

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Pathologie und Neuropathologie
der Universität Tübingen
Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie

**Die Rolle von *SRSF2* und *TP53*
in der Progression chronisch
myeloproliferativer Erkrankungen -
Eine Untersuchung an seriellen Knochenmarkbiopsien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Flaadt, Tim

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Möhle

Tag der Disputation: 22.05.2018

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
1.1	Einführung und Zielsetzung	9
1.2	Hämatologische Neoplasien	11
1.2.1	Die Knochenmarkstammzelle	11
1.2.2	Hämatologische Neoplasien	12
1.2.3	Myeloproliferative Erkrankungen	13
1.2.4	Myelodysplastische Syndrome	16
1.2.5	Myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasien	16
1.2.6	Akute myeloische Leukämie	17
1.3	Diagnostik	18
1.3.1	Klinisches Bild	18
1.3.2	Epidemiologie	19
1.3.3	Risikofaktoren	20
1.3.1	Knochenmarkbefunde	21
1.3.1.1	Polyzythämia vera	21
1.3.1.2	Primäre Myelofibrose	22
1.3.1.3	Essentielle Thrombozythämie	24
1.3.2	Myelodysplastisch-myeloproliferative Erkrankung unklassifizierbar	25
1.3.3	Molekulare Pathogenese	27
1.3.3.1	Gene der Signaltransduktion	27
1.3.3.2	Spliceosom-assoziierte Gene	29
1.3.3.3	Epigenetische Modifikatoren	32
1.3.3.4	Mutationen in Transkriptionsfaktoren	33
1.3.3.5	Tumorsuppressorgene	34
1.3.3.6	CALR-Mutationen	35
1.3.4	WHO-Kriterien zur Diagnose einer MPN	37
1.4	Progression	39
1.4.1	Fibrose	39
1.4.2	Akzeleration	41
1.4.3	Leukämische Transformation	41
1.4.4	Knochenmarkbefunde der MPN in fortgeschrittenen Stadien: Fibrose, Dysplasie, Leukämie	43
1.5	Zielsetzung der Arbeit	46

2	MATERIAL UND METHODEN	46
2.1	Auswahl der Studienfälle und Einordnung in Gruppen	46
2.2	Verwendete Gerätschaften und Reagenzien	47
2.3	DNA-Extraktion und PCR zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA	51
2.3.1	DNA-Extraktion mit QIAamp® DNA FFPE Tissue KIT	51
2.3.2	PCR zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA	52
2.4	<i>SRSF2</i> -Mutationsanalyse	55
2.4.1	Semi-nested PCR	55
2.4.2	Verdau mit der Restriktionsendonuklease BsaJI	58
2.5	<i>TP53</i> -Immunhistochemie	59
2.6	<i>JAK2</i> -Mutationsanalyse	59
2.7	Statistische Analyse	59
3	ERGEBNISSE	60
3.1.1	Alters- und Geschlechterverteilung des Studienkollektivs	65
3.2	Überblick über die Progression, unabhängig der Grunderkrankung	66
3.2.1	Zusammenhang zwischen Diagnose und <i>SRSF2</i>-Mutationsstatus	66
3.3	Einfluss von <i>SRSF2</i> auf die Progression myeloproliferativer Erkrankungen	68
3.3.1	Zeitlicher Verlauf der <i>SRSF2</i> Mutation bei Patienten mit seriellen Biopsien	70
3.4	<i>JAK2</i>	71
3.4.1	<i>JAK2</i>- Mutationsstatus im untersuchten Kollektiv	71
3.5	Häufigkeit einer <i>JAK2</i> -Mutation bei progredienter und nicht-progredienter Erkrankung	72
3.5.1	Zeitlicher Verlauf der <i>JAK2</i>-Mutation bei Patienten mit seriellen Biopsien	72
3.5.2	Assoziation zwischen <i>JAK2</i>- und <i>SRSF2</i>-Mutationsstatus	72
3.6	<i>TP53</i>	74
4	DISKUSSION	77
4.1	Die Eignung von FFPE-fixiertem Gewebe für die <i>SRSF2</i> - und <i>TP53</i> Analyse	77
4.2	Der Restriktionsverdau mit BsaJI zur Analyse einer <i>SRSF2</i> - Mutation	78
4.3	Die Art der Progression bei myeloproliferativen Erkrankungen	78

4.4 Die Rolle von SRSF2 bei myeloproliferativen Erkrankungen	80
4.5 Die Rolle der <i>JAK2</i> -Mutation bei MPN	82
4.6 Die Rolle von <i>TP53</i> bei der leukämischen Transformation	84
5 ZUSAMMENFASSUNG	86
LITERATUR	88
VERZEICHNIS VON ABBILDUNGEN UND TABELLEN	97
ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT	99
DANKSAGUNG	100

Abkürzungsverzeichnis

2-HG	2-Hydroxyglutarat
aCML	Atypische chronisch myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BM	Bone marrow
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
CALR	Calreticulin
CD	Cluster of Differentiation
CIMP	Chronische idiopathische Myelofibrose
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CNL	Chronische neutrophilen Leukämie
DNA	Deoxyribonucleic Acid (=DNS)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
ET	Essentielle Thrombozythämie
FAB	French-American-British
GH	growth hormone
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony stimulating factor
HB	Hämoglobin (-wert)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxilin-Eosin
HSC	Hematopoetic stem cell
IDH	Isocitratdehydrogenase
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LDH	Laktatdehydrogenase
LOH	Loss of heterozygosity

LPN	Lymphoproliferative Neoplasie (<i>lymphoproliferative Neoplasm</i>)
M.	Morbus
MCD	Mast cell disease
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDS/MPN	Myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasie
MDS/MPN-UC	Myelodysplastisch-myeloproliferative Neoplasie unklassifizierbar
MF	Markfibrose
MPE	Myeloproliferative Erkrankung
MPL	Myeloproliferative leukemia virus Protein
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
mRNA	Messenger-Ribonuklein-Säure
NK	Natural Killer
OMF	Osteomyelofibrose
PMF	Primäre Myelofibrose
post-ET-MF	Post-essentielle Thrombozythämie Myelofibrose
post-PV-MF	Post-Polyzythämia vera Myelofibrose
PV	Polyzythämia vera
RARS-T	(MDS vom Typ der) refraktären Anämie mit Ringsideroblasten und Thrombozytose
RNA	Ribonukleinsäure
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
sog	Sogenannt/e
SRSF2	Serine/arginine-rich splicing factor 2
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SZT	Stammzelltransplantation
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TPO	Thrombopoietin
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Einführung und Zielsetzung

Myeloproliferative Neoplasien (MPN) sind klonale Erkrankungen der Knochenmarkstammzellen, die durch eine Überproduktion reifer Blutzellen, zunehmende Knochenmarkfibrose und extramedulläre Blutbildung gekennzeichnet sind. Myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasien (MDS/MPN) zeigen zusätzlich MDS-typische Veränderungen mit ineffizienter Hämatopoese und, abhängig von der jeweiligen Entität, auch fortschreitender Bildung entdifferenzierter Knochenmarks- und Blutzellen.

Sowohl MPN als auch MDS/MPN bergen in unterschiedlicher Frequenz das Risiko der Entwicklung einer akuten Leukämie, einer sekundären Myelofibrose und/oder hämatopoetischen Insuffizienz.

Je nach Entität, Erkrankungsdauer, Therapie und bedingt durch eine Reihe ungeklärter Faktoren variiert das Risiko deutlich.

In den vergangenen Jahren wurden bei diesen Erkrankungen zahlreiche rekurrente Mutationen beschrieben, über deren genaue molekulare Mechanismen oder die zeitliche Abfolge im Sinne einer klonalen Evolution, deren prognostische Wertigkeit sowie deren Korrelation mit Knochenmarkmorphologie und Klinik ist bislang wenig bekannt. Auch, da in den bisher veröffentlichten Studien, meist eine einzelne Untersuchung mit dem klinischen Verlauf korreliert wurde, sind Aussagen über den Verlauf der Erkrankungen, deren Knochenmarkbefunde und den Verlauf der Mutationen nur in begrenztem Maße möglich. Die Untersuchungen wurden in der Regel an peripheren Blutproben oder Knochenmark-Aspiraten durchgeführt. Eine Knochenmarkaspiration gestaltet sich im Verlauf der Erkrankung jedoch häufig schwierig, da bei zunehmender Knochenmarkfibrose diese häufig als punctio sicca erfolgt und so nur eingeschränkt oder gar nicht auswertbar ist. Ebenso problematisch sind periphere Blutproben, da in fortgeschrittenen Stadien häufig ausgeprägte Zytopenien vorliegen, welche die Mutationsanalysen solcher Proben deutlich erschweren.

Daher stellt das Knochenmark-Trepanat eine gute Quelle zur Mutationsanalyse chronisch myeloproliferativer Neoplasien dar, da neben der nahezu uneingeschränkt möglichen genetischen Analyse, sowohl auf DNA- als auch auf RNA-

Ebene, eine Korrelation mit der Knochenmarkmorphologie jeder Zeit möglich ist, insbesondere auch retrospektiv. [1]

In der Pathogenese chronischer myeloischer und myeloproliferativer Neoplasien sind derzeit krankheitsauslösende Mutationen in fünf Hauptklassen von Genen beschrieben. Dazu gehören Gene der Signaltransduktion und Mutationen in Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie zum Beispiel *JAK2*, *NRAS*, *KRAS* und *MPL*. [2] Mutationen in Transkriptionsfaktoren und Epigenetische Modifikatoren sind in der Pathogenese myeloproliferativer Erkrankungen ebenfalls beteiligt.

Durch den Einsatz von neuen Sequenziermethoden (Next Generation Sequencing) wurden in jüngster Zeit eine Vielzahl von Mutationen bei MPN, MDS und MDS/MPN identifiziert, welche teilweise Gene betreffen, die bisher nicht als Mutationen bei malignen Tumoren oder hämatologischen Erkrankungen im Allgemeinen aufgefallen waren. Zu diesen Genen gehören Spliceosom-assoziierte Gene, beispielsweise Splicing factor 3 subunit B1 (*SF3B1*), *U2AF1* und *SRSF2*. Es wird vermutet, dass diese Gruppe von Mutationen, als sogenannte Treibermutationen frühe Ereignisse auf genetischer Ebene darstellen, die eine klonale Evolution ermöglichen. [3] Im weiteren Verlauf kommt es dann zu Akkumulation weiterer Mutationen in epigenetischen Regulatoren, z.B. *IDH1/2*, Genen der Signaltransduktion wie *JAK2* und Tumorsuppressorgenen wie *TP53*. [4]

Der zeitliche Verlauf, Kombinationen dieser Mutationen und die Art der mutierten Zelle (Vorläufer- oder Stammzelle) bestimmen wahrscheinlich den klinischen und morphologischen Verlauf, sowie die Progression der Erkrankung. Dies erklärt auch die deutliche klinische Heterogenität dieser Erkrankungen. [4]

Ziel der Arbeit war eine Untersuchung der Verläufe von myeloproliferativen Erkrankungen und MDS/MPN an sequentiellen Knochenmarkbiopsien. Hierbei sollten sowohl der morphologische als auch der klinische Verlauf zur Einordnung in Gruppen betrachtet werden. Diese Verläufe wurden mit einer Untersuchung von molekularen Mechanismen der Progression, dem zeitlichen Verlauf der Mutationen und möglicher additiver Effekte dieser Mutationen korreliert. Ein besonderer Fokus lag auf der Bedeutung der Mutationen im *SRSF2*- und im *TP53*-Gen.

1.2 Hämatologische Neoplasien

1.2.1 Die Knochenmarkstammzelle

Eine kleine Anzahl hämatopoetischer Stammzellen (HSC, hematopoetic stem cells), die sog. long term HSCs haben das einzigartige Potential sich ein Leben lang selbst zu erneuern und die Fähigkeit der sog. multi-Linien-Differenzierung, also Möglichkeit der Differenzierung in alle Zellen der Hämatopoese. [5] Abb.1 stellt dieses Konzept der Hämatopoese dar. [6] Von diesen multi-potenten Zellen gehen die sog. short term HCSs hervor, die ebenfalls diese Fähigkeit besitzen, jedoch mit nur eingeschränkter Lebenszeit. [7] Aus den multi-potenten Precursor Zellen entstehen lymphatische (common lymphoid precursor, CLP) und myeloische (common myeloid precursor, CMP) Vorläuferzellen. Aus diesen reifen wiederum in der lymphatischen Reihe, B- und T-Zellen, aus der myeloischen Vorläuferzelle, Erythrozyten, Megakaryozyten, Granulozyten und Monozyten. Diese Differenzierungsvorgänge werden durch zahlreiche hämatopoetische Wachstumsfaktoren vermittelt. [6] In hämatologischen Neoplasien verursachen dysregulierte oder mutierte Wachstums- oder Transkriptionsfaktoren in diesen Reifungsvorgängen einen Differenzierungsarrest und ermöglichen so eine klonale Evolution. Dieses Konzept der Leukämogenese wurde zunächst bei akuten myeloischen Leukämien beobachtet. Ein klassisches Beispiel sind somatisch erworbene, onkogene Fusionsproteine, beispielsweise RUNX1–ETO (t(8;21)). [8]

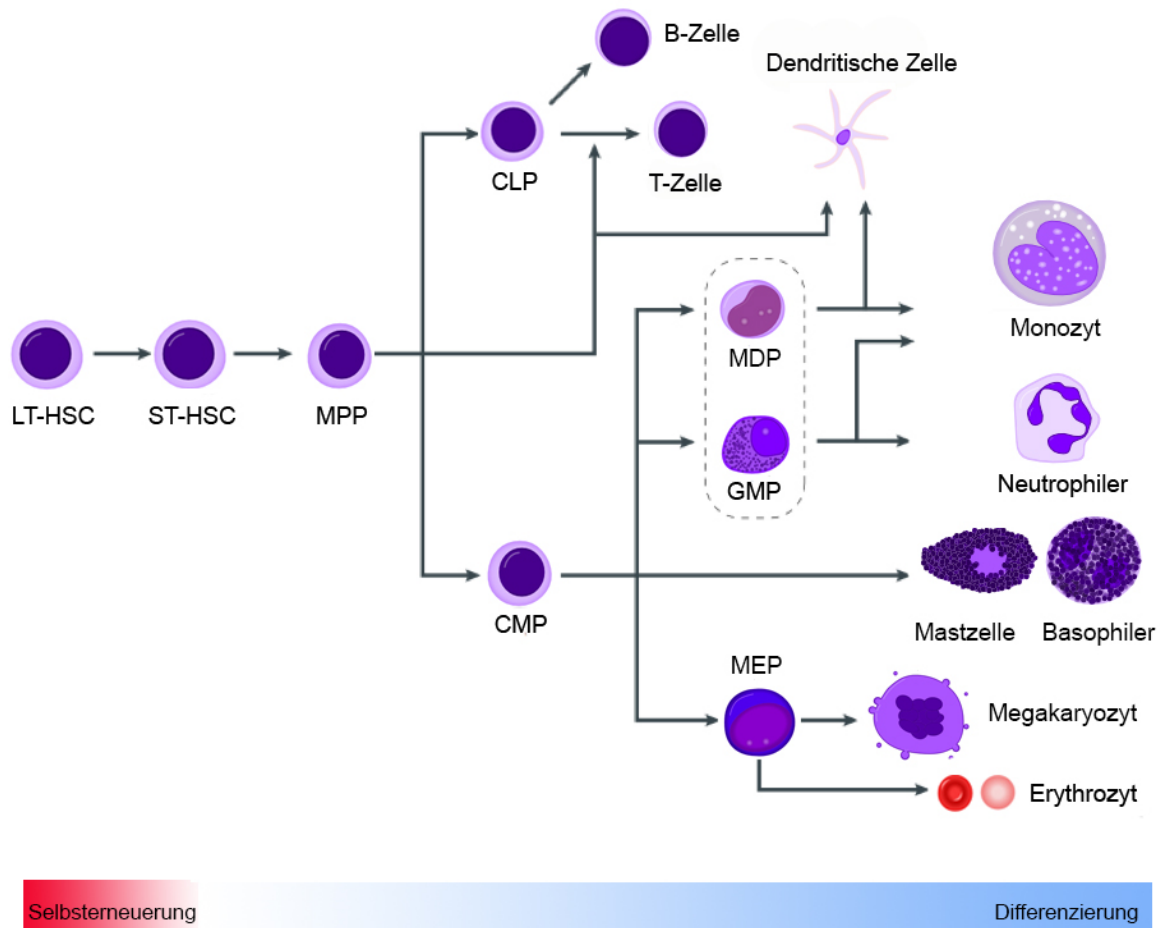


Abb. 1: Konzept der Hämatopoese nach Weissman [6], Bilder der hämatopoetischen und Blutzellen aus [9]

LT-HSC: Long-term haematopoietic stem cells; **ST-HSC:** *short-term haematopoietic stem cells*, diese produzieren *multipotential progenitors (MPPs)*, **CLP:** *common lymphoid progenitor* (Lymphatische Vorläuferzelle) **CMP:** *common myeloid progenitor* (myeloische Vorläuferzelle); **GMP:** *granulocyte/macrophage progenitor* (Vorläufer von Granulozyten und Makrophagen) **MEP:** *megakaryocyte/erythroid progenitors* (Vorläufer von Megakaryozyten und Erythrozyten(vorläufer)); **MDP:** *macrophage/dendritic-cell progenitors* (Vorläufer von Makrophagen und Dendritischen Zellen)

1.2.2 Hämatologische Neoplasien

Eingeteilt werden hämatologische Neoplasien nach der WHO-Klassifikation. [10] Diese Einteilung folgt primär morphologischen Kriterien, entsprechend der Reihenzugehörigkeit der Erkrankung. Es werden im Wesentlichen myeloische und lymphatische Neoplasien unterschieden, daneben, deutlich seltener, histiozytäre Neoplasien, sowie Mastzellerkrankungen.

Neben der Morphologie erfolgt eine Einteilung durch immunphänotypische Merkmale, genetische Typisierung und in klinische Syndrome. Die myeloischen Neo-

plasien, inklusive der akuten Leukämien und myelodysplastischen Syndrome, umfassen eine Vielzahl unterschiedlicher Entitäten; folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der WHO-Klassifikation von 2016.[10]

WHO-Klassifikation der myeloischen Neoplasien und akuten Leukämien (2016)
Myeloproliferative Neoplasien (MPN)
Chronisch myeloische Leukämie, <i>BCR-ABL1</i> -positiv (CML)
Chronische Neutrophilen Leukämie (CNL)
Polycythemia vera (PV)
Primäre Myelofibrose (PMF)
Primäre Myelofibrose (PMF) präfibrotisches Stadium / Frühstadium
Primäre Myelofibrose (PMF) fibrotisches Stadium
Essentielle Thrombozythämie (ET)
Chronische Eosinophilen Leukämie (CEL-NOS)
MPN unklassifizierbar
Mastozytose (MCD)
Myeloische/Lymphatische Neoplasien mit Eosinophilie und Rearrangierung von <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i> oder <i>FGFR1</i> oder mit <i>PCM1-JAK2</i>
MDS/MPN
Chronisch myelomonozytäre Leukämie (CMML)
Juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML)
Atypische chronisch myeloische Leukämie, <i>BCR-ABL1</i> -negativ (aCML)
MDS/MPN with Ringsideroblasten und Thrombozytose (MDS/MPN-RS-T)
MDS/MPN unklassifizierbar
Myelodysplastische Syndrome (MDS)
Akute myeloische Leukämien (AML) und verwandte Neoplasien
Akute Leukämien unklarer Linienzugehörigkeit
B-lymphoblastische Leukämien / B-lymphoblastische Lymphome
T-lymphoblastische Leukämien / T-lymphoblastische Lymphome

Tab. 1 WHO-Klassifikation der myeloischen Neoplasien und akuten Leukämien (2016); nach [10]

1.2.3 Myeloproliferative Erkrankungen

Auch myeloproliferative Erkrankungen sind klonale Erkrankungen einer Knochenmarkstamm- oder Progenitorzelle. Diese Erkrankungen sind durch Überproduktion reifer Blutzellen, extramedulläre Blutbildung und häufig eine Knochenmarkfibrose gekennzeichnet. [11, 12] Mit Ausnahme der chronisch-myeloischen Leukämie (CML), die definitionsgemäß ein *BCR/ABL1* Fusionsgen (Philadelphia-

Chromosom, Ph¹⁺) aufweisen muss, erfolgt die Einteilung der „klassischen myeloproliferativen Erkrankungen“ primär nach klinischen und histomorphologischen Kriterien. [13]

Die Philadelphia-negativen (Ph¹⁻), „klassischen“ chronisch myeloproliferativen Erkrankungen (MPN / MPE) bestehen aus drei Subtypen, der Polyzythämia (rubra) vera (PV), der essentiellen Thrombozythämie (ET) und der primären Myelofibrose (PMF) (früher: chronisch idiopathische Myelofibrose (CIMF)).

Diese Bezeichnung und Klassifikation wurde bereits 1951 von William Dameshek eingeführt. [14] 2008 und 2016 wurden in der WHO-Klassifikation die chronische Neutrophilenleukämie (CNL), die chronische Eosinophilenleukämie (not otherwise specified) (CEL-NOS) sowie die myeloproliferative Neoplasie unklassifizierbar (MPN-UC) ergänzt. [10] [15] Früher zu den MPN zählend stellt die Mastozytose inzwischen (seit der Aktualisierung der WHO-Kriterien 2016) eine eigenständige Entität dar. [16]

Die Erkrankungen entstammen einer Knochenmarkstamm- bzw Progenitorzelle, welche durch exzessive Produktion von Blutzellen gekennzeichnet und gegenüber Zytokin-Signalen hypersensitiv oder sogar unabhängig sind [12, 17] Die Myeloproliferation entsteht dann durch Unabhängigkeit von Rückkopplungs- (feedback-) Mechanismen gegenüber reifen Zellen. Die meisten myeloproliferativen Erkrankungen können anhand der prädominanten differenzierten myeloischen Zellart eingeteilt werden; dies ist in Abb. 2 dargestellt.

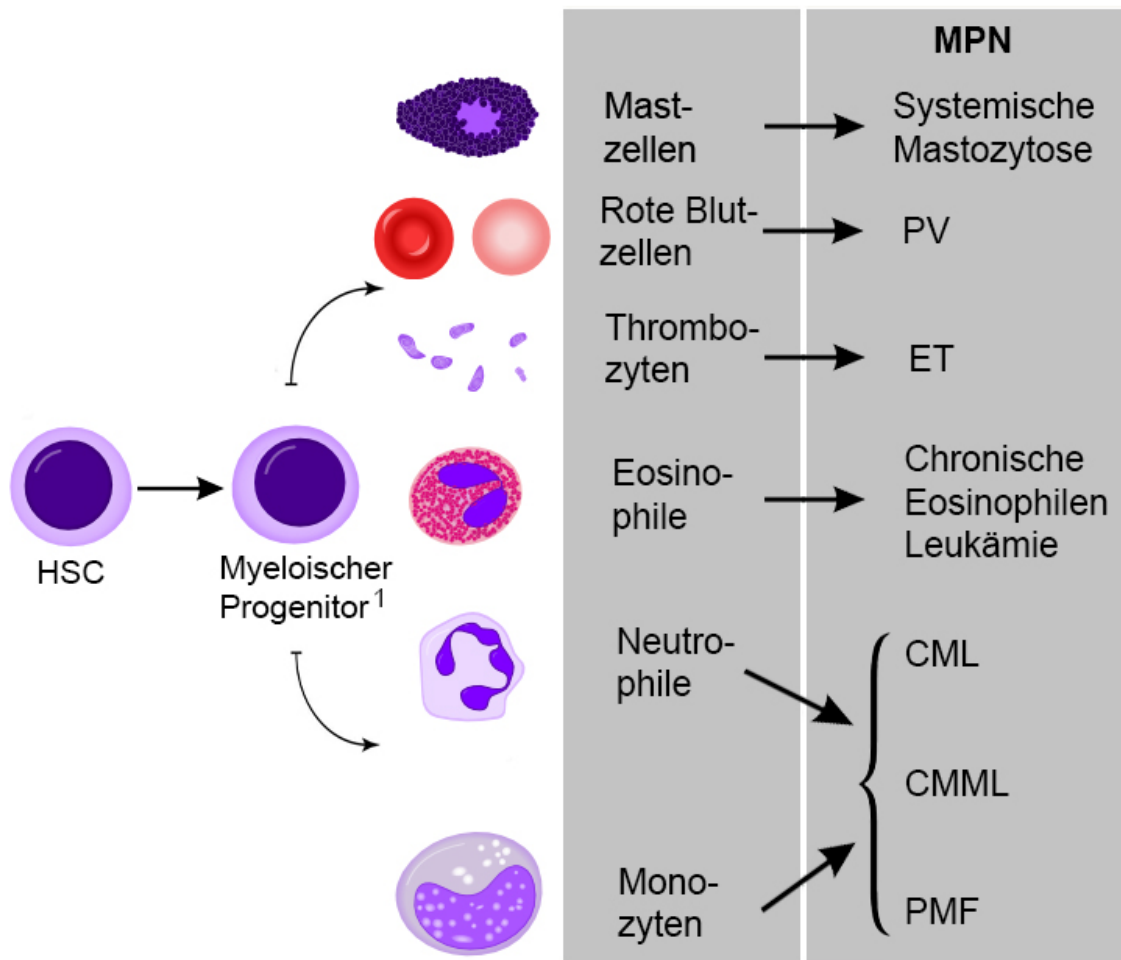


Abb. 2: Einteilung der myeloproliferativen Erkrankungen nach [18]: Bilder der Blutzellen aus [9]

¹ Myeloische Progenitor: entspricht *common myeloid progenitor* (myeloische Vorläuferzelle) aus Abb.1

HSC: hematopoetic stem cell = hämatopoetische Stammzelle

Die Zelllinien sind entsprechend in unterschiedlicher Dominanz beteiligt: Die essentielle Thrombozythämie zeigt ein „zu viel“ an reifen Thrombozyten, bedingt durch eine Störung auf der Ebene der Megakaryozyten bzw. deren Vorläufern, die Polyzythämia vera ist durch eine Erythrozytose gekennzeichnet, bei der primären Myelofibrose herrschen megakaryozytäre und granulopoetische Zellen vor.

