Patienten, bei denen eine Mutation der Gene *SRSF2*, *SF3B1* oder *U2AF1* festgestellt wurde, reagierten stärker auf die Behandlung als Patienten, bei denen o.g. Mutationen nicht festgestellt wurden. Am eindeutigsten zeigte sich ein Unterschied bei den Konzentration 500nM AZD6738 und 5nM PladB. Es zeigt sich in den Einzeldosen wie auch in den Kombinationen die Tendenz, dass die SF-mutierten Zellen stärker reagieren (Abb. 28B).

Vergleicht man nur *SRSF2* (n=5) bzw. nur *SF3B1* (n=7) mutierte Patienten mit NSFM Zellen zeigt sich ebenfalls die Tendenz, dass die jeweiligen SF-mutierten Zellen stärker reagieren (Abb. 29).

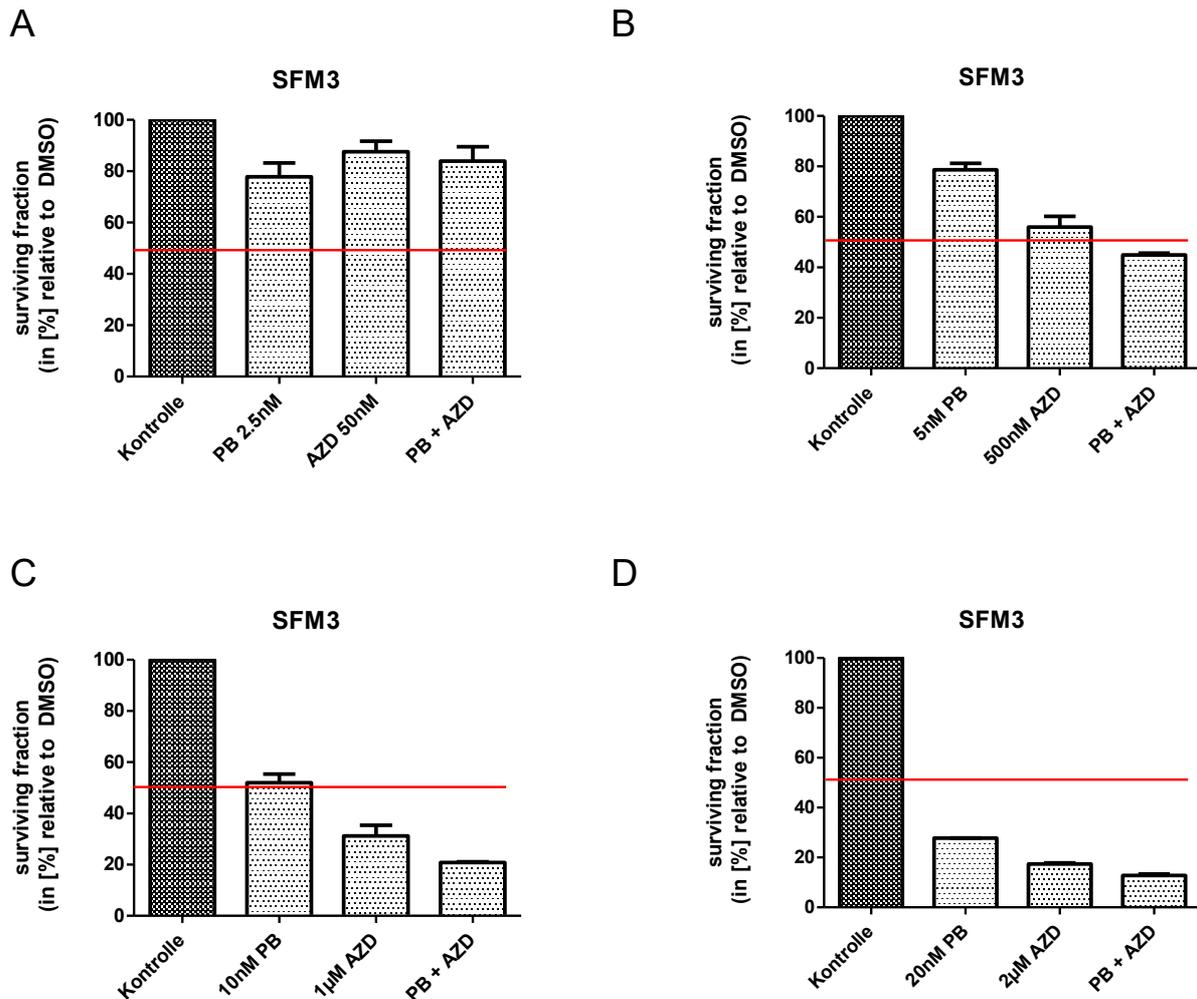


Abbildung 26: Reaktion eines SF3B1-mutierten Patienten auf AZD6738 und PladB in vier verschiedenen Konzentrationen, einzeln und in Kombination.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition *in vitro* bestimmt.

A) Die Zellen wurden mit 50nM AZD6738 und 2,5nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt.

B) Die Zellen wurden mit 500nM AZD6738 und 2,5nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt.

C) Die Zellen wurden mit 1µM AZD6738 und 10nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt.

D) Die Zellen wurden mit 2µM AZD6738 und 20nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt.

SFM3: SF-mutierter Patient Nr. 3, rote Linie: 50% Lebensfähigkeit

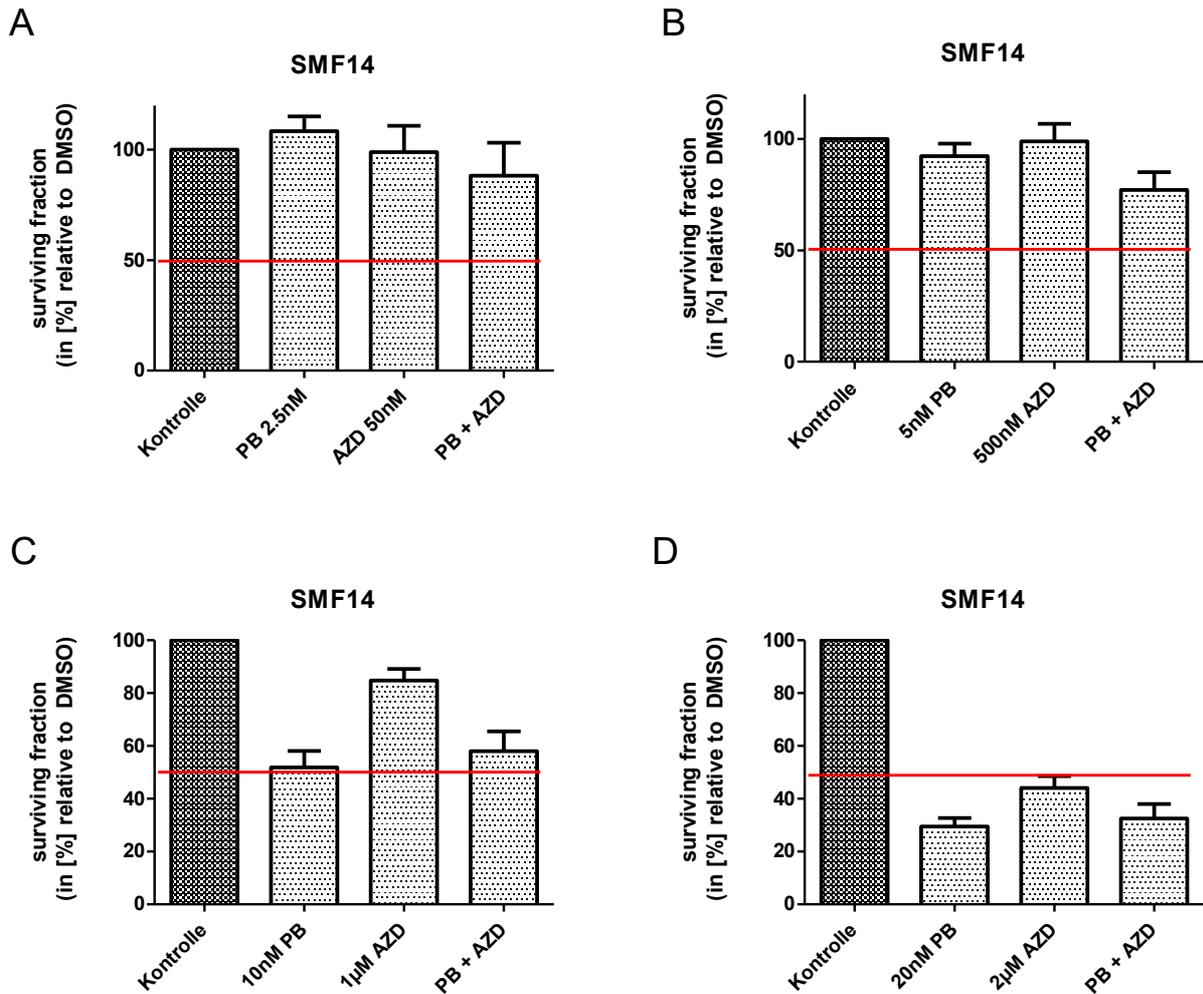


Abbildung 27: Reaktion eines ZRSR2-mutierten Patienten auf AZD6738 und PladB in vier verschiedenen Konzentrationen, einzeln und in Kombination.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition *in vitro* bestimmt.

A) Die Zellen wurden mit 50nM AZD6738 und 2,5nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt.

B) Die Zellen wurden mit 500nM AZD6738 und 2,5nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt.

C) Die Zellen wurden mit 1µM AZD6738 und 10nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt.

D) Die Zellen wurden mit 2µM AZD6738 und 20nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt.

SFM14: SF-mutierter Patient Nr. 14, rote Linie: 50% Lebensfähigkeit

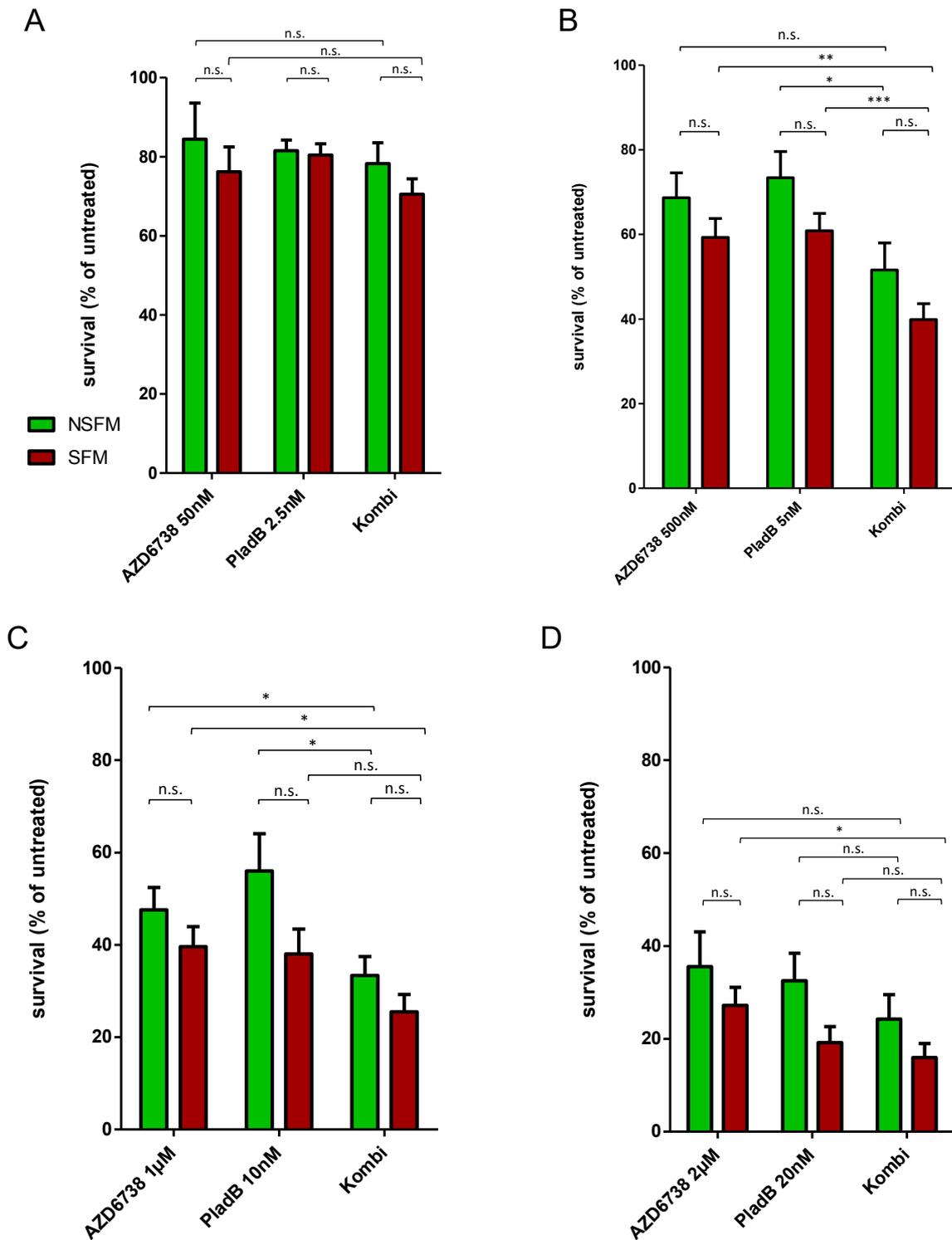


Abbildung 28: Vergleich der Reaktion von SF-mutierten und nicht SF-mutierten Zellen auf AZD6738 und PladB einzeln und in Kombination.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition *in vitro* bestimmt. Die Zellen wurden mit 50nM, 500nM, 1µM und 2µM AZD6738, 2.5nM, 5nM, 10nM und 20nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt.; n=6 (NSFM Patienten), n=13 (SFM Patienten)

Die Daten sind in Mittelwerten +/- Standardabweichung angegeben.

