

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Ursprung und Expansion der Klonalen Hämatopoese während der hämatopoetischen Differenzierung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Joël Galán Sousa

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Abstract | |
| 1.1 Abstract Deutsch | 2 |
| 1.2 Abstract English | 3 |
| 2. Einleitung | |
| 2.1 Die Klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potential | 4 |
| 2.2 Ziele und Fragestellungen | 6 |
| 3. Methodik | |
| 3.1 Probenrekrutierung und Probenverarbeitung | 6 |
| 3.2 Mutationsnachweis und bioinformatische Analyse | 6 |
| 3.3 Durchflusszytometrische Experimente | 9 |
| 3.4 Statistische Analyse | 11 |
| 4. Ergebnisse | |
| 4.1 Mutationsanalyse der Klonalen Hämatopoese von unbestimmtem Potential an 437 Patienten | 11 |
| 4.2 Mutationslast in den sortierten Zellfraktionen des peripheren Blutes | 12 |
| 4.3 Mutationslast in den sortierten Zellfraktionen des Knochenmarks | 13 |
| 4.4 Korrelation des Mutationsstatus mit klinischen Variablen | 14 |
| 4.5 Weitere Ergebnisse | 15 |
| 5. Diskussion | |
| 5.1 Charakter und klinische Relevanz der Klonalen Hämatopoese von unbestimmtem Potential | 16 |
| 5.2 Betrachtung der Ergebnisse in der Gesamtschau | 18 |
| 5.3 Perspektiven | 19 |
| 6. Literaturverzeichnis | 20 |
| 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | 22 |
| 8. Abkürzungsverzeichnis | 23 |
| 9. Eidesstattliche Versicherung | 24 |
| 10. Anteilserklärung | 25 |
| 11. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen | |
| 11.1 Publikation 1 | 29 |
| 11.2 Publikation 2 | 38 |
| 11.3 Publikation 3 | 51 |
| 12. Curriculum vitae | 66 |
| 13. Komplette Publikationsliste | 69 |
| 14. Danksagung | 71 |

1. Abstract

1.1. Abstract Deutsch

Einleitung: Die Klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potential (CHIP) ist ein mit dem Alter in der Häufigkeit zunehmendes Phänomen. Sie ist mit dem Risiko der Entstehung hämatologischer Neoplasien, kardiovaskulärer Ereignisse und einem kürzeren Gesamtüberleben (OS) assoziiert. Definiert wird sie durch das Vorkommen somatischer Mutationen mit einer Varianten Allelfrequenz (VAF) $\geq 2\%$ im peripheren Blut (PB) von Individuen ohne eine nachgewiesene hämatologische Erkrankung oder morphologische Veränderungen der Blutzellen. Ziel der Arbeit war die Identifizierung der Ursprungszelle und die Beschreibung des klonalen Expansionsmusters der Mutationen während der hämatopoetischen Differenzierung. Auch sollten Assoziationen mit klinischen Parametern und die Dynamik der Mutationen unter zellulären Stressbedingungen einer Radiochemotherapie analysiert werden.

Methodik: Im Hauptprojekt wurden insgesamt 437 Patienten ($n = 365$ und $n = 72$) rekrutiert. Zum Mutationsnachweis wurde die gezielte Tiefensequenzierung verwendet. Mittels Durchflusszytometrie wurden verschiedene Zellreihen des PB und des Knochenmarks (KM) aufgetrennt. In Nebenprojekten wurde sowohl die Rolle von CHIP während einer allogenen Stammzelltransplantation (HSCT) als auch die klinische Bedeutung von *EGR2*-Mutationen bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) untersucht.

Ergebnisse: Insgesamt konnten 168 Mutationen in 121 Patienten (CHIP-Prävalenz 27,7 %) nachgewiesen werden. In 91 Individuen wurde die Mutationslast in den einzelnen hämatopoetischen Zellfraktionen des PB quantifiziert. In neun Patienten wurden die Mutationen darüber hinaus in den Stamm- und Vorläuferzellen des KM untersucht. Die im PB auftretenden Mutationen konnten dabei in allen untersuchten Fällen bereits in den Lin⁻CD34⁺CD38⁻ hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden. Zur größten relativen Expansion der Mutationslast kam es meist während der früheren Stadien der hämatopoetischen Differenzierung innerhalb des Stammzell-Kompartiments. Die Mutationen expandierten zumeist stärker in myeloische als in lymphatische Zellfraktionen. Im PB waren die VAFs in der myeloischen Zellreihe und in den natürlichen Killerzellen in fast allen Fällen hochsignifikant größer als in den lymphatischen T- und B-Zellen ($P = .0001$). Darüber hinaus war der Nachweis von zwei oder mehr Mutationen hochsignifikant mit dem Auftreten einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit ($P = .001$) und signifikant mit dem eines Diabetes mellitus Typ 2 ($P = .034$) assoziiert.

CHIP-positive Patienten zeigten unter zytostatischer Chemotherapie Abweichungen in Bezug auf Therapieverträglichkeit, Nebenwirkungen und die Dynamik der unterschiedlichen CHIP-Klone.

Die HSCT von CHIP-positiven Spendern scheint trotz Unterschieden im klinischen Verlauf zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich des OS zu führen wie eine HSCT mit CHIP-negativen Spendern.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse liefern erstmalig einen Einblick in die Ontogenese und die Expansionsdynamik von CHIP und vertiefen unser Verständnis von den klinischen Assoziationen und ihrer Rolle während chemotherapeutischer Behandlungen und der allogenen Stammzelltransplantation.

1.2 Abstract English

Introduction: Clonal haematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) is a phenomenon whose frequency rises with age. It is associated with the risk of hematologic neoplasia, cardiovascular events and shorter OS. It is defined by the presence of somatic mutations with a variant allele frequency (VAF) $\geq 2\%$ in the peripheral blood of individuals without a hematologic disease or morphologic abnormalities. Our objective was to identify the cell-of-origin and to describe the clonal expansion pattern of mutations during hematopoietic differentiation. Additionally, we resolved to analyze associations with clinical parameters and to evaluate the dynamics of CHIP-mutations under cellular stress conditions such as radiochemotherapy.

Methods: 437 patients ($n = 365$ and $n = 72$) were recruited within the main project. For mutation detection, we used a combination of targeted deep and digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) sequencing. Flow cytometry was used to separate different PB and bone marrow cell fractions. In side projects, we studied the role of CHIP during hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and the clinical significance of *EGR2* mutations in chronic lymphocytic leukemia (CLL).

Results: 168 mutations could be detected in 121 patients (CHIP prevalence 27.7 %). The mutation burden in the different haematopoietic cell fractions of the PB was quantified in 91 individuals. We analyzed the mutations in stem and progenitor cells of the BM in nine patients. All mutations present in the PB could already be detected in the Lin⁻CD34⁺CD38⁻ haematopoietic stem cells. The strongest expansion arose mostly during the earlier stages of hematopoietic differentiation within the stem cell compartment. The mutations predominantly expanded towards myeloid rather than lymphatic cell fractions. Almost exclusively, the VAFs in the myeloid cell fractions and in the natural killer cells were greater than in the lymphatic T and B cells ($P = .0001$). The presence of two or more mutations was highly significantly associated with peripheral arterial occlusive disease ($P = .001$) and significantly associated with diabetes mellitus type 2 ($P = .034$).

CHIP-positive patients undergoing cytostatic chemotherapy showed variations in therapy tolerance, side effects and dynamics of the various CHIP clones.

Despite differences in the clinical course, HSCT from CHIP-positive donors seems to lead to similar results regarding the OS as HSCT from CHIP-negative donors.

Conclusion: These findings provide new insight into the ontogenesis and expansion of CHIP and enhance our understanding of the clinical associations and their relevance during chemotherapy and HSCT.

2. Einleitung

2.1 Die Klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potential

Im Jahr 2014 konnten drei unabhängige Studien mit insgesamt 32.290 Teilnehmern somatische Mutationen in mindestens 10 % der peripheren Blutproben von hämatologisch unauffälligen >60-jährigen Personen nachweisen, die aus dem Kontext hämatologischer Erkrankungen bekannt sind. Das Auftreten dieser Mutationen war stark mit ansteigendem Alter assoziiert und Personen <50 Jahre waren nur sehr selten betroffen (<1 %) [1–3]. Als Ursprungszelle dieser Mutationen wurde von einer langlebigen hämatopoetischen Stammzelle (*hematopoietic stem cell* = HSC) ausgegangen [4], was in den genannten Studien jedoch nicht bewiesen werden konnte, da PB untersucht wurde. Um dieses Phänomen von anderen, bereits bekannten hämatologischen Veränderungen zu unterscheiden, wurde eine neue Definition eingeführt: die Klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potential (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential* = CHIP). Definiert wird die CHIP durch den Nachweis einer typischen somatischen Mutation mit einer VAF von mindestens 2 % ohne den anderweitigen Nachweis einer hämatologischen Erkrankung oder bekannter Vorstufen wie zum Beispiel der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) [5]. Es zeigten sich vor allem Gene der epigenetischen Regulatoren betroffen, darunter die Gene *DNA-Methyltransferase 3A* (*DNMT3A*) und *Ten-Eleven Translocation 2* (*TET2*). Ferner waren auch Gene mutiert, die Faktoren des Spleißosom codieren oder solche, die an dem Prozess der Reparatur der Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid* = DNA) beteiligt sind und regulierend auf den Zellzyklus wirken. *DNMT3A* katalysiert die *de novo* Methylierung der DNA [6], wohingegen *TET2* als Methylcytosin-Dioxygenase die Konversion von 5-Methyl-Cytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin katalysiert [7]. In verschiedenen Experimenten zeigte sich, dass murine HSCs mit einer *Dnmt3a*- oder einer *Tet2*-Mutation oder einem entsprechenden Gen-Knockout ein vergrößertes Potential zur Selbsterneuerung besitzen, ihre Fähigkeit zur Differenzierung jedoch eingeschränkt ist [8–10]. Die Beteiligung von mutierten HSCs in der Entwicklung anderer hämatologischer Erkrankungen wie der Aplastischen Anämie (AA) [11], der Akuten myeloischen Leukämie (AML) [12, 13], der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) [14], den myelodysplastischen Syndromen (MDS) [15], den Myeloproliferativen Neoplasien (MPN) [16, 17] und verschiedenen T-Zell-Lymphomen [10, 18] gilt als gesichert.

CHIP ist mit einem erhöhten Risiko für hämatologische Neoplasien assoziiert (Hazard Ratio: 11,1). Die Progression der CHIP hin zu hämatologischen Neoplasien ist dabei jedoch eher gering (0,5–1 % pro Jahr) [2, 3]. Das erhöhte Risiko für eine maligne Transformation kann jedoch nicht allein erklären, warum bei Patienten mit einer CHIP-Mutation eine erhöhte Gesamtmortalität besteht. Es zeigte sich, dass dafür vorrangig ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung verantwortlich ist [3]. Diese Beobachtung wurde in weiteren Studien bestätigt [19, 20].

In Mausexperimenten konnte diesbezüglich für *Tet2*-Mutationen bereits ein kausaler Zusammenhang aufgezeigt werden. Hier zeigte sich, dass der Verlust von *Tet2* in murinen Monozyten zu einer beschleunigten und vergrößerten atherosklerotischen Plaquebildung führte [21]. Trotzdem wird weiterhin diskutiert, ob die CHIP ein physiologischer Prozess des Alterns ist, der durch exogene Noxen, wie zum Beispiel Tabakexposition, beschleunigt wird [4]. Eine Verallgemeinerung ist jedoch problematisch, da die CHIP eine Vielzahl an Mutationen umfasst, deren potentielle biologischen und klinischen Folgen durchaus unterschiedlich sein dürften. Weitere Forschung ist nötig, um diese umfassend zu evaluieren.