Während ET und die PV durch normal ausreifende, überschießende Produktion reifer Zellen gekennzeichnet sind, entsteht bei der PMF die zunehmende Knochenmarkfibrose vermutlich durch abnorme, dysplastische Reifung von Megakaryozyten. Dadurch entsteht dann die Ausschwemmung unreifer Vorläuferzellen ins periphere Blut (Leukoerythroblastisches Blutbild, s.u.). [19] [15] [20]

Mit der Einführung der neuen WHO-Klassifikation 2008, wurde der Name der Erkrankungen, von myeloproliferative Störungen (myeloproliferative disorders) in myeloproliferative Neoplasien (myeloproliferative neoplasms) [13] umbenannt. Ein Großteil der Änderungen in den neuen WHO-Klassifikationen aus den Jahren 2008 und 2016 resultiert, ähnlich wie bei den Leukämien, durch die Entdeckung molekularer Marker, [13, 16] im Falle der MPN insbesondere durch Entdeckung der *JAK2-V617F*-Mutation [21]. Diese ermöglichte ein neues Verständnis der Biologie, Pathogenese und Diagnostik der myeloproliferativen Erkrankungen (s.u.). [22] [23]

1.2.4 Myelodysplastische Syndrome

In ihrer Gesamtheit beschreiben die myelodysplastischen Syndrome eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, mit teils indolenten Verläufen und nahezu normaler Lebenserwartung, sowie Subtypen mit Morphologie und Prognose ähnlich einer akuten Leukämie. [24]

MDS sind gekennzeichnet durch eine Proliferation hämatopoetischer Stamm- oder Progenitorzellen, mit ineffektiver Hämatopoese, abnormer – dysplastischer – Zellmorphologie und dem Potential einer klonalen Entwicklung. [25] Im Vergleich zu myeloproliferativen Erkrankungen, welche üblicherweise durch eine erhöhte Anzahl reifer Zellen im peripheren Blut gekennzeichnet sind, herrschen bei MDS vor allem Zytopenien und Dysplasien einer oder mehrerer myeloischer Zellreihen vor. Prädominant ist meist eine Anämie, Bi- oder Panzytopenien sind aber ebenfalls möglich. Daneben bergen die myelodysplastischen Syndrome die Gefahr der Entwicklung einer akuten myeloischen Leukämie (AML). [26] Morphologisch weisen mindestens 10% der Zellen einer Zellreihe Dysplasiezeichen auf, im Knochenmark finden sich definitionsgemäß < 20% Blasten. [13, 27]

Myelodysplastische Syndrome können de-novo oder sekundär, z.B. nach Strahlen- und/oder Chemotherapie anderer Malignome oder aus einer anderen hämatologischen Erkrankung, beispielsweise aus einer MPN, entstehen. [26]

1.2.5 Myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasien

Myelodysplastisch-myeloproliferative Neoplasien, sind seltene Erkrankungen, die Merkmale beider Erkrankungen, myelodysplastischer Syndrome und myeloproliferativer Neoplasien, aufweisen und entsprechend weder der einen noch der anderen Gruppe zugeordnet werden können. [15, 28] Während im peripheren Blut, wie

beim MDS, meist uniliniäre Zytopenien vorliegen, präsentiert sich das Knochenmark meist hyperzellulär mit dysplastischer, überschießender Ausreifung mindestens einer Zellreihe, welche dann auch vermehrt im peripheren Blut zu finden ist. [15, 28] Man unterscheidet im Wesentlichen drei Typen der myelodysplastisch-myeloproliferativen Neoplasien: Die chronisch myelomonozytäre Leukämie (CMML), die juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML), sowie die atypische chronische myeloische Leukämie (aCML). [29] Ebenfalls zu den myelodysplastisch-myeloproliferativen Neoplasien gehört die myelodysplastisch-myeloproliferative Neoplasie unklassifizierbar (MDS/MPN-UC) (s.u.). In diese Gruppe der sogenannten overlap-Syndrome gehört ebenfalls das RARS-T (refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis), das neben MDS-typischen Zeichen vom Typ RARS, histologische Merkmale einer MPN entsprechend einer ET und als klinisches Zeichen die Thrombozytose zeigt. [30]

1.2.6 Akute myeloische Leukämie

Auch akute Leukämien sind klonale Erkrankungen hämatopoetischer Progenitor- oder Stammzellen. Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML), sind myeloische, unvollständig differenzierte Vorläuferzellen, sogenannte Blasten, krankheitsdefinierend. Diese entstehen häufiger aus granulopoetischen und monopoetischen, seltener aus erythropoetischen und megakaryopoetischen Vorläuferzellen.[31]

Da die Anzahl und die Art der leukämischen Blasten im Knochenmark für die Diagnose eine maßgebliche Bedeutung haben, werden diese genau klassifiziert. Man unterscheidet Mono-, Megakaryo- und Myeloblasten. Die Zellen der Erythropoese werden in der Regel gesondert betrachtet und gezählt.[31, 32] Definiert ist eine akute myeloische Leukämie AML durch $\geq 20\%$ myeloische Blasten im Knochenmark oder das Auftreten einer AML-definierenden Mutation (z.B. $t(8;21)$, $inv(16)$). [23] Eingeteilt werden die akuten myeloischen Leukämien nach WHO und FAB. Die Einteilung nach FAB erfolgt von FAB-M0 bis FAB-M7 vor allem nach morphologischen Kriterien. [13, 33] (M0: AML mit geringer immunphänotypischer Markerdifferenzierung, M1: AML mit deutlicher immunphänotypischer Markerdifferenzierung, morphologische keine Differenzierung, M2: AML mit morphologischer Ausreifung, M3: Akute Promyelozytenleukämie, M4: Akute myelomonozytäre Leukämie, M5: akute Monoblastenleukämie, M6: Akute Erythroleukämie, M7: Akute Megakaryoblastäre Leukämie) [13, 33]

1.3 Diagnostik

1.3.1 Klinisches Bild

Häufig wird die Verdachtsdiagnose einer MPN aufgrund auffälliger Laborbefunde, bei meist nur gering eingeschränktem Allgemeinbefinden, gestellt. Chronisch myeloproliferative Neoplasien haben insbesondere initial häufig ein ähnliches klinisches Bild. Es können Allgemeinsymptome wie Leistungsminderung, Knochenschmerzen, Nachtschweiß, Gewichtsverlust oder Fieber auftreten. Abdominelle Beschwerden können durch Splenomegalie oder auch Thrombosen abdomineller Gefäße entstehen. [34, 35]

Durch den gesteigerten Zellumsatz können sie zu einer Hyperurikämie und zu Gicht-typischen Symptomen führen, die zunehmende Markfibrose, die alle MPN in unterschiedlich starker Ausprägung zeigen, führt zur extramedullären Blutbildung und so, je nach Ausprägung, zu einer mehr oder minder starken Spleno- gelegentlich auch Hepatosplenomegalie und den damit verbundenen Beschwerden. (Tab. 2.) Ebenso bergen alle myeloproliferativen Erkrankungen das Risiko einer leukämischen Transformation oder Akzeleration (Entwicklung in Richtung MDS) dann mit typischen Symptomen dieser Erkrankungen. [34, 35]

Charakterisierung der myeloproliferativen Neoplasien							
Typ	Hämatokrit	Leukozyten	Thrombozyten	Splenomegalie	ALP-Index ¹	Myelofibrose	Besonderheit
CML	n/↓	↑↑↑	↑/n/↓	+++	↓	n/+	<i>BCR-ABL1</i> +++ (100%)
PV	↑	↑	↑	+	↑↑	+	<i>JAK2-V617F</i> +++ (96%)
ET	n	↑/n	↑↑↑	+	n/↓	±	<i>JAK2-V617F</i> ++ (50-60%) <i>CALR</i> ++ (30-35%) <i>MPL</i> + (3%)
PMF	↓	↑/n/↓	↑/n/↓	+++	↑	+++	<i>JAK2-V617F</i> ++ (60%) <i>CALR</i> ++ (30-35%) <i>MPL</i> + (8%)

↑ erhöht; ↓ erniedrigt; n normal; ±/+/++/+++ nachweisbar; ¹ Alkalische Leukozytenphosphatase

Tab. 2: Charakterisierung der myeloproliferativen Neoplasien nach [34] [36]

PV und ET zeigen Komplikationen durch erhöhte Blutviskosität, Mikrozirkulationsstörungen, Hypertonie oder die Thrombozytose und auch damit verbundenen Blutungskomplikationen durch sekundären von-Willebrand-Faktor-Mangel [37, 38].

Dazu gehören Schlaganfall bzw. transitorische ischämische Attacken, Blutungen aus Ulcus duodeni / ventriculi, Epistaxis, Schwindel, Kopfschmerz, Plethora, Tinnitus, Sehstörungen, Erythromelalgie („burning feet syndrome“), tiefe Beinvenenthrombosen, Lungenarterienembolien, sowie „atypische“ Thrombosen, beispielsweise im Pfortader- und Mesenterialvenenstromgebiet [34, 35]

1.3.2 Epidemiologie

Die Inzidenz myeloproliferativer Erkrankungen wird in der Literatur zwischen 1,15 [39] und 4,99 [40] je 100000 angegeben. Aktuelle Zahlen des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) geben eine Inzidenz von 1,53 pro 100000 in Deutschland an [41]. Teilweise auch in jüngerem Alter auftretend, mit einer deutlichen männlichen Dominanz, gehört die chronisch myeloische Leukämie mit 0,89 pro 100000 Einwohnern zu den häufigeren MPN. [41] [42] Dank herausragender Fortschritte in der Therapie auch mit hoher Prävalenz und vielen Langzeitüberlebenden. Beispielsweise leben in den USA aktuell etwa 70000 Personen mit einer CML. [43]

Tabelle 3 gibt einen Überblick über Inzidenz, Prävalenz, Geschlechterverteilung, 5-Jahres Überleben, sowie das Altersmedian bei Diagnose der „klassischen“ MPN.

	<i>Inzidenz je 100000</i>	<i>Prävalenz je 100000</i>	<i>Geschlechter- verteilung</i>	<i>5- JÜL²</i>	<i>Altersmedian bei Diagnose</i>
Polyzythämia vera	0,67 ¹ (0,01-2,61) ³ Europa: 0,86	0,49-46,88 ³	♂ = ♀	84.8 %	61 Jahre (Range 18-95 Jahre)
Essentielle Thrombozythämie	1,03 ¹ (0,21 - 2,53) ³	11,00-42,51 ³	♂ > ♀ ? ♂ < ♀ ? ⁴	89.9 %	56 Jahre (Range 13-91 Jahre).
Primäre Myelofibrose	0,47 ¹ (0,22 - 0,99) ³	1,76-4,05 ³	♂ > ♀	39,0%	64 Jahre (Range 10-90 Jahre)
gesamt	2,58 ¹ (1,15 - 4,99) ³ Deutschland: 1,53	93,43 ⁶	♂ ≈ ♀ ⁵		

¹ Jährlich gepoolter Mittelwert; ² 5-Jahres-Überleben;

³ Range in verschiedenen epidemiologischen Studien; ♂: männlich ♀: weiblich

⁴ Widersprüchliche Aussagen in verschiedenen Studien ⁵ Verteilung ungefähr gleich

⁶ Daten für Nordamerika

Tab. 3: Epidemiologie MPN, Werte nach [44] [45] [46]

Im Kindesalter sind MPN insgesamt sehr selten, die jährliche Inzidenz für alle MPN gesamt beträgt 0,03 bis 1,04/100000 im Alter zwischen 0 und 16 Jahren. Die jährliche Inzidenz der kindlichen ET liegt zwischen 0,004 und 0,11/100000, die kindliche PMF ist mit 0,003/100000 noch seltener. [44] [45] [46] Als Rarität anzusehen ist die kindliche PV, hierfür existieren lediglich einzelne Fallberichte [47] [48] [49]

1.3.3 Risikofaktoren

Adipositas erhöht insbesondere Frauen das MPN und MDS-Risiko deutlich, bei einem Übergewicht von 10 kg/m² (= 10 „BMI-Punkte“) ist das Risiko an einer MPN zu erkranken rund 30% erhöht. [50] [51] Die Körpergröße hat keinen Einfluss auf das Risiko. [50] Körperliche Aktivität reduziert das Risiko an einer myeloproliferativen Neoplasie, insbesondere an einer CML oder ET zu erkranken [52] [53], Rauchen erhöht das Risiko deutlich. [53] [52] Benzol Exposition ist in einer Vielzahl hämatologischer Neoplasien als Karzinogen gesichert, auch bei den klassischen

myeloproliferativen Erkrankungen gelten aromatische Kohlenwasserstoffe als krankheitsbegünstigend, wenn nicht sogar auslösend. [54] [55] Umweltbedingte und berufsbedingte Strahlenexposition erhöht das Risiko an einer CML zu erkranken. [54] [56]

Der Zusammenhang zwischen regelmäßiger Blutspende und Entwicklung einer Polyzythämia vera ist pathophysiologisch durch die Stimulation der Hämatopoese zumindest denkbar. Frühere Studien sahen bei Blutspendern tatsächlich ein erhöhtes Risiko für eine PV, neuere Studien konnten dies jedoch nicht belegen. [57] Wie bereits erwähnt, können MDS und (meist myeloische) Leukämien aus einer vorbestehenden hämatologischen Erkrankung (z.B. einer MPN) oder therapieassoziiert, beispielsweise nach zytostatischer Therapie, entstehen. Oft bleibt der auslösende Faktor jedoch unklar, die Erkrankung somit „schicksalhaft“.

1.3.1 Knochenmarkbefunde

1.3.1.1 Polyzythämia vera

Auch wenn die WHO-Kriterien für die Diagnose einer Polyzythämia vera die histologische Knochenmarkuntersuchung nicht zwingend fordern (siehe auch 1.3.4.) und die Kriterien der Polycythemia Vera Study Group (PVSG) diese nicht einmal beinhalten, empfiehlt sich, sowohl bei unklaren Fällen, als auch bei klinisch eindeutiger PV, eine Knochenmarkentnahme und histologische Aufarbeitung. [10] [58]

Insbesondere in frühen Phasen der Erkrankung erfüllen manche Patienten die von den Gesellschaften festgelegten klinischen Kriterien für eine PV nicht, da Hämoglobin- und Erythrozytenwerte noch unter den definierten Werten liegen, die Erkrankung lässt sich teilweise aber schon histologisch nachweisen. [59] [60] [61] [13] Eine bei rund 20% der Patienten schon zu Beginn vorliegende Knochenmarkfibrose kann ohne histopathologische Aufarbeitung nicht festgestellt werden. [10]

Mikroskopisch zeigt eine Polyzythämia vera hyperzelluläres Knochenmark mit sogenannter Panmyelose, alle drei Zellreihen des Knochenmarks sind also vermehrt. Hierbei zeigen erythropoetische, granulozytäre und megakaryozytäre Vorläuferzellen eine Proliferation mit charakteristischen morphologischen Merkmalen (Abb. 3). [62] [63] [64] Eine atypisch gesteigerte und pleomorphe Megakaryopoese, im Sinne von zahlreichen sehr kleinen bis gigantisch-großen Megakaryozyten, welche einzeln oder als lockere Cluster vorliegen, ist charakteristisch für eine Polyzythä-

mia vera, (Abb. 3) insbesondere zur Unterscheidung gegenüber anderen MPN und einer sekundären Polyzythämie (SP) [65], da Linksverschiebung und gesteigerte Erythropoese auch bei reaktiven Zuständen vorkommen. Bei rund 20% der Patienten tritt bereits in frühen Stadien der Erkrankung auch eine Vermehrung der Retikulinfasern auf [66]. Diese initiale Knochenmarkfibrose stellt wahrscheinlich einen Risikofaktor für eine schnellere Progression zur post-PV Myelofibrose dar. [59] [60] [61] [13] [10].

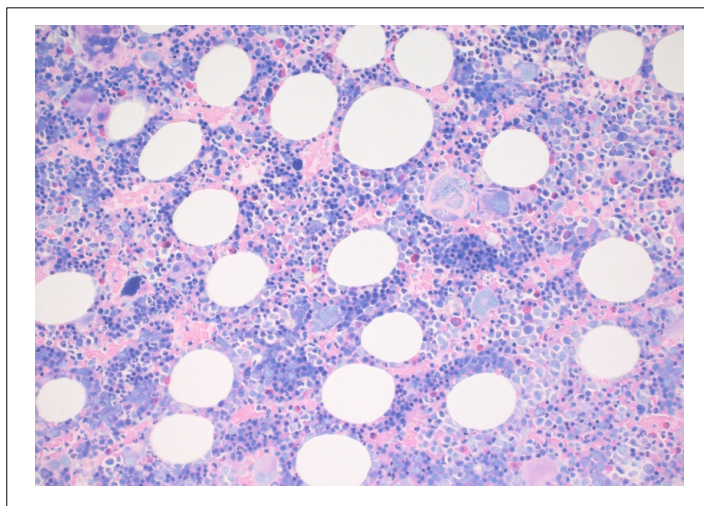


Abb. 3: PV in einer frühen Phase, mit freundlicher Genehmigung von Professor Dr. F. Fend

Polyzythämia vera in einer frühen Krankheitsphase:

Verstärkte Erythropoese mit Linksverschiebung und pleomorphen Megakaryozyten

1.3.1.2 Primäre Myelofibrose

Die primäre Myelofibrose präsentiert sich initial typisch mit hyperzellulärem Knochenmark, welches eine verstärkte Proliferation, insbesondere von Granulozyten (häufig: Linksverschiebung) und Megakaryozyten zeigt. Dies bedingt einen Reifungsstopp der kernhaltigen erythrozytären Vorläufer. [67] Eine Vermehrung von Retikulinfasern, die namensgebende Fibrose, liegt initial noch nicht vor (Sog. prä-fibrotische Phase).

Typisch ist auch eine Störung der Knochenmarkarchitektur und -topografie. Die Megakaryozyten weisen ein deutliches „Clustering“ auf, sowie eine Translokation zu endostalen Grenzen. (Abb.4) [67]

Von allen MPN weisen bei der primären Myelofibrose die Megakaryozyten die ausgeprägtesten Reifungsstörungen mit den stärksten Dysplasiezeichen auf. [68]

Die Zellgröße erscheint sehr variabel, die Kern-Plasma-Relation ist mit aufgedunsenen, hyperchromatischen, teils „Wolken-artigen“ Kernen deutlich verschoben, die Kernlappung desorganisiert, häufig sind „nackte“ Zellkerne ohne umgebendes Plasma zu finden. [19] [15] [20]

In späteren Phasen der Erkrankung führt eine zunehmende Knochenmarkfibrose zu einer Steigerung der Angiogenese und Störungen in der vaskulären Architektur. Verstärkte Knochenmarkperfusion wird, unter anderem, durch dilatierte und stärker torquierte Gefäße bedingt. [69] [70] Die Marksinus zeigen sich hierdurch erweitert, häufig findet intraluminale Hämatopoese, insbesondere Megakaryopoese, statt. Durch die räumliche Nähe zu den erweiterten Sinus können hämatopoetische Vorläuferzellen leichter das Lumen der Sinus und somit das periphere Blut erreichen, was zur Entstehung des leukoerythroblastischen Blutbilds beiträgt. Daneben ermöglicht die extramedulläre Blutbildung in Leber und Milz ebenfalls das „ungefilterte“ Ausschwemmen von hämatopoetischen Zellen in das periphere Blut (Leukerythroblastose). [71] [72] Entsprechend der WHO-Kriterien wird die Knochenmarkfibrose in die Grade 0-3 eingeteilt. [31] (Tab.4)

Gradierung der Knochenmarkfibrose:

Graduierung ¹	Beschreibung
MF²-0	Verstreutes, lineares Retikulin ohne Überkreuzungen, entsprechend normalem Knochenmark
MF²-1	Loses Retikulinnetzwerk mit vielen Überkreuzungen, speziell in perivaskulären Regionen
MF²-2	Diffuse und dichte Retikulinvermehrung mit extensiven Überkreuzungen, gelegentlich mit fokalen Bündeln von Kollagen und/oder fokaler Osteosklerose
MF²-3	Diffuse und dichte Retikulinvermehrung mit extremen Überkreuzungen und groben Kollagenbündeln, oft assoziiert mit Osteosklerose

¹Die Faserdichte sollte in hämatopoetisch aktiven Regionen bestimmt werden ² Markfibrose

Tab. 4: WHO Kriterien der Knochenmarkfibrose aus [31]

Die Wahrscheinlichkeit einer präfibrotischen primären Myelofibrose zu einer manifesten Myelofibrose zu werden liegt bei 50-70%, abhängig von der Ausprägung der Dysplasie der Megakaryozyten. [11] [73] [74] [75]

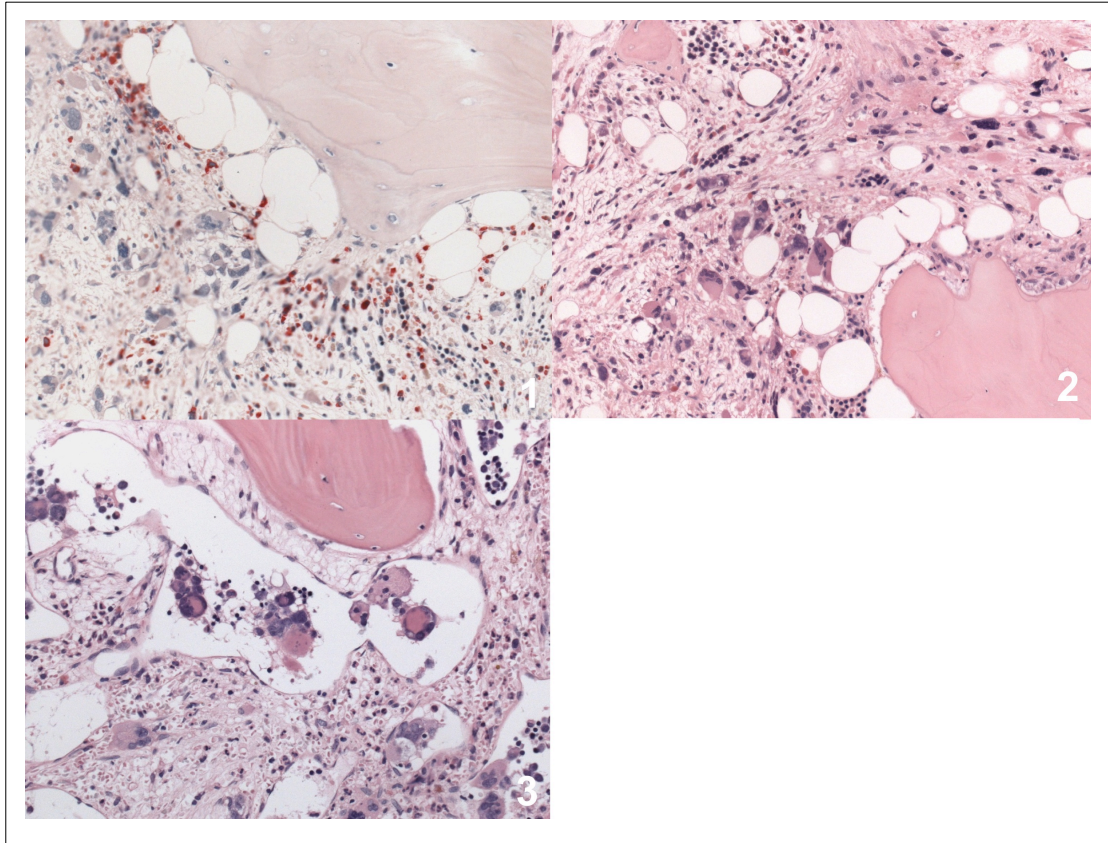


Abb. 4: Primäre Myelofibrose, mit freundlicher Genehmigung von Professor Dr. F. Fend

1. In der Übersicht verstärkte Markfibrose, verminderte Hämatopoese und „Clustering“ von Megakaryozyten (ASDCL-Färbung)
2. „Clustering“ von Megakaryozyten und ausgeprägte Kernatypien
3. Abnorme Megakaryozyten und dilatierte Knochenmarksinus

1.3.1.3 Essentielle Thrombozythämie

Die histopathologische Aufarbeitung einer essentiellen Thrombozythämie ist insbesondere zur Unterscheidung dieser gegenüber einer präfibrotischen primären Myelofibrose wichtig, da auch diese mit erhöhten Thrombozytenwerten einhergehen kann. [58] Im Gegensatz zu einer PMF mit Thrombozytose, zeigt eine „echte“ ET meist eine normale oder mäßig gesteigerte Knochenmarkzellularität und keine Linksverschiebung der Granulopoese. [68] Am stärksten unterscheidet sich die Knochenmarkshistologie jedoch im Bereich der Megakaryopoese. Während bei der PMF Megakaryozyten typischerweise dicht gepackt in sog. Clustern vorliegen, sind diese bei der essentiellen Thrombozythämie gleichmäßig verteilt. [68] Weiter

zeigt die essentielle Thrombozythämie sehr große bis „gigantische“, reife Megakaryozyten, mit hyperlobulierten, „hirschgeweihartigen“ Kernen. Das Zytoplasma erscheint ebenfalls ausgereift. [19] Eine die verschobene Kern-Plasma-Relation, als Zeichen einer Dysplasie, liegt bei der ET in der Regel nicht vor, [76] ebenso ist eine Vermehrung von Retikulinfasern (Retikulinfaserfibrose) bei der ET sehr selten. (< 3% der Fälle) [64] (Abb. 5)

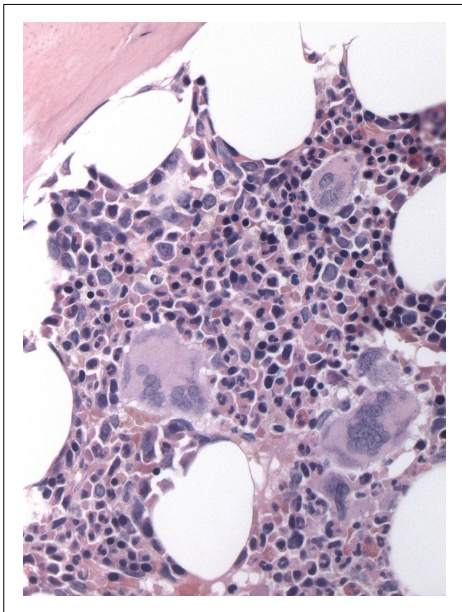


Abb. 5: Essentielle Thrombozythämie, mit freundlicher Genehmigung von Professor Dr. F. Fend.

Hyperzelluläres Knochenmark mit Vermehrung von vergrößerten Megakaryozyten mit atypischen Nuclei. Im Gegensatz zur PMF: kein „Clustering“ der Megakaryozyten, keine Markfibrose

1.3.2 Myelodysplastisch-myeloproliferative Erkrankung unklassifizierbar

Bei der myelodysplastisch/myeloproliferativen Erkrankung unklassifizierbar finden sich Zeichen eines MDS (s.o.) und für MDS atypische Merkmale, wie Hepato-/Splenomegalie, Markfibrose oder eine Leukozytose, welche eher auf eine myeloproliferative Erkrankung hinweisen. Zur Diagnose müssen für andere Krankheiten definierende Mutationen wie z.B. *BCR/ABL1* ausgeschlossen werden. (Tab.5)

Diagnostische Kriterien für MDS/MPN-UC	
1.	Die Kombination folgender Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> a) Laborchemische, klinische und morphologische Merkmale eines myelodysplastischen Syndroms (z.B. MDS mit refraktärer Anämie oder MDS mit refraktärer Anämie und Ringsideroblasten) jedoch weniger als 20% Blasten in Knochenmark und Blut b) Zeichen der Myeloproliferation, $> 600 \times 10^9/l$ Thrombozyten mit Vermehrung der Megakaryozyten, Leukozytenzahlen über $13.0 \times 10^9/l$, mit oder ohne Splenomegalie. c) Anamnestisch keine MPN, kein MDS, keine Zytostatika-Therapie oder Therapie mit Wachstumsfaktoren, die das Bild eines MDS oder einer MPN imitieren könnten. d) Kein Philadelphia Chromosom oder <i>BCR/ABL</i> - Fusionsgen, keine der folgenden Mutationen: <i>del(5q)</i>, <i>t(3;3)(q21;q26)</i>, <i>inv(3)(q21q26)</i>.
2.	Gemischt myeloproliferativ-myelodysplastische Merkmale, die keiner Kategorie von MPN oder MDS zugeschrieben werden können.
3.	Klinische Merkmale <ul style="list-style-type: none"> a) Merkmale von MDS und MPN b) Hepatomegalie c) Splenomegalie

Tab. 5: Diagnostische Kriterien für MDS/MPN-UC: nach [77]

Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine seltene hämatologische Neoplasie, in einer Serie wurden rückwirkend etwa 2% der ursprünglich als MDS klassifizierten Erkrankungen der Gruppe der MDS/MPN-UC zugeordnet. [77] Die Inzidenz ist bislang unbekannt und es wurde noch kein typischer zytogenetischer oder molekularer Marker gefunden. Szpurka et al. beschrieben 2006 in einer kleinen Serie, dass bei 6 von 9 Patienten, die Ringsideroblasten und Thrombozytose zeigten (RARS-T), eine Assoziation mit der *JAK2-V617F* -Mutation besteht. [78]

Laborchemisch zeigt sich meist eine Anämie, kombiniert mit dysmorphen Erythrozyten, Thrombozytose (meist $> 600 \times 10^9/l$) oder Leukozytose mit Werten $>13.0 \times 10^9/l$ (Tab. 5). Riesenthrombozyten, hypogranulierte Thrombozyten oder dysmorphe Leukozyten können ebenfalls vorkommen. [15, 28]

Das Knochenmark ist in erster Linie hyperzellulär, zeigt jedoch einen Blastenanteil von $< 20\%$, mindestens eine myeloische Zelllinie ist vermehrt und zeigt dysplastische Veränderungen. (siehe auch Abb. 8) [77] Die Prognose ist insgesamt ungünstig, mit einem medianen Überleben von 21 Monaten. [77]

1.3.3 Molekulare Pathogenese

In der Pathogenese chronisch myeloischer und myeloproliferativer Neoplasien sind derzeit krankheitsauslösende Mutationen in fünf Hauptklassen von Genen beschrieben. Dazu gehören Gene der Signaltransduktion und Mutationen in Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie zum Beispiel *JAK2*, *NRAS*, *KRAS* und *MPL*.

Eine bei hämatologischen Neoplasien neu entdeckte Gen-Klasse sind Spliceosom-assoziierte Gene, Mutationen in dieser Gruppe waren bislang bei keiner anderen Neoplasie gefunden worden. [2] Mutationen in Transkriptionsfaktoren und epigenetische Modifikatoren sind in der Pathogenese myeloproliferativer Erkrankungen ebenfalls beteiligt.

1.3.3.1 Gene der Signaltransduktion

Zahlreiche Kinasen, insbesondere Tyrosin-Kinasen, spielen in der Entstehung hämatologischer Neoplasien zentrale, teilweise definierende, Rollen. Beispielsweise verursacht das *BCR/ABL1*-Tyrosin-Kinase-Fusionsprotein, per definitionem, die chronisch myeloische Leukämie [79].

Im *JAK2*- (Janus kinase 2) Gen, das für eine zytoplasmatische Tyrosin-Kinase codiert, wurde 2005 eine für myeloproliferative Neoplasien erworbene, charakteristische Punktmutation, nämlich V617F, gefunden. Diese Mutation wurde nahezu zeitgleich in 4 Studien veröffentlicht [21, 80] und nahm danach in der Definition und dem Verständnis der Pathogenese der MPN eine zentrale Rolle ein. [16] [23]

Bei Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien wurde in diesen Studien am kurzen Arm von Chromosom 9 (Position 9p24 [81]) ein LOH (loss-of-heterozygosity) festgestellt. [82] An dieser Stelle befindet sich das *JAK2*-Gen. Bei genauerer Betrachtung stellte in diesem Gen im Kodon 617 eine G→T Transversion fest, wodurch der Genotyp *JAK2* -V617F entsteht. [82] Dieser Genotyp verursacht auf Proteinebene einen Austausch von Phenylalanin gegen Valin.

