

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

Präklinische Untersuchung von Eltrombopag in einem
patientenabgeleiteten Xenograftmodell Myelodysplastischer Syndrome

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Nanni Schmitt

aus
Weinheim
2022

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

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Myelodysplastische Syndrome	4
1.1.1 Pathogenese	4
1.1.2 Klinisches Bild und Inzidenz	6
1.1.3 Diagnostik	6
1.1.4 Klassifikation und prognostische Stratifizierung	7
1.1.5 Therapie	9
1.2 Thrombozytopenie in MDS	10
1.2.1 Inzidenz und Prognose	10
1.2.2 Pathophysiologie in MDS	11
1.2.3 Auswirkungen	11
1.3 Eltrombopag	12
1.3.1 TPO-Signalweg	12
1.3.2 EPAG-Wirkmechanismus	12
1.3.3 In-vitro- und In-vivo-Studien	13
1.3.4 Förderung der Krankheitsprogression	15
1.4 Präklinische MDS-Modelle	16
1.4.1 Zelllinien	16
1.4.2 2D- und 3D-in-vitro-Kulturen	17
1.4.3 Patientenabgeleitete Xenograftmodelle	18
1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Patienten	21
2.1.1 Knochenmarkproben	21
2.1.2 Patientenkohorte	21
2.2 Zellbiologische Methoden	21

2.2.1	Zellzahlbestimmung.....	21
2.2.2	Isolation von mononukleären Knochenmarkzellen	22
2.2.3	Anreicherung von CD34+ Stammzellen.....	22
2.2.4	Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen	23
2.2.5	Kryokonservierung.....	24
2.2.6	Proben für Xenotransplantationsexperimente.....	24
2.2.7	Herstellung des 10x Erythrozytenlysepuffers.....	25
2.3	Tierexperimentelle Methoden	25
2.3.1	Versuchstiere.....	25
2.3.2	Versuchsplan	25
2.3.3	Konditionierung.....	26
2.3.4	Analgesie.....	26
2.3.5	Inhalationsnarkose.....	27
2.3.6	Intrafemorale Transplantation	27
2.3.7	Blutentnahme	27
2.3.8	Knochenmarkpunktion.....	28
2.3.9	Verabreichung von EPAG.....	28
2.3.10	Tötung der Tiere und Probenentnahme.....	28
2.4	Zytometrische Methoden	29
2.4.1	Probenvorbereitung	29
2.4.2	Maschinelles Blutbild	30
2.4.3	Fluoreszenzfärbung.....	30
2.4.4	Durchflusszytometrische Messung	31
2.4.5	Zellsortierung.....	31
2.4.6	Auswertung.....	31
2.5	Molekularbiologische Methoden	32
2.5.1	DNA- und RNA-Aufarbeitung.....	32
2.5.2	DNA- und RNA-Messung.....	34
2.5.3	Aufkonzentrierung der DNA.....	34
2.5.4	Gesamt-Exom-Sequenzierung	35
2.5.5	Sanger-Sequenzierung.....	35
2.5.6	cDNA-Synthese	37
2.5.7	Quantitative PCR.....	37
2.6	Bioinformatische Methoden	38
2.6.1	Bioinformatische Pipeline	38
2.6.2	SciClone	39

2.6.3	Software-Pakete	39
2.7	Histologische Methoden	39
2.7.1	Knochenmarkausstriche	39
2.7.2	May-Grünwald-Giemsa-Färbung	40
2.7.3	Paraffinschnitte	41
2.7.4	Immunhistochemische Färbung.....	41
2.7.5	Bildaufnahme und -verarbeitung.....	41
2.8	Proteinbiochemische Methoden	42
2.8.1	ELISA für humanes TPO	42
2.8.2	ELISA für murines TPO	42
2.9	Statistische Methoden	42
3	ERGEBNISSE	44
3.1	Das MDS-PDX-Modell als präklinisches Werkzeug zum Testen von Therapeutika	44
3.2	Das MDS-PDX-Modell zur Evaluierung von EPAG am Beispiel von Patient P01 50	
3.3	Der Einfluss von EPAG auf die humane Thrombo- und Megakaryopoese im MDS-PDX-Modell	55
3.4	Der Einfluss von EPAG auf Krankheitsprogress und Transformation im MDS- PDX-Modell	69
3.5	Der Einfluss von EPAG auf die klonale Zusammensetzung des humanen Knochenmarks im MDS-PDX-Modell	73
4	DISKUSSION	79
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	84
7	ANHANG	94
8	LEBENS LAUF	104

9 DANKSAGUNG 107

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(s)AML	(sekundäre) akute myeloische Leukämie
+8	Trisomie des Chromosoms 8
5-Aza	5-Azacytidin
-7	Monosomie des Chromosoms 7
A	Fläche (engl. <i>area</i>)
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>analysis of variance</i>)
AUC	Fläche unter der Kurve (engl. <i>area under the curve</i>)
Best.-Nr.	Bestellnummer
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Unterscheidungsgruppe (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
CHIP	klonale Hämatopoese unbestimmten Potentials (engl. <i>clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>)
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CTRL	Kontrolle (engl. <i>control</i>)
del	Deletion, z.B. del(5q)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung nach Dulbecco (engl. <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>)
EGA	„European Genome-phenome Archive“
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	European Medicines Agency (engl. <i>European Medicines Agency</i>)
EPAG	Eltrombopag
ESA	erythropoesestimulierendes Agens
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>)
G	Gauge (= Maßeinheit für den Außendurchmesser einer Kanüle)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)
HBSS	Salzlösung nach Hanks (engl. <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
i	Isochromosom, z.B. i(17q)
IF TX	intrafemorale Transplantation
IF	Impact-Faktor

<i>IL2rg</i>	Gen der Interleukin-2-Rezeptor-Gammakette (engl. <i>interleukin-2 receptor subunit gamma</i>)
int	intermediär
inv	Inversion, z.B. inv(3)
IPSS(-R)	internationales prognostisches Punktesystem für MDS (engl. (<i>Revised</i>) <i>International Prognostic Scoring System</i>)
KM(P)	Knochenmark(punktion)
Len	Lenalidomid
LOH	Verlust der Heterozygotie (engl. <i>loss of heterozygosity</i>)
MACS	magnetische Zellseparation (engl. <i>magnetic-activated cell sorting</i>)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MDS	Myelodysplastische Syndrome
MDS-EB	MDS mit Blastenexzess
MDS-MLD	MDS mit Mehrliniendysplasie
MDS-RS	MDS mit Ringsideroblasten
MDS-RS-MLD	MDS-RS mit Mehrliniendysplasie
MDS-RS-SLD	MDS-RS mit Einliniendysplasie
MDS-SLD	MDS mit Einliniendysplasie
MDS-U	unklassifizierbares MDS
MNCs	mononukleäre Zellen (engl. <i>mononuclear cells</i>)
<i>MPL</i>	engl. <i>myoproliferative leukemia virus oncogene</i>
MPN	myeloproliferative Neoplasie
MSCs	mesenchymale Stromazellen (engl. <i>mesenchymal stromal cells</i>)
N/A	nicht verfügbar (engl. <i>not available</i>)
NaN3	Natriumazid
NCBI	„ <i>National Center for Biotechnology Information</i> “
NGS	“Sequenzierungsmethode der nächsten Generation“ (engl. <i>next generation sequencing</i>)
NOD	NOD/ShiLtJ-Mausstamm (engl. <i>non-obese diabetic</i>)
ns	nicht signifikant
NSG	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Wjl} /SzJ-Mausstamm
p	kleiner Chromosomenarm (franz. <i>bras petit</i> , „kleiner Arm“)
PB	peripheres Blut
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDX	patientenabgeleitetes Xenograft (engl. <i>patient-derived xenograft</i>)
PEG-rHuMGDF	engl. <i>pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor</i>

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLT	Thrombozyten (engl. <i>platelets</i>)
PZN	Pharmazentralnummer
q	großer Chromosomenarm (q folgt auf p im Alphabet)
R-CHOP	Kombinationstherapie aus Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
RT-qPCR	Reverse Transkriptase-quantitative PCR
<i>scid</i>	schwerer kombinierter Immundefekt (engl. <i>severe combined immune deficiency</i>), Genmutation des DNA-Reparaturkomplex-Proteins Prkdc
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i>)
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
t	Translokation, z.B. t(3q)
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor β (engl. <i>transforming growth factor β</i>)
TK	Thrombozytenkonzentrat
t-MDS	therapieassoziiertes MDS
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α (engl. <i>tumor necrosis factor α</i>)
TPO	Thrombopoetin
UPD	uniparentale Disomie
VAF	Varianzallelfrequenz (engl. <i>variant allele frequency</i>)
WES	Gesamt-Exom-Sequenzierung (engl. <i>whole exome sequencing</i>)
WHO 2016	MDS-Klassifikation nach WHO 2016
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i>)

1 EINLEITUNG

1.1 Myelodysplastische Syndrome

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine heterogene Gruppe klonaler hämatopoetischer Stammzellerkrankungen des Knochenmarks, die durch eine ineffektive Hämatopoese gekennzeichnet sind. Diese zeichnet sich durch Dysplasien in einer oder mehreren myeloischen Linien und periphere Zytopenien aus. Zudem wird das Krankheitsbild von wiederkehrenden chromosomalen Aberrationen und somatischen Mutationen sowie einer Prädisposition für die Transformation in eine akute myeloische Leukämie (AML) geprägt (Cazzola, 2020).

1.1.1 Pathogenese

Die Pathogenese von MDS basiert auf dem Erwerb von genomischen Schäden in Form von chromosomalen Aberrationen und DNA-Mutationen in frühen hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (Woll et al., 2014; Mian et al., 2015), deren Differenzierung in die myeloische Linie bereits determiniert ist. Die pathologischen Läsionen haben demnach nur Einfluss auf die Myelopoese, nicht aber die Lymphopoese. Diese malignen Stammzellen und ihre Nachkommen besitzen aufgrund ihrer somatischen Aberrationen einen Selektionsvorteil, wodurch es zur sukzessiven klonalen Besiedlung des Knochenmarks und infolge dessen zur Verdrängung der gesunden Hämatopoese kommt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Mutationen in den Genen *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *SRSF2* und *SF3B1* überproportional häufig als „Gründermutationen“ bei der Entstehung von klonaler Hämatopoese fungieren. Chromosomale Läsionen und weitere Genmutationen werden überwiegend erst im späteren Verlauf der klonalen Evolution erworben (Papaemmanuil et al., 2013; Mossner et al., 2016; Makiyama et al., 2017). Interessanterweise können auch mit zunehmendem Alter (>65 Jahre) in mindestens 10 % der hämatologisch gesunden Personen diese „Gründermutationen“, insbesondere *DNMT3A*, *TET2* und *ASXL1*, nachgewiesen werden (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014). Zwischen der Transformation von „klonaler Hämatopoese unbestimmten Potentials“, kurz CHIP (engl. *clonal hematopoiesis of indeterminate potential*), über MDS hin zu einer sekundären AML (sAML), die ein Drittel der MDS-Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung entwickeln (Greenberg et al., 1997), liegt eine Latenzzeit von zum Teil mehreren Jahren. Dies zeigt, dass in einem dynamischen Prozess eine schrittweise Akkumulation von genomischen Schäden und multiplen Selektionszyklen stattfindet (Walter et al., 2012).

Chromosomenaberrationen sind ein bestimmender Faktor in der Pathogenese, Diagnose und Prognose von MDS. Wiederkehrende chromosomale Anomalien werden bei 32-52 % der *de novo* (Haase et al., 2007; Papaemmanuil et al., 2013; Haferlach et al., 2014) und etwa 80 % der therapieassoziierten MDS (t-MDS)-Patienten (Le Beau et al., 1986) festgestellt. Dabei unterscheidet man zwischen numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen. Von numerischen Chromosomenaberrationen spricht man beim Verlust (Monosomie) oder dem Gewinn eines Chromosoms (z.B. Trisomie). Zu den strukturellen Chromosomenaberrationen gehört der Verlust von einzelnen Chromosomenteilen (Deletion), der Austausch von Chromosomenteilen zwischen verschiedenen Chromosomen (Translokation), die Drehung eines Chromosomenabschnittes um 180 ° (Inversion) und die Fehlbildung von Isochromosomen, bei der der Verlust eines Arms, welcher durch eine Kopie des anderen Arms ersetzt wurde, zur Folge hat, dass das Chromosom nur aus zwei kurzen bzw. langen Armen besteht. Die häufigsten chromosomalen Aberrationen in MDS sind in **Tabelle 1** dargestellt.

Tabelle 1: Häufige chromosomale Aberrationen in MDS (Swedlow et al., 2017). t-MDS, therapieassoziiertes MDS; p, kleiner Chromosomenarm; q, großer Chromosomenarm; del, Deletion; t, Translokation; inv, Inversion.

Chromosomale Aberrationen	Frequenz	
	MDS	t-MDS
Unbalanciert		
Trisomie 8	10 %	
Monosomie 7 oder del(7q)	10 %	50 %
Del(5q)	10 %	40 %
Del(20q)	5-8 %	
Verlust des Y-Chromosoms	5 %	
Isochromosom 17q oder t(17p)	3-5 %	25-30 %
Monosomie 13 oder del(13q)	3 %	
Del(11q)	3 %	
Del(12p) oder t(12p)	3 %	
Del(9q)	1-2 %	
Isodizentrisches Chromosom (X)(q13)	1-2 %	
Balanciert		
t(11;16)(q23.3;p13.3)		3 %
t(3;21)(q26.2;q22.1)		2 %
t(1;3)(p36.3;q21.2)	1 %	
t(2;11)(p21;q23,3)	1 %	
inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26,2)	1 %	
t(6;9)(p23;q34.1)	1 %	

Aufgrund der rasanten Entwicklung und Etablierung der „Next Generation Sequencing“ (NGS)-Technologien, die eine kostengünstige Sequenzierung ganzer Exome oder Genome ermöglichen, wurde im letzten Jahrzehnt eine Vielzahl rekurrenter MDS-spezifischer Mutationen identifiziert. In zwei groß angelegten Studien bestehend aus Kohorten mit $n = 738$ (Papaemmanuil et al., 2013) und $n = 944$ MDS-Patienten (Haerlach et al., 2014) wurde der Mutationsstatus von über 100 Genen, die zuvor in MDS oder anderen myeloischen Erkrankungen dokumentiert wurden, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass 74-90 % aller MDS-Patienten mindestens eine rekurrente somatische Mutation besitzen. Der Durchschnitt liegt bei zwei bis drei pathogenen Mutationen pro MDS-Patient. Das dabei offenbarte Mutationsspektrum ist äußerst heterogen und setzt sich aus über 40 Genen zusammen, die sich allerdings gemeinsamen biologischen Prozessen zuordnen lassen. Die am häufigsten mutierten Gene in MDS, d.h. in mindestens 5 % der Fälle (siehe **Tabelle 2**), kodieren für Proteine, die das RNA-Spleißen kontrollieren (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* und *ZRSR2*) oder die Genexpression mittels DNA-Methylierung (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*) oder Histonmodifikation (*ASXL1*, *EZH2*) regulieren. Andere häufig mutierte Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren (*RUNX1*, *NRAS*, *BCOR*), Signalproteine (*CBL*), den Tumorsuppressor p53 (*TP53*) und Proteine des Cohesinkomplexes (*STAG2*) (Swedlow et al., 2017).

Tabelle 2: Häufige Genmutationen in MDS und ihre prognostische Auswirkung (Swedlow et al., 2017).

Genmutation	Häufigkeit	Prognostische Auswirkung
<i>SF3B1</i>	20-30 %	günstig
<i>TET2</i>	20-30 %	unklar
<i>ASXL1</i>	15-20 %	ungünstig
<i>SRSF2</i>	~15 %	ungünstig
<i>DNMT3A</i>	~10 %	ungünstig
<i>RUNX1</i>	~10 %	ungünstig
<i>U2AF1</i>	5-10 %	ungünstig
<i>TP53</i>	5-10 %	ungünstig
<i>EZH2</i>	5-10 %	ungünstig
<i>ZRSR2</i>	5-10 %	unklar
<i>STAG2</i>	5-7 %	ungünstig
<i>IDH1/IDH2</i>	~5 %	unklar
<i>CBL</i>	~5 %	ungünstig
<i>NRAS</i>	~5 %	ungünstig
<i>BCOR</i>	~5 %	ungünstig

1.1.2 Klinisches Bild und Inzidenz

Die klinische Manifestation von MDS ist sehr heterogen. Die unspezifische Symptomatik der Patienten ist von den bestehenden peripheren Zytopenien sowie deren Ausprägungsgrad abhängig. MDS-Patienten sind häufig klinisch zunächst unauffällig und werden daher oft als Zufallsbefund im Rahmen einer Routineuntersuchung diagnostiziert. In den meisten Fällen manifestiert sich die Erkrankung als erstes in Form einer Anämie (Greenberg et al., 2002). Zu den typischen Symptomen anämischer Patienten zählen Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Atembeschwerden, verminderte Leistungsfähigkeit, Schwindel, Herzrasen sowie Kopfschmerzen. Obwohl etwa zwei Drittel aller MDS-Patienten bei Erstdiagnose eine Thrombozytopenie aufweisen, sind Blutungskomplikationen eher selten (Kantarjian et al., 2007). Es kommt vor allem zu Petechien, Zahnfleischbluten oder Hämatomen nach leichten Traumata. Eine Neutropenie kann bei etwa jedem dritten Patienten im Zuge der Erstdiagnose festgestellt werden, was eine erhöhte Infektanfälligkeit zur Folge hat (Greenberg et al., 2002). Manche Patienten präsentieren sich auch mit einer Bi- oder Panzytopenie.

Die rohe Inzidenz bei MDS liegt bei ca. 4,9/100.000 Einwohnern pro Jahr (Germing et al., 2004; Neukirchen et al., 2011). Dabei steigt die Inzidenz mit zunehmendem Alter, während diese bei Männern deutlich höher ist als bei Frauen vor allem in den Altersgruppen ab 60 Jahren. Im Alter zwischen 70 und 80 Jahren steigt die Inzidenz auf >20/100.000 Einwohnern pro Jahr an. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei ca. 73 Jahren, wobei Männer im Durchschnitt früher erkranken als Frauen.

1.1.3 Diagnostik

Um die eindeutige Diagnose eines MDS stellen zu können, ist eine umfangreiche Diagnostik von Blut und Knochenmark notwendig. Nach gesicherter Diagnose werden diese Befunde auch zur anschließenden MDS-Klassifizierung und Risikostratifizierung der Patienten herangezogen (siehe 1.1.4).

Zur Analyse des peripheren Bluts werden Blutbild und durchflusszytometrisches sowie mikroskopisches Differenzialblutbild genutzt. Diese geben zunächst eine Auskunft über die Anzahl und Zusammensetzung der Zellen im Blut wie auch ihre Form und Größe. Dabei stellt das Vorliegen von mindestens einer Zytopenie im peripheren Blut ein wesentliches diagnostisches Kriterium bei MDS dar. Für die jeweiligen myeloischen Zelllinien ist eine Zytopenie durch folgende Schwellenwerte definiert: Hämoglobin <10 g/dl, Thrombozytenzahl $<100 \times 10^9/l$ und absolute Neutrophilenzahl $<1,8 \times 10^9/l$. Zytomorphologisch wird der Anteil der Retikulozyten und peripheren Blasten bestimmt. Im Blutserum werden zudem die Konzentrationsspiegel von Laktatdehydrogenase, Bilirubin, Ferritin, Erythropoetin, Folsäure und Vitamin B12 bestimmt (Malcovati et al., 2013; Hofmann et al., 2020).

Im Knochenmark umfasst die Zytologie des Aspirats die Bestimmung der Zellularität, des medullären Blastenanteils, und des Vorhandenseins von Dysplasiezeichen, Auerstäbchen sowie Ringsideroblasten. Dabei sollte unter prognostischen Gesichtspunkten eine möglichst exakte Bestimmung des Blastenanteils erfolgen (0-2 % vs. 3-4 % vs. 5-9 % vs. 10-19 %). Der Schwellenwert bei medullären Blasten zur Unterscheidung zwischen MDS und AML liegt bei ≥ 20 %. Ergänzend kann noch eine Immunophänotypisierung des Knochenmarks mittels Durchflusszytometrie durchgeführt werden. Die konventionelle Zytogenetik mit Chromosomenbänderungsanalyse wird zum Nachweis von MDS-typischen numerischen und strukturellen Chromosomenanomalien durchgeführt. Eine Knochenmarkbiopsie mit anschließender Histopathologie ist von Bedeutung, um eine Aussage zum Vorliegen von Knochenmarkfibrose oder -infiltraten treffen zu können. Abschließend erlaubt die Durchführung einer molekulargenetischen Untersuchung zur Identifizierung von rekurrenten somatischen Mutationen die Diagnose eines MDS zu unterstützen und wird mittlerweile, in Ergänzung zu den etablierten Parametern, ebenfalls zur Einschätzung der Prognose berücksichtigt (Malcovati et al., 2013; Hofmann et al., 2020).

Darüber hinaus müssen zahlreiche Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden. Neben anderen hämatologischen Erkrankungen, die sich symptomatisch ähnlich darstellen und ebenfalls mit Zytopenien und dysplastischen Veränderungen präsentieren, wie die aplastische Anämie, eine Immunthrombozytopenie oder die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie, ist auch ein Ausschluss von Mangelerscheinungen, toxischen Knochenmarkschäden und reaktiven Knochenmarkveränderungen nötig. Abschließend muss eine eindeutige Abgrenzung zu anderen klonalen myeloischen Erkrankungen, wie einer chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML), einer AML oder myeloproliferativen Neoplasien, vorgenommen werden (Malcovati et al., 2013; Hofmann et al., 2020).

1.1.4 Klassifikation und prognostische Stratifizierung

Die Gruppe der MDS wird in verschiedene Subgruppen unterteilt. Die gängigste Version der MDS-Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl. *World Health Organization*) stammt aus dem Jahre 2016 (Arber et al., 2016) und unterteilt die Entität MDS in MDS mit Einliniendysplasie (MDS-SLD), MDS mit Mehrliniendysplasie (MDS-MLD), MDS-SLD mit Ringsideroblasten (MDS-RS-SLD), MDS-MLD mit Ringsideroblasten (MDS-RS-MLD), MDS mit isolierter 5q-Deletion, MDS mit Blastenzexzess der Kategorie 1 (MDS-EB-1) und 2 (MDS-EB-2), sowie den unklassifizierbaren MDS (MDS-U). Bei der Klassifizierung werden die Anzahl der dysplastischen myeloischen Linien und Zytopenien, der prozentuale Anteil der erythroiden Zellen mit Ringsideroblasten, der Prozentsatz der Blasten im Knochenmark bzw. peripheren Blut oder das Vorhandensein von Auerstäbchen sowie der Karyotyp der Patienten berücksichtigt (siehe **Tabelle 3**).

Tabelle 3: MDS-Klassifikation nach WHO 2016 (Arber et al., 2016). KM, Knochenmark; PB, peripheres Blut

Kategorie	Dysplasien	Zytopenien ¹	Ringsideroblasten ²	Blasten im KM und PB	Karyotyp
MDS mit Einliniendysplasie (MDS-SLD)	1	1 oder 2	<15 % / <5 % ³	BM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	alle, außer del(5q) +/- eine andere Nicht-Chr. 7 Aberration
MDS mit Mehrliniendysplasie (MDS-MLD)	2 oder 3	1-3	<15 % / <5 % ³	BM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	alle, außer del(5q) +/- eine andere Nicht-Chr. 7 Aberration
MDS mit Ringsideroblasten (MDS-RS)					
MDS-RS mit Einliniendysplasie	1	1 oder 2	≥15 % / ≥5 % ³	BM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	alle, außer del(5q) +/- eine andere Nicht-Chr. 7 Aberration 5q
MDS-RS mit Mehrliniendysplasie	2 oder 3	1-3	≥15 % / ≥5 % ³	BM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	alle, außer del(5q) +/- eine andere Nicht-Chr. 7 Aberration
MDS mit isolierter del(5q)	1-3	1-3	irrelevant	BM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	del(5q) isoliert oder mit einer anderen Nicht-Chr. 7 Aberration
MDS mit Blastenexzess (MDS-EB)					
MDS-EB-1	0-3	1-3	irrelevant	BM 5-9 % oder PB 2-4 %, keine Auerstäbchen	irrelevant
MDS-EB-2	0-3	1-3	irrelevant	BM 10-19 % oder PB 5-19 % oder Auerstäbchen	irrelevant
MDS, unklassifizierbar					
mit 1 % peripheren Blasten	1-3	1-3	irrelevant	BM <5 %, PB=1 % ⁴ , keine Auerstäbchen	irrelevant
mit Einliniendysplasie und Panzytopenie	1	3	irrelevant	BM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	alle, außer del(5q) +/- eine andere Nicht-Chr. 7 Aberration
Basierend auf definierenden zytogenetischen Veränderungen	0	1-3	<15 % ⁵	BM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	MDS-definierende Abnormalität

¹ Zytopenien definiert als: Hämoglobin <10 g/dl, Thrombozytenzahl <100 x 10⁹/l und absolute Neutrophilenzahl <1,8 x 10⁹/L

² prozentualer Anteil der erythroiden Zellen mit Ringsideroblasten

³ falls eine SF3B1-Mutation vorhanden ist

⁴ 1 % periphere Blasten müssen zu 2 verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert worden sein

⁵ Fälle mit ≥15 % Ringsideroblasten haben definitionsgemäß eine signifikante Dyserythropoese und werden daher als MDS-RS-SLD klassifiziert

Um bei MDS eine Abschätzung der Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens und der Transformation in eine AML vornehmen zu können, werden neben Alter, Geschlecht und Komorbidität der Patienten auch krankheitsbiologische Parameter herangezogen. Zur individuellen Risikostratifizierung von Patienten wurde 1997 das „*International Prognostic Scoring System*“ (IPSS) (Greenberg et al., 1997) eingeführt, das 2012 in einer überarbeiteten Form, dem IPSS-R (siehe **Tabelle 4** und **Tabelle 5**), veröffentlicht wurde (Greenberg et al., 2012). Dabei haben sich der medulläre Blastenteil, zytogenetische Befunde und das Bestehen sowie der Schweregrad von Zytopenien als wichtige prognostische Indikatoren etabliert. Zusammen mit der vorliegenden MDS-Klassifikation wird diese Prognose dann in der Klinik zum Treffen von Therapieentscheidungen genutzt.

Tabelle 4: Internationales prognostisches Punktesystem IPSS-R (Greenberg et al., 2012). KM, Knochenmark; Hb, Hämoglobin; PLT, Thrombozyten.

Punkte-Score	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Karyotyp	A	-	B	-	C	D	E
KM-Blasten (%)	≤2	-	>2-<5	-	5-10	>10	-
Hb-Wert (g/dl)	≥10	-	8-<10	<8	-	-	-
PLT (/nl)	≥100	50-<100	<50	-	-	-	-
Neutrophile (/nl)	≥0,8	<0,8	-	-	-	-	-

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

B: Gut (normal, del(5q), del(12p), del(20q), Doppelklon mit del(5q) außer chr7)

C: Intermediär (del(7q), +8, +19, i(17q), andere Einzel- oder Doppelklone)

D: Schlecht (-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), Doppelklon mit -7/del(7q), komplex (≥ 3 Aberrationen))

E: Sehr schlecht (komplex >3 Aberrationen)

Tabelle 5: Risikokategorien und Prognose nach IPSS-R (Greenberg et al., 2012). AML, akute myeloische Leukämie.

Punkte	Risiko-Score	Überleben in Jahren (Median)	AML/25 %*
≤ 1,5	sehr niedrig	8,8	nicht erreicht
2-3	niedrig	5,3	10,8
3,5-4,5	intermediär	3,0	3,2
5-6	hoch	1,6	1,4
>6	sehr hoch	0,8	0,73

*Mediane Zeit bis zu 25 % AML-Evolution (95 % KI), p < 0,001.

Zu den prognostisch relevantesten zytogenetischen Anomalien gehören laut „*Comprehensive Cytogenetic Scoring System*“ der Verlust des Y-Chromosoms (-Y), eine Monosomie des Chromosoms 7 (-7), eine Trisomie der Chromosomen 8 (+8) und 19 (+19), ein Isochromosom der Chromosomenregion 17q (i(17q)), eine Translokation der Chromosomenregion 3q (t(3q)), eine Inversion des Chromosoms 3 (inv(3)) und Deletionen (del) der Chromosomenregionen 3q, 5q, 7q, 11q, 12p und 20q (Schanz et al., 2012). Dies spiegelt sich auch im IPSS-R wider (siehe **Tabelle 4**).

Obwohl bisher noch kein validiertes, umfassendes Prognosesystem existiert, das molekulare Befunde mit einbezieht, wird die Molekulargenetik bereits zur Risikostratifizierung bei MDS eingesetzt. Beispielsweise stellen Mutationen im SF3B1-Gen unabhängige Prädiktoren für ein günstiges klinisches Ergebnis dar (Malcovati et al., 2011), während Mutationen in Genen wie *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1*, und *ASXL1* Prädiktoren für ein schlechtes Gesamtüberleben bei MDS-Patienten sind, unabhängig von deren Prognoseabschätzung mittels IPSS-R (Bejar et al., 2011) (siehe **Tabelle 2**). Darüber hinaus können die somatischen Mutationen als Biomarker genutzt werden, um den Krankheitsverlauf zu überwachen oder einen möglichen Progress zu erkennen.

1.1.5 Therapie

MDS präsentieren sich mit einer erheblichen Heterogenität in der Klinik, sowohl bei ihrer Symptomatik sowie ihrer Prognose bzgl. Überleben und Progressionsrisiko. Daher ergibt sich für jeden Patienten ein individuelles Therapiekonzept, das die „*Watch and wait*“-Strategie, supportive und MDS-spezifische Therapieansätze, aber auch die Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation umfassen kann. Dieses wird in Abhängigkeit von der Risikoklasse, dem Alter und dem Allgemeinzustand des Pati-

enten entworfen. Bei Niedrigrisiko-MDS-Patienten steht die Linderung der zytopenienbedingten Symptomatik bei gleichzeitiger Reduktion der Transfusionsbedürftigkeit im Vordergrund. In Fällen mit Hochrisiko-MDS besteht das Therapieziel darin, die Krankheitsprogression zu verlangsamen und somit das Überleben des Patienten zu verbessern (Platzbecker, 2019).

Bei MDS-Patienten mit minderschweren, asymptomatischen Zytopenien ohne Transfusionsabhängigkeit ist die „*Watch and wait*“-Strategie, also ein engmaschiges Beobachten des Patienten bzw. dessen Krankheitsverlauf und Abwarten ohne therapeutische Intervention, zunächst ausreichend. Die regelmäßige Transfusion von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten erfolgt erst mit dem Auftreten von Symptomen, d.h. möglichst nicht prophylaktisch, um eine Alloimmunisierung zu vermeiden. Bei polytransfundenen, anämischen Patienten kann eine daraus resultierende Eisenüberladung zudem die Behandlung mit Eisenchelatoren notwendig machen. Transfusionsabhängige MDS-Patienten können darüber hinaus mit Erythropoese-stimulierenden Agenzien oder, obwohl bisher nicht für MDS zugelassen, im Rahmen eines individuellen Heilversuchs mit Thrombopoetin (TPO)-Rezeptor-Agonisten behandelt werden, um die vorliegende Zytopenie und deren Symptome zu lindern, und den Transfusionsbedarf zu reduzieren. Im Falle einer schweren Neutropenie und/oder dem Vorliegen einer Infektion ist die Verabreichung von Antibiotika indiziert. Bei wiederholten Infekten kann zusätzlich die Gabe von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF, engl. *granulocyte colony-stimulating factor*) zur transienten Erhöhung der neutrophilen Granulozyten in Betracht gezogen werden (Platzbecker, 2019).

Transfusionsbedürftige, anämische MDS-Patienten, die eine Deletion auf dem langen Arm von Chromosom 5 aufweisen (del(5q)), werden sehr erfolgreich mit dem immunmodulatorischen Therapeutikum Lenalidomid behandelt. Im Verlauf der Behandlung kommt es bei einer Mehrheit der Patienten zu einer Transfusionsfreiheit sowie zu einem zytogenetischen Ansprechen (Fenaux et al., 2011). Hochrisiko-MDS-Patienten, für die eine allogene Stammzelltransplantation nicht geeignet ist, erhalten eine Behandlung mit der demethylierenden Substanz 5-Azacytidin. Diese führt in dieser Gruppe von Patienten zu einem signifikant längeren Gesamt- und progressionsfreien Überleben (Fenaux et al., 2009). Sprechen Patienten nicht oder nicht mehr auf die Therapie mit 5-Azacytidin an, kann auch Decitabin, eine weitere demethylierende Substanz, eingesetzt werden, die ebenfalls das Progressionsrisiko mindert (Lübbert et al., 2011). Das momentan einzige potentiell kurative Therapieverfahren für MDS-Patienten besteht in der Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation. Dieses Verfahren kommt vor allem für Hochrisiko-MDS-Patienten in klinisch gutem Zustand und ohne schwere Komorbiditäten in Frage, bei denen ansonsten mit einer raschen Progression zu rechnen wäre (Platzbecker, 2019).

1.2 Thrombozytopenie in MDS

1.2.1 Inzidenz und Prognose

Eine Thrombozytopenie ist durch eine Thrombozytenzahl von weniger als $100 \times 10^9/L$ im peripheren Blut definiert (Greenberg et al., 1997) und tritt bei MDS-Patienten mit einer geschätzten Prävalenz von 40–65 % auf (Kantarjian et al., 2007), wobei Patienten mit Hochrisiko-MDS tendenziell häufiger betroffen sind (Sekeres et al., 2008). Bei der Thrombozytopenie handelt es sich um eine häufige Komplikation, die lebensbedrohliche Blutungsereignisse zur Folge haben kann, und mit einer erhöhten Morbidität und schlechteren Überlebenschance der Patienten einhergeht (Kantarjian et al., 2007; Gonzalez-Porras et al. 2011). Die Häufigkeit von Todesfällen bei thrombozytopenen

MDS-Patienten, die mit Blutungsereignissen in Verbindung stehen, liegt Schätzungen zufolge bei 14–24 % (Kantarjian et al., 2007). Darüber hinaus besteht bei Patienten mit MDS bereits ab einer Thrombozytenzahl von weniger als $100 \times 10^9/L$ ein signifikant höheres Risiko der Progression in eine sAML (Neukirchen et al., 2009). Daher stellt der Schweregrad der Thrombozytopenie bei MDS-Patienten einen unabhängigen, ungünstigen Faktor dar (de Swart et al., 2015), der Teil der Prognoseeinstufung nach IPSS-R ist (Greenberg et al., 2012).

1.2.2 Pathophysiologie in MDS

Die pathophysiologischen Mechanismen, die bei MDS zu einer Thrombozytopenie führen, sind multifaktoriell und noch nicht in Gänze erforscht. Zu den Auslösern zählen unter anderem eine gestörte Proliferation und Differenzierung (Hofmann et al., 2000; Kalina et al., 2000), und eine erhöhte Apoptose der Megakaryozyten (Houwerzijl et al., 2005; Houwerzijl et al., 2006), jener Zellen, die im Knochenmark für die Produktion der Thrombozyten verantwortlich sind. Dies resultiert in jedem Fall in einer ineffizienten Thrombozytenproduktion. Darüber hinaus kann es zu einem beschleunigten Abbau der Thrombozyten im peripheren Blut kommen (Bourgeois et al., 2001; Houwerzijl et al., 2005). Inhibitorische Zytokine wie TGF- β (engl. *transforming growth factor β*), Interferon- α und $-\gamma$ sowie TNF- α (engl. *tumor necrosis factor α*), die im Serum von MDS-Patienten erhöht sind (Allampallam et al., 2002), induzieren durch die Aktivierung des „Mitogen-aktivierte Proteinkinase“ (MAPK)-Signalwegs Apoptose in MDS-Knochenmarkszellen, was wiederum zu ineffektiver Megakaryopoese führt (Navas et al., 2006). Ähnlich wie bei der Immunthrombozytopenie, eine durch eine Autoimmunreaktion erworbene Form der Thrombozytopenie, konnten auch bei manchen MDS-Patienten die Zerstörung von Thrombozyten und Megakaryozyten durch Autoantikörper nachgewiesen werden (Gilli et al., 2012; Elzaem et al., 2021). In einer Studie mit Sequenzierungsdaten von $n = 439$ MDS-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Mutationen *RUNX1*, *TP53* und *NRAS* mit einer schweren Thrombozytopenie und einem erhöhten Anteil an Blasten im Knochenmark assoziiert sind (Bejar et al., 2011). Zudem induzieren Chemotherapie und MDS-Standardtherapeutika wie Lenalidomid oder 5-Azacytidin eine zumindest vorübergehende Thrombozytopenie oder verschlimmern einen bereits bestehenden Mangel an Thrombozyten zusätzlich, was eine Dosisreduktion oder eine Unterbrechung bzw. einen Abbruch der Behandlung erforderlich machen kann und somit letztendlich den Behandlungserfolg mindert (List et al., 2006; Kantarjian et al., 2006; Fenaux et al., 2009).

1.2.3 Auswirkungen

Etwa 20 % der thrombozytopenen MDS-Patienten sind transfusionsabhängig, d.h. sie sind auf regelmäßige supportive Thrombozytentransfusionen angewiesen (Sekeres et al., 2008; Neukirchen et al., 2009). Die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten stellt dabei zwar eine wirksame Methode zur vorübergehenden Erhöhung der Thrombozytenzahl dar, ist jedoch mit nicht unerheblichen Risiken wie Infektionen, Transfusionsreaktionen oder dem Auftreten einer transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz verbunden (Gupta et al., 1999; Prodger et al., 2019). Vor allem bei regelmäßiger Anwendung droht zudem eine Alloimmunisierung, die die Patienten letztendlich transfusionsresistent macht (Prodger et al., 2019). Aus diesen Gründen bedarf es dringend besserer Alternativen zur Behandlung von thrombozytopenen MDS-Patienten.

1.3 Eltrombopag

Eltrombopag (EPAG) ist ein oral verabreichter, niedermolekularer, nicht-peptidischer TPO-Rezeptor-Agonist, der zur Behandlung von Thrombozytopenien eingesetzt wird. Er besitzt eine Zulassung zur Anwendung bei immunidiopathischer thrombozytopenischer Purpura, Hepatitis-C-Virusinfektionen mit bestehender Thrombozytopenie sowie schwerer aplastischer Anämie. Sein Handelsname in Europa lautet Revolade®. Dabei wirkt EPAG als Mimetikum des Zytokins TPO, das als Hauptregulator der Megakaryo- und Thrombopoese fungiert (Kaushansky et al., 1994; de Sauvage et al., 1996).

1.3.1 TPO-Signalweg

TPO wird hauptsächlich in der Leber und den Nieren produziert und bindet an die extrazelluläre Domäne des TPO-Rezeptors, auch als c-Mpl-Rezeptor bezeichnet. Der c-Mpl-Rezeptor wird durch das Gen *MPL* (engl. *myoproliferative leukemia virus oncogene*) kodiert (Drachman und Kaushansky, 1997) und vor allem auf der Oberfläche von Vertretern der megakaryozytären Abstammungslinie, Thrombozyten und den meisten hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (Debili et al., 1995; Solar et al., 1998). Die Bindung von TPO an den Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung dieses, die zur Aktivierung der Tyrosinkinase JAK2 aus der Familie der Januskinasen führt (Miyakawa et al., 1995; Tortolani et al., 1995). Infolgedessen werden mehrere Signalmoleküle rekrutiert und aktiviert, die die zelluläre Antwort auf TPO vermitteln (Bhat et al., 2018). Darunter die Mitglieder der Proteinfamilien „Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription“ (STAT), MAPK und „Phosphoinositid-3-Kinasen“ (PI3K) (Bacon et al., 1995; Miyakawa et al., 1996; Rojnuckarin et al., 1999; Geddis et al., 2001). Dabei sind der JAK/STAT- und MAPK/ERF-Signalweg an der Proliferation und Differenzierung von Megakaryozyten und deren Vorläuferzellen beteiligt (Alexander et al., 1996; Tong und Lodish, 2004; Rouyez et al., 1997; Fichelson et al., 1999), während der PI3K/AKT-Weg für deren Zellzyklusprogression erforderlich ist (Geddis et al. 2001; Nakao et al. 2008). Zirkulierendes TPO wird schnell von Blutplättchen und Megakaryozyten ausgeschieden, so dass der TPO-Spiegel im Blutplasma in umgekehrter, proportionaler Beziehung zur gesamten Thrombozytenmasse steht (Kuter und Rosenberg, 1995).

1.3.2 EPAG-Wirkmechanismus

EPAG bindet dagegen nicht an die extrazelluläre TPO-Bindestelle, sondern die Transmembrandomäne des c-Mpl-Rezeptors (Kim et al., 2007), was ein Konkurrieren um die aktive Bindungsstelle mit dem endogenen TPO verhindert und somit additive Effekte bei der Signaltransduktion ermöglicht (Erickson-Miller et al., 2009). Zudem weist EPAG eine hohe rezeptor- und speziesspezifische Bindungsselektivität für den humanen c-Mpl-Rezeptor auf (Erickson-Miller et al., 2005). Die Signalkaskade, die durch EPAG induziert wird, stimuliert die humane Megakaryopoese in gleichem Maße wie das endogene TPO (Duffy und Erickson-Miller, 2007), unterscheidet sich allerdings bei der Aktivierung nachgeschalteter Ziele: Während TPO sowohl STAT3 und STAT5 aktiviert, kommt es im Zuge der Signalübertragung mittels EPAG nur zur Phosphorylierung von STAT5 (Will et al., 2009), zudem bleibt eine Aktivierung von AKT aus (Erhardt et al., 2009). Diese Unterschiede in der durch EPAG stimulierten Signalübertragung stehen mutmaßlich mit dessen einzigartiger Bindung an den c-Mpl-Rezeptor im Zusammenhang.

1.3.3 In-vitro- und In-vivo-Studien

1.3.3.1 MPL und TPO in MDS und AML

In über 40 % der MDS-Patienten mit Blastenüberschuss und AML-Patienten konnte eine erhöhte Expression von *MPL* in Proben aus peripherem Blut bzw. Knochenmark im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt werden, welche mit dem Anteil der CD34-positiven Blastenpopulation korreliert (Vigon et al., 1993; Bouscary et al., 1995). Diese gesteigerte *MPL*-Expression besitzt einen negativen Einfluss auf die Prognose und das Gesamtüberleben der Patienten, und erhöht im Falle von MDS insbesondere das Risiko für die Entwicklung einer sAML (Bouscary et al., 1995; Wetzler et al., 1997). *In vitro* stimuliert TPO die Vermehrung von humanen multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen (Kobayashi et al., 1996). In Mausexperimenten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass TPO sowohl den Erhalt ruhender hämatopoetischer Stammzellen als auch deren Expansion nach einer Transplantation reguliert (Fox et al., 2002; Qian et al., 2007). In In-vitro-Experimenten mit primären Knochenmarksproben von MDS-Patienten konnte allerdings gezeigt werden, dass TPO neben der gesunden auch die maligne Hämatopoese stimuliert (Fontenay-Roupie et al., 1998). Auch in primären AML-Proben wurde eine Förderung der Proliferation durch TPO unabhängig vom AML-Subtyp beobachtet (Matsumura et al., 1996). Zudem konnten in AML-Patienten, die funktionelles *MPL* auf Blasten exprimierten, unverhältnismäßig niedrige TPO-Plasmaspiegel mittels Reduktion dieser Blasten infolge einer erfolgreichen Induktionstherapie wieder normalisiert werden (Corazza et al., 2006). Demnach ermöglicht die erhöhte *MPL*-Expression auf Blasten die Nutzung von endogenem TPO als leukämischen Wachstumsfaktor.

1.3.3.2 EPAG in MDS und AML

Für EPAG konnte in In-vitro-Experimenten hingegen gezeigt werden, dass es die Proliferation verschiedener Leukämiezelllinien sowie primärer Knochenmarkszellen von MDS- und AML-Patienten hemmt und die Differenzierung leukämischer Zellen und die Bildung megakaryozytärer Kolonien fördert (Will et al., 2009; Erickson-Miller et al., 2010; Roth et al., 2012). In zwei Leukämiemausmodellen führte die Behandlung mit EPAG zu einem verlängerten Überleben der Mäuse (Roth et al., 2012). In patientenabgeleiteten MDS- bzw. AML-PDX-Modellen wurde unter der Behandlung mit EPAG ein tendenziell niedrigerer humaner Chimärismus festgestellt (Will et al., 2009). Die beobachtete antileukämische Wirkung EPAGs ist unabhängig von dessen Interaktion mit dem c-Mpl-Rezeptor und konnte auf die Reduktion von intrazellulärem Eisen durch EPAG zurückgeführt werden (Roth et al., 2012; Vlachodimitropoulou et al., 2017). Zudem konnte gezeigt werden, dass EPAG einen positiven Einfluss auf die gesunde humane Hämatopoese besitzt indem es, ebenfalls unabhängig vom c-Mpl-Rezeptor, die Differenzierung multipotenter Vorläuferzellen und die Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen fördert (Kao et al., 2018).

1.3.3.3 Klinische Studien

1.3.3.4 TPO-Rezeptor-Agonisten: Erste Generation

Zu den TPO-Rezeptor-Agonisten der ersten Generation gehörten rekombinantes humanes TPO und das rekombinante, pegylierte Protein PEG-rHuMGDF (engl. *pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor*) (Kuter und Begley, 2002). In einem Fallbericht eines MDS-Patienten, der mit rHuMGDF behandelt wurde, konnte ein Anstieg der Thrombozytenzahlen sowie der Hämoglobinkonzentration beobachtet werden (Kizaki et al., 2003). Obwohl beide Substanzen in klinischen Studien insgesamt gute Erfolge erzielten, erwiesen sie sich als zu immunogen, da es

bei einigen Krebspatienten sowie gesunden Probanden zur Ausbildung von neutralisierenden Antikörpern kam, die mit dem endogenen TPO kreuzreagierten und somit zu schweren Thrombozytopenien führten (Li et al., 2001; Basser et al., 2002).

1.3.3.5 TPO-Rezeptor-Agonisten: Zweite Generation

TPO-Rezeptor-Agonisten der neueren Generation, wie EPAG oder Romiplostim, wurden in zahlreichen klinischen Studien getestet und sind bereits für mehrere Indikationen zugelassen. Im Falle der Immunthrombozytopenie konnte für beide Wirkstoffe gezeigt werden, dass sie Blutungsereignisse signifikant verringern, die Notwendigkeit der Transfusion von Thrombozytenkonzentraten und anderen Therapieoptionen verringern sowie die Lebensqualität der Patienten verbessern (Bussel et al., 2007; Kuter et al., 2008; George et al., 2009; Saleh et al., 2013). EPAG besitzt auch eine Zulassung zur Behandlung von Thrombozytopenien im Rahmen einer schweren aplastischen Anämie. Die aplastische Anämie setzt sich, ebenso wie MDS, aus einer heterogenen Gruppe seltener Erkrankungen des blutbildenden Systems zusammen, die infolge von Hypo- oder Aplasie der Zellen im Knochenmark zu dessen Insuffizienz führen. Klinisch spiegelt sich dies in Bi- oder Trizytopenie in unterschiedlichem Ausmaß wider (Young, 2018). Studien mit EPAG als Monotherapie bei refraktärer schweren aplastischen Anämie zeigten eine Gesamtansprechrate von 40–50 %. Bei einigen Patienten erzielte die Behandlung sogar eine Normalisierung der Hämatopoese in zwei oder mehr myeloiden Linien (Olnes et al., 2012; Desmond et al., 2014; Winkler et al., 2019). Dieses Ergebnis wurde darauf zurückgeführt, dass EPAG nachweislich die Selbsterneuerung von gesunden hämatopoetischen Stammzellen stimuliert (Kao et al., 2018).

1.3.3.6 EPAG in MDS und AML

Mehrere klinische Studien haben die Wirksamkeit und Sicherheit von EPAG als Monotherapie bei Niedrig- und Hochrisiko-MDS, sowie AML bereits untersucht.

In der einfach verblindeten, randomisierten und placebokontrollierten Phase 1/2-Studie von Oliva und Kollegen (Oliva et al., 2017) wurden n = 90 Niedrigrisiko-MDS-Patienten für mindestens 24 Wochen mit EPAG behandelt. Ein Anstieg der Thrombozyten konnte in n = 28 (47 %) von 59 der EPAG- und in n = 1 (3 %) von 31 Patienten der Placebokohorte festgestellt werden, wobei von n = 13 Patienten in der EPAG-Gruppe, die zuvor auf Thrombozytenkonzentrate angewiesen waren, n = 7 (54 %) transfusionsunabhängig wurden. Eine Transformation in eine AML wurde bei n = 7 (12 %) von 59 EPAG- und n = 5 (16 %) von 31 placebobehandelten Patienten beobachtet. Die nicht-randomisierte und –placebokontrollierte Phase 2-Studie von Vicente und Kollegen (Vicente et al., 2020) schloss n = 25 MDS-Patienten mit Niedrigrisiko ein. Insgesamt sprachen n = 11 (44 %) von 25 Patienten auf die 16- bis 20-wöchige Behandlung an, darunter auch n = 6 (24 %) Probanden, die eine klinische Verbesserung in zwei hämatologischen Linien zeigten. Zudem wurden n = 6 von 8 transfusionsabhängigen Respondern nach der Behandlung mit EPAG transfusionsfrei. N = 6 (24 %) von 25 Patienten erfuhren eine Progression ohne Expansion von mutierten Klonen. Eine Transformation in eine AML wurde nicht beobachtet. Comont und Kollegen (Comont et al., 2021) präsentierten Daten einer retrospektiven, multi-zentrischen Studie mit n = 50 ebenfalls Niedrigrisiko-MDS-Patienten und n = 11 Patienten mit CMML, deren durchschnittliche Behandlungsdauer mit EPAG zehn Monate betrug. Ein Anstieg der Thrombozytenzahl konnte dabei in n = 47 (77 %) von 50 Patienten nachgewiesen werden, wobei n = 6 (12 %) von 50 eine biliniäre Verbesserung ihrer Blutparameter aufwiesen. Von 27 ehemals transfusionsabhängigen Probanden erreichten n = 19 (70 %) eine Unabhängigkeit. Ein Krankheitsprogress wurde in n = 4 (7 %) von 50 Patienten festgestellt.

Platzbecker und Kollegen (Platzbecker et al., 2015) haben eine multizentrische, doppelt verblindete, randomisierte, placebokontrollierte Phase 1/2-Studie zur Sicherheit von EPAG bei $n = 98$ Patienten, davon $n = 26$ mit Hochrisiko-MDS, $n = 70$ AML und $n = 2$ undefinierten Fällen nach WHO-Klassifikation, durchgeführt. Innerhalb eines Behandlungszeitraums von sechs Monaten wurde bei $n = 18$ (28 %) von 64 EPAG- und $n = 10$ (29 %) von 34 placebobehandelte Probanden eine Erhöhung der Thrombozyten festgestellt. Eine Transfusionsunabhängigkeit konnte in $n = 24$ (38 %) von 64 Patienten der EPAG- und $n = 7$ (21 %) von 34 der Placebokohorte beobachtet werden. Darüber hinaus konnten keine Unterschiede bezüglich der Anzahl der Blasten im peripheren Blut und Knochenmark zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Das progressionsfreie Überleben betrug bei den mit EPAG-behandelten Patienten 8,1 Wochen im Vergleich zu 6,6 Wochen bei den Patienten, die das Placebo erhielten. Die Phase 2-Studie von Mittelman und Kollegen (Mittelman et al., 2018) setzte sich aus einer achtwöchigen, offenen Studie mit $n = 9$ Hochrisiko-MDS- und $n = 8$ AML-Patienten und einer zwölfwöchigen, doppelt verblindeten, randomisierten, placebokontrollierten und dosisesskalierten Studie mit $n = 72$ Hochrisiko-MDS- und $n = 73$ AML-Patienten zusammen. Im ersten Teil der Studie konnte bei $n = 4$ (24 %) von 17 Probanden in der mit EPAG-behandelten Gruppe ein Ansprechen und bei $n = 10$ (59 %) von 17 ein reduzierter Bedarf an Thrombozytenkonzentraten festgestellt werden. Im zweiten Teil der Studie konnte eine Erhöhung der Thrombozytenzahlen bei $n = 8$ (8 %) von 98 Patienten der EPAG- und $n = 2$ (4 %) der Placebokohorte beobachtet werden. Ein Krankheitsprogress trat bei $n = 61$ (62 %) von 98 und $n = 36$ (77 %) von 47, und eine Transformation in eine AML bei $n = 31$ (62 %) von 50 und $n = 16$ (73 %) von 22 der EPAG- bzw. placebobehandelten Probanden auf. Sowohl in der Studie von Platzbecker, als auch in der von Mittelman wurden die erhobenen Daten nicht separat für die beiden Entitäten MDS und AML betrachtet.

Zusammenfassend lassen die Daten zu Progressions- und Transformationsraten der bisher erfolgten Studien darauf schließen, dass die Behandlung thrombozytopenen Patienten mit EPAG sowohl für Niedrig- als auch Hochrisiko-MDS sicher ist. Zudem konnte die Wirksamkeit von EPAG, insbesondere bei MDS Patienten mit Niedrigrisiko, nachgewiesen werden.

1.3.4 Förderung der Krankheitsprogression

Auch bei der schweren aplastischen Anämie besteht das Risiko einer klonalen Evolution, die meist in zytogenetischen Veränderungen besteht, oder einer Transformation in MDS bzw. AML im Verlauf der Erkrankung (Young, 2018). Bei Studien zu EPAG als Monotherapie in Patienten mit refraktärer schwerer aplastischen Anämie ohne Kontrollgruppe wurde in allen drei Studien bei etwa 19 % der Patienten eine klonale zytogenetische Evolution festgestellt (Olnes et al., 2012; Desmond et al., 2014; Winkler et al., 2019). Dieser Wert ist im Vergleich zur historischen Vergleichskohorte mit einer Evolutionsrate von 10-15 % bei Patienten mit schwerer aplastischen Anämie deutlich erhöht (Ogawa, 2016). Die Frequenz somatischer Mutationen der Patienten blieb allerdings unverändert (Winkler et al., 2019). Da diese Veränderungen in den meisten Fällen relativ kurz nach Behandlungsbeginn beobachtet werden konnten, lässt dies vermuten, dass EPAG womöglich die Expansion von ruhenden, bereits existierenden Klonen mit einem aberranten Karyotyp fördert, wie für gesunde hämatopoetische Stammzellen *in vitro* demonstriert wurde (Kao et al., 2018).

Eine groß angelegte, randomisierte klinische Studie mit dem Thrombopoetin-Rezeptor-Agonisten Romiplostim als Monotherapie bei $n = 250$ MDS-Patienten mit niedriger bis mittlerer Risikoprognose nach IPSS-R wurde aufgrund von Bedenken hinsichtlich eines Anstiegs der Anzahl der Blasten im peripheren Blut und der Progressionsraten

von 6 % in der mit Romiplostim behandelten im Vergleich zu 4 % in der mit Placebo behandelten Studiengruppe vorzeitig beendet (Giagounidis et al., 2014). In der durch die Europäische Arzneimittelagentur (EMA, engl. *European Medicines Agency*) veröffentlichten Produktinformation zu EPAG wird daher eine Behandlung einer durch MDS-bedingten Thrombozytopenie mittels EPAG außerhalb von klinischen Studien untersagt. In diesem Zusammenhang muss zudem vor der Behandlung von Patienten mit Immunthrombozytopenie oder schwerer aplastischen Anämie mit EPAG das Vorliegen von MDS ausgeschlossen werden (EMA, 2021). Im Rahmen eines 5-Jahre-Follow-ups jener Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Romiplostim- und dem Placeboarm bezüglich des Risikos der Transformation in eine AML und dem Überleben der Patienten nachgewiesen werden (Kantarjian et al., 2018). Trotz dessen und den vielversprechenden Ergebnissen aus den klinischen Studien mit EPAG als Monotherapie in Niedrig- sowie Hochrisiko-MDS-Patienten konnten die vorliegenden Bedenken hinsichtlich einer möglichen Förderung der Krankheitsprogression bei MDS durch EPAG noch nicht zur Gänze ausgeräumt werden, so dass bis heute keine Zulassung von EPAG für die Indikation MDS existiert.

1.4 Präklinische MDS-Modelle

In den vergangenen Jahren ist unser Wissen und Verständnis bezüglich der molekularen Pathogenese von MDS mithilfe der NGS-Technologien maßgeblich vorangeschritten (Yoshida et al., 2011; Haferlach et al., 2014; Ogawa, 2019). Während diese Daten die Grundlage bilden, um neue therapeutische Strategien zu entwickeln, werden Fortschritte auf dem Gebiet der translationalen Forschung durch einen Mangel an zuverlässigen, präklinischen MDS-Modellen behindert.

1.4.1 Zelllinien

Immortalisierte Zelllinien stellen ein simples und universell nutzbares Modellsystem dar, das die Untersuchung der zellulären und molekularen Mechanismen der Pathogenese von Krebserkrankungen sowie das Screening von neuen Krebsmedikamenten ermöglicht.

Zur Modellierung und Erforschung von AML existieren zahlreiche etablierte Zelllinien (Quentmeier et al., 2019), wie beispielsweise KASUMI-6, OCI-AML3 und KG-1. Diese besitzen konservierte genetische Signaturen, die sich durch bestimmte Chromosomenaberrationen und/oder Mutationen auszeichnen und auch für primäre AML-Proben charakteristisch sind, was sie zu realitätsnahen Modellsystemen macht (Rücker et al., 2006). Im Falle von MDS herrscht jedoch ein Mangel an „echten“ MDS-Zelllinien. In der Arbeit von Drexler und Kollegen (Drexler et al., 2009) wurden $n = 31$ publizierte Zelllinien untersucht, die primären MDS-Zellen entstammen sollen. Dabei konnte bei $n = 5$ der MDS-Zelllinien nachgewiesen werden, dass diese durch AML-Zelllinien kreuzkontaminiert wurden. Weitere $n = 2$ Zelllinien stellten sich als immortalisierte Zellen nicht-malignen Ursprungs heraus. Bei insgesamt $n = 21$ der etablierten MDS-Zelllinien handelte es sich um MDS im Übergang in eine AML oder bereits um eine sAML aus MDS. In der Literatur sind lediglich $n = 3$ Zelllinien beschrieben, die während der MDS-Phase der Erkrankung etabliert wurden: M-TAT, TER-3 und MDS92. Es wurden zwar Daten zu M-TAT und TER-3 publiziert (Minegishi et al., 1994; Mishima et al., 2002), allerdings sind beide Zelllinien nicht (mehr) erhältlich. Die Zelllinie MDS92 (Tohyama et al., 1994) und die von ihr abgeleitete, Interleukin 3-abhängige Sublinie MDS-L (Nakamura et al., 2000) zeichnen sich durch MDS-assoziierte Veränderungen

aus. Diese bestehen aus den chromosomalen Aberrationen einer 5q-Deletion und einer Monosomie des Chromosoms 7 sowie Mutationen in den Genen *CEBPA*, *NRAS* und *TP53* (Kida et al., 2018).

Somit scheint es sich bei MDS92 zum jetzigen Zeitpunkt um das einzige valide MDS-Zelllinienmodell zu handeln. Dennoch gilt zu berücksichtigen, dass sowohl die genetische Modifikation der Ursprungszellen zur Herstellung einer Zelllinie als auch das serielle Passagieren über hunderte von Generationen zu geno- und phänotypischen Veränderungen führen können. Bei der Nutzung von Zelllinien können diese Umstände im Vergleich mit primären Zellen daher zu abweichenden Ergebnissen führen. Da sich MDS zudem durch ein sehr heterogenes Erkrankungsbild auszeichnet, ist zur Erforschung dieser Erkrankung der Einsatz von primären Patientenproben unverzichtbar.

1.4.2 2D- und 3D-in-vitro-Kulturen

Die Ex-vivo-Expansion von primären hämatopoetischen Stammzellen gestaltet sich aufgrund des über die Kultivierungsdauer allmählichen Verlusts der Multipotenz und der damit einhergehenden Ausdifferenzierung der Zellen schwierig (Zhang et al., 2008). Das komplexe Zusammenspiel von zellintrinsic und -extrinsic Signalen, das das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen reguliert, ist *in vitro* nur schwer nachempfindbar. Die Kultivierung von primären MDS-Zellen *in vitro* hat sich darüber hinaus als noch anspruchsvoller erwiesen, da diese im Vergleich zu gesunder Hämatopoese ein eingeschränktes Proliferations- und Expansionspotenzial sowie eine erhöhte Apoptoserate besitzen (Nilsson et al., 2000; Martínez-Jaramillo et al., 2002). Daher proliferieren primäre CD34+ Zellen von MDS-Patienten in einer 2D-Suspensionskultur nicht länger als zwei Wochen (Elvarsdóttir et al., 2020).

Da sowohl bei der gesunden Hämatopoese als auch bei der Pathogenese von MDS die Knochenmarknische eine große Rolle spielt (Raaijmakers, 2012), haben sich zur Verbesserung der Effizienz von In-vitro-Kulturen primärer MDS-Zellen zwei Ansätze bewährt: Die Kokultivierung von CD34+ positiven MDS-Stammzellen mit mesenchymalen Stromazellen (MSCs), sowie die Verwendung von 3D-Zellkulturen. MSCs sind multipotente Stammzellen, die Teil der Knochenmarknische sind und sich in Knochen, Knorpel, Muskel- und Fettgewebe ausdifferenzieren können. Beide Ansätze verfolgen dabei das Ziel das Tumormikromilieu in der Knochenmarknische nachzuempfinden und somit die MDS-Hämatopoese zu unterstützen.

In einer Publikation von Rouault-Pierre und Kollegen (Rouault-Pierre et al., 2017) konnten in einer 2D-Kokultur bestehend aus 1×10^3 CD34+ Knochenmarkszellen und autologen und/oder allogenen humanen MSCs die hämatopoetischen Zellen über einen Zeitraum von vier Wochen um das 50- bis 600-fache expandiert werden ohne dass diese ihr klonales Mutationsprofil veränderten. Bei den verbleibenden hämatopoetischen Zellen wurde jedoch nicht evaluiert, ob sich darunter weiterhin Zellen mit Stammzellcharakter befinden. Es konnte aber bereits für die Kokultivierung gesunder CD34+ Stammzellen mit MSCs gezeigt werden, dass bei dieser Art der Kultivierung der Stammzellpool bewahrt wird (Jing et al., 2010).

Um die Knochenmarknische noch realitätsnäher modellieren zu können, werden in 3D-Kulturen die Zellen in eine Art Gerüst eingesät, das aus verschiedensten Materialien bestehen kann. Dazu zählen synthetische Kunststoffe wie Polyurethan (Blanco et al., 2010; Mortera-Blanco et al., 2011; Severn et al., 2016) und Polycaprolacton (Ferreira et al., 2012) oder natürliche Stoffe wie Collagen (Leisten et al., 2012), Gelatine (Abarategi et al., 2017) und Knochen (Bianco et al., 2019), um nur einige Beispiele zu nennen. Diese Ansätze wurden für gesunde Hämatopoese (Mortera-Blanco et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Leisten et al., 2012; Severn et al., 2016; Bianco et al., 2019) und

AML bereits mehrfach erprobt (Blanco et al., 2010; Abarrategi et al., 2017). In MDS existieren dazu bisher nur wenige Publikationen (Elvarsdóttir et al., 2020). Allerdings wurde *in-vivo* bereits ein ähnlicher Ansatz verfolgt bei dem ektopische 3D-MDS-Nischen subkutan in Mäuse transplantiert wurden (Mian et al., 2021; Altrock et al., 2022). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu 2D-Kulturen in 3D-Kulturen die Multipotenz der hämatopoetischen Stammzellen besser bewahrt wird und diese erfolgreicher expandiert werden können.

1.4.3 Patientenabgeleitete Xenograftmodelle

Patientenabgeleitete Xenografts (PDX, engl. *patient-derived xenografts*) werden durch die Transplantation von primären Patientenzellen in immundefiziente Mäuse generiert. Sie stellen ein wichtiges Tool der translationalen Medizin zur Modellierung und Erforschung verschiedenster Krebserkrankungen, und einen vielversprechenden Ansatz zur Förderung und Verbesserung der personalisierten Medizin dar (Clohessy und Pandolfi, 2018). So konnten Lapidot und Kollegen (Lapidot et al., 1994) mittels Transplantation der CD34+CD38-, CD34+ CD38+ und CD34- Zellfraktionen aus Knochenmark von AML-Patienten in immundefiziente Mäuse erstmals zeigen, dass lediglich die CD34+CD38- Zellfraktion in der Lage war in den Mäusen anzuwachsen und entwickeln somit das Konzept der leukämischen Stammzelle.

Zur Generierung von MDS-PDX werden CD34+ hämatopoetische Stammzellen, die aus dem Knochenmark des Patienten isoliert wurden, transplantiert. Die ersten Versuche robuste MDS-PDX-Modelle in immundefizienten Mäusen zu generieren, erzielten inkonsistente Ergebnisse mit zum Teil transientem Engraftment und niedriger Erfolgsquote, besonders bei Proben von Niedrigrisiko-MDS-Patienten (Martin et al., 2010; Thanopoulou et al., 2004). Der Großteil der Proben, die in diesen Studien erfolgreich transplantiert wurden, stammte von Hochrisiko-MDS- oder AML-Patienten. Aus diesem Grund etablierte unsere Arbeitsgruppe vor einiger Zeit ein MDS-PDX-Modell, dass mittels orthotoper Kotransplantation von CD34+ Stammzellen und autologen MSCs in das Femur von Mäusen generiert wird (Medyouf et al., 2014). Die Rationale für die Kotransplantation von CD34+ und MSCs war die Involvierung der Knochenmarknische in die Pathogenese von MDS und eine dadurch potenzielle Unterstützung des Anwachsens der hämatopoetischen Stammzellen durch die MSCs. Dabei konnte gezeigt werden, dass die humanen CD34+ Zellen, die zusammen mit MSCs transplantiert wurden, signifikant besser in den Mäusen anwachsen, als CD34+ Zellen desselben Patienten, die ohne MSCs transplantiert wurden. Zudem ermöglichte dieser Ansatz auch Proben von Niedrigrisiko-MDS-Patienten erfolgreich zu engraften.

Während sich MDS-PDX-Modelle mittlerweile etabliert haben, werden sie noch nicht als systematischer Ansatz zur präklinischen Evaluierung von Therapeutika in MDS eingesetzt. Obwohl in einigen Studien bereits Chemotherapeutika, Antikörper und verschiedene Inhibitoren mittels MDS-PDX getestet wurden, waren diese eher von geringem Umfang, restringiert durch niedrige Patienten- und/oder PDX-Zahlen, kurze Behandlungsdauern oder das teilweise Fehlen von Vehikelkontrollen (Stevens et al., 2018; Shastri et al., 2018; Meunier et al., 2018; Smith et al., 2019; Pang et al., 2019; Song et al., 2019) (siehe **Tabelle 6**).

Tabelle 6: Übersicht durchgeführter präklinischer Studien zur Testung von therapeutischen Substanzen mit MDS-PDX. mAK, monoklonaler Antikörper; PDX, patientenabgeleitete Xenografts

Publikation	Getestete Substanz	Anzahl der Patientenproben	Anzahl der generierten PDX	Behandlungszeitraum	Vehikelkontrolliert?
Stevens et al., 2018	Omacetaxin, Venetoclax, Azacitidin	3	>104	2 Wochen	ja
Shastri et al., 2018	STAT3-Inhibitor AZD9150	2	6	4 Wochen	ja
Meunier et al., 2018	Cytarabin	1	7	2 Wochen	ja
Smith et al., 2019	IRAK4-Kinaseinhibitor CA-4948	2	14	3 Wochen	ja
Pang et al., 2019	Anti-CD117-mAK SR-1, Anti-CD117-mAK AMG 191	10	18	8-12 Wochen	teilweise
Song et al., 2019	IDH2-Inhibitor Enasidenib	1	14	N/A	ja

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Durch den Vormarsch der NGS-Technologien konnten im letzten Jahrzehnt große Fortschritte bei der Charakterisierung der komplexen molekularen Signaturen von MDS erzielt werden. Diese gewonnenen Erkenntnisse könnten zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien im Bereich der personalisierten Medizin beitragen, jedoch wird dieses Vorhaben nicht zuletzt durch einen Mangel an zuverlässigen präklinischen MDS-Modellen zur Beantwortung funktioneller Fragen erschwert. Aufgrund der Heterogenität von MDS sind MDS-Zelllinien nur bedingt in der Lage, die menschliche MDS-Biologie abzubilden. 2D- und 3D-in-vitro-Kulturen aus primären MDS-Patientenzellen bieten mit einer maximalen Kulturdauer von vier Wochen ein dagegen nur sehr begrenztes experimentelles Zeitfenster. In der Theorie bieten MDS-PDX-Modelle die Möglichkeit patientenindividuelle und vehikelkontrollierte Experimente *in vivo* in Replikaten über einen längeren Zeitraum durchzuführen. Die bisher realisierten präklinischen Studien mit MDS-PDX-Modellen bestanden aus kleinen Patienten- und/oder PDX-Kohorten, wurden z.T. ohne Kontrollgruppe durchgeführt und dauerten maximal vier Wochen. Ziel dieser Arbeit war es daher den Beweis zu erbringen, dass unser zuvor etabliertes nischenbasiertes MDS-PDX-Modell, das auf der orthotopen Kotransplantation von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen und MSCs in immundefiziente Mäuse basiert, als präklinisches Modell zur Beantwortung klinischer Fragestellungen genutzt werden kann.

Primäre Fragestellungen:

- Kann unser MDS-PDX-Modell genutzt werden, um potentielle Therapeutika für MDS-Patienten präklinisch zu testen?
- Können wichtige klinische Parameter, insbesondere die klonale Zusammensetzung des humanen Knochenmarks, zuverlässig und über einen längeren Zeitraum in unserem MDS-PDX-Modell nachverfolgt werden?

Zu diesem Zweck haben wir den TPO-Rezeptor-Agonisten EPAG in unserem MDS-PDX-Modell untersucht. Die Thrombozytopenie stellt eine häufige und prognostisch ungünstige Komplikation bei MDS-Patienten dar, die potenziell lebensbedrohliche Blutungsereignisse zur Folge haben kann. Darüber hinaus können aktuelle Behandlungsoptionen für MDS wie Lenalidomid oder 5-Azacytidin vorbestehende Thrombozytopenien verschlimmern und letztendlich eine Dosisreduktion oder eine Unterbrechung der Behandlung erforderlich machen. Daher sind viele MDS-Patienten auf die regelmäßige Transfusion von Thrombozytenkonzentraten angewiesen, die ihrerseits wiederum mit erheblichen Risiken verbunden sind. In diesem Zusammenhang haben sich Thrombopoietin-Rezeptor-Agonisten wie EPAG als alternative Behandlungsoptionen für thrombozytopenie MDS-Patienten aufgetan. Obwohl die Wirksamkeit und Sicherheit von EPAG in klinischen Studien demonstriert werden konnte, existieren immer noch Vorbehalte hinsichtlich einer möglichen Förderung der Krankheitsprogression durch EPAG aufgrund dessen Stimulierung des MPL-Rezeptors in seiner Rolle als TPO-Mimetikum.

Ein sehr wichtiger Vorteil von PDX-Modellen gegenüber klinischen Studien besteht in der Möglichkeit vehikelkontrollierte Experimente auf patientenindividueller Ebene durchzuführen. Dies wird durch die Generierung mehrerer Krankheitsreplikate desselben Patienten in Form von PDX erreicht und erlaubt uns, zwischen krankheitsbedingten und therapieinduzierten Effekten zu unterscheiden. Daraus ergaben sich für diese Arbeit folgende zusätzliche Fragestellungen:

Sekundäre Fragestellungen:

- Hat EPAG einen Einfluss auf die humane Thrombo- und Megakaryopoese in unserem MDS-PDX-Modell? Falls ja, existieren mögliche klinische oder molekulare Prädiktoren für ein Ansprechen auf EPAG?
- Hat EPAG einen Einfluss auf den Krankheitsprogress und die Transformation in unserem MDS-PDX-Modell? Und in diesem Zusammenhang: Können die in In-vitro-Studien demonstrierten anti-leukämischen Effekte EPAGs bestätigt werden?
- Hat EPAG einen Einfluss auf die klonale Zusammensetzung des humanen Knochenmarks in unserem MDS-PDX-Modell?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

2.1.1 Knochenmarkproben

Bei allen für diese Arbeit verwendeten Knochenmarkproben von MDS-Patienten handelt es sich um Restmaterial, das erst nach der Durchführung aller notwendigen labor-diagnostischer Analysen weiterverarbeitet wurde. Zudem wurden diese Proben für die Nutzung zu Forschungszwecken erst nach schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg und der Genehmigung durch die zuständige Ethikkommission in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki in Form des bestehenden Ethikvotums 2013-509N-MA freigegeben.

2.1.2 Patientenkohorte

Insgesamt wurden Knochenmarkproben von $n = 26$ MDS-Patienten für dieses Projekt verwendet. Diese Proben wurden anhand einer beim Patienten zum Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion bestehenden mittleren ($50.000-99.000/\mu\text{l}$) oder schweren ($<50.000/\mu\text{l}$) Thrombozytopenie ausgewählt. Auf diese Weise sollte für die präklinische Testung des TPO-Rezeptor-Agonisten EPAG in unserem patientenabgeleiteten PDX-Modell eine möglichst realistische Patientenkohorte nachempfunden werden. Alle Patienten wurden entsprechend der MDS-Klassifikation der WHO 2016 (Arber et al., 2016) und der Prognoseeinstufung nach IPSS-R (Greenberg et al., 2012) kategorisiert. Die Charakteristika aller transplantierten Patienten, einschließlich Geschlecht, Alter, Zytogenetik, Mutationsstatus, Blastenanteil, Thrombozytenanzahl und Therapiestatus, sind in **Tabelle 10** einzusehen. Da ein Teil der Patientenproben nicht oder nur in einzelnen PDX angewachsen war, konnten nicht alle für die präklinische Testung von EPAG im PDX genutzt werden. Die finale Kohorte dieser Arbeit besteht daher aus $n = 49$ PDX von insgesamt $n = 9$ MDS-Patienten (P01-P09).

2.2 Zellbiologische Methoden

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeiten wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt, d.h. unter Nutzung von sterilen Reagenzien und Materialien sowie der Arbeit an einer Sicherheitswerkbank. Zum Pelletieren von Zellen erfolgte prinzipiell deren Zentrifugation bei $400 \times g$ und 4°C für 5 min und das anschließende Absaugen des Überstands.

2.2.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl und Viabilität der Proben wurde mit einem „Vi-CELL XR“ (Beckman Coulter) mittels automatisierter Standard-Trypanblau-Methode bestimmt. Zu diesem Zweck wurde das Zellpellet zunächst in einem definierten Volumen Medium o.ä. aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in einem Verhältnis von 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 oder 1:20 mit DPBS (Sigma Aldrich, Best.-Nr. D8537) verdünnt und in die für das Gerät vorgesehenen Probenröhrchen (Beckman Coulter, Best.-Nr. 383721) überführt. Die bestimmte Zellzahl wurde in Zellen/ml angegeben.

2.2.2 Isolation von mononukleären Knochenmarkzellen

Zur Isolation der mononukleären Zellen (MNCs, engl. *mononuclear cells*) mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden zuvor 15 ml Ficoll-Paque-Dichtegradientenmedium (Cytiva, Best.-Nr. 17544203) auf ein 50 ml-Röhrchen mit Trennscheibe (Greiner Bio-One, Best.-Nr. 227290) gegeben und bei 1000 x g für 1 min zentrifugiert. Das Patientenknorpelmark wurde zunächst über ein 100 µM-Zellsieb (Greiner Bio-One, Best.-Nr. 542000) in ein 50 ml-Röhrchen (Greiner Bio-One, Best.-Nr. 227261) gegeben. Die herausgefilterten Knochentrabekelfragmente wurden zur Kultivierung der MSCs genutzt (siehe 2.2.4). Das gefilterte Knochenmark wurde mit DBPS auf ca. 30 ml verdünnt und langsam auf ein mit Dichtegradientenmedium gefülltes 50 ml-Röhrchen geschichtet. Die Probe wurde bei 1000 x g für 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Vom Überstand wurden anschließend zweimal 2 ml abgenommen, in 2 ml-Zentrifugenröhrchen (Eppendorf, Best.-Nr. 0030123344) überführt und als Patientenplasma bei -80 °C asserviert, das später für den humanen TPO-ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) genutzt wurde (siehe 2.8.1). Der restliche Überstand wurde oberhalb der Leukozytenmanschette, auch „*buffy coat*“, vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden in ein frisches 50 ml-Röhrchen gekippt. Das kopfüber-gekippte Röhrchen wurde dann in dieser Position mittels einer Transferpipette (Sarstedt, Best.-Nr. 86.1171.001) mit etwas DPBS mehrmals ausgespült, um die restlichen Zellen herauszuwaschen. Die geernteten Zellen wurden pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet anschließend je nach Größe in 5-10 ml selbsthergestelltem Erythrozytenlysepuffer (siehe 2.2.7) resuspendiert. Die Zellen wurden dann für 5-7 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Lysereaktion mit ca. 10 ml DPBS abgestoppt. Die Zellen wurden erneut pelletiert. Das Pellet wurde in einem definierten Volumen DPBS aufgenommen, um die Zellzahl zu bestimmen (siehe 2.2.1). Danach wurden mindestens 1×10^6 MNCs pelletiert, die Zellen in 500 µl RNeasy Protect®-Puffer (QIAGEN, Best.Nr. 76526) aufgenommen und für die spätere Aufarbeitung von DNA und RNA (siehe 2.5.1) bei -80 °C gelagert. Von den übrigen MNCs wurden 1×10^7 bis maximal 1×10^8 Zellen zur Anreicherung von CD34+ Zellen genutzt (siehe 2.2.3). Der Rest wurde anschließend viabel kryokonserviert (siehe 2.2.5).

2.2.3 Anreicherung von CD34+ Stammzellen

Zur Anreicherung der CD34+ Stammzellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS, engl. *magnetic-activated cell sorting*) wurden die zuvor isolierten MNCs (siehe 2.2.2) in ca. 10 ml MACS-Puffer (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-091-222) mit 5 % bovinen Serumalbumin (BSA) (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-091-376) (i.F. nur „MACS-Puffer“ genannt) aufgenommen und pelletiert. Dann wurden 1×10^8 Zellen in 300 µL MACS-Puffer, 100 µL FcR-Block-Reagenz (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-059-901) und 100 µL CD34-Beads (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-046-703) resuspendiert. Die Zellen wurden für 30 min im Kühlschrank inkubiert. Im Anschluss wurden ca. 10 ml MACS-Puffer zu den Zellen gegeben und diese pelletiert. Währenddessen wurde der Magnetständer (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-042-303) inklusive Magnet (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-042-302) aufgebaut und letzterer mit einer Zellseparationssäule (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-042-401) und einem 70 µM-Filter (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-095-823) bestückt. Unterhalb der Säule wurde ein 50 ml-Röhrchen in einem Kühlständer (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-092-951) platziert. Die Säule wurde mit 3 ml MACS-Puffer angefeuchtet. Anschließend wurde die pelletierte Probe in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Sobald die Suspension vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde mit 3 ml MACS-Puffer nachgespült. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Zur Elution der CD34+ Zellen

wurde die Säule aus dem Magnet gelöst und auf ein 15 ml-Röhrchen (Greiner Bio-One, Best.-Nr. 188161) gesetzt. Dann wurden 3 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben und mittels des dazugehörigen Kolbens durch die Säule in das Röhrchen gedrückt. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die CD34+ Zellen wurden dann pelletiert. Das Pellet wurde in einem definierten Volumen DPBS aufgenommen, um die Zellzahl zu bestimmen (siehe 2.2.1). Danach wurden 2×10^5 CD34+ Zellen pelletiert, das Zellpellet in 350 μ l RLT Plus-Puffer (QIAGEN, Best.Nr. 1053393) aufgenommen und für die spätere Aufarbeitung von DNA und RNA (siehe 2.5.1) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die restlichen CD34+ Zellen wurde anschließend viabel weggefroren (siehe 2.2.5).

2.2.4 Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen

Zur Kultivierung von MSCs wurden 5×10^6 bis 5×10^7 frisch isolierte MNCs (siehe 2.2.2) mit oder ohne Fragmenten von Knochen trabekeln, die bei der Knochenmarkpunktion zusammen mit dem Knochenmark aspiriert und bei der Isolation der MNCs im Filter aufgefangen wurden, in eine T25-Kulturflasche (SARSTEDT, Best.-Nr. 83.3910.302) mit 5 ml StemMACS™ Expansion Media XF (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-104-182) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Gibco, Best.-Nr. 5140122) gegeben und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Zellkulturinkubator mit einem CO_2 -Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Die MSCs wurden im Laufe der Kultivierung mittels ihrer Adhärenz selektiert. Ein Medienwechsel erfolgte einmal wöchentlich. Nicht-adhärenzte Zellen wurden dabei durch Waschen mit ca. 5 ml DPBS nach Absaugen des alten Mediums aus der Kultur entfernt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70-80 % erreichten, wurde sie in ein neues Gefäß passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Kulturflasche mit DPBS gewaschen und ebenfalls abgesaugt. Anschließend wurde 1 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, Best.-Nr. 59417C) auf die Zellen gegeben, gleichmäßig verteilt und für ca. 5 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Um das Ablösen der Zellen zu unterstützen, wurde leicht gegen das Zellkulturgefäß geklopft. Unter einem Mikroskop wurde überprüft, ob sich alle Zellen von der Zellkulturflasche abgelöst hatten. Um den Verdauungsprozess abzustoppen, wurde die Zellsuspension dann in ein 50 ml-Röhrchen (Greiner Bio-One, Best.-Nr. 227261) überführt in dem sich bereits ca. 10 ml Medium befanden. Anschließend wurden die geernteten Zellen pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium aufgenommen und seine Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.1). Abhängig von der Gesamtzellzahl, wurden die Zellen in eine oder mehrere Kulturflaschen ausgesät:

T25-Kulturflasche	$2,0 \times 10^4$ Zellen	
T75-Kulturflasche	$6,0 \times 10^4$ Zellen	(Greiner Bio-One, Best.-Nr. 658175)
T175-Kulturflasche	$1,5 \times 10^5$ Zellen	(Greiner Bio-One, Best.-Nr. 661175)

Sobald erneut eine Konfluenz von 70-80 % erreicht war, wurden die Zellen wieder geerntet. Betrug die Zellzahl mehr als 1×10^6 Zellen, wurden mindestens 2×10^5 Zellen in ATL-Puffer (QIAGEN, Best.-Nr. 19076) und mindestens 1×10^5 Zellen in RNAprotect®-Puffer aufgenommen und für die spätere Aufarbeitung von DNA und RNA (siehe 2.5.1) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, und die restlichen Zellen viabel weggefroren (siehe 2.2.5). Andernfalls wurden die Zellen erneut expandiert und im Anschluss kryokonserviert.

2.2.5 Kryokonservierung

Isolierte MNCs aus humanem oder PDX-Knochenmark (siehe **2.2.2** und **2.4.5**) sowie CD34+ Zellen (siehe **2.2.3**) und geerntete MSCs (siehe **2.2.4**), die nicht sofort weiterverarbeitet wurden, wurden zur Aufbewahrung viabel kryokonserviert. Dazu wurden maximal 2×10^7 Zellen in ein steriles 1,8 ml-Kryoröhrchen (Nunc, Best.-Nr. 10577391) überführt und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml selbsthergestelltem Einfriermedium resuspendiert. Dieses Einfriermedium bestand aus dem entsprechenden Zellmedium, wobei RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Best.-Nr. R8758) für MNCs oder CD34+ Zellen, und StemMACS™ Expansion Media XF für MSCs genutzt wurde, hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) (Gibco, Best.-Nr. 11550356) und DMSO (Sigma-Aldrich, Best.-Nr. D2650) in einem Verhältnis von 6:3:1. Anschließend wurden die Kryoröhrchen umgehend in einem Mr. Frosty™ Gefrierbehälter (Thermo Scientific, Best.-Nr. 5100-0001) platziert und dieser möglichst schnell in einen -80°C -kalten Gefrierschrank gestellt. Dort wurden die Röhrchen über Nacht heruntergekühlt und am nächsten Tag schließlich in einen Flüssigstickstofftank überführt.

2.2.6 Proben für Xenotransplantationsexperimente

Für die intrafemorale Transplantation (siehe **2.3.6**) wurden mindestens 1×10^5 CD34+ Stammzellen und maximal 5×10^5 MSCs pro Mausbein transplantiert. Die MSCs wurden vorab expandiert, um die benötigte Zellzahl zu erhalten. Zunächst wurden die kryokonservierten MSCs aufgetaut. Dazu wurde in einem 50 ml-Röhrchen ca. 10 ml kaltes StemMACS™ Expansion Media XF vorgelegt. Dieses wurde mittels Transferpipette in geringem Volumen in das zuvor aus dem Stickstofftank geholte Kryoröhrchen mit den viabel asservierten MSCs gegeben. Während des Auftauprozesses wurde die flüssig gewordene Zellsuspension beständig abgesaugt, in das 50 ml-Röhrchen überführt und mit neuem Medium ausgetauscht, um das DMSO möglichst schnell zu verdünnen, da es in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirkt. Nachdem die Probe vollständig aufgetaut war, wurden die Zellen pelletiert und im Anschluss ihre Zellzahl bestimmt (siehe **2.2.1**). Analog zu dem Abschnitt „Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen“ (siehe **2.2.4**) wurden die Zellen entsprechend ihrer Zellzahl ausgesät und in den folgenden Wochen expandiert. Dabei wurde eine Anzahl von mehr als vier Passagen nicht überschritten. Bei einer komplett konfluenten MSC-Kultur in einer T175-Flasche konnte eine Zellzahl von ca. 1×10^6 Zellen angenommen werden. D.h. pro Maus, die transplantiert werden sollte, wurde eine T175-Flasche eingeplant. War absehbar, dass die MSC-Kulturen in den nächsten zwei Tagen die gewünschte Zellzahl erreicht haben würden, wurde umgehend damit begonnen, die Mäuse zu konditionieren (siehe **2.3.3**). Am Tag der intrafemorale Transplantation wurden die MSCs geerntet (siehe **2.2.4**). Dabei wurden sie zusätzlich mit einem $100\ \mu\text{M}$ -Zellsieb gefiltert, um später Klumpen im Transplantat zu vermeiden. Das resultierende Zellpellet wurde in DPBS aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die MSCs vorerst auf Eis gestellt. Die CD34+ Zellen wurden anschließend, wie zuvor die MSCs, in kaltem RPMI-1640-Medium mit zusätzlich 10 % FKS, um das Pelletieren der Zellen zu unterstützen, aufgetaut und dann ihre Zellzahl bestimmt. Sobald beide Zellfraktionen geerntet bzw. aufgetaut waren, wurden die Zellen in der entsprechenden Zellzahl auf sterile 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen (Eppendorf, Best.-Nr. 0030123328) verteilt. Dabei wurde für jedes zu transplantierte Bein ein Röhrchen vorbereitet. Die fertig vorbereiteten Proben wurden anschließend auf Eis ins Tierhaus transportiert.

2.2.7 Herstellung des 10x Erythrozytenlysepuffers

Zur Herstellung des Puffers zum Lysieren von Erythrozyten wurden folgende Substanzen abgewogen und anschließend in 1 L destilliertem Wasser gelöst:

Substanz	Molare Konzentration	Masse/Volumen für 1 L
NH ₄ Cl	1,55 M	82,91 g
NH ₄ HCO ₃	0,1 M	7,91 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	1 mM	2 ml

Der 10-fach-konzentrierte Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wurde der Puffer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt, anschließend sterilfiltriert (Millipore, Best.-Nr. S2GPT05RE) und bis zur Nutzung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.3 Tierexperimentelle Methoden

2.3.1 Versuchstiere

Für diese Arbeit wurden Mäuse des Stammes NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, besser bekannt als „NOD scid gamma“ (NSG), genutzt. NSG-Mäuse vereinen die Merkmale des NOD/ShiLtJ-Stamms, der als Hintergrundstamm genutzt wurde und eine verringerte angeborene Immunität besitzt (Shultz et al., 1995), sowie der Mutationen *Prkdc^{scid}* und *Il2rg^{tm1Wjl}*, die die adaptive Immunantwort beeinträchtigen. Die *Prkdc^{scid}*-Mutation, allgemein bekannt als „scid“ (engl. *severe combined immune deficiency*) für „schwerer kombinierter Immundefekt“, führt zu einem Mangel an reifen T- und B-Zellen (Shultz et al., 1995). Die Mutation *Il2rg^{tm1Wjl}* der Gammakette des Interleukin-2-Rezeptors (IL2rg) hat eine gestörte Zytokinsignalübertragung und somit einen Mangel an funktionellen NK-Zellen zur Folge (Shultz et al., 2005). Aufgrund ihrer schweren Immundefizienz können NSG-Mäuse mittels Transplantation von humanen CD34+ hämatopoetischen Stammzellen humanisiert werden, um z.B. PDX-Modelle zu generieren. Die NSG-Mäuse wurden direkt von Jackson Laboratory (JAX) bezogen und in den Tierhäusern 21 und 111 des Zentrums für Medizinische Forschung (ZMF) in Mannheim unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten und gezüchtet. Das Umsetzen der Mäuse und alle an ihnen vorgenommenen Eingriffe wurden stets unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Für alle Versuche wurden ausschließlich weibliche NSG-Mäuse im Alter von 8-10 Wochen verwendet, da Weibchen ein signifikant höheres Engraftment von humanen hämatopoetischen Stammzellen aufweisen (Notta et al., 2010; Chevaleyre et al., 2013). Sobald die Tiere in den Versuch eingeschlossen waren, wurden sie wöchentlich gewogen, um ihren Gesundheitsstatus zu überwachen. Alle Tierexperimente wurden durch die Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Karlsruhe geprüft und im Rahmen des Tierversuchsantrags G-150/17 genehmigt.

2.3.2 Versuchsplan

Den 8- bis 10-wöchigen, weiblichen NSG-Mäusen wurden zunächst, nach vorangegangener zweitägiger Konditionierung mit Busulfan (siehe 2.3.3), humane CD34+ Stammzellen und MSCs mittels intrafemorale Transplantation (siehe 2.3.6) koinjiziert. Nach 12 Wochen wurde mittels einer Knochenmarkpunktion (siehe 2.3.8) ermittelt, ob das humane Transplantat angewachsen war. Erfolgreich transplantierte Mäuse wurden anschließend in zwei Gruppen aufgeteilt und entweder mit 50 mg/kg EPAG oder

Vehikel für insgesamt 18 Wochen behandelt (siehe 2.3.9). In zwei Dosisesskalations-experimenten wurde nach 12 Wochen die verabreichte EPAG-Dosis auf 150 mg/kg für 12 weitere Wochen erhöht. Innerhalb des Behandlungszeitraums von 18-24 Wochen wurden die Mäuse alle zwei Wochen einer Blutentnahme (siehe 2.3.7) und alle sechs Wochen einer Knochenmarkpunktion unterzogen. Das Versuchsende und damit die Tötung der Tiere (siehe 2.3.10) erfolgte 30-36 Wochen nach der intrafemorale Transplantation. Die Versuchspläne wurden in **Abbildung 1A)** und **B)** schematisch dargestellt.

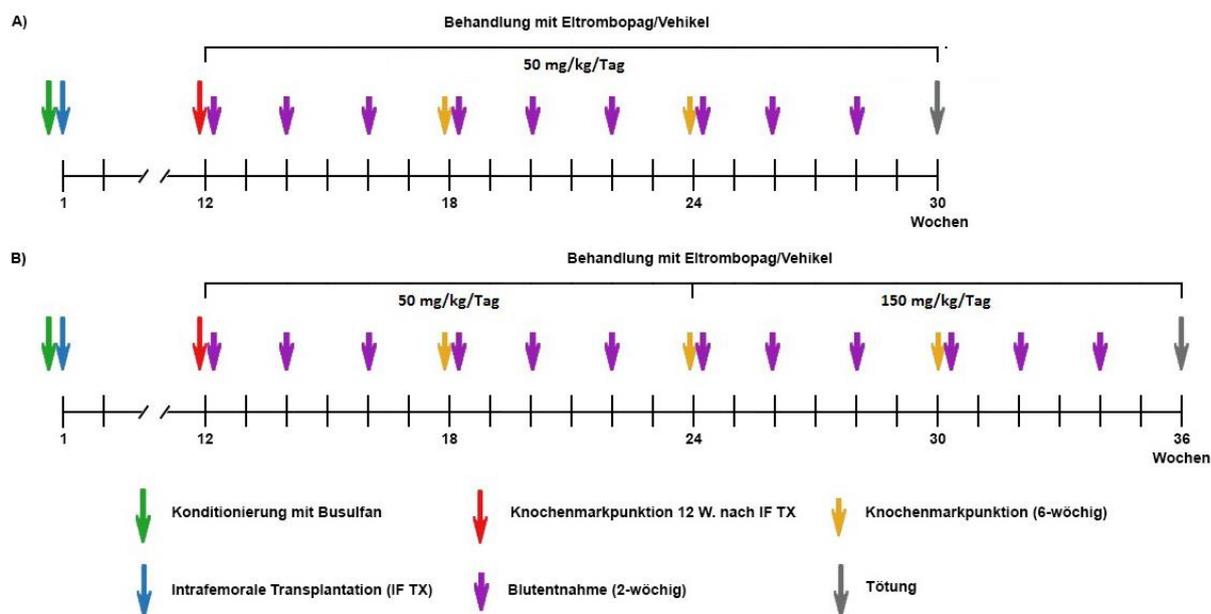


Abbildung 1: Tierexperimenteller Versuchsplan. A) 30-wöchiger Versuchsplan inklusive 18-wöchiger Behandlung mit 50 mg/kg EPAG pro Tag. **B)** 36-wöchiger Versuchsplan inklusive 12-wöchiger Behandlung mit 50 mg/kg EPAG pro Tag und anschließender 12-wöchiger Behandlung mit 150 mg/kg EPAG pro Tag.

2.3.3 Konditionierung

48 h und 24 h vor der intrafemorale Transplantation (siehe 2.3.6) wurden die Mäuse mittels Verabreichung von 25 mg/kg Körpergewicht des Chemotherapeutikums Busulfan (Sigma Aldrich, Best-Nr. B2635) subletal konditioniert. Dazu wurden einer 20 g-schweren Maus 5 mg/ml Busulfan in 2 % DMSO in sterilem DPBS in einem Injektionsvolumen von 100 µl intraperitoneal appliziert. Dies hat die Ablation des murinen Knochenmarks zur Folge, welches das Anwachsen der humanen Zellen in der murinen Knochenmarknische unterstützt (Robert-Richard et al. 2006; Hayakawa et al. 2009).

2.3.4 Analgesie

15 min vor den Eingriffen „Intrafemorale Transplantation“ (2.3.6) und „Knochenmarkpunktion“ (2.3.8) erfolgte die Verabreichung von 5 mg/kg Körpergewicht Carprofen (Cayman Chemical, Best.-Nr. 16409). Dazu wurden einer 20 g-schweren Maus 0,5 mg/ml Carprofen in 2 % DMSO in sterilem DPBS in einem Injektionsvolumen von 200 µl subkutan appliziert.

2.3.5 Inhalationsnarkose

Die Eingriffe „Intrafemorale Transplantation“ (2.3.6), „Blutentnahme“ (2.3.7), „Knochenmarkpunktion“ (2.3.8) und „Tötung der Tiere und Probenentnahme“ (2.3.10) wurden alle unter einer Inhalationsnarkose mit 2,5 Vol.-% Isofluran (Baxter, PZN: 6497131) bei gleichzeitiger Gabe von reinem Sauerstoff mittels eines mobilen Tiernarkosegeräts mit Isofluranverdampfer durchgeführt. Die Narkose wurde zunächst in einer Kammer eingeleitet und für die operativen Eingriffe anschließend außerhalb dieser Kammer über einen Schlauch mit Nasenstück aufrechterhalten.