*p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; n.s. = nicht signifikant.

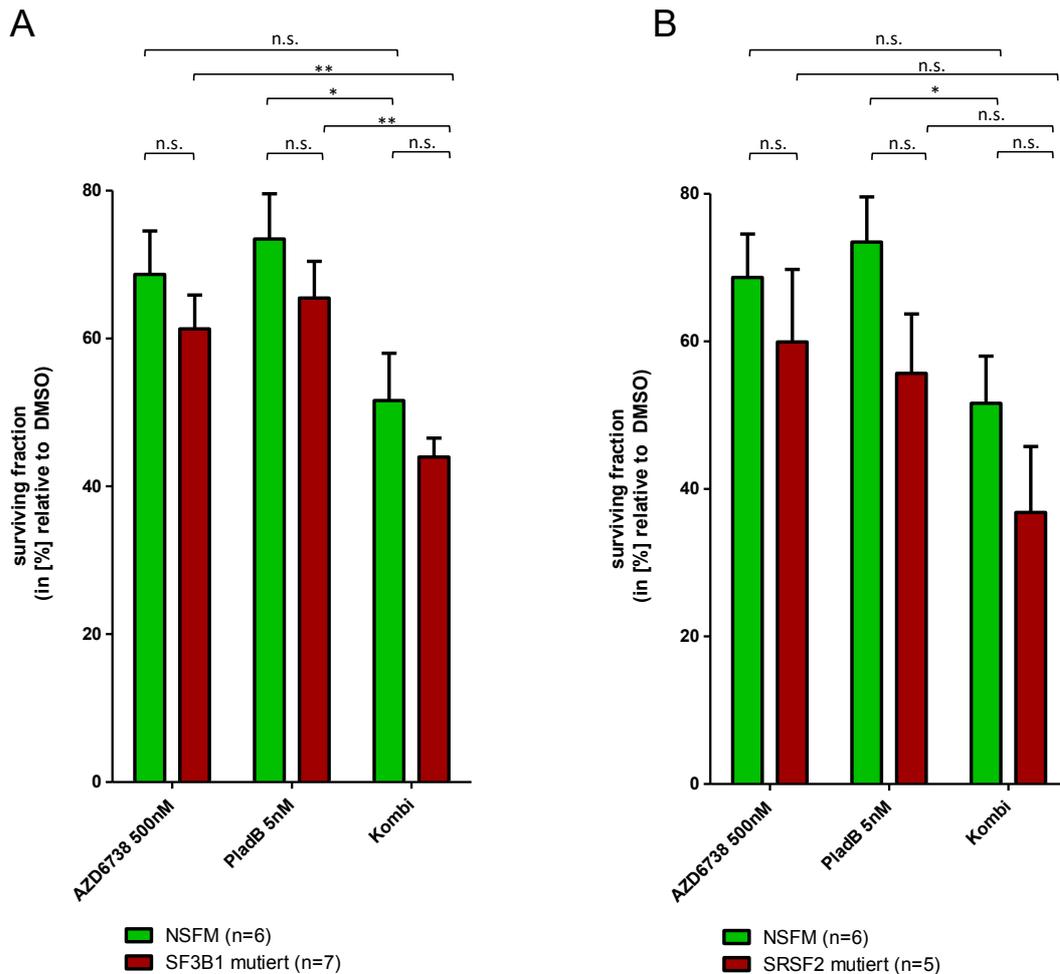


Abbildung 29: Vergleich der Reaktion von SFRB1- und SRSF2- mutierten Zellen auf AZD6738 und PladB einzeln und in Kombination.

(A) Die Zellen wurden mit 500nM AZD6738, 5nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition in vitro bestimmt; n=6 (nicht SF-mutierte Patienten), n=7 (SF3B1 mutierte Patienten)

(C) Die Zellen wurden mit 500nM AZD6738, 5nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition in vitro bestimmt; n=6 (nicht SF-mutierte Patienten), n=5 (SRSF2-mutierte Patienten)

Die Daten sind in Mittelwerten +/- Standardabweichung angegeben.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; n.s.= nicht signifikant.

3.5 Einfluss von TP53-Mutationen auf die Zell-Sensibilität auf AZD6738

TP53 ist ein Tumorsuppressorgen, das nachweislich Anteil an der DNA-Schaden-Antwort nimmt. Um den Einfluss durch TP53-Mutationen auf unseren Therapieansatz nachvollziehen zu können, wurden mutierte wie auch nicht mutierte Patientenproben auf ihren TP53-Mutationsstatus hin untersucht und miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass allgemein die SF-mutierten Zellen stärker auf die Behandlung mit AZD6738 reagierten, der Patient mit SF-Mutation und TP53-Mutationen jedoch etwas weniger sensitiv auf die Behandlung zu reagieren schien, als Zellen anderer Patientenproben. Unter den NSFM Proben, die alle weniger sensibel auf die Behandlung mit AZD6738 reagierten, als die SF-mutierte Fraktion, konnte man den gleichen Effekt beobachten. Auch hier zeigten sich die Zellen der TP53-mutierten Patienten resistenter gegenüber der Behandlung mit AZD6738 und es brauchte stärkere Konzentrationen, um den gleichen Effekt zu erzeugen (Abb. 30). Hierbei ist zu beachten, dass stärkere Konzentrationen wiederum auch gesunde Zellen abtöten und somit nicht mehr in unserem für gut befunden Konzentrationsbereich liegen.

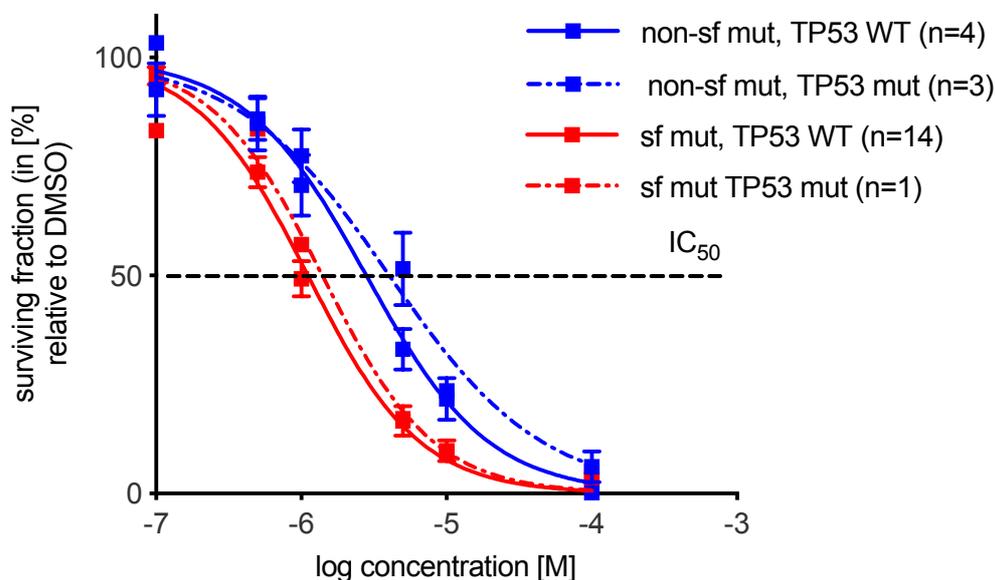


Abbildung 30: Einfluss von TP53 auf den zytotoxischen Effekt von AZD6738 bei SFM und NSFM Zellen

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition mit AZD6738 *in vitro* bestimmt.

3.6 Korrelation zwischen detektierter R-Loops Menge und Zell-Sensibilität auf AZD6738 und PladB

Um die Korrelation der R-Loops Menge mit vorhanden Mutationen darzustellen und auch nach den verschiedenen Mutationen aufzuteilen, haben wir die Intensität der R-Loops der einzelnen Patientenproben der Stärke nach aufgereiht (Abb. 31).

CD34⁺ Stammzellen, bei denen die meisten R-Loops detektiert wurden, stammen von Patienten mit SF-Mutation, wohingegen die Zellen mit den wenigsten R-Loops von Patienten ohne SF-Mutation stammen. Es zeigten sich zwei „Ausreißer“, durch die sich die nach R-Loops-Quantität aufgelisteten Patienten nicht ganz in zwei Hälften teilen lassen (Abb. 32).

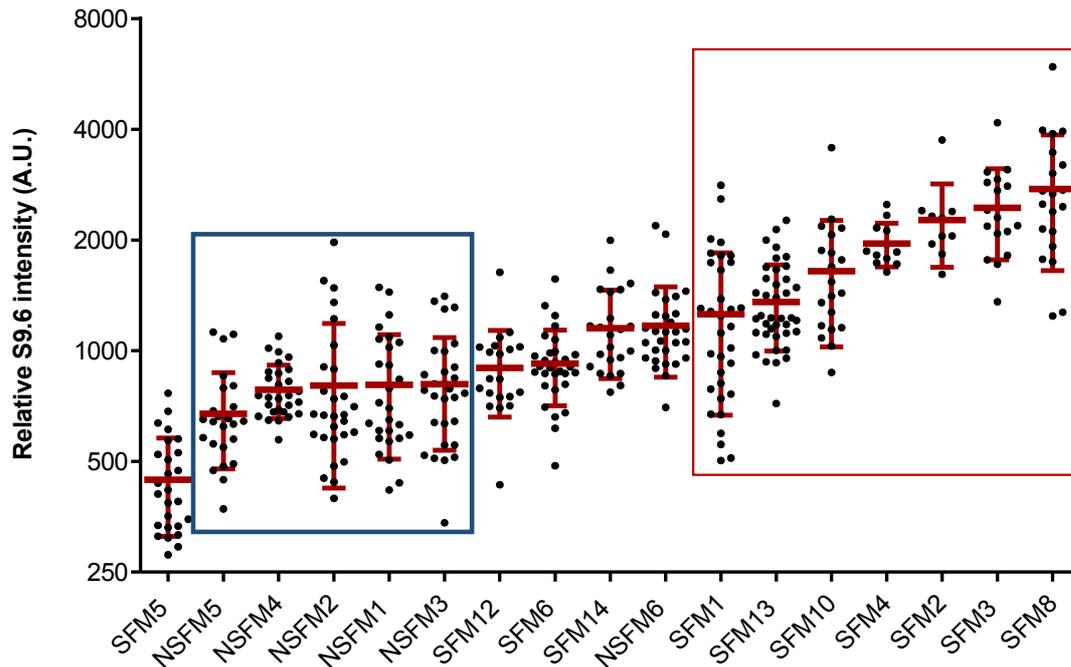


Abbildung 31: Vergleich R-Loops (S9.6) Quantität der 20 untersuchten Patientenproben, aufgereiht nach Mittelwert.