Diese Mutation ist bei chronisch myeloproliferativen Neoplasien die mit Abstand häufigste Mutation im *JAK2*-Gen. Der *JAK2*-V617F-Genotyp liegt bei 80-95 % der Patienten mit PV und ca. 50-60 % der Patienten mit ET und PMF [21, 80, 83] vor. Dadurch ergaben sich in der Diagnose und Therapie der chronisch myeloproliferativen Erkrankungen radikal neue Möglichkeiten. [84]

Janus-Kinasen nehmen an der Zytokin-Rezeptor-Signaltransduktion teil und leiten Zytokin-vermittelte Informationen über Signal Transducers and Activators of Transcription (*STAT*) weiter.

JAK2 leitet insbesondere Informationen von Typ I Zytokinen weiter, beispielsweise TPO (Thrombopoietin), GH (growth hormone), EPO (Erythropoietin) oder GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony stimulating factor) [85-88]

Durch Liganden-Bindung (z.B. EPO) werden zwei *JAK2*-Proteine so nahe zu einander gebracht, dass sie sich gegenseitig phosphorylieren können, wodurch *STAT*-Proteine ebenfalls phosphoryliert, somit aktiviert werden. Die aktivierten *STAT*-Proteine dimerisieren und wandern in den Nucleus, wo sie als Transkriptionsfaktoren regulatorisch auf Ziel-Gene einwirken. [84, 89]

Die Janus Kinase 2 wird in hämatopoetischen Zellen, sowie zahlreichen anderen Zellen exprimiert. *JAK2* nimmt in der Hämatopoese eine zentrale Rolle ein, so findet in *JAK2*-knock-out-Mäusen beispielsweise nur eine primitive Hämatopoese statt. [90] [91]

Janus-Kinasen haben zwei wichtige Domänen: JH1 und JH2. Während JH1 als katalytische Domäne die tatsächliche Kinase-Aktivität ausübt, scheint JH2 eine inhibitorische Wirkung auf JH1 zu haben. [84] [92]

Die Aminosäure 617 im *JAK2*-Protein, beim Wildtyp Valin, sowie die danebengelegenen Aminosäuren liegen im Bereich der JH2-Domäne des *JAK2*-Proteins. Durch die Mutation im JH2-Bereich wird die Aktivierungsschleife in JH1 daran gehindert seine aktivierte Konformation zu verlassen, was zu einer dauerhaften, Zytokin-unabhängigen Aktivierung führt. [81, 90]

Neben der typischen Mutation, *JAK2-V617F*, gibt es eine Reihe weiterer Mutationen im Exon 14, an den Positionen 611, 616, 620 und 627, Punktmutationen im Exon 12 (Positionen 537 bis 543) [93], sowie eine Reihe von *JAK2*-Fusionsgenen, wie *PCM1-JAK2*, *BCR-JAK2* und *TEL/ETV6-JAK2*. [93] Bei den Translokationen wird angenommen, dass das Fusionsgen zu einer Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von *JAK2* ohne Ligandenbindung führt, wodurch das Protein dauerhaft aktiviert wird. [93]

Ein kleinerer Teil der Patienten zeigt eine homozygote *JAK2-V617F*-Mutation. Diese scheint vor allem mit der Polyzythämia vera assoziiert zu sein. [80]

Wenn keine der bekannten *JAK2*-Mutationen (insbesondere keine *JAK2-V617F* oder *JAK2 Exon 12*-Mutation) gefunden werden kann, spielen *MPL*-Mutationen in der Diagnose einer MPN eine wichtige Rolle.

Die Mutationen wurden zuerst bei der familiären essentiellen Thrombozythämie entdeckt [94] und sind inzwischen in die Leitlinien zur Diagnose *JAK2-V617F* - negativer, *BCR-ABL1*-negativer chronisch myeloproliferativer Erkrankungen aufgenommen [38]. Insbesondere bei positiver Familienanamnese scheint die *MPL*-Mutation diagnostisch relevant zu sein [95].

Bei einem Teil der Patienten mit MPN sind aktivierende Mutationen in *MPL*, dem myeloproliferative leukemia virus Protein zu finden. Bei *MPL* handelt es sich um Produkt des Thrombopoietin Rezeptor Gens, typische Mutationen sind *W515L* und *W515K*. [95]

Diese Mutationen finden sich deutlich seltener als die *JAK2*-Mutationen, nur in etwa 5% der Fälle von primärer Myelofibrose und essentieller Thrombozythämie. [96] [97]. Die wichtigste Tatsache ist jedoch, dass sich *MPL*- und *JAK2*-Mutationen gegenseitig ausschließen, die Mutation somit bei einer PV de facto nicht vorkommt. [98]

Die *MPL*-Mutationsanalyse wird häufig in der Diagnostik *JAK2*- und *CALR*- negativer (s.u.) MPN benutzt, auch wenn sie (alleine) in der Regel keine genaue Differenzierung zwischen den Entitäten erlaubt. [96] [97]

Sie stellt einen wichtigen Bestandteil der molekularen Diagnostik der MPN dar, in den 2016 erneuerten WHO-Kriterien für ET und PMF wurde die *MPL*-Mutation als ein Hauptkriterium mit aufgenommen (siehe auch 1.3.4). [16]

1.3.3.2 Spliceosom-assoziierte Gene

Beim Splicing wird prä-mRNA in mRNA umgewandelt, welche anschließend weiter in Proteine übersetzt (= translatiert) wird. Die durch Transkription gebildete prä-mRNA enthält neben Exons noch Introns, diese werden beim Splicing entfernt. Die verbleibenden Exons werden zur fertigen mRNA zusammengesetzt. Der Splicingprozess wird vom Spliceosom katalysiert, einem aus fünf sogenannten snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins) bestehendem RNA-Komplex. Diese interagieren mit dem Intron. [99] [100] [101]

Man unterscheidet ein major- und minor-Spliceosom. Das major-Spliceosom besteht aus den snRNPs U1, U2, U4, U5 und U6. Diese wiederum bestehen aus

verschiedenen Untereinheiten, U2 beispielsweise aus SF3B1, SF3A1 und einer 12S RNA Einheit. [99] Dazu kommen eine Reihe von Proteinen, die zum „Zusammenbau“ des Spliceosoms notwendig sind, z.B. U2AF1 (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1) [102] , bzw. das Splicing unterstützen in dem Splicing-Faktoren zueinander gebracht werden oder mRNA aus dem Kern transportiert wird, wie z.B. SRSF2 (serine/arginine-rich splicing factor 2) [103]

Das Splicing stellt einen elementaren, stark regulierten zellulären Prozess dar, der wichtig für Gen-Expression und genetische Vielfalt ist. Über 90% des menschlichen Genoms unterliegen alternativen Splicing-Prozessen, was die Bildung verschiedener Protein-Isoformen, mit unterschiedlichen biologischen Funktionen, bei einer nur beschränkten Anzahl an Genen, ermöglicht. [100] [101]

Als „Krebs-spezifisches Splicing“ (cancer specific splicing), bezeichnet man Splicingmuster, die durch spezifische Proteinsynthese Wachstum und Überleben der malignen Zellen begünstigen und entsprechend typischerweise bei Krebserkrankungen vorkommen. [104] [105]

Durch Sequenzierung des gesamten Exoms (whole exome-sequencing) fielen solche Mutationen in Genen der Splicing-Maschinerie bei myelodysplastischen Syndromen auf. [106]

In einer 2011 von Yoshida et al. publizierten Studie waren, je nach Entität, einer oder mehrere Splicingfaktoren bei 45% bis 85% der myelodysplastischen Syndrome mutiert. [106]

Bei MDS sind vor allem die Faktoren *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF35* und *ZRSR2* verändert. Diese gehören alle zum so genannten E/A-Splicing - Komplex, der, pathogenetisch in myeloischen Neoplasien, insbesondere myelodysplastischen Syndromen, eine zentrale Rolle einzunehmen scheint, da unter der Vielzahl von Splicing-Komplexen typischerweise eben dieser Komplex spezifisch mutiert ist. [106]

Beim myelodysplastischen Syndrom oder MDS/MPN mit Ringsideroblasten aber auch bei chronisch lymphatischer Leukämie kommt die *SF3B1* Mutation vor, *SRSF2* Mutationen bei der CMML und fortgeschrittenen Formen des MDS, fortgeschrittenen Formen der systemischen Mastozytose oder MDS vom Typ der refraktären Anämie mit Blastenexzess. [107] [108] [109] [110]

SRSF2, gehört zu der Serin/Arginin-reichen Proteinfamilie. Der *serine/arginine-rich splicing factor 2* ist an 17q25.1 lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle in der Aus-

wahl der Stelle des Splicings, dem Zusammenbau des Splicosomes und in der Regulation sowohl des alternativen als auch des regulären Splicings. [111]

Die für MPN und MDS typischen Mutationen in *SRSF2* befinden sich in der Regel in der Hotspot-Region im Kodon 95, das heißt der Splicosome Komplex ist am oder um das Kodon, das für das Prolin an Position 95 codiert, mutiert. Häufige Mutationen sind beispielsweise p.P95H (47% der *SRSF2*-Punktmutationen bei der CMML [112]), p.P95L (32% der *SRSF2*-Punktmutationen bei der CMML [112]) und p.P95R (19,3% der *SRSF2*-Punktmutationen bei der CMML [112]).

Die Pathogenese dieser Mutationen ist bislang unbekannt, Hypothesen postulieren, basierend auf in vitro und in silico-Analysen, dass die Mutationen sowohl RNA-Bindung als auch die so genannten nuclear speckles (Ansammlungen von Faktoren, die für das Splicing benötigt werden) beeinflussen. [113]

In der Progression chronisch myeloproliferativer Neoplasien spielen Mutationen in *SRSF2* eine wichtige Rolle. Bei den „klassischen MPN“ kommen Splicosome-assoziierte Mutationen bei ET und PMF vor, bei der PV nicht. [114] [115] Bei diesen Erkrankungen sind *SRSF2*-Mutationen mit *IDH1/2* -Mutationen und einer insgesamt schlechteren Prognose assoziiert. [116] [115] [117]

18,9% der Fälle, bei denen eine leukämische Transformation aus MPN stattfindet, sind *SRSF2* mutiert. Diese Zahl übersteigt die bisher gefundenen Mutationen, insbesondere *IDH1/2* (4%-13%) und *TP53* (11,6%). [118] [119]

SRSF2 Mutationen finden sich hingegen selten in einer LT aus MDS oder in einer primären AML (< 5%) [106]

Bei der primären Myelofibrose kommen *SRSF2*-Mutationen in etwas höheren Prozentzahlen (ca. 17%) vor, es wurde hier im Verlauf eine deutlich ungünstigere Prognose und ein kürzeres Gesamtüberleben, sowie ein kürzeres Leukämie-freies Überleben gesehen. [117] [116]

Im Gegensatz zu anderen bekannten Mutationen bei MPN, wie zum Beispiel *JAK2* und *TET2* hat der *SRSF2* Mutationsstatus, selbst bei schon erfolgter leukämischer Progression, einen entscheidenden negativen Einfluss auf die Prognose. Zhang et al. zeigten 2012, dass Patienten mit leukämischer Transformation einer MPN mit *SRSF2*-Wildtyp eine deutlich bessere Prognose als Patienten mit mutiertem *SRSF2* (Gesamtüberleben: 307 Tage versus 117 Tage) haben, unabhängig von Alter und zytogenetischem Risiko. [118]

Die Mutation in *SRSF2* könnte bei den MPN zur Risikostratifizierung für spätere leukämische Transformationen oder einen Progress hinzugezogen werden, sollte sie bei den übrigen MPN, wie bei der PMF, ebenfalls eine frühe somatische Mutation darstellen. [117]

Als schnelles Screening-Tool zur Analyse einer *SRSF2*-Mutation eignet sich die Untersuchung mittels Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus. Hiermit lassen sich die meisten *SRSF2*-Mutationen detektieren (abgesehen von der seltenen p.P95A-Mutation). [108]

1.3.3.3 Epigenetische Modifikatoren

In der Entstehung und Progression der MPN spielen Veränderungen auf epigenetischer Ebene im Rahmen der DNA-Methylierung ebenfalls eine Rolle.

Zu den Vertretern, die sowohl in der Pathogenese, als auch in der Progression chronisch myeloproliferativer Erkrankungen relevant sind, gehören *TET2* [120], *IDH1* und *IDH2* [121], sowie *DNMT3A* [122].

Als Teil des Citrat Zyklus katalysieren *IDH1* und *IDH2* in Zytosol, Peroxysomen und Mitochondrien die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat.

Mutationen in diesen Enzymen führen zur einer zellulären α -Ketoglutarat-Verarmung und Aktivierung des nachgeschalteten onkogenen HIF-1 α Signalwegs. [123], sowie zu einer Überaktivierung der NADPH-abhängigen Reduktion von α -Ketoglutarat zum (R)- Enantiomer von 2-Hydroxyglutarat (2-HG). Sowohl in Gliomen, als auch in akuten Leukämien wurde der Akkumulation von 2-HG eine onkogene Rolle zugeschrieben. [121] [122] [124] [125] [126] Auch in der Progression von MPN spielen Störungen im Isocitrat-Dehydrogenase-Stoffwechsel eine Rolle, 21% der Fälle einer akute Leukämie aus PV oder PMF zeigen eine Mutation in der IDH. [121] Bei Patienten mit de-novo AML oder nicht progredienter MPN wurden diese Mutationen nicht gefunden. [121] Die Mutationen stellen innerhalb der Krankheitsentstehung ein frühes genetisches Ereignis dar und begünstigen so die Progression myeloproliferativer Neoplasien. [121]

Sehr frühe somatische Mutationen in der hämatopoetischen Knochenmarkstammzelle bei chronisch myeloproliferativen Neoplasien stellen *TET2*-Mutationen dar, diese treten teilweise vor *JAK2*-Mutationen auf. [120]

Diese Mutation findet sich in rund 15 % aller myeloischen Neoplasien, unter anderem MPN (12%), MDS (19%), sekundärer AML (24%) und CMML (22%). [120]

Ursächlich handelt es sich um eine Deletion auf Chromosom 4q24, welche zu einer Dysfunktion des Tumor-Suppressor *TET2* führt. [120]

Die die Chromatin-Struktur verändernden, Mutationen in *EZH2* [127] und *ASXL1* wurden ebenfalls bei chronisch myeloproliferativen Erkrankungen gefunden, die pathogenetische Relevanz dieser Mutationen ist noch weitestgehend unklar, zumal sie nur bei einem kleinen Anteil der Patienten gefunden wird. [128]

1.3.3.4 Mutationen in Transkriptionsfaktoren

Schon längere Zeit ist bekannt, dass beim therapieassoziierten myelodysplastischen Syndrom und bei der akuten myeloischen Leukämie nach Strahlenexposition oder zytoreduktiver Therapie, Mutationen im *AML1/RUNX1*-Gen eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen. [129]

Ding et al. untersuchten 2009 417 Patienten mit MPN, von denen 4,3 % (n=14) einen Progress zu einer akuten Leukämie zeigten. [130] Von diesen 14 Patienten zeigten 5 eine Punktmutation im *AML1/RUNX1*-Gen (*AML1 D171N Mutant*). Diese Patienten hatten zuvor eine zytoreduktive Therapie durchlaufen, was die Schlussfolgerung zuließ, dass es sich hierbei um eine Therapienebenwirkung handelt. [130]

Bei einer signifikanten Anzahl von Patienten die eine leukämische Transformation (LT) aus einer MPN erlebt haben, wurde ein loss of heterozygosity (LOH) in Form einer Deletion an Chromosom 7p gefunden, was sich als Genlocus des *IKZF1* Gens herausstellte. [131] Das *IKZF1*-Gen kodiert für den Transkriptionsfaktor *Ikaros*, der eine zentrale Rolle in der Regulation der Hämatopoese spielt, ein komplettes oder partielles Ausschalten dieses Transkriptionsfaktors führt zu einer Vielzahl hämatologischer Erkrankungen, wie T- und B-Zell Leukämien und Lymphomen. [132] [133] [134]

Auch in der Progression von chronisch myeloproliferativen Erkrankungen spielt Ikaros eine Rolle. 21% der Patienten mit LT versus 0,3% der Patienten in der chronischen Phase einer MPN zeigten eine Deletion im *IKZF1*-Gen. [131]

In der *de novo*-AML spielt diese Deletion keine Rolle. [135]

Die genaue Rolle dieser Mutation bleibt jedoch noch unklar, die Haploinsuffizienz scheint jedoch ein recht spätes Ereignis im Krankheitsverlauf zu sein, welches zu einer verstärkten Anfälligkeit der hämatopoetischen Stammzellen für eine leukämische Transformation führen könnte. Chromosomale Instabilität könnte hierfür der

Grund sein, nahezu alle Patienten mit Deletion im *IKZF1*-Gen zeigen multiple weitere zytogenetische Aberrationen. [131]

Die deutliche Assoziation von *JAK2*- Mutationen mit Defekten im *IKZF1*-Gen bei kindlicher ALL [136], legt eine direkte Beteiligung von *Ikaros* im *JAK-STAT-pathway* und somit eine Begünstigung der Leukämogenese nahe. *JAK2*-Mutationen, wie zum Beispiel *JAK2* Fusionen (*TEL-JAK2*) [137], führen zu einer dramatischen Steigerung der Kinase-Aktivität und sind somit in der Krankheitsentstehung wesentlich beteiligt. Das lässt den Schluss zu, dass insbesondere bei *JAK2*-mutierten chronisch myeloproliferativen Erkrankungen *Ikaros* in der Progression eine direkte Rolle durch eine zusätzliche Aktivierung des *JAK-STAT*-Pathways spielt. [131]

1.3.3.5 Tumorsuppressorgene

Als Antwort auf zellulären Stress wird häufig der p53-Signalweg aktiviert, was dem *TP53*-Gen erlaubt Transkriptionsprogramme koordiniert zu hemmen, beispielsweise um unkontrolliertes Zell-, oder Tumorwachstum nach genetischer Schädigung zu vermindern bzw. zu verhindern. [138]

Abgeschwächte Funktion oder Verlust von p53 ist ein klassischer Weg der Kanzerogenese über einen Verlust eines Tumor-Suppressors. Dies geschieht in 75% der Fälle der Tumorentstehung über p53, in den restlichen Fällen erwirbt das Protein über gain-of-function Mutationen onkogene Eigenschaften. [139]

p53 ist das häufigste in Krebserkrankungen mutierte Protein, mit inzwischen über 25000 bekannten Mutationen [140].

Patienten mit einer leukämischen Transformation einer MPN zeigten in einer Analyse des gesamten Genoms auf SNP (single-nucleotide polymorphisms) zu fast 20% eine auffällige Amplifikation von Chromosom 1q. Dem gegenüber standen in der Kontrollgruppe, MPN in chronischer Phase, nur 0,32% Amplifikationen in dieser Region. [141]

Weitere Analysen zeigten, dass diese Genregion *MDM4* beinhaltet.

MDM4 ist als starker Inhibitor von *TP53* in einer Vielzahl von Krebserkrankungen, beispielsweise dem Retinoblastom, amplifiziert. Dies führt zu einer übermäßigen Hemmung von *TP53* und somit zu einer Enthemmung des Zellzyklus. [142]

Bei der Sequenzierung des *TP53* Gens fanden Harutyunyan et al. bei 27.3% der Patienten mit leukämischer Transformation aus MPN eine Mutation in diesem Gen, wobei in den meisten Fällen (5 von 6 Patienten) homozygote Mutationen bzw.,

bedingt durch uniparentale Disomie, beide Allele mutiert vorlagen. [141] Bei den Patienten mit MPN in chronischer Phase fanden Harutyunyan et al. in nur 3.1% eine *TP53*-Mutation. Leider waren in dieser Studie bei lediglich 2 Patienten Verläufe dokumentiert (chronische vs. Blastenphase), sodass über den Verlauf nur eingeschränkte Aussagen möglich sind.

Neuere Studien mit größeren Patientenzahlen zeigten, dass *TP53* insbesondere im Stadium der LT mutiert vorliegt, bzw. die Mutation eine leukämische Transformation hervorruft [118] [143]

Im Mausmodell konnte in neueren Studien gezeigt werden, dass durch Ausschalten von *TP53* die leukämische Transformation einer MPN (in der Studie mit der PV untersucht) ausgelöst werden kann. [144]

Beer et al. zeigten, dass *TP53*-Mutationen eher bei einem *JAK2*-Wildtyp zu einer leukämischen Transformation führen und dann mit dem Ausbruch der Leukämie vergesellschaftet sind. [145] *TP53*-Mutationen kommen häufiger bei post-PV AML und post-ET AML vor als bei einer sekundären akuten Leukämie aus einer PMF. [143]

Nakatake et al. beschrieben einen negativ-dominanten Einfluss von *JAK2*-V617F auf *p53* durch die Steigerung der *MDM2*-Expression. Darüber führt *JAK2*-V617F zu einer funktionellen Inaktivierung von *p53* und wurde so Studie als potentieller Risikofaktor für Progression der Erkrankung genannt [146]

So wurde gezeigt, dass sowohl eine funktionelle Inaktivierung von *p53*, z.B über *JAK2*-V617F oder *MDM4*, als auch eine Mutation im *TP53*-Gen selbst die Progression einer chronisch myeloproliferativen Erkrankung begünstigen, wenn nicht sogar auslösen können.

Eine valide und schnelle Methode zur *TP53*-Mutationsanalyse am Knochenmarkreperat stellt die immunhistochemische Analyse von *p53*, beispielsweise mit *p53*-DO1- oder *p53*-DO7-Antikörpern dar. Eine starke *p53*-Oberflächenexpression korreliert hierbei mit einer *TP53*-Mutation. [147]

1.3.3.6 *CALR*-Mutationen

CALR, *Calreticulin*, ist sowohl als Chaperon im endoplasmatischen Retikulum (ER) als eine Art „Qualitätssicherung“ für die korrekte Faltung von Glykoproteinen verantwortlich [148], als auch in der Calciumhomöostase beteiligt. [149]

Außerhalb des endoplasmatischen Retikulums spielt es als potentiell Onkogen in der zellulären Stress-Antwort [148], in immunmodulatorischen Vorgängen und Zelladhäsion und -migration eine Rolle [150] [151] [152].

Eine *CALR*-Überexpression ist mit zahlreichen malignen Erkrankungen, wie beispielsweise dem hepatozellulären Karzinom (HCC) [153] und der akuten myeloischen Leukämie assoziiert. [154] [155]

Jedoch wurde, außer bei chronisch myeloproliferativen Erkrankungen, bislang keine deaktivierende, somatische Mutation von *CALR* oder anderen endoplasmatischen Chaperonen in der Krebsentstehung beschrieben [156].

Nangalia et al. beschrieben 2013 bei Patienten mit *MPN* 19 verschiedene *CALR*-Mutationen, die durch Leserasterverschiebung alle das C-terminale Ende des Proteins beeinflussen. [156]

In der Studie von Nangalia et al. zeigten bei chronisch myeloproliferativen Erkrankungen, die *JAK2-V617F*-negativ und *MPL-WT* waren, 70% der untersuchten Proben eine der 19 bekannten *CALR*-Mutationen. (71% der Patienten mit ET, 56% der PMF-Fälle, 8% der Fälle mit MDS, sowie 86% der Fälle, die einen Progress einer ET zu einer Myelofibrose gezeigt haben).

In den Kontrollgruppen, *JAK2-V617F*- und *MPL*-Mutationsträgern, sowie Zellen aus Lymphomen und soliden Tumoren, wurden keine *CALR*-Mutationen gefunden.

Der *CALR*-Mutationsstatus wird als diagnostisches Werkzeug zur Diagnose, insbesondere *JAK2-V617F*-negativer chronisch myeloproliferativer Erkrankungen genutzt und hat Einzug in die WHO-Kriterien für ET und PMF gefunden. [156] [38] [16]

1.3.4 WHO-Kriterien zur Diagnose einer MPN

Die Tabellen 6,7 und 8 stellen die WHO-Kriterien aus dem Jahr 2016 zur Diagnose der drei klassischen MPN zusammen. [10]

WHO-Kriterien für eine Polyzythämia vera (PV)

Die Diagnose erfordert <u>alle</u> Hauptkriterien oder <u>zwei</u> Hauptkriterien <u>plus</u> das Nebenkriterium:	
<u>Hauptkriterien</u>	
1	Hämoglobin > 16.5 g/dL bei Männern, 16.0 g/dL bei Frauen oder Hämatokrit > 49% bei Männern, > 48% bei Frauen oder Erhöhung der Erythrozytenmasse um > 25% über der Norm
2	Hyperzelluläres Knochenmark mit Panmyelose: gesteigerte erythrozytäre, granulozytäre und pleomorphe, reife megakaryozytäre Proliferation ¹
3	JAK2 V617F oder JAK2 Exon 12 Mutation
<u>Nebenkriterium</u>	
1	Erniedrigter EPO-Spiegel

¹ auf eine Knochenmarkbiopsie kann unter Umständen verzichtet werden, wenn Hauptkriterium 1 und 3 sowie das Nebenkriterium vorliegen, eine (bei rund 20% der Patienten schon zu Beginn vorliegende) Myelofibrose kann dann jedoch nicht festgestellt werden. Die initiale Knochenmarkfibrose stellt wahrscheinlich einen Risikofaktor für eine schnellere Progression zur post-PV Myelofibrose dar.

WHO-Kriterien für eine essentielle Thrombozythämie (ET)

Die Diagnose erfordert <u>alle</u> 4 Hauptkriterien oder <u>die ersten 3</u> Hauptkriterien <u>plus</u> das Nebenkriterium:	
<u>Hauptkriterien</u>	
1	Thrombozytenzahl $\geq 450 \times 10^9/L$
2	Das Knochenmark zeigt im Wesentlichen eine Vermehrung der megakaryozytären Reihe mit einer gesteigerten Anzahl an vergrößerten, reifen Megakaryozyten. Keine wesentliche Vermehrung oder Linksverschiebung der Granulopoese und/oder Erythropoese
3	Kriterien für PV, PMF, BCR-ABL1-positive CML, MDS oder andere myeloische Neoplasie treffen nicht zu
4	Nachweis einer JAK2-, CALR- oder MPL- Mutation
<u>Nebenkriterium</u>	
1	Nachweis eines anderen klonalen Markers oder Ausschluss einer reaktiven Thrombozytose ¹

¹ Ursachen einer reaktiven Thrombozytose: Eisenmangel, Splenektomie, chirurgische Eingriffe, Entzündungen, metastasierte Malignome, lymphoproliferative Erkrankungen. Das Vorliegen einer dieser Ursachen schließt eine ET jedoch nicht abschließend aus.

WHO-Kriterien für die primäre Myelofibrose (PMF)

<u>Präfibrotisches Stadium</u>
Die Diagnose erfordert <u>alle 3 Haupt- und ein Nebenkriterium</u>
<u>Hauptkriterien</u> <ol style="list-style-type: none">1 In der Knochenmarkhistologie Proliferation atypischer Megakaryozyten mit einer Retikulin- oder Kollagenfaserfibrose < Grad 1¹, gesteigerte Knochenmarkzellulartät, meist durch gesteigerte Granulopoese und verminderte Erythropoese2 Kriterien für PV, ET, <i>BCR-ABL1</i>-positive/negative CML, MDS oder andere myeloische Neoplasie treffen nicht zu3 Nachweis einer <i>JAK2</i>-, <i>CALR</i>- oder <i>MPL</i>-Mutation eines anderen klonalen Markers² oder Ausschluss einer reaktiven Knochenmarkfibrose³
<u>Nebenkriterien</u> (in zwei konsekutiven Untersuchungen bestimmt) <ol style="list-style-type: none">1 Anämie, die nicht durch andere Ursachen erklärt werden kann2 Leukozytose > 11000/μl3 Palpable Splenomegalie4 Erhöhte LDH im Serum
<u>Fibrotisches Stadium</u>
Die Diagnose erfordert <u>alle 3 Haupt- und ein Nebenkriterium</u>
<u>Hauptkriterien</u> <ol style="list-style-type: none">1 In der Knochenmarkhistologie Proliferation atypischer Megakaryozyten mit Retikulin- oder Kollagenfaserfibrose Grad 2 oder 3¹, gesteigerte Knochenmarkzellulartät meist durch gesteigerte Granulopoese und verminderte Erythropoese2 Kriterien für PV, ET, <i>BCR-ABL1</i>-positive/negative CML, MDS oder andere myeloische Neoplasie treffen nicht zu3 Nachweis einer <i>JAK2</i>-, <i>CALR</i>- oder <i>MPL</i>-Mutation eines anderen klonalen Markers² oder Ausschluss einer reaktiven Knochenmarkfibrose³
<u>Nebenkriterien</u> (in zwei konsekutiven Untersuchungen bestimmt) <ol style="list-style-type: none">1 Anämie, die nicht durch andere Ursachen erklärt werden kann2 Leukozytose > 11000/μl3 Palpable Splenomegalie4 Erhöhte LDH im Serum5 Leukoerythroblastisches Blutbild

¹ Graduierung der Knochenmarkfibrose: siehe Tabelle 4

² häufig *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*

³ Ursachen einer sekundären Knochenmarkfibrose: Infektionen, Autoimmunerkrankungen oder andere chronische entzündliche Erkrankungen, Haarzelleukämie und andere lymphatische Neoplasien, metastasierte Malignome, toxische Markschäden. Auch hier schließt das Vorliegen einer möglichen sekundären Ursache die primäre Myelofibrose nicht abschließend aus.