2.3.6 Intrafemorale Transplantation

48 h und 24 h nach ihrer Konditionierung (siehe 2.3.3) wurde bei den Mäusen die intrafemorale Transplantation der humanen Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde den Mäusen zunächst das Schmerzmittel Carprofen (siehe 2.3.4) verabreicht und sie anschließend in eine Isoflurannarkose (siehe 2.3.5) versetzt. In der Zwischenzeit wurden die vorbereiteten humanen Zellen (siehe 2.2.6) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 20 µl sterilem DPBS resuspendiert. Anschließend wurde der Spritzenstempel aus einer sterilen 26G x ½"-Einwegspritze mit geringem Totvolumen (BD, Best.-Nr. 305501) herausgezogen und die Zellsuspension hineinpipettiert. Danach wurde der Stempel wieder in die Spritze eingeführt und die Zellsuspension nach oben geschoben. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen in der Zellsuspension und/oder Spritze befinden. Bis zur Injektion der Zellen wurde die Spritze auf Eis gekühlt. Die narkotisierten Mäuse wurden auf eine 37 °C-warme Heizplatte gelegt. Ihr Fell wurde rund um das Knie und am Femur wegrasiert und die freigelegte Haut mit Octenisept® (Schülke, Best.-Nr. 121418) desinfiziert. Zur Vorbereitung der Injektion wurde das Femur zwischen Daumen und Zeigefinger der nicht-dominanten Hand genommen und senkrecht zum Untergrund aufgerichtet. Mit der dominanten Hand wurde eine 26G x ½"-Kanüle (BD, Best.-Nr. 303800) seitlich der Kniescheibe aufgesetzt und unter rotierenden Bewegungen in das Femur gedreht. Dies diente zur Vorbohrung des Injektionslochs, damit die Spritze mit der Zellsuspension beim Einführen in den Knochen nicht verstopfen konnte. Anschließend wurde die vorbereitete Spritze mit der Zellsuspension eingeführt und die humanen Zellen in das Femur injiziert.

2.3.7 Blutentnahme

Bei allen Versuchstieren erfolgte ab der 12. Woche nach der intrafemorale Transplantation (siehe 2.3.6) alle zwei Wochen bis zum Erreichen des Versuchsendpunkts eine Blutentnahme. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse in eine Isoflurannarkose (siehe 2.3.5) versetzt. Den narkotisierten Mäusen wurde zunächst durch Zurückziehen der Gesichtshaut die Gesichtsvene (*Vena facialis*) gestaut und diese dann mittels einer sterilen Blut Lanzette (Buddeberg, Best.-Nr. 9.409 820) mandibular, am Unterkiefer, punktiert. Pro Blutentnahme wurden maximal 100 µl venöses Blut genommen. Dieses wurde in EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Best.-Nr. 20.1288) aufgefangen und sofort invertiert, um eine Koagulation des Bluts zu verhindern. Anschließend wurde die Stauung der Gesichtsvene aufgehoben und die Einstichstelle mit einer Mullkompressen (Lohmann & Rauscher, Best.-Nr. 13621) komprimiert, um die Blutung zu stoppen und ein Hämatom zu vermeiden. Die Aufarbeitung der gewonnenen Blutproben ist unter 2.4.1.1 beschrieben.

2.3.8 Knochenmarkpunktion

Bei allen Versuchstieren erfolgte ab der 12. Woche nach der intrafemorale Transplantation (siehe 2.3.6) alle sechs Wochen bis zum Erreichen des Versuchsendpunkts eine Knochenmarkpunktion am rechten Bein, wobei die initiale Punktion der Überprüfung des Anwachsens des humanen Transplantats diente. Zu diesem Zweck wurde den Mäusen zunächst das Schmerzmittel Carprofen (siehe 2.3.4) verabreicht und sie anschließend in eine Isoflurannarkose (siehe 2.3.5) versetzt. Den narkotisierten Mäusen wurde das Fell rund um das Knie und am Femur wegrasiert und die freigelegte Haut mit Octenisept® desinfiziert. Anschließend wurde eine sterile 26G x ½"-Einwegspritze mit ca. 100 µl sterilem DPBS aufgezogen. Zum Einführen der Nadel wurde das Femur zwischen Daumen und Zeigefinger der nicht-dominanten Hand genommen. Mit der dominanten Hand wurde die Kanüle seitlich der Kniescheibe aufgesetzt und unter rotierenden Bewegungen in das Femur gedreht. Sobald sich die Nadel im Inneren des Knochens befand, wurde das Knochenmark aspiriert. Die Spritze wurde anschließend aus dem Knochen herausgezogen und in einem bereitgestellten, sterilen und mit DPBS gefüllten 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen gespült. Die Aufarbeitung der gewonnenen Knochenmarkzellen ist unter 2.4.1.2 beschrieben.

2.3.9 Verabreichung von EPAG

Für diese Arbeit wurde das Medikament EPAG von Novartis in Form eines Pulvers zur Herstellung einer Suspension zum Einnehmen direkt zur Verfügung gestellt. Basierend auf Daten der Publikation von Sun und Kollegen (Sun et al., 2012) wurde die initiale EPAG-Konzentration auf 50 mg/kg pro Tag festgelegt. Diese wurde für zwei Experimente nach einer Behandlungsdauer von 12 Wochen auf 150 mg/kg pro Tag für 12 weitere Wochen erhöht. Die Behandlungsdauer betrug in der Regel 18 Wochen. Davon ausgenommen waren die beiden zuvor erwähnten Dosisescalationsexperimente, in denen sich die Behandlungsdauer auf insgesamt 24 Wochen belief. Den Mäusen wurde die Substanz über das Trinkwasser verabreicht, zu dem alle Mäuse eines Käfigs jederzeit Zugang hatten. Um sicherzustellen, dass jede Maus die tägliche Dosis von 50 mg/kg EPAG zu sich nimmt, betrug die eingesetzte Konzentration 375 µg/ml. Diese Konzentration wurde unter folgenden Annahmen berechnet: Jede Maus trinkt täglich etwa 4-8 ml Wasser (Bachmanov et al., 2002). Ausgehend von einer Tagesdosis von 50 mg/kg und einem maximalen Körpergewicht von 30 g pro Maus, wurde jede Maus mit 1,5 mg/Tag behandelt. Um die Tagesdosis mit 4 ml Wasser decken zu können, musste die eingesetzte Konzentration 375 µg/ml betragen. Für die Erhöhung der Dosis auf 150 mg/kg EPAG pro Tag, wurde die eingewogene Menge entsprechend angepasst. Die Suspensionslösung wurde dreimal wöchentlich gewechselt, um einen mikrobiellen Befall zu verhindern. Mäuse in der Vehikelgruppe erhielten weiterhin Wasser zum Trinken.

2.3.10 Tötung der Tiere und Probenentnahme

Die Tötung der Tiere erfolgte spätestens 36 Wochen nach der intrafemorale Transplantation (siehe 2.3.6). Dazu wurden die Mäuse unter Isoflurannarkose (siehe 2.3.5) zunächst mittels mandibularer Blutentnahme (siehe 2.3.7) entblutet und anschließend sofort mittels zervikaler Dislokation final getötet. Danach wurden Oberarme, Brustbein, Tibiae, Femora, Hüftknochen und Rückgrat sowie die Milz entnommen. Das Gewicht der Milz wurde auf einer Feinwaage bestimmt. Um die Länge der Milz messen zu können, wurde diese zusammen mit einem Lineal fotografiert. Anschließend wurde die Milz und eine Tibia in einer 10 %igen Formalinlösung (Sigma-Aldrich, Best.-Nr.

HT501128-4L) fixiert und asserviert. Die Aufarbeitung der anderen entnommenen Proben ist unter **2.4.1.3** beschrieben.

2.4 Zytometrische Methoden

2.4.1 Probenvorbereitung

2.4.1.1 Peripheres Blut

Im peripheren Blut, das mittels mandibularer Blutentnahme (siehe **2.3.7**) alle zwei Wochen einschließlich zum Endpunkt (siehe **2.3.10**), entnommen wurde, wurde der Gesamthämoglobingehalt und die absolute Anzahl der humanen Thrombozyten durchflusszytometrisch bestimmt, letzteres wie bereits zuvor beschrieben (Schipper et al., 2007). Dazu wurden „Flow-Count Fluorospheres“ Beads (Beckman Coulter, Best.-Nr. 7547053) 12 s gevortext und dann 25 µl der Beadsuspension in ein 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Diese Suspension besitzt eine definierte, chargenspezifische Beadkonzentration, die schlussendlich die absolute Quantifizierung der Thrombozyten ermöglicht. Das Blut wurde zunächst resuspendiert, um nach längerem Stehen und einem damit einhergehenden Sich-Absetzen der Zellen das Blut wieder zu homogenisieren, und dann 12 µl für das maschinelle Blutbild entnommen (siehe **2.4.2**) und 25 µl zu den Beads gegeben. Darauf wurden 250 µl des Erythrozytenlysepuffers hinzugegeben und für 5 min inkubiert. Die Lysereaktion wurde anschließend mit 250 µl DPBS abgestoppt und die Probe bei 400 x g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 2000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, um Plasma abzutrennen. Das Plasma wurde oberhalb des Zellpellets abgenommen, auf zwei frische 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und anschließend bei -80 C asserviert, um später für den murinen TPO-ELISA genutzt zu werden (siehe **2.8.2**). Die Färbung der Zellen ist unter **2.4.3.1** beschrieben.

2.4.1.2 Knochenmarkaspirate

Die alle sechs Wochen aspirierten Knochenmarkproben (siehe **2.3.8**) wurden genutzt, um den Prozentsatz der humanen Zellen im Verlauf des Experiments zu verfolgen und humane CD45+ Zellen daraus zu sortieren. Dazu wurde das in DPBS aufgenommene Knochenmark zusätzlich mit ein paar Tropfen FKS versetzt, invertiert und anschließend pelletiert. Um den Zellverlust bei den Knochenmarkaspiraten möglichst gering zu halten, wurden diese keiner Erythrozytenlyse unterzogen. Die Färbung der Zellen ist unter **2.4.3.2** beschrieben.

2.4.1.3 Gesamtknochenmark

Die zum Endpunkt (siehe **2.3.10**) entnommenen Oberarme, Tibiae, Femora, Hüftknochen sowie Brustbein und Rückgrat wurden von Muskeln und Sehnen befreit. Das Rückgrat wurde zudem in kleine Stücke gebrochen, um das darin enthaltene Rückenmark zu entfernen. Die Knochen wurden anschließend mittels Stößel in einem Mörser zusammen mit ca. 5 ml DPBS zerkleinert. Die entstehende Zellsuspension wurde über ein 100 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Zellen wurden anschließend pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet dann in 5 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 7 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde mit DPBS abgestoppt und die Zellen erneut pelletiert. Die Färbung der Zellen ist unter **2.4.3.3** beschrieben.

2.4.2 Maschinelles Blutbild

Mittels eines ABX Micros 60 Hämatologie-Analysegeräts (HORIBA) wurde ein maschinelles Blutbild erstellt, um den Gesamthämoglobingehalt in den alle zwei Wochen und zum Endpunkt entnommenen Blutproben (siehe **2.3.7** und **2.3.10**) zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden 12 µl PDX-Vollblut eingesetzt.

2.4.3 Fluoreszenzfärbung

Für alle Proben wurde das humane und murine (Miltenyi Biotec, Best.-Nr. 130-092-575) FcR-Block-Reagenz in einer Verdünnung von 1:10 bzw. 1:20 benutzt. Alle Details zu den in diesem Abschnitt genutzten Antikörpern sind in **Tabelle 7** einzusehen. Diese wurden zuvor titriert und alle in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Für jede Färbung wurde eine ungefärbte Kontrolle, die nur mit humanem und murinem FcR-Block-Reagenz behandelt wurde, mitgeführt.

2.4.3.1 Peripheres Blut

Zur Färbung der humanen und murinen Thrombozyten im peripheren Blut wurde ein Mastermix bestehend aus selbsthergestelltem FACS-Puffer (siehe **2.4.3.4**), humanem und murinem FcR-Block-Reagenz, sowie dem humanen (hCD41) und murinen CD41 (mCD41)-Antikörper hergestellt. Jedes Zellpellet wurde in einem Volumen von 100 µl aufgenommen, in FACS-Röhrchen mit Deckel (Corning, Best.-Nr. 352054) überführt und dann im Kühlschrank für 30 min inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Färbereaktion mit "CellWASH"-Puffer (BD, Best.-Nr. 349524) abgestoppt und die Zellen pelletiert. Der Überstand wurde anschließend dekantiert und die Proben bis zur Messung auf Eis gestellt.

2.4.3.2 Knochenmarkaspirate

Zur Färbung der humanen und murinen Leukozyten im Knochenmark wurde ein Mastermix bestehend aus selbsthergestelltem FACS-Puffer, humanem und murinem FcR-Block-Reagenz, sowie dem humanen und murinen CD45-Antikörper hergestellt. Die Zellpellets wurden in einem Volumen von 100 µl aufgenommen und wie unter **2.4.3.1** weiterprozessiert.

2.4.3.3 Gesamtknochenmark

Zur Färbung des Gesamtknochenmarks wurde das Zellpellet zunächst in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und humanes und murines FcR-Block-Reagenz dazugegeben. Für die beiden Färbungen, die nur zur Analyse dienten, nämlich hCD45/mCD45/hCD34 und hCD45/mCD45/hCD3/hCD19/hCD33, wurden je 25 µl Zellsuspension pro PDX entnommen und mit 100 µl Antikörpermix gefärbt. Der Rest der Zellen wurde zum Sortieren humaner Zellen genutzt. Dazu wurde die Proben je nach Experiment entweder komplett mit hCD45 und mCD45 gefärbt oder die Proben aufgeteilt und die andere Hälfte zusätzlich mit hCD45/mCD45/hCD61 gefärbt. Das Färbungsprotokoll ist **2.4.3** zu entnehmen.

2.4.3.4 Herstellung des FACS-Puffers

Zur Herstellung des FACS-Puffers für die Durchflusszytometrie wurden 4 ml BSA und 10 ml einer 2 % Natriumazid (NaN₃)-Lösung, hergestellt aus 1 g NaN₃ in 50 ml destilliertem Wasser, zu 1 L DPBS gegeben. Der Puffer wurde anschließend auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, sterilfiltriert und bis zur Nutzung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.4.4 Durchflusszytometrische Messung

2.4.4.1 Peripheres Blut

Die Messung der Thrombozyten erfolgte an einem „BD FACSCanto™ II“ Durchflusszytometer (BD) in der Core Facility „FlowCore Mannheim“. Dabei wurde in der SSC-A/FSC-A-Darstellung ein „Stopping Gate“ auf das „Gate“ mit den Beads gelegt und in diesem für jede Probe 5.000 Ereignisse, auch „Events“, aufgenommen, um die spätere absolute Quantifizierung der Thrombozyten zu ermöglichen.

2.4.4.2 Knochenmark

Alle Knochenmarkproben, einschließlich der Negativkontrollen, wurden vor der Analyse in selbsthergestelltem Sortpuffer (siehe **2.4.4.3**), versetzt mit dem Farbstoff „SYTOX Blue“ (Invitrogen, Best.-Nr. S34857) im Verhältnis 1:2000, zur späteren Diskriminierung von toten Zellen, aufgenommen. Vor der eigentlichen Messung wurden alle Proben in ein neues FACS-Tube mit aufgesetztem 35 µM-Zellsieb (Corning, Best.-Nr. 352235) überführt, da Knochenmark zur Klumpenbildung neigt. Die Messung der Proben erfolgte an einem „BD FACSAria II“, der in der „FlowCore Mannheim“ genutzt wurde, und einem „BD FACSMelody“ Zellsortierer (BD). Dabei wurden für jede Probe insgesamt 100.000 Events aufgenommen.

2.4.4.3 Herstellung des Sortpuffers

Zur Herstellung des Sortpuffers für die Zellsortierung wurden 4 ml 0,5 M EDTA, 10 ml hitzeinaktiviertes FKS und 10 ml 1 M HEPES zu 1 L HBSS gegeben. Der Puffer wurde anschließend sterilfiltriert und bis zur Nutzung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.4.5 Zellsortierung

Zur Gewinnung von DNA und RNA (siehe **2.5.1**) wurden aus den PDX-Knochenmarkproben verschiedene Zellfraktionen sortiert. Aus den Knochenmarkaspiraten (siehe **2.4.3.2**) wurden humane CD45⁺ Zellen und aus dem Knochenmark vom Endpunkt (siehe **2.4.3.3**) wurden sowohl humane CD45⁺, als auch humane CD45⁺CD61⁺ Zellen sortiert. Der Sortiervorgang erfolgte an den Zellsortierern „BD FACSAria II“ und dem „BD FACSMelody“. Abhängig vom Anteil des humanen Chimärismus in den PDX-Mäusen wurden bei einem hohen Anteil der jeweiligen Zellfraktion die Zellen erst in ein mit 350 µl Sortpuffer gefülltes DNA LoBind® 1,5 ml-Röhrchen (Eppendorf, Best.-Nr. 0030108051) sortiert. Nach Beendigung des Sortiervorgangs wurde dieses Röhrchen bei 700 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand anschließend abgenommen und das Zellpellet in 350 µl RLT Plus-Puffer unter mehrmaligem Vortexen lysiert. Bei einem niedrigen Anteil an humanen Zellen in der Maus wurden die Zellen direkt in 350 µl RLT Plus-Puffer sortiert. Falls möglich wurden mindestens 250.000 Zellen sortiert, um eine gute Ausbeute an DNA und RNA zu garantieren. Die RLT Plus-Proben wurden bis zu ihrer Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Knochenmarkproben, die nicht vollständig sortiert wurden, wurden im Anschluss viabel asserviert (siehe **2.2.5**).

2.4.6 Auswertung

Die akquirierten durchflusszytometrischen Daten wurden mittels der Software „FlowJo™“ (BD) ausgewertet. Die angegebenen Zellzahlen bzw. Prozentsätze beziehen sich auf die Ergebnisse nach Doublettenausschluss sowie, im Fall von Knochenmarkproben, nach Ausschluss der toten Zellen. Der prozentuale Anteil des humanen Chimärismus in den PDX-Mäusen wurde dabei wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Prozentsatz der humanen CD45+ Zellen}}{\text{Prozentsatz der humanen und murinen CD45+ Zellen}} \times 100$$

Die absolute Quantifizierung der humanen bzw. murinen Thrombozyten pro Mikroliter Blut erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mittels folgender Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der gemessenen CD41+ Thrombozyten}}{\text{Anzahl der gemessenen Beads}} \times \text{Definierte Anzahl an Beads}/\mu\text{l}$$

Tabelle 7: Auflistung der für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper.

Antigen	Fluorophor	Klon	Hersteller	Best.-Nr.
CD3, human	PerCP-Cy5.5	UCHT1	BD Biosciences	560835
CD19, human	FITC	HIB19	BD Biosciences	555412
CD33, human	APC	WM53	Biolegend	303407
CD34, human	FITC	561	Biolegend	343603
CD41, human	PE	HIP8	Biolegend	303705
CD41, murin	APC/Cy7	MWReg30	Biolegend	133927
CD45, human	PE	HI30	BD Biosciences	560975
CD45, murin	APC/Cy7	30-F11	Biolegend	103115
CD61, human	APC	VI-PL2	Biolegend	336411

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 DNA- und RNA-Aufarbeitung

Bei den in diesem Abschnitt aufgeführten Protokollen handelt es sich um Standardprotokolle des Herstellers, die an mehreren Stellen optimiert wurden. Eluierte RNA wurde sofort auf Eis gestellt und anschließend bei -80 °C weggefroren, eluierte DNA wurde bei -20 °C eingelagert.

2.5.1.1 RNA aus MNCs, CD34+ und sortierten Zellen

Zum Isolieren von RNA und DNA aus MNCs (siehe 2.2.2) und CD34+ Zellen (siehe 2.2.3) aus Patientenproben sowie den sortierten humanen CD45+ und CD61+ Zellen (siehe 2.4.5) aus PDX-Proben wurden das „AllPrep DNA/RNA Mini“ Kit (QIAGEN, Best.-Nr. 80204) und das „AllPrep DNA/RNA Micro“ Kit (QIAGEN, Best.-Nr. 80284) genutzt. Falls nicht anderweitig definiert, erfolgten die Zentrifugationsschritte bei 10.000 rpm für 30 s. Zunächst wurden die RNAprotect®- und RLT Plus-Proben auf Eis aufgetaut. Die RNAprotect®-Proben wurden anschließend gut gevortext und bei 8.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 600 µl RLT Plus-Puffer aufgenommen und die Probe abermals gut gevortext bis das Pellet vollständig gelöst war. Für den Fall, dass mehr als 1×10^6 Zellen lysiert wurden, wurde die Probe auf eine QIAshredder-Säule (QIAGEN, Best.Nr. 79654) gegeben und bei höchstmöglicher Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert. Der Durchfluss bzw. die

RLT Plus-Proben mit geringerer Zellzahl wurden dann auf eine AllPrep DNA-Säule (in den Kits enthalten) gegeben und zentrifugiert. Die Säule wurde dann auf ein neues Auffangröhrchen (i.F. „Collection Tube“), gesetzt und zur Seite gestellt, um daraus im Anschluss DNA zu isolieren (siehe **2.5.1.2**). Der Durchfluss wurde mit dem 1,5-fachen Volumen an 100 % Ethanol (Merck, Best.-Nr. 1.00983) versetzt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Maximal 700 µl des Gemischs wurde bei einer Zellzahl größer als 5×10^5 Zellen auf eine RNeasy Mini-Säule (Teil des AllPrep DNA/RNA Mini Kits), bei einer geringeren Zellzahl auf eine RNeasy MinElute-Säule (Teil des AllPrep DNA/RNA Micro Kits) gegeben und zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt mit dem Restvolumen des Durchfluss-Ethanol-Gemischs wiederholt. Die Säule wurde dann nacheinander mit 700 µl RWT-Puffer (QIAGEN, Best.-Nr. 1067933) und 500 µl RPE-Puffer (in den Kits enthalten) gewaschen, jeweils bei 10.000 rpm für 30 s zentrifugiert und die Säule in ein neues Collection Tube gesetzt. Auf eine RNeasy Mini-Säule wurden darauf weitere 500 µl RPE-Puffer, auf eine RNeasy MinElute-Säule 500 µl 80 % Ethanol gegeben und bei 10.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Dann wurde die Säule in ein neues Collection Tube gesetzt und im Falle einer RNeasy Mini-Säule für 1 min und bei einer RNeasy MinElute-Säule für 5 min bei offenem Deckel und höchstmöglicher Geschwindigkeit zentrifugiert, um diese zu trocknen. Zur Elution der RNA wurde die Säule auf ein 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen gesetzt und auf eine RNeasy Mini-Säule 30 µl und auf eine RNeasy MinElute-Säule 14 µl RNase-freies Wasser (in den Kits enthalten) pipettiert und bei höchstmöglicher Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert.

2.5.1.2 DNA aus MNCs, CD34+ und sortierten Zellen

Zur Isolation der DNA wurde die AllPrep DNA-Säule (siehe **2.5.1.1**) zunächst mit 500 µl AW1-Puffer (in den Kits enthalten) gewaschen, bei 10.000 rpm für 30 s zentrifugiert und die Säule in ein neues Collection Tube gesetzt. Danach wurde auf die Säule 500 µl AW2-Puffer (in den Kits enthalten) gegeben und diese bei höchstmöglicher Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert. Die Säule wurde dann auf ein neues Collection Tube gesetzt und bei höchstmöglicher Geschwindigkeit für 1 min trockenzentrifugiert. Im Anschluss wurde die Säule auf ein DNA LoBind® 1,5 ml-Röhrchen gesetzt. Die DNA wurde je nach Zellzahl unterschiedlich oft und in unterschiedlichen Volumina EB-Puffer eluiert:

<1 x 10 ⁵ Zellen	3 x 30 µl
1 x 10 ⁵ -1 x 10 ⁶ Zellen	3 x 50 µl
>1 x 10 ⁶ Zellen	2 x 100 µl

Zur Elution wurde der EB-Puffer (in den Kits enthalten) auf dem Heizblock zuvor auf 70 °C erwärmt, dann in dem entsprechenden Volumen auf die Säule gegeben und diese anschließend bei 70 °C für 5 min auf dem Heizblock inkubiert. Danach wurde die Säule bei 10.000 rpm für 1 min zentrifugiert.

2.5.1.3 RNA aus MSCs

Zum Isolieren von RNA aus MSCs (siehe **2.2.4**) wurden das „RNeasy Micro“ Kit (QIAGEN, Best.-Nr. 74004) genutzt. Die Arbeitsschritte erfolgten bis auf geringe Abweichungen analog zur Isolation von RNA aus MNCs, CD34+ und sortierten Zellen (siehe **2.5.1.1**). Die in RNAProtect®-Puffer aufgenommenen Zellen wurden in RLT-Puffer (im Kit enthalten) aufgenommen. Dabei wurden bei einer Zellzahl größer als 5×10^5 Zellen 600 µl RLT-Puffer, bei einer geringeren Zellzahl 350 µl RLT-Puffer eingesetzt. Das Durchfluss-Ethanol-Gemisch wurde bei einer Zellzahl größer als 1×10^5 auf eine

RNeasy Mini-Säule (Teil des AllPrep DNA/RNA Mini Kit), bei einer geringeren Zellzahl auf eine RNeasy MinElute-Säule (im Kit enthalten) gegeben.

2.5.1.4 DNA aus MSCs

Zur Isolation von DNA aus MSCs (siehe **2.2.4**) wurde das „QIAamp DNA Mini“ Kit (QIAGEN, Best.-Nr. 51304) genutzt. Zunächst wurden die ATL-Proben auf Eis aufgetaut. Danach wurden 20 µl Proteinase K (im Kit enthalten) zur Probe gegeben und bei 56 °C für 10 min auf dem Heizblock inkubiert. Der Heizblock wurde danach auf 70 °C hochgestellt. Zur Probe wurden im Anschluss 4 µl RNase A (QIAGEN, Best.-Nr. 158922) gegeben, diese für 15 s gevortext und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 200 µl AL-Puffer (im Kit enthalten) dazupipettiert, die Probe kurz gevortext und dann bei 70 °C für 1 min inkubiert. Danach wurden 100 % Ethanol zu der Probe hinzugegeben, diese gevortext und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde das Gemisch auf eine QIAamp MinElute-Säule (im Kit enthalten) pipettiert, diese bei 8.000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurden 500 µl AW1-Puffer auf die Säule gegeben, diese bei 8.000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurden 500 µl AW2-Puffer auf die Säule gegeben, diese bei höchstmöglicher Geschwindigkeit zentrifugiert und die Säule anschließend in ein neues Collection Tube gesteckt. Zum Trocken wurde die Säule bei höchstmöglicher Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Säule auf ein DNA LoBind® 1,5 ml-Röhrchen gesetzt. Zur Elution der DNA wurden 50 µl EB-Puffer (Teil des AllPrep DNA/RNA Mini Kit), der zuvor auf 70 °C erhitzt wurde, auf die Säule gegeben. Die Säule wurde dann bei 70 °C für 5 min auf dem Heizblock inkubiert, bevor sie bei 8.000 rpm für 1 min zentrifugiert wurden. Der Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt.

2.5.2 DNA- und RNA-Messung

Die Konzentration der isolierten RNA (siehe **2.5.1.1** und **2.5.1.3**) wurde an einem NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) gemessen. Die Konzentration der isolierten DNA (siehe **2.5.1.2** und **2.5.1.4**) wurde mittels des „Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay“ Kit (Invitrogen, Best.-Nr. P11496) bestimmt. Dazu wurden für die DNA-Standardreihe folgender Konzentrationsbereich gewählt: 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,13 – 1,56 – 0,78 ng/µl. Eine zweifachkonzentrierte Standardreihe wurde aus DNA-Standard und TE-Puffer hergestellt und davon je 50 µl in eine schwarze 96-Well-Half-Area-Mikroplatte (Greiner Bio-One, Best.-Nr. 675946) pipettiert. Von den Proben wurde je 1 µl DNA eingesetzt und diese mit 49 µl TE-Puffer verdünnt. Die Standardreihe und alle Proben wurden mindestens in Duplikaten gemessen. Das Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA-Reagenz wurde 1:200 mit TE-Puffer verdünnt, in ein 5 ml-Reservoir (Biozym, Best.-Nr. 675020) gekippt und dann davon je 50 µl mit einer Mehrkanalpipette in jedes Well pipettiert und mehrfach resuspendiert. Der Assay wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 535 nm mit dem Plattenlesegerät „Tecan Infinite 200 PRO 8“ (Tecan Group Ltd.) gemessen. Die Erstellung der Standardgerade sowie die Auswertung der Ergebnisse erfolgten in Microsoft Excel (Microsoft Corporation).

2.5.3 Aufkonzentrierung der DNA

Für die Gesamt-Exom-Sequenzierung (siehe **2.5.4**) wurde eine DNA-Menge von 150 ng in einem maximalen Volumen von 30 µl angestrebt also eine DNA-Konzentration von mindestens 5 ng/µl pro Probe. Proben, die diese Konzentration nicht erreichten, wurden mittels „AMPure XP“-Beads (Beckman Coulter, Best.-Nr. A63881) aufkon-

zentriert. Bei sehr geringen Konzentrationen wurden zwei oder alle DNA-Elutionen einer Probe vereint. Dazu wurden die Beads 30 min vor Beginn aus dem Kühlschrank genommen, um auf Raumtemperatur zu kommen, und im Anschluss mehrfach gut gevortext. Die DNA und die Beads wurden dann in einem Verhältnis von 1:1 in eine U-Bottom-Mikroplatte (Greiner Bio-One, Best.-Nr. 650101) gegeben, durch mindestens 10-faches Auf- und Abpipettieren gut gemischt und für 10 min inkubiert. Danach wurde die Platte für 5 min auf einem Plattenmagnetständer inkubiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig abgenommen und das gebildete Bead-Pellet mit 100 µl 80 % Ethanol zweimal für 30 s gewaschen. Das Pellet wurde dann zum Trocknen etwa für 5 min stehengelassen, damit das Ethanol verdampft. Die Platte wurde vom Magnetständer heruntergenommen, das Pellet in einem geeigneten Volumen RNase-freiem Wasser aufgenommen und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut auf den Magnetständer gestellt und für 5 min inkubiert. Schließlich wurde das DNA-Eluat aus der Platte in ein frisches 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt.

2.5.4 Gesamt-Exom-Sequenzierung

Für die Gesamt-Exom-Sequenzierung wurden, sofern möglich, 150 ng genomische DNA aus Patienten-MSCs und -MNCs bzw. CD34+ Zellen, und sortierten humanen CD45+ Zellen (siehe **2.5.1.2** und **2.5.1.4**) an das Münchener Leukämie Labor (MLL) geschickt. Dort wurde die Bibliotheksvorbereitung (engl. *library prep*) der DNA mit dem „Nextera™ Flex for Enrichment“ Kit (Illumina) unter der Verwendung von eindeutigen, doppelten Indizes (engl. *unique dual indices*) durchgeführt. Die generierte Insertgröße betrug 180 Basenpaare. Die Anreicherung (engl. *enrichment*) der zu sequenzierenden DNA-Bereiche erfolgt mit dem „Hybridization capture“-Protokoll (IDT), inklusive dem „xGen Exome Research“-Panel. Bei PDX-Proben mit DNA-Mengen kleiner als 50 ng wurden die PCR-Zyklen während dem Capture gemäß dem Protokoll des Herstellers von 9 auf 12 erhöht. Die Sequenzierung der Bibliothek erfolgt mit einer mittleren Zielcoverage von 120 x auf einem „NovaSeq 6000 System“ Sequenzierautomaten mit S4-Flusszelle (engl. *flow cell*) (Illumina). Die Rohsequenzierungsdaten wurden anschließend über eine Cloud zur Verfügung gestellt.

2.5.5 Sanger-Sequenzierung

Die Validierung der patientenspezifischen Mutationen von Patient P04, die während der Analyse der Gesamt-Exom-Sequenzierung (siehe **2.6.1**) detektiert wurden, in der DNA der sortierten hCD45+ und hCD45+hCD61+ Zellen (siehe **2.4.5**) erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung. Dazu wurden zunächst Primerpaare mittels des Webtools Primer3 (<https://primer3.ut.ee>) (Kõressaar und Remm, 2007; Untergasser et al., 2012; Kõressaar et al., 2018) für die folgenden Mutationen designet: *ASXL1-Q561X*, *RUNX1-T196fs*, *SRSF2-P95H* und *TET2-H1904Q*. Alle Primersequenzen sind in **Tabelle 8** aufgelistet. Die PCR-Reaktion wurde mittels des „FastStart™ High Fidelity PCR-System, dNTPack“ Kits (Roche, Best.-Nr. 4738284001) nach Angaben des Herstellers angesetzt und in eine 96-Well-PCR-Mikroplatte (Sarstedt, Best.-Nr. 72.1978.202), die mit einer PCR-Klebefolie versiegelt wurde (neoLab, Best.-Nr. 7-5212), überführt. Zur Optimierung der SRSF2-PCR wurden zusätzlich 10 % DMSO zur Reaktion hinzugefügt. Zur Amplifikation wurde eine „Mastercycler X50s“ PCR-Maschine (Eppendorf) und das folgende Touchdown-PCR-Programm genutzt:

Schritt		Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung		95 °C	2 min
20 PCR-Zyklen	Denaturierung	95 °C	30 s
	Primerhybridisierung	63 °C	30 s
	Elongation	72 °C	1,5 min
35 PCR-Zyklen	Denaturierung	95 °C	30 s
	Primerhybridisierung	53 °C	30 s
	Elongation	72 °C	1,5 min
Finale Elongation		72 °C	7 min
Halten		10 °C	∞

Die Funktionalität der Primer wurde mittels Auftragens auf ein 2 % Agarosegel getestet. Zum Gießen des Gels wurden 2 g Agarosepulver (Biozym, Best.-Nr. 840001) in 100 ml TBE-Puffer (AppliChem, Best.-Nr. A3945) in der Mikrowelle aufgekocht und mit 5 µl ROTI@GelStain (Roth, Best.-Nr. 3865.1) versetzt. Anschließend wurden 2 µl PCR-Produkt mit 2 µl „6X Orange“-DNA-Ladefarbe (Thermo Scientific, Best.-Nr. R0631) und 8 µl RNasefreiem Wasser gemischt und zusammen mit 2 µl „O'GeneRuler 1 kb“-DNA-Leiter (Thermo Scientific, Best.-Nr. SM1163) auf das Gel geladen. Die Banden auf dem Gel wurden schließlich mit einem ChemiDoc XRS+ Imager (Biorad) visualisiert. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Best.-Nr. 28104) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und die DNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die DNA-Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte wurde mittels NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer gemessen. Pro Sequenzierungsansatz wurden bei einer PCR-Produkt-Größe von 300-1000 bp 75 ng DNA in einem Volumen von 15 µl, d.h. einer DNA-Konzentration von 5 ng/µl, und 2 µl Primer in einer Konzentration von 10 µM benötigt. Für jedes PCR-Produkt wurde dabei je ein Ansatz mit dem dazugehörigen Vorwärts- und Rückwärts-Primer hergestellt. Die Proben wurden schließlich zum Sequenzieren zu Eurofins Genomics (Ebersberg) geschickt.

Tabelle 8: Auflistung der Primersequenzen die für die Sanger-Sequenzierung (siehe 2.5.5) genutzt wurden.

Gen (Mutation)	Primersequenz (5'→3')	Produktgröße
ASXL1 (p.Q561X)	vorwärts GTTGAGTCTGTGGCTTCTCG	432 bp
	rückwärts TCTCACTAACTTGAAGGCTGTC	
RUNX1 (p.T196fs)	vorwärts GCCAAAATTCCGGGAGTGTT	510 bp
	rückwärts TGCTGCCCTGAATGGTTCTA	
SRSF2 (p.P95H)	vorwärts GGCCGCCACTCAGAGCTA	461 bp
	rückwärts CTTCGCCGCGGACCTTTG	
TET2 (p.H1904Q)	vorwärts AGGACAACGATGAGGTCTGG	409 bp
	rückwärts GACATGGTCCTTTCGGCAAG	

2.5.6 cDNA-Synthese

Für die quantitative PCR (siehe **2.5.7**) wurden, sofern möglich, 1 µg RNA von MNCs, MSCs und sortierten humanen CD45+ Zellen (siehe **2.5.1.1** und **2.5.1.3**) mittels des „QuantiTect Reverse Transcription“ Kit (QIAGEN, Best.-Nr. 205311) gemäß dem Protokoll des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden die cDNA-Proben aus Patientenmaterial 1:10 und jene aus PDX-Material 1:3 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

2.5.7 Quantitative PCR

Zur Bestimmung des mRNA-Expressionslevels der Gene *S100A8*, *S100A9*, *CASP1* und *NLRP3* wurde eine Reverse Transkriptase-quantitative PCR (RT-qPCR) mittels der zuvor hergestellten cDNA von MNCs, MSCs und sortierten humanen CD45+ Zellen (siehe **2.5.6**) durchgeführt. *GUSB* wurde dabei als Haushaltsgen genutzt. Dazu wurden zunächst die Primerpaare mittels des Webtools „Primer-BLAST“ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) (Ye et al., 2012) des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) designet. Dabei wurde darauf geachtet, dass zwischen den Primern ein mindestens 1000 basenpaarlanges Intron lag und/oder mindestens einer der Primer zwei Exons überspannte. Als Referenz diente die in der NCBI-Datenbank hinterlegte Transkriptsequenz des entsprechenden Gens:

Gen	NCBI-Referenzsequenz
<i>S100A8</i>	NM_002964.5
<i>S100A9</i>	NM_002965.4
<i>CASP1</i>	NM_001257118.3
<i>NLRP3</i>	NM_001243133.2
<i>GUSB</i>	NM_000181.4

Alle Primersequenzen sind in **Tabelle 9** aufgelistet. Die qPCR-Reaktion wurde mittels des „LightCycler® 480 SYBR Green I Master“-Reaktionsmix (Roche, Best.-Nr. 04707516001) nach Angaben des Herstellers angesetzt und in eine 96-Well-qPCR-Mikroplatte (Roche, Best.-Nr. 04729692001), die mit einer qPCR-Klebefolie versiegelt wurde (Sarstedt, Best.-Nr. 951.994), überführt. Alle Proben wurden in Triplikaten analysiert. Die RT-qPCR wurde auf einem „LightCycler® 480 II“-System (Roche) durchgeführt. Dazu wurde das folgende Programm genutzt:

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
45 PCR-Zyklen	Denaturierung	95 °C
	Primerhybridisierung	60 °C
	Elongation	72 °C

Die relative Quantifizierung des mRNA-Expressionslevels erfolgte mittels der sogenannten Delta-Delta-Ct-Methode (Livak und Schmittgen, 2001) unter Nutzung von zuvor gemittelten Ct-Werten.

Tabelle 9: Auflistung der Primersequenzen die für die quantitative PCR (siehe 2.5.7) genutzt wurden.

Gen	Primersequenz (5'→3')	Produktgröße
S100A8	vorwärts TGTCTTTCAGAAGACCTGGTGG	199 bp
	rückwärts GACGTCTGCACCCTTTTTCC	
S100A9	vorwärts CTGCAAATTTTCTCAAGAAGGAGA	160 bp
	rückwärts CACCCTCGTGCATCTTCTCG	
CASP1	vorwärts GAAAAGCCATGGCCGACAAG	189 bp
	rückwärts CGGAGTCAATCAAAGCTCGG	
NLRP3	vorwärts ATGTGGGGGAGAATGCCTTG	199 bp
	rückwärts TTGTCTCCGAGAGTGTTGCC	
GUSB	vorwärts CCTGCGTCCCACCTAGAATC	188 bp
	rückwärts AGGTGCCCGTAGTCGTGATA	

2.6 Bioinformatische Methoden

2.6.1 Bioinformatische Pipeline

Zum Bestimmen von somatischen Mutationen in den Patienten- und PDX-Proben wurden die Rohsequenzierungsdaten im FASTQ-Format (siehe 2.5.4) mittels einer bereits zuvor etablierten bioinformatischen Pipeline (Mossner et al., 2016) analysiert. Dazu wurden die Daten der einzelnen, sequenzierten DNA-Fragmente, auch „Reads“ genannt, zunächst mit „trimmomatic“ (v0.39) gekürzt (engl. *trimming*), um Sequenzierungsartefakte zu entfernen. Dann wurden sie mittels „bwa“ (v0.7.9) mit dem humanen hg19-Referenzgenom abgeglichen und entsprechend arrangiert (engl. *alignment*). PCR-Duplikate wurden mit „picard MarkDuplicates“ (v2.20.5) identifiziert und entfernt (engl. *deduplication*). Die generierten BAM-Dateien wurden mit dem „gatk-Bundle“ (v3.8) neu ausgerichtet und kalibriert. Potenziell überlappende Readabschnitte am Anfang und/oder Ende eines Reads, die nicht mit dem Referenzgenom übereinstimmten, wurden mit „bamUtil clipOverlap“ (v1.0.14) maskiert (engl. *soft-clipping*) und somit aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Daten von PDX-Proben wurden zunächst unabhängig gegen das humane hg19- und murine mm10Bam-Referenzgenom alignet und dann unter Verwendung des „R“-Softwarepakets „xenofilter“ auf kontaminierende Maus-DNA-Reads gefiltert (Jo et al., 2019). Somatische Mutationen wurden dann durch Nutzung von „gatk Mutect2“ (gatk v4.1.3.0) identifiziert (engl. *mutational calling*). DNA von autologen MSCs diente dabei als Keimbahnkontrolle. Für einen homogenen Vergleich zwischen mehreren PDX desselben Patienten wurden zunächst alle PDX-Proben einzeln gecalled. Danach wurden alle passierten Filterstellen aller PDX mittels „gatk genotypeMergeOptions UNIQUIFY“ kombiniert und anschließend einschließlich der Patientenprobe mit „VarScans mpileup2snp“ und „VarScans mpileup2indel“ (v2.4.4) erneut quantifiziert. Nur Varianten die die Qualitätskontrolle durch „gatk FilterMutectCalls“ bestanden hatten, wurden mit „annovar“ (Wang et al., 2010) weiter annotiert und anschließend nochmals durch Visualisierung im „IG Viewer“ manuell verifiziert. Im Durchschnitt wurde für Patienten- und PDX-Proben eine 89,8-fache mittlere

Coverage erreicht. Zum Nachweis von Kopienzahlvariationen und chromosomalen Veränderungen, die zu einem Verlust der Heterozygotie (LOH, engl. *loss of heterozygosity*) führen, in Patienten- und PDX-Proben wurde das „R“-Softwarepaket „Sequenza“ (Favero et al., 2015) verwendet. Für die anschließende Quantifizierung dieser Aberrationen wurde die gemittelte B-Allel-Frequenz von heterozygoten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, engl. *single-nucleotide polymorphisms*) verwendet. Die Rohdaten wurden beim „European Genome-Phenome Archive“ (EGA) (<https://ega-archive.org/>) (Lappalainen et al., 2015) hochgeladen und stehen unter der Kennnummer „EGAS00001005329“ zur freien Verfügung.

2.6.2 SciClone

Um die klonale Komposition der Patienten- und PDX-Proben zu rekonstruieren sowie deren Entwicklung im Verlauf des Experiments zu verfolgen, wurden die zuvor ermittelte Varianzallelfrequenz (VAF, engl. *variant allele frequency*) der somatischen Mutationen (siehe 2.6.1) mittels des Softwarepakets „SciClone“ (v1.1) (Miller et al., 2014) unter Benutzung von „R“ (v3.5.1) und „RStudio“ (v1.2.5001) analysiert. Dabei berechnet SciClone anhand der VAFs, welche der Mutationen aufgrund einer ähnlichen Frequenz und eines ähnlichen Frequenzverlaufs zwischen zwei oder mehreren zeitlich aufeinanderfolgenden Proben desselben Patienten oder desselben PDX mit hoher Wahrscheinlichkeit demselben Mutationscluster bzw. Klon angehören. Für die Analyse wurden nur Mutationen eingeschlossen, die in den Patienten-MNCs bzw. CD34+ Zellen eine VAF von >10 % besaßen, sowie in den Patienten-MSCs bei <10 % lagen. Alle PDX-Proben desselben Patienten wurden gemeinsam geclustert.

2.6.3 Software-Pakete

Alle in dieser Studie für die bioinformatische Pipeline verwendeten Software-Pakete können auf der Webseite GitHub (<https://github.com>) kostenfrei heruntergeladen werden (Stand: 28.11.2022):

- Trimmomatic: <https://github.com/usadellab/Trimmomatic>
- Burrows-Wheeler Aligner (BWA): <https://github.com/lh3/bwa>
- Picard: <https://github.com/broadinstitute/picard>
- Genome Analysis Toolkit (GATK): <https://github.com/broadinstitute/gatk>
- BamUtil: <https://github.com/statgen/bamUtil>
- XenofilteR: <https://github.com/PeepersLab/XenofilteR>
- IGV Viewer: <https://github.com/igvteam/igv>
- VarScan: <https://github.com/dkoboldt/varscan>
- Sequenza: <https://github.com/cran/sequenza>
- SciClone <https://github.com/genome/sciclone>

2.7 Histologische Methoden

2.7.1 Knochenmarkausstriche

Zu Versuchsende wurden aus dem Knochenmark je einer Tibia pro PDX Knochenmarkausstriche angefertigt. Dazu wurden zunächst die Epiphysen der Tibia mit einem Skalpell abgetrennt. Dann wurde eine mit DPBS-gefüllte Spritze (B. Braun, Best.-Nr. 9161406V) mit aufgesetzter 24G x 1"-Kanüle (BD, Best.-Nr. 304100) in das schmale Ende der Tibia eingeführt, während diese mit einer Pinzette fixiert wurde. Das andere

Ende der Tibia wurde in eine ebenfalls mit DPBS gefüllte Petrischale gehalten und anschließend das Knochenmark aus dem Knochen herausgespült. Das herausgespülte, fadenförmige Knochenmark wurde dann mittels Skalpell in ca. 2 mm große Stücke geteilt. Diese Stücke wurden einzeln auf Objektträger (Carl Roth, Best.-Nr. H868.1) gelegt und mit einem Tropfen DPBS befeuchtet. Mit einem zweiten Objektträger wurde das Knochenmark zwischen den beiden Objektträgern dann zerquetscht. Danach wurde der obere Objektträger um ca. 20 ° angewinkelt und über den unteren Objektträger gezogen, um das Knochenmark auf diesem zu verteilen. Eine schematische Darstellung der Anfertigung von Knochenmarkausstrichen ist in **Abbildung 2** zu sehen. Nach Herstellung der Knochenmarkausstriche wurden diese für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend 10 min in Methanol (Merck, Best.-Nr. 106009) fixiert.

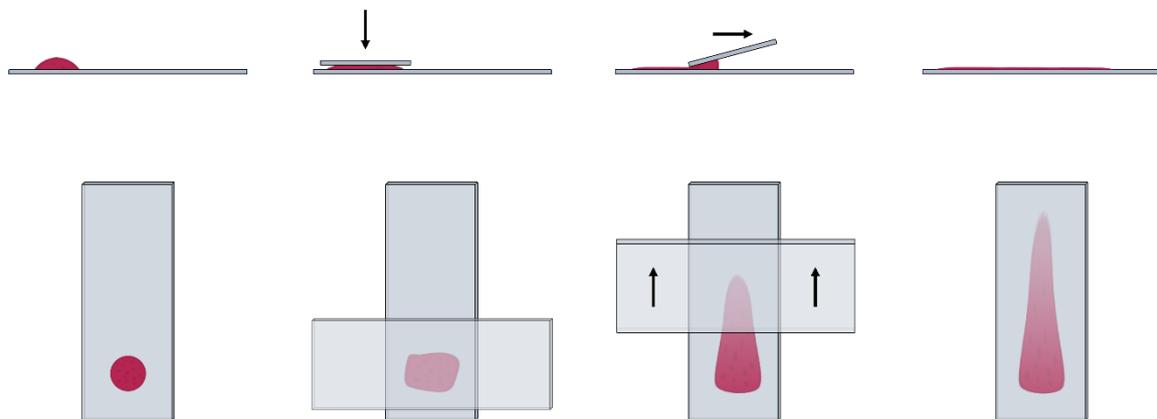


Abbildung 2: Schema zur Anfertigung von Knochenmarkausstrichen.