Blauer Kasten: nicht SF-mutierte Patienten am „unteren Ende“, also den niedrigeren S9.6 Intensitäten. Roter Kasten: SF-mutierte Patienten am „oberen Ende“, also den höchsten S9.6 Intensitäten.

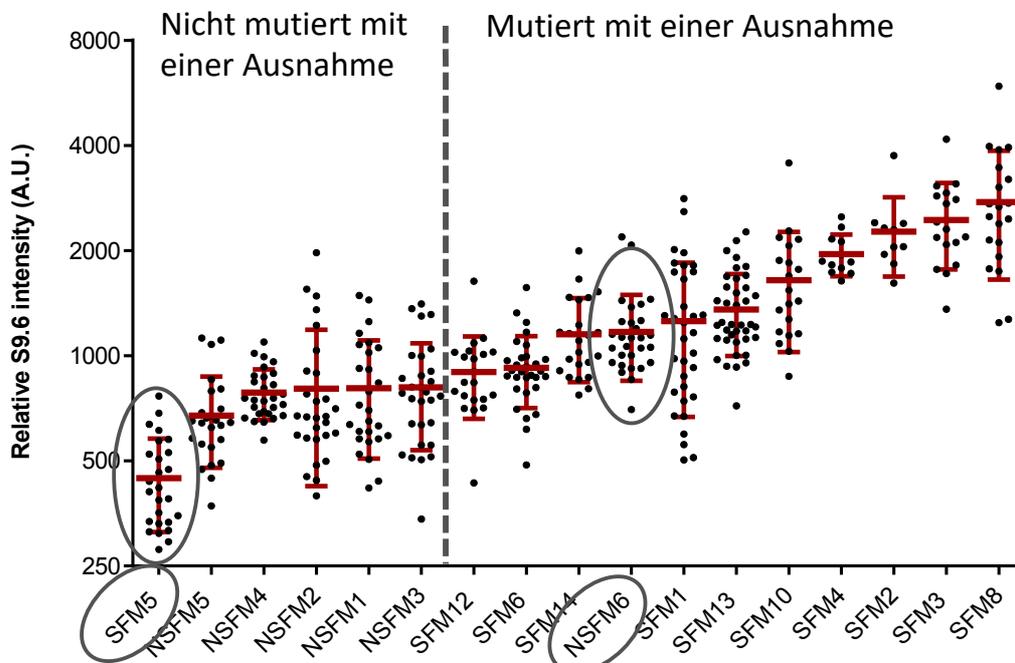


Abbildung 32: Vergleich R-Loops (S9.6) Quantität der 20 untersuchten Patientenproben, aufgereiht nach Mittelwert.

Eingekreist: „Ausreißer“, die die Aufteilung der Patienten nach Aufreihung der R-Loops Quantität in zwei Gruppen (nicht mutiert vs. mutiert) nicht möglich machen.

3.6.1 Erhöhte R-Loops führen zu verstärkter Reaktion auf AZD6738 und PladB

Basierend auf den Daten aus unseren Zelllinien- und NSB-Experimenten stellt sich die Frage, ob erhöhte R-Loops Mengen bei SF-mutierten Zellen, isoliert aus KM von MDS Patienten, eine „Angriffsfläche“ für Spleiß-Modulatoren wie PladB und/oder ATR-Inhibitoren wie AZD6738 darstellen. Eine Übersicht über die klinischen Daten der MDS Patienten ist in Tabelle 6 dargestellt.

Um nun den Zusammenhang zwischen hohen R-Loops Werten mit der Zellsensitivität auf AZD6738 und PladB darzustellen, haben wir die Patienten in zwei Hälften geteilt: die Proben mit mehr R-Loops im Vergleich zur Hälfte mit weniger R-Loops: es zeigte sich, dass Zellen, die mehr R-Loops aufwiesen, auch stärker auf die Medikamente reagierten, als die Hälfte mit weniger R-Loops.

Die Patienten haben wir nach zwei unterschiedlichen Prinzipien aufgeteilt.

Zum ersten in zwei Hälften nach Median (9 Patienten mit weniger R-Loops, Median eingeschlossen, 8 Patienten mit mehr R-Loops als der Median, Abb. 33A). Diese Patienten wurden dann auf ihre Reaktion hinsichtlich der Behandlung mit AZD6738 und PladB verglichen. Es zeigte sich, dass die Patientenhälfte mit weniger R-Loops schwächer auf AZD6738, PladB wie auch deren Kombination reagierte, als die Patientenhälfte, die eine höhere Quantität an R-Loops aufwies (Abb. 33B). Es lässt sich somit ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an R-Loops und der Zellsensibilität auf die von uns getesteten Substanzen nachweisen. Besonders die Reaktion auf AZD6738 weist einen signifikanten Unterschied auf.

Als zweites haben wir die Patienten nach Mittelwert aufgeteilt. Eine Gruppe mit R-Loops niedriger als der Mittelwert aller von uns untersuchten Patientenproben (n=13) und eine Gruppe mit höheren R-Loops Werten als der Durchschnitt (n=5) (Abb. 34A). Auch diese Patienten wurden auf ihre Reaktion hinsichtlich der Behandlung mit AZD6738 und PladB verglichen. Es zeigten sich ähnlich zu der ersten Aufteilung signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Abb. 34B). Die Patientengruppe mit überdurchschnittlichen R-Loops-Mengen zeigte ein höheres Ansprechen auf die Behandlung mit AZD6738 und PladB als die Patienten mit weniger R-Loops als der Mittelwert.

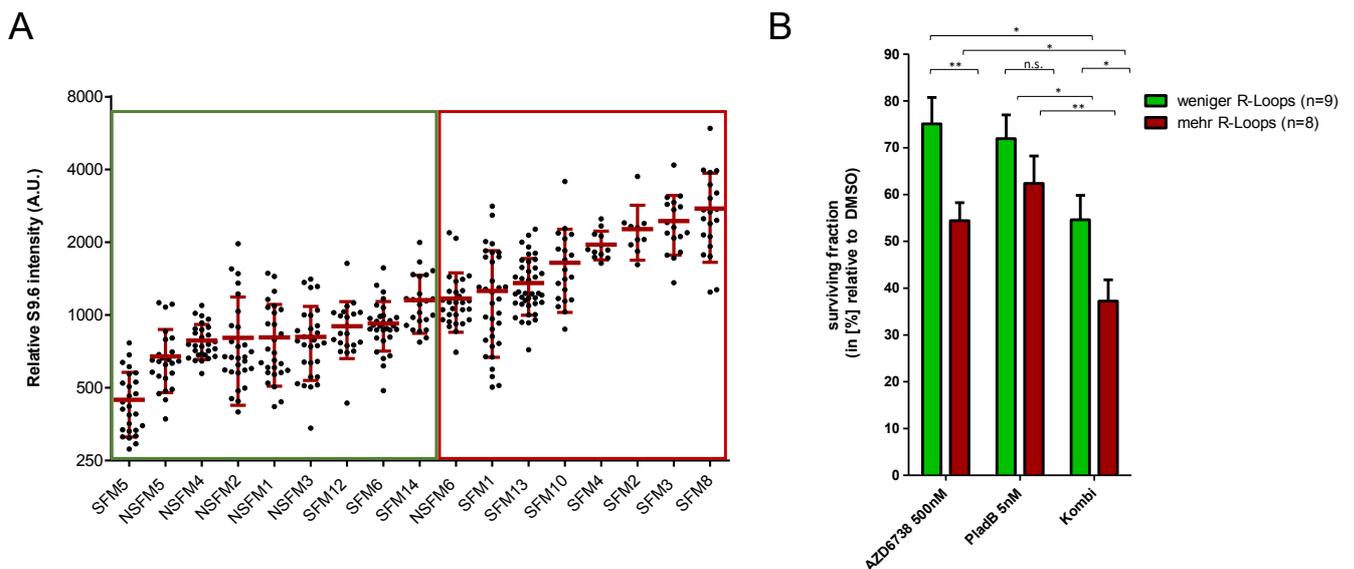


Abbildung 33: Zusammenhang zwischen R-Loops Quantität und Sensibilität auf PladB und AZD6738, Aufteilung in zwei Gruppen nach Mittelwert.

(A) Vergleich R-Loops (S9.6) Quantität der 20 untersuchten Patientenproben, aufgereiht nach Mittelwert. Grüner Kasten: Patientenhälfte mit weniger R-Loops, Roter Kasten: Patienten mit mehr R-Loops

(B) Vergleich der in (A) in zwei Gruppen unterteilter Patienten nach Reaktion auf AZD6738, PladB wie auch auf die Kombination beider Substanzen.

Die Zellen wurden mit 500nM AZD6738, 5nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition in vitro bestimmt; n=9 (Patientenhälfte mit weniger R-Loops), n=9 (Patientenhälfte mit mehr R-Loops)

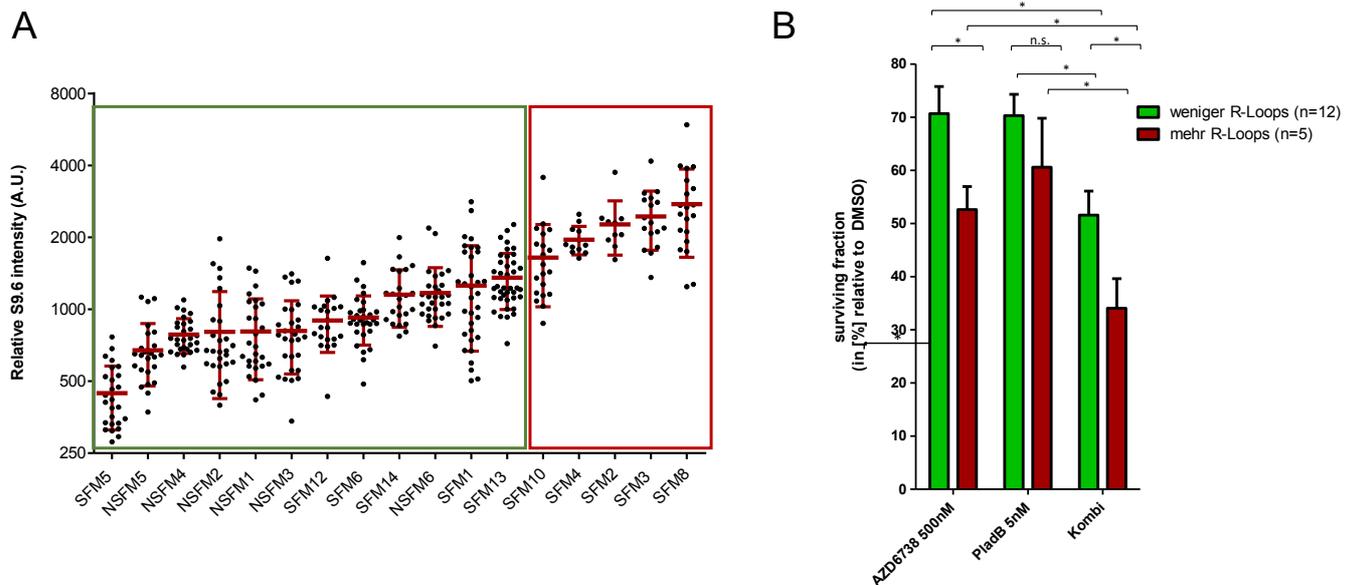


Abbildung 34: Zusammenhang zwischen R-Loops Quantität und Sensibilität auf PladB und AZD6738, Aufteilung in zwei Gruppen nach Median.

(A) Vergleich R-Loops (S9.6) Quantität der 20 untersuchten Patientenproben, aufgereiht nach Mittelwert und aufgeteilt nach Mittelwert der R-Loops im Durchschnitt. Grüner Kasten: Patienten mit weniger R-Loops als der Durchschnitt aller untersuchten Patienten.