Tab. 6, 7 & 8: WHO-Kriterien zur Diagnose einer MPN; nach [10]

1.4 Progression

Myeloproliferative Erkrankungen verlaufen häufig biphasisch. Nach einer teils jahrelangen stabilen Phase, die durch eine Überproduktion einer oder mehrerer reifer Zelllinien gekennzeichnet ist, durchläuft ein variabler Anteil der MPN einen Progress zu hämatopoetischer Insuffizienz mit uni- oder biliniärer Insuffizienz oder Panzytopenie. Diese Insuffizienz kann durch Entwicklung einer Myelofibrose, eines myelodysplastischen Syndroms, einen Progress in eine akute Leukämie oder durch eine Kombination dieser verursacht sein. Den Zeitraum zwischen stabiler Phase und der terminalen Phase nennt man Akzeleration. Eine Progression tritt meist 10-15 Jahre nach Erstdiagnose ein. [157]

1.4.1 Fibrose

Myelofibrose und extramedulläre Blutbildung sind Zeichen der Progression einer PV, diese Phase wurde früher auch spent phase genannt. [158] Histologisch zeigt sich eine Reduktion von Granulopoese und Erythropoese, was zur Normalisierung des Hb-Werts führen kann. Durch die zunehmende Fibrose, kommt es zu extramedullärer Blutbildung mit konsekutiver Splenomegalie. [158] Nach 10-jähriger Erkrankungsdauer betrifft dies rund 20% der Patienten mit Polyzythämia vera. [159] Patienten mit ET hingegen zeigen ausgesprochen selten eine relevante Markfibrose, mit weniger als 1% nach 10 Jahren und weniger als 10% nach 15 Jahren Erkrankungsdauer. [160]

Zwar zeigen die Megakaryozyten je nach ursprünglicher Erkrankung in der Regel verschiedene Morphologien und zytogenetische Auffälligkeiten, zur Diagnose einer post-PV- oder post-ET-Myelofibrose (post-PV-MF/post-ET-MF) ist eine vorherige Diagnose eben dieser Erkrankung notwendig (Tab. 9 & 10. bzw. Tab. 6 & 7). [161]

Obwohl post-PV Myelofibrose und die PMF im fibrotischen Stadium die Myelofibrose als deutliches gemeinsames Merkmal haben, unterscheiden sie sich in ihrer Pathogenese erheblich. Während die post-PV Myelofibrose die späte Phase einer klonalen, myeloischen Erkrankung ist, deren zunehmende Anzahl an Mutationen die Erkrankung von einer hoch-proliferativen Erkrankung, zu einem Syndrom mit Knochenmarkversagen wandeln, hat die PMF dieses Potential meist von Beginn an und entwickelt sich innerhalb eines kürzeren Zeitraums in Richtung dieses Endstadiums. [157] Entsprechend zeigt die Polyzythämia vera im fibrotischen Stadium eine deutlich größere Anzahl somatischer Mutationen und komplexer Karyotypen. [161] [162]

Die Diagnose einer post-ET oder post-PV Myelofibrose erfolgt anhand der Kriterien, die von der International Working Group for MPN Research and Treatment (IWG-MRT) festgelegt wurden (Tab. 9 und Tab. 10) [163] Zur Graduierung der Fibrose siehe Tab. 4.

Für die Diagnose einer *post-ET* Myelofibrose bzw. einer *post-PV* Myelofibrose müssen beide Hauptkriterien und je zwei Nebenkriterien erfüllt sein.

Diagnostische Kriterien für eine post-PV Myelofibrose	
Hauptkriterien	1 Vorangegangene Diagnose einer PV entsprechend der WHO-Kriterien (s.o.)
	2 Knochenmarkfibrose Grad 2–3
Nebenkriterien	1 Anämie oder stabiler HB ohne zytoreduktive Therapie oder Aderlass
	2 Leukoerythroblastisches Blutbild
	3 Zunahme der Splenomegalie um ≥ 5 cm (tastbar unter dem Rippenbogen) oder neu auftretende Splenomegalie
	4 ≥ 1 der folgenden B - Symptome: $> 10\%$ Gewichtsverlust in 6 Monaten, Nachtschweiß, Fieber ($>37.5^{\circ}\text{C}$)

Tab. 9: Diagnostische Kriterien für eine post-PV Myelofibrose nach [163]

Diagnostische Kriterien für eine post-ET Myelofibrose	
Hauptkriterien	1 Vorangegangene Diagnose einer ET entsprechend der WHO-Kriterien (s.o.)
	2 Knochenmarkfibrose Grad 2–3
Nebenkriterien	1 Anämie und / oder ein Absinken des Hb-Werts von ≥ 2 g/dL
	2 Leukoerythroblastisches Blutbild
	3 Zunahme der Splenomegalie um ≥ 5 cm (tastbar unter dem Rippenbogen) oder neu auftretende Splenomegalie
	4 Erhöhte LDH
	5 ≥ 1 der folgenden B - Symptome: $> 10\%$ Gewichtsverlust in 6 Monaten, Nachtschweiß, Fieber ($> 37.5^{\circ}\text{C}$)

Tab. 10: Diagnostische Kriterien für eine post-ET Myelofibrose nach [163]

1.4.2 Akzeleration

Zeichen der Akzeleration sind eine Zunahme von Blasten im peripheren Blut und Knochenmark, deren Anzahl $> 10\%$ und $< 20\%$ beträgt und/oder eine zunehmende Dysplasie der Hämatopoese. Es zeigt sich histologisch das Bild eines MDS mit Fibrose. [157] Klinisch liegt meist eine uni- oder bilinäre Zytopenie, gelegentlich auch eine Panzytopenie vor. Die Entwicklung zunehmender Dysplasien charakterisiert wahrscheinlich einen der natürlichen Verläufe myeloproliferativer Erkrankungen. Einige Studien sehen eine Assoziation von Dysplasie mit vorangegangener Therapie mit Alkylanzien und P^{32} , diese Akzeleration kommt jedoch auch bei einer Vielzahl von Patienten ohne vorangegangene Therapie vor. [164]

1.4.3 Leukämische Transformation

Die Entwicklung einer sog. Blasten-Phase, also die Transformation zu einer akuten Leukämie, ist durch $> 20\%$ Blasten in Knochenmark oder Blut definiert und tritt insgesamt seltener ein als die chronische Entwicklung zu Fibrose oder Dysplasie. [153] Durch die Infiltration im Knochenmark werden die Zellen der Hämatopoese mehr und mehr verdrängt, mit daraus resultierender Anämie und Thrombozytopenie. [157, 165] Neben der leukämischen Transformation kann es sehr selten auch zu einer extramedullären Progression der Erkrankung mit Lymphknoten- Leber- oder Milzinfiltration durch die leukämischen Blasten oder zur Ausbildung von Chlo-

romen (= extramedulläre, solide Ansammlungen von leukämischen Blasten, auch myeloisches Sarkom genannt) kommen. [166] [157, 165]

Das höchste Risiko einer Transformation zur Leukämie, mit 8%-10% nach 10 Jahren, haben Patienten mit primärer Myelofibrose, gefolgt von Patienten mit PV (5%-10%). Ein insgesamt geringes Risiko haben an essentieller Thrombozythämie Erkrankte mit 2%-5% nach 10 Jahren Erkrankungsdauer. [167] Das Risiko einer LT bei post-ET oder post-PV Myelofibrose entspricht in etwa dem Risiko einer LT bei PMF, in etwa 10% [168]

Auch hier zeigte sich die Entwicklung mit vorangegangener Therapie mit Alkylanzien und P³² assoziiert, jedoch haben ca. 25% der Patienten mit MPN in der Blastenphase zuvor diese Therapien nicht erhalten. [169, 170] Dies legt nahe, dass eine maligne Transformation, ebenso wie Fibrose und Dysplasie, einen der möglichen natürlichen Verläufe der Erkrankung darstellt. [171] [165]

Das entspricht der Hypothese, dass, ähnlich der sogenannten Richter-Transformation bei chronisch lymphatischer Leukämie [172] oder dem Übergang zwischen chronischer und blastärer Phase der CML, somatische Mutationen in Schlüsselgenen die Blastenkrise auslösen. [173] [174]

In der Blastenkrise einer MPN entsteht in der Regel eine akute myeloische Leukämie (AML), die Entwicklung einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) hingegen ist eine Rarität [175]. Im Fall einer ALL aus MPN ist eher von einer Zweitneoplasie auszugehen. [175]

Die häufigste Untergruppe einer myeloischen Leukämie nach Transformation aus einer Myelofibrose (inkl. post-PV und post-ET MF) ist mit rund 25% die Akute megakaryoblastäre Leukämie (AML FAB-M7), gefolgt von der AML FAB-M0 (22 %) und FAB-M2 (18%) (Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung & mit Ausreifung). [176] [170] [165]

Eine leukämische Transformation aus myeloproliferativer Neoplasie hat eine wesentlich schlechtere Prognose, als eine de-novo-AML, lässt sich entsprechend schwerer therapieren, bzw. zeigt sich häufig therapierefraktär. [170] [165]

1.4.4 Knochenmarkbefunde der MPN in fortgeschrittenen Stadien: Fibrose, Dysplasie, Leukämie

Fortgeschrittene oder terminale Formen der Polyzythämie sind gekennzeichnet durch eine deutliche Linksverschiebung der neutrophilen Granulopoese zusammen mit einer Reduktion der kernhaltigen erythropoetischen Vorläuferzellen. Eine Knochenmarkfibrose zeigt sich durch eine Verdickung der Sinus-Wände, die sogenannte Sinus-Wand-Sklerose. [68]

Die fortgeschrittene Fibrose zeigt ein engmaschiges Retikulिन-Netz und grobkörnige Kollagen-Bündel, die sich über das gesamte Knochenmark ausbreiten. (Abb.6) Kollagen- und Retikulinfibrose sind in der Regel durch verstärkte Proliferation unreifer und atypischer Megakaryozyten begleitet, was der Akzeleration der Erkrankung entspricht. [68] Klinisch zeigt sich ein solches Stadium in der Regel durch eine Normalisierung des Hb-Werts und eine zunehmende Splenomegalie, häufig durch B-Symptome begleitet (siehe auch post-PV Myelofibrose). [177].

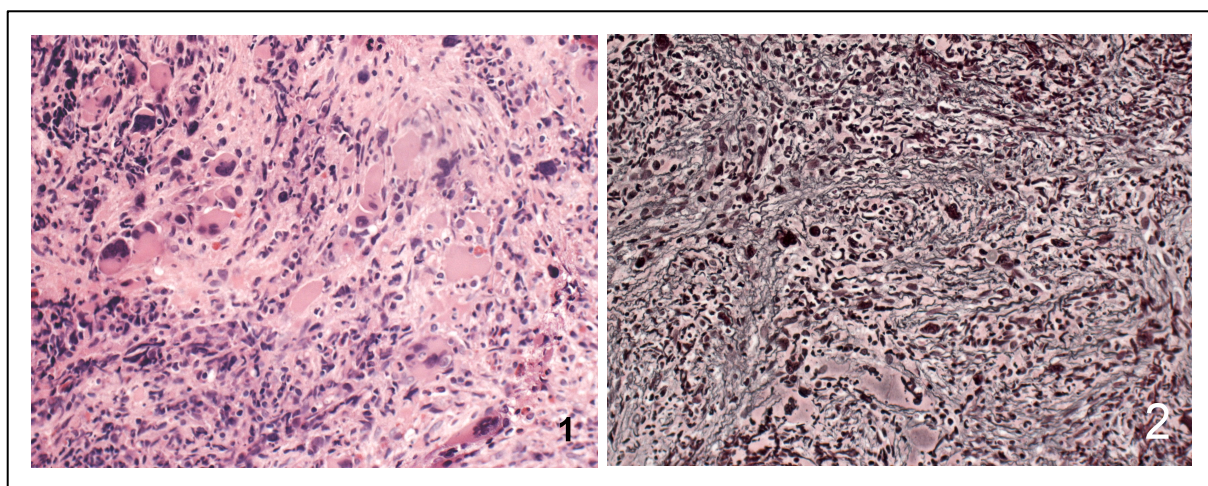


Abb. 6: Exemplarische Darstellung: Post-PV Myelofibrose (Patient 62)

1. Insgesamt deutlich vermindert Erythropoese, deutlich vermehrte Megakaryozyten, diese teils geclustert liegend, teils hypolobuliert, dysplastisch. Die Granulopoese reduziert mit geringer Ausreifung.
2. In der Silber-Färbung zeigt sich eine deutliche Fibrose mit diffuser und dichter Retikulinfaservermehrung mit groben Kollagenbündeln.

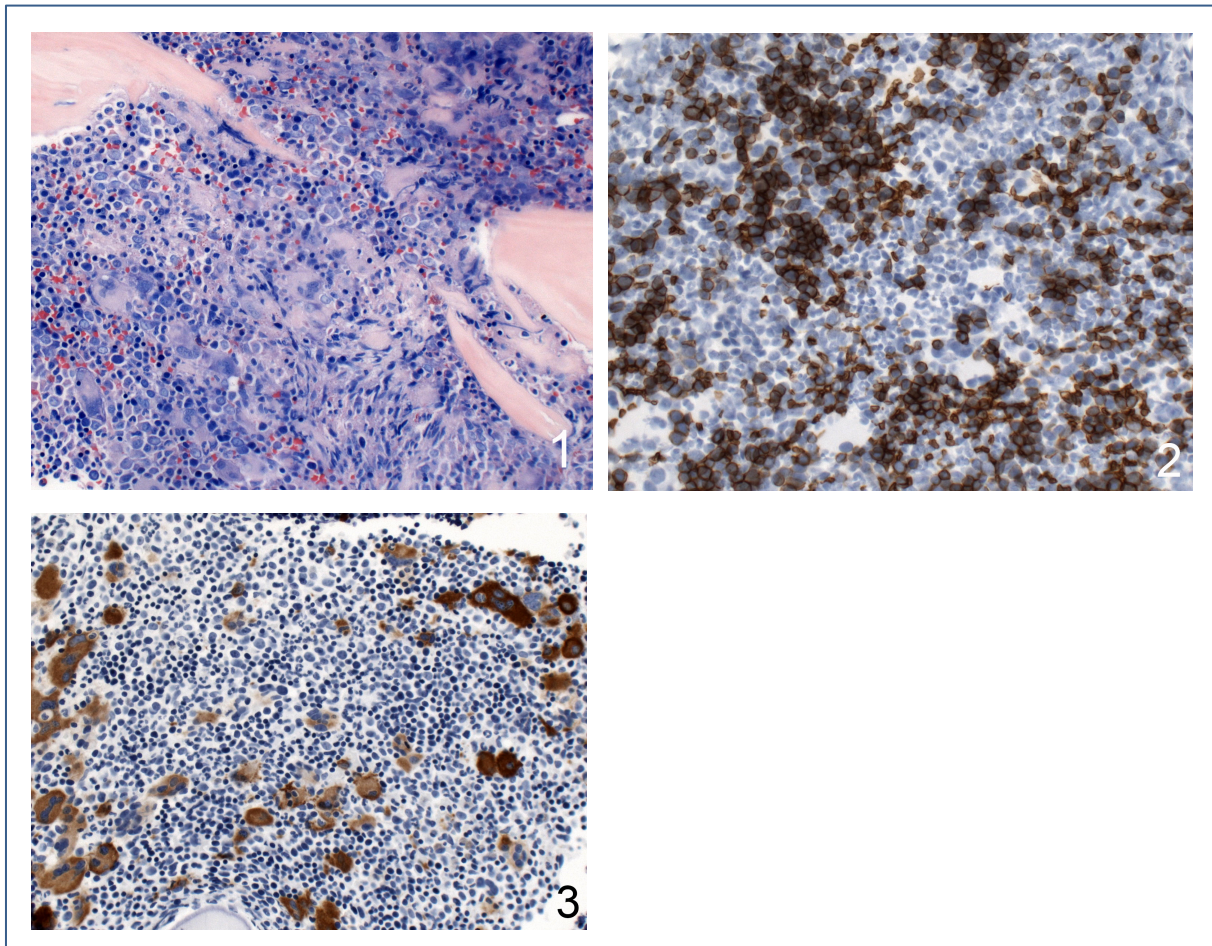


Abb. 7: Exemplarische Darstellung: Akzeleration einer PV zu einem sekundären MDS (Patient 137)

Sekundäres myelodysplastisches Syndrom vom Typ der refraktären Zytopenie mit trilineärer Dysplasie (RCMD) nach einer Polyzythämia vera:

1. Deutlich hyperzelluläres Knochenmark (Zellularität > 90 %). Die Granulopoese ist gesteigert und linksverschoben. Keine Vermehrung von Speichereisen, keine Faservermehrung.
2. Die Glykophorin A - Färbung zeigt die deutlich gesteigerte und dysplastische Erythropoese.
3. Die Färbung gegen CD61 zeigt die ebenfalls deutlich gesteigerte und dysplastische Megakaryopoese.

Beim sekundären MDS aus einer MPN sich eine Akzeleration durch Zunahme der Blasten, teils Megakaryoblasten, die >10% jedoch weniger als 20% der KM-Zellularität ausmachen [157] In Abgrenzung zur leukämischen Transformation liegt histologisch kein Blastenrasen vor. [157] (Abb. 7 / 8).

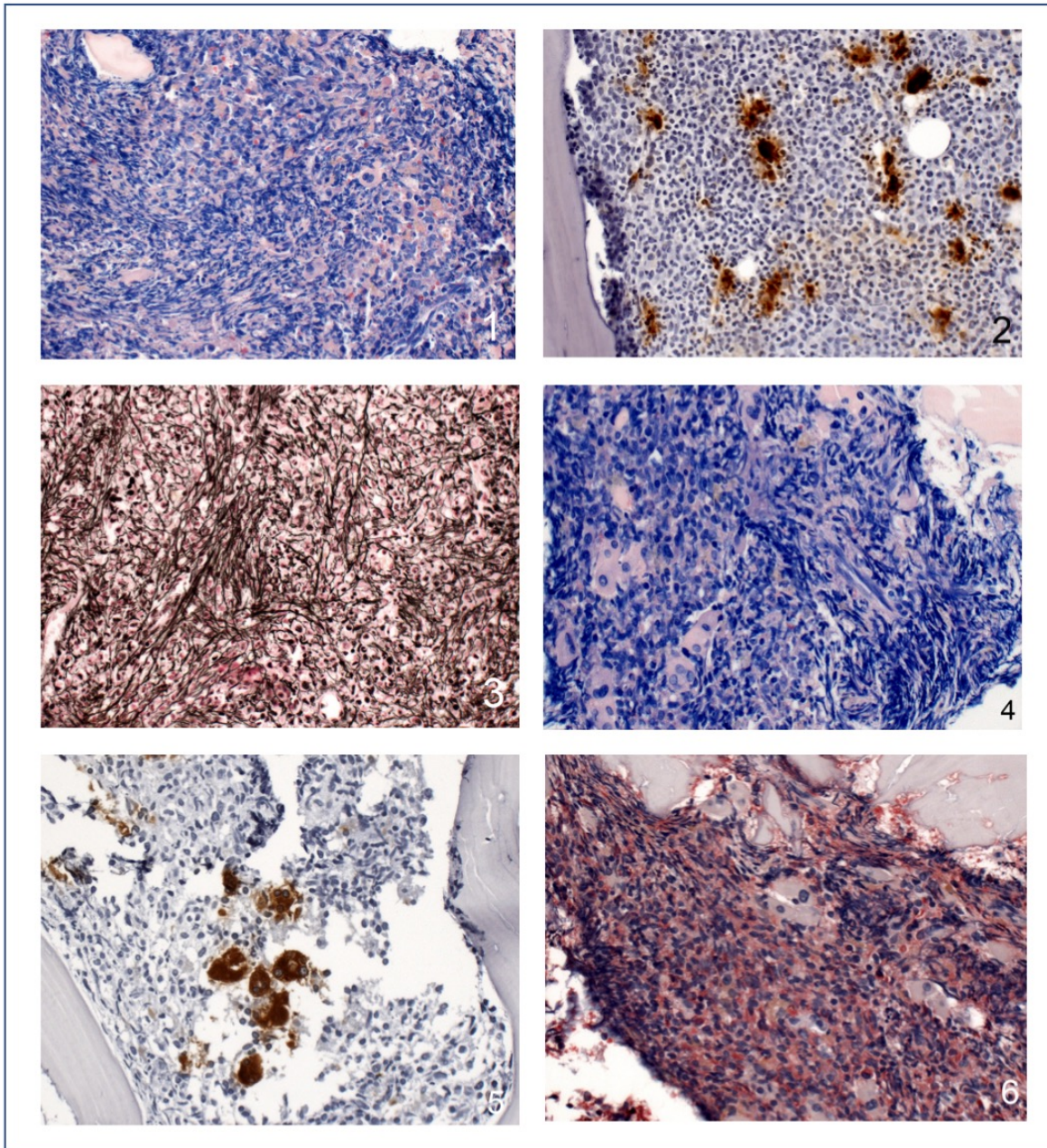


Abb. 8: Exemplarische Darstellung: Progression eines MPN/MDS-UC zur einer AML (Patient 139)

1. MPN/MDS-UC: Deutlich Hyperzelluläres Knochenmark mit in allen drei Zelllinien ausreifender Hämatopoese, in der
2. CD61-Färbung zeigt sich eine gesteigerte Megakaryopoese mit Dysmegakaryopoesezeichen.
3. Ausgeprägte Retikulinfaserfibrose (Silber-Färbung). Insgesamt akzentuierung der myeloproliferativen Komponente.
4. - 6. Progression der Erkrankung zu einer AML: Deutlich Hyperzelluläres Knochenmark mit Vermehrung von Megakaryozyten (5.), sowie einer dichten Infiltration durch Myelozyten und Promyelozyten. Die Erythropoese erscheint deutlich vermindert.
(4. Giemsa, 5. CD61, 6. ASDCL)

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war eine Untersuchung und Einteilung der Verläufe von MPN und MDS/MPN an sequentiellen Präparaten von Knochenmark-Trepanaten. Zunächst wurden der morphologische (histopathologische) und der klinische Verlauf betrachtet, die Fälle ggf. neu klassifiziert und in eine Gruppe der Progression und eine Kontrollgruppe, Patienten mit stabiler, also nicht progredienter/akzelerierter MPN, eingeteilt. Zur Gruppe der Progression zählten Patienten sowohl mit klinischen, als auch mit histologischen Zeichen für eine Progression.

Die Verläufe wurden mit einer Untersuchung der molekularen Mechanismen der Progression und möglicher additiver Effekte von Mutationen korreliert. Ein besonderer Fokus lag auf der Bedeutung der Mutationen in *SRSF2* und *TP53*. Die Hypothese lautete, dass, wie bei der primären Myelofibrose, *SRSF2* eine frühe, somatisch erworbene Mutation darstellt, die als Risikofaktor eine Progression begünstigt, auch wenn klinisch und in der Knochenmarkhistologie noch kein Hinweis auf eine Progression besteht. Eine leukämische Transformation kann dann durch Mutationen im *TP53*-Gen ausgelöst werden. Als schnelle Screening Möglichkeit sollte eine RFLP-Analyse für *SRSF2* und eine immunhistochemische Analyse von p53, bzw. *TP53* dienen. Als klassischer Marker für myeloproliferative Erkrankungen sollte der *JAK2*-Mutationsstatus ebenfalls betrachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl der Studienfälle und Einordnung in Gruppen

Es wurden bei einer ersten Archivsuche etwa 200 Fälle ermittelt, Patienten bei denen klinisch der Verdacht auf eine myeloproliferative Neoplasie geäußert wurde oder bei denen eine solche Neoplasie schon bekannt war und eine erneute Knochenmarkbiopsie entnommen wurde. Gesucht wurde mit dem digitalen Fallerfassungs- und Befundungsprogramm „NEXUS/PAS-NET“ (NEXUS AG, 60314 Frankfurt am Main, Deutschland). Parallel dazu wurden die klinischen Verläufe der Patienten anhand von Arztbriefen und Laborwerten evaluiert.

Ausgeschlossen wurden Fälle bei denen sich der klinische Verdacht einer MPN histologisch nicht bestätigt hat, ebenso Fälle mit einer (typischen, *BCR/ABL*⁺-) chronisch myeloischen Leukämie. Im Anschluss wurden sämtliche Fälle durch einen erfahrenen Hämatopathologen (Professor Dr. F. Fend) histologisch und im-

munhistochemisch reevaluiert und gegebenenfalls reklassifiziert. Als Grundlage für die Einteilung dienten die WHO-Klassifikationen von 2008 und 2016 [16], [13, 15] Ziel waren Fälle in denen sich eine PV, ET oder PMF bestätigte. MDS/MPN-UC (inkl. aCML) wurden in der Studiengruppe behalten, ebenso wie MDS und AML nach vorangegangener MPN. Die nach den WHO-Kriterien von 2008 noch zu den MPN zählende Mastozytose wurde nicht mit in das zu untersuchende Kollektiv aufgenommen. Nach diesem Reevaluationsprozess blieb ein Studienkollektiv mit insgesamt 133 Fällen von insgesamt 75 Patienten. Der Großteil der verwendeten Knochenmarkbiopsate und -Schnitte stammt aus dem Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie in Tübingen. Dabei handelt es sich um Proben von Patienten, die entweder in der Medizinischen Universitätsklinik oder Kinderklinik in Behandlung waren und sind oder von externen Einsendern, angeschlossenen Kliniken oder niedergelassenen Ärzten.

Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

2.2 Verwendete Gerätschaften und Reagenzien

Eingesetzte Lösungen

10x TBE-Puffer	Hergestellt aus: 0,89 M TRIS 0,02 M EDTA- Na ₂ 0,89 M Borsäure
----------------	------------------------------------------------------------------------------------

DNA-Extraktion - Reagenzien

Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K (100 mg/ml)	Roth, Karlsruhe oder Qiagen®, Venlo, Niederlande
QIAamp® DNA FFPE Tissue KIT:	Qiagen®, Venlo, Niederlande <u>Enthält:</u> QIAamp MinElute® Columns 50 Collection Tubes (2 ml) 3 x 50 Buffer ATL 14 ml (Tissue Lysis Buffer) Buffer AL12 ml (Lysis Buffer AL) Buffer AW1 (concentrate) 19 ml (Wash Buffer) Buffer AW2 (concentrate) 13 ml (Wash Buffer) Buffer ATE 20 ml

	Proteinase K 1.25 ml (100 mg/ml; 7000 units/ml)
RNAse A (100 mg/ml)	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen®, Venlo, Niederlande
Xylol	VWR Darmstadt, Deutschland

PCR – Reagenzien

dNTPs	Fermentas Life Sciences St. Leon-Rot, Deutschland
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase(5U/μl), ink 10x PCR-Puffer und Magnesiumchlorid	Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA

Primer	Sequenz	Hersteller
AF4/X3U	GGAGCAGCATTCCATCCAGC	alle: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
AF4/X3L	CATCCATGGGCCGGACATAA	
AF4/X11U	CCGCAGCAAGCAACGAACC	
AF4/X11L	GCTTTCCTCTGGCGGCTCC	
PLZF/X1U	TGCGATGTGGTCATCATGGTG	
PLZF/X1L	CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC	
RAG1/X2U	TGTTGACTCGATCCACCCCA	
RAG1/X2L	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA	
TBXAS1/X9U	GCCCGACATTCTGCAAGTCC	
TBXAS1/X9L	GGTGTGCGCGGAAGGGTT	
SRSF2_P3I_M13_F	TGTA AACGACGGCCAGTGCTGAGGAC GCTATGGATG	
SRSF2_P3_M13m_R	CAGGAAACAGCTATGACAATCATCGGCT GTGGTGTGAGTCC	

Elektrophorese – Reagenzien

GelRed™ Nucleic Acid Stain	Biotium®, Hayward, CA, USA
GenRuler100bp DNA-ladder inkl. Loading-Dye	Fermentas®, Burlington, Kanada
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH®, Wien

TBE-Puffer	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
------------	-----------------------------------------------------------------------------

RFLP – Reagenzien

FastDigest BsaJI inkl. 10x Fast Green Buffer	Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, USA
-------------------------------------------------	-------------------------------------------------

Geräte

Elektrophoresekammer, Schlitten und Kämme	PEQLAB®, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Heizblock	PEQLAB®, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Magnetrührer	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikrowelle	Samsung, Suwon, Südkorea
Pipetten	Pipetman Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen	Safe Seal Tips®, Biozym Scientific GmbH Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße	2,0 ml, 1,5 ml, 0,5 ml Eppendorf Cups Eppendorf, Köln/Wesseling, Deutschland
Spectrometer	Nano Drop 2000®: Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler	LightCycler® 480: Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland Thermocycler® ABI 9700: Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Thermoschüttler	PEQLAB®, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
UV- Bestrahlungsgerät	HERAsafe®, Thermo Scientific/Dharmacon, Lafayette, CO, USA

Zentrifugen	<p>Biofuge 13R: Thermo Fisher Scientific®/ Dharmacon, Lafayette, CO, USA</p> <p>COMBI-SPIN FVL-2400: PEQLAB®, Biotechnologie GmbH, Erlangen, D</p> <p>Minizentrifuge: neoLab®, Heidelberg, Deutschland</p> <p>Vortex-2-Genie®: Scientific Industries, Bohemia, NY, USA</p>
UV-Licht Geldokumentationssysteme	<p>PeqLab® Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland</p>

p53-Immunhistochemie

Liquid Mouse Monoclonal p53-(DO-7)-Antikörper	<p>Novocastra®, Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland</p> <p>Verdünnung: 1:200</p>
BenchMark® ULTRA Automated IHC/ISH slide staining system	<p>Ventana Medical Systems®, Tucson, AZ, USA</p>
BenchMark® XT IHC/ISH slide staining system	<p>Ventana Medical Systems®, Tucson, AZ, USA</p>

2.3 DNA-Extraktion und PCR zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA

2.3.1 DNA-Extraktion mit QIAamp® DNA FFPE Tissue KIT

Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion waren Knochenmarktrepanate in Paraffin-Blöcken (FFPE-(Formalin-fixed, paraffin-embedded)Gewebe). Die Trepanate wurden hierfür in Neutral-Formalin gepuffert, mit EDTA entkalkt und in Paraffin eingebettet. Diese säurefreie Entkalkung bietet den Vorteil, dass sie, auch rückblickend, nahezu uneingeschränkt molekulare Analysen zulässt. [178]

Die Paraffin-Blöcke wurden mittels Microtom 5µm dick geschnitten und 10 bis 15 dieser Schnitte aufgerollt in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben.

Es folgte die Entparaffinierung mit Xylol und Ethanol. Zu den Schnitten erfolgte die Zugabe von 1 ml Xylol, Mischen über 5 sec im Vortex, 5-minütige Inkubation und danach bei 13.000 rpm eine 5-minütige Zentrifugation. Es wurde der Überstand abgenommen und dann der erste Schritt wiederholt. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml 100% Ethanol, 5 sec mischen im Vortex, eine 5-minütige Inkubation, eine erneute-Zentrifugation bei 13.000 rpm über 5 min. Auch dieser Schritt erfolgte zweimalig. Danach wurde das Ethanol abgenommen und das Gewebe zusammen mit dem restlichen Ethanol bei 50°C (im Peqlab® Thermoschüttler) mit offenem Deckel getrocknet bis das Ethanol vollständig verdampft war.

Die Zelllyse und DNA-Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers mit dem QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit: Hierfür wurden in das 1,5 ml Reaktionsgefäß mit dem entparaffinierten Gewebe 180 µl Puffer ATL (QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit, Quiagen, Venlo, Niederlande) gegeben, welches mit 20µl Proteinase K (Roth, Karlsruhe oder QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit, Quiagen, Venlo, Niederlande) versetzt und im Vortex gemischt wurde. Bei 56°C und 500 rpm erfolgte im Thermoschüttler die Zelllyse über mindestens 18 Stunden (Peqlab® Thermoschüttler). Sollte danach makroskopisch das Gewebe noch nicht vollständig lysiert sein, wurden weitere 10 µl Proteinase K hinzugegeben und das Gewebe nochmals über mindestens 30 min lysiert um eine maximale DNA-Ausbeute zu erreichen. [1]

Danach erfolgte eine Inkubation bei 90°C über 1 h (im Peqlab® Thermoschüttler). Nach kurzer Zentrifugation wurden 2 µl RNase A (QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit, Quiagen, Venlo, Niederlande) mit einer Konzentration von 100 mg/ml hinzugegeben

und bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubiert. Es erfolgte die Pufferung mit 200 µl Puffer AL (QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit, Quiagen, Venlo, Niederlande), Mischen, Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100%), Mischen und kurzes Zentrifugieren.

Das Lysat wurde in eine QIAampMinElute Säule (QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit, Quiagen, Venlo, Niederlande) überführt und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert, danach die Säule in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung wurde mit 500 µl Puffer AW1 (Quiagen, Venlo, Niederlande) fortgesetzt, welcher auf die QIAampMinElute Säule (Quiagen, Venlo, Niederlande) gegeben wurde. Anschließend wurde für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert und die Säulen in frische 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgte die weitere Aufreinigung mit 500 µl Puffer AW2 nach demselben Schema (8000 rpm für 1 min, frische 2 ml Reaktionsgefäße). Danach Trocknen der Membran bei 14000 rpm über 3 min.

Die Säule wurde in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben, 30 µl Puffer ATE (QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit, Quiagen, Venlo, Niederlande) in das Zentrum der Membran gegeben, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nochmals bei 14000 r/min 1min lang zentrifugiert. Das Eluat wurde abgenommen und wieder in das Zentrum der Membran gegeben, erneut inkubiert und zentrifugiert.

Die anschließende Messung der DNA-Konzentration erfolgte spektrometrisch im NanoDrop2000 Spectrometer (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA). Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben anschließend mit ddH₂O auf 50 ng/µl verdünnt, direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C zur späteren Verwendung gelagert.

2.3.2 PCR zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA

Nach Bestimmung der Konzentration der extrahierten DNA, erfolgte eine PCR zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA. Formaldehyd, welches für die Einbettung der Knochemarkbiopsate verwendet wird, erzeugt Querverbindungen in DNA und zwischen Proteinen und verursacht durch den sehr niedrigen pH-Wert (<1) Strangbrüche der DNA. [179] Dadurch ist die DNA, die aus FFPE-Proben extrahiert wird, häufig fragmentiert und schwierig amplifizierbar. [180] Die Länge der DNA-Fragmente beträgt oftmals < 500bp. Bevor molekulargenetische Analysen durchgeführt werden, sollte, um fehlerhafte Befunde auszuschließen, die Amplifizierbarkeit der DNA überprüft werden. [1]

Van Dongen et al. beschrieben 2003 eine zuverlässige, schnelle Methode zur Abschätzung der DNA-Qualität [181], an der sich das Protokoll orientiert. Die Zielsequenzen dieser Untersuchung liegen in den Genen für *AF4* (Exon 3 und Exon 11), *PLZF*, *RAG1* und *TBXAS1*. Diese Gene enthalten große Exons und offene Leseraster. Dies erlaubt eine gute Amplifizierbarkeit. Durch die eingesetzten Primer entstehen, abhängig vom Fragmentierungsgrad, Amplifikate mit unterschiedlicher Länge, welche sich anschließend mittels Elektrophorese darstellen lassen: 600 bp (*AF4* Exon 3), 400 bp (*AF4* Exon 11), 300 bp (*PLZF*), 200 bp (*RAG1*), 100 bp (*TBXAS1*) (Tab. 11).

Primer	Sequenz	Konzentration in der PCR
AF4/X3U	GGAGCAGCATTCCATCCAGC	2,5 pmol
AF4/X3L	CATCCATGGGCCGGACATAA	2,5 pmol
AF4/X11U	CCGCAGCAAGCAACGAACC	1,25 pmol
AF4/X11L	GCTTTCCTCTGGCGGCTCC	1,25 pmol
PLZF/X1U	TGCGATGTGGTCATCATGGTG	1,25 pmol
PLZF/X1L	CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC	1,25 pmol
RAG1/X2U	TGTTGACTCGATCCACCCCA	1,25 pmol
RAG1/X2L	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA	1,25 pmol
TBXAS1/X9U	GCCCCGACATTCTGCAAGTCC	1,25 pmol
TBXAS1/X9L	GGTGTTGCCGGAAGGGTT	1,25 pmol

Tab. 11: Zusammensetzung Primer - Mix für PCR zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA

2 µl der auf 50 ng/µl verdünnten isolierten DNA wurde zusammen mit 23 µl der PCR-Reagenzien in 0,2ml PCR - Reaktionsgefäße überführt, gemischt und mittels PCR amplifiziert (Tab. 12 und Tab. 13).

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O	15,8 µl	
10x PCR-Puffer	2,5 µl	1x
25 mM MgCl ₂	2,0 µl	2,0 mM
10 mM dNTPs	0,4 µl	160 µM
Primer-Mix	2,0 µl	siehe Tabelle
50U/µl AmpliTaq Gold	0,3 µl	1,7 U

Tab. 12: Reagenzien für die für PCR zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA

Bei niedrigeren DNA-Konzentrationen wurde ggf. die zugegebene DNA-Menge erhöht, damit 100 ng DNA in jede Reaktion eingesetzt wurde, entsprechend wurde die Menge der anderen Reagenzien reduziert.

Zeit	Temperatur		
7 Minuten	95°C	Denaturierung	
45 Sekunden	95°C	35 Zyklen	
45 Sekunden	60°C		Annealing
90 Sekunden	72°C		Elongation
10 Minuten	72°C	Elongation	
∞	12°C	Kühlung	

Tab. 13: PCR-Programm zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA

Nach der PCR wurden die Produkte sofort mittels Gelelektrophorese aufgetrennt oder alternativ bis zur Elektrophorese bei -20°C gelagert. Für die Gelelektrophorese wurde ein 2%-iges Agarosegel verwendet.

Es wurden 2 g LE-Agarose (Biozym Scientific GmbH®, Wien) mit 100 ml 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich eine klare Lösung gebildet hatte. Diese

Lösung wurde unter ständigem Rühren auf 60°C abgekühlt und dann mit 10 µl Gel-Red™ Nucleic Acid Stain (Biotium®, Hayward) versetzt. Dieses interkaliert mit der DNA, wodurch diese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. [182] Danach erfolgte das Gießen in die entsprechenden Gelkammern mit eingesetzten Kämmen zur Geltaschen-Bildung. Nach Abkühlen und Aushärten des Gels (ca. 30 Minuten), wurde dieses in die Elektrophoresekammer platziert.

15 µl der PCR - Produkte wurden mit Ladepuffer (Loading-Dye, Fermentas®, Burlington, Kanada) versetzt und in die Geltaschen überführt. Die erste und letzte Geltasche wurde mit einem 100 Basenpaar-Längenmarker (GenRuler100bp DNA-ladder, Fermentas®, Burlington, Kanada) beladen. Danach erfolgte eine Gelelektrophorese bei 140 Volt und 500 Watt über 45 min.

Nach der Auftrennung erfolgte unter UV-Licht mittels eines Geldokumentationssystems (PeqLab® Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) die fotografische Dokumentation.

Die für die *SRSF2*-Mutationsanalyse zu amplifizierende Region umfasst 145bp (s.u.). Daher sollte die Amplifikation der DNA mindestens 200 bp aufweisen.

2.4 SRSF2-Mutationsanalyse

Die *SRSF2*-Mutationsanalyse erfolgte mittels einer Restriktionslängenpolymorphismus-Analyse.

2.4.1 Semi-nested PCR

Zur Analyse wurde die DNA zunächst mit Hilfe einer semi-nested PCR amplifiziert. Diese Art der PCR eignet sich insbesondere für Proben mit niedriger DNA-Konzentration und eingeschränkter DNA-Qualität. Hierfür werden 2 PCR-Schritte mit insgesamt 3 unterschiedlichen Primern durchgeführt.

Zielregion für die erste PCR war ein 145 Basenpaare umfassender DNA-Abschnitt um das Kodon 95 (Tab. 14). Die zweite PCR enthielt ebenfalls die Hot-Spot-Region, jedoch in einem kürzeren, nur 97 Basenpaare umfassenden Abschnitt.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O	16,75 µl	
10x PCR-Puffer	2,5 µl	1x
25 mM MgCl ₂	1,5 µl	1,5 mM
10 mM dNTPs	0,5 µl	200 µM
1 µM Primer SRSF2_P3_M13m_R	0,75 µl	0,3 µM
1 µM Primer SRSF2_P3l_M13_F	0,75 µl	0,3 µM
50U/µl AmpliTaq Gold	0,25 µl	1,25 U

Tab. 14: Reagenzien 1. Semi-nested PCR

Auch für diese PCR wurden zunächst ddH₂O, PCR-Puffer, MgCl₂, dNTPs, mit den Primern und AmpliTaq Gold in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und gemischt (Tab. 16).

Anschließend wurden von der auf 50 ng/µl verdünnten DNA, 1 µl zusammen mit 24 µl der vorgemischten Reagenzien in 0,2ml PCR-Reaktionsgefäße überführt und amplifiziert (Tab. 15).

Ebenso wurde mit einer Negativkontrolle verfahren, bei der statt DNA eine äquivalente Menge ddH₂O zugegeben wurde, um Kontaminationen der Reagenzien festzustellen. Bei niedrigeren DNA-Konzentrationen wurde ggf. die zugegebene DNA-Menge erhöht, damit sich 50 ng DNA in jedem Reaktionsgefäß befanden, entsprechend wurde die Menge der übrigen Reagenzien äquivalent reduziert. Die Proben wurden anschließend gemischt und kurz zentrifugiert.

Zeit	Temperatur		
5 Minuten	95°C	Denaturierung	
30 Sekunden	95°C	34 Zyklen	
75 Sekunden	59°C		Annealing
45 Sekunden	72°C		Elongation
10 Minuten	72°C	Elongation	
∞	12°C	Kühlung	

Tab. 15: PCR-Programm, Semi-nested-PCR Schritt 1

Nach Ablauf der PCR (ca. 2,5 Stunden) erfolgte eine Gelelektrophorese.

Die Herstellung des Gels für die Elektrophorese und die elektrophoretische Auftrennung erfolgten analog zur Analyse der PCR zur Testung der Amplifizierbarkeit der DNA (s. 2.3.2).

Da sich bei geringer Amplifizierbarkeit der Proben, die Produkte schwach vervielfältigen ließen, erfolgte eine 2. PCR, die so genannte Semi-nested-PCR, bei der mittels eines anderen Forward-Primers ein insgesamt kürzerer DNA-Abschnitt (97bp) amplifiziert wurde (Tab. 16).

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O	17,75 µl	
10x PCR-Puffer	2,5 µl	1x
25 mM MgCl ₂	1,5 µl	1,5 mM
10 mM dNTPs	0,5 µl	200 µM
10 µM Primer R	0,75 µl	0,3 µM
10 µM Primer F	0,75 µl	0,3 µM
50 U/µl AmpliTaq Gold	0,25 µl	1,25 U

Tab. 16: Zusammensetzung Semi – nested PCR Schritt 2

24 µl der vorgemischten Reagenzien wurde dann zusammen mit 1 µl des PCR-Produkts aus der 1. PCR in 0,2ml PCR-Reaktionsgefäße gegeben, gemischt, zentrifugiert und anschließend im Thermocycler amplifiziert (Tab. 17).

Zeit	Temperatur		
5 Minuten	95°C	Denaturierung	
30 Sekunden	95°C	34 Zyklen	
75 Sekunden	59°C		Annealing
45 Sekunden	72°C		Elongation
10 Minuten	72°C	Elongation	
∞	12°C	Kühlung	

Tab. 17: PCR-Programm semi-nested PCR Schritt 2

Nach Ablauf der PCR (ca. 2,5 Stunden) erfolgte eine Gelelektrophorese in 2% Agarosegel. Das Elektrophoresegel wurde entsprechend dem Gel zur PCR zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA (siehe 2.3.2). Die erwarteten Produkte hatten eine Länge von 97 bp (Basenpaare).

2.4.2 Verdau mit der Restriktionsendonuklease BsaJI

In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden 10 µl der *SRSF2*-PCR-Produkte der 2. *SRSF2*-PCR mit 0,5 µl der Restriktionsendonuklease BsaJI (Thermo Scientific FastDigest BsaJI, Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, USA) versetzt. Hinzu kamen 17,5 µl ddH₂O und 2 µl 10x Fast Green Buffer (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, USA) Diese wurden gemischt und zentrifugiert, anschließend bei 37°C im Heizblock (PqLab® Thermoschüttler) für eine Stunde inkubiert. Das Produkt wurde komplett (30 µl) in die Elektrophorese-Taschen eines 3% Agarosegel überführt. Die erste und letzte Geltasche wurde mit einem 100 Basenpaar-Längenmarker (GenRuler100bp DNA-ladder, Fermentas®, Burlington, Kanada) beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120V, 500W, für 1 Stunde. Nach der Auftrennung erfolgte unter UV-Licht mittels eines Geldokumentationssystems (PqLab® Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) die fotografische Dokumentation.

BsaJI schneidet folgende Sequenz:



Beim *SRSF2*-Wildtypallel entstehen durch den Enzymverdau mit BsaJI ein 53bp und 44bp Fragment, während bei mutiertem *SRSF2* ein zusätzliches Fragment mit 107bp entsteht, welches durch eine Mutation im Kodon 95 (Vgl. 1.3.3.2) in *SRSF2* entsteht:

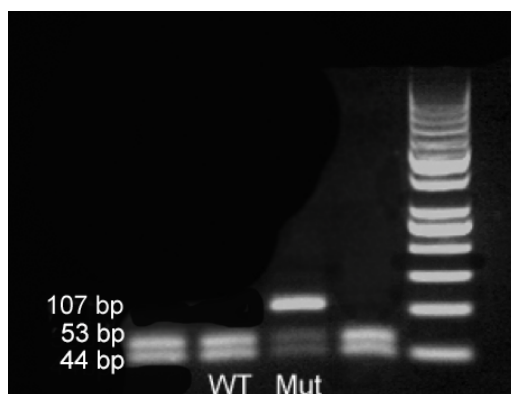


Abb. 9: Exemplarische Darstellung der RFLP-Analyse: Fragmentlängen *SRSF2* Wildtyp (WT) und Mutation (Mut), links: Länge der Fragmente in Basenpaaren (bp), RFLP mit BsaJI

Insgesamt werden mit dieser Methode ca. 95% der *SRSF2* Mutationen entdeckt. [108], insbesondere die häufigen Mutationen p.P95H, p.P95L und p.P95R. Lediglich die seltene p.P95A Mutation wird nicht erkannt.

2.5 TP53-Immunhistochemie

Die TP53-Immunhistochemie erfolgte nach der von Saft et al. 2014 publizierten immunhistochemischen Methode. Hier wurde gezeigt, dass eine starke p53-Expression (3+, s.u.) mit TP53-Mutationen korreliert. Polymorphismen ohne pathologische Relevanz führen zu keiner vermehrten p53-Expression. [147]

Paraffin-Blöcke wurden mittels Mikrotom 5 µm dick geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und anschließend mit dem Liquid Mouse Monoclonal p53- (DO-7)- Antikörper (Novocastra®, Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:200 mit dem *BenchMark® ULTRA Automated IHC/ISH slide staining system* oder dem *BenchMark® XT IHC/ISH slide staining system* (beide: Ventana Medical Systems®, Tucson, AZ, USA) nach Herstellerangaben gefärbt. Für die Auswertung der Schnitte wurden mindestens je 1000 hämatopoetische Zellen lichtmikroskopisch betrachtet (Lymphozyten und -Aggregate ausgenommen).

Die Graduierung der Intensität p53-Expression erfolgte nach dem Modified Quick Score in 0 = negativ, 1+ = schwach positiv, 2+ = mäßig positiv, 3+ = stark positiv. [183, 184]

Ein Wert von 3+ wurde als positiv, also als starke Assoziation zu einer TP53-Mutation, betrachtet. Eine positive p53-Expression korreliert gut mit TP53 Gen Mutation an, dies wurde für sowohl für das MDS, als auch für eine Reihe von anderen hämatologischen Neoplasien, beispielsweise das Multiple Myelom gezeigt. [185] Eine Zunahme der p53-Expression ist Ausdruck einer Akzeleration.

MDS sind bei einer p53-Expression >1% mit einem höheren Risiko der Entwicklung einer AML assoziiert. [147]

2.6 JAK2-Mutationsanalyse

Die JAK2-Mutationsanalyse wurde im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführt, oder wenn diese noch nicht durchgeführt wurde, rückwirkend ergänzt. Diese erfolgt als Allel-spezifische PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse.

2.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS® Version 23 für Mac® (IBM, Armonk, NY, USA), sowie Excel® 2011 für Mac® (Microsoft, Redmond, Washington USA). p-Werte kleiner, gleich (\leq) 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

Das Patientenkollektiv wurde in insgesamt vier Gruppen eingeteilt. Das erste Kollektiv stellten Patienten dar, bei denen mehrere (mindestens 2, maximal 6) Knochenmarkbiopsien durchgeführt wurden und welche, klinisch und oder histologisch, eine Progression oder Akzeleration ihrer Erkrankung zeigten.

Als Progression der Erkrankung wurden eine Myelofibrose nach vorangegangener Polyzythämia vera oder ET, entsprechend der WHO- bzw. International Working Group for MPN Research and Treatment (IWG-MRT) - Kriterien (siehe Kap. 1.3.4) klassifiziert. Der Verlauf einer präfibrotischen Myelofibrose zu einer manifesten Myelofibrose (fibrotische Phase) wurde nicht als Progression gewertet.

Außerdem wurden Patienten mit einer Akzeleration, also der Entwicklung eines sekundären MDS nach vorangegangener MPN, in die Progressions-Gruppe eingeteilt. Die Akzeleration ist im Wesentlichen durch eine ineffektive Hämatopoese gekennzeichnet, daneben zeigt sich histologisch eine Zunahme von Blasten im Knochenmark, deren Anzahl $>10\%$ und $<20\%$ beträgt, sowie eine zunehmende Dysplasie der Hämatopoese. [157] [186]

In Abgrenzung zur leukämischen Transformation liegt histologisch definitionsgemäß kein Blasten-Rasen vor. [157] Klinisch zeigt sich häufig eine neu aufgetretene uni- oder bilinäre Zytopenie, prädominant meist eine Anämie, gelegentlich auch eine Panzytopenie, histologisch das Bild eines MDS mit Fibrose. [157]

Die dritte Art der Progression im untersuchten Kollektiv war die Entwicklung einer akuten myeloischen Leukämie aus einer myeloproliferativen Neoplasie oder aus einem sekundären myelodysplastischen Syndroms aus vorangegangener MPN. Histologisch zeigt sich im Knochenmarktrepanat oder -ausstrich bzw. durchflusszytometrisch eine Infiltration mit myeloischen Blasten, deren Anzahl $>20\%$ der Knochenmarkzellularität ausmacht. Das Ausschwemmen dieser Blasten ins periphere Blut führt in der Regel zu einer Leukozytose, aleukämische Verlaufsformen mit normalen oder erniedrigten Leukozytenzahlen sind jedoch auch möglich. Durch die Infiltration im Knochenmark werden die Zellen der Hämatopoese mehr und mehr verdrängt, mit daraus resultierender Anämie und Thrombozytopenie. Daneben kann es auch zu einer extramedullären Progression der Erkrankung mit Lymphknoten-, Leber- oder Milzinfiltration oder der Ausbildung von Chloromen kommen. [166] Auch hier sieht man histologisch eine Infiltration mit leukämischen Blasten. Diese seltene

Art der leukämischen Transformation einer MPN kam im untersuchten Kollektiv jedoch nicht vor.

Die zweite Progressions-Gruppe setzt sich aus Patienten mit MPN zusammen, von denen nur eine Knochenmarkbiopsie, im Verlauf der Erkrankung aber klinisch oder histologisch ein Progress vorlag (Gruppe 3 im Folgenden). Hierbei wurden Fälle untersucht, bei denen vorangegangen die Diagnose einer MPN gestellt wurde, das Knochenmarkbiopsat der Erstdiagnose jedoch nicht (mehr) vorlag, sich histologisch oder laborchemisch im Verlauf eine der o.g. Progressionen zeigte. Dazu gehören auch Fälle bei denen initial keine histologische Aufarbeitung des Knochenmarks erfolgte, beispielsweise Patienten mit einer Polyzythämia vera, bei denen die Erkrankung aufgrund eines erhöhten Hb-Werts und einer *JAK2 V617F*-Mutation, welche im peripheren Blut festgestellt wurde, diagnostiziert wurde (Vgl. WHO-Kriterien, Kapitel 1.3.4). Daneben wurden Patienten, bei denen sich im ersten untersuchten Präparat schon eine Progression zeigte, beispielsweise eine ET mit MDS-Zeichen, in die Progressions-Gruppe aufgenommen.

MDS/MPN-UC und MPN-UC ohne weitere Zeichen einer Akzeleration oder Progression wurden nicht als Progression gewertet.

Die Kontrollgruppen waren Patienten ohne Progression der Erkrankung, von denen nur ein Biopsat gewonnen wurde oder Patienten ohne Progression, mit mehreren (mindestens 2, maximal 4) Knochenmarktrepnaten. (Gruppe 2 und 4) (Tab. 18 und Tab. 19).

Die häufigste Diagnose stellte die primäre Myelofibrose dar, gefolgt von PV und MDS/MPN-UC. Am seltensten fand sich die MPN-UC. (Abb.10). In Gruppe 1 wurden die Erkrankungen entsprechend der Ersterkrankung gezählt. (Tab. 18)

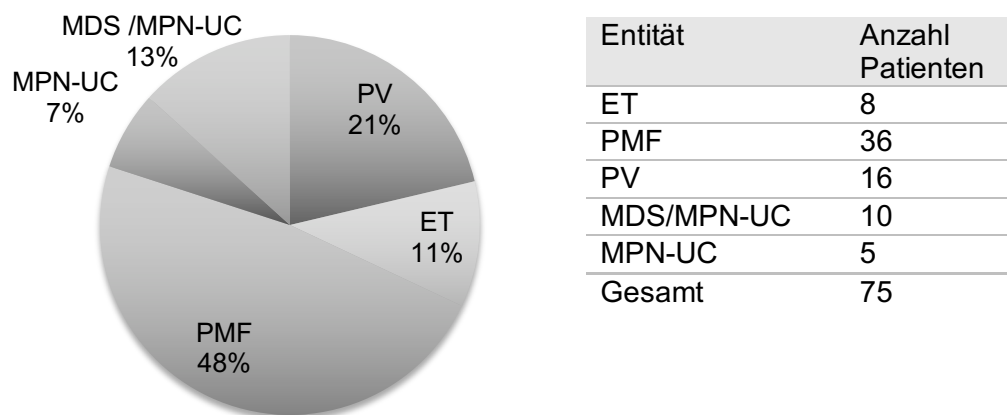


Abb. 10: Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Gruppe	Beschreibung
1	Patienten mit seriellen Knochenmarkbiospien mit histopathologischem oder klinischem Nachweis einer Progression der myeloischen Neoplasie (MN)
2	Patienten mit seriellen Knochenmarkbiospien ohne Progress der MN
3	Patienten mit nur einer Knochenmarkbiopsie aber histopathologischem oder klinischem Nachweis einer Progression bei anamnestisch gesicherter MN
4	Patienten mit einer Knochenmarkbiopsie ohne Progress der MN

Tab. 18: Einteilung der Gruppen des Studienkollektivs

Gruppe 1: Verlaufsbiospien mit Progress

Entität	Patienten	%	Präparate
ET	3	15	10
PMF	6	30	18
PV	8	40	26
MDS/MPN-UC	3	15	11
gesamt	20		65

Gruppe 2: Kontrollgruppe: Verlaufsbiospien ohne Progress

Entität	Patienten	%	Präparate
ET	0		0
PMF	5	45,45	9
PV	2	18,18	6
MDS/MPN-UC	3	27,3	7
MPN-UC	1	9,1	4

Gruppe 3: Progression, je Patient 1 Biopsie

Entität	Patienten	%
ET	1	11,1
PMF	3	33,3
PV	1	11,1
MDS/MPN-UC	3	33,3
MPN-UC	1	11,1
gesamt	9	

Gruppe 4: Kontrollgruppe: kein Progress, je Patient 1 Biopsie

Entität	Patienten	%
ET	4	11,4
PMF	22	62,9
PV	5	14,3
MDS/MPN-UC	1	2,9
MPN-UC	3	8,6
gesamt	34	

Tab. 19: Zusammensetzung der Gruppen des Studienkollektivs

Insgesamt wurden bei der erneuten histopathologischen Begutachtung, Ergänzung von Mutationsanalysen und Betrachtung des weiteren klinischen Verlaufs der Erkrankung 21 Fälle reklassifiziert, davon 6 in Gruppe 1, 5 Fälle in Gruppe 2, 2 Fälle in Gruppe 3 und 8 Fälle in Gruppe 4, darunter 2 Fälle, die ursprünglich als nicht progredient galten als progrediente Erkrankung klassifiziert.

Tabelle 20 gibt einen Überblick über die reklassifizierten Fälle.

