

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der
Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

**Die Rolle der aktivierenden Mutation JAK 2 V617F bei
chronisch-myeloproliferativen Syndromen**

Thomas Horn

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prüfer der Dissertation:

- Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
1. Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler
2. Priv.-Doz. Dr. N. Chr. C. von Bubnoff

Die Dissertation wurde am 26.2.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.7.2009 angenommen.

MEINER FAMILIE GEWIDMET

1. EINLEITUNG	6
1.1. Myeloproliferative Syndrome	6
<i>Polycythaemia vera</i>	7
<i>Essentielle Thrombozythämie</i>	8
<i>Osteomyelofibrose</i>	9
1.2. Myelodysplastische Syndrome	12
1.3. Die Punktmutation JAK2 V617F	13
1.4. Basic fibroblast growth factor bFGF bei MPS.....	19
2. ZIELSETZUNG	22
3. MATERIAL UND METHODEN	24
3.1. Auswahl der Fälle für die Studie	24
<i>Patienten</i>	24
<i>Kontrollen</i>	25
<i>Klinische Daten</i>	25
3.2. Immunhistochemie.....	25
3.3. Laser Capture Microdissection LCM	26
<i>Durchführung</i>	27
3.4. DNA-Extraktion	29
3.5. PCR	29
<i>β-Globin PCR</i>	30
<i>Allelspezifische PCR</i>	31
<i>Nested PCR und Restriktionsenzymverdau mit Bsa XI</i>	32
<i>PCR für das Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangement (FR 3A)</i>	33
<i>PCR für das TCRγ-Rearrangement</i>	34
3.6. Fragment-Längen-Analyse.....	36
3.7. Sequenzierung	37
3.8. Real-Time quantitative TaqMan PCR.....	37
<i>Hintergrund</i>	37
<i>Durchführung</i>	39
4. ERGEBNISSE	43
4.1. Patienten	43
<i>Histologische Untersuchung</i>	43
4.2. Immunhistochemie.....	45
4.3. Mutationsnachweis	47
<i>Kontrolle der DNA-Qualität</i>	47
<i>Allelspezifische PCR</i>	47

<i>Korrelation von bFGF-Immunhistochemie und JAK2 V617F-Mutationsanalyse</i>	49
<i>Nested PCR und Restriktionsenzymverdau</i>	50
4.4. Korrelation des Mutationsnachweises mit klinischen Daten	52
4.5. Sequenzierung	55
4.6. Ergebnisse der Klonalitätsuntersuchungen	56
<i>JAK 2-Status der Fälle mit nodulären lymphoiden Infiltraten</i>	57
4.7. Real-Time qPCR	58
<i>Quantifizierung</i>	58
<i>Untersuchung der nodulären lymphoiden Infiltrate</i>	58
<i>Untersuchung der Megakaryozyten</i>	60
5. DISKUSSION	66
5.1. Methodologische Betrachtungen	66
<i>Allelspezifische PCR</i>	66
<i>Nested PCR mit Restriktionsenzymverdau</i>	67
<i>Sequenzierung</i>	68
<i>Realtime qPCR</i>	69
5.2. Vergleich der Mutationshäufigkeit der einzelnen MPS mit der Literatur	71
5.3. Veränderungen des Mutationsstatus im zeitlichen Verlauf	73
5.4. Klinische Daten	74
5.5. Korrelation der Mutationsanalyse mit der Expression von bFGF	76
5.6. Mutationsanalyse von Megakaryozyten und nicht-megakaryozytären Populationen	77
5.7. Selektive Mutationsanalyse lymphozytärer Zellen aus nodulären Infiltraten	79
5.8. JAK2 V617F: Pathogenetische Rolle bei MPS und zukünftige Bedeutung in der Praxis	80
6. ZUSAMMENFASSUNG	91
7. LITERATURVERZEICHNIS	93
8. ANHANG	107
8.1. Immunhistochemie-Puffer	107
8.2. PCR – Lösungen und Reagenzien	107
8.3. Fragment-Längen-Analyse-Lösungen und Reagenzien	108
8.4. Sequenzierung – Lösungen und Reagenzien	108
8.5. Aminosäurecodierung	108
8.6 Abkürzungen	109

8.7. Verzeichnis der Tabellen	110
8.8. Verzeichnis der Abbildungen.....	111
8.9. Veröffentlichung	111
9. DANKSAGUNG	112

1. Einleitung

1.1. Myeloproliferative Syndrome

Myeloproliferative Syndrome (MPS) sind eine heterogene Gruppe von in der Regel klonalen Erkrankungen des blutbildenden Systems, die sich durch eine chronisch gesteigerte Hämatopoese auszeichnen (Adamson JW et al, 1976; Jacobson RJ et al, 1978; Fialkow PJ et al, 1981; Prechal JT et al, 1993). Von den drei Linien der Hämatopoese, diese sind die granulozytäre, thrombozytäre und erythrozytäre Reihe, können dabei eine oder mehrere betroffen sein. Gemeinsames Charakteristikum der MPS ist, dass die vermehrt in das periphere Blut ausgeschwemmten Zellen zum großen Teil einen regelrechten Differenzierungsprozess durchlaufen haben und nur selten morphologische Atypien zeigen. Lediglich die im Knochenmark verbleibenden Megakaryozyten und die von ihnen abstammenden Thrombozyten können in ihrer Größe und im Falle der Megakaryozyten ihrer Kernmorphologie und ihrer Gruppierung im Knochenmark verändert sein. Die vier klassischen MPS sind die Polyzythaemia Vera (PV), die Essentielle Thrombozythämie (ET), die Osteomyelofibrose (OMF) und die Chronisch-Myeloische Leukämie (CML) (Dameshek W, 1951).

Dem chronischen, langsam fortschreitenden Charakter der MPS entsprechend, können betroffene Patienten oft über Jahre symptomarm oder asymptomatisch bleiben. Typische klinische Merkmale aller MPS sind eine Splenomegalie, häufig in Kombination mit einer Hepatomegalie, als Ausdruck der extramedullären Hämatopoese und des vergrößerten Zellumsatzes und eine erhöhte Zahl der vermehrt produzierten Zellen im peripheren Blut. Durch die vermehrte Zellzahl kann es zu Störungen der Mikrozirkulation kommen, nicht selten ist eine Blutung oder ein thrombotisches Ereignis die erste klinische Manifestation. Im weiteren Verlauf kann jedes MPS in eine sogenannte akzelerierte Phase, die durch einen Blastenanteil im Knochenmark von 10-20% gekennzeichnet ist, oder in eine akute Leukämie mit mehr als 20% Blasten übergehen. Ob diese Transformation den natürlichen Krankheitsprogress repräsentiert oder als Folge einer zytoreduktiven Therapie entsteht, ist umstritten (Barbui T et al, 2004). Weiterhin kann eine Fibrosierung des Knochenmarkraumes eintreten, die die Hämatopoese zunehmend verdrängt.

Bis zum Jahr 2005 sind vereinzelte unspezifische zytogenetische Alterationen mit gehäuftem Auftreten bei Patienten mit MPS beschrieben worden (siehe Tabelle 1), wie beispielsweise eine Deletion auf Chromosom 20q bei der Polycythaemia vera, die jedoch nur einen kleinen Teil der Patienten betreffen (Chen Z et al, 1998; Bench AJ et al, 2000; Najfeld V et al, 2002). Ein befriedigendes pathogenetisches Modell der MPS fehlte. Eine Ausnahme stellt die CML dar, bei der in 90-95% der Fälle die spezifische Translokation t(9;22)(q34;q11) nachgewiesen werden kann. Diese Translokation resultiert im Fusionsgen *bcr-abl*, in welchem die Transkription der Tyrosinkinase *abl* unter die Kontrolle des Onkogens *bcr* und seiner assoziierten Proteine gerät (Nowell PC et al, 1960).

	<u>Spezifische Abnormalitäten</u>	<u>Unspezifische, häufiger auftretende Abnormalitäten</u>	<u>Häufigkeit</u>
<u>PV</u>	keine	+8,+9, del(20q), del (13q), del (1p11)	ca. 15%
<u>ET</u>	keine	+8, del(20q), -7/del(q7), del(11q), del(13q)	ca. 35%
<u>OMF</u>	Keine	+8, del(13q)	ca. 5%

Tabelle 1: Bei klassischen MPS beschriebene zytogenetische Alterationen (nach Swerdlow SH et al, 2008).

Der Altersgipfel des Auftretens der MPS liegt im fünften bis siebten Lebensjahrzehnt, die jährliche Inzidenz wird auf 6-9/100000 geschätzt. Die Lebenserwartung nach Diagnosestellung variiert erheblich zwischen den Entitäten und reicht von drei bis fünf Jahren bei der Osteomyelofibrose bis zu einer nahezu normalen Lebenserwartung bei der Essentiellen Thrombozythämie.

Die dadurch bedeutsame Abgrenzung der Entitäten voneinander geschieht in Synopse der klinischen Befunde mit der Histologie des Knochenmarks, gestaltet sich jedoch wegen zahlreicher Überlappungen häufig als schwierig.

Die drei MPS, die die oben genannte Gemeinsamkeit eines fehlenden ätiologischen Modells hatten (PV, ET, OMF), sind Gegenstand dieser Arbeit und werden im folgenden vorgestellt. In der Klassifikation der MPS durch die *World Health Organization WHO* von 2008 sind auch die selteneren Entitäten Chronische Neutrophile Leukämie, Chronische Eosinophile Leukämie, die Mastozytose und ein nicht näher klassifizierbares myeloproliferatives Syndrom in der Gruppe der MPS aufgeführt (Swerdlow SH et al, 2008). Auf diese wird jedoch nicht eingegangen werden.

Polycythaemia vera

Per definitionem findet sich bei der PV eine Hyperproliferation der erythrozytären Reihe, die von den im Normalfall regulierenden Mechanismen entkoppelt ist. Sehr häufig ist diese von einer vermehrten Granulo- und Thrombopoese begleitet. Die jährliche Inzidenz der PV beträgt etwa 2/100000, mit einer leichten Bevorzugung des männlichen Geschlechts. In etwa 75% aller Fälle sind die Tumorzellen monoklonal (Levine RL et al, 2006).

Das bisher verlässlichste diagnostische Kriterium ist der oft aufwendige Nachweis der Bildung von sogenannten *endogenous erythroid colonies (EEC)* (Cazzola M et al, 2005), welche eine in vitro-Proliferation von erythrozytären Vorläuferzellen ohne adäquaten physiologischen Stimulus darstellen. Weitere Kriterien sind neben dem Blutbild und der Klinik des Patienten ein verringerter Serumspiegel von Erythropoietin und die Knochenmarkshistologie.

Dort zeigt sich ein deutlich hyperzelluläres Mark mit kompletter Eisendepletion und zahlreichen, großen Megakaryozyten. Mit länger dauerndem Krankheitsverlauf findet sich in vielen Fällen eine

zunehmende Fibrosierung des Markraumes und eine oft mit deutlicher Organomegalie einhergehende Verlagerung der Hämatopoese in Milz, Leber oder Lymphknoten.

Der Krankheitsverlauf lässt sich vereinfacht in zwei Stadien untergliedern, eine initiale, durch Proliferation gekennzeichnete polyzythämische Phase und eine post-polyzythämische Phase, die sogenannte *spent phase*, in der die Fibrose des Markraumes und damit einhergehende Zytopenien im Vordergrund stehen. Gelegentlich kommt es zu einer prä-polyzythämischen Phase, die klinisch einer ET ähnelt.

Unbehandelt haben Patienten mit einer PV eine mediane Lebenserwartung im Bereich von Monaten, unter adäquater Therapie lässt sich diese auf bis zu 20 Jahre verlängern. Diese Therapie besteht aus regelmäßigen Aderlässen, um den Hämatokritwert zur Verringerung des Risikos thromboembolischer Komplikationen unter höchstens 45% zu halten, bei Frauen wird 42% vorgeschlagen (Schafer A, 2005). Auch eine Therapie mit Acetylsalicylsäure kann hilfreich sein (Spivak JL et al, 2003; Landolfi R et al, 2004). Macht es der Verlauf der Erkrankung erforderlich, kann zusätzlich symptomatisch beziehungsweise zytoreduktiv mit Substanzen wie Interferon- α (IFN- α), Hydroxyharnstoff oder Anagrelid behandelt werden. Die Therapiephasen sollen so kurz wie möglich gehalten werden, um das Risiko einer therapieinduzierten Transformation in eine akute Leukämie zu minimieren.

Das Risiko für eine Akzeleration oder den Übergang in eine Blastenkrise wird bei natürlichem Verlauf mit 2-3% der Patienten angegeben, wohingegen dieser Anteil unter zytoreduktiver Behandlung auf bis zu 10% ansteigt.

Essentielle Thrombozythämie

Die ET ist durch eine isolierte Hyperproliferation der Megakaryozyten und eine konsekutiv erhöhte Thrombozytenzahl im peripheren Blut meist über 600000/ μ l gekennzeichnet. Die Diagnose einer ET darf erst im Falle einer über einen längeren Zeitraum bestehenden Thrombozytose und nach dem Ausschluss eines anderen MPS oder einer reaktiv erhöhten Thrombozytenzahl gestellt werden.

Bei der ET finden sich häufiger als bei den anderen MPS polyklonale Granulozyten im peripheren Blut, nur etwa 66% aller Fälle sind monoklonal (Adamson JW et al, 1976; Harrison CN et al, 1999; Kralovics R et al, 2006; Levine RL et al, 2006).

Die ET ist das seltenste Syndrom der MPS, sie kann in jedem Lebensalter auftreten und zeigt eine leichte Bevorzugung des weiblichen Geschlechts, wofür kein Grund bekannt ist.

Histologisch zeigt sich ein normo- bis mäßig hyperzelluläres, gelegentlich jedoch auch ein hypozelluläres Knochenmark. Das auffälligste histologische Merkmal ist das Vorhandensein einer Vielzahl von großen, stark gelappten Megakaryozyten, die sich oft gehäuft in sogenannten *Clustern* anordnen, aber auch einzeln über den Markraum verstreut vorkommen können.

Sowohl manche biologischen Merkmale wie das Auftreten von dysmorphen Megakaryozyten mit Clusterbildung als auch klinische Merkmale wie die Neigung zu thrombotischen und hämorrhagischen

Ereignissen werden von ET und PV geteilt (Michiels JJ et al, 2002; Elliott MA et al, 2005). Passend dazu wird gelegentlich beobachtet, dass eine ET nach längerem Verlauf der Krankheit in eine PV transformieren kann.

Die ET verläuft indolent. Meist ist eine zufällig festgestellte Erhöhung der Thrombozytenzahl diagnostisch richtungsweisend. Die mit Abstand häufigsten Symptome sind Blutungen oder thrombotische Ereignisse. Eine durch ihre hohe Zahl bedingte Funktionsstörung der Thrombozyten kann die Blutungsneigung erklären. Etwa die Hälfte der Patienten zeigt bei Diagnosestellung eine meist moderate Splenomegalie.

Wie die anderen MPS kann auch die ET nach Jahren in eine akute Leukämie übergehen. Die derzeitige Meinung ist jedoch, dass bei der ET die überwiegende Mehrzahl dieser Transformationen als Nebenwirkung einer zytoreduktiven Therapie mit Phosphor-32, Hydroxyharnstoff oder Alkylanzien auftritt (Finazzi G et al, 2000), weshalb man auf diese Substanzen nur noch in Ausnahmefällen zurückgreift. Folglich wird die ET zurückhaltend therapiert. Macht die Symptomatik, der Verlauf der Erkrankung oder ein hohes individuelles Risiko dennoch eine Therapie erforderlich, versucht man die Thrombozytenzahlen mit IFN- α oder Anagrelid zu senken (Spivak JL et al, 2003; Spivak JL, 2005).

Obwohl auch bei der ET ein vermehrter Retikulinfasergehalt auftreten kann, spricht eine deutliche Fibrosierung des Markraumes eher gegen die Diagnose einer ET (Thiele J et al, 2000; Swerdlow SH et al, 2008).

Die Rate aller Transformationen bei der ET, sei es zu einer PV, einer akuten Leukämie oder einer Knochenmarksfibrose, wird mit 2-10% angegeben (Tefferi A et al, 2001; Passamonti F et al, 2004).

Osteomyelofibrose

Das Kennzeichen der OMF ist eine rasche Obliteration des Knochenmarkraumes durch Retikulin- und Kollagenfasern. Diese Fibrosierung ist verbunden mit einer Hyperproliferation von Megakaryozyten und granulozytären Vorläuferzellen. In einem späten Stadium ist die OMF kaum von der *Spent Phase* einer PV oder einer späten CML zu unterscheiden. (Spivak JL, 2005). Die OMF ist vor dem 60. Lebensjahr sehr selten, es ist keine Geschlechtspräferenz zu beobachten. Etwa 80% der Fälle zeichnen sich durch eine monoklonale Hämatopoese aus (Levine RL et al, 2006). Zu bemerken ist, dass die Fibroblasten als Produzenten der kollagenen Fasern polyklonal sind (Jacobson RJ et al, 1978; Wang JC et al, 1992)

Die OMF verläuft in zwei Phasen. Im ersten, sogenannten präfibrotischen Stadium, steht eine übermäßige Proliferation von megakaryozytären und granulozytären Zellen im Vordergrund. Eine Fibrose ist noch nicht vorhanden, allenfalls eine Vermehrung der Retikulinfaserzeichnung. Die Blutbildveränderungen und die unspezifische Symptomatik sind der ET ähnlich. In diesem Stadium werden wegen der gering ausgeprägten Symptome nur etwa ein Viertel der Patienten diagnostiziert.

Das zweite, sogenannte fibrotische Stadium der Erkrankung ist geprägt von der rasch zunehmenden Ablagerung von Bindegewebsfasern im Markraum. Von den Megakaryozyten produzierte Faktoren scheinen hierbei eine große kausale Rolle einzunehmen: *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor* (TGF- β) und *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) (Tefferi A, 2000; Aster JC, 2005).

Die zunehmende Obliterierung des Markraumes führt zu einer Verlagerung der Hämatopoese in extramedulläre Gewebe wie Milz, Leber und Lymphknoten. Daraus lassen sich die Symptome der oft massiven Splenomegalie (90%), Hepatomegalie (50%) und Leukoerythroblastose im peripheren Blut ableiten. Aus nicht verstandenen Gründen ist die extramedulläre Blutbildung ineffektiv, so dass die schon aufgrund der Fibrose präexistenten Zytopenien oft bestehen bleiben (Aster JC, 2005).

Ebenso kann es durch die extramedulläre Hämatopoese zu Symptomen einer Raumforderung wie Aszites, pulmonale oder portale Hypertension oder einem Ileus kommen. Die OMF macht relativ häufig eine Transformation in eine akute Leukämie durch, die beschriebenen Raten reichen von fünf bis 30% (Swerdlow SH et al, 2008).

Im präfibrotischen Stadium ist das Knochenmark hyperzellulär. Die Granulopoese ist gesteigert und eventuell zu unreifen Formen verschoben. Es finden sich gehäuft atypische Megakaryozyten. Diese sind meist vergrößert, formen *Cluster* in der Nähe der Sinus, weisen gelegentlich eine veränderte Kern-Plasma-Relation und eine veränderte Chromatinstruktur, die dem bildlichen Namen *Wolkenkerne* entspricht, auf.

Es ist schwierig, eine Unterscheidung zwischen einer ET und der präfibrotischen Phase einer OMF zu treffen, eventuell tragen Abnormalitäten der Megakaryozyten und der Granulozyten-proliferation dazu bei (Thiele J et al, 1999; 2003). Auch folgende Punkte favorisieren eher die Diagnose einer OMF: trilineäre Hyperplasie, Splenomegalie, Myelophthisis und deutlich erhöhte Laktatdehydrogenase im Serum (Tefferi A, 2000).

Im fibrotischen Stadium verläuft eine zunehmende Ablagerung von Fasermaterial im Knochenmark parallel mit einer Abnahme der Zellularität. In einem sehr späten Krankheitsstadium kann der fibrotische Markraum in Knochenmaterial umgebildet werden, was als Osteosklerose bezeichnet wird. Besonders die gehäufte Transformationsrate von 20% in den ersten zehn Jahren (Tefferi A, 2000), eine erhöhte Infektneigung und thromboembolische Ereignisse sowie Blutungen beschränken das mittlere Überleben auf drei bis fünf Jahre. Einige Prognoseindikatoren wie zum Beispiel das Auftreten von zirkulierenden Blasten sind bekannt (Spivak JL, 2005; Swerdlow SH et al, 2008; Tefferi A, 2005b).

Es existiert keine überzeugende Therapie, lediglich in Einzelfällen kann eine Splenektomie bei nachgewiesenem Hypersplenismus Palliation bieten oder eine Therapie mit Hydroxyharnstoff die Organomegalie in Schranken halten. Bei einem ausgewählten Patientenkollektiv sollte eine allogene Stammzelltransplantation erwogen werden (Deeg HJ et al, 2003). Auch gibt es zunehmende Evidenz für die Wirksamkeit von Angiogenesehemmern wie Thalidomid (Spivak JL et al, 2003).

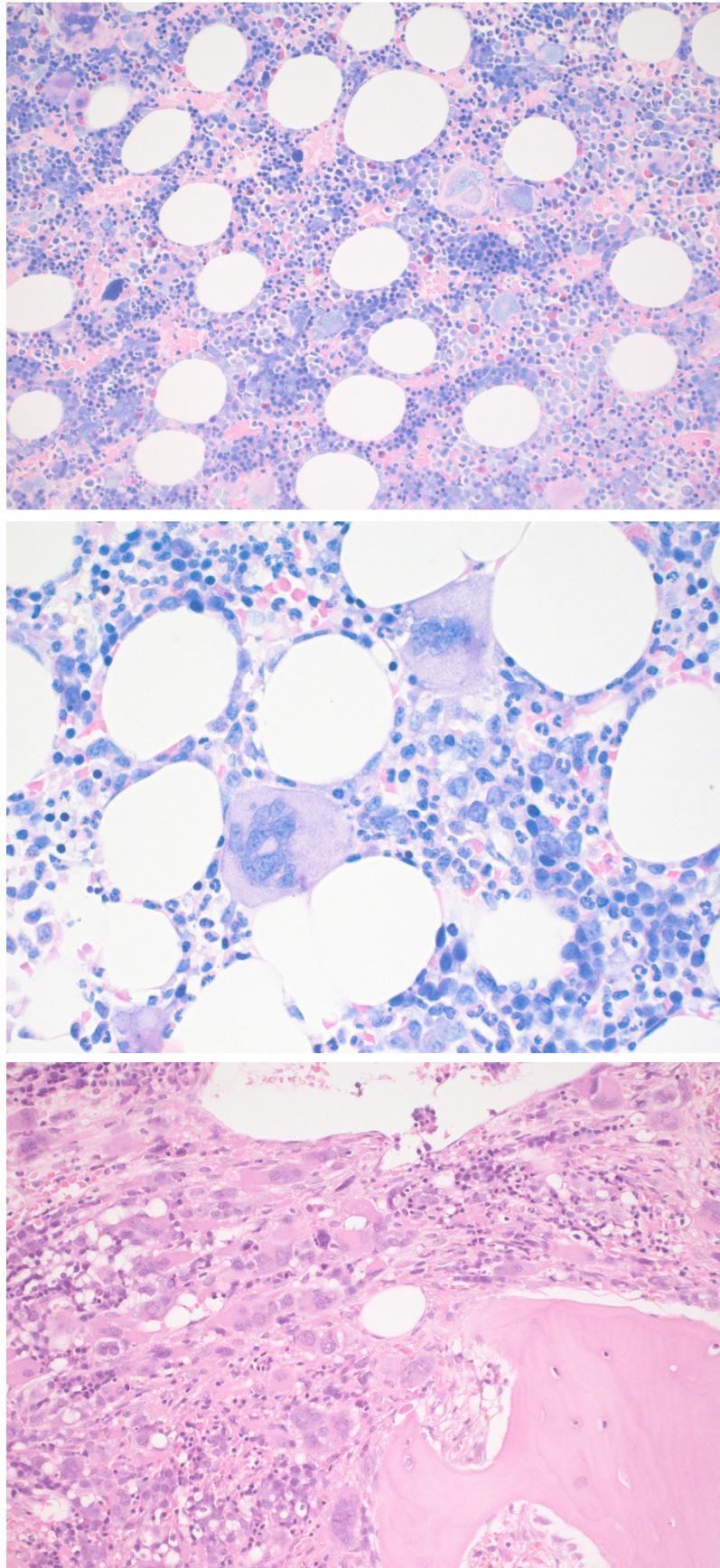


Abbildung 1: Histologie des Knochenmarks bei MPS. Bei der Polycythämia vera (oben, Vergrößerung 100-fach) findet sich ein deutlich hyperzelluläres Mark mit einer erhöhten Zahl von großen Megakaryozyten. Auch bei der ET (Mitte, Vergrößerung 500-fach) kann man diese veränderten, hier auch hyperlobulierten Megakaryozyten beobachten, dazu ist das Knochenmark hier normozellulär. Bei der OMF (unten, Vergrößerung 100-fach) kann eine deutliche Kollagenfaserfibrose beobachtet werden, die das Knochenmark mehr und mehr ausfüllt und die Hämatopoese verdrängt.

1.2. Myelodysplastische Syndrome

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind ebenfalls klonale hämatologische Stammzellerkrankungen (Spivak JL, 2005; Aster JC, 2005; Swerdlow SH et al, 2008). Sie sind gekennzeichnet durch eine ineffektive Zellproliferation und -differenzierung des normalerweise hyper- oder normozellulären Knochenmarks in zumindest einer Reihe mit daraus resultierenden peripheren Zytopenien. Die betroffenen hämatopoetischen Reihen, meist ist die erythrozytäre zumindest mitbeteiligt, sind dabei von funktionellen und morphologischen Atypien betroffen.

Die aktuelle Klassifikation der *WHO* von 2008 führt sieben Krankheitsbilder unter dem Oberbegriff MDS auf. Eine refraktäre Zytopenie mit unilineärer Zytopenie wird derjenigen mit multilineären Zytopenien gegenübergestellt. Zur erstgenannten Gruppe gehört die Refraktäre Anämie (RA), die mit der RA mit Exzess-Blasten von bis zu 20% Blastenanteil im peripheren Blut beziehungsweise im Knochenmark (RAEB) und der RA mit Ringsideroblasten (RARS) weitere Untergruppen hat. Eine Deletion von Teilen des langen Armes von Chromosom 5 geht mit einem so distinkten klinischen und morphologischen Bild einher, dass es in der Literatur als 5q(-)-Syndrom geführt wird (Spivak JL, 2005; Swerdlow SH et al, 2008). Die letzten beiden Entitäten in der Gruppe der MDS sind das MDS des Kindesalters und ein nicht näher klassifizierbares MDS.

Primäre MDS sind Erkrankungen des älteren Menschen (medianes Erkrankungsalter 68 Jahre), sie kommen jedoch auch in erheblich jüngerem Lebensalter vor. Diese MDS bei jüngeren Patienten treten meist sekundär in Folge einer intensiven Tumorthherapie nach einer Latenzzeit von zwei bis acht Jahren auf. Als besonders risikoreich für die Entwicklung eines MDS gilt eine Strahlentherapie und eine Therapie mit Alkylanzien und Topoisomeraseinhibitoren. Bei über 70-jährigen Menschen liegt die jährliche Inzidenz bei 20/100000 (Swerdlow SH et al, 2008).

Etwa die Hälfte der Patienten mit MDS, deutlich mehr als bei MPS, haben zytogenetische Alterationen. Diese Alterationen sind nicht zufällig über das Genom verteilt. Einige treten rekurrent auf, wie zum Beispiel ein teilweiser oder kompletter Verlust der Chromosomen fünf, sieben und 20 sowie eine Trisomie 8.

Die Diagnose eines MDS wird häufig im Rahmen einer Routineuntersuchung bei wenig symptomatischen Patienten gestellt. Falls Symptome vorhanden sind, lassen sie sich meist auf die bestehenden peripheren Zytopenien zurückführen, wie etwa Müdigkeit und Blässe bei einer Anämie, Infektionen bei einer Granulopenie und Blutungen bei einer Thrombopenie. Etwa ein Fünftel der Patienten haben eine Splenomegalie. MDS haben eine größere Tendenz als MPS zur Transformation in eine akute Leukämie, wobei die Raten zwischen den einzelnen Entitäten stark variieren.

Es existieren keine spezifischen morphologischen Alterationen, jedoch treten einige Veränderungen häufig auf. Dazu gehören in der erythrozytären Reihe das Vorhandensein von eisenbeladenen Mitochondrien um die Kerne von Vorläuferzellen (Ringsideroblasten) sowie von megaloblastischen Kernen mit defekter Hämoglobinisierung. In der thrombozytären Reihe findet man eine verringerte Zahl von Megakaryozyten mit hypobulierten und dysorganisierten Kernen, ebenso hypobulierte

und hyposegmentierte granulozytäre Vorläuferzellen sowie das Auftreten von Blasten. Bei einem Blastenanteil über 20% spricht man definitionsgemäß von einer akuten Leukämie, wobei diese Grenze als fließend anzusehen ist.

Die Prognose wird in der Reihenfolge abnehmender Wichtigkeit von dem Anteil blastärer Zellen, dem Karyotyp und der Anzahl peripherer Zytopenien bestimmt. Die mediane Überlebensdauer reicht von Monaten bei der RAEB oder einer Panzytopenie mit Monosomie des Chromosoms sieben bis zu einigen Jahren beim 5q(-)-Syndrom. Eine definitive Heilung kann nur durch eine Stammzelltransplantation erreicht werden.

Es soll darauf hingewiesen werden, dass die *WHO*-Klassifikation gewissen Entitäten, die eine Stellung zwischen MPS und MDS einnehmen, ein eigenes Kapitel widmet. Auch bei diesen entsteht durch eine Hyperproliferation von mindestens einer hämatopoetischen Reihe ein hyperzelluläres Knochenmark. Dabei ist kennzeichnend, dass die Proliferation in einer Reihe effektiv und zugleich in einer anderen ineffektiv ist und mit einer peripheren Zytopenie einhergeht.

Zu dieser Klasse von Entitäten werden in der *WHO*-Klassifikation die folgenden gezählt: CMML, atypische CML ohne Nachweis eines Philadelphia-Chromosoms oder von *bcr-abl*, die juvenile Myelomonocytenleukämie, eine nicht näher klassifizierbare Zwischenstufe zwischen MDS und MPS, genannt *MDS/MPS, unklassifizierbar* und eine Sonderform der oben genannten RARS, die mit einer Thrombozytose einhergeht (Swerdlow SH et al, 2008).

1.3. Die Punktmutation JAK2 V617F

War die Ätiologie und Pathogenese der myeloproliferativen Syndrome lange unbekannt, gelang der Forschung auf diesem Gebiet im Frühjahr 2005 ein Durchbruch. Nahezu gleichzeitig veröffentlichten fünf Arbeitsgruppen, dass bei einem großen Anteil der Patienten mit den klassischen MPS PV, ET und OMF auf dem kurzen Arm von Chromosom neun die Punktmutation JAK2 V617F gefunden werden konnte (Baxter EJ et al, 2005; Levine RL et al, 2005b; James C et al, 2005; Kralovics R et al, 2005a; Zhao R et al, 2005). Zusammengefasst konnte sie bei etwa 80% der Fälle mit PV und je 40-50% der Fälle mit ET oder OMF gefunden werden. Bei anderen myeloproliferativen oder myelodysplastischen Entitäten als den drei klassischen MPS kommt die Mutation erheblich seltener vor, ihre Häufigkeit wird bei MDS mit maximal 5% angegeben (Jones AV et al, 2005; Steensma DP et al, 2005; Scott LM et al, 2005) (siehe Tabelle 2). Auch in einigen Fällen von AML ohne vorangegangenes MPS konnte JAK2 V617F nachgewiesen werden (Scott LM et al, 2005; Lee JW et al, 2006a).

Etwa 20-40% der Patienten mit PV sind homozygot für das mutierte Allel, was ungefähr der Häufigkeit der Patienten mit mitotischer Rekombination auf Chromosom neun entspricht, wie die Analyse von Mikrosatelliten zeigte (Kralovics R et al, 2005a; Vannucchi AM et al, 2007a). Bei der OMF ist Homozygotie etwas seltener zu beobachten als bei der PV, bei der ET ist sie ein sehr seltenes Ereignis (Vannucchi AM et al, 2007a).

JAK2 V617F konnte bei gesunden Menschen oder Patienten ohne MPS fast nie entdeckt werden, lediglich in zwei Studien wurde sie in einem sehr geringen Prozentsatz in einer solchen Population nachgewiesen (Sidon P et al, 2006; Xu X et al, 2007). Ebenso ist sie bisher nicht bei Patienten mit soliden Tumoren oder Erkrankungen des lymphatischen Systems nachgewiesen worden (Scott LM et al, 2005; Tefferi A, 2006b). Bei Patienten mit idiopathischer Erythrozytose ist die Mutation bei einem von 63 Patienten gefunden worden (Percy MJ et al, 2006).

	<u>PV</u>	<u>ET</u>	<u>OMF</u>	<u>CML</u>	<u>CMML</u>	<u>MDS</u>	<u>SM</u>	<u>CNL</u>	<u>Reaktiv</u>	<u>Normal</u>
<u>James et al</u>	40/45	-	-	-	-	-	-	-	0/35	0/15
<u>Baxter et al</u>	71/73	29/51	8/16	-	-	-	-	-	-	-
<u>Levine et al</u>	121/164	37/115	16/46	-	-	-	-	-	-	0/269
<u>Kralovics et al</u>	83/128	21/93	13/23	0/9	-	-	-	-	0/11	0/71
<u>Steensma et al</u>	-	-	-	-	3/119	5/101	2/8	1/6	-	-
<u>Zhao et al</u>	20/24	-	-	-	-	-	-	-	-	0/12

Tabelle 2: Anteil der mutierten an den untersuchten Patienten. Dargestellt sind die Ergebnisse der ersten Studien, welche die Mutation JAK2 V617F beschrieben. PV=Polycythaemia Vera, ET=Essentielle Thrombozythämie, OMF=Osteomyelofibrose, CML=Chronisch-Myeloische Leukämie, CMML=Chronisch-Myelomonozytäre Leukämie, MDS=Myelodysplastisches Syndrom, SM=Systemische Mastozytose, CNL= Chronisch-Neutrophile Leukämie (Baxter E et al, 2005 ; Kralovics R et al, 2005 ; James C et al, 2005 ; Levine RL et al, 2005 ; Steensma DP et al, 2005 ; Zhao R et al, J Biol Chem 2005)

Bei der Familie der JAK-Kinasen handelt es sich um zytoplasmatische Tyrosinkinassen, die mit einer Vielzahl von Rezeptoren kommunizieren. Zu ihnen gehören vier Typen: JAK-1, JAK-2, JAK-3 und TYK-2. Alle haben die Domänen JH 1-7 gemeinsam, nummeriert vom Carboxy- zum Aminoterminus. Die Domäne JH-7 geht mit den prolinreichen, konservierten Regionen der Zytokinrezeptoren eine non-kovalente Bindung ein. JH-1 ist die Phosphotyrosinkinasedomäne, die sowohl den assoziierten Rezeptor als auch sogenannte *signal transducers and activators of transcription* (STATs) phosphoryliert, welche den Signalweg weiterführen. Bei JH-2 handelt es sich um eine sogenannte Pseudokinasedomäne, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist, die aber sowohl die Basisaktivität von JAK-2 zu beeinflussen als auch die rezeptorvermittelte Aktivierung zu regulieren und damit inhibitorisch auf JH-1 zu wirken scheint (Saharinen P et al, 2000).

JAK2 interagiert mit verschiedenen Zytokinrezeptoren, besonders denen des Typ I wie beispielsweise dem Erythropoietinrezeptor oder dem Thrombopoietinrezeptor, und initiiert deren Signalwege (Witthuhn BA et al, 1993; Parganas E et al, 1998). JAK2-defiziente Mäuse sterben am Tag 12 der Embryonalentwicklung, wobei ihre Erythropoese völlig fehlt (Neubauer H et al, 1998).

Durch die Bindung des jeweiligen hämatopoetischen Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor werden zwei mit diesem Rezeptor assoziierte JAK2-Moleküle in enge Nachbarschaft gebracht, dadurch aktiviert und können nun die intrazytoplasmatischen Rezeptordomänen phosphorylieren. An diese

phosphorylierten Rezeptoren können STATs binden, die wiederum von JAK2 phosphoryliert werden (Remy I et al, 1999; Kisseleva T et al, 2002).

JAK-2 stand aus verschiedenen Gründen schon längere Zeit im Fokus der MPS-Forschung. Es war nämlich eine Hypersensitivität der Hämatopoese bei MPS gegenüber bestimmten Wachstumsfaktoren wie Erythropoietin, Thrombopoietin, Interleukin-3 oder Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) sowie eine EPO-unabhängige Bildung von erythrozytären Kolonien nachgewiesen worden (Prchal JF et al, 1974; Zanjani ED et al, 1977; Casadevall N et al, 1982; Dai CH et al, 1992; Baxter EJ et al, 2005; James C et al, 2005; Prchal JT et al, 2005). Der Signaltransduktionsweg der genannten Wachstumsfaktoren mündet intrazellulär in eine gemeinsame Endstrecke, an deren Spitze JAK2 steht. Dieser Signaltransduktionsweg ist in Abbildung zwei dargestellt.

Von Bedeutung ist auch die Abschwächung dieses Signalweges, welche hauptsächlich über drei Wege geschieht. Die von JAK2 an STATs gebundenen Phosphatreste werden von Phosphatasen wieder abgespalten und damit inaktiviert. Bestimmte Mutationen in diesen Phosphatasen sind bei Mäusen mit der Entstehung eines MPS in Verbindung gebracht worden (Tsui HW et al, 1993). Dazu gibt es spezifische Inhibitoren der STATs, die *protein inhibitors of active STATs* (PIAS) und die Gruppe der *suppressors of cytokine signaling* (SOCS), die zur Terminierung des ausgelösten Signals beitragen. Die Wichtigkeit dieser Mechanismen belegt, dass ein *Silencing* der Gene der SOCS oder der oben angesprochenen Phosphatasen durch DNA-Methylierung onkogen wirkt, nicht nur für hämatologische Tumore, sondern beispielsweise auch für Plattenepithelkarzinome des HNO-Bereiches oder das hepatozelluläre Karzinom (Valentino L et al, 2006).

Es war zusätzlich bekannt, dass eine Hemmung des JAK2-Signalweges zu einer Hemmung der Differenzierung von erythroiden Zellen führt und dass bei myeloproliferativen Syndromen die Signalproteine STAT-3, STAT-5, Bcl-xL und AKT, die in der Transduktionskaskade hinter JAK-2 liegen, dauerhaft aktiviert sind (Roder S et al, 2001; Ugo V et al, 2004).

Ein weiterer Hinweis auf den kurzen Arm des Chromosoms neun als möglichen genetisch veränderten Ort bei MPS ergab sich durch den Nachweis einer dort wiederholt auftretenden mitotischen Rekombination (Kralovics R et al, 2002, 2005a; Najfeld V et al, 2002).

Desweiteren war bekannt, dass es durch eine Translokation zwischen den Chromosomen neun und zwölf zu einem Fusionsprotein kommen kann, welches -ähnlich *bcr-abl*- die Tyrosinkinase JAK unter die Kontrolle der Oligomerisierungsdomäne des Transskriptionsfaktors *TEL* bringt und damit in unphysiologischem Maße aktiviert. Dieses TEL-JAK-Fusionsprotein ist in Einzelfällen bei MPS sowie bei manchen Fällen von akuter lymphoblastischer Leukämie ebenso beschrieben worden wie ein Fall einer atypischen CML mit dem Fusionsprotein *bcr-JAK* und eine Amplifikation des chromosomalen Bereiches um JAK2 beim klassischen Hodgkin-Lymphom (Lacronique V et al, 1997; Joos S et al, 2003; Griesinger F et al, 2005). Die wichtige Rolle von JAK2 für die Regulation von Proliferation und

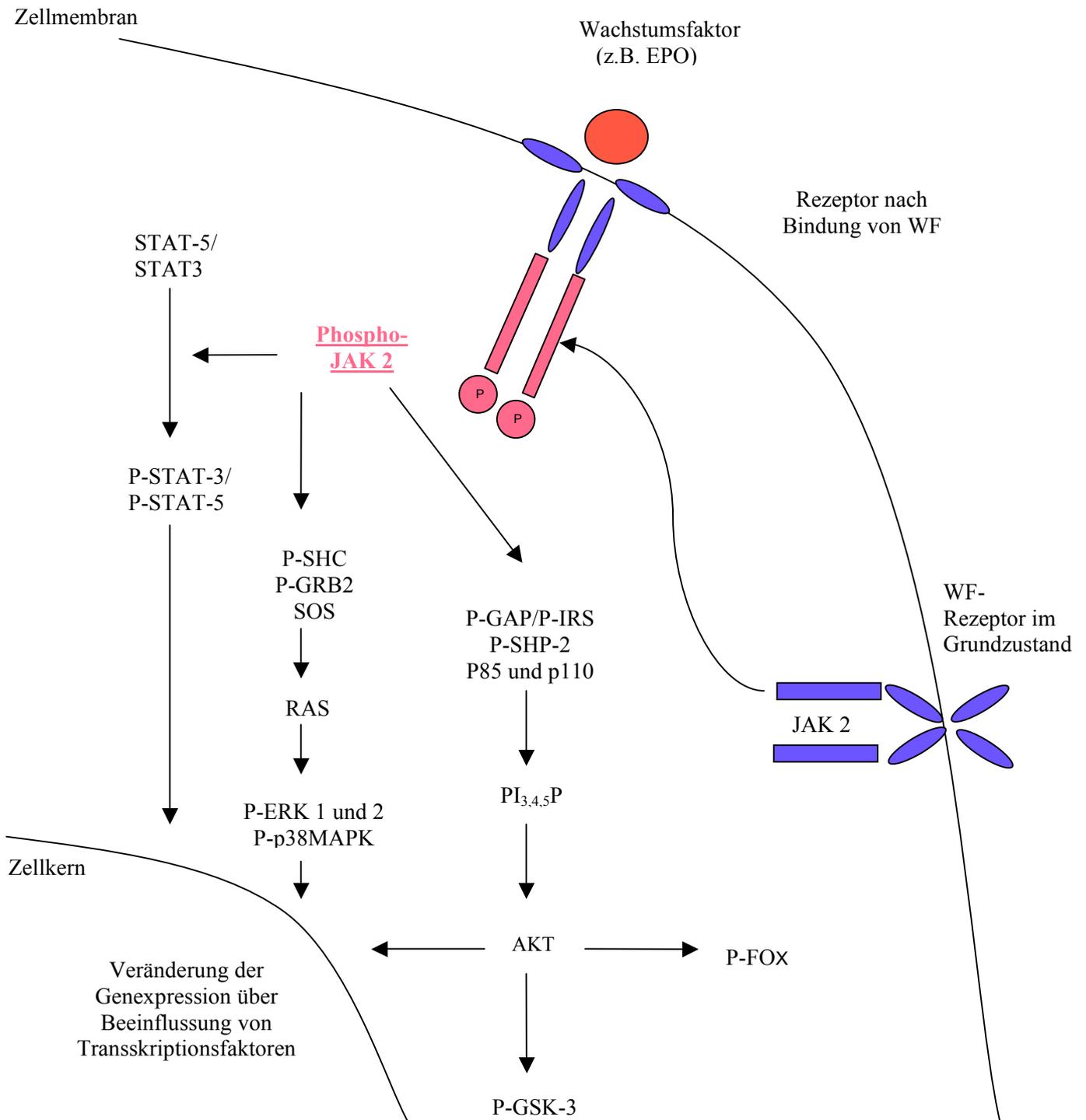


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Signaltransduktionswegs von JAK2. (WF=Wachstumsfaktor, EPO=Erythropoietin, SOS=Son of Sevenless, GSK=Glykogen-Synthase-Kinase, GRB=Growth-factor-bound, FOX=Forkhead-box-proteins, ras=rat sarcoma)

Differenzierung von hämatopoetischen Zellen unterstreicht der kürzlich durchgeführte Nachweis von JAK2-Mutationen an Aminosäureposition 683 bei 20 Prozent der Fälle von Down-Syndrom-assoziierten akuten lymphatischen Leukämien (ALL) (Bercovich D et al, 2008).

Außerdem sind bestimmte Mutationen (Y570F und E695K) in der JH2-Domäne von JAK2 bekannt, die deren inhibitorische Wirkung auf die Kinasedomäne aufheben und zu ständiger Aktivierung des Signalwegs führen (Luo H et al, 1997; Argetsinger LS et al, 2004).

All dies hatte auf eine Rolle von JAK-2 in der Pathogenese der MPS hingedeutet. Es passt in das Gesamtbild, dass auch bei anderen verwandten hämatologischen Erkrankungen Tyrosinkinase ätiologisch beteiligt sind, wie zum Beispiel *c-kit* bei der Systemischen Mastozytose, *bcr-abl* bei der CML oder TEL/PDGF-R β bei der CMML (Golub TR et al, 1994; Longley BJ et al, 1996; Büttner C et al, 1998; Kaushansky K, 2005).

Bei JAK2 V617F ist an Nukleotidposition 1849 ein Guanin- gegen einen Thyminrest ausgetauscht, was auf Proteinebene die Substitution der Aminosäure Valin durch Phenylalanin bewirkt. Die Mutation liegt in Exon 14 in der inhibitorischen Pseudokinasedomäne von JAK 2 (siehe Abbildung 3). Diese Lage bewirkt, dass das veränderte Protein durch den Wegfall der autogenen Hemmung ständig aktiviert ist und somit die Zelle ständig zu Proliferation und Wachstum angeregt wird.

Kürzlich wurde nachgewiesen, dass nicht nur der Austausch gegen Phenylalanin, sondern auch gegen andere große unpolare Aminosäuren eine Aktivierung von JAK2 bewirkt (Dusa A et al, 2008).

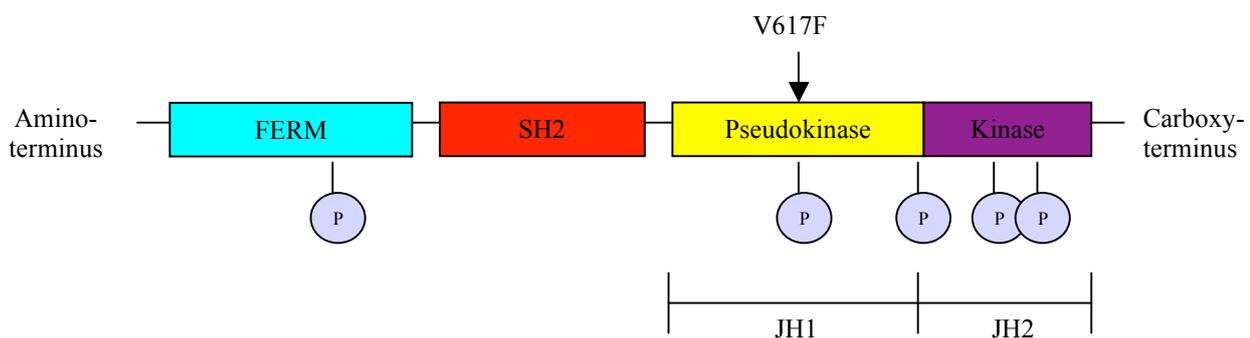


Abbildung 3: Lage der Mutation JAK2 V617F in der Pseudokinasedomäne der Kinase JAK2. Diese liegt neben der Kinasedomäne. An mit P gekennzeichneten Stellen findet eine Autophosphorylierung statt. Außerdem besitzt JAK2 eine FERM-Domäne (band 4.1(f)-ezrin-radixin-moesin) (nach Goldmann DM, N Engl J Med 2005)

JAK2 V617F bewirkt hauptsächlich durch veränderte Expression von zellzyklusrelevanten Genen wie Cyclin D2 oder p27^{Kip} eine Beschleunigung der G1/S-Phase-Transition und führt zu einer geringen Abnahme der Apoptoserate (Walz C et al, 2006). An anderer Stelle ist beschrieben, dass JAK2 V617F eine Dysregulation der Expression verschiedener Gene (Bcl-X, PRV-1, NF-E2) und des Thrombopoietin-Rezeptors bewirkt (Silva M et al, 1998; Socolovsky M et al, 1999; Goerttler PS et al, 2005a, 2005b; Kralovics R et al, 2005b; Tefferi A et al, 2006a; Mnjayan Z et al, 2006). Die Überexpression von NF-E2 könnte hierbei eine übermäßig starke erythrozytäre Differenzierung bewirken (Labbaye C et al, 1995; Sayer MS et al, 2000; Goerttler PS et al, 2005b). Weiterhin bewirkt die Mutation eine Verminderung der Hemmung von JAK2 durch aktivierte SOCS-Proteine (Hookham MB et al, 2007).

Es gibt deutliche Hinweise für die prominente Rolle, die JAK2 V617F im Prozess der Krankheitsentstehung einnimmt. Beispielsweise ist eine Assoziation der EPO-unabhängigen Bildung von erythroiden Kolonien mit dem Vorhandensein der Mutation gezeigt worden (Baxter EJ et al, 2005; James C et al, 2005; Goerttler PS et al, 2005a). Eine siRNA-vermittelte Hemmung des JAK-Signalweges führt zu einer Blockierung der Bildung dieser Kolonien. Diese sind wie oben beschrieben ein bedeutendes Charakteristikum aller MPS und sind niemals bei gesunden Individuen nachzuweisen (Kaushansky K, 2005).

Erythrozyten-Vorläuferzellen können in vitro nur ohne exogenes EPO wachsen, wenn die Mutation vorhanden ist (James C et al, 2005; Baxter EJ et al, 2005; Levine RL et al, 2005b; Dupont S et al, 2007), in Zelllinien induziert sie einen Proliferationsvorteil (James C et al, 2005; Kralovics R et al, 2005a; Levine RL et al, 2005b). Ebenso ist das Vorhandensein der Mutation Voraussetzung für die EPO-unabhängige Aktivierung von STAT5 (James C et al, 2005). Diese beiden Tatsachen stellen ein Korrelat für die vorbekannte Wachstumsfaktorhypersensitivität der hämatopoetischen Zellen bei MPS dar.

Interessanterweise wird die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges deutlich reduziert, wenn man zu JAK2 V617F-Zellen zusätzlich Wildtyp-Zellen zuführt (James C et al, 2005). Die Mutation ist zwar ihrem Wesen nach dominant, da ein konstitutionell aktives Enzym entsteht, sie kann jedoch scheinbar durch normales Protein wieder abgeschwächt werden.

Das stärkste Argument für einen Kausalzusammenhang zwischen der Mutation und der Entstehung eines MPS ist die Tatsache, dass Mäuse, die nach myeloablativer Bestrahlung mit JAK2 V617F-Knochenmark transplantiert wurden, ein klinisches Bild zeigen, das dem der PV sehr ähnelt (Zaleskas VM et al, 2005; Bumm TG et al, 2005; James C et al, 2005; Wernig G et al, 2006; Lacout C et al, 2006). Diese Mäuse entwickelten hohe Hämatokrit- und Leukozytenwerte sowie oft eine Splenomegalie und nach etwa 20 Wochen eine postpolyzythämische Phase mit Fibrosierung des Markraums. Hier konnte erstmals in vivo die konstitutionelle Aktivierung von JAK2 und STAT5 nachgewiesen werden, die man bisher lediglich aus in vitro-Versuchen kannte.

Die Abwesenheit der Mutation in nicht-hämatopoetischen Zellen legt nahe, dass es sich bei JAK2 V617F nicht um eine Keimbahnmutation, sondern um eine erworbene Mutation handelt (Kralovics R et al, 2005a). Dies wird unterstützt durch Erkenntnisse bei Patienten mit familiären myeloproliferativen Syndromen, bei denen innerhalb einer Familie sowohl Patienten mit als auch solche ohne die Mutation vorkommen (Bellanné-Chantelot C et al, 2006).

Offen bleibt die Frage, wie eine einzige Punktmutation drei unterschiedliche Krankheitsbilder bewirken kann. Dafür gibt es bisher drei mögliche Erklärungsmodelle. Das erste besagt, dass JAK2 V617F lediglich ein Schritt in der Pathogenese der MPS ist und andere genetische Ereignisse, die die Krankheit initiieren, noch folgen oder bereits vorausgegangen sein müssen. Eine Abwandlung dieses Modells sieht den individuellen genetischen Hintergrund als entscheidende Determinante für den durch JAK2 V617F bewirkten Phänotyp an.

Das zweite Modell sieht die Stufe der Hämatopoese, auf der die Mutation geschieht, als den entscheidenden Schritt an. Fände die Mutation in einer thrombozytären Vorläuferzelle statt, entwickle sich eher ein ET-ähnlicher Phänotyp, wohingegen das entstehende Krankheitsbild einer PV ähnlicher, wenn sich die Mutation in einer erythrozytären Vorläuferzelle entwickelt.

Die dritte Möglichkeit beschreibt die sogenannte Dosishypothese. Wie oben dargelegt, differiert die Frequenz der homozygoten Patienten drastisch zwischen der ET und der PV. Dies führt zu der These dass ein geringerer Anteil an mutierten Zellen oder an mutierten Allelen von polyploiden Zellen eher einen megakaryozytär dominierten Phänotyp bewirkt, während höhere Anteile die Erythropoese dominant werden lassen.

Andere offene Fragen sind, warum die Inaktivierungsmechanismen des hochkontrollierten JAK/STAT-Signalwegs nach dem Mutationserwerb nicht mehr greifen und wie es ohne JAK2 V617F zu einem MPS kommen kann.

Die oben genannten Modelle werden in Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie diskutiert werden.

1.4. Basic fibroblast growth factor bFGF bei MPS

1973 wurde der *Fibroblast Growth Factor* (FGF) erstmals in Kuhhirnextrakt nachgewiesen und dessen proliferationsfördernde Wirkung auf Fibroblasten gezeigt (Gospodarowicz D et al, 1974). Es konnte eine saure und eine basische Form dieses Proteins unterschieden werden, letzteres erhielt daher den Beinamen *basic*. Inzwischen sind 22 Mitglieder der FGF-Familie identifiziert.

BFGF nimmt eine wichtige Stellung bei vielen biologisch bedeutenden Vorgängen ein, er fungiert in der Embryonalentwicklung als Induktor von neuralem und mesodermalem Gewebe und sowohl in der Wundheilung als auch bei der Tumorentstehung als Förderer der Neoangiogenese (Böttcher RT et al, 2005). Diese Induktion der Angiogenese und eine bekannte osteoanabole Wirkkomponente sind die

Auswirkungen von bFGF, denen in der Pathogenese der MPS eine bedeutende Rolle zukommen könnte.

Es sind zwei molekulare Isoformen von bFGF beschrieben, eine zytosolische mit einem Molekulargewicht von 18 kDa, die ihre Wirkung über Rezeptorbindung und den MAP-Kinase-Weg vermittelt, und eine kernständige (MG 24 kDa), welche als zelltypabhängiger Regulator von Differenzierung und Proliferation agiert (Mason IJ et al, 1994; Delrieu I et al, 2000).

Die Verknüpfung zwischen bFGF und der Mutation JAK2 V617F ist das Zytokin Interleukin-6, welches ein für viele Knochenmarkszellen vital wichtiges Signal darstellt und in diesem speziellen Fall über den in Abbildung zwei beschriebenen JAK/STAT-Signalweg die Expression von bFGF fördert.

Es konnte gezeigt werden, dass auf den Thrombozyten und Megakaryozyten vieler Patienten mit Markraumfibrose, gleichgültig ob dieser eine OMF oder eine PV zugrunde liegt, der Thrombopoietinrezeptor Mpl minderexprimiert ist (Moliterno AR et al, 1998; Yoon SY et al, 2000). Weiterhin ist dort nicht nur der normale Rezeptor exprimiert, sondern zusätzlich eine Variante, die auf abnormaler posttranslatinaler Prozessierung beruht (Moliterno AR et al, 1999). Diese Variante ist durch die Unterbindung der negativen Regulation des Rezeptors in ihrer Auswirkung vergleichbar mit erhöhten Spiegeln von Thrombopoetin (TPO). Die Tatsache, dass Mäuse, die mit einem Retrovirus mit zu TPO komplementärer DNA infiziert wurden, eine letale Fibrose entwickeln (Villeval JL et al, 1997), unterstreicht die Rolle von Megakaryozyten bei deren Entstehung, da diese von den bei diesen Mäusen hohen TPO-Spiegeln aktiviert werden. Jedoch spielt hierbei der genetische Hintergrund eine Rolle, andere Mäuse (*non obese diabetic-severe combined immunodeficient NOD-SCID*) reagieren auf die retrovirale Infektion nicht mit einer Fibrose. Aus dem Wissen, dass diese Mäuse einen Defekt auf Monozyten tragen, wurde gefolgert, dass auch Monozyten, alleine oder in Interaktion mit Megakaryozyten, eine Fibrose induzieren. Bei Menschen konnte als Korrelat dieser Beobachtungen in Monozyten von Fibrosepatienten eine spontane Aktivierung des NF- κ B- Signalweges nachgewiesen werden.

Es ist bekannt, dass Megakaryozyten verschiedene Wachstumsfaktoren wie TGF- β , PDGF, Calmodulin oder bFGF freisetzen, die infolge der megakaryozytären Überstimulation die Vermittler der Fibroseentstehung sein könnten, ebenso kommen aktivierte Monozyten als Quelle in Frage (Rameshwar P et al, 1994; Tefferi A et al, 2000; 2005). Allgemein nimmt man eine abnorme Interaktion von Megakaryozyten und Leukozyten an, welche die Freisetzung von fibrogenen Zytokinen induziert (Tefferi A, 2007c).

Tatsächlich entwickelten Mäuse nach Infektion mit dem TPO-DNA-tragenden Retrovirus keine Fibrose, wenn sie zuvor mit hämatopoetischen Zellen des Genotyps TGF- β 1^{-/-} transplantiert worden waren (Chagraoui H et al, 2002). Weiterhin konnte in den TPO-Mäusen eine wahrscheinlich durch eine Fehldistribution von P-Selektin bedingte abnorm gesteigerte Emperipolese (Wandern von Granulozyten durch das megakaryozytäre Zytoplasma) beobachtet werden, die mit der Freisetzung

von Wachstumsfaktoren aus megakaryozytären Speichergranula korreliert (Schmitt A et al, 2002). Passend dazu sind Veränderungen des Zytokinmilieus im Knochenmark bei der Myelofibrose beschrieben (Tefferi A, 2000; 2005).

Diese Beobachtungen betonen die zentrale Rolle, die Zytokine bei der Entstehung der reaktiven Fibrose des Markraumes und vielleicht sogar bei der Induktion der klonalen Proliferation einnehmen, wenn auch ihre kausale pathogenetische Rolle bisher nicht bewiesen werden konnte.

Was das Augenmerk dieser Studie auf den Wachstumsfaktor bFGF lenkt, ist die Tatsache, dass bei MPS die Konzentration von bFGF sowohl im Serum als auch im Urin im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht ist und auch im Blut zirkulierende Megakaryozyten und Thrombozyten bei MPS eine hohe bFGF-Expression zeigen (Dalley A et al, 1996; Martyre MC et al, 1997; Le Bousse-Kerdilés et al, 2001). Immunhistochemische Untersuchungen konnten eine erhöhte Expression der nukleären Isoform von bFGF von Megakaryozyten bei MPS zeigen (Bock O et al, 2002). Weiterhin konnte bei ungefähr 70% der Patienten mit OMF eine vermehrte Mikrovaskularisation des Knochenmarkes nachgewiesen werden, ein Effekt, der gut durch die Wirkungen von bFGF erklärt werden kann, sei es durch eine autokrine Stimulation der Proliferation von Megakaryozyten oder eine direkte Stimulation von Fibroblasten (Bock O et al, 2002).

2. Zielsetzung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob die Mutationsanalyse an formalinfixierten, paraffineingebetteten Knochenmarksbiopsien durchgeführt werden kann. Alle bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien bedienten sich beim Mutationsnachweis peripherer Blutzellpopulationen oder Zellaspiraten aus dem Knochenmark. Der Nachweis an Knochenmarksbiopsien ist methodologisch schwieriger, zum einen wegen der Formalinfixierung des Materials, zum anderen wegen des teilweise größeren Alters der Proben. Die Durchführung von Southern und Northern Blot-Untersuchungen ist beispielsweise an formalinfixiertem Material nicht möglich (Fend F et al, 2002). Falls der Nachweis gelingt, eröffnet sich die Möglichkeit der Mutationsanalyse einer großen Menge von archivierten Knochenmarksbiopsien.

Außerdem soll die Häufigkeit des Auftretens der Mutation im Knochenmark bei den verschiedenen MPS sowie der Anteil der Patienten, der dort homozygot für die Mutation ist, mit den jeweiligen Anteilen im Blut verglichen werden. Das Vorhandensein der Mutation soll mit klinischen Daten korreliert und einige Patienten daraufhin beobachtet werden, ob sich im zeitlichen Verlauf der Erkrankung Änderungen des Mutationsstatus ergeben haben. Desweiteren sollen einige Patienten mit myelodysplastischen Syndromen und Akuter Myeloischer Leukämie (AML) auf das Auftreten von JAK2 V617F untersucht werden. Die bei MPS bekannte Überexpression von bFGF soll mit dem Auftreten einer Fibrose des Knochenmarks und dem JAK2-Status korreliert werden. Dies soll sowohl bei Patienten mit MPS als auch bei Fällen mit AML oder MDS mit und solchen ohne Fibrose geschehen.

Der zweite Teil der Studie beschäftigt sich mit den Megakaryozyten, welche, wie oben beschrieben, eine Schlüsselrolle bei den drei klassischen MPS, insbesondere der ET, einnehmen. Dazu kommt, dass sie nicht oder selten und in einem geringen Anteil ins periphere Blut ausgeschwemmt werden und nicht immer aus dem Knochenmark aspirierbar sind (Hussein K et al, 2006). Daraus ergibt sich, dass sie bisher nicht umfassend untersucht wurden. Interessanterweise ist bei manchen ET-Fällen die JAK2-Mutation in cDNA von thrombozytärer RNA nachgewiesen worden (Thrombozyten besitzen keine eigene DNA), wohingegen die Granulozyten den genetischen Wildtyp aufwiesen (Kiladjian JJ et al, 2006b). Dazu ist bei einigen Patienten ist die thrombozytäre die einzige klonale Zellpopulation (El-Kassar N et al, 1997).

Der Anteil von Patienten mit ET, bei denen JAK2 V617F nachgewiesen werden kann, variiert mit der gewählten Nachweismethode. Je sensitiver die Methode ist, desto höher ist auch der Anteil an mutierten Fällen. Dies könnte den Schluß zulassen, dass bei vielen Fällen von ET nur ein kleiner Teil der gesamten Zellpopulation des Knochenmarks Träger der Mutation ist, wobei die Vermutung nahe liegt, dass dieser kleine Teil die Megakaryozyten sind. Eine Studie konnte bisher bei fünf von 24 untersuchten ET feststellen, dass die Megakaryozyten eine im Vergleich zum Restmark doppelt so hohe Gendosis von JAK2 V617F hatten, in einem Fall waren anscheinend ausschließlich die

Megakaryozyten von der Mutation betroffen (Hussein K et al, 2006). Um den Mutationsstatus der Megakaryozyten zu bestimmen und mit dem anderer Zellen zu vergleichen, sollen Megakaryozyten aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Knochenmarksbiopsien isoliert, auf JAK2 V617F untersucht und mit der nicht-megakaryozytären Restpopulation des Knochenmarkes verglichen werden. Hierfür soll eine Methodik zum Einsatz kommen, die genauere quantitative Aussagen treffen lässt, um bessere Vergleichsmöglichkeiten und eine Beurteilung des Zygotiestatus der einzelnen Populationen erreichen zu können.

Ob auch Lymphozyten die Mutation tragen, ist umstritten. Die Klonalität von sowohl B- als auch T-Lymphozyten hatte zwar in zahlreichen Studien gezeigt werden können (Fialkow PJ et al, 1978; Martin PJ et al, 1980; Raskind WH et al, 1985; Gilliland DG et al, 1991; Tsukamoto N et al, 1994; El-Kassar N et al, 1997; Buschle M et al, 1988; Reeder TL et al, 2003; Kralovics R et al, 2002), jedoch gab es auch Studien, die zumindest für T-Zellen Polyklonalität zeigten (Anger B et al, 1990; Liu E et al, 2003). Diejenigen Studien, die zuerst die Mutation beschrieben, konnten sie in T-Lymphozyten wie oben beschrieben nicht nachweisen (James C et al, 2005; Tefferi A et al, 2005b; Lasho T et al, 2005; Baxter EJ et al, 2005; Kralovics R et al, 2005a; Rumi E et al, 2006).

Diese Frage ist bedeutsam, da sich die lymphozytäre Reihe in der Hämatopoese früh von den anderen Reihen trennt. Ist sie mutiert, liesse dies darauf schliessen, dass die Mutation in einer pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle stattfindet.

Für die Beantwortung dieser Frage sollen Patienten mit einem MPS identifiziert werden, bei denen zugleich Infiltrate von Lymphozyten im Knochenmark beobachtet werden können. Deren Häufigkeit wird mit 30% aller MPS angegeben (Kremer M et al, 2000). Manchmal sind diese Infiltrate ein Teil eines koexistenten Non-Hodgkin-Lymphoms, manchmal sind sie reaktive Ansammlungen. Eine Unterscheidung kann mithilfe eines Klonalitätsnachweises getroffen werden, im ersten Fall sind die Lymphozyten monoklonal, in zweiten polyklonal. In bisherigen Studien konnte keine Involvierung von Zellen von Non-Hodgkin-Lymphomen in das JAK2-Mutationsgeschehen und damit eine mögliche pathogenetische Beteiligung von JAK2 V617F bei diesen Lymphomen gezeigt werden (Lee JW et al, 2006b; Melzner I et al, 2006; Steensma DP et al, 2006; Reading NS, 2006).

Diese lymphozytären Infiltrate sollen aus Knochenmarksbiopsien isoliert und quantitativ auf das Vorhandensein von JAK2 V617F untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Auswahl der Fälle für die Studie

Patienten

Für die Rekrutierung von geeigneten Fällen wurde das Archiv des Instituts für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Höfler) durchgesehen. Es wurde einerseits nach Paraffin-eingebetteten Knochenmarksbiopsien von Fällen mit MPS für die Mutationsanalyse gesucht. Andererseits wurde nach Fällen von MDS und AML gesucht, um die JAK2-Mutation mit der bFGF-Expression und dem Auftreten einer Fibrose zu korrelieren.

Anhand von folgenden histologischen Standardfärbungen wurde die genaue Diagnose reevaluiert und die Fälle gegebenenfalls reklassifiziert:

HE, Giemsa, Gomori, Naphthol-D-AS-Chloroacetatesterase, Eisen, Retikulinfaserfärbung.

Alle Biopsate waren histologischen Standardprotokollen des Instituts folgend unmittelbar nach ihrer Gewinnung in 10%iger, neutraler Formalinlösung über 24 Stunden fixiert und anschließend in neutraler (pH=7,0), gepufferter Natrium-EDTA-Lösung entkalkt worden.

Biopsien von vor 1998 waren in 1% Formaldehyd/0,5% Glutaraldehyd (pH=7,4) fixiert worden.

Die Reevaluation und Reklassifizierung geschah durch zwei erfahrene Hämatopathologen (Prof. Dr. F. Fend, PD Dr. M. Kremer), wobei einerseits die WHO-Kriterien von 2001 (Vardiman JW et al, 2001) und andererseits ein Vorschlag zur Fibrose-Einteilung von Thiele et al (Thiele J et al, 2005) Anwendung fanden (siehe Abbildung 4).

<u>Grad</u>	<u>Beschreibung</u>
<u>0</u>	Vereinzelte lineare Retikulinfaserablagerungen ohne Quervernetzungen, vereinbar mit unauffälligem Knochenmarksbefund
<u>1</u>	Lockerer Retikulinfasergeflecht mit vielen Quervernetzungen, besonders perivaskulär
<u>2</u>	Diffuses und dichtes Retikulinfasergeflecht mit sehr vielen Quervernetzungen, gelegentlich mit fokaler Ablagerung von Kollagenfaserbündeln oder fokaler Osteosklerose
<u>3</u>	Diffuses und dichtes Retikulinfasergeflecht mit sehr vielen Quervernetzungen, Ablagerung von groben Kollagenfaserbündeln, oft mit signifikanter Osteosklerose

Abbildung 4: Einteilung der Schweregrade der Myelofibrose (nach Thiele J et al, 2005)

Falls mehr als ein Knochenmarksbiopsat der ausgewählten Patienten vorhanden war, wurden auch die zusätzlichen Biopsate in die Studie aufgenommen um Informationen über den Krankheitsverlauf zu gewinnen.

Weiterhin wurden für die Studie Fälle von ET und von AML mit Fibrose aus dem Universitätsklinikum Innsbruck (Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Mikuz) zur Verfügung gestellt.

Die Fälle von MPS aus dem Archiv des Instituts für Pathologie und Pathologische Anatomie wurden auch daraufhin untersucht, ob im Knochenmark noduläre lymphoide Infiltrate zu sehen waren (Prof. Dr. F. Fend, PD Dr. M. Kremer). Hierbei spielte es keine Rolle, ob neben dem MPS ein zusätzliches Non-Hodgkin-Lymphom bestand oder die Zellen als reaktive Ansammlung benigner Zellen angesehen wurden. Bei den Fällen mit einem malignen Lymphom fand die WHO-Klassifikation von 2001 Anwendung (Jaffe ES et al, 2001).

Um die Anzahl der Fälle mit solchen nodulären lymphoiden Infiltraten zu erhöhen, wurden derartige Fälle auch vom Universitätsklinikum Würzburg (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H.-K. Müller-Hermelink) zur Verfügung gestellt.

Kontrollen

Als Kontrollen dienten sowohl die Knochenmarksbiopsien von Patienten ohne histologischen oder klinischen Verdacht auf ein MPS als auch solche, bei denen aufgrund von Laborwerten und klinischen Parametern die Verdachtsdiagnose MPS geäußert wurde, sich jedoch histologisch nicht bestätigte, bei denen also eine reaktive Myeloproliferation vorlag. Die Positiv- und Negativkontrollen, die bei den verschiedenen Untersuchungsmethoden verwendet wurden, sind an der jeweiligen Stelle genannt.

Klinische Daten

Sowohl von den Fällen mit MPS wie auch von den Kontrollen mit klinischem Verdacht auf ein MPS wurden folgende klinische Daten erhoben:

Hämoglobinkonzentration, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Bestehen einer Splenomegalie, Datum der Erstdiagnose des MPS sowie gegebenenfalls weitere hämatologische und auch nichthämatologische Diagnosen.

Diese Informationen wurden entweder anhand der Antragscheine auf histopathologische Befundung der Knochenmarksbiopsien oder durch Befragung der behandelnden Hämatologen gewonnen.

3.2. Immunhistochemie

Von den Paraffinblöcken der Fälle, die einer Mikrodissektion zugeführt werden sollten, sowie der Fälle, deren bFGF-Expression untersucht werden sollte, wurden für die immunhistochemischen Färbungen 3-4µm dicke Schnitte hergestellt und auf Glasobjektträger (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH und Co. KG, Sondheim) gebracht. Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert (2 x 5 Minuten in jeweils frischem Xylol, 2 x 5 Minuten in 100% Ethanol, 1 Minute in 100% Ethanol, 2 x 1 Minute in jeweils 96% Ethanol, 1 Minute in 80% Ethanol, 3 Minuten Waschen in fließendem Wasser).

Während des Entparaffinierens wurde der Puffer für den nächsten Schritt (Kochen der Schnitte in der Mikrowelle) hergestellt. Pro Arbeitsgang wurden 1,5 l eines 10 mM Citratpuffers (0,01 mol/l, pH= 6) eingesetzt. Die genaue Anleitung zur Herstellung der Lösung ist im Anhang aufgeführt.

Da die bei Knochenmarksbiopsien durchgeführte Fixierung mit Formaldehyd oder Formaldehyd/Glutaraldehyd Proteine und DNA, die Zielstrukturen für immunhistochemische Untersuchungen, quervernetzt und damit für die Antikörperbindung schwerer zugänglich macht, ist es nötig, ein sogenanntes *antigen retrieval* durchzuführen. Dies bezeichnet die Wiederherstellung der Bindungsstellen für die Antikörper und kann entweder durch Proteasen oder hohe Temperatur geschehen (Dinges HP et al, 2002), wobei letztere die Methode der Wahl in dieser Studie war.

In einem mit 1,5 l Citratpuffer gefüllten Topf wurden die in Glasschaukeln platzierten paraffinfreien Schnitte für 40 Minuten mit 800 Watt in der Mikrowelle gekocht. Nach dem Kochen wurden die Objektträger sofort in 20°C warmen TBS-Puffer (*tris buffered saline*, genaue Zusammensetzung im Anhang) mit 3% Ziegen Serum (Sigma, Deisenhofen) überführt und für mindestens 20 Minuten inkubiert. Das Ziegen Serum soll unspezifische Bindungen an das Gewebe verhindern, so dass der Antikörper nur an die gewünschten Stellen binden kann.

Die Objektträger wurden mit computerlesbaren Etiketten versehen, auf denen die Fallnummer, das Jahr, der verwendete Antikörper und dessen Verdünnung dokumentiert worden war. Die Schnitte wurden über Nacht mit dem mit Diluent (Dako, Kopenhagen, Dänemark) verdünnten Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert.

Es wurden folgende Antikörper, Verdünnungsstufen und Positivkontrollen verwendet:

- Anti-CD 5 (4C7, Dako) 1:30, Positivkontrolle Lymphknoten
- Anti-CD 61 (Y2/51, Dako) 1:80, Positivkontrolle normales Knochenmark
- Anti-bFGF (Monoklonaler Maus-AK, BD Transduction) 1:100, Positivkontrolle Pseudarthrose

Die weiteren Schritte –sekundärer Antikörper, Avidin-Biotin Komplex (ABC), Farbentwicklung und Gegenfärbung– erfolgten automatisiert in einem *Immunostainer* (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) gemäß dem für den jeweiligen Antikörper notwendigen Programm.

Zum Abschluß wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (1 x 80%, 2 x 96%, 2 x 100% Ethanol, 2 x Xylol), eingedeckelt und getrocknet. Die Schnitte für eine nachfolgende Mikrodissektion wurden ohne Deckel in Xylol unter Luftabschluss gelagert.

3.3. Laser Capture Microdissection LCM

Besonders in frühen Stadien von Neoplasien sieht man sich häufig mit dem Problem konfrontiert, dass in einem Gewebe nur eine Minderheit von Zellen die jeweilige Pathologie repräsentiert, sich zugleich

aber einer Vielzahl von normalen oder reaktiv in das Gewebe eingewanderten Zellen gegenüber sieht (Fend F et al, 2003).

Der sich aus dieser Tatsache ergebende Wunsch nach einer Isolierung der pathologisch veränderten Zellen führte zur Entwicklung lasergestützter Zellseparationsverfahren. Mit ihrer Hilfe konnte unter anderem der zelluläre Ursprung des Hodgkin-Lymphoms geklärt werden (Küppers R et al, 1994; Stein H et al, 1999).

Eines dieser Verfahren ist die *Laser Capture Microdissection LCM*. Bei der LCM wird eine auf eine durchsichtige Kunststoffkappe, das sogenannte *Cap*, aufgebrachte, im Durchmesser circa 6mm messende Membran aus Ethylenvinylacetat mithilfe eines Schwenkarmes auf einen dehydrierten, mittels Unterdruck an der Objektebene des Mikroskops befestigten Gewebsschnitt aufgesetzt. Unter mikroskopischer Kontrolle können die Zellen von Interesse visuell selektiert werden. Auf Knopfdruck kann ein Infrarot-laserimpuls freigesetzt werden, welcher fokal die thermoplastische Membran zum Schmelzen bringt. Der Durchmesser des Laserstrahls kann dabei je nach Größe des Zielgebiets manuell von 7,5 bis 30µm reguliert werden. Das Zielgebiet wird vor der Impulsfreisetzung von einem dünnen Fokussierungsstrahl markiert.

Die geschmolzene Membran füllt winzige Zwischenräume im Gewebe aus und wird in Sekundenbruchteilen wieder fest, so dass die selektierten Zellen fest an der Membran haften und sich mit ihr vom Objektträger ablösen lassen.

Die Intaktheit der zu untersuchenden Moleküle wird dadurch gewährleistet, dass der Großteil der Energie von der Membran absorbiert wird und so eine maximale Gewebstemperatur von etwa 90°C erreicht wird, die nur über einige Millisekunden bestehen bleibt. Wegen dieser geringen Energie sind keine photochemischen Effekte zu erwarten (Fend F et al, 2000a).

Es ist sowohl die Durchführbarkeit der LCM an Paraffingewebe beschrieben als auch die Möglichkeit der nachfolgenden Untersuchung von DNA und der ungleich empfindlicheren RNA, von welcher Fragmente von einer Länge bis über 400 bp gewonnen werden können (Fink L et al, 1998; Fend F et al, 1999a; 2000a; 2005; Specht K et al, 2001). Die Durchführung der LCM an immunhistochemisch gefärbten Schnitten erlaubt eine Selektion der Zellen unter funktionellen Gesichtspunkten, wobei konventionelle Färbeprotokolle die DNA-Qualität nicht stark verändern und ohne größere Modifikationen benutzt werden können (Fend F et al, 1999b; 2000a; 2000b).

Durchführung

Wie in Kapitel 3.2. beschrieben wurden 3-4µm dicke Schnitte der Paraffinblöcke der Fälle für die Mikrodisektion gegen CD 61, welches ein Marker für Megakaryozyten ist und zu deren besserer Detektion beitragen sollte, gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden in Xylol luftdicht verschlossen gelagert und unmittelbar vor der Durchführung der LCM luftgetrocknet.

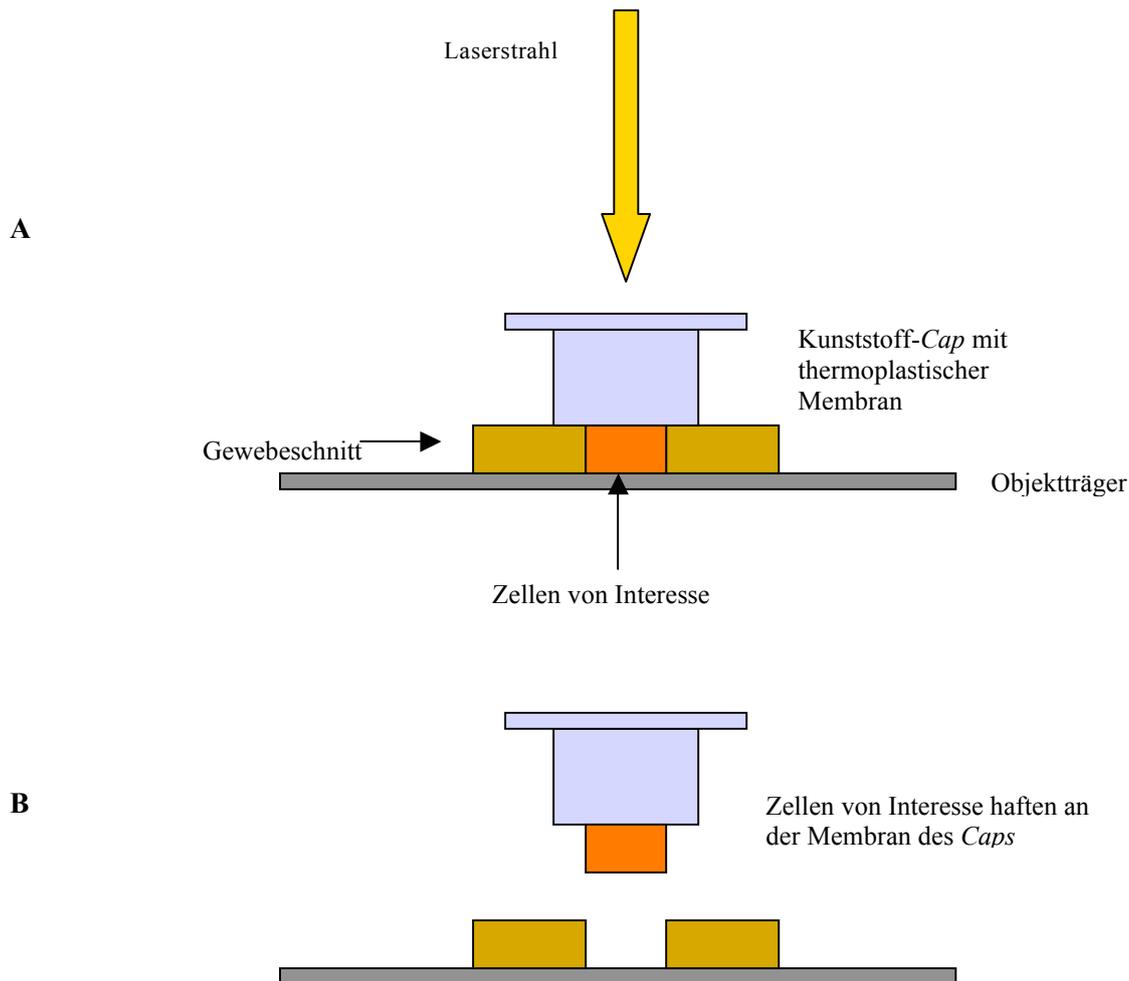


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise der *Laser Capture Microdissection*

Zur Verwendung kam das Mikrodisektionsensemble Pix Cell 2e (Arcturus Engineering Inc., Mountain View, California, USA).

Von jedem Fall wurden möglichst viele sicher identifizierte Megakaryozyten auf einer Membran gesammelt. Die theoretische Regel für das weitere Vorgehen war, auf einer weiteren Membran diejenigen Zellen auszuwählen, die morphologisch nicht sicher der Gruppe der Megakaryozyten zuzuordnen waren, diese zu verwerfen und mit einer dritten Membran die gesamte sicher nicht-megakaryozytäre Restpopulation abzuheben.

Weiterhin wurden von den Fällen mit einem nodulären lymphoiden Infiltrat zwei Membranen angefertigt. Zur besseren Identifizierung der Infiltrate waren diese, wie in Kapitel 3.2. beschrieben, gegen das Lymphozyten-Markerprotein CD 5 immunhistochemisch gefärbt worden.

Die erste Membran beinhaltete die lymphozytären Zellen des Infiltrats, die zweite eine Mischpopulation des Knochenmarks, welche weder Zellen des Infiltrats noch Megakaryozyten enthielt.

3.4. DNA-Extraktion

Zur Gewinnung genomischer DNA aus dem Paraffinmaterial wurde bei den Fällen ohne vorausgegangene Mikrodissektion zuerst eine Entparaffinierung durchgeführt. Hierzu wurden 3-4 Gewebsschnitte von je 10µm in ein Sarstedtröhrchen gegeben, mit 1 ml Xylol versetzt und für 15 Sekunden gemischt. Nach Zugabe von 250µl 70%-igen Ethanol und erneutem Mischen für 15 Sekunden wurden die Röhrchen für 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert.

Zum Trocknen des Gewebsspellets wurde so viel Flüssigkeit wie möglich abpipettiert und der Rest in der Vakuumzentrifuge Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg) bei 45°C bis zum völligen Eintrocknen des Gewebes verdampft.

Das trockene Pellet wurde in einer mit der Gewebsmenge von 25 µl bis 200 µl variierenden Menge von Proteinase K-Puffer gelöst (50ml 1M TRIS-HCl pH=8,3, 2ml 0,5M EDTA pH=8, Aqua destillata ad 1000ml, von dieser Lösung wurden pro 50ml 250µl TWEEN 20 [Merck, Darmstadt] steril in Falcon-Röhrchen filtriert). Meist wurden 100 µl Proteinase K-Puffer verwendet. Nach Zugabe von Proteinase K der Konzentration 20 mg/ml in einem Volumen, das 5% des Puffervolumens entsprach, wurden die Sarstedt-Röhrchen in einem Thermomixer (Eppendorf Thermomixer Comfort) bei 55°C und 550-700 rpm über Nacht inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Röhrchen nachfolgend zehn Minuten lang bei 100°C inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D).

Bei den Fällen mit vorausgegangener Mikrodissektion wurde die Membran, welche die Zellen enthielt, unter sterilen Bedingungen mit einer Pinzette vom Cap gelöst und in ein Sarstedt-Röhrchen mit 25 µl Proteinase K-Puffer gegeben. Nach Zugabe einer entsprechenden Menge Proteinase K (GE Health Care, Dallas, Texas, USA) der Konzentration 20mg/ml entsprach das weitere Vorgehen mit Inkubation über Nacht und Inaktivierung der Proteinase K dem oben beschriebenen.

Anschließend wurden die Proben entweder direkt in die sich anschließenden PCR-Untersuchungen eingesetzt oder im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.5. PCR

Die Polymerasekettenreaktion PCR wurde erstmals 1985 beschrieben (Saiki RK et al, 1985). Eine PCR bietet die Möglichkeit, einen bestimmten Nukleinsäureabschnitt zu vervielfältigen. Hierzu müssen lediglich die Ränder dieses Abschnitts bekannt sein, denn dazu komplementäre, synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die sogenannten *Primer*, müssen dort an die Template-DNA binden.

Das Prinzip jeder PCR besteht aus drei Schritten.

Auf das Denaturieren, das Auftrennen des Doppelstranges, folgt das Annealing, das Binden der *Primer* an die beiden Nukleinsäurestränge, und im Anschluß daran die Neusynthese zu zwei Doppelsträngen mithilfe einer Polymerase. Der gewünschte DNA-Abschnitt wird so in exponentieller Weise vervielfältigt.

Die ursprüngliche Methodik ist in vielfältiger Weise modifiziert worden und es gibt für jede einzelne PCR eigene optimale Bedingungen, die durch die Wahl der Temperaturen für die jeweiligen Schritte und die Konzentrationen der Reagenzien bestimmt werden.

β-Globin PCR

Es ist bekannt, dass aus formalinfixiertem Material extrahierte DNA zu einem gewissen Ausmaß degradiert ist, welches von der Verwendung von Zusatzstoffen wie Glutaraldehyd, der Dauer des Verbleibens des Materials in der Fixationslösung, der Methode der Entkalkung und dem Alter der Biopsien abhängt (Greer CE et al, 1991; 1994). Generell kann man davon ausgehen, dass DNA-Fragmentlängen über 500bp aus solchem Material nur schwer erreicht werden. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass PCR-Untersuchungen gut durchführbar sind (Rogers BB et al, 1990; Coates PJ et al, 1991; Goelz SE et al, 1985), mitunter sogar bei Längen des zu amplifizierenden Fragments über 300bp, beträgt die Verwertbarkeit von DNA aus Paraffinmaterial nie 100% und die Qualität des Materials muss überprüft werden (Provan AB et al, 1992; Fend F et al, 2005; Huang LE et al, 2002, Lehmann U et al, 2001).

Dazu dient die β -Globin PCR, bei der ein 268bp langer Abschnitt des in allen Zellen vorhandenen *housekeeping gene* β -Globin auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 amplifiziert wird und somit bei einem positiven Nachweis Rückschlüsse auf die Qualität des Materials zulässt (Greer CE et al, 1991; Kremer M et al, 2003). Diese Qualitätskontrolle wurde bei nicht-mikrodissezierter DNA nach folgendem Protokoll durchgeführt:

In einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß wurden 15,25 μ l Wasser (ad iniectionabilia), 4 μ l dNTP (Endkonzentration von 5mM pro Base), 2,5 μ l Puffer (MgCl₂-Konzentration von 20 mM), jeweils 0,5 μ l der unten aufgeführten Primer PC 04 und GH 20 in einer Endkonzentration von 20 pM, 0,25 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l) (GE Health Care) und 2 μ l der Proben-DNA zu einem 25 μ l-Ansatz gemischt. Die Proben-DNA wurde zunächst in einer 1:10-Verdünnung eingesetzt. Falls keine Amplifikation nachgewiesen werden konnte, wurde die Reaktion mit unverdünnter DNA wiederholt.

PC 04: 5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC- 3'

GH20: 5'- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC- 3'

Bei allen PCR-Untersuchungen kam entweder der Cyclyer Primus 96 plus (MWG-Biotech, Ebersberg) oder der PTC Peltier Thermal Cyclyer 200 (MJ Research, San Diego, USA) zum Einsatz.

Anfangs wurde für vier Minuten bei 94°C denaturiert, danach folgten 40 Zyklen, die aus einer Minute Denaturierung bei 94°C, einer Minute Annealing bei 55°C und einer Minute Synthese bei 72°C bestanden. Nachdem der letzte Zyklus beendet und für sieben Minuten eine Temperatur von 72°C gehalten worden war, wurden die Reaktionsprodukte bis zu ihrer Entnahme auf 4°C gekühlt.

Zur Visualisierung des PCR-Produkts wurde bei allen PCR-Untersuchungen eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Herstellung des Gels erfolgte mit 2g Agarose (SeaKem LE Agarose, BMA, Rockland, ME, USA) in 100ml 1xTBE- Puffer (1:10-Verdünnung des 10xTBE-Puffers, genaue Zusammensetzung im Anhang [invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA]) und einem Tropfen Ethidiumbromid (Eurobio, Cedex, Frankreich) der Konzentration 0,7 mg/ml. Ethidiumbromid leuchtet nach Interkalation in die DNA unter UV-Bestrahlung blau auf. Als Elektrophoresepuffer kam mit Ethidiumbromid (1 Tropfen je 100ml) versetzter 1xTBE Puffer zum Einsatz.

Jeweils 5 µl des PCR-Produkts wurden zur Darstellung der Laufweite auf dem Gel bei Raumbeleuchtung mit 1 µl violetter Ladepuffer (10xDyes) durchmischt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Identifikation der β-Globin-Bande kamen in einer zusätzlichen Geltasche 5 µl eines Längenmarkers zum Einsatz (1µl DNA Marker 9 [Fermentas, St. Leon-Rot], 6 µl 6x Loading Dye Solution, 24 µl Aqua dest.).

Zum Ausschluß von Kontaminationen der PCR-Reagenzien wurde bei jedem Ansatz ein Reaktionsgefäß ohne DNA belassen und diente als Negativkontrolle.

Die Elektrodenspannung wurde auf 130 Volt eingestellt und das Ergebnis nach 25-30 Minuten unter UV-Licht abgelesen und fotografiert.

Allelspezifische PCR

Für den Nachweis der Mutation JAK2 V617F bei nicht-mikrodisseziertem Material wurden zwei verschiedene PCR-basierte Methoden eingesetzt, eine *Nested PCR* mit anschließendem Restriktionsenzymverdau (siehe dort) und eine für das mutierte Allel spezifische PCR.

Bei dieser wurden, statt der üblichen zwei, insgesamt drei Primer mit den folgenden Sequenzen eingesetzt:

<u>F (interne Kontrolle):</u>	5'- ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG AGA AAG -3'
<u>F (mutationsspezifisch):</u>	5'- AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATT -3'
<u>R (gemeinsam):</u>	5'- CTG AAT AGT CCT ACA GTG TTT TCA GTT TCA -3'

Der zweitgenannte Primer F (mutationsspezifisch) kann aufgrund des Basenaustauschs G→T nur an das mutierte Allel binden, zusätzlich ist seine Bindungsspezifität durch einen mit Absicht

herbeigeführten *mismatch* am 3'-Ende erhöht. Die Primersequenzen waren in der Literatur zuvor bereits beschrieben worden (Baxter EJ et al, 2005).

Der Rückwärtsprimer und der Vorwärtsprimer der internen Kontrolle amplifizieren in allen Proben ein 364bp langes Kontrollfragment. Wenn die Mutation vorhanden ist, kann auch der mutationspezifische Vorwärtsprimer an die DNA binden und gemeinsam mit dem Rückwärtsprimer ein zusätzliches 203bp langes Fragment amplifizieren.

Es wurde ein 25 µl-Ansatz in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß benutzt, bestehend aus 14,75 µl Aqua destillata, 4 µl dNTP, 2,5 µl PCR-Puffer (MgCl₂-Konzentration 15 mM), je 0,5 µl der drei Primer, 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) und 2 µl Proben- DNA.

Auch bei dieser PCR betrug die Zykluszahl 40:

- 1 Minute Denaturierung bei 94°C
- 1 Minute Annealing bei 60°C
- 1 Minute Synthese bei 72°C

Nach Beendigung der 40 Zyklen wurde das PCR-Produkt nach weiteren sieben Minuten bei 72°C auf 10°C gekühlt, der Nachweis der Banden geschah dem der β-Globin- PCR entsprechend.

Da das bei dieser PCR amplifizierte längere Fragment ebenso wie bei der Globin-PCR als Kontrolle der DNA-Qualität verstanden werden konnte, wurde das Material als verwendbar angesehen, wenn entweder der Globinnachweis oder der Nachweis dieser Kontrollbande gelang. Anderenfalls wurde der Fall aus der Studie ausgeschlossen.

Nested PCR und Restriktionsenzymverdau mit Bsa XI

Unter einer *Nested PCR* versteht man das direkte Hintereinanderschalten von zwei PCR-Reaktionen, wobei das Produkt der ersten als Template in die zweite eingesetzt wird. Die in der zweiten Reaktion benutzten Primer müssen innerhalb des ersten Primerpaares liegen, daher spricht man von einem externen und einem internen Primerpaar.

Die Stelle der Mutation liegt dabei innerhalb des internen Amplifikats und wird durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym Bsa XI nachgewiesen. Restriktionsenzyme können Nukleinsäuren nur an definierten Basensequenzen schneiden. Der Basenaustausch, der zu JAK2 V617F führt, zerstört die von Bsa XI auf dem Wildtypallel vorhandene Erkennungsstelle ([9/12] ACNNNNNCTCC [10/7]) und verhindert die enzymatische Spaltung des Amplifikats.

Das Produkt des zweiten Schrittes der *nested PCR* ist 373bp lang und wird im Fall der Wildtyp-DNA durch BsaXI in ein 170bp und ein 203bp langes Fragment geschnitten. Mutierte DNA kann nicht geschnitten werden. Somit kann aufgrund der in der Gelelektrophorese auftretenden Banden einerseits darauf geschlossen werden, ob die Mutation vorhanden ist oder nicht, andererseits auch eine

Abschätzung erreicht werden, ob in einer Probe das mutierte oder das Wildtypallel überwiegt. Erschien die Bande bei 373bp stärker als der optische Summeneindruck der beiden bei 170bp und bei 203bp, wurde der Fall als homozygot mutiert bezeichnet, da bei einer relativen Häufigkeit des mutierten Allels von über 50% homozygote Zellen vorhanden sein müssen.

Der 25µl-Ansatz setzte sich sowohl beim internen als auch beim externen Reaktionsabschnitt wie folgt zusammen:

15,25 µl Aqua destillata, 4 µl dNTP, 2,5 µl PCR-Puffer (MgCl₂- Konzentration 15 mM), jeweils 0,5 µl der eingesetzten Primer, 0,25 µl Taq-Polymerase und 2 µl Proben-DNA beim externen Abschnitt beziehungsweise Amplifikat beim internen Abschnitt.

Die verwendeten Primersequenzen waren:

R (extern): 5' - TTG TTT GGG CAT TGT AAC CTT C - 3'

F (extern): 5' - GGT TTC CTC AGA ACG TTG ATG - 3'

R(intern):

5' - CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCC TAC AGT GTT TTC AGT TTC AAA AA - 3'

F(intern):

5' - GTA AAA CGA CGG CCA GTT GCT GAA AGT AGG AGA AAG TGC AT - 3'

Die externe PCR setzte sich aus 35 Zyklen zusammen, bestehend aus je einer Minute Denaturierung bei 94°C, Annealing bei 55°C und Synthese bei 72°C.

Bei der internen PCR wurden 25 Zyklen durchgeführt. Die Annealingtemperatur wurde auf 60°C erhöht. Nach Beendigung jedes Zyklus wurde für jeweils sieben Minuten auf 72°C erwärmt und auf 10°C gekühlt.

Zur Kontrolle der Amplifikation wurden die Produkte der internen PCR wie oben beschrieben mit Ethidiumbromid angefärbt, in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert. Konnte eine Bande nachgewiesen werden, wurden 5 µl des Amplifikats zu 0,5 µl BsaXI der Konzentration 2000 U/ml (New England Biolabs, Hitchin, UK) und 0,6 µl BsaXI-Puffer (New England Biolabs, Hitchin, UK) gegeben und für mindestens 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde eine erneute Gelelektrophorese durchgeführt und das Ergebnis wie oben beschrieben abgelesen und interpretiert.

PCR für das Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangement (FR 3A)

Um die Klonalität der Zellen aus den mikrodisszierten lymphoiden Infiltraten zu beurteilen, wurde eine PCR durchgeführt, welche die hochvariable Region der V_H-D_H-J_H-Sequenz von B-Lymphozyten untersuchte. Falls eine (Sub-)population von Zellen existiert, die in dieser Sequenz identisch sind, so

erhält man in der Gelelektrophorese eine oder wenige klar definierte Banden und diese Zellen können als klonal bezeichnet werden.

Es wurden Konsensusprimer für die *framework region 3* des variablen Abschnitts und für die *joining region Jha* verwendet (Segal GH et al, 1994). Unter Konsensusprimern versteht man solche, die keine 100%ige Komplementarität ihrer Bindungssequenz benötigen.

Ihre Sequenzen waren:

FR3A: 5'- ACA CGG C(C/T)(G/G) TGT ATT ACT GT - 3'

Jha: 5'- ACC TGA GGA GAC GGT CAC C - 3'

Da im Anschluß an die PCR eine Fragmentlängenanalyse durchgeführt werden sollte, war der Jha-Primer fluoreszenzmarkiert. Jeder Fall wurde mindestens im doppelten Ansatz untersucht.

Der 25 µl-Ansatz bestand aus 15,25 µl Aqua destillata, 4 µl dNTP, 2,5 µl Puffer (MgCl₂-Konzentration 20 mM), je 0,5 µl der beiden Primer und 0,25 µl *AmpliTaqGold* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Dazu wurden 2-8 µl Proben-DNA gegeben. Je nach der Menge der eingesetzten DNA wurde die Wassermenge dem Gesamtvolumen von 25 µl entsprechend reduziert.

Bei jedem Ansatz wurden zugleich geeignete polyklonale (DNA eines reaktiv veränderten Lymphknotens) sowie monoklonale (DNA eines malignen Lymphoms) Kontrollen und eine DNA-freie Kontrolle untersucht.

PCR-Programm:

10 Minuten bei 95°C

40 Zyklen zu: - 1 Minute bei 94°C

- 1 Minute bei 56°C

- 1 Minute bei 74°C

6 Minuten bei 74°C, Abkühlen auf 4°C

Die Elektrophorese erfolgte wie oben beschrieben, allerdings aufgrund der Möglichkeit der schärferen Trennung der Banden in einem 3%-Metaphor®-Gel (FMC Bio Products, Rockland, ME, USA).

PCR für das TCRγ-Rearrangement

Um auch die Klonalität von T-Zell-Infiltraten untersuchen zu können, wurde eine PCR der den T-Zell-Rezeptor kodierenden DNA durchgeführt. Die Auswertung geschah analog der bei der *framework 3 PCR* beschriebenen, viele Banden zeugten von Polyklonalität, eine oder nur wenige Banden von Monoklonalität.

Um der hohen Variabilität des T-Zell-Rezeptors Rechnung zu tragen, wurden einerseits in jeden Ansatz zwei verschiedene Vorwärts-Primer (Vg 11 und Vg 101) in die PCR eingesetzt und andererseits von jeder Probe zwei Ansätze mit unterschiedlichen Rückwärtsprimern (Jp und Jg) untersucht. Diese Maßnahmen erhöhten die Wahrscheinlichkeit einer Bindung der eingesetzten Primer an die T-Zell-Rezeptor-Sequenz der Probe.

Die verwendeten Primersequenzen waren:

TCR γ Vg 11: 5'- TCT GG(G/A) GTC TAT TAC TGT GC -3'

TCR γ Vg 101: 5' – CTC ACA CTC (C/T)CA CTT C – 3'

TCR γ Jp 11: 5' – GTT ACT ATG AGC (C/T)TA GTC C – 3'

TCR γ Jg 11: 5' – CAA GTG TTG TTC CAC TGC C – 3'

Der Primer Jg 11 war wegen der folgenden Fragmentlängenanalyse mit dem Farbstoff HEX fluoreszenzmarkiert.

Ein 25 μ l-Ansatz der PCR bestand aus 15 μ l Aqua destillata, 4 μ l dNTP, 2,5 μ l PCR-Puffer (MgCl₂-Konzentration 15 mM), je 0,3 μ l der Primer Vg 11 und Vg 101, 0,6 μ l Primer Jg oder Jp, 0,3 μ l AmpliTaq Gold und 2 μ l 1:10-verdünnte Proben-DNA.

Gleichgültig mit welchem Rückwärtsprimer der Ansatz hergestellt wurde, bestand der Reaktionsablauf aus folgenden Schritten:

10 Minuten bei 95°C

40 Zyklen zu:

- 1 Minute bei 94°C
- 1 Minute bei 57°C
- 1 Minute bei 72°C

7 Minuten bei 42°C

10°C bis zum Entfernen der Proben

Erneut wurden in allen Reaktionen bekannte polyklonale (DNA eines reaktiven Lymphknotens) und bekannte monoklonale (DNA eines malignen Lymphoms) sowie leere Kontrollen mitgeführt.

Wie oben beschrieben wurden die PCR-Produkte auf ein 3%-iges Metaphor®-Gel aufgetragen und nach dem Lauf ausgewertet.

Generell kann mit den beschriebenen Klonalitätsanalysen ein Anteil klonaler B-/T-Zellen zwischen 2 und 10% detektiert werden (Fend F et al, 2003).

3.6. Fragment-Längen-Analyse

Bei den Produkten aus den PCR für das Rearrangement von IgH beziehungsweise TCR γ wurde zur besseren Interpretierbarkeit des Ergebnisses eine Fragment-Längen-Analyse durchgeführt (Gene Scan, Perkin Elmer, Weiterstadt). Durch diese Methode können monoklonale Banden vor einem polyklonalen Hintergrund, der auch bei maligner Infiltration vorkommen kann, besser aufgetrennt und erkennbar gemacht werden. Weiterhin kann die genaue Länge der Fragmente bestimmt werden, was einen guten Vergleich der einzelnen Produktgrößen ermöglicht (Worley J et al, 1997; Kremer M et al, 2000).

Herstellung des Polyacrylamidgels:

21 g Harnstoff (Gibcol, Life Technologies, Carlsbad, USA)

5 ml 10xTBE/EDTA

Hydrolink 5 ml (*long ranger hydrolink gel*) (BMA, Rockland, ME, USA)

Aqua-Spüllösung ad 50 ml

Die Reagenzien wurden sorgfältig durchmischt, vollständig in Lösung gebracht, gefiltert und bis zur kompletten Blasenfreiheit entgast. Zur Polymerisation wurden 350 μ l einer 10%-igen Ammoniumpersulfatlösung von -20°C und 15 μ l Tetramethylethylendiamin TEMED (Bio-Rad, München) für die Polymerisation hinzugegeben.

Nach Gießung des Gels mittels einer dafür vorgesehenen Spritze zwischen zuvor vorbereitete Platten wurde der 34-Zacken-Kamm eingesetzt und die Polymerisation für 1,5 Stunden abgewartet.

Probenvorbereitung und Gellauf

Für die Laflösung wurden 20 μ l Genescan 500 TAMRA, 20 μ l *loading buffer* und 80 μ l Formamid vermischt. Von dieser Laflösung wurden je 3 μ l in eine 96-Loch-Platte pipettiert und 1 μ l PCR-Produkt zugegeben, welches je nach Stärke der Bande von unverdünnt bis zu einer 1:20-Verdünnung eingesetzt wurde.

Nach Vorbereitung des Laufpuffers aus 150 ml 10xTBE/EDTA und 1350 ml Aqua destillata wurden die erforderlichen Daten in den Computer eingegeben und der Heizblock der Genescanmaschine auf 95°C aufgeheizt. Das Polyacrylamidgel wurde nach Vorschrift in die Maschine eingehängt, *loading buffer* in ausreichender Menge zugegeben und der Vorlauf zur Erwärmung des Gerätes und zur Kontrolle der Sauberkeit der Platten durchgeführt.

Nach Denaturierung der Proben im Brutschrank bei 95°C für 5 Minuten und anschließender Lagerung auf Eis wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Der Lauf dauerte zwei Stunden und wurde mit der zugehörigen Software (Genescan, Perkin Elmer, Weiterstadt) ausgewertet.

3.7. Sequenzierung

Zur Bestätigung und Kontrolle der PCR-Methoden wurde die DNA einiger Fälle sequenziert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem zufälligen Einbau fluoreszenzmarkierter Dideoxynukleotide in den neusynthetisierten DNA-Strang während einer PCR. Wegen des Fehlens einer Hydroxylgruppe am 3'-Ende führt dies zum Syntheseabbruch und damit zum Vorhandensein verschieden langer Nukleinsäureketten, die alle ein Dideoxynukleotid mit einem je nach Base unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff am 3'-Ende tragen. Die Fragmente können mittels einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt und durch Detektion der Fluoreszenzsignale die Basensequenz ermittelt werden.

Als Template wurde das Produkt des internen Reaktionsteiles der oben beschriebenen *Nested PCR* verwendet. Vor Einsetzen in die *Cycle PCR* wurde dieses Reaktionsprodukt mit dem *Qia Quick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers gereinigt und das erhaltene aufgereinigte Amplifikat auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen und nach 25-minütigem Lauf bei 130 V unter UV-Licht abgelesen und fotografiert. Die Stärke der beobachteten Bande diente als Orientierung für das Template-Volumen, das in die *Cycle PCR* eingesetzt wurde. Maximal waren dies 14 µl. Der verwendete Primer war der Vorwärtsprimer der *Nested PCR*.

Für die CyclePCR wurden 4 µl Premix (Applied Biosystems), 2 µl Big Dye Sequencing Buffer, 0,25µl Primer (Konzentration 5 pM) und wie oben erwähnt maximal 14 µl Template vermischt und mit Aqua destillata zu einem Gesamtansatz von 20 µl ergänzt.

Die PCR bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt bei 96°C für eine Minute und 25 Zyklen zu je 10 Sekunden bei 96°C, 5 Sekunden bei 60°C und weiteren 4 Minuten bei 60°C.

Im Anschluß an die PCR wurde das Produkt mit dem Dye Ex 2.0 Spin Kit (50) (Qiagen, Hilden, Deutschland) nochmals gereinigt und 5 µl davon der Kapillarelektrophorese mit Detektion der Sequenz im ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems) zugeführt. Die Basensequenz wurde von der zugehörigen Software ermittelt.

3.8. Real-Time quantitative TaqMan PCR

Hintergrund

Da die Quantifizierung des mutierten Allels in der *nested PCR* in einem nicht vernachlässigbaren Ausmaß subjektiv war und die Ergebnisse der auch am mikrodissidierten Material getesteten PCR-Untersuchungen nicht immer reproduzierbar waren, wurde für die Untersuchung dieses Materials eine *real-time quantitative TaqMan PCR (qPCR)* durchgeführt.

Grundsätzlich ist die Menge an DNA, die in eine PCR eingesetzt wird, der Menge des erhaltenen Amplifikats nicht proportional. Gründe hierfür sind zum Beispiel eine mit zunehmender Dauer der Reaktion abnehmende Konzentration von dNTP oder die zunehmende sterische Hemmung der Primer durch die große Zahl an neu synthetisierten Oligonukleotidsträngen, was zu einem Abweichen von der exponentiellen Natur der PCR führt. Endpunktanalysen sind daher nicht möglich.

1993 wurde erstmals eine quantitative PCR beschrieben und die Verfahren danach ständig weiterentwickelt. Ihre Anwendungsbereiche liegen zum Beispiel in mRNA-Expressionsmustern, Bestimmung von DNA-Kopienzahlen und einer allelischen Diskriminierung (Ginzinger DG, 2002).

Die Durchführbarkeit der qPCR an formalinfixiertem Paraffinmaterial und an mikrodissiziertem Material war in vorherigen Studien gezeigt worden. Es hat sich herausgestellt, dass die Qualität der Ergebnisse wegen der oben beschriebenen Degradation stark von der Länge des zu amplifizierenden Nukleinsäureabschnitts abhängt. Dieser sollte daher möglichst kurz gewählt werden. Weiterhin ist beschrieben, dass fünf bis zehn DNA-Moleküle als Ausgangsmaterial ausreichend sind (Leutenegger CM, 2001; Specht K et al, 2001).

Das in der vorliegenden Studie angewendete Verfahren des *5'-Nuklease-Assay* basiert auf dem zielspezifischen Binden von fluoreszenzmarkierten Sonden. Im Ruhezustand wird ihr Fluoreszenzsignal von einem Molekül am 3'-Ende absorbiert, dessen Resonanzfrequenz genau im Bereich der Frequenz der emittierten Fluoreszenz liegt. Diese Absorption entfällt, wenn der am 5'-Ende angebrachte Fluoreszenzfarbstoff von der Taq-Polymerase abgetrennt und damit räumlich vom 3'-Ende der Sonde getrennt wird. Die Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) entwickelte als absorbierendes Molekül am 3'-Ende einen sogenannten *minor groove binder (mgb)*. Dieser *mgb* erhöht den Schmelzpunkt der Sonde und ermöglicht damit den Einsatz kürzerer Sonden.

Nach jedem PCR-Zyklus kann die Stärke des Fluoreszenzsignals, welche der Menge des Allels, an das die entsprechende Sonde bindet, proportional ist, gemessen und als Funktion der Zykluszahl in halblogarithmischer Weise aufgetragen werden. So erhält man nach dem Start einen rein logarithmischen Bereich der Reaktion, der am Ende aus den oben besprochenen Gründen stark abflacht.

Je größer die ursprünglich eingesetzte DNA-Menge ist, desto früher wird ein Fluoreszenzsignal erreicht werden, dessen Stärke signifikant größer ist als die des immer vorhandenen Hintergrundsignals. Die Zykluszahl, in der das passiert nennt man *cycle threshold* oder kurz *Ct-Wert*.

Um alle amplifizierten Nukleinsäurestränge zu erfassen, muß gewährleistet sein, dass an jedes dieser Moleküle eine Sonde bindet, bevor die Primer dies tun und die Synthese beginnt. Das wird durch einen Schmelzpunkt der Sonden erreicht, der etwa 10°C über dem der Primer liegt (Leutenegger CM, 2001).

Die Effizienz der TaqMan PCR kann mit einer Standardkurve bestimmt werden, in der eine bekannte Ausgangskonzentration mehrere Male zehnfach verdünnt und der für die jeweilige Konzentration erhaltene Ct-Wert graphisch gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten Konzentration

aufgetragen wird. Ist die Steigung der resultierenden Geraden -3.32 , so beträgt die Effizienz der PCR 100%. Die Effizienz sollte über 90% liegen, die Abweichung von 100% kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Abweichung der Effizienz (in \%)} = [10^{(1/\text{Steigung})} - 1] \times 100\%$$

Auf jeder 96-Loch-Platte ist eine solche Standardkurve mitgeführt worden. Die Effizienz einer *Real-time PCR* wird besonders beeinflusst durch die Konzentration an Magnesiumchlorid MgCl_2 sowie der Primer- und der Sondenkonzentration (Ginzinger DG, 2002).

Durchführung

Von den Fällen, deren Anteil des mutierten Allels in Megakaryozyten von Interesse war, wurde die DNA von den Schnitten des gesamten Knochenmarks ebenso in den TaqMan eingesetzt wie mikrodissenzierte megakaryozytäre beziehungsweise nicht-megakaryozytäre DNA. Alle Proben wurden jeweils in doppeltem Ansatz untersucht.

Von den Fällen mit nodulären lymphoiden Infiltraten ist die DNA von Zellen des gesamten Marks, lymphozytäre DNA und DNA der nicht-lymphozytären, nicht-megakaryozytären Restpopulation, ebenfalls jeweils in doppeltem Ansatz untersucht worden.

Als Vergleichswert diente DNA von den Zelllinien HEL (humane Leukämiezelllinie, ATCC TIB 180) beziehungsweise ANBL-6 (humane Myelomzelllinie, erhalten von DF Jelinek, nach Jelinek DF et al, 1993), von denen die erstgenannte den Genotyp JAK2 V617F/V617F, letztere JAK2 WT/WT besitzt. Zusätzlich zu diesen Positiv- und Negativkontrollen wurden auf jeder TaqMan-Platte sechs Löcher ohne Template-DNA belassen, die als *No Template Control NTC* keine Fluoreszenz über dem Hintergrundrauschen zeigen durften.

Die Primer für die TaqMan PCR amplifizierten ein 86bp langes Fragment. Ihre Sequenzen waren:

JAK2-R: 5' - AAA GGC ATT AGA AAG CCT GTA GTT TTA CT - 3'

JAK2-F: 5' - TCA CAA GCA TTT GGT TTT AAA TTA TGG - 3'

Die Sonden hatten folgende Zusammensetzung:

JAK2-1: 5' - FAM - TCC ACA GAC ACA TAC T - mgb - 3'

JAK2-2: 5' - VIC - CTC CAC AGA AAC ATA CT - mgb - 3'

Das Fluoreszenzsignal der Sonde VIC war das Signal des mutierten Allels, das der Sonde FAM gehörte zum Wildtypallel.

Zur Quantifizierung der Proben wurde zum Bestimmen eines Referenzwertes zunächst die DNA der beiden Zelllinien nach folgendem Protokoll präamplifiziert:

Es wurden 3 µl zehnfach verdünnte, aus Paraffinmaterial extrahierte DNA in die Reaktion eingesetzt. Die übrigen Reagenzien sind dieselben wie die unten für die übrigen TaqMan-Läufe angegebenen, mit dem Unterschied, dass die Sonden durch Aqua destillata ersetzt wurden.

Das PCR-Programm bestand aus zwei Minuten bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95°C und einer Minute bei 64°C.

Das Amplifikat wurde mit dem QiaQuick Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt, seine Konzentration in einem Spektralphotometer (NanoDrop, Wilmington DE, USA) in ng/µl gemessen und unter Anwendung des folgenden Zusammenhangs in die Einheit Kopienzahl/µl umgerechnet:

1 µg DNA mit 1000bp enthält $9,1 \times 10^{11}$ Kopien.

Daraus folgt:

1 ng DNA mit 87bp enthält $1,046 \times 10^{10}$ Kopien.

Von den Amplifikaten wurden Verdünnungen zu 10^6 Kopien/µl, 10^5 Kopien/µl, 10^4 Kopien/µl, 10^3 Kopien/µl und 10^2 Kopien/µl hergestellt und zum Zwecke der Berechnung des genauen Zusammenhangs zwischen Ct-Wert und Kopienzahl in jeweils dreifachem Ansatz in die qPCR eingesetzt.

Der Reaktionsansatz für jede durchgeführte TaqMan PCR enthielt ein Volumen von 23µl pro Loch und setzte sich wie in Tabelle 3 gezeigt zusammen.

2,3 µl 10x Puffer	1,15 µl Sonde I
2,3 µl MgCl ₂ 50 mM	1,15 µl Sonde II
0,92 µl dNTP 5 mM	0,115 µl Taq Hot Gold Star
0,69 µl F-Primer	10,685 µl Aqua destillata
0,69 µl R-Primer	3 µl unverdünnte Template-DNA

Tabelle 3: Zusammensetzung der Reagenzien für die TaqMan-PCR

Dabei stammten Puffer, MgCl₂, dNTP und Taq Hot Gold Star aus dem *Taq Man Kit* von eurogentec (Seraing, Belgien).

Die qPCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

2 Minuten bei 50°C → 10 Minuten bei 95°C

40 Zyklen: - 15 Sekunden bei 95°C

- 1 Minute bei 64°C

Zur Auswertung wurden die ermittelten Ct-Werte über oben genannte Beziehung zwischen Kopienzahl und Ct-Wert in Kopienzahlen umgerechnet und daraus die Frequenz des mutierten Allels bestimmt. Diese ergab sich wie folgt:

$$\text{Frequenz (in \%)} = \frac{\text{Kopienzahl(VIC)}}{\text{Kopienzahl(VIC)} + \text{Kopienzahl(FAM)}}$$

Fälle mit einer Frequenz des mutierten Allels von über 50% wurden als homozygot klassifiziert, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass zwischen 40% und 60% eine Zone liegt, in der die Genauigkeit der Methode nicht ausreicht, um die Fälle mit letzter Sicherheit in die heterozygote oder die homozygote Gruppe einordnen zu können.

Da die beiden Sonden nicht zu 100% spezifisch an ihr Zielallel binden, wird auch in reiner DNA der Zelllinie ANBL-6, die ja die Mutation nicht trägt, immer ein gewisses Signal der VIC-Sonde registriert und damit ein geringer Prozentsatz mutierten Allels berechnet. Um die Grenze zwischen nicht mutierten und heterozygot mutierten Proben festzulegen, wurden alle Prozentsätze, die in reiner Wildtyp-DNA als mutierter Anteil berechnet wurden, zusammengestellt, das arithmetische Mittel berechnet und zu diesem die dreifache Standardabweichung des Mittels addiert:

$$\text{Cutoff (in \% mutiertes Allel)} = \sum(\text{scheinbare JAK2 V617F-Frequenz in ANBL-6})/n + 3 \times \text{StdDev}$$

Man erhielt somit einen Wert für den Anteil mutierten Allels, oberhalb dessen die Proben mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,7% tatsächlich die Mutation aufwiesen.

Als maximaler für das FAM-Signal akzeptabler Ct-Wert wurde 35 festgelegt. Bei homozygot mutierten Proben, die ja mehr VIC-Signal als FAM-Signal emittierten, galt dieses Maximum für die VIC-Sonde. Zusätzlich durfte die Differenz der entsprechenden Ct-Werte der Duplikate nicht größer als eins sein. Anderenfalls wurden die Proben aus der Studie ausgeschlossen. Lediglich bei exzellenter Übereinstimmung der Duplikate konnte als Einzelfallentscheidung von diesen Regeln abgewichen werden.

An dieser Stelle soll betont werden, dass die hier angewandte Berechnungsmethodik keine absolute Quantifizierung zulässt, sondern nur den Vergleich des Signals der einen Sonde in Relation zu dem der anderen.

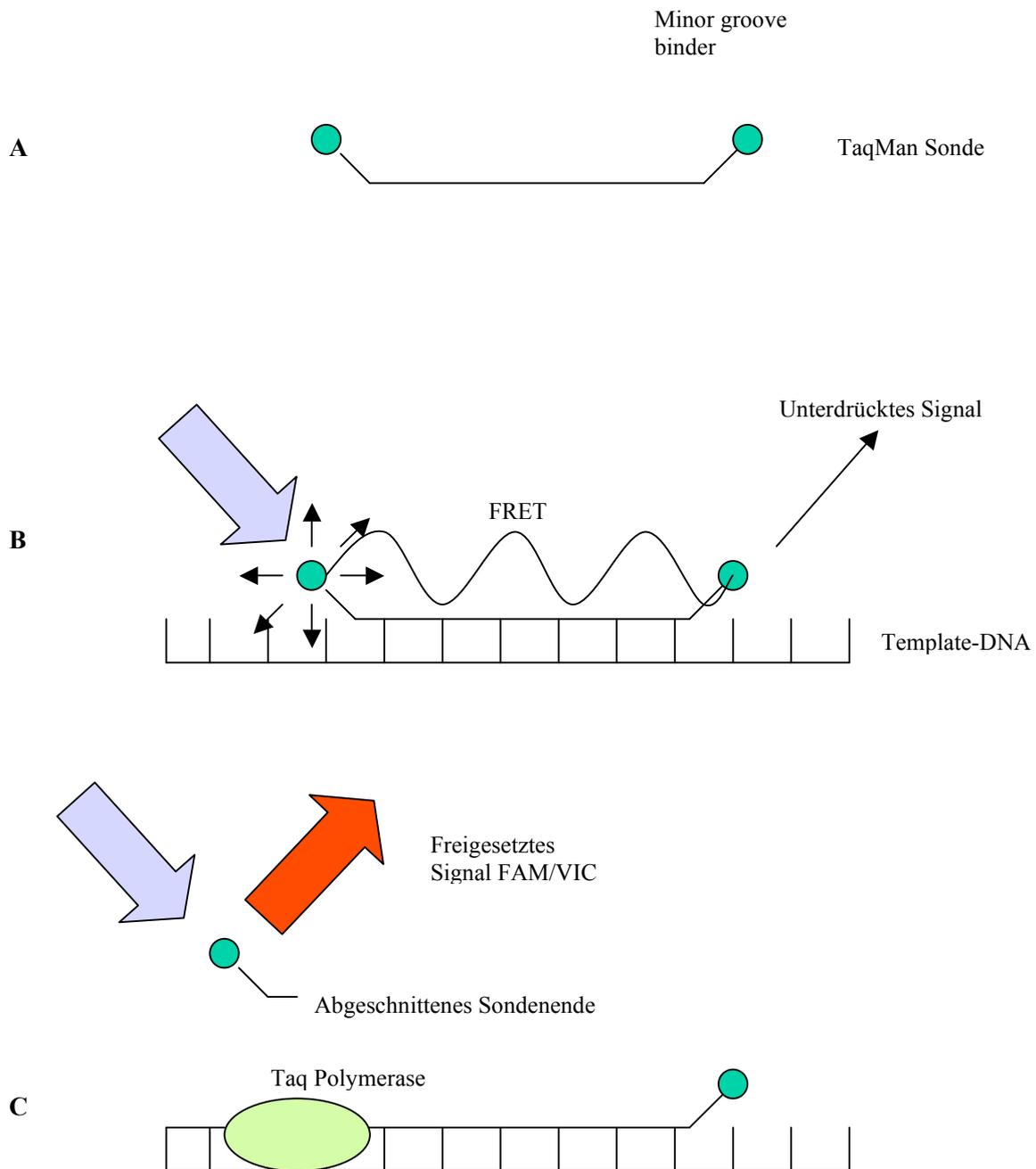


Abbildung 6: Funktionsprinzip der verwendeten TaqMan Sonden. Der *minor groove binder* am 3'-Ende der Sonde absorbiert bei intakter Sonde das am 5'-Ende emittierte Signal. Wird die Sonde durch die Exonuklease- Aktivität der Taq-Polymerase zerstört, wird diese Absorption durch die räumliche Trennung von 5'-und 3'-Ende aufgehoben. (nach: Ginzinger DG, 2002) (FRET=Fluorescence resonance energy transfer)

4. Ergebnisse

4.1. Patienten

Die Archivsuche ergab 127 Fälle von MPS und einen Fall von myelodysplastischem Syndrom, der später als MPS reklassifiziert wurde. Dreizehn weitere Fälle wurden integriert, bei denen der klinische Verdacht auf ein MPS eine Knochenmarksbiopsie rechtfertigte, die sich dann als nicht-myeloproliferativ herausstellten. Es fanden sich also 141 Fälle mit MPS beziehungsweise einer reaktiven Steigerung der Hämatopoese ohne zugrunde liegendes MPS. Dazu dienten 20 Fälle ohne Veränderung des Knochenmarks als Kontrollen.

Von 19 der Patienten (6 PV, 3 ET, 8 OMF, 1 aCML, 1 MPS unklassifiziert) waren mindestens zwei Knochenmarksbiopsien vorhanden, so dass molekulare Verlaufsuntersuchungen durchgeführt werden konnten.

Histologische Untersuchung

Mit Ausnahme der normalen Kontrollen wurden alle Fälle histologisch reevaluiert. Sieben der 141 Fälle (5%) wurden aus Unsicherheit, ob ein myeloproliferatives Syndrom oder eine andere hämatologische Alteration vorliegt, wegen ungenügender Materialmenge oder einer kompletten Verödung des Marks aus der Studie ausgeschlossen. 34 der verbleibenden 134 Fälle (25,4%) wurden reklassifiziert, wobei die Änderungen meist marginal waren.

In lediglich vier von 134 Fällen (3,0%) ergab sich eine wesentliche Änderung der Diagnose. Zwei Fälle, deren Befunde initial als vereinbar mit einem frühen Stadium der PV gewertet worden waren, wurden nun als reaktive Erythrozytose klassifiziert und ein Fall von OMF nun als MDS/atypisches MPS. Der ursprünglich als atypische CML klassifizierte Fall wurde nun als unklassifiziertes MPS eingestuft.

Die Reklassifizierung geschah anhand der WHO-Kriterien von 2001 (Vardiman JW et al, 2001) und der verfügbaren klinischen Daten, falls vorhanden in Verbindung mit der Histologie von Verlaufsbiopsien und klinischen Progressionsparametern.

Die sich nach dem Ausschluß der sieben Fälle und der Reklassifikation ergebende Zusammensetzung des Patientenguts ist in Tabelle 4 gezeigt. Von den 49 Fällen mit OMF sind elf in die Gruppe der präfibrotischen OMF (Fibrosegrad 1-2) und 38 in die der fibrotischen OMF (Fibrosegrad 2-3) eingeordnet worden.

Zusätzlich zu den oben aufgelisteten 154 Patienten stellte das Pathologische Institut des Universitätsklinikums Innsbruck 17 Fälle von ET für die selektive Untersuchung mikrodissasierter Megakaryozyten zur Verfügung, von denen keine klinischen Daten zur Verfügung standen.

<u>Diagnose</u>	<u>Fallzahl</u>	<u>Diagnose</u>	<u>Fallzahl</u>
PV	29	MDS/atypisches MPS	3
ET	24	Reaktive Thrombozytose	1
OMF	49	Reaktive Polyglobulie	14
CML	4	Normale Kontrollen	20
ET/frühe OMF	5		
MPS unklassifiziert	5	Summe	154

Tabelle 4: Endgültige Zusammensetzung der Studienpatienten

<u>Diagnose</u>	<u>Fallzahl</u>	<u>Alter</u>	<u>Geschlecht</u>
<u>PV</u>	29	65 (43-81)	14m, 15w
<u>ET</u>	24	61 (23-87)	10m, 14w
<u>OMF</u>	49	68 (47-88)	25m, 24w
<u>CML</u>	4	57 (35-79)	1m, 3w
<u>ET/frühe OMF</u>	5	65 (43-78)	1m, 4w
<u>MPS unklassifiziert</u>	5	73 (61-82)	3m, 2w
<u>MDS/atypisches MPS</u>	3	66 (57-74)	2m, 1w
<u>Reaktive Thrombozytose</u>	1	46	1w
<u>Reaktive Erythrozytose</u>	14	60 (37-87)	7m, 7w
<u>Kontrollen</u>	20	58 (26-71)	12m, 8w
<u>Summe</u>	154	64 (23-88)	74m, 79w

Tabelle 5: Alters- und Geschlechtsverteilung der Studienpatienten.

Bei der Untersuchung der Fälle auf noduläre lymphoide Infiltrate wurden 50 zusätzliche Knochenmarksbiospien des Universitätsklinikums Würzburg einbezogen. Damit wurden inklusive der 154 Fälle aus München im ganzen 204 Fälle auf solche Infiltrate untersucht (in Würzburg: Prof. Dr. S. Gattenlöhner, PD Dr. M. Kremer; in München: Prof. Dr. F. Fend und PD Dr. M. Kremer). In 52/204 (25,5%) Fällen konnten noduläre lymphoide Infiltrate gefunden werden, jedoch stand nur bei 18 dieser 52 Fälle (34,6%) genug Material zur molekularen Untersuchung zur Verfügung. Hauptsächlich lag dies am Verlust der Infiltrate durch das Anfertigen mehrerer Schnitten des Paraffinblocks. Elf der 18 Fälle stammten aus München, sieben aus Würzburg. Bei neun der 18 Fälle bestand die gleichzeitige Diagnose eines Non-Hodgkin-Lymphoms, deren Klassifikation anhand der WHO-Kriterien von 2001 vorgenommen wurde (Jaffe ES et al, 2001).

Im einzelnen waren dies:

- 3 Fälle von B-CLL
- 3 Fälle eines lymphoplasmozytischen Lymphoms
- 1 Fall eines Multiplen Myeloms
- 2 Fälle von B-NHL (nicht genauer bezeichnet)

Bei den 18 Fällen handelte es sich um fünf Fälle von PV, sechs von OMF, vier von ET, zwei Fälle von unklassifizierten MPS und einen Fall von MDS/unklassifizierbares MPS.

Um das Auftreten von JAK2 V617F bei verschiedenen Entitäten mit der Expression des beschriebenen Wachstumsfaktors bFGF und dem Auftreten einer Fibrose zu korrelieren, wurden Fälle von MDS und von akuter Leukämie untersucht. Im einzelnen waren dies:

- 17 Fälle MDS mit Fibrose
- 12 Fälle MDS ohne Fibrose
- 8 Fälle AML mit Fibrose
- 7 Fälle AML ohne Fibrose

Dazu kamen als Negativkontrollen für die Immunhistochemie die Biopsien von 14 Patienten mit Immunthrombopenie (ITP) aus dem Pathologischen Institut der TU München.

4.2. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen gegen CD 61 und CD 5 dienten in dieser Studie keinen diagnostischen Zwecken, sondern nur der erleichterten Visualisierung der Zielzellen während der Durchführung der Mikrodissektion.

Gegen bFGF wurden die Schnitte von den oben genannten Fällen von MDS und AML gefärbt, die Schnitte von 67 MPS (3 CML, 1 unklassifiziertes MPS, 14 ET, 13 PV, 28 OMF und 8 sekundäre Myelofibrosen ohne weitere Berücksichtigung der Primärdiagnose), die einen Teil des oben dargestellten MPS-Patientenguts repräsentierten, sowie die von den oben genannten 14 Fällen von ITP, die als Negativkontrollen dienten. Zur Ermittlung der Höhe der bFGF-Expression wurden 100 Megakaryozyten pro Schnitt beurteilt und diejenigen gezählt, die eine Kernreaktion mit dem anti-bFGF-Antikörper aufwiesen. Das Ergebnis wurde in der Einheit „von Hundert“ angegeben. Ab einem Wert von 10% wurde die Reaktion als positiv gewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. In dieser Tabelle sind fünf Fälle bereits nicht mehr aufgeführt, welche mit der allelspezifischen PCR nicht untersuchbar waren und aus der Studie ausgeschlossen wurden. Dies waren drei Fälle von MDS/AML mit Fibrose und zwei ohne Fibrose.

<u>Diagnose</u>	<u>bFGF positiv</u>	<u>bFGF negativ</u>
<u>MDS/AML mit Fibrose</u>	17	5
<u>MDS/AML ohne Fibrose</u>	3	14
<u>MPS unklassifiziert</u>	0	1
<u>CML</u>	0	3
<u>ET</u>	13	1
<u>PV</u>	13	0
<u>OMF</u>	28	0
<u>Sekundäre OMF</u>	8	0
<u>ITP (Kontrolle)</u>	0	14

Tabelle 6: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung gegen den Wachstumsfaktor bFGF. (Der Fall von unklassifiziertem MPS war, wie in Kapitel 4.1. geschildert, ursprünglich als aCML eingestuft worden. Die fünf mit der allelspezifischen PCR nicht untersuchbaren Fälle sind bereits nicht mehr berücksichtigt.)

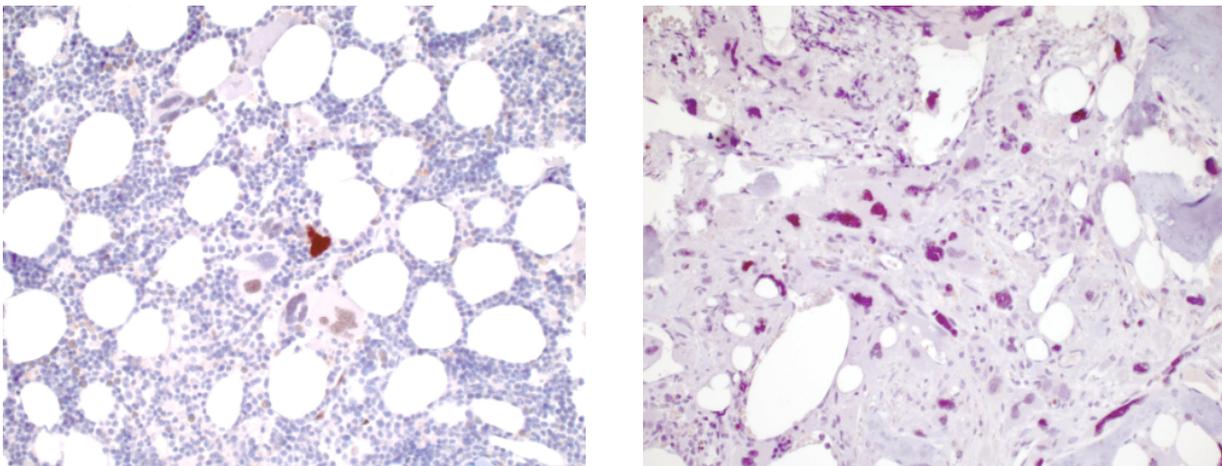


Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis der bFGF-Expression in megakaryozytären Kernen. Zur Beurteilung wurde der prozentuale Anteil positiver Kerne herangezogen, über 10% gefärbte Kerne wurden als positive Reaktion gewertet. Links ein Fall von ET, rechts von OMF.

4.3. Mutationsnachweis

Kontrolle der DNA-Qualität

Wie in Kapitel 3.4. beschrieben, wurde die Qualität des Paraffinmaterials durch die Amplifikation einer 268bp langen Kontrollbande (β -Globin) kontrolliert. Da in der mutationsspezifischen PCR ebenfalls ein 364bp langes Kontrollfragment amplifiziert wurde, wurden kritische Fälle nur dann aus der Studie ausgeschlossen, wenn keines dieser beiden Fragmente amplifiziert werden konnte. Dies waren sechs Fälle (4 OMF, 1 PV, 1 Kontrollfall), so dass sich die Zahl der Fälle der MPS für das Mutationsscreening auf 114 reduzierte, inklusive der Fälle von reaktiver Myeloproliferation und der Kontrollfälle auf 148. Von den 17 Fällen von ET der Universitätsklinik Innsbruck mussten zwei aus der Studie ausgeschlossen werden, bei den 19 vorhandenen Zweitbiopsien waren es drei, von den 44 Fällen von MDS/AML fünf, von den sieben Fällen mit lymphoiden Infiltraten aus Würzburg drei. Damit gelang der Mutationsnachweis bei insgesamt 222 von 241 Biopsien (92,1%).

Bei 13 von diesen 241 Biopsien konnte zwar das β -Globin-Fragment nicht amplifiziert werden, jedoch die Kontrollbande aus der mutationsspezifischen PCR, so dass diese Fälle in der Studie verblieben. Bei den 16 verbleibenden Zweitbiopsien, den 15 verbliebenen ET aus Innsbruck und den sieben Fällen aus Würzburg war auf die Durchführung der β -Globin-PCR verzichtet und die mutationsspezifische PCR zugleich als Qualitätskontrolle wie als Indikator des Mutationsstatus benutzt worden.

Es gab keinen Fall, bei dem eine Amplifikation des β -Globin-Gens gelang, die anschließende allelspezifische PCR dagegen nicht.

Allelspezifische PCR

Die oben genannten 114 Fälle von MPS wurden mit der allelspezifischen PCR untersucht, ebenso die 16 verbleibenden Zweitbiopsien sowie die 15 Fälle von reaktiver Myeloproliferation, 19 Kontrollfälle, die 15 verbleibenden Fälle von ET aus Innsbruck und die 53 verbleibenden Fälle von MDS, AML und ITP aus der bFGF-Expressionsstudie.

Die Ergebnisse der 148 Fälle des ersten Abschnitts der Studie (114 MPS, 15 reaktive Myeloproliferation, 19 Kontrollen) sind zusammen mit den verbliebenen 15 Fällen von ET aus Innsbruck in Tabelle 7 zusammengestellt. Von diesen 15 ET aus Innsbruck konnte mit der mutationsspezifischen PCR bei zwölf die Mutation nachgewiesen werden (80%). Fasst man diese 15 Fälle mit den oben genannten 24 ET zusammen, so erhält man eine Mutationsrate bei der ET von 30/39 (77%).

Alle vier verbleibenden MPS-Fälle aus Würzburg erwiesen sich als mutiert, so dass in dieser Studie insgesamt 133 Fälle von MPS untersucht wurden, von denen 99 die Mutation aufwiesen (74,4%).

Keine der 16 Folgebiopsien wies eine Veränderung des Mutationsstatus im zeitlichen Verlauf auf, 12 blieben mutiert und vier blieben Wildtyp. Die Dauer des Abstandes zwischen den Biopsien betrug dabei median 1 Jahr (wenige Wochen bis 10 Jahre).

	<u>PV</u>	<u>ET</u>	<u>OMF</u> <u>(präfibrotisch)</u>	<u>OMF</u> <u>(fibrotisch)</u>	<u>Ph+</u> <u>CML</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
Abs.	27/28	30/39	7/10	21/35	0/4	4/5	4/5	2/3	0/15	0/19
Rel	96%	77%	70%	60%	0%	80%	80%	67%	0%	0%

Tabelle 7: Ergebnisse der allelspezifischen PCR (I: ET/frühe OMF; II: MPS unklassifiziert; III: MDS/atypisches MPS; IV: Sekundäre Erythrozytose/Thrombozytose mit MPS-Verdacht; V: Sekundäre Erythrozytose/Thrombozytose ohne MPS- Verdacht)

<u>Diagnose</u>	<u>Fallzahl</u>	<u>JAK 2 V617F (abs./rel.)</u>
<u>MDS/AML mit Fibrose</u>	22	0/0%
<u>MDS/AML ohne Fibrose</u>	17	0/0%
<u>MPS unklassifiziert</u>	1	1/100%
<u>CML</u>	3	0/0%
<u>ET</u>	14	9/64%
<u>PV</u>	13	13/100%
<u>OMF</u>	28	18/64%
<u>Sekundäre OMF</u>	8	8/100%
<u>ITP(Kontrolle)</u>	14	0/0%

Tabelle 8: JAK-2-Status der Fälle, die auch auf ihre bFGF-Expression hin untersucht wurden. (Der Fall von unklassifiziertem MPS war ursprünglich als aCML eingestuft worden.)

Tabelle 8 gibt die Ergebnisse der Fälle von MDS, AML und ITP wieder. Darin sind 69 Fälle von MPS enthalten, welche eine Teilmenge der oben dargestellten 113 MPS darstellen. Aus Gründen der besseren Übersicht erscheinen sie in diesem Zusammenhang erneut. Es ist erwähnenswert, dass keiner der untersuchten Fälle von MDS und AML das mutierte Allel trägt.

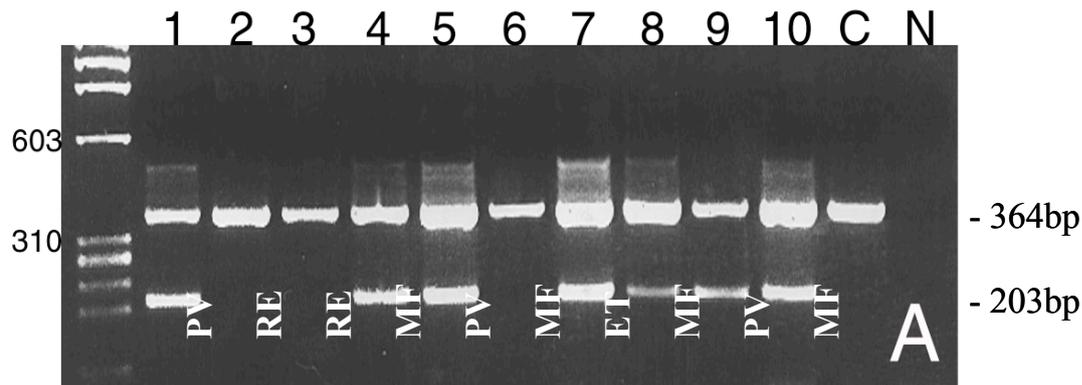


Abbildung 8: Allelspezifische PCR. Die obere Bande wird als interne Kontrolle in allen Fällen amplifiziert, die untere Bande nur bei Vorhandensein der Mutation. Rechts findet sich eine nicht mutierte sowie eine leere Kontrolle. C=Kontrollfall, N=No Template Control, leere Kontrolle.

Korrelation von bFGF-Immunhistochemie und JAK2 V617F-Mutationsanalyse

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung und der allelspezifischen PCR bei diesen Fällen sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Bei 72% der Fälle von MDS/AML mit Fibrose konnte eine immunhistochemische bFGF-Positivität nachgewiesen werden, jedoch nur bei 15% solcher Fälle ohne Fibrose. Damit ergibt sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von Fibrose und dem Nachweis einer Kernfärbung gegen bFGF ($p < 0,005$). Weiterhin fällt auf, dass bei allen Fällen der klassischen MPS außer einem Fall von ET unabhängig davon, ob eine Fibrose des Markraumes vorlag (wie bei der sekundären Myelofibrose) oder nicht (wie bei präfibrotischen OMF und den meisten ET), eine positive Reaktion gegen bFGF beobachtet werden konnte. Dementsprechend konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen diesen beiden Faktoren (Vorhandensein einer Fibrose bei MPS und bFGF-Positivität) ermittelt werden.

Anders als die klassischen MPS sind die Fälle von CML bFGF-negativ. Da diese Fälle keine Fibrose aufwiesen, konnten keine Vergleiche zwischen bFGF-Expression und Fibrostatus angestellt werden.

Die letzte Beobachtung ist das Fehlen eines Zusammenhangs zwischen dem JAK2-Mutationsstatus und der bFGF-Expression bei den MPS. Es sind ja alle drei klassischen MPS ohnehin fast immer positiv für bFGF.

Es fand sich keine Korrelation von bekannten klinischen und zytogenetischen Daten oder dem Grad der Fibrose mit der bFGF-Expression.

<u>Diagnose</u>	<u>bFGF-positiv</u>		<u>bFGF-negativ</u>	
	<u>JAK 2 V617F</u>	<u>JAK2 WT</u>	<u>JAK2 V617F</u>	<u>JAK2 WT</u>
<u>MDS/AML mit Fibrose</u>	0	17	0	5
<u>MDS/AML ohne Fibrose</u>	0	3	0	14
<u>MPS unklassifiziert</u>	0	0	1	0
<u>CML</u>	0	0	0	3
<u>ET</u>	9	4	0	1
<u>PV</u>	13	0	0	0
<u>OMF</u>	18	10	0	0
<u>Sekundäre OMF</u>	8	0	0	0
<u>ITP(Kontrolle)</u>	0	0	0	14

Tabelle 9: Zusammenfassende Darstellung der Untersuchung der Zusammenhänge von JAK2-Mutationsstatus, bFGF-Expression und Fibrose bei MDS/AML und MPS. (Der Fall von unklassifiziertem MPS war ursprünglich als aCML eingestuft worden.)

Nested PCR und Restriktionsenzymverdau

Von den primär mit der allelspezifischen PCR untersuchbaren 148 Fällen wurden 82 der 83 Fälle mit der Mutation mit der *Nested PCR* untersucht. Ein Fall von ET ist nicht weiter untersucht worden. Dazu kamen 27 der nicht mutierten Fälle, die zufällig als Kontrolle der Zuverlässigkeit der Methode der *Nested PCR* ausgewählt worden waren. Die Fälle von ET aus Innsbruck wurden nicht mit der *Nested PCR* untersucht, da sie erst später in die Studie aufgenommen worden waren.

Bei 28 dieser 109 untersuchten Fälle (25,7%) konnte keine Amplifikation nachgewiesen werden, wobei zwei von diesen 28 zu den nicht mutierten Fällen gehörten. Die Durchführung der *Nested PCR* gelang somit bei 25 nicht mutierten sowie 56 mutierten Fällen.

Die Übereinstimmung mit den Ergebnissen der allelspezifischen PCR war sehr gut. Die 25 nicht mutierten Fälle wurden auch mit der *Nested PCR* ohne Ausnahme als nicht mutiert bestätigt, bei 54 der 56 verbleibenden Fälle, die mit der allelspezifischen PCR als Mutationsträger identifiziert worden waren, zeigte auch die *Nested PCR* ein solches Ergebnis an. Lediglich in zwei Fällen von ET konnte die Mutation in der *Nested PCR* nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse beider PCR-Verfahren waren für diese beiden Fälle reproduzierbar.

Von den 16 Folgebiopsien wurden die vier nicht mutierten Fälle (3 OMF, 1 ET) nicht weiter untersucht. Drei der verbleibenden zwölf Fälle waren mit der *nested PCR* nicht amplifizierbar (25%, darunter zwei PV, eine OMF). Bei drei der verbleibenden neun Zweitbiopsien wurde der JAK-2-

Mutationsstatus bestätigt (zwei heterozygote OMF und eine homozygote PV), in keinem dieser drei Fälle konnte eine Änderung des Zygotiestatus beobachtet werden. Die Erstbiopsien der verbleibenden sechs Zweitbiopsien waren mit der *nested PCR* nicht amplifizierbar gewesen, so dass sich mit der Untersuchung der Folgebiopsie neue Informationen ergaben. Zwei Fälle von ET, einer von unklassifiziertem MPS und einer von OMF im fibrotischen Stadium wurden nun als heterozygot mutiert, ein Fall von PV und einer von unklassifiziertem MPS als homozygot mutiert diagnostiziert.

Fasst man die Ergebnisse der *Nested PCR* der Erstbiopsien mit den sich aus der Untersuchung der Folgebiopsien ergebenden Daten zusammen, sind jeweils in Relation zur Zahl der untersuchbaren Fälle elf von 13 ET (84,6%), sieben von 15 fibrotischen OMF (47%) und einer von drei unklassifizierten MPS in der *nested PCR* heterozygot. Dazu steigt der Anteil an homozygot mutierten Fällen bei der PV auf 14 von 22 (63,6%) und bei den unklassifizierten MPS auf 2 von 3 (67%). Alle Ergebnisse der *Nested PCR* sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse ergibt sich eine Ausfallsrate der *Nested PCR* von 31/121 (25,6%). Dabei waren die amplifizierbaren Biopsien im Durchschnitt 2,26 Jahre (0-12 Jahre) alt, wohingegen die nicht amplifizierbaren mit 5,06 Jahren (1-12 Jahren) älter waren. Dabei fällt auf, dass es nur einen Fall gab, bei dem sich Gewebe, das innerhalb von zwei Jahren nach der Biopsie untersucht wurde, mit der *Nested PCR* nicht untersuchen ließ.

	<u>Amplifizierbare, mutierte</u> <u>Fälle</u>	<u>Homozygot</u>	<u>Heterozygot</u>
<u>PV</u>	22	14	8
<u>ET</u>	13	0	11
<u>OMF präfibrotisch</u>	5	1	4
<u>OMF fibrotisch</u>	15	8	7
<u>ET/frühe OMF</u>	3	1	2
<u>MPS unklassifiziert</u>	3	2	1
<u>MDS/atypisches MPS</u>	1	0	1

Tabelle 10: Ergebnisse der Untersuchung der Fälle, die in der allelspezifischen PCR als mutiert ermittelt wurden, mit der *Nested PCR* mit Restriktionsenzymverdau durch BsaXI. Eventuell vorhandene Zweitbiopsien sind in die Zahlen eingerechnet. Zwei Fälle von mutierter ET wurden in der *nested PCR* als Wildtyp angezeigt.

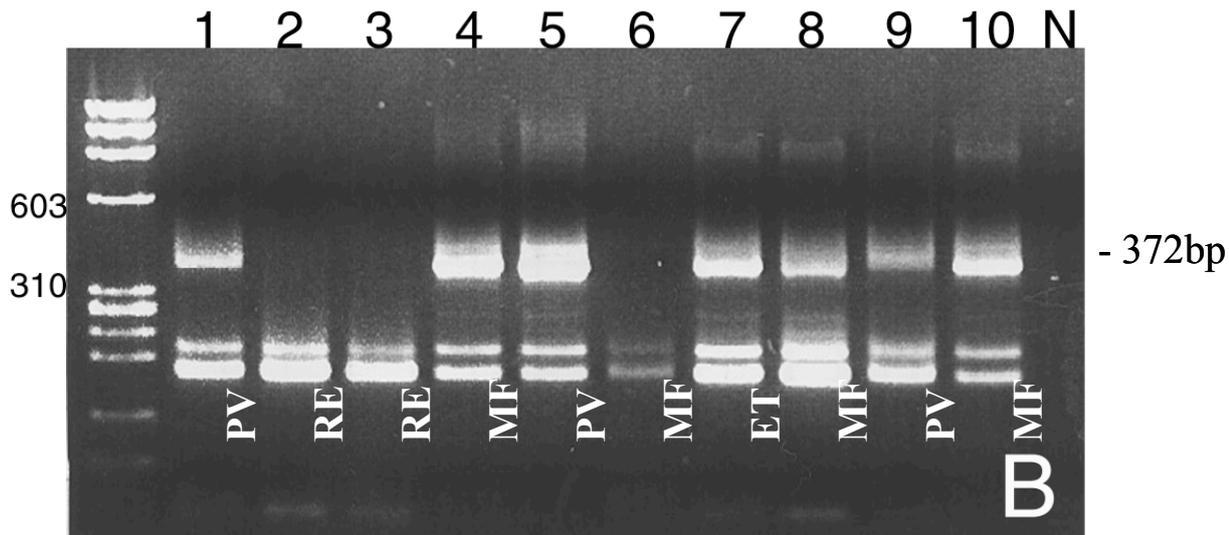


Abbildung 9: Restriktionsenzymverdau mit BsaXI von Produkten der *Nested PCR*. Eine Bande bei 372bp zeigt das Vorhandensein der Mutation an. (von links nach rechts: heterozygot, WT, WT, homozygot, homozygot, WT, heterozygot, heterozygot, heterozygot, homozygot) (WT=Wildtyp, RE=reaktive Erythrozytose, MF=Myelofibrose, N=No Template Control, leere Kontrolle)

4.4. Korrelation des Mutationsnachweises mit klinischen Daten

Wie in Kapitel 3.1. beschrieben wurden von den Patienten mit MPS folgende klinische Daten erhoben: Hämoglobinkonzentration, Leukozyten- und Thrombozytenzahl, Vorliegen einer Splenomegalie, Zeitpunkt der Erstdiagnose, Alter und Geschlecht der Patienten.

Da die Patientengruppen mit den Diagnosen CML, ET/frühe OMF, unklassifiziertes MPS und MDS/atypisches MPS sehr klein waren (n=3-5), bei den Fällen von MDS und AML sowie bei den Fällen von reaktiver Myeloproliferation und den normalen Kontrollen kein Fall mit der Mutation nachgewiesen und daher keine Korrelation zwischen Klinik und Mutationsstatus vorgenommen werden konnte, sind lediglich die Gruppen PV, ET und OMF ausgewertet worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 sowie in Abbildung zehn zusammengestellt.

Ohne einer Prüfung auf statistische Signifikanz standzuhalten, fielen einige Zusammenhänge auf. Bei den Fällen von ET waren sowohl die durchschnittlichen Zellzahlen als auch der Hämoglobinwert bei den Fällen mit JAK2 V617F höher als bei denen ohne die Mutation. Betrachtet man die Fälle von PV, fällt auf, dass der durchschnittliche Hämoglobinwert vom Status *homozygot mutiert* über *heterozygot mutiert* bis zum nicht mutierten Fall zunimmt, während dieser Trend bei der Leukozyten- und Thrombozytenzahl gerade gegenläufig ist.

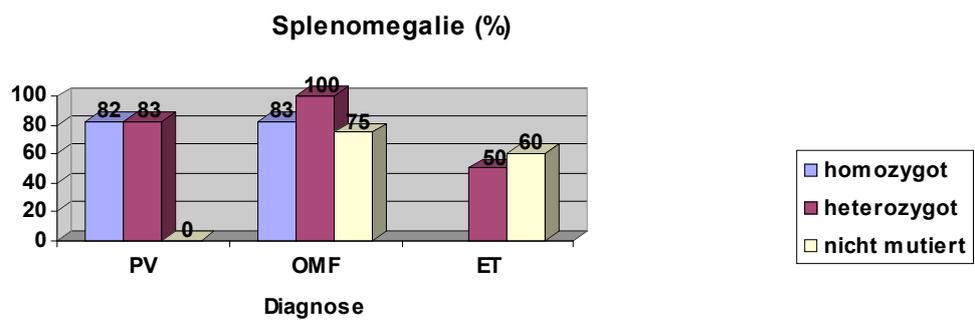
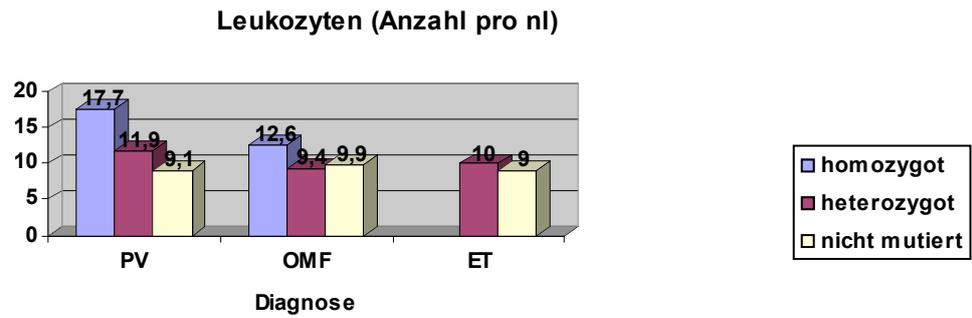
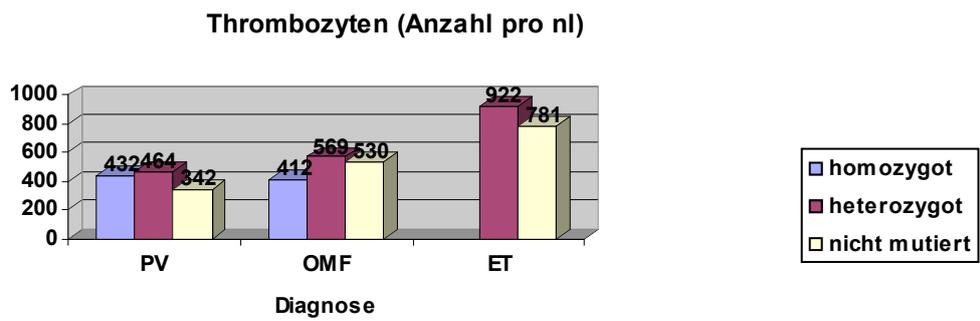
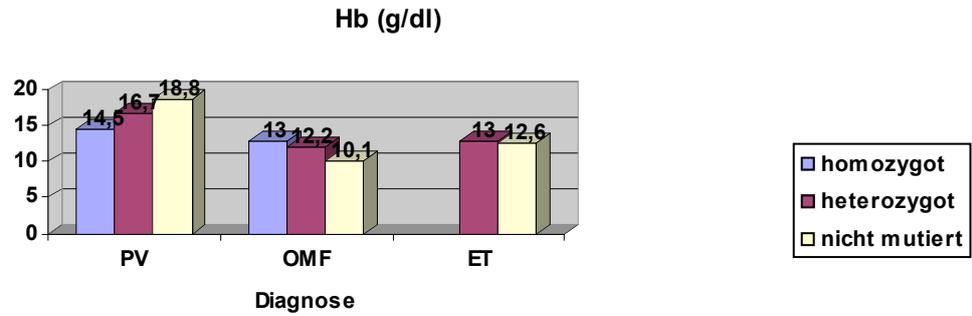


Abbildung 10: Korrelation von klinischen Daten der jeweiligen Entitäten mit dem JAK 2-Mutationsstatus.

<u>Diagnose und JAK2 Status</u>	<u>Leukos x 10⁹/L (mittel, range)</u>	<u>Thromb. x 10⁹/L (mittel, range)</u>	<u>Hb in g/L (mittel, range)</u>	<u>Splenomegalie</u>
<u>PV (14m, 14w)</u>				
<u>Homozygot (n=14)</u>	17.7 (7.0-49.3)	432(152-1300)	145 (68-204)	82% (3 n.a.)
<u>Heterozygot (n=8)</u>	11.9(6.9-16.3)(1 n.a.)	464 (91-798)(1 n.a.)	167 (120-202) (1 n.a.)	83% (2 n.a.)
<u>Negativ (n=1)</u>	9.1	342	188	nein
<u>OMF (21m, 24w)</u>				
<u>Homozygot (n=9)</u>	12.6 (5.2-22.4)	412 (77-762)	130 (83-154)	83% (1 n.a.)
<u>Heterozygot (n=11)</u>	9.4 (3.9-15.8)	569 (23-1028)	122 (86-160)	100% (5 n.a.)
<u>Negativ (n=17)</u>	9.9 (2.1-53) (1 n.a.)	530 (28-1800)	101 (35-136)	75% (1 n.a.)
<u>ET (9m, 14w)</u>				
<u>Heterozygot (n=13)</u>	10.0 (6.8-17) (4 n.a.)	922 (393-1620) (3 n.a.)	130 (100-153) (4 n.a.)	50% (3 n.a.)
<u>Negativ (n=6)</u>	9.0 (3.5-11.4)	781 (220-1400)	126 (89-152)	60% (1 n.a.)

Tabelle 11: Korrelation von klinischen Daten mit dem ermittelten Mutationsstatus.

(Leukos=Leukozyten, Thromb.= Thrombozyten, Hb= Hämoglobin, m=männlich, w=weiblich, n.a.= not available)

Betrachtet man den zeitlichen Abstand von der Diagnosestellung zum Zeitpunkt der untersuchten Biopsie, so fällt auf, dass die Fälle mit der Mutation in allen drei Patientengruppen eine längere Krankheitsdauer haben als solche ohne die Mutation. Im einzelnen war die Krankheitsdauer:

- bei der PV 5,9 Jahre gegenüber 0 Jahre
- bei der ET 2,75 Jahre gegenüber 1,25 Jahre
- bei der OMF 4,5 gegenüber 3,5 Jahre

Noch deutlicher wird diese Tatsache, wenn die Gruppe der mutierten Patienten zusätzlich in heterozygot mutierte und homozygot mutierte unterschieden wird. Bei PV und OMF haben letztere eine längere Krankheitsdauer als die heterozygot mutierten und diese wiederum eine längere als die Nichtmutierten. Bei den ET wird durch das Fehlen von homozygot mutierten Fällen lediglich die oben genannte Zahl bestätigt (siehe Tabelle 12).

<u>Diagnose</u>	<u>Mutationsstatus</u>	<u>Krankheitsdauer</u>
PV	Homozygot mutiert (n=14)	8,9 a (4 n.a.)
	Heterozygot mutiert (n=8)	4,75 a (4 n.a.)
	Nicht mutiert (n=1)	0 a
OMF	Homozygot mutiert (n=9)	5,4 a (2 n.a.)
	Heterozygot mutiert (n=11)	3,5 a (2 n.a.)
	Nicht mutiert (n=17)	2,6 a (2 n.a.)
ET	Heterozygot mutiert (n=13)	2,8 a (4 n.a.)
	Nicht mutiert (n=6)	1,25 a (2 n.a.)

Tabelle 12: Korrelation der Dauer der jeweiligen Krankheit mit dem JAK 2-Status (nach *Nested PCR*, a=Jahre)

4.5. Sequenzierung

Zur Bestätigung des mithilfe der *Nested PCR* ermittelten Zygotiestatus wurden zehn Fälle sequenziert. Darin enthalten waren vier Fälle von OMF, vier von PV sowie je ein Fall von ET und reaktiver Polyglobulie. Unter diesen zehn Fällen waren vier homozygot mutierte, drei heterozygot mutierte und drei nicht mutierte Fälle, wie mit der *Nested PCR* und dem anschließenden Restriktionsenzymverdau ermittelt worden war. Die Fälle waren willkürlich aus dem gesamten Patientengut ausgewählt worden.

In lediglich einem der zehn Fälle (10%) ließ sich die Sequenzierung nicht durchführen, die anderen neun brachten eine Bestätigung des ermittelten Zygotiestatus und sprechen damit für die Aussagekraft der Methode der *nested PCR* mit Restriktionsenzymverdau.

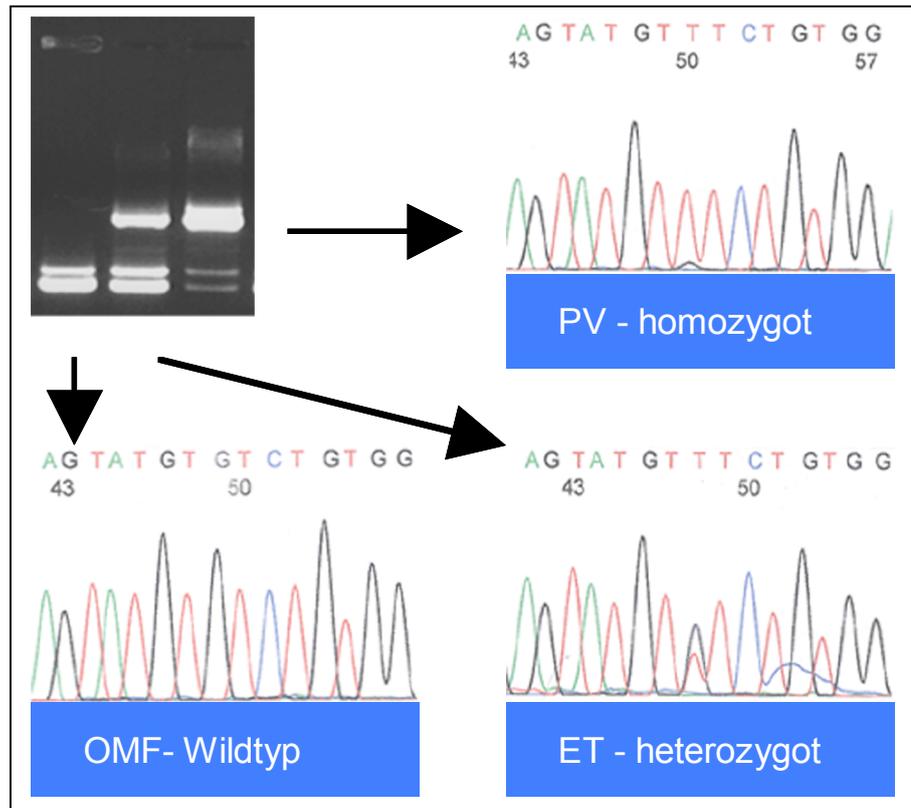


Abbildung 11: Links oben im Bild drei Fälle nach Restriktionsenzymverdau mit BsaXI (von links nach rechts: Wildtyp, heterozygot mutiert, homozygot mutiert). Die Pfeile weisen auf die zugehörige Sequenz, ermittelt nach der Dideoxymethode mittels Kapillarelektrophorese. Wildtypsequenz: 5'-...TAT GTG TCT ...-3'

4.6. Ergebnisse der Klonalitätsuntersuchungen

Von den 18 Fällen, bei denen noduläre lymphoide Infiltrate gefunden wurden und diese in für molekulare Untersuchungen ausreichender Menge vorhanden waren, mussten vier (2 PV, 1 ET, 1 MPS unklassifiziert) aus der Studie ausgeschlossen werden, da eine Durchführung der *realtime qPCR* an ihren Infiltraten nicht möglich war (siehe Kapitel 4.7.). Drei davon hatten ein koexistentes Non-Hodgkin-Lymphom.

Von den verbleibenden 14 Fällen zeigten die sechs Fälle mit bekanntem, gleichzeitig bestehendem B-NHL Monoklonalität der B-Zellen der lymphoiden Infiltrate in der PCR für das IgH-Rearrangement. In sieben der acht übrigen Fälle konnte für die B-Zellen des Infiltrats Polyklonalität nachgewiesen werden, lediglich bei einem Fall war die Untersuchung nicht durchzuführen.

Für 10 der 14 Fälle zeigte die PCR für das T-Zell-Rezeptor-Rearrangement das Vorliegen polyklonaler T-Zellen im lymphoiden Infiltrat an, vier Fälle waren nicht amplifizierbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei den sechs Fällen mit koexistentem NHL die B-Zellen im Knochenmarksinfiltrat Teil des Tumorklons waren, während diese Zellen bei sieben der übrigen acht Fälle ohne NHL polyklonal und damit als reaktiv zu werten waren.

Ebenso konnte hiermit gezeigt werden, dass die T-Zellen in den nodulären Infiltraten in 10 der 14 Fälle keine monoklonale Tumorzellpopulation darstellten, sondern ebenso aus reaktiven Zellen bestanden. In einem Fall konnte die Klonalität der B-Zellen, in vier die der T-Zellen des Infiltrats nicht bestimmt werden.

JAK 2-Status der Fälle mit nodulären lymphoiden Infiltraten

Die 14 Fälle, deren Menge und Materialqualität der lymphoiden Infiltrate suffizient für die anschließende Untersuchung mit der *real-time qPCR* waren, sind auch mit der allelspezifischen PCR untersucht worden, wobei die dafür verwendete DNA aus kompletten Schnitten extrahiert worden war. Einer der 14 Fälle (OMF mit koexistentem B-NHL) war nicht amplifizierbar, zwei trugen die Mutation nicht. Bei den übrigen Fällen konnte die Mutation nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sowohl der Mutations- als auch der Klonalitätsanalyse zeigt Tabelle 13.

Nr	Diagnose	Neben- diagnose NHL	JAK 2-Status Gesamtes Mark		JAK 2-Status Infiltrat	IgH		TCR- γ	
			Allel PCR	Real-Time qPCR	Real-Time qPCR	Gz. Schnitt	MD Infiltrat	Gz. Schnitt	MD Infiltrat
1	ET	-	+	27%(he)	15% (he)	Poly	poly	poly	n.a.
2	OMF	-	+	60%(ho)	43% (he)	Poly	poly	poly	n.a.
3	PV	-	+	53%(ho)	45% (he)	Poly	poly	poly	n.a.
4	MDS/MPS	-	-	0%(neg.)	0%(neg.)	Poly	poly	poly	poly
5	ET	-	+	17%(he)	4,5%(neg.)	Poly	poly	poly	poly
6	MPS unklass.	-	+	1%(neg.)	0%(neg.)	Poly	n.a.	poly	poly
7	PV	-	+	27% (he)	3%(neg.)	Poly	poly	poly	poly
8	PV	-	+	34%(he)	2%(neg)	Poly	poly	poly	poly
9	OMF	Imzy	-	0%(neg.)	0%(neg.)	Mono	mono	poly	poly
10	ET	Imzy	+	17%(he)	4,5%(neg.)	Mono	mono	poly	poly
11	OMF	B-CLL	+	51%(ho)	0%(neg)	Mono	mono	n.a.	n.a.
12	OMF	B-CLL	+	44%(he)	4%(neg.)	Mono	mono	poly	poly
13	PV	B-CLL	+	55%(ho)	3,7%(neg.)	Mono	mono	poly	poly
14	OMF	B-NHL	n.a.	1,5%(neg.)	1,5%(neg.)	Mono	mono	n.a.	poly

Tabelle 13: Auflistung der 14 Fälle mit MPS und gleichzeitig bestehenden lymphoiden Knochenmarksinfiltraten, die einer molekularen Untersuchung zugänglich waren. Deren JAK 2-Mutationsstatus in den gesamten Schnitten und den Infiltraten ist ebenso aufgeführt wie die Ergebnisse der Klonalitätsuntersuchungen an mikrodissierten Infiltraten. (- = nicht mutiert, + = mutiert, poly =polyklonal, mono =monoklonal, n.a. =not available, neg. =negativ, he =heterozygot, ho= homozygot, Imzy= Immunozytom)

4.7. Real-Time qPCR

Quantifizierung

Das Ziel des Wechsels der Methode auf eine *Real-Time qPCR* war, eine genauere Quantifizierung des mutierten Allels zu erreichen als mit der *Nested PCR*. Außerdem hatten die anderen PCR-Methoden bei den geringen DNA-Mengen aus der Mikrodissektion oftmals keine verlässlich reproduzierbaren Ergebnisse liefern können, wie hier nicht näher geschilderte Vorversuche gezeigt hatten.

Um einen Zusammenhang zwischen Ct-Wert und Kopienzahl zu erhalten, ist wie in Kapitel 3.8. erläutert, eine Verdünnungsreihe von Amplifikaten der beiden Zelllinien ANBL-6 und HEL hergestellt worden. Diese Verdünnungsreihe ist in drei qPCR-Ansätzen jeweils im dreifachen Ansatz amplifiziert worden. Die erhaltenen Ct-Werte wurden gemittelt, für die Zelllinie HEL waren dies die aus dem VIC-Signal resultierenden Ct-Werte, für ANBL-6 diejenigen des FAM-Signals. Die erhaltenen Mittelwerte wurden gegen die bekannte Kopienzahl in halblogarithmischer Weise aufgetragen und die Gleichungen der sich ergebenden Geraden mithilfe von *Microsoft Excel*® bestimmt. Es ergaben sich folgende Zusammenhänge:

$$\text{FAM-Signal: Kopienzahl} = e^{[(37,672-Ct)/1,486]}$$

$$\text{VIC-Signal: Kopienzahl} = e^{[(37,047-Ct)/1,4585]}$$

Die Umrechnung in den Prozentsatz mutierten Allels erfolgte wie in Kapitel 3.8. beschrieben. Durch die Berücksichtigung der unspezifischen Bindung der VIC-Sonde, das heißt ihrer Bindung auch an nicht mutierte DNA, konnte nach der Formel in 3.8. ein Cutoff-Wert zwischen nicht mutiert und heterozygot mutiert von 6,7% berechnet werden.

Untersuchung der nodulären lymphoiden Infiltrate

Wie oben erwähnt konnten vier der ursprünglich 18 Fälle mit nodulären lymphoiden Infiltraten keine den Anforderungen an die Ct-Werte genügenden Resultate erbringen und wurden aus der Studie ausgeschlossen. Von den 14 in Tabelle 13 aufgelisteten Fällen wurde die aus ganzen Schnitten beziehungsweise den mikrodisszierten Zellen der Infiltrate extrahierte DNA in die *Real-Time qPCR* eingesetzt und die Frequenz des mutierten Allels bestimmt.

Bei der Untersuchung der gesamten Zellpopulation des Knochenmarks bestätigte die *Real-Time qPCR* in 12 von 13 Fällen (92,3%) das Ergebnis der allelspezifischen PCR. Bei einem Fall, für den mit der allelspezifischen PCR das Vorhandensein von JAK2 V617F nachgewiesen werden konnte, ergab die qPCR eine Mutationsfrequenz von 0%. Der bisher nicht amplifizierbare Fall stellte sich im TaqMan mit 1,5% mutierten Allels als nicht mutiert heraus.

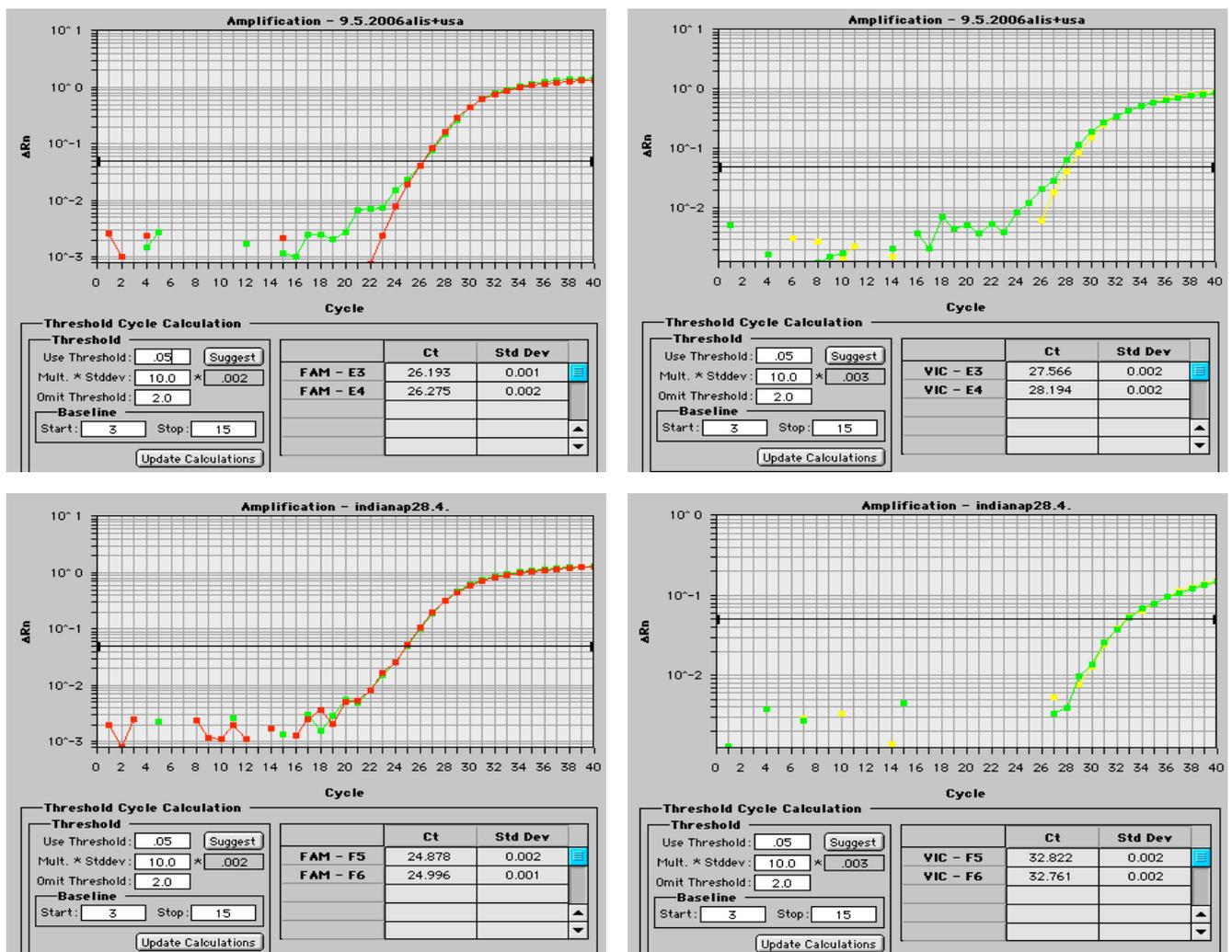


Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung der *Realtime qPCR* anhand eines Falles mit der Mutation (obere Bilder) und eines Falles mit normaler DNA (untere Bilder). Im jeweils linken Bild ist der Verlauf des Signals der mit dem Farbstoff FAM markierten Sonde dargestellt, die an die normale DNA bindet. Rechts sieht man den Signalverlauf der mit VIC markierten Sonde, welche an die mutierte DNA binden kann. Im oben dargestellten Fall sind die VIC-Ct-Werte lediglich etwa um zwei höher als die FAM- Werte, während diese Differenz im unteren Fall etwa acht beträgt.

Bei den mikrodisszierten Infiltraten aller sechs Fälle mit koexistentem NHL sowie bei fünf der acht Fälle mit polyklonalen Infiltraten konnte die Mutation nicht nachgewiesen werden. Bei den verbleibenden drei der acht Fälle (37,5%, Nummer 1,2,3) ergaben sich für die Lymphozyten der Infiltrate Mutationsfrequenzen von 20%, 48% und 40%. Es sind also bei MPS in einem Teil der Fälle auch Lymphozyten von der Mutation betroffen, nicht jedoch die Tochterlymphozyten eines gleichzeitig bestehenden NHL.

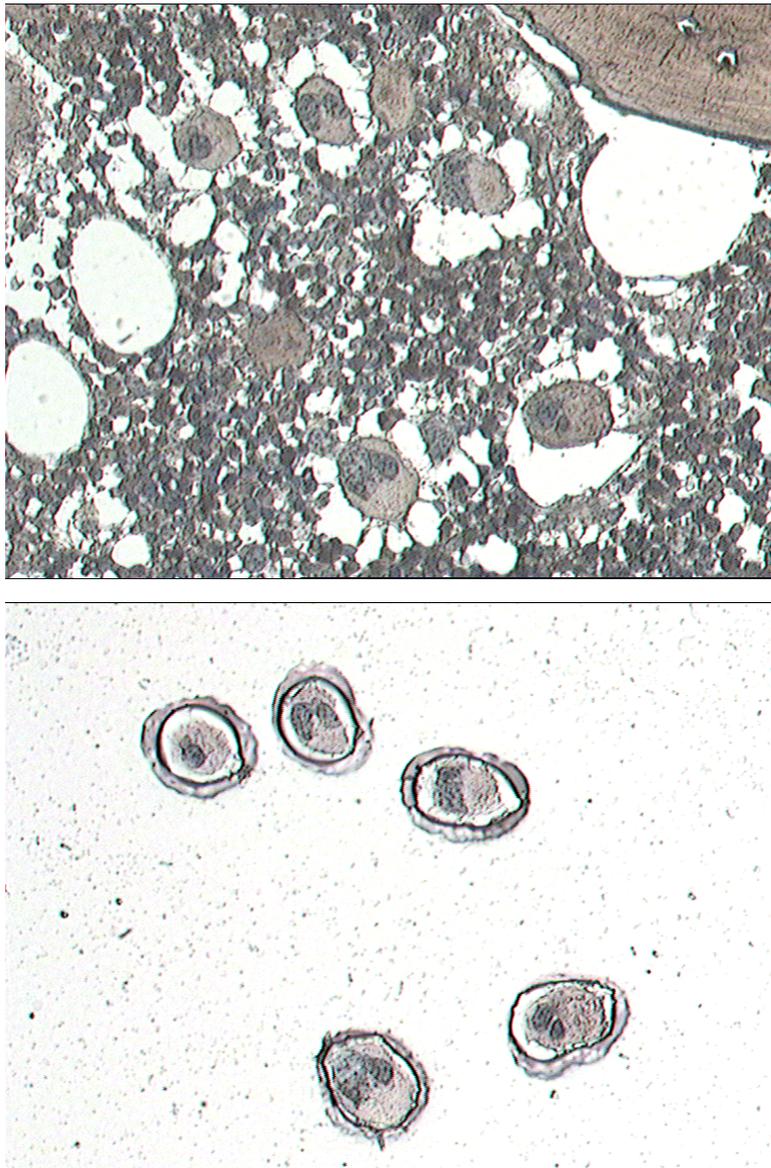


Abbildung 13: Derselbe Ausschnitt eines gegen CD 61 gefärbten Schnittes eines Knochenmarkbiopsats vor und nach Durchführung der lasergestützten Mikrodisektion. Vergrößerung 500-fach.

Untersuchung der Megakaryozyten

Für den Teil der Studie, der sich mit den Megakaryozyten beschäftigt, war von 58 Fällen die gesamte Knochenmarkspopulation mit der *Realtime qPCR* untersucht worden. Die Gruppe der Patienten mit ET von bisher 24 Patienten ist durch die 17 Patienten aus dem Universitätsklinikum Innsbruck ergänzt worden. Einer der 24 ursprünglichen Fälle ist nicht mikrodiseziert worden, da er erst später in die Studie aufgenommen wurde und ein Fall der Innsbrucker ET ließ sich nicht mikrodisezieren. Es wurden somit 39 Fälle von ET mikrodiseziert. Zusätzlich wurden die übrigen Fälle für die Mikrodisektion aus den bereits in der Studie vorhandenen Fällen von präfibrotischer OMF und

sowohl heterozygoter als auch homozygoter PV zufällig ausgewählt. Es waren dies zehn Fälle von präfibrotischer OMF (sieben JAK2 V617F-positiv in der allelspezifischen PCR, davon einer homozygot für das mutierte Allel, drei ohne Nachweis einer Mutation), sieben Fälle von PV (alle mutiert, sechs homozygot in der Nested PCR, einer heterozygot), ein Kontrollfall ohne MPS-Verdacht und der Fall von reaktiver Thrombozytose (beide letztgenannten JAK2 WT). Drei dieser 58 Fälle (5,2%) waren mit der qPCR nicht untersuchbar. Diese waren diejenigen beiden Fälle von ET, welche bereits in der allelspezifischen PCR nicht amplifizierbar gewesen waren, und ein Fall von OMF. Für diesen ergab sich zwar in beiden Wells ein sehr ähnlicher Prozentsatz mutierten Allels, der auch mit dem Ergebnis der *nested PCR* übereinstimmte, bei dem jedoch die Ct-Werte den geforderten Kriterien nicht standhielten.

Bei fünf der verbleibenden 55 Fälle (9,1%) waren die Ergebnisse diskordant im Vergleich zu den bisher durchgeführten PCR-Methoden. Zur besseren Erkennung sind diese in Tabelle 14 fett gedruckt. In drei Fällen (Nummer 20,22,49) hatte die allelspezifische PCR die Mutation nachweisen können, in der qPCR lagen die Anteile mutierten Allels jedoch unter dem ermittelten Cutoff (0%, 2,75%, 4,75%). Bei einem dieser drei Fälle war zusätzlich mit der *Nested PCR* die Mutation nicht nachzuweisen, für die beiden anderen Fälle ist kein Ergebnis der *Nested PCR* verfügbar. Diese Ergebnisse könnten eine größere Sensitivität der allelspezifischen PCR belegen, jedoch auch falsch-positive Ergebnisse darstellen.

Die beiden übrigen der fünf Fälle mit diskordanten Ergebnissen waren Fälle von PV (Nummer 55,56), die mit der *Nested PCR* als homozygot mutiert eingestuft worden waren und für die sich in der *Realtime PCR* Mutationsfrequenzen von 47% beziehungsweise 42,5% ergaben. Berücksichtigt man die einer quantitativen PCR-Methodik inhärenten Exaktheitsgrenzen, die in der Abgrenzung zwischen heterozygot und homozygot mutierten Fällen wie in Kapitel 3.6. beschrieben zu einem Graubereich führen, sind dies marginale Abweichungen. Mit Ausnahme dieser fünf Fälle sind die Ergebnisse kongruent.

In der gesamten Knochenmarkspopulation wurde für einen Fall von ET eine Mutationsfrequenz von knapp über 60% ermittelt (60,5%), was als Grenze zu eindeutig homozygot mutierten Fällen angesehen wurde. Dieses Ergebnis unterstreicht die Seltenheit von homozygot mutierten ET.

Von den 55 mit der qPCR untersuchbaren Fällen wurden 54 wie in Kapitel 3.2 beschrieben, mikrodiseziert und mit der qPCR untersucht, der Fall mit Knochenmark ohne MPS-Verdacht ist nicht mikrodiseziert worden. Sieben dieser 54 Fälle (sechs ET, eine OMF, zusammen 13%) mussten ausgeschlossen werden, da die Ergebnisse der qPCR am mikrodisezierten Material nicht die geforderten Ct-Wert-Kriterien erfüllten (sechs Fälle) oder zu wenig Material vorhanden war (ein Fall). Es blieben 47 Fälle mit aussagekräftigen Ergebnissen am mikrodisezierten Material, diese sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Nr.	Diagnose	PCR-Ergebnisse		Ergebnisse der Real-Time qPCR		
		Allel PCR	Nested PCR	Gesamtes Knochenmark	Megakaryozyten	Nicht-megakaryozytäre Mischpopulation
15	ET	-	-	3	1,5	0,5
16	ET	-	-	4	0,5	0,5
17	ET	-	-	4	1	0
18	ET	-	-	0	0	0
19	ET	-	n.a.	2	2	2
20	ET	+	n.a.	4,75	1,75	0,5
21	ET	-	n.a.	4,75	0,5	0,5
22	ET	+	-	2,5	1,25	1
23	ET	-	n.a.	5,5	3,5	1,5
24	ET	-	n.a.	1,5	0,5	0
25	ET	+	n.a.	47	45,5	42,5
26	ET	+	n.a.	19	17	44,5
27	ET	+	Heterozygot	16	22	14
28	ET	+	-	15,5	22	17
29	ET	+	n.a.	36,5	22,5	26,5
30	ET	+	Heterozygot	36	32	32
31	ET	+	-	32	31	21,5
32	ET	+	n.a.	46	52,5	41
33	ET	+	Heterozygot	14,5	17	19
34	ET	+	Heterozygot	20,5	22	27
35	ET	+	Heterozygot	14,5	23	11
36	ET	+	Heterozygot	41	33	32
37	ET	+	n.a.	23,5	34,5	23
38	ET	+	n.a.	40	25,5	36,5
39	ET	+	n.a.	22	12	20,5
40	ET	+	n.a.	30	15	14
41	ET	+	n.a.	31	31	16
42	ET	+	n.a.	29	13,5	8,5
43	ET	+	n.a.	52	28,5	35
44	ET	+	Heterozygot	9	6,5	9,5
45	ET	+	Heterozygot	18	23,5	22,5
46	OMF	-	-	0	4	1
47	OMF	-	-	3,5	1,5	3,5
48	OMF	-	n.a.	0,5	1	0
49	OMF	+	n.a.	0	1	0,5
50	OMF	+	Heterozygot	35	34	20,5
51	OMF	+	Heterozygot	27	24	16
52	OMF	+	Heterozygot	34	32,5	26,5
53	OMF	+	Homozygot	81	34,5	65
54	PV	+	Heterozygot	29	24,5	37

55	PV	+	Homozygot	42,5	38	31
56	PV	+	Homozygot	47	50,5	33,5
57	PV	+	Homozygot	60	53	46
58	PV	+	Homozygot	93	99	94
59	PV	+	Homozygot	74,5	46,5	56,5
60	PV	+	Homozygot	55,5	48	44
61	RT	-	-	1	1,5	0,5

Tabelle 14: Auflistung aller Fälle, bei denen eine Mikrodissektion von Megakaryozyten und einer nicht-megakaryozytären Restpopulation vorgenommen wurde. Die Einteilung als *heterozygot* oder *homozygot* geschah mithilfe der *nested PCR*. Später diskutierte Problemfälle sind fettgedruckt. Allel PCR=Allelspezifische PCR.

Unter den sieben Fällen, von denen nur das gesamte Knochenmark untersucht werden konnte, waren neben dem oben erwähnten anscheinend homozygot mutierten Fall von ET weitere vier heterozygote und ein nicht mutierter Fall von ET, sowie eine OMF, der mit 51% mutierten Allels kein sicherer Zygotiestatus zugeordnet werden kann.

Nr.	Diagnose	JAK2 V617F(%qPCR)	Allelspezifische PCR	Nested PCR
62	ET	3%	-	-
63	ET	22%	+	n.a.
64	ET	24%	+	n.a.
65	ET	27%	+	n.a.
66	ET	28,5%	+	n.a.
67	ET	60,5%	+	n.a.
68	OMF	51%	+	n.a.
69	Kontrolle	1,5%	-	n.a.

Tabelle 15: Auflistung der Fälle, die mit der *Realtime qPCR* nur am gesamten Knochenmark, nicht jedoch am mikrodissezierten Material, untersucht werden konnten. Dazu ein Kontrollfall, der nicht mikrodisseziert wurde. n.a.= not available

Es konnte kein Fall gefunden werden, bei dem ausschließlich die Megakaryozyten oder ausschließlich die nicht-megakaryozytäre Population die Mutation aufwies, entweder waren beide Populationen mutiert oder beide nicht mutiert. Dies ist die Kernaussage dieses Abschnittes.

Betrachtet man die Fälle mit der Mutation, so sind bei 16 von 21 Fällen von ET (76,2%) sowohl das gesamte Knochenmark wie auch die mikrodissezierten Populationen heterozygot mutiert, in zwei weiteren Fällen (Nummer 25,32) bewegen sich die Mutationsfrequenzen aller drei Populationen im Graubereich zwischen 40% und 60%, der keine eindeutige Trennung zwischen heterozygoter und homozygoter Mutation erlaubt.

Ein Fall (Nummer 43) zeigte einen Abfall von 52,5% Mutationsfrequenz im gesamten Knochenmark über 35% in der Restpopulation zu 28,5% bei den Megakaryozyten, die Ct-Werte des

mikrodissezierten Materials lagen zwischen 31,5 und 33 und damit deutlich innerhalb der geforderten Grenzen. Ein weiterer Fall (Nummer 44), der sowohl in der Gesamt- wie in der Restpopulation heterozygot mutiert war (9% und 9,5%), wies in den Megakaryozyten eine Mutationsfrequenz von 6,5 % auf. Dies liegt zwar unterhalb des generellen Grenzwertes von 6,7%, betrachtet man jedoch die Allelfrequenzen für ANBL-6-DNA in diesem Lauf, so ergibt sich für diese Platte ein Cutoff von 4,8%, so dass hier auch die Megakaryozyten als heterozygot klassifiziert werden konnten. Ein Fall (Nummer 26) zeigte mit über 40% mutierten Allels in den nicht-megakaryozytären Zellen eine deutlich höhere Frequenz als in der Gesamtpopulation oder den isolierten Megakaryozyten. In diesen beiden Populationen war die Mutationsfrequenz 19% beziehungsweise 17%.

Von den vier Fällen von OMF mit Nachweis von JAK2 V617F sind drei in allen Populationen heterozygot. Der vierte Fall (Fall 53) zeigt Homozygotie im gesamten Mark und der Restpopulation sowie Heterozygotie in den Megakaryozyten. Auch bei diesem Fall waren alle Ct-Werte sehr gut (<33).

Unter den sieben untersuchten Fällen mit PV waren zwei in allen Populationen heterozygot für das mutierte Allel, zwei ebenfalls in allen untersuchten Zellen im Graubereich und einer überall homozygot für JAK2 V617F. Ein Fall (Nummer 59) war im gesamten Knochenmark homozygot (74,5%), jedoch wurde oben beschriebener Abfall der Mutationsfrequenz in den mikrodissezierten Populationen in den Bereich um 50% beobachtet (Ct im mikrodissezierten Material <33,5). Beim letzten Fall von PV (Nummer 56) lagen die Allelfrequenzen für JAK2 V617F für das gesamte Knochenmark (47%) und die Megakaryozyten (50,5%) im Graubereich und die Restpopulation mit 33,5% im eindeutig heterozygoten Bereich. Die für die FAM-Sonde gemessenen Ct-Werte der Restpopulation lagen unter 32,6.

Alle Fälle, die in der allelspezifischen PCR negativ auf die Mutation getestet worden waren, wurden durch die qPCR als nicht mutiert bestätigt.

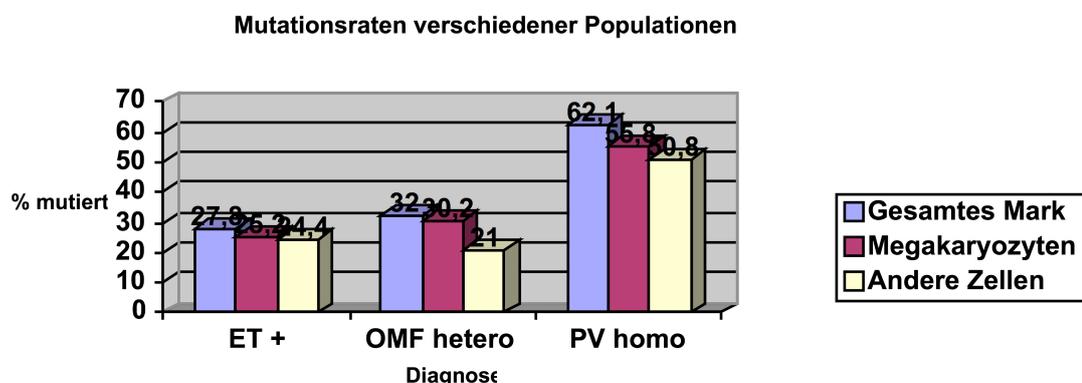


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Mutationsfrequenzen der einzelnen Zellpopulationen bei den drei größten Patientengruppen mit Mutation: Mutierte ET (n=21), heterozygot mutierte OMF (n=3), homozygot mutierte PV (n=6)

	<u>n</u>	<u>Gz.Mark</u>	<u>Std.Dev</u>	<u>Range</u>	<u>Megas</u>	<u>StdDev</u>	<u>Range</u>	<u>Andere</u>	<u>StdDev</u>	<u>Range</u>
<u>ET mut.</u>	21	27,8	12,5	9-52	25,2	10,9	6,5-52,5	24,4	11,1	8,5-44,5
<u>ET neg.</u>	10	3,2	1,7	0-5,5	1,25	1	0-3,5	0,65	0,7	0-2
<u>PV homo</u>	6	62,1	18,8	42,5-93	55,8	21,8	38-99	50,8	23,1	31-94
<u>PV hetero</u>	1	29	-		24,5			37		
<u>OMF neg.</u>	4	1	1,7	0-3,5	1,9	1,4	1-4	1,25	1,6	0-3,5
<u>OMF hetero</u>	3	32	4,4	27-35	30,2	5,4	24-34	21	5,3	16-26,5
<u>OMF homo</u>	1	81			34,5		-	65		-
<u>Kontrollen</u>	1	1	-	-	1,5	-	-	0,5	-	

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der qPCR am mikrodisszezierten Material sowie am gesamten Schnitt (StdDev= Standard Deviation)

5. Diskussion

5.1. Methodologische Betrachtungen

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass der Nachweis der Mutation JAK2 V617F an formalinfixierten, EDTA-entkalkten, Paraffin-eingebetteten Knochenmarksbiopsien mit allen durchgeführten Methoden möglich ist. Damit wird eine große Zahl von archivierten Knochenmarksbiopsien der molekularen Untersuchung auf JAK2 V617F zugänglich. Ebenso bestätigt diese Studie die Möglichkeit, auch an separierten Zellpopulationen aus solchen Präparaten die Mutationsanalyse durchzuführen (Kremer M et al, 2008; Hussein K et al, 2006). Das Alter der Biopsien scheint für ihre Verwendbarkeit für molekulare Untersuchungen von Bedeutung zu sein. Die Beobachtung, dass bei der *Nested PCR* die amplifizierbaren Biopsien durchschnittlich 2,3 (0-12) Jahre, die nicht amplifizierbaren dagegen 5,1 (1-12) Jahre alt waren, bestätigt die bereits beschriebene Abnahme der Eignung von Proben für PCR-Untersuchungen mit dem Alter und der damit verbundenen langen Lagerung des Gewebes in Paraffin (Greer CE et al, 1994). Die Untersuchung gelang jedoch auch an einem zwölf Jahre alten Fall.

Die eingesetzten Methoden unterscheiden sich in ihrer Ausfallsrate, der Einfachheit der Durchführung und damit der Fehleranfälligkeit und ihrer Aussagekraft voneinander. Grundsätzlich geht man davon aus, dass die durchschnittliche Länge der DNA-Fragmente nach Formalinfixierung bei etwa 300-400bp liegt, was einen Teil der Unterschiede zwischen den Methoden erklären könnte (Lehmann U et al, 2001).

Allelspezifische PCR

Die allelspezifische PCR ist an 92,1% der untersuchten Fälle erfolgreich durchgeführt worden und ist als eine Methode, die nur einen einzigen Amplifikationsschritt beinhaltet, weniger anfällig gegenüber äußeren Störeinflüssen als eine *Nested PCR* oder die Sequenzierung, dabei zugleich schneller und weniger aufwendig in ihrer Durchführung.

Es existieren Fälle, welche mithilfe der allelspezifischen PCR positiv auf die Mutation getestet worden waren, die *Nested PCR* oder die realtime qPCR ein negatives Ergebnis brachten. Bei der *Nested PCR* gab es zwei solche Fälle (beide ET), bei der qPCR vier (zwei ET, eine OMF, ein unklassifiziertes MPS). Von diesen vier Fällen war keiner mit seiner ermittelten Mutationsfrequenz in unmittelbarer Nähe des berechneten Cutoffs von 6,7%, die Werte lagen bei 4,75%, 2,5%, 1% und 0%. Einzig bei dem Fall mit einer Mutationsfrequenz von 4,75% könnte man argumentieren, dass dieser Fall zwar die Mutation trägt, jedoch durch einen zu hoch gewählten Cutoff als falsch-negativ gewertet wurde. Denn durch die Addition von drei Standardabweichungen zum Mittelwert der unspezifischen Bindungen und den so eher hohen Cutoff sind solche falsch-negativen Ergebnisse nicht auszuschließen. Bei den

drei anderen Fällen (2,5%, 1%, 0%) liegt ein solcher Gedankengang wegen der ermittelten Prozentsätze deutlich unter dem errechneten Cutoff fern.

Dies könnte auf eine höhere Sensitivität der allelspezifischen PCR gegenüber den anderen Methoden hindeuten, welche in der Literatur mit 0,01-2% angegeben wird (Jones AV et al, 2005; Baxter EJ et al, 2005; Tefferi A, 2006b; Pardanani AD et al, 2006a; Mc Clure R et al, 2006; Lippert E et al, 2006; Kralovics R et al, 2006). Diese Angabe bedeutet, dass mit dieser Methode ein mutiertes Allel unter 50-10000 normalen detektiert werden kann.

Es könnte jedoch auch dafür sprechen, dass bei einer derart großen Sensitivität eine größere Anfälligkeit gegenüber Kontaminationen besteht als bei anderen Methoden. Weiterhin könnte das auf das Gel aufgetragene Amplifikat von der auf dem Agarosegel benachbarten Laufspur eines eindeutig mutierten Falles herübergelaufen sein. Letztere Variante konnte in dieser Studie durch wiederholte Untersuchung der fraglichen Fälle nahezu ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Vorteil der allelspezifischen PCR ist die gleichzeitige Amplifikation einer Kontrollsequenz, welche Schlüsse über die DNA-Qualität des untersuchten Materials zulässt. Alle diese Eigenschaften machen die allelspezifische PCR zu einer robusten, zuverlässigen und einfach durchzuführenden Screeninguntersuchung.

Nested PCR mit Restriktionsenzymverdau

Die Durchführung der *Nested PCR* mit Restriktionsenzymverdau hat den Nachteil, dass sie mit den zwei nacheinander geschalteten PCR-Reaktionen und dem anschließenden Restriktionsverdau ein dreischrittiges Verfahren ist, welches dadurch zeitaufwendiger und fehleranfälliger ist als die anderen Methoden. Zusätzlich muss in der externen PCR ein deutlich längeres Fragment amplifiziert werden als dasjenige, welches bei der allelspezifischen PCR das Vorhandensein der Mutation anzeigt. Diese beiden Tatsachen erklären zumindest teilweise die hohe Ausfallsrate von 25,6% und die mangelhafte Durchführbarkeit an mikrodiseziertem Material, bei dem nach der zusätzlichen immunhistochemischen Färbung von einer noch geringeren mittleren Länge der DNA-Fragmente ausgegangen werden muß und durch die geringere Zellzahl weniger DNA vorhanden ist.

Der Vorteil der *Nested PCR* liegt darin, dass ihr Ergebnis zusätzlich zum Nachweis oder Ausschluß der Mutation über den Anteil des mutierten im Vergleich zum normalen Allel informiert. Jedoch obliegt diese Information einer subjektiven Interpretation, da sich das Problem ergibt, dass eine Bande, die das mutierte Allel repräsentiert mit zwei nebeneinander existierenden Banden für das normale Allel, die visuell addiert werden müssen, verglichen wird. Damit ist die *Nested PCR* anderen Verfahren zur Bestimmung von Homo- oder Heterozygotie wie dem in der Literatur gelegentlich angewendeten Pyrosequencing oder dem Nachweis eines *loss of heterozygosity* auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 in ihrer Genauigkeit unterlegen (Kralovics R et al, 2005a).

In dieser Studie ergab sich eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse der *Nested PCR* mit denen der Sequenzierung, der Vergleich mit der allelspezifischen PCR war in nur zwei Fällen diskordant. Diese beiden diskordanten Fälle, beide ET, wurden mit der AS-PCR als mutiert eingestuft, während die *Nested PCR* keine Mutation zeigen konnte. Bei der bekannten geringeren Sensitivität der *Nested PCR* kann dies für einen geringen Prozentsatz mutierten Allels sprechen, der nicht detektiert werden konnte.

Die *Nested PCR* mit Restriktionsenzymverdau ist ein Verfahren, dass sich wegen der hohen Ausfallrate nur bedingt als eine Screeningmethode anbietet und auch zur Abschätzung der Frequenz des mutierten Allels nicht an erster Stelle steht. Eine weitere Einschränkung dieses Verfahrens ergibt sich aus der Zugehörigkeit des verwendeten Restriktionsenzym BSA XI zu den Typ IIb-Restriktionsenzymen, die DNA entweder schneiden oder methylieren können (Poodt J et al, 2006). Mit der Schwierigkeit, das Verhalten des Enzyms vorherzusagen, geht das Problem einher, das Vorhandensein ungeschnittener DNA zu interpretieren.

Sequenzierung

Die durchgeführte Sequenzierung ist eine vierschrittige Methode, welche sich aus externer PCR, interner PCR, der Sequenzierungs-PCR mit Didesoxynukleotiden und der Kapillarelektrophorese zusammensetzt. Damit ist diese Methode im Vergleich zu den anderen aufwendig. Die Sensitivität des Mutationsnachweises ist in der Literatur mit meist über 5% angegeben (Cazzola M et al, 2005; Campbell PJ et al, 2005; James C et al, 2006; Tefferi A et al, 2006b; Larsen TS et al, 2007) und liegt damit unter derjenigen der allelspezifischen PCR. Eine Studie gibt ihre Sensitivität mit 3,2% an (Poodt J et al., 2006). Eine weitere Arbeit befand im direkten Vergleich sowohl die AS-PCR als auch den Restriktionsenzymverdau sensitiver als klassisches Sequenzieren (Campbell PJ et al, 2006c). Baxter et al stellten durch den Methodenwechsel von einer Sequenzierung auf die AS-PCR einen Anstieg des Anteils mutierter Patienten von 12% auf 57% fest (Baxter EJ et al, 2005).

Es kann wie bei der *Nested PCR* auch beim klassischen Sequenzieren eine durch Integration der Kurven und Vergleich der dadurch ermittelten Flächen mit größerer Genauigkeit und Objektivität als bei der *Nested PCR* eine Unterscheidung zwischen homozygot und heterozygot mutierten Fällen getroffen werden. Die Sequenzierung wird daher als semiquantitative Methode bezeichnet, eine exakte Quantifizierung ist auch mit ihr nicht möglich.

In der vorliegenden Studie sind einige wenige Fälle sequenziert worden, um das Ergebnis der allelspezifischen und der *Nested PCR* zu bestätigen. Tatsächlich waren die Ergebnisse der drei Methoden in allen zehn Fällen konkordant.

Der bloße Nachweis der Mutation mit der Sequenzierung ist mit einer vergleichsweise geringen Sensitivität möglich, jedoch lässt sich die Häufigkeit des mutierten Allels besser als mit der *Nested*

PCR abschätzen. Als Methode für ein Mutationsscreening scheint sie kaum besser geeignet als die *Nested PCR*.

Realtime qPCR

Mithilfe der qPCR ließ sich nicht nur DNA, die aus kompletten Gewebsschnitten extrahiert wurde, sondern in insgesamt 61/72 Fällen (84,7%) auch mikrodissiziertes Material untersuchen. Dies ist trotz der geringen DNA-Menge und der eher schlechteren Qualität durch die kurze Länge (86bp) des amplifizierten Abschnitts gut begründbar. Die Stärke der Methodik liegt darin, eine genaue Aussage über die Frequenz des mutierten Allels und damit die Unterscheidung zwischen homozygot und heterozygot mutierten Fällen zu treffen. Die immer vorhandene unspezifische Bindung der VIC-markierten Sonde an das normale Allel verhindert dagegen eine scharfe Trennung heterozygot mutierter von nicht mutierten Fällen. Zwar sind Fälle, deren Mutationsfrequenz über dem Cutoff-Wert von 6,7% liegt, mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,7% mutiert, jedoch besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass ein Fall mit der Mutation ein Ergebnis unter diesem Cutoff hat, also als falsch-negativ angezeigt wird.

Bei der Gruppe der ET, welche die größte der mit der qPCR untersuchten Patientengruppen war, wurde eine durchschnittliche Allellast von 27,8% am gesamten Knochenmark gefunden. Dieses Ergebnis steht in gutem Einklang mit der Literatur (Antonioli E et al, 2008). Wie erwähnt wies ein Fall von ET eine Allellast im eindeutig homozygot mutierten Bereich auf.

Es wurden vier Fälle gefunden, die mit der qPCR ein abweichendes Ergebnis von der allelspezifischen PCR hatten. Bei allen zeigte die allelspezifische PCR die Mutation an, die qPCR jedoch nicht (2 ET, 1 OMF, 1 unklassifiziertes MPS). Die ermittelten Mutationsfrequenzen waren 0%, 1%, 2,5% und 4,75%. Der erste Fall mit der Frequenz von 0% zeigte in der AS-PCR eine sehr schwache Bande, so dass angenommen werden muss, dass das Ergebnis der qPCR das richtige ist, zumal die Ct-Werte mit etwa 27,0 und 27,3 sehr gut sind. Entsprechendes gilt für den Fall von unklassifiziertem MPS mit einer angezeigten Mutationsfrequenz von 1%. Bei dem Fall mit einer Mutationsfrequenz von 2,5% in der qPCR hatte auch die *Nested PCR* keine Mutation nachweisen können, so dass hier zwei Methoden gegen die allelspezifische PCR stehen, welche jedoch sehr sensitiv ist. Der vierte Fall ist mit 4,75% Mutationsfrequenz nahe am Cutoff zu den heterozygot mutierten Fällen von 6,7%, so dass hier ein falsch-negatives Ergebnis des TaqMan möglich ist. Dem kann jedoch entgegen gehalten werden, dass sich für das mikrodissizierte Material dieses Falles Frequenzen von 0,5% für die Megakaryozyten beziehungsweise 0% für die nicht-megakaryozytäre Population ergaben, noch dazu mit sehr guten Ct-Werten für mikrodissiziertes Material von etwa 31 mit guter Übereinstimmung zwischen den Duplikaten. Dieser Fall muss als unklar bestehen bleiben.

Die vier beobachteten Abweichungen sind alle dahingehend gleich, dass die Mutation mit der AS-PCR entdeckt werden konnte, mit der qPCR dagegen nicht. Dies könnte einerseits für eine größere Sensitivität der AS-PCR sprechen, andererseits könnten deren Ergebnisse falsch-positiv sein. Diese Frage ist für jeden Einzelfall neu zu entscheiden. Generell kann gesagt werden, dass wegen des relativ hoch gelegten Cutoffs in der qPCR falsch-negative Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden können. Wie schon dargelegt gibt es aber auch Argumente, die für falsch-positive Ergebnisse der AS-PCR sprechen können.

Wie in Kapitel 4.3. besprochen gibt es zwei Fälle, die mit der Methode des Restriktionsenzymverdaus nach *Nested PCR* als Wildtyp, mit der AS-PCR dagegen als mutiert eingestuft wurden. Während für einen dieser beiden Fälle durch die RT-PCR mit einer Mutationsfrequenz von 2,5% das negative Ergebnis der *Nested PCR* bestätigt wurde, hatte der zweite Fall in der RT-PCR eine Mutationsfrequenz von 15,5%. Dies könnte einerseits als Beleg für eine schwache Sensitivität der *Nested PCR* angesehen werden, bei der eine Mutationsfrequenz von bis zu 20% für eine positive Reaktion nötig sind. Andererseits könnte das falsch-negative Ergebnis der *Nested PCR* zum Beispiel durch „Hinüberlaufen“ von Amplifikat aus benachbarten Taschen beim Auftragen auf ein Agarosegel oder durch die oben geschilderte schwer vorhersagbare Verhaltensweise des Enzyms BsaXI zustande gekommen sein.

Es war berichtet worden, dass Mutationen mithilfe der qPCR nachgewiesen werden konnten, die mithilfe der Sequenzierung unerkant geblieben waren (Hammond E et al, 2007b). Auch Poodt et al geben in einer methodologischen Zusammenschau die qPCR mit 0,8% als eines der sensitivsten Verfahren zum Mutationsnachweis an (Poodt J et al, 2006).

Es ist unklar, ob die allelspezifische PCR oder die qPCR die sensitivere Methode ist. In einer Studie wurden in einem teilweise überlappenden Patientenkollektiv signifikant mehr Mutationen mit einem TaqMan Assay als mit der AS-PCR beschrieben (Lucia E et al, 2008). Der Anteil an mutierter Patienten mit allen MPS, der mit dem TaqMan Assay festgestellt wurde, war mit 93% jedoch deutlich höher als in anderen Studien beschrieben und muss kritisch bewertet werden. Eine andere Arbeit fand mit dem TaqMan deutlich geringere Anteile an mutierten Patienten, nämlich 68%, 59% und 46% bei der PV, ET und der OMF (Hammond E, 2007a). Eine weitere Studie untersuchte 168 Patienten sowohl mit der AS-PCR als auch mit einem TaqMan Assay und fand in allen Fällen konkordante Ergebnisse (Ruan GR et al, 2007). Es scheint eine Frage des für den TaqMan Assay gewählten Cutoffs und des genauen Assayansatzes zu sein, wie gut die Sensitivität des Mutationsnachweises und wie hoch das Risiko falsch-positiver Ergebnisse wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich für den Nachweis der Mutation sowohl die allelspezifische PCR als auch die qPCR eignen und die qPCR bei nachgewiesener Mutation zusätzlich eine gute Quantifizierung zulässt.

Hier muss erwähnt werden, dass andere sehr sensitive Verfahren beschrieben sind. Vanucchi et al bedienen sich einer Methode mit fluoreszenzmarkierten, allelspezifischen Primern und einer

Kapillarelektrophorese und fanden 9% mehr Mutationen als mit der AS-PCR (Vanucchi AM et al, 2006b).

5.2. Vergleich der Mutationshäufigkeit der einzelnen MPS mit der Literatur

Wie in Kapitel 1.3. beschrieben liegt nach den Literaturangaben der Anteil der Patienten, bei denen die Mutation nachgewiesen werden konnte, bei etwa 80% bei der PV und bei je 40-50% bei ET und OMF. Die in der vorliegenden Studie ermittelten Werte liegen höher (96% bei PV, 77% bei ET, 62% bei OMF). Es fällt auf, dass von den in der Literatur beschriebenen Zahlen diejenigen von Baxter et al die höchsten sind (97% bei PV, 57% bei ET, 50% bei OMF; Baxter EJ et al, 2005). Diese Arbeitsgruppe verwendete ebenso wie diese Studie die allelspezifische PCR als Methode des Mutationsnachweises, welche wie beschrieben sensitiver als andere Verfahren wie Sequenzierung oder Restriktionsenzymverdau nach einer *Nested PCR* ist. Dazu passt, dass sich der Anteil der ET-Patienten mit der Mutation in der genannten Studie durch den Wechsel der Methodik von Sequenzierung auf die allelspezifische PCR von 12% auf 57% erhöhte (Baxter EJ et al, 2005). Drei weitere Studien erhielten mit der AS-PCR bei der ET eine ähnlich hohe Frequenz (Antonioli E et al, 2005; Chen S et al, 2007; Speletas M et al, 2007). Zieht man lediglich diese Studien zum Vergleich mit der vorliegenden heran, entzerren sich die Unterschiede in den Prozentzahlen ein wenig, jedoch bei der ET und der OMF nicht vollständig.

Der Grund kann darin vermutet werden, dass in manchen Fällen die Mutation ausschließlich in jenen Zellen vorhanden ist, die nicht aus dem Knochenmark in das periphere Blut ausgeschwemmt werden und deren Nachfahren im peripheren Blut keine DNA mehr enthalten. Es könnte sich dabei um präerythrozytäre Vorläufer handeln, da die Erythrozyten ihre DNA früh in ihrem Lebenszyklus verlieren. Auch die Megakaryozyten könnten als Vorläufer der ebenfalls keine DNA enthaltenden Thrombozyten die alleinigen Träger der Mutation sein. Dazu passt es, dass in einer Studie in von thrombozytärer RNA gewonnener cDNA die JAK2-Mutation nachgewiesen wurde (Kiladjan JJ et al, 2006b). Die Tatsache, dass bei der ET die Diskrepanz des Prozentsatzes der Patienten mit der Mutation zwischen der vorliegenden Studie und der Literatur größer ist als bei den anderen MPS, kann als Hinweis auf die Megakaryozyten als alleinigen Träger der Mutation gesehen werden. Dieses Modell würde auch den bei der ET im Vergleich zu den anderen MPS höheren Anteil an solchen Fällen erklären, die mit den gängigen Klonalitätsuntersuchungen als nicht-klonal in den Zellen des peripheren Blutes eingestuft werden

Die Beobachtung von zwei Fällen mit ET, die mit der *Nested PCR* als Wildtyp eingestuft worden waren, bei denen mit der sensitiveren, allelspezifischen PCR die Mutation jedoch nachgewiesen werden konnte, kann wie dargelegt als falsch-positive Reaktion der AS-PCR, aber auch als Hinweis auf einen geringen Anteil mutierter Zellen bei diesen Fällen gewertet werden. Diese Beobachtung kann also das oben genannte Modell unterstützen. Die Untersuchung dieser These im Fall der Megakaryozyten war Gegenstand der vorliegenden Studie und ist wie in Kapitel 4.7. dargestellt widerlegt worden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen McClure et al in einer Studie, in der von 15

Patienten sowohl periphere Blutzellen als auch Knochenmarkaspirat untersucht wurde und keinerlei Diskrepanz hinsichtlich des Mutationsstatus festgestellt wurde (McClure R et al, 2006). Eine andere Arbeit untersuchte von 25 JAK2-mutierten Patienten sowohl Blut als auch Knochenmark und fand dabei keinen Unterschied. Allerdings wurde in dieser Arbeit von einem von zwölf untersuchten im Blut JAK2-negativen Fällen berichtet, der am Knochenmark ein fraglich positives Ergebnis hatte (Mirza I et al, 2008).

Der in dieser Studie gefundene höhere Anteil von Patienten mit der Mutation könnte weiterhin darin begründet liegen, dass die histologische Untersuchung einer Knochenmarksbiopsie in der vorliegenden Studie als diagnostisches Kriterium gefordert wurde und die Fälle von drei erfahrenen Hämatopathologen reevaluiert wurden. Dies könnte zu einer stringenteren Diagnosestellung führen. Eine Histologie des Knochenmarks war bei den meisten anderen Studien nicht in die Diagnosestellung einbezogen, was zu einem versehentlichen Einschluss von reaktiv veränderten Fällen ohne MPS geführt haben könnte.

Es ist schwierig, ähnliche Vergleiche bei der PV anzustellen. Es gibt nämlich Hinweise dafür, dass bei der PV in nahezu allen Fällen die Mutation zu finden sein könnte. In einer Studie wurden 17 Fälle, die zuvor als nicht mutierte PV klassifiziert worden waren, reevaluiert und alle Fälle mussten aus dieser Gruppe herausgenommen werden. Größtenteils stellten sich diese Fälle als zweifelhaft diagnostiziert heraus oder es ließ sich mit einer sensitiveren Methode doch JAK2 V617F nachweisen (Tefferi A, 2006b).

Bei der PV wurden in dieser Studie 62% der mutierten Patienten (13/21) als homozygote Träger des mutierten Allels identifiziert, bei der OMF waren es 47%. Auch diese Zahlen sind höher als die in der Literatur angegebenen (20-40% bei PV, etwa 30% bei OMF). Wie oben beschrieben kam in dieser Studie für die Abschätzung der Häufigkeit des mutierten Allels eine *Nested PCR* mit anschließendem Restriktionsenzymverdau zur Anwendung, deren Interpretation subjektiv ist und keine exakte Trennung der Fälle zulässt.

Betrachtet man diese Fälle von PV, die mit der qPCR untersucht wurden, so stellt man fest, dass bei vier von sieben Fällen der Anteil mutierten Allels im Bereich zwischen 40 und 60% liegt, in welchem wie dargelegt eine eindeutige Zuordnung zu homo- oder heterozygot mit der *Nested PCR* nicht möglich ist. Drei dieser vier Fälle waren mit der *Nested PCR* als homozygot mutiert klassifiziert worden, was für eine Überschätzung der Homozygotie mit dieser Methode spricht. Jedoch unterstützen die Ergebnisse der Sequenzierung ausgewählter Fälle die Einschätzung des Zygostatus durch die *Nested PCR*.

In Übereinstimmung mit der Literatur konnte kein Fall von eindeutig homozygot mutierter ET gefunden werden, ein Fall war mit einer Mutationsfrequenz von 60,5% an der Grenze zur Homozygotie. Der Anteil homozygoter Fälle von präfibrotischer OMF war mit 20% (einer von fünf Fällen) geringer als bei der OMF im fibrotischen Stadium mit 53,3% (acht von fünfzehn Fällen). Dass

in dieser Studie Fälle von OMF in der fibrotischen Phase gegenüber denen in der präfibrotischen Phase in der Überzahl waren, kann ein Grund für den in dieser Studie in der Gesamtgruppe der OMF beobachteten höheren Anteil an homozygoten Fällen sein.

5.3. Veränderungen des Mutationsstatus im zeitlichen Verlauf

Über den zeitlichen Verlauf des Anteils der mutierten Zellen gibt es verschiedene Aussagen. Die statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten der Mutation und dem Alter der Patienten (siehe Kapitel 5.4) hatte die Vermutung nahe gelegt, dass die Mutation ein sich im Laufe der Zeit evolvierendes Ereignis ist. Manche Studien stellten dementsprechend fest, dass der Anteil mutierter Zellen mit der Zeit zunahm, wobei dies eher bei der PV als bei der ET beobachtet wurde (Tefferi A et al, 2005a; Rumi E et al, 2006; Passamonti F et al, 2006). Andere Studien konnten dagegen keine oder nur minimale Veränderungen des Mutationsstatus beobachten (Campbell PJ et al, 2006a; Mesa RA et al, 2006b; Gale RE et al, 2007). Bei der PV wurde ein mit der Zeit zunehmender Anteil homozygot mutierter Patienten beschrieben (Scott LM et al, 2006).

Die Antwort auf die in der Literatur kontrovers diskutierte Frage, ob der Mutationsstatus mit der Zeit einer Veränderung unterliegt, lässt wichtige Schlüsse über die Rolle zu, die JAK2 V617F in der Pathogenese der MPS einnimmt. Gehen mutierte Fälle in einen nicht mutierten Status über oder andersherum und bleibt dabei das MPS bestehen, wäre dies ein Hinweis auf die Existenz eines weiteren genetischen Events, das die Erkrankung auslöst. Vergleiche der klinischen Daten könnten zeigen, ob und in welcher Weise die JAK2-Mutation das Krankheitsbild beeinflusst.

Finden sich keine Veränderungen des Mutationsstatus, kann man dies als eine schwache Untermauerung der These ansehen, dass JAK2 V617F das krankheitsauslösende Ereignis ist. Es wäre nämlich nicht wahrscheinlich, dass in einer Vielzahl der Fälle die JAK2-Mutation dem eigentlichen initialen Event folgt. Jedoch könnte eine vorausgehende genetische Alteration eine Neigung zum Erwerb der JAK2-Mutation bewirken.

Die letzte mögliche Beobachtung ist die, dass sich der Mutationsstatus im Sinne des bloßen Vorhandenseins nicht ändert, jedoch der Anteil der mutierten Zellen sich erhöht oder eventuell verringert. Man würde in einigen Fällen einen Wechsel von heterozygoter zu homozygoter Mutation beobachten. Diese Beobachtung stünde in guter Übereinstimmung zu einem veröffentlichten Modell, welches besagt, dass inmitten einer primär heterozygot mutierten Subpopulation durch mitotische Rekombination ein homozygoter Subklon entsteht, welcher aufgrund eines Proliferationsvorteils die Restpopulation überwuchert (Kralovics R et al, 2005a). Solche homozygot mutierten Vorläuferzellen sind in den meisten Fällen von PV, bei der ET dagegen selten zu finden (Scott LM et al, 2006).

Dieser Proliferationsvorteil homozygoter Zellen könnte einerseits in einer gesteigerten Signalisierung durch den JAK/STAT-Pathway begründet liegen. Tatsächlich konnte eine mit der Mutationsdosis zunehmende RNA-Konzentration von PRV-1 oder NF-E2, zwei JAK-2 kontrollierten Genen, festgestellt werden (Tefferi A et al, 2005c; Vanucchi AM et al, 2006a). Andererseits könnte der

Wegfall des normalen Proteins könnte zu dieser Hyperproliferation homozygot mutierter Zellen beitragen (James C et al, 2005). Denn die Zugabe von normalem zu mutiertem Protein beeinflusst das Ausmaß dessen Aktivität, die EPO-Abhängigkeit wird wieder hergestellt (Vanucchi AM et al, 2006a).

Dieses Modell ist vereinbar mit JAK2 V617F als Krankheitsauslöser, jedoch lässt es ebenso die Existenz eines vorausgehenden genetischen Ereignisses zu. In diesem Fall hätte JAK2 V617F seine Rolle in der Beeinflussung der klinischen Präsentation. Dieses Modell wird als Dosishypothese bezeichnet und wird in Kapitel 5.8. genauer diskutiert.

In dieser Studie ist bei 16 von 16 Fällen mit der AS-PCR keine Änderung des Mutationsstatus nach median einem Jahr (wenige Wochen bis 10 Jahre) festgestellt worden. Die *Nested PCR* war nur bei vier Fällen mit DNA aus beiden Biopsien durchführbar, bei keinem ergab sich eine Änderungen.

Diese Ergebnisse würden für eines der beiden zuletzt dargestellten Modelle sprechen. Eine Trennung zwischen diesen ist kaum möglich, da vier Fälle nicht ausreichend sind, um Änderungen in der Mutationsdosis auch in anderen Fällen mit hinreichender Wahrscheinlichkeit ausschließen zu können.

Es zeigte sich in dieser Studie für alle MPS eine Korrelation zwischen der JAK2 V617F-Allellast und der Krankheitsdauer. Diese Ergebnisse können als Widerspiegelung des Proliferationsvorteils mutierter Zellen ein indirekter Hinweis für eine stattfindende Evolution des JAK2-Mutationsstatus sein. Andere Studien konnten ebenfalls feststellen, dass die Allellast mit der Zeit variierte, besonders bei der PV und der OMF, während sie bei der ET eher konstant blieb (Passamonti F et al, 2006; Barosi G et al, 2007; Tefferi A et al, 2007a; Gale RE et al, 2007).

5.4. Klinische Daten

Die in dieser Studie untersuchten klinischen Parameter der Patienten waren die Hämoglobinkonzentration, die Anzahl an Leukozyten und Thrombozyten, das Vorhandensein einer Splenomegalie und der Zeitpunkt der Erstdiagnose, der auf die Dauer der Erkrankung zurückschließen ließ.

Für alle Entitäten war eine positive Korrelation zwischen dem Anteil des mutierten Allels und der Krankheitsdauer gegeben (siehe Tabelle 12). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Literatur (Kralovics R et al, 2005a, Levine RL et al, 2005b). Sie führte zu der in Kapitel 5.3. geschilderten These, dass, von einer homozygoten Vorläuferzelle, deren Existenz bei fast allen Fällen der PV gezeigt werden konnte (Scott LM et al, 2006), ausgehend, die homozygoten die übrigen Zellen im Laufe der Zeit überwuchern. So würde der Anteil des mutierten Allels kontinuierlich ansteigen, bis der in den meisten Studien benutzte Grenzwert zur Homozygotie von 50% erreicht wird.

Für homozygot mutierte Fälle ist in der Literatur der höchste Hämoglobinwert beschrieben. Es folgen heterozygot mutierte vor nicht mutierten Patienten (Wolanskyj AP et al, 2005; Antonioli E et al, 2005; Tefferi A et al, 2005b; 2006a; Cheung B et al, 2006; Vannucchi AM et al, 2007; Barosi G et al, 2007; Finazzi G et al, 2007). In der vorliegenden Studie konnte ein ähnliches Bild bei der OMF und der ET

festgestellt werden, bei der PV zeigte sich ein umgekehrter Trend. Diese Abweichung von der Literatur kann damit begründet werden, dass die homozygot mutierten Patienten in dieser Studie wegen ihrer länger bestehenden Krankheit eventuell häufiger zytoreduktiv therapiert wurden. Ob und wie die Patienten therapiert wurden, war kein Parameter, der in dieser Studie erhoben wurde. Es fällt jedoch auf, dass die beiden homozygot mutierten PV-Patienten mit den geringsten Hb-Werten, 6,8 mg/dl beziehungsweise 9,8 mg/dl, zum Zeitpunkt der Biopsie unter Therapie standen. Diese beiden sehr geringen Werte veränderten den Mittelwert bereits um mehr als 1 g/dl nach unten.

Bei den Leukozytenzahlen ließ sich der in der Literatur beschriebene Trend nachvollziehen. Es wurden die höchsten Werte bei homozygot mutierten Patienten gefunden, gefolgt von heterozygot mutierten und nicht mutierten.

Bemerkenswert ist das Ergebnis des Vergleichs der Thrombozytenzahlen. Hier fand sich bei allen drei betrachteten MPS der höchste Wert bei heterozygot mutierten Patienten, die anderen blieben dahinter zurück. Diese Beobachtung deckte sich mit klinischen Vergleichen aus anderen Studien, die ebenso bei homozygot mutierten Patienten geringere Thrombozytenzahlen registrierten als bei heterozygot mutierten und JAK2-negativen Patienten (Campbell PJ et al, 2005; Antonioli E et al, 2005; Tefferi A et al, 2006a; Vannucchi AM et al, 2007; Barosi G et al, 2007; Finazzi G et al, 2007).

Interessanterweise entwickelten Mäuse, die nach letaler Bestrahlung mit mutationstragenden Knochenmarkszellen transplantiert wurden, dementsprechend eher eine Thrombopenie als eine Thrombozytose. Die heterozygote Mutation scheint einen eher thrombozytär geprägten Phänotyp zu favorisieren, während eine homozygote Mutation die Erythropoese zugunsten der Thrombopoese in den Vordergrund treten lässt. Manche Autoren sehen dieser Beobachtung ein Kontinuum von JAK2 V617F-ET und PV zugrundeliegen, dessen phänotypische Ausprägung durch den Anteil mutierten Allels bestimmt wird (Campbell PJ et al, 2006). In Kapitel 5.8. wird darauf eingegangen werden.

Bei der Betrachtung der Häufigkeit einer Splenomegalie ergaben sich keine gravierenden Unterschiede zwischen den Mutationsklassen, was zum Teil darin begründet liegen mag, dass diese Information bei weniger Patienten zu erhalten war als die übrigen Daten. Es fällt jedoch auf, dass eine Splenomegalie wie wegen der geringer ausgeprägten Fibrose erwartet- bei der ET seltener ist als bei der PV oder der OMF (siehe Tabelle 11). Eine Arbeit fand ein häufigeres Vorkommen von Splenomegalie mit steigender Allellast (Antonioli E et al, 2008).

In der Literatur wurde weder eine Korrelation zwischen der Häufigkeit der Mutation und dem Geschlecht noch ein häufigeres Vorkommen der Mutation in bestimmten ethnischen Gruppen belegt (Antonioli E et al, 2005; Wolanskyi AP et al, 2005; Tefferi A et al, 2005b). Bei der Myelofibrose besteht zudem kein deutlicher und reproduzierbarer Zusammenhang zwischen der Mutation und der Überlebensdauer oder einer leukämischen Transformation (Tefferi A et al, 2005b; 2008; Campbell PJ et al, 2006a; Barosi G et al, 2007). Als unabhängige Indikatoren für das Überleben konnten nur das Alter und der *Dupriez Prognostic Score* gefunden werden, welcher einen abnormen Karyotyp sowie pathologische Werte für Hämoglobin und Leukozyten berücksichtigt (Dupriez B et al, 1996; Tefferi A

et al, 2005b). Kralovics et al beschrieben mehr thrombotische und fibrotische Ereignisse bei Patienten mit der Mutation in einer Gruppe von nicht näher differenzierten MPS (Kralovics R et al, 2005a). Andere Studien bewerteten die Assoziation von JAK2 V617F mit thrombotischen Ereignissen unterschiedlich (Cheung B et al, 2005; Campbell PJ et al, 2005; Finazzi G et al, 2007; Wolanskyi AP et al, 2005; Antonioli E et al, 2005; 2008).

Diese genannten Komplikationen der MPS (Thrombose, Fibroseentstehung, leukämische Transformation) sind in dieser Studie nicht untersucht worden.

5.5. Korrelation der Mutationsanalyse mit der Expression von bFGF

In der vorliegenden Studie wurden Fälle von AML mit und ohne Fibrose, MDS mit und ohne Fibrose und von MPS auf das Vorhandensein der JAK2-Mutation sowie auf die megakaryozytäre Expression der nukleären *high-molecular-weight-isoform* des Wachstumsfaktors bFGF untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Kapitel 4.3. dargestellt.

Dabei ist festzuhalten, dass in dieser im Gegensatz zu anderen Studien keine Mutation in MDS oder AML gefunden werden konnte. Diese teilweise widersprüchlichen Ergebnisse könnten mit den unterschiedlichen an die Fallauswahl gestellten Kriterien und einer unscharfen Klassifikation begründet werden (Ohyashiki K et al, 2005; Kremer M et al, 2006).

Weiterhin scheint sich der Mechanismus der Fibroseentstehung bei MPS auf der einen und AML und MDS auf der anderen Seite zu unterscheiden. Bei den letztgenannten fand sich bei Fällen mit Fibrose mit 77,2% signifikant häufiger eine megakaryozytäre bFGF-Expression als bei Fällen ohne Fibrose mit 17,6% ($p < 0,005$). Dagegen ist bei fast allen Fällen von MPS unabhängig vom Vorhandensein einer Fibrose bFGF-Positivität nachzuweisen. Die Überexpression von bFGF scheint bei AML und MDS ein starker Reiz für eine Fibroseentstehung zu sein, wenn auch dafür nicht hinreichend, wie drei Fälle mit bFGF-Expression, aber ohne Fibrose, belegen. Dieser Reiz scheint bei MPS nicht vorhanden zu sein, es sei denn der genetische Hintergrund verhindert in mehr Fällen als bei MDS und AML die Entstehung einer Fibrose.

Eine andere Auswirkung von bFGF bei MPS könnte in einem autokrinen proliferativen Reiz für Megakaryozyten zu suchen sein. Die Existenz von Fällen von MPS mit bFGF-Überexpression und ohne Fibrose legt diesen Gedanken nahe.

Weiterhin könnte JAK2 V617F ein Grund für eine bFGF-Überexpression sein. Denn, betrachtet man alle Fälle, bei den nicht mutierten Patienten ist bei 34 von 57 Fällen (59,6%), bei den mutierten in 48 von 49 Fällen (98%) eine bFGF-Überexpression zu finden. Der hohe Prozentsatz von fast 60% bei den nicht mutierten Patienten fordert aber auch andere hierzu führende Mechanismen, die sogar in einem größeren Teil der Fälle wirksam werden als JAK2 V617F.

Betrachtet man nur die drei klassischen MPS PV, ET und OMF so zeigen zwar 100% der Patienten mit der Mutation eine bFGF-Überexpression, jedoch auch 14 von 15 (93%) ohne die Mutation. Somit

findet sich kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der Mutation und bFGF-Positivität bei MPS, sie sind unabhängige Ereignisse.

Es bleibt zusammenfassend festzuhalten, dass bFGF ein Induktor für eine Fibroseentstehung sein kann, aber keineswegs hinreichend dafür ist und andere Mechanismen sowie der genetische Hintergrund seine Wirkung ergänzen beziehungsweise abschwächen.

5.6. Mutationsanalyse von Megakaryozyten und nicht-megakaryozytären Populationen

Verglichen mit anderen MPS scheint in einem höheren Anteil von Fällen bei der ET lediglich ein geringer Anteil von Zellen Träger der JAK2-Mutation zu sein. Die Gründe für diese Annahme sind bereits dargelegt worden und lassen die Vermutung zu, dass bei der ET die Megakaryozyten diejenigen Zellen sind, welche ausschließlich oder fast ausschließlich die Mutation tragen.

Mit der Methode der lasergestützten Mikrodisektion wurden Megakaryozyten und nicht-megakaryozytäre Zellen isoliert und deren DNA mit einer quantitativen *TaqManPCR* analysiert. Insgesamt konnten 31 Fälle von ET sowohl am Material des gesamten Markes als auch am mikrodissezierten Material untersucht werden. Acht dieser 31 Fälle waren schon vorher mit der AS-PCR als nicht mutiert bestimmt worden, sie dienten der Überprüfung der qPCR. Dazu kamen die beiden vorher beschriebenen Fälle, für die mit der AS-PCR die Mutation nachgewiesen werden konnte, jedoch mit der *Real-Time PCR* nicht.

Die übrigen 21 Fälle von mutierter ET waren die eigentlichen Studienfälle. Zunächst ist festzuhalten, dass kein Fall existierte, bei dem entweder nur die Megakaryozyten oder nur nicht-megakaryozytäre Zellen von der Mutation betroffen waren. Dies steht in Widerspruch zu den Ergebnissen einer anderen Studie, in der die Megakaryozyten, ebenso wie in der vorliegenden, mittels einer lasergestützten Mikrodisektion isoliert wurden, die Frequenz des mutierten Allels jedoch nicht mit einer qPCR, sondern mittels *Pyrosequencing* bestimmt worden war. In dieser Studie wurde ein Fall von insgesamt 24 untersuchten beschrieben, der mit 56% Allelfrequenz homozygot mutierte Megakaryozyten hatte und die Restpopulation des Knochenmarks die Mutation nicht trug (Hussein K et al, 2006). Ein solcher Zustand müsste durch eine selektive Vervielfältigung der Mutation in den polyploiden Megakaryozyten zustande kommen, beispielsweise durch mehrfache mitotische Rekombination. Gleichzeitig wäre die Mutation in den übrigen Zellen entweder nicht oder -was nach der Studienlage wahrscheinlicher ist- nur auf Stammzellniveau vorhanden, ohne in einem Proliferationsvorteil für nicht-megakaryozytäre Zellen zu resultieren.

In der vorliegenden Studie ist weiterhin kein Fall beobachtet worden, bei dem die Megakaryozyten und die Restpopulation eine derart unterschiedliche Frequenz des mutierten Allels aufwiesen, dass ein Sprung von Homozygotie zu Heterozygotie oder andersherum beobachtet werden konnte. Nur in einem Fall (Nummer 26, Tabelle 14) lag die Allelfrequenz von JAK2 V617F für die nicht-megakaryozytäre Population in der beschriebenen Übergangszone zwischen 40% und 60% mutierten

Allels, diejenige für Megakaryozyten jedoch im eindeutig heterozygoten Bereich. Diese Erkenntnisse stehen ebenso in Widerspruch zu den Schlussfolgerungen der oben genannten Studie aus dem Jahre 2006, die in einigen Fällen einen deutlichen Unterschied in der Allelfrequenz der beiden untersuchten Populationen feststellte. Ein deutlicher Unterschied wurde dort als eine mindestens doppelt so große Mutationsfrequenz der Megakaryozyten gegenüber der Restpopulation definiert. Jedoch war dieser Unterschied in nur 3 von 24 Fällen gegeben und andersherum wurde auch ein Fall beschrieben, der eine mehr als doppelt so große Frequenz der Restpopulation hatte (Hussein K et al, 2006). Daraus die selektiv mutierten Megakaryozyten als *primum agens* bei der ET abzuleiten, ist kritisch zu bewerten und wird mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie unwahrscheinlicher. Es ist durchaus möglich, dass einzelnen Fällen von ET die selektive Mutation der Megakaryozyten als Pathomechanismus zugrunde liegt, der Normalfall scheint es aber nicht zu sein.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse des mikrodisszezierten Materials fallen viele Fälle auf, bei denen die Frequenz mutierten Allels des gesamten Knochenmarks weder von den Megakaryozyten noch von der Restpopulation erreicht wird. Diese Abweichungen sind zwar in vielen Fällen klein und innerhalb der Genauigkeitsgrenzen der qPCR, es könnte aber auch ein Effekt der nach Mikrodissektion geringen DNA-Mengen vorliegen. Um dies auszuschließen, wurde unter anderem eine Mischung der DNA der beiden verwendeten Zelllinien hergestellt und diese in mehreren Schritten verdünnt, jedoch blieb die sich ergebende Mutationsfrequenz bis zu einem Ct-Wert von mindestens 31 nahezu konstant. In diesem Ct-Bereich liegt das mikrodisszezierte Material einiger Fälle, bei denen der beschriebene Abfall der Mutationsfrequenz beobachtet wurde. Weiterhin ist die DNA eines zufällig gewählten Falles vor dem Einsetzen in die qPCR mit demselben PCR-Programm wie in der *RealTime PCR* mit 15, 20, 25 oder 35 Zyklen vor dem qPCR-Lauf präamplifiziert worden sowie die DNA dieses Falles vor dem Einsatz in die qPCR zu ihrer Aufreinigung mit Phenol/Chloroform gefällt worden. Auch diese Versuche brachten jedoch keine nennenswerte Änderung der Ergebnisse.

Die Untersuchungen an den mutierten Fällen von OMF und PV ergaben ähnliche Ergebnisse. Bei drei der vier Fälle von OMF waren beide Populationen gleichermaßen mutiert, bei einem Fall die nicht-megakaryozytäre Population mit 64% in deutlich höherem Maße als die Megakaryozyten mit 35%.

Von den sieben Fällen mutierter PV zeigten sich bei sechs die Allelfrequenzen für Megakaryozyten und für die Restpopulation im selben Bereich. Nur in einem Fall (Nummer 56, Tabelle 14) waren die Megakaryozyten mit 50,5% Allelfrequenz für JAK2 V617F im Übergangsbereich von Hetero- zu Homozygotie, die Restpopulation mit 33,5% jedoch eindeutig heterozygot.

In der Zusammenschau unterstützen diese Ergebnisse das Modell, dass die JAK2-Mutation bei MPS auf einer frühen Stufe der Hämatopoese stattfindet und dass in den meisten Fällen alle myeloischen Zellen gleichermaßen betroffen sind. Dies steht in Einklang mit anderen Studien, welche die Mutation in hämatopoetischen Stammzellen, *common myeloid progenitors*, *granulocyte/macro-phage*

progenitors und *megakaryocyte/erythroid progenitors* finden konnten (Jamieson CH et al, 2006; Delhommeau F et al, 2007).

Je nach individuellem genetischen Hintergrund, chromosomalen Alterationen oder anderen Einflussfaktoren wie zum Beispiel der Tatsache, ob der Patient unter einer zytoreduktiven Therapie stand oder nicht, könnten in Einzelfällen verschiedene Populationen mit der Mutation in ihrer Proliferationsaktivität unterschiedlich beeinflusst sein. Dies kann der Grund dafür sein, dass in diesen Einzelfällen eine für die einzelnen Populationen unterschiedliche Mutationsfrequenz beobachtet wird. Mit der selektiven Untersuchung der Megakaryozyten lässt sich nicht beantworten, ob die JAK2-Mutation ursächlich für die Erkrankung ist oder ob andere Events vorausgehen. Ebenso gibt sie keine Antwort auf die Frage, ob die Mutation in einer myeloischen oder in einer gemischt lymphomyeloischen Stammzelle auftritt.

5.7. Selektive Mutationsanalyse lymphozytärer Zellen aus nodulären Infiltraten

Zur Beantwortung der letztgenannten Frage wurden in dieser Studie lymphozytäre Infiltrate selektioniert und auf die Mutation hin untersucht. Insgesamt erfüllten 14 Fälle die geforderten Voraussetzungen und ließen sich mit der qPCR sowohl am Material des kompletten Schnitts als auch am mikrodisszierten Material untersuchen.

Bei vier der 14 Fälle war weder im gesamten Mark noch in den Lymphozyten die Mutation festzustellen, so dass zehn Fälle verblieben, welche die Mutation im gesamten Knochenmark aufwiesen, darunter vier mit einem koexistenten NHL (siehe Tabelle 13). Bei den Lymphozyten von sieben dieser zehn Fälle wurde nur JAK2-Wildtyp festgestellt, in drei Fällen waren die Lymphozyten mit einer Allellast von 15%, 43% und 45% von der Mutation betroffen (Nummer 1,2,3, Tabelle 13). Bei einem dieser drei Fälle war das Ergebnis mit der AS-PCR bestätigt worden, während diese in den beiden anderen Fällen nicht anwendbar war. Es ist festzuhalten, dass die monoklonalen Infiltrate eines NHL in allen untersuchten Fällen nicht mutiert waren.

Dies bleibt als das erste wesentliche Teilergebnis dieses Abschnittes festzuhalten und steht in Einklang mit der Literatur, welche die Abwesenheit von JAK2 V617F sowohl bei Hodgkin- als auch Non-Hodgkin-Lymphomen beschreibt. (Levine RL et al, 2005a; McClure R et al, 2006; Steensma DP et al, 2006; Melzner I et al, 2006). Bei den beiden Entitäten *Primär Mediastinales B-Zell-Lymphom* und dem klassischen *Hodgkin-Lymphom* gibt es beispielsweise Hinweise für eine Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges und es lag nahe, eine Involvierung der JAK2-Mutation in deren Pathogenese anzunehmen, welche jedoch ausgeschlossen werden konnte (Gutter C et al, 2004; Melzner I et al, 2006). Die vorliegende Studie unterstreicht in der Zusammenschau mit der Literatur, dass JAK2 V617F keinen Einfluß auf die Krankheitsentstehung bei lymphatischen Malignomen hat. Eine andere Erklärung für die Aktivierung des JAK/STAT-Pathways ist kürzlich mit Mutationen in SOCS1 beschrieben worden, die deren hemmende Aktivität verringern (Weniger MA et al, 2006).

Das zweite wesentliche Resultat aus den dargestellten Ergebnissen ist, dass bei einigen Fällen von MPS auch die Lymphozyten Träger der Mutation sind. Von sechs Fällen mit nodulären lymphoiden Infiltraten ohne koexistentes NHL, bei denen die JAK2-Mutation an der aus dem gesamten Knochenmark extrahierten DNA nachgewiesen werden konnte, waren in drei Fällen (50%) ebenfalls die mikrodisezierten lymphoiden Infiltrate mutiert. Da nicht selektiv T- oder B-Zellen mikrodiseziert werden konnten, kann mit den Ergebnissen dieser Studie lediglich eine Aussage für die gesamte Lymphozytenpopulation getroffen werden.

Unabhängig von der Unterscheidung zwischen T- und B-Zellen unterstützt diese Beobachtung die Annahme, dass die JAK2-Mutation zumindest in einer Untergruppe der Patienten in einer gemischt lymphomyeloischen Vorläuferzelle auftritt. Dafür gab es zuletzt in der Literatur vermehrt Hinweise, wobei dort die Involvierung der B-Zellen in das Mutationsgeschehen meist deutlicher als die der T-Zellen war, jedoch für beide genauso wie für NK-Zellen gezeigt werden konnte (Bellanné-Chantelot C et al, 2006; Ishii T et al, 2006; Delhommeau F et al, 2007; Larsen TS et al, 2007). In den meisten Studien blieb die Mutationsfrequenz sowohl der B- als auch der T-Zellen hinter derjenigen der myeloischen Populationen zurück. Ein möglicher Grund hierfür ist kürzlich beschrieben worden. JAK-Kinasen brauchen zur vollen Entfaltung ihres Signalweges homodimere Typ I-Zytokinrezeptoren, die in Lymphozyten nicht vorkommen und deren Fehlen ein Grund für die geringere Proliferation der mutierten Lymphozyten im Vergleich zu anderen Zellen sein könnte (Lu X et al, 2005; Cazzola M et al, 2006). Eine weitere Erklärung könnte sein, dass ein Teil der zirkulierenden, langlebigen T-Zellen aus der Zeit vor dem Ereignis der Mutation stammt (Delhommeau F et al, 2007).

Auch ist festzustellen, dass diese drei Fälle mit mutierten Lymphozyten ein Abbild der drei klassischen MPS geben (je ein Fall von PV, ET und OMF). Diese Erkenntnis spricht gegen die Hypothese, dass bei den verschiedenen MPS die Mutation auf unterschiedlichen Stufen der Hämatopoese geschieht und legt nahe, dass andere Ereignisse die phänotypische Ausprägung bestimmen. Jedoch muss die Möglichkeit eingeräumt werden, dass JAK2 V617F verschiedene Subgruppen von hämatopoetischen Stammzellen betrifft, die sich in ihrem Transkriptionsmuster oder ihren Differenzierungskapazitäten unterscheiden. Tatsächlich wurden Unterschiede zwischen den Stammzellgruppen bei PV und OMF beobachtet (James C et al, 2008).

5.8. JAK2 V617F: Pathogenetische Rolle bei MPS und zukünftige Bedeutung in der Praxis

Mit der Entdeckung der Mutation von JAK2 V617F bei etwa 50% aller MPS gelang im Jahr 2005 ein entscheidender Durchbruch in der Erforschung der Pathogenese dieser Erkrankungen, der in Zukunft vielfältige Auswirkungen auf die Klassifikation, die Diagnostik und die Therapie der MPS haben wird. Ungeklärt sind bisher die Fragen, wie eine einzige Mutation drei verschiedene Krankheitsbilder zur Folge haben kann und wodurch die Krankheit bei den Patienten ohne die Mutation verursacht wird. Eine bisherige These zur Beantwortung der ersten Frage war, dass die Stufe der Hämatopoese, die von

der Mutation betroffen ist, die entscheidende Rolle spielt. Betrifft die Mutation nur die megakaryozytäre Linie, werden selektiv diese Zellen zu vermehrter Proliferation angeregt und es entsteht eine ET. Findet die Mutation in einer erythroiden Vorläuferzelle statt, kommt es zu einer PV. Dieses Konzept war unterstützt worden durch Studien, die tatsächlich die Mutation in einigen Fällen ausschließlich in der erythroiden Reihe bei PV respektive der megakaryozytären Reihe bei ET nachweisen konnten (Hussein K et al, 2006; Zehentner BK et al, 2006). Dagegen hatte jedoch die Erkenntnis gesprochen, dass alle myeloischen Zellreihen bei MPS eine klonale Hämatopoese aufwiesen (Adamson JW et al, 1976; Jacobson RJ et al, 1978; Fialkow PJ et al, 1981). In jüngerer Zeit mehrten sich die Hinweise auf das Vorkommen der Mutation auf früheren Stufen der Hämatopoese. Zunächst waren in einer großen Zahl der Fälle mutierte CD 34-positive Zellen entdeckt, dann auch die Mutation in Lymphozyten und in Kolonien von hämatopoetischen Vorläufern und von Stammzellen nachgewiesen worden (Lasho TL et al, 2005; Baxter EJ et al, 2005; Jamieson CH et al, 2006; Scott LM et al, 2006; Ishii T et al, 2006; Delhommeau F et al, 2007). Auch die vorliegende Studie unterstreicht die eher gleichförmige Involvierung verschiedener hämatopoetischer Reihen im Knochenmark in das Ereignis der JAK2-Mutation. Sie lässt mitunter beobachtete Unterschiede in der Allelfrequenz der einzelnen Subpopulationen als durch den genetischen Hintergrund oder durch andere modifizierende Faktoren bedingt erscheinen. Die Erkenntnisse schließen zwar nicht aus, dass die Mutation in einigen Fällen tatsächlich auf eine hämatopoetische Linie restringiert ist, lassen diese Fälle jedoch eher als Ausnahme erscheinen. Bevor auf die Frage eingegangen werden kann, wodurch festgelegt wird, welches MPS durch JAK2 V617F entsteht, wenn in den meisten Fällen die Mutation auf einer sehr frühen Stufe der Hämatopoese geschieht, muss zuerst diskutiert werden, ob die JAK2-Mutation für die Entstehung eines MPS hinreichend ist oder ob andere genetische Ereignisse mitbeteiligt sind.

Ein wichtiger Aspekt bei der Beantwortung dieser Frage sind Klonalitätsstudien. Diese hatten in einem nicht kleinen Teil der Patienten zu dem Resultat geführt, dass der Prozentsatz zirkulierender klonaler Zellen größer ist als der Prozentsatz JAK2-mutierter Zellen (Kralovics R et al, 2006; Rumi E et al, 2006; Levine RL et al, 2006; Kiladjian JJ et al, 2006). Teilweise wurde die Klonalitätsbestimmung hierbei mithilfe des Nachweises von del(20q) durchgeführt, was bei 5-10% der MPS auftritt (Bench AJ et al, 1998). Patienten mit einer solchen Deletion auf Chromosom 20q tragen fast alle JAK2 V617F, was als Hinweis für die eventuelle Existenz einer Kooperation genetischer Ereignisse gedeutet werden kann (Campbell et al, 2006b).

Unterstützt wird die Annahme eines der JAK-Mutation vorausgehenden Events durch die Tatsache, dass bei einigen Patienten von PV ohne die Mutation erythroide Kolonien in Abwesenheit von EPO wachsen konnten (Nussenzweig RH et al, 2007) und dass von Patienten mit einer PV JAK2-negative Vorläuferzellen isoliert wurden, welche ein doppelt so großes proliferatives Potential hatten als diejenigen von gesunden Kontrollen (Gaikwad A et al, 2007). Desweiteren zeigte sich in einer Studie,

die sich mit der ET beschäftigte, fast die Hälfte der untersuchten Fälle als klonal und zugleich JAK2-negativ (Antonioli E et al, 2005).

Außerdem legt die Existenz von familiären MPS, die innerhalb einer Generation mit und ohne JAK2 V617F vorkommen, nahe, dass ein anderer genetischer Prädispositionsfaktor oder gewissermaßen die Neigung zum Erwerb von JAK2 V617F vererbt wird (Cario H et al, 2005; Rumi E et al, 2006; Bellané-Chantelot C et al, 2006; Pardanani A et al, 2006a). Als letzter Hinweis auf die Existenz prädisponierender Ereignisse dient die Tatsache, dass die Tumorzellen einer aus einem MPS mit JAK2 V617F hervorgegangenen Leukämie oftmals die Mutation nicht mehr tragen (Jelinek J et al, 2005; Campbell PJ et al, 2006b, Theocharides A et al, 2007). Mesa et al halten eine pathogenetische Beteiligung der Mutation bei der leukämischen Transformation wegen der danach nicht wachsenden Mutationslast und des geringen Anteils von Post-MPS-AML-Patienten mit einer hohen Mutationslast für unwahrscheinlich (Mesa RA et al, 2006a). Dass ein der JAK2-Mutation vorausgehendes Event das MPS auch phänotypisch auslöst, erscheint unwahrscheinlich, da bisher kein Fall beschrieben wurde, der nach dem Auftreten von Symptomen von JAK2 WT zu JAK2 V617F übergegangen ist.

Die unmittelbare Schlussfolgerung aus diesen Beobachtungen wäre, dass die JAK2-Mutation nicht alleine ursächlich für ein MPS ist, sondern andere krankheitsinitiierende Ereignisse ihr vorausgehen oder folgen müssen, zum Beispiel eine Deletion auf Chromosom 20q. Dazu passt die Beobachtung, dass in wenigen Einzelfällen die JAK2-Mutation bereits Jahre vor der Krankheitsmanifestation geschah (Bellané-Chantelot C et al, 2008).

Mit diesem vorausgehenden Ereignis müsste die Zelle eine Neigung zum Erwerb der JAK-Mutation erhalten, da es anders schwer zu erklären wäre, dass in zusammengefasst etwa 50% der MPS diese Mutation auftritt, bei gesunden Kontrollen jedoch fast nie. Die Tatsache, dass fast alle Patienten mit einer Deletion auf Chromosom 20q auch die JAK2-Mutation aufweisen, ist eine dazu passende Feststellung. Die Reihenfolge von JAK2 V617F und del 20q ist dabei umkehrbar (Schaub FX et al, 2008).

Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die JAK2-Mutation mit einer genetischen Instabilität einhergeht und die betroffene Zelle anfälliger für genetische Ereignisse wie homologe Rekombinationen, Punktmutationen, Insertionen und Deletionen macht (Plo I et al, 2008). Jedoch sind auch JAK2-negative Fälle beobachtet worden, die mehrere Deletionen auf Chromosom 20q hatten (Schaub FX et al, 2008). Da diese Defekte selten und somit deren mehrmaliges Vorkommen bei einem Patienten unwahrscheinlich ist, lässt dies die Existenz von anderen zu genetischer Instabilität führenden Veränderungen nötig erscheinen.

Bei der Beurteilung des Ergebnisses einer Klonalitätsanalyse muss in die Überlegung einbezogen werden, dass die nicht-zufällige übermäßige Lyonisierung entweder des paternalen oder des maternalen X-Chromosoms einer altersabhängigen Variabilität unterliegt (Busque et al 1996). Je älter

der untersuchte Patient ist, desto eher wird der Anteil klonaler Zellen überschätzt, was möglicherweise der Ausdruck einer Stammzellepletion im Alter ist. Diese Tatsache ist besonders in myeloischen Zellreihen ausgeprägt (Gale RE et al, 1997). Es ist also durchaus möglich, dass bei den oft über 60-jährigen MPS-Patienten dieser Mechanismus zu dem beobachteten höheren Anteil klonaler als mutierter Zellen beitrug. Diese Diskrepanz bleibt jedoch auch in solchen Studien bestehen, die einen altersunabhängigen Marker für die Klonalitätsanalyse verwendeten (Kralovics R et al, 2006).

An anderer Stelle wird eine weitere Einschränkung von Klonalitätsstudien deutlich. In der Berechnung des Anteils klonaler Zellen wird vorausgesetzt, dass T-Zellen nicht in das Mutationsgeschehen involviert sind und sie den gleichen Anteil klonaler Zellen aufweisen wie Granulozyten. Beide Annahmen sind kritisch zu bewerten und können zu einer Überschätzung der klonalen Zellen beitragen (Campbell PJ et al, 2006b).

Wenn auch nicht bewiesen, ist es sehr nahe liegend, wegen des fast vollständigen Fehlens der Mutation bei gesunden Kontrollfällen, einen kausalen Zusammenhang zwischen der JAK2-Mutation und der MPS-Entstehung anzunehmen. Dies wird durch die bereits in der Einleitung dargelegte Ursächlichkeit von JAK2 V617F für die Aktivierung von Signalwegen, für das Erreichen eines EPO-hypersensitiven Zustands, für die Fähigkeit zur EPO-unabhängigen Bildung von erythroiden Kolonien sowie für das vermehrte Proliferationsvermögen in verschiedenen Zelllinien und besonders durch die beschriebenen Mausmodelle unterstützt. Dazu ist beschrieben worden, dass JAK2 V617F sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung hämatopoetischer Zellen anregt (Dupont S et al, 2007). Es mag mitunter Fälle geben, die durch andere Mechanismen entstanden sind. Warum diese Fälle im Verlauf ebenso JAK2 V617F entwickeln, ist nicht bekannt.

Ein alternatives pathogenetisches Modell könnte sein, dass zunächst eine heterozygote JAK2-Mutation auftritt, mit der das MPS entsteht, und dass durch die nun gesteigerte proliferative Aktivität und eine gewisse genetische Instabilität vermehrt chromosomale Alterationen entstehen. So könnte bei einer Mitose dasjenige Chromosom mit JAK2 WT zum Beispiel die besagte Deletion auf Chromosom 20q erleiden und daraufhin die entstehende Tochterzelle stärker in ihrer proliferativen Tätigkeit aktiviert sein als der andere Klon mit der JAK2-Mutation aber ohne del(20q). Dieser würde in einem solchen Fall von dem neuen Klon mit del(20q) verdrängt werden. Die Tatsache, dass fast alle Fälle mit del(20q) auch die JAK2-Mutation tragen, kann für eine bevorzugte Entwicklung dieser Aberration bei JAK2-mutierten Fällen sprechen.

Der Prozess ist aber auch andersherum vorstellbar: zuerst eine andere genetische Alteration, danach ebenso bedingt durch die gesteigerte proliferative Aktivität die Mutation in JAK2. Homozygotie von JAK2 V617F kann durch mitotische Rekombination in beiden Fällen entstehen (siehe Abbildung 15).

Für die Umkehrbarkeit des Prozesses spricht die kürzlich gemachte Beobachtung, dass in einigen Fällen die Deletion auf Chromosom 20q vor der JAK2 V617F-Mutation auftritt, in einigen Fällen danach. Es wird damit unwahrscheinlich, dass eine von diesen beiden genetischen Alterationen prädisponierend für die andere ist und als erste auftreten muss (Schaub FX et al, 2008).

Die Frage, wie MPS ohne die JAK2-Mutation entstehen können, scheint durch die Entdeckung von anderen Mutationen mehr und mehr beantwortet zu werden. Bei Patienten mit PV ohne JAK2 V617F wurden mindestens acht verschiedene Mutationen in Exon 12 des Gens für JAK2 gefunden. Die Patienten mit diesen Mutationen weisen mit einer isolierten Erythrozytose einen im Vergleich zu den JAK2 V617F-PV etwas unterschiedlichen Phänotyp auf, teilen aber auch einige Merkmale wie einen niedrigen EPO-Spiegel, die Wachstumsfaktorunabhängigkeit der hämatopoietischen Zellen oder die Aktivierung des STAT-Signalweges mit ihnen. Auch bei diesen Exon 12-Mutationen ist eine Induzierbarkeit des MPS durch retrovirale Transfektion mutierter DNA in Mausknorpelzellen gezeigt (Scott LM et al, 2007; Pietra D et al, 2008).

Ausserdem wurden Mutationen im Thrombopoietinrezeptor Mpl an Aminosäureposition 515 beschrieben, die entweder zum Austausch W515K oder W515L führen (Pardanani A et al, 2006b; Lasho TL et al, 2006; Pikman Y et al, 2006). Eine dieser Mutationen findet sich bei etwa fünf Prozent der Fälle von OMF und bei einem Prozent der Fälle von ET. Bei der PV ist sie bisher nicht beschrieben worden. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte das Fehlen einer Mpl-Expression auf Thrombozyten und Megakaryozyten mit einer hohen Thrombozytose in Verbindung gebracht werden (Tiedt R et al, 2008a). Dies könnte die Wirkung der Mpl-Mutation erklären. Generell können solche anderen Mutationen die Existenz von zwar klonalen, aber JAK2-negativen Fällen erklären.

Bemerkenswerterweise gibt es Fälle, die sowohl Mpl W515K/L als auch JAK2 V617F tragen. Lasho et al haben drei solche Fälle beschrieben (alle OMF), die eine im zeitlichen Verlauf über mehrere Jahre zwar nicht konstante Mutationslast der Mpl-Mutation, jedoch eine beständig höhere als die JAK2-Mutation, aufweisen. Dagegen hatten in derselben Studie zwei Fälle von ET nur eine geringe Mpl-Mutationslast (Lasho TL et al, 2006).

Nach diesen Beobachtungen ist es möglich, dass die Mutationslast den Phänotyp bestimmt. Je höher der Anteil von MPL W515K/L an der Gesamt-DNA ist, desto mehr verändert sich das klinische Bild von der ET zur OMF. Die in der Einleitung dargestellte oftmals schwierige histologische Unterscheidung zwischen diesen beiden Entitäten passt in dieses Bild. Dennoch kann diese Annahme für die Mpl-Mutation wegen der wenigen untersuchten Fälle nur eine Vermutung sein und bedarf der Bestätigung beziehungsweise der Widerlegung durch größere Studien.

Im Vergleich zu Patienten mit der Mutation JAK2 V617F haben Patienten mit Mpl-Mutationen eine geringere Hämoglobinkonzentration und höhere Thrombozytenzahlen (Beer PA et al, 2008). Der Transfusionsbedarf bei OMF-Patienten mit Mpl-Mutationen ist höher als bei Patienten mit der JAK-Mutation (Guglielmelli P et al, 2007). Desweiteren können Zellen von Patienten mit Mpl-Mutationen zwar endogene megakaryozytäre, jedoch keine erythrozytären Kolonien bilden. All dies deutet auf eine stärkere Aktivierung der thrombozytären und eine schwächere Aktivierung der erythrozytären Reihe als durch JAK2 V617F hin. Wie dies bei zwei Mutationen, die im gleichen Signalweg liegen, erklärt werden kann ist unklar.

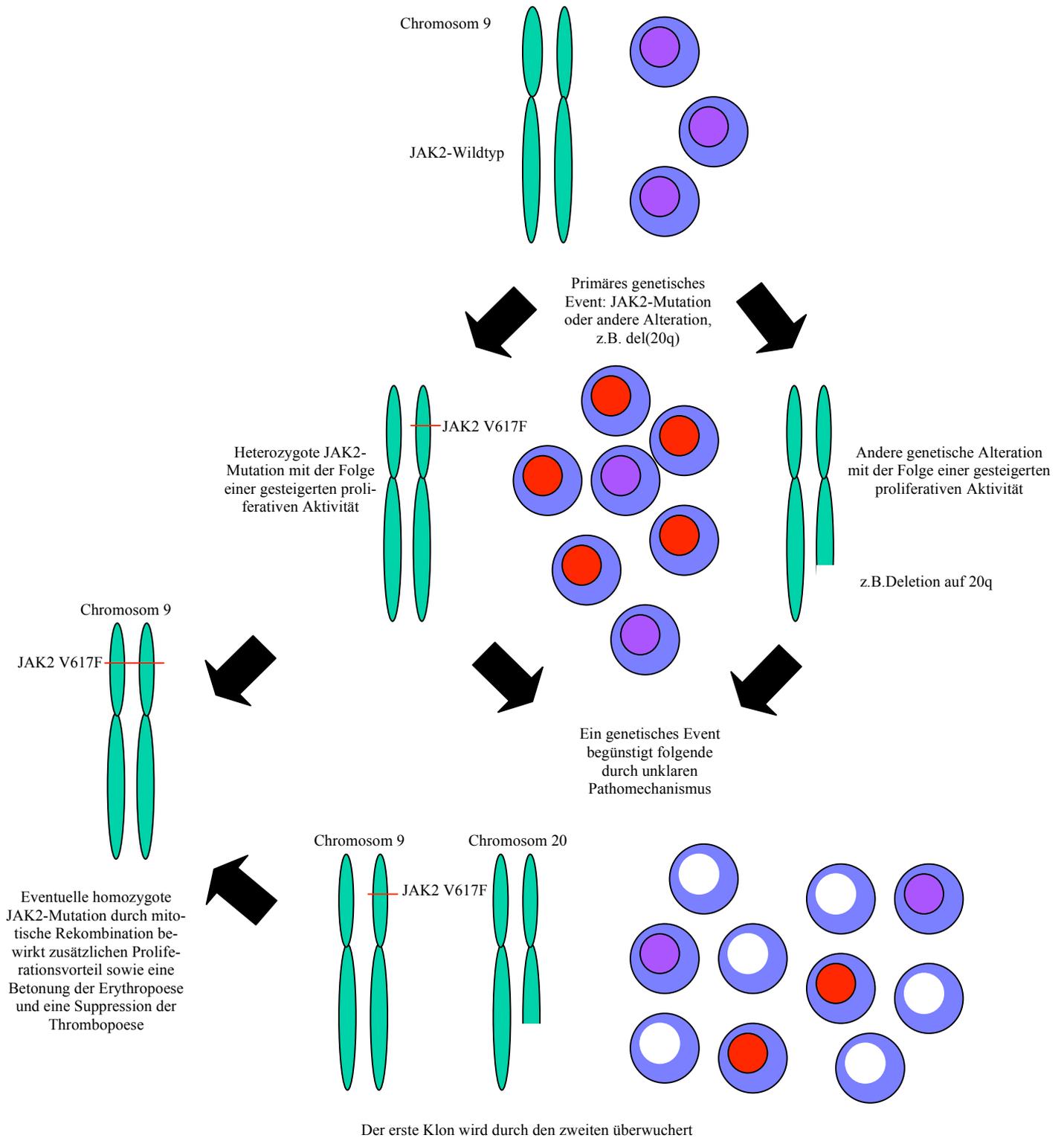


Abbildung 15: Pathogenetisches Modell der MPS (Erläuterungen im Freitext)

Es gibt noch immer zahlreiche MPS-Patienten, bei denen bisher keine genetische Alteration bekannt ist. Auf der anderen Seite konnten schon andere naheliegende Alterationen ausgeschlossen werden, wie etwa eine Mutation des EPO-Rezeptors bei PV (Mittelman M et al, 1996).

Es ist wahrscheinlich, dass nicht bei allen JAK2 V617F-negativen Patienten eine genetische Alteration vorliegt, die den STAT-Signalweg aktiviert. Denn eine Arbeit konnte eine geringere Expression der JAK-STAT-Zielgene Pim-1 und SOCS-2 bei JAK-2 negativen ET nachweisen (Schwemmers S et al, 2007).

Bei Mäusen konnte eine Mutation einer Phosphatase nachgewiesen werden, die zu deren Fehlfunktion führte. Solche Mäuse entwickelten ebenfalls ein MPS (Tsui HW et al, 1993).

Anders als bei den Mpl-Mutationen ist bei der JAK2-Mutation eine sogenannte Dosishypothese besser begründet. Dieses Modell besagt, dass ein Kontinuum zwischen ET und PV existiert. Je höher die JAK-2-Mutationslast ist, desto PV-betonter wird der Phänotyp (Campbell PJ et al, 2006b). Dass bei der PV in deutlich mehr Fällen als bei der ET homozygot mutierte Patienten vorkommen und damit bei der PV im Mittel eine höhere Mutationslast besteht als bei der ET, war in zahlreichen Studien, unter anderem auch in der vorliegenden, zweifellos gezeigt worden (siehe Einleitung). Außerdem fand sich in einigen Studien eine Assoziation zwischen der Gendosis des mutierten Allels und einem PV-gewichteten Phänotyp (Tefferi A et al, 2005c; James C et al, 2005; Mesa RA et al, 2006b; Vannucchi AM et al, 2007b; Tefferi A et al, 2007a).

Weiterhin konnten in über 90% der Fälle mit PV homozygot mutierte hämatopoetische Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Dies ist ein deutlich höherer Anteil als der an zirkulierenden Granulozyten beobachtete von etwa 30%. Bei der ET waren dagegen in keinem Fall solche homozygoten Vorläufer gefunden worden (Scott LM et al, 2006). Ebenso passt die Tatsache in das Gesamtbild, dass das Vorhandensein von JAK2 V617F eng mit einer Überexpression von PRV-1 und der Fähigkeit der Zellen zur unabhängigen Bildung von endogenen erythroiden Kolonien, jedoch nicht mit der Höhe der Expression des Thrombopoietinrezeptors Mpl korreliert (Goerttler PS et al, 2005a). Die MPS-Fälle in dieser Studie wurden nämlich nicht auf die JAK2 V617F-Allellast, sondern lediglich auf das Vorhandensein der Mutation untersucht. Alle mutierten Fälle wurden als eine Gruppe, unabhängig vom Zygotiestatus, mit der Höhe der Mpl-Expression korreliert. Es könnte sein, dass die fehlende Trennung zwischen hetero- und homozygot mutiert eine Korrelation des Mutationsstatus mit der Mpl-Expression verwischt. Das könnte bedeuten, dass unabhängig von der Allellast das Vorhandensein der JAK2-Mutation in einer bestimmten Zellpopulation mit der Fähigkeit zur EEC-Bildung und der Überexpression von PRV-1 einhergeht, die Höhe der Mpl-Expression jedoch invers von der JAK2 V617F-Allellast abhängt. Bei der gegebenen hohen Expression von Mpl auf megakaryozytären Vorläuferzellen reichte eine geringe Dosis von JAK2 V617F zu deren Aktivierung aus, wohingegen für den auf erythroiden Vorläuferzellen gering exprimierten EPO-Rezeptor eine hohe Dosis nötig wäre (James C et al, 2008).

Es könnte also sein, dass lediglich die Tatsache, ob in einer heterozygot mutierten Zelle eine mitotische Rekombination stattfindet und die Zelle somit Ausgangspunkt eines homozygoten Subklons werden kann, der die übrigen Zellen überwuchert, darüber bestimmt, ob der betreffende Patient eine PV entwickelt oder eine ET. Für den Fall der ET bliebe diese mitotische Rekombination aus (Campbell PJ et al, 2006d). Der Ausgangspunkt für diese Überlegungen war die Beobachtung, dass ET-Patienten mit der JAK2-Mutation sich in vielerlei Hinsicht von jenen ohne die JAK2-Mutation unterschieden. Sie zeigten unter anderem mit einer stärker betonten Granulo- und Erythropoese einen eher PV-ähnlichen Phänotyp (Campbell PJ et al, 2005; Finazzi G et al, 2007). Außerdem steigt der Anteil der Patienten mit ET, deren Zellen endogene erythrozytäre Kolonien bildeten, proportional zur Allellast (Antonioli E et al, 2008). In diesem Zusammenhang ist eine vor der JAK2-Ära aufgefallene Erkenntnis sehr interessant: es hatten zwei Typen von ET anhand ihres PRV-1-Expressionsmusters unterschieden werden können (Griesshammer M et al, 2004). Die Annahme liegt nahe, dass die Gruppe mit hoher Expression sich aus den mutierten Fällen zusammensetzte.

Die These, dass die Allellast von JAK2 V617F den Phänotyp beeinflusst, wird durch genetische Expressionsstudien unterstützt. Diese zeigen, dass die Expression von 16 verschiedenen Genen, darunter PRV-1 und NF-E2, von denen schon bekannt war, dass ihre mRNA-Konzentrationen bei der PV erhöht sind, mit dem Mutationsstatus variieren (Goertler PS et al, 2005b; Kralovics R et al, 2005b; Vannucchi AM et al, 2006a; Dupont S et al, 2007).

Entscheidend ist, dass mitunter ein gradueller Anstieg der Expressionshöhe dieser Gene mit der Mutationslast beobachtet wurde, wenn auch nur für zwei Gene der Unterschied zwischen hetero- und homozygot statistisch signifikant war. Eines der Gene, ANKRD15, verhielt sich kontrovers: es wurde mit zunehmender Mutationslast geringer exprimiert (Kralovics R et al, 2005b).

Diese Abhängigkeit der Genexpression von der Allellast von JAK2 V617F findet in Mausmodellen ihr in vivo-Korrelat. In diesen Modellen ließ sich eine inverse Korrelation zwischen der Gendosis von JAK2 V617F und der Thrombozytenzahl zeigen (Lacout C et al, 2006). Zwei neuere Modelle von transgenen Mäusen, die etwa eine Allellast von 30% beziehungsweise von 60% hatten, zeigten ebenso eine Assoziation der geringeren Allellast mit einem ET-ähnlichen Phänotyp. Umgekehrt war bei den transgenen Mausmodellen eine höhere Allellast mit einem PV-ähnlichen Phänotyp assoziiert. (Tiedt R et al, 2008b; Xing S et al, 2008; Shide K et al, 2008). Dabei scheinen interindividuelle genetisch determinierte Abweichungen der Auswirkungen von JAK2 V617F auf den Phänotyp zu existieren, wie die Untersuchung von sechs verschiedenen Mausstämmen zeigte, die sich nach der Transplantation unterschiedlich entwickelten (Wernig G et al, 2006). Auch wirkte sich die Mutation bei manchen Zelllinien phänotypisch stärker aus als bei anderen, was als zusätzliches Indiz für den individuellen genetischen Phänotyp als Modifier der Wirkung von JAK2 V617F gesehen werden kann (Kralovics R et al, 2005a). Passend dazu sind Einzelnukleotidpolymorphismen von JAK2 beschrieben, die mit einem PV-ähnlichen Phänotyp einhergehen (Pardanani A et al, 2008b).

Außerdem wird die Aktivität von JAK2 durch den Rezeptorbesatz einer Zelle beeinflusst, beispielsweise brauchen BAF-3-Zellen den EPO-Rezeptor für ein optimales Signalisieren (Walz C et al, 2006; Lu X et al, 2005).

Eine mögliche Erklärung der Dosishypothese auf zellulärer Ebene liegt darin, dass in einer heterozygot mutierten Zelle sowohl normales als auch konstitutiv aktiviertes Protein vorkommt. Es ist gezeigt worden, dass das Vorhandensein von normalem JAK2 die Wachstumsfaktorabhängigkeit wieder herstellt und damit die Aktivität des mutierten Proteins herabsetzt (James C et al, 2005). Die Abhängigkeit des JAK2-Signals von homodimeren Typ1-Zytokinrezeptoren ist bereits erwähnt worden, zudem könnte das Mengenverhältnis von JAK2 zum Rezeptor relevant sein, da es sowohl das Trafficking als auch das Signaling des Rezeptors beeinflusst.

Es ist möglich, dass je nach Zellart verschiedene Einflüsse auf die JAK-Kaskade hinzukommen. So könnte ein granulozytärer oder erythrozytärer Vorläufer durch den heterozygot mutierten Zustand stärker in seiner Proliferationsfähigkeit eingeschränkt werden als ein megakaryozytärer Vorläufer oder der Signalweg über Mpl durch die heterozygote Mutation mehr als durch die homozygote bevorzugt werden. Das Resultat wäre ein ET-ähnliches Krankheitsbild. Im homozygot mutierten Zustand wäre die Proliferationsbremse entfernt und das Vollbild der PV könnte sich entwickeln.

Die Entdeckung der Mutation JAK2 V617F hat weitreichenden Einfluß auf die Klassifikation, die Diagnosestellung und eventuell in naher Zukunft auch auf die Therapie der myeloproliferativen Syndrome. Es lassen sich wie bereits geschildert durch den Nachweis der Mutation zwei Subgruppen der ET unterscheiden. Die Gruppe mit der Mutation ähnelt klinisch der PV und legt die Existenz eines Kontinuums nahe, das sich zwischen der mutierten ET und der PV aufspannt. Die Abgrenzung zu den nicht mutierten ET wird dadurch verdeutlicht, dass in einer Untersuchung von 50 solchen Fällen über mehr als sechs Jahre keiner die Mutation entwickelte. Somit wird die Annahme einer frühen „Prä-Mutations-ET“ unwahrscheinlich (Campbell PJ et al, 2006b). Weiterhin sind die histologisch sehr ähnlichen Entitäten ET und frühe OMF auch in der Häufigkeit des Auftretens der Mutation nicht verschieden, was eine Trennung dieser beiden zumindest teilweise artefiziell erscheinen lässt.

Vor diesem Hintergrund wurde die 2008 veröffentlichte neue WHO-Klassifikation der myeloproliferativen Syndrome erstellt, welche die Mutation JAK2 V617F als diagnostisches Kriterium aufnimmt. Dadurch konnte die Thrombozytenzahl, die für die Diagnose einer ET gefordert wird, von 600000/ μ l auf 450000/ μ l gesenkt werden (Swerdlow SH et al, 2008).

Weiterhin ist zur WHO-Klassifikation von 2008 anzumerken, dass die in der Version von 2001 eingeführte Kategorie mit Syndromen, die eine Zwischenstellung zwischen MDS und MPS einnehmen (siehe Kapitel 1.2.), durch die Entdeckung der JAK2-Mutation gestützt wird. Denn die Mehrzahl der Patienten mit einer RARS mit koexistenter Thrombozytose, die in der WHO-Klassifikation zu diesen Zwischensyndromen wird, trägt die Mutation, während sie sich bei RARS-Patienten ohne Thrombozytose, die zu den MDS zählen, bisher nicht nachweisen ließ (Gattermann N et al, 2007).

Außerdem trennt die JAK2-Mutation die MDS von den MPS ab, da bei ersteren die Mutation fast nie zu finden ist.

Wie bereits dargestellt ist die prognostische Aussagekraft des Nachweises der JAK2-Mutation kontrovers diskutiert und somit eher begrenzt (Tefferi A et al, 2005b; Wolanskyi AP et al, 2005; Campbell PJ et al, 2006a, 2006b; Ohyashiki K et al, 2007; Gangat N et al, 2007) Bei der Diagnosestellung eines MPS kommt ihr jedoch eine große Bedeutung zu. Beispielsweise ist der Nachweis von JAK2 V617F in Verbindung mit einem erhöhten Hämatokritwert diagnostisch für eine PV (Michiels JJ et al, 2007).

Als besonders hilfreich erweist sich der Mutationstest, wenn durch eine Erhöhung des Hämatokritwertes ein klinischer Verdacht auf eine PV besteht. Kommt zu diesem Verdacht ein positiver Mutationstest, ergibt sich für die Diagnose einer PV eine Sensitivität von 95% und eine Spezifität von 100% (Michiels JJ et al, 2007).

Ein negativer Mutationstest macht die Diagnose einer PV sehr unwahrscheinlich, in Verbindung mit normalen EPO-Werten ist sie ausgeschlossen. Ein Mutationsscreening zur Diagnose einer ET oder OMF hat keine vergleichbare Aussagekraft, da sowohl die Spezifität als auch der prädiktive Wert eines negativen Testergebnisses geringer sind (Tefferi A, 2006).

Da die Mutation, wie weiter oben dargelegt, in einem sehr geringen Prozentsatz auch in einer gesunden Population vorzukommen scheint, ist ein breit angelegtes Screening ohne klinischen Verdacht nicht angebracht.

Auch für die Therapie der MPS ist die Entdeckung von JAK2 V617F ein Meilenstein. Auf der einen Seite kann der Erfolg traditioneller Therapien in Abhängigkeit vom Mutationsstatus beurteilt werden. So zeigte sich in einer Post-hoc-Analyse ein erhöhtes Risiko mutierter Patienten für die Entwicklung einer Thrombose während der Gabe von Anagrelid (Campbell PJ et al, 2005) und ein besseres Ansprechen auf Hydroxyharnstoff mit einer hohen Allellast (Sirhan S et al, 2008).

Auf der anderen Seite besteht die Hoffnung, durch die spezifische Hemmung von JAK2 den dauerhaft bestehenden Proliferationsreiz von der Zelle zu nehmen und so den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen.

Es existieren zahlreiche Studien mit verschiedenen Inhibitorsubstanzen. Bereits vor der JAK2 V617F-Ära wurden erfolgreich Studien mit JAK2-Inhibitoren durchgeführt, da man sich unter anderem eine Hemmung des Wachstums IL 6-abhängiger Myelomzellen erhoffte, deren Signalweg ebenfalls über JAK 2 führt (DeVos J et al, 2000). Zum Beispiel existierten mit Tyrphostin AG 490 und seiner Folgesubstanz 1,2,3,4,5,6-Hexabromcyclohexan bereits vor der JAK2 V617F-Ära JAK2-Inhibitoren, die sowohl in vitro als auch in vivo das Wachstum maligner Zellen verschiedener Tumore zu bremsen beziehungsweise deren Apoptose anzuregen schienen. (Sandberg EM et al, 2004; 2005).

Nach der Entdeckung der Mutation wuchs das Interesse der Wissenschaft an spezifischeren, oral verfügbaren JAK2-Inhibitoren weiter und dessen strukturelle Voraussetzungen wurden vorgestellt (Lucet IS et al, 2006). Mit dem Molekül TG 101209 wurde eine Möglichkeit sowohl der Hemmung

von JAK2 V617F als auch MPLW515K/L gezeigt (Pardanani A et al, 2007). Zahlreiche präklinische Studien hatten sowohl bei Versuchen mit Zellen (Dobrzanski P et al, 2006; Pardanani A et al, 2007; Li Z et al, 2007) als auch im Mausmodell (Zaleskas VM et al, 2006; Pardanani A et al, 2007) eine gute Wirkung zeigen können. Die ersten Phase-I/II-Studien an Patienten mit Myelofibrose berichteten über gute Symptomlinderung am Menschen mit einem akzeptablen Nebenwirkungsprofil (Levine RL et al, 2008b).

Die Allellast von JAK2 V617F könnte dabei ein Mittel sein, um den Erfolg einer wie auch immer gearteten Therapie zu bemessen (Jones AV et al, 2006; Kiladjian JJ et al, 2006a; Kroger N et al, 2007).

6. Zusammenfassung

Mit der Entdeckung der Mutation V617F im Gen der Tyrosinkinase JAK2 war im April 2005 ein entscheidender Durchbruch in der Aufklärung der Pathogenese der bcr-abl-negativen myeloproliferativen Syndrome PV, ET und OMF gelungen. Diese Mutation konnte bei etwa 70% aller Patienten, bei der PV bei nahezu 100% nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie wird gezeigt, dass der Mutationsnachweis auch an EDTA-entkalkten, formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Knochenmarksbiopsien durchführbar ist, wohingegen vorausgegangene Studien Zellen des peripheren Blutes untersucht hatten. Mit einer allelspezifischen PCR gelang die Untersuchung auf die JAK2-Mutation in 222 von 241 Biopsien (92,1%). Insgesamt wurden 133 Fälle von MPS untersucht, die Mutation konnte mit einer allelspezifischen PCR bei 99 Fällen nachgewiesen werden (74,4%).

In 39 Fällen von MDS oder AML konnte die Mutation in keinem Fall gezeigt werden, ebenso wenig in 15 Fällen mit reaktiver Myeloproliferation, 14 Fällen von ITP und 19 normalen Kontrollen.

Das bereits in der Literatur vorbeschriebene häufigere Vorkommen der Mutation bei der PV konnte in dieser Studie bestätigt werden. 96% der PV waren mutiert, dagegen nur 77% der ET und 62% der OMF. Die Häufigkeiten bei OMF und ET sind größer als die zuvor am peripheren Blut beschriebenen, wofür die Verwendung von Knochenmarksbiopsaten zur Untersuchung sowie eine strikte Diagnosestellung Gründe sein können.

Die Durchführbarkeit der Mutationsanalyse eröffnet die Möglichkeit, die große Zahl von archivierten Knochenmarksbiopsien für wissenschaftliche und diagnostische Zwecke zu nutzen. Eine Korrelation des Mutationsstatus mit klinischen Daten sowie die Beobachtung des Mutationsstatus über die Zeit bei 79 Fällen ergab einige nicht signifikante Trends. Die Leukozytenzahlen bei der PV waren mit größerer Mutationslast höher, das Hämoglobin dagegen geringer. Mutierte Fälle von ET hatten mehr Thrombozyten als nicht mutierte und bei der OMF stieg mit steigender Mutationslast die Hämoglobinkonzentration.

Für den Mutationsnachweis wurden unterschiedliche Strategien eingesetzt, von denen drei eine Quantifizierung der Allellast ermöglichten. Eine allelspezifische PCR-Methodik erwies sich als am besten geeignete Screeningmethode. Die Ergebnisse einer *Nested PCR* mit anschließendem Restriktionsenzymverdau zeigten bei der PV eine höhere Mutationslast als bei der ET, bei der kein homozygot mutierter Fall gefunden werden konnte. Bei der OMF gab es sowohl homozygot als auch heterozygot mutierte und negative Fälle. Die genaueste Quantifizierung erlaubte eine allelspezifische quantitative Real-time PCR, mit der 69 von 76 Fällen erfolgreich untersucht wurden. Hier lag bei der PV die Allellast der untersuchten mutierten Fälle bei durchschnittlich 57% (n=6), bei der OMF bei 44% (n=4) und bei der ET bei 28% (n=21).

Eine Korrelation der immunhistochemisch nachgewiesenen Expression von bFGF, einem Wachstumsfaktor, der mit der Entstehung einer Knochenmarksfibrose in Verbindung gebracht wird,

mit dem Mutationsstatus von 64 MPS brachte kein Ergebnis, da eine bFGF-Expression in der überwiegenden Mehrheit der MPS nachgewiesen werden konnte.

Die Feststellungen, dass der Anteil mutierten Allels bei der ET vergleichsweise gering ist, und dass die in dieser Studie gefundene Häufigkeit der Mutation bei ET größer war als in vorgehenden Untersuchungen am peripheren Blut, gab Anlass zu Folgeuntersuchungen mit der zugrunde liegenden Hypothese, dass die Megakaryozyten bei der ET diejenigen Zellen sind, die vorwiegend oder alleinig von der Mutation betroffen sind. Sie sind im peripheren Blut nämlich nur selten vorhanden.

Diese Hypothese wurde widerlegt, indem mittels lasergestützter Mikrodissektion der Mutationsstatus von Megakaryozyten mit dem von nicht-megakaryozytären Zellen verglichen wurde. Nach der erfolgreichen Analyse von 21 mutierten ET ergaben sich durchschnittliche Prozentsätze mutierten Allels von 25,2% bei den Megakaryozyten und 24,4% bei den nicht-megakaryozytären Zellpopulationen.

In 14 Fällen wurden Lymphozyten eines Knochenmarkinfiltrates selektiv mikrodisseziert und auf das Vorhandensein der Mutation untersucht. Bei sechs Fällen waren die untersuchten Lymphozyten Teil eines malignen Infiltrates eines koexistenten NHL. In allen diesen Fällen waren die untersuchten Lymphozyten nicht mutiert. Somit ergab sich kein Anhalt für die Involvierung von JAK2 V617F in die Pathogenese dieser NHL. Bei drei der acht übrigen Fälle ließ sich die Mutation in Lymphozyten nachweisen, was zumindest für einen Teil aller MPS eine pluripotente hämatopoetische Vorläuferzelle als Ort des Mutationsgeschehens identifizierte.

Die Ergebnisse dieser Studie stehen in Kontrast zu der Hypothese, dass es bei Vorliegen der Mutation von der Art der betroffenen Zellreihe abhängt, welcher Phänotyp sich entwickelt. Vielmehr wird die sogenannte Dosishypothese unterstützt. Diese besagt, dass die Mutationslast den Phänotyp prädestiniert, jedoch vielfältige Einflussfaktoren wie der individuelle genetische Hintergrund und das Zytokinmilieu berücksichtigt werden müssen. Diese These lässt die MPS als ein von der Mutationslast aufgespanntes Krankheitskontinuum erscheinen, an dessen Ende mit niedriger Mutationslast die ET, am anderen Ende mit einer hohen Mutationslast die PV steht.

Nicht geklärt wird in dieser Arbeit die Pathogenese der JAK2-Wildtyp-MPS sowie die Beobachtung, dass in manchen Fällen ein höherer Anteil klonaler als mutierter Zellen beobachtet wurde. Während die erste Frage durch die Entdeckung anderer Mutationen wie MPL 515K/L nach und nach beantwortet zu werden scheint, lässt die zweite Frage unterschiedliche Schlüsse zu, welche in dieser Arbeit diskutiert werden.

Die Entdeckung der Mutation JAK2 V617F revolutionierte das Verständnis der MPS. In der neuen WHO-Klassifikation von 2008 erscheint sie als diagnostisches Kriterium und veränderte die Klassifikation der MPS. Für die diagnostische Routine bleibt festzuhalten, dass der Nachweis der Mutation in Verbindung mit erhöhten Blutzellzahlen ein MPS sehr wahrscheinlich macht. Für die Therapie erhofft man sich eine Linderung der Symptomatik und des Fortschreitens der Erkrankung mithilfe spezifischer JAK2-Inhibitoren vergleichbar mit Imatinib bei der CML sowie ein Monitoring des Therapieerfolges mithilfe der Bestimmung der Mutationslast.

7. Literaturverzeichnis

- Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 1976;295(17):913-6.
- Anger B, Janssen JW, Schrezenmeier H, Hehlmann R, Heimpel H, Bartram CR. Clonal analysis of chronic myeloproliferative disorders using X-linked DNA polymorphisms. *Leukemia*. 1990; 4(4): 258-61.
- Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005; 19(10): 1847-9.
- Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, Ponziani V, Tozzi L, Pieri L, Santini V, Bosi A, Vannucchi AM; Myeloproliferative Disorders Research Consortium (MPD-RC). Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythaemia. *Haematologica* 2008; 93(1): 41-8.
- Argetsinger LS, Kouadio JL, Steen H, Stensballe A, Jensen ON, Carter-Su C. Autophosphorylation of JAK2 on tyrosines 221 and 570 regulates its activity. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(11): 4955-67.
- Aster JC. Diseases of White Blood Cells, Lymph Nodes, Spleen and Thymus, in: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Pathologic Basis of Disease*, Elsevier Verlag, Philadelphia 2005, 7. Auflage, 661-709.
- Barbui T. The leukemia controversy in myeloproliferative disorders: is it a natural progression of disease, a secondary sequela of therapy, or a combination of both? *Semin Hematol* 2004; 41(2 Suppl 3): 15-7.
- Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Massa M, Rosti V, Campanelli R, Villani L, Viarengo G, Gattoni E, Gerli G, Specchia G, Tinelli C, Rambaldi A, Barbui T; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Italian Registry of Myelofibrosis. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 2007; 110: 4030–4036.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR, Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365(9464): 1054-6. [Erratum, *Lancet* 2005;366:122.]
- Bellanné-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, Delhommeau F, Casadevall N, Vainchenker W, Thomas G, Najman A. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 108(1):346-52.
- Bellanné-Chantelot C, Jego P, Lionne-Huyghe P, Tulliez M, Najman A; French group on myeloliferative disorders. The JAK2(V617F) mutation may be present several years before the occurrence of overt myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2008; 22(2):450-1.
- Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Baillieres Clin Haematol* 1998; 11(4):819-48.
- Bench AJ, Nacheva EP, Hood TL, Holden JL, French L, Swanton S, Champion KM, Li J, Whittaker P, Stavrides G, Hunt AR, Huntly BJ, Campbell LJ, Bentley DR, Deloukas P, Green AR. . Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identification of candidate genes. *Oncogene* 2000; 19(34):3902-13.
- Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008; 112(1):141-9.
- Bercovich D, Ganmore I, Scott LM, Wainreb G, Birger Y, Elimelech A, Shochat C, Cazzaniga G, Biondi A, Basso G, Cario G, Schrappe M, Stanulla M, Strehl S, Haas OA, Mann G, Binder

- V, Borkhardt A, Kempinski H, Trka J, Bielorei B, Avigad S, Stark B, Smith O, Dastugue N, Bourquin JP, Tal NB, Green AR, Izraeli S. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet* 2008; 372(9648):1484-92.
- Bock O, Schlué J, Lehmann U, von Wasielewski R, Länger F, Kreipe H. Megakaryocytes from chronic myeloproliferative disorders show enhanced nuclear bFGF expression. *Blood* 2002; 100(6): 2274-5.
 - Böttcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signalling during early vertebrate development. *Endocr Rev.* 2005; 26(1):63-77.
 - Büttner C, Henz BM, Welker P, Sepp NT, Grabbe J. Identification of activating c-kit mutations in adult-, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: a possible explanation for divergent clinical behavior. *J Invest Dermatol.* 1998; 111(6):1227-31.
 - Bumm TG, Elsea C, Wood LG. JAK2 V617F mutation induces a myeloproliferative disorder in mice. *Blood* 2005;106: A116.
 - Buschle M, Janssen JW, Drexler H, Lyons J, Anger B, Bartram CR. Evidence for pluripotent stem cell origin of idiopathic myelofibrosis: clonal analysis of a case characterized by a N-ras gene mutation. *Leukemia* 1988; 2(10):658-60.
 - Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, Maragh M, Gilliland DG. Nonrandom X-Inactivation Patterns in Normal Females: Lyonization Ratios Vary With Age. *Blood* 1996; 88(1):59-65.
 - Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR; United Kingdom Myeloproliferative Disorders Study Group; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party; Australasian Leukaemia and Lymphoma Group. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; 366(9501):1945-53.
 - Campbell PJ, Griesshammer M, Döhner K, Döhner H, Kusec R, Hasselbalch HC, Larsen TS, Pallisgaard N, Giraudier S, Le Bousse-Kerdilès MC, Desterke C, Guerton B, Dupriez B, Bordessoule D, Fenaux P, Kiladjian JJ, Viallard JF, Brière J, Harrison CN, Green AR, Reilly JT. V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2006a; 107(5):2098-100.
 - Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, Scott LM, Bench AJ, Huntly BJ, Erber WN, Kusec R, Larsen TS, Giraudier S, Le Bousse-Kerdilès MC, Griesshammer M, Reilly JT, Cheung BY, Harrison CN, Green AR. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations and role in leukemic transformation. *Blood.* 2006b; 108(10):3548-55.
 - Campbell PJ, Scott LM, Baxter EJ, Bench AJ, Green AR, Erber WN. Methods for the detection of the JAK2 V617F mutation in human myeloproliferative disorders. *Methods Mol Med* 2006c;125:253- 64.
 - Campbell PJ, Green AR. The Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med* 2006d; 355(23):2452-66
 - Cario H, Goerttler PS, Steimle C, Levine RL, Pahl HL. The JAK 2V617F mutation is acquired secondary to the predisposing alteration in familial polycythaemia vera. *Brit J Hematol* 2005; 130(5):800
 - Casadevall N, Vainchenker W, Lacombe C, Vinci G, Chapman J, Breton-Gorius J, Varet B. Erythroid progenitors in polycythemia vera: demonstration of their hypersensitivity to erythropoietin using serum free cultures. *Blood.* 1982; 59(2):447-51.
 - Cazzola M, Skoda R. Gain of function, loss of control - a molecular basis for chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica.* 2005; 90(7):871-4.
 - Cazzola M, Passamonti F. Not just clonal expansion of hematopoietic cells, but also activation of their progeny in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Haematologica* 2006; 91(2):159.
 - Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, Giraudier S, Vainchenker W, Wendling F. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood* 2002; 100(10):3495-503.

- Chen S, Fei H, Zhang R, Xue Y, Pan J, Wu Y, Ceng J. Analysis of JAK 2V617F Mutation in Chinese Patients with myeloproliferative disorders. *Am J Hematol.* 2007; 82(6):458-9.
- Chen Z, Notohamiorodjo M, Guan XY, Paietta E, Blackwell S, Stout K, Turner A, Richkind K, Trent JM, Lamb A, Sandberg AA. Gain of 9p in the pathogenesis of polycythaemia vera. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998; 22(4):321-4
- Cheung B, Radia D, Pantelidis P, Yadegarfar G, Harrison C. The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2006; 132(2):244-5.
- Coates PJ, d'Ardenne AJ, Khan G, Kangro HO, Slavin G. Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections. *J Clin Pathol.* 1991; 44(2):115-8.
- Dai CH, Krantz SB, Dessypris EN, Means RT Jr, Horn ST, Gilbert HS. Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 1992; 15:80(4):891-9.
- Dalley A, Smith JM, Reilly JT, Neil SM. Investigation of calmodulin and basic fibroblast growth factor (bFGF) in idiopathic myelofibrosis: evidence for a role of extracellular calmodulin in fibroblast proliferation. *Br J Haematol.* 1996; 93(4):856-62.
- Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951; 6(4):372-5.
- Deeg HJ, Gooley TA, Flowers ME, Sale GE, Slattery JT, Anasetti C, Chauncey TR, Doney K, Georges GE, Kiem HP, Martin PJ, Petersdorf EW, Radich J, Sanders JE, Sandmaier BM, Warren EH, Witherspoon RP, Storb R, Appelbaum FR. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood.* 2003; 102(12):3912-8.
- Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, Masse A, Godin I, Le Couedic JP, Debili N, Saulnier P, Casadevall N, Vainchenker W, Giraudier S Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythaemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2007; 109(1): 71-7.
- Delrieu I. The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism. *FEBS Lett* 2000; 468(1):6-10.
- DeVos J, Jourdan M, Tarte K, Jasmin C, Klein B. JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *Br J Hematol* 2000; 109(4):823-8
- Dinges HP, Denk H, Reiner A, Würtz FG. Immunhistochemie. ÖGP Qualitätsstandards in der Pathologie, Version Juli 2002.
- Dobrzanski P, Hexner E, Serdikoff C, Jan M, Swider C, Robinson C. CEP-701 is a Jak2 inhibitor which attenuates Jak2/Stat5 signaling pathway and the proliferation of primary cells from patients with myeloproliferative disorders. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts);* 2006; 108 Abstract 3594.
- Dupont S, Massé A, James C, Teyssandier I, Lécluse Y, Larbret F, Ugo V, Saulnier P, Koscielny S, Le Couédic JP, Casadevall N, Vainchenker W, Delhommeau F. The JAK2V617F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid differentiation in primary cells from patients with polycythaemia vera. *Blood.* 2007; 110(3):1013-21.
- Dupriez B, Morel P, Demory JL, Lai JL, Simon M, Plantier I, Bauters F. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood.* 1996; 88(3):1013-8.
- Dusa A, Staerk J, Elliott J, Pecquet C, Poirel HA, Johnston JA, Constantinescu SN. Substitution of pseudokinase domain residue Val-617 by large non-polar amino acids causes activation of JAK2. *J Biol Chem* 2008; 283(19):12941-8.
- El-Kassar N, Hetet G, Brière J, Grandchamp B. Clonality Analysis of Hematopoiesis in Essential Thrombocythaemia: Advantages of Studying T Lymphocytes and Platelets. *Blood* 1997; 89(1):128-34
- Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol.* 2005; 128(3):275-90.

- Fend F, Emmert-Buck MR, Chuaqui R, Cole K, Lee J, Liotta LA, Raffeld M. Immuno-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. *Am J Pathol* 1999a.; 154(1): 61-66.
- Fend F, Quintanilla-Martinez L, Kumar S, Beaty MW, Blum L, Sorbara L, Jaffe ES, Raffeld M. Composite low grade B-cell-lymphomas with two immunophenotypically distinct cell populations are true biclonal lymphomas. A molecular analysis using laser capture microdissection. *Am J Pathol* 1999b; 154(6): 1857-66.
- Fend F, Raffeld M. Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Path* 2000a; 53(9):666-72.
- Fend F, Kremer M, Quintanilla-Martinez L. Laser Capture Microdissection: Methodical Aspects and Applications with Emphasis on Immuno-Laser Capture Microdissection. *Pathobiology* 2000b; 68(4-5):209-14.
- Fend F, Specht K, Kremer M, Quintanilla-Martinez L. Laser Capture Microdissection in Pathology. *Methods in Enzymology* 2002; 356:196-206.
- Fend F, Kremer M, Specht K, Quintanilla-Martinez L. Laser Microdissection in Hematopathology. *Pathol Res Pract* 2003; 199(6):425-30.
- Fend F, Bock O, Kremer M, Specht K, Quintanilla-Martinez L. Ancillary techniques in bone marrow pathology: molecular diagnostics on bone marrow trephine biopsies. *Vir Arch* 2005; 447(6):909-19.
- Fend F, Horn T, Koch I, Vela T, Orazi A. Atypical chronic myeloid leukemia as defined in the WHO classification is a JAK2 V617F negative neoplasm. *Leuk Res* 2008; 32(12):1931-5.
- Fialkow PJ, Denman AM, Jacobson RJ, Lowenthal MN. Chronic myelocytic leukemia. Origin of some lymphocytes from leukemic stem cells. *J Clin Invest.* 1978; 62(4):815-23.
- Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood.* 1981; 58(5):916-9.
- Finazzi G, Ruggeri M, Rodeghiero F, Barbui T. Second malignancies in patients with essential thrombocythaemia treated with busulphan and hydroxyurea: long-term follow-up of a randomized clinical trial. *Br J Haematol* 2000; 110(3):577-83.
- Finazzi G, Rambaldi A, Guerini V, Carobbo A, Barbui T. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 V617F mutation status. *Haematologica.* 2007; 92(1):135-6.
- Fink L, Seeger W, Ermert L, Hänze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 1998; 4(11):1329-33.
- Gaikwad A, Nussenzweig RH, Liu E, Gottschalk S, Chang K, Prchal JT. In vitro expansion of erythroid progenitors from polycythaemia vera patients leads to decrease in JAK2V617F allele. *Exp Hematol* 2007; 35(4):587-95.
- Gale RE, Fielding AK, Harrision CN, Linch DC. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *Br J Hematol* 1997; 98(3):512-9
- Gale RE, Allen AJ, Nash MJ, Linch DC. Long-term serial analysis of X-chromosome inactivation patterns and JAK2 V617F mutant levels in patients with essential thrombocythemia show that minor mutant-positive clones can remain stable for many years. *Blood.* 2007; 109(3):1241-3.
- Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF, Li CY, Schwager S, Wu W, Tefferi A. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients. *Leukemia.* 2007; 21(2):270-6.
- Gattermann N, Billiet J, Kronenwett R, Zipperer E, Germing U, Nollet F, Criel A, Selleslag D. High frequency of the JAK2 V617F mutation in patients with thrombocytosis (platelet count >600x10⁹/L) and ringed sideroblasts more than 15% considered as MDS/MPD, unclassifiable. *Blood* 2007; 109(3):1334-5
- Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(15):6848-52.
- Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 2002; 30(6):503-12.

- Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 130(1):118-26.
- Goerttler PS, Steimle C, März E, Johansson PL, Andreasson B, Griesshammer M, Gisslinger H, Heimpel H, Pahl HL. The Jak2V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood* 2005a; 106(8): 2862-4.
- Goerttler PS, Kreutz C, Donauer J, Faller D, Maiwald T, März E, Rumberger B, Sparna T, Schmitt-Gräff A, Wilpert J, Timmer J, Walz G, Pahl HL. Gene expression profiling in polycythaemia vera: overexpression of transcription factor NF E2. *Br J Haematol.* 2005b; 129(1):138-50.
- Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994; 77(2):307-16.
- Gospodarowicz D, Jones KL, Sato G. Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974; 71(6):2295-9.
- Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol.* 1991; 95(2):117-24.
- Greer CE, Wheeler CM, Manos MM. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. *PCR Methods Appl.* 1994; 3(6):113-22.
- Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, Pies A, Wörmann B, Haase D, Bohlander SK. A bcr-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2)translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(3):329-33.
- Griesshammer M, Klippel S, Strunck E, Temerinac S, Mohr U, Heimpel H, Pahl HL. PRV-1 mRNA expression discriminates two types of essential thrombocythemia. *Ann Hematol.* 2004; 83(6):364-70.
- Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, Rosti V, Villani L, Antonioli E, Bosi A, Barosi G, Vannucchi AM; GIMEMA--Italian Registry of Myelofibrosis; MPD Research Consortium. Anemia characterises patients with myelofibrosis harboring MPLW515L/K mutation. *Br J Hematol* 2007; 137(3): 244-7.
- Guiter C, Dusanter-Fourt I, Copie-Bergman C, Boulland ML, Le Gouvello S, Gaulard P, Leroy K, Castellano F. Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood.* 2004; 104(2):543-9.
- Hammond E, Shaw K, Carnley P, P'ng S, James I, Herrmann R. Quantitative determination of JAK2 V617F by TaqMan: An absolute measure of averaged copies per cell that may be associated with the different types of myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn* 2007a; 9(2):242-8.
- Hammond E, Shaw K, Herrmann R. The JAK2 V617F mutation is detectable in granulocyte populations at greater than two copies per cell among individuals with myeloproliferative disorders. *Leukemia.* 2007b; 21(4):815-6; discussion 816-8.
- Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood.* 1999; 93(2):417-24.
- Hookham MB, Elliott J, Suessmuth Y, Staerk J, Ward AC, Vainchenker W, Percy MJ, McMullin MF, Constantinescu SN, Johnston JA. The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by Suppressor of Cytokine Signaling 3. *Blood* 2007; 109(11): 4924-9.
- Huang LE, Luzzi V, Ehrig T, Holtschlag V, Watson MA. Optimized tissue processing and staining for Laser Capture Microdissection and Nucleic Acid Retrieval. *Methods in Enzymology* 2002; 356:33-49.
- Hussein K, Brakensiek K, Buesche G, Buhr T, Wiese B, Kreipe H, Bock O. Different involvement of the megakaryocytic lineage by the JAK2^{V617F} mutation in Polycythaemia vera, essential thrombocythaemia and chronic idiopathic myelofibrosis. *Ann Hematol* 2007; 86(4):245-53.
- Ishii T, Bruno E, Hoffman R, Xu M. Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera. *Blood.* 2006; 108(9):3128-34.

- Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood*. 1978; 51(2):189-94.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. 2001 Lyon, France: IARC Press.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434(7037):1144-8.
- James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couédic JP, Giraudier S, Roy L, Saunier P, Lacroix L, Maury S, Tulliez M, Vainchenker W, Ugo V, Casadevall N. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006; 20(2):350-3.
- James C, Mazurier F, Dupont S, Chaligne R, Lamrissi-Garcia I, Tulliez M, Lippert E, Mahon FX, Pasquet JM, Etienne G, Delhommeau F, Giraudier S, Vainchenker W, de Verneuil H. The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. *Blood* 2008; 112(6):2429-38.
- Jamieson CH, Gotlib J, Durocher JA, Chao MP, Mariappan MR, Lay M, Jones C, Zehnder JL, Lilleberg SL, Weissman IL. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(16):6224-9.
- Jelinek DF, Ahmann GJ, Greipp PR, Jalal SM, Westendorf JJ, Katzmann JA, Kyle RA, Lust JA. Coexistence of aneuploid subclones within a myeloma cell line that exhibits clonal immunoglobulin gene rearrangement: clinical implications. *Cancer Res* 1993; 53(21):5320-7.
- Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, Beran M, Estey E, Kantarjian HM, Issa JP. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005; 106(10):3370-3.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106(6):2162-8.
- Jones AV, Silver RT, Waghorn K, Curtis C, Kreil S, Zoi K, Hochhaus A, Oscier D, Metzgeroth G, Lengfelder E, Reiter A, Chase AJ, Cross NC. Minimal molecular response in polycythemia vera patients treated with imatinib or interferon alpha. *Blood* 2006; 107(8):3339-41.
- Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, Siebert R, Harder L, Martín-Subero JI, Wolf J, Adamowicz M, Barth TF, Lichter P, Jauch A. Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *Int J Cancer*. 2003; 103(4):489-95.
- Kaushansky K. On the molecular origins of the Chronic Myeloproliferative Disorders: It all makes Sense. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005;533-7.
- Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S, Menot ML, Massonnet G, Dutel JL, Ghomari K, Rousselot P, Grange MJ, Chait Y, Vainchenker W, Parquet N, Abdelkader-Aljasseem L, Bernard JF, Rain JD, Chevret S, Chomienne C, Fenaux P. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood* 2006a; 108(6):2037-2040.
- Kiladjian JJ, Elkassar N, Cassinat B, Hetet G, Giraudier S, Balitrand N, Conejero C, Briere J, Fenaux P, Chomienne C, Grandchamp B. Essential thrombocythemias without V617F JAK2 mutation are clonal hematopoietic stem cell disorders. *Leukemia* 2006b; 20(6):1181-3.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002; 285(1-2):1- 24.
- Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2002; 30(3): 229-36.

- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005a; 352(17):1779-90.
- Kralovics R, Teo SS, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A, Passamonti F, Pietra D, Cazzola M, Skoda RC. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood* 2005b; 106(10):3374-6.
- Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A, Skoda RC. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;108(4):1377-80.
- Kremer M, Cabras AD, Fend F, Schulz S, Schwarz K, Höfler H, Werner M. PCR Analysis of IgH-Gene Rearrangements in Small Lymphoid Infiltrates Microdissected from sections of Paraffin-embedded Bone Marrow Biopsy Specimens. *Hum Pathol* 2000; 31(7):847-53.
- Kremer M, Spitzer M, Mandl-Weber S, Stecker K, Schmidt B, Höfler H, Quintanilla-Martínez L, Fend F. Discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: comparative molecular analysis reveals a heterogeneous group of disorders. *Lab Invest*. 2003; 83(1):107-14.
- Kremer M, Horn T, Dechow T, Tzankov A, Quintanilla-Martinez L, Fend F. The JAK2 V617F mutation occurs frequently in myelodysplastic/myeloproliferative diseases, but is absent in true myelodysplastic syndromes with fibrosis. *Leukemia* 2006; 20(7):1315-6.
- Kremer M, Horn T, Koch I, Gattenloehner S, Pfeiffer W, Quintanilla-Martinez L, Fend F. Quantitation of the JAK2V617F mutation in microdissected bone marrow trephines: equal mutational load in myeloid lineages and rare involvement of lymphoid cells. *Am J Surg Pathol* 2008; 32(6):928-35.
- Kroger N, Badbaran A, Holler E, Hahn J, Kobbe G, Bornhauser M, Reiter A, Zabelina T, Zander AR, Fehse B. Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood* 2007; 109(3):1316-1321.
- Küppers R, Rajewsky Z, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91(23):10962-6.
- Labbaye C, Valtieri M, Barberi T, Meccia E, Masella B, Pelosi E, Condorelli GL, Testa U, Peschle C. Differential expression and functional role of GATA-2, NF-E2, and GATA-1 in normal adult hematopoiesis. *J Clin Invest*. 1995; 95(5):2346-58.
- Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 2006; 108(5):1652-60.
- Lacronique V, Boureux A, Della Valle V, Poirel H, Tranquang C, Mauchauffe M, Berthoud C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA. A TEL-JAK2 fusion- protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 1997; 278(5341):1309-12.
- Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, Barbui T. European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythaemia Vera. *N Engl J Med*. 2004; 350(2):114-24.
- Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2007; 136(5):745-51.
- Lasho TL, Mesa R, Gilliland DG, Tefferi A. Mutation studies in CD3+, CD19+ and CD34+ cell fractions in myeloproliferative disorders with homozygous JAK2 (V617F) in granulocytes. *Br J Haematol* 2005; 130(5):797-9.
- Lasho TL, Pardanani A, McClure RF, Mesa RA, Levine RL, Gilliland DG, Tefferi A. Concurrent MPL515 and JAK2 V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *Br J Haematol* 2006; 135(5):683-87.
- Le Bousse-Kerdilès MC, Martyre MC; French INSERM research network on idiopathic myelofibrosis. Involvement of the fibrogenic cytokines, TGF-beta and bFGF, in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Pathol Biol (Paris)* 2001; 49(2):153-7.

- Lee JW, Kim YG, Soung YH, Han KJ, Kim SY, Rhim HS, Min WS, Nam SW, Park WS, Lee JY, Noo NJ, Lee SH. The JAK2 V617F mutation in de novo acute myelogenous leukemias. *Oncogene* 2006a; 25(9):1434-6.
- Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Park WS, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. JAK2 V617F mutation is uncommon in Non-Hodgkin-Lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2006b; 47(2):313-4.
- Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*. 2001; 25(4):409-18.
- Leutenegger CM. The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine. *Vet Sci Tomorrow*. 1, Jan 2001.
- Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, Berger R, Clark JJ, Willis SG, Nguyen KT, Flores NJ, Estey E, Gattermann N, Armstrong S, Look AT, Griffin JD, Bernard OA, Heinrich MC, Gilliland DG, Druker B, Deininger MW.. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005a; 106(10):3377-9.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005b; 7(4):387-97.
- Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P, Gilliland DG, Busque L. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveals a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006; 107(10):4139-41.
- Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood* 2008a; 112(6):2190-8.
- Levine RL, Heaney M. New advances in the pathogenesis and therapy of essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008b; 2008: 76-82.
- Li Z, Xu M, Xing S, Ho WT, Ishii T, Li Q, Fu X, Zhao ZJ. Erlotinib effectively inhibits JAK2V617F activity and polycythemia vera cell growth. *J Biol Chem* 2007; 282(6):3428-3432.
- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, Boiret-Dupré N, Skoda RC, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2006; 108(6):1865-7.
- Liu E, Jelinek J, Pastore YD, Guan Y, Prchal JF, Prchal JT. Discrimination of polycythaemias and thrombocytoses by novel, simple, accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin. *Blood* 2003; 101(8):3294-3301.
- Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG, Duffy T, Jacobs P, Tang LH, Modlin I. Somatic c-kit activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: Establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet*. 1996; 12(3):312-4
- Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, Gilliland DG, Lodish H. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(52):18962-7.
- Lucia E, Martino B, Mammi C, Vigna E, Mazzone C, Gentile M, Quattieri G, Bisconte MG, Naccarato M, Gentile C, Laganà C, Romeo F, Neri A, Nobile F, Morabito F. The incidence of JAK2 V617F mutation in bcr/abl-negative chronic myeloproliferative disorders: assessment by two different methods. *Leuk Lymphoma* 2008; 49(10):1907-15.
- Luo H, Rose P, Barber D, Hanratty WP, Lee S, Roberts TM, D'Andrea AD, Dearolf CR. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol*. 1997; 17(3):1562-71.
- Lucet IS, Fantino E, Styles M, Bamert R, Patel O, Broughton SE, Walter M, Burns CJ, Treutlein H, Wilks AF, Rossjohn J. The structural basis of Janus Kinase2 inhibition by a potent and specific pan.Janus kinase inhibitor. *Blood*. 2006; 107(1):176-83.

- Martin PJ, Najfeld V, Hansen JA, Penfold GK, Jacobson RJ, Fialkow PJ. Involvement of the B-lymphoid system in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1980; 287(5777):49-50.
- Martyré MC, Le Bousse-Kerdiles MC, Romquin N, Chevillard S, Praloran V, Demory JL, Dupriez B. Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*. 1997; 97(2):441-8.
- Mason IJ. The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell* 1994; 78(4): 547-52.
- McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2006; 20(1):168-71.
- Melzner I, Weniger MA, Menz CK, Moller P. Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* 2006; 20(1):157-8.
- Mesa RA, Powell H, Lasho T, Dewald G, McClure R, Tefferi A. JAK2(V617F) and leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leuk Res* 2006a; 30(11):1457-60.
- Mesa RA, Powell H, Lasho T, DeWald GW, McClure R, Tefferi A. A longitudinal study of the JAK2(V617F) mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: analysis at two time points. *Haematologica* 2006b; 91(3):415-6.
- Michiels JJ, Thiele J. Clinical and pathological criteria for the diagnosis of essential thrombocythemia, polycythemia vera, and idiopathic myelofibrosis (agnogenic myeloid metaplasia). *Int J Hematol*. 2002; 76(2):133-45.
- Michiels JJ, De Raeve H, Hebeda K, Lam KH, Berneman Z, Schroyens W, Schwarz J. WHO bone marrow features and European clinical, molecular, and pathological (ECMP) criteria for the diagnosis of myeloproliferative disorders. *Leuk Res* 2007; 31(8):1031-8.
- Mirza I, Sekora D, Frantz C. Testing for JAK2V617F mutation across specimen types yields concordant results. *J Clin Pathol* 2008; 61(8):975.
- Mittelman M, Gardyn J, Carmel M, Malovani H, Barak Y, Nir U. Analysis of the erythropoietin receptor gene in patients with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 1996; 20(6):459-66.
- Mnjoyan Z, Yoon D, Delhommeau F, Afshar-Kharghan V. The effect of the JAK2 V617F mutation on PRV-1 expression. *Haematologica*. 2006; 91(3):411-12.
- Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998; 338(9):572-80.
- Moliterno AR, Spivak JL. Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythaemia vera. *Blood*. 1999; 94(8): 2555-61.
- Najfeld V, Montella L, Sealise A, Fruchtman S. Exploring Polycythaemia vera with fluorescence in situ hybridization: additional cryptic 9p is the most frequent abnormality detected. *Br J Hematol*. 2002; 119(2):558-66.
- Neubauer H, Cumano A, Muller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 1998; 93:397-409.
- Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132:1497.
- Nussenzweig RH, Swierczek SI, Jelinek J, Gaikwad A, Liu E, Verstovsek S, Prchal JF, Prchal JT. Polycythaemia vera is not initiated by JAK2V617F mutation. *Exp Hematol* 2007; 35(1):32-8.
- Ohyashiki K, Aota Y, Akahane D, Gotoh A, Miyazawa K, Kimura Y, Ohyashiki JH. The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myelodysplastic syndromes (MDS) developing myelofibrosis indicates the myeloproliferative nature in a subset of MDS patients. *Leukemia* 2005; 19(12):2359-60.
- Pardanani A, Lasho T, McClure R, Lacy M, Tefferi A. Discordant distribution of JAK2V617F mutation in siblings with familial myeloproliferative disorders. *Blood* 2006a; 107(11):4572-3.
- Pardanani A, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006b; 108(10): 3472-6.
- Pardanani A, Hood J, Lasho T, Levine RL, Martin MB, Noronha G, Finke C, Mak CC, Mesa R, Zhu H, Soll R, Gilliland DG, Tefferi A. TG101209, a small molecule JAK2-selective

- kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia*. 2007; 21(8):1658-68.
- Pardananani A. JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. *Leukemia* 2008a; 22(1):23-30.
 - Pardananani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood* 2008b; 111(5):2785-9.
 - Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998; 93(3):385-95.
 - Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, Orlandi E, Arcaini L, Brusamolino E, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med*. 2004; 117(10):755-61.
 - Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, Vanelli L, Arcaini L, Burcheri S, Malcovati L, Lazzarino M, Cazzola M. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006; 107(9):3676-82.
 - Percy MJ, Jones FG, Green AR, Reilly JT, McMullin MF. The incidence of the JAK2 V617F mutation in patients with idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 2006; 91(3):413-4.
 - Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, Ferrari M, Gisslinger H, Kralovics R, Cremonesi L, Skoda R, Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2(V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 111(3):1686-9.
 - Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006; 3(7):1140-51.
 - Plo I, Nakatake M, Malivert L, de Villartay JP, Giraudier S, Villeval JL, Wiesmuller L, Vainchenker W. JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 112(4):1402-12.
 - Poodt J, Fijnheer R, Walsh IBB, Hermans MHA. A sensitive and reliable semi-quantitative real-time PCR assay to detect JAK2V617F in blood. *Hematol Oncol*. 2006; 24(4):227-33.
 - Prchal JF, Axelrad AA. Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med* 1974; 290(24):1382.
 - Prchal JT, Guan YL, Prchal JF, Barany F. Transcriptional analysis of the active X-chromosome in normal and clonal hematopoiesis. *Blood*. 1993; 81(1):269-71.
 - Prchal JT. Polycythemia vera and other primary polycythemias. *Curr Opin Hematol*. 2005; 12(2):112-6.
 - Provan AB, Hodges E, Smith AG, Smith JL. Use of paraffin wax embedded bone marrow trephine biopsy specimens as a source of archival DNA. *J Clin Pathol*. 1992; 45(9):763-5.
 - Rameshwar P, Denny TN, Stein D, Gascón P. Monocyte adhesion in patients with bone marrow fibrosis is required for the production of fibrogenic cytokines. Potential role for interleukin-1 and TGF-beta. *J Immunol*. 1994; 153(6):2819-30.
 - Raskind WH, Jacobson R, Murphy S, Adamson JW, Fialkow PJ. Evidence for the involvement of B lymphoid cells in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *J Clin Invest*. 1985; 75(4):1388-90.
 - Reading NS, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. Detection of acquired Janus kinase 2 V617F mutation in myeloproliferative disorders by fluorescence melting curve analysis. *Mol Diagn Ther*. 2006; 10(5):311-7.
 - Reeder TL, Bailey RJ, Dewald GW, Tefferi A. Both B and T lymphocytes may be clonally involved in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2003; 101(5):1981-3.
 - Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* 1999; 283(5404):990-3.
 - Roder S, Steimle C, Meinhardt G, Pahl HL. STAT3 is constitutively active in some patients with polycythemia rubra vera. *Exp Hematol* 2001; 29(6):694-702.

- Rogers BB, Alpert LC, Hine EA, Buffone GJ. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 1990; 136(3):541-8.
- Ruan GR, Chen SS, Li LD, Liu YR, Qin YZ, Li JL, Ma X, Wang FR, Jiang Q, Jiang B, Liu KY, Huang XJ. Detection of JAK2V617F mutation in patients with myeloproliferative disorders with TaqMan-MGB-probe. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007; 87(34):2401-4.
- Rumi E, Pasamonti F, Pietra D, Della Porta MG, Arcaini L, Boggi S, Elena C, Boveri E, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M JAK2 (V617F) as an acquired somatic mutation and a secondary genetic event associated with disease progression in familial myeloproliferative disorders. *Cancer* 2006; 107(9):2206-11.
- Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2000; 20(10):3387-95.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230(4732):1350-4.
- Sandberg EM, Wallace TA, Godeny MD, Vonderlinden D, Sayeski PP. Jak2 tyrosine kinase: a true jak of all trades? *Cell Biochem Biophys* 2004; 41(2):207-32.
- Sandberg EM, Ma X, He K, Frank SJ, Ostrov DA, Sayeski PP. Identification of 1,2,3,4,5,6-hexabromocyclohexane as a small molecule inhibitor of jak2 tyrosine kinase autophosphorylation [correction of autophosphorylation]. *J Med Chem.* 2005; 48(7):2526-33.
- Sayer MS, Tilbrook PA, Spadaccini A, Ingley E, Sarna MK, Williams JH, Andrews NC, Klinken SP. Ectopic expression of transcription factor NF-E2 alters the phenotype of erythroid and monoblastoid cells. *J Biol Chem.* 2000; 275(33):25292-8.
- Schafer A. Molecular Basis of the diagnosis and treatment of Polycythaemia Vera and Essential Thrombocythaemia. *Blood* 2005; 107(11): 4214-22.
- Schaub FX, Jager R, Looser R, Hao-Shen H, Hermouet S, Girodon F, Tichelli A, Gisslinger H, Kralovics R, Skoda RC. Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and JAK2-V617F in MPD suggests that del20q acts independently and is not one of the pre-disposing mutations for JAK2-V617F. *Blood* 2008 Dec 1. Epub ahead of print.
- Schmitt A, Drouin A, Massé JM, Guichard J, Shagraoui H, Cramer EM. Polymorphonuclear neutrophil and megakaryocyte mutual involvement in myelofibrosis pathogenesis. *Leuk Lymphoma.* 2002; 43(4):719-24.
- Schwemmers S, Will B, Waller CF, Abdulkarim K, Johansson P, Andreasson B, Pahl HL. JAK2V617F-negative ET patients do not display constitutively active JAK/STAT signaling. *Exp Hematol* 2007; 35(11):1695-703.
- Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, Todd T, Stephens P, Edkins S, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA, Green AR. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106(8):2920-1.
- Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F JAK2 mutation occur in most patients with polycythemia vera but not essential thrombocythemia. *Blood* 2006; 108:2435-7.
- Scott LM, