

Nachweis und Bedeutung von Leukozyten mit klonaler Hämatopoese
von unbestimmtem Potential (CHIP) im humanen atherosklerotischen
Plaque

Julia Maria Fleig

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der
Technischen Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Marcus Makowski

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Heribert Schunkert
2. Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Die Dissertation wurde am 22.07.2024 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 04.12.2024
angenommen.

Zusammenfassung

Leukozyten, die von klonaler Hämatopoese unbestimmter Signifikanz (CHIP) betroffen sind, haben einen relevanten Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko. Die Prävalenz und biologische Relevanz von CHIP auf die koronare Herzerkrankung (KHK) ist bislang jedoch nicht ausreichend verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es, CHIP-positive Leukozyten mittels mutaFISH-Analyse im humanen, atherosklerotischen Plaque zu visualisieren und basierend auf tiefer DNA-Panel-Sequenzierung bzw. Ganzgenom Sequenzierung spezifische CHIP-Mutationen in Kombination mit Co-Expressionsanalysen funktionell zu untersuchen.

Die Arbeit fußt auf Proben von zwei Kohorten. Einerseits einer postmortem Biobank (MISSION) und einer KHK-Kohorte, die eine Bypass-Operation erhalten hat und Expressionsprofile verschiedener Gewebe (STARNET) bereithält. In MISSION wurde DNA von 540 verstorbenen Patienten tief sequenziert und es konnten bei 46,9% der Individuen CHIP definierende Mutationen identifiziert werden. Diese Mutationen konnten ebenfalls auf DNA-Ebene in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Die Visualisierung von einzelnen CHIP-positiven Zellen im atherosklerotischen Plaques wurde mittels MutaFISH (Sonde zum Nachweis spezifischer CHIP-Mutationen) auf RNA-Ebene visualisiert. In STARNET konnten CHIP-Mutationen auf DNA- und RNA-Level in Vollblut und verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. RNA-Analysen von CHIP betroffenen Makrophagen zeigten deutlich veränderte Genexpressionsmuster im Vergleich zu Makrophagen von gematchten KHK-Patienten. TET2-Mutationen führten zur Hochregulierung inflammatorischer Signalwege, während ASXL1-Mutationen vornehmlich Perturbation in metabolischen Signalwegen verursachten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass KHK-Patienten eine erhöhte Prävalenz für CHIP haben und CHIP-positive Leukozyten das Potential haben in atherosklerotische Plaques einzudringen. Die funktionellen Untersuchungen legen nahe, dass die Effekte von CHIP vor allem pro-inflammatorisch vermittelt werden und die Entstehung sowie das Voranschreiten der Atherosklerose begünstigen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle spezifischer CHIP-

Mutationen, ihre kardiovaskuläre Relevanz und potentielle Therapiestrategien zu untersuchen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Atherosklerose	1
1.2 CHIP.....	4
1.2.1 Definition CHIP	4
1.2.2 Vorkommen CHIP.....	5
1.2.3 Auswirkung von CHIP auf das kardiovaskuläre Risiko	5
1.2.4 Treibermutationen	6
1.3 Tiefe, gezielte DNA-Sequenzierung.....	7
1.4 MISSION Munich cardlovaScular Studles biobank.....	7
1.5 Ganzgenom-Sequenzierung	7
1.6 STARNET	8
2 Fragestellung und Zielsetzung	8
3 Material und Methoden	9
3.1 Ethikvotum.....	9
3.2 Material.....	9
3.2.1 Verwendete Chemikalien.....	9
3.2.2 Verwendete Puffer	10
3.2.3 Verwendete Kits.....	11
3.2.4 Verwendete Antikörper für IHC	11
3.2.5 Verbrauchsmaterial	12
3.2.6 Geräte und technisches Zubehör	12
3.2.7 Software.....	13
3.3 MISSION	14
3.3.1 FFPE Probenmaterial und Lagerung.....	14
3.3.2 Probengewinnung.....	17
3.3.3 Histologische Analyse	20

3.3.4	MutaFish.....	23
3.3.5	DNA Extraktion aus Blut.....	24
3.3.6	Probenvorbereitung und DNA Extraktion.....	25
3.3.7	Tiefe, gezielte DNA-Sequenzierung.....	25
3.3.8	Visualisierung von spezifischen CHIP Mutationen in humanen Plaques	27
3.4	STARNET Studie und Proben.....	27
3.4.1	Ganzgenom Sequenzierung	28
3.4.2	RNA Sequenzierung und Datenverarbeitung	29
3.4.3	eQTL Analyse.....	29
3.4.4	Differentielle Genexpression und Analyse von Signalwegen	30
3.4.5	Netzwerk und Key-Driver-Analyse	30
3.4.6	Co-Expressionsmodule und klinische Merkmale	31
4	Ergebnisse	31
4.1	CHIP-Screening.....	31
4.2	Visualisierung von spezifischen CHIP-Mutationen	33
4.3	CHIP-Screening in Makrophagen.....	36
4.3.1	Differenzielle Genexpressionsanalyse von TET2-mutierten Makrophagen	37
4.3.2	Differenzielle Genexpressionsanalyse von ASXL1-mutierten Makrophagen	40
5	Diskussion	44
6	Limitationen	46
7	Fazit.....	47
	Anhang.....	IX
	Danksagung	XXXV
	Lebenslauf.....	XXXVI
	Publikationsliste	XXXVII
	Eidesstattliche Versicherung.....	XXXVIII

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
°C	Grad Celsius
ACS	Akuten Koronar Syndroms
AHA	American Heart Association
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
ca	circa
CAD	coronary artery disease
CBM	Cardiovascular Biobank Munich (CBM)
CHIP	clonale Hämatopoese unklaren Potentials
CRP	C reaktives Protein
DAP	Diaminophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNB	DNA Nanobälle
DPBS	desbecco phosphate buffered saline = phosphathaltiger Puffer
dsDNA	Doppelstrang DNA
EAS	European Atherosclerosis Society
ECS	European Society of Cardiology
EEL	äußere elastische Lamina
EvG	Elastica van Gieson
FFPE	formalin-fixierte in Paraffin eingebettet
FISH	Fluoreszens in situ Hybritisierung
GO	Genontologie
GRN	genetic regulatory network
h	Stunde
HE	Hämatoxylin Eosin
HIER	phosphate buffered saline = phosphathaltiger Puffer
HTX	Hämatoxylin
IEL	innere elastische Lamina
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IHC	Immunhistochemie

IL1 β	Interleukin 1 beta
IL6	Interleukin 6
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Proximale Vorderwandarterie
LDL-C	Low-density Lipoprotein Cholesterin
LM PCR	Ligandenvermittelte PCR
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LU	Lumen
m	männlich
ma	muscle actin
min	Minute
MISSION	Munich cardiovascular Studies biobank
Mut	Mutation
muta FISH	mutationsspezifische Fluoreszenz in situ hybridisierung
NO	Stickstoff
O ₂	Sauerstoff
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
pAVK	periphere Arterielle Verschlusskrankheit
sek	Sekunde
SNP	single nucleotide polymorphisms
STARNET	Stockholm-Tartu Atherosclerosis Reverse Networks Engineering Task
SYNTAX	SYnergy between PCI with TAXUS and Cardiac Surgery
t-PA	tissue-type Plasminogen Aktivator
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VAF	Variant-Allel-Frequenz
vWF	Von Willebrand Faktor
wt	wildtyp
z.B.	zum Beispiel
μ m	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung des atherosklerotischen Plaques.	3
Abbildung 2: Anatomische Übersicht der koronaren Gefäßabschnitte	16
Abbildung 3: Anatomie der Entnahmestellen von Karotiden	17
Abbildung 4: Workflow Probenprozessierung	18
Abbildung 5: ABC Modell der Immunhistochemie.	22
Abbildung 6: MutaFish	24
Abbildung 7: VAF und Mutationslast in MISSION.....	32
Abbildung 8: DNMT3A CHIP Mutation	33
Abbildung 9: Färbungen im direkten Vergleich	34
Abbildung 10: CHIP-positive Makrophage im humanen Plaque	35
Abbildung 11: DNMT3A CHIP Mutation	36
Abbildung 12: Volcanoplot TET2	38
Abbildung 13: Top 10 Pathways TET2.....	38
Abbildung 14: Dark Green Modul TET2	39
Abbildung 15: Klinische Relevanz TET2	40
Abbildung 16: Volcanoplot ASXL1	41
Abbildung 17: Top 10 Pathways ASXL1	42
Abbildung 18: Black Modul ASXL1.....	43
Abbildung 19: Klinische Relevanz ASXL1.....	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	9
Tabelle 2: Verwendete Puffer.....	10
Tabelle 3: Verwendete Kits	11
Tabelle 4: Verwendete Antikörper für IHC.....	11
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien	12
Tabelle 6: Geräte und technisches Zubehör	12
Tabelle 7: Verwendete Software.....	13
Tabelle 8: Ein- und Ausschlusskriterien in MISSION	14
Tabelle 9: Gewebeproben mit anatomischem Korrelat.....	15
Tabelle 10: Antikörperkonzentrationen für die Immunhistochmie.....	23
Tabelle 11: Patientencharakteristika von TET2 Mutationsträgern	37
Tabelle 12: Patientencharakteristika von ASXL1 Mutationsträgern	40

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist ein chronisch pathologischer Prozess, der die arterielle Gefäßwand betrifft und zentral durch Inflammation und Cholesterinmetabolismus begünstigt wird. Die Atherosklerose ist ursächlich für die Mehrzahl von kardiovaskulären Ereignissen verantwortlich (Libby, Ridker, & Hansson, 2011). Auf molekularer Ebene – aus proteomischer Perspektive – kann die Atherosklerose auch als die Interaktion zahlreicher Proteine und Moleküle verstanden werden, die gemeinsam die Zellfunktion und das Umfeld dieser Zellen dahingehend beeinflussen, dass atherosklerotische Läsionen entstehen, die schließlich für ischämische kardiovaskuläre Ereignisse verantwortlich sind (Herrington et al., 2018).

Die Entstehung von atherosklerotischen Prozessen wird unter anderem auf die Störung der endothelialen Funktionen zurückgeführt. Wesentliche Aufgaben des Endothels umfassen die Vermittlung des Gefäßtonus, die Expression von antikoagulatorischen, fibrinolytischen und antithrombozytären Funktionen sowie die Rekrutierung und Aktivität von Entzündungszellen und die Bestimmung der Gefäßpermeabilität. Diese endotheliale Funktion des gesunden Gewebes wird durch verschiedene Faktoren und Mediatoren gesteuert (Kinlay, Libby, & Ganz, 2001). Jegliche Störung der aufgeführten Funktionen wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet. Wichtige Signalstoffe des Endothels sind Stickstoffmonoxid (NO), von Willebrand Faktor (vWF), sThrombomodulin, tissue-type Plasminogen Aktivator (t-PA), Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI). NO ist von wesentlicher Bedeutung und kann gut quantifiziert werden. Es beeinflusst den Gefäßtonus mit direkter Wirkung auf die glatten Muskelzellen und hat somit indirekten Einfluss auf Blutdruck und Gefäßpermeabilität. Mit Blick auf NO kann eine Dysfunktion kompensiert werden, eine wesentliche Rolle spielen dabei Antioxidantien, die unter anderem die Konzentration der Sauerstoffradikale in der Gefäßwand reduzieren (Kelm & Strauer, 1999). In der klinischen Therapie werden zum Beispiel NO Donatoren angewendet, um bei stabiler Angina Pectoris symptomatisch zu therapieren. Durch NO Freisetzung sinkt die kardiale Vor- und Nachlast, sodass der Sauerstoffbedarf sinkt (Dietz & Rauch, 2003).

Die atherosklerotische Plaquebildung ist ein multifaktorieller, dynamischer Prozess. Sie umfasst unter anderem die Retention von Lipoproteinen, Rekrutierung von inflammatorischen Zellen, Umwandlung von Makrophagen in Schaumzellen, Apoptose, Proliferation von glatten Muskelzellen sowie Kalzifizierung.

Low-density Lipoprotein Cholesterin (LDL-C) hat einen wesentlichen Anteil an der Entstehung von atherosklerotischen Plaques. Initial sammelt sich LDL-C in der Intima, wird dort oxidiert und wirkt als chronischer Stimulus für inflammatorische Prozesse. Diese umfassen sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem. Die Adhäsion an die Intima wird über Proteoglykane vermittelt. Endothelschäden der Intima sind dabei prädestiniert für die Adhäsion von LDL-C (Stary et al., 1992). Die oxidierte Form des LDL-C fördert die Expression von Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Proliferationsfaktoren. Diese rekrutieren zirkulierende Monozyten aus dem Blutstrom, die anschließend zu Makrophagen und dendritischen Zellen differenzieren.

Die frühe Läsion wird nun durch unterschiedliche Faktoren aufrechterhalten. Makrophagen sezernieren einerseits Zytokine und Chemokine und präsentieren andererseits Rezeptoren, die weitere Entzündungsprozesse auslösen. Die Makrophagen nehmen dabei LDL-C auf und entwickeln sich zu Schaumzellen. In diesen Prozess greift das erworbene Immunsystem ein, indem es auf oxidiertes LDL-C reagiert (Stary et al., 1994).

Diese Vorgänge führen zu einer Akkumulation der oben beschriebenen Zellen und Lipoproteine in der Intima und dehnen sich schließlich in die subendotheliale Schicht aus. Die Entwicklung der Läsion verläuft in der Regel asymptomatisch. Eine weitere Progression verursacht Nekrosen im Kernbereich der Läsion. Der nekrotische Kern hat Einfluss auf die den Plaque umgebenden fibröse Kappe und somit der Stabilität der Läsion (Moore & Tabas, 2011).

Die Plaquestabilität ist ein zentrales Thema bei der Entstehung des akuten Koronarsyndroms (ACS) (Davies, 1990). Atherosklerotische Läsionen werden in stabile oder instabile Plaques unterteilt. Diese Einteilung ist wichtig für das

pathophysiologische Verständnis, dass das ACS vor allem von Plaques verursacht wird, die rupturieren und die Bildung eines arteriellen Thrombus hervorrufen (Davies, 1996). Abbildung 1 gibt einen komprimierten Überblick zu den einzelnen Stadien der Plaqueentwicklung.

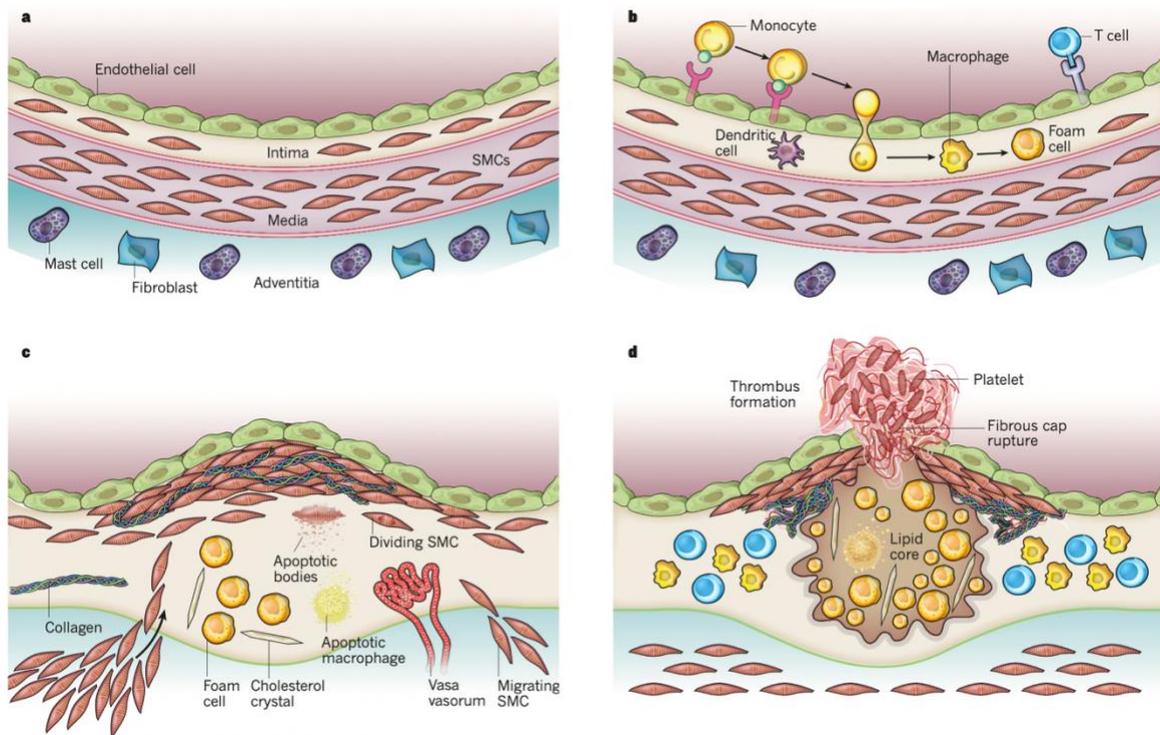


Abbildung 1: Entstehung des atherosklerotischen Plaques.

a: Aufbau einer Gefäßwand mit glatten Gefäßmuskelzellen in der Intima und Media. b: Initiale Schritte der Atherosklerose sind die Einwanderung von Bluteukozyten und Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen. c: Läsionsentwicklung mit Einwanderung von glatten Muskelzellen, Ablagerung von Cholesterin und Neovaskularisierungen. d: Thrombose als Komplikation von Atherosklerose, hier gezeigt die Ruptur der fibrösen Kappe (Libby et al., 2011)

Die Stabilität wird vor allem von der Zusammensetzung und der Struktur des Plaques bestimmt. Dabei spielen die fibröse Kappe, die Zusammensetzung des nekrotischen Kerns, Inflammation, Hämorrhagien, Nekrosen, Apoptosen und Umbau der Matrix und Kalzifikationen eine relevante Rolle. Ein stabiler Plaque zeichnet sich vor allem durch eine dicke bzw. stabile fibröse Kappe und Kalzifikationen aus (Goldstein et al., 2000).

Demnach ist ein instabiler oder vulnerabler Plaque primär durch einen lipidreichen nekrotischen Kern, Inflammation in den Schulterbereichen und die Ausdünnung

der fibrösen Kappe charakterisiert. Unter einer Ausdünnung der fibrösen Kappe versteht man, wenn diese eine Dicke $<200\mu\text{m}$ aufweist (Redgrave, Gallagher, Lovett, & Rothwell, 2008). Die Vulnerabilität von Plaques wird maßgeblich von zwei unterschiedlichen Makrophagenklassen (M1 und M2) und einwandernden Immunzellen bestimmt (Stone et al., 2011). Die fibröse Kappe besteht aus Kollagen, das von glatten Muskelzellen gebildet und durch verschiedene Mechanismen beeinflusst wird (Boyle, Weissberg, & Bennett, 2002). Der nekrotische Kern ist das Resultat der Makrophagenfunktion und führt zu einer Reduktion von Zellzahl und Zelldichte, sowie einer Überrepräsentation extrazellulärer Massen (Tabas, 2010).

Im Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen ist sowohl in der Therapie als auch der Diagnostik das Risikoprofil des jeweiligen Patienten relevant. So ist zum Beispiel beim akuten Koronarsyndrom das weitere Vorgehen insbesondere in Bezug auf invasive Diagnostik abhängig von Risikokriterien. Diese schließen das klinische Bild der Patienten und allgemeine Risikofaktoren ein (Hamm, 2004).

Risikofaktoren stellen im Allgemeinen das Alter, männliches Geschlecht, Vorerkrankungen wie eine arterielle Hypertonie, eine Hyperlipidämie, einen Diabetes mellitus, Adipositas, Nikotinabusus und körperliche Aktivität, sowie die genetische Prädisposition für Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar.

Die American Heart Association (AHA) veröffentlicht jährlich ihre Statistik zur Prävalenz, Inzidenz und Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen. Hierbei wird die Relevanz spezifischer Risikofaktoren beleuchtet und die longitudinale Entwicklung beleuchtet (Mozaffarian et al., 2016).

1.2 CHIP

1.2.1 Definition CHIP

CHIP steht für Klonale Hämatopoese unbestimmten Potentials. CHIP ist ein altersabhängiges Phänomen und ist definiert als das Vorhandensein einer klonal expandierten hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzelle, die durch eine CHIP definierende, somatische Mutation bei Personen ohne Anzeichen einer hämatologischen Malignität, Dysplasie oder Zytopenie verursacht wird (Genovese

et al., 2014). Das heißt, dass spezifische erworbene Mutationen einen Selektionsvorteil für hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen mit sich bringen und es so zur klonalen Vermehrung kommt. Die häufigsten Mutationen finden sich in den epigenetischen Regulatorgenen DNMT3A, TET2 und ASXL1.

1.2.2 Vorkommen CHIP

Das Risiko für CHIP steigt mit zunehmendem Lebensalter an. In der Altersgruppe der 60–70-Jährigen ist eine Prävalenz von ca. 20% beschrieben. Bei Individuen unter 30 Jahren liegt die Prävalenz bei unter 1%, wohingegen bei den über 80-Jährigen bereits jeder Dritte betroffen ist. Die somatische Mutation stellt also einen Teil des Alterungsprozesses dar. Die Last an CHIP-mutierten Zellen wird mittels Varianten-Allel-Frequenz (VAF) gemessen, also der Anzahl der betroffenen Allele. CHIP-Mutationen sind heterozygot, sodass bei einer VAF von 5% entsprechend 10% aller Leukozyten betroffen sind.

1.2.3 Auswirkung von CHIP auf das kardiovaskuläre Risiko

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen CHIP und dem kardiovaskulären Risiko besteht. CHIP-Mutationsträger hatten im Vergleich zu Individuen ohne CHIP sowohl einen ausgeprägteren Phänotyp für kardiovaskuläre Erkrankungen (z.B. gemessen an der Kalklast im Koronar-CT), als auch ein erhöhtes Risiko kardiovaskuläre Events zu erleiden oder zu versterben. Unabhängige Untersuchungen konnten zeigen, dass das erhöhte kardiovaskulären Risiko primär durch ein pro-inflammatorisches Milieu vermittelt wird. Beispielsweise führt die vermehrte Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie Interleukinen zu einer Destabilisierung atherosklerotischer Plaques.

Fuster et al. gelang es in einem eleganten Mausmodell die humane Situation von CHIP nachzuahmen, indem er eine TET2 *loss-of-function* Mutation in einen Teil der hämatopoetischen Stammzellen implementierte. Anschließend wurde beobachtet, dass es zu einer erhöhten Anzahl an aktivierten Makrophagen kam und IL-1 β hochreguliert wurde (Amoros-Perez & Fuster, 2020). CHIP-positive

Zellen zeigten signifikant größere atherosklerotische Läsionen. Zudem konnte beobachtet werden, dass eine Aktivierung von Makrophagen mittels Lipopolysacchariden zu einer vermehrten Expression von IL-6 und IL-1 β führte.

1.2.4 Treibermutationen

Unter Treibermutationen versteht man Mutationen, die eine selektive Expansion begünstigen und beispielsweise zur Krebsentstehung beitragen. Bei CHIP sind vor allem die epigenetischen Regulatorgene DNMT3A, TET2 und ASXL1 betroffen.

TET2 moduliert die Erneuerung von hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen. In der entsprechenden Literatur ist beschrieben, dass TET2 ein wesentlicher Regulator für die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen sowohl in frühen als auch späten Stadien der lymphatischen Differenzierung ist. So ist auch beschrieben, dass TET2 als Tumorsuppressor fungiert, welcher die Homöostase von hämatopoetischen Zellen wahrt (Z. Li et al., 2011; Quivoron et al., 2011).

DNMT3A ist eine Methyltransferase, welche bei Mutation mit Störungen der Mastzellproliferation zusammenhängt. Nach dem aktuellen Kenntnisstand hemmt DNMT3A die Mastzellreaktion auf akute und chronische Stimuli. Es wurde bei Ausschaltung dieses Enzyms eine überschießende Mastzellreaktion beobachtet sowie bei Demethylierung und Herabregulation von DNMT1 (Leoni et al., 2017).

Bezüglich des erhöhten kardiovaskulären Risikos bei einer Mutation von ASXL1 ist im Mausmodell eine erhöhte Makrophagenaktivität mit erhöhter vermehrter entzündlicher Antwort durch AIM2 Agonisten nachgewiesen worden (Yu et al., 2022).

Insgesamt beeinflussen diese einzeln hervorgehobenen Faktoren das inflammatorische Potential, das zentral im NLRP3-Inflammasom zusammenkommt.

1.3 Tiefe, gezielte DNA-Sequenzierung

Bei der tiefen, gezielten DNA-Sequenzierung werden definierte DNA-Abschnitte, z.B. einzelne Gene oder Genpanels, mehrere hundert bis tausendfach untersucht. Im Vergleich zur Sequenzierung von ganzen Genomen (üblicherweise wird hier nur eine begrenzte Tiefe gewählt) ist eine tiefe, gezielte DNA-Sequenzierung kosteneffizienter und genauer, was die Detektion von Mutationen betrifft. Die Genauigkeit kommt durch eine bessere Proben-Vorlagenüberlappung, dem sogenannten Probe-Tiling zustande. Ebenfalls werden die betreffenden DNA Sequenzen deutlich häufiger gelesen, sodass zufällige Fehler im Sequenzierungsprozess deutlich vermindert werden (Rizzo & Buck, 2012). Für die klonale Hämatopoese bzw. CHIP gibt es bereits eine Reihe von Genen, deren Relevanz bereits geklärt ist, sodass eine Analyse mit Genpanels hier durchaus sinnvoll erscheint.

1.4 MISSION Munich cardiovaScular Studles biobank

Die Munich cardiovaScular Studles biObaNk (MISSION) ist eine der umfassendsten kardiovaskulären postmortem Biobanken mit Fokus auf kardiovaskuläre Gewebe weltweit. Sie umfasst neben Vollblut und Plasma auch arterielle Proben von Carotiden und Koronarien. Die Gewebe liegen sowohl jeweils in Paraffin als auch in gefrorener Form vor. Die kardiovaskulären Proben für den ersten Teil dieser Arbeit stammen aus MISSION und wurden für die tiefe, gezielte DNA-Sequenzierung, die histomorphologische Charakterisierung und den Nachweis von CHIP-Mutationen im humanen atherosklerotischen Plaque verwendet.