<i>Ursprüngliche Diagnose</i>	<i>Diagnose reklassifiziert</i>	<i>Gruppe</i>
CML	MPN-UC ¹	2
ET	MPN/MDS-UC	1
	PV	4
MDS	MPN/MDS-UC	2
MDS/MPN-UC	MPN-UC	1
MPN-UC	PV	1
	PV	4
	ET	1
	MPN/MDS-UC	3
	MPN/MDS-UC	4
	PMF	4
	PMF	4
PMF	MPN-UC	4
	PV	4
PV	PMF	2
	PMF	4
Reaktive Veränderungen ²	PV	1
	PV	2
	PMF	2
	MPN/MDS-UC	3
	MPN-UC	1

¹ *BCR/ABL1*-negativ

² in dieser Gruppe erfolgte die Reklassifizierung meist durch den weiteren klinischen Verlauf und/oder die Ergänzung molekularer Analysen.

Tab. 20: Übersicht über die reklassifizierten Fälle

3.1.1 Alters- und Geschlechterverteilung des Studienkollektivs

Das mediane Alter des Studienkollektivs beträgt 66 Jahre mit einem Range von 30 bis 91 Jahren, rund zwei Drittel des Studienkollektivs sind Männer (n=48), Frauen: n=27 (Tab.21)

	Alter	Geschlecht	
	Median (Range) Jahre	Männlich Anzahl (%)	Weiblich (Anzahl) (%)
Gruppe 1	56 (44-74)	13 (65%)	7 (35%)
Gruppe 2	71(46-80)	9 (81,8%)	2 (18,2%)
Gruppe 3	67 (60-91)	8 (88,9%)	1 (11,1%)
Gruppe 4	67 (30-86)	18 (51,4%)	17 (48,6%)
Gesamt	66 (30-91)	48 (64%)	27 (36%)

Tab. 21: Alters- und Geschlechterverteilung des Studienkollektivs

3.2 Überblick über die Progression, unabhängig der Grunderkrankung

Akzeleration mit sekundären dysplastischen Veränderungen war mit 47% am häufigsten, die Transformation zu einer akuten Leukämie mit etwa 20% deutlich seltener, die Entwicklung einer sekundären Myelofibrose machte etwa 1/3 der Progressionen aus (Abb. 11)

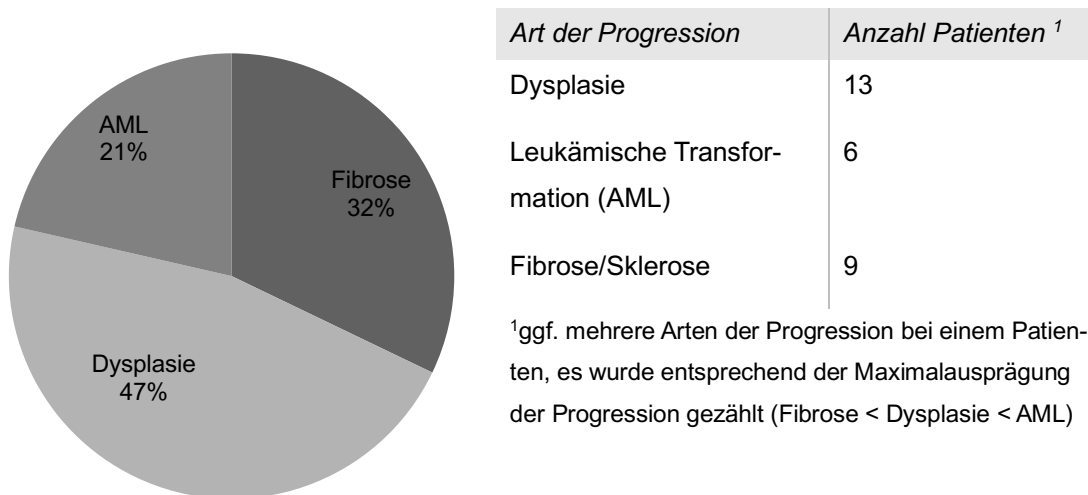


Abb. 11: Überblick über die Arten der Progression

3.2.1 Zusammenhang zwischen Diagnose und *SRSF2*-Mutationsstatus

Den mit 44,4% und 50% größten Anteil an *SRSF2*-Mutationen fanden sich bei essentieller Thrombozythämie und bei MDS/MPN-UC. Mit einer Frequenz von 40% ebenfalls häufig kam eine *SRSF2*-Mutation bei der unklassifizierbaren myeloproliferativen Erkrankung vor.

Bei den 14 untersuchten Patienten mit Polyzythämia vera fand sich keine *SRSF2*-Mutation. (Tab.22)

		<i>SRSF2</i> Wildtyp	<i>SRSF2</i> Mutation	gesamt	unbekannt
PV	n (%)	14 (100,0%)	0	14	2
ET	n (%)	3 (50,0%)	3 (50,0%)	6	2
PMF	n (%)	31(88,6%)	4 (11,4%)	35	1
MPN-UC	n (%)	3 (60,0%)	2(40,0%)	5	
MDS/MPN-UC	n (%)	5 (55,6%)	4 (44,4%)	9	1
Gesamt	n (%)	56 (81,2%)	13(18,8%)	69 (92%) ¹	6 ¹

¹: 6 Fälle (8%) konnten aufgrund fehlender Biopsate oder unzureichender DNA-Qualität nicht auf eine *SRSF2* Mutationen untersucht werden.

Tab. 22: Zusammenhang zwischen Diagnose und *SRSF2*-Mutationsstatus (Patienten mit und ohne Progression der Erkrankung)

3.3 Einfluss von *SRSF2* auf die Progression myeloproliferativer Erkrankungen

Das Vorliegen einer *SRSF2*-Mutation bei Patienten mit myeloproliferativer Erkrankung in Akzeleration bzw. mit Progression war mit 32% deutlich häufiger gegenüber der nicht-progredienten Gruppe (11,4%). Es zeigte sich bei allen untersuchten Diagnosen, ausgenommen der Polyzytämia vera, prozentual ein größerer Anteil an *SRSF2*-Mutationen bei den Patienten mit Progression gegenüber den Patienten mit einer nicht-progredienten Erkrankung. (Tab. 23 und Tab. 24)

Patienten mit Progression		<i>SRSF2</i> Wildtyp	<i>SRSF2</i> Mutation	Gesamt
PV	n (%)	7 (100,0%)	0	7
ET	n (%)	2 (50,0%)	2 (50,0%)	4
PMF	n (%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7
MPN-UC	n (%)	0	1 (100,0%)	1
MDS/MPN-UC	n (%)	3 (50,0%)	3 (50,0%)	6
Gesamt	n (%)	17 (68,0%)	8 (32,0%)	25

Tab. 23: Häufigkeit der *SRSF2*-Mutation abhängig von der Diagnose bei Patienten mit progredienter Erkrankung.

Patienten ohne Progression		<i>SRSF2</i> Wildtyp	<i>SRSF2</i> Mutation	Gesamt
PV	n (%)	7 (100,0%)	0	7
ET	n (%)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2
PMF	n (%)	26 (92,9%)	2 (7,1%)	28
MPN-UC	n (%)	3 (75,0%)	1 (25,0%)	4
MDS/MPN-UC	n (%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3
Gesamt	n (%)	39 (88,6%)	5 (11,4%)	44

Tab. 24: Häufigkeit der *SRSF2*-Mutation abhängig von der Diagnose bei Patienten mit stabiler Erkrankung.

Tabelle 25 zeigt nochmals die schon erwähnte Tendenz, dass die *SRSF2* Mutation bei Progredienz der myeloproliferativen Erkrankung häufiger auftritt. Eine statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$) liegt vor.

		SRSF2 Wildtyp	SRSF2 Mutation	Gesamt
Kein Progress	n (%)	39 (88,6%)	5 (11,4%)	44
Progress	n (%)	17 (68,0%)	8 (32,0%)	25
Gesamt	n (%)	56 (81,2%)	13 (18,8%)	69

Chi-Quadrat-Test: Progression / *SRSF2*

Likelihood-Quotient	df	p
4,274	1	0,039

Tab. 25: *SRSF2*-Mutationsstatus im Zusammenhang mit der Art der Progression

Tabelle 26 und 27 zeigen den Einfluss des *SRSF2*-Mutationsstatus auf die Art der Progression. Bei Entwicklung einer Fibrose kommt eine *SRSF2*-Mutation nicht vor, hingegen sind 58,3% der Fälle mit Dysplasie und 20% der sekundären AML Fälle *SRSF2* mutiert. Umgekehrt liegt bei positivem *SRSF2*-Mutationsnachweis bei Progression in 87,5% eine Dysplasie vor, bzw. unabhängig davon ob eine Einteilung in Progression oder nicht vorlag, findet sich in 53,8% der Fälle histopathologisch eine Dysplasie bei Nachweis einer *SRSF2* Mutation. Eine statistische Signifikanz mit $p=0,003$ liegt vor. (Tab. 27)

		<i>SRSF2</i> Wildtyp	<i>SRSF2</i> Mutation	Gesamt
Fibrose	Anzahl (%)	8 (100,0%)	0	10
Dysplasie	Anzahl	5 (41,7%)	7 (58,3%)	12
AML	Anzahl	4 (80,0%)	1 (20,0%)	5
Gesamt	Anzahl	17	8	25

Chi-Quadrat-Test: Art der Progression / *SRSF2*

Likelihood-Quotient	df	p
10,039	2	0,007

Tab. 26: Einfluss von *SRSF2* auf die Art der Progression

		<i>SRSF2</i> Wildtyp	<i>SRSF2</i> Mutation	Gesamt
keine Progression	Anzahl	39 (88,6%)	5 (11,4%)	44
Fibrose	Anzahl	8 (100,0%)	0	10
Dysplasie	Anzahl	5 (41,7%)	7 (58,3%)	12
AML	Anzahl	4 (80,0%)	1 (20,0%)	5
Gesamt	Anzahl	56	13	69

Chi-Quadrat-Test: Progression und Art der Progression und *SRSF2*

Likelihood-Quotient	df	p
14,317	3	0,003

Tab. 27: Einfluss von *SRSF2* auf Progression und die Art der Progression

3.3.1 Zeitlicher Verlauf der *SRSF2* Mutation bei Patienten mit seriellen Biopsien

Bis auf einen Patienten waren die Mutationen über den zeitlichen Verlauf der Erkrankung stabil, Das gilt sowohl für die progredienten Fälle (Gruppe 1), als auch für die Kontrollgruppe (Gruppe 2), die keinen Progress zeigten. (Tab. 28)

Einen Sonderfall stellt Patient Nr. 113 dar, welcher mit asymptomatischer Leukozytose und Anämie Knochenmark biopsiert wurde. Die Erkrankung wurde als MPN-UC diagnostiziert, welche im Verlauf eine zunehmende Fibrosierung und, bedingt dadurch, eine Panzytopenie, entwickelte, weshalb eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt wurde. Die Erkrankung zeigte initial den *JAK2*, *SRSF2* Wildtyp und war *BCR/ABL* negativ, gewann aber dann die *SRSF2* und *JAK2* Mutation hinzu (nach allogener Transplantation), sodass der Verdacht auf einer Zweitneoplasie geäußert wurde. Histologisch zeigte sich das Knochenmark zu dem Zeitpunkt hypozellulär ohne Blastenvermehrung. In einer vierten Biopsie nach SZT bestand histologisch dann wieder das Bild einer MPN-UC, die *SRSF2* nicht-mutiert und *JAK2* mutiert war. Diesen Fall, insbesondere vor dem Hintergrund der allogenen Stammzelltransplantation, ausgeklammert, lässt sich festhalten, dass es sich bei der *SRSF2*-Mutation um eine stabile, frühe Mutation handelt, ein Zugewinn oder Verlust der Mutation sind untypisch.

		Mutation		Wildtyp	
		Anzahl Patienten	Anzahl Biopsien	Anzahl Patienten	Anzahl Biopsien
Gruppe 1	stabil	4	13	24	40
	verloren	1*	2	1*	2
	hinzugewonnen	1*	2	1*	2
Gruppe 2	stabil	2	4	9	15
	verloren	0	0	0	0
	hinzugewonnen	0	0	0	0

*es handelt sich hierbei um einen Patienten (Pat. Nr. 113) bei dem insgesamt 4 Biopsate untersucht wurden, die *SRSF2* Mutation lag initial nicht vor, war dann in 2 Biopsien nachweisbar. In der letzten Biopsie fand sich die Mutation dann nicht mehr.

Tab. 28: Zeitlicher Verlauf der *SRSF2* Mutation

3.4 *JAK2*

3.4.1 *JAK2*- Mutationsstatus im untersuchten Kollektiv

Am häufigsten fand sich die *JAK2*-V617F Mutation bei PV und ET, am seltensten bei MDS/MPN-UC. (Tab. 30) Insgesamt zeigten 64% der Biopsate die *JAK2*-V617F Mutation. (Tab. 29)

	Häufigkeit	%
<i>JAK2</i> Wildtyp	22	29,3
<i>JAK2</i> -V617F Mutation	48	64,0
untersucht	70	93,3
nicht untersucht / kein Ergebnis	5	6,7

Tab. 29: Mutationsstatus *JAK2*, gesamtes Kollektiv

		<i>JAK2</i> Wildtyp ²	<i>JAK2</i> -V617F Mutation	Gesamt
PV	n (%)	2 (13,3%)	13 (86,7%)	15
ET	n (%)	4 (50,0%)	4 (50,0%)	8
PMF	n (%)	8 (24,2%)	25 (75,8%)	33
MPN-UC	n (%)	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5
MDS/MPN-UC	n (%)	6 (66,7%)	3 (33,3%)	9
Gesamt	n (%)	22 (31,4%)	48 (68,6%) ¹	70

¹fehlende Werte nicht mit einberechnet, daher ergeben sich andere Prozentzahlen als die in Tab. 31 genannten.² Keine *JAK2*-V617F-Mutation

Tab. 30: *JAK2* Mutationsstatus abhängig von der Diagnose

3.5 Häufigkeit einer *JAK2*-Mutation bei progredienter und nicht-progredienter Erkrankung

Eine *JAK2*-V617F-Mutation kam in der Gruppe der progredienten MPN seltener vor, als bei Patienten mit nicht-progredienter Erkrankung. (Tab. 31)

		Kein Progress	Progress	Gesamt
<i>JAK2</i> Wildtyp	n (%)	12 (54,5%)	10 (45,5%)	22
<i>JAK2</i> -V617F Mutation	n (%)	32 (66,7%)	16 (33,3%)	48
Gesamt	n (%)	44 (62,9%)	26 (37,1%)	70

Tab. 31: Häufigkeit der *JAK2*-Mutation bei progredienter / nicht-progredienter Erkrankung

3.5.1 Zeitlicher Verlauf der *JAK2*-Mutation bei Patienten mit seriellen Biopsien

Im untersuchten Kollektiv hatten nur Patienten, die eine progrediente Erkrankung hatten, einen *JAK2*-Mutationsverlust oder -Zugewinn. Insgesamt waren davon 3 Patienten betroffen.

		Mutation		Wildtyp	
		Anzahl Patienten	Anzahl Biopsien	Anzahl Patienten	Anzahl Biopsien
Gruppe 1	stabil	10	8	7	38
	verloren	2*	3	2*	3
	hinzugewonnen	2*	5	2*	3
Gruppe 2	stabil	8	15	3	5
	verloren	0	0	0	0
	hinzugewonnen	0	0	0	0

*Es handelt sich hierbei um insgesamt 3 Patienten: Patient 113, 116 und 119.

Patient 113 hat die *JAK2*-Mutation zunächst hinzugewonnen, dann wieder verloren, daher erscheint der Patient doppelt in der Tabelle

Tab. 32: Zeitlicher Verlauf der *JAK2*-Mutation bei Patienten mit seriellen Biopsien

3.5.2 Assoziation zwischen *JAK2*- und *SRSF2*-Mutationsstatus

		<i>JAK2</i> Wildtyp	<i>JAK2</i> Mutation	Gesamt
<i>SRSF2</i> Mutation	Anzahl	6 (54,5%)	5 (45,5%)	11
<i>SRSF2</i> Wildtyp	Anzahl (%)	13 (24,1%)	41 (75,9%)	54
Gesamt	Anzahl	19 (29,2%)	46 (70,8%)	65

Tab. 33: Assoziation *JAK2* und *SRSF2*

Wie in Tabelle 33 zu sehen, kommt es seltener zu einem koinzidenten Auftreten der *JAK2*- und *SRSF2* Mutation als der Nachweis einer der Mutationen. Ebenso ist es selten, dass keine der genannten Mutationen vorliegt. Insgesamt ist eine *JAK2* Mutation deutlich häufiger als eine *SRSF2* Mutation.

3.6 TP53

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 67 Biopsien immunhistochemisch auf die p53-Expression untersucht. Der Fokus lag auf dem zeitlichen Verlauf und auf der Rolle der Mutation in der Progression der MPN, daher wurden die Patienten aus den Gruppen 1, 2 und 3 ausgewählt. Die p53-Expression wurde in 0, 1+, 2+, 3+ graduiert. Eine Expression von 3+ wurde als positiv gewertet, da eine hohe Wahrscheinlichkeit der Mutation vorliegt. (Abb.12)

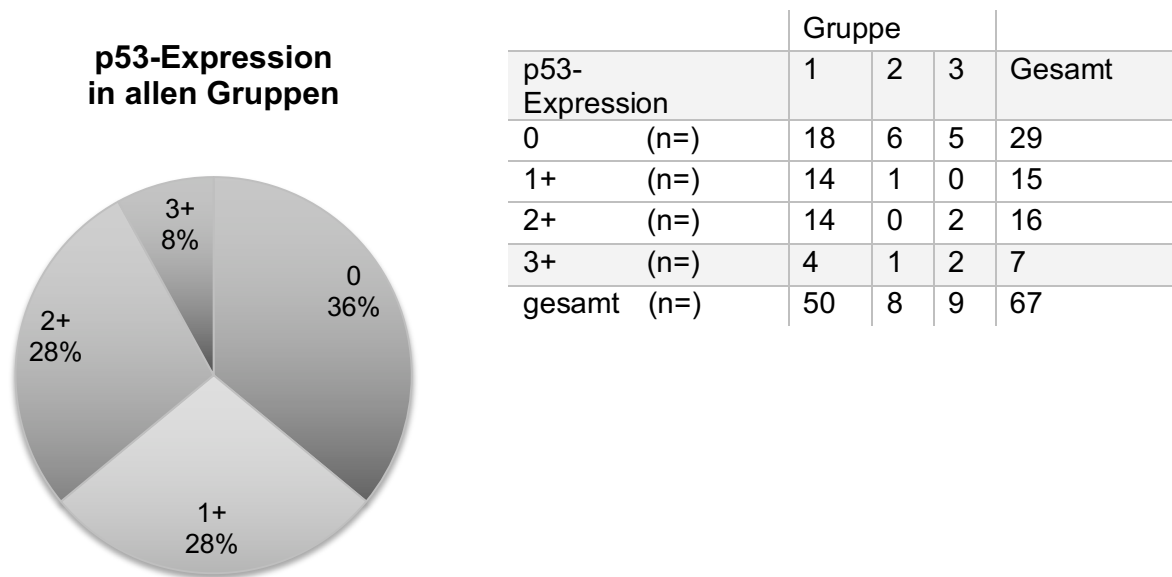


Abb. 12: Verteilung der p53-Expression in allen Gruppen

Die positiven („3+“-) Fälle genauer betrachtet:

Patientennummer	Biopsie Nr. ¹	Geschlecht	Diagnose	Progression	SRSF2 ²	JAK2 V617F ³	p53 ⁴	klinische Angaben
39	1	männlich	primäre Myelofibrose	AML FAB⁵-M5	WT	Mut.	2+	V.a. akute Transformation
	2	männlich	AML M5 aus PMF	AML FAB-M5	WT	Mut.	3+	Sekundäre AML
	3	männlich	AML M5 aus PMF	AML FAB-M5	WT	Mut.	3+	Sekundäre AML
74	1	männlich	MDS/MPS overlap		WT	unbek.	0	
	2	männlich	MDS/MPS overlap		WT	WT	3+	
91	1	weiblich	AML M7 aus ET	AML FAB-M7	WT	Mut.	3+	MPN in Akzeleration
110	1	männlich	MDS/MPS overlap	keine	WT	Mut.	3+	keine
136	1	männlich	frühe fibrotische Phase PMF	AML FAB-M7	unbek.	WT	0	V.a. PMF
	2	männlich	minimale residuelle Infiltration der bekannten AML	AML FAB-M7	WT	WT	3+	Kontrolle bei allo-SCT d+23 bei AML M7 aus PMF
	3	männlich	ausgedehnte Infiltrate der bek AML (M7), Blastengehalt 25%	AML FAB-M7	WT	WT	3+	Z.n. allo-SCT bei AML M7 aus PMF

¹ Biopsie-Nr= Reihenfolge der Biopsien beim entsprechenden Patienten

² Mutationsstatus SRSF2: WT=Wildtyp, Mut.=Mutation, unbek.= unbekannt

³ Mutationsstatus JAK2: WT=Wildtyp, Mut.=Mutation, unbek.= unbekannt

⁴ p53: Immunhistochemische p53-Expression: 0, 1+, 2+, 3+

⁵ FAB: French-American-British

Tab. 34: Positive p53-Expression und klinischer Verlauf

Dargestellt sind fünf Patienten mit insgesamt 10 Knochenmarkbiopsien.

Es zeigt sich, dass typischerweise zum Zeitpunkt der leukämischen Transformation, p53 hoch exprimiert war, und bei den selben Patienten während der stabilen Phase der Erkrankung weniger oder nicht exprimiert war. Es besteht eine eindeutige Assoziation zur leukämischen Transformation, eine hohe Expression korreliert mit dem klinischen Verlauf. Bei allen Patienten mit starker *TP53*-Expression lag keine *SRSF2* Mutation vor.

Bei einem Patienten fand sich eine „3+“-Expression bei einem MPN/MDS-overlap Syndrom ohne klinischen oder histologischen Hinweis auf eine Progression.

Im untersuchten Kollektiv fanden sich drei weitere Patienten, bei denen aus einer MPN eine akute myeloische Leukämie entstanden ist, bei diesen fand sich keine

„hoch positive“ (= 3+) p53-Expression, bei zwei Patienten jedoch eine positive (=2+)-Expression (s.u.).

Korrelation des klinischen Verlaufs mit jeglicher p53-Expression:

p53-Expression ¹		0	+1	+2	+3
		Anzahl Patienten (n)			
Progression zu	AML	0	1	2	3
	MDS	3	2	1	1
	Fibrose	3	4	5	0
Keine Progression		3	0	0	1

¹Stärke der immunhistochemischen p53-Expression (s.o.)

Tab. 35: Korrelation des klinischen Verlaufs mit der p53-Expression

Bei der Korrelation des klinischen Verlaufs mit jeglicher p53-Expression zeigt sich, dass eine p53-Expression bei jeglicher Art der Progression vorkommen kann. Die hoch-positive p53-Expression ist mit Entwicklung einer AML assoziiert.

4 Diskussion

Nach einer, teils jahrelangen, stabilen Phase, die durch eine Über-Produktion einer oder mehrerer reifer Zelllinien gekennzeichnet ist, durchläuft ein variabler Anteil der MPN einen Progress zu einem Knochenmarkversagen mit uni- oder bilinärer Insuffizienz oder einer Panzytopenie, im Falle einer malignen Transformation aber auch zu unkontrollierter Zellproliferation mit konsekutiver Leukozytose.

Die Knochenmarkinsuffizienz kann durch Markfibrose, MDS oder durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese durch einen Progress in eine akute Leukämie verursacht sein. [157]

Durch den Einsatz moderner Sequenzierungstechnologien (next generation sequencing) kamen im Laufe der vergangenen Jahre (teilweise während der Erstellung dieser Arbeit) zahlreiche neue Erkenntnisse über die Rolle und Reihenfolge verschiedener Mutationen in der Progression myeloproliferativer Erkrankungen hinzu.

4.1 Die Eignung von FFPE-fixiertem Gewebe für die *SRSF2*- und *TP53* Analyse

Wie durch zahlreiche Vorarbeiten gezeigt, eignen sich FFPE-Knochenmarktrepnate bestens für molekulare und immunhistochemische Analysen, ebenso auch für die *SRSF2* und *TP53*-Analyse bei chronisch myeloproliferativen Erkrankungen. [178] [108] [1, 178] Daneben bietet diese Art der Fixierung natürlich auch rückwirkend die Möglichkeit einer histopathologischen Aufarbeitung mit der Möglichkeit einer Reklassifizierung oder immunhistochemischen Analyse, da die Knochenmarkmorphologie, trotz immer neuer molekulargenetischer Untersuchungsmöglichkeiten, noch immer eine zentrale Rolle in der Diagnostik dieser Erkrankungen spielt [187]. Die Schwierigkeit in der Analyse in der vorliegenden Arbeit lag darin, dass, bedingt durch die Erkrankungen selbst, bei beispielsweise ausgeprägter Aplasie und Fibrose, der DNA-Gehalt in den untersuchten Proben teilweise gering war und diese mitunter stark fragmentiert war. Abhilfe schaffte hier eine semi-nested PCR, bei der in ausreichender Menge DNA amplifiziert werden konnte, sodass bei nahezu jeder Probe eine Analyse möglich war.

4.2 Der Restriktionsverdau mit BsaJI zur Analyse einer *SRSF2*- Mutation

Wie bereits gezeigt werden konnte, bietet der Enzymverdau mit der Restriktionsendonuklease BsaJI eine schnelle, kostengünstige und zuverlässige Möglichkeit der Analyse des *SRSF2*-Mutationsstatus bei der chronisch myelomonozytären Leukämie (CMML) [108]. Hier konnte dies ebenfalls für verschiedene MPN, MDS/MPN, und deren progrediente Formen gezeigt werden. Es können mit dieser Methode nahezu alle *SRSF2*-Mutationen ($\approx 95\%$) detektiert werden, insbesondere die häufigen Mutationen p.P95H, p.P95L und p.P95R. Lediglich die seltene p.P95A Mutation wird nicht erkannt. [108] Da die *SRSF2*-Mutation einen Risikomarker bei myeloproliferativen Erkrankungen darstellt und sich zur Diagnosefindung bei MDS/MPN-UC eignet, könnte der Enzymverdau mit BsaJI und eine anschließende Elektrophorese eine schnelle und günstige Methode für die Routinediagnostik bei diesen Erkrankungen geeignet sein.

4.3 Die Art der Progression bei myeloproliferativen Erkrankungen

Im untersuchten Kollektiv wurden insgesamt 28 Patienten mit progredienter MPN untersucht. Die häufigste Art der Progression stellte das sekundäre MDS mit 13 Patienten (47 %), gefolgt von der sekundären Myelofibrose mit 32 % (9 Patienten). Am seltensten war die Entwicklung einer akuten Leukämie aus einer MPN, in unserem Kollektiv bei 6 Patienten (21%). Es ist jedoch zu beachten, dass in den hier dargestellten Daten die Maximalausprägung der Progression gezählt wurde, das heißt, ein Patient der eine Progression zu einer akuten Leukämie erfahren hat, zuvor aber die Stadien der Fibrose und Dysplasie durchlaufen hat, wurde hier als leukämische Transformation gezählt.

Bei der Polyzythämia vera ist die Myelofibrose eine häufige Progressionsform, wenn nicht sogar einer der natürlichen Verläufe der Erkrankung. Literaturangaben zu folge betrifft dieses, früher spent-Phase genannte, Erkrankungsstadium nach 10-jähriger Erkrankungsdauer rund 20% der Patienten [159]. Auch im vorliegenden Kollektiv stellt die Markfibrose mit 77,8% die häufigste Progressionsform bei der Polyzythämia vera dar, 20% der Fälle mit MDS/MPN-UC zeigten ebenfalls eine sekundäre Myelofibrose, aufgrund der Seltenheit und Heterogenität der Erkrankung ist keine Inzidenz der verschiedenen Arten der Progression bei dieser Entität bekannt. [28] Bei den übrigen untersuchten Entitäten, ET und MPN-UC fand sich kein Fall von sekundärer Myelofibrose. Bei der essentiellen Thrombozythämie ist dies auch in der Literatur als

ausgesprochen seltenes Ereignis beschrieben, mit weniger als 1% nach 10 Jahren Erkrankungsdauer. [160] Bei der unklassifizierbaren myeloproliferativen Erkrankung gilt, dass, wie beim MDS/MPN-UC, aufgrund der Seltenheit und Heterogenität keine Inzidenz der verschiedenen Progressionsarten bekannt ist.

Die häufigste Form der Akzeleration oder Progression stellt die sekundäre Myelodysplasie mit rund 47% der Progressionen (17,3% aller untersuchten Fälle) dar. Mit 30,8% die häufigste Diagnose in der Gruppe des sekundären MDS war die primäre Myelofibrose. 11,8% der untersuchten Fälle mit PMF zeigten eine Akzeleration in diese Richtung. Eine Häufigkeit der sekundären myelodysplastischen Syndrome nach PMF ist nicht bekannt, jedoch ist diese Entität mit einem hohen Risiko einer klonalen Entwicklung verbunden, was sich mit der hohen Inzidenz an leukämischen Transformationen, sowohl im untersuchten Kollektiv, als auch durch frühere Studien zeigt [167] Einen ebenfalls hohen Anteil an dysplastischer Entwicklung zeigten MDS/MPN-UC und ET. Im Verlauf entwickelte eine unklassifizierbare myeloproliferative Erkrankung (MPN-UC) dann noch MDS-typische Zeichen, die Entstehung eines MDS/MPN-UC aus MPN-UC ist bereits beschrieben. [28]

Insgesamt zeigten 6 der 75 untersuchten Patienten den dramatischsten Verlauf einer myeloproliferativen Erkrankung mit Entwicklung einer Leukämie.