2.7.2 May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Die methanolfixierten Knochenmarkausstriche wurden innerhalb von zwei Wochen einer May-Grünwald-Giemsa-Färbung unterzogen. Diese Färbung ermöglicht durch eine detaillierte und unterschiedlichfarbige Darstellung von Zytoplasmen, Granula und Zellkernen die Differenzierung von verschiedenen Zelltypen sowie normalen und pathologischen hämatopoetischen Zellen. Die Färbung wurde händisch in gläsernen Färbetrögen mit Objektträgerereinsätzen durchgeführt. Zum Waschen der Präparate bzw. Verdünnen der May-Grünwald-Lösung (Merck, Best.-Nr. 101424) und Giemsa-Lösung (Merck, Best.-Nr. 109204) wurde gepuffertes Wasser mit pH 6,8 (i.F. „Puffer“ genannt) aus destilliertem Wasser und Puffertabletten (Merck, Best.-Nr. 111374) hergestellt. Das genutzte Protokoll wurde der Publikation Binder et al., 2012 entnommen:

7 min	1 Teil May-Grünwald-Lösung + 1 Teil Puffer
20 min	1 Teil Giemsa-Lösung + 6 Teile Puffer
10 s	Puffer
4 min	Puffer
4 min	Puffer

Nach vollständiger Trocknung wurden die Objektträger unter Nutzung des Eindeckmittels Entellan® Neu (Merck, Best.-Nr. 107961) und Deckgläsern (Carl Roth, Best.-Nr. H878.2) eingedeckt.

Zur Diagnostik werden bei jeder durchgeführten Knochenmarkpunktion in der Abteilung für „Hämatologie und Onkologie“ der „Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg“ routinemäßig Knochenmarkausstriche angefertigt und anschließend im „Institut für klinische Chemie“ einer May-Grünwald-Giemsa-Färbung unterzogen. Die Knochenmarkausstriche der n = 9 MDS-Patienten der finalen Kohorte wurden herausgesucht, um sie mit denen ihrer PDX vergleichen zu können. Alle Knochenmarkausstriche wurden auf das Vorkommen von Blasten in dem Präparat untersucht.

2.7.3 Paraffinschnitte

Die Herstellung der Paraffinschnitte wurde am „Pathologischen Institut Mannheim“ durchgeführt. Dazu wurden die Tibias der PDX (siehe **2.3.10**) und Mäusen ohne Transplantat über Nacht bei Raumtemperatur in 10 % Formalin fixiert. Anschließend erfolgte die Dekalzifizierung der Knochen in 25 % EDTA für ca. 6 h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Knochen in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom 10 µM-dicke Schnitte angefertigt, diese auf Objektträger aufgezogen und getrocknet.

2.7.4 Immunhistochemische Färbung

Die in **2.7.3** angefertigten Paraffinschnitte wurden sowohl für humane Mitochondrien sowie für humane CD61+ Megakaryozyten gefärbt. Diese Arbeiten wurden erneut am „Pathologischen Institut Mannheim“ durchgeführt. Um eine Kreuzreaktion mit dem Mausgewebe ausschließen zu können, wurden auch die zuvor angefertigten Tibiaschnitte von Mäusen ohne humanes Transplantat gefärbt. Dazu wurden die Schnitte zunächst mittels Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte 20 min in einem EDTA-Tween 20-Puffer gekocht. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurden die Schnitte dann mit jeweils der in den Detektionskits enthaltenen Protein-Block-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit den Primärantikörpern 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Dazu wurde der humane Anti-Mitochondrien-Antikörper (Merck, Best.-Nr. MAB1273) und der humane Anti-CD61-Antikörper (DCS Diagnostics, Best.-Nr. CI869C002) in einer Verdünnung von 1:80 bzw. 1:50 benutzt. Zum Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte danach mit jeweils der in den Detektionskits enthaltenen Wasserstoffperoxid-Block-Lösung inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte für den humanen Anti-Mitochondrien-Antikörper mit dem „EnVision Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse“ Kit (Agilent, Best.-Nr. K500711-2) und für den humanen Anti-CD61-Antikörper mit dem „OptiView DAB Detection“ Kit (Roche, Best.-Nr. 06396500001). Danach wurden die Schnitte mit Hematoxylin gegengefärbt, um die Zellkerne zu visualisieren. Zum Schluss wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und in Xylol inkubiert, bevor sie mit dem Eindeckmittel Entellan® (Merck, Best.-Nr. 107960) eingedeckt wurden.

2.7.5 Bildaufnahme und -verarbeitung

Alle Bilder wurden an einem „M8 Mikroskop und Scanner“ (PreciPoint) aufgenommen und mittels der dazugehörigen Software „ViewPoint Light“ (PreciPoint) auf die angegebene Vergrößerung eingestellt und anschließend zurechtgeschnitten.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 ELISA für humanes TPO

Im Knochenmarkplasma von insgesamt $n = 7$ der MDS-Patienten der finalen Kohorte, das im Zuge der Isolation der MNCs asserviert wurde (siehe **2.2.2**), wurde der humane TPO-Spiegel mittels Sandwich-ELISA gemessen, um eine mögliche Korrelation zwischen diesem und einem Ansprechen auf EPAG zu untersuchen. Die Plasmaproben wurden dazu auf Eis aufgetaut und bei $10.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min zentrifugiert, um mögliche Restzellbestandteile, insbesondere Thrombozyten, zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen, in ein frisches 2 ml-Röhrchen überführt und permanent auf Eis gehalten. Zur Messung des humanen TPO-Spiegels wurde das „Human Thrombopoietin Quantikine ELISA Kit“ (R&D Systems, Best.-Nr. DTP00B) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Alle Proben wurden in Duplikaten analysiert. Der Assay wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Plattenlesegerät „Tecan Infinite 200 PRO 8“ gemessen. Die Erstellung der Standardgerade sowie die Auswertung der Ergebnisse erfolgten in Microsoft Excel.

2.8.2 ELISA für murines TPO

Im PDX-Blutplasma von insgesamt $n = 3$ der MDS-Patienten der finalen Kohorte, das im Zuge der Aufarbeitung des Bluts für die durchflusszytometrische Analyse asserviert wurde (siehe **2.4.1.1**), wurde der murine TPO-Spiegel mittels Sandwich-ELISA gemessen, um eine mögliche Korrelation zwischen diesem und der Anzahl der humanen Thrombozyten zu untersuchen. Dazu wurden Plasmaproben aus den Behandlungswochen 0, 4 bzw. 6, 12 und 18 ausgewählt. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut. Zur Messung des murinen TPO-Spiegels wurde das „Mouse Thrombopoietin Quantikine ELISA Kit“ (R&D Systems, Best.-Nr. MTP00) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Humanes Blutplasma wurde dabei als Negativkontrolle genutzt, um eine mögliche Kreuzreaktivität auszuschließen. Alle Proben wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers 1:5 mit dem im Kit enthaltenen, vorgesehenen Reagenz verdünnt und in Duplikaten analysiert. Der Assay wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Plattenlesegerät „Tecan Infinite 200 PRO 8“ gemessen. Die Erstellung der Standardgerade sowie die Auswertung der Ergebnisse erfolgten in Microsoft Excel.

2.9 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Daten wurde mittels der „Prism 8“ Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ausgewertet und visualisiert. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 gewählt. Die Höhe der Signifikanz ist durch folgende p-Werte und Symbole definiert:

Symbol	Bedeutung
ns (nicht signifikant)	$p > 0,05$
*	$p \leq 0,05$
**	$p \leq 0,01$
***	$p \leq 0,001$
****	$p \leq 0,0001$

Der Vergleich von zwei Gruppen wurde mittels zweiseitigen t-Tests oder einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA, engl. *analysis of variance*) für unabhängige Stichproben durchgeführt. Für den Nachweis einer Korrelation zwischen zwei Variablen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient ermittelt. Als Fehlerbalken wurde stets die Standardabweichung (SD, engl. *standard deviation*) angegeben. Unter dem Punkt Ergebnisse „**3 Ergebnisse**“ wird in der Legende jeder Abbildung genau definiert, welcher statistische Test zur Auswertung des entsprechenden Datensatzes genutzt wurde.

3 ERGEBNISSE

3.1 Das MDS-PDX-Modell als präklinisches Werkzeug zum Testen von Therapeutika

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das von unserer Arbeitsgruppe bereits etablierte nischenbasierte MDS-PDX-Modell (Medyouf et al., 2014), das auf der orthotopen Ko-transplantation von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen und MSCs in immundefiziente NSG-Mäuse basiert, als präklinisches Modell zur patientenindividuellen Testung von Therapeutika genutzt werden kann. Grundvoraussetzung für dieses Vorhaben war die Möglichkeit innerhalb des MDS-PDX-Modells wichtige klinische Parameter, insbesondere die klonale Zusammensetzung des humanen Knochenmarks, zuverlässig und über einen längeren Zeitraum nachverfolgen zu können. Dazu sollte am Beispiel des TPO-Rezeptor-Agonisten EPAG dessen Wirksamkeit und Sicherheit an primären MDS-Zellen *in vivo* im PDX-Modell überprüft werden. Der komplette experimentelle Aufbau dieser Studie ist in **Abbildung 3** dargestellt.

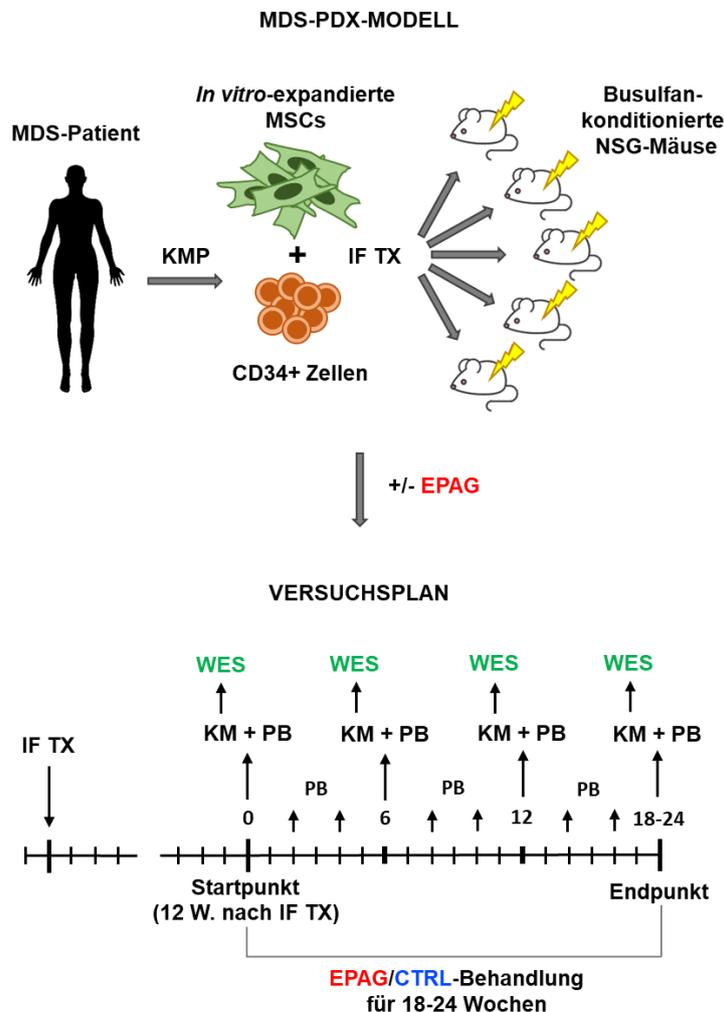


Abbildung 3: Experimenteller Aufbau zur präklinischen Evaluierung von EPAG im MDS-PDX-Modell (Schmitt et al. 2022). KM(P), Knochenmark(punktion); IF TX, intrafemorale Transplantation; EPAG, EPAG; PB, peripheres Blut; WES, Gesamt-Exom-Sequenzierung (engl. whole exome sequencing).

Um einen Vergleich zwischen der Behandlung mit EPAG und Vehikel zu ermöglichen, mussten zunächst möglichst viele PDX-Replikate desselben Patienten generiert werden. Insgesamt wurden dafür $n = 26$ Proben von MDS-Patienten (siehe **Tabelle 10**) in NSG-Mäuse transplantiert. 12 Wochen nach der intrafemorale Transplantation wurden die PDX erstmals knochenmarkpunktiert und das gewonnene Zellmaterial durchflusszytometrisch analysiert, um zu überprüfen, ob das humane Transplantat angewachsen war (**Abbildung 4**).

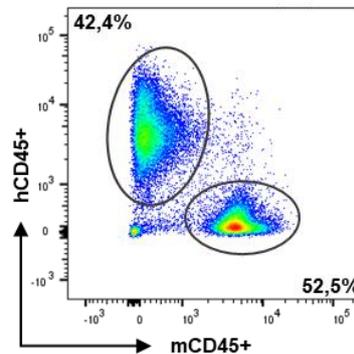


Abbildung 4: Humaner Chimärismus im PDX-Knochenmark (Schmitt et al. 2022). Beispielhafter Durchflusszytometrieplot, der den Prozentsatz menschlicher CD45+ (hCD45+, Y-Achse) und muriner CD45+ (mCD45+, X-Achse) Zellen im Knochenmark eines PDX zeigt. CD45 gilt als Panleukozytenmarker in Mensch und Maus.

Der Prozentsatz des humanen Chimärismus wurde dabei als Anteil der humanen CD45+ Zellen aller CD45+ Zellen, d.h. sowohl humaner als auch muriner, definiert. CD45 wird in Mensch und Maus auf allen hämatopoetischen Zellen außer reifen Erythrozyten und Thrombozyten exprimiert, und gilt daher als Panleukozytenmarker. Ein humaner Chimärismus von $\geq 0,01\%$ wurde als erfolgreiches Anwachsen des humanen Transplantats definiert. Für den Fall, dass Patientenproben nicht, nur geringfügig oder nicht in allen transplantierten Mäusen angewachsen waren und somit eine zu geringe Anzahl an PDX erzielten, wurden diese aus der Studie ausgeschlossen. Um zu untersuchen, ob die MDS-assoziierten Mutationen der Patientenproben deren Anwachsen in den Mäusen beeinflussen, wurden diese zwischen Engraftern und Non-Engraftern verglichen (**Abbildung 5**). Dabei zeichneten sich geringe Tendenzen zwischen den beiden Gruppen ab. Beispielsweise waren jeweils 3 von 4 der *EZH2*- bzw. *TET2*-mutierten Patienten Engrafter, während 4 von 5 Patienten mit einer *IDH2*-Mutation und alle $n = 3$ Patienten, die keine MDS-spezifische Mutation aufwiesen, sich als Non-Engrafter herausstellten.

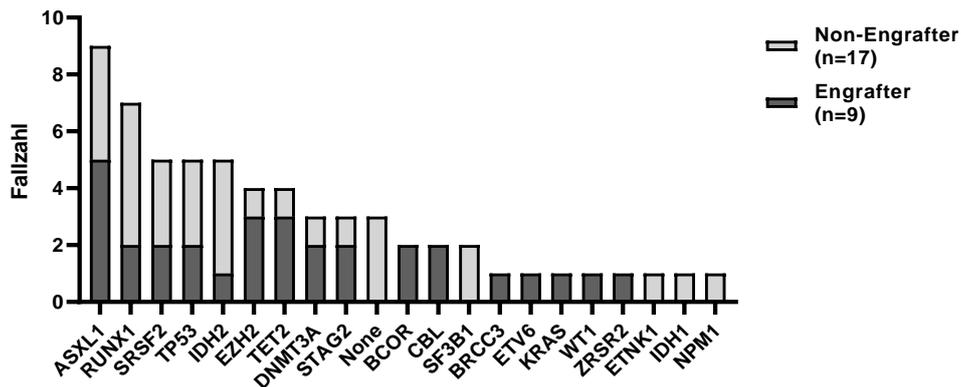


Abbildung 5: Verteilung der MDS-assoziierten Mutationen zwischen Engraftern und Non-Engraftern. Vergleich der Verteilung von MDS-assoziierten Mutationen, die in der primären Patienten-DNA der mononukleären Zellen von $n = 9$ Engraftern (dunkelgrau) und $n = 17$ Non-Engraftern (hellgrau). Patienten deren $CD34+$ Zellen in den PDX einen humanen Chimärismus von $\geq 0,01\%$ erzielten wurden als Engrafter definiert, der Rest der Patienten als Non-Engrafter.

Die finale Kohorte dieser Arbeit bestand damit aus $n = 9$ MDS-Patienten (P01-P09, **Tabelle 10**) und insgesamt $n = 49$ PDX. Erfolgreich generierte PDX desselben Patienten wurden folglich in zwei Gruppen eingeteilt und entweder mit EPAG oder Vehikel für die nächsten 18 bis 24 Wochen behandelt. Der Versuchsplan war im Folgenden darauf ausgerichtet innerhalb dieses Behandlungszeitraums möglichst viele Proben zu entnehmen, um eine engmaschige Beobachtung und Analyse der klinischen Parameter zu ermöglichen. Beginnend mit der 12. Woche nach der intrafemorale Injektion wurde bei den PDX alle sechs Wochen eine Knochenmarkaspiration vorgenommen. Die Isolierung des gesamten Knochenmarks aus Oberarmen, Brustbein, Tibiae, Femora, Hüftknochen und Rückgrat erfolgte zum jeweiligen Endpunkt. Die Knochenmarkproben wurden dazu genutzt, die Entwicklung des humanen Chimärismus im Verlauf der Behandlung verfolgen zu können sowie humane $CD45+$ Zellen mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung zu isolieren, um daraus anschließend DNA für die Gesamt-Exom-Sequenzierung zu gewinnen. In den meisten Fällen nahm der humane Chimärismus im Verlauf des 18 bis 24-wöchigen Behandlungszeitraums in den PDX zu (**Abbildung 6**). Diese Entwicklung war unabhängig von der Art der Behandlung, die die PDX erhielten.

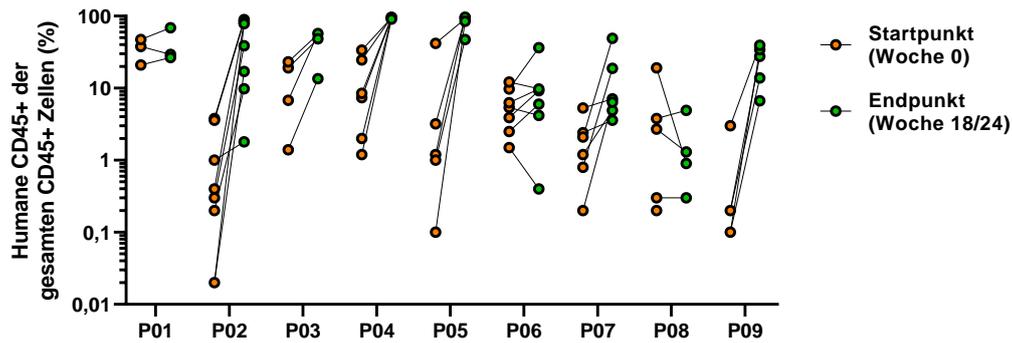


Abbildung 6: Vergleich des Prozentsatzes des humanen Chimärismus zum Start- und Endpunkt (Schmitt et al. 2022). Die Engraftmentraten von PDX beider Behandlungsgruppen zum Startpunkt (orange) und zum Endpunkt nach 18 bzw. 24 Wochen des Experiments sind dargestellt. Auf der X-Achse sind die Patientenkennungen aufgetragen.

Abgesehen von einzelnen Ausnahmen wurde der allgemeine Gesundheitszustand der PDX auch nicht durch humane Chimärismusraten von über 90 % negativ beeinflusst. Der Großteil der Mäuse litt im Verlauf der 18-24 weder an Gewichtsverlust, noch entwickelt er eine Anämie, wie durch die Kontrolle des Gesamthämoglobinspiegels sichergestellt wurde (**Abbildung 41A-I**). Um auszuschließen, dass womöglich überwiegend Zellen der lymphatischen Linie in den PDX angewachsen waren, wurde das Knochenmark der $n = 14$ PDX von $n = 3$ Patienten (P04, P06, P09) zusätzlich mit Markern für T-Zellen (CD3), B-Zellen (CD19) und myeloische Zellen (CD33) zum Endpunkt analysiert (**Abbildung 7A+B**). Diese Stichprobe ergab, dass im Durchschnitt über 90 % der angewachsenen, humanen Zellen der myeloischen Linie angehörten.

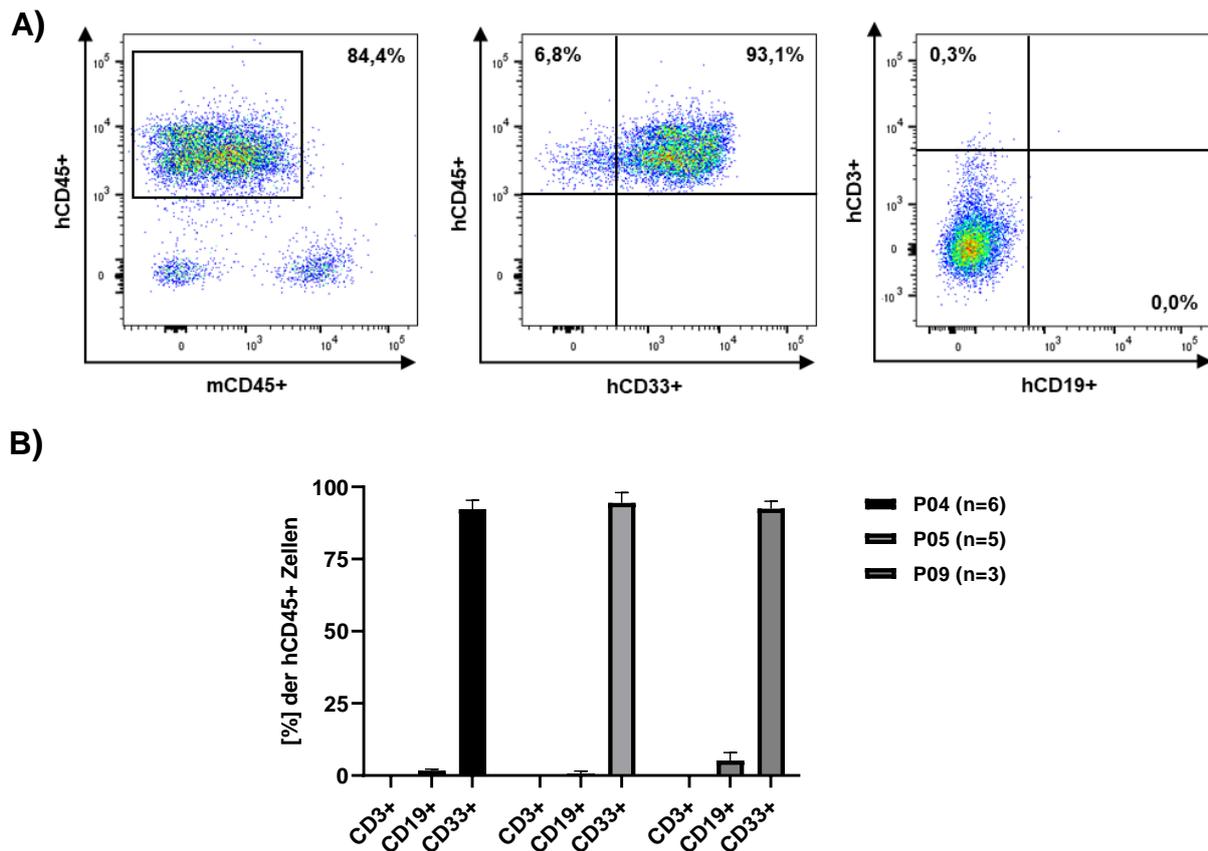


Abbildung 7: Verteilung der humanen lymphatischen und myeloischen Zelllinie im PDX-Knochenmark zum Endpunkt (Schmitt et al. 2022). (A) Beispielhafter Durchflusszytometrieplot des Knochenmarks eines PDX inklusive Gatingstrategie zur Bestimmung der Anteile der lymphatischen ($CD3^+$, $CD19^+$) und myeloischen ($CD33^+$) Zellen innerhalb der humanen $CD45^+$ Leukozytenpopulation. (B) Prozentsatz der humanen $CD33^+$, $CD3^+$ und $CD19^+$ Zellen im Knochenmark von $n = 14$ PDX von $n = 3$ Patienten (P04, P06, P09). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

Um zu untersuchen, ob EPAG in der Lage ist, die humane Thrombopoese in den PDX zu stimulieren, wurde den PDX mit Beginn der ersten Knochenmarkpunktion in der 12. Woche nach der intrafemorale Injektion alle zwei Wochen peripheres Blut abgenommen. Zur absoluten Quantifizierung der humanen $CD41^+$ Thrombozyten im PDX-Blut wurden diese zusammen mit Beads gemessen (**Abbildung 8**). Auf diese Weise konnten die humanen Thrombozytenverläufe während des gesamten Experiments zuverlässig und exakt nachverfolgt werden.

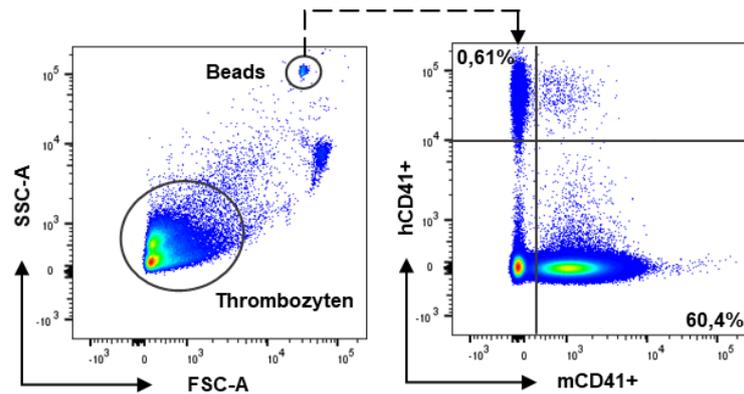


Abbildung 8: Absolute Quantifizierung der humanen Thrombozyten im peripheren PDX-Blut (Schmitt et al. 2022). Beispielhafte Durchflusszytometrieplots inklusive Gatingstrategie, die den experimentellen Aufbau zur absoluten Quantifizierung der humanen Thrombozyten verdeutlicht (links), sowie den Prozentsatz der humanen CD41+ (hCD41+) und murinen CD41+ (mCD41+) Thrombozyten im peripheren Blut eines PDX zeigen (rechts). SSC-A, side scatter area; FSC, forward scatter area.

Um einen potenziellen Einfluss von EPAG auf die klonale Zusammensetzung des humanen Knochenmarks in unserem MDS-PDX-Modell zu untersuchen, wurde eine Gesamt-Exom-Sequenzierung der Patienten-MNCs, aus denen die transplantierten CD34+ Zellen isoliert wurden, und allen gesammelten PDX-Knochenmarkproben durchgeführt. Dies sollte ermöglichen, die klonale Zusammensetzung der Patienten- und PDX-Proben zu rekonstruieren und letztendlich Aufschluss darüber geben, ob sich die transplantierte Patientenprobe im PDX unter der Behandlung mit EPAG klonal verändert hat. Dazu wurden die durch die bioinformatische Pipeline bestimmten VAFs der Mutationen und zytogenetischen Aberrationen, wie Kopienzahlvariationen und LOH-Ereignisse, mittels des Tools SciClone analysiert und in einzelne „Mutationscluster“ gruppiert (**Abbildung 9**).

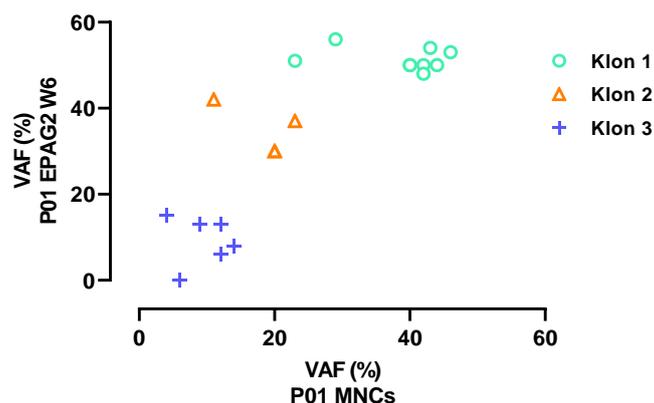


Abbildung 9: Bestimmung der „Mutationscluster“ im Patienten- und PDX-Knochenmark (Schmitt et al. 2022). Beispielhafter Plot, der die einzelnen Subklone (Klon 1-3) im Patienten- und PDX-Knochenmark von Patient P01 und dessen PDX EPAG2 in Woche 6 (W6) darstellt. Die Klone wurden anhand der einzelnen Varianzallelfrequenzen (VAF) der Mutationen und zytogenetischen Aberrationen in den beiden gegenübergestellten Proben unter Verwendung des bioinformatischen Tools SciClone gruppiert. MNCs, mononukleäre Zellen.

3.2 Das MDS-PDX-Modell zur Evaluierung von EPAG am Beispiel von Patient P01

In diesem Abschnitt soll eine Gesamtübersicht der umfassenden klinischen und molekularen Hauptreadouts dieser Studie am Beispiel von Patient P01 und dessen $n = 3$ PDX gegeben werden. Aus dem Knochenmarkproben von Patient P01 konnten insgesamt $n = 3$ PDX generiert werden, von denen $n = 2$ PDX mit EPAG (EPAG1 und EPAG2) und $n = 1$ PDX mit Vehikel (CTRL) behandelt wurden. Die Kontrollmaus musste aufgrund ihres kontinuierlichen Gewichtsverlusts bereits sechs Wochen nach Behandlungsbeginn getötet werden (**Abbildung 10**). Das Gewicht der mit EPAG-behandelten PDX blieb dagegen während der gesamten 18-wöchigen Behandlungsdauer weitgehend stabil.

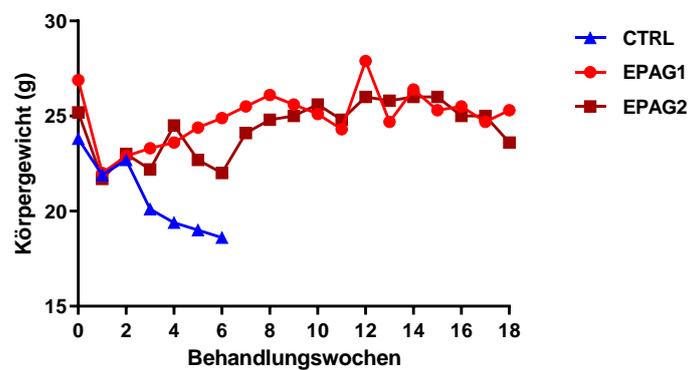


Abbildung 10: Verlauf des Körpergewichts der PDX von Patient P01 (Schmitt et al. 2022). Körpergewicht der beiden mit Eltrombopag (EPAG) behandelten PDX EPAG1 und EPAG2 (Rottöne), und des mit Vehikel behandelten PDX CTRL (blau) von Patient P01 im Verlauf der 18-wöchigen Behandlung. Das Körpergewicht der Mäuse wurde einmal wöchentlich bestimmt.

Der Anteil des humanen Chimärismus in der Kontrollmaus blieb in den sechs Wochen nahezu unverändert (**Abbildung 11**). Dabei war ihr humanes Engraftment in Woche 6 mit 29,3 % deutlich höher als das der beiden mit EPAG-behandelten PDX mit 8,0 % bzw. 3,1 %. Im Verlauf der folgenden 12 Behandlungswochen nahm der humane Chimärismus in den EPAG-Mäusen stetig zu. Die Anzahl der humanen Thrombozytenzahlen in der Kontrollmaus nahmen während den sechs Behandlungswochen kontinuierlich ab (**Abbildung 12**). Im Gegensatz dazu führte die EPAG-Behandlung bei den beiden anderen PDX nach zwei Wochen zu einem Anstieg der humanen Thrombozytenzahlen. Während die Anzahl der humanen Thrombozyten in PDX EPAG2 nach zwei Wochen ihren Höchststand erreichte und anschließend auf den Ausgangswert zurückkehrte, konnte in PDX EPAG1 ein stetiger Anstieg der humanen Thrombozyten über einen Zeitraum von sechs Wochen und bis zum Endpunkt ein im Vergleich zum Ausgangswert erhöhter Thrombozyten Spiegel verzeichnet werden.

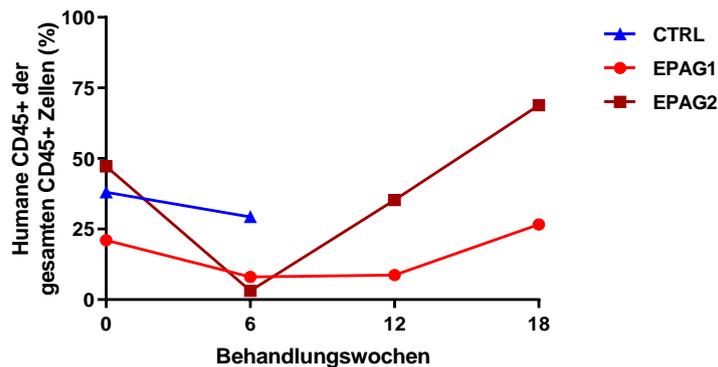


Abbildung 11: Verlauf des humanen Engraftments in den PDX von Patient P01 (Schmitt et al. 2022). Anteil des humanen Engraftments im Knochenmark der beiden mit Eltrombopag (EPAG) behandelten PDX EPAG1 und EPAG2 (Rottöne), und des mit Vehikel behandelten PDX CTRL (blau) von Patient P01 im Verlauf der 18-wöchigen Behandlung. Knochenmarkpunktionen wurden in Woche 0, 6 und 12 vorgenommen. Zum Endpunkt In Woche 18 erfolgte die Analyse des Gesamtknochenmarks.

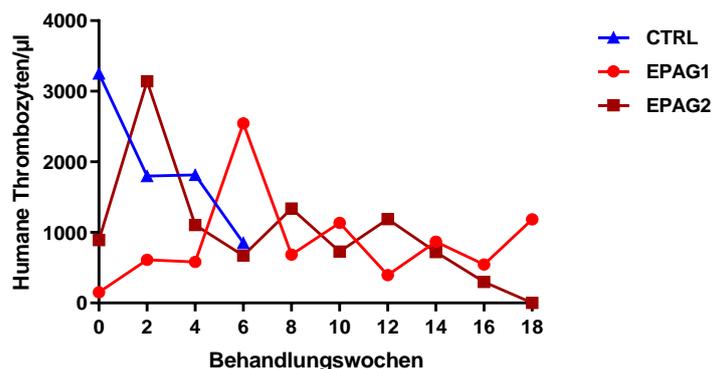


Abbildung 12: Verlauf der humanen Thrombozytenkonzentration in den PDX von Patient P01 (Schmitt et al. 2022). Anzahl der humanen Thrombozyten pro Mikroliter peripheren Bluts der beiden mit Eltrombopag (EPAG) behandelten PDX EPAG1 und EPAG2 (Rottöne), und des mit Vehikel behandelten PDX CTRL (blau) von Patient P01 im Verlauf der 18-wöchigen Behandlung. Blutentnahmen erfolgten alle zwei Wochen.

Um zu klären, ob die Verschlechterung des Gesundheitszustands der Kontrollmaus womöglich mit dem Auftreten eines Krankheitsprogresses der transplantierten Patientenzellen zusammenhing, wurden die nach Endpunkt angefertigten Knochenmarkausstriche von PDX CTRL und EPAG1 miteinander verglichen (**Abbildung 13**). Beide PDX besaßen zu ihrem jeweiligen Endpunkt in etwa denselben Prozentsatz an humanem Chimärismus (CTRL: 29,3 %, EPAG1: 26,6 %). Dabei konnten in beiden PDX morphologisch keine Blasten identifiziert werden. Das Knochenmark der Kontrollmaus präsentierte sich aber hyperzellulär mit einer monomorphen Population von dysplastischen Myelozyten, während das mit EPAG behandelte PDX EPAG1 vermehrt Megakaryozyten und einen höheren Anteil differenzierter hämatopoetischer Zellen der Erythro- und Granulopoese aufwies.

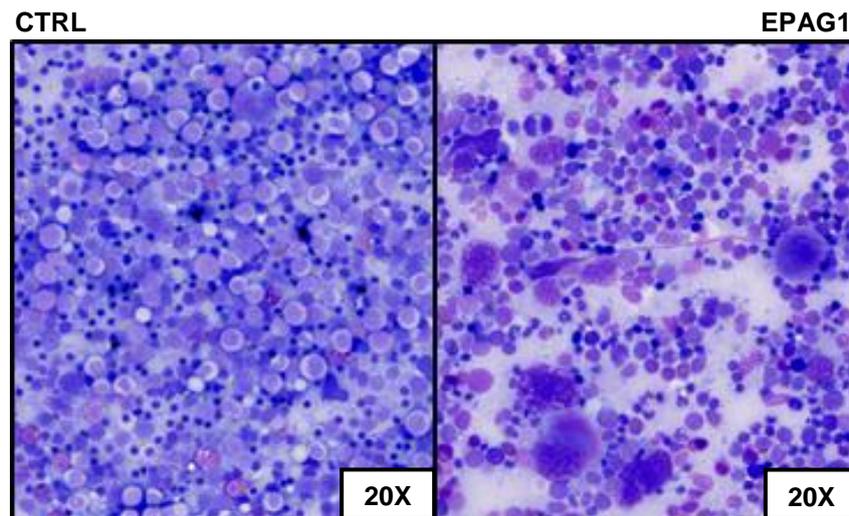


Abbildung 13: Vergleich der Knochenmarksausstriche der PDX von Patient P01 (Schmitt et al. 2022). Vergleich der Knochenmarksausstriche des mit Vehikel behandelten PDX CTRL (links) und des mit Eltrombopag (EPAG) behandelten PDX EPAG1 (rechts) von Patient P01. Zur Differenzierung der einzelnen Zelltypen im Knochenmark wurde eine May-Grünwald-Giemsa-Färbung durchgeführt. Die Abbildungen sind in 20-facher (20X) optischer Vergrößerung aufgenommen.

Um zu bestimmen, ob die EPAG-Behandlung die klonale Zusammensetzung des Patientenknorpelmarks in den PDX beeinflusst hatte, wurde eine Gesamt-Exom-Sequenzierung der MNCs von Patient P01 und allen gesammelten PDX-Verlaufsproben durchgeführt. In der primären Patientenprobe von P01 wurden drei Klone nachgewiesen (**Abbildung 14A**), die in allen $n = 3$ PDX originalgetreu abgebildet wurden (**Abbildung 14B-D**). Während der 18 Behandlungswochen blieb die klonale Zusammensetzung in beiden mit EPAG behandelten PDX weitgehend stabil. Im Gegensatz dazu expandierte ein neuer Subklon mit einer *U2AF1*-Mutation innerhalb von sechs Wochen in der Kontrollmaus, der dabei den *EZH2/BRCC3*-Klon verdrängte. Die Expansion dieses Klons könnte potentiell der Auslöser für die Verschlechterung des Gesundheitszustands dieser Maus gewesen sein. Interessanterweise war der *U2AF1*-Klon auch in den PDX EPAG1 und EPAG2 nachweisbar, blieb aber während des gesamten Experiments stabil bei einer VAF von unter 1%. Folglich konnte diese klonale Evolution nur in der Kontrollmaus beobachtet werden, wie in **Abbildung 15** visualisiert wurde. Um die klonale Dynamik in den PDX messen und untereinander vergleichen zu können, wurden die Differenzen der VAF jeder somatischen Mutation zwischen allen aufeinanderfolgenden Gesamt-Exom-Sequenzierungs-Zeitpunkten gemittelt (**Abbildung 16**). Die Summe aller so für jede somatische Mutation ermittelten Werte wurde als mittlere Delta-VAF bezeichnet. Dieses Vorgehen wurde zuvor bereits für primäre MDS-Patientenproben beschrieben (Mossner et al., 2016). Die Ergebnisse für die PDX von Patient P01 zeigten, dass der Delta-VAF-Wert der Kontrollmaus im Vergleich mit den EPAG-behandelten Mäusen deutlich höher war, wenn auch nicht statistisch signifikant (**Abbildung 17**). Dies war ein weiteres Indiz für eine höhere Rate der klonalen Evolution in dem vehikelbehandelten PDX.

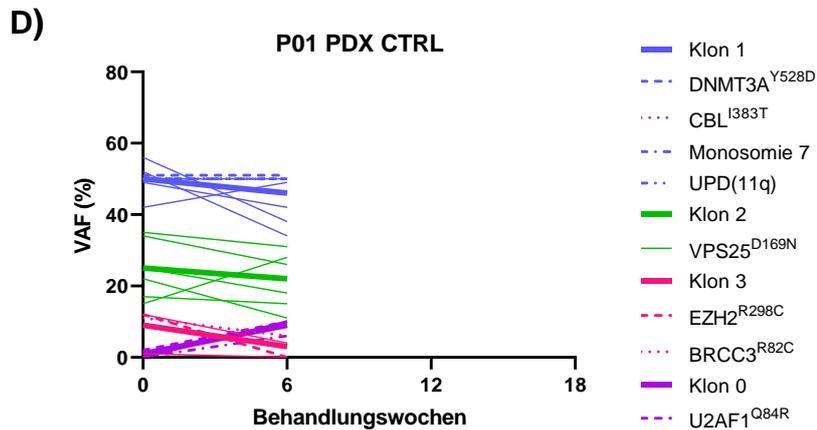
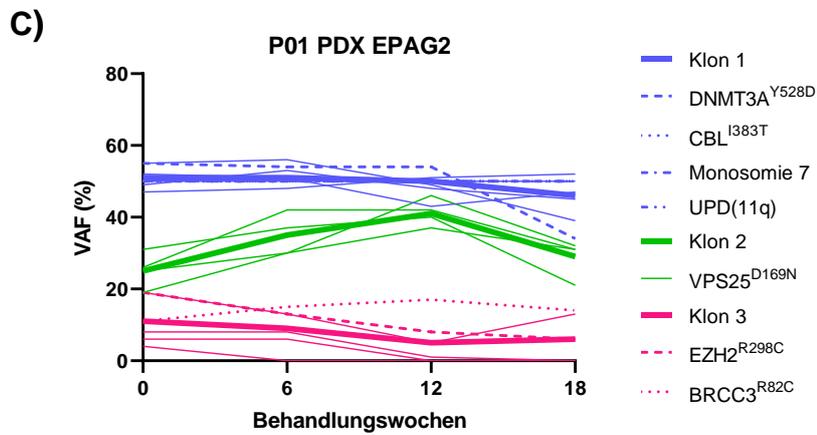
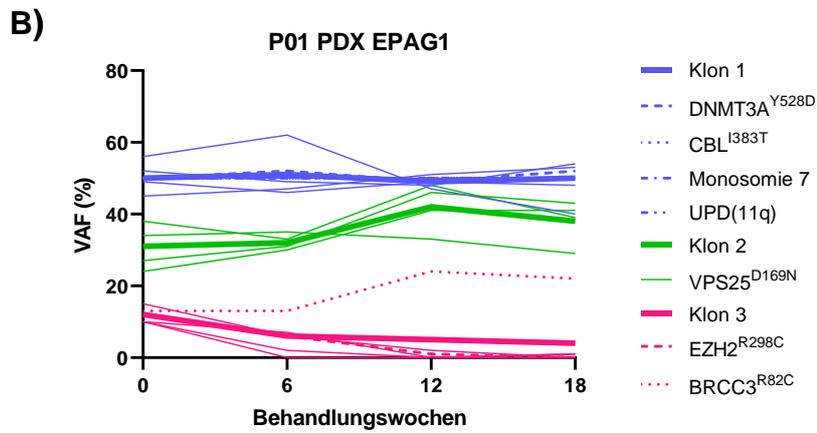
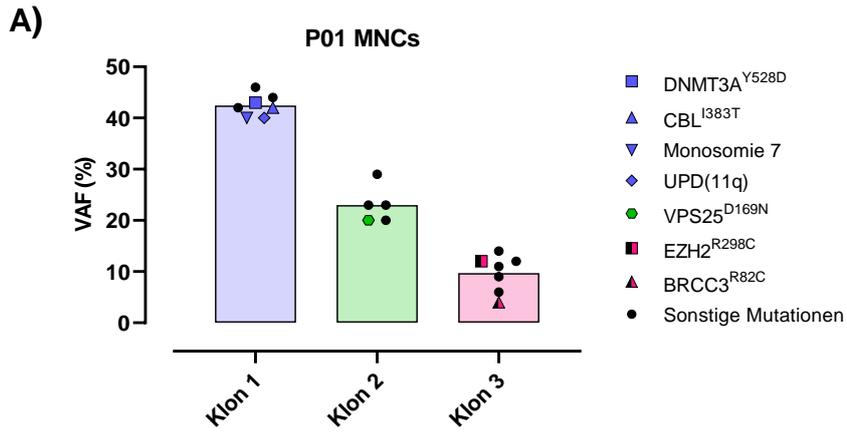


Abbildung 14: Klonale Knochenmarkszusammensetzung von Patient P01 und dessen PDX (Schmitt et al. 2022). Ergebnisse der Gesamt-Exom-Sequenzierung der mononukleären Zellen (MNCs) aus dem Knochenmark von Patient P01 (**A**) und der beiden mit Eltrombopag (EPAG) behandelten PDX EPAG1 (**B**) und EPAG2 (**C**), und des mit Vehikel behandelten PDX CTRL (**D**) im Verlauf der 18- bzw. 6-wöchigen Behandlung. Dargestellt ist die Varianzallelfrequenz (VAF) der Mutationen und zytogenetischen Aberrationen. „Mutationscluster“ wurden mittels des bioinformatischen Tools SciClone berechnet. Die Balken in **A**) stellen den Mittelwert der VAF der einzelnen Klone dar. Wiederkehrende Klone in **A-D** sind in derselben Farbe dargestellt. Dicke Linien in **B-D** stellen den Mittelwert des jeweiligen Klons dar. Die durch die Mutationen erfolgten Aminosäureaustausche werden für die jeweilige Mutation als hochgestellte Kodierung angezeigt. Knochenmarkpunktionen der PDX wurden in Woche 0, 6 und 12 vorgenommen. In Woche 18 erfolgte nach Endpunkt die Analyse des Gesamtknochenmarks.

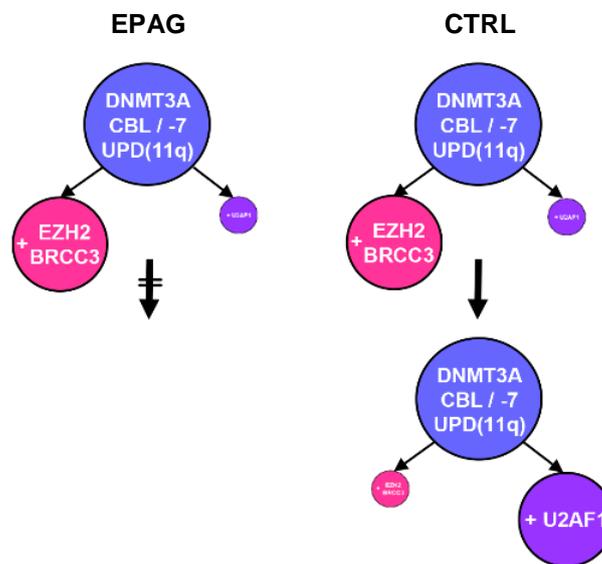


Abbildung 15: Klonalen Evolution in den PDX von Patient P01 (Schmitt et al. 2022). Schematische Darstellung der klonalen Ereignisse, die in den beiden mit Eltrombopag (EPAG) behandelten PDX im Verlauf der 18-wöchigen Behandlung und in dem mit Vehikel (CTRL) behandelten PDX CTRL im Verlauf der 6-wöchigen Behandlung bis zu seiner vorzeitigen Tötung stattfanden. Die Größe der Kreise korreliert nicht mit der tatsächlichen Varianzallelfrequenz, aber spiegelt das Verhältnis der Klone zueinander und dessen Entwicklung grob wider.

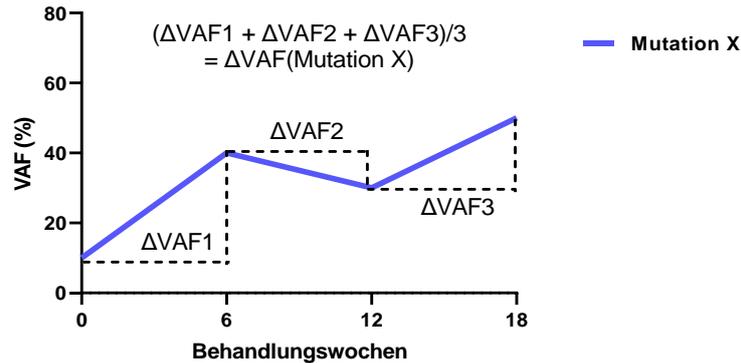


Abbildung 16: Bildliche Darstellung der Bestimmung der Delta-VAF von Mutation X. Zur Berechnung der Delta-Varianzallelfrequenz (Δ VAF) wurden die Differenzen (Δ) der VAF von Mutation X zwischen allen aufeinanderfolgenden Gesamt-Exom-Sequenzierungs-Zeitpunkten (Δ VAF1, Δ VAF2, Δ VAF3) ermittelt. Der Mittelwert der in diesem Beispiel $n = 3$ Δ VAF-Werte wurde als Δ VAF von Mutation X (Δ VAF(Mutation X)) bezeichnet. Bildet man den Mittelwert der Δ VAF aller somatischen Mutationen einer Probe, erhält man die mittlere Δ VAF. Diese bildet die klonale Dynamik in einer Probe ab und ermöglicht einen Vergleich mit anderen Proben.