Des Weiteren ist der Einfluss der CHIP auf medizinische Behandlungen mit Auswirkungen auf das KM von großem Interesse. Dazu zählen beispielsweise die (Radio-)Chemotherapie und die autologe und allogene HSCT. Dass HSCs mit einer vorbestehenden CHIP-Mutation aufgrund ihres erhöhten Selbsterneuerungspotentials beziehungsweise ihrer erhöhten Resistenz gegenüber zytotoxischen Einflüssen durch eine Chemotherapie positiv selektioniert werden können und es so zu einer malignen Transformation kommen kann, wurde für die CHIP mit *TP53*-Mutation bereits gezeigt [22]. Auch konnte bei Patienten mit malignen Erkrankungen und vorbestehender CHIP ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung therapieassoziierter myeloischer Neoplasien nachgewiesen werden [23–25]. Trotzdem wurde die Eignung von Individuen mit einer CHIP-Mutation als Spender für eine allogene HSCT bis heute nicht systematisch evaluiert.

Die mögliche Dominanz der sich neu bildenden Hämatopoese des Empfängers durch einen Zellklon mit einer CHIP-Mutation kann möglicherweise zu einer Dysfunktion des Transplantats, zum Beispiel im Sinne einer Zytopenie, führen [26]. Auch eine maligne Entartung bei vorbestehender CHIP im Sinne einer Spenderzell-Leukämie (*donor-cell leukemia* = DCL) ist vorstellbar und wird durch Fallberichte gestützt [27–29]. Dennoch wird hier von einer sehr geringen Frequenz ausgegangen [30, 31].

Die Auswirkungen der CHIP auf Transplantationsergebnisse und Therapieverträglichkeit bei zytotoxischen Chemotherapien und der allogenen HSCT sind noch unzureichend verstanden oder untersucht.

Klonale Entwicklungen und somatische Mutationen spielen auch in der Pathogenese der CLL, der häufigsten chronischen Leukämie in den westlichen Ländern [32], eine wichtige Rolle [33]. Bei der Untersuchung molekularer Marker konnte kürzlich gezeigt werden, dass Mutationen im Gen *Early Growth Response 2 (EGR2)* häufiger als vermutet in CLL-Patienten in fortgeschrittenen Stadien vorkamen und darüber hinaus auch mit einem schlechteren Verlauf assoziiert waren [14]. *EGR2* kodiert dabei für einen Transkriptionsfaktor, der unter anderem an der Differenzierung hämatopoetischer Zellen, insbesondere der Lymphozyten, essentiell beteiligt ist [34–36].

2.2 Ziele und Fragestellungen

Die Ziele der Arbeit lauteten wie folgt: (1) Untersuchung der Häufigkeit verschiedener CHIP-Mutationen in einem Patientenkollektiv mit einem hohen Risiko für Arteriosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen. (2) Identifizierung der Ursprungszelle der CHIP-Mutationen sowie des Expansions- und Differenzierungsmusters. (3) Erfassung von klinischen und biologischen Assoziationen der CHIP-Mutationen. Den Schwerpunkt der Arbeit sollten die unter (2) genannte Untersuchung der Ontogenese und die Expansionsdynamik der CHIP darstellen. Weitere Fragestellungen, an denen der Autor dieser Arbeit mitgewirkt hat, waren die Untersuchung der Auswirkungen und klinischen Assoziationen einer Mutation im *EGR2*-Gen auf die Prognose der CLL sowie der klinischen Assoziationen und der Rolle der CHIP während chemotherapeutischer Behandlungen und der allogenen HSCT.

3. Methodik

3.1 Probenrekrutierung und Probenverarbeitung

Insgesamt konnten im Zeitraum von Juni 2015 bis Oktober 2017 Proben von 437 Patienten >55 Jahren gewonnen werden. Für die Kohorte ohne maligne Tumore konnten 365 PB- und 30 zugehörige KM-Proben gewonnen werden. Für die Kohorte mit malignen (soliden) Tumoren wurden 72 PB-Proben gesammelt. Die Aufklärung und schriftliche Einwilligung wurden entsprechend der Deklaration von Helsinki und nach positivem Ethikvotum der Ethikkommission der Charité durchgeführt. Die Patienten befanden sich in stationärer Behandlung auf einer kardiologischen, nephrologischen, rheumatologischen oder orthopädischen Station der Charité. Mit dem QIAamp DNA Mini Kit (*Qiagen, Hilden, DEU*) wurde genomische DNA aus Vollblut aufgereinigt und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Monozytäre Zellen und Granulozyten wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut angereichert und in einer Nährlösung (Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640), 70 %, Fetal-Bovine-Serum (FBS), 20 % (beide *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) und Dimethylsulfoxid (DMSO), 10 % (*Carl Roth, Karlsruhe, DEU*), bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alle Kits oder Protokolle wurden entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

3.2 Mutationsnachweis und bioinformatische Analyse

Beim Mutations-Screening wurden die Vollblut-DNA-Proben mittels gezielter Tiefensequenzierung auf das Vorhandensein von somatischen Mutationen untersucht. Dafür wurden das TruSight Myeloid Sequencing Panel (sequenzierte Proben: $n = 268$), das 95 % der zum Zeitpunkt der Untersuchung beschriebenen Mutationen der CHIP abdeckt [37], und eine nach neueren Forschungsergebnissen aktualisierte, individuell angepasste Version, das Custom Myeloid Panel (sequenzierte Proben: $n = 97$), verwendet (siehe Tabelle 1).

Für die Probenaufbereitung wurden zunächst die Zielregion flankierende DNA-Oligonukleotide (Oligos) an die durch Hitzedenaturierung einzelsträngig vorliegende DNA hybridisiert. Jedes Oligo

enthielt darüber hinaus auch universelle Adaptersequenzen für nachfolgende Schritte. Nicht hybridisierte Oligos wurden anschließend durch Waschen mit verschiedenen Waschlösungen und -puffern entfernt. Eine Polymerase verlängerte nun das vorgelagerte Oligo (*extension*) und eine Ligase verband das Produkt mit dem '5-Ende des nachgelagerten Oligos (*ligation*). Nun wurden alle Produkte (insgesamt eine sogenannte genetische Library) mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* = PCR) amplifiziert, mit patienten- oder probenspezifischen Indexadaptern markiert und um für die Bildung der Cluster nötige Sequenzen erweitert. Die Proben wurden mithilfe magnetischer Beads gereinigt und die Länge der PCR-Produkte mittels Bioanalyzer (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*) überprüft. Für eine ausgeglichene Repräsentation einzelner Proben wurde ihre Quantität normalisiert. Nach einem Pooling von 8 bis 24 Proben wurden diese auf einer MiSeq- oder einer HiSeq-Sequenziermaschine unter Verwendung des MiSeq Reagent Kit v2 beziehungsweise des Rapid Duo cBot v2 Sample Loading Kit sequenziert. Die Proben aus der Kohorte mit malignen Tumoren, der Kohorte der Stammzellspender und Teile der *EGR2*-Kohorte wurden ebenfalls entsprechend analysiert. Alle hierbei verwendeten Geräte und Reagenzien stammten von der Firma *Illumina (San Diego, CA, USA)* und wurden entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Beim Screening der *EGR2*-Hotspot-Region kam darüber hinaus noch das Sanger Sequencing zum Einsatz. Das Sanger Sequencing wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt [38].

| Gen | Zielregion (Exon) | Gen | Zielregion (Exon) | Gen | Zielregion (Exon) | Gen | Zielregion (Exon) | Gen | Zielregion (Exon) | Gen | Zielregion (Exon) |
|----------------|--------------------------------------|-----------------|-------------------|---------------|-------------------|------------------|-------------------|----------------|-----------------------------------|-----------------|-------------------|
| <i>ABL1</i> | 4–6 | <i>CBLC</i> | 9, 10 | <i>GATA2</i> | 2–6 | <i>KLHDC8A**</i> | komplett | <i>PPM1D**</i> | 5, 6 (Exon 6: Codierende Sequenz) | <i>STAT3**</i> | 20, 21 |
| <i>ASXL1</i> | 12 | <i>CDKN2A</i> | komplett | <i>GNAS</i> | 8, 9 | <i>KRAS</i> | 2, 3 | <i>PTEN</i> | 5, 7 | <i>TET2</i> | 3–11 |
| <i>ASXL2**</i> | 12, 13 (Exon 13: Codierende Sequenz) | <i>CEBPA*</i> | komplett | <i>GNB1**</i> | 2, 3, 4, 5 | <i>MLL</i> | 5–8 | <i>PTPN11</i> | 3, 13 | <i>TP53</i> | 2–11 |
| <i>ATRX*</i> | 8–10, 17–31 | <i>CSF3R</i> | 14–17 | <i>HRAS</i> | 2, 3 | <i>MPL</i> | 4**, 10, 12** | <i>RAD21</i> | komplett | <i>U2AF1</i> | 2, 6 |
| <i>BCOR</i> | komplett | <i>CUX1</i> | komplett | <i>IDH1</i> | 4 | <i>MYB**</i> | komplett | <i>RUNX1</i> | komplett | <i>WT1</i> | 7, 9 |
| <i>BCORL1</i> | komplett | <i>DNMT3A</i> | komplett | <i>IDH2</i> | 4 | <i>MYD88</i> | 3–5 | <i>SETBP1</i> | 4 (teilweise) | <i>ZRSR2</i> | komplett |
| <i>BRAF</i> | 15 | <i>ETV6/TEL</i> | komplett | <i>IKZF1</i> | komplett | <i>NOTCH1</i> | 26–28, 34 | <i>SF3B1</i> | 13–16 | <i>ZBTB7A**</i> | komplett |
| <i>BRCC3**</i> | komplett | <i>EZH2</i> | komplett | <i>JAK2</i> | 12, 13**, 14 | <i>NPM1</i> | 12 | <i>SMC1A</i> | 2, 11, 16, 17 | | |
| <i>CALR</i> | 9 | <i>FBXW7</i> | 9, 10, 11 | <i>JAK3</i> | 13 | <i>NRAS</i> | 2, 3 | <i>SMC3</i> | 10, 13, 19, 23, 25, 28 | | |
| <i>CBL</i> | 8, 9 | <i>FLT3</i> | 14, 15, 20 | <i>KDM6A</i> | komplett | <i>PDGFRA</i> | 12, 14, 18 | <i>SRSF2</i> | 1 | | |
| <i>CBLB</i> | 9, 10 | <i>GATA1</i> | 2 | <i>KIT</i> | 2, 8–11, 13, 17 | <i>PHF6</i> | komplett | <i>STAG2</i> | komplett | | |

Tabelle 1: Liste der Gene und Zielregionen, die im TruSight Myeloid Sequencing Panel und im modifizierten Custom Myeloid Panel untersucht wurden. * Im Custom Myeloid Panel ausgeschlossen. ** Ausschließlich im Custom Myeloid Panel

Jede im Screening nachgewiesene Variante wurde entweder mit der gezielten Tiefensequenzierung, der Digital Droplet PCR (ddPCR) oder dem Sanger Sequencing validiert und quantifiziert. Für die Tiefensequenzierung wurden mit dem Programm *Primer 3 Plus* [39] Primer entworfen, die die potentiellen Einzelnukleotid-Varianten (*single nucleotide variant* = SNV) flankierten. Dabei wurden die Orte der Primerhybridisierung so gewählt, dass die Zielregion in den 100–200 Basenpaare (bp)

langen Amplikons enthalten ist. Zur Indizierung der Proben wurde das NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit (*New England Biolabs, Ipswich, MA, USA*) verwendet. Die Sequenzierung wurde auf einer MiSeq-Sequenziermaschine unter Verwendung des MiSeq Reagent Kit v2 (300 Zyklen, *Illumina*) durchgeführt [14, 40–42]. Für die Analyse der Mutations-Hotspots *DNMT3A* R882C und R882H, *JAK2* V617F, *U2AF1* S34F wurde die ddPCR verwendet. Da die Amplifikation hier mit vereinzelt DNA-Molekülen in einer großen Anzahl kleinster Tröpfchen (Droplets) durchgeführt wird, können auch Varianten mit einer sehr niedrigen Frequenz zuverlässig nachgewiesen werden. Spezifische fluoreszenzgekoppelte Sonden binden dabei entweder spezifisch an den Wildtyp oder die Variante, sodass bei der Auswertung einzelner Droplets ein digitales Ergebnis gemessen werden kann [43]. Die Droplets wurden dabei mittels eines QX200 Droplet Generator erzeugt, auf einem QX200 Droplet Reader ausgelesen und mittels der Software QuantaSoft V.1.7.4 analysiert (alle von der Firma *Bio-Rad, Hercules, CA, USA*). Die Dropletgenerierung und die Analyse wurden entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Im Screening konnten elf Varianten in GC-reichen Regionen detektiert werden, die sich aus technischen Gründen nur unzureichend mittels gezielter Tiefensequenzierung validieren ließen. Daher musste in diesen Fällen alternativ auf das Sanger Sequencing ausgewichen werden.