1.5 Ganzgenom-Sequenzierung

Die Ganzgenom-Sequenzierung ist in der aktuellen Forschung von großer Bedeutung. Sie ist Teil des sogenannten *next generation sequencing*, also der Hochdurchsatzsequenzierung. Es können dabei mehrere Millionen DNA Fragmente gleichzeitig sequenziert werden. Die meisten Arten von Hochdurchsatzsequenzierung folgen diesem Prinzip. Zunächst wird in der Library bzw. Bibliotheken-Präparation die DNA mehrschrittig vorbereitet, indem sie

fragmentiert und mit Adaptoren versehen wird. Die vorbereiteten Fragmente nennt man DNA-Bibliothek. Die Amplifikation kann dann als Brückenamplifikation am festen Träger stattfinden. Da lokale Cluster an DNA-Stücken als Klone des gleichen Fragments entstehen, nennt man diese *Clusteramplifikation*. Der Output der Sequenzierung wird schließlich über die Messung von unterschiedlichen Lichtspektren bestimmt (Schmidt & Schmidt, 2017).

1.6 STARNET

STARNET ist ein Akronym für Stockholm-Tartu Atherosclerosis Reverse Networks Engineering Task. In dieser Studie wurden 600 gut charakterisierte KHK-Patienten, die eine Revaskularisation mittels Bypass-Operation benötigten, rekrutiert und umfangreiche DNA- und RNA-Analysen in verschiedenen Geweben durchgeführt, darunter Blut, innere Brustwandarterie (IMA), Aortenwurzel, subkutanes Fett, viszerales Bauchfett, Skelettmuskel und Leber (Franzén et al., 2016). STARNET dient in dieser Arbeit als externe Validierungsmöglichkeit, sowie einem besseren funktionellen Verständnis von spezifischen CHIP-Mutationen auf Transkriptionsebene.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Basierend auf der Relevanz von CHIP als eigenständigen kardiovaskulären Risikofaktor sollte zunächst die Prävalenz von CHIP bei Individuen mit gesicherter KHK ermittelt werden. Dies erfolgte zunächst im peripheren Blut. Bei ausgewählten CHIP positiven Individuen wurde anschließend auch im Gewebe für korrespondierende CHIP-Mutationen gescreent, um zu überprüfen, ob CHIP mutierte Leukozyten das Potential haben in den humanen kardiovaskulären Plaque einzudringen. Um die funktionelle Biologie von CHIP besser zu verstehen, sollten additiv Expressionsprofile von Alters- und Geschlecht gematchten CHIP-Mutationsträgern und entsprechenden Kontrollen, die jeweils eine etablierte KHK haben untersucht werden. Dies ermöglicht die klinische Relevanz von CHIP auf die KHK besser zu verstehen.

3 Material und Methoden

3.1 Ethikvotum

Die Ethik-Kommission der Technischen Universität München genehmigte die geplanten Untersuchungen der humanen Samples in MISSION. Zur Verwendung von STARNET Proben gab es die Erlaubnis durch das estnische Institut für Bioethik und humane Forschung des Ministeriums für Soziales und durch die Einwilligung nach Aufklärung durch die Gewebsspender in Übereinstimmung mit den Richtlinien und Vorschriften für die Verwendung von biologischem Material humanen Ursprungs. Beide Studien wurden in Übereinstimmung mit den Bestimmungen der Deklaration von Helsinki und den Richtlinien der Internationalen Harmonisierungskonferenz für die gute klinische Praxis durchgeführt.

3.2 Material

3.2.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller	Nummer
Aceton	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	9372.5
DMSO	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	A3672,0250
DPBS	ThermoFisher scientific (Waltham, USA)	14190-144
Eosin 1%, alkoholisch	Morphisto (Frankfurt, Deutschland)	11503.01000
Ethanol 96%, 70% vergällt	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	T171.4
Eukitt	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	03989
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	T865.2

Weigert Stammlösung A und B	Morphisto (Frankfurt, Deutschland)	10225A.1000 10225B.1000
Isopropanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	6752.4
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	A0830,1000
Xylol substitute	ThermoFisher scientific (Waltham, USA)	9990505
Picrofuchsin	Merck (Darmstadt, Deutschland)	1.00199.0500
Resorcin-Fuchsin, alkoholisch nach Weigert	Engelbrecht (Edermünde, Deutschland)	10354.01000
Poly-L-Lysine solution 0.1%	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	P8920-500ml
Paraffin Typ 6	Thermo scientific (Waltham, USA)	8336
Entkalker soft für die Histologie	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	6484.3

3.2.2 Verwendete Puffer

Tabelle 2: Verwendete Puffer

Name	Hersteller	Nummer	Inhaltsstoffe
HIER Citrat Puffer pH 6.0	Zytomed	ZUC028-500	
Target Retrieval Solution	Dako	S1699	
TRIS-EDTA pH9	-	-	Tris-Base 1,21g AquaDest 1000ml EDTA 0,37g
TRIS Puffer 10x pH 7,6	-	-	Tris-Base 61g Aqua Dest 1000ml

3.2.3 Verwendete Kits

Tabelle 3: Verwendete Kits

Name	Hersteller	Nummer
Mouse and rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit	Abcam (Cambridge, UK)	ab64264
Maxwell RSC Blood DNA	Promega (Madison, USA)	AS1400
DAB substrate kit	Abcam (Cambridge, UK)	Ab64238
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies	Q32851
mutaFISH RNA Probes KIT	Abnova Corporation, (Taiwan)	KA4915
mutaFISHTM RNA Accessory KIT	Abnova Corporation, (Taiwan)	

3.2.4 Verwendete Antikörper für IHC

Tabelle 4: Verwendete Antikörper für IHC

Name	Hersteller	Nummer
Monoclonal Mouse Anti-Human CD31	Agilent Dako (Santa Clara, USA)	M0823
Monoclonal mouse Anti-human CD45	Agilent Dako (Santa Clara, USA)	M0701
Monoclonal Mouse Anti-human CD68	Agilent Dako (Santa Clara, USA)	M0814
Monoclonal Mouse Anti-Human CD8	Agilent Dako (Santa Clara, USA)	M7103
Monoclonal Mouse anti-human muscle actin	Agilent Dako (Santa Clara, USA)	M0635

3.2.5 Verbrauchsmaterial

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Nummer
Cryotubes	VWR (Ismaning, Deutschland)	479-1262
Deckgläser	VWR (Ismaning, Deutschland)	631-0146
Handschuhe, Nitril	homedcare	2541M
Microtom Klinge	Feather (Osaka, Japan)	02.075.00.003
Mikroliterpipetten (2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Brand (Wertheim, Deutschland)	20E80703, 20D61964, 20D57573, 20C36108, 20E89481, 20C50317
Objektträger superfrost	VWR (Ismaning, Deutschland)	AAAA000082##32E
Objektträger superfrost plus	Thermo scientific (Waltham, USA)	J1800AMNZ
Pasteurpipetten		
Pipettenspitzen	Brand (Wertheim, Deutschland)	
Safe lock tubes	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	0030123.328

3.2.6 Geräte und technisches Zubehör

Tabelle 6: Geräte und technisches Zubehör

Name	Hersteller	Nummer
Handystep touch	Brand (Wertheim, Deutschland)	19L75457
Rotations Mischer	Kisker Biotech (Steinfurt, Deutschland)	L010
Maxwell RSC 48	Promega (Madison, USA)	AS8500

Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	5382 000.015
Infinite M200 pro	Tecan (Männedorf, Schweiz)	30002620
Biofuge fresco	Thermo scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	10026231
Paraffin Ausgießstation	Microm	AP280-2
Gewebeeinbettautomat	Thermo scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	STP-120
Slide Moat Ofen	Boekel Scientific	
Kühlplatte	Medite (Burgdorf, Deutschland)	COP
Mikrotom	Microm	HM340e
Wasserbad	Medite (Burgdorf, Deutschland)	TFB45
Wärmeplatte	Medite (Burgdorf, Deutschland)	OTS

3.2.7 Software

Tabelle 7: Verwendete Software

Name	Hersteller	Nummer
i-control	tecan	
Microsoft word		
Aperio ImageScope	Leica biosystems	
ZEN 3.5 blue edition	Zeiss	410135-0011-350

3.3 MISSION

Im Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilian-Universität München wurden anhand von spezifischen Ein- und Ausschlusskriterien Probanden ausgewählt und Proben entnommen. Die Kriterien sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Ein- und Ausschlusskriterien in MISSION

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien und Einschränkungen
Tod vor weniger als 72h	Mögliche Infektionen mit z.B. Hepatitis B, Tuberkulose, HIV
Patienten ab 18 Jahren	Brandopfer
	Kein Zugang zum Herzen bei Verdacht auf ärztliches Versagen und Fehler bei Operationen

Alle Patientendaten wurden an eine fortlaufend generierte Pseudo-ID angefügt, eine Re-Identifizierung Seitens DHM ist nicht möglich. Die Phänotypdaten sind auf nachfolgende Faktoren beschränkt.:

- Geburtsjahr
- Geschlecht
- Gewicht
- Größe
- Vermutete Todesursache
- Zeitpunkt des Todes
- Zeitpunkt des Kühlungsbeginnes
- Makroskopische Kalzifizierung der Gefäße (0-III)

3.3.1 FFPE Probenmaterial und Lagerung

MISSION umfasst kardiovaskulär relevantes, humanes Gewebe aus Koronarien, Karotiden, Herzmuskel, Skelettmuskel, Leber, viszerales und subkutanes Fett, sowie Blut- und Plasmaproben. Die Proben liegen sowohl bei -80°C als gefrorenes

Frischgewebe als auch als formalin-fixierte in Paraffin eingebettete (FFPE) Proben vor. Mit Ausnahme von Fettgewebe, wovon keine FFPE Probe angefertigt wurde.

Für das vorliegende Projekt wurden humane FFPE-Proben der proximalen Vorderwandarterie (RIVA/LAD – im Folgenden K6) des Koronarbaumes verwendet. Die Koronarien wurden mit einer Abkürzung bestehend aus einem K und einer Nummer bezeichnet. Um welches anatomische Korrelat es sich hier jeweils handelt, kann der Tabelle 9 entnommen werden. Abbildung 2 verdeutlicht die Lokalisation der Entnahmestellen der koronaren Gefäßproben.

Tabelle 9: Gewebeproben mit anatomischem Korrelat

Kurzbezeichnung	Anatomisches Korrelat
K1	Proximale Rechte Koronararterie
K3	Distale rechte Koronararterie
K5	Hauptstamm
K6	Ramus interventricularis anterior proximal
K8	Ramus interventricularis anterior distal
K9	Ramus circumflexus proximal
K11	Ramus circumflexus distal
CL	Linke Karotide
CR	Rechte Karotide
L	Leber
HM	Herzmuskel
SM	Skelettmuskel
VF	Viszerales Fettgewebe
SF	Subkutanes Fettgewebe

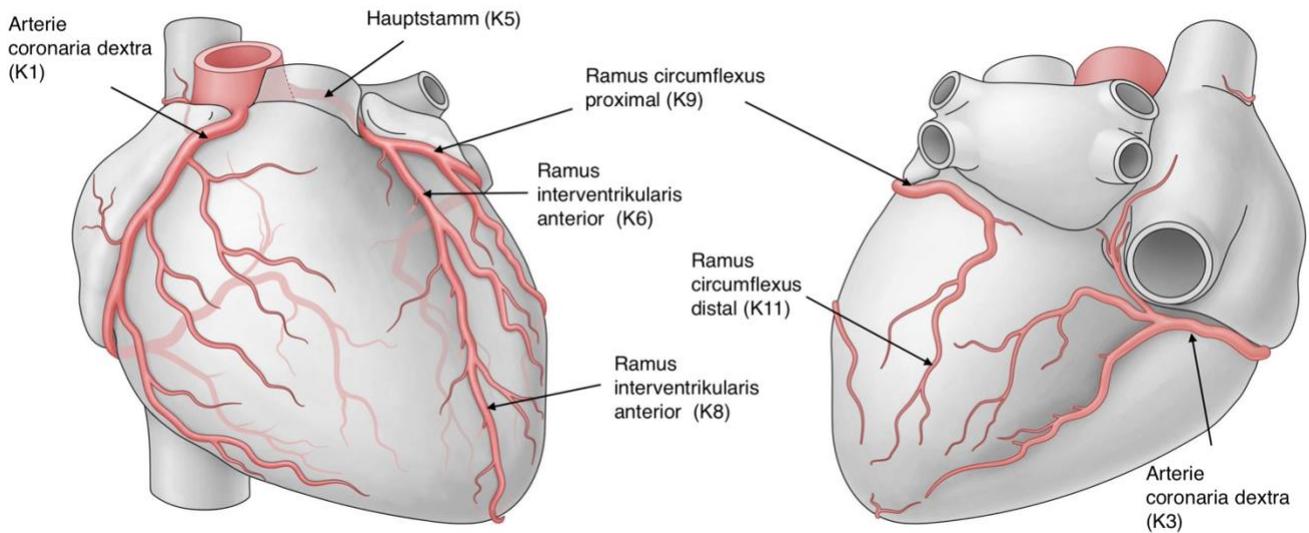


Abbildung 2: Anatomische Übersicht der koronaren Gefäßabschnitte

links: ventrale Ansicht des Herzens. rechts: dorsokaudale Ansicht des Herzens. Eingezeichnet ist die anatomische Lage der Entnahmestellen der koronaren Gefäßproben mit Name und Kurzbezeichnung (AMBOSS GmbH, Berlin und Köln, Germany)

Die Karotiden wurden beidseits nahe am Sinus caroticus entnommen, der obere Teil Richtung der Bifurkation wird in der Regel als Frischgewebe in DMSO/PBS eingefroren. Abbildung 3 zeigt die anatomische Lage der Entnahmestelle.

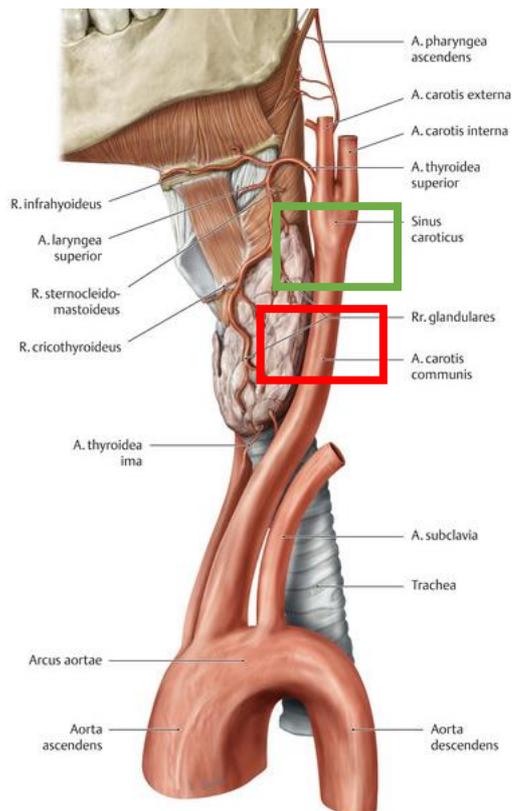


Abbildung 3: Anatomie der Entnahmestellen von Karotiden

Rot umrandet ist der Gefäßabschnitt, der mit Formalin fixiert wird. Grün umrandet der Abschnitt, der als Frischgewebe eingefroren wird (Schünke, Schulte, Schumacher, Voll, & Wesker, 2015).

3.3.2 Probengewinnung

In der Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilian-Universität München werden die Proben im Rahmen der Obduktion gewonnen. Pro Entnahmestelle wurde je ein Gefäßteil in Formalin fixiert, ein zweiter Teil des Gefäßes wurde umgehend in einem Stabilisierungsmedium aus PBS/DMSO bei -25°C eingefroren. So liegt jeder entnommene Gefäßabschnitt sowohl als formalin fixierte Probe als auch als gefrorenes Frischgewebe vor.

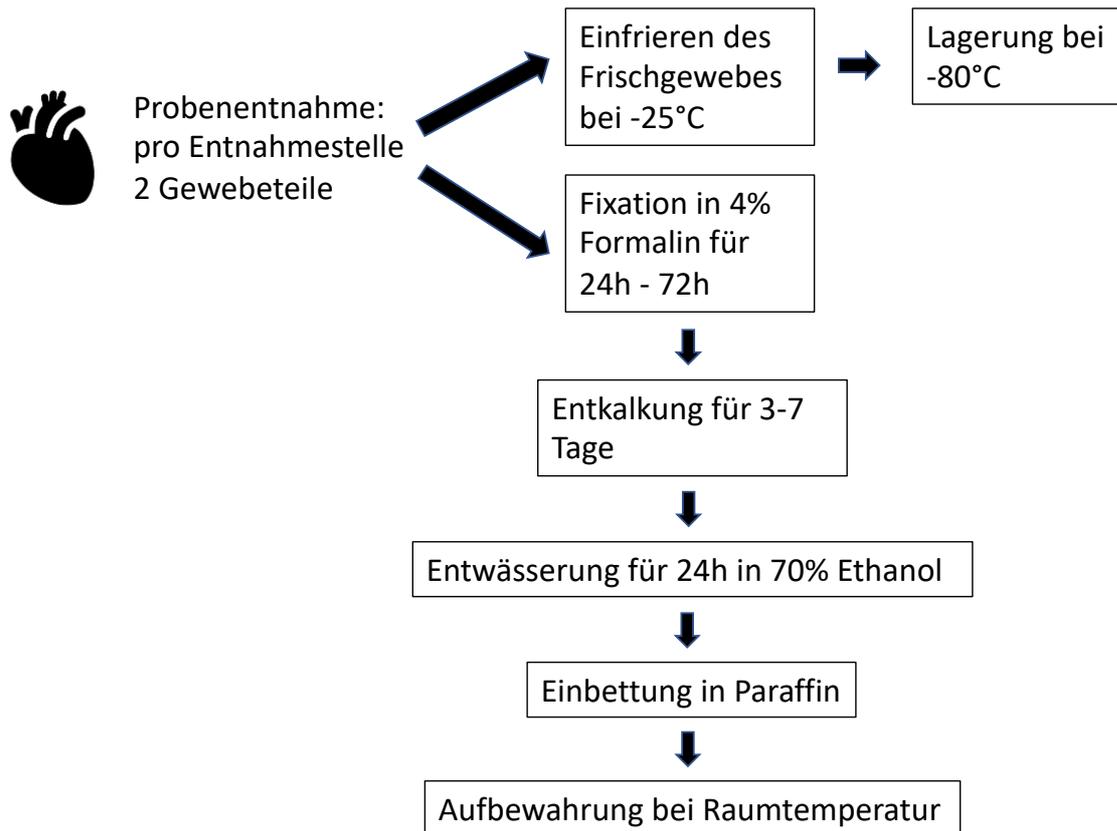


Abbildung 4: Workflow Probenprozessierung

Pro Entnahmestelle (oben beschriebene Gefäßabschnitte, Leber und Muskelgewebe) wird je ein Teil des Gewebes in Formalin fixiert und ein Teil als Frischgewebe eingefroren. Das Frischgewebe wird sofort nach Entnahme bei -25°C eingefroren und später bei -80°C gelagert. Die FFPE werden nach Entnahme für 24-72h in 4%Formalin fixiert und nach den schematisch abgebildeten Arbeitsschritten innerhalb von 5-9 Tagen in Paraffin eingebettet.

3.3.2.1 Entkalkung

Die Proben für die Histologie wurden in der Rechtsmedizin gesammelt und einmal wöchentlich abgeholt. Zur besseren histologischen Aufbereitung wurden Gefäßproben entkalkt, die Organproben (Leber, Skelettmuskel und Herzmuskel) wurden in 70% Ethanol transferiert. Bei den Gefäßproben wurde das Formalin durch einen Gewebeentkalker (Roth) ersetzt.

3.3.2.2 Trimmen

Bei den Proben wurden überflüssiges Fett- und Bindegewebe entfernt. Um die histologischen Schnitte im Querschnitt anfertigen zu können, musste zunächst die Orientierung und die Laufrichtung des Gefäßes festgestellt werden. Da die meisten Gefäße aus der Rechtsmedizin zum Ausschluss von thromboembolischen

Ereignissen der Länge nach aufgeschnitten sind und somit nicht mehr in geschlossener Form vorliegen, wurde als makroskopische Orientierung das glatte Endothel verwendet. Um glatte Schnittkanten zu erlangen, wurden die Gefäßteile in der Mitte geteilt. Kann mit bloßem Auge eine Veränderung erkannt werden, wurde versucht, die Probe an dieser Stelle zu teilen. Die Organproben wurden so geschnitten, dass glatte Flächen entstehen. Nach dem Trimmen mit dem Skalpell wurden die Gewebeteile in Einbettkassetten in 70% Ethanol gebracht.

3.3.2.3 Entwässerung

Im weiteren Schritt wurde ein Gewebeeinbettautomat eingesetzt. Mit der ansteigenden Alkoholreihe mit 70% Ethanol, 80% Ethanol, 90% Ethanol wurden die Proben entwässert. Damit im Einbettungsschritt das Paraffin in das Gewebe gelangen kann, wird Xylol verwendet. Xylol mischt sich gleichermaßen gut mit Alkohol und Paraffin und bildet den Zwischenschritt. Ausgehend vom Alkohol kann das Xylol in die Zellen wandern und im nächsten Schritt durch Paraffin ersetzt werden.

3.3.2.4 Einbettung in Paraffin

Zur Einbettung in den Paraffinblock kam eine Paraffin Ausgießstation zum Einsatz. Die Gießwanne wurde zunächst mit etwas Paraffin gefüllt, im nächsten Schritt wurde eine Gewebeprobe mit der Pinzette in der gewünschten Ausrichtung an den Boden der Gießform gebracht. Die unterste Schicht des Paraffins konnte bei Platzierung der Probe auf der Kühlplatte schon einmal erhärten. Es musste darauf geachtet werden, dass die Probe nach unten gedrückt wird. Gibt es zwei Probenanteile, konnte man zunächst erst einen Teil der unteren Paraffinschicht in der Gießform erhärten lassen und im zweiten Schritt den zweiten Teil der Probe positionieren. Sind die Gefäßproben platziert wird die Einbettkassette aufgelegt und mit Paraffin ausgegossen. Zum endgültigen Aushärten wurde die Gießform auf der Kühlplatte gelagert bis der Paraffinblock aus der Form gelöst werden konnte.

Auf verschiedene Dinge musste geachtet werden. Um spätere Risse im Block zu vermeiden, sollte nicht zu lange zwischengekühlt werden. Die Gefahr, dass der

Block beim Anfertigen der Schnitte springt ist bei durchgehenden Rissen groß. Die Positionierung der Proben im späteren Block sollte mittig erfolgen.

3.3.3 Histologische Analyse

Die Immunhistochemie beinhaltet Verfahren vom Gewebestück im Paraffinblock bis zum fertig gefärbten Gewebeschnitt, der schließlich erlaubt die entsprechende Gewebeprobe zu charakterisieren.

Die Objektträger wurden nur für immunhistochemische Färbemethoden mit Poly-L-Lysine 1:1000 beschichtet. Poly-L-Lysine verbessert die Haftung der Gewebe am Objektträger im weiteren Arbeitsverlauf.

3.3.3.1 Schneiden

Beim Schneiden der FFPE Proben mit dem Microtom werden 2-3µm dicke Schnitte angefertigt. Hierzu werden die gekühlten Probenblöcke mit dem Rotationsmicrotom geschnitten und die Schnitte werden in ein mit destilliertem Wasser gefüllten Streckbad (40°C) ausgelegt. Im Streckbad können sich kleine Falten im Schnitt auslegen. Die Schnitte werden nun auf die Objektträger (super Frost) aufgezogen und zunächst auf einer 40°C warmen Platte getrocknet. Vor dem Färben werden die Objektträger mit den histologischen Schnitten über Nacht bei 40°C getrocknet und ca. 30-60 min. bei 57°C gebacken.

3.3.3.2 Hämatoxylin Eosin

Die klassische Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wird zur Charakterisierung der Gefäßabschnitte genutzt. Sie besteht anfangs aus einer Entparaffinisierung und einer Rehydrierung des Gewebes. Hier kommen *Xylene substitute* (15min) und eine absteigende Alkoholreihe mit Isopropanol und 96% sowie 70% Ethanol (je 4min) zum Einsatz. Als Färbelösungen wurden Hämatoxylin nach Mayer (HTX) für die Kernfärbung und Eosin zur Färbung des Cytoplasmas verwendet. Nach einer anschließenden Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 30 sek.) wird der Alkohol im Gewebe wieder im Xylol (2 mal 2min) entfernt. Nach dem Xylolschritt werden die gefärbten Schnitte mit *Eukitt* Einschlussmedium mit einem

Deckglas eingedeckt. Als Färbeergebnis erhält man in violett die Zellkerne und in rosa-rot das Cytoplasma.

3.3.3.3 Elastika van Gieson

Die Elastika van Gieson (EvG) Färbung wird genutzt um elastische Fasern in den Gefäßwänden sichtbar zu machen. Die Färbung besteht aus einer Entparaffinisierung und einer Rehydrierung der Proben. Xylene substitute (Roth) und eine absteigende Alkoholreihe mit Isopropanol und 96% sowie 70% Ethanol werden hier verwendet. Die Färbelösungen sind Resorcinfuchsin für die Färbung von kollagenem Bindegewebe, Hämalanlösung nach Weigert, um die Zellkerne sichtbar zu machen und Picrofuchsin, das kollagenes Bindegewebe und Muskelzellen anfärbt. Nach dem Xylolschritt werden die gefärbten Schnitte mit *Eukitt* Einschlussmedium mit einem Deckglas eingedeckt. Als Ergebnis zeigen sich Zellkerne schwarzbraun, elastische Fasern schwarzviolett, kollagene Fasern rot und Muskulatur sowie Cytoplasma gelb.