Alle Fälle entwickelten eine akute myeloische Leukämie, nicht bei allen Patienten war eine Einteilung nach FAB möglich. Der in unserem Kollektiv am häufigsten diagnostizierte Typ war eine AML FAB-M7 (3 Patienten). Die megakaryoblastäre Leukämie (AML-FAB-M7) gilt als häufigste myeloische Leukämie, die aus einer MPN entsteht. [176] [170] Ein Patient entwickelte eine AML-FAB M5 (Akute Monoblastenleukämie) aus einer primären Myelofibrose. Auch die Entstehung dieser Form der Leukämie aus einer MPN ist bekannt, diese ist jedoch deutlich seltener als die AML-FAB M7 [176] [170].

Bei 4 Patienten entstand die Leukämie aus einer primären Myelofibrose, somit neben der Dysplasie die häufigste Art der Progression bei dieser Entität und mit 11,1% leukämischen Transformationen die Entität mit dem höchsten Risiko der Entwicklung einer Leukämie im untersuchten Kollektiv. Als seltenes Ereignis beschrieben ist die Entwicklung einer Leukämie aus einer essentiellen Thrombozythämie. Mit 2-5% leukämischen Transformationen nach 10 Jahren haben Patienten mit ET von allen MPN das insgesamt geringste Risiko der Entwicklung einer sekundären Leukämie. In un-

serem Kollektiv entwickelte eine Patientin eine akute myeloische Leukämie nach essentieller Thrombozythämie. Beim MDS/MPN-UC wird insgesamt ein hohes Risiko für eine leukämische Transformation angenommen, jedoch ist keine Inzidenz bekannt. Von den 10 untersuchten Patienten mit MDS/MPN-UC war ein Patient progredient in Richtung AML.

4.4 Die Rolle von SRSF2 bei myeloproliferativen Erkrankungen

Aus früheren Studien war bekannt, dass eine *SRSF2*-Mutation einen Risikofaktor für die Progression chronisch myeloproliferativer Erkrankung darstellt. Es wurde insbesondere die Rolle der Mutation in der Progression zu akuten Leukämien untersucht und im Falle eines Mutationsnachweises auch ein erhöhtes Risiko gefunden. [118]

Es wurde außerdem gezeigt, dass etwa 17% der Patienten mit einer primären Myelofibrose eine *SRSF2*-Mutation tragen, bei diesen Patienten wurde insgesamt ein schlechteres Gesamtüberleben und, im Falle der leukämischen Transformation, bei *SRSF2*-mutierten MPN, eine schlechtere Prognose im Vergleich zum *SRSF2*-WT gefunden [116-118]. Jedoch ist auch bekannt, dass die *SRSF2*-Mutation bei der PMF insgesamt in höherer Frequenz vorkommt, auch bei nicht-progredienten Erkrankungen. [117] Aus den Erkenntnissen der Untersuchungen zur primären Myelofibrose ließ sich ableiten, dass es sich bei *SRSF2* um eine früh erworbene somatische Mutation handelt, diese meist schon bei Erstdiagnose nachweisbar ist. [117]

Unsere Untersuchungen zeigten, dass eine *SRSF2*-Mutation statistisch signifikant häufiger bei Patienten mit einer progredienten Erkrankung vorkommt als bei Patienten mit nicht-progredientem Verlauf einer MPN. Die *SRSF2*-Mutation ist deutlich mit der Entwicklung einer Dysplasie assoziiert, 58,3% der Fälle, die eine Entwicklung in Richtung eines sekundären MDS zeigten, waren *SRSF2*-mutiert ($p=0,007$). Umgekehrt, lag bei Nachweis einer *SRSF2*-Mutation, unabhängig vom klinischen Verlauf, zu 54% ein sekundäres myelodysplastisches Syndrom vor.

Diese Tendenz passt auch zur Tatsache, dass 44,4% der MDS/MPN-UC Fälle *SRSF2*-mutiert waren, von denen wiederum 60% progredient waren, 50% mit zunehmender Dysplasie und ein Patient mit leukämischer Transformation. Zur Identifikation einer MDS/MPN-UC ist bislang kein spezifischer genetischer Marker bekannt, in einer kleineren Serie wurde eine Häufung der *JAK2*-Mutation beim MDS vom Typ RARS-T gefunden. [78] In der Gruppe der *overlap*-Syndrome wurde allerdings für

die CMML eine eindeutige Assoziation zur *SRSF2*-Mutation gezeigt, es scheint, dass auch beim MDS/MPN-UC die *SRSF2*-Mutation eine wichtige Rolle spielt.[108]

Interessant ist, dass in unseren Untersuchungen *SRSF2*-Mutationen bei Patienten mit einer Polyzythämia vera nicht vorkamen, ebenso, unabhängig der Grunderkrankung, bei Patienten mit sekundärer Myelofibrose. Hier ist anzunehmen, dass andere Mutationen zur Entstehung der Erkrankung und deren Progression beitragen (insbesondere *JAK2*, s.u.).

In den bislang publizierten Studien zeigt sich ein ähnliches Bild zur Häufigkeit der *SRSF2*-Mutation bei der PV. Mit einer Mutationshäufigkeit von etwa 3 % ist *SRSF2* bei Patienten mit Polyzythämia vera eine sehr seltene Mutation [188], andere Studien zeigten sogar, dass Spliceosom-assoziierte Mutationen bei PV gar nicht vorkommen. [115]

11,4% der untersuchten Fälle einer PMF waren *SRSF2*-mutiert, mit 28,6% *SRSF2*-positiven in der Progress-Gruppe gegenüber 7,1% *SRSF2*-positiven Fälle in der Kontrollgruppe, liegt auch hier eine deutliche Tendenz in Richtung Progression im Falle einer Mutation vor. Diese Tendenz zeigt sich ebenfalls bei der ET (50% mutiert, davon 50% progredient, 3 Patienten mit Entstehung eines MDS, ein Patient mit LT), bei der MPN-UC (40% mutiert, davon 50% progredient in Richtung Dysplasie). Der prozentual hohe Anteil an *SRSF2*-Mutationen bei der ET hängt jedoch sicherlich auch mit der Auswahl und der Größe des Kollektivs mit dem besonderen Fokus auf progrediente Erkrankungen mit Verlaufsbiopsien zusammen.

Es lässt sich festhalten, dass *SRSF2* ein Risikofaktor für die Entstehung einer Progression bei PMF, ET, MPN-UC und MDS/MPN-UC ist. Die Mutation ist ein guter Marker zur Identifizierung einer Dysplasie, sowohl in der Progression einer MPN in Richtung eines sekundären MDS als auch in der Diagnose einer MDS/MPN-UC. Obwohl die pathogenetischen Auswirkungen der *SRSF2*-Mutation bei MPN und MDS noch nicht genau geklärt sind, scheinen Mutationen in der Splicing-Maschinerie eine Dysplasie im Knochenmark zu begünstigen, da diese Mutationen eben typischerweise bei primären und sekundären myelodysplastischen Syndromen und MDS/MPN-*overlap* Syndromen vorkommen.

Die erhobenen Daten zur Rolle von *SRSF2* bei der leukämischen Transformation zeigen, wie schon die bisherigen Studien, dass ein Teil der sekundären Leukämien bei MPN durch *SRSF2*-Mutationen begünstigt sind, in unserem Kollektiv 20%. Diese

Erkrankungen waren in unserem Kollektiv interessanterweise nicht *TP53*-mutiert (s.u). Hier ist natürlich zu betrachten, dass die Anzahl an leukämischen Transformationen im untersuchten Kollektiv insgesamt gering ist.

Die *SRSF2*-Mutation eignet sich schon früh zur Risikostratifizierung myeloproliferativer Erkrankungen, da die Mutation in der Regel zu Beginn der Erkrankung nachweisbar ist und mutierte Erkrankungen eine insgesamt schlechtere Prognose und ein höheres Risiko der Progression, insbesondere in Richtung eines MDS, haben. Zugewinn oder Verlust der Mutation sind untypisch. Mittels RFLP ist der *SRSF2*-Mutationsstatus zuverlässig, schnell und kostengünstig aus dem Knochenmarktrepanat festzustellen, dies wurde für die CMML gezeigt und konnte auch hier bei den verschiedenen MPN-Entitäten, sekundären MDS, MDS/MPN und sekundären akuten myeloischen Leukämien gezeigt werden. [108]

4.5 Die Rolle der *JAK2*-Mutation bei MPN

Die Rate an *JAK2*-V617F-Mutationen lag im gesamten Kollektiv bei 64%, naturgemäß bei der Polyzythämia vera mit 86,7% am höchsten. Mit 75,8% *JAK2*-Mutationen bei der PMF lag die Mutationshäufigkeit etwas über dem in der Literatur angegebenen Wert, bei der ET mit 50% und der MPN-UC mit 60% in etwa im Bereich der bekannten Werte. Beim MDS/MPN-*overlap* Syndrom ist die *JAK2*-Mutation mit 30% relativ selten. Hier ist anzunehmen, dass andere, häufiger vorkommende, Treibermutationen an der Pathogenese dieser Erkrankungen beteiligt sind. Eine solche Treibermutation bei MDS/MPN-UC könnte möglicherweise die *SRSF2*-Mutation darstellen.

In der Gruppe der progredienten myeloproliferativen Erkrankungen war eine *JAK2*-Mutation seltener als der *JAK2*-Wildtyp. Bezogen auf die unterschiedlichen Arten der Progression, gab es in Richtung AML und Fibrose keine wesentlichen Unterschiede in der Häufigkeit von *JAK2*-Mutation und Wildtyp. Bei den Patienten mit sekundärem MDS war der *JAK2*-Wildtyp mit 22,7% gegenüber 14,6% *JAK2*-Mutationen häufiger.

In der Gruppe der Kontrollfälle mit nicht-progredienter Erkrankung zeigte sich der *JAK2*-Mutationsstatus stabil. Insgesamt 3 Patienten mit progredienter MPN hatten hingegen einen *JAK2*-Mutationsverlust, - Zugewinn oder beides.

Ein Zugewinn somatischer Mutationen ist mit einer Progression myeloproliferativer Erkrankungen assoziiert [162], ebenso ist bekannt, dass aus *JAK2*-positiven „Mutterkolonien“, *JAK2*-negative „Tochterkolonien“ entstehen können, die im Sinne einer klonalen Evolution möglicherweise einen Selektionsvorteil haben, somit aus einer

JAK2-mutierten, eine *JAK2*-nicht-mutierte Erkrankung entstehen kann. Diese Entwicklung ist natürlich auch umgekehrt möglich, aus der Erkrankung mit *JAK2*-Wildtypstatus entsteht eine *JAK2*-mutierte Erkrankung. [189, 190] Es zeigt sich, sowohl in den vorherigen Studien, als auch in unserem Kollektiv, dass ein *JAK2*-Mutationsverlust oder -Zugewinn insbesondere bei progredienten Erkrankungen vorkommen.

SRSF2- und *JAK2*- Mutation können gemeinsam vorkommen, häufiger liegt jedoch eine der beiden Mutationen vor. Ebenfalls seltener kommt keine der beiden Mutationen vor. Eine Erklärung könnte sein, dass die *SRSF2*-Mutation als frühe somatische Mutation an der Krankheitsentstehung beteiligt ist, somit zusätzlich zur sogenannten Treibermutation in der Krankheitsentstehung wirkt oder gar als solche wirkt. So wird von Anfang an die Progression der Erkrankung unterstützt, sodass die Krankheit auch ohne das Vorhandensein einer Mutation in einem Gen der Signaltransduktion, wie z.B. der typischen *JAK2*-Mutation, entstehen kann. Diese Beobachtung wurde bei primären MDS bereits gemacht (siehe Kap. 4.6.). [191] [192] [106] Wenn keine Mutation in *JAK2* vorliegt, liegt meist eine der anderen bekannten Treibermutationen vor, zum Beispiel im *CALR*- oder *MPL*-Gen [4]. Zusätzliche Mutationen treten dann, im Sinne einer klonalen Evolution, erst im späteren Verlauf auf. Dies betrifft dann meist Mutationen in anderen Gen-Klassen, beispielsweise in Tumorsuppressor-Genen wie *TP53* [4]. Liegen beide Mutationen, in *SRSF2* und *JAK2*, gemeinsam vor, haben die Betroffenen wahrscheinlich ein höheres Risiko der Progression. Eine Zunahme somatischer Mutationen und zytogenetischer Aberrationen ist mit schlechterem Outcome und größerem Risiko einer Akzeleration und Progression assoziiert. [187] Natürlich können *SRSF2* und *JAK2* alleine nicht die gesamte Pathogenese und Progression myeloproliferativer und myelodysplastischer-myeloproliferativer Neoplasien erklären, dennoch scheinen für einen gewissen Teil der Erkrankungen diese Mutationen entscheidende Rollen zu spielen. Zukünftige Untersuchungen mit modernen Sequenzierungsmethoden, wie zum Beispiel Next-Generation-Sequencing (NGS), werden sicherlich ein noch tiefergehendes Verständnis über Verlauf und Pathogenese dieser Erkrankungen ermöglichen. Am hier dargestellten Kollektiv soll dies durch Folgearbeiten untersucht werden.

4.6 Die Rolle von *TP53* bei der leukämischen Transformation

Es besteht eine Assoziation des p53-pathways mit der leukämischen Transformation myeloproliferativer Erkrankungen. 40-50% der leukämischen Transformationen von MPN sind durch Störung der Tumor-Suppressor-Funktion des *TP53*-Signalwegs verursacht, dies kann sowohl durch Mutationen in *TP53* selbst oder aber durch eine funktionelle Inhibition, beispielsweise über *MDM4* geschehen (s.o.). [115, 141]

Über den zeitlichen Verlauf von *TP53*-Mutationen bei chronisch myeloproliferativen Erkrankungen war bislang wenig bekannt. Da in den meisten Studien keine Verläufe einzelner Patienten dokumentiert waren, ist unklar, ob *TP53* zum Zeitpunkt der Akzeleration mutiert, die Leukämie damit auslöst oder ob eine solche Mutation schon in der chronischen Phase vorliegt und eine Progression „nur“ begünstigt. Im Mausmodell konnte in neueren Studien gezeigt werden, dass durch Ausschalten von *TP53* die leukämische Transformation einer MPN (in der Studie mit der PV untersucht) ausgelöst werden kann. [144]

Bei sich den MPN klinisch ähnlichen verhaltenden chronisch myeloischen und chronisch lymphatischen Leukämien, treten zum Zeitpunkt der Transformation in eine akute Leukämie Mutationen in Schlüsselgenen auf, die zur Progression führen.

Bei der sog. Richter-Transformation der CLL und dem Übergang einer CML in die Blasten-Krise ist bekannt, dass ein solch auslösendes Schlüsselgen *TP53* sein kann. [193, 194] Als elementarer Bestandteil der Zellzyklus-Regulation liegt nahe, dass eine Mutation im *TP53*-Gen, zusammen mit der über die Jahre entstandenen chromosomalen Instabilität der Erkrankungen, die recht indolenten myeloproliferativen Neoplasien in eine hoch aggressive Leukämie verwandeln kann. Durch verschiedene Vorarbeiten war bekannt, dass bei rund 12% der leukämischen Transformationen *TP53*-Mutationen vorliegen (s.o). Durch diese Arbeit sollte der zeitliche Verlauf der *TP53*-Mutationen geklärt werden.

Die immunhistochemische Methode zur Darstellung der p53-Expression von Saft et al. eignet sich gut, eine *TP53*-Mutation festzustellen, eine hohe p53-Expression korreliert mit *TP53*-Mutationen. [147] Im untersuchten Kollektiv erlebten insgesamt zwölf Patienten mit myeloproliferativer Erkrankung eine leukämische Transformation. Von diesen Patienten zeigte die Hälfte eine *TP53* Überexpression (3+).

Bei zwei Patienten lagen frühere Biopsien vor, bei diesen Patienten war in der Phase der nicht-transformierten Erkrankung *TP53* noch nicht überexprimiert.

Ein Patient mit MDS/MPN-UC war ebenfalls *TP53*-überexprimiert, bei diesem Patienten liegt jedoch nur eine Knochenmarkbiopsie vor, sodass über den Verlauf nichts bekannt ist, jedoch kann eine *TP53*-Mutation bereits Ausdruck einer möglichen Akzeleration sein.

Vorarbeiten zeigten, dass die *TP53*-Mutation eher mit einem *JAK2*-Wildtyp assoziiert ist. [118] [145] Diese Assoziation lässt sich an unserem Kollektiv nicht nachvollziehen, es sind in gleicher Anzahl *JAK2*-positive Fälle wie *JAK2*-negative Fälle unter den *TP53*-mutierten. Weiter zu untersuchen ist, ob bei den Patienten mit leukämischer Transformation ohne *TP53*-Mutation, eine funktioneller *TP53*-Verlust, beispielsweise durch *TP53*-Inhibition durch *MDM2* oder sogar durch *JAK2*-V617F vorliegt.

Es ist natürlich zu beachten, dass es sich bei sechs Patienten mit leukämischer Transformation um ein kleines, nicht unbedingt repräsentatives Kollektiv handelt. Die durch Vor-Studien beschriebene Assoziation von *TP53*-Mutation und leukämischer Transformation hat sich jedoch auch in unseren Untersuchungen gezeigt. Außerdem zeigt sich, dass durch das Auftreten einer *TP53*-Mutation, eine akute Leukämie ausgelöst werden kann, was sich auch in neueren Studien auch im Mausmodell gezeigt hat. [144]

Ob *SRSF2*-Mutation und *TP53*-Mutation bei Patienten mit leukämischer Transformation einer MPN tatsächlich nicht gemeinsam vorkommen, sollte, bevor allgemeingültige Aussagen getätigt werden, an einem größeren Kollektiv untersucht werden. Vorbestehende Daten zu primären MDS könnten diese Hypothese jedoch unterstützen. Hier zeigt sich die *SRSF2*-Mutation oftmals „exklusiv“. Zu nahezu allen bekannten Mutationen bei primären myelodysplastischen Syndromen und *SRSF2* besteht eine negative Assoziation, es kommen lediglich *IDH2*-und *SRSF2*-Mutationen häufiger gemeinsam vor. [191] [192] [106] *IDH*-Mutationen stellen bekanntermaßen einen Risikofaktor für leukämische Transformationen von MPN dar [195]. Es wäre denkbar, dass auch bei *SRSF2*-mutierten MPN in Akzeleration die LT durch *IDH2*-Mutationen begünstigt wird, wohingegen beim *SRSF2*-WT beispielsweise *TP53* entscheidend die Transformation vorantreibt.

Um solche Hypothesen zu unterstützen werden jedoch tiefergehende Analysen mit größeren Kollektiven und moderneren Methoden, wie beispielsweise Next-Generation-Sequencing, notwendig sein.

5 Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren wurden bei myeloproliferativen Erkrankungen zahlreiche Mutationen beschrieben, über deren genaue molekulare Mechanismen oder die zeitliche Abfolge, im Sinne einer klonalen Evolution, deren prognostische Wertigkeit sowie deren Korrelation mit Knochenmarkmorphologie und Klinik war jedoch wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Verläufe von myeloproliferativen Erkrankungen und MDS/MPN an sequentiellen Knochenmarkbiopsien untersucht. Es wurde sowohl der morphologische als auch der klinische Verlauf zur Einordnung in Gruppen betrachtet und die Verläufe mit einer Untersuchung von molekularen Mechanismen der Progression, dem zeitlichen Verlauf der Mutationen und möglicher additiver Effekte dieser Mutationen korreliert. Ein besonderer Fokus lag auf der Bedeutung der Mutationen im *SRSF2*- und im *TP53*-Gen.

Die Untersuchungen erfolgten an einem Studienkollektiv von insgesamt 133 Fällen bzw. 75 Patienten, von denen 30 Patienten (37,3%) progredient waren, 45 Patienten (62,7%) eine stabile myeloproliferative Erkrankung (Kontrollgruppe) hatten. Es zeigte sich, dass die *SRSF2*-Mutation signifikant häufiger in der Gruppe der progredienten myeloproliferativen Erkrankungen vorkam, insbesondere bei Progression in Richtung eines MDS. Als frühe somatische Mutation eignet sich die Mutation möglicherweise schon bei Erstdiagnose zur Risikostratifizierung. Ebenso stellt die *SRSF2*-Mutation bei MDS/MPN-UC eine sehr häufige Mutation dar, kann somit als ein mögliches diagnostisches Werkzeug dienen.

Das Auftreten einer *TP53* Überexpression verursacht bei einem Teil der Patienten eine Transformation der MPN in Richtung einer akuten myeloischen Leukämie, es zeigte die in der Literatur beschriebene Tendenz, dass *TP53*-Mutationen erst zum Zeitpunkt einer leukämischen Transformation auftreten.

Im untersuchten Kollektiv kamen *SRSF2*- und starke *TP53* Überexpression als Hinweis auf Mutation nicht gemeinsam vor, *JAK2*- und *SRSF2*-Mutation waren ebenfalls seltener koinzident. Wie durch Vorarbeiten bei der CMML gezeigt, lässt sich mittels RFLP der *SRSF2*-Mutationsstatus zuverlässig und schnell aus dem Knochenmarktrepanat identifizieren, in der vorliegenden Arbeit konnte dies bei den verschiedenen MPN-Entitäten, sekundären MDS, MDS/MPN und sekundären akuten myeloischen Leukämien gezeigt werden. Die immunhistochemische Methode zur Darstellung der

TP53-Überexpression von Saft et al. eignet sich gut um Fälle mit erhöhtem Risiko der Progression am Knochenmarktrepanat festzustellen. [147]

Literatur

1. Fend, F., et al., *Ancillary techniques in bone marrow pathology: molecular diagnostics on bone marrow trephine biopsies*. *Virchows Arch*, 2005. **447**(6): p. 909-19.
2. Visconte, V., et al., *SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts*. *Leukemia*, 2012. **26**(3): p. 542-5.
3. Tenedini, E., et al., *Targeted cancer exome sequencing reveals recurrent mutations in myeloproliferative neoplasms*. *Leukemia*, 2014. **28**(5): p. 1052-9.
4. Papaemmanuil, E., et al., *Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2013. **122**(22): p. 3616-27; quiz 3699.
5. Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. *Blood*, 1993. **81**(11): p. 2844-53.
6. Rosenbauer, F. and D.G. Tenen, *Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(2): p. 105-17.
7. Morrison, S.J., N. Uchida, and I.L. Weissman, *The biology of hematopoietic stem cells*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. **11**: p. 35-71.
8. Kondo, M., et al., *Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 759-806.
9. Mikael Häggström, W.c. *Hematopoiesis simple*. 2017 [cited 2017 09.11]; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Blood_cell_-_/media/File:Hematopoiesis_simple.svg. Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>
10. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. *Blood*, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
11. Laszlo, J., *Myeloproliferative disorders (MPD): myelofibrosis, myelosclerosis, extramedullary hematopoiesis, undifferentiated MPD, and hemorrhagic thrombocytopenia*. *Semin Hematol*, 1975. **12**(4): p. 409-32.
12. Peter J. Campbell, A.R.G., *Mechanisms of Disease - The Myeloproliferative Disorders*. *N Engl J Med*, 2006. **355**: p. 2452-2466.
13. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. *Blood*, 2009. **114**(5): p. 937-51.
14. Dameshek, W., *Editorial: Some Speculations on the Myeloproliferative Syndromes*. *Blood*, 1951. **6**(4): p. 372-375.
15. Hebeda, K.M. and F. Fend, *Changed concepts and definitions of myeloproliferative neoplasms (MPN), myelodysplastic syndromes (MDS) and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in the updated 2008 WHO classification*. *J Hematop*, 2009. **2**(4): p. 205-10.
16. Barbui, T., et al., *The 2016 revision of WHO classification of myeloproliferative neoplasms: Clinical and molecular advances*. *Blood Rev*, 2016. **30**(6): p. 453-459.
17. Delhommeau, F., et al., *Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(24): p. 2939-53.
18. Levine, R.L., et al., *Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(9): p. 673-83.
19. Thiele, J. and H.M. Kvasnicka, *Clinicopathological criteria for differential diagnosis of thrombocytopenias in various myeloproliferative disorders*. *Semin Thromb Hemost*, 2006. **32**(3): p. 219-30.
20. Thiele, J., et al., *Histomorphometry of bone marrow biopsies in primary osteomyelofibrosis/sclerosis (agnogenic myeloid metaplasia)--correlations between clinical and morphological features*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1989. **415**(3): p. 191-202.
21. Baxter, E.J., et al., *Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders*. *Lancet*, 2005. **365**(9464): p. 1054-61.
22. Vainchenker, W., et al., *New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms*. *Blood*, 2011. **118**(7): p. 1723-35.
23. Tefferi, A., J. Thiele, and J.W. Vardiman, *The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos*. *Cancer*, 2009. **115**(17): p. 3842-7.

24. Malcovati, L., et al., Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2011. **118**(24): p. 6239-46.
25. Tefferi, A. and J.W. Vardiman, Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*, 2009. **361**(19): p. 1872-85.
26. Stone, R.M., How I treat patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2009. **113**(25): p. 6296-303.
27. Bejar, R. and D.P. Steensma, Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2014. **124**(18): p. 2793-803.
28. Mughal, T.I., et al., An International MDS/MPN Working Group's perspective and recommendations on molecular pathogenesis, diagnosis and clinical characterization of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, 2015. **100**(9): p. 1117-30.
29. Foucar, K., Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Am J Clin Pathol*, 2009. **132**(2): p. 281-9.
30. Shaw, G.R., Ringed sideroblasts with thrombocytosis: an uncommon mixed myelodysplastic/myeloproliferative disease of older adults. *Br J Haematol*, 2005. **131**(2): p. 180-4.
31. Löffler, H.H., Torsten, Hämatologische Erkrankungen : Atlas und diagnostisches Handbuch / von Helmut Löffler, Torsten Haferlach. Vol. 2. 2013.
32. Torsten Haferlach, U.B., Harald Thiel, Heinz Diem, Taschenatlas Hämatologie. Vol. 6. 2012.
33. Bennett, J.M., et al., Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 1976. **33**(4): p. 451-8.
34. Berger, E., Mertelsmann, DAS ROTE BUCH - Hämatologie und Internistische Onkologie. Vol. 3. Auflage. 2006.
35. Colaizzo, D., et al., The JAK2 V617F mutation frequently occurs in patients with portal and mesenteric venous thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(1): p. 55-61.
36. Eva Lengfelder, M.G., Petro E. Petrides. Myeloproliferative Neoplasien (MPN) (früher: Chronische Myeloproliferative Erkrankungen (CMPE)). 2017 [cited 2017 18.04]; Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/myeloproliferative-neoplasien-mpn-frueher-chronische-myeloproliferative-erkrankungen-cmpe/@@view/html/index.html>.
37. Michiels, J.J., et al., The paradox of platelet activation and impaired function: platelet-von Willebrand factor interactions, and the etiology of thrombotic and hemorrhagic manifestations in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost*, 2006. **32**(6): p. 589-604.
38. Tefferi, A. and T. Barbui, Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*, 2015. **90**(2): p. 162-73.
39. Broccia, G., et al., Hematological malignancies in the island of Sardinia, 1974-1993: age and sex distributions and temporal changes in incidence. *Hematol Oncol*, 2004. **22**(3): p. 91-109.
40. Johansson, P., et al., Trends in the incidence of chronic Philadelphia chromosome negative (Ph-) myeloproliferative disorders in the city of Goteborg, Sweden, during 1983-99. *J Intern Med*, 2004. **256**(2): p. 161-5.
41. Nennecke, A., A. Wienecke, and K. Kraywinkel, [Leukemia incidence and survival in Germany according to current standardized categories]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2014. **57**(1): p. 93-102.
42. Radivoyevitch, T., et al., Sex differences in the incidence of chronic myeloid leukemia. *Radiat Environ Biophys*, 2014. **53**(1): p. 55-63.
43. Huang, X., J. Cortes, and H. Kantarjian, Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer*, 2012. **118**(12): p. 3123-7.
44. Anderson, L.A. and M.F. McMullin, Epidemiology of MPN: what do we know? *Curr Hematol Malig Rep*, 2014. **9**(4): p. 340-9.
45. Tefferi, A., et al., Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia*, 2013. **27**(9): p. 1874-81.
46. Mehta, J., et al., Epidemiology of myeloproliferative neoplasms in the United States. *Leuk Lymphoma*, 2014. **55**(3): p. 595-600.