Zur Qualitätssicherung wurden Proben mit einer durchschnittlichen Abdeckung durch die sequenzierten Fragmente (reads) von weniger als 300 reads von der Auswertung ausgeschlossen. Die genetischen Daten wurden mithilfe des Programms BWA-MEM (Version 0.7.15-r1140) [44] gegen das GRCh37-Referenz-Genom mit zusätzlichen Decoy-Sequenzen (hs37d5) und Sequenzen des Epstein-Barr-Virus abgeglichen (Alignment). Zum lokalen Alignment um Indels wurde der GATK IndelRealigner (3.6-0-g89b7209) eingesetzt [45]. Zur Detektion von Varianten kamen die Programme SAMtools (Version 1.3.1) [46] und Varscan (Version 2.4.2) [47] zum Einsatz. Eine Variante musste folgende Qualitätskriterien erfüllen: (1) Minimale VAF von $> 1\%$, (2) minimale Abdeckung von 50 reads und (3) mindestens 10 reads, die die Variante bestätigten. Die funktionelle Zuordnung (Annotation) wurde mittels Jannovar (Version 0.16) [48] unter Verwendung des Ensembl Transcript Set vorgenommen. Zum Abgleich auf bekannte Polymorphismen und somatische Mutationen wurden die Daten auch in die dbSNP-Datenbank (b146/GRCh37p13) und die COSMIC-Datenbank (COSMIC v76) eingegeben. Nach dieser Auswertung wurde eine Variante von der weiteren Analyse ausgeschlossen, wenn (1) die VAF $< 2\%$ war, (2) wenn sie als intronische oder synonyme Variante erkannt wurde, (3) wenn sie in der dbSNP-Datenbank als Polymorphismus bekannt war und ihre VAF zwischen 45% und 55% oder $> 95\%$ lag und wenn sie bis dahin noch nie als somatische Mutation in der COSMIC-Datenbank beschrieben wurde. Varianten, die in folgenden Hotspot-Regionen lagen, wurden jedoch stets gesondert analysiert: *SF3B1* K666N und K700E, *JAK2* V617F, *DNMT3A* R882C/H, *U2AF1* S34F und Q157P/R, *GNB1* K57E, *SFRS2* P95L. Varianten, die den oben genannten

Kriterien entsprachen, wurden anschließend manuell unter Verwendung des Integrative Genome Viewer (IGV, *Broad Institute*, Version 2.3) [49, 50] begutachtet und für weitere Validierungsschritte ausgewählt. Die Analyse für die gezielte Tiefensequenzierung zur Validierung und Quantifizierung einer Variante entsprach dem des Screening-Prozesses. Die Varianten wurden dabei mit der Software freeBayes (Version 1.0.2) [51] identifiziert und manuell im IGV analysiert.

3.3 Durchflusszytometrische Experimente

In einem nächsten Schritt wurden validierte Mutationen in den zellulären Subfraktionen des PB und des KM quantifiziert. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting* = FACS) sortiert. Beim FACS werden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert. Diese richten sich gegen bestimmte zelluläre Oberflächenproteine und können im FACS-Gerät an einem spezifischen laserinduzierten Lichtimpuls erkannt werden. Zellen mit einem bestimmten Fluoreszenzprofil können dann mittels eines elektrostatischen Sortiermechanismus von anderen Zellen getrennt werden (Sorting) [52]. Das Sorting fand auf einem Aria II SORP Zellsorter (*BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA*) statt. Zur Vorbereitung auf das Sorting wurden die bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefrorenen mononukleären Zellen in $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmem Wasser aufgetaut und in ein Nährmedium (RPMI-1640, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) überführt. Die granulozytären Zellen wurden separat vorbereitet und sortiert. Die Proben wurden dann über 24 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert und anschließend mittels Zählkammer gezählt. Nun konnten die Zellen entsprechend der vorhandenen Zellzahl und der Herstellerangaben gefärbt werden. Die für die Färbung der Zellen genutzten Antikörper sowie eine für das Sorting eingesetzte Definition der Zellpopulationen sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt.

| Zelltyp | Gating-Strategie/Definition |
|--|---|
| CD34+ Hämatopoetische Progenitorzellen | DAPI(-), CD3(-), CD34(+) |
| Monozyten | DAPI(-), CD3(-), CD14(+), CD19(-) |
| B-Zellen | DAPI(-), CD3(-), CD19(+) |
| T-Zellen | DAPI(-), CD3(+), CD19(-) |
| Natürliche Killerzellen (NK-Zelle) | DAPI(-), CD3(-), CD14(-), CD19(-), CD56(+) |
| Granulozyten | CD45(+), CD66b(+) |
| Hämatopoetische Stammzellen (hematopoietic stem cells = HSC) | Lineage(-), CD34(+), CD38(-), CD90(+) |
| Multipotente Vorläuferzellen (<i>multipotent progenitors</i> = MPP) | Lineage(-), CD34(+), CD38(-), CD45(-), CD90(-) |
| Lymphatisch veranlagte multipotente Vorläuferzellen (<i>lymphoid-primed multipotent progenitors</i> = LMPP) | Lineage(-), CD34(+), CD38(-), CD45(+), CD90(-) |
| Gemeinsame Vorläuferzellen von Granulozyten und Makrophagen (<i>granulocyte-macrophage progenitors</i> = GMP) | Lineage(-), CD34(+), CD38(+), CD45(-), CD110(-) |
| Gemeinsame myeloische Vorläuferzellen (<i>common myeloid progenitors</i> = CMP) | Lineage(-), CD34(+), CD38(+), CD45(+), CD110(-) |

Tabelle 2: Definition der einzelnen hämatopoetischen Untergruppen des peripheren Blutes und des Knochenmarks.

| Zelltyp | Antikörper |
|-----------------------------------|--|
| CD34+ Stamm- und Progenitorzellen | CD34-PE (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) |
| Monozyten | CD14-APC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) |
| B-Zellen | CD19-PE-Cy7 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) |
| T-Zellen | CD3-FITC (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) |
| NK-Zelle | CD56-PerCP-Cy5.5 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) |
| Granulozyten | CD45-PerCP-5.5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), CD66b-PE (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) |
| HSCs | CD34-PE (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA), CD90-PerCP-Cy5.5 (BioLegend, San Diego, CA, USA) |
| MPPs | CD34-PE (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) |
| LMPPs | CD34-PE (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA), CD45-RA-PE-Cy7 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) |
| GMPs | CD34-PE, CD38-AF700, CD110-APC (alle Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) |
| CMPs | CD34-PE, CD38-AF700, CD45-RA-PE-Cy7 (alle Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) |

Tabelle 3: Antikörper, welche für die Durchflusszytometrie verwendet wurden.

Zur Markierung avitaler Zellen wurde direkt vor dem Sorting 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) zugesetzt. Die Gating-Strategie zum Sortieren der verschiedenen Zellpopulationen ist exemplarisch in Abbildung 1 dargestellt. Aus den KM-Proben mussten vor dem Sorting mittels einer Negativselektion (*lineage depletion*) die reifen Zellen entfernt werden. Hier kam der *human hematopoietic lineage cocktail* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) zum Einsatz. Dieser markiert via Biotin-konjugierter Antikörper Zellen, die Oberflächenproteine reifer Zellen tragen. Mittels magnetischer anti-Biotin MicroBeads (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DEU*) wurden die so markierten Zellen entfernt. Im Sorter konnten verbleibende antikörpertragende Zellen durch den mit dem Fluoreszenzfarbstoff Brilliant Violet 421 gekoppelten anti-Biotin Antikörper Streptavidin (*BioLegend, San Diego, CA, USA*) erkannt werden. Alle sortierten Zellen wurden anschließend gewaschen, gezählt und dann bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Isolierung genomischer DNA kam das NucleoSpin Tissue XS Kit (*Macherey-Nagel, Düren, DEU*) zum Einsatz.

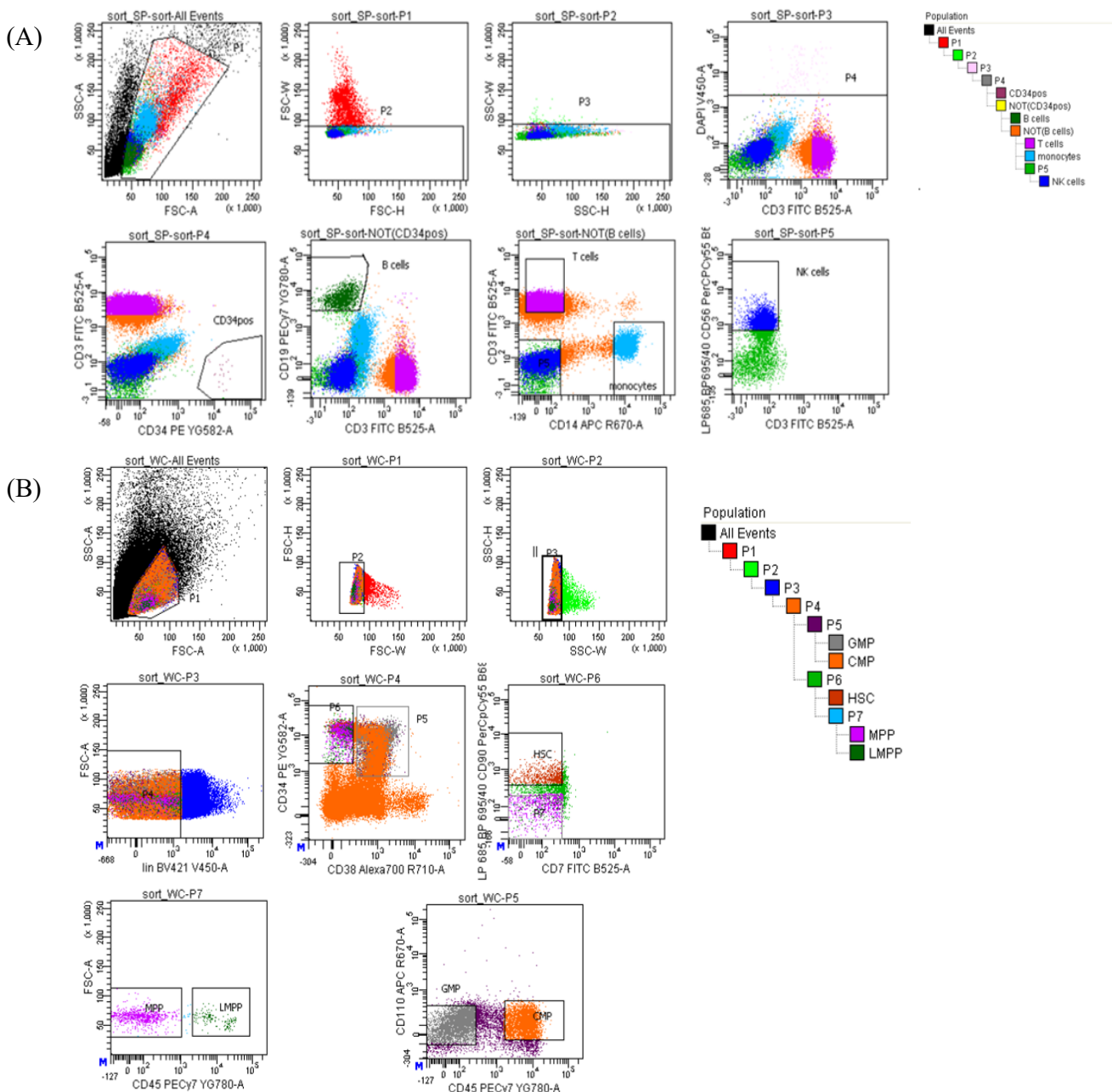


Abbildung 1: Exemplarische visuelle Darstellung der Gating-Strategie für das periphere Blut (A) und das Knochenmark (B). 10

3.4 Statistische Analysen

Für die Berechnung von Assoziationen wurde der exakte zweiseitige Fisher-Test verwendet. Zum Vergleich von Basisparametern wurde der zweiseitige Chi-Quadrat-Test für kategoriale Variablen und der zweiseitige Mann-Whitney U-Test für den Vergleich verwendet. Das Signifikanzniveau betrug $P = <0.05$. Weitere eingesetzte statistische Verfahren waren unter anderem: Kaplan-Meier-Methode, Log-Rank-Test, Gray's Test, multivariate Analyse und Risiko-Regressionsmodell nach Fine und Gray und die Cox-Regressionsanalyse. Für die statistischen Analysen wurden unter anderem folgende Programme verwendet: IBM SPSS Statistics (Version 23, *IMB, Armonk, NY, USA*), R (Version 3.3.1) und RStudio (Version 0.99.463, *RStudio, Bosten, MA, USA*) und Statistica Software 13.0 (*Dell Inc., Round Rock, TX, USA*).