3.3.3.4 Immunhistochemie

Um spezifische Zellpopulationen zu identifizieren, wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen angewandt. Die Färbungen wurden nach dem ABC Modell angefertigt. Die Färbungen waren hier indirekte Nachweise. Das heißt, dass der Marker, der detektiert werden kann, nicht am primären Antikörper sitzt, sondern an einem sekundären Antikörper. Das Prinzip des ABC-Modells, der Streptavidin-Biotin-Technik, ist in Abbildung 5 gezeigt. Grundlage der Färbung ist die hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin. Bei dieser Technik bindet ein primärer Antikörper gezielt an die gewünschten Antigene des Gewebes. Ein sekundärer biotinylierter Antikörper kann dann an den primären Antikörper binden. Der sekundäre Antikörper bindet das Enzym, was die Farbentwicklung durch die Bildung eines Streptavidin-Biotin-Enzymkomplexes ermöglicht.

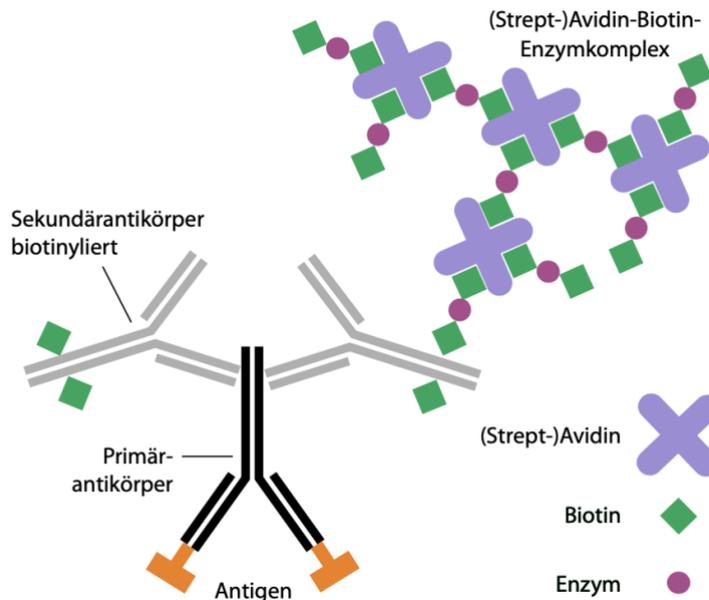


Abbildung 5: ABC Modell der Immunhistochemie.

Das ABC-Modell der Immunhistochemie nutzt spezifische Antikörper, die an das Zielantigen im Gewebe binden und mit einer Markierung versehen sind. Ein zweiter Antikörper mit einer Detektionskomponente verstärkt das Signal, sodass das Zielantigen sichtbar wird, was eine präzise Lokalisierung ermöglicht. Diese Methode bietet eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität bei der Untersuchung von Antigenen in Gewebeproben (Mulisch & Welsch, 2015).

Um für spätere Analysen spezifisch Leukozyten und Makrophagen nachzuweisen, wurden anti-CD45 und anti-CD68 Antikörper eingesetzt, zum Färben von glatten Gefäßmuskelzellen anti-*ma* (muscle aktin) Antikörper. Die Gewebeschnitte für die Immunhistochemie wurden auf eine Dicke von 10µm geschnitten und auf Poly-L-Lysin beschichtete *superfrost plus* Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden im ersten Schritt wie oben in den HE und EvG Färbungen mit *Xylene substitute* entparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Im zweiten Schritt wurde das *antigen retrieval* mit Citratpuffer im Schnellkochtopf (7min) durchgeführt, dass die durch das Formalin gebildeten Methylen-Querbrücken gespalten werden konnten, um die Antigene des Gewebes freizulegen. Die darauffolgenden Arbeitsschritte wurden mit Bestandteilen des *Mouse and rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit* (Abcam) durchgeführt. Zunächst wurde ein Peroxidaseblock (10min) und ein Proteinblock mit Milchpulver (30min) durchgeführt. Nach dem primären Antikörper (1h) sind aus dem Kit noch der sekundäre Antikörper und die Streptavidin Peroxidase eingesetzt worden, bevor die Farbreaktion mit dem *DAB substrate kit* gestartet werden konnte. Die

Farbentwicklung dauerte je nach Antikörper zwischen 2-4 min. Die Konzentrationen der einzelnen Antikörper sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Antikörperkonzentrationen für die Immunhistochmie

Antikörper	Konzentration
Anti CD68	1:1300
Anti CD45	1:500
Anti ma	1:300

Für die Gegenfärbung der Kerne wurde Hämalaun nach Mayer (25 sek.) verwendet. Anschließend wurden die Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und der Alkohol mit *Xylene substitute* aus dem Schnitt entfernt. Abschließend wurde wieder mit Einschussmedium *Eukitt* mit einem Deckglas eingedeckt. Die Zellkerne erscheinen final blau, die jeweilig immungefärbten Zellen braun. Die positiv gefärbten Zellen werden als solche identifiziert, indem im braun gefärbten Bereich ein blauer Kern zu sehen ist. Da die Oberflächenmarker CD45 und CD68 an der Oberfläche der Zelle sind, wird die Zellwand gefärbt. Bei der Färbung mit Anti-ma wird das sich im Zytoplasma befindliche Aktin angefärbt.

3.3.4 MutaFish

Zur Visualisierung spezifischer CHIP-Mutationen wurde eine sogenannte MutaFISH, eine mutationsspezifische Fluoreszenz in situ Hybridisierung, genutzt. Die Technik kann zur hoch sensitiven und spezifischen Darstellung von Mutationen verwendet werden (van Ommen, Breuning, & Raap, 1995). Die Interphase FISH wird genutzt, wenn keine Zellen in der Metaphase, also in der Teilungsphase sind. Dies trifft auf fixiertes Gewebe in MISSION zu. Durch die geringe Kondensation des Erbguts kann mit der Interphase FISH eine hohe Auflösung erzielt werden (Haralambieva et al., 2003).

Die MutaFISH wurde für zwei spezifische Mutationen auf dem DNMTA3 Gen (c.2245C>T und c.2333T>G) etabliert. Mit speziell angefertigten RNA-Sonden für Wildtyp DNMTA3 und das mutierte DNMTA3 wurde die In-situ-Rolling-Circle-Technologie angewendet. Die In-situ-Rolling-Circle-Technologie ermöglicht durch die spezifische Amplifikation der hybridisierten Mutationen die Darstellung der

fluoreszierenden Produkte (Iris Schrijver, 2023). Im Wesentlichen werden FFPE Gewebe in 3-5µm dicken Schnitten auf dem Objektträger fixiert, Rehydriert und vorbereitet, sodass die Zielstrukturen abrufbar und zugänglich sind. Danach kann die eigentliche Hybridisierung und Fixation erfolgen, bis die Darstellung möglich ist. Das vollständige Protokoll ist im Anhang 2 zu finden.

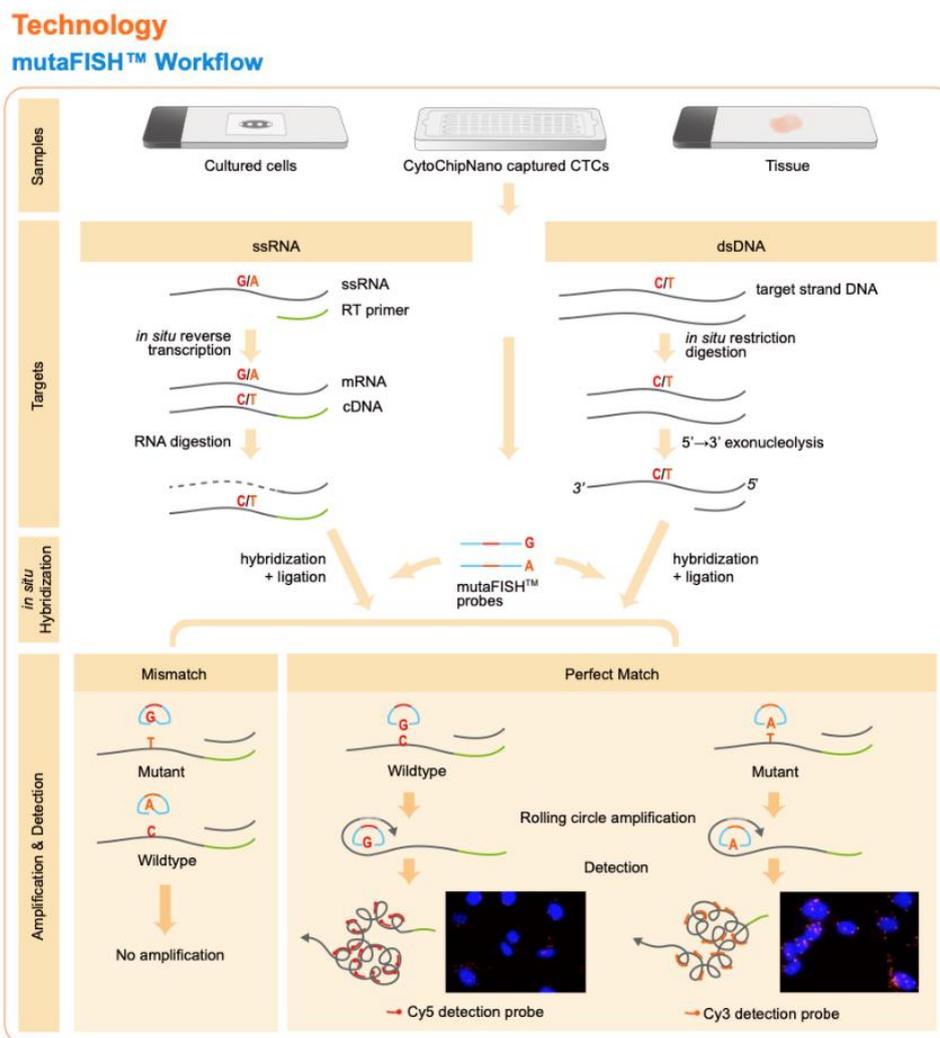


Abbildung 6: MutaFish

Für den Nachweis spezifischer Punktmutationen in Zellen oder Geweben können Sonden auf DNA oder RNA Ebene angefertigt werden. Im Falle eines ‚Matchings‘ wird die Mutation mittels Fluoreszenzverfahren sichtbar (‐MutaFISH,‐ 2023).

3.3.5 DNA Extraktion aus Blut

Die Extraktion von DNA wurde automatisiert mit dem Maxwell RSC 48 von Promega durchgeführt. Hier kam das *DNA blood kit* (Promega) zum Einsatz. Die Vorbereitung der Blutproben enthält einige Schritte bevor der automatisierte Teil des Maxwell genutzt werden kann. Zunächst wurden die aufgetauten Blutproben

mit einem Rotationsmixer (*Kisker*) ca. 5 Minuten vermischt. 300µl Vollblut wurden dann zusammen mit 300µl Lyse Puffer und 30µl Proteinase K in ein Probenröhrchen gegeben. Die Mischung aus Blut, Lysepuffer und Proteinase K werden als nächstes im geschlossenen Tube vermischt und in einem Heizblock (Eppendorf) bei 56°C unter konstantem Schütteln inkubiert. Das fertig lysierte Blut wurde danach in das erste Fach der mitgelieferten Kartusche transferiert. Die Kartuschen mit Blut wurden in die Vorrichtung des Maxwell zusammen mit den Pipettenspitzen und den Elutions-Gefäßen mitsamt 65µl Elutionspuffer eingestellt. Das Programm „*blood DNA*“ wurde entsprechend des Protokolls ausgewählt und der Lauf gestartet. Protokoll siehe Anhang 1.

3.3.6 Probenvorbereitung und DNA Extraktion

Das Ziel war es, von hämatopoetischen Stammzellen abgeleitete mononukleäre Zellen mit CHIP-Mutationen in kardiovaskulär relevantem Gewebe nachzuweisen. Hierfür wurde Vollblut und kardiovaskuläres Gewebe mittels tiefer DNA-Sequenzierung analysiert. Im Münchner Leukämie-Labor wurden die Proben mit einem Illumina TruSeq Custom Sequenzierpanel sequenziert und die Konzentration der extrahierten genomischen DNA mit einem *Quit dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies) bestimmt. Die DNA wurde auf 25ng/µl in 30µl nukleasefreiem Wasser verdünnt. Es wurden aus Vollblut, in von Atherosklerose betroffenen Koronarien, Carotiden und in Herzmuskelgewebe des linken Ventrikels CHIP-mutierte hämatopoetische Zellen bestimmt. Um hier einen zuverlässigen Nachweis zu erreichen wurde eine Tiefe von mindestens 1000-fach Detektionen festgelegt.

3.3.7 Tiefe, gezielte DNA-Sequenzierung

Zum Nachweis von CHIP wurde ein Panel mit den häufigsten CHIP-Mutationen zusammengestellt. Dies umfasst die Gene ASXL1, CALR, CBL, DNMT3A, JAK2, MPL, PPM1D, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF2 und ZRSR2. Die DNA der Patienten wurde aus Leukozyten des peripheren Blutes mit *MagNA Pure 96* (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) isoliert. Die Vorbereitung der Bibliothek für die Anreicherung wurde aus 150ng DNA pro Probe mit dem *Illumina*

DNA Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) unter Verwendung von *Unique Dual Indices* und einer enzymatischen DNA-Fragmentierung durchgeführt. Die Zielanreicherung erfolgte mit dem IDT Hybridization Capture Protocol und einem entsprechenden Lockdown-Genpanel (IDT Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). Die Sequenzierung erfolgte auf einem NovaSeq 6000 (Illumina) mit Paired-End-Sequenzierungsmodus (2x101 Zyklen) und einer angestrebten 2.000-fachen Zielabdeckung. Um duplizierte, identische PCR-Reads zu eliminieren und so die Genauigkeit der berechneten Varianten-Allel-Häufigkeit (VAF) zu verbessern wurde vor dem Alignment eine De-Duplizierung durchgeführt. Das Varianten-Calling von Einzelnukleotid-Varianten und kleinen InDels (<50 Basenpaare) erfolgte mit den Varianten-Callern Dragen, PISCES (Illumina) und Pindel (Wellcome Sanger Institute, Cambridgeshire, UK). Danach schlossen wir eine manuelle Annotation und Klassifizierung der Varianten durch einen internen, routinemäßig akkreditierten (ISO 15189 und College of American Pathologists) Arbeitsablauf des Munich Leukemia Laboratory (MLL, München, Deutschland) an. Für diesen Arbeitsablauf wurden frei zugängliche Datenbanken wie COSMIC, IRAC, ClinVAR, dbSNP und gnomAD sowie die hauseigenen, auf hämatologische Erkrankungen spezialisierten Datenbanken genutzt. Als pathogen wurden Varianten eingestuft, die Proteinkürzungen und Konsensus-Spleißstellen beeinträchtigen.

Nicht-synonyme Veränderungen wurden unter verschiedenen Gesichtspunkten berücksichtigt.

Die Varianten mussten:

- für die Pathogenität bei hämatologischen Malignomen gut annotiert sein (mehrere definitive Einträge in der COSMIC-, IRAC-, ClinVAR- oder MLL-Datenbank),
- in einer funktionellen Domäne des Proteins liegen oder aufgrund eines VAF <25 % wahrscheinlich somatisch sein;
- für ASXL1 wurden nur proteinabbrechende Varianten als pathogen eingestuft.

Andere seltene, nicht proteinabbrechende Varianten wurden als Varianten mit unklarer Bedeutung definiert und in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Die Sequenzierung wurde mit einer Nachweisgrenze von 1% VAF durchgeführt, und entdeckte Varianten mit einem VAF <5 % wurden unabhängig durch Amplikon-Sequenzierung auf einem MiSeq (Illumina) bestätigt.

3.3.8 Visualisierung von spezifischen CHIP Mutationen in humanen Plaques

Die mutationsspezifische Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungsanalyse (*mutaFISH*TM) des DNMT3A-Gens wurde an 3-5 µm dicken Gewebeschnitten aus menschlichen Koronar- und Karotisarterien von Patienten mit bekannter Mutation (c.2245C>T und c.2333T>G) im DNMT3A-Gen angewandt. Für die In-situ-Rolling-Circle-Technologie nutzten wir speziell angefertigten zweifarbigen DNMT3A-Mutations- und Wildtyp-spezifischen FISH-Sonden (Abnova, Taiwan). Das ausführliche Protokoll für die Vorbehandlung, reverse Transkription, Hybridisierung, Amplifikation und Signaldetektion ist im Anhang angehängt. Das Protokoll wurde im Wesentlichen vom Herstellerprotokoll für das *mutaFISH*TM RNA Accessory Kit und dem Protokoll für die *muta FISH*TM HER2wt RNA-Sonden übernommen. Lediglich wurden Schritte des Target Retrievals, der Waschpuffer und die Inkubation verändert. Es wurden Negativkontrollen verwendet, um unspezifische Bindungen und Hintergrund zu ermitteln. Alle Reagenzien wurden mit RNase-freiem (DEPC-behandeltem) Wasser/PBS hergestellt. Für die Hybridisierung wurde ein Boekel Scientific Slide Moat Ofen verwendet. Die Bilder wurden mit dem ZEISS Axioscan 7 Diascanner aufgenommen und mit der Zeiss Software ZEN 3.5 blue edition ausgewertet.

3.4 STARNET Studie und Proben

Sehr kondensiert wurden in STARNET von mehr als 600 KHK-Patienten, die für eine Bypass-Operation geplant wurden, Blut, Plasma und verschiedene kardiovaskulär relevante Gewebe gewonnen. Bedeutsam ist, dass in dieser exzellent phänotypisierten Kohorte KHK-relevante Expressionsmuster im Vergleich zu anderen frei zugänglichen Expressionsstudien (z.B. GTEx) deutlich klarere Assoziationen identifiziert werden konnten (Franzén et al., 2016).

3.4.1 Ganzgenom Sequenzierung

Zur Isolation der DNA aus Vollblut kam das QIAmp DNA Blood Midi Kit (Qiagen) zum Einsatz. Die DNA-Qualität wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) bewertet. Die Vorbereitungen der Genbibliotheken und die Sequenzierung wurden am Beijing Genomic Institute (BGI) durchgeführt. Die Genomische DNA-Proben, die die Qualitätskontrolle bestanden, wurden nach dem Zufallsprinzip mit der Covaris-Technologie fragmentiert. Dann wurden 350bp-Fragmente ausgewählt. Die Enden der DNA-Fragmente wurden repariert und am 3'-Ende jedes Strangs eine A-Base hinzugefügt. Anschließend wurden Adapter an die endreparierten bzw. mit einer A-Base versehenen DNA Fragmente ligiert. Zunächst wurden sie mittels ligationsvermittelter PCR (LM-PCR) amplifiziert, dass dann eine Einzelstrangtrennung und Zyklisierung stattfinden konnte. Für die Herstellung von DNA-Nanobällen (DNBs) wurde eine Rolling-Circle-Amplifikation genutzt.

Die qualifizierten DNBs wurden in gemusterte Nanoarrays geladen und Paar-End-Lesevorgänge wurden auf der BGISEQ-500-Plattform durchgeführt. Für jede Bibliothek wurde eine Hochdurchsatz-Sequenzierung durchgeführt, um sicherzustellen, dass jede Probe die durchschnittliche Sequenzierungsabdeckung von 35-fach erfüllt. Die Rohdaten aus der Sequenzierung wurden von der BGISEQ-500 Base-Calling-Software mit Standardparametern verarbeitet, und die Sequenzdaten jedes Individuums wurden als Paired-End-Reads generiert.

Rohdaten im FASTQ-Format wurden gefiltert und Rohdaten mit geringer Qualität wurden entfernt. Die Daten wurden mit dem Burrows-Wheeler Aligner (BWA) v0.7.12 am menschlichen Referenzgenom (GRCh37/HG19) ausgerichtet (H. Li & Durbin, 2009), (H. Li & Durbin, 2010) und das Varianten-Calling wurde mit dem Genome Analysis Toolkit (v3.3.0) (Nowak et al., 2015) durchgeführt, wobei doppelte Reads mit den Picard Tools v1.118. entfernt wurden.

Der HaplotypeCaller von GATK wurde verwendet, um sowohl SNPs als auch InDels gleichzeitig über eine lokale de-novo-Assemblierung von Haplotypen in einer Region mit Anzeichen von Variationen zu rufen (McKenna et al., 2010).

Basisqualitäts-Scores wurden mit dem GATK BaseRecalibrator rekali­briert und die SNPs-Rekalibrierung wurde mit der GATK VariantRecalibrator-Funktion durchgeführt (DePristo et al., 2011), (Van der Auwera et al., 2013).

3.4.2 RNA Sequenzierung und Datenverarbeitung

Um die Auswirkungen von CHIP-Mutationen auf die Genexpression in Makrophagen und Schaumzellen zu identifizieren, wurde nach der Zentrifugation von Vollblut das Zellpellet mit PBS gewaschen und die Zellen ausplattiert. Nach 3-6 Stunden hafteten die Monozyten an der Platte und die Erythrozyten und Lymphozyten, die nicht hafteten, konnten bei der Adhäsionsreinigung abgewaschen werden. Die Kultivierung der Monozyten fand in Humanserum statt, sie wurden stimuliert und über 48-72 Stunden zu Makrophagen differenziert. Der Übergang zu Schaumzellen wurde durch die Behandlung mit oxidiertem Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Cholesterin erreicht. Schließlich wurden die Makrophagen und Schaumzellen geerntet und die RNA isoliert (Koplev et al., 2022).

Die RNA-Bibliotheksvorbereitung basierte auf der Ribo-Zero-Bibliotheksvorbereitungsmethode unter Verwendung des Illumina TruSeq nonstranded mRNA-Kits. Die Proben wurden randomisiert, um Chargeneffekte zu vermeiden. Die Sequenzierung erfolgte mit Paired-End-Reads von 100 Basenpaaren auf einem Illumina HiSeq, und die Qualitätskontrolle wurde mit FASTQC3 durchgeführt. GENCODE wurde zur Quantifizierung der Expression von Genen und Isoformen verwendet und mit STAR4 auf das menschliche Genom abgebildet. Die durchschnittliche Abdeckung betrug >40 Millionen Reads pro Probe. Nur Proben mit mehr als 1 Million eindeutig zugeordneten Reads wurden für die weitere Analyse verwendet (von Scheidt et al., 2023).

3.4.3 eQTL Analyse

Die genetischen Daten wurden auf einem Genom-Build 37-Hintergrund mit GenomeStudio (Illumina) analysiert. Nach der Bestätigung des genetischen Geschlechts wurde eine Qualitätskontrolle mit *PLINK v 2.05* durchgeführt. Die

Daten wurden unter Verwendung des HRC r1.1 2016 Referenzpanels mit minimac4 importiert. Cis- und trans-regulierte Expression Quantitative Trait Loci (eQTLs) in Makrophagen wurden mit dem R-Paket matrix eQTL v.2.1.1 bestimmt. Für Alter, Geschlecht, BMI und die ersten fünf genetischen Hauptkomponenten wurde adjustiert. Cis-regulatorische SNPs innerhalb von 1 Megabase des jeweiligen Gens wurden durch ein lineares Regressionsmodell (hg19 Genome) bestimmt. Eine false discovery rate (FDR) <5% wurde als statistisch signifikant angesehen (von Scheidt et al., 2023).

3.4.4 Differentielle Genexpression und Analyse von Signalwegen

Die Unterschiede in der Genexpression zwischen CHIP-Mutationsträgern und Kontrollen wurden mit dem R-Paket limma untersucht. Co-Varianten in dem linearen Regressionsmodell waren Alter, Geschlecht und BMI. Bereinigte p-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Differenziell exprimierte Gene wurden mit *PhenoScanner* auf eine Überrepräsentation von Genen aus genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) zu KHK analysiert. Differenziell exprimierte Gene wurden mittels Binomialtest auf Anreicherung von Genontologie (GO) Begriffen und mittels Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) analysiert. Die maximale Größe eines Gensatzes in der GSEA wurde auf 3.000 festgelegt. Bonferroni-korrigierte p-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen (von Scheidt et al., 2023).

3.4.5 Netzwerk und Key-Driver-Analyse

Regulatorische Netzwerke wurden mit *GENIE3* rekonstruiert, basierend auf einer Random-Forests-Ensemble-Methode (Huynh-Thu & Geurts, 2018). Das Netzwerk wurde mit Transkriptionsfaktoren und cis-eQTL-regulierten Genen aus Makrophagen als Regulierungskandidaten angereichert (Abugessaisa et al., 2021; Lizio et al., 2015). Die gewichtete Key-Driver-Analyse (wKDA) wurde mit Mergeomics durchgeführt (Ding et al., 2021; Shu et al., 2016). Mergeomics ermöglicht es, krankheitsrelevante Prozesse auf molekulare Interaktionsnetzwerke abzubilden, um Hubs als potenzielle Schlüsselregulatoren zu identifizieren. Die Netzwerkvisualisierung wurde mit Cytoscape v3.7.0 realisiert.

3.4.6 Co-Expressionsmodule und klinische Merkmale

Die Korrelationsmuster zwischen den Genexpressionen wurden mit dem R-Paket Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA) analysiert, um Korrelationsnetzwerke zu konstruieren und Co-Expressionsmodule zu identifizieren. Die Korrelationen der Genexpression mit klinischen Merkmalen wurden mithilfe der Spearman-Korrelation berechnet. Die Assoziation von Co-Expressionsmodulen mit klinischen Merkmalen wurde mit dem Exakt-Test von Fisher analysiert, um die Anreicherung der Anzahl der signifikant korrelierten Gene in jedem Modul zu berechnen.