47. M V Vodoff, N.P., J P Vannier, F Freycon, D Valla, M Nenadov-Beck and B Nelken, POLYCYTHEMIA VERA (PV) IN CHILDHOOD : REPORT ON SEVEN CASES. *Pediatric Research*, 1997. **41**.
48. Reid, M.M., P.W. Saunders, and J. Kernahan, Myeloproliferative disease in children: a demographic study. *J Clin Pathol*, 1988. **41**(8): p. 883-5.
49. Craft, A.W., et al., The Northern region Children's malignant disease registry 1968-82: incidence and survival. *Br J Cancer*, 1987. **56**(6): p. 853-8.
50. Murphy, F., et al., Body size in relation to incidence of subtypes of haematological malignancy in the prospective Million Women Study. *Br J Cancer*, 2013. **108**(11): p. 2390-8.
51. Larsson, S.C. and A. Wolk, Overweight and obesity and incidence of leukemia: a meta-analysis of cohort studies. *Int J Cancer*, 2008. **122**(6): p. 1418-21.
52. Leal, A.D., et al., Anthropometric, medical history and lifestyle risk factors for myeloproliferative neoplasms in the Iowa Women's Health Study cohort. *Int J Cancer*, 2014. **134**(7): p. 1741-50.
53. Kabat, G.C., et al., Lifestyle and dietary factors in relation to risk of chronic myeloid leukemia in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. **22**(5): p. 848-54.
54. Anderson, L.A., et al., Environmental, lifestyle, and familial/ethnic factors associated with myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol*, 2012. **87**(2): p. 175-82.
55. Mele, A., et al., Risk factors for essential thrombocythemia: A case-control study. Italian Leukemia Study Group. *Cancer*, 1996. **77**(10): p. 2157-61.
56. Hsu, W.L., et al., The incidence of leukemia, lymphoma and multiple myeloma among atomic bomb survivors: 1950-2001. *Radiat Res*, 2013. **179**(3): p. 361-82.
57. Magnussen, K., et al., Characterization of blood donors with high haemoglobin concentration. *Vox Sang*, 2013. **104**(2): p. 110-4.
58. Thiele, J. and H.M. Kvasnicka, Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification systems (PVSG, WHO) on 839 patients. *Ann Hematol*, 2003. **82**(3): p. 148-52.
59. Pearson, T.C., Diagnosis and classification of erythrocytoses and thrombocytoses. *Baillieres Clin Haematol*, 1998. **11**(4): p. 695-720.
60. Najean, Y., F. Triebel, and C. Dresch, Pure erythrocytosis: reappraisal of a study of 51 cases. *Am J Hematol*, 1981. **10**(2): p. 129-36.
61. Westwood, N., et al., Primary polycythaemia: diagnosis by non-conventional positive criteria. *Eur J Haematol*, 1993. **51**(4): p. 228-32.
62. Bartl, R., B. Frisch, and W. Wilmanns, Potential of bone marrow biopsy in chronic myeloproliferative disorders (MPD). *Eur J Haematol*, 1993. **50**(1): p. 41-52.
63. Dickstein, J.I. and J.W. Vardiman, Issues in the pathology and diagnosis of the chronic myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol*, 1993. **99**(4): p. 513-25.
64. Georgii, A., G. Buesche, and A. Kreft, The histopathology of chronic myeloproliferative diseases. *Baillieres Clin Haematol*, 1998. **11**(4): p. 721-49.
65. Thiele, J. and H.M. Kvasnicka, Diagnostic impact of bone marrow histopathology in polycythemia vera (PV). *Histol Histopathol*, 2005. **20**(1): p. 317-28.
66. Buhr, T., A. Georgii, and H. Choritz, Myelofibrosis in chronic myeloproliferative disorders. Incidence among subtypes according to the Hannover Classification. *Pathol Res Pract*, 1993. **189**(2): p. 121-32.
67. Georgii, A., et al., Classification and staging of Ph-negative myeloproliferative disorders by histopathology from bone marrow biopsies. *Leuk Lymphoma*, 1996. **22 Suppl 1**: p. 15-29.
68. Thiele, J., H.M. Kvasnicka, and J. Vardiman, Bone marrow histopathology in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders: a forgotten pearl. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2006. **19**(3): p. 413-37.
69. Van Dyke, D., et al., Markedly increased bone blood flow in myelofibrosis. *J Nucl Med*, 1971. **12**(7): p. 506-12.
70. Thiele, J., et al., Vascular architecture and collagen type IV in primary myelofibrosis and polycythaemia vera: an immunomorphometric study on trephine biopsies of the bone marrow. *Br J Haematol*, 1992. **80**(2): p. 227-34.

71. Wolf, B.C. and R.S. Neiman, Myelofibrosis with myeloid metaplasia: pathophysiologic implications of the correlation between bone marrow changes and progression of splenomegaly. *Blood*, 1985. **65**(4): p. 803-9.
72. Thiele, J., et al., Agnogenic myeloid metaplasia (AMM)--correlation of bone marrow lesions with laboratory data: a longitudinal clinicopathological study on 114 patients. *Hematol Oncol*, 1989. **7**(5): p. 327-43.
73. Tefferi, A., Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med*, 2000. **342**(17): p. 1255-65.
74. Cervantes, F., et al., Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br J Haematol*, 1998. **102**(3): p. 684-90.
75. Thiele, J., et al., Dynamics of fibrosis in chronic idiopathic (primary) myelofibrosis during therapy: a follow-up study on 309 patients. *Leuk Lymphoma*, 2003. **44**(6): p. 949-53.
76. Florena, A.M., et al., Value of bone marrow biopsy in the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica*, 2004. **89**(8): p. 911-9.
77. Orazi, A. and U. Germing, The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia*, 2008. **22**(7): p. 1308-19.
78. Szpurka, H., et al., Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood*, 2006. **108**(7): p. 2173-81.
79. Deininger, M.W., J.M. Goldman, and J.V. Melo, The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2000. **96**(10): p. 3343-56.
80. Levine, R.L., et al., Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 2005. **7**(4): p. 387-97.
81. JAK2, Janus kinase 2 Gene Info pubmed. [cited 2017 18.4]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3717>.
82. Kralovics, R., et al., A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, 2005. **352**(17): p. 1779-90.
83. James, C., et al., A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, 2005. **434**(7037): p. 1144-8.
84. Smith, C.A. and G. Fan, The saga of JAK2 mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Hum Pathol*, 2008. **39**(6): p. 795-810.
85. Drachman, J.G., J.D. Griffin, and K. Kaushansky, The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. *J Biol Chem*, 1995. **270**(10): p. 4979-82.
86. Argetsinger, L.S., et al., Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell*, 1993. **74**(2): p. 237-44.
87. Witthuhn, B.A., et al., JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*, 1993. **74**(2): p. 227-36.
88. Parganas, E., et al., Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 385-95.
89. Ward, A.C., I. Touw, and A. Yoshimura, The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*, 2000. **95**(1): p. 19-29.
90. Harpur, A.G., et al., JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene*, 1992. **7**(7): p. 1347-53.
91. Neubauer, H., et al., Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 397-409.
92. Silvennoinen, O., et al., Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(18): p. 8429-33.
93. Scott, L.M., et al., JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*, 2007. **356**(5): p. 459-68.
94. Ding, J., et al., Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*, 2004. **103**(11): p. 4198-200.

95. Teofili, L., et al., Markers of myeloproliferative diseases in childhood polycythemia vera and essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(9): p. 1048-53.
96. Pikman, Y., et al., MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*, 2006. **3**(7): p. e270.
97. Pancrazzi, A., et al., A sensitive detection method for MPLW515L or MPLW515K mutation in chronic myeloproliferative disorders with locked nucleic acid-modified probes and real-time polymerase chain reaction. *J Mol Diagn*, 2008. **10**(5): p. 435-41.
98. Ma, W., et al., MPL mutation profile in JAK2 mutation-negative patients with myeloproliferative disorders. *Diagn Mol Pathol*, 2011. **20**(1): p. 34-9.
99. SF3B1 splicing factor 3 Gene Info pubmed. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23451> [cited 2017 18.05]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23451>.
100. Wahl, M.C., C.L. Will, and R. Luhrmann, The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, 2009. **136**(4): p. 701-18.
101. Chen, M. and J.L. Manley, Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(11): p. 741-54.
102. Black, D.L., Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 2003. **72**: p. 291-336.
103. PubMed. SRSF2, serine and arginine rich splicing factor 2. 2017 [cited 2017 10.11]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6427>.
104. David, C.J. and J.L. Manley, Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev*, 2010. **24**(21): p. 2343-64.
105. Pajares, M.J., et al., Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol*, 2007. **8**(4): p. 349-57.
106. Yoshida, K., et al., Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 2011. **478**(7367): p. 64-9.
107. Makishima, H., et al., Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*, 2012. **119**(14): p. 3203-10.
108. Federmann, B., et al., The detection of SRSF2 mutations in routinely processed bone marrow biopsies is useful in the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia. *Hum Pathol*, 2014. **45**(12): p. 2471-9.
109. Wang, L., et al., SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2011. **365**(26): p. 2497-506.
110. Hanssens, K., et al., SRSF2-p95 hotspot mutation is highly associated with advanced forms of mastocytosis and mutations in epigenetic regulator genes. *Haematologica*, 2014. **99**(5): p. 830-5.
111. Long, J.C. and J.F. Caceres, The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J*, 2009. **417**(1): p. 15-27.
112. Meggendorfer, M., et al., SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood*, 2012. **120**(15): p. 3080-8.
113. Sateesh Kunigal , X.R., Jeffrey S. Painter , Rainer Metcalf , Joseph Johnson , Ling Zhang , Jeffrey E Lancet , Rami S Komrokji , Kenyon Daniels , Alan List , Pearlie K Epling-Burnette SRSF2 Mutations Impair Nuclear Aggregation and Represent a Novel Mechanism Of Spliceosomal Dysregulation In CMML. *Blood*, 2013. **122** (22): p. 260.
114. Wassie, E., et al., A compendium of cytogenetic abnormalities in myelofibrosis: molecular and phenotypic correlates in 826 patients. *Br J Haematol*, 2015. **169**(1): p. 71-6.
115. Vainchenker, W. and R. Kralovics, Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2017. **129**(6): p. 667-679.
116. Lasho, T.L., et al., SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood*, 2012. **120**(20): p. 4168-71.
117. Lehmann, U., et al., SRSF2 mutation is present in the hypercellular and prefibrotic stage of primary myelofibrosis. *Blood*, 2013. **121**(19): p. 4011-2.
118. Zhang, S.J., et al., Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood*, 2012. **119**(19): p. 4480-5.

119. Tefferi, A., et al., *IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F*. *Leukemia*, 2012. **26**(3): p. 475-80.
120. Delhommeau, F., et al., *Mutation in TET2 in myeloid cancers*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(22): p. 2289-301.
121. Pardanani, A., et al., *IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms*. *Leukemia*, 2010. **24**(6): p. 1146-51.
122. Abdel-Wahab, O., et al., *DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms*. *Leukemia*, 2011. **25**(7): p. 1219-20.
123. Zhao, S., et al., *Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha*. *Science*, 2009. **324**(5924): p. 261-5.
124. Ward, P.S., et al., *The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(3): p. 225-34.
125. Gross, S., et al., *Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations*. *J Exp Med*, 2010. **207**(2): p. 339-44.
126. Dang, L., et al., *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate*. *Nature*, 2010. **465**(7300): p. 966.
127. Ernst, T., et al., *Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders*. *Nat Genet*, 2010. **42**(8): p. 722-6.
128. Carbuccia, N., et al., *Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms*. *Leukemia*, 2009. **23**(11): p. 2183-6.
129. Harada, H., et al., *Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2003. **101**(2): p. 673-80.
130. Ding, Y., et al., *AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms*. *Blood*, 2009. **114**(25): p. 5201-5.
131. Jager, R., et al., *Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms*. *Leukemia*, 2010. **24**(7): p. 1290-8.
132. Georgopoulos, K., D.D. Moore, and B. Derfler, *Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment*. *Science*, 1992. **258**(5083): p. 808-12.
133. Winandy, S., P. Wu, and K. Georgopoulos, *A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma*. *Cell*, 1995. **83**(2): p. 289-99.
134. Wang, J.H., et al., *Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation*. *Immunity*, 1996. **5**(6): p. 537-49.
135. Iacobucci, I., et al., *Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP)*. *Blood*, 2009. **114**(10): p. 2159-67.
136. Mullighan, C.G., et al., *JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(23): p. 9414-8.
137. Lacronique, V., et al., *A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia*. *Science*, 1997. **278**(5341): p. 1309-12.
138. Vousden, K.H. and C. Prives, *Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53*. *Cell*, 2009. **137**(3): p. 413-31.
139. Brosh, R. and V. Rotter, *When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(10): p. 701-13.
140. Vogelstein, B. *p53 : The Most Frequently Altered Gene in Human Cancers*. 2010.
141. Harutyunyan, A., et al., *p53 lesions in leukemic transformation*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(5): p. 488-90.
142. Laurie, N.A., et al., *Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma*. *Nature*, 2006. **444**(7115): p. 61-6.

143. Courtier, F., et al., Genomic analysis of myeloproliferative neoplasms in chronic and acute phases. *Haematologica*, 2017. **102**(1): p. e11-e14.
144. Tsuruta-Kishino, T., et al., Loss of p53 induces leukemic transformation in a murine model of Jak2 V617F-driven polycythemia vera. *Oncogene*, 2017. **36**(23): p. 3300-3311.
145. Beer, P.A., et al., Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood*, 2010. **115**(14): p. 2891-900.
146. Nakatake, M., et al., JAK2(V617F) negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via La expression in myeloproliferative neoplasms. *Oncogene*, 2012. **31**(10): p. 1323-33.
147. Saft, L., et al., p53 protein expression independently predicts outcome in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes with del(5q). *Haematologica*, 2014. **99**(6): p. 1041-9.
148. Wang, W.A., J. Groenendyk, and M. Michalak, Calreticulin signaling in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. **44**(6): p. 842-6.
149. Michalak, M., et al., Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J*, 2009. **417**(3): p. 651-66.
150. Gold, L.I., et al., Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J*, 2010. **24**(3): p. 665-83.
151. Luo, B. and A.S. Lee, The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*, 2013. **32**(7): p. 805-18.
152. Porcellini, S., et al., Regulation of peripheral T cell activation by calreticulin. *J Exp Med*, 2006. **203**(2): p. 461-71.
153. Yoon, G.S., et al., Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2000. **60**(4): p. 1117-20.
154. Helbling, D., et al., CFBF-SMMHC is correlated with increased calreticulin expression and suppresses the granulocytic differentiation factor CEBPA in AML with inv(16). *Blood*, 2005. **106**(4): p. 1369-75.
155. Du, X.L., et al., Proteomic profiling of proteins dysregulated in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. *J Mol Med (Berl)*, 2007. **85**(8): p. 863-75.
156. Nangalia, J., et al., Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*, 2013. **369**(25): p. 2391-405.
157. Czader, M. and A. Orazi, Acute Myeloid Leukemia and Other Types of Disease Progression in Myeloproliferative Neoplasms. *Am J Clin Pathol*, 2015. **144**(2): p. 188-206.
158. Michiels, J.J., et al., Diagnosis and treatment of polycythemia vera and possible future study designs of the PVSG. *Leuk Lymphoma*, 2000. **36**(3-4): p. 239-53.
159. Thiele, J. and H.M. Kvasnicka, Myelofibrosis in chronic myeloproliferative disorders--dynamics and clinical impact. *Histol Histopathol*, 2006. **21**(12): p. 1367-78.
160. Barbui, T., et al., Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(23): p. 3179-84.
161. Boiocchi, L., et al., Morphologic and cytogenetic differences between post-polycythemic myelofibrosis and primary myelofibrosis in fibrotic stage. *Mod Pathol*, 2013. **26**(12): p. 1577-85.
162. Lundberg, P., et al., Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2014. **123**(14): p. 2220-8.
163. Barosi, G., et al., Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia*, 2008. **22**(2): p. 437-8.
164. Dingli, D., et al., Der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3): a specific cytogenetic abnormality in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*, 2005. **130**(2): p. 229-32.
165. Heaney, M.L. and G. Soriano, Acute myeloid leukemia following a myeloproliferative neoplasm: clinical characteristics, genetic features and effects of therapy. *Curr Hematol Malig Rep*, 2013. **8**(2): p. 116-22.
166. Byrd, J.C., et al., Extramedullary myeloid cell tumors in acute nonlymphocytic leukemia: a clinical review. *J Clin Oncol*, 1995. **13**(7): p. 1800-16.

167. Bjorkholm, M., et al., Treatment-related risk factors for transformation to acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in myeloproliferative neoplasms. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(17): p. 2410-5.
168. Tam, C.S., et al., Dynamic model for predicting death within 12 months in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(33): p. 5587-93.
169. Huang, J., et al., Risk factors for leukemic transformation in patients with primary myelofibrosis. *Cancer*, 2008. **112**(12): p. 2726-32.
170. Mesa, R.A., et al., Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood*, 2005. **105**(3): p. 973-7.
171. Finazzi, G., et al., Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood*, 2005. **105**(7): p. 2664-70.
172. Rossi, D. and G. Gaidano, Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol Oncol*, 2009. **27**(1): p. 1-10.
173. Kundra, M.N., R. Tibes, and R.A. Mesa, Transformation of a chronic myeloproliferative neoplasm to acute myelogenous leukemia: does anything work? *Curr Hematol Malig Rep*, 2012. **7**(1): p. 78-86.
174. Campbell, P.J. and A.R. Green, The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, 2006. **355**(23): p. 2452-66.
175. Ohanian, M., et al., Acute lymphoblastic leukemia arising in post-polycythemic myelofibrosis: a rare entity. *Leuk Lymphoma*, 2012. **53**(9): p. 1839-41.
176. Abdulkarim, K., et al., AML transformation in 56 patients with Ph- MPD in two well defined populations. *Eur J Haematol*, 2009. **82**(2): p. 106-11.
177. Ellis, J.T., et al., Studies of the bone marrow in polycythemia vera and the evolution of myelofibrosis and second hematologic malignancies. *Semin Hematol*, 1986. **23**(2): p. 144-55.
178. Horn, T., et al., Detection of the activating JAK2 V617F mutation in paraffin-embedded trephine bone marrow biopsies of patients with chronic myeloproliferative diseases. *J Mol Diagn*, 2006. **8**(3): p. 299-304.
179. Gilbert, M.T., et al., The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One*, 2007. **2**(6): p. e537.
180. Gillio-Tos, A., et al., Efficient DNA extraction from 25-year-old paraffin-embedded tissues: study of 365 samples. *Pathology*, 2007. **39**(3): p. 345-8.
181. van Dongen, J.J., et al., Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 2003. **17**(12): p. 2257-317.
182. Biotium PAGE Gel Stains: <https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/10/PAGE-Gel-Stains-GR-GG-flyer.pdf>. [cited 2016 25.09].
183. Allred, D.C., et al., Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1993. **85**(3): p. 200-6.
184. Elledge, R.M., et al., Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1993. **26**(3): p. 225-35.
185. Chang, H., et al., Aberrant nuclear p53 protein expression detected by immunohistochemistry is associated with hemizygous P53 deletion and poor survival for multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2007. **138**(3): p. 324-9.
186. Valent, P., et al., Standards and impact of hematopathology in myelodysplastic syndromes (MDS). *Oncotarget*, 2010. **1**(7): p. 483-96.
187. Kim, Y., et al., Genetic-pathologic characterization of myeloproliferative neoplasms. *Exp Mol Med*, 2016. **48**: p. e247.
188. Ayalew Tefferi, T.L.L., Paola Guglielmelli, Christy M. Finke, Giada Rotunno, Yoseph Elala, Annalisa Pacilli, Curtis A. Hanson, Alessandro Pancrazzi, Rhett P. Ketterling, Carmela Mannarelli, Daniela Barraco, Tiziana Fanelli, Animesh Pardani, Naseema Gangat, Alessandro M. Vannucchi, Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Advances* 2016. **Nov**.
189. Beer, P.A., et al., Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones. *Br J Haematol*, 2009. **144**(6): p. 904-8.

190. Campbell, P.J., et al., Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*, 2006. **108**(10): p. 3548-55.
191. Pellagatti, A., et al., Targeted resequencing analysis of 31 genes commonly mutated in myeloid disorders in serial samples from myelodysplastic syndrome patients showing disease progression. *Leukemia*, 2016. **30**(1): p. 247-50.
192. Haferlach, T., et al., Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 2014. **28**(2): p. 241-7.
193. Kokate, P., R. Dalvi, and S. Mandava, A complex three-way translocation with deletion of the TP53 gene in a blast crisis chronic myeloid leukemia patient. *J Cancer Res Ther*, 2015. **11**(4): p. 1037.
194. Jain, N. and M.J. Keating, Richter transformation of CLL. *Expert Rev Hematol*, 2016. **9**(8): p. 793-801.
195. Green, A. and P. Beer, Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*, 2010. **362**(4): p. 369-70.

Verzeichnis von Abbildungen und Tabellen

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Konzept der Hämatopoese nach Weissman [6], Bilder der hämatopoetischen und Blutzellen aus [9]	12
Abb. 2: Einteilung der myeloproliferativen Erkrankungen nach [18]: Bilder der Blutzellen aus [9].....	15
Abb. 3: PV in einer frühen Phase, mit freundlicher Genehmigung von Professor Dr. F. Fend.....	22
Abb. 4: Primäre Myelofibrose, mit freundlicher Genehmigung von Professor Dr. F. Fend.....	24
Abb. 5: Essentielle Thrombozythämie, mit freundlicher Genehmigung von Professor Dr. F. Fend.	25
Abb. 6: Exemplarische Darstellung: Post-PV Myelofibrose (Patient 62).....	43
Abb. 7: Exemplarische Darstellung: Akzeleration einer PV zu einem sekundären MDS (Patient 137)	44
Abb. 8: Exemplarische Darstellung: Progression eines MPN/MDS-UC zur einer AML (Patient 139)...	45
Abb. 9: Exemplarische Darstellung der RFLP-Analyse: Fragmentlängen <i>SRSF2</i> Wildtyp (WT) und Mutation (Mut), links: Länge der Fragmente in Basenpaaren (bp), RFLP mit BsaJI.....	58
Abb. 10: Zusammensetzung des Patientenkollektivs	62
Abb. 11: Überblick über die Arten der Progression	66
Abb. 12: Verteilung der p53-Expression in allen Gruppen	74

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1 WHO-Klassifikation der myeloischen Neoplasien und akuten Leukämien (2016); nach [10]....	13
Tab. 2: Charakterisierung der myeloproliferativen Neoplasien nach [34] [36].....	19
Tab. 3: Epidemiologie MPN, Werte nach [44] [45] [46]	20
Tab. 4: WHO Kriterien der Knochenmarkfibrose aus [31]	23
Tab. 5: Diagnostische Kriterien für MDS/MPN-UC: nach [77]	26
Tab. 6, 7 & 8: WHO-Kriterien zur Diagnose einer MPN; nach [10]	38
Tab. 9: Diagnostische Kriterien für eine post-PV Myelofibrose nach [163]	40
Tab. 10: Diagnostische Kriterien für eine post-ET Myelofibrose nach [163].....	41
Tab. 11: Zusammensetzung Primer - Mix für PCR zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA ..	53
Tab. 12: Reagenzien für die für PCR zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA.....	54
Tab. 13: PCR-Programm zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA.....	54
Tab. 14: Reagenzien 1. Semi-nested PCR.....	56
Tab. 15: PCR-Programm, Semi-nested-PCR Schritt 1.....	56
Tab. 16: Zusammensetzung Semi – nested PCR Schritt 2	57
Tab. 17: PCR-Programm semi-nested PCR Schritt 2	57
Tab. 18: Einteilung der Gruppen des Studienkollektivs.....	62
Tab. 19: Zusammensetzung der Gruppen des Studienkollektivs	63
Tab. 20: Übersicht über die reklassifizierten Fälle	64
Tab. 21: Alters- und Geschlechterverteilung des Studienkollektivs	65

Tab. 22: Zusammenhang zwischen Diagnose und <i>SRSF2</i> -Mutationsstatus (Patienten mit und ohne Progression der Erkrankung)	67
Tab. 23: Häufigkeit der <i>SRSF2</i> -Mutation abhängig von der Diagnose bei Patienten mit progredienter Erkrankung.	68
Tab. 24: Häufigkeit der <i>SRSF2</i> -Mutation abhängig von der Diagnose bei Patienten mit stabiler Erkrankung.	68
Tab. 25: <i>SRSF2</i> -Mutationsstatus im Zusammenhang mit der Art der Progression	69
Tab. 26: Einfluss von <i>SRSF2</i> auf die Art der Progression	69
Tab. 27: Einfluss von <i>SRSF2</i> auf Progression und die Art der Progression.....	70
Tab. 28: Zeitlicher Verlauf der <i>SRSF2</i> Mutation.....	71
Tab. 29: Mutationsstatus <i>JAK2</i> , gesamtes Kollektiv	71
Tab. 30: <i>JAK2</i> Mutationsstatus abhängig von der Diagnose.....	71
Tab. 31: Häufigkeit der <i>JAK2</i> -Mutation bei progredienter / nicht-progredienter Erkrankung.....	72
Tab. 32: Zeitlicher Verlauf der <i>JAK2</i> -Mutation bei Patienten mit seriellen Biopsien	72
Tab. 33: Assoziation <i>JAK2</i> und <i>SRSF2</i>	72
Tab. 34: Positive p53-Expression und klinischer Verlauf.....	75
Tab. 35: Korrelation des klinischen Verlaufs mit der p53-Expression	76

Erklärungen zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie und Neuropathologie in der Abteilung Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie unter Betreuung von Herr Professor Dr. F. Fend durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herr Professor Dr. F. Fend.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. I. Bonzheim, Frau Dr. J. Steinhilber und Frau J. Schmitt von mir eigenständig durchgeführt. Die *TP53*-immunhistochemischen Untersuchungen, sowie die *JAK2*-Analyse wurden im Rahmen der Routine-Diagnostik durch das Laborpersonal durchgeführt. Vier Fälle waren bereits durch Hr. Dr. M. Abele in einer Vorarbeit auf das Vorliegen einer *SRSF2*-Mutation untersucht worden, hier wurde auf eine erneute Untersuchung des Mutationsstatus verzichtet.

Die Revision und histopathologische Reklassifizierung erfolgte durch Professor Dr. F. Fend in meinem Beisein.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie durch Fr. Dr. B. Federmann und mich.

Histologische Bilder der drei klassischen myeloproliferativen Erkrankungen wurden mir durch Hr. Professor Fend freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Abb.1 und Abb. 2 sind an die Darstellungen aus den genannten Publikationen angelehnt. Die histologischen Bilder in den Abbildungen 6, 7 und 8 stammen aus dem untersuchten Kollektiv und wurden durch Fr. Dr. Federmann aufgenommen.

Ich versichere, das Manuskript nach Anleitung durch Herrn Professor Dr. F. Fend, Frau Dr. B. Federmann und Frau Dr. I. Bonzheim selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 04.12.2017

Tim Flaadt

Danksagung

An erste Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. F. Fend danken. Er hat mich vom Beginn meiner Arbeit hervorragend betreut, seine stets offene Tür hat es mir immer ermöglicht den aktuellen Stand, kleinere und größere Probleme und die weitere Planung des Projekts zu besprechen. Es war unglaublich lehrreich und begeisternd mit ihm gemeinsam die histopathologische Reklassifizierung durchzuführen und hat sicherlich zu meinem Entschluss der Arbeit in der Hämatologie und Onkologie beigetragen. Bei der Erstellung der Arbeit hat seine riesige Erfahrung noch für zahlreiche entscheidende Hinweise und Verbesserungen gesorgt.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Birgit Federmann. Insbesondere bei der Erhebung der klinischen Daten, der statistischen Auswertung und der Erstellung der Dissertationsschrift war sie mir eine sehr große Hilfe. Auch sie hatte immer ein offenes Ohr für mich und hat mich stets mit Tipps und Tricks für die Dissertation versorgt. Nicht weniger möchte ich Frau Dr. Irina Bonzheim danken. Auch sie hat mich während der meiner gesamten Zeit im Institut betreut. Sie führte mich in die Laborarbeit ein, hatte immer Zeit für Fragen oder Hilfestellungen und hat stets die erhobenen Ergebnisse mit mir besprochen. Daneben war sie bei der Erstellung dieser Arbeit eine große Hilfe.

Als weitere Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe möchte ich besonders Frau Dr. Julia Steinhilber ganz herzlich danken. Sie hat mich insbesondere bei der praktischen Arbeit im Labor unterstützt und mir das „Handwerkszeug“ für die Laborarbeit beigebracht.

Daneben möchte ich allen Mitarbeitern aus der Routinediagnostik des Instituts für Pathologie danken, die mir schnell und unkompliziert mit Leerschnitten, immunhistochemischen Färbungen und allen möglichen Problemen und Fragen des Alltags ausgeholfen haben, ohne sie wäre die Arbeit nicht möglich gewesen, vielen Dank dafür.

Meinen Eltern, die mich immer in allen meinen Plänen und Wünschen unterstützt haben und stets gefördert haben, bin ich unendlich dankbar und widme ihnen diese Arbeit.