4. Ergebnisse

4.1 Mutationsanalyse der Klonalen Hämatopoese von unbestimmtem Potential an 437 Patienten

Bei der Analyse der Mutationen konnten keine Unterschiede zwischen der Kohorte mit und der ohne maligne Tumore bezüglich der CHIP-Prävalenz, der betroffenen Gene, der Anzahl der Mutationen pro Patienten und der VAF der Mutationen festgestellt werden. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich daher auf die gemeinsame Datenauswertung beider Kohorten. Im Durchschnitt konnte eine Abdeckung von 34,500 reads/Amplikon im Rahmen der Validierung erreicht werden. In 97 % der Fälle konnten mindestens 500 reads und in 95 % der Fälle mindestens 1000 reads pro untersuchter Base sichergestellt werden. Die VAF des Screenings korrelierte dabei gut mit der VAF der Validierung (Pearson Korrelationskoeffizient $r = 0,93$). Bei der Durchführung mehrerer Verdünnungsreihen zeigte sich, dass die Messungen mittels ddPCR und durch die gezielte Tiefensequenzierung sehr genau waren (Determinationskoeffizient $R^2 > 0,91$ und $R^2 > 0,92$, jeweils für alle Mutationen). Von 201 potentiellen Varianten konnten 168 Varianten in 121 Patienten validiert werden, was eine CHIP-Prävalenz von 27,7 % ($121/437 = 27,7\%$) in unserer Gesamtkohorte ergab. Es zeigte sich, dass die meisten Individuen nur eine Mutation aufwiesen ($87/121 = 71,9\%$). Deutlich seltener konnten zwei ($23/121 = 19\%$), drei ($9/121 = 7,4\%$) oder sogar vier ($2/121 = 1,7\%$) Mutationen in einem Patienten gleichzeitig nachgewiesen werden. Die häufigsten mutierten Gene waren dabei *DNMT3A* ($59/437 = 13,5\%$), *TET2* ($34/437 = 7,8\%$), *ASXL1* ($11/437 = 2,5\%$), *SF3B1* ($9/437 = 2,1\%$), *PPM1D* ($4/148 = 2,7\%$), *TP53* ($8/437 = 1,8\%$) und *RAD21* ($5/437 = 1,1\%$) (siehe Abbildung 2). Über 70 % der nachgewiesenen 122 SNVs waren dabei Transitionen. Der am häufigsten nachgewiesene Basenaustausch (Cytosin → Thymin) scheint dabei typisch für Mutationen zu sein, die während des Alterungsprozesses erworben werden [53, 54]. Von den 66 *DNMT3A*-Varianten waren 42 Punktmutationen und 24 solche Mutationen, bei denen es aufgrund einer Verschiebung des Leserasters mit Entstehung eines vorzeitigen Stop-Codons zu einem Abbruch der Proteinsynthese kommt (Truncating-Mutation). Von den 40 *TET2*-Varianten waren hingegen 11 Punktmutationen und 29 Truncating-Mutationen. Die

Kombination aus einer *DNMT3A*- und einer *TET2*-Mutation war unter den 34 Patienten mit mehr als einer Mutation die häufigste Kombination ($n = 10$). Seltener waren die Varianten *DNMT3A/DNMT3A* ($n = 5$) und *TET2/TET2* ($n = 4$). Darüber hinaus zeigte sich, dass Patienten mit einer *TET2*-Mutation häufiger als Patienten mit einer *DNMT3A*-Mutation weitere Mutationen aufwiesen. Sie traten signifikant vermehrt im Verbund mit einer *DNMT3A*-Mutation ($P = .015$), einer *ASXL1*-Mutation ($P = .046$) und der zusammengefassten Gruppe von seltener mutierten Genen ($P = .025$) auf.

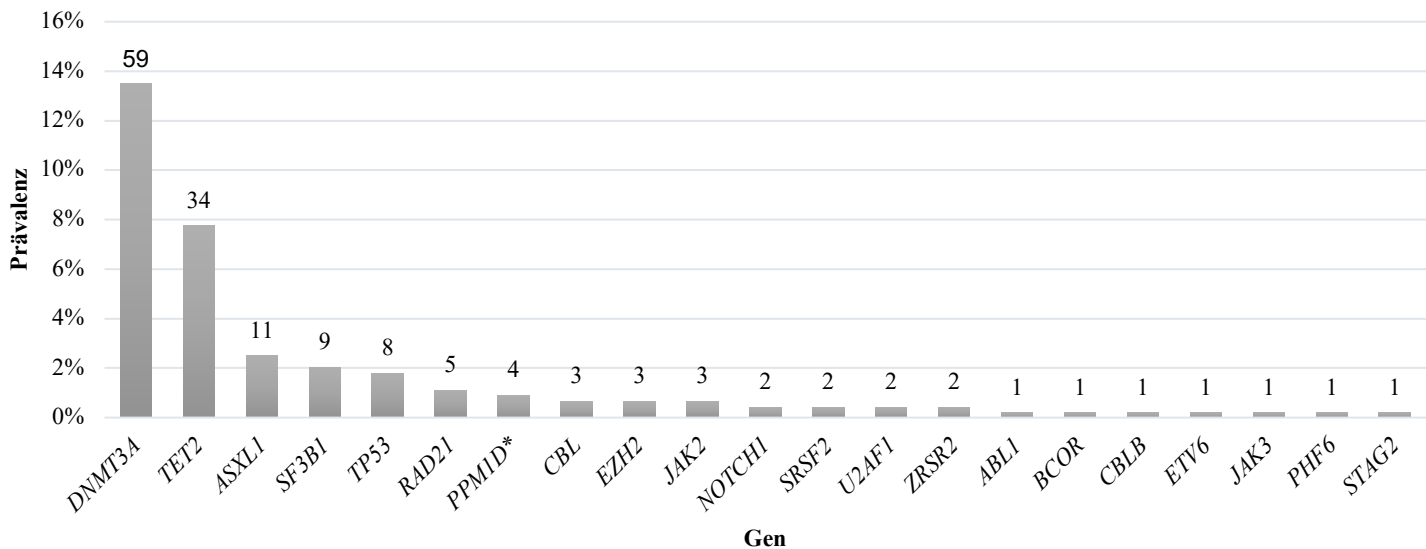


Abbildung 2: Prävalenz von CHIP-assoziierten Mutationen in 437 älteren Individuen. **PPM1D* wurde nur in 148 Patienten sequenziert.

4.2 Mutationslast in sortierten Zellfraktionen des peripheren Blutes

In 63 Patienten konnten 91 Mutationen für sechs Zellfraktionen des PB bestimmt werden. Die mediane VAF der Mutationen lag bei 5,1 % für $CD34^+$ Vorläuferzellen, bei 7,1 % für Monozyten, bei 6,3 % für Granulozyten, bei 6,0 % für NK-Zellen, bei 1,9 % für B-Zellen und bei 0,5 % für T-Zellen (siehe Abbildung 3 (A)). B- und T-Zellen wiesen somit eine hochsignifikant niedrigere Mutationslast auf, sowohl im Vergleich zum Vollblut (Mediane Screening VAF 6 %) als auch zu allen anderen zellulären Subfraktionen ($P < .001$). NK-Zellen wiesen eine hochsignifikant höhere Mutationslast als T- und B-Zellen auf ($P < .001$) und erreichten regelmäßig die VAFs der myeloischen Zellfraktionen. Das ist bemerkenswert, da diese sowie die T-Zellen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle, dem gemeinsamen lymphatischen Vorläufer (*common lymphoid precursor* = CLP), abstammen. Vorläuferzellen mit einer CHIP-Mutation schienen also deutlich häufiger in Richtung der myeloischen Zellreihen und der NK-Zellen und nur sehr viel seltener in die lymphatischen Zellreihen zu differenzieren. Bei Betrachtung der fünf häufigsten CHIP-Mutationen (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *SF3B1* und *TP53*) konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der medianen VAF in den verschiedenen Zellfraktionen gefunden werden. Einzig auffällig war, dass die *DNMT3A*-Mutationslast in der T-Zellfraktion signifikant höher war als die der anderen CHIP-Mutationen ($P < .001$) (siehe Abbildung 3 (B)).

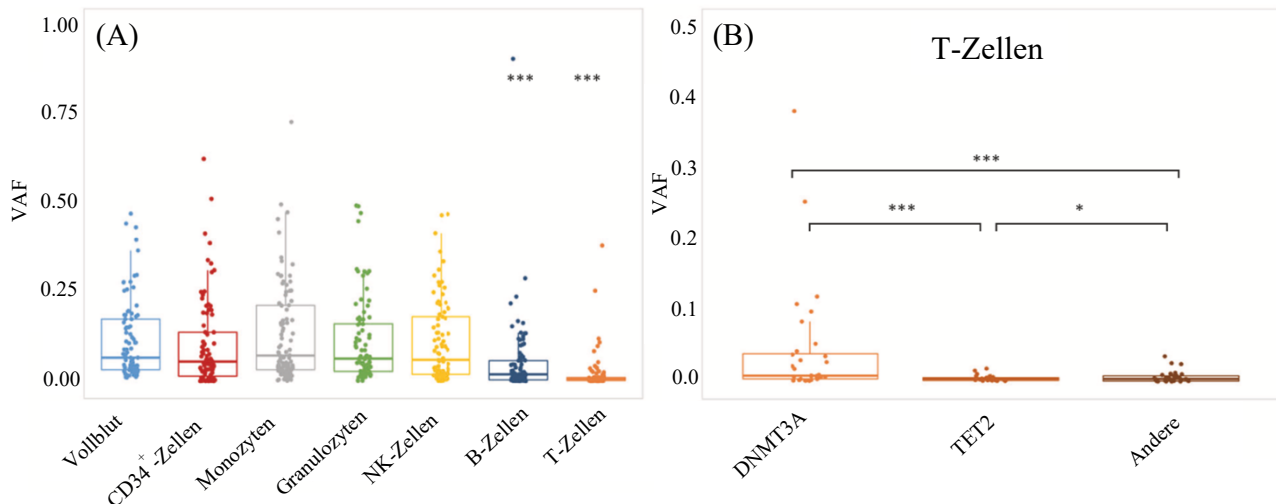


Abbildung 3: Die Boxplots stellen die VAFs der klonalen Mutationen in den sortierten Zellfraktionen des peripheren Blutes dar (A) Die VAFs in den B- und T-Zellen waren signifikant niedriger als in allen anderen Zellfraktionen ($P = <.0001$ für alle Vergleiche), wie durch *** angezeigt. (B) Vergleich der T-Zell-VAFs von *DNMT3A*, *TET2* und der Summe der restlichen CHIP-Mutationen („Andere“). Der Unterschied in den T-Zell-VAFs zwischen *DNMT3A* und *TET2* sowie zwischen *DNMT3A* und der restlichen Kohorten war hochsignifikant ($P = <.001$ für jeden Vergleich). Der Unterschied zwischen den VAFs von *TET2* in den T-Zellen und den VAFs der verbleibenden Gene war ebenfalls signifikant ($P = .041$). Die Abbildungen stammen aus dem Originalpaper.