Roter Kasten: Patienten mit mehr R-Loops als der Durchschnitt aller untersuchten Patienten.

(B) Vergleich der in (A) in zwei Gruppen unterteilter Patienten nach Reaktion auf AZD6738, PladB wie auch auf die Kombination beider Substanzen.

Die Zellen wurden mit 500nM AZD6738, 5nM Pladienolide B oder einer Kombination von beidem behandelt. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit CellTiter-Glo® 48h nach kontinuierlicher Medikamentenexposition in vitro bestimmt; n=13 (Patientenhälfte mit weniger R-Loops als Mittelwert), n=5 (Patientenhälfte mit mehr R-Loops als Mittelwert)

Tabelle 6: Klinische Daten der Patienten

| Patient | Geschlecht | Alter | WHO | IPSS | IPSS-R | Karyotyp | SF - Mutation | VAF SF- Mutation | andere Mutationen (VAF) |
|---------|------------|-------|----------------------------|-----------|----------------|--|---------------|------------------|--|
| NSFM1 | m | 78 | MDS-MLD | | low | 46XY[20] | NEIN | | TET2 (2x50%) |
| NSFM2 | w | 73 | MDS mit isolierter del(5q) | int | | 46XX [8], 46XX del (5) (q14q33) [12] (09/10) | NEIN | | DNMT3A (12,62%) |
| NSFM3 | m | 78 | RAEB-I/II | | very high risk | koplex abberant | NEIN | | TP53 (2x15%, 1x38%), FLT3 (11,1%) |
| NSFM4 | m | 79 | MDS-MLD | int-2 | high | komplex aberranter Karyotyp inkl. del(5q) | NEIN | | TP53(37%,22%) |
| NSFM5 | w | 84 | RAEB-1 | int-1 | intermediate | 46,XX,del(5)(q14q34)[6] /46,XX[19] | NEIN | | NF1 (15,38%) |
| NSFM6 | m | 79 | | | low | 46,XY [20] | NEIN | | STAG2 (15,4%) |
| SFM1 | m | 69 | MDS mit isolierter del(5q) | int | low | 46,XY,del(5)(q21q34)[17] /46,XY[3] | SF3B1 | 16,50% | STAG2 (19,9%), RUNX1 (4,5%), PTPN11 (9,7%), PPM1D (3,2% 3,6%), NF1 (8,4%), JAK2 (10%), BCORL1 (6,4%), SRSF2 (3,6%) |
| SFM2 | m | 73 | RCMD-RS | low | | 46,XY [20] | SF3B1 | 56,50% | |
| SFM3 | w | 76 | RARS-T | | low | 46XX[20] | SF3B1 | 46,30% | JAK2, SETBP1 (5,2%) |
| SFM4 | w | 84 | RARS-T | low | low | 46, XX [20] | SF3B1 | 49% | JAK2 (12,7%) |
| SFM5 | w | 77 | RARS | | very low | 46,XX,del(11)(q14q25) [17]; 46,XX [3] | SF3B1 | 46,30% | SRSF2 (4,8%) |
| SFM6 | w | 83 | MDS-RARS | | low-risk | 46,XX [20] | SF3B1 | 40% | U2AF1 (9%) |
| SFM7 | m | 77 | MDS-MLD | int-1 | intermediate | 46,XY [20] | SF3B1 | 30% | TET2 (10%) MLL |
| SFM8 | w | 77 | MDS-MLD | low | low | 46XX[20] | SRSF2 | 46,70% | TET2 (2x43%) |
| SFM9 | m | 80 | MDS-EB2 | high risk | Hochrisiko | 47,XY,+8 [2], 46, XY [19] | SRSF2 | 47,20% | ASXL1 (46%), BCOR (31,7%), STAG2 (77%), TET2 (47% und 39%) |
| SFM10 | m | 72 | RAEB-II | | intermediate | 46,XY [20] | SRSF2 | 50,90% | STAG2 (42,9%), IDH1 (10,7%), RUNX1 (43%) |
| SFM11 | m | 82 | RAEB-II | int | intermediate | 46,XY [20] | SRSF2 | 48,20% | BCOR (1,3%), DNMT3A (1%), ETV6 (1,3%), IDH2 (40,4%), JAK2 (25%), RUNX1 (1,3%), STAG2 (1,3% 1,2%), TP53 (1,3%) |
| SFM12 | m | 79 | MDS-MLD | int | | 46, XY [20] | SRSF2 | 52,80% | TET2 (41%), ASXL1 (5,4% und 44,5%), NF1 (13,3%) |
| SFM13 | m | 72 | MDS-MLD | Int-1 | Low | 46XY[20] | U2AF1 | 11% | JAK2 (7%), ASXL1 (8%) (MLL) |
| SFM14 | m | 62 | RCMD | low | low | 46,XY [20] | ZRSR2 | 68,80% | NF1 (27,9%), RUNX1 (10,9%), STAG2 (31,5%) |

NSFM: nicht SF-mutiert, SFM: SF-mutiert, Int: intermediate; SF: Spleißfaktor; VAF: variant allele frequency

Tabelle 7: Mutationsstatus der „common myeloid mutations“ der 6 Patienten, die keine SF-Mutation aufweisen

| Patient \ Gen | NSFM1 | NSFM2 | NSFM3 | NSFM4 | NSFM5 | NSFM6 |
|---------------|-----------|--------|-------------------|----------|--------|--------|
| SRSF2 | | | | | | |
| SF3B1 | | | | | | |
| STAG2 | | | | | | 15,40% |
| TET2 | 49,9% 50% | | | | | |
| NF1 | | | | | 15,38% | |
| RUNX1 | | | | | | |
| ASXL1 | | | | | | |
| JAK2 | | | | | | |
| TP53 | | | 15,4% 15,7% 38,7% | 37%, 22% | | |
| BCOR | | | | | | |
| DNMT3A | | 12,62% | | | | |
| BCORL1 | | | | | | |
| ETV6 | | | | | | |
| FLT3 | | | 11,10% | | | |
| IDH1 | | | | | | |
| IDH2 | | | | | | |
| PPM1D | | | | | | |
| PTPN11 | | | | | | |
| SETBP1 | | | | | | |
| U2AF1 | | | | | | |
| ZRSR2 | | | | | | |
| CALR | | | | | | |
| CBL | | | | | | |
| CEBPA | | | | | | |
| CSF3R | | | | | | |
| EZH2 | | | | | | |
| KIT | | | | | | |
| KRAS | | | | | | |
| MPL | | | | | | |
| NPM1 | | | | | | |
| NRAS | | | | | | |
| PHF6 | | | | | | |
| RAD21 | | | | | | |
| SMC3 | | | | | | |

Tabelle 8: Mutationsstatus der „common myeloid mutations“ der 14 Patienten, die eine SF-Mutation aufweisen.

| Patient | SFM1 | SFM2 | SFM3 | SFM4 | SFM5 | SFM6 | SFM7 | SFM8 | SFM9 | SFM10 | SFM11 | SFM12 | SFM13 | SFM14 |
|---------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|-------|--------|
| SRSF2 | 3,6% | | | | 4,80% | | | 46,70% | 47,20% | 50% | 48,20% | 52,80% | | |
| SF3B1 | 16,50% | 56,50% | 46,30% | 49,30% | 46,20% | 40,90% | 32,70% | | | | | | | |
| STAG2 | 19,90% | | | | | | | | 77,10% | 42,90% | 1,3% 1,2% | | | 31,50% |
| TET2 | | | | | | | 45,10% | 2x43% | 47% 39,2% | | | 41% | | |
| NF1 | 8,40% | | | | | | | | | | | 13,30% | | 27,90% |
| RUNX1 | 4,50% | | | | | | | | | 43% | 1,30% | | | 10,90% |
| ASXL1 | | | | | | | 3,50% | | 46,10% | | | 44,7% + 5,4% | | |
| JAK2 | 10% | | | 12,70% | | | | | | | 25% | | | |
| TP53 | | | | | | | | | | | 1,30% | | | |
| BCOR | | | | | | | | | 31,70% | | 1,30% | | | |
| DNMT3A | | | | | | | | | | | 1% | | | |
| BCORL1 | | | | | | | | | | | | | | |
| ETV6 | | | | | | | | | | | 1,30% | | | |
| FLT3 | | | | | | | | | | | | | | |
| IDH1 | | | | | | | | | | 10% | | | | |
| IDH2 | | | | | | | | | | | 40,40% | | | |
| PPM1D | 3,2% 3,6% | | | | | | | | | | | | | |
| PTPN11 | 9,70% | | | | | | | | | | | | | |
| SETBP1 | | | 5,20% | | | | | | | | | | | |
| U2AF1 | | | | | | 9,70% | | | | | | | | |
| ZRSR2 | | | | | | | | | | | | | | 68,80% |
| CALR | | | | | | | | | | | | | | |
| CBL | | | | | | | | | | | | | | |
| CEBPA | | | | | | | | | | | | | | |
| CSF3R | | | | | | | | | | | | | | |
| EZH2 | | | | | | | | | | | | | | |
| KIT | | | | | | | | | | | | | | |
| KRAS | | | | | | | | | | | | | | |
| MPL | | | | | | | | | | | | | | |
| NPM1 | | | | | | | | | | | | | | |
| NRAS | | | | | | | | | | | | | | |
| PHF6 | | | | | | | | | | | | | | |
| RAD21 | | | | | | | | | | | | | | |
| SMC3 | | | | | | | | | | | | | | |

4 DISKUSSION

4.1 SF-Mutationen und die Aktivierung der ATR-vermittelten DNA-Schadensantwort

Somatische heterozygote Mutationen in SF-Genen wie *U2AF1*, *SRSF2*, *SF3B1* und *ZRSR2* sind die am häufigsten vorkommenden Mutationen bei an MDS erkrankten Patienten. Ihre hohe Allelfrequenz lässt annehmen, dass sie oft den Ursprungsklon der Krankheit betreffen und verändertes RNA-Spleißen implizieren, welches wiederum einen kritischen Punkt für die Entwicklung und die Progression von MDS darstellt [10, 11, 69].

Aufgrund des starken Vorkommens dieser Mutationen bei an MDS erkrankten Patienten, stellen sie ein attraktives Ziel für die Entwicklung von neuen molekularen Therapiestrategien dar.

Interessanterweise wurden - je nach SF-Mutation - unterschiedliche Veränderungen im Spleiß-Mechanismus festgestellt [70]. Dies macht es unwahrscheinlich, dass das veränderte Spleißen an sich allein für den gemeinsamen Pathomechanismus in MDS bei unterschiedlichen SF-Mutationen verantwortlich ist. Stattdessen wurden erhöhte Mengen an R-Loops als möglicher gemeinsamer Mechanismus bei *U2AF1* S34 und *SRSF2* P95 Mutationen festgestellt [38].

Die Assoziation mit erhöhter R-Loops-Bildung, im Besonderen bei SF-Mutationen der Gene *SRSF2* und *U2AF1* wurde letztlich in Zelllinienmodellen demonstriert [38, 71]. Des Weiteren hat eine kürzlich durchgeführte Studie gezeigt, dass sich vermehrte R-Loops Akkumulationen in induzierten pluripotenten Stammzellen und n=3 primäre MDS Patienten mit *SF3B1*-Mutation nachweisen lassen [72].

Die vorliegende Arbeit zeigt diesen Zusammenhang in einer großen repräsentativen klinischen Kohorte von primären Zellen aus MDS Patienten und bringt diese Ergebnisse damit in ein prä-klinisches Setting. Wir haben 20 Proben von MDS-Patienten (6 NSFM, 14 SFM (*SF3B1*=7, *SRSF2*=5, *U2AF1*=1, *ZRSR2*=1)) auf ihre R-Loops Quantität in isolierten CD34⁺ KM-Zellen untersucht; eine Zellpopulation, die dafür bekannt ist, angereichert mit MDS initiiierenden Zellen zu sein. Siehe hierzu den folgenden Graphen, der in Vorarbeit erstellt wurde und besagt, dass sich bei CD34⁺ Zellen mehr R-Loops nachweisen lassen, als bei CD34⁺CD38⁻, CD33⁺ und CD19⁺ Zellpopulationen (Abb. 23).