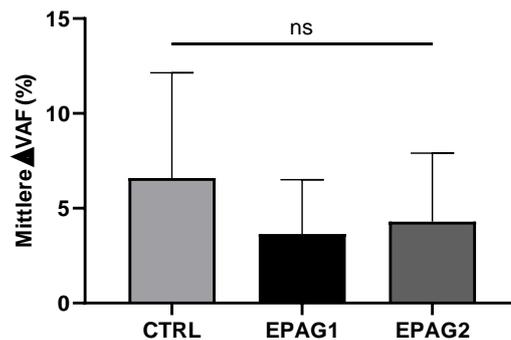
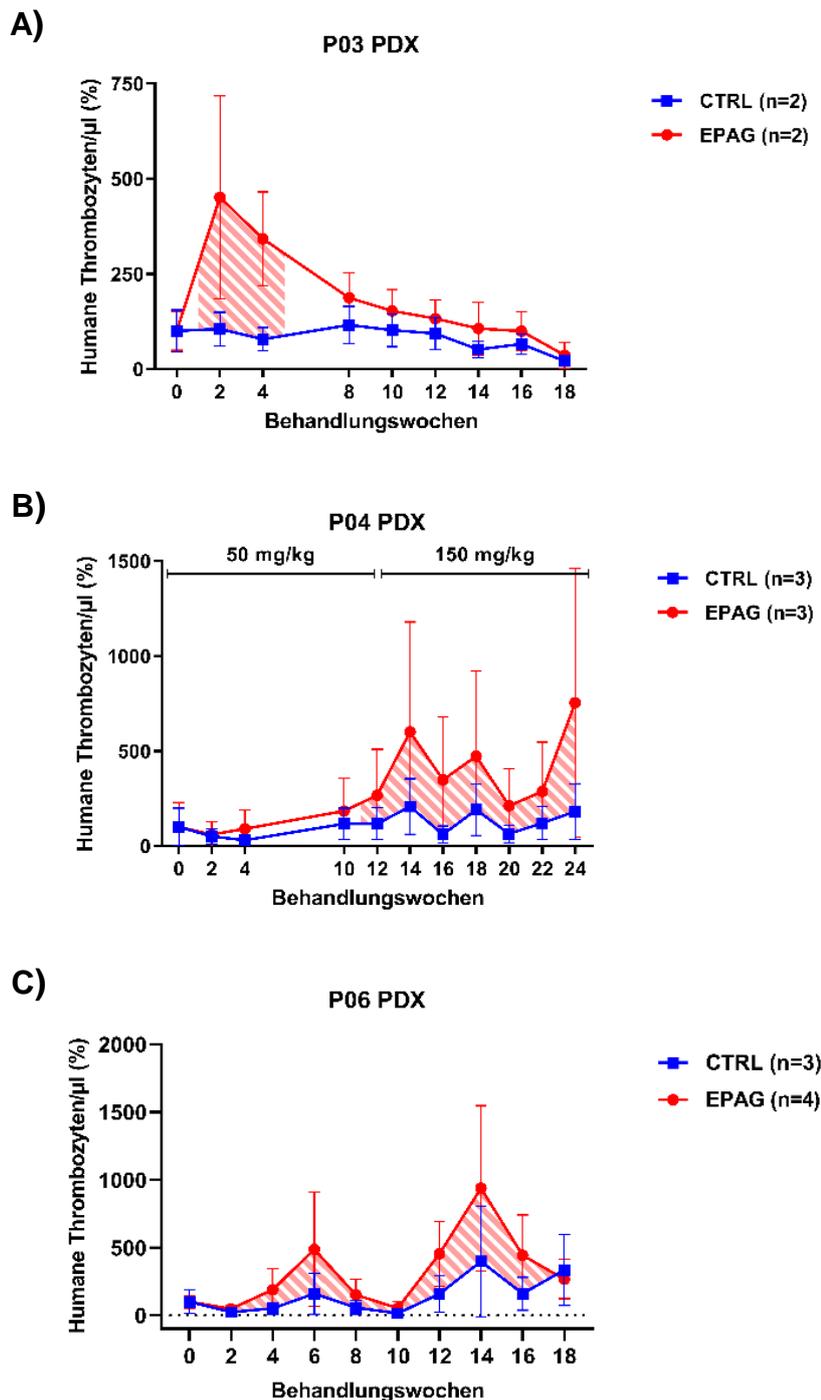


Abbildung 17: Vergleich der mittleren Delta-VAF der PDX von Patient P01 (Schmitt et al. 2022). Vergleich der mittleren Delta-Varianzallelfrequenz (Δ VAF) zwischen dem mit Vehikel behandelten PDX CTRL (links, hellgrau) und den beiden mit Eltrombopag (EPAG) behandelten PDX EPAG1 und EPAG2 (Mitte/rechts, schwarz/dunkelgrau) von Patient P01. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden mittels zweiseitigen t -Tests für unabhängige Stichproben analysiert. ns, nicht signifikant

3.3 Der Einfluss von EPAG auf die humane Thrombo- und Megakaryopoese im MDS-PDX-Modell

Neben Patient P01 konnte ein Ansprechen auf EPAG auch in den PDX der Patienten P03, P04, P06 und P09 nachgewiesen werden. In den **Abbildung 18A-D** wurden die baselinekorrigierten Mittelwerte der absoluten humanen Thrombozytenzahlen im peripheren Blut von vehikel- und EPAG-behandelten PDX der zuvor genannten Patienten miteinander verglichen. Ein Ansprechen auf EPAG wurde als Verdopplung der Anzahl der humanen Thrombozyten in den EPAG-behandelten PDX im Vergleich zu den Kontroll-PDX definiert und wird durch die rotgestreifte Fläche angezeigt. Um den Effekt von EPAG patientenübergreifend darzustellen, wurde die Fläche unter der Kurve (AUC, engl. *area under the curve*) dieser $n = 4$ Graphen für beide Behandlungsgruppen zusammengefasst (**Abbildung 19A+B**). Dies bewies, dass die Behandlung mit EPAG

im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere humane Thrombozytenzahl bewirkt. Dieser Trend blieb auch bestehen nachdem die humanen Thrombozytenzahlen in Verhältnis mit dem humanen Engraftment gesetzt wurden, war allerdings nicht mehr statistisch signifikant. Da die Knochenmarkpunktionen lediglich alle sechs Wochen vorgenommen wurden und somit im Vergleich zu der vorherigen Analyse 2/3 der Datenpunkte entfielen, könnte dies den Verlust der Signifikanz erklären. Interessanterweise führte im Fall von Patient P04 die Verabreichung der Standarddosis von 50 mg/kg EPAG in den ersten 12 Wochen nur zu einem geringfügigen Anstieg der humanen Thrombozyten, wohingegen eine Dosisescalation auf 150 mg/kg EPAG für 12 weitere Wochen ein starkes Ansprechen bei allen $n = 3$ EPAG-behandelten PDX erzielte (**Abbildung 18B**).



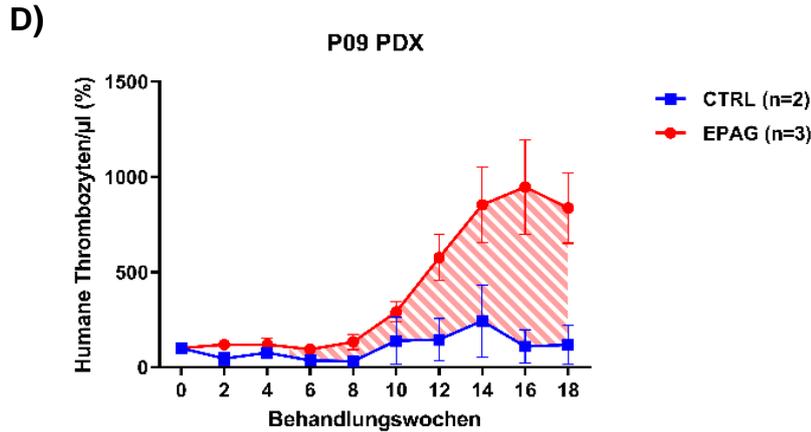


Abbildung 18: Anstieg der humanen Thrombozytenzahlen in EPAG-behandelten PDX (Schmitt et al. 2022). Darstellung der baselinekorrigierten Mittelwerte der absoluten humanen Thrombozytenzahlen im peripheren Blut von vehikel- (CTRL, blau) und Eltrombopag-behandelten (EPAG, rot) PDX der Patienten P03 (A), P04 (B), P06 (C) und P09 (D) im Verlauf der 18- bis 24-wöchigen Behandlung. PDX wurden i.d.R. mit 50 mg/kg EPAG behandelt, bei den PDX von P04 erfolgte ab Woche 12 eine Dosisescalation auf 150 mg/kg. Ein Ansprechen auf EPAG wurde als Verdopplung der Anzahl der humanen Thrombozyten in den EPAG-behandelten PDX im Vergleich zu den Kontrollmäusen definiert und ist durch die rotgestreifte Fläche angezeigt. Blutentnahmen erfolgten alle zwei Wochen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

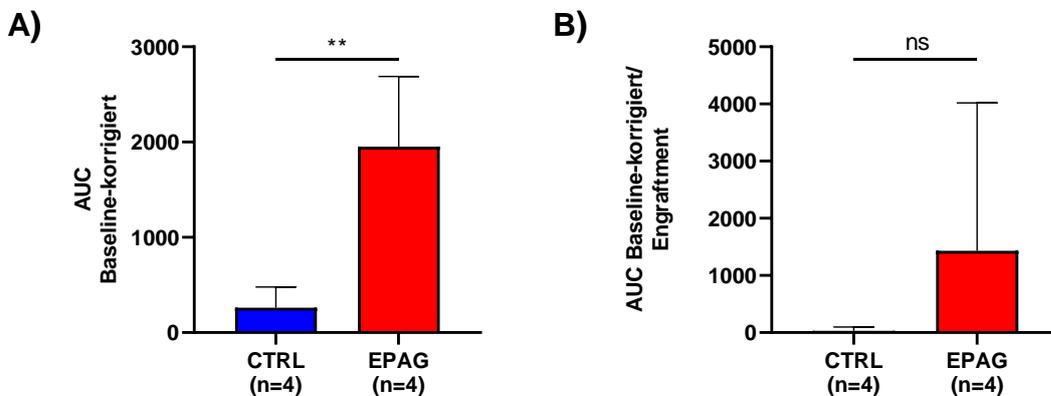


Abbildung 19: Vergleich der humanen Thrombozytenzahlen in Vehikel- und EPAG-behandelten PDX (Schmitt et al. 2022). **A)** Darstellung des Mittelwerts der Fläche unter der Kurve (AUC, engl. area under the curve) der vehikel- (CTRL, blau) und Eltrombopag-behandelten (EPAG, rot) PDX der Patienten P03, P04, P06 und P09 im Verlauf der 18- bis 24-wöchigen Behandlung aus **Abbildung 19A-D**. **B)** AUC im Verhältnis zum humanen Engraftment. Zur Bestimmung des Verhältnisses wurden nur die Daten der humanen Thrombozyten der Wochen 0, 6, 12, 18 und 24, in denen auch Knochenmarkpunktionen vorgenommen wurden, genutzt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden mittels zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben analysiert. **, $p \leq 0,01$; ns, nicht signifikant

Bei Patient P08 handelte es sich um einen partiellen Responder, da nur eines von drei EPAG-behandelten PDX eine erhöhte humane Thrombopoese aufwies (**Abbildung 20**). Die drei Patienten P02, P05 und P07 waren Non-Responder, da in den PDX entweder zu keinem Zeitpunkt humane Thrombozyten nachgewiesen werden konnten (P02 und P07) oder die EPAG-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Anstieg der humanen Thrombozyten induzieren konnte (P05).

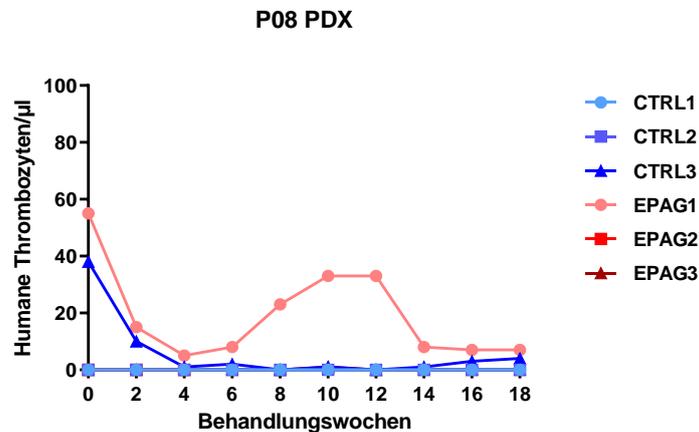


Abbildung 20: Unterschiedliches Ansprechen auf die Behandlung mit EPAG der PDX von Patient P08 (Schmitt et al. 2022). Darstellung der humanen Thrombozytenzahlen pro Mikroliter peripheren Bluts der Vehikel- (CTRL, Blautöne) und Eltrombopag-behandelten (EPAG, Röttöne) PDX von Patient P08 im Verlauf der 18-wöchigen Behandlung. Unter den mit EPAG behandelten PDX konnte nur bei EPAG1 ein Ansprechen auf die Substanz verzeichnet werden. Blutentnahmen erfolgten alle zwei Wochen.

Die Behandlung mit EPAG hatte allerdings keinen Einfluss auf die Anzahl der murinen CD41+ Thrombozyten (**Abbildung 21**), wie bereits in einer anderen Publikation gezeigt werden konnte, in welcher PDX aus Nabelschnurrblut mit EPAG behandelt wurden (Sun et al., 2012).

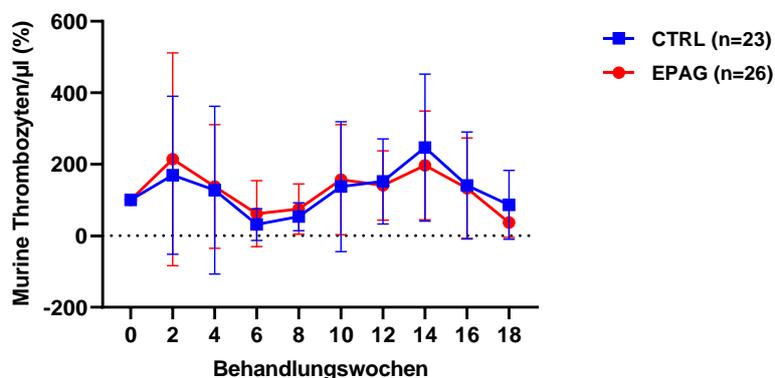


Abbildung 21: Auswirkung der EPAG-Behandlung auf die murine Thrombopoese (Schmitt et al. 2022). Darstellung der baselinerkorrigierten Mittelwerte der absoluten murinen Thrombozytenzahlen im peripheren Blut von $n = 23$ Vehikel- (CTRL, blau) und $n = 26$ Eltrombopag-behandelten (EPAG, rot) PDX im Verlauf der 18-wöchigen Behandlung. Blutentnahmen erfolgten alle zwei Wochen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

Um auszuschließen, dass der endogene murine TPO-Spiegel einen Einfluss auf die humane Thrombopoese hat, wurde dieser im Blutplasma der PDX von $n = 2$ Respondern und $n = 1$ Non-Responder mittels ELISA bestimmt und mit dem Verlauf der humanen Thrombozyten in den PDX verglichen (**Abbildung 22A-C**). Dabei konnte keine Korrelation zwischen murinem TPO-Spiegel und humanem Thrombozytenlevel festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob ein Ansprechen auf EPAG in unserem MDS-PDX-Modell durch klinische Marker vorhergesagt werden kann, wurden mehrere Parameter untersucht. Zunächst wurde der endogene humane TPO-Spiegel im Knochenmarkplasma von $n = 7$ Patientenproben, die zur Generierung der PDX genutzt wurden, bestimmt, und dabei Responder und Non-Responder miteinander verglichen (**Abbildung 23**). In anderen Publikationen konnte gezeigt werden, dass die Chance eines Ansprechens auf TPO-Rezeptor-Agonisten höher ist, je niedriger der TPO-Spiegel im Blutplasma der (MDS-)Patienten war (Sekeres et al., 2014; Al-Samkari and Kuter, 2018; Platzbecker et al., 2019). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Respondern und Non-Respondern festgestellt werden. Auch bei der Prognoseeinstufung nach IPSS-R und dem mittleren IPSS-R-Prognosescore der $n = 9$ Patienten bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (**Abbildung 24A+B**). Allerdings besaßen die Non-Responder tendenziell eine höhere Risikobewertung sowie ein höheres Scoring. Des Weiteren wurden die detektierten somatischen Mutationen und zytogenetischen Aberrationen der PDX von Respondern und Non-Respondern miteinander verglichen (**Abbildung 25A-D**). Dabei stellte sich heraus, dass beide *TP53*-mutierte Patienten Non-Responder waren (**Abbildung 25A+B**). Zudem zeigte sich eine starke Tendenz zu mehr zytogenetischen Aberrationen in den Non-Respondern (**Abbildung 25C+D**).

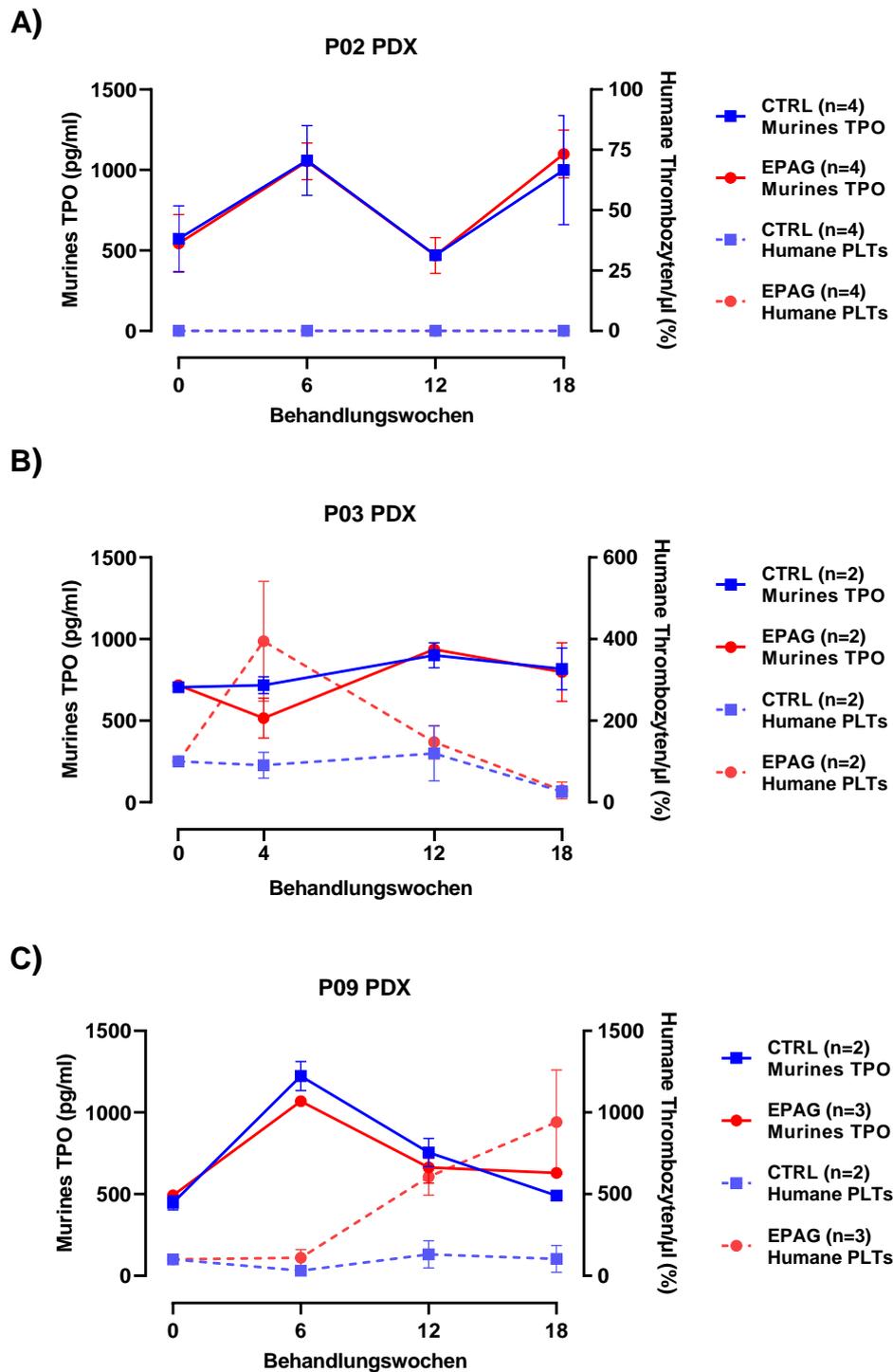


Abbildung 22: Bestimmung des murinen TPO-Spiegels und dessen Auswirkung auf die humane Thrombopoese (Schmitt et al. 2022). Bestimmung des endogenen murinen Thrombopoetin (TPO)-Spiegels (Y-Achse, links, durchgezogene Linien) mittels ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) im Blutplasma der vehikel- (CTRL, Blautöne) und $n = 26$ Eltrombopag-behandelten (EPAG, Rottöne) PDX des Non-Responders Patient P02 (A) und der beiden Responder Patient P03 (B) und P09 (C). Auf der rechten Y-Achse wurde der Verlauf baselinekorrigierten Mittelwerte der absoluten humanen Thrombozyten-(PLTs)-zahlen (gestrichelte Linien) in den PDX aufgetragen, um eine mögliche Korrelation zwischen murinem TPO-Spiegel und humanen Thrombozyten identifizieren zu können. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

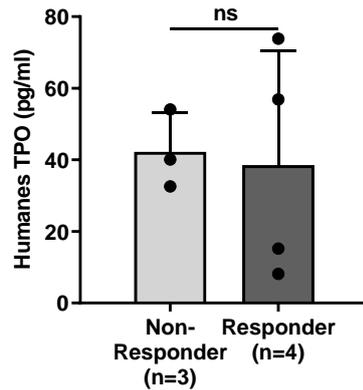


Abbildung 23: Bestimmung des humanen TPO-Spiegels im Knochenmarkplasma von Patientenproben (Schmitt et al. 2022). Die Konzentration des endogenen humanen Thrombopoetin (TPO) im Knochenmarkplasma von $n = 7$ Patientenproben, die zur Generierung der PDX genutzt wurden, wurde mittels ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) gemessen. Die Ergebnisse wurden zwischen den $n = 3$ Non-Respondern (links, hellgrau) und $n = 4$ Respondern (rechts, dunkelgrau) verglichen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden mittels zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben analysiert. ns, nicht signifikant

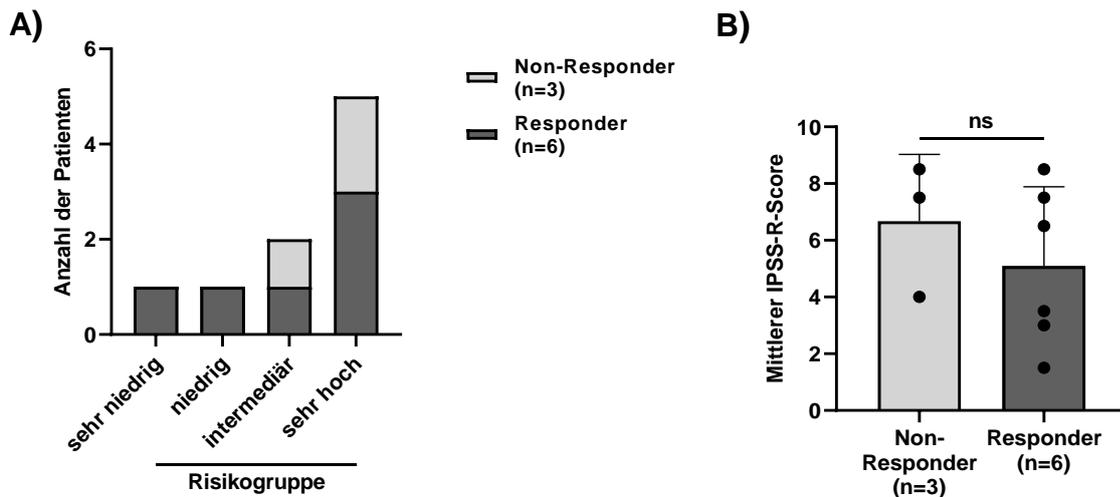


Abbildung 24: Korrelation der Prognoseeinstufung nach IPSS-R mit dem Ansprechen auf EPAG (Schmitt et al. 2022). Vergleich der Prognoseeinstufung nach IPSS-R der $n = 3$ Non-Responder (hellgrau) und $n = 6$ Respondern (dunkelgrau). **A)** Aufteilung der Non-Responder und Responder auf die verschiedenen prognostischen Risikogruppe (sehr niedrig, niedrig, intermediär, sehr hoch) nach IPSS-R. **B)** Vergleich des mittleren IPSS-R-Scores zwischen Non-Respondern und Respondern. Die Daten in **B)** sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden mittels zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben analysiert. ns, nicht signifikant

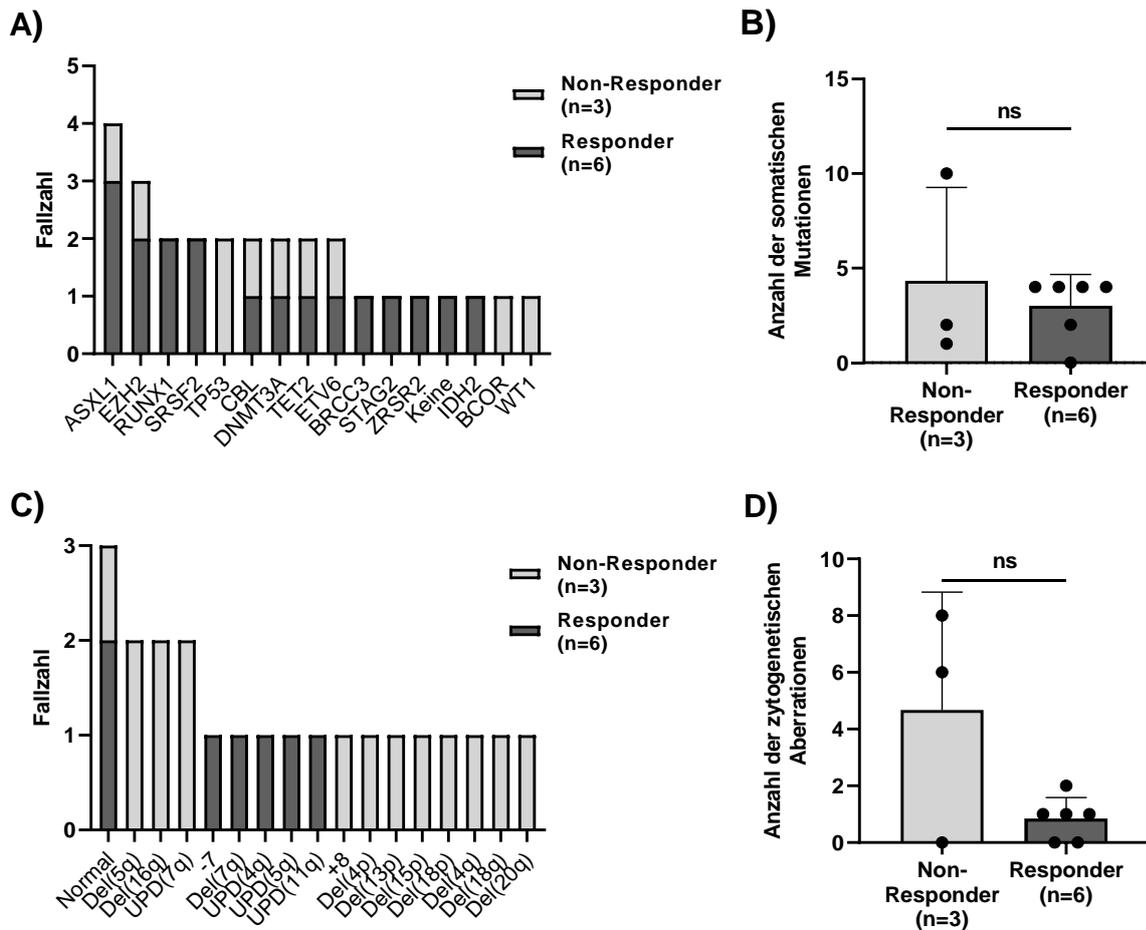


Abbildung 25: Korrelation somatischer Mutationen und zytogenetischer Aberrationen mit dem Ansprechen auf EPAG (Schmitt et al. 2022). Vergleich der Anzahl der somatischen Mutationen der $n = 3$ Non-Responder (hellgrau) und $n = 6$ Respondern (dunkelgrau). **A)** Verteilung der Non-Responder und Responder auf die verschiedenen MDS-spezifischen somatischen Mutationen. **B)** Vergleich der mittleren somatischen Mutationsanzahl zwischen Non-Respondern und Respondern. **C)** Verteilung der Non-Responder und Responder auf die verschiedenen zytogenetischen Aberrationen. **D)** Vergleich der mittleren Anzahl der zytogenetischen Aberrationen zwischen Non-Respondern und Respondern. Die Daten in **B)** und **D)** sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden mittels zweiseitigen t -Tests für unabhängige Stichproben analysiert. ns, nicht signifikant

Da MDS häufig mit einer dysregulierten proinflammatorischen Signalübertragung im Knochenmark assoziiert ist (Sallman et al., 2019), wurde eine RT-qPCR-Analyse zur Bestimmung des Expressionsniveaus der inflammationsassoziierten Gene *S100A8*, *S100A9*, *CASP1* und *NLRP3* in primären Patienten-MNC- und PDX-Proben durchgeführt (**Abbildung 26A-D**, **Abbildung 27A-D**, **Abbildung 28A-D**), um zu überprüfen, ob eines der Gene als Prädiktor für ein Ansprechen EPAGs geeignet ist und ob sich deren Expression unter der Behandlung mit EPAG in den PDX verändert. Die Expressionsniveaus der $n = 4$ Gene waren in den Patientenproben sehr heterogen, unterschieden sich allerdings nicht signifikant zwischen Respondern und Non-Respondern (**Abbildung 26A-C**).

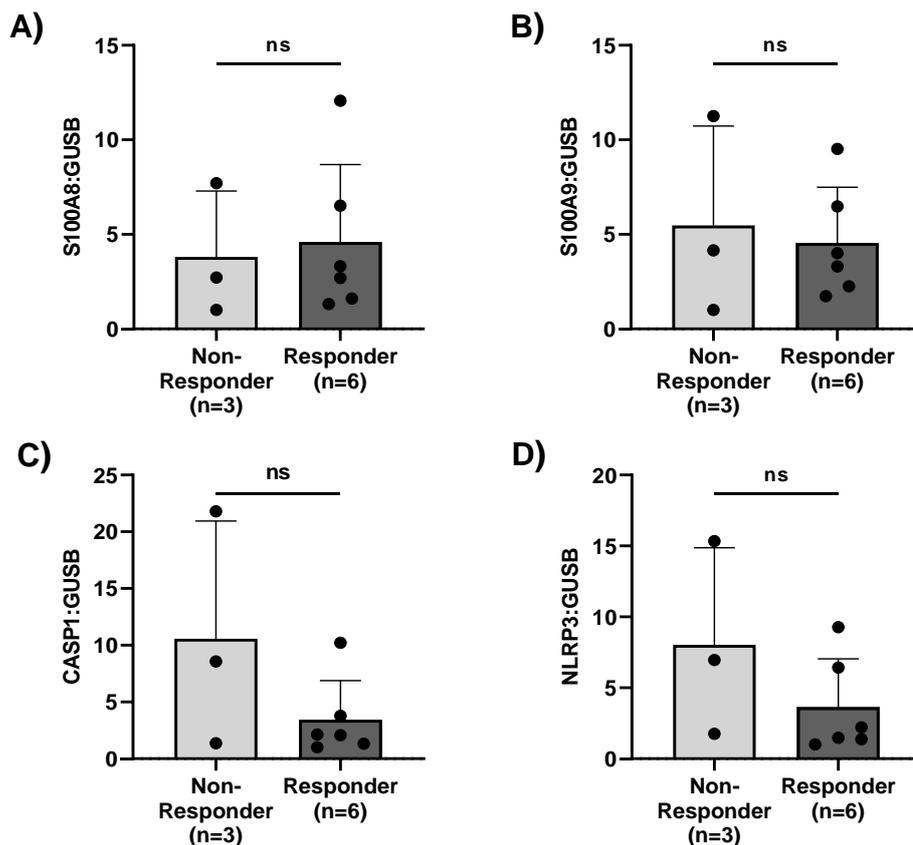


Abbildung 26: Expressionsniveaus inflammationsassoziierter Gene in primären Patienten-MNCs (Schmitt et al. 2022). Vergleich der relativen Expressionsniveaus der inflammationsassozierten Gene S100A8 (A), S100A9 (B), CASP1 (C) und NLRP3 (D) in primären mononukleären Zellen (MNCs) von Patienten zwischen $n = 3$ Non-Respondern (links, hellgrau) und $n = 6$ Respondern (rechts, dunkelgrau). Die Bestimmung der Expressionsniveaus erfolgte mittels RT-qPCR-Analyse. GUSB wurde dabei als Referenzgen genutzt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden mittels zweiseitigen t -Tests für unabhängige Stichproben analysiert. ns, nicht signifikant

Im Vergleich der Patienten-MNCs mit den PDX-Proben des Endpunkts zeigten sich bei S100A8, S100A9 und CASP1 ähnliche mittlere relative Expressionsniveaus (**Abbildung 27A-C**). Im Fall von NLRP3 war das Expressionsniveau der PDX-Proben 5-fach signifikant höher als das der Patientenproben (**Abbildung 27D**). Zuletzt wurden die PDX-Proben des 12 Wochenzeitpunkts und des Endpunkts in Abhängigkeit von der erhaltenen Behandlung miteinander verglichen (**Abbildung 28A-D**). Insgesamt konnte für S100A8, S100A9 und CASP1 beobachtet werden, dass deren Expression zwischen dem 12 Wochen-Zeitpunkt und dem Endpunkt sowohl in den vehikel- als auch den EPAG-behandelten PDX zunahm. Ausgenommen NLRP3 zeigte einen entgegengesetzten Trend. Alles in allem bestand aber für keines der Gene ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

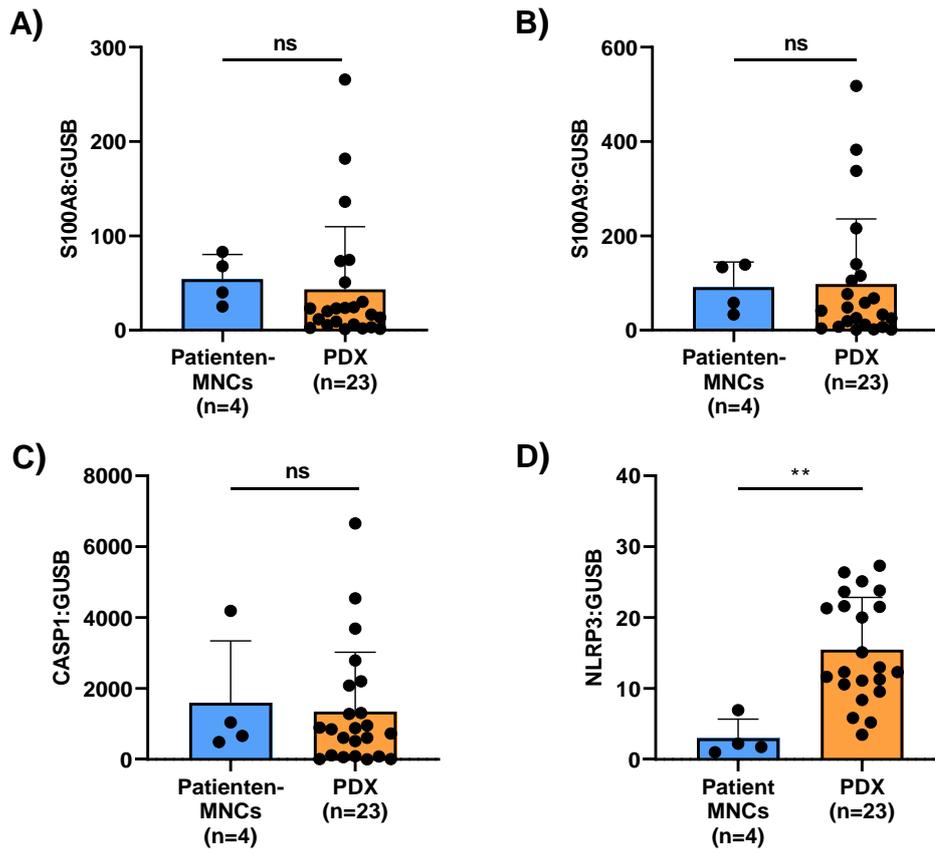


Abbildung 27: Vergleich des Expressionsniveaus inflammationsassoziierter Gene in primären Patienten-MNCs und PDX-Proben (Schmitt et al. 2022). Vergleich der relativen Expressionsniveaus der inflammationsassozierten Gene S100A8 (A), S100A9 (B), CASP1 (C) und NLRP3 (D) zwischen primären mononukleären Zellen (MNCs) von Patienten (blau) und humanen CD45+ Zellen aus patientenabgeleiteten Xenografts (PDX) zum Endpunkt (orange). Die Bestimmung der Expressionsniveaus erfolgte mittels RT-qPCR-Analyse. GUSB wurde dabei als Referenzgen genutzt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden mittels zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben analysiert. **, $p \leq 0,01$; ns, nicht signifikant

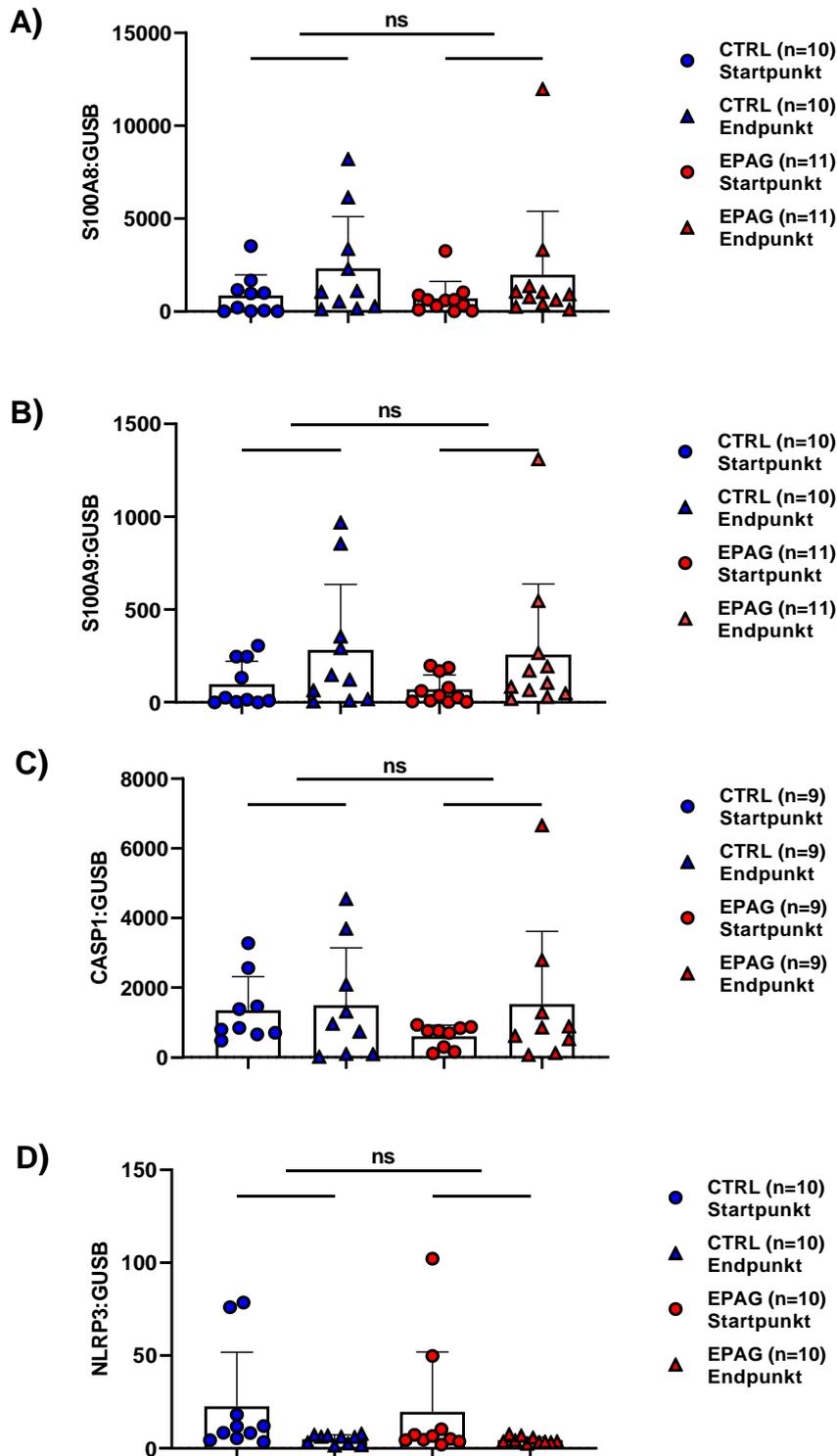


Abbildung 28: Vergleich des Expressionsniveaus inflammationsassoziierter Gene in PDX-Proben (Schmitt et al. 2022). Vergleich der relativen Expressionsniveaus der inflammationsassozierten Gene S100A8 (A), S100A9 (B), CASP1 (C) und NLRP3 (D) in humanen CD45+ Zellen aus patientenabgeleiteten Xenografts (PDX) zwischen vehikelbehandelten PDX zu Start- (blaue Kreise) und Endpunkt (blaue Dreiecke), und EPAG-behandelten PDX zu Start- (rote Kreise) und Endpunkt (rote Dreiecke). Die Bestimmung der Expressionsniveaus erfolgte mittels RT-qPCR-Analyse. GUSB wurde dabei als Referenzgen genutzt. Der Startpunkt ist als 12 Wochen nach der intrafemorale Transplantation und vor Behandlungsbeginn definiert. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA, engl. analysis of variance) für unabhängige Stichproben analysiert. ns, nicht signifikant

Um zu untersuchen, ob EPAG darüber hinaus auch die humane Megakaryopoese in unserem MDS-PDX-Modell stimuliert, haben wir immunhistologische Färbungen von humanen Mitochondrien und humanen CD61+ Megakaryozyten an seriellen Tibia-schnitten der PDX durchgeführt. In **Abbildung 29** sind exemplarische Schnitte eines mit Vehikel (CTRL1) und mit EPAG (EPAG2) behandelten PDX von Patient P03 gezeigt. Diese beiden PDX wurden ausgewählt, da sie zum Endpunkt einen ähnlichen Anteil an humanem Chimärismus aufwiesen (EPAG2: 56,2 %, CTRL1: 57,5 %). Dies spiegelte sich auch in der humanen Mitochondrienfärbung wider, da die Anzahl der positiven Zellen, erkennbar an der hell- bis dunkelbraunen Färbung, in beiden PDX augenscheinlich in etwa gleich war. Gefärbte humane CD61+ Megakaryozyten konnten in beiden PDX nachgewiesen werden, allerdings waren diese in dem mit EPAG-behandelten PDX im Vergleich zu der Kontrollmaus deutlich vermehrt. Dies erbrachte den Beweis, dass die humane Megakaryopoese in unserem MDS-PDX-Modell durch die Behandlung mit EPAG gesteigert werden konnte.

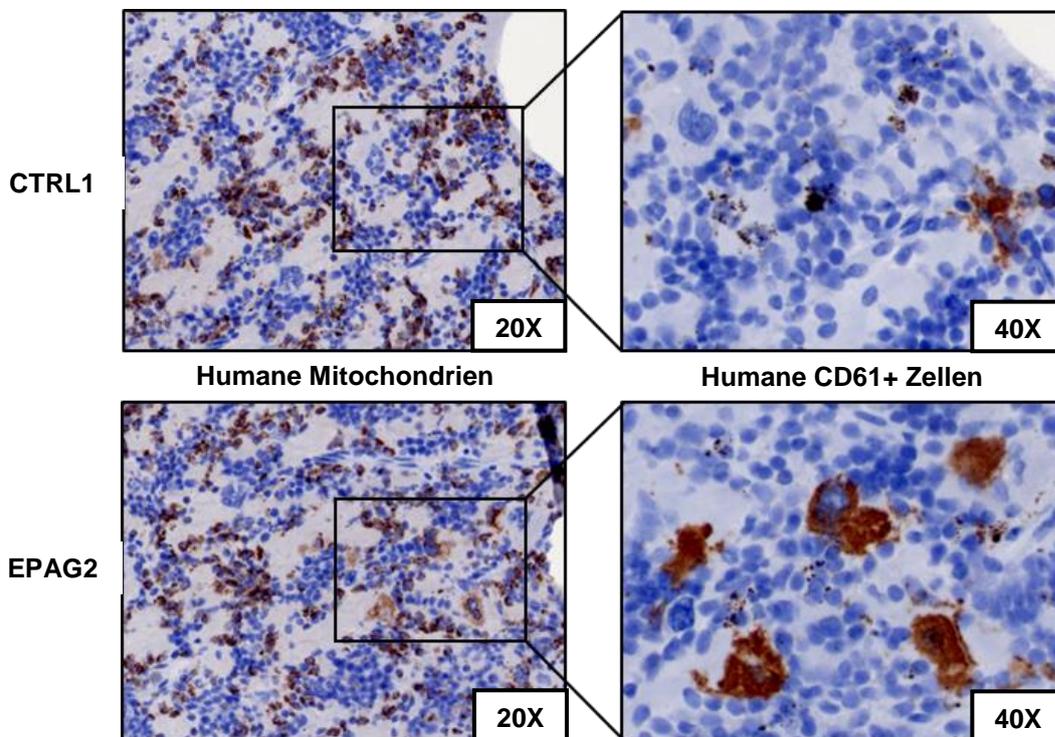


Abbildung 29: Nachweis des humanen Engraftments und der humanen Megakaryopoese im Knochenmark der PDX von Patient P03 (Schmitt et al. 2022). Vergleich der Knochenmäcker des mit Vehikel behandelten patientenabgeleiteten Xenografts (PDX) CTRL1 (oben) und des mit Eltrombopag (EPAG) behandelten PDX EPAG2 (unten) von Patient P03. Das humane Engraftment wurde mittels Färbung von humanen Mitochondrien visualisiert (links). Zellen der megakaryozytären Abstammungslinie wurden mittels humanem CD61-Antikörper gefärbt. Zellen positiv für die jeweilige Färbung erscheinen in braun. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde eine Gegenfärbung mit Hematoxylin vorgenommen. Beide Färbungen wurden separat an zwei aufeinander folgenden histologischen Schnitten derselben Tibia vorgenommen. Die Abbildungen sind in 20-facher (20X) und 40-facher (40X) optischer Vergrößerung aufgenommen und zeigen dieselbe Stelle.

Abschließend sollte der Frage nachgegangen werden, ob EPAG in unserem MDS-PDX-Modell klonale MDS-Megakaryopoese oder womöglich restliche gesunde Megakaryopoese stimulierte, die letztendlich für den Anstieg der humanen Thrombozyten sorgte. Zu diesem Zweck haben wir hCD45+ sowie hCD45+hCD61+ Zellen aus den primären MNCs von Patient P04 und gepoolten Knochenmarkproben von dessen $n = 3$ EPAG- und $n = 3$ vehikelbehandelten PDX sortiert (**Abbildung 30**). Der Prozentsatz der hCD45+hCD61+ Zellen in den Patienten-MNCs (4,5 %) war ähnlich zu dem in der Vehikelgruppe (5,1 %), wohingegen er in der EPAG-Gruppe mit 59,0 % etwa 12-mal höher war. Die DNA aus den sortierten hCD45+ und hCD45+hCD61+ Zellen wurde verwendet, um eine Sanger-Sequenzierung der $n = 4$ MDS-spezifischen Mutationen des Patienten ASXL1-Q561X, RUNX1-T196fs, SRSF2-P95H und *TET2-H1904Q* durchzuführen. Diese Analyse zeigte, dass alle $n = 4$ Mutationen in den sortierten hCD45+ sowie hCD45+hCD61+ Subfraktionen in ähnlicher Frequenz messbar waren (**Abbildung 31**). Dies bestätigte, dass EPAG in der Lage ist, Megakaryopoese zu stimulieren, die von mutierten MDS-Klonen stammt.

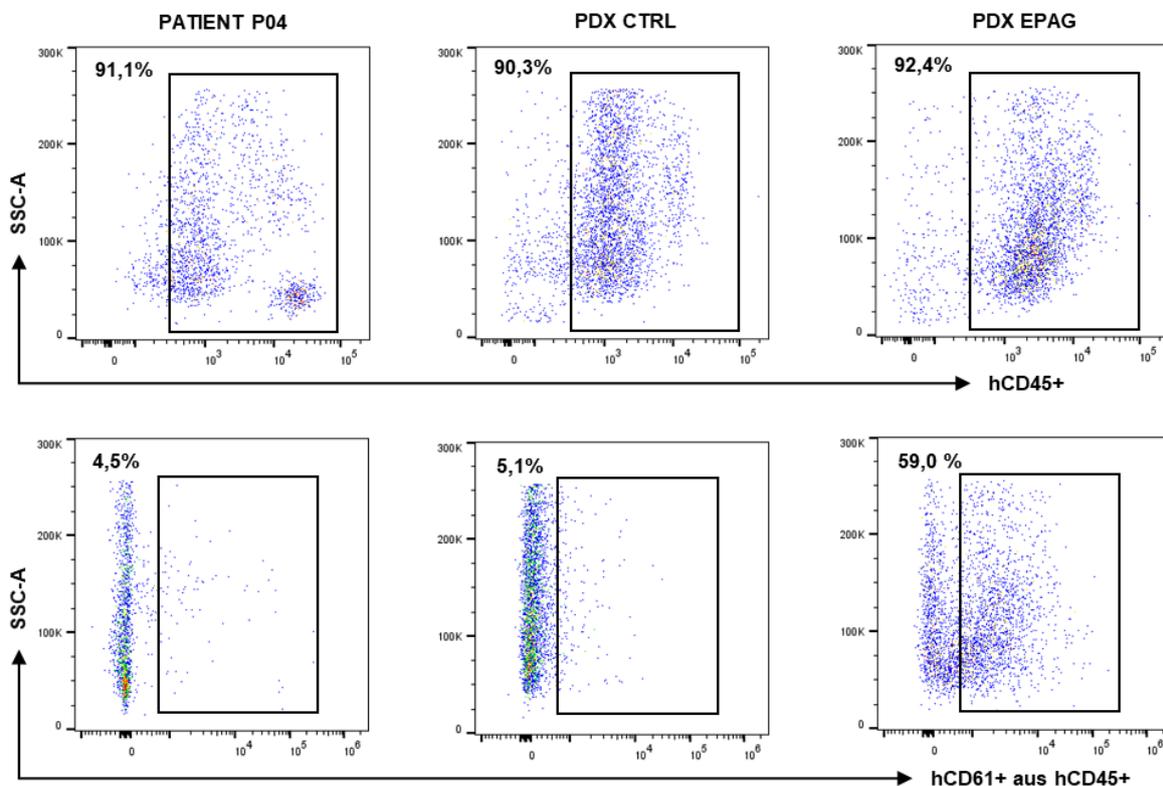
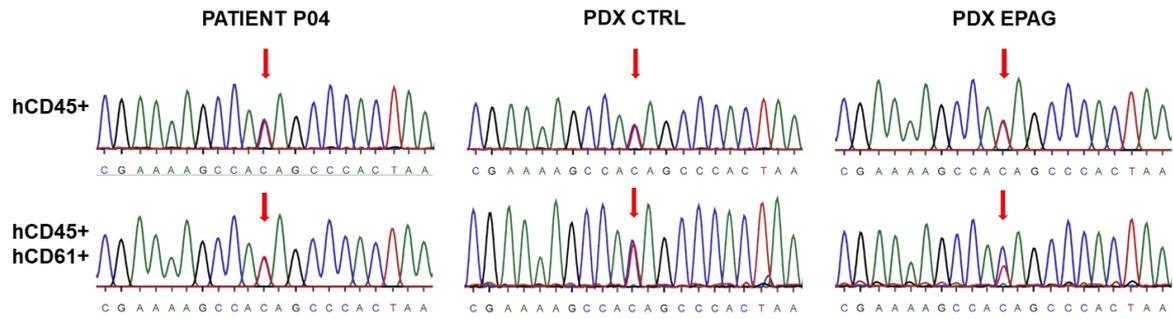
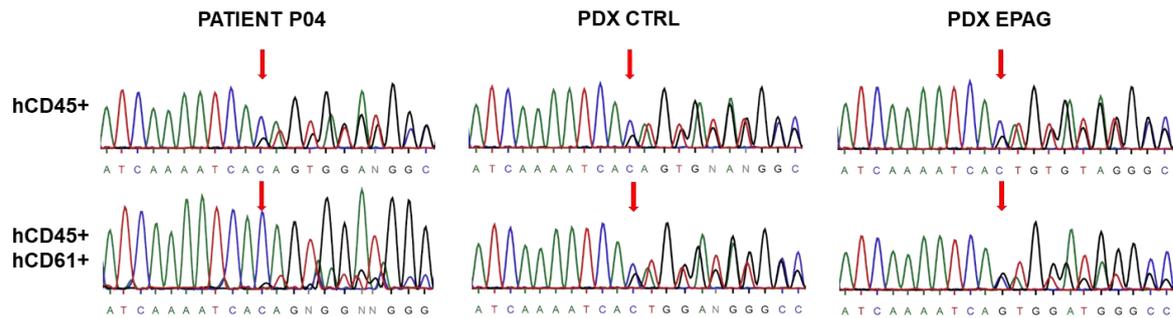


Abbildung 30: Anteil der humanen Megakaryopoese im Knochenmark von Patient P04 und seinen PDX (Schmitt et al. 2022). Plots der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils der humanen CD45+ Zellen (oben) und der humanen megakaryozytären CD45+CD61+ Zellen (unten) in den primären mononukleären Zellen von Patient P04 (links) und den gepoolten Knochenmarkproben seiner $n = 3$ mit Vehikel (CTRL, Mitte) und $n = 3$ mit Eltrombopag (EPAG, rechts) behandelten PDX. Der prozentuale Anteil der entsprechenden Zellpopulation ist dem jeweiligen Plot oben links zu entnehmen.

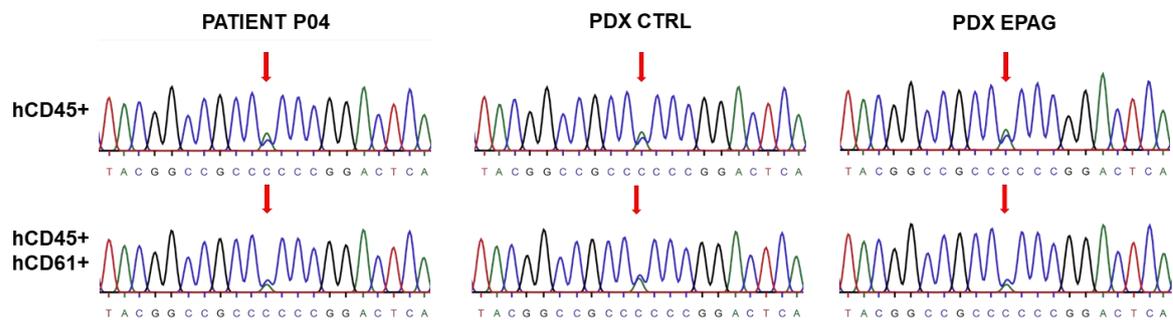
A) ASXL1-Q561X



B) RUNX1-T196fs



C) SRSF2-P95H



D) TET2-H1904Q

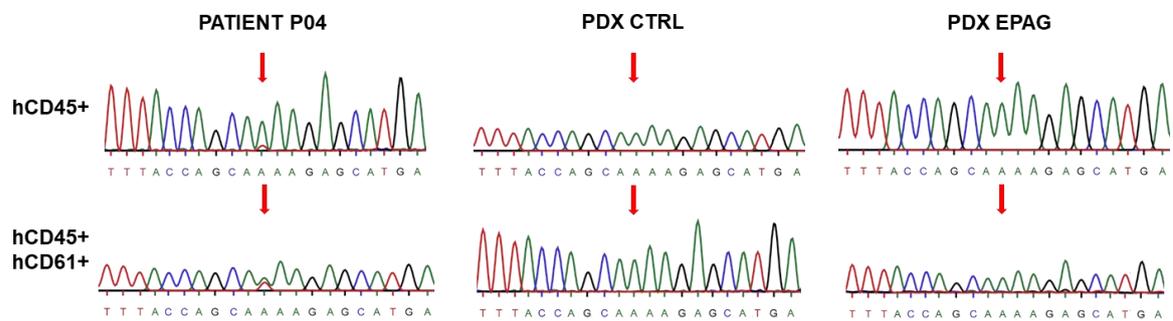


Abbildung 31: Vergleich des Mutationsprofils der CD45+ und megakaryozytären Zellen von Patient P04 und dessen PDX (Schmitt et al. 2022). Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung für die in Patient P04 detektierten MDS-spezifischen Mutationen ASXL1-Q561X (A), RUNX1-T196fs (B), SRSF2-P95H (C) und TET2-H1904Q (D) in der DNA der sortierten humanen CD45+ Zellen (oben) und der humanen megakaryozytären CD45+CD61+ Zellen (unten) aus den primären mononukläeren Zellen von Patient P04 (links) und den gepoolten Knochenmarkproben seiner n = 3 mit Vehikel (CTRL, Mitte) und n = 3 Eltrombopag (EPAG, links) behandelten patientenabgeleiteten Xenografts (PDX). Die dargestellten „Peaks“ codieren für die Nukleinsäuresequenz an der jeweiligen Stelle im Genom. Dabei steht A für Adenin (grün), C für Cytosin (blau), G für Guanin (schwarz) und T für Thymin (rot). Der rote Pfeil gibt die Stelle der Sequenz an, an der die jeweilige Mutation auftritt.

3.4 Der Einfluss von EPAG auf Krankheitsprogress und Transformation im MDS-PDX-Modell

Eines der Hauptanliegen dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob EPAG einen Einfluss auf den Krankheitsprogress oder die Chance einer Transformation in eine sAML in primären MDS-Zellen *in vivo* im PDX-Modell hat. Um diese Frage zu beantworten, wurden verschiedene Parameter in den vehikelkontrollierten Experimenten analysiert. Es wurde die Annahme getroffen, dass im Falle eines Progresses im PDX, der Anteil der humanen Zellen zunehmen würde, da die Erkrankung in der Regel aggressiver wird und stärker proliferiert. Zudem gilt bei MDS-Patienten der Prozentsatz der CD34+ Blasten als Indiz für ein Voranschreiten der Erkrankung. Ebenso lässt sich häufig eine Vergrößerung der Milz beobachten, die auch in AML-Maus- und PDX-Modellen ein Indikator für die Schwere der Erkrankung darstellt. Daher wurden zunächst die Engraftmentraten im zeitlichen Verlauf der mit EPAG und Vehikel behandelten PDX aller Patienten gegenüber gestellt. Dabei konnte festgestellt werden, dass das humane Engraftment in beiden Behandlungsgruppen über die Zeit des Experiments kontinuierlich zunahm, aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der einzelnen Zeitpunkte der n = 26 mit EPAG und n = 23 mit Vehikel behandelten PDX existierte (**Abbildung 32**). Die n = 3 PDX von Patient P01 wurden aufgrund des frühzeitigen Endpunkts der Kontrollmaus aus der Analyse ausgeschlossen. Auch eine patientenindividuelle Betrachtung der PDX-Engraftmentraten zeigte keine signifikanten Unterschiede (**Abbildung 42A-H**).

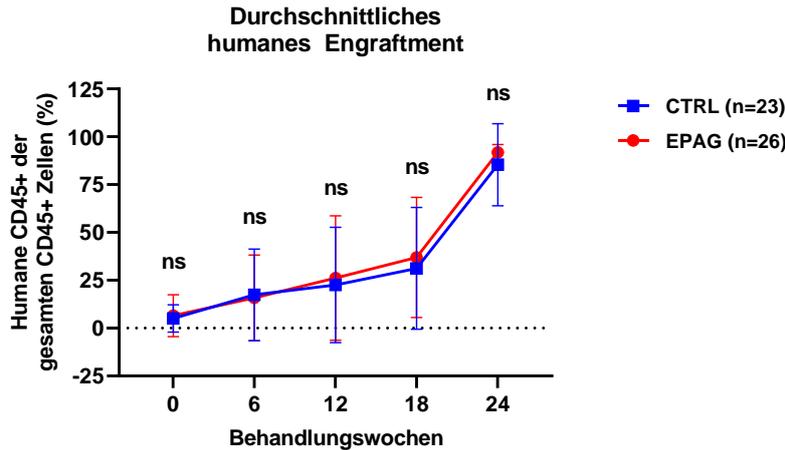


Abbildung 32: Verlauf des durchschnittlichen humanen Engraftments in vehikel- und EPAG-behandelten PDX (Schmitt et al. 2022). Verlauf des durchschnittlichen humanen Engraftments in den $n = 23$ vehikel- (blau) und $n = 26$ EPAG-behandelten (rot) patientenabgeleiteten Xenografts (PDX) von $n = 8$ transplantierten Patientenproben im Verlauf der 18- bis 24-wöchigen Behandlung. Die $n = 3$ PDX von Patient P01 wurden aufgrund des frühzeitigen Endpunkts der Kontrollmaus aus der Analyse ausgeschlossen. Knochenmarkpunktionen wurden in Woche 0, 6 und 12 vorgenommen. Zum Endpunkt in Woche 18 erfolgte die Analyse des Gesamtknochenmarks. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden mittels zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben analysiert. ns, nicht signifikant

Ein Vergleich der humanen CD45+CD33+ Zellen (**Abbildung 33A**) zum Endpunkt von $n = 5$ vehikel- und $n = 9$ EPAG-behandelten PDX zeigte ebenso keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen, wie der Anteil der humanen CD45+CD34+ Zellen (**Abbildung 33B**) in $n = 18$ vehikel- und $n = 23$ EPAG-behandelten PDX zum Endpunkt.

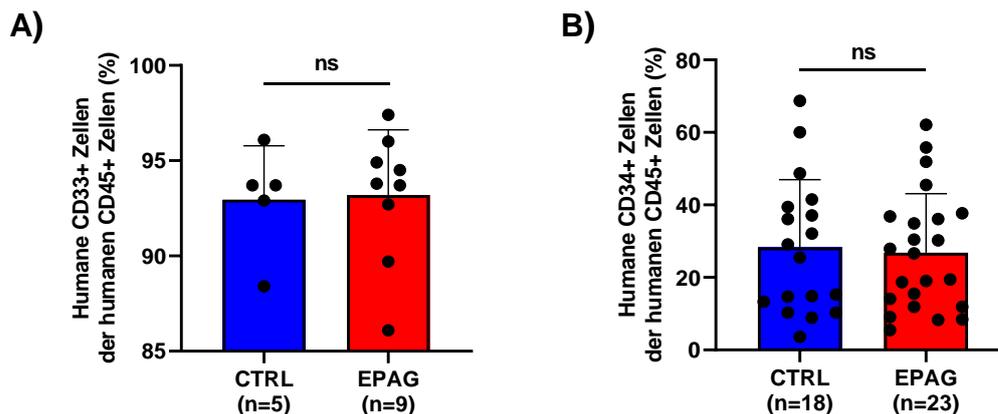


Abbildung 33: Anteil der humanen CD33+ und CD34+ Zellen in der humanen CD45+ Population in vehikel- und EPAG-behandelten PDX (Schmitt et al. 2022). Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils der humanen CD33+ (**A**) und CD34+ Zellen (**B**) in der humanen CD45+ Zellpopulation im Knochenmark von $n = 5$ bzw. $n = 18$ vehikel- (blau) und $n = 9$ bzw. $n = 23$ EPAG-behandelten patientenabgeleiteten Xenografts (PDX) zum Endpunkt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden mittels zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben analysiert. ns, nicht signifikant

Um den Ausschluss einer durch EPAG induzierten Blastenvermehrung mittels durchflusszytometrischer Quantifizierung von CD34 zusätzlich zu validieren, wurden Knochenmarkausstriche der PDX zum Endpunkt angefertigt und mit May-Grünwald-Giemsa-Färbung gefärbt. Alle Präparate wurden morphologisch auf das Vorkommen von Blasten untersucht. Falls vorhanden, wurden die May-Grünwald-Giemsa-gefärbten Knochenmarkausstriche der transplantierten Patienten als zusätzlicher Vergleich hinzugezogen. In allen Fällen konnten keine Blasten festgestellt werden. Dies galt auch für die Kontrollmaus von Patient P01 sowie der EPAG-behandelten Maus EPAG3 von Patient P04, die beide vor dem offiziellen Versuchsende getötet werden mussten. In **Abbildung 34** sind die beispielhaften Knochenmarkausstriche von Patient P06 und einem seiner vehikel- (CTRL3) sowie EPAG-behandelten (EPAG3) PDX zu sehen. Obwohl mittels dieser Färbung nicht zwischen humaner und muriner Megakaryopoese unterschieden werden kann, ist in diesem Fall auffällig, dass in dem EPAG-behandelten PDX im Vergleich zum Patienten selbst und der Kontrollmaus zahlreiche Megakaryozyten im Ausstrich zu sehen sind.

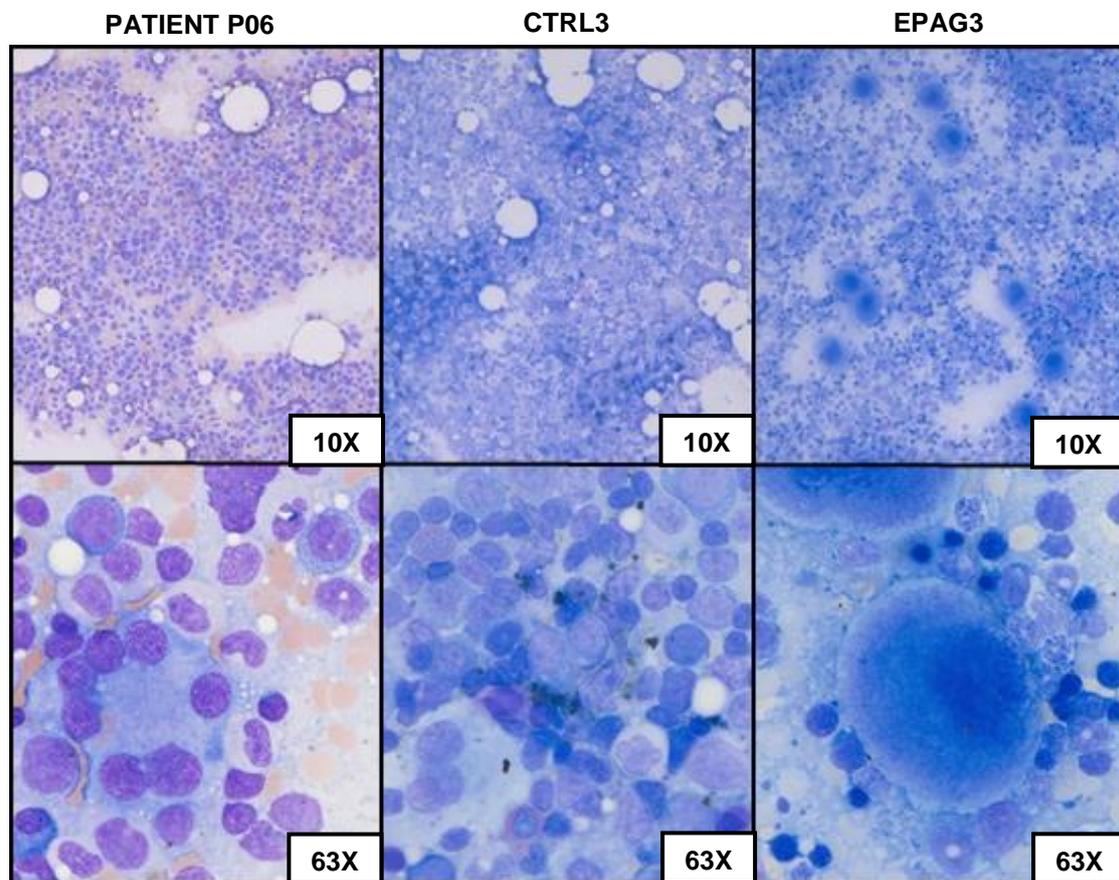


Abbildung 34: Vergleich der Knochenmarkausstriche von P06 und dessen PDX (Schmitt et al. 2022). Vergleich der Knochenmarkausstriche von Patient P06 (links) und dessen mit Vehikel (CTRL) behandelten patientenabgeleiteten Xenograft (PDX) CTRL3 (Mitte) und mit Eltrombopag (EPAG) behandelten PDX EPAG3 (rechts). Der Knochenmarkausstrich von Patient P06 stammt von derselben Punktion wie das Transplantat mit dem die PDX generiert wurden. Zur Differenzierung der einzelnen Zelltypen im Knochenmark wurde eine May-Grünwald-Giemsa-Färbung durchgeführt. Die Abbildungen sind in 10-facher (10X) und 63-facher (63X) optischer Vergrößerung aufgenommen.

Zuletzt wurden die Größe und das Gewicht der PDX-Milzen zwischen den beiden Gruppen verglichen, um das Vorhandensein von extramedullärer Hämatopoese zu untersuchen. Weder die Größe der Milzen (**Abbildung 35A**) von den $n = 23$ vehikel- und $n = 25$ EPAG-behandelten PDX, noch das Milz-Gewicht (**Abbildung 35B**) der $n = 22$ mit Vehikel und $n = 23$ mit EPAG behandelten PDX war signifikant unterschiedlich. Allerdings wiesen beide Parameter eine positive Korrelation mit dem humanen Engraftment zum Endpunkt auf (**Abbildung 36A+B**). Dies lässt darauf schließen, dass je mehr humane Zellen sich im Knochenmark des PDX befinden, desto eher wandern die humanen Zellen auch in die Milz der Maus.

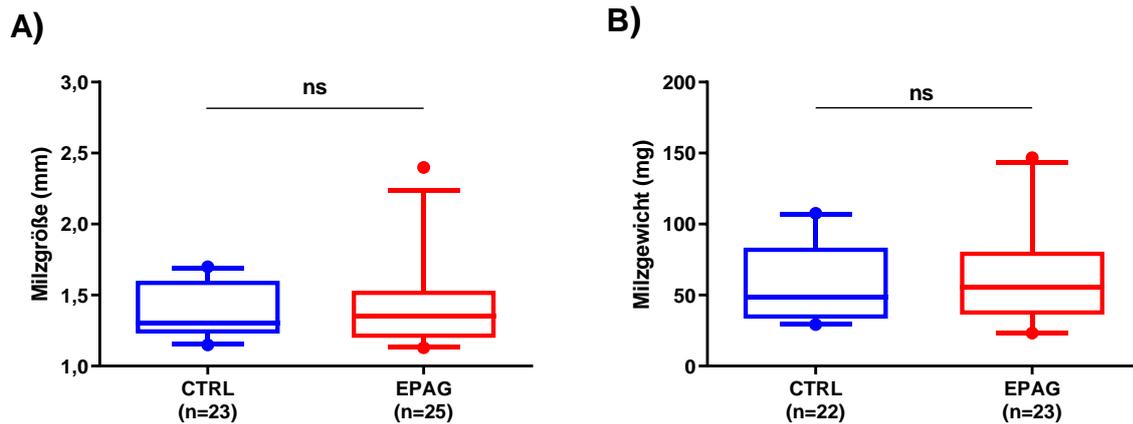


Abbildung 35: Vergleich der Größe und des Gewichts der Milzen von vehikel- und EPAG-behandelten PDX (Schmitt et al. 2022). Ergebnisse der Bestimmung der mittleren Milzgröße (A) und des mittleren Milzgewichts (B) von $n = 23$ bzw. $n = 22$ vehikel- (blau) und $n = 25$ bzw. $n = 23$ EPAG-behandelten patientenabgeleiteten Xenografts (PDX) zum Endpunkt. Die Ergebnisse der PDX von P01 fehlen in der Milzgewichtkohorte. Die Daten sind als Boxplot mit unterem 0,05-Quantil und oberem 0,95-Quantil dargestellt und wurden mittels zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben analysiert. Die Punkte zeigen Ausreißer. ns, nicht signifikant

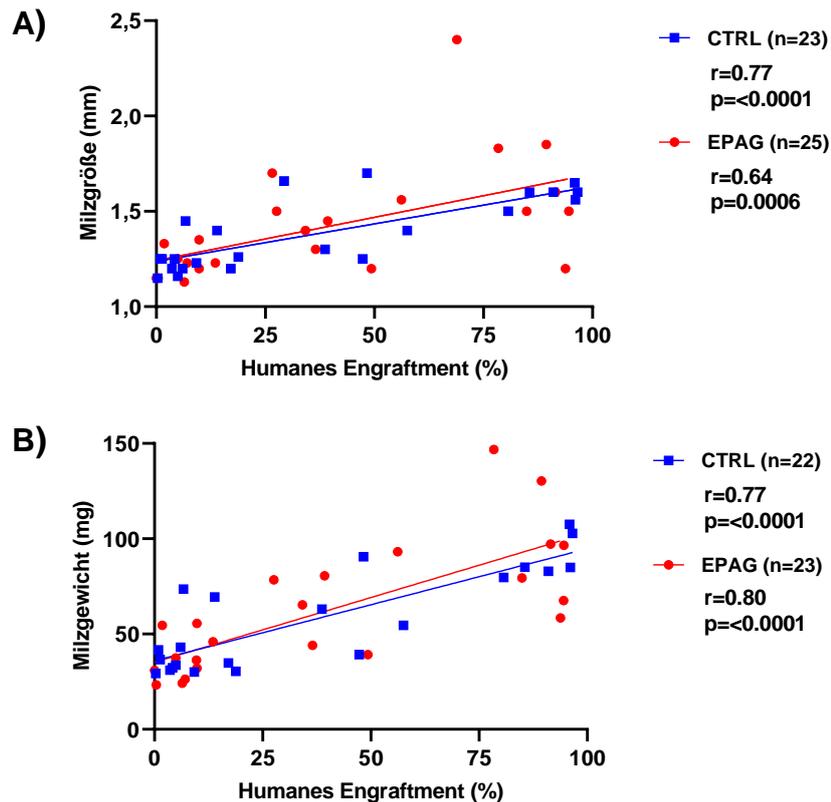
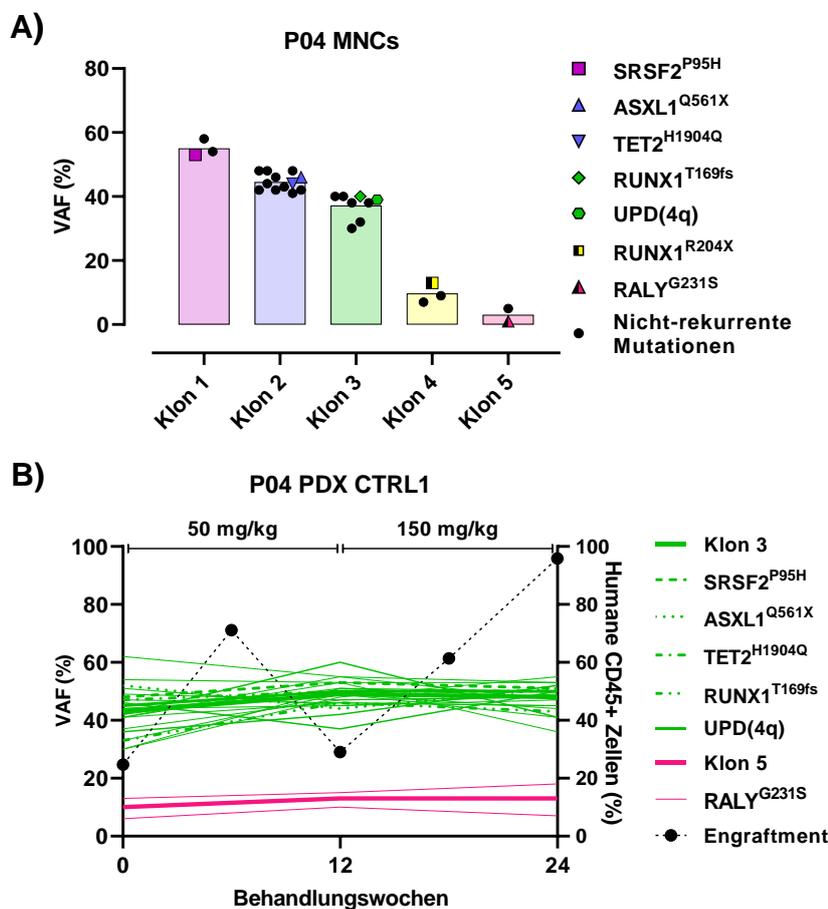


Abbildung 36: Korrelation von humanem Engraftment zu Milzgröße und Milzgewicht in den PDX (Schmitt et al. 2022). Bestimmung der Korrelation des humanen Engraftments zu der Größe und des Gewichts der Milzen von $n = 23$ bzw. $n = 22$ vehikel- (blau) und $n = 25$ bzw. $n = 23$ EPAG-behandelten patientenabgeleiteten Xenografts (PDX) zum Endpunkt. Die Ergebnisse der PDX von P01 fehlen in der Milzgewichtkohorte. Zum Nachweis der Korrelation der gegenübergestellten Variablen wurde eine einfache lineare Regression durchgeführt und im Anschluss der Pearson-Korrelationskoeffizient r und die dazugehörigen p -Werte berechnet.

3.5 Der Einfluss von EPAG auf die klonale Zusammensetzung des humanen Knochenmarks im MDS-PDX-Modell

Der Versuchsaufbau dieser Studie ermöglichte unter Nutzung unseres MDS-PDX-Modells erstmals eine langfristige Evaluierung der MDS-spezifischen klonalen Entwicklung in Abhängigkeit von der Behandlung mit EPAG unter vehikelkontrollierten Bedingungen und auf patientenindividueller Ebene. Für die Patienten P01 (**Abbildung 14A-D**), P03, P04, P05, P07, P08 und P09 und deren PDX (**Abbildungen 37A-C, 38A-C, 40A+B, 43A-Z**) wurden dazu die gewonnenen PDX-DNA-Proben von bis zu fünf aufeinanderfolgenden Zeitpunkten innerhalb eines Behandlungszeitraums von bis zu 24 Wochen und ihre korrespondierenden Patientenproben mittels Gesamt-Exom-Sequenzierung analysiert und die klonalen Verläufe im PDX-Knochenmark rekonstruiert. In den Fällen der Patienten P02 und P06 konnten nur die Daten der PDX-Endpunkte erfasst werden (**Abbildung 43Y+Z**). Die verschiedenen molekulardefinierten Klone, die in den primären Patienten- und PDX-Proben vorhanden waren, wurden unter Verwendung des R-Tools SciClone in kohärente Mutations- und zytogenetische „Cluster“ gruppiert. Dies führte zum Nachweis von drei bis fünf definierten dominanten und Subklonen pro Patient. In der Mehrheit der Fälle wiesen die PDX ein ähnliches Mutationsprofil wie die dazugehörigen Patientenproben auf (**Abbildung 44A-G**). Die Patienten

P01, P03, P04, P05, P08 und P09 ermöglichten durch das Vorhandensein mehrerer, serieller Proben standardisierte Vergleiche der klonalen Zusammensetzung zwischen PDX, die entweder mit EPAG oder Vehikel behandelt wurden (**Abbildung 44A-X**). Obwohl die Daten im Einzelfall sehr individuell waren, konnten zusammenfassend keine Anhaltspunkte dafür gefunden werden, dass die Behandlung mit EPAG eine klonale Selektion oder die Entwicklung neuer Klone in den PDX fördert (**Abbildungen 37A-C, 38A-C, 40A+B, 43A-Z**). In den Fällen der Patienten P04 und P05 zeigten die Daten aller PDX, dass ihre klonale Knochenmarkszusammensetzung während des gesamten Experiments stabil blieb, selbst nach der Dosisescalation von EPAG auf 150 mg/kg für 12 weitere Behandlungswochen (**Abbildungen 37A-C, 38A-C, 43G-M**). Dies galt auch für das EPAG-behandelte PDX EPAG3 von Patient P04 (**Abbildung 37C**), das ähnlich wie die Kontrollmaus von Patient P01, aufgrund massiven Gewichtsverlusts vorzeitig getötet werden musste, aber hingegen keine klonale Evolution aufwies.



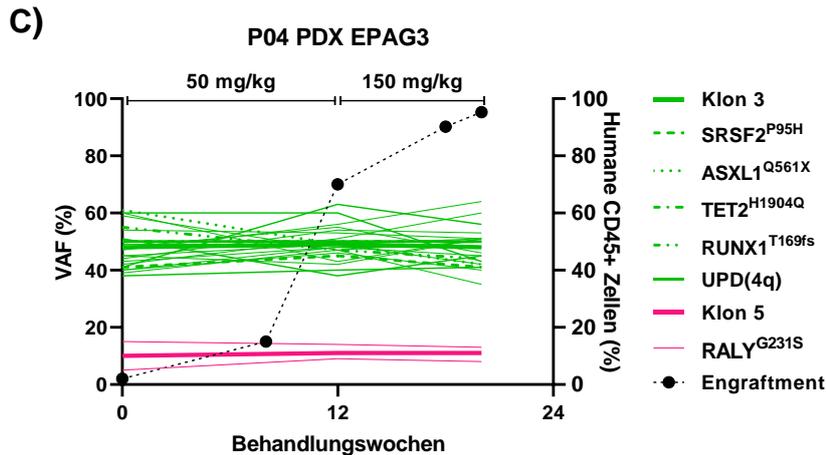
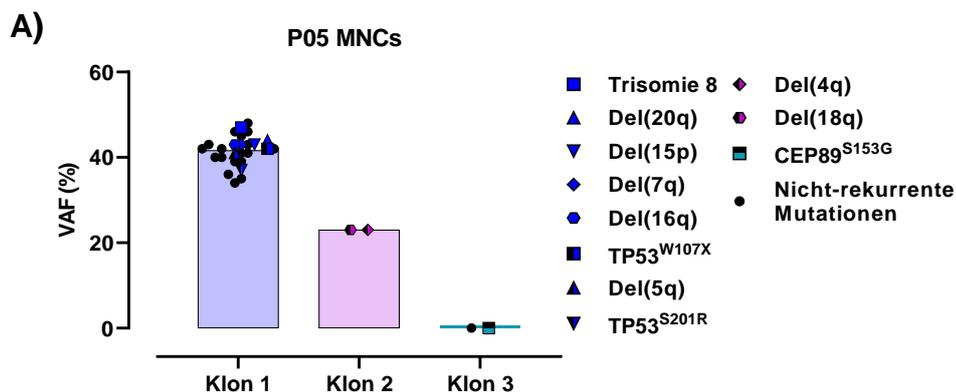


Abbildung 37: Klonale Knochenmarkszusammensetzung von Patient P04 und dessen PDX (Schmitt et al. 2022). Ergebnisse der Gesamt-Exom-Sequenzierung der DNA der mononukleären Zellen (MNCs) aus dem Knochenmark von Patient P04 (A), dessen mit Vehikel (CTRL) behandelten patientenabgeleiteten Xenograft (PDX) CTRL1 (B) und dessen mit Eltrombopag behandelten PDX EPAG3 (C) im Verlauf der 24-wöchigen Behandlung. Die PDX wurden anfänglich mit 50 mg/kg EPAG behandelt, ab Woche 12 erfolgte eine Dosisescalation auf 150 mg/kg. PDX EPAG3 musste aufgrund massiven Gewichtsverlusts in Woche 20 vorzeitig getötet werden. Sequenziert wurden die humanen CD45+ Zellen aus dem PDX-Knochenmark der Woche 0, 12 und 20 bzw. 24. Dargestellt ist die Varianzallelfrequenz (VAF) der Mutationen und zytogenetischen Aberrationen (linke Y-Achse). „Mutationscluster“ wurden mittels des bioinformatischen Tools SciClone berechnet. Die Balken in A stellen den Mittelwert der VAF der einzelnen Klone dar. Wiederkehrende Klone in A-C) sind in derselben Farbe dargestellt. Dicke Linien in B) und C) stellen den Mittelwert des jeweiligen Klons dar. Die durch die Mutationen erfolgten Aminosäureaustausche werden für die jeweilige Mutation als hochgestellte Kodierung angezeigt. Die schwarze gestrichelte Linie beschreibt das Engraftment in dem jeweiligen PDX (rechte Y-Achse). Die übrigen n = 4 PDX von Patient P04 sind in **Abbildung 43G-J** einzusehen.



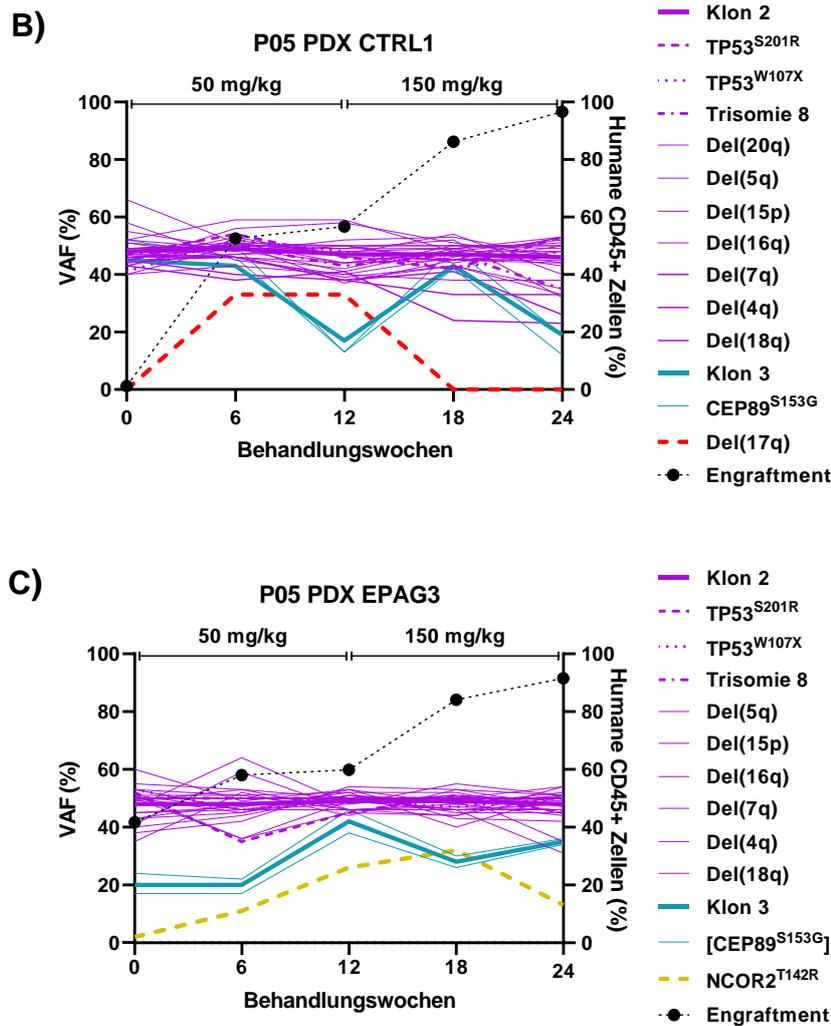


Abbildung 38: Klonale Knochenmarkszusammensetzung von Patient P05 und dessen PDX (Schmitt et al. 2022). Ergebnisse der Gesamt-Exom-Sequenzierung der DNA der mononukleären Zellen (MNCs) aus dem Knochenmark von Patient P05 (A), dessen mit Vehikel (CTRL) behandelten patientenabgeleiteten Xenograft (PDX) CTRL1 (B) und dessen mit Eltrombopag behandelten PDX EPAG3 (C) im Verlauf der 24-wöchigen Behandlung. Die PDX wurden anfänglich mit 50 mg/kg EPAG behandelt, ab Woche 12 erfolgte eine Dosisescalation auf 150 mg/kg. Sequenziert wurden die humanen CD45+ Zellen aus dem PDX-Knochenmark der Woche 0, 6, 12, 18 und 24. Dargestellt ist die Varianzallelfrequenz (VAF) der Mutationen und zytogenetischen Aberrationen (linke Y-Achse). „Mutationscluster“ wurden mittels des bioinformatischen Tools SciClone berechnet. Die Balken in A) stellen den Mittelwert der VAF der einzelnen Klone dar. Wiederkehrende Klone in A)-C) sind in derselben Farbe dargestellt. Dicke Linien in B) und C) stellen den Mittelwert des jeweiligen Klons dar. Die durch die Mutationen erfolgten Aminosäureaustausche werden für die jeweilige Mutation als hochgestellte Kodierung angezeigt. Die schwarze gestrichelte Linie beschreibt das Engraftment in dem jeweiligen PDX (rechte Y-Achse). Die übrigen $n = 3$ PDX von Patient P05 sind in **Abbildung 43K-M** einzusehen.

In einzelnen PDX der Patienten P01, P03, P05 und P08 konnte das, zum Teil lediglich transiente, Auftreten von neuen molekularen Läsionen in $n = 4$ (17 %) vehikel- und $n = 2$ (8 %) EPAG-behandelten PDX beobachtet werden (**Abbildung 14D, 43B, 39B+C, 43O+P**). Dieser Umstand hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die durchschnittliche Stabilität der klonalen Zusammensetzung, wie der Vergleich der mittleren Delta-VAF zwischen den entsprechenden EPAG- und Vehikel-Gruppen der Patienten zeigte (**Abbildung 39A+B, 43F+Q+X**). Eine Ausnahme bildete Patient P03, dessen vehikelbehandelte PDX eine signifikant höhere mittleren Delta-VAF besaßen als deren mit EPAG behandelten Pendanten (**Abbildung 43F**). Insgesamt konnte dadurch gezeigt werden, dass die beobachtete klonale Evolution in den PDX nicht im Zusammenhang mit der EPAG-Behandlung stand.

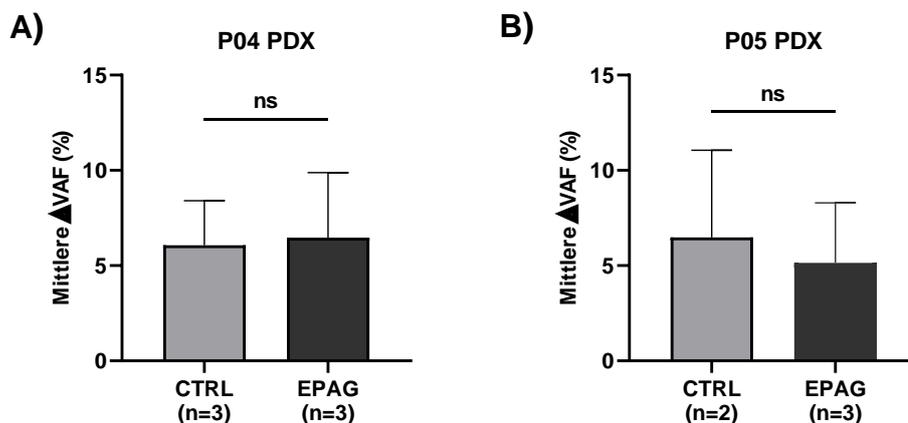


Abbildung 39: Vergleich der mittleren Delta-VAF der PDX von Patient P04 und P05 (Schmitt et al. 2022). Vergleich der mittleren Delta-Varianzallelfrequenz (Δ VAF) zwischen den $n = 2$ bzw. $n = 3$ mit Vehikel (CTRL, hellgrau) behandelten patientenabgeleiteten Xenograft (PDX) und den mit Eltrombopag (EPAG, dunkelgrau) behandelten PDX von Patient P04 (A) (links) und P05 (B) (rechts). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden mittels zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben analysiert. Die Vergleiche der PDX von Patient P03, P08 und P09 sind in **Abbildung 43 F, Q**) und **X**) einzusehen. ns, nicht signifikant

Auch Patient P07 diente in diesem Zusammenhang als wichtiges Fallbeispiel. Für diesen Patienten stand DNA primärer CD34+ Zellen von zwei aufeinanderfolgenden klinischen Zeitpunkten zur Verfügung sowie serielle DNA-Proben von humanen CD45+ Zellen eines einzelnen PDX (EPAG2), das mit EPAG behandelt wurde. In der initialen Patientenprobe konnten fünf verschiedene Klone identifiziert werden, die durch zehn verschiedene MDS-typische Mutationen definiert wurden (**Abbildung 40A**). Über einen Zeitraum von zehn Monaten trat bei diesem Patienten eine natürliche klonale Evolution auf, in deren Verlauf der mittlere Klon, charakterisiert durch eine *WT1*- und *BCOR*-Mutation, durch einen neuen Klon mit zwei zusätzlichen *CBL*-Mutationen und einer *ETV6*-Mutation verdrängt wurde. Interessanterweise wurde diese Veränderung der klonalen Zusammensetzung in dem entsprechenden EPAG-behandelten PDX innerhalb eines Zeitraums von nur 18 Wochen nahezu identisch reproduziert (**Abbildung 40B**). Dies bestätigte zum einen, dass unser MDS-PDX-Modell den Verlauf einer natürlichen klonalen Evolution originalgetreu abbilden kann und zum anderen, dass dieser klonale Progress nicht durch die Behandlung mit EPAG induziert wurde.

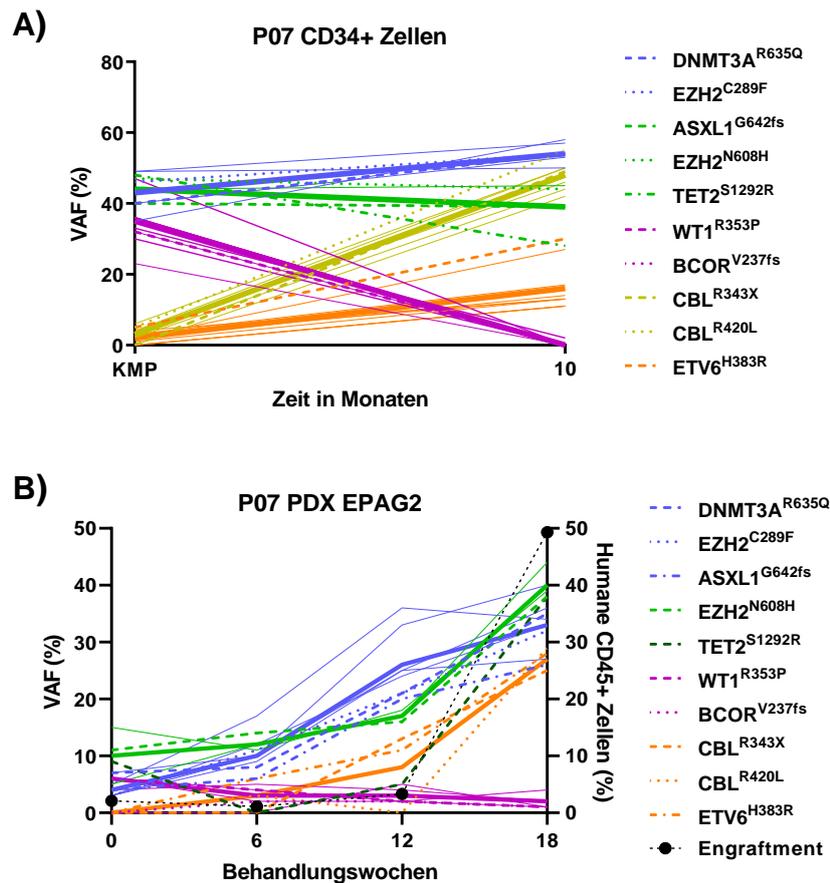


Abbildung 40: Klonale Knochenmarkszusammensetzung von Patient P07 und dessen PDX (Schmitt et al. 2022). Ergebnisse der Gesamt-Exom-Sequenzierung der DNA der CD34+ Zellen zwei aufeinanderfolgenden klinischen Zeitpunkten aus dem Knochenmark von Patient P05 (A) und dessen mit Eltrombopag (EPAG) behandelten patientenabgeleiteten Xenograft (PDX) EPAG2 (B). Die Patientenproben stammen von der Knochenmarkpunktion (KMP) aus der das Transplantat für das PDX gewonnen wurde und einer 10 Monate späteren KMP. Das PDX wurde mit 50 mg/kg EPAG behandelt. Sequenziert wurden die humanen CD45+ Zellen aus dem PDX-Knochenmark der Woche 0, 6, 12 und 18. Dargestellt ist die Varianzallelfrequenz (VAF) der Mutationen (linke Y-Achse). „Mutationscluster“ wurden mittels des bioinformatischen Tools SciClone berechnet. Wiederkehrende Klone in A) und B) sind in derselben Farbe dargestellt. Dicke Linien stellen den Mittelwert des jeweiligen Klons dar. Die durch die Mutationen erfolgten Aminosäureaustausche werden für die jeweilige Mutation als hochgestellte Kodierung angezeigt. Die schwarze gestrichelte Linie in B) beschreibt das Engraftment im PDX (rechte Y-Achse).

4 DISKUSSION

Der TPO-Rezeptor-Agonist EPAG ist bereits als Therapeutikum für die immun-idiopathische thrombozytopenische Purpura und Hepatitis-C-Virus-Infektionen mit begleitender Thrombozytopenie sowie die schwere aplastische Anämie zugelassen. Obwohl mehrere klinische Studien die Wirksamkeit und Sicherheit von EPAG als Monotherapie sowohl bei Niedrigrisiko- als auch Hochrisiko-MDS-Patienten bestätigt haben (Platzbecker et al., 2015; Oliva et al., 2017; Mittelman et al., 2018; Vicente et al., 2020; Comont et al., 2021), konnten Bedenken hinsichtlich einer möglichen Förderung des Krankheitsverlaufs in MDS durch EPAG nicht gänzlich ausgeräumt werden. Dies ist zum einen auf die intrinsischen Eigenschaften von MDS als klinisch und molekular sehr heterogene Gruppe von Knochenmarkerkrankung zurückzuführen; zum anderen auf die Grenzen klinischer Studien am Menschen, bei denen Verum und Placebo nicht an ein und demselben Patienten getestet werden können und im Falle von MDS somit beispielsweise krankheitsbedingte und therapieinduzierte Progression der Erkrankung nicht eindeutig differenziert werden können. Eine randomisierte klinische Studie mit dem TPO-Rezeptor-Agonisten Romiplostim als Monotherapie bei MDS-Patienten mit niedriger bis mittlerer IPSS-R-Risikoprognose wurde aufgrund ebenfalls bestehender Bedenken hinsichtlich einer Erhöhung der Anzahl an Blasten im Knochenmark und der Transformationsraten in der mit Romiplostim behandelten Studiengruppe vorzeitig beendet (Giagounidis et al., 2014). Der Verdacht einer durch Romiplostim vermehrt induzierten Progression oder Transformation in eine sAML in den MDS-Patienten konnte schließlich durch eine Langzeit-Follow-up-Studie ausgeräumt werden (Kantarjian et al., 2018). Aus diesem Grund stellen PDX-Modelle einen vielversprechenden Ansatz zur Förderung und Verbesserung der personalisierten Medizin dar (Clohessy und Pandolfi, 2018). Durch die Erstellung mehrerer Replikate der Erkrankung eines Patienten in Form von PDX und die Möglichkeit dadurch potentiell neue therapeutische Substanzen patientenindividuell zu testen, bieten diese Plattformen einzigartige Vorteile (Côme et al., 2020).

Während sich MDS-PDX-Modelle als „*proof of principle*“ bereits etabliert haben, werden sie noch nicht als systematischer Ansatz zur präklinischen Evaluierung von Therapeutika in MDS eingesetzt. Obwohl bereits in einigen Studien Chemotherapeutika, Antikörper und verschiedene Inhibitoren mittels MDS-PDX getestet wurden, waren diese eher von geringem Umfang, restringiert durch niedrige Patienten- und/oder PDX-Zahlen, kurze Behandlungsdauern oder das teilweise Fehlen von Vehikelkontrollen (Stevens et al., 2018; Shastri et al., 2018; Meunier et al., 2018; Smith et al., 2019; Pang et al., 2019; Song et al., 2019). In der hier beschriebenen Studie haben wir eine systematische, präklinische Evaluierung von EPAG hinsichtlich seiner Wirksamkeit und seines Einflusses auf die klonale Knochenmarkzusammensetzung bei $n = 49$ PDX, generiert aus Proben von insgesamt $n = 9$ MDS-Patienten mit einer mittleren bis schweren Thrombozytopenie, durchgeführt. Durch die Herstellung mehrerer PDX von jedem Patienten und deren Einteilung in zwei Gruppen, die entweder mit EPAG oder Vehikel behandelt wurden, konnten krankheitsbedingte und therapieinduzierte Effekte voneinander unterschieden werden. Mittels durchflusszytometrischer Analysen und Ganz-Exom-Sequenzierung wurden klinische Parameter wie die Anzahl der menschlichen Thrombozyten und die molekulare, klonale Knochenmarkzusammensetzung mit hoher Zuverlässigkeit *in vivo* während des gesamten Behandlungszeitraums verfolgt. Eine Behandlungsdauer von bis zu 24 Wochen ermöglichte mehrere molekulare Follow-ups, die zur Nachverfolgung der klonalen Entwicklung notwendig waren. Da in

den PDX selbst hohe humane Chimärismusraten von über 90 % den allgemeinen Gesundheitszustand der Mäuse nicht beeinträchtigten, sind theoretisch auch länger andauernde Experimente für zukünftige Studien realisierbar.

EPAG erwies sich in allen behandelten PDX von insgesamt $n = 5$ MDS-Patienten als wirksam, während in $n = 3$ Fällen alle PDX Non-Responder waren. Der Fall von Patient P08 zeigte ein heterogenes Ansprechen auf EPAG, da nur eines der $n = 3$ mit EPAG behandelten PDX einen Anstieg der humanen Thrombozyten aufwies. Dies entspricht einer Gesamtansprechrate von 56 %. In klinischen Studien am Menschen lag die Wirksamkeit von EPAG bei 44-77 % für Niedrigrisiko- und bei 24-28 % für Hochrisiko-MDS-Patienten (Platzbecker et al., 2015; Oliva et al., 2017; Mittelman et al., 2018; Vicente et al., 2020; Comont et al., 2021). Demnach lässt sich bei Fällen mit Hochrisiko-MDS ein insgesamt schlechteres Ansprechen verzeichnen. Dies wurde ebenfalls in einer Metaanalyse der bis dato publizierten klinischen Studien zu EPAG in MDS-Patienten bestätigt (Meng et al., 2020). Auch in unserer präklinischen Studie gehörten von den $n = 3$ Non-Respondern basierend auf der Prognoseeinstufung nach IPSS-R $n = 1$ Patient der Gruppe des intermediären und $n = 2$ Patienten des sehr hohen Risikos an. Die Spezifität des Ansprechens auf EPAG in den PDX wurde durch die Tatsache bestätigt, dass in den PDX von Patient P04 trotz einer 12-wöchigen Behandlung mit einer Dosis von zunächst 50 mg/kg EPAG erst nach einer Dosissteigerung auf 150 mg/kg ein Anstieg der humanen Thrombozyten festgestellt werden konnte. Bemerkenswert ist, dass Patient P07 einige Zeit nach der Entnahme der Knochenmarkprobe, aus der die Zellen zur Generierung der PDX gewonnen wurden, und der zehn Monate darauffolgenden Follow-up-Probe zur Behandlung der bestehenden Thrombozytopenie klinisch mit EPAG therapiert wurde. Allerdings wurde die Behandlung nach einer Zeit abgebrochen, da ebenso wie in den PDX von Patient P07 auch im realen Patienten kein Ansprechen auf EPAG festgestellt werden konnte. In diesem konkreten Fall konnte unser präklinisches MDS-PDX-Modell demnach den klinischen Verlauf, genauer das Nicht-Ansprechen auf EPAG, dieses Patienten korrekt voraussagen.

Der Umfang der Kohorte dieser Studie war zu gering, um statistisch signifikante, prädiktive klinische und molekulare Marker für das (Nicht-)Ansprechen auf EPAG zu bestimmen. Nichtsdestotrotz waren interessanterweise beide *TP53*-mutierten MDS-Patienten Non-Responder und besaßen gemäß IPSS-R eine sehr hohe Risikoprognose. Dies könnte darauf hinweisen, dass ein Ansprechen auf die Behandlung mit EPAG nicht nur abhängig von der Risikoprognose des jeweiligen MDS-Patienten ist, sondern womöglich auch von dessen *TP53*-Mutationstatus. In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass *TP53*-Mutationen sich zunehmend als die wichtigsten Kandidaten für eine besonders ungünstige Prognose bei MDS-Patienten hervortun (Takahashi et al., 2016; Stengel et al., 2017; de Jesus dos Santos et al., 2019; Haase et al., 2019). Obwohl bisher nur wenige Daten dazu existieren, gibt es zudem Hinweise darauf, dass *TP53*-Mutationen die Induktion von Genen, die mit der Megakaryopoese assoziiert sind, beeinträchtigen, sowie die durch Lenalidomid induzierte Differenzierung von Megakaryozyten stört und schlussendlich zu einer Lenalidomidresistenz führt (Martinez-Høyer et al., 2020). Leider wurde nur in einer der bisher durchgeführten EPAG-Studien in MDS eine Panel-Sequenzierung der Patienten zur Bestimmung von MDS-assoziierten Mutationen durchgeführt (Vicente et al., 2020). Jedoch besaß keiner der $n = 29$ in dieser Studie inkludierten und sequenzierten Probanden eine *TP53*-Mutation.

Die wichtigste zu beantwortende Frage war, ob die Behandlung mit EPAG womöglich einen Progress oder eine Transformation in eine sAML der Erkrankung fördert. Die Untersuchung von Knochenmarksausstrichen der PDX zeigte weder in den EPAG- noch in den vehikelbehandelten PDX-Gruppen eine erhöhte Anzahl von myeloischen

Blasten oder sonstige Anzeichen einer morphologischen Transformation. Darüber hinaus erbrachte die durchflusszytometrische Analyse des PDX-Knochenmarks keinen Nachweis eines signifikanten Unterschieds zwischen den beiden Behandlungsgruppen bezüglich des Prozentsatzes des humanen Chimärismus während des gesamten Behandlungsverlaufs oder des Prozentsatzes der humanen CD45+CD33+ sowie humanen CD45+CD34+ Zellen zum Endpunkt. Abschließend wurde eine umfassende molekulare Analyse mittels Gesamt-Exom-Sequenzierung der aus den sortierten, humanen CD45+ Knochenmarkszellen gewonnenen DNA von seriellen Zeitpunkten durchgeführt. Dabei konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass es bei den EPAG-behandelten MDS-PDX im Vergleich zu den vehikelbehandelten Kontrollen keinen Hinweis auf ein höheres Risiko einer klonalen Evolution gab. Im Gegensatz dazu war beim Vergleich der genetischen Plastizität, beschrieben durch die mittlere Delta-VAF, diese bei den mit EPAG behandelten PDX tendenziell niedriger. In Einzelfällen konnten dynamische, teilweise transiente, klonale Veränderungen z.B. durch das Auftreten neuer molekularer Läsionen in $n = 4$ (17 %) der vehikel- und $n = 2$ (8 %) der EPAG-behandelten PDX festgestellt werden. Diese Daten dienen als Beweis, dass der für diese Arbeit gewählte experimentelle Zeitraum von 18-24 Wochen ausreichend ist, damit eine klonale Expansion und/oder Verdrängung in den PDX stattfinden und somit eine durch die Behandlung einer Substanz potenziell induzierte klonale Veränderung festgestellt werden kann.

In-vitro- und In-vivo-Xenotransplantationsstudien, in denen Leukämiezelllinien und primäre MDS- und AML-Patientenproben mit EPAG behandelt wurden, konnten eine erhöhte megakaryozytäre Differenzierung und Koloniebildung der Knochenmarkszellen sowie eine zusätzliche antileukämische Wirkung EPAGs, die durch eine gehemmte Proliferation und erhöhte Differenzierung gekennzeichnet war (Will et al., 2009; Erickson-Miller et al., 2010; Roth et al., 2012), nachweisen. Die hier beschriebene Arbeit konnte keine Hinweise auf eine mögliche antileukämische Wirkung EPAGs aufzeigen. Der Anteil der humanen CD45+CD33+ sowie humanen CD45+CD34+ Zellen zum Endpunkt, die ebenfalls ein Maß für die Proliferation und Differenzierung der Knochenmarkszellen darstellen, unterschied sich in beiden PDX-Behandlungsgruppen nicht signifikant, wie zuvor bereits erwähnt.

Bei Studien zu EPAG als Monotherapie in Patienten mit refraktärer schwerer aplastischen Anämie ohne Kontrollgruppe wurde in den Patientenkohorten eine erhöhte Rate klonaler Evolution festgestellt (Olmes et al., 2012; Desmond et al., 2014) im Vergleich zur historischen Vergleichskohorte (Ogawa, 2016). Vor diesem Hintergrund scheint es bemerkenswert, dass in der hier vorgestellten Studie selbst in PDX, die aus Knochenmarkmaterial von MDS-Patienten mit sehr hoher IPSS-R-Risikoprognose oder den bereits diskutierten prognostisch ebenfalls sehr ungünstigen *TP53*-Mutationen, kein Nachweis eines Progresses, einer Transformation oder klonalen Evolution erbracht wurde. Dies untermauert erneut die Ergebnisse der klinischen Studien von EPAG in MDS-Patienten, die keine erhöhten Progressions- oder Transformationsraten in der mit EPAG behandelten Studiengruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe feststellen konnten (Platzbecker et al., 2015; Oliva et al., 2017; Mittelman et al., 2018; Vicente et al., 2020; Comont et al., 2021).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass unser MDS-PDX-Modell genutzt werden kann, um potentielle Therapeutika für MDS-Patienten präklinisch zu testen. Ein entscheidender Vorteil gegenüber klinischen Studien am Menschen ist, dass dies die Möglichkeit eröffnet, die Wirksamkeit und Sicherheit einer Substanz in vehikelkontrollierten Experimenten an primären Knochenmarksproben desselben MDS-Patienten *in vivo* zu untersuchen. Dabei können wichtige klinische Parameter,

insbesondere die klonale Zusammensetzung des humanen Knochenmarks zuverlässig und über einen Zeitraum von mindestens 24 Wochen in unserem MDS-PDX-Modell nachverfolgt werden. Im Falle von EPAG konnte mit Hilfe unseres PDX-Modell gezeigt werden, dass der TPO-Rezeptor-Agonist in der Lage war sowohl die humane Thrombo- als auch Megakaryopoese in einem Teil der MDS-Patienten erfolgreich zu stimulieren. Aufgrund der kleinen Kohortengröße der Studie konnten keine prädiktiven klinischen und molekularen Marker für ein (Nicht-)Ansprechen auf EPAG identifiziert werden. Nichtsdestotrotz könnte es von Interesse sein den Zusammenhang zwischen dem Nicht-Ansprechen auf EPAG und Mutationen im *TP53*-Gen weiterzuverfolgen, optimaler Weise im Rahmen einer klinischen Studie. Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Studie ein Einfluss EPAGs auf den Krankheitsprogress, die Transformation in eine sAML, sowie die klonale Evolution ausgeschlossen werden. Antileukämische Effekte von EPAG, die bereits in einigen In-vitro- und In-vivo-Studien demonstriert wurden, konnten in der hier beschriebenen Studie allerdings nicht beobachtet werden. Somit konnten die Ergebnisse dieser Arbeit nicht nur die Wirksamkeit in MDS-Patienten bestätigen, sondern darüber hinaus auch weitere Informationen in Bezug auf die Sicherheit von EPAG in MDS liefern. Diese zusätzliche Bestätigung der Anwendungssicherheit von EPAG in MDS-Patienten sollte zukünftige Studien ermutigen, EPAG in Kombination mit anderen Substanzen zu testen, die die Hämatopoese fördern oder die Regenerierung des Knochenmarks nach einer zytotoxischen Behandlung unterstützen. Beispielsweise könnte die Kombination von EPAG mit der erythropoesestimulierenden Substanz Luspatercept, deren Wirkung bereits in klinischen Studien an Niedrigrisiko-MDS-Patienten demonstriert werden konnte (Platzbecker et al., 2017; Fenaux et al., 2020), möglicherweise eine synergistische Wirkung bei panzytopenen MDS-Patienten, die unter einer Thrombozytopenie sowie Anämie leiden, erzielen. Abschließend lassen die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zu der Erkenntnis kommen, dass es in Zukunft sinnvoll sein könnte, klinische Studien am Menschen mit präklinischen Substanztests in PDX-Modellen, wie es hier am Beispiel von EPAG demonstriert wurde, zu begleiten und voranzutreiben.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine heterogene Gruppe klonaler hämatopoetischer Stammzellerkrankungen des Knochenmarks, die durch eine ineffektive Hämatopoese gekennzeichnet sind. Diese zeichnet sich unter anderem durch Zytopenien im peripheren Blut sowie einer Prädisposition für die Transformation in eine akute myeloische Leukämie aus. Die Thrombozytopenie stellt dabei eine häufige Komplikation bei Patienten mit MDS dar. Um Blutungsereignisse zu verhindern, sind viele thrombozytopen MDS-Patienten auf Thrombozytentransfusionen angewiesen, die zwar eine kurzfristige therapeutische Linderung bieten, aber mit erheblichen klinischen Risiken wie einer Alloimmunisierung oder transfusionsbedingten Reaktionen verbunden sind. Diesbezüglich standen Thrombopoetin-Rezeptor-Agonisten wie Eltrombopag (EPAG) als alternative Behandlungsoption thrombozytopen MDS-Patienten bereits im Fokus klinischer Studien. Trotz vielversprechender Ergebnisse existieren allerdings bis heute Vorbehalte, dass diese wachstumsrezeptor-stimulierenden Substanzen die Krankheitsprogression in MDS-Patienten fördern könnten.

Diese Vorbehalte gründen auf den Ergebnissen einer klinischen Studie eines anderen Thrombopoetin-Rezeptor-Agonisten (Romiplostim) an MDS-Patienten, in der es zu einem transienten Anstieg von leukämischen Blasten im Blut von Patienten kam, was zu ihrem vorzeitigen Abbruch führte. In einer Follow-up-Studie konnte der Verdacht der Progressionsförderung weitestgehend entkräftet werden. Dennoch ist dieser Fall ein Beispiel für das grundlegende Problem, dass es aufgrund der Heterogenität von MDS bei der Durchführung klinischer Studien schwierig sein kann, eindeutig zwischen substanzinduzierten Effekten und dem natürlichen Krankheitsverlauf als Ursache eines Progresses zu unterscheiden. Ein möglicher Lösungsansatz für dieses entscheidende Problem stellen ergänzende präklinische Versuche mit primären MDS-Patientenzellen dar. In diesem Zusammenhang ist es unserer Arbeitsgruppe gelungen, ein patientenabgeleitetes Xenograft (PDX)-Modell für MDS zu etablieren. Die hier dargestellte Arbeit demonstriert zum ersten Mal, dass dieses MDS-PDX-Modell als präklinische Plattform nutzbar ist, um aktuelle klinische Fragestellungen zu beantworten.

Dazu wurde die Wirksamkeit und Sicherheit des Thrombopoietin-Rezeptor-Agonisten EPAG in unserem MDS-PDX-Modell untersucht. Diese präklinische Studie umfasste $n = 49$ PDX, die aus $n = 9$ MDS-Patientenproben generiert wurden. Mittels Durchflusszytometrie und Gesamt-Exom-Sequenzierung konnten klinische Parameter wie die Anzahl der humanen Thrombozyten im peripheren Blut und die molekulare klonale Zusammensetzung der humanen Knochenmarkzellen in den PDX mit hoher Zuverlässigkeit über eine Behandlungsdauer von 18-24 Wochen beobachtet werden. Im Gegensatz zu klinischen Studien am Menschen erlaubte dieser Versuchsaufbau vehikelkontrollierte Experimente in Replikaten auf patientenindividueller Ebene sowie die Differenzierung von substanzspezifischen Effekten und natürlichem Krankheitsverlauf. Es konnte gezeigt werden, dass EPAG die humane Thrombopoese in MDS-PDX wirksam stimulierte, ohne die klonale Zusammensetzung der Patientenproben nachteilig zu beeinflussen. Dies erbrachte den Beweis, dass unser MDS-PDX-Modell ein nützliches Werkzeug zur Durchführung patientenindividueller und vehikelkontrollierter Tests von Therapeutika zur Behandlung von MDS in Ergänzung zu klinischen Studien darstellt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abarrategi, A. *et al.* Versatile humanized niche model enables study of normal and malignant human hematopoiesis. *J Clin Invest* **127**, 543–548 (2017).

Alexander, W. S., Maurer, A. B., Novak, U. & Harrison-Smith, M. Tyrosine-599 of the c-Mpl receptor is required for Shc phosphorylation and the induction of cellular differentiation. *The EMBO Journal* **15**, 6531–6540 (1996).

Allampallam, K. *et al.* Biological Significance of Proliferation, Apoptosis, Cytokines, and Monocyte/Macrophage Cells in Bone Marrow Biopsies of 145 Patients With Myelodysplastic Syndrome. *Int J Hematol* **75**, 289–297 (2002).

Al-Samkari, H. & Kuter, D. J. Thrombopoietin level predicts response to treatment with eltrombopag and romiplostim in immune thrombocytopenia. *Am J Hematol* **93**, 1501–1508 (2018).

Altrock, E. *et al.* Humanized three-dimensional scaffold xenotransplantation models for myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol* **107**, 38–50 (2022).

Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).

Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Beauchamp, G. K. & Tordoff, M. G. Food Intake, Water Intake, and Drinking Spout Side Preference of 28 Mouse Strains. *Behavior Genetics* **32**, 435–443 (2002).

Bacon, C. M. *et al.* Thrombopoietin (TPO) induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT5 and STAT3. *FEBS Journal* **370**, 63–68 (1995).

Basser, R. L. *et al.* Development of pancytopenia with neutralizing antibodies to thrombopoietin after multicycle chemotherapy supported by megakaryocyte growth and development factor. *Blood* **99**, 2599–2602 (2002).

Beau, M. M. L. *et al.* Clinical and Cytogenetic Correlations in 63 Patients With Therapy-Related Myelodysplastic Syndromes and Acute Nonlymphocytic Leukemia: Further Evidence for Characteristic Abnormalities of Chromosomes No. 5 and 7. *Journal of Clinical Oncology* **3**, 325–345 (1986).

Bejar, R. *et al.* Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *New England Journal of Medicine* **364**, 2496–2506 (2011).

Bhat, F. A. *et al.* A network map of thrombopoietin signaling. *J Cell Commun Signal* **12**, 737–743 (2018).

Bianco, J. E. R. *et al.* Characterization of a novel decellularized bone marrow scaffold as an inductive environment for hematopoietic stem cells. *Biomater Sci-uk* **7**, 1516–1528 (2019).

Binder, T., Diem, H., Fuchs, R., Gutensohn, K. & Nebe, T. Pappenheim-Färbung: Beschreibung einer hämatologischen Standardfärbung – Geschichte, Chemie, Durchführung, Artefakte und Problemlösungen/Pappenheim Stain: Description of a hematological standard stain – history, chemistry, procedure, artifacts and problem solutions. *Laboratoriumsmedizin* **36**, 293–309 (2012).

Blanco, T. M., Mantalaris, A., Bismarck, A. & Panoskaltzis, N. The development of a three-dimensional scaffold for ex vivo biomimicry of human acute myeloid leukaemia. *Biomaterials* **31**, 2243–2251 (2010).

Bourgeois, E. *et al.* Role of splenectomy in the treatment of myelodysplastic syndromes with peripheral thrombocytopenia: a report on six cases. *Leukemia* **15**, 950–953 (2001).

- Bouscary, D. *et al.* c-mpl Expression in Hematologic Disorders. *Leukemia Lymphoma* **17**, 19–26 (1995).
- Bussel, J. B. *et al.* Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Cochrane Central Register Control Trials Central* **2008**, (2007).
- Cazzola, M. Myelodysplastic Syndromes. *New England Journal of Medicine* **14**, 1358–1374 (2020).
- Chevaleyre, J. *et al.* Busulfan Administration Flexibility Increases the Applicability of Scid Repopulating Cell Assay in NSG Mouse Model. *Plos One* **8**, e74361 (2013).
- Clohessy, J. G. & Pandolfi, P. P. The Mouse Hospital and Its Integration in Ultra-Precision Approaches to Cancer Care. *Frontiers Oncol* **8**, 340 (2018).
- Côme, C., Balhuizen, A., Bonnet, D. & Porse, B. T. Myelodysplastic syndrome patient-derived xenografts: from no options to many. *Haematologica* **105**, 864–869 (2020).
- Comont, T. *et al.* Eltrombopag for myelodysplastic syndromes or chronic myelomonocytic leukaemia with no excess blasts and thrombocytopenia: a French multicentre retrospective real-life study. *Brit J Haematol* **194**, 336–343 (2021).
- Corazza, F. *et al.* Circulating thrombopoietin as an in vivo growth factor for blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood* **107**, 2525–2530 (2006).
- Debili, N. *et al.* The Mpl Receptor Is Expressed in the Megakaryocytic Lineage From Late Progenitors to Platelets. *Blood* **85**, 391–401 (1995).
- Desmond, R. *et al.* Eltrombopag restores trilineage hematopoiesis in refractory severe aplastic anemia that can be sustained on discontinuation of drug. *Blood* **123**, 1818–1825 (2014).
- Drachman, J. G. & Kaushansky, K. Dissecting the thrombopoietin receptor: Functional elements of the Mpl cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2350–2355 (1997).
- Drexler, H. G., Dirks, W. G. & MacLeod, R. A. F. Many are called MDS cell lines: One is chosen. *Leukemia Res* **33**, 1011–1016 (2009).
- Duffy, K. J. & Erickson-Miller, C. L. 13 - The Discovery of Eltrombopag, an Orally Bioavailable TpoR Agonist. *Iii Validating Targets Small Mol Approaches* 241–254 (2007) doi:10.1016/b978-012369393-8/50014-6.
- Elvarsdóttir, E. M. *et al.* A three-dimensional in vitro model of erythropoiesis recapitulates erythroid failure in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **34**, 271–282 (2020).
- Elzaem, D. I. *et al.* Comparative study of IgG binding to megakaryocytes in immune and myelodysplastic thrombocytopenic patients. *Ann Hematol* **100**, 1701–1709 (2021).
- Erhardt, J. A. *et al.* Comparative analyses of the small molecule thrombopoietin receptor agonist eltrombopag and thrombopoietin on in vitro platelet function. *Exp Hematol* **37**, 1030–1037 (2009).
- Erickson-Miller, C. L. *et al.* Discovery and characterization of a selective, nonpeptidyl thrombopoietin receptor agonist. *Exp Hematol* **33**, 85–93 (2005).
- Erickson-Miller, C. L. *et al.* Preclinical Activity of Eltrombopag (SB-497115), an Oral, Non-peptide Thrombopoietin Receptor Agonist. *Stem Cells Dayt Ohio* **27**, 424–430 (2009).
- Erickson-Miller, C. L. *et al.* Reduced proliferation of non-megakaryocytic acute myelogenous leukemia and other leukemia and lymphoma cell lines in response to eltrombopag. *Leukemia Res* **34**, 1224–1231 (2010).
- European Medicines Agency: 15/12/2021 Revolade - EMEA/H/C/001110 - IB/0066/G, https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/revolade-epar-product-information_de.pdf (Stand: 19.10.2022)

- Favero, F. *et al.* Sequenza: allele-specific copy number and mutation profiles from tumor sequencing data. *Ann Oncol* **26**, 64–70 (2015).
- Fenaux, P. *et al.* A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood* **118**, 3765–3776 (2011).
- Fenaux, P. *et al.* Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* **10**, 223–232 (2009).
- Fenaux, P. *et al.* Luspatercept in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. *New Engl J Med* **382**, 140–151 (2020).
- Ferreira, M. S. V. *et al.* Cord blood-hematopoietic stem cell expansion in 3D fibrin scaffolds with stromal support. *Biomaterials* **33**, 6987–6997 (2012).
- Fichelson, S. *et al.* Megakaryocyte Growth and Development Factor-Induced Proliferation and Differentiation Are Regulated by the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Primitive Cord Blood Hematopoietic Progenitors. *Blood* **94**, 1601–1613 (1999).
- Fontenay-Roupie, M. *et al.* Analysis of megakaryocyte growth and development factor (thrombopoietin) effects on blast cell and megakaryocyte growth in myelodysplasia. *Leukemia Res* **22**, 527–535 (1998).
- Fox, N., Priestley, G., Papayannopoulou, T. & Kaushansky, K. Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation. *J Clin Invest* **110**, 389–394 (2002).
- Geddis, A. E., Fox, N. E. & Kaushansky, K. Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Necessary but Not Sufficient for Thrombopoietin-induced Proliferation in Engineered Mpl-bearing Cell Lines as Well as in Primary Megakaryocytic Progenitors*. *J Biol Chem* **276**, 34473–34479 (2001).
- Genovese, G. *et al.* Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *New Engl J Medicine* **371**, 2477–2487 (2014).
- George, J. N. *et al.* Improved quality of life for romiplostim-treated patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: results from two randomized, placebo-controlled trials. *Brit J Haematol* **144**, 409–415 (2009).
- Germing, U. *et al.* No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **89**, 905–10 (2004).
- Giagounidis, A. *et al.* Results of a randomized, double-blind study of romiplostim versus placebo in patients with low/intermediate-1-risk myelodysplastic syndrome and thrombocytopenia. *Cancer* **120**, 1838–1846 (2014).
- Gilli, S. C. O., Medina, S. de S., Castro, V. de, Fernandes, L. G. R. & Saad, S. T. O. Platelet associated IgG may be related with thrombocytopenia in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Res* **36**, 554–559 (2012).
- Gonzalez-Porras, J. R. *et al.* Prognostic impact of severe thrombocytopenia in low-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer* **117**, 5529–5537 (2011).
- Greenberg, P. L. *et al.* International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood* **89**, 2079–2088 (1997).
- Greenberg, P. L. *et al.* Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood* **120**, 2454–2465 (2012).
- Greenberg, P. L., Young, N. S. & Gattermann, N. Myelodysplastic Syndromes. *Hematology* **2002**, 136–161 (2002).

- Gupta, P., LeRoy, S. C., Luikart, S. D., Bateman, A. & Morrison, V. A. Long-term blood product transfusion support for patients with myelodysplastic syndromes (MDS): cost analysis and complications. *Leukemia Res* **23**, 953–959 (1999).
- Haase, D. *et al.* New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* **13**, 4385–4395 (2017).
- Haase, D. *et al.* TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia* **33**, 1747–1758 (2019).
- Haferlach, T. *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **28**, 241–247 (2014).
- Hayakawa, J., Hsieh, M. M., Uchida, N., Phang, O. & Tisdale, J. F. Busulfan Produces Efficient Human Cell Engraftment in NOD/LtSz-Scid IL2RyNull Mice. *Stem Cells* **27**, 175–182 (2009).
- Hofmann, W.-K. *et al.* Defective Megakaryocytic Development in Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia Lymphoma* **38**, 13–19 (2000).
- Hofmann, W. K., Müller-Tidow, C. *et al.* Myeloische Neoplasien. De Gruyter (2020).
- Houwerzijl, E. J. *et al.* Increased peripheral platelet destruction and caspase-3-independent programmed cell death of bone marrow megakaryocytes in myelodysplastic patients. *Blood* **105**, 3472–3479 (2005).
- Houwerzijl, E. J., Blom, N. R., Want, J. J. L. van der, Vellenga, E. & Wolf, J. T. M. de. Megakaryocytic dysfunction in myelodysplastic syndromes and idiopathic thrombocytopenic purpura is in part due to different forms of cell death. *Leukemia* **20**, 1937–1942 (2006).
- Jaiswal, S. *et al.* Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *New Engl J Medicine* **371**, 2488–2498 (2014).
- Jing, D. *et al.* Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells - modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica* **95**, 542–550 (2010).
- Jo, S.-Y., Kim, E. & Kim, S. Impact of mouse contamination in genomic profiling of patient-derived models and best practice for robust analysis. *Genome Biol* **20**, 231 (2019).
- Kalina, U. *et al.* Alteration of c-mpl-mediated signal transduction in CD34+ cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol* **28**, 1158–1163 (2000).
- Kantarjian, H. M. *et al.* Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes. *Cancer* **106**, 1794–1803 (2006).
- Kantarjian, H. M. *et al.* The incidence and impact of thrombocytopenia in myelodysplastic syndromes. *Cancer* **109**, 1705–1714 (2007).
- Kantarjian, H. M. *et al.* Long-term follow-up for up to 5 years on the risk of leukaemic progression in thrombocytopenic patients with lower-risk myelodysplastic syndromes treated with romiplostim or placebo in a randomised double-blind trial. *Lancet Haematol* **5**, e117–e126 (2018).
- Kao, Y.-R. *et al.* Thrombopoietin receptor-independent stimulation of hematopoietic stem cells by eltrombopag. *Sci Transl Med* **10**, (2018).
- Kaushansky, K. *et al.* Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* **369**, 568–571 (1994).
- Kida, J. *et al.* An MDS-derived cell line and a series of its sublines serve as an in vitro model for the leukemic evolution of MDS. *Leukemia* **32**, 1846–1850 (2018).
- Kim, M.-J. *et al.* NMR Structural Studies of Interactions of a Small, Nonpeptidyl Tpo Mimic with the Thrombopoietin Receptor Extracellular Juxtamembrane and Transmembrane Domains*. *J Biol Chem* **282**, 14253–14261 (2007).

- Kizaki, M., Miyakawa, Y. & Ikeda, Y. Long-term administration of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor dramatically improved cytopenias in a patient with myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology* **122**, 764–767 (2003).
- Kobayashi, M., Laver, J. H., Kato, T., Miyazaki, H. & Ogawa, M. Thrombopoietin Supports Proliferation of Human Primitive Hematopoietic Cells in Synergy With Steel Factor and/or Interleukin-3. *Blood* **88**, 429–436 (1996).
- Koressaar, T. & Remm, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23**, 1289–1291 (2007).
- Koressaar, T. *et al.* Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics* **34**, 1937–1938 (2018).
- Kuter, D. J. & Begley, C. G. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood* **100**, 3457–3469 (2002).
- Kuter, D. J. & Rosenberg, R. D. The Reciprocal Relationship of Thrombopoietin (c-Mpl Ligand) to Changes in the Platelet Mass During Busulfan-Induced Thrombocytopenia in the Rabbit. *Blood* **85**, 2720–273 (1995).
- Kuter, D. J. *et al.* Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* **371**, 395–403 (2008).
- Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645–648 (1994).
- Lappalainen, I. *et al.* The European Genome-phenome Archive of human data consented for biomedical research. *Nat Genet* **47**, 692–695 (2015).
- Leisten, I. *et al.* 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. *Biomaterials* **33**, 1736–1747 (2012).
- Li, J. *et al.* Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood* **98**, (2001).
- List, A. *et al.* Lenalidomide in the Myelodysplastic Syndrome with Chromosome 5q Deletion. *New Engl J Medicine* **355**, 1456–1465 (2006).
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_T$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
- Lübbert, M. *et al.* Low-Dose Decitabine Versus Best Supportive Care in Elderly Patients With Intermediate- or High-Risk Myelodysplastic Syndrome (MDS) Ineligible for Intensive Chemotherapy: Final Results of the Randomized Phase III Study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS Study Group. *J Clin Oncol* **29**, 1987–1996 (2011).
- Makishima, H. *et al.* Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* **49**, 204–212 (2017).
- Malcovati, L. *et al.* Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **118**, 6239–6246 (2011).
- Malcovati, L. *et al.* Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood* **122**, 2943–2964 (2013).
- Martin, M. G. *et al.* Limited engraftment of low-risk myelodysplastic syndrome cells in NOD/SCID gamma-C chain knockout mice. *Leukemia* **24**, 1662–1664 (2010).
- Martinez-Høyer, S. *et al.* Loss of lenalidomide-induced megakaryocytic differentiation leads to therapy resistance in del(5q) myelodysplastic syndrome. *Nat Cell Biol* **22**, 526–533 (2020).

- Martínez-Jaramillo, G. *et al.* Comparative analysis of the in vitro proliferation and expansion of hematopoietic progenitors from patients with aplastic anemia and myelodysplasia. *Leukemia Res* **26**, 955–963 (2002).
- Matsumura, I. *et al.* The biologic properties of recombinant human thrombopoietin in the proliferation and megakaryocytic differentiation of acute myeloblastic leukemia cells. *Blood* **88**, 3074–82 (1996).
- Medyouf, H. *et al.* Myelodysplastic Cells in Patients Reprogram Mesenchymal Stromal Cells to Establish a Transplantable Stem Cell Niche Disease Unit. *Cell Stem Cell* **14**, 824–837 (2014).
- Meng, F. *et al.* Safety and Efficacy of Eltrombopag and Romiplostim in Myelodysplastic Syndromes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers Oncol* **10**, 582686 (2020).
- Meunier, M. *et al.* Molecular dissection of engraftment in a xenograft model of myelodysplastic syndromes. *Oncotarget* **9**, 14993–15000 (2018).
- Mian, S. A. *et al.* Ectopic Humanized Mesenchymal Niche in Mice Enables Robust Engraftment of Myelodysplastic Stem Cells Humanized Niches Support Myelodysplastic Stem Cells. *Blood Cancer Discov* **2**, 135–145 (2020).
- Mian, S. A. *et al.* SF3B1 mutant MDS-initiating cells may arise from the haematopoietic stem cell compartment. *Nat Commun* **6**, 10004 (2015).
- Miller, C. A. *et al.* SciClone: Inferring Clonal Architecture and Tracking the Spatial and Temporal Patterns of Tumor Evolution. *Plos Comput Biol* **10**, e1003665 (2014).
- Minegishi, N. *et al.* Erythropoietin-dependent induction of hemoglobin synthesis in a cytokine-dependent cell line M-TAT. *J Biol Chem* **269**, 27700–27704 (1994).
- Mishima, Y. *et al.* New human myelodysplastic cell line, TER-3: G-CSF specific downregulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Cell Physiol* **191**, 183–190 (2002).
- Mittelman, M. *et al.* Eltrombopag for advanced myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukaemia and severe thrombocytopenia (ASPIRE): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Haematol* **5**, e34–e43 (2018).
- Miyakawa, Y. *et al.* Recombinant Thrombopoietin Induces Rapid Protein Tyrosine Phosphorylation of Janus Kinase 2 and Shc in Human Blood Platelets. *Blood* **86**, 23–27 (1995).
- Miyakawa, Y. *et al.* Thrombopoietin Induces Tyrosine Phosphorylation of Stat3 and Stat5 in Human Blood Platelets. *Blood* **87**, 439–446 (1996).
- Mortera-Blanco, T., Mantalaris, A., Bismarck, A., Aqel, N. & Panoskaltsis, N. Long-term cytokine-free expansion of cord blood mononuclear cells in three-dimensional scaffolds. *Biomaterials* **32**, 9263–9270 (2011).
- Mossner, M. *et al.* Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood* **128**, 1246–1259 (2016).
- Nakamura, S. *et al.* Retrovirus-mediated gene transfer of granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSFR) cDNA into MDS cells and induction of their differentiation by G-CSF. *Cytokines Cell Mol Ther* **6**, 61–70 (2009).
- Nakao, T., Geddis, A. E., Fox, N. E. & Kaushansky, K. PI3K/Akt/FOXO3a pathway contributes to thrombopoietin-induced proliferation of primary megakaryocytes in vitro and in vivo via modulation of p27Kip1. *Cell Cycle* **7**, 257–266 (2008).
- Navas, T. A. *et al.* Inhibition of overactivated p38 MAPK can restore hematopoiesis in myelodysplastic syndrome progenitors. *Blood* **108**, 4170–4177 (2006).
- Neukirchen, J. *et al.* Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leukemia Res* **35**, 1591–1596 (2011).

- Neukirchen, J. *et al.* Platelet counts and haemorrhagic diathesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* **83**, 477–482 (2009).
- Nilsson, L. *et al.* Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q-deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. *Blood* **96**, 2012–2021 (2000).
- Notta, F., Doulatov, S. & Dick, J. E. Engraftment of human hematopoietic stem cells is more efficient in female NOD/SCID/IL-2Rgc-null recipients. *Blood* **115**, 3704–3707 (2010).
- Ogawa, S. Clonal hematopoiesis in acquired aplastic anemia. *Blood* **128**, 337–347 (2016).
- Ogawa, S. Genetics of MDS. *Blood* **10**, 1049–1059 (2019).
- Oliva, E. N. *et al.* Eltrombopag versus placebo for low-risk myelodysplastic syndromes with thrombocytopenia (EQoL-MDS): phase 1 results of a single-blind, randomised, controlled, phase 2 superiority trial. *Lancet Haematol* **4**, e127–e136 (2017).
- Olnes, M. J. *et al.* Eltrombopag and Improved Hematopoiesis in Refractory Aplastic Anemia. *New Engl J Medicine* **367**, 11–19 (2012).
- Pang, W. W. *et al.* Anti-CD117 antibody depletes normal and myelodysplastic syndrome human hematopoietic stem cells in xenografted mice. *Blood* **133**, 2069–2078 (2019).
- Papaemmanuil, E. *et al.* Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **22**, 3616–3627 (2013).
- Platzbecker, U. *et al.* Biomarkers of Response to Romiplostim in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndrome (MDS) and Thrombocytopenia - Results of the Europe Trial By the Emsco Network. *Blood* **134**, 2998–2998 (2019).
- Platzbecker, U. *et al.* Luspatercept for the treatment of anaemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes (PACE-MDS): a multicentre, open-label phase 2 dose-finding study with long-term extension study. *Lancet Oncol* **18**, 1338–1347 (2017).
- Platzbecker, U. *et al.* Safety and tolerability of eltrombopag versus placebo for treatment of thrombocytopenia in patients with advanced myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 1/2 trial. *Lancet Haematol* **2**, e417–e426 (2015).
- Platzbecker, U. Treatment of MDS. *Blood* **10**, 1096–1107 (2019).
- Prodger, C. F., Rampotas, A., Estcourt, L. J., Stanworth, S. J. & Murphy, M. F. Platelet transfusion: Alloimmunization and Refractoriness. *Semin Hematol* **57**, 92–99 (2019).
- Qian, H. *et al.* Critical Role of Thrombopoietin in Maintaining Adult Quiescent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* **1**, 671–684 (2007).
- Quentmeier, H. *et al.* The LL-100 panel: 100 cell lines for blood cancer studies. *Sci Rep-uk* **9**, 8218 (2019).
- Robert-Richard, E. *et al.* Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice. *Haematologica* **91**, 1384–1387 (2006).
- Rojnuckarin, P., Drachman, J. G. & Kaushansky, K. Thrombopoietin-Induced Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway in Normal Megakaryocytes: Role in Endomitosis. *Blood* **94**, 1273–1282 (1999).
- Roth, M. *et al.* Eltrombopag inhibits the proliferation of leukemia cells via reduction of intracellular iron and induction of differentiation. *Blood* **120**, 386–394 (2012).
- Rouault-Pierre, K. *et al.* Preclinical modeling of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **31**, 2702–2708 (2017).

- Rouyez, M. C., Boucheron, C., Gisselbrecht, S., Dusanter-Fourt, I. & Porteu, F. Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**, 4991–5000 (1997).
- Rücker, F. G. *et al.* Molecular profiling reveals myeloid leukemia cell lines to be faithful model systems characterized by distinct genomic aberrations. *Leukemia* **20**, 994–1001 (2006).
- Saleh, M. N. *et al.* Safety and efficacy of eltrombopag for treatment of chronic immune thrombocytopenia: results of the long-term, open-label EXTEND study. *Blood* **121**, 537–545 (2013).
- Sallman, D. A. & List, A. The central role of inflammatory signaling in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Blood* **133**, 1039–1048 (2019).
- Santos, T. E. de J. dos *et al.* Presence of CD34 + in Megakaryocytes in Association With p53 Expression Predicts Unfavorable Prognosis in Low-risk Myelodysplastic Syndrome Patients. *In Vivo* **33**, 277–280 (2019).
- Sauvage, F. J. de *et al.* Physiological Regulation of Early and Late Stages of Megakaryocytopoiesis by Thrombopoietin. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 651–656 (1996).
- Schanz, J. *et al.* New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge. *J Clin Oncol* **30**, 820–829 (2012).
- Schipper, L. F., Hensbergen, Y. V., Fibbe, W. E. & Brand, A. A sensitive quantitative single-platform flow cytometry protocol to measure human platelets in mouse peripheral blood. *Transfusion* **47**, 2305–2314 (2007).
- Schmitt, N. *et al.* Preclinical evaluation of eltrombopag in a PDX model of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **36**, 236–247 (2022).
- Sekeres, M. A. *et al.* Characteristics of US Patients with Myelodysplastic Syndromes: Results of Six Cross-sectional Physician Surveys. *Jnci J National Cancer Inst* **100**, 1542–1551 (2008).
- Sekeres, M. A. *et al.* Development and validation of a model to predict platelet response to romiplostim in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Brit J Haematol* **167**, 337–345 (2014).
- Severn, C. E. *et al.* Polyurethane scaffolds seeded with CD34+ cells maintain early stem cells whilst also facilitating prolonged egress of haematopoietic progenitors. *Sci Rep-uk* **6**, 32149 (2016).
- Shastri, A. *et al.* Antisense STAT3 inhibitor decreases viability of myelodysplastic and leukemic stem cells. *J Clin Invest* **128**, 5479–5488 (2018).
- Shultz, L. D. *et al.* Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2R γ null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells. *J Immunol* **174**, 6477–6489 (2005).
- Shultz, L. D. *et al.* Multiple Defects in Innate and Adaptive Immunologic Function in NOD/LtSz-scid Mice. *Journal of Immunology* **154**, 180–191 (1995).
- Smith, M. A. *et al.* U2AF1 mutations induce oncogenic IRAK4 isoforms and activate innate immune pathways in myeloid malignancies. *Nat Cell Biol* **21**, 640–650 (2019).
- Solar, G. P. *et al.* Role of c-mpl in Early Hematopoiesis. *Blood* **92**, 4–10 (1998).
- Song, Y. *et al.* A highly efficient and faithful MDS patient-derived xenotransplantation model for pre-clinical studies. *Nat Commun* **10**, 366 (2019).

- Stengel, A. *et al.* The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases. *Leukemia* **31**, 705–711 (2017).
- Stevens, B. M. *et al.* Characterization and targeting of malignant stem cells in patients with advanced myelodysplastic syndromes. *Nat Commun* **9**, 3694 (2018).
- Sun, H., Tsai, Y., Nowak, I., Liesveld, J. & Chen, Y. Eltrombopag, a thrombopoietin receptor agonist, enhances human umbilical cord blood hematopoietic stem/primitive progenitor cell expansion and promotes multi-lineage hematopoiesis. *Stem Cell Res* **9**, 77–86 (2012).
- Swart, L. *et al.* Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes: a report from the prospective European LeukaemiaNet MDS (EUMDS) registry. *Brit J Haematol* **170**, 372–383 (2015).
- Swerdlow, S., Campo E., Harris, N. L., Jaffe, E. S. & Pileri, S. A. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues: Vol. 2. WORLD HEALTH ORGN (2017).
- Takahashi, K. *et al.* Clinical implications of TP53 mutations in myelodysplastic syndromes treated with hypomethylating agents. *Oncotarget* **7**, 14172–14187 (2016).
- Thanopoulou, E. *et al.* Engraftment of NOD/SCID- β 2 microglobulin null mice with multilineage neoplastic cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* **103**, 4285–4293 (2004).
- Tohyama, K., Tsutani, H., Ueda, T., Nakamura, T. & Yoshida, Y. Establishment and characterization of a novel myeloid cell line from the bone marrow of a patient with the myelodysplastic syndrome. *Brit J Haematol* **87**, 235–242 (1994).
- Tong, W. & Lodish, H. F. Lnk Inhibits Tpo–mpl Signaling and Tpo-mediated Megakaryocytopoiesis. *J Exp Medicine* **200**, 569–580 (2004).
- Tortolani, J. *et al.* Thrombopoietin Induces Tyrosine Phosphorylation and Activation of the Janus Kinase, JAK2. *Blood* **85**, 3444–3451 (1995).
- Untergasser, A. *et al.* Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**, e115–e115 (2012).
- Vicente, A. *et al.* Eltrombopag monotherapy can improve hematopoiesis in patients with low to intermediate risk-1 myelodysplastic syndrome. *Haematologica* **105**, 2785–2794 (2020).
- Vigon, I. *et al.* Expression of the c-mpl Proto-oncogene in Human Hematologic Malignancies. *Blood* **82**, 877–883 (1993).
- Vlachodimitropoulou, E. *et al.* Eltrombopag: a powerful chelator of cellular or extracellular iron(III) alone or combined with a second chelator. *Blood* **130**, 1923–1933 (2017).
- Walter, M. J. *et al.* Clonal Architecture of Secondary Acute Myeloid Leukemia. *New Engl J Medicine* **366**, 1090–1098 (2012).
- Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* **38**, e164–e164 (2010).
- Wetzler, M. *et al.* Expression of c-mpl mRNA, the Receptor for Thrombopoietin, in Acute Myeloid Leukemia Blasts Intensive Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* **15**, 2262–2268 (1997).
- Will, B. *et al.* Effect of the nonpeptide thrombopoietin receptor agonist Eltrombopag on bone marrow cells from patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* **114**, 3899–3908 (2009).
- Winkler, T. *et al.* Treatment optimization and genomic outcomes in refractory severe aplastic anemia treated with eltrombopag. *Blood* **133**, 2575–2585 (2019).