4.3 Mutationslast in den sortierten Zellfraktionen des Knochenmarks

Es konnten insgesamt KM-Proben von neun Patienten mit nachgewiesenen CHIP-Mutationen analysiert werden. In allen Fällen konnte die spezifische Mutation bereits in der frühesten hämatopoetischen Stammzellfraktion (Lin^- , CD34^+ , CD38^- HSCs) nachgewiesen werden. Um die Expansion einer Mutation von der hämatopoetischen Stammzelle hin zu den reifen hämatologischen Zellen des peripheren Blutes zu analysieren, wurde die Expansionsrate (ER) der Mutationen berechnet ($\text{ER} = \text{VAF}(\text{Monozyten})/\text{VAF}(\text{HSCs})$ oder $\text{ER} = \text{VAF}(\text{Granulozyten})/\text{VAF}(\text{HSCs})$). Entsprechend der unterschiedlichen Expansionsprofile erfolgte eine Einteilung in drei Untergruppen. Drei Patienten wiesen eine geringe ER <2 auf (siehe Abbildung 4 (A)), wohingegen drei weitere Patienten eine mittelgradige ER von ~ 3 aufwiesen (siehe Abbildung 4 (B)). In diesen Fällen konnte eine stetige Expansion von den Vorläufern hin zu den reifen Zellen beobachtet werden. In drei anderen Fällen kam es hingegen zu einer deutlich stärkeren Expansion (ER 6,5–88), die vor allem während der frühen Differenzierung von Stamm- zu oligopotenten Progenitorzellen auftrat (siehe Abbildung 4 (C)). Lag bei einem Patienten mehr als eine Mutation vor, so zeigten sämtliche Mutationen meistens ein ähnliches Muster ihrer Expansion. Das weist darauf hin, dass sich diese Mutationen innerhalb eines Klons entwickelt haben (siehe Abbildung 4 (C)). Es traten jedoch auch Fälle auf, bei denen zwei verschiedene Mutationen innerhalb eines Patienten ein unterschiedliches Expansionsverhalten aufwiesen. So zeigte sich bei der Probe UPN039 eine *DNMT3A* R882H-Mutation, die hauptsächlich in den NK-Zellen (18 %) nachgewiesen werden konnte. In den anderen Fraktionen lag diese Mutation nur mit einer VAF zwischen 2–5 % vor. Des Weiteren konnte eine *TP53*-Mutation mit einer VAF von 91 % in den B-Zellen identifiziert werden. Die sehr hohe VAF weist hier auf den Verlust der Heterozygotie in den B-Zellen hin. Dies sind zwei starke Hinweise für die unabhängige Entstehung und Expansion der beiden Mutationen innerhalb dieses Patienten. Darüber hinaus konnten in der Probe UPN161 zwei *TET2*-Mutationen nachgewiesen werden (Q440* und T443fs). Während Q440* mit

einer VAF von 8 % in den Monozyten und Granulozyten nachgewiesen werden konnte, trat T443fs nahezu ausschließlich in den NK-Zellen mit einer VAF von 21 % auf. Auch konnten die Mutationen in >1000 reads nicht im selben DNA-Molekül nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass es sich hier um zwei verschiedene Klone handelt.

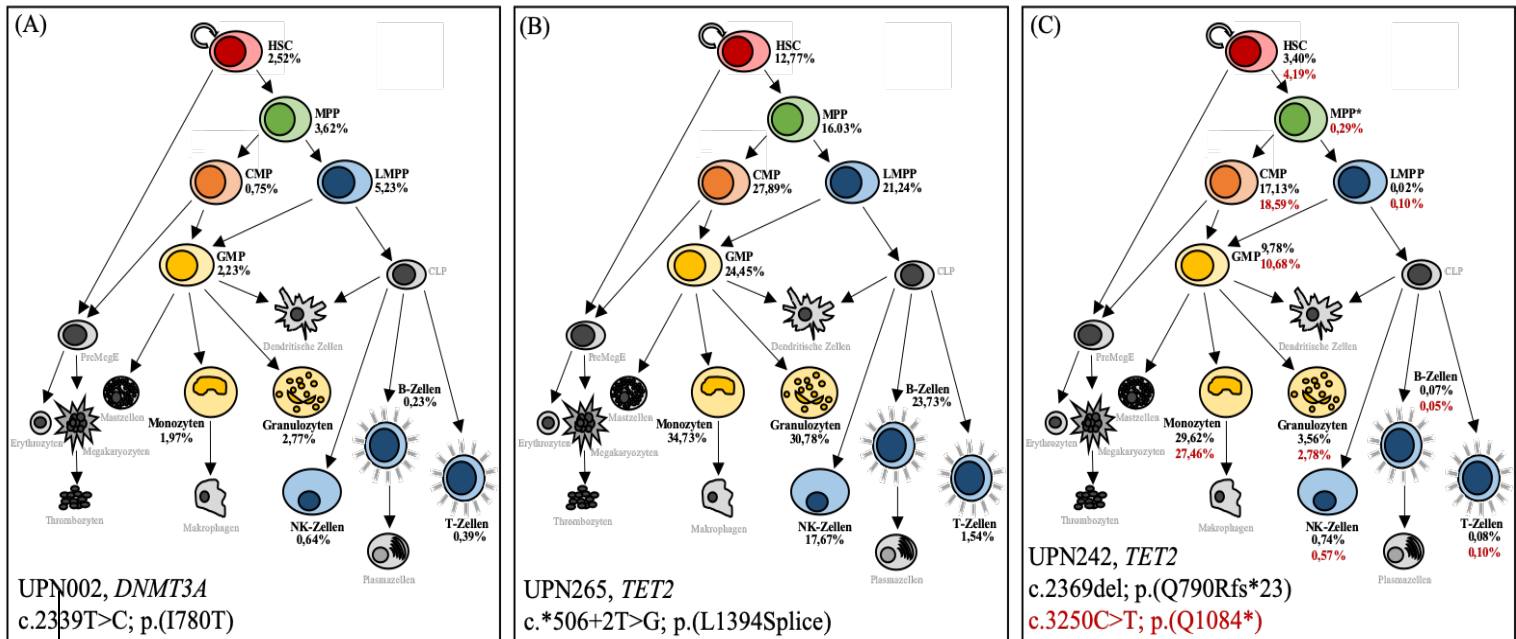


Abbildung 4: Die VAFs (in %) von CHIP-assoziierten Mutationen in den zellulären Subfraktionen. (A) Eine geringe ER von 1,1 wurde für *DNMT3A* I780T in UPN002 berechnet. (B) Eine Mutation, welche zu Veränderungen in der für das Spleißen wichtigen Regionen führt (Splicesite-Mutation) in *TET2* in UPN265 zeigte eine mittelgradige ER von 2,7. (C) Beide in UPN 424 nachgewiesenen *TET2*-Mutationen zeigten eine hohe ER von 6,6 bzw. 8,7. Die Expansion bei diesem Patienten war jedoch nicht konstant, sondern erfolgte vor allem während der frühen Differenzierung der Stammzellen zu den oligopotenten Vorläuferzellen (HSCs zu CMPs). Die Abbildungen stammen aus dem Originalpaper.

4.4 Korrelation des Mutationsstatus mit klinischen Variablen

Patienten mit CHIP waren in der Kohorte signifikant älter als Patienten ohne CHIP (Median 76,4 Jahre versus (vs.) 73,5 Jahre; $P = <.001$). Die Mutationsprävalenzen lagen dabei für das Lebensalter im Bereich von 55–69, 70–79, 80–89 und 90–99 Jahren bei jeweils 16,8 %, 29,3 %, 35,2 % und 66,7 % ($P = .001$). Auch stieg mit dem Alter die Anzahl der Mutationen pro Patienten ($P = .003$). Der häufigste Befund bei der Betrachtung der Laborparameter war eine Anämie ($81/437 = 18,5$ %). Eine Korrelation mit dem CHIP-Status ließ sich dabei nicht feststellen. Allerdings zeigte sich, dass Patienten mit CHIP eine höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten aufwiesen (Median 6 vs. $5,2 \times 10^9/l$, $P = .022$) und generell zu höheren Leukozyten- (Median 8,4 vs. $7,9 \times 10^9/l$, $P = .068$) und Monozytenzahlen neigten (Median 0,7 vs. $0,7 \times 10^9/l$, $P = .072$). Auch der RDW-Wert war signifikant erhöht (Median 14,6 vs. 14,1 %, $P = .042$). In der Kohorte ohne maligne Tumore zeigte sich außerdem, dass Patienten mit einer CHIP-Mutation ein erhöhtes Risiko für die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) haben ($P = .043$, alterskorrigiert). Werden die Patienten mit mehr als einer Mutation ($n = 34$) isoliert betrachtet, zeigt sich außerdem, dass dies hochsignifikant mit einer pAVK ($P = .001$, alterskorrigiert) und signifikant mit einem Diabetes Mellitus (DM) Typ 2 ($P = .034$, alterskorrigiert) assoziiert ist.

4.5 Weitere Ergebnisse

In der Kohorte mit malignen Tumoren konnten 33 Mutationen in 22 Patienten ($22/72 = 30,6\%$) nachgewiesen werden. Zu 121 Zeitpunkten wurde vor und im Verlauf der Chemotherapie die Mutationslast im Vollblut bestimmt. Während die VAF einiger Mutationen im Verlauf der Therapie anstieg oder abfiel, war diese vor allem bei den *DNMT3A*-Mutationen meist konstant (als Grenzwert wurde eine Veränderung der VAF $\pm 50\%$ der Ausgangs-VAF festgelegt: $1/13 = 7,7\%$ vs. $13/19 = 68,4\%$; $P < .001$). Wurden die sieben alleinig *DNMT3A*-mutierten Patienten aus der Analyse ausgeschlossen, zeigte sich, dass es nach sechs Zyklen zu einem erniedrigten Hämoglobinlevel ($P = .017$) und einem erhöhten Transfusionsbedarf roter Blutzellen ($P = .025$) bei CHIP-positiven Patienten kam. Auch kam es bei ihnen häufiger zu einer Dosisreduktion ($P = .035$) der Chemotherapie. Andere erfasste Faktoren blieben unbeeinflusst vom CHIP-Status.

In der Kohorte der allogenen Stammzellspender konnten 92 Mutationen in 80 Spendern ($80/500 = 16\%$) mit einer medianen VAF von $5,9\%$ nachgewiesen werden. Auch hier stieg die CHIP-Prävalenz mit dem höheren Lebensalter der Spender an. Die häufigsten mutierten Gene waren auch hier *DNMT3A* ($8,0\%$) und *TET2* ($2,2\%$). In 24 von 25 untersuchten Fällen zeigte sich, dass die CHIP-positiven Stammzellen im Verlauf nach Transplantation zur Hämatopoese des Empfängers beitragen und in der Hälfte der Fälle sogar überproportional stark expandierten. Empfänger eines CHIP-positiven Transplantats haben eine höhere Inzidenz für eine chronische Graft-versus-Host-Erkrankung ($P = .008$). Dafür scheinen vor allem *DNMT3A*-Mutationen verantwortlich zu sein ($P = .006$). Des Weiteren zeigte sich einerseits eine niedrigere Inzidenz für ein Rezidiv der Grunderkrankung oder eine Krankheitsprogression ($P = .027$), andererseits aber auch ein erhöhtes Risiko für eine DCL ($P = .026$). Trotzdem konnte insgesamt kein Einfluss des CHIP-Status auf die Mortalität oder das OS ($P = .434$) der Empfänger nachgewiesen werden.