Unsere Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass eine erhöhte R-Loops Akkumulation einen gemeinsamen physiologischer Mechanismus in Zellen von MDS Patienten mit SF-Mutationen darstellt. Gestützt auf frühere Studien an Zelllinien und als Konsequenz auf erhöhte R-Loops Mengen, haben wir Signale für hochgradig aktivierten Replikationsstress in SFM CD34⁺ Zellen von MDS Patienten detektiert und quantifiziert. Dies hat uns zu der Hypothese geführt, dass SFM KM-Zellen von MDS Patienten von einem gut funktionierenden ATR-Signalweg abhängig sind, um den durch Replikationsstress induzierten DNA-Schaden entgegenzuwirken.

4.2 R-Loops Quantität und Zellsensibilität auf AZD6738 und PladB

In unseren Vorarbeiten mit Zellkulturen und NSB konnten wir zeigen, dass eine Behandlung mit PladB zur Erhöhung der R-Loops Quantität führt. Des Weiteren zeigte sich in den CTG Versuchen, dass eine Behandlung mit PladB wie auch AZD6738 zu einer deutlichen Reduzierung der Lebensfähigkeit der Zellen führte.

Nachfolgend wurden CD34⁺ Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen des KM von Patienten mit und ohne SF-Mutationen untersucht. Auch hier zeigte sich, dass Zellen von Patienten mit SF-Mutationen stärker auf die Behandlung mit PladB und/oder AZD6738 reagierten, als die NSFM Proben. Bei allen Zellen zeigte sich, dass eine Behandlung mit AZD6738 und PladB einen signifikant stärkeren Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen hat als die alleinige Behandlung mit PladB. Es handelt sich demnach um einen additiven Effekt der beiden Substanzen.

Um den Einfluss von R-Loops auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Behandlung mit AZD6738 und PladB genauer zu untersuchen und damit besser zu verstehen, haben wir die Patienten nicht nur in die Gruppen „mutiert“ und „nicht mutiert“ eingeteilt, sondern auch nach der bei ihnen detektierten R-Loops Quantität unterschieden (Abb. 28, 29, 31-34).

Die erhöhte Menge an R-Loops bei SFM MDS-Patienten stellt die Grundlage der Hypothese unserer zielgerichteten Therapie dar. Bei den Versuchen ergab sich folgendes: Vergleicht man die Gruppen mutiert (*SRSF2*, *SF3B1* und *U2AF1*) vs. nicht mutiert, zeigt sich zwar eine Tendenz, dass die SFM Zellen stärker auf die Behandlung mit AZD6738 und/oder PladB reagieren, dieser Unterschied ist aber nicht signifikant. Vergleicht man die Gruppen mehr vs. weniger R-Loops (einmal nach Mittelwert, einmal nach Median), so zeigen sich signifikante Unterschiede sowohl bei der Einzeldosis AZD6738, wie auch bei der Kombinationsgabe von Spleiß-Modulator und ATR-Inhibitor. Des Weiteren sind auch die Unterschiede zwischen Einzelbehandlung mit AZD6738 oder PladB und Kombination der beiden Substanzen signifikant (Abb. 33, 34).

Der Unterschied der Einteilung „mutiert vs. nicht mutiert“ und „mehr vs. weniger R-Loops“ wird vor allem durch zwei Patientenproben verursacht. Es handelt sich dabei zum einen um SFM5, einen Patienten, der trotz SF-Mutation relativ wenig R-Loops hat. Er stellt insofern eine Ausnahme der mutierten Patienten dar, da er der einzige Patient mit einer „very low risk“ Einstufung nach IPSS-R ist (Tabelle 1). Ob dies der ausschlaggebende Faktor ist, kann bei n=1 nicht sichergestellt werden, es ist jedoch auffällig und stellt bei unserem Kenntnisstand der Patientenzellen den einzigen wesentlichen Abgrenzungsfaktor zu den anderen Proben dar. Zum anderen handelt es sich um NSFM6, einen Patienten, bei dem, obwohl bei ihm keine SF-Mutation nachgewiesen werden konnte, außergewöhnlich viele R-Loops detektiert wurden (Abb. 32). Bei ihm wurde bei der Untersuchung der „common myeloid mutations“ festgestellt, dass er eine Mutation im *STAG2* Gen mit einer VAF von 15,4% aufweist. *STAG2* ist eine der 34 common myeloid mutations, die mit MDS assoziiert werden. Auch in anderen Studien ergeben sich Hinweise darauf, dass Patienten mit *STAG2*-Mutationen sensibler auf diese Behandlung reagieren [73]. Es müssten weitere Nachforschungen angestellt werden, um herauszufinden, ob dieser Fakt mit der erhöhten Quantität an R-Loops zu tun haben könnte (Tabelle 1, 2).

4.3 Veränderungen der R-Loops Mengen

Um die Veränderungen der R-Loops Quantität vor und nach Behandlung zu untersuchen, haben wir Zellen aus MDS-Zellkulturen (HEL, HL60, MOLM13 und SKM1), CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen von MDS-Patienten mit und ohne SF-Mutationen vor und nach Behandlung mit PladB auf ihre S9.6 und RPA2 (S33)-Quantität hin untersucht.

Bei den Versuchen mit Zelllinien zeigte sich eindeutig, dass die R-Loops Quantität (gemessen über anti-S9.6-Antikörper) wie auch die Aktivität des ATR-Signalweges (gemessen über anti-RPA2 (S33)-Antikörper) durch Behandlung mit PladB stark signifikant ansteigen (Abb. 12).

Bei den Zellen aus drei verschiedenen von uns untersuchten NSB-Proben, zeigte sich auch ein Anstieg der detektierten S9.6 Quantität, dieser stellte sich jedoch nur bei einer Probe als signifikant heraus (Abb. 13A). Überraschenderweise sank bei allen drei NSB-Proben die RPA2 (S33)-Quantität nach Behandlung mit PladB. Bei zwei der drei Proben ist der Unterschied signifikant (Abb. 13B). Nach momentanem Wissensstand kann man nur vermuten, woran das liegt, der genaue Mechanismus ist noch nicht eindeutig geklärt. Es stellt sich die Frage, ob der SF-Modulator einen so starken Einfluss auf die Zellen aus Nabelschnurblut hat, dass es direkt zur Apoptose der meisten Zellen mit R-Loops kam, und somit auch kein ATR-Reparatursignalweg mehr in Anspruch genommen wurde. Gehen Nabelschnurblutzellen anders mit Replikationsstress um?

Bei den von uns hier untersuchten CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen von MDS-Patienten handelt es sich um den nicht SFM Patienten NSF5 und die SFM MDS-Patienten SFM12 und SFM5. Die Patienten wurden nicht nur mit PladB behandelt, sondern auch mit AZD6738.

NSFM5 zeigte einen signifikanten Anstieg der R-Loops nach Behandlung mit PladB und AZD6738 und einen signifikanten Abfall der Aktivität des ATR-Signalweges. Dies lässt sich damit erklären, dass die R-Loops durch den SF-Modulator PladB verstärkt gebildet wurden. Die erhöhte R-Loops Akkumulation führte zu Replikationsstress, welcher durch den ATR-Signalweg reduziert werden sollte. Da dieser jedoch durch den ATR-Inhibitor AZD6738 gehemmt wird, kommt es sogar zu einer Verminderung der RPA2 (S33)-Quantität. Der Patient SFM12 zeigte schon vor Behandlung mit AZD6738 und PladB stark erhöhte R-Loops Mengen, nach Behandlung kam es zu einem nicht signifikanten Abfall der S9.6 Intensität. Vermutlich waren die Zellen schon so vorgeschädigt, dass es durch den Spleiß-Modulator nicht erst zu vermehrten R-Loops, sondern direkt zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose kam. Die von uns gemessene RPA2 (S33)-Intensität, was der Aktivität des ATR-Signalweges entspricht, sank nach der Behandlung mit AZD6738 signifikant. Der dritte Patient, SFM5, zeigte nach Behandlung mit PladB und AZD6738 einen signifikanten Anstieg sowohl von S9.6, als auch von RPA2 (S33). Es könnte sein, dass es durch den sehr starken Anstieg an R-Loops (bei vorher außergewöhnlich niedrigen R-Loops Mengen), zu einer so starken ATR-Aktivität kam, dass unsere Dosis des Inhibitors nicht ausreichte, um den Signalweg zu inhibieren. Anhand dieser drei Beispielpatienten kann man schlussfolgern, dass mehrere Aspekte zu beachten sind und nicht nur der Mutationsstatus der SF-Gene einen wichtigen Einflussfaktor darstellt. Da es sich bei den untersuchten Proben nur um n=3 mit jeweils unterschiedlichem Mutationsstatus handelt, ist es schwierig, aus den stark voneinander abweichenden Ergebnissen eine allgemeine Aussage zu schließen. Der Versuch müsste mit einer höheren Fallzahl wiederholt werden.

Als wichtigster Faktor scheint wohl die R-Loops Mengen zu gelten, sie können trotz vorhandenen SF-Mutation stark variieren. Vermutlich gibt es hier wiederum Unterschiede zwischen den einzelnen Mutationen. Wie man auf Abb. 15C erkennen kann, haben die MDS-Patienten mit den meisten R-Loops eine *SRSF2*-Mutation. Es gilt also, Unterschiede zwischen den verschiedenen SF-Mutationen zu beachten.

4.4 ATR-Inhibitoren und synthetische Letalität – „Sola dosis facit venenum“

Als Konsequenz dieser Erkenntnisse stellten wir die Hypothese, dass eine Unterbrechung der ATR-gesteuerten DNA-Reparatur durch ATR-Inhibitoren wie z.B. VE-821 und AZD6738 bei SFM Zellen dazu führt, dass sie den durch R-Loops induzierten Replikationsstress nicht länger tolerieren können. Es kommt zur Einstellung des Zell-

zyklus und letztendlich zum Tod der Zelle. Man kann sich bei einer durch SF-Mutationen im RS befindlichen Zellen ATR-Inhibitoren zunutze machen, um eine synthetische Letalität herbeizuführen.

Angesichts der Tatsache, dass Spleiß-Modulatoren Einfluss auf die therapeutische Aktivität bei SFM Zellen haben, stellen wir die Hypothese auf, dass eine Kombination von Spleiß-Modulatoren wie PladB mit niedrig dosierter Gabe von AZD6738 das therapeutische Fenster bei SFM Zellen verstärken könnte. Tatsächlich hat die Behandlung von Zellen mit PladB die Sensitivität SFM Zellen auf ATR-Inhibition verstärkt und somit eine präklinische Grundlage für einen synergistischen Aktionsmechanismus abzielend auf zwei unterschiedliche zelluläre Signalwege, welche durch die Anwesenheit einer einzigen Mutation verändert sind, geschaffen. Aus klinischer Sicht erlaubt uns dies eine sparsame Anwendung von ATR-Inhibitor und PladB, welche in niedrigen Konzentrationen einen vernachlässigbaren Einfluss auf nicht SFM und gesundes KM haben, da diese Zellen von niedrigen Dosierungen der einzelnen Substanzen kaum betroffen sind. Diese synthetisch letale Verbindung zwischen erhöhter R-Loops Quantität und ATR-Inhibition macht demnach eine therapeutische Behandlung möglich, ohne zu stark in die gesunde Hämatopoese einzugreifen. Wie schon Paracelsus sagte: "Sola dosis facit venenum", nur die Dosis macht das Gift.

Während hohe Konzentrationen von ATR-Inhibitoren auch die Lebensfähigkeit von nicht SFM CD34⁺ Zellen von MDS Patienten schädigen, hat uns eine umsichtige Titration die Konzentrationen an ATR-Inhibitoren herausfinden lassen, die für CD34⁺ Zellen von nicht SFM MDS Patienten und CD34⁺ Zellen von gesunden Probanden noch gut toleriert wurden. Dies legt nahe, dass es, zumindest in *in vitro* Versuchen, ein therapeutisches Fenster für SF-Mutationen-spezifische gezielte Therapie gibt. Unsere *in vitro* Versuchsergebnisse untermauern diese Hypothese in einer ausführlichen präklinischen Patientenprobenkohorte mit n=20. Sie zeigt, dass hämatopoetische Zellen mit SF-Mutationen selbst auf niedrige Dosen von ATR-Inhibitoren empfindlich reagieren, d.h. selbst in Konzentrationen, die gesunde Zellen kaum beeinflussen. Es muss herausgefunden werden, wie dieses Konzept *in vivo* Situationen z.B. an Mausmodellen und zu guter Letzt an Menschen angewendet werden kann. Wir haben gezielt AZD6738 für unsere Experimente ausgesucht, da diese Substanz schon in klinischen Studien Anwendung findet (NCT03770429).

4.5 Einfluss von MDS-assoziierten Co-Mutationen auf das Ansprechen auf ATR Inhibitoren

Zusätzlich zu den vier SF-Mutationen gibt es ca. 30 weitere Mutationen, die mit MDS assoziiert werden. Diese als Co-Mutationen bezeichneten Genmutationen haben vermutlich auch einen Einfluss auf die Reaktion der Zellen auf ATR-Inhibitoren. Um beurteilen zu können, ob diese Co-Mutationen einen verzerrenden Einfluss ausüben, wurden unsere Patientenproben mittels NGS Sequenzierung mit Genpanels, die wiederkehrende Genmutationen in myeloischen Erkrankungen beinhalten, oder WES analysiert. Wir konnten jedoch keinen molekularen Marker entdecken, der die durch SF-Mutationen herbeigeführte Empfindlichkeit gegen ATR-Inhibitoren nachweislich beeinflusst. Die in unseren Patientenproben am häufigsten zusätzlich auftretende Mutationen waren die folgenden: *RUNX1*, *TET2*, *STAG2*, *ASXL1*, *JAK2* und *TP53*. Mutationen, die mit der DNA-Schaden-Antwort interferieren, so wie *TP53*, könnten zu einer Resistenz gegen ATR-Inhibitoren führen. *TP53* spielt vor allem nach ATM im Signalweg der DNA-Schaden-Antwort eine Rolle. Wir konnten zeigen, dass Zellen mit *TP53*-Mutation weniger auf die Behandlung mit AZD6738 zu reagieren scheinen, als Zellen von Patienten ohne Mutation in diesem Gen (Abb. 30).

Der Einfluss von *TP53* auf die Reaktion auf ATR-Inhibitoren sollte in weiteren Studien gesondert genauer untersucht werden und bei potentiellen klinischen Versuchen berücksichtigt werden.

4.6 Unterschiede zwischen den verschiedenen SF-Mutationen

Im Durchschnitt zeigten die Patientenproben mit SF-Mutationen in den immunfluoreszenzmikroskopischen Messungen stärkere R-Loops Mengen und ATR-Signalweg Aktivierungen, als die Zellen der nicht mutierten Patientenproben.

Es ließen sich jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen Mutationen feststellen.

SRSF2- und *U2AF1*-Mutationen stellen insofern eine Besonderheit dar, da sie mit einem besonders hohen Risiko einer Transformation in eine sAML behaftet sind [15, 16]. Schaut man sich die Ergebnisse unserer Experimente an, so lässt sich erkennen, dass die Patienten mit genau diesen Mutationen auch höhere R-Loops Mengen aufwiesen als die Patienten mit *ZRSR2*- bzw. *SF3B1*-Mutationen [72].

Am meisten R-Loops wurden detektiert bei den *SRSF2*-mutierten Proben, aber auch bei dem *U2AF1*-Patienten war die detektierte Menge an R-Loops, wie auch die Aktivität des ATR-Signalweges höher als der Durchschnitt bei den Patientenproben der anderen Mutationen.

Die Steigerung der ATR-Aktivität nach Behandlung der Zellen mit PladB zeigt sich bei den Proben mit *SF3B1*-Mutation am niedrigsten. Die Intensitäten der fluoreszierenden Sekundärantikörper zeigt sich sehr gestreut. Allerdings ist *SF3B1* im Gegensatz zu *SRSF2* und *U2AF1* eine SF-Mutation, die bei MDS mit einer eher guten Prognose einhergeht [17].

Auch bei den CTG Messungen zur Lebensfähigkeit der Zellen fiel auf, dass die Zellen mit Mutationen in *SRSF2* und *U2AF1* schon auf niedrigere Konzentrationen stärker reagierten als die übrigen Proben.

Interessanterweise könnten Mutationen im *ZRSR2*-Gen eine Ausnahme bei den SF-Mutationen darstellen. Der von uns untersuchte Patient mit *ZRSR2*-Mutation hatte weder stark erhöhte R-Loops Mengen, noch hat er auf die Behandlung mit AZD6738 so stark reagiert, wie die Zellen von anderen SFM Patienten. Der Grund dafür ist bis jetzt unbekannt, genauere Schlussfolgerungen können aufgrund der geringen Patientenzahl mit *ZRSR2*-Mutation in unserem Versuch noch nicht gezogen werden. Die *ZRSR2* Mutation stellt insofern eine Ausnahme dar, da sie im Gegensatz zu *SRSF2*, *SF3B1* und *U2AF1* Mutationen keine change-of-function/neomorphic oder gain-of-function Mutation ist, sondern eine loss-of-function-Mutation darstellt [12, 17, 74]. Eine weitere Besonderheit von *ZRSR2* ist die Lokation auf dem Y-Chromosom. Die genauen Mechanismen, nach denen verschiedene Mutationen den Spleiß-Prozess beeinflussen, sind noch nicht geklärt, so dass es durchaus denkbar ist, dass die unerwartet geringe Reaktion auf die Behandlung mit AZD6738 und PladB Gründe hat, die wir noch nicht verstehen können.

Auf der anderen Seite kann man anhand von zwei einzelnen Proben keine Aussage darüber machen, ob Patienten mit *ZRSR2* Mutation im Allgemeinen nicht auf die Behandlung reagieren, oder ob unsere beiden Patienten eine Ausnahme darstellen, aufgrund von Details, die wir noch nicht kennen. Hier müssten weitere Versuche unternommen werden. Der pathophysiologische Mechanismus, welcher der *ZRSR2*-Mutation bei MDS unterliegt, könnte im Vergleich zu den drei anderen untersuchten SF-Mutationen (*SRSF2*, *SF3B1* und *U2AF1*) anders sein. Möglicherweise hängt dies zusammen mit dem Einfluss von *ZRSR2* auf die U12-Introns. Eine transiente Überexpression von *ZRSR2* könnte zu einem spezifischen Defekten bei Spleißen des U12-

Introns führen [35]. Auch dies ist ein wichtiger Ansatzpunkt zur genaueren Untersuchung für weitere Studien.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Mutationen, die durch ihre hohe Transformationsgefahr eine besondere Stellung einnehmen (*SRSF2* und *U2AF1*) auch besser auf unsere Behandlung zu reagieren scheinen und unserer vorausgegangenen Hypothese (mehr R-Loops, höhere ATR-Aktivität und stärkere Reaktion auf die von uns eingesetzten Medikamente) entsprechen.

4.7 Ausblick

Den pathophysiologischen Mechanismus betreffend hat die Arbeit von Chen et. al kürzlich demonstriert, dass SF-Mutationen die Bildung von R-loops durch Veränderungen auf Transkriptionsebene induzieren [38]. Dies deutet an, dass Störungen des RNA-Spleißens und R-Loops Akkumulation zwei voneinander unabhängige Prozesse sein könnten, die beide von SF-Mutationen in MDS beeinflusst werden. Durch erhöhte R-Loops-Quantität entstandene DNA-Schäden könnte die Progression eines MDS in ein sAML fördern. Während *SRSF2* und *U2AF1* Mutationen mit einer überwiegend schlechten Prognose behaftet sind, sind *SF3B1* K700 Mutationen mit einer eher günstigeren Prognose assoziiert. Dies lässt vermuten, dass zusätzliche, R-Loops unabhängige Mechanismen, die klonale Evolution in SFM Zellen beeinflussen.

Des Weiteren hat eine kürzlich durchgeführte Studie gezeigt, dass Mutationen in SF-Genen die angeborene Immunreaktion triggern können, indem sie die Produktion von inflammatorischen Zytokinen in myeloischen Zellen steigern. SF-Mutationen bei MDS scheinen das Spleißen von Genen zu verändern, welche das angeborene Immunsystem regulieren. Dies wiederum könnte zur Pathologie der Krankheit beitragen [75].

Schlussendlich zeigt unsere Studie in einer großen Kohorte primärer MDS CD34⁺ Zellen mit SF-Mutationen (*SF3B1*, *SRSF2* und *U2AF1*) stark erhöhte R-Loops Mengen, welche in einer erhöhten Sensitivität auf pharmakologische ATR-Inhibition resultieren. Unsere Daten verstärken die präklinische Grundlage für diese neue therapeutische zielgerichtete Strategie bei MDS-Patienten. Eine kürzlich initiierte einarmige Phase Ib klinische Studie schätzt die Sicherheit ein und sucht für einen vorbereitenden Beweis der Nützlichkeit von AZD6738 bei Patienten mit MDS und CMML, bei denen die Erstlinientherapie versagt hat (NCT03770429). R-Loops könnten einen neuen potentiellen Biomarker für die Reaktion auf die Behandlung darstellen. Zukünftige Bemühungen sollten auf eine Kombinationsstrategie mit ATR-Inhibitoren abzielen.

Angesichts der in unserer Studie gewonnen Erkenntnisse stellen sich neue Fragen, z.B. ob und wie sich im Verlauf einer MDS Erkrankung die vorhandenen Mutationen bilden und verändern. Wir wissen, dass SF-Mutationen meist initial bei Krankheitsbeginn vorhanden sind. Aber wie verhält es sich im Progress? Steigt die Allelfrequenz an? Kommen andere Mutationen hinzu, welche dazu führen, dass der Körper besser mit den resultierenden R-Loops bzw. dem Replikationsstress fertig wird? Schlägt die zielgerichtete Therapie mit AZD6738 und PladB zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung unterschiedlich gut an?

Mit der hier präsentierten Arbeit zur zielgerichteten Therapie bei MDS haben wir einen weiteren Schritt in den Vorarbeiten für *in vivo* Studien gemacht, in denen gezielte einzelne bzw. duale Therapien mit SF-Modulatoren und ATR-Inhibitoren getestet werden. Wir haben die bislang größte Kohorte primärer MDS Proben zu dieser Fragestellung

untersucht und damit signifikante unterstützende in vitro Daten zur Bestätigung des Konzeptes geliefert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind maligne, klonale Erkrankungen der myeloischen Hämatopoese. MDS resultieren in Zytopenien einer oder mehrerer Zellreihen, was bei den betroffenen Patienten zu lebensgefährlichen Blutungen, Infektionen und Anämien führen kann. In ca. 50% der Fälle transformiert MDS im Verlauf in eine akute myeloische Leukämie. Die Inzidenz beträgt ca. 4-5/100.000 pro Jahr mit einem starken Anstieg auf bis zu 60/100.000 bei älteren Patienten (> 65 Jahren). Die therapeutischen Optionen sind aktuell begrenzt und bestehen z.B. aus supportiven Maßnahmen wie Transfusionen, hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, demethylierenden Therapien oder Lenalidomid. Die allogene Stammzelltransplantation bei jüngeren Patienten stellt zur Zeit die einzige kurative Therapieoption dar.

Molekulare Analysen haben hinsichtlich der Pathogenese der MDS in den letzten Jahren in ca. 50% der MDS-Patienten rekurrente Mutationen in Genen des RNA-Spleißens wie z.B. *SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2* oder *ZRSR2* identifiziert. In Bestrebungen, diese Mutationen als Zielstrukturen für neue Therapiekonzepte zu etablieren, konnte gezeigt werden, dass sie im Sinne eines übergeordneten Pathomechanismus zu vermehrter Akkumulation von DNA:RNA Hybridstrukturen, sogenannter „R-Loops“, in der Replikationsgabel mutierter Zellen führen. Die Anhäufung von R-Loops führt in den Zellen zu erhöhtem replikativen Stress und könnte daher eine Möglichkeit zum Angriff mittels synthetischer Letalitätskonzepte durch Inhibition von DNA-Reparaturmechanismen sein. Vor diesem Hintergrund ergab sich die Fragestellung dieser Doktorarbeit. Da Zellen mit erhöhtem replikativen Stress abhängig von ATR-vermittelten DNA-Reparaturmechanismen sind, war es Ziel dieser Arbeit, präklinisch zu prüfen, ob Zellen von MDS-Patienten mit Spleißfaktor-Mutationen gezielt sensibel gegenüber einer Therapie mit ATR-Inhibitoren (AZD6738), ggf. in Kombination mit Spleißfaktor-Modulatoren (Pladienolide B), sein könnten.