Woll, P. S. *et al.* Myelodysplastic Syndromes Are Propagated by Rare and Distinct Human Cancer Stem Cells In Vivo. *Cancer Cell* **25**, 794–808 (2014).

Ye, J. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, (2012).

Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64–69 (2011).

Young, N. S. Aplastic Anemia. *New Engl J Med* **379**, 1643–1656 (2018).

Zhang, C. C., Kaba, M., Iizuka, S., Huynh, H. & Lodish, H. F. Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood* **7**, 3415–3423 (2008).

7 ANHANG

Tabelle 10: Übersicht der klinischen Charakteristika aller transplantierten Patientenproben. MDS, Myelodysplastische Syndrome; WHO 2016, MDS-Klassifikation nach WHO 2016; MDS-EB, MDS mit Blastenexzess; t-MDS, therapieassoziiertes MDS; MDS-MLD, MDS mit Mehrliniendysplasie; MDS-U, unklassifizierbares MDS; MPN, myeloproliferative Neoplasien; CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie; sAML, sekundäre AML; IPSS-R, Prognosescore nach IPSS-R; int, intermediär; PLT, Thrombozyten; Aza, Azacytidin; EK, Erythrozytenkonzentrat; TK, Thrombozytenkonzentrat; R-CHOP, Kombinationstherapie aus Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison; G-CSF, Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor; ESA, erythropoeseestimulierendes Agens; Len, Lenalidomid; N/A, nicht verfügbar.

Patient	Geschlecht	Alter	WHO 2016	IPSS-R	Karyotyp	Mutationen	Blasten (%)	PLT (x10E9/L)	Bisherige Therapie
P01	m	59	MDS-EB-2	sehr hoch	komplex aberrant	<i>CBL, DNMT3A, EZH2</i>	5-10	29	Aza, EK, TK
P02	m	82	MDS-EB-2	sehr hoch	komplex aberrant	<i>TET2, TP53</i>	10	7	Aza, EK, TK
P03	m	65	t-MDS-EB-1	sehr hoch	komplex aberrant	<i>KRAS, BCOR</i>	5	15	Aza, EK, TK
P04	m	71	t-MDS-MLD	niedrig	46,XY,r(6)(p21q26)[14]/46,XY[6]	<i>ASXL1, RUNX1, SRSF2, TET2</i>	0	24	EK, R-CHOP
P05	m	69	MDS-EB-1	sehr hoch	komplex aberrant	<i>TP53</i>	3-5	15	Aza, EK, TK
P06	m	82	MDS-EB-2	sehr hoch	47,XY,+8[4]/46,XY[21]	<i>ASXL1, RUNX1, ZRSR2, STAG2</i>	<10	15	keine
P07	f	83	MDS-MLD	int	46,XX[20]	<i>ASXL1, DNMT3A, EZH2, TET2, CBL, BCOR, WT1</i>	<5	24	G-CSF

P08	m	80	MDS-U	int	47,XY,+8[3]/46,XY[17]	<i>ASXL1, IDH2, SRSF2, STAG2</i>	<1	80	ESA
P09	m	77	MDS mit isolierter del(5q)	sehr niedrig	del(5q)	<i>ASXL1, ETV6, EZH2</i>	1-2	74	EK, Len, TK
P10	m	63	MDS-MLD	niedrig	46,XY[20]	keine detektiert	<2	23	APG101, EK
P11	m	76	MDS-MLD	niedrig	46,XY[20]	<i>ASXL1</i>	1-2	62	APG101, EK
P12	f	66	MDS-MLD	niedrig	46,XX[20]	<i>ASXL1, IDH2, RUNX1, STAG2</i>	1-2	51	Aza, EK, G-CSF
P13	m	68	MDS-MLD	int	46,XY[20]	<i>DNMT3A, TP53</i>	<5	43	EK, G-CSF
P14	f	76	MDS mit isolierter del(5q)	niedrig	46,XX,del(5q)(q21q34)[20]	<i>RUNX1, SF3B1</i>	<5	35	Len
P15	m	75	MDS-MLD	niedrig	46,XY[20]	keine detektiert	<1	55-66	APG101, EK
P16	m	77	MDS-MPN	int	46,XY,t(2,2)(p23;q32)[10]/47,XY,t(2,2)(p23;q32),+8[2]/46,XY[9]	<i>ASXL1, RUNX1, SRSF2</i>	2	75	EK
P17	f	75	MDS-EB-2	sehr hoch	44,XX,-3,del(5)(q13q31),-12[22]	<i>EZH2, TP53</i>	10	50	EK
P18	m	63	MDS-EB-1	hoch	46,XY,+1,der(1;16)(q10;p10)[18]/46,XY[2]	<i>IDH1, IDH2, RUNX1, SRSF2</i>	<10	25	N/A
P19	m	56	MDS-MLD	niedrig	46,XY[20]	<i>ETNK1</i>	0	36	TK
P20	m	80	MDS-EB-2	int	46,XY[20]	<i>IDH2, SRSF2</i>	<5	99	APG101, EK, TK

P21	f	83	MDS mit isolierter del(5q)	niedrig	46,XX,del(5)(q13q33)[13]/46,XX[7]	<i>SF3B1, TP53</i>	1-2	99	Len
P22	m	76	CMML-2	-	46,XY[20]	<i>IDH2, NPM1</i>	10-20	66	N/A
P23	m	72	MDS-EB-2	hoch	46,XY	keine detektiert	15	88	N/A
P24	m	65	MDS-EB-2	int	46,XY	<i>ASXL1</i>	10	71	keine
P25	m	69	sAML	-	47,XY,+21[6]/46,XY[14]	<i>RUNX1</i>	20-60	98	EK
P26	m	76	MDS-MLD	niedrig	46,XY[20]	<i>TET2</i>	1	14	EK, TK

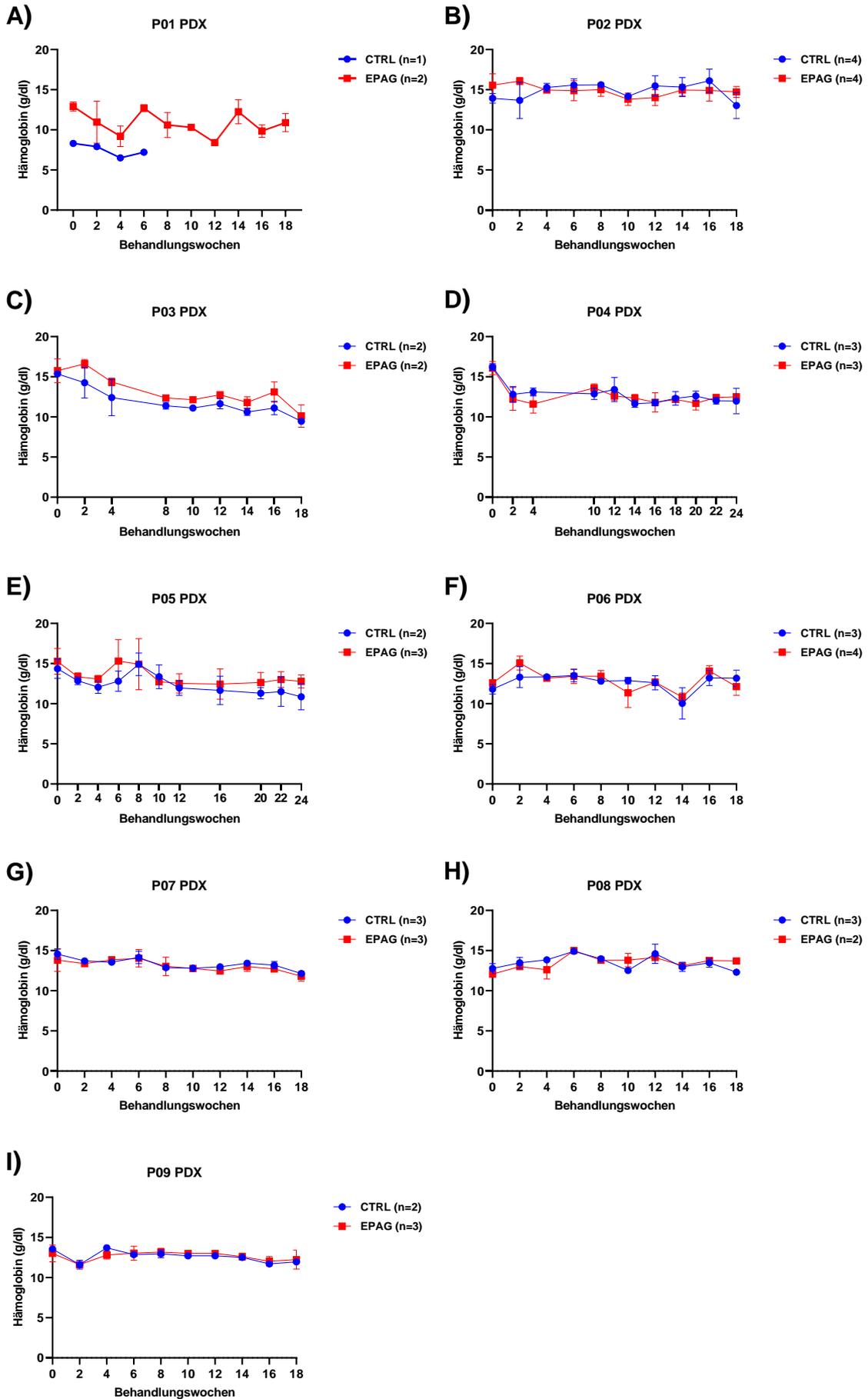


Abbildung 41: Verlauf der mittleren Hämoglobinkonzentration in vehikel- und EPAG-behandelten PDX (Schmitt et al. 2022). Verlauf der mittleren Gesamthämoglobinkonzentration, zusammengesetzt aus humanem und murinem Hämoglobin, der vehikel- (blau) und EPAG-behandelten (rot) patientenabgeleiteten Xenografts (PDX) von Patient P01 (A), P02 (B), P03 (C), P04 (D), P05 (E), P06 (F), P07 (G), P08 (H) und P09 (I) im Verlauf der 18- bis 24-wöchigen Behandlung. Blutentnahmen wurden alle zwei Wochen vorgenommen. Alle Daten bis auf die des vehikelbehandelten PDX in A) sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

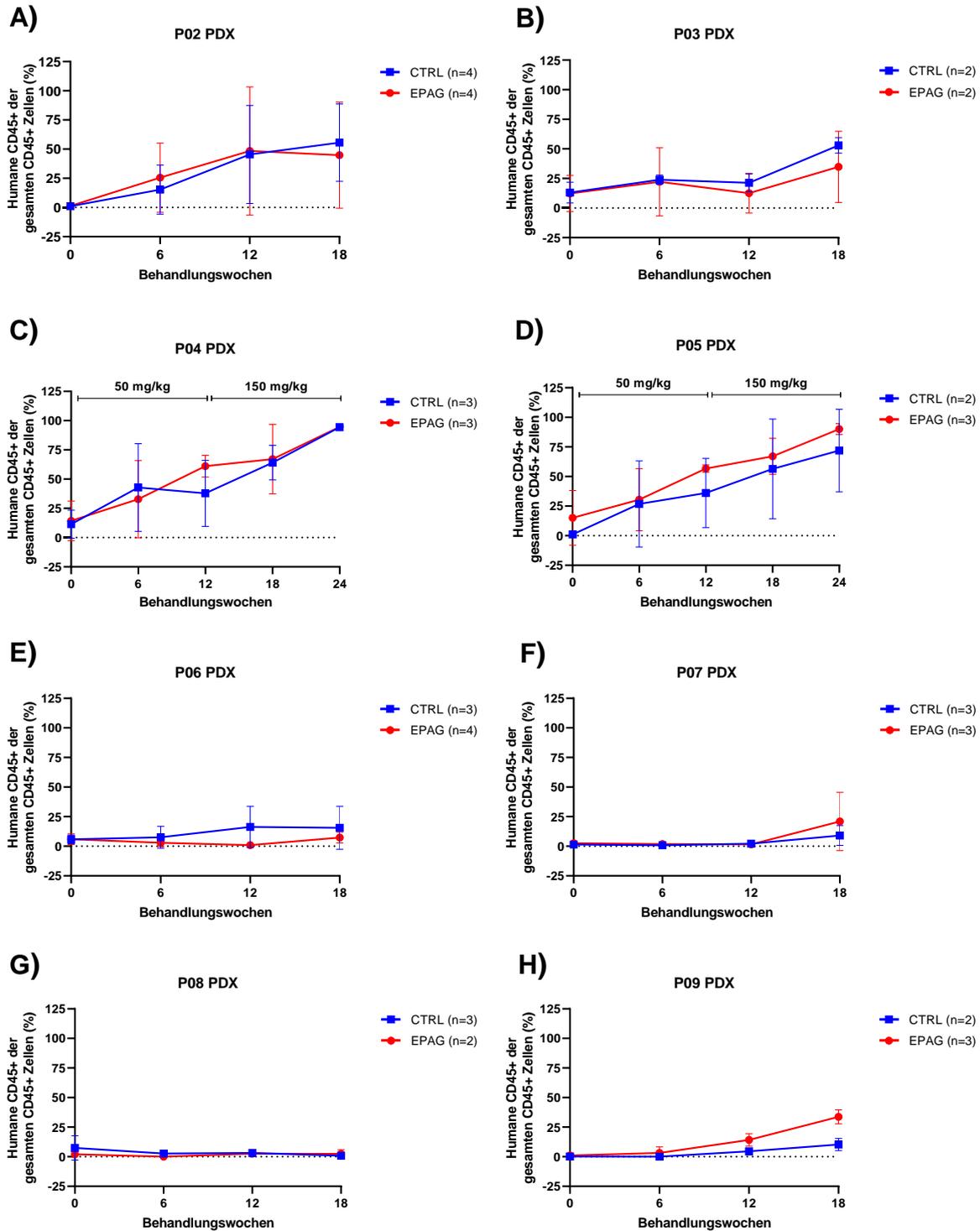
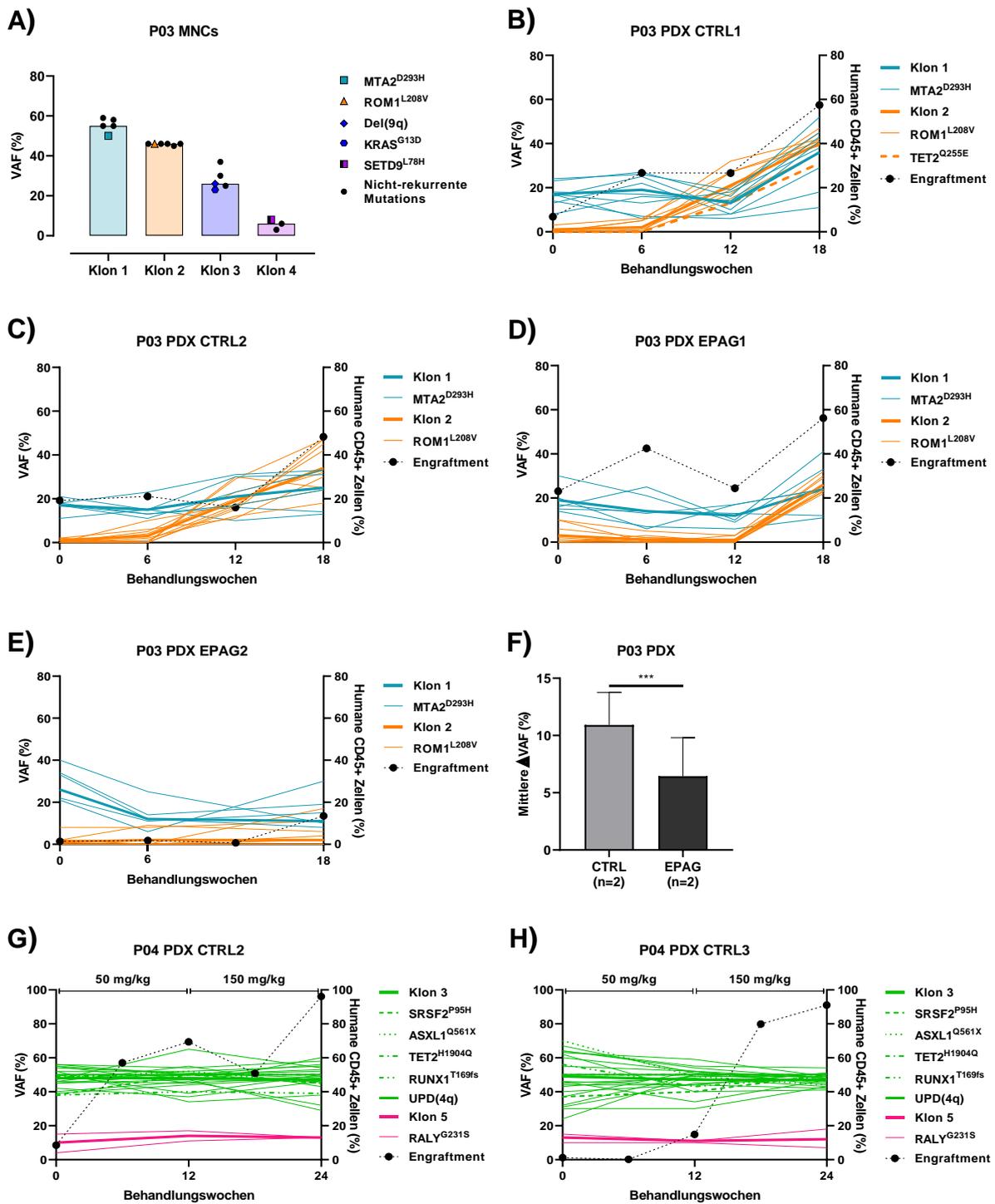
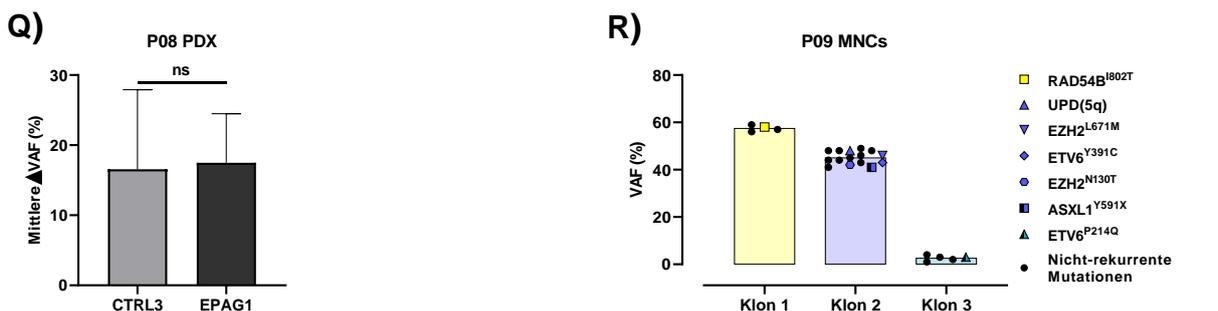
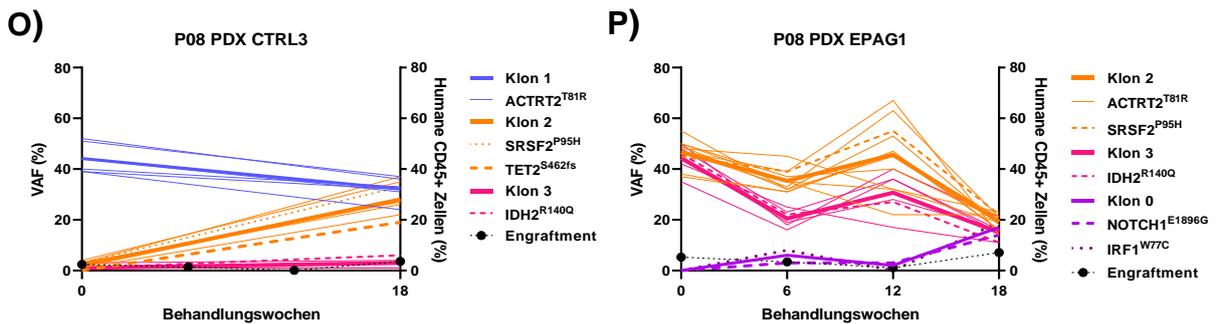
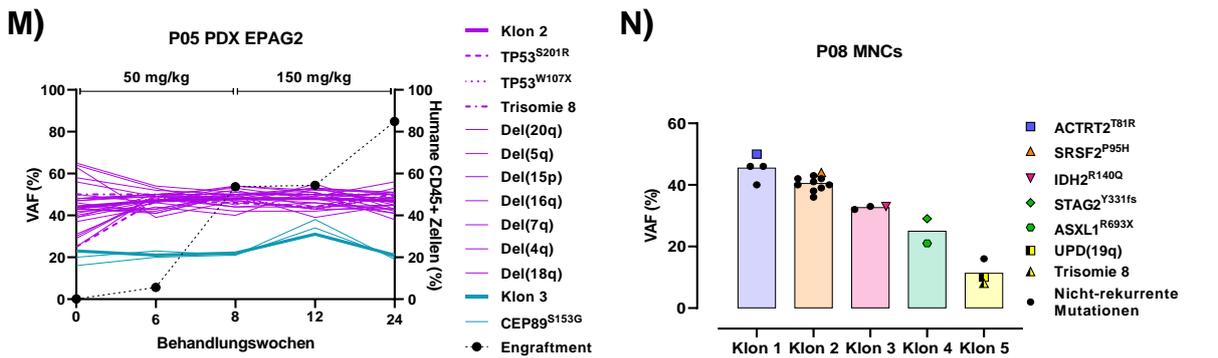
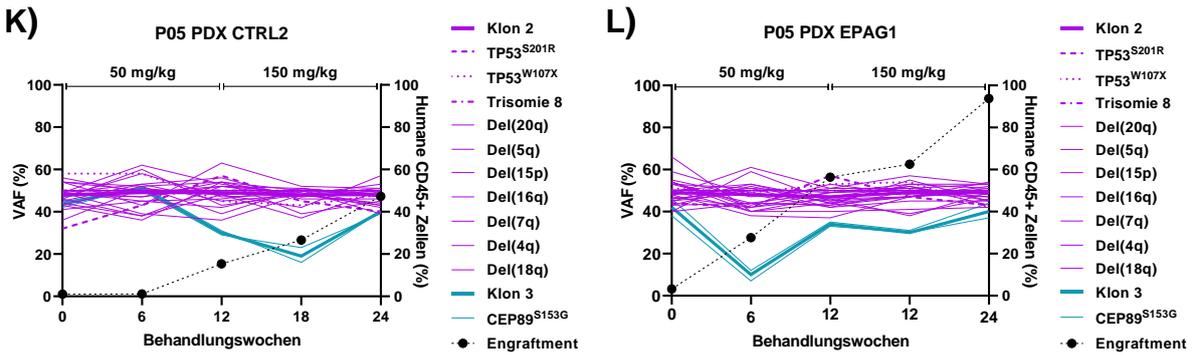
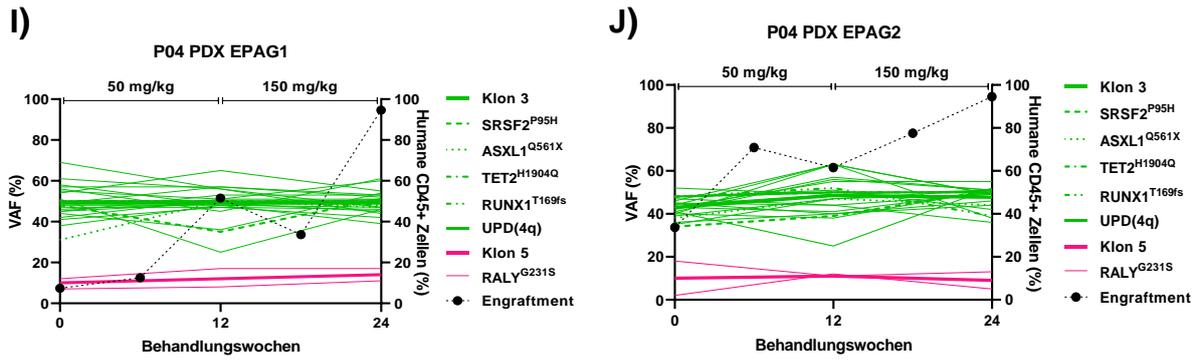


Abbildung 42: Verlauf des mittleren humanen Engraftments in vehikel- und EPAG-behandelten PDX (Schmitt et al. 2022). Verlauf des mittleren humanen Engraftments der vehikel- (blau) und EPAG-behandelten (rot) patientenabgeleiteten Xenografts (PDX) von Patient P02 (A), P03 (B), P04 (C), P05 (D), P06 (E), P07 (F), P08 (G) und P09 (H) im Verlauf der 18- bis 24-wöchigen Behandlung. Knochenmarkpunktionen wurden in Woche 0, 6 und 12 bzw. 18 vorgenommen. In Woche 18 bzw. 24 erfolgte nach Endpunkt die Analyse des Gesamtknochenmarks. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt.





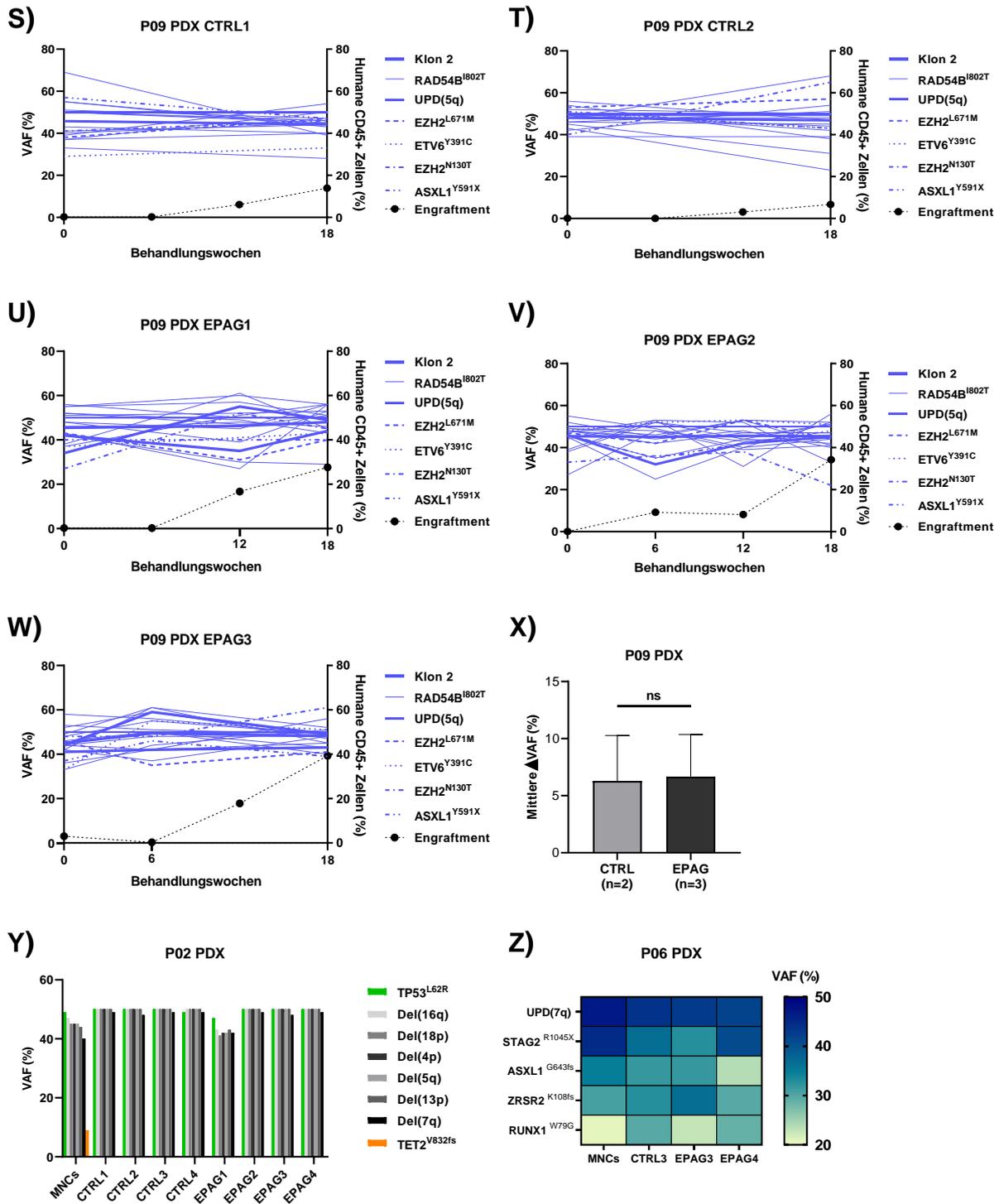
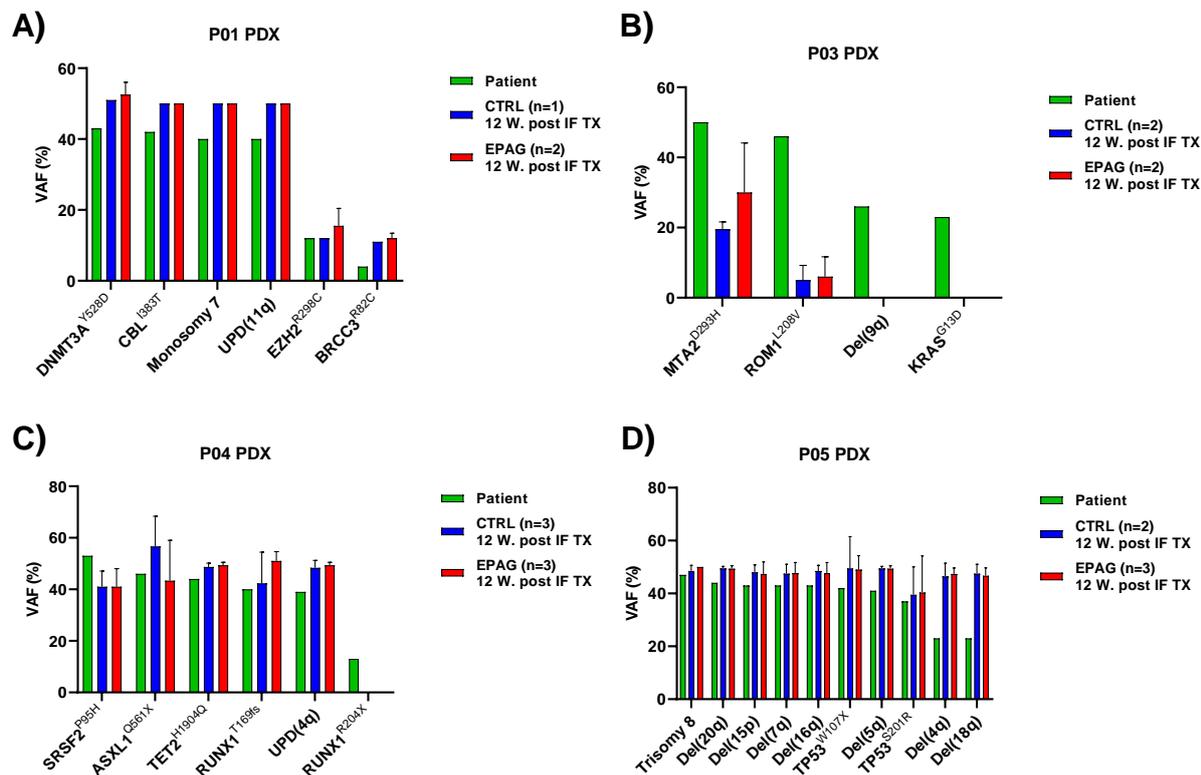


Abbildung 43: Klonale Knochenmarkszusammensetzung der Patienten P02, P03, P04, P05, P06, P08 und P09, und deren PDX (Schmitt et al. 2022). Ergebnisse der Gesamt-Exom-Sequenzierung zur Rekonstruktion der klonalen Knochenmarkszusammensetzung von Patienten P02, P03, P04, P05, P06, P08 und P09, und deren mit Vehikel (CTRL) und deren mit Eltrombopag (EPAG) behandelten patientenabgeleiteten Xenografts (PDX) im Verlauf der 18- bis 24-wöchigen Behandlung. Die PDX wurden mit 50 mg/kg EPAG behandelt. Für die PDX von P04 und P05 erfolgte ab Woche 12 eine Dosisescalation auf 150 mg/kg. Sequenziert wurden die humanen CD45+ Zellen aus dem PDX-Knochenmark der Woche 0, 6, 12, 18 und 24. Wiederkehrende Klone desselben Patienten und dessen PDX sind in derselben Farbe dargestellt. Dicke Linien in den Verlaufsdiagrammen stellen den Mittelwert des jeweiligen Klons

dar. Die durch die Mutationen erfolgten Aminosäureaustausche werden für die jeweilige Mutation als hochgestellte Kodierung angezeigt. Die schwarze gestrichelte Linie beschreibt das Engraftment in dem jeweiligen PDX (rechte Y-Achse). Dargestellt ist die Varianzallelfrequenz (VAF) der Mutationen und zytogenetischen Aberrationen (linke Y-Achse). „Mutationscluster“ wurden mittels des bioinformatischen Tools SciClone berechnet. Balkendiagramme stellen den Mittelwert der VAF der einzelnen Klone dar. **(A-E)** VAFs der mononukleären Zellen (MNCs) des Patienten P03 und humanen CD45+ Zellen seiner PDX CTRL1+2 und EPAG1+2. **(F)** Mittlere Delta-VAF (Δ VAF) der $n = 2$ CTRL- und $n = 2$ EPAG PDX von Patient P03. **(G-J)** VAFs der hCD45+ Zellen der PDX CTRL2+3 und EPAG1+2 von Patienten P04. **(K-M)** VAFs der humanen CD45+-Zellen der PDX CTRL2 und EPAG1+2 des Patienten P05. **(N-P)** VAFs der MNCs des Patienten P08 und humanen CD45+ Zellen seiner PDX CTRL3 und EPAG1. **(Q)** Mittlere Δ VAF der PDX CTRL3 und EPAG1. **(R-W)** VAFs der MNCs des Patienten P09 und humanen CD45+ Zellen seiner PDX CTRL1+2 und EPAG 1-3. **(X)** Mittlere Δ VAF der $n = 2$ CTRL und $n = 3$ EPAG PDX von Patient P09. **(Y)** VAFs der MNCs des Patienten P02 und humanen CD45+ Zellen seiner PDX CTRL1-4 und EPAG1-4 zum Endpunkt. **(Z)** Heatmap der VAFs der MNCs von Patient P06 und humanen CD45+ Zellen seiner PDX CTRL3 und EPAG3+4 zum Endpunkt. Die Daten in **(F)**, **(Q)** und **(X)** sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden mittels zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben analysiert. ***, $p < 0,001$; ns, nicht signifikant



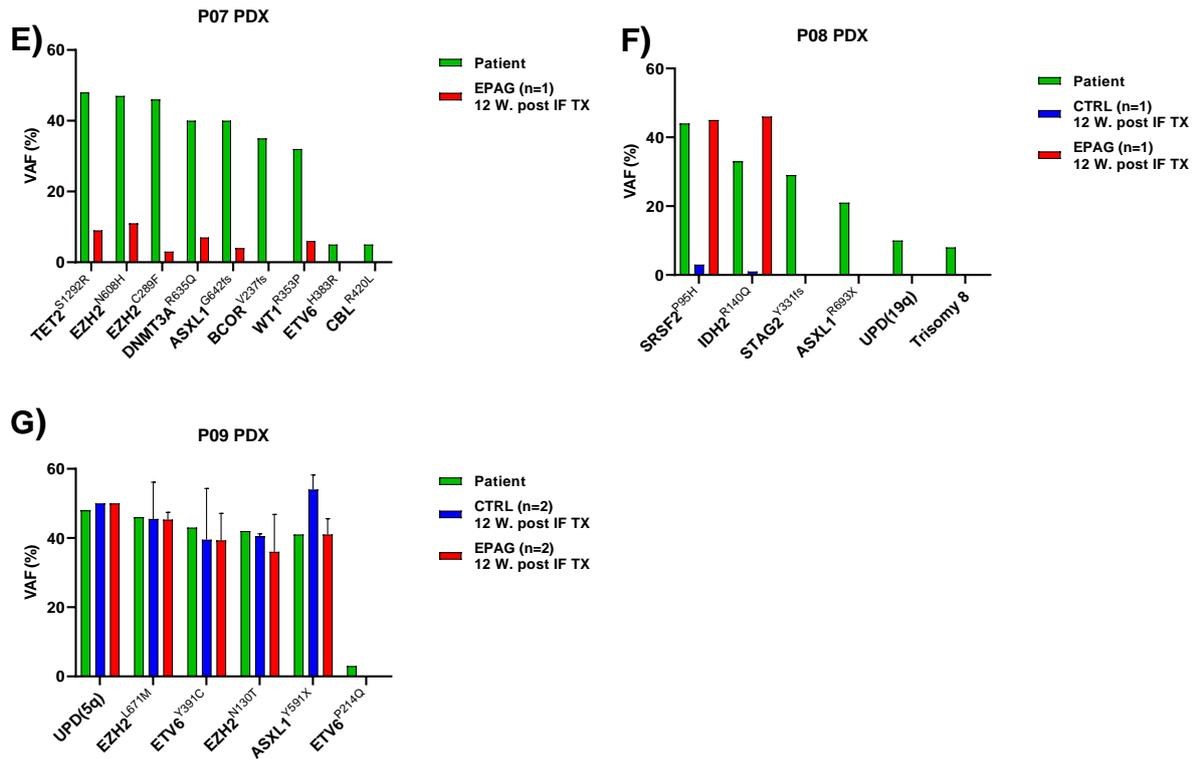


Abbildung 44: Mutationsprofile von Patienten und deren PDX vor Behandlungsbeginn (Schmitt et al. 2022). Vergleich der Varianzallelfrequenz (VAF) von MDS-spezifischen Mutationen in den primären Patientenproben von P01 (A), P03 (B), P04 (C), P05 (D), P07 (E), P08 (F) und P09 (G) und ihren patientenabgeleiteten Xenografts (PDX) 12 Wochen nach der intrafemorale Transplantation (IF TX), d.h. vor Behandlungsbeginn. Die PDX wurden entsprechend ihrer späteren Einteilung in die Behandlungsgruppen Vehikel (CTRL, blau) und Eltrombopag (EPAG, rot) unterteilt. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Nanni Schmitt
Geburtsdatum: 11.01.1991
Geburtsort: Weinheim

SCHULISCHER WERDEGANG

09/1997 – 06/2001 Goetheschule Grundschule, Hemsbach
09/2001 – 06/2010 Bergstraßen-Gymnasium, Hemsbach
30.06.2010 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

10/2010 – 12/2014 Kassiererin in EDEKA-Filiale Hemsbach (Voll- und Teilzeit)
09/2016 – 05/2017
10/2011 – 11/2014 Studium im Fach Biologie (B.Sc.)
Technische Universität Darmstadt
09/2014 – 11/2014 Bachelorarbeit
“Posttranslational methylation of MeCP2”
10.11.2014 Abschluss B.Sc. Biologie
01/2015 – 08/2016 Studium im Fach Technische Biologie (M.Sc.)
Technische Universität Darmstadt
01/2016 – 08/2016 Masterarbeit
“Generation of CRISPR/Cas constructs to create a PROX1
reporter cell line”
23.08.2016 Abschluss M.Sc. Technische Biologie
Seit 06/2017 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der III. Medizinischen Kli-
nik, Hämatologie und Onkologie, Medizinische Fakultät
Mannheim der Universität Heidelberg

PREISE UND AUSZEICHNUNGEN

- | | |
|---------|---|
| 10/2018 | Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO) |
| 12/2018 | “Abstract Achievement Award” der American Society of Hematology (ASH) |
| 10/2020 | „Young Investigators' Award“ der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO) |
| 09/2021 | “Tito Bastianello Young Investigator Award in Translational Research” der MDS Foundation |

KONFERENZBEITRÄGE

- | | |
|---------|--|
| 10/2018 | Posterpräsentation, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO):
“Functional analysis of EPAG in a preclinical xenograft model of myelodysplastic syndromes (MDS) with thrombocytopenia: Proof of principle” |
| 12/2018 | Vortrag, American Society of Hematology (ASH):
“Placebo Controlled Functional Analysis of EPAG in a Pre-clinical Xenograft Model of Myelodysplastic Syndromes (MDS)” |
| 02/2019 | Posterpräsentation, Deutscher Krebsforschungskongress (DKFK):
“Functional Analysis of EPAG in a Preclinical Xenograft Model of Myelodysplastic Syndromes (MDS) for Patient-Individual Placebo-Controlled Substance Testing” |
| 05/2019 | Posterpräsentation, International Symposium FOR 2033 - The Hematopoietic Niches:
“Evaluation of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) as a therapeutic target in the hematopoietic niche of Myelodysplastic Syndromes (MDS)” |
| 10/2019 | Vortrag, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO):
“Patient-Individual Substance Testing of EPAG in a Preclinical Xenograft Model of Myelodysplastic Syndromes (MDS)” |
| 10/2020 | Vortrag, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO):
“The role of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in the hematopoietic niche of Myelodysplastic Syndromes (MDS)” |

- 09/2021 Vortrag, 16th International Congress on Myelodysplastic Syndromes:
„A PRE-CLINICAL PATIENT-DERIVED XENOGRAFT MODEL OF MYELODYSPLASTIC SYNDROMES DEMONSTRATES EFFICACY AND SAFETY OF EPAG”
- 10/2021 Vortrag, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO):
„Pre-clinical evaluation of EPAG in a patient-derived xenograft model of Myelodysplastic Syndromes”

PUBLIKATIONEN

- J.-C. Jann, F. Nolte, M. Mossner, J. Flach, E. Altrock, **N. Schmitt**, H. Röhl, A. Jawhar, U. Neumann, V. Nowak, J. Danner, J. Obländer, I. Palme, W.-K. Hofmann, D. Nowak, Comparative Analysis of Clonal Hematopoiesis of Multipotent Stem Cells in Healthy Elderly in Blood and Bone Marrow. *Leukemia Res.* 82, 15–18 (2019). **IF: 2,214**
- J. Flach, J.-C. Jann, A. Knaflic, V. Riabov, A. Streuer, E. Altrock, Q. Xu, **N. Schmitt**, J. Obländer, V. Nowak, J. Danner, A. Mehralivand, F. Hofmann, I. Palme, A. Jawhar, P. Wuchter, G. Metzgeroth, F. Nolte, W.-K. Hofmann, D. Nowak, Replication stress signaling is a therapeutic target in myelodysplastic syndromes with splicing factor mutations. *Haematologica*, 106, 2906–17 (2021). **IF: 9,941 (2020/2021)**
- V. Riabov, M. Mossner, A. Stöhr, J. Jann, A. Streuer, **N. Schmitt**, A. Knaflic, V. Nowak, N. Weimer, J. Obländer, I. Palme, C. Schumann, C. D. Baldus, T. J. Schulze, P. Wuchter, H. Röhl, A. Jawhar, C. Weiss, T. Boch, G. Metzgeroth, M. Neumann, W. Hofmann, F. Nolte, D. Nowak, High erythroferrone expression in CD71+ erythroid progenitors predicts superior survival in myelodysplastic syndromes. *Brit J Haematol.* 192, 879–891 (2021). **IF: 6,998 (2020/2021)**
- J.-C. Jann, M. Mossner, V. Riabov, E. Altrock, **N. Schmitt**, J. Flach, Q. Xu, V. Nowak, J. Obländer, I. Palme, N. Weimer, A. Streuer, A. Jawhar, A. Darwich, M. Jawhar, G. Metzgeroth, F. Nolte, W.-K. Hofmann, D. Nowak, Bone marrow derived stromal cells from Myelodysplastic Syndromes are altered but not clonally mutated in vivo. *Nat. Commun.* 12, 6170 (2021). **IF: 14,919 (2020/2021)**
- N. Schmitt**, J.-C. Jann, E. Altrock, J. Flach, J. Danner, S. Uhlig, A. Streuer, A. Knaflic, V. Riabov, Q. Xu, A. Mehralivand, I. Palme, V. Nowak, J. Obländer, N. Weimer, V. Haselmann, A. Jawhar, A. Darwich, C.-A. Weis, A. Marx, L. Steiner, M. Jawhar, G. Metzgeroth, T. Boch, F. Nolte, W.-K. Hofmann, D. Nowak, Preclinical evaluation of EPAG in a PDX model of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 36, 236–47 (2022). **IF: 11,528 (2020/2021)**
- E. Altrock, C. Sens-Albert, J.-C. Jann, J. Flach, V. Riabov, **N. Schmitt**, Q. Xu, A. Mehralivand, A. Hecht, L. Steiner, A. Streuer, V. Nowak, J. Obländer, N. Weimer, I. Palme, A. Jawhar, C.-A. Weis, V. Weyer, F. Nolte, M. Jawhar, G. Metzgeroth, A. Marx, C. Groden, W.-K. Hofmann, D. Nowak, Humanized 3D scaffold xenotransplantation models for Myelodysplastic Syndromes. *Exp. Hematology*, 107, 38–50 (2022). **IF: 3,084 (2020/2021)**

9 DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich ausdrücklich bei Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Dissertation im Wissenschaftlichen Labor der III. Medizinischen Klinik der Medizinischen Fakultät Mannheim und die exzellente Förderung, die man dort als Nachwuchswissenschaftler*in erhält, bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinem Doktorvater und Mentor Prof. Dr. med. Daniel Nowak bedanken. Vielen Dank für die persönliche Betreuung, Förderung und Unterstützung in allen Lebenslagen. Ich habe die letzten Jahre unglaublich viel gelernt.

Danke an Stefanie Uhlig für die großartige Unterstützung bei diesem Projekt sowie die netten Gespräche.

Für eine überragende technische Assistenz möchte ich mich bei Verena Nowak, Julia Obländer, Iris Palme, Nadine Weimer und Melda Göl bedanken. Vielen Dank für eure Hilfe und dass ihr den Laden am Laufen haltet.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Eva Altrock und Dr. Johanna Flach für die Betreuung und schöne Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit bedanken. Danke auch an Dr. Felicitas Rapp für die Durchsicht meiner Thesis sowie Dr. med. Johann-Christoph Jann und Dr. med. Alexander Streuer für die Unterstützung bei der bioinformatischen Analyse meiner Daten. Kurz erwähnen möchte ich auch meine ehemaligen Kolleg*innen Justine Danner, Dr. med. Antje Knaflic und Arwin Mehralivand, die ich in guter Erinnerung behalten werde.

Special thanks go to my dear colleagues Dr. Vladimir Riabov and Dr. med. Qingyu Xu from the "important office" for making work more fun and keeping me company in the afternoon, in the evening and sometimes even at night.

Bei meiner Mutter, meinem Vater sowie meinen Schwiegereltern möchte ich mich gerne für die Unterstützung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit bedanken.

Ein großer Dank geht auch an meine Freunde, die während dieser stressigen Zeit für die nötige Ablenkung und Spaß gesorgt haben, und mit denen ich hoffentlich auch noch in 30 Jahren zusammen in Ms Garten sitze.

Mein größter Dank gilt meinem besten Freund und Ehemann, ohne den ich nie so weit gekommen wäre. Danke für deine Unterstützung, deinen Rückhalt, deine Geduld und dein Verständnis, das du all die Jahre aufgebracht hast.