Ferner konnte gezeigt werden, dass CLL-Patienten mit einer *EGR2*-Mutation ($91/2403 = 3,8\%$) signifikant jünger (57 vs. 62 Jahre; $P = .0042$) und zum Zeitpunkt der Diagnose häufig bereits in einem höheren Krankheitsstadium (Binet-Stadium B/C 56% vs. 30% ; $P = .0005$) sind. In einer der untersuchten Kohorten ($n = 1178$) hatten Patienten mit einer *EGR2*-Mutation mit einer VAF $> 5\%$ im Vergleich zu CLL-Patienten mit einem *EGR2*-Wildtyp eine signifikant geringere Zeitspanne bis zur ersten Behandlung (*time to first treatment* = TTFT) (Median $7,8$ vs. $38,5$ Monate; $P = < .001$) und ein signifikant niedrigeres OS (Median, $74,7$ vs. $127,2$ Monate; $P = < .001$). In multivariaten Analysen blieb eine *EGR2*-Mutation auch unter Berücksichtigung anderer molekularer Marker und klinischer Variablen, wie zum Beispiel dem Alter, dem Geschlecht oder dem Binet-Stadium, ein unabhängiger negativer prognostischer Marker sowohl für die TTFT ($P = .047$) als auch für das OS ($P = .014$). Diese Beobachtungen bestätigten sich bei der Auswertung der Daten einer Validierungs-Kohorte.

5. Diskussion

5.1 Charakter und klinische Relevanz der Klonalen Hämatopoese von unbestimmtem Potential

Diese Arbeit beschäftigte sich hauptsächlich mit der Identifizierung der Ursprungszelle der CHIP sowie der Beschreibung ihres klonalen Expansionsmusters innerhalb der hämatopoetischen Differenzierung. Bei der Betrachtung des Gesamtbildes wurden jedoch auch klinische Parameter mit einbezogen. Wie bereits vielfach vorbeschrieben, korreliert die Prävalenz der CHIP-Mutationen stark mit einem höheren Lebensalter. Auch die Mutationshäufigkeit bestimmter Gene in unserer Kohorte deckt sich mit den Ergebnissen vorheriger Publikationen [1–3, 55]. Im Vergleich zu den bereits publizierten Daten für Menschen derselben Altersgruppe ist die CHIP-Prävalenz ($121/437 = 27,7\%$) jedoch erhöht. Sie ist damit vergleichbar mit der CHIP-Prävalenz von Patienten mit hämatologischen (29,9 %) und nicht-hämatologischen (25 %) Krebserkrankungen. Auch war die Prävalenz an CHIP-positiven Patienten mit mehr als einer Mutation ($34/121 = 28,1\%$) erhöht. Für diese Beobachtungen gibt es mindestens zwei Erklärungen. (1) Es wurden gezielt Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder Krankheitsbildern rekrutiert, da die CHIP eine erhöhte Prävalenz für derartige Erkrankungen aufweist. (2) Vorherige Arbeiten nutzten häufig komplette Exomdaten. Dort lag der Detektions-Grenzwert zum Nachweis einer klonalen Hämatopoese bei einer VAF von 5 % [3, 19]. Mit der Tiefensequenzierung konnten SNVs mit niedrigeren VAFs zuverlässig bestimmt werden. Der von uns benutzte Grenzwert einer VAF von 2 % entspricht den gängigen Definitionen von CHIP [5].

Betrachtet man die mutierten Gene, so zeigt sich, dass Mutationen im *DNMT3A*- und *TET2*-Gen für den Großteil aller nachgewiesenen Mutationen verantwortlich sind, zudem treten beide Mutationen oft gemeinsam auf. Dies unterstreicht die zentrale Rolle der epigenetischen Regulation der Transkription in der Entstehung von CHIP. Trotzdem unterscheiden sich Mutationen in diesen Genen hinsichtlich ihrer Expansionsrate in die verschiedenen Zellkompartimente voneinander. Im Vergleich zu Patienten mit anderen Mutationen zeigten *DNMT3A*-mutierte Patienten eine höhere VAF im T-Zell-Kompartiment. Dies ließe sich dadurch erklären, dass der Erwerb der *DNMT3A*-Mutationen im Vergleich zu den anderen Mutationen in noch früheren HSCs stattfindet, die sich noch in alle Zellfraktionen differenzieren können. Vorstellbar wäre auch, dass *DNMT3A*-Mutationen zu einer weniger starken Expansion in das myeloische Kompartiment führen.

In der Entstehung von Malignomen spielt die schrittweise Akkumulation von Mutationen innerhalb einer Zelle eine wichtige Rolle [56]. Denkbar wäre, dass dies auch bei der Transformation von CHIP zu einer hämatologischen Neoplasie der Fall ist. So ist zum Beispiel bekannt, dass ältere Patienten mit einer Zytopenie und mehr als einer somatischen Mutation ein höheres Risiko aufweisen, in der Folge eine myeloische Neoplasie zu entwickeln [57]. In unserer Kohorte konnte der genaue zeitliche Ablauf des Erwerbs der Mutationen aufgrund der häufig niedrigen VAF bei Patienten mit zwei oder mehr Mutationen meistens nicht nachverfolgt werden. In vier Patienten konnte das Vorliegen von zwei

Klonen jedoch sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da die Summe der VAF von zwei Mutationen >50 % war. Für diese Fälle gilt, dass der Erwerb der Mutationen ein schrittweise ablaufender Prozess zu sein scheint.

In allen neun untersuchten Fällen mit vorhandenem KM-Material konnten die Mutationen bereits in den Lin⁻ CD34⁺ CD38⁻ HSCs nachgewiesen werden. Dies beweist, dass die CHIP hier ihren zellulären Ursprung hat. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte diese Ergebnisse bestätigen [58]. Unabhängig von der im Blut nachgewiesenen VAF oder des mutierten Gens fand die stärkste Expansion stets während der frühen Stadien der hämatopoetischen Differenzierung statt. Dies spricht für eine klonale Dominanz des CHIP-Klons im Stamm-/Progenitorzellkompartiment. Um die einzelnen Entwicklungsschritte individueller HSCs innerhalb der hämatopoetischen Differenzierung nachvollziehen zu können, müssen spezifische Zellen und Mutationen innerhalb dieses komplexen Systems *in vivo* nachverfolgt werden. Dies macht neue biotechnologische Ansätze nötig. Eine Möglichkeit bestünde in der Markierung einzelner HSCs mittels künstlicher DNA-Fragmente, sogenannter „Barcodes“ [59] oder der Untersuchung somatischer Mutationen innerhalb der Mitochondrien dieser Zellen [60]. Ebenfalls zu diskutieren ist, ob für den sicheren Nachweis einer CHIP zukünftig möglicherweise auch das KM untersucht werden muss, da Mutationen existieren, die nur im Stammzellkompartiment, nicht aber im PB detektiert werden können [58].

Als wichtige klinische Assoziation zeigte sich, dass der Nachweis von zwei oder mehr CHIP-Mutationen in der Kohorte ohne maligne Tumore alterskorrigiert hochsignifikant mit einer pAVK und signifikant mit einem DM Typ 2 assoziiert war. Dass die CHIP und kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert sind, war vorbekannt [61]. Die Genese kardiovaskulärer Erkrankungen ist ein multifaktorieller Prozess [62] und eine kausale Verbindung zur CHIP war bis vor Kurzem unklar. Die in diesem Zusammenhang relevante Arteriosklerose ist ein chronisch inflammatorischer Prozess der Gefäßwand [63], in dem Makrophagen eine Schlüsselrolle spielen. Beeinflusst wird dieser Prozess von einer Vielzahl von Chemo- und Zytokinen [64]. Im Mausmodell konnte nun gezeigt werden, dass zwischen Mutationen im *Tet2*-Gen und der Entstehung der Arteriosklerose ein kausaler Zusammenhang besteht. Der Verlust von *Tet2* in einem Teil der Monozyten von Mäusen führte bei diesen zu vergrößerten vaskulären Plaques. Die verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine in Monozyten und Makrophagen, vor allem von Interleukin-1 β , kann dabei die Entstehung vaskulärer Plaques begünstigen [19, 21]. In diesem Zusammenhang ist auch die Diabeteserkrankung von Interesse. Auch in der Pathogenese des DM scheint eine Aktivierung von Interleukin-1 β beziehungsweise ein proinflammatorisches Milieu eine Rolle zu spielen [65]. Des Weiteren verstärkt ein DM arteriosklerotische Prozesse [66] und wurde selbst mit einer verstärkten Hämatopoese assoziiert [67]. Auch wurde kürzlich die Rolle von *DNMT3A* und *TET2* in der epigenetischen Regulation der Insulinsensitivität von Adipozyten und damit der Entstehung von DM Typ 2 diskutiert

[68]. Inwieweit CHIP-Mutationen Einfluss auf die Entstehung vaskulärer Plaques oder die Störung des Insulinhaushaltes haben und ob die Anwesenheit von mehr als einer CHIP-Mutation das Risiko für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung stärker erhöht, ist noch genauer zu untersuchen. In einer anderen Publikation wurden *TET2*-Mutationen mit der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung assoziiert [55], was sich bei uns aber nicht bestätigte.

Bei CHIP-positiven Patienten zeigten sich einige signifikante Abweichungen der Laborwerte. Es konnte jedoch kein Parameter identifiziert werden, der eindeutig auf die Anwesenheit einer CHIP hinweist. Auch war der häufige Nachweis einer Anämie mit Hb-Werten ≤ 10 g/dl in 23,6 % der Fälle in der Kohorte ohne maligne Erkrankungen nicht mit dem CHIP-Status assoziiert. Die starke Assoziation der Anämien zu einer chronischen Nierenerkrankung ($P = <.001$) macht hier die renale Anämie als Ursache sehr wahrscheinlich.

5.2 Betrachtung der Ergebnisse in der Gesamtschau

Insgesamt weist die CHIP eine komplexe Entstehungs- und Progressionsdynamik sowie vielfältige klinische Konsequenzen auf, die bislang nur sehr unvollständig untersucht sind.

In Bezug auf zytotoxische Chemotherapien zeigte sich, dass sich die Anwesenheit bestimmter CHIP-Mutationen auf den Verlauf und bestimmte Aspekte der Verträglichkeit zytotoxischer Therapien auswirken kann. Im Gegenzug hat eine Chemotherapie auch Einfluss auf die Dynamik des Zellklons mit einer CHIP-Mutation. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass manche Mutationen eine größere Relevanz in Hinblick auf das Verabreichen einer Chemotherapie haben als andere. Zukünftige Studien sollten untersuchen, ob vor dem Beginn einer Chemotherapie bestimmte, möglicherweise risikobehaftete CHIP-Mutationen abgeklärt werden sollten. Insgesamt ist weitergehende Forschung nötig, um mehr Sicherheit im Umgang mit den verschiedenen CHIP-Mutationen im Rahmen zytotoxischer Therapien zu erlangen.

Eine allogene HSCT zwischen älteren verwandten Menschen, bei der der Spender eine CHIP-Mutation aufweist, scheint insgesamt sicher zu sein. Sie führt bezüglich des OS zu ähnlichen Resultaten wie eine Transplantation mit einem Spender ohne CHIP-Mutation. Ob durch die gezielte Untersuchung der Spender auf spezielle CHIP-Mutationen und eine – sofern machbar – entsprechende Spenderauswahl die Rezidivraten beeinflusst werden können, bleibt abzuwarten.

Insgesamt bleibt die Bewertung der klinischen Relevanz einer klonalen Hämatopoese beziehungsweise der CHIP eine Herausforderung. Da CHIP-Mutationen in sehr niedriger VAF bei bis zu 95 % der 50- bis 60-jährigen Menschen vorliegen [4], wird die Relevanz einer zufällig nachgewiesenen CHIP-Mutation infrage gestellt. Klarheit kann hier die weitere Abklärung des Risikoprofils einzelner Mutationen bringen. In den bereits publizierten Daten zeigt sich für *DNMT3A*- und *TET2*-Mutationen häufig ein eher benignes Phänotyp [55, 69]. Dennoch bleibt ungeklärt, welche Rolle das durch CHIP-

Mutationen ausgelöste proinflammatorische Milieu bei der Entstehung anderer Krankheiten hat und inwieweit andere Prozesse im menschlichen Körper davon beeinflusst werden.

5.3 Perspektiven

Bei der Aussage über zukünftige Entwicklungen ist Vorsicht geboten. Es bleibt abzuwarten, wie sich das Verständnis der CHIP in Bezug auf die Entwicklung und Progression kardiovaskulärer und metabolischer Erkrankungen weiterentwickeln wird. Die Tatsache, dass *TET2*-Mutationen über eine veränderte Funktion von Monozyten Einfluss auf systemische inflammatorische Prozesse nehmen können, wirft die Frage auf, inwieweit diese Ergebnisse schon jetzt Einfluss auf den klinischen Umgang mit kardiovaskulären Risikopatienten haben sollten. Ein Screening dieser Patientengruppe beispielsweise auf *TET2*-Mutationen scheint vorstellbar. Beim Nachweis einer Mutation könnten neben der klassischen Therapie auch direkt anti-inflammatorisch wirksame Medikamente zum Einsatz kommen. Auch scheinen Behandlungen im Sinne einer zielgerichteten Therapie möglich, die die Auswirkungen bestimmter CHIP-Mutationen eindämmen [70]. So wird zum Beispiel bereits der Einsatz von Interleukin-1 β -neutralisierenden Antikörpern für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen in klinischen Studien evaluiert [71]. Die Behandlung kardiovaskulärer Risikopatienten könnte somit weiter personalisiert werden.

Aktuell wird ein Patient nur unter bestimmten Umständen, wie zum Beispiel bei einer unklaren Zytopenie, auf das Vorliegen von CHIP untersucht. Angesichts der zunehmenden Personalisierung therapeutischer Konzepte und fallender Preise für genetische Analysen ist es jedoch vorstellbar, dass die Gruppe derjenigen, die auf eine CHIP untersucht werden, ausgedehnt wird. Es ist davon auszugehen, dass die Antwort auf die Frage nach dem richtigen Umgang mit der CHIP in Anbetracht vieler Variablen – unter anderem Mutationsart, VAF, Dynamik – unterschiedlich ausfallen wird. So wird eine stabile CHIP-Mutation in einem *Passenger*-Gen bei einem älteren Menschen ohne relevante Risikofaktoren möglicherweise eher als eine benigne Veränderung des Alters gewertet werden. Hingegen könnte eine ähnliche Mutation bei einem jüngeren Patienten mit kardiovaskulärem Risikoprofil oder einer anstehenden Chemotherapie kritischer bewertet werden. Auch der Nachweis von zwei oder mehr Mutationen oder einer Mutation in einem *Driver*-Gen könnte als risikobehaftet gewertet werden. Auf Grundlage dieser unterschiedlichen Beurteilungen könnte dann die Evaluation möglicher weiterführender diagnostischer und therapeutischer Optionen erfolgen.

Auch wenn noch zu viele Fragen unbeantwortet sind, könnte für die CHIP insgesamt ein Algorithmus erarbeitet werden, der die vielen Variablen zusammenfasst und bewertet. Implementiert in die klinische Standardversorgung könnte somit der zukünftige Umgang mit der CHIP vereinfacht und die Sicherheit für Patienten verbessert werden. Solche Überlegungen scheinen nicht verfrüht. So kann ein erst kürzlich vorgestelltes Modell bereits jetzt prognostizieren, welche Patienten mit einer klonalen Hämatopoese ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AML aufweisen [69].

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der Gene und Zielregionen, die im TruSight Myeloid Sequencing Panel und im modifizierten Custom Myeloid Panel untersucht wurden. * Im Custom Myeloid Panel ausgeschlossen.

** Ausschließlich im Custom Myeloid Panel

Tabelle 2: Definition der einzelnen hämatopoetischen Untergruppen des peripheren Blutes und des Knochenmarks.

Tabelle 3: Antikörper, welche für die Durchflusszytometrie verwendet wurden.

Abbildung 1: Exemplarische visuelle Darstellung der Gating-Strategie für das periphere Blut (A) und das Knochenmark (B)

Abbildung 2: Prävalenz von CHIP-assoziierten Mutationen in 437 älteren Individuen. **PPMID* wurde nur in 148 Patienten sequenziert.

Abbildung 3: Die Boxplots stellen die VAFs der klonalen Mutationen in den sortierten Zellfraktionen des peripheren Blutes dar (A) Die VAFs in den B- und T-Zellen waren signifikant niedriger als in allen anderen Zellfraktionen ($P = <.0001$ für alle Vergleiche), wie durch *** angezeigt. (B) Vergleich der T-Zell-VAFs von *DNMT3A*, *TET2* und der Summe der restlichen CHIP-Mutationen („*Andere*“). Der Unterschied in den T-Zell-VAFs zwischen *DNMT3A* und *TET2* sowie zwischen *DNMT3A* und der restlichen Kohorten war hochsignifikant ($P = <.001$ für jeden Vergleich). Der Unterschied zwischen den VAFs von *TET2* in den T-Zellen und den VAFs der verbleibenden Gene war ebenfalls signifikant ($P = .041$). Die Abbildungen stammen aus dem Originalpaper.

Abbildung 4: Die VAFs (in %) von CHIP-assoziierten Mutationen in den zellulären Subfraktionen. (A) Eine geringe ER von 1,1 wurde für *DNMT3A* I780T in UPN002 berechnet. (B) Eine Mutation, welche zu Veränderungen in der für das Spleißen wichtigen Regionen führt (Splicesite-Mutation) in *TET2* in UPN265 zeigte eine mittelgradige ER von 2,7. (C) Beide in UPN424 nachgewiesenen *TET2*-Mutationen zeigten eine hohe ER von 6,6 bzw. 8,7. Die Expansion bei diesem Patienten war jedoch nicht konstant, sondern erfolgte vor allem während der frühen Differenzierung der Stammzellen zu den oligopotenten Vorläuferzellen (HSCs zu CMPs). Die Abbildungen stammen aus dem Originalpaper.

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| bp | Basenpaar |
| CHIP | Clonal hematopoiesis of indeterminate potential |
| CLL | Chronische lymphatische Leukämie |
| CLP | Common lymphoid precursor |
| CMP | Common myeloid progenitors |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DCL | Donor-cell leukemia |
| ddPCR | Digital Droplet PCR |
| DM | Diabetes mellitus |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleic acid |
| <i>DNMT3A</i> | <i>DNA-Methyltransferase 3A</i> |
| <i>EGR2</i> | <i>Early Growth Response</i> |
| ER | Expansionsrate |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting |
| FBS | Fetal-Bovine-Serum |
| GMP | Granulocyte-macrophage progenitor |
| HSC | Hematopoietic stem cell |
| HSCT | Hematopoietic stem cell transplantation |
| KM | Knochenmark |
| LMPP | Lymphoid-primed multipotent progenitor |
| MDS | Myelodysplastisches Syndrom |
| MGUS | Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz |
| MPN | Myeloproliferative Neoplasie |
| MPP | Multipotent progenitor |
| Oligos | DNA-Oligonukleotide |
| OS | Overall survival |
| pAVK | Periphere arterielle Verschlusskrankheit |
| PB | Peripheres Blut |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| RPMI-1640 | Roswell Park Memorial Institute 1640 |
| SNV | Single Nucleotide Variant |
| <i>TET2</i> | <i>Ten-Eleven Translocation 2</i> |
| TTFT | Time to first treatment |
| VAF | Variante Allelfrequenz |

9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Joël Galán Sousa, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Ursprung und Expansion der Klonalen Hämatopoese während der hämatopoetischen Differenzierung” selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum, Unterschrift

10. Anteilserklärung

Joel Galán Sousa hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Autoren: Young E*, Noerenberg D*, Mansouri L, Ljungström V, Frick M, Sutton LA, Blakemore SJ, **Galan-Sousa J**, Plevova K, Baliakas P, Rossi D, Clifford R, Roos-Weil D, Navrkalova V, Dörken B, Schmitt CA, Smedby KE, Juliusson G, Giacobelli B, Blachly JS, Belessi C, Panagiotidis P, Chiorazzi N, Davi F, Langerak AW, Oscier D, Schuh A, Gaidano G, Ghia P, Xu W, Fan L, Bernard OA, Nguyen-Khac F, Rassenti L, Li J, Kipps TJ, Stamatopoulos K, Pospisilova S, Zenz T, Oakes CC, Strefford JC, Rosenquist R, Damm F., Titel: *EGR2* mutations define a new clinically aggressive subgroup of chronic lymphocytic leukemia., Zeitschrift: *Leukemia*, Erscheinungsjahr: 2017

* Diese Autoren haben in gleichen Teilen zur Arbeit als Erstautoren beigetragen.

Beitrag im Einzelnen:

- Aufbereitung und Quantifizierung von DNA, Durchführung von PCRs mit anschließender Qualitätskontrolle mittels Gel-Elektrophorese und Sanger Sequenzierung zum Nachweis des Vorliegens einer *EGR2*-Mutation.

Publikation 2: Autoren: Arends CM*, **Galan-Sousa J***, Hoyer K*, Chan W, Jäger M, Yoshida K, Seemann R, Noerenberg D, Waldhueter N, Fleischer-Notter H, Christen F, Schmitt CA, Dörken B, Pelzer U, Sinn M, Zemojtel T, Ogawa S, Märdian S, Schreiber A, Kunitz A, Krüger U, Bullinger L, Mylonas E, Frick M, Damm F., Titel: Hematopoietic lineage distribution and evolutionary dynamics of clonal hematopoiesis., Zeitschrift *Leukemia*, Erscheinungsjahr 2018

* Diese Autoren haben in gleichen Teilen zur Arbeit als Erstautoren beigetragen.

Die vorliegende Arbeit entstand im international hochkompetitiven Forschungsfeld der Hämatookologie und wurde hochrangig publiziert. Die Arbeit verlangte die Rekrutierung zweier umfangreicher Patientenkohorten, die Sammlung zahlreicher Proben sowie die Etablierung, Durchführung und Auswertung vielfältiger und komplexer Experimente. Unter der Betreuung der Letztautoren hat jeder Erstautor im gleichen Umfang, aber mit verschiedenen Schwerpunkten an dieser Arbeit mitgewirkt und somit ganz entscheidend zur Gewinnung neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse beigetragen. Die nachfolgende Anteilserklärung stellt allein die Schwerpunkte des Erstautors Joël

Galán Sousa dar. Sie enthält keine Aussagen zu den spezifischen Beiträgen der anderen (Erst- und Letzt-)Autoren.

Die Arbeit von mir, Joël Galán Sousa, konzentrierte sich vor allem auf die Charakterisierung der Klonalen Hämatopoese und die Untersuchung der Ontogenese und der Expansionsdynamik der Klonalen Hämatopoese während der hämatopoetischen Differenzierung. Dafür arbeitete ich schwerpunktmäßig an und mit der Kohorte ohne maligne Erkrankungen ($n = 365$).