4 Ergebnisse

4.1 CHIP-Screening

Es wurden Proben von 540 Individuen im Alter zwischen 40-98 Jahren und bei Autopsie bestehender KHK mittels tiefer, gezielter DNA-Sequenzierung untersucht. Diese Patienten wurden durchschnittlich mit einer 3.592-fachen Sequenzierungstiefe auf CHIP definierende Mutationen gescreent. Jedes Gen hatte mindestens eine 1.000-fache Sequenzierungstiefe. Bei 253 Patienten (46,9%) konnten im Vollblut 445 individuelle CHIP-Mutationen nachgewiesen werden. Die Prävalenz von CHIP-Mutationen stieg mit dem Alter an ($R=0.76$; $p<0.001$), das mittlere Alter der Mutationsträger betrug 78,3 Jahre. 44,7% waren weiblich. 78 Individuen wiesen eine CHIP-Mutation mit einer Varianten-Allelfrequenz (VAF) $>10\%$ auf, 130 Individuen trugen mindestens eine CHIP-Mutationen mit VAF $>2\%$ auf und bei 45 Individuen konnte eine Klonale Hämatopoese mit einem VAF $<2\%$ identifiziert werden. Die höchste Last an CHIP wurde bei einem 85 Jahre alten Mann festgestellt, welcher 6 einzelne Mutationen aufwies. Die meisten somatischen Mutationen wurden in DNMT3A ($n=155$), TET2 ($n=152$) und ASXL1 ($n=32$) gefunden. Weitere CHIP Mutationen waren in BCOR, CBL, CALR, CBL, EZH2, GNAS, GNB1, IDH1, JAK2, KRAS, PPM1D, RAD21, SETBP1, SF3B1, SMC1A, SMC3, SRSF2, TP53, U2AF1 und ZRSR2 zu finden. In der folgenden Abbildung sind sowohl die Verteilung der VAF (links) als auch die prozentuale Verteilung von Genen, die von CHIP betroffen sind, dargestellt

(rechts). Eine komplette Auflistung aller CHIP-Mutationen befindet sich im Anhang 3.

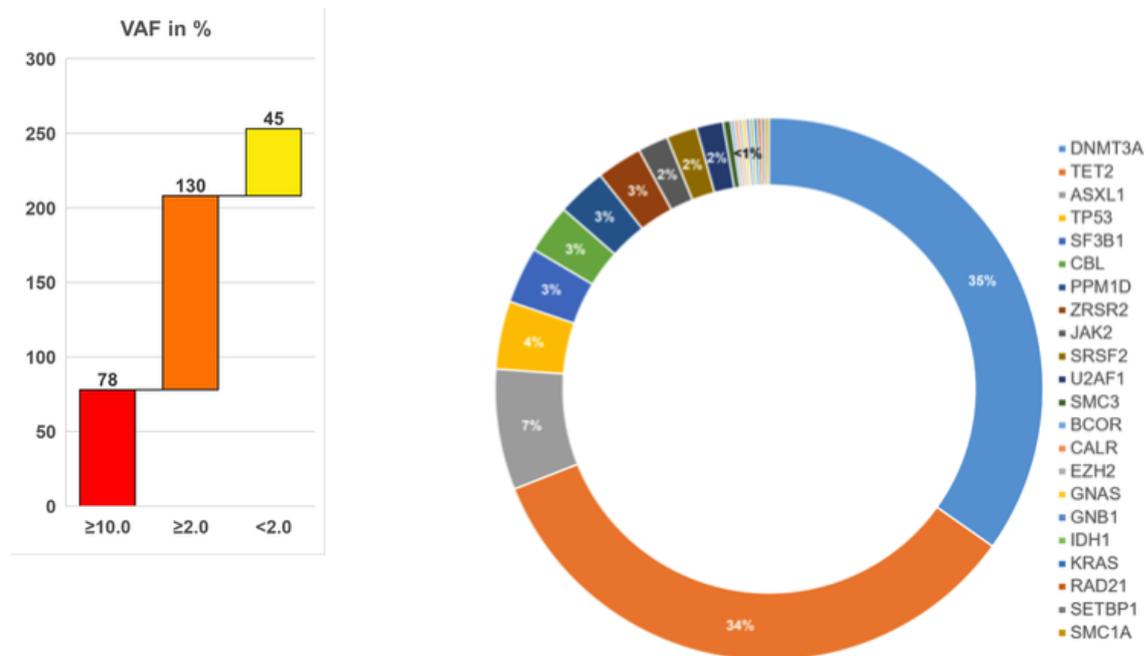


Abbildung 7: VAF und Mutationslast in MISSION

Gezeigt ist die Varianten-Allelfrequenz für <2%, ≥2-10% und ≥10%, sowie der relative Anteil der einzelnen CHIP definierenden Gene.

Im Vergleich zu MISSION waren die Patienten aus STARNET, die sich einer offenen Herzoperation unterzogen, jünger. Bezüglich der Sequenzierung erzielte die WGS-Sequenzierung eine deutlich geringe Tiefe als die tiefe, gezielte DNA-Sequenzierung in MISSION (mutmaßlich wurde eine Reihe CHIP-Mutationen mit geringer VAF in STARNET aufgrund der geringen Tiefe nicht identifiziert). Insgesamt wurden bei 134 Patienten, also 14,2% der Personen in STARNET, 159 spezifische CHIP-Mutationen in den Genen ASXL1, DNMT3A, JAK2 oder TET2 identifiziert (Anhang 3). Das durchschnittliche Alter der CHIP-Mutationsträger betrug 67,1 Jahre. Ein Anteil von 17%, numerisch 27 Patientinnen, waren weiblich. Eine Variantenanalyse in RNA-Sequenzdaten bestätigte bei 43 Mutationen die CHIP-Mutation auf RNA Ebene im Vollblut, und bei 10 Mutationen in kultivierten von Monozyten abstammenden Makrophagen. Fünf Mutationen konnten in kultivierten Makrophagen, die von Monozyten abstammen, bestätigt werden, und 18 Mutationen konnte in atherosklerose-betroffenem Gewebe nachgewiesen werden, welches aus der Aorta gewonnen wurde.

4.2 Visualisierung von spezifischen CHIP-Mutationen

CHIP-Mutationen konnten bislang nicht im humanen, atherosklerotischen Plaque visualisiert werden. Nachdem wir die CHIP Mutationen aus dem Vollblut auf DNA-Ebene auch im Gewebe nachweisen konnten, sollten im nächsten Schritt CHIP-mutierte Zellen im atherosklerotischen Plaque sichtbar gemacht werden. Die Darstellung wurde wie oben beschrieben mittels MutaFISH durchgeführt. Abbildung 8 zeigt den erfolgreichen Nachweis der spezifischen DNMT3A Mutation c.2333G>T im human Plaque einer Koronararterie. Die Färbung erfolgte auf RNA-Ebene in einem fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaque im FFPE-Gewebe. Es wurden parallel der Wildtyp sowie die Mutation angefärbt. Auf der linken Seite der Abbildung 8 ist eine Übersicht abgebildet, das Lumen des Gefäßes ist mit LU bezeichnet, IEL steht für innere elastische Lamina und EEL für äußere elastische Lamina. Die Roten Kästchen zeigen die Bereiche an, welche von Interesse sind. Die weißen Pfeile im mittleren Teil heben CHIP-tragende Makrophagen hervor. Im rechten Feld sind die zusammengefassten und individuellen Signale auf Einzelzellebene dargestellt. Das grüne Signal ist spezifisch für die DNMT3A Mutation c.2333G>T und das rote Signal für den DNMT3A-Wildtyp. Die Zellkerne (DAPI) kommen blau zur Darstellung.

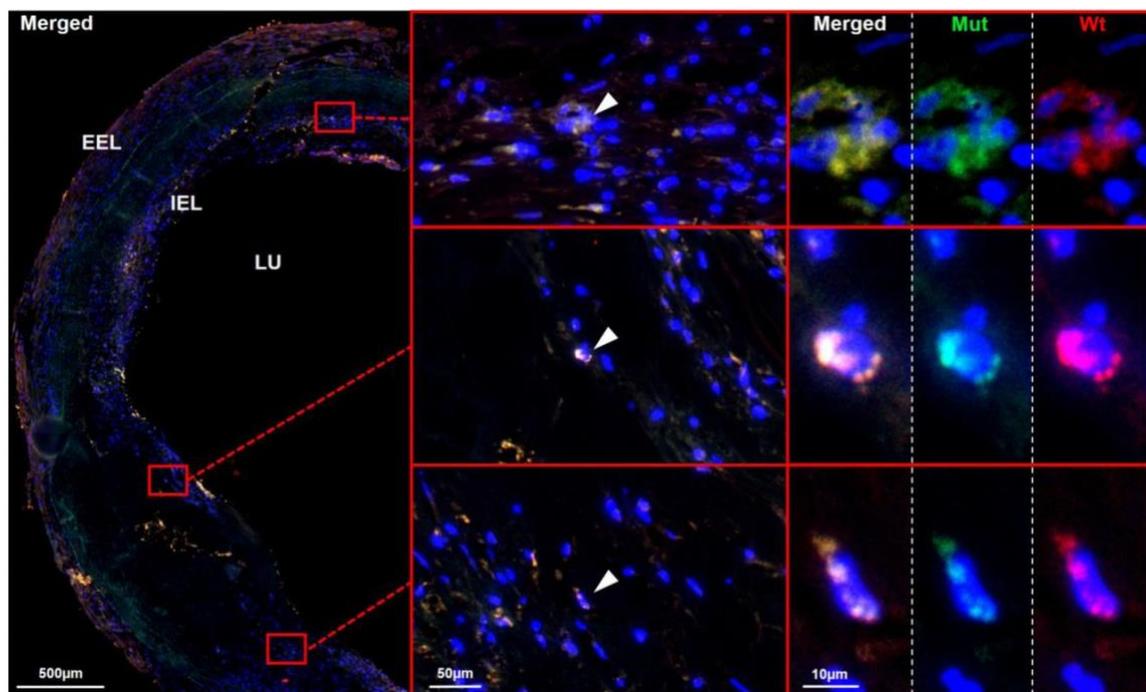


Abbildung 8: DNMT3A CHIP Mutation

Nachweis der spezifischen CHIP Mutation c.2333G>T im DNMT3A-Gen der atherosklerotisch veränderten linken Herzkranzarterie eines CHIP-Mutationsträgers mittels MutaFISH.

Für die eindeutige Klassifikation der Gewebe wurden alle arteriellen Proben mit der Hämatoxylin und Eosin (HE) und der Elastin van Gieson (EvG) Färbung gefärbt.

In der Abbildung 9 sind beispielhaft alle Färbungen der mittels MutaFISH untersuchten Probe aufgeführt. Das hierfür genutzte Gewebe stammt aus drei sequenziellen Schnitten des Paraffinblocks.



Abbildung 9: Färbungen im direkten Vergleich
Übersicht der einzelnen Färbungen (HE, EvG und mutaFISH) am Beispiel der weiterführend untersuchten proximalen linken Herzkranzarterie.

Um die Frage zu klären, welche Leukozytenpopulation von der CHIP-Mutation betroffen war, erfolgte die weitere Differenzierung mittels immunhistochemischer Färbung. Das Oberflächenmerkmal CD68 ist spezifisch für Makrophagen. Wir konnten in zwei sequentiellen Schnitten mittels MutaFISH und Immunhistochemie visualisieren, dass es sich bei den CHIP betroffenen Zellen um CD68 positive Makrophagen handelt. Dies ist in Abbildung 10 veranschaulicht. Visualisiert ist eine CHIP betroffene Makrophage in der Schulterregion eines humanen atherosklerotischen Plaques. Mittels mutaFISH wurde die DNMT3A Mutation c.2333T>G und der Wildtyp auf RNA-Ebene nachgewiesen. Das grüne Signal ist spezifisch für die DNMTA3 Mutation c.2333G>T und das rote Signal für den DNMT3A-Wildtyp. Die Zellkerne (DAPI) kommen blau zur Darstellung.

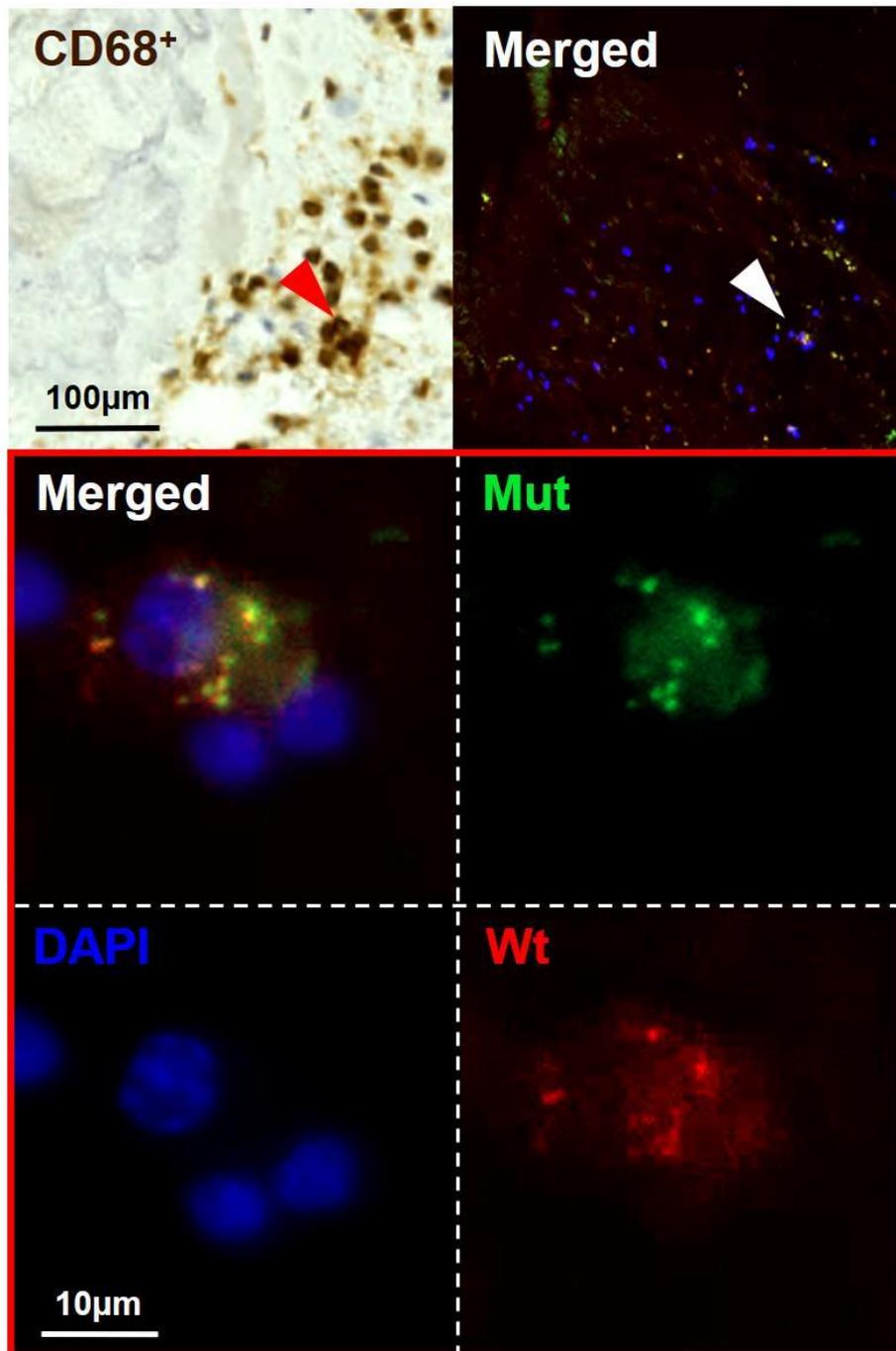


Abbildung 10: CHIP-positive Makrophage im humanen Plaque

Darstellung einer einzelnen CHIP betroffenen Makrophage in der Schulterregion eines atherosklerotischen Plaques, DNMT3A Mutation c.2333T>G

CHIP-mutierte Makrophagen wurden vor allem in der Schulterregion von fortgeschritten entzündlich veränderten Plaques gefunden, die in humanen Proben von Koronarien und Carotiden vorkamen.

Zur weiteren Validierung wurde eine separate CHIP Mutation (DNMT3A, c.2245C>T) mittels MutaFISH visualisiert (Abbildung 11). Erneut erfolgte die Visualisierung im humanen atherosklerotischen Plaque einer Koronararterie. Im

linken Teil der Abbildung 11 ist die Übersicht über die Schulterregion des Plaques abgebildet, die beiden roten Boxen markieren beispielhaft relevante Bereiche. In den Vergrößerungen sind die CHIP tragenden Leukozyten mit weißen Pfeilen hervorgehoben. In der rechten Spalte sind die individuellen Signale auf Einzelzellebene dargestellt.

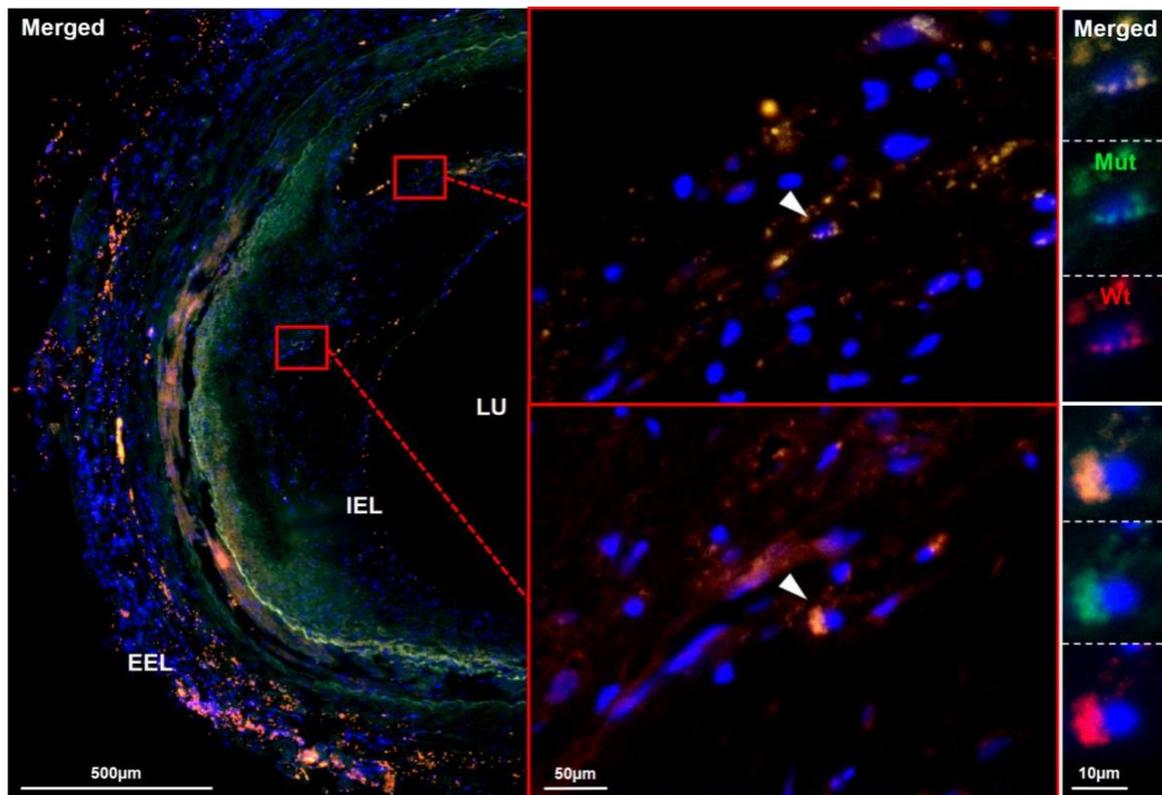


Abbildung 11: DNMT3A CHIP Mutation
 Nachweis der spezifischen CHIP-Mutation c.2245C>T im DNMT3A-Gen der atherosklerotisch veränderten linken Herzkranzarterie eines CHIP-Mutationsträgers mittels MutaFISH.

4.3 CHIP-Screening in Makrophagen

Nach erfolgreichem Nachweis auf DNA-Ebene und Visualisierung der CHIP-Mutation im humanen atherosklerotischen Plaque, sollen im Folgenden die Auswirkung von TET2 und ASXL1 CHIP-Mutationen auf die Genexpression in STARNET untersucht werden. Hierfür wurden alters- und geschlechts-gematchte Individuen mit und ohne CHIP verglichen.

4.3.1 Differenzielle Genexpressionsanalyse von TET2-mutierten Makrophagen

Zwischen den Patienten mit TET2 CHIP-Mutation (n=3; c.6819G>T; c.6834C>T und c.7698T>C) und den 21 Kontrollen ohne Mutationen zeigte sich nach Matching kein Unterschied beim Alter (60.3±12.0 vs. 61.8±8.2 Jahre). Die Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die Patienteneigenschaften von TET2-Mutationsträgern mit CHIP-befallenen Makrophagen und Kontrollen ohne CHIP-Mutation.

Tabelle 11: Patientencharakteristika von TET2 Mutationsträgern mit CHIP-mutierten Makrophagen und alters- und geschlechtgematchten Kontrollen, basierend auf Daten von KHK-Patienten aus STARNET

Patienteneigenschaften	TET2 CHIP (n=3)	TET2 non- CHIP (=21)	p-Wert
Mittleres Alter	60,3 (±12,0)	61,8 (±8,2)	0,82
Geschlecht (m)	3	21	1
Mittlerer BMI	28,0 (±4,9)	28,6 (±5,0)	0,86
Arterieller Hypertonus	2	14 (n=20)	1
Hypercholesterinämie	0	14 (n=20)	<0,05
Rauchen (jemals)	2	7 (n=20)	0,54
Diabetes	0	4 (n=20)	1
Früherer Myokardinfarkt	1	7 (n=20)	1
Früherer Schlaganfall	0	0 (n=20)	1

Mittels RNA-Sequenzierung der Makrophagen wurde die differentielle Genexpression zwischen TET2 Mutationsträgern und den gematchten Kontrollen ermittelt. Insgesamt wurden 1.523 Gene bei Trägern der TET2-Mutation im Vergleich zu den Kontrollen unterschiedlich exprimiert. 1.098 Gene waren bei CHIP-Mutationsträgern hochreguliert und 425 Gene herunterreguliert. Die am stärksten hochregulierten Gene waren LINC01882, IGKV3-15, IGHG2 und IGHA1, die am stärksten herunterregulierten Gene waren BMS1P10 und ZCCHC4 ($p_{adj.} < 0,05$).

Die differentielle Expression ist in Abbildung 12 visualisiert und kann unterschiedlichen Expressionsmodulen zugewiesen werden.

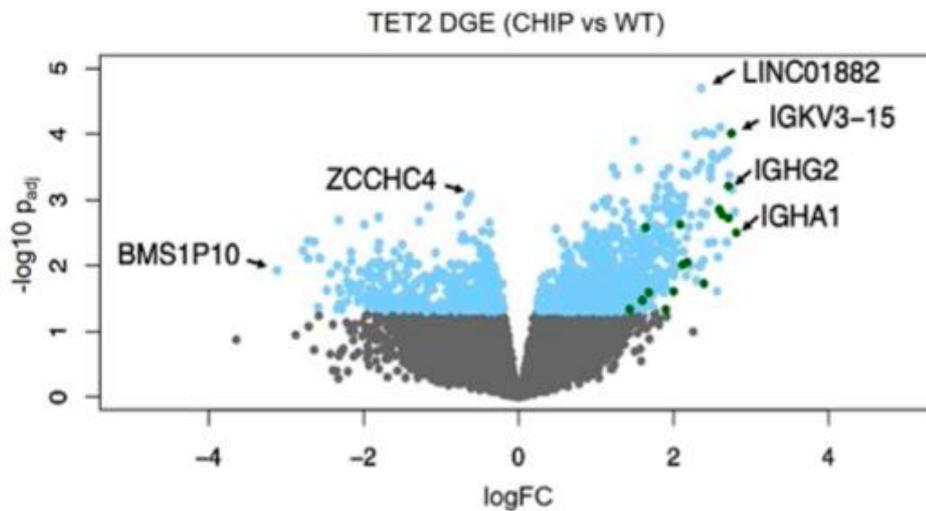


Abbildung 12: Volcanoplot TET2

Der Volcanoplot zeigt differenziell exprimierte Gene zwischen TET2 CHIP Mutationsträgern und gematchten nicht mutationstragenden Kontrollen

Basierend auf der differentiellen Expression wurde ein Enrichment und eine Gene Ontologie (GO) Analyse durchgeführt. Diese erbrachte auf Pathwayebene deutliche Unterschiede für T-Zell Rezeptorkomplex, Opsonisierung und Immunantwort von zirkulierenden Immunglobulinen (Abbildung 13). Generell zeigten sich Immunsystem vermittelte Signalkaskaden und Entzündungsprozesse hochreguliert.

