



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

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

Autor: Antje Jean Knaflic
Institut / Klinik: III. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. D. Nowak

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 Knochenmarkzellen 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.