Um dies zu untersuchen, führten wir präklinische in-vitro Versuche mit primären CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen von MDS-Patienten durch. Es wurden insgesamt Zellen von n=53 MDS-Patienten in in-vitro Differenzierungskulturen untersucht. Die Knochenmarkszellen aller Patienten wurden mittels „next generation sequencing“ molekular charakterisiert und in Gruppen mit und ohne Spleißfaktor-Mutationen unterteilt. Ferner wurden die Zellen immunologisch und mikroskopisch hinsichtlich ihrer R-Loops-Menge und Aktivierung von DNA-Reparaturschäden charakterisiert. In unserer Arbeit konnten wir erstmals anhand einer repräsentativen MDS-Kohorte zeigen, dass primäre hämatopoetische MDS-Zellen mit Spleißfaktor-Mutationen höhere R-Loops-Mengen akkumulierten als nicht Spleißfaktor-mutierte Zellen. Diese erhöhte R-Loops-Quantität war funktionell mit einer signifikant höheren Sensitivität gegenüber des ATR-Inhibitors AZD6738 verbunden. Dieser Inhibitor befindet sich aktuell in einer frühen Phase I Studie in klinischer Erprobung (NCT03770429). Die Wirksamkeit des ATR-Inhibitors konnte im Sinne eines additiven Effektes durch Kombination mit einem Spleißfaktor-Modulator (Pladienolide B) zusätzlich verstärkt werden.

Zusammenfassend konnten wir in dieser präklinischen Untersuchung mit primären MDS-Stammzellen die Hypothese bestätigen, dass Spleißfaktor-mutierte MDS-Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber ATR-Inhibitoren aufweisen, was die Rationale für die klinische Erprobung von ATR-Inhibitoren bei MDS mit Spleißfaktor-Mutationen begründet. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden 2020 in der Fachzeitschrift *Haematologica*, Impact Factor 2019: 7.116 (doi: 10.3324/haematol.2020.254193, PMID: 33054116) publiziert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Neukirchen, J., et al., *Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry*. *Leuk Res*, 2011. **35**(12): p. 1591-6.
2. Aul, C., N. Gattermann, and W. Schneider, *Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes*. *Br J Haematol*, 1992. **82**(2): p. 358-67.
3. Aul, C., et al., *[Myelodysplastic syndromes. The epidemiological and etiological aspects]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 1992. **117**(33): p. 1223-31.
4. Nimer, S.D., *Myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2008. **111**(10): p. 4841-51.
5. Haferlach, T., et al., *Myelodysplastische Syndrome von A bis Z*. Vol. 3. 2014, Thieme.
6. Kreuzer, K.-A. and J. Bexer, *Hämatologie und Onkologie*. 2016: Thieme.
7. Williamson, P.J., et al., *Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome*. *Br J Haematol*, 1994. **87**(4): p. 743-5.
8. Kuendgen, A., et al., *Myelodysplastic syndromes in patients younger than age 50*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(34): p. 5358-65.
9. Will, B., et al., *Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations*. *Blood*, 2012. **120**(10): p. 2076-86.
10. Papaemmanuil, E., et al., *Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2013. **122**(22): p. 3616-27; quiz 3699.
11. Haferlach, T., et al., *Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes*. *Leukemia*, 2014. **28**(2): p. 241-7.
12. Yoshida, K., et al., *Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia*. *Nature*, 2011. **478**(7367): p. 64-9.
13. Valent, P., *ICUS, IDUS, CHIP and CCUS: Diagnostic Criteria, Separation from MDS and Clinical Implications*. *Pathobiology*, 2019. **86**(1): p. 30-38.
14. Sperling, A.S., C.J. Gibson, and B.L. Ebert, *The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia*. *Nat Rev Cancer*, 2017. **17**(1): p. 5-19.
15. Makishima, H., et al., *Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis*. *Blood*, 2012. **119**(14): p. 3203-10.
16. 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. 3578-84.
17. Papaemmanuil, E., et al., *Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(15): p. 1384-95.
18. Bejar, R. and D.P. Steensma, *Recent developments in myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2014. **124**(18): p. 2793-803.
19. Damm, F., et al., *Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2012. **119**(14): p. 3211-8.
20. Dvinge, H., et al., *RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(7): p. 413-30.
21. Pellagatti, A. and J. Boulton, *Splicing factor gene mutations in the myelodysplastic syndromes: impact on disease phenotype and therapeutic applications*. *Adv Biol Regul*, 2017. **63**: p. 59-70.

22. Kim, E., et al., *SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(5): p. 617-30.
23. Mupo, A., et al., *Hemopoietic-specific Sf3b1-K700E knock-in mice display the splicing defect seen in human MDS but develop anemia without ring sideroblasts*. *Leukemia*, 2017. **31**(3): p. 720-727.
24. Foy, A. and M.F. McMullin, *Somatic SF3B1 mutations in myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts and chronic lymphocytic leukaemia*. *J Clin Pathol*, 2019. **72**(11): p. 778-782.
25. Gozani, O., R. Feld, and R. Reed, *Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A*. *Genes Dev*, 1996. **10**(2): p. 233-43.
26. Gao, K., et al., *Human branch point consensus sequence is yUnAy*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(7): p. 2257-67.
27. Chen, M. and J.L. Manley, *Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(11): p. 741-54.
28. Graveley, B.R. and T. Maniatis, *Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing*. *Mol Cell*, 1998. **1**(5): p. 765-71.
29. Liu, H.X., et al., *Exonic splicing enhancer motif recognized by human SC35 under splicing conditions*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(3): p. 1063-71.
30. Schaal, T.D. and T. Maniatis, *Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(3): p. 1705-19.
31. Meggendorfer, M., et al., *SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML)*. *Blood*, 2012. **120**(15): p. 3080-8.
32. Patnaik, M.M., et al., *Spliceosome mutations involving SRSF2, SF3B1, and U2AF35 in chronic myelomonocytic leukemia: prevalence, clinical correlates, and prognostic relevance*. *Am J Hematol*, 2013. **88**(3): p. 201-6.
33. Ruskin, B., P.D. Zamore, and M.R. Green, *A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly*. *Cell*, 1988. **52**(2): p. 207-19.
34. Wu, S., et al., *Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35*. *Nature*, 1999. **402**(6763): p. 832-5.
35. Madan, V., et al., *Aberrant splicing of U12-type introns is the hallmark of ZRSR2 mutant myelodysplastic syndrome*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6042.
36. Shen, H., et al., *The U2AF35-related protein Urp contacts the 3' splice site to promote U12-type intron splicing and the second step of U2-type intron splicing*. *Genes Dev*, 2010. **24**(21): p. 2389-94.
37. Nguyen, H.D., et al., *Functions of Replication Protein A as a Sensor of R Loops and a Regulator of RNaseH1*. *Mol Cell*, 2017. **65**(5): p. 832-847 e4.
38. Chen, L., et al., *The Augmented R-Loop Is a Unifying Mechanism for Myelodysplastic Syndromes Induced by High-Risk Splicing Factor Mutations*. *Mol Cell*, 2018. **69**(3): p. 412-425 e6.
39. Chen, L., et al., *R-ChIP Using Inactive RNase H Reveals Dynamic Coupling of R-loops with Transcriptional Pausing at Gene Promoters*. *Mol Cell*, 2017. **68**(4): p. 745-757 e5.
40. Hamperl, S. and K.A. Cimprich, *Conflict Resolution in the Genome: How Transcription and Replication Make It Work*. *Cell*, 2016. **167**(6): p. 1455-1467.
41. Gaillard, H., T. Garcia-Muse, and A. Aguilera, *Replication stress and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2015. **15**(5): p. 276-89.

42. Hamperl, S. and K.A. Cimprich, *The contribution of co-transcriptional RNA:DNA hybrid structures to DNA damage and genome instability*. DNA Repair (Amst), 2014. **19**: p. 84-94.
43. Zeman, M.K. and K.A. Cimprich, *Causes and consequences of replication stress*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(1): p. 2-9.
44. Marechal, A. and L. Zou, *DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(9).
45. Li, X. and J.L. Manley, *Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability*. Cell, 2005. **122**(3): p. 365-78.
46. Helmrich, A., M. Ballarino, and L. Tora, *Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes*. Mol Cell, 2011. **44**(6): p. 966-77.
47. Flach, J. and M. Milyavsky, *Replication stress in hematopoietic stem cells in mouse and man*. Mutat Res, 2017.
48. Zou, L. and S.J. Elledge, *Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1542-8.
49. Karnitz, L.M. and L. Zou, *Molecular Pathways: Targeting ATR in Cancer Therapy*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(21): p. 4780-5.
50. Shirai, C.L., et al., *Mutant U2AF1-expressing cells are sensitive to pharmacological modulation of the spliceosome*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14060.
51. Fong, P.C., et al., *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers*. N Engl J Med, 2009. **361**(2): p. 123-34.
52. O'Neil, N.J., M.L. Bailey, and P. Hieter, *Synthetic lethality and cancer*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(10): p. 613-623.
53. Palau, A., et al., *Immunophenotypic, cytogenetic, and mutational characterization of cell lines derived from myelodysplastic syndrome patients after progression to acute myeloid leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 2017. **56**(3): p. 243-252.
54. Nakagawa, T. and S. Matozaki, *The SKM-1 leukemic cell line established from a patient with progression to myelomonocytic leukemia in myelodysplastic syndrome (MDS)-contribution to better understanding of MDS*. Leuk Lymphoma, 1995. **17**(3-4): p. 335-9.
55. Quentmeier, H., et al., *FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines*. Leukemia, 2003. **17**(1): p. 120-4.
56. Martin, P. and T. Papayannopoulou, *HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression*. Science, 1982. **216**(4551): p. 1233-5.
57. Gallagher, R., et al., *Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia*. Blood, 1979. **54**(3): p. 713-33.
58. Pederiva, C., et al., *Splicing controls the ubiquitin response during DNA double-strand break repair*. Cell Death Differ, 2016. **23**(10): p. 1648-57.
59. Bonnal, S., L. Vigevani, and J. Valcarcel, *The spliceosome as a target of novel antitumour drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(11): p. 847-59.
60. Lee, S.C., et al., *Modulation of splicing catalysis for therapeutic targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal proteins*. Nat Med, 2016. **22**(6): p. 672-8.
61. Obeng, E.A., et al., *Physiologic Expression of Sf3b1(K700E) Causes Impaired Erythropoiesis, Aberrant Splicing, and Sensitivity to Therapeutic Spliceosome Modulation*. Cancer Cell, 2016. **30**(3): p. 404-417.

62. Seiler, M., et al., *H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers*. Nat Med, 2018.
63. Steensma, D.P., et al., *Results of a Clinical Trial of H3B-8800, a Splicing Modulator, in Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS), Acute Myeloid Leukemia (AML) or Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML)*. Blood, 2019. **134**(Supplement_1): p. 673-673.
64. Kwok, M., et al., *Synthetic lethality in chronic lymphocytic leukaemia with DNA damage response defects by targeting the ATR pathway*. Lancet, 2015. **385** Suppl 1: p. S58.
65. Vendetti, F.P., et al., *The orally active and bioavailable ATR kinase inhibitor AZD6738 potentiates the anti-tumor effects of cisplatin to resolve ATM-deficient non-small cell lung cancer in vivo*. Oncotarget, 2015. **6**(42): p. 44289-305.
66. Lebeau, P.F., et al., *The trypan blue cellular debris assay: a novel low-cost method for the rapid quantification of cell death*. MethodsX, 2019. **6**: p. 1174-1180.
67. Strober, W., *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*. Curr Protoc Immunol, 2015. **111**: p. A3 B 1-A3 B 3.
68. Nguyen, H.D., et al., *Spliceosome Mutations Induce R Loop-Associated Sensitivity to ATR Inhibition in Myelodysplastic Syndromes*. Cancer Res, 2018. **78**(18): p. 5363-5374.
69. Lindsley, R.C., *Mutational complexity in myelodysplasia*. Best Pract Res Clin Haematol, 2017. **30**(4): p. 290-294.
70. Armstrong, R.N., et al., *Splicing factor mutations in the myelodysplastic syndromes: target genes and therapeutic approaches*. Adv Biol Regul, 2017.
71. Nguyen, H.D., et al., *Spliceosome Mutations Induce R loop-Associated Sensitivity to ATR Inhibition in Myelodysplastic Syndrome*. Cancer Res, 2018.
72. Singh, S., et al., *SF3B1 mutations induce R-loop accumulation and DNA damage in MDS and leukemia cells with therapeutic implications*. Leukemia, 2020.
73. Vallurupalli, M., et al., *Talazoparib Treatment Preferentially Depletes Cohesin-Mutant Clones in New In Vivo Models of Cohesin-Mutant Myeloid Diseases*. Blood, 2019. **134**(Supplement_1): p. 560-560.
74. Yip, B.H., et al., *Impact of Splicing Factor Mutations on Pre-mRNA Splicing in the Myelodysplastic Syndromes*. Curr Pharm Des, 2016. **22**(16): p. 2333-44.
75. Pollyea, D.A., et al., *Myelodysplastic syndrome-associated spliceosome gene mutations enhance innate immune signaling*. Haematologica, 2019.

7 TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: WHO-Klassifikation (2016) [6] | 6 |
| Tabelle 2: IPSS-Score Punkte Verteilung [7, 8] | 7 |
| Tabelle 3: IPSS-R Score Punkte Verteilung [9] | 7 |
| Tabelle 4: Auflistung der benutzten Antikörper | 13 |
| Tabelle 5: Auflistung benutzter Substanzen zur ATR-Inhibition und SF-Modulation | 14 |
| Tabelle 6: Klinische Daten der Patienten | 54 |
| Tabelle 7: Mutationsstatus der „common myeloid mutations“ der 6 Patienten, die keine SF-Mutation aufweisen | 55 |
| Tabelle 8: Mutationsstatus der „common myeloid mutations“ der 14 Patienten, die eine SF-Mutation aufweisen. | 56 |

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Verteilung von Mutationen in acht Spleißfaktor-Genen bei verschiedenen hämatologischen Krankheitsbildern. | 4 |
| Abbildung 2: Darstellung einer RNA:DNA Hybridstruktur in der Replikations-/Transkriptionsgabel. | 9 |
| Abbildung 3: Schematische und vereinfachte Darstellung des ATR-Signalweges bei vermehrten R-Loops induziert durch SF-Mutationen | 10 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung des Mechanismus der synthetischen Letalität. Darstellung in Anlehnung an [52] | 11 |
| Abbildung 5: Strukturformel des SF-Modulators PladB; Entnommen aus: [47] | 14 |
| Abbildung 6: Strukturformel des ATR-Inhibitors AZD6738 | 15 |
| Abbildung 7: Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, Darstellung der Zellen, der S9.6- und RPA2 (S33)-Quantität | 18 |
| Abbildung 8: Wachstumskurven von CD34 ⁺ hämatopoetischen Stammzellen von 3 MDS-Patienten nach Auftauen. | 21 |
| Abbildung 9: Darstellung der Auswertung der Zell-Vitalität mittels CTG. | 22 |
| Abbildung 10: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Zellen der Zelllinie SKM1 mit DAPI, S9.6 + Sekundärantikörper 555 und Overlay; Maßstab: 5µM. | 23 |
| Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Zellen der Zelllinie SKM1 mit DAPI, S9.6 + Sekundärantikörper 488 und Overlay; Maßstab: 5µM. | 23 |
| Abbildung 12: Vergleich Quantität von S9.6 und RPA2 (S33) mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bei zwei Zelllinien, vor und nach Behandlung mit SF-Modulator PladB | 25 |
| Abbildung 13: Vergleich Quantität von S9.6 und RPA2 (S33) bei Nabelschnurblut-Zellen vor und nach Behandlung mit PladB. | 26 |
| Abbildung 14: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von R-Loops und dem ATR-Signalweg in SFM und NSFMD CD34 ⁺ hämatopoetischen Zellen von MDS-Patienten. | 28 |
| Abbildung 15: Vergleich Quantität von S9.6 (A,C) und RPA2 (S33) (B,D) bei Patienten mit und ohne SF Mutationen und Proben von „gesunden“ Älteren. | 29 |
| Abbildung 16: Vergleich S9.6 und RPA2 (S33) Intensitäten vor und nach Behandlung mit PladB und AZD6738 bei CD34 ⁺ hämatopoetischen Stammzellen von drei MDS-Patienten | 31 |
| Abbildung 17: Dosis-Wirkungs-Kurven an den Zelllinien MOLM13 und SKM1 nach kontinuierlicher in vitro Behandlung mit drei verschiedenen ATR-Inhibitoren. | 33 |
| Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MOLM13-Zellen 48 Stunden nach Behandlung mit PladB und/oder AZD6738 | 34 |
| Abbildung 19: Reaktion von Zellen der HL60 Zelllinie auf PladB in den Konzentrationen 0.1nM, 0.5nM, 1nM, 2.5nM, 5nM, 10nM, 15nM, 25nM, 50nM. | 35 |
| Abbildung 20: Messung der Lebensfähigkeit von Zellen der HL60 Zelllinie nach Behandlung mit AZD6738 in den Konzentrationen 10µM, 5µM, 1µM, 500nM, 100nM, 50nM und 10nM zu verschiedenen Zeitpunkten. | 36 |
| Abbildung 21: Messung der Lebensfähigkeit von CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut nach Behandlung mit PladB oder AZD6738. | 37 |
| Abbildung 22: Messung der Lebensfähigkeit von CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut nach Behandlung mit PladB oder AZD6738. | 38 |
| Abbildung 23: R-Loops Quantifizierung bei CD34 ⁺ , CD34 ⁺ CD38 ⁻ , CD33 ⁺ und CD19 ⁺ Zellpopulationen im Vergleich. | 39 |
| Abbildung 24: Reaktion von SF-mutierten und nicht mutierten CD34 ⁺ Zellen auf Pladienolide B in den Konzentrationen 2.5nM, 5nM, 10nM und 20nM. | 42 |
| Abbildung 25: Reaktion von SF-mutierten und nicht mutierten CD34 ⁺ Zellen auf AZD6738 in den Konzentrationen 100nM, 500nM, 1µM und 2µM. | 44 |
| Abbildung 26: Reaktion eines SF3B1-mutierten Patienten auf AZD6738 und PladB in vier verschiedenen Konzentrationen, einzeln und in Kombination. | 46 |
| Abbildung 27: Reaktion eines ZRSR2-mutierten Patienten auf AZD6738 und PladB in vier verschiedenen Konzentrationen, einzeln und in Kombination. | 47 |
| Abbildung 28: Vergleich der Reaktion von SF-mutierten und nicht SF-mutierten Zellen auf AZD6738 und PladB einzeln und in Kombination. | 48 |
| Abbildung 29: Vergleich der Reaktion von SFRB1- und SRSF2- mutierten Zellen auf AZD6738 und PladB einzeln und in Kombination. | 49 |

| | |
|--|-----------|
| Abbildung 30: Einfluss von TP53 auf den zytotoxischen Effekt von AZD6738 bei SFM und NSFM Zellen | 50 |
| Abbildung 31: Vergleich R-Loops (S9.6) Quantität der 20 untersuchten Patientenproben, aufgereiht nach Mittelwert. | 51 |
| Abbildung 32: Vergleich R-Loops (S9.6) Quantität der 20 untersuchten Patientenproben, aufgereiht nach Mittelwert. | 51 |
| Abbildung 33: Zusammenhang zwischen R-Loops Quantität und Sensibilität auf PladB und AZD6738, Aufteilung in zwei Gruppen nach Mittelwert. | 52 |
| Abbildung 34: Zusammenhang zwischen R-Loops Quantität und Sensibilität auf PladB und AZD6738, Aufteilung in zwei Gruppen nach Median. | 53 |

9 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

| | |
|-------------------|----------------------------|
| Name und Vorname: | Knaflic, Antje Jean |
| Geburtsdatum: | 10.05.1994 |
| Geburtsort: | Saarbrücken |
| Familienstand: | ledig |
| Vater: | Dr. med. Dag Peter Knaflic |
| Mutter: | Dr. med. Gabriele Knaflic |

SCHULISCHER WERDEGANG

| | |
|------------|--|
| 2000-2004 | Grundschule Hohe Wacht, Saarbrücken |
| 2004-2012 | Deutsch-französisches Gymnasium Saarbrücken |
| 21.06.2012 | Abitur/Baccalauréat am Deutsch-Französischen Gymnasium Saarbrücken |

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

| | |
|-------------|---|
| WS2013/14 | Beginn des Medizinstudiums An der Universität Pécs, Ungarn |
| Herbst 2016 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1) |
| WS2016/17 | Beginn des klinisches Abschnittes an der Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim |
| Herbst 2019 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2) |

PUBLIKATIONEN

1. Flach J, Jann JC, **Knaflic A**, Riabov V, Streuer A, Altrock E, Xu Q, Schmitt N, Obländer J, Nowak V, Danner J, Mehravand A, Hofmann F, Palme I, Jawhar A, Wuchter P, Metzgeroth G, Nolte F, Hofmann WK, Nowak D. Replication stress signaling is a therapeutic target in myelodysplastic syndromes with splicing factor mutations. *Haematologica*. 2020 Sep 14; Online ahead of print. doi: 10.3324/haematol.2020.254193. PMID: 33054116.
2. Riabov V, Mossner M, Stöhr A, Jann JC, Streuer A, Schmitt N, **Knaflic A**, Nowak V, Weimer N, Obländer J, Palme I, Schumann C, Baldus CD, Schulze TJ, Wuchter P, Röhl H, Jawhar A, Weiss C, Boch T, Metzgeroth G, Neumann M, Hofmann WK, Nolte F, Nowak D. High erythroferrone expression in CD71⁺erythroid progenitors predicts superior survival in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2021 Jan 24. doi: 10.1111/bjh.17314. Epub ahead of print. PMID: 33486765.

10 DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich meinen Dank an den Direktor der III. Medizinischen Klinik, Herrn Prof. Dr. med. Wolf-K. Hofmann richten, für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation im Wissenschaftlichen Labor der III. Medizinischen Klinik der Medizinischen Fakultät Mannheim.

Herrn Prof. Dr. med. Daniel Nowak danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die ausgezeichnete Möglichkeit, es zu bearbeiten.

Besonderen Dank schulde ich Frau Dr. Johanna Flach für die hervorragende Betreuung. Ich danke Ihr für Ihren Input und die permanente Hilfsbereitschaft und Unterstützung, auf die ich mich immer verlassen konnte. Ebenso danke ich Ihr für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren.

Nanni Schmitt und Alexander Streuer danke ich für die herzliche Atmosphäre im Labor, die ein bisschen Abwechslung und Schokolade in den Alltag gebracht haben.

Verena Nowak, Julia Oblaender und Justine Danner danke ich für die technische Unterstützung und Aufarbeitung von Materialien.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen anderen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern des Forschungslabors für die gute Zusammenarbeit im Labor und die Diskussion und kritische Betrachtung der Ergebnisse bedanken.

Für die Durchsicht meiner Arbeit bedanke ich mich bei meiner Cousine Danisa Bresser, meinen Eltern und meinen Kommilitoninnen Iris Fein und Birga Klingler.

Für die moralische Unterstützung bedanke ich mich bei meiner ganzen Familie wie auch bei meinen Freunden, die mich in dieser Zeit immer unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Großmutter Sonja Knaflic, die mich immer ermutigt hat und nie daran gezweifelt hat, dass ich alles schaffen kann, was ich mir in den Kopf setze.