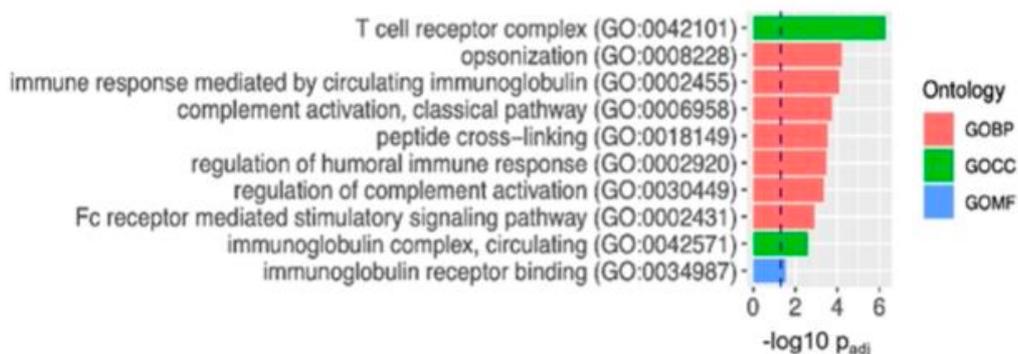


Abbildung 13: Top 10 Pathways TET2

Gezeigt sind die Top 10 Pathways basierend auf differenziell regulierten Genen zwischen TET2 CHIP-Mutationsträgern und gematchten nicht mutationstragenden Kontrollen

Mittels gewichteter Co-Expression-Netzwerkanalyse der STARNET RNA Sequenzdaten wurde ein Co-Expressionsmodul generiert, um funktionelle

Zusammenhänge zu untersuchen. Basierend auf dem Genetic Regulatory Network (GRN) sollen anschließend zentrale Key-Driver-Genes ermittelt werden. Basierend auf 10.267 Transkripten wurden 23 Module (Benennung erfolgte nach Farbkodierung in STARNET) generiert, welche zwischen 36 bis 2.473 Gene umfassten. Dafür wurden die gesamten verfügbaren RNAseq Daten von STARNET verwendet. Die biologische Funktion der Co-Expressionsmodule wurde mittels GO analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass TET2 Mutationen in Makrophagen eine signifikante Perturbation der Expression hervorrufen. Im *Darkgreen Modul* sind 38 Gene abgebildet, welche primär in Signalwege des Immunsystems eingebunden sind (GO:0019814, GO:0003823, GO:0006959, GO:0006958, GO:0002455, GO:0006956, GO:0002768, GO:0002764, GO:0016064, GO:0019724; $p < 0.001$ für sämtliche Pathways). Die wichtigsten durch CHIP hochregulierten Key-Driver-Gene in diesem Modul waren BACH2, BANK1, BLK, FCRL3, MS4A1 und PAX5. Abbildung 14 visualisiert das *Darkgreen Modul*, das sich zwischen CHIP-Mutationsträgern und den Kontrollen unterscheidet.

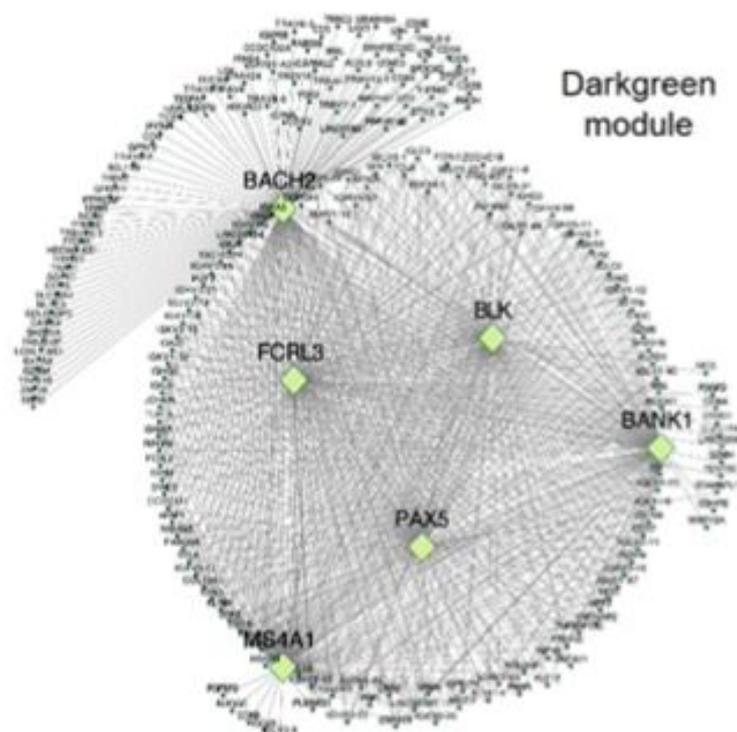


Abbildung 14: Dark Green Modul TET2

Das Darkgreen Modul repräsentiert ein zentrales durch CHIP verändertes Co-Expressionsnetzwerk. Übergeordnete Key-Driver-Gene sind hervorgehoben. Die Analyse basiert auf differenziell regulierten Genen zwischen TET2 CHIP-Mutationsträgern und gematchten nicht mutationstragenden Kontrollen

Anschließend wurden die die CHIP-spezifischen Veränderungen des *Darkgreen Moduls* mit klinischen Parametern in Kontext gesetzt (Abbildung 15).

Signifikante Zusammenhänge wurden für das Vorhandensein von Schwere und Komplexität der CAD auf der Grundlage von Koronarangiogrammen unter Anwendung des SYNTAX-Scores identifiziert. Der SYNTAX Score (SYnergy between PCI with TAXUS and Cardiac Surgery) wurde entwickelt, um die Schwere der KHK von Patienten zu klassifizieren (Sianos et al., 2005). Der Score umfasst Charakteristik der Komplexität der Läsion, die Anzahl der Läsionen und deren Ort.

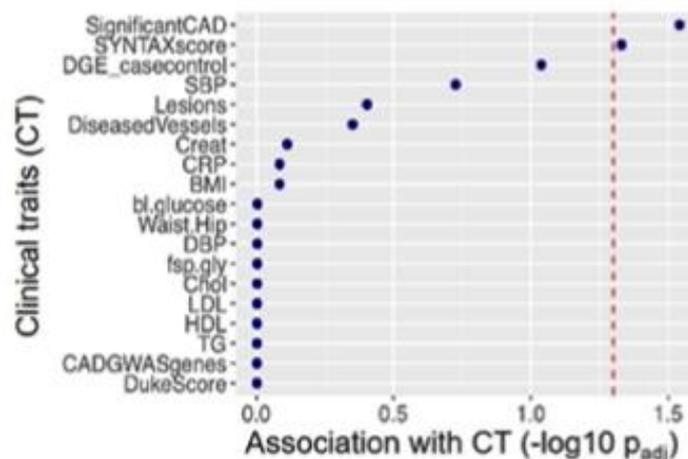


Abbildung 15: Klinische Relevanz TET2
Assoziation des TET2 CHIP perturbierten Darkgreen Modulus mit kardiovaskulär relevanten klinischen Traits.

4.3.2 Differenzielle Genexpressionsanalyse von ASXL1-mutierten Makrophagen

Die basalen Patientencharakteristika für die Genexpressionsanalyse von ASXL1 mutierten Makrophagen ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Für Alter (67,3±5,5 vs. 67,3±5,6 Jahre) und Geschlecht besteht nach erfolgtem Matching kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 12: Patientencharakteristika von ASXL1 Mutationsträgern mit CHIP-mutierten Makrophagen und alters- und geschlechtgematchten Kontrollen, basierend auf Daten von KHK-Patienten aus STARNET

Patienteneigenschaften	ASXL1 CHIP (n=3)	ASXL1 non- CHIP (=21)	p-Wert
Mittleres Alter	67,3 (\pm 5,5)	67,3 (\pm 5,6)	0,98
Geschlecht (m)	3	27	1
Mittlerer BMI	26,4 (\pm 0,9)	29,3 (\pm 3,6)	<0,05*
Arterieller Hypertonus	1	23 (n=26)	0,07
Hypercholesterinämie	2	14 (n=26)	1
Rauchen (jemals)	1	4 (n=26)	0,45
Diabetes	0	4 (n=26)	1
Früherer Myokardinfarkt	1	10 (n=26)	1
Früherer Schlaganfall	0	4 (n=26)	1

ASXL1 Mutationen in Makrophagen hatten einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression. In der Genexpressionsanalyse zeigten Makrophagen mit ASXL1 CHIP Mutation 1,222 Gene, die im Vergleich zu den gematchten Kontrollen differenziell exprimiert wurden. 665 Gene waren hochreguliert und 557 Gene waren herabreguliert. Unter den am stärksten hochregulierten Gene waren HLA-DQB2, ASNS und SLC25A16, und den am stärksten herunterregulierten Genen waren NPIP2, HNRNPH1 und POLA2 ($p_{\text{adj.}} < 0,05$) (Abbildung 16).

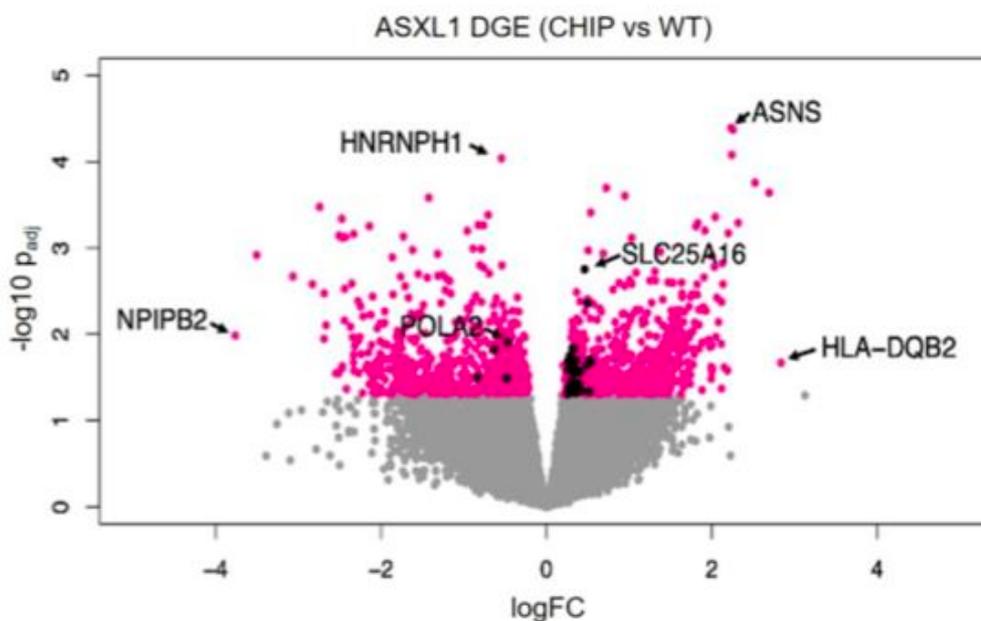


Abbildung 16: Volcanoplot ASXL1

Der Volcanoplot zeigt differenziell exprimierte Gene zwischen ASXL1 CHIP Mutationsträgern und gematchten nicht mutationstragenden Kontrollen.

In der durchgeführten GO-Analyse zeigten sich auf Pathwayebene die stärksten Unterschiede hinsichtlich intrazellulärer Anatomie (GO: 0005622), RNA-Bindung (GO:0003723) und der Bindung an heterozyklische Verbindungen (GO:1901363). Insgesamt ist zu beobachten, dass CHIP-Mutationen im ASXL1 Gen zur Hochregulation von Zellzyklus und metabolischen Prozessen führt.

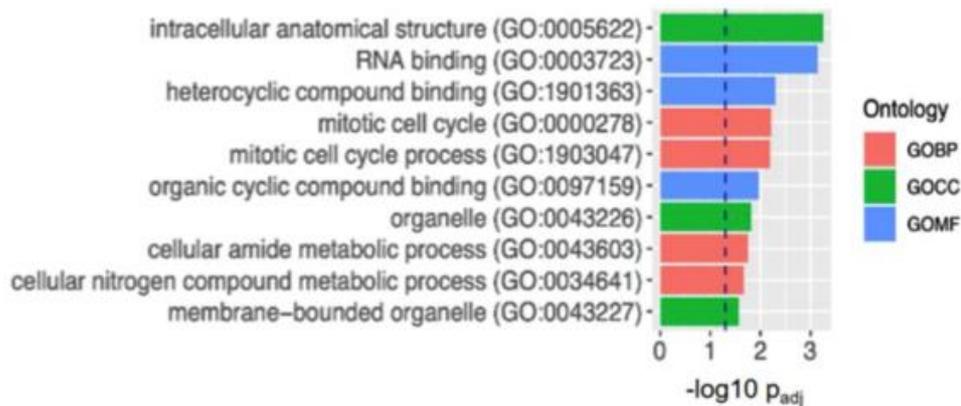


Abbildung 17: Top 10 Pathways ASXL1

Gezeigt sind die Top 10 Pathways basierend auf differenziell regulierten Genen zwischen ASXL1 CHIP-Mutationsträgern und gematchten nicht mutationstragenden Kontrollen.

Vergleichbar mit der Analyse, die bereits für TET2 erfolgte, kam es bei ASXL1 Mutationen in Makrophagen zu einer signifikanten Perturbation im *Black Module*, welches aus 468 Genen besteht, die in die intrazelluläre Translation von RNA zu Proteinen involviert sind (GO:0022626, GO:0006614, GO:0019083, GO:0006613, GO:0045047, GO:0006413, GO:0072599, GO:0000184, GO:0019080, GO:0070972; all p<0.001). Basierend auf ASXL1 mutierten Makrophagen konnten im Vergleich zu den Kontrollen fünf spezifische Key-Driver-Gene ANAPC16, CZIB, RPL7A, RPL14 und SNHG6 priorisiert werden. Das Black Module ist in Abbildung 18 visualisiert.

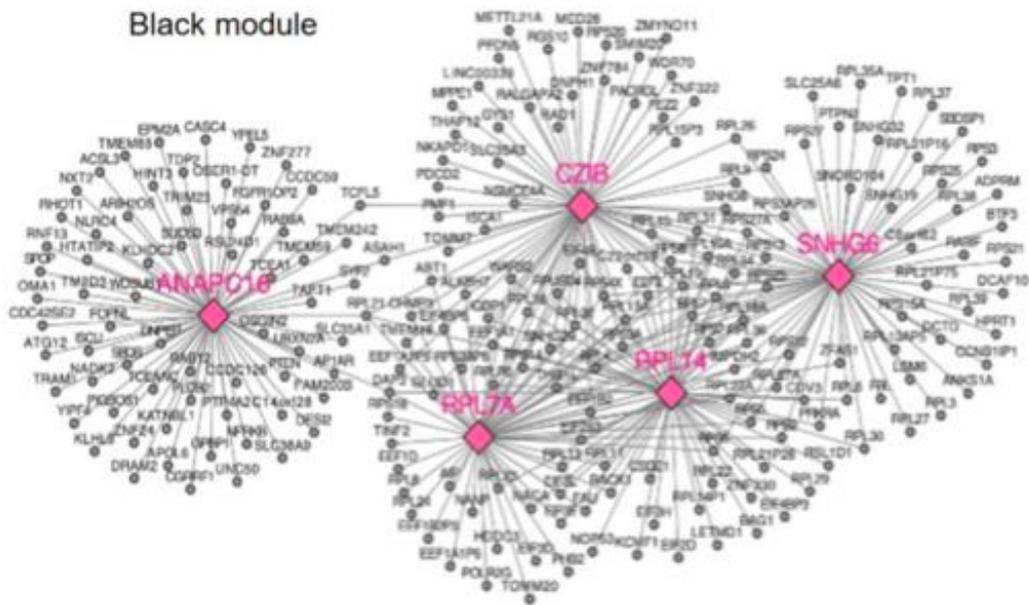


Abbildung 18: Black Modul ASXL1

Das Black Modul repräsentiert ein zentrales durch CHIP verändertes Co-Expressionsnetzwerk. Übergeordnete Key-Driver-Gene sind hervorgehoben. Die Analyse basiert auf differenziell regulierten Genen zwischen ASXL1 CHIP-Mutationsträgern und gematchten nicht mutationstragenden Kontrollen

Abschließend wurden die die CHIP-spezifischen Veränderungen des *Black Moduls* ebenfalls mit klinischen Parametern in Kontext gesetzt (Abbildung 19). Hierbei zeigten sich hochsignifikante Assoziationen mit Cholesterinmetabolismus, Inflammation aber auch KHK und Ausmaß der KHK.

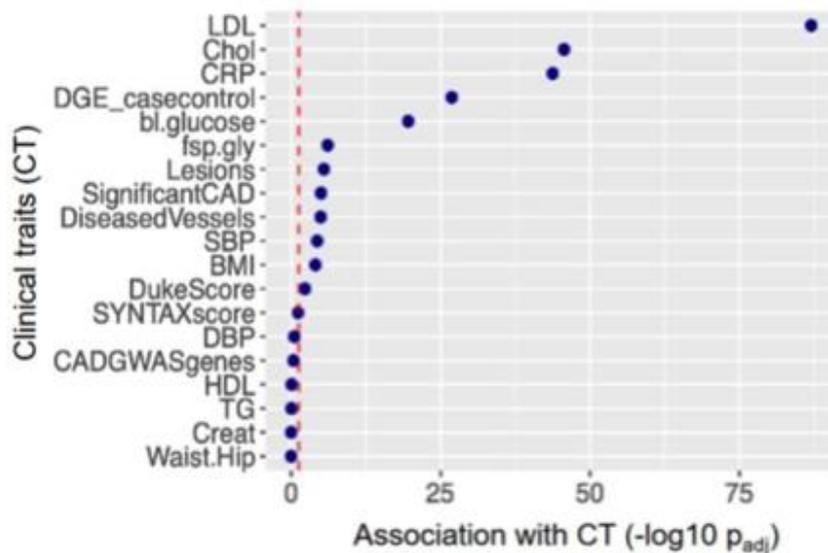


Abbildung 19: Klinische Relevanz ASXL1

Assoziation des ASXL1 CHIP perturbierten Black Moduls mit kardiovaskulär relevanten klinischen Traits.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von CHIP-Mutationen für die KHK besser zu verstehen. Mit MISSION konnte auf eine der größten postmortem Biobanken für kardiovaskuläres Gewebe weltweit zugegriffen werden. Dies erlaubt es Individuen mit bereits etablierter KHK auf CHIP zu screenen. In 46% der Individuen konnte mindestens eine CHIP-Mutation nachgewiesen werden. Das Durchschnittsalter der Mutationsträger lag bei 78 Jahren. Insgesamt belegt diese Analyse, dass CHIP Mutationen bei Patienten mit KHK häufiger zu finden sind als in Patientengruppen ohne KHK (Jaiswal et al., 2014), (Yu et al., 2022).

In 70% der betroffenen Individuen konnten die idente Mutation auch in mindestens einem kardiovaskulären Gewebe auf DNA-Ebene oder im Falle von STARNET, in einem Drittel der Fälle auch auf RNA-Ebene gezeigt werden. Obwohl sich Blut und Gewebe anhand ihrer zellulären Zusammensetzung deutlich unterscheiden, konnten auf DNA-Ebene ähnliche VAFs in Blut und kardiovaskulären Plaques festgestellt werden. Ferner konnten CHIP mutierte Leukozyten erstmalig im humanen atherosklerotischen Plaque visualisiert werden. Dies wurde mittels mutaFISH-Analyse erreicht. Immunhistochemische Analysen von sequentiellen Schnitten erlaubten die CHIP mutierten Leukozyten als Makrophagen zu identifizieren. Zudem konnten CHIP-Mutationen, denen Entwicklung und Progression von ischämischer Herzinsuffizienz zugeschrieben werden (Assmus et al., 2021; Dorsheimer et al., 2019), auch im linksventrikulären Myokard nachgewiesen werden.

Die funktionelle Bedeutung von CHIP wurde in STARNET in KHK Patienten, die eine Bypass-Operation erhalten haben, untersucht. Basierend auf Ganzgenom Sequenzierung (mit begrenzter Tiefe) und RNAseq Daten sind CHIP-Mutationen in 14% der Patienten gefunden worden. Die identen Mutationen konnten ebenfalls in atherosklerotisch veränderter Aorta, und in von Monozyten abstammenden Makrophagen und Schaumzellen nachgewiesen werden. Dieses erlaubte uns weitere Untersuchungen in Bezug von CHIP auf klinische Merkmale sowie RNA-Expressionsmuster anzustellen.

In RNA-Sequenzierungen fiel auf, dass in CHIP Mutationsträgern Gene unterschiedlich exprimiert werden. Zwei der prominentesten CHIP-Mutationen sind TET2 und ASXL1, beide verursachten eine deutliche Perturbation auf Expressionsebene im Vergleich zu alters- und geschlechtgematchten Kontrollen. Patienten, die eine TET2 Mutation aufwiesen, hatten eine signifikant höhere KHK-Last und KHK-Komplexität (gemessen am SYNTAX-Score). In den Genexpressionsstudien konnte eine Hochregulation inflammatorischer Signalkaskaden und des Immunsystems beobachtet werden. Spezifische Unterschiede der Gene fanden sich in Funktionen der Immunantwort, der Zellmigration und der Differenzierung von Leukozyten.

Bei ASXL1 Mutationsträgern zeigte sich eine signifikante Assoziation mit erhöhten LDL- und Gesamtcholesterinspiegeln, sowie erhöhte CRP-Spiegel als Zeichen einer vermehrten Inflammation. Genau wie bei TET2 konnte eine signifikante Assoziation mit der KHK und dem Ausmaß der KHK gezeigt werden. Insgesamt ergaben die Untersuchungen, dass Signalwege des Zellzyklus und metabolische Prozesse verändert waren. So betreffen Abweichung der Genexpression vor allem die Regulation von Metabolismus, Ubiquitinierung und Proteinsynthese.

Es gibt mehrere Studien im kardiovaskulären Bereich, die sich bereits mit anti-inflammatorischen Therapien auseinandergesetzt haben. Da CHIP nachweislich mit erhöhter Inflammation und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko vergesellschaftet ist, besteht großes Interesse spezifische entzündungshemmende Strategien für CHIP-Patienten zu untersuchen.

Potenziell kommen verschiedene anti-inflammatorische Ansätze z.B. mit Antikörpern gegen IL-1beta (Ridker et al., 2017) oder IL6-Rezeptor sowie anti-IL6-Liganden (Hartman & Frishman, 2014; Poznyak et al., 2021) in Frage. Colchizin ist ebenfalls im kardiovaskulären Kontext untersucht worden. Die CANTOS Studie untersuchte die Auswirkung von Canakinumab auf Patienten stattgehabtem Myokardinfarkt und erhöhten CRP-Werten. In der retrospektiven Analyse dieser Studie zeichnete sich neben der erhöhten Entzündungsaktivierung ein Behandlungsvorteil für Träger mit spezifischen CHIP-Mutation ab. Spezifisch konnte bei TET2 Mutationsträgern eine relative Risikoreduktion von 62% durch die

Gabe von Canakinumab erreicht werden. Allerdings wurden nur 40% der CANTOS Population auf CHIP gescreent, sodass die Gesamtzahl der CHIP-Mutationsträger insgesamt niedrig war (Svensson et al., 2022).

Diese Arbeit bestärkt die Annahme, dass spezifische CHIP-Mutationen zu gewebsspezifischen Veränderungen von Genexpressionsmustern führen. Also neben einem rein systemischen Effekt auch ein lokaler Effekt auf die Entstehung und Progression von atherosklerotischen Plaques besteht. Zentral scheinen dabei pro-inflammatorische Mechanismen zu sein. Dies eröffnet die Möglichkeit das kardiovaskuläre Risiko von Individuen mit CHIP-Mutationen künftig durch anti-inflammatorische Therapieansätze zu senken.

6 Limitationen

Unsere Studie weist mehrere Limitationen auf. Zum einen ist unbekannt, wie lange die CHIP-Mutationen bei den jeweiligen Individuen bestanden, da keine Longitudinalen Daten vorliegen. CHIP-Mutationen entwickeln sich über Dekaden hinweg und die damit verbundenen Risiken und potenziellen Auswirkungen akkumulieren über die Zeit. Des Weiteren erreichte STARNET mit der Ganzgenom Sequenzierung eine geringere Sequenziertiefe, sodass die Sensitivität in STARNET eingeschränkt ist – es wurden mutmaßlich CHIP-Mutationen mit niedriger VAF nicht detektiert. In MISSION wurde hingegen mit gezielter tiefer DNA-Sequenzierung nur ein Teil der knapp 70 bekannten CHIP relevanten Gene untersucht, sodass auch hier mutmaßlich nicht alle Mutationen erfasst wurden.

Dadurch, dass Daten aus unterschiedlichen Quellen (MISSION und STARNET) genutzt wurden, ist die direkte Vergleichbarkeit eingeschränkt. Ebenfalls ist noch unklar, inwiefern die Höhe der VAF einen Einfluss auf die klinische Auswirkung hat. Zum Beispiel bleibt noch offen, welcher Schwellenwert als VAF für einzelne CHIP-Mutation relevant ist (z.B. bei VAF <1%). Weiter untersucht werden muss die Relevanz der Mutationen der verschiedenen Gene sowie die Relevanz von Mehrfachmutationen. Wichtige Grundlage für personalisierbare Therapie ist es, die Auswirkungen von CHIP in prospektive randomisiert kontrollierten Studien zu validieren. Abschließend kann festgehalten werden, dass lokale Effekte von CHIP-

mutierten Leukozyten in kardiovaskulärem Gewebe bislang nicht ausreichend untersucht sind.

7 Fazit

Unsere Daten zeigen, dass aus dem Blut stammende zirkulierende CHIP-veränderte Leukozyten das Potenzial haben, in menschliche atherosklerotische Läsionen in Koronar- und Carotisarterien, Aorta und Herzmuskel einzudringen. Wir haben CHIP-mutierte Leukozyten auf Einzelzellebene in menschlichen atherosklerotischen Plaques visualisiert, und die Immunhistochemie bestätigte diese Leukozyten als CD68 positive Makrophagen. Da diese erworbenen CHIP-Mutationen von hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen im Knochenmark stammen und im Vollblut identifiziert wurden, können die sichtbar gemachten CHIP-Mutationen nicht von in der Gefäßwand ansässigen Makrophagen stammen. Darüber hinaus wurden durch RNA-Sequenzierung CHIP-spezifische Signaturen in Makrophagen, neue Key-Driver-Gene und Assoziationen mit klinischen Merkmalen wie Ausmaß und Komplexität der KHK identifiziert. Zukünftige Studien sind erforderlich, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen weiter zu charakterisieren, durch die einzelne Mutationen zur KHK beitragen, und um zu prüfen, ob die gezielte Beeinflussung spezifischer Signalwege für die Präzisionsmedizin bei Patienten mit CHIP-Mutationen von Nutzen sein könnte.