Beiträge im Einzelnen:

- Übernahme eines wesentlichen Anteils der Patientenrekrutierung und Probenakquirierung der Kohorte ohne maligne Erkrankungen ($n \approx 250$).
 - Verarbeitung der Patientenproben (inklusive Ficoll-Dichtenzentrifugation)
 - DNA-Extraktion aus Vollblutproben
- Erhebung und Verwaltung der demographischen und zum Teil auch der klinischen Daten der Kohorte ohne maligne Erkrankungen (Laborwerte für $n = 365$ Patienten).
- Mitarbeit beim Mutationsscreening für die Kohorte ohne maligne Erkrankungen.
 - Erstellung eines Teils der Sequencing-Libraries ($n \approx 100$)
 - Mitarbeit bei der manuellen Auswertung der Sequenzierdaten im Integrated Genome Viewer (IGV)
- Mitarbeit bei der Validierung und Quantifizierung mittels gezielter Tiefensequenzierung potentieller Mutationen für die Kohorte ohne maligne Erkrankungen, unter anderem:
 - Primerdesign für alle potentiellen Mutationen
 - Etablierung, Optimierung und Durchführung konventioneller PCRs ($n \approx 140$)
 - Pooling der Proben für die gezielte Tiefensequenzierung
 - Manuelle Überprüfung der Sequenzierdaten im IGV
- Durchführung der durchflusszytometrischen Sortierung der sechs zellulären hämatopoetischen Subfraktionen des peripheren Bluts und der fünf zellulären hämatopoetischen Subfraktionen des Knochenmarks für Patientenproben mit einer bestätigten Mutation.
 - Periphere Blutproben ($n = 63$)
 - Knochenmarkproben ($n = 9$)
- Validierung und Quantifizierung der ursprünglichen Mutation in den zellulären hämatopoetischen Subfraktionen. Diese Daten sind unter anderem in Figure 2 (A-D) und Figure 3 (A-C) sowie in Supplemental Figure S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12 und S13 dargestellt.
 - Durchführung der PCRs ($n \approx 600$)

- Pooling der Proben
- Manuelle Überprüfung der Sequenzierdaten im IGV
- Mitarbeit an der statistischen Analyse und Interpretation aller Daten für die Kohorte ohne maligne Erkrankungen sowie aller Daten für die zellulären hämatopoetischen Subfraktionen.
- Mitarbeit bei der Erstellung des Manuskripts.
 - Schwerpunktmäßige an Bereichen des Manuskripts, die die Analyse und Interpretation der Daten der Kohorte ohne maligne Erkrankungen sowie die Daten für die zellulären hämatopoetischen Subfraktionen behandeln
- Mitarbeit bei der Erstellung der Abbildungen und Tabellen, die Informationen und Daten für die Kohorte ohne maligne Erkrankungen und die Mutationen in den zellulären hämatopoetischen Subfraktionen vom peripheren Blut und Knochenmark zeigen.
 - Darunter eigenständige Erstellung folgender Abbildungen:
 - Figure 3 A-C
 - Supplemental Table S2 A, B
 - Supplemental Figure S2 (A, B), S13 (A-F), S14 (A, B)
 - Darüber hinaus führten die von mir (zum Teil in Zusammenarbeit mit anderen) durchgeführten Experimente und Datensammlungen zu Erstellung von Abbildungen und Tabellen, die Informationen und Daten für die Kohorte ohne maligne Erkrankungen und die Mutationen in den zellulären hämatopoetischen Subfraktionen vom peripheren Blut und Knochenmark zeigen.
- Mitarbeit an der Etablierung und Protokollerstellung von im Labor zum Zeitpunkt der Etablierung noch nicht standardmäßig durchgeführten Methoden, vor allem für die Probenverarbeitung und die DNA-Extraktion.

Anmerkung: Die durchflusszytometrischen und Next-Generations-Sequencing Untersuchungen wurden mit technischer Assistenz des Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien (BCRT) durchgeführt.

Publikation 3: Autoren: Frick M*, Chan W*, Arends CM, Hablesreiter R, Halik A, Heuser M, Michonneau D, Blau O, Hoyer K, Christen F, **Galan-Sousa J**, Noerenberg D, Wais V, Stadler M, Yoshida K, Schetelig J, Schuler E, Thol F, Clappier E, Christopheit M, Ayuk F, Bornhäuser M, Blau IW, Ogawa S, Zemojtel T, Gerbitz A, Wagner EM, Spriewald BM, Schrezenmeier H, Kuchenbauer F, Kobbe G, Wiesneth M, Koldehoff M, Socié G, Kroeger N, Bullinger L, Thiede C, Damm F., Titel:

Role of Donor Clonal Hematopoiesis in Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation.,
Zeitschrift Journal of Clinical Oncology, Erscheinungsjahr 2018

* Diese Autoren haben in gleichen Teilen zur Arbeit als Erstautoren beigetragen.

Beitrag im Einzelnen:

- Mitarbeit bei der Vorbereitung (Library preparation) der Proben für das Deep Sequencing

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers (PD Dr. med. Frederik Damm)

Unterschrift des Doktoranden (Joël Galán Sousa)

11. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

11.1 Publikation 1

„EGR2 mutations define a new clinically aggressive subgroup of chronic lymphocytic leukemia“

E Young*, D Noerenberg*, L Mansouri, V Ljungström, M Frick, L-A Sutton, SJ Blakemore, **J Galan-Sousa**, K Plevova, P Baliakas, D Rossi, R Clifford, D Roos-Weil, V Navrkalova, B Dörken, CA Schmitt, KE Smedby, G Juliusson, B Giacomelli, JS Blachly, C Belessi, P Panagiotidis, N Chiorazzi, F Davi, AW Langerak, D Oscier, A Schuh, G Gaidano, P Ghia, W Xu, L Fan, OA Bernard, F Nguyen-Khac, L Rassenti, J Li, TJ Kipps, K Stamatopoulos, S Pospisilova, T Zenz, CC Oakes, JC Strefford, R Rosenquist and F Damm

* Diese Autoren haben in gleichen Teilen zur Arbeit als Erstautoren beigetragen.

Impact Factor 2017: 10.023

Diese Arbeit wurde laut Thomson Reuters ISI Web of Science Core Collection (Stand: 24.12.2019) in 10 Artikeln zitiert.

Direktlink: <https://www.doi.org/10.1038/leu.2016.359>

11.2 Publikation 2

“Hematopoietic lineage distribution and evolutionary dynamics of clonal hematopoiesis”

Christopher Maximilian Arends*, **Joel Galan-Sousa***, Kaja Hoyer*, Willy Chan, Marten Jäger, Kenichi Yoshida, Ricarda Seemann, Daniel Noerenberg, Nils Waldhueter, Helga Fleischer-Notter, Friederike Christen, Clemens A. Schmitt, Bernd Dörken, Uwe Pelzer, Marianne Sinn, Tomasz Zemojtel, Seishi Ogawa, Sven Märdian, Adrian Schreiber, Annegret Kunitz, Ulrike Krüger, Lars Bullinger, Elena Mylonas, Mareike Frick, Frederik Damm

* Diese Autoren haben in gleichen Teilen zur Arbeit als Erstautoren beigetragen.

Impact Factor 2018: 9.944

Diese Arbeit wurde laut Thomson Reuters ISI Web of Science Core Collection (Stand: 24.12.2019) in 20 Artikeln zitiert.

Direktlink: <https://www.doi.org/10.1038/s41375-018-0047-7>

11.3 Publikation 3

“Role of Donor Clonal Hematopoiesis in Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation”

Mareike Frick*, Willy Chan*, Christopher Maximilian Arends, Raphael Hablesreiter, Adriane Halik, Michael Heuser, David Michonneau, Olga Blau, Kaja Hoyer, Friederike Christen, **Joel Galan-Sousa**, Daniel Noerenberg, Verena Wais, Michael Stadler, Kenichi Yoshida, Johannes Schetelig, Esther Schuler, Felicitas Thol, Emmanuelle Clappier, Maximilian Christopeit, Francis Ayuk, Martin Bornhäuser, Igor Wolfgang Blau, Seishi Ogawa, Tomasz Zemojtel, Armin Gerbitz, Eva M. Wagner, Bernd M. Spriewald, Hubert Schrezenmeier, Florian Kuchenbauer, Guido Kobbe, Markus Wiesneth, Michael Koldehoff, Gérard Socié, Nicolaus Kroeger, Lars Bullinger, Christian Thiede, and Frederik Damm

* Diese Autoren haben in gleichen Teilen zur Arbeit als Erstautoren beigetragen.

Impact Factor 2018: 28.349

Diese Arbeit wurde laut Thomson Reuters ISI Web of Science Core Collection (Stand: 24.12.2019) in 10 Artikeln zitiert.

Direktlink: <https://www.doi.org/10.1200/JCO.2018.79.2184>

12. Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13. Komplette Publikationsliste

Publikation 1:

„EGR2 mutations define a new clinically aggressive subgroup of chronic lymphocytic leukemia“

E Young*, D Noerenberg*, L Mansouri, V Ljungström, M Frick, L-A Sutton, SJ Blakemore, **J Galan-Sousa**, K Plevova, P Baliakas, D Rossi, R Clifford, D Roos-Weil, V Navrkalova, B Dörken, CA Schmitt, KE Smedby, G Juliusson, B Giacomelli, JS Blachly, C Belessi, P Panagiotidis, N Chiorazzi, F Davi, AW Langerak, D Oscier, A Schuh, G Gaidano, P Ghia, W Xu, L Fan, OA Bernard, F Nguyen-Khac, L Rassenti, J Li, TJ Kipps, K Stamatopoulos, S Pospisilova, T Zenz, CC Oakes, JC Strefford, R Rosenquist and F Damm

* Diese Autoren haben in gleichen Teilen zur Arbeit als Erstautoren beigetragen.

Publikation 2:

“Hematopoietic lineage distribution and evolutionary dynamics of clonal hematopoiesis”

Christopher Maximilian Arends*, **Joel Galan-Sousa***, Kaja Hoyer*, Willy Chan, Marten Jäger, Kenichi Yoshida, Ricarda Seemann, Daniel Noerenberg, Nils Waldhueter, Helga Fleischer-Notter, Friederike Christen, Clemens A. Schmitt, Bernd Dörken, Uwe Pelzer, Marianne Sinn, Tomasz Zemojtel, Seishi Ogawa, Sven Märdian, Adrian Schreiber, Annegret Kunitz, Ulrike Krüger, Lars Bullinger, Elena Mylonas, Mareike Frick, Frederik Damm

* Diese Autoren haben in gleichen Teilen zur Arbeit als Erstautoren beigetragen.

Publikation 3:

“Role of Donor Clonal Hematopoiesis in Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation”

Mareike Frick*, Willy Chan*, Christopher Maximilian Arends, Raphael Habesreiter, Adriane Halik, Michael Heuser, David Michonneau, Olga Blau, Kaja Hoyer, Friederike Christen, **Joel Galan-Sousa**, Daniel Noerenberg, Verena Wais, Michael Stadler, Kenichi Yoshida, Johannes Schetelig, Esther Schuler, Felicitas Thol, Emmanuelle Clappier, Maximilian Christopeit, Francis Ayuk, Martin

Bornhäuser, Igor Wolfgang Blau, Seishi Ogawa, Tomasz Zemojtel, Armin Gerbitz, Eva M. Wagner, Bernd M. Spriewald, Hubert Schrezenmeier, Florian Kuchenbauer, Guido Kobbe, Markus Wiesneth, Michael Koldehoff, Gérard Socié, Nicolaus Kroeger, Lars Bullinger, Christian Thiede, and Frederik Damm

* Diese Autoren haben in gleichen Teilen zur Arbeit als Erstautoren beigetragen.

14. Danksagung

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei den Menschen bedanken, die mich bei diesem Dissertationsprojekt maßgeblich unterstützt haben. Ohne die vielfältige Hilfe und Unterstützung hätte ich die Arbeit nicht in dieser Form realisieren können.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater PD Dr. med. Frederik Damm für die Überlassung dieses spannenden Themas sowie dessen inhaltliche Ausrichtung und der thematischen Eingrenzung. Er hat meine Arbeit stets mit viel Verständnis unterstützt und mit seiner hervorragenden fachlichen Betreuung maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss beigetragen.

Ebenso danke ich meiner Zweitbetreuerin Dr. med. Mareike Frick, die meine Arbeit mit großem Engagement über einen langen Zeitraum hinweg begleitet hat. Dank ihrer kompetenten Unterstützung, ihrer konstruktiven Kritik und nicht zuletzt ihres professionellen Lektorats konnte ich meine Dissertation erfolgreich abschließen.

Ich danke auch meinen vielen Kollegen und Mitstreitern für eine kollegiale und wertschätzende Zusammenarbeit in zahlreichen gemeinsamen Projekten: unter anderem Christopher Maximilian Arends, Kaja Hoyer, Willy Chan, Daniel Nörenberg, Nils Waldhüter, Helga Fleischer-Notter, Friederike Christen, Elena Mylonas, Ricarda Seeman. Ohne die vielfältige fachliche Unterstützung bei der Probenrekrutierung und -verarbeitung sowie den verschiedenen Experimenten wäre die Bewältigung dieses Projekts nicht möglich gewesen.

Auch danke ich dem Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien und ihren Mitarbeitern für ihre technische Assistenz und ihre Unterstützung bei speziellen Experimenten.

Besonders danken möchte ich auch meiner langjährigen Partnerin Parnia Pirmoradi für ihre stets liebevolle Unterstützung und Geduld. Dank ihrer motivierenden Worte und ihren frischen Sichtweisen gelang es mir, auch in schwierigen Situationen den Fokus zu behalten.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank auch meinen Eltern und meiner Familie, die mich stets vollumfänglich unterstützt und mir das Medizinstudium ermöglicht haben.