Literaturverzeichnis

- Abugessaisa, I., Ramilowski, J. A., Lizio, M., Severin, J., Hasegawa, A., Harshbarger, J., . . . Kasukawa, T. (2021). FANTOM enters 20th year: expansion of transcriptomic atlases and functional annotation of non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res*, 49(D1), D892-D898. doi:10.1093/nar/gkaa1054
- Amoros-Perez, M., & Fuster, J. J. (2020). Clonal hematopoiesis driven by somatic mutations: A new player in atherosclerotic cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 297, 120-126. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.02.008
- Assmus, B., Cremer, S., Kirschbaum, K., Culmann, D., Kiefer, K., Dorsheimer, L., . . . Zeiher, A. M. (2021). Clonal haematopoiesis in chronic ischaemic heart failure: prognostic role of clone size for DNMT3A- and TET2-driver gene mutations. *Eur Heart J*, 42(3), 257-265. doi:10.1093/eurheartj/ehaa845
- Boyle, J. J., Weissberg, P. L., & Bennett, M. R. (2002). Human macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis requires NO enhancement of Fas/Fas-L interactions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22(10), 1624-1630.
- Davies, M. J. (1990). A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation*, 82(3 Suppl), II38-46.
- Davies, M. J. (1996). Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis: the Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*, 94(8), 2013-2020.
- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., . . . Hanna, M. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics*, 43(5), 491-498.
- Dietz, R., & Rauch, B. (2003). Leitlinie zur Diagnose und Behandlung der chronischen koronaren Herzerkrankung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie–Herz-und Kreislaufforschung (DGK). *Zeitschrift für Kardiologie*, 92(6), 501-521.
- Ding, J., Blencowe, M., Nghiem, T., Ha, S. M., Chen, Y. W., Li, G., & Yang, X. (2021). Mergeomics 2.0: a web server for multi-omics data integration to elucidate disease networks and predict therapeutics. *Nucleic Acids Res*, 49(W1), W375-W387. doi:10.1093/nar/gkab405
- Dorsheimer, L., Assmus, B., Rasper, T., Ortman, C. A., Ecke, A., Abou-El-Ardat, K., . . . Rieger, M. A. (2019). Association of Mutations Contributing to Clonal Hematopoiesis With Prognosis in Chronic Ischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol*, 4(1), 25-33. doi:10.1001/jamacardio.2018.3965
- Franzén, O., Ermel, R., Cohain, A., Akers, N. K., Di Narzo, A., Talukdar, H. A., . . . Sukhvasi, K. (2016). Cardiometabolic risk loci share downstream cis- and trans-gene regulation across tissues and diseases. *Science*, 353(6301), 827-830.
- Genovese, G., Kahler, A. K., Handsaker, R. E., Lindberg, J., Rose, S. A., Bakhoum, S. F., . . . McCarroll, S. A. (2014). Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*, 371(26), 2477-2487. doi:10.1056/NEJMoa1409405
- Goldstein, J. A., Demetriou, D., Grines, C. L., Pica, M., Shoukfeh, M., & O'Neill, W. W. (2000). Multiple complex coronary plaques in patients with acute myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, 343(13), 915-922.

- Hamm, C. W. (2004). Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS). *Zeitschrift für Kardiologie*, 93(1), 72-90.
- Haralambieva, E., Banham, A. H., Bastard, C., Delsol, G., Gaulard, P., Ott, G., . . . Mason, D. Y. (2003). Detection by the fluorescence in situ hybridization technique of MYC translocations in paraffin-embedded lymphoma biopsy samples. *British journal of haematology*, 121(1), 49-56.
- Hartman, J., & Frishman, W. H. (2014). Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol Rev*, 22(3), 147-151. doi:10.1097/CRD.0000000000000021
- Herrington, D. M., Mao, C., Parker, S. J., Fu, Z., Yu, G., Chen, L., . . . Van Eyk, J. E. (2018). Proteomic Architecture of Human Coronary and Aortic Atherosclerosis. *Circulation*, 137(25), 2741-2756. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034365
- Huynh-Thu, V. A., & Geurts, P. (2018). dynGENIE3: dynamical GENIE3 for the inference of gene networks from time series expression data. *Sci Rep*, 8(1), 3384. doi:10.1038/s41598-018-21715-0
- Iris Schrijver, M. L. Z., MD. (2023). Tools for genetics and genomics: Cytogenetics and molecular genetics. *uptodate*.
- Jaiswal, S., Fontanillas, P., Flannick, J., Manning, A., Grauman, P. V., Mar, B. G., . . . Chavez, A. (2014). Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *New England Journal of Medicine*, 371(26), 2488-2498.
- Kelm, M., & Strauer, B. (1999). Endotheliale dysfunction therapeutische und prognostische relevanz. *Der Internist*, 40(12), 1300-1307.
- Kinlay, S., Libby, P., & Ganz, P. (2001). Endothelial function and coronary artery disease. *Current opinion in lipidology*, 12(4), 383-389.
- Koplev, S., Seldin, M., Sukhvasi, K., Ermel, R., Pang, S., Zeng, L., . . . Björkegren, J. L. M. (2022). A mechanistic framework for cardiometabolic and coronary artery diseases. *Nature Cardiovascular Research*, 1(1), 85-100. doi:10.1038/s44161-021-00009-1
- Leoni, C., Montagner, S., Rinaldi, A., Bertoni, F., Polletti, S., Balestrieri, C., & Monticelli, S. (2017). Dnmt3a restrains mast cell inflammatory responses. *Proceedings of the national academy of sciences*, 114(8), E1490-E1499.
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324
- Li, H., & Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26(5), 589-595. doi:10.1093/bioinformatics/btp698
- Li, Z., Cai, X., Cai, C. L., Wang, J., Zhang, W., Petersen, B. E., . . . Xu, M. (2011). Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*, 118(17), 4509-4518. doi:10.1182/blood-2010-12-325241
- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473(7347), 317-325.
- Lizio, M., Harshbarger, J., Shimoji, H., Severin, J., Kasukawa, T., Sahin, S., . . . consortium, F. (2015). Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol*, 16(1), 22. doi:10.1186/s13059-014-0560-6

- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzky, A., . . . Daly, M. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research*, 20(9), 1297-1303.
- Moore, K. J., & Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 145(3), 341-355.
- Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., . . . Fullerton, H. J. (2016). Executive summary: heart disease and stroke statistics—2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 133(4), 447-454.
- Mulisch, M., & Welsch, U. (2015). *Romeis-mikroskopische technik*: Springer-Verlag.
- MutaFISH. (2023). Retrieved from <https://www.fishersci.com/shop/products/mutafish-dna-accessory-kit-1-cells/89333042>
- Nowak, J., Kościńska, K., Mika-Witkowska, R., Rogatko-Koroś, M., Mizia, S., Jaskuła, E., . . . Gronkowska, A. (2015). Role of Donor Activating KIR–HLA Ligand–Mediated NK Cell Education Status in Control of Malignancy in Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(5), 829-839.
- Peter J Hulick, M., MMSc, FACMG. (2022). Next-generation DNA sequencing (NGS): Principles and clinical applications.
- Poznyak, A. V., Bharadwaj, D., Prasad, G., Grechko, A. V., Sazonova, M. A., & Orekhov, A. N. (2021). Anti-Inflammatory Therapy for Atherosclerosis: Focusing on Cytokines. *Int J Mol Sci*, 22(13). doi:10.3390/ijms22137061
- Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, C. K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., . . . Bernard, O. A. (2011). TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell*, 20(1), 25-38. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.003
- Redgrave, J. N., Gallagher, P., Lovett, J. K., & Rothwell, P. M. (2008). Critical cap thickness and rupture in symptomatic carotid plaques: the oxford plaque study. *Stroke*, 39(6), 1722-1729.
- Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., . . . Group, C. T. (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*, 377(12), 1119-1131. doi:10.1056/NEJMoa1707914
- Rizzo, J. M., & Buck, M. J. (2012). Key principles and clinical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer prevention research*, 5(7), 887-900.
- Schmidt, O., & Schmidt, O. (2017). Genomik. *Genetik und Molekularbiologie*, 263-280.
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., & Wesker, K. (2015). *Prometheus Lernatlas-Kopf, Hals und Neuroanatomie*: Thieme.
- Shu, L., Zhao, Y., Kurt, Z., Byars, S. G., Tukiainen, T., Kettunen, J., . . . Yang, X. (2016). Mergeomics: multidimensional data integration to identify pathogenic perturbations to biological systems. *BMC Genomics*, 17(1), 874. doi:10.1186/s12864-016-3198-9
- Sianos, G., Morel, M.-A., Kappetein, A. P., Morice, M.-C., Colombo, A., Dawkins, K., . . . Mohr, F. W. (2005). The SYNTAX Score: an angiographic tool

- grading the complexity of coronary artery disease. *EuroIntervention*, 1(2), 219-227.
- Sary, H. C., Blankenhorn, D. H., Chandler, A. B., Glagov, S., Insull Jr, W., Richardson, M., . . . Wagner, W. D. (1992). A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology*, 12(1), 120-134.
- Sary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull Jr, W., Rosenfeld, M. E., . . . Wissler, R. W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 89(5), 2462-2478.
- Stone, G. W., Maehara, A., Lansky, A. J., De Bruyne, B., Cristea, E., Mintz, G. S., . . . Marso, S. P. (2011). A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*, 364(3), 226-235.
- Svensson, E. C., Madar, A., Campbell, C. D., He, Y., Sultan, M., Healey, M. L., . . . Basson, C. T. (2022). TET2-Driven Clonal Hematopoiesis and Response to Canakinumab: An Exploratory Analysis of the CANTOS Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol*, 7(5), 521-528. doi:10.1001/jamacardio.2022.0386
- Tabas, I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 10(1), 36-46.
- Van der Auwera, G. A., Carneiro, M. O., Hartl, C., Poplin, R., Del Angel, G., Levy-Moonshine, A., . . . DePristo, M. A. (2013). From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*, 43(1110), 11 10 11-11 10 33. doi:10.1002/0471250953.bi1110s43
- van Ommen, G.-J. B., Breuning, M. H., & Raap, A. K. (1995). FISH in genome research and molecular diagnostics. *Current opinion in genetics & development*, 5(3), 304-308.
- von Scheidt, M., Bauer, S., Ma, A., Hao, K., Kessler, T., Vilne, B., . . . Mokry, M. (2023). Leukocytes carrying Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (CHIP) Mutations invade Human Atherosclerotic Plaques. *medRxiv*.
- Yu, Z., Fidler, T. P., Ruan, Y., Vlasschaert, C., Nakao, T., Uddin, M. M., . . . Natarajan, P. (2022). Genetic modification of inflammation and clonal hematopoiesis-associated coronary artery disease. *medRxiv*, 2022.2012.2008.22283237. doi:10.1101/2022.12.08.22283237

Anhang

Anhang 1 Protokoll Promega blood DNA kit	X
Anhang 2 angepasstes mutaFISH Protokoll	XXII
Anhang 3 einzelne CHIP Mutationen aus MISSION.....	XXV



Maxwell[®] RSC Blood DNA Kit

All technical literature is available at: www.promega.com/protocols/
 Visit the web site to verify that you are using the most current version of this Technical Manual.
 E-mail Promega Technical Services if you have questions on use of this system: techserv@promega.com

1.	Description.....	1
2.	Product Components and Storage Conditions.....	2
3.	Manual Preparation of Blood Samples.....	3
	3.A. Preparation of Whole Blood Samples	3
	3.B. Maxwell [®] RSC Blood DNA Cartridge Preparation.....	4
4.	Maxprep [™] Preprocessing	5
	4.A. Maxprep [™] Cartridge Preparation	5
	4.B. Maxprep [™] Liquid Handler Preprocessing Protocol	7
5.	Maxwell [®] RSC Instrument Setup and Run	7
6.	Reference	10
7.	Troubleshooting.....	10
8.	Related Products.....	11
9.	Summary of Changes	12

1. Description

The Maxwell[®] RSC Blood DNA Kit^(a) is used with the Maxwell[®] RSC or Maxwell[®] RSC 48 Instruments to provide an easy method for efficient, automated purification of genomic DNA (gDNA) from samples. The Maxwell[®] RSC and Maxwell[®] RSC 48 Instruments are supplied with preprogrammed purification procedures and are designed for use with predispersed reagent cartridges, maximizing simplicity and convenience. The Maxwell[®] RSC Instrument can process up to 16 samples and the Maxwell[®] RSC 48 instrument can process up to 48 samples. Both instruments can process the maximum number of samples in about 40 minutes. The purified DNA can be used directly in a variety of downstream applications.

The Maxwell[®] RSC Blood DNA Kit purifies samples using a novel paramagnetic particle, called the MagnaCel[™] particle, which provides a mobile solid phase that optimizes sample capture, washing and purification of gDNA. This particle utilizes cellulose-based binding of nucleic acids and provides a higher bind capacity and cleaner eluate than traditional DNA purification. The Maxwell[®] RSC and Maxwell[®] RSC 48 are magnetic particle-handling instruments that efficiently bind gDNA to the paramagnetic particle in the first well of a prefilled cartridge. The samples are processed through a series of washes before the gDNA is eluted.



1. Description (continued)

Prior to extraction, samples can be preprocessed manually or using the Maxprep™ Liquid Handler. The Maxprep™ Liquid Handler will scan bar codes and transfer samples from primary blood tubes, perform sample lysis prior to extraction, transfer lysed samples to Maxwell® RSC Blood DNA cartridges, add plungers to Maxwell® RSC Blood DNA cartridges, and add Elution Buffer to elution tubes. Instructions are provided for preprocessing samples manually or with the Maxprep™ Liquid Handler.

2. Product Components and Storage Conditions

PRODUCT	SIZE	CAT.#
Maxwell® RSC Blood DNA Kit	48 preps	AS1400

For Research Use. Sufficient for 48 automated isolations from up to 300µl of whole blood samples. Includes:

- 2 × 1ml Proteinase K (PK) Solution
- 20ml Lysis Buffer
- 48 Maxwell® RSC Cartridges
- 1 Maxwell® RSC Plunger Pack (48 Plungers)
- 50 Elution Tubes (0.5ml)
- 20ml Elution Buffer

PRODUCT	SIZE	CAT.#
Maxwell® RSC Blood DNA Multi-Pack Kit	144 preps	ASB1400

For Research Use. Sufficient for 144 automated isolations from up to 300µl of whole blood samples.

Note: ASB1400 is not recommended for use with the Maxprep™ Liquid Handler. Includes:

- 6 × 1ml Proteinase K (PK) Solution
- 3 × 20ml Lysis Buffer
- 144 Maxwell® RSC Cartridges
- 3 × 50/pkg Maxwell® CSC/RSC Plungers
- 3 × 50 Elution Tubes (0.5ml)
- 3 × 20ml Elution Buffer

Storage Conditions: Store the Maxwell® RSC Blood DNA Kit at 15–30°C.

Safety Information: The Maxwell® RSC Cartridges contain ethanol and isopropanol. These substances should be considered flammable, harmful and irritants. Lysis Buffer contains guanidine hydrochloride and urea. These substances should be considered toxic, harmful and irritants.



Maxwell® RSC Cartridges are designed to be used with potentially infectious substances. Wear appropriate protection (e.g., gloves and goggles) when handling potentially infectious substances. Adhere to your institutional guidelines for the handling and disposal of all potentially infectious substances used with this system.

Available Separately (recommended for sample extraction)

For Manual Preprocessing

PRODUCT	SIZE	CAT.#
ClickFit Microtube, 1.5ml	1,000/pack	V4741

For Preprocessing with the Maxprep™ Liquid Handler

PRODUCT	SIZE	CAT.#
Nunc 2.0ml Deep Well Plates	60/pack	AS9307
Maxprep™ 1000µl Conductive Disposable Tips, Filtered	40/box	AS9303
Maxprep™ 300µl Conductive Disposable Tips, Filtered	60/box	AS9302
Maxprep™ Reagent Reservoir, 50ml	28/pack	AS9304
Maxprep™ Plunger Holder	1 each	AS9408
Maxwell® RSC Plunger Pack	1 each	AS1670
Maxprep™ 3-Position Reagent Tube Holder	1 each	AS9409

3. Manual Preparation of Blood Samples

Materials to Be Supplied by the User

- optional, rotating tube mixer for liquid blood samples
- benchtop vortex mixer
- pipettors and pipette tips for sample transfer into prefilled reagent cartridges
- 1.5–2.0ml tubes for incubation of samples (e.g., ClickFit Microtube, 1.5ml [Cat.# V4741]; recommended to prevent the cap from opening during heating)
- heating block set at 56°C

The total yield of genomic DNA from whole blood samples depends on the sample volume and number of white blood cells/ml. Each Maxwell® RSC Cartridge supplied in the Maxwell® RSC Blood DNA Kit is designed to purify genomic DNA from up to 300µl of whole blood, assuming an average number of white blood cells in the range of 4×10^6 to 1.1×10^7 cells/ml whole blood (values for a normal healthy adult; 1).

Note: Whole blood samples collected in EDTA, ACD or heparin tubes can be used. These samples may be either fresh or frozen. Frozen samples must be thawed before processing.

3.A. Preparation of Whole Blood Samples

1. Mix all blood samples for at least 5 minutes at room temperature.
2. Prepare and label incubation tubes compatible with a heating block.
3. Add 30µl of Proteinase K (PK) Solution to each incubation tube.
4. Add liquid blood (up to 300µl) to each incubation tube.



3.A. Preparation of Whole Blood Samples (continued)

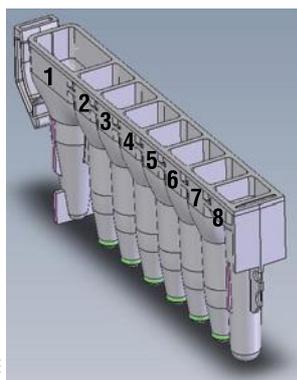
5. Add 300µl of Lysis Buffer to each incubation tube.
6. Vortex each tube for 10 seconds.
7. Incubate each tube in the heating block (set to 56°C) for 20 minutes. During this incubation, prepare cartridges as described in Section 3.B.
8. Transfer each blood lysate sample from the incubation tube to well #1 of each cartridge. (Well #1 is the well closest to the printed side and furthest from the elution tube.)

3.B. Maxwell® RSC Blood DNA Cartridge Preparation

1. Change gloves before handling Maxwell® RSC Cartridges, RSC Plungers and Elution Tubes (0.5ml). Place each cartridge in the deck tray with the printed side facing away from the elution tubes. Press down on both the front and back of the cartridge to snap it into position. Carefully peel back the seal so that all plastic comes off the top of the cartridge. Ensure that all sealing tape and any residual adhesive are removed before placing cartridges in the instrument.
2. Place one plunger into well #8 of each cartridge.
3. Place an empty elution tube into the elution tube position for each cartridge in the deck tray. Add 50µl of Elution Buffer to the bottom of each elution tube.
4. Proceed to Section 5 for Maxwell® Instrument setup and run.

Notes:

1. Specimen or reagent spills on any part of the deck tray should be cleaned with a detergent-water solution, followed by a bacteriocidal spray or wipe, then water. Do not use bleach on any instrument parts.
2. Use only the 0.5ml Elution Tubes provided in the kit; other tubes may be incompatible with the Maxwell® Instrument.



User Adds to Wells

1. Sample lysate
8. RSC Plunger

Figure 1. Maxwell® RSC Cartridge.



Figure 2. Setup and configuration of the deck tray. Elution Buffer is added to the elution tubes as shown. Plungers are in well #8 of the cartridge.

4. Maxprep™ Preprocessing

Materials to Be Supplied by the User

- optional, rotating tube mixer for liquid blood samples

The total yield of genomic DNA from whole blood samples depends on the sample volume and number of white blood cells/ml. Each Maxwell® RSC Cartridge supplied in the Maxwell® RSC Blood DNA Kit is designed to purify genomic DNA from up to 300µl of whole blood, assuming an average number of white blood cells in the range of 4×10^6 to 1.1×10^7 cells/ml whole blood (values for a normal healthy adult; 1).

Note: Whole blood samples collected in EDTA, ACD or heparin tubes can be used. These samples may be either fresh or frozen. Frozen samples must be thawed before processing.

4.A. Maxprep™ Cartridge Preparation

1. Mix all blood samples for at least 5 minutes at room temperature.
2. Turn on the Maxprep™ Liquid Handler and PC. Log in to the PC, and start the Maxprep™ software on the PC by double-clicking the desktop icon.
3. Press **Start** to access the 'Methods' screen.
4. On the 'Methods' screen, select a method using one of the two options below:
 1. Touch the Blood DNA preprocessing method or laboratory-specific variant of the Blood DNA preprocessing method.
 2. Use a bar code reader to scan the 2D bar code on the kit box to automatically select the appropriate base method. Touch the laboratory-specific user variant of the Blood DNA preprocessing method if desired.
5. Verify that the appropriate preprocessing method or user-variant method has been selected, and press the **Proceed** button. Touch the **Run** button on the method run screen to start the run.
6. Enter any method-specific variables (Sample Number, Sample Volume, Elution Volume).



4.A. Maxprep™ Cartridge Preparation (continued)

7. Prior to placing Maxwell® RSC or Maxwell® RSC 48 deck trays on the Maxprep™ Liquid Handler, prepare the deck trays with cartridges and elution tubes. Change gloves before handling Maxwell® RSC Cartridges, RSC Plungers and Elution Tubes (0.5ml). Place each cartridge in the deck tray(s) with the printed side facing away from the elution tubes. Press down on both the front and back of the cartridge to snap it into position. Carefully peel back the seal so that all plastic comes off the top of the cartridge. Ensure that all sealing tape and any residual adhesive are removed before placing cartridges in the Maxprep™ Liquid Handler. Place an empty elution tube into the elution tube position for each cartridge in the deck tray(s).

Notes:

1. Specimen or reagent spills on any part of the deck tray should be cleaned with a detergent-water solution, followed by a bacteriocidal spray or wipe, then water. Do not use bleach on any instrument parts.
 2. Use only the 0.5ml Elution Tubes provided in the kit; other tubes may be incompatible with the Maxwell® Instruments.
8. Follow instrument setup instructions displayed in the method. The Maxprep™ software will direct you where to place the following items on the instrument:

Labware Type

- Maxprep™ Plunger Holders and Maxwell® RSC Plunger Packs (2; one may be partially full)
 - Maxwell® RSC 48 Front deck tray or Maxwell® RSC deck tray containing Maxwell® RSC cartridges with seals removed and open elution tubes
 - Maxwell® RSC 48 Back deck tray or Maxwell® RSC deck tray containing Maxwell® RSC cartridges with seals removed and open elution tubes (if you are running greater than 24 samples in a run)
 - Maxprep™ 3-Position Reagent Tube Holder with up to 3 Proteinase K tubes
 - Maxprep™ Reagent Reservoir, 50ml, with Lysis Buffer
 - Maxprep™ Reagent Reservoir, 50ml, with Elution Buffer
 - Nunc 2.0ml Deep-well Plate (empty)
 - Maxprep™ 1000µl Conductive Disposable Tips, Filtered (2; one rack may be partially full)
 - Maxprep™ 300µl Conductive Disposable Tips, Filtered (rack may be partially full)
9. Close the Maxprep™ Liquid Handler door, and touch the **Next** button to start the automated preprocessing of your samples.

4.B. Maxprep™ Liquid Handler Preprocessing Protocol

The Maxprep™ Liquid Handler will use the following steps to prepare samples prior to extraction with the Maxwell® RSC or Maxwell® RSC 48 Instrument.



1. The system prepares a lysis reaction in the Nunc 2.0ml Processing Plate consisting of the following components:
 - a. The specified volume of whole blood
 - b. 30µl of Proteinase K Solution
 - c. 300µl of Lysis Buffer
2. The Processing Plate incubates for 20 minutes.
3. During the lysis incubation, plungers are transferred to each of the cartridges in the Maxwell® RSC or Maxwell® RSC 48 deck trays. The specified volume of Elution Buffer is transferred to the elution tubes for each position in the Maxwell® RSC or Maxwell® RSC 48 deck tray.
4. After lysis incubation is complete, each sample is transferred from the Processing Plate to its corresponding Maxwell® RSC cartridge.
5. Once the method is complete, open the Maxprep™ Liquid Handler door, and transfer the deck trays to your Maxwell® RSC or Maxwell® RSC 48 Instrument for extraction. Remove primary sample tubes and Processing Plate, and discard the used tips from the waste bin as hazardous waste following your institution's recommended guidelines. Either discard or tightly cap and store remaining reagents.

Consumables used by the Maxprep™ Instrument for preprocessing methods are designed to be used with potentially infectious substances. Use appropriate protective equipment (e.g., gloves and goggles) when handling infectious substances. Adhere to your institutional guidelines for the handling and disposal of all infectious substances when used with this system.

5. Maxwell® RSC Instrument Setup and Run

Refer to the *Maxwell® RSC Instrument Operating Manual #TM411* or the *Maxwell® RSC 48 Instrument Operating Manual #TM510* for detailed information.

1. Turn on the Maxwell® Instrument and Tablet PC. Log in to the Tablet PC, and start the maxwell® Software by double-touching the icon on the desktop. The instrument will power up, proceed through a self-check and home all moving parts.
2. Touch **Start** to access the 'Methods' screen.

When running in Portal mode, scan the bar code(s) on the deck tray(s). After data has been returned from the Portal database, press **Continue** to use the sample tracking information for the deck tray(s) or press **New** to start a run and enter new sample tracking information.



5. Maxwell® RSC Instrument Setup and Run (continued)

3. On the 'Methods' screen, if a method has not been chosen by scanning the bar code on the deck trays, select a method using one of the two options below:
 - a. Touch the RSC Blood DNA method.
 - b. Use a bar code reader to scan the 2D bar code on the kit box to automatically select the appropriate method.
4. Verify that the RSC Blood DNA method has been selected, and press the **Proceed** button. If requested by the software, enter any kit lot and expiration information that has been required by the Administrator.
5. On the 'Cartridge Setup' screen (if shown), touch the cartridge positions to select/deselect any positions to be used for this extraction run. Enter any required sample tracking information, and press the **Proceed** button to continue.

Note: When using the Maxwell® RSC 48 Instrument, use the **Front** and **Back** buttons to select/deselect cartridge positions on each deck tray.
6. After the door has been opened, confirm that all Extraction Checklist items have been performed. Verify that samples were added to well #1 of the cartridges, cartridges are loaded on the instrument, uncapped elution tubes are present with Elution Buffer and plungers are in well #8. Transfer the deck tray(s) containing the prepared cartridges onto the Maxwell® instrument platform.

Inserting the Maxwell® deck tray(s): Hold the deck tray by the sides to avoid dislodging cartridges from the deck tray. Ensure that the deck tray is placed in the Maxwell® Instrument with the elution tubes closest to the door. Angle the back of the deck tray downward and place into the instrument so that the back of the deck tray is against the back of the instrument platform. Press down on the front of the deck tray to firmly seat the deck tray on the instrument platform. If you have difficulty fitting the deck tray on the platform, check that the deck tray is in the correct orientation. Ensure the deck tray is level on the instrument platform and fully seated.

Note: When using the Maxwell® RSC 48 Instrument, check the identifier on the Maxwell® RSC 48 deck tray to determine whether it should be placed in the front or back of the instrument.

7. Touch the **Start** button to begin the extraction run. The platform will retract, and the door will close.



Warning: Pinch point hazard.

The Maxwell® Instrument will immediately begin the purification run. The screen will display information including the user who started the run, the current method step being performed, and the approximate time remaining in the run.

Notes:

1. When using the Maxwell® RSC 48 Instrument, if the Vision System has been enabled, the deck trays will be scanned as the door retracts. Any errors in deck tray setup (e.g., plungers not in well #8, elution tubes not present and open) will cause the software to return to the 'Cartridge Setup' screen and problem positions will be marked with an exclamation point in a red circle. Resolve all error states, and press the **Start** button again to repeat deck tray scanning and begin the extraction run.
2. Pressing the **Abort** button will abandon the run. All samples from an aborted run will be lost.
3. If the run is abandoned before completion, you may be prompted to check whether plungers are still loaded on the plunger bar. If plungers are present on the plunger bar, you should perform Clean Up when requested. If plungers are not present on the plunger bar, you can choose to skip Clean Up when requested. The samples will be lost.
8. Follow on-screen instructions at the end of the method to open the door. Verify that plungers are located in well #8 of the cartridge at the end of the run. If plungers are not removed from the plunger bar, follow the instructions in the *Maxwell® RSC Instrument Operating Manual* or the *Maxwell® RSC 48 Instrument Operating Manual* to perform a Clean Up process to attempt to unload the plungers.
9. Remove the deck tray(s) from the instrument. Remove elution tubes containing DNA, and cap the tubes. After the run has been completed, the extraction run report will be displayed. From the "Report View" screen, you can print or export this report or both.
10. Remove the cartridges and plungers from the deck tray, and discard as hazardous waste following your institution's recommended guidelines. Do not reuse reagent cartridges, plungers or elution tubes.



Ensure samples are removed before performing any required UV light treatment to avoid damage to the nucleic acid.



6. Reference

1. Henry, J.B. (2001) *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20th ed., W.B. Saunders Company, 509.

7. Troubleshooting

For questions not addressed here, please contact your local Promega Branch Office or Distributor. Contact information available at: www.promega.com. E-mail: techserv@promega.com

Symptoms	Causes and Comments
Lower than expected A_{260} (lower than expected yield)	<p>Blood that has undergone multiple freeze-thaw cycles may have degraded DNA. Use fresh samples whenever possible, or avoid multiple freeze-thaw cycles.</p> <p>Proteinase K Solution was not added. The lysis and yield are dependent upon complete extraction with Proteinase K. If Proteinase K was not added in Section 3.A, Step 3, or set up on the Maxprep™ Liquid Handler, the resulting blood sample will be red. Proteinase K-treated samples turn greenish brown. This can be used as a quick diagnostic method of determining whether or not Proteinase K was added.</p> <p>Whole blood sample contained low white blood cell count. The yield of genomic DNA from blood samples depends on the number of white blood cells present in the sample</p> <p>Whole blood sample was not mixed before processing. Be sure to mix whole blood samples before processing to ensure that the white blood cells are in suspension.</p> <p>The Maxwell® RSC or RSC 48 Instrument was set for the wrong method. Ensure that the Blood DNA method is chosen.</p>
RNA contamination in DNA eluates	In some cases, total RNA can be copurified with the genomic DNA. To remove copurified RNA, an RNase treatment can be performed. Add 5µl of RNase A (Cat.# A7973) per milliliter of Elution Buffer.
Instrument unable to pick up plungers	Make sure you are using an RSC-specific chemistry kit; the plungers for the Maxwell® RSC reagent kits are specific for the Maxwell® RSC or RSC 48 Instruments.

8. Related Products

Instrument and Accessories

Product	Size	Cat.#
Maxwell® RSC Instrument	1 each	AS4500
Maxwell® RSC 48 Instrument	1 each	AS8500
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 each	SP6019
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 each	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 each	AS8402
Maxprep™ Carrier, Maxwell® RSC	1 each	AS9402
Maxprep™ Carrier, Maxwell® RSC 48 Front	1 each	AS9403
Maxprep™ Carrier, Maxwell® RSC 48 Back	1 each	AS9404
Maxprep™ Liquid Handler, RSC Carriers w/UV light	1 each	AS9101
Maxprep™ Liquid Handler, RSC Carriers	1 each	AS9100
Maxprep™ Liquid Handler, RSC 48 Carriers w/UV light	1 each	AS9201
Maxprep™ Liquid Handler, RSC 48 Carriers	1 each	AS9200
Nunc 2.0ml Deep Well Processing Plates	60/pack	AS9307
Maxprep™ 1000µl Conductive Disposable Tips, Filtered	40/box	AS9303
Maxprep™ 300µl Conductive Disposable Tips, Filtered	60/box	AS9302
Maxprep™ Reagent Reservoir, 50ml	28/pack	AS9304
Maxprep™ Plunger Holder	1 each	AS9408
Maxprep™ 3-Position Reagent Tube Holder	1 each	AS9409
Maxprep™ Waste Bags, Clear	100/box	AS9305
Maxwell® RSC Plunger Pack	1 each	AS1670
Maxwell® RSC/CSC Plungers	50/pack	AS1331
RNase A Solution, 4mg/ml	1ml	A7973
ClickFit Microtube, 1.5ml	1,000/pack	V4741

Maxwell® RSC Reagent Kits

Visit www.promega.com for a list of available Maxwell® RSC purification kits.



9. Summary of Changes

The following changes were made to the 5/20 revision of this document:

1. Added new multi-pack size ASB1400.
2. Updated names of Related Products in Section 8.

^(a)U.S. Pat. No. 6,855,499, European Pat. Nos. 1368629, 2090655 and 2363476, Japanese Pat. No. 4399164 and other patents.

© 2014–2020 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Maxwell is a registered trademark of Promega Corporation. MagnaCel and Maxprep are trademarks of Promega Corporation.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.

12 Promega Corporation · 2800 Woods Hollow Road · Madison, WI 53711-5399 USA · Toll Free in USA 800-356-9526 · 608-274-4330 · Fax 608-277-2516
TM419 · Revised 5/20 www.promega.com

Anhang 2 angepasstes mutaFISH Protokoll

Adapted mutaFISH™ protocol

Used Kits

- mutaFISH RNA Probes KIT (Abnova Corporation, Taiwan)
- mutaFISH™ RNA Accessory KIT (KA4915, Abnova Corporation, Taiwan)

Preparation of RNase free buffers

All buffers for the mutaFISH protocol have to be nuclease free.

- **Poly-L-Lysine 1:10:** Prepare 1:10 Poly-L-Lysine in ddH₂O.
- **DEPC H₂O:** Use 1 ml DEPC for 1000 ml ddH₂O incubate for 1h at RT and autoclave.
- **DEPC PBS*:** Use 1 ml DEPC for 1000 ml PBS pH 7.4 incubate for 1h at RT and autoclave.
- **PBST*:** Use autoclaved DEPC PBS and add 1 ml Tween20 after autoclaving. If you use ready-to-use PBST Use DEPC and filter after 1h of incubation at RT.
- **Permeable Protease buffer:** Use 3mg/ml Pepsin to 0.5 M HCL.
- **Nuclease Free 1x Citric acid buffer pH6:** dilute nuclease free 10x ready-to-use Citric acid buffer in DEPC H₂O or prepare 1x nuclease free buffer pH6.
- **2x SSC Buffer**:** Dilute ready-to-use nuclease free 20x SSC buffer in DEPC H₂O or prepare 2x nuclease free buffer.
- **70% and 85% EtOH:** Dilute EtOH absolute to 70% and 85%.
- **3-4% Paraformaldehyde:** Paraformaldehyde solution has to be prepared methanol free. Dilute in DEPC-PBS

* here Roti@fair PBST 7.4 and Roti@ PBS 7.4 (CarlRoth GmbH&CoKG, Karlsruhe) were used

** here here Roti@-Stock 20x SSC (CarlRoth GmbH&CoKG, Karlsruhe) was used

Protocol – Coating with Poly-L-Lysine

1. Let Poly-L-Lysine (1:10 in ddH₂O) come to room temperature.
2. Incubate Slides 7min at RT in **1:10 Poly-L-Lysine** for coating.
3. Remove slides from the rack and tap off water droplets.
4. Incubate slides at 56 °C for at least 1h.

Protocol – mutaFISH

Tissue preparation

1. Prepare 3-5 µm thick FFPE sections, air dry sections at heating plate (40 °C).
2. Incubate FFPE sections for 1h at 56 °C.

Deparaffinization and rehydration

1. Rinse slides 2 times in xylene substitute for each 5 min.
2. Immerse slides 2 times in 100% EtOH for each 3 min.
3. Immerse slides 2 times in 85% EtOH for each 3 min.
4. Immerse slides 2 times in 70% EtOH for each 3 min.
5. Wash slides in DEPC-H₂O for 1 min and dry shortly at RT.

Target retrieval

1. Preheat heating plate to 75 °C.
2. Create secure bond with wax pen around the tissue sections.
3. Wash slides in DEPC-PBS for 2 min
4. Incubate slides with 1x citric buffer at 75-85 °C on heating plate for 20 min.
CAVE: Renew citric buffer every 10-15 min – sample should not dry out.

- Wash twice with 2x SSC buffer for 5 min.

CAVE: If costaining with an antibody should be done perform permeabilization and immunostaining prior to metaFISH and end up with 20 min fixation in 4% formaldehyde at RT.

Fixiation and permeabilization

- Incubate in 3-4% paraformaldehyde (provided) for 20 min at RT.
 - Immerse slides in 2x SSC buffer for 5 min.
 - Prewarm permeable buffer (provided in the kit or self-made) to 37 °C.
 - Use permeable buffer or 3 mg/mL Pepsin to 0.1 M HCl) at 37 °C for 30 min.
TIPP: RNAscope® Protease III & Protease IV³ reagents can be used. Here no prewarming is necessary.*
 - Wash slides in 2x SSC buffer for 5 min.
- * RNAscope® Protease IV (Advanced Cell Diagnostics, Inc., Canada) was used in this case

Dehydration

- Immerse slides in 70% EtOH for 1 min.
- Immerse slides in 85% EtOH for 1 min.
- Immerse slides in 100% EtOH for 1 min.
- Immerse slides in fresh PBST for 1 min.

In situ reverse transcription

- prepare the following mixture on ice and use 100 µl of the mixture per slide.

Component	Amount per slide [µL]
DEPC-H ₂ O (Kit)	60.5
5x RT Buffer (Kit)	20.0
BSA (Kit)	1.0
dNTP Mix (Kit)	5.0
RT Primer (individual)	1.0
RNase Inhibitor (Kit)	2.5
RT Enzyme (Kit)	10.0
Total volume:	100.0

- Incubate Slides at 37 °C in humidity oven over night.
CAVE: Take care that there is enough humidity. Slides should not dry out.
- Wash shortly in PBST.
- Immerse slides with fresh PBST 2 times for each 2 min.

Postfixiation and probe hybridization

- Cover tissue with 3-4% paraformaldehyde (provided) and incubate at 37 °C in humidity Box for 45 min.
CAVE: Check formaldehyde every 10-15 min – sample should not dry out.
- Wash slides with fresh PBST 2 times for 2 min.
- prepare the following mixture on ice and use 100µl per slide.

Component	Amount per slide [µL]	Amount for negative control [µl]
DEPC-H ₂ O (Kit)	32.5	34.5
Formamide (Kit)	20.0	20.0
10x Hybrid Enzyme Buffer (Kit)	10.0	10.0
1 M KCl (Kit)	5.0	5.0

mutaFISH probe wt (individual)	1.0	
mutaFISH probe mutation (individual)	1.0	
RNase Inhibitor (Kit)	2.5	2.5
RNaseH (Kit)	8.0	8.0
Hybrid Enzyme (Kit)	20.0	20.0
Total volume:	100.0	200.0

4. Incubate at 37 °C in humidity oven for 60 min.
5. Heat up to 45 °C and incubate slides for another 90 min.
6. Immerse slide with fresh PBST 2 times for 2 min.

Amplification

1. Prepare the following mixture on ice and use 100 µl per slide.

Component	Amount per slide [µL]
DEPC-H ₂ O (Kit)	61.5
50% Glycerol (Kit)	10.0
10x DNA Polymerase Buffer (Kit)	10.0
BSA (Kit)	1.0
dNTP mix (Kit)	5.0
RNase Inhibitor (Kit)	2.5
DNA Polymerase (Kit)	10.0
Total volume:	100.0

2. Incubate slides at 37 °C in humidity oven for 120 min.
3. Wash shortly in PBST.
4. Immerse slide with fresh PBST two times for 1 min.

Detection and counterstain

1. Use 100 µl of the following mixture per slide (prepare on ice).

Component	Amount per slide [µL]
Detection Buffer (Kit)	98.0
Detection probe for wt (individual)	1.0
Detection probe for mutation (individual)	1.0
Total volume:	100.0

2. Incubate at 37 °C in humidity oven for 60 min.
3. Wash shortly in PBST.
4. Immerse slide with fresh PBST 2 times for 2 min.
5. Immerse the slide in 70% EtOH for 0.5 min.
6. Immerse the slide in 85% EtOH for 0.5 min.
7. Immerse the slide in 100% EtOH for 0.5 min.
8. Mix 4 µl DAPI with 664 µl DEPC-PBS and apply 100 µl to the sample for 2-3 min at RT.

Sealing

- Immerse slide two times in fresh DEPC-PBS for 1 min.
- Cover slide with Prolong-Gold-Anti-Fade let it dry for 15 min and seal with nail-polish.
- Let dry slides for 1h and proceed with microscopy.

Anhang 3 einzelne CHIP Mutationen aus MISSION

Supplemental Table 1 – List of 445 unique CHIP mutations identified in MISSION based on deep-DNA-sequencing. Provided are gene name, confirmation of CHIP mutation – polymorphisms, variants, synonymous and uncertain mutations were excluded, change on DNA level, change on amino acid (AA) level and variant allele frequency (VAF).

Gene	CHIP result	DNA result	AA result	VAF (%)
ASXL1	mutated	c.1534C>T	p.Gln512*	4.1
ASXL1	mutated	c.1564C>T	p.Gln522*	4.7
ASXL1	mutated	c.1585C>T	p.Gln529*	16.3
ASXL1	mutated	c.1720-2A>G	p.splice site mutation	6.3
ASXL1	mutated	c.1749G>A	p.Trp583*	31.5
ASXL1	mutated	c.1762C>T	p.Gln588*	5.5
ASXL1	mutated	c.1772dup	p.Tyr591*	5.2
ASXL1	mutated	c.1772dup	p.Tyr591*	3.0
ASXL1	mutated	c.1900_1922del	p.Glu635Argfs*15	7.6
ASXL1	mutated	c.1900_1922del	p.Glu635Argfs*15	6.6
ASXL1	mutated	c.1900_1922del	p.Glu635Argfs*15	1.5
ASXL1	mutated	c.1900_1922del	p.Glu635Argfs*15	11.0
ASXL1	mutated	c.1900_1922del	p.Glu635Argfs*15	19.6
ASXL1	mutated	c.1934dup	p.Gly646Trpfs*12	18.6
ASXL1	mutated	c.1934dup	p.Gly646Trpfs*12	16.6
ASXL1	mutated	c.1934dup	p.Gly646Trpfs*12	12.4
ASXL1	mutated	c.1934dup	p.Gly646Trpfs*12	10.8
ASXL1	mutated	c.1934dup	p.Gly646Trpfs*12	7.0
ASXL1	mutated	c.1934dup	p.Gly646Trpfs*12	11.2
ASXL1	mutated	c.1934dup	p.Gly646Trpfs*12	16.0
ASXL1	mutated	c.2069_2075del	p.Asp690Glyfs*11	1.5
ASXL1	mutated	c.2077C>T	p.Arg693*	2.1
ASXL1	mutated	c.2083C>T	p.Gln695*	2.6
ASXL1	mutated	c.2290del	p.Leu764Tyrfs*8	5.5
ASXL1	mutated	c.2302C>T	p.Gln768*	22.6
ASXL1	mutated	c.2324T>G	p.Leu775*	14.1
ASXL1	mutated	c.2387G>A	p.Trp796*	16.3
ASXL1	mutated	c.2468del	p.Leu823*	6.1
ASXL1	mutated	c.2528_2529insCT	p.Thr844*	2.2
ASXL1	mutated	c.2676del	p.Asn893Thrfs*15	9.6
ASXL1	mutated	c.2989G>T	p.Glu997*	7.8
ASXL1	mutated	c.3554dup	p.Thr1186Hisfs*7	2.7
BCOR	mutated	c.4616dup	p.Asn1540Glufs*16	7.0
CALR	mutated	c.1154_1155insTTGTC	p.Lys385Asnfs*47	28.8
CBL	mutated	c.1009del	p.Tyr337Ilefs*13	5.0
CBL	mutated	c.1102T>C	p.Tyr368His	11.5
CBL	mutated	c.1129A>G	p.Thr377Ala	8.0
CBL	mutated	c.1139T>C	p.Leu380Pro	1.7
CBL	mutated	c.1145A>G	p.Lys382Arg	4.3
CBL	mutated	c.1175A>G	p.Lys392Arg	1.3

CBL	mutated	c.1211G>A	p.Cys404Tyr	29.2
CBL	mutated	c.1211G>A	p.Cys404Tyr	9.1
CBL	mutated	c.1211G>A	p.Cys404Tyr	3.0
CBL	mutated	c.1211G>A	p.Cys404Tyr	4.2
CBL	mutated	c.1254C>A	p.Phe418Leu	6.7
CBL	mutated	c.1268T>A	p.Ile423Asn	23.0
CBL	mutated	c.1694del	p.Leu565Cysfs*50	3.5
DNMT3A	mutated	c.1014+1G>T	p.splice site mutation	4.0
DNMT3A	mutated	c.1021_1022del	p.Val341*	1.9
DNMT3A	mutated	c.1040T>C	p.Leu347Pro	9.6
DNMT3A	mutated	c.1058_1066del	p.Ala353_Gln356delinsGlu	11.0
DNMT3A	mutated	c.1069_1086dup	p.Ala357_Gln362dup	1.2
DNMT3A	mutated	c.1077_1078dup	p.Asn360Thrfs*48	2.1
DNMT3A	mutated	c.1136G>A	p.Arg379His	3.3
DNMT3A	mutated	c.1138_1147del	p.Ala380Cysfs*24	1.8
DNMT3A	mutated	c.1152_1155del	p.Phe384Leufs*22	8.0
DNMT3A	mutated	c.1156del	p.Val386Cysfs*21	3.0
DNMT3A	mutated	c.1223_1226del	p.Glu408Glyfs*242	5.1
DNMT3A	mutated	c.1226G>A	p.Trp409*	1.7
DNMT3A	mutated	c.1229C>T	p.Ala410Val	5.5
DNMT3A	mutated	c.1234_1235insA	p.Gly412Glufs*9	1.1
DNMT3A	mutated	c.1238dup	p.Phe414Leufs*7	2.7
DNMT3A	mutated	c.1410del	p.Ile471Leufs*180	1.4
DNMT3A	mutated	c.1428del	p.Glu477Serfs*174	1.5
DNMT3A	mutated	c.1429G>C	p.Glu477Gln	5.5
DNMT3A	mutated	c.1481G>A	p.Cys494Tyr	2.9
DNMT3A	mutated	c.1489T>C	p.Cys497Arg	2.2
DNMT3A	mutated	c.1498del	p.Leu500Serfs*151	2.3
DNMT3A	mutated	c.1507dup	p.Thr503Asnfs*43	14.2
DNMT3A	mutated	c.1517A>G	p.His506Arg	2.6
DNMT3A	mutated	c.1523T>C	p.Leu508Pro	1.5
DNMT3A	mutated	c.1543C>T	p.Gln515*	19.4
DNMT3A	mutated	c.1543del	p.Gln515Lysfs*136	1.8
DNMT3A	mutated	c.1551_1552delinsG	p.Cys517Trpfs*134	1.3
DNMT3A	mutated	c.1555-2A>T	p.splice site mutation	4.8
DNMT3A	mutated	c.1555-8_1555del	p.splice site mutation	1.7
DNMT3A	mutated	c.1591G>A	p.Asp531Asn	1.4
DNMT3A	mutated	c.1592A>G	p.Asp531Gly	6.1
DNMT3A	mutated	c.1628G>C	p.Gly543Ala	21.6
DNMT3A	mutated	c.1637T>A	p.Val546Glu	3.8
DNMT3A	mutated	c.1640T>A	p.Leu547His	4.1
DNMT3A	mutated	c.1640T>A	p.Leu547His	1.4
DNMT3A	mutated	c.1657_1659del	p.Asn553del	8.9
DNMT3A	mutated	c.1713_1724del	p.Ala572_Ala575del	1.4
DNMT3A	mutated	c.1726_1729delinsC	p.Ile576_Lys577delinsGln	22.6
DNMT3A	mutated	c.1742G>A	p.Trp581*	1.8
DNMT3A	mutated	c.1903C>T	p.Arg635Trp	2.8

DNMT3A	mutated	c.1906G>A	p.Val636Met	1.1
DNMT3A	mutated	c.1969G>A	p.Val657Met	5.3
DNMT3A	mutated	c.1969G>A	p.Val657Met	1.4
DNMT3A	mutated	c.1972G>T	p.Asp658Tyr	10.0
DNMT3A	mutated	c.1976G>A	p.Arg659His	1.4
DNMT3A	mutated	c.1979A>G	p.Tyr660Cys	4.5
DNMT3A	mutated	c.1998_1999del	p.Cys666*	2.2
DNMT3A	mutated	c.1998T>G	p.Cys666Trp	2.9
DNMT3A	mutated	c.2007dup	p.Ile670Hisfs*43	20.6
DNMT3A	mutated	c.2023G>A	p.Val675Met	1.1
DNMT3A	mutated	c.2024_2026dup	p.Val675_Arg676insLeu	4.7
DNMT3A	mutated	c.2032del	p.Gln678Argfs*27	1.1
DNMT3A	mutated	c.2053G>C	p.Gly685Arg	15.0
DNMT3A	mutated	c.2056del	p.Asp686Thrfs*19	1.9
DNMT3A	mutated	c.2057A>G	p.Asp686Gly	2.3
DNMT3A	mutated	c.2062C>T	p.Arg688Cys	1.7
DNMT3A	mutated	c.2063G>A	p.Arg688His	1.1
DNMT3A	mutated	c.2063G>A	p.Arg688His	2.3
DNMT3A	mutated	c.2084T>C	p.Ile695Thr	2.0
DNMT3A	mutated	c.2095G>C	p.Gly699Arg	16.7
DNMT3A	mutated	c.2095G>C	p.Gly699Arg	2.3
DNMT3A	mutated	c.2098C>A	p.Pro700Thr	4.7
DNMT3A	mutated	c.2099C>T	p.Pro700Leu	2.4
DNMT3A	mutated	c.2104G>T	p.Asp702Tyr	11.8
DNMT3A	mutated	c.2108del	p.Leu703Argfs*2	1.1
DNMT3A	mutated	c.2114T>C	p.Ile705Thr	1.3
DNMT3A	mutated	c.2171A>G	p.Tyr724Cys	2.2
DNMT3A	mutated	c.2171A>G	p.Tyr724Cys	5.7
DNMT3A	mutated	c.2177G>T	p.Gly726Val	1.7
DNMT3A	mutated	c.2183G>A	p.Gly728Asp	5.6
DNMT3A	mutated	c.2185C>T	p.Arg729Trp	30.8
DNMT3A	mutated	c.2185C>T	p.Arg729Trp	13.9
DNMT3A	mutated	c.2192T>A	p.Phe731Tyr	5.0
DNMT3A	mutated	c.2204A>C	p.Tyr735Ser	8.5
DNMT3A	mutated	c.2204A>G	p.Tyr735Cys	1.1
DNMT3A	mutated	c.2204A>G	p.Tyr735Cys	11.3
DNMT3A	mutated	c.2204A>G	p.Tyr735Cys	22.8
DNMT3A	mutated	c.2204A>G	p.Tyr735Cys	1.4
DNMT3A	mutated	c.2204A>G	p.Tyr735Cys	1.9
DNMT3A	mutated	c.2206C>T	p.Arg736Cys	9.6
DNMT3A	mutated	c.2206C>T	p.Arg736Cys	4.8
DNMT3A	mutated	c.2206C>T	p.Arg736Cys	9.5
DNMT3A	mutated	c.2228C>T	p.Pro743Leu	12.2
DNMT3A	mutated	c.2245C>T	p.Arg749Cys	5.6
DNMT3A	mutated	c.2245C>T	p.Arg749Cys	6.3
DNMT3A	mutated	c.2245C>T	p.Arg749Cys	4.4
DNMT3A	mutated	c.2254T>G	p.Phe752Val	1.0

DNMT3A	mutated	c.2259G>A	p.Trp753*	5.2
DNMT3A	mutated	c.2261T>C	p.Leu754Pro	1.8
DNMT3A	mutated	c.2261T>G	p.Leu754Arg	1.8
DNMT3A	mutated	c.2264T>C	p.Phe755Ser	4.3
DNMT3A	mutated	c.2302delG	p.Asp768Thrfs*11	2.3
DNMT3A	mutated	c.2309C>T	p.Ser770Leu	2.9
DNMT3A	mutated	c.2311C>G	p.Arg771Gly	3.6
DNMT3A	mutated	c.2311C>T	p.Arg771*	4.9
DNMT3A	mutated	c.2311C>T	p.Arg771*	15.3
DNMT3A	mutated	c.2311C>T	p.Arg771*	1.3
DNMT3A	mutated	c.2311C>T	p.Arg771*	1.8
DNMT3A	mutated	c.2312G>T	p.Arg771Leu	23.7
DNMT3A	mutated	c.2320G>T	p.Glu774*	11.3
DNMT3A	mutated	c.2330C>G	p.Pro777Arg	1.3
DNMT3A	mutated	c.2332G>A	p.Val778Met	1.3
DNMT3A	mutated	c.2333T>G	p.Val778Gly	6.5
DNMT3A	mutated	c.2333T>G	p.Val778Gly	2.8
DNMT3A	mutated	c.2339T>C	p.Ile780Thr	5.4
DNMT3A	mutated	c.2339T>C	p.Ile780Thr	1.1
DNMT3A	mutated	c.2339T>C	p.Ile780Thr	2.2
DNMT3A	mutated	c.2347A>T	p.Lys783*	1.6
DNMT3A	mutated	c.2377T>G	p.Tyr793Asp	1.3
DNMT3A	mutated	c.2387del	p.Gly796Valfs*6	2.2
DNMT3A	mutated	c.2387G>A	p.Gly796Asp	1.5
DNMT3A	mutated	c.2389A>T	p.Asn797Tyr	2.7
DNMT3A	mutated	c.2390A>G	p.Asn797Ser	17.0
DNMT3A	mutated	c.2395C>T	p.Pro799Ser	5.0
DNMT3A	mutated	c.2404A>T	p.Asn802Tyr	5.1
DNMT3A	mutated	c.2462del	p.His821Leufs*4	3.0
DNMT3A	mutated	c.2471dup	p.Ala825Serfs*30	1.4
DNMT3A	mutated	c.2524C>T	p.Gln842*	2.4
DNMT3A	mutated	c.2524C>T	p.Gln842*	3.7
DNMT3A	mutated	c.2533del	p.Asp845Thrfs*8	3.0
DNMT3A	mutated	c.2550del	p.Phe851Serfs*2	3.1
DNMT3A	mutated	c.2578T>C	p.Trp860Arg	6.2
DNMT3A	mutated	c.2617C>T	p.His873Tyr	1.1
DNMT3A	mutated	c.2644C>T	p.Arg882Cys	2.6
DNMT3A	mutated	c.2644C>T	p.Arg882Cys	32.2
DNMT3A	mutated	c.2645G>A	p.Arg882His	2.2
DNMT3A	mutated	c.2645G>A	p.Arg882His	2.5
DNMT3A	mutated	c.2645G>A	p.Arg882His	3.2
DNMT3A	mutated	c.2645G>A	p.Arg882His	1.5
DNMT3A	mutated	c.2666T>C	p.Leu889Pro	2.2
DNMT3A	mutated	c.2666T>C	p.Leu889Pro	0.9
DNMT3A	mutated	c.2679G>C	p.Trp893Cys	3.5
DNMT3A	mutated	c.2695C>T	p.Arg899Cys	1.9
DNMT3A	mutated	c.2695C>T	p.Arg899Cys	2.0

DNMT3A	mutated	c.2695C>T	p.Arg899Cys	4.7
DNMT3A	mutated	c.2695C>T	p.Arg899Cys	2.2
DNMT3A	mutated	c.2705del	p.Phe902Serfs*4	8.2
DNMT3A	mutated	c.2710C>T	p.Pro904Ser	1.2
DNMT3A	mutated	c.2714T>G	p.Leu905Arg	1.6
DNMT3A	mutated	c.2723A>G	p.Tyr908Cys	1.9
DNMT3A	mutated	c.2726T>C	p.Phe909Ser	1.8
DNMT3A	mutated	c.719_725del	p.Glu240Alafs*74	1.8
DNMT3A	mutated	c.814A>T	p.Lys272*	1.1
DNMT3A	mutated	c.884T>A	p.Leu295Gln	2.3
DNMT3A	mutated	c.890G>A	p.Trp297*	1.5
DNMT3A	mutated	c.893G>A	p.Gly298Glu	2.6
DNMT3A	mutated	c.901C>T	p.Arg301Trp	2.2
DNMT3A	mutated	c.905G>T	p.Gly302Val	13.9
DNMT3A	mutated	c.914G>A	p.Trp305*	2.5
DNMT3A	mutated	c.915G>A	p.Trp305*	26.4
DNMT3A	mutated	c.929T>C	p.Ile310Thr	3.0
DNMT3A	mutated	c.976C>T	p.Arg326Cys	20.5
DNMT3A	mutated	c.976C>T	p.Arg326Cys	3.6
DNMT3A	mutated	c.976C>T	p.Arg326Cys	8.4
DNMT3A	mutated	c.98G>A	p.Arg33His	1.8
EZH2	mutated	c.875A>G	p.Tyr292Cys	1.1
GNAS	mutated	c.2531G>A	p.Arg844His	2.9
GNB1	mutated	c.169A>G	p.Lys57Glu	13.9
IDH1	mutated	c.395G>A	p.Arg132His	43.7
JAK2	mutated	c.1849G>T	p.Val617Phe	2.0
JAK2	mutated	c.1849G>T	p.Val617Phe	2.6
JAK2	mutated	c.1849G>T	p.Val617Phe	5.5
JAK2	mutated	c.1849G>T	p.Val617Phe	2.3
JAK2	mutated	c.1849G>T	p.Val617Phe	4.5
JAK2	mutated	c.1849G>T	p.Val617Phe	38.7
JAK2	mutated	c.1849G>T	p.Val617Phe	1.5
JAK2	mutated	c.2569A>G	p.Lys857Glu	1.2
KRAS	mutated	c.35G>A	p.Gly12Asp	4.3
PPM1D	mutated	c.1270G>T	p.Glu424*	5.9
PPM1D	mutated	c.1297A>T	p.Lys433*	1.0
PPM1D	mutated	c.1349del	p.Leu450*	4.4
PPM1D	mutated	c.1372C>T	p.Arg458*	17.4
PPM1D	mutated	c.1382del	p.Val461Alafs*4	2.4
PPM1D	mutated	c.1434C>A	p.Cys478*	8.8
PPM1D	mutated	c.1528C>T	p.Gln510*	2.8
PPM1D	mutated	c.1535del	p.Asn512lifs*2	0.7
PPM1D	mutated	c.1535del	p.Asn512lifs*2	0.9
PPM1D	mutated	c.1566dup	p.Ala523Serfs*5	10.0
PPM1D	mutated	c.1609del	p.Thr537Hisfs*2	34.0
PPM1D	mutated	c.1649del	p.His550Leufs*6	6.9
PPM1D	mutated	c.1654C>T	p.Arg552*	2.7

PPM1D	mutated	c.1654C>T	p.Arg552*	13.6
PPM1D	mutated	c.1714C>T	p.Arg572*	2.8
RAD21	mutated	c.144+1G>T	p.splice site mutation	6.1
SETBP1	mutated	c.2572G>A	p.Glu858Lys	1.8
SF3B1	mutated	c.1868A>T	p.Tyr623Phe	1.3
SF3B1	mutated	c.1876A>G	p.Asn626Asp	1.3
SF3B1	mutated	c.1985A>T	p.His662Leu	1.0
SF3B1	mutated	c.1986C>G	p.His662Gln	1.2
SF3B1	mutated	c.1996A>C	p.Lys666Gln	4.8
SF3B1	mutated	c.1997A>G	p.Lys666Arg	7.8
SF3B1	mutated	c.1998G>C	p.Lys666Asn	8.1
SF3B1	mutated	c.1998G>C	p.Lys666Asn	1.0
SF3B1	mutated	c.1998G>T	p.Lys666Asn	5.4
SF3B1	mutated	c.1998G>T	p.Lys666Asn	27.1
SF3B1	mutated	c.1998G>T	p.Lys666Asn	23.9
SF3B1	mutated	c.1998G>T	p.Lys666Asn	1.7
SF3B1	mutated	c.1998G>T	p.Lys666Asn	26.7
SF3B1	mutated	c.2098A>G	p.Lys700Glu	13.8
SF3B1	mutated	c.2098A>G	p.Lys700Glu	23.0
SMC1A	mutated	c.2131C>T	p.Arg711Trp	4.7
SMC3	mutated	c.3353G>T	p.Gly1118Val	0.7
SMC3	mutated	c.3598G>A	p.Val1200Met	6.0
SRSF2	mutated	c.170T>A	p.Phe57Tyr	2.0
SRSF2	mutated	c.170T>A	p.Phe57Tyr	2.1
SRSF2	mutated	c.284C>A	p.Pro95His	32.0
SRSF2	mutated	c.284C>A	p.Pro95His	23.1
SRSF2	mutated	c.284C>G	p.Pro95Arg	1.2
SRSF2	mutated	c.284C>G	p.Pro95Arg	18.2
SRSF2	mutated	c.284C>T	p.Pro95Leu	41.8
SRSF2	mutated	c.287C>T	p.Pro96Leu	7.4
TET2	mutated	c.1028_1046del	p.Thr343Metfs*23	2.4
TET2	mutated	c.1061C>A	p.Ser354*	17.5
TET2	mutated	c.1061C>G	p.Ser354*	1.3
TET2	mutated	c.1201_1203del	p.Pro401del	2.7
TET2	mutated	c.1201_1203del	p.Pro401del	2.8
TET2	mutated	c.1212del	p.Leu404Phefs*23	1.9
TET2	mutated	c.1219del	p.Ser407Leufs*20	27.7
TET2	mutated	c.1249C>T	p.Gln417*	4.4
TET2	mutated	c.1259del	p.Ser420*	1.6
TET2	mutated	c.1430del	p.Ser477Leufs*9	3.2
TET2	mutated	c.1469_1470del	p.Ile490Thrfs*13	1.7
TET2	mutated	c.1588C>T	p.Gln530*	5.9
TET2	mutated	c.1630C>T	p.Arg544*	25.0
TET2	mutated	c.1630C>T	p.Arg544*	3.8
TET2	mutated	c.1699_1703del	p.Leu567Glyfs*14	2.7
TET2	mutated	c.1800_1801dup	p.Thr601Argfs*39	6.3
TET2	mutated	c.1803del	p.Ser602Profs*37	16.5

TET2	mutated	c.1842del	p.Leu615Serfs*24	3.0
TET2	mutated	c.1863_1879del	p.Gln622Glyfs*10	3.8
TET2	mutated	c.2167_2170del	p.Pro723Ilefs*27	1.8
TET2	mutated	c.2255_2261del	p.Asn752Argfs*59	2.1
TET2	mutated	c.2276del	p.Thr759Ilefs*54	5.5
TET2	mutated	c.2370_2382dup	p.Ser795Valfs*11	6.6
TET2	mutated	c.2375C>G	p.Ser792*	17.4
TET2	mutated	c.2662C>T	p.Gln888*	2.6
TET2	mutated	c.2662C>T	p.Gln888*	6.0
TET2	mutated	c.2674C>T	p.Gln892*	7.6
TET2	mutated	c.2746C>T	p.Gln916*	4.6
TET2	mutated	c.2746C>T	p.Gln916*	5.1
TET2	mutated	c.2746C>T	p.Gln916*	1.5
TET2	mutated	c.2749C>T	p.Gln917*	27.0
TET2	mutated	c.2757C>A	p.Tyr919*	1.8
TET2	mutated	c.2839C>T	p.Gln947*	19.2
TET2	mutated	c.2884C>T	p.Gln962*	29.5
TET2	mutated	c.2896C>T	p.Gln966*	2.0
TET2	mutated	c.2905C>T	p.Gln969*	1.3
TET2	mutated	c.2926C>T	p.Gln976*	2.0
TET2	mutated	c.2926C>T	p.Gln976*	16.3
TET2	mutated	c.2944A>T	p.Lys982*	38.9
TET2	mutated	c.3119T>G	p.Leu1040*	2.9
TET2	mutated	c.3127del	p.His1043Ilefs*12	21.0
TET2	mutated	c.3287del	p.Thr1096Lysfs*10	2.6
TET2	mutated	c.3339_3340del	p.Thr1114Serfs*15	1.3
TET2	mutated	c.3344del	p.Pro1115Leufs*2	1.9
TET2	mutated	c.3344del	p.Pro1115Leufs*2	1.0
TET2	mutated	c.3369del	p.Val1124Serfs*13	2.0
TET2	mutated	c.3404G>A	p.Cys1135Tyr	1.9
TET2	mutated	c.3404G>A	p.Cys1135Tyr	1.8
TET2	mutated	c.3409+1G>A	p.splice site mutation	2.6
TET2	mutated	c.3415del	p.Ile1139Leufs*13	6.9
TET2	mutated	c.3415del	p.Ile1139Leufs*13	3.1
TET2	mutated	c.3491T>G	p.Met1164Arg	1.0
TET2	mutated	c.3500G>A	p.Arg1167Lys	1.1
TET2	mutated	c.3522_3523insG	p.Ile1175Aspfs*2	19.0
TET2	mutated	c.3523A>T	p.Ile1175Phe	18.7
TET2	mutated	c.3524_3526delinsCTT	p.Ile1175_Arg1176delinsThrTrp	5.9
TET2	mutated	c.3530T>G	p.Ile1177Ser	7.4
TET2	mutated	c.3578G>A	p.Cys1193Tyr	2.6
TET2	mutated	c.3637G>A	p.Val1213Met	1.4
TET2	mutated	c.3640C>T	p.Arg1214Trp	1.4
TET2	mutated	c.3640C>T	p.Arg1214Trp	4.7
TET2	mutated	c.3646C>T	p.Arg1216*	1.5
TET2	mutated	c.3656A>C	p.His1219Pro	1.4
TET2	mutated	c.3661T>G	p.Cys1221Gly	1.7

TET2	mutated	c.3662G>C	p.Cys1221Ser	1.5
TET2	mutated	c.3732_3733del	p.Tyr1245Leufs*22	4.8
TET2	mutated	c.3732_3733del	p.Tyr1245Leufs*22	1.5
TET2	mutated	c.3733_3737del	p.Tyr1245Glyfs*21	1.2
TET2	mutated	c.3734A>G	p.Tyr1245Cys	39.6
TET2	mutated	c.3755T>C	p.Leu1252Pro	4.3
TET2	mutated	c.3781C>T	p.Arg1261Cys	1.6
TET2	mutated	c.3782G>A	p.Arg1261His	2.0
TET2	mutated	c.3785G>A	p.Arg1262Gln	2.0
TET2	mutated	c.3788G>C	p.Cys1263Ser	1.5
TET2	mutated	c.3788G>C	p.Cys1263Ser	1.6
TET2	mutated	c.3821_3822del	p.Gln1274Argfs*25	1.5
TET2	mutated	c.3822G>C	p.Gln1274His	5.7
TET2	mutated	c.3863G>A	p.Gly1288Asp	2.0
TET2	mutated	c.3863G>A	p.Gly1288Asp	3.3
TET2	mutated	c.3866G>T	p.Cys1289Phe	2.2
TET2	mutated	c.3894dup	p.Lys1299*	13.5
TET2	mutated	c.3904A>G	p.Arg1302Gly	5.7
TET2	mutated	c.3968del	p.Glu1323Glyfs*40	37.8
TET2	mutated	c.4015A>T	p.Lys1339*	23.3
TET2	mutated	c.4021dup	p.Ala1341Glyfs*3	1.6
TET2	mutated	c.4030G>A	p.Ala1344Thr	8.0
TET2	mutated	c.4042del	p.Gln1348Argfs*15	7.6
TET2	mutated	c.4075C>A	p.Arg1359Ser	4.7
TET2	mutated	c.4075C>A	p.Arg1359Ser	1.2
TET2	mutated	c.4076G>A	p.Arg1359His	2.9
TET2	mutated	c.4081G>C	p.Gly1361Arg	4.9
TET2	mutated	c.4082G>A	p.Gly1361Asp	2.9
TET2	mutated	c.4103_4116del	p.Phe1368Cysfs*28	19.2
TET2	mutated	c.4126G>A	p.Asp1376Asn	1.9
TET2	mutated	c.4131_4132del	p.Phe1377Leufs*23	21.5
TET2	mutated	c.4132T>C	p.Cys1378Arg	19.6
TET2	mutated	c.4133G>A	p.Cys1378Tyr	26.3
TET2	mutated	c.4136C>T	p.Ala1379Val	36.6
TET2	mutated	c.4138C>T	p.His1380Tyr	7.6
TET2	mutated	c.4138C>T	p.His1380Tyr	1.5
TET2	mutated	c.4140T>G	p.His1380Gln	5.9
TET2	mutated	c.4193T>G	p.Leu1398Arg	6.4
TET2	mutated	c.4234G>T	p.Asp1412Tyr	19.3
TET2	mutated	c.4256C>G	p.Pro1419Arg	7.7
TET2	mutated	c.4354C>T	p.Arg1452*	5.0
TET2	mutated	c.4393C>T	p.Arg1465*	2.1
TET2	mutated	c.4393C>T	p.Arg1465*	26.9
TET2	mutated	c.4399del	p.Arg1467Glyfs*3	14.6
TET2	mutated	c.4481C>G	p.Ser1494*	3.6
TET2	mutated	c.4546C>T	p.Arg1516*	29.7
TET2	mutated	c.4546C>T	p.Arg1516*	3.9

TET2	mutated	c.4570C>T	p.Gln1524*	12.3
TET2	mutated	c.4589_4618del	p.Pro1530_Gln1539del	57.0
TET2	mutated	c.4621C>T	p.Gln1541*	18.4
TET2	mutated	c.4624C>T	p.Gln1542*	6.6
TET2	mutated	c.4639C>T	p.Gln1547*	1.8
TET2	mutated	c.4757C>G	p.Ser1586*	3.0
TET2	mutated	c.4854C>G	p.Tyr1618*	5.0
TET2	mutated	c.4879C>T	p.Gln1627*	2.5
TET2	mutated	c.506_508delinsC	p.His169Profs*6	2.4
TET2	mutated	c.5220dup	p.Pro1741Thrfs*12	2.9
TET2	mutated	c.5271_5272dup	p.Ser1758Phefs*6	28.7
TET2	mutated	c.532G>T	p.Glu178*	29.3
TET2	mutated	c.5413_5420del	p.Asn1805*	3.7
TET2	mutated	c.5454_5458del	p.Leu1819*	9.8
TET2	mutated	c.5467_5472delinsCC	p.Asn1823Profs*9	25.7
TET2	mutated	c.5482C>T	p.Gln1828*	2.1
TET2	mutated	c.5500C>T	p.Gln1834*	4.2
TET2	mutated	c.5541G>A	p.Trp1847*	3.1
TET2	mutated	c.5541G>A	p.Trp1847*	2.1
TET2	mutated	c.5543C>A	p.Ser1848*	4.2
TET2	mutated	c.5551_5554del	p.Glu1851Argfs*35	4.0
TET2	mutated	c.5551G>T	p.Glu1851*	0.8
TET2	mutated	c.5603A>G	p.His1868Arg	2.1
TET2	mutated	c.5615T>A	p.Leu1872His	3.3
TET2	mutated	c.561dup	p.Lys188Glufs*4	18.9
TET2	mutated	c.5621A>T	p.Glu1874Val	2.1
TET2	mutated	c.5636A>C	p.Glu1879Ala	11.5
TET2	mutated	c.5642A>G	p.His1881Arg	2.5
TET2	mutated	c.5650A>G	p.Thr1884Ala	1.4
TET2	mutated	c.5690T>G	p.Ile1897Ser	4.1
TET2	mutated	c.5720T>A	p.Met1907Lys	11.1
TET2	mutated	c.651del	p.Val218Trpfs*32	1.4
TET2	mutated	c.661_667del	p.Thr221Valfs*27	5.8
TET2	mutated	c.662_663insTC	p.Gly223Metfs*28	2.2
TET2	mutated	c.763C>T	p.Gln255*	6.5
TET2	mutated	c.822del	p.Asn275Ilefs*18	2.0
TET2	mutated	c.822del	p.Asn275Ilefs*18	1.3
TET2	mutated	c.840_841insTT	p.Asn281Leufs*13	4.1
TET2	mutated	c.897dup	p.Asp300*	4.9
TP53	mutated	c.223C>G	p.Pro75Ala	4.7
TP53	mutated	c.329G>C	p.Arg110Pro	5.2
TP53	mutated	c.332T>G	p.Leu111Arg	1.7
TP53	mutated	c.376T>C	p.Tyr126His	5.9
TP53	mutated	c.464C>T	p.Thr155Ile	3.2
TP53	mutated	c.473G>T	p.Arg158Leu	4.4
TP53	mutated	c.530C>T	p.Pro177Leu	2.5
TP53	mutated	c.533A>C	p.His178Pro	2.9

TP53	mutated	c.541C>T	p.Arg181Cys	45.9
TP53	mutated	c.584T>C	p.Ile195Thr	11.4
TP53	mutated	c.586C>T	p.Arg196*	24.2
TP53	mutated	c.658T>C	p.Tyr220His	2.4
TP53	mutated	c.668C>T	p.Pro223Leu	2.1
TP53	mutated	c.731G>T	p.Gly244Val	1.9
TP53	mutated	c.734G>A	p.Gly245Asp	4.6
TP53	mutated	c.745A>G	p.Arg249Gly	2.6
TP53	mutated	c.817C>T	p.Arg273Cys	1.7
TP53	mutated	c.997del	p.Arg333Valfs*12	2.5
U2AF1	mutated	c.101C>T	p.Ser34Phe	7.0
U2AF1	mutated	c.470A>C	p.Gln157Pro	9.8
U2AF1	mutated	c.470A>C	p.Gln157Pro	3.2
U2AF1	mutated	c.470A>G	p.Gln157Arg	1.6
U2AF1	mutated	c.470A>G	p.Gln157Arg	23.6
U2AF1	mutated	c.470A>G	p.Gln157Arg	4.6
U2AF1	mutated	c.470A>G	p.Gln157Arg	37.1
ZRSR2	mutated	c.1017del	p.Trp340Glyfs*?	20.9
ZRSR2	mutated	c.1141dup	p.Arg381Lysfs*4	16.9
ZRSR2	mutated	c.1223dup	p.His408Glnfs*20	5.7
ZRSR2	mutated	c.195_198del	p.Glu67Glyfs*10	1.8
ZRSR2	mutated	c.376C>T	p.Arg126*	17.5
ZRSR2	mutated	c.398_399del	p.Glu133Glyfs*11	8.3
ZRSR2	mutated	c.593del	p.Pro198Leufs*40	4.5
ZRSR2	mutated	c.706T>A	p.Phe236Ile	1.8
ZRSR2	mutated	c.80G>T	p.Arg27Leu	6.8
ZRSR2	mutated	c.83dup	p.Lys29Glnfs*26	4.6
ZRSR2	mutated	c.860_864delinsAAT	p.Phe287*	2.4
ZRSR2	mutated	c.988C>T	p.His330Tyr	1.6

Danksagung

Mein Dank gilt allen voran Herrn Prof. Dr. med. Heribert Schunkert, dem Klinikdirektor der Erwachsenenkardiologie am Deutschen Herzzentrum München, in dessen Klinik und grundlagenwissenschaftlichem Labor ich die Möglichkeit hatte, meine Dissertation anzufertigen. Zudem möchte ich Ihm für die Betreuung und Überlassung dieses klinisch relevanten und interessanten Themas danken. Ohne seine Erfahrung und Organisation aller für eine Dissertation relevanten Komponenten, wäre die Durchführung und Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Durch die klaren Vorgaben und Strukturen, sowie professionelle Handhabung auftretender Probleme, fühlte ich mich zu jeder Zeit gut betreut.

Ich danke zudem Herrn Prof. Dr. med. Lars Mägdefessel für seine wegweisende und wertvolle Unterstützung in allen Bereichen dieser Arbeit, welche wesentlich zum Gelingen der Dissertation beigetragen hat.

Für seine unermüdliche Hilfe und sein großes Engagement möchte ich mich auch bei meinem Mentor Herrn Dr. med. Moritz von Scheidt und seiner gesamten Arbeitsgruppe bedanken. Die mich stets als wertvolle Ansprechpartner während des gesamten Prozesses begleitet haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund, die mich auf dem Weg bis hin zum Abschluss meiner Dissertation immer begleitet, an den richtigen Stellen motiviert und kontinuierlich unterstützt haben.

Publikationsliste

Bauer S, Eigenmann J, Zhao Y, **Fleig J**, Hawe JS, Pan C, Bongiovanni D, Wengert S, Ma A, Lusic AJ, Kovacic JC, Björkegren JLM, Maegdefessel L, Schunkert H, von Scheidt M. *Identification of the Transcription Factor ATF3 as a Direct and Indirect Regulator of the LDLR*. *Metabolites*. 2022 Sep 6;12(9):840. doi: 10.3390/metabo12090840. PMID: 36144244

von Scheidt M, Bauer S, Ma A, Hao K, Kessler T, Vilne B, Wang Y, Hodonsky CJ, Ghosh SKB, Mokry M, Gao H, Kawai K, Sakamoto A, Kaiser J, Bongiovanni D, **Fleig J**, Oldenbuettel L, Chen Z, Moggio A, Sager HB, Hecker JS, Bassermann F, Maegdefessel L, Miller CL, Koenig W, Zeiher AM, Dimmeler S, Graw M, Braun C, Ruusalepp A, Leeper NJ, Kovacic JC, Björkegren JLM, Schunkert H. *Leukocytes carrying Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (CHIP) Mutations invade Human Atherosclerotic Plaques*. medRxiv. 2023 Jul 26:2023.07.22.23292754. doi: 10.1101/2023.07.22.23292754. Preprint. PMID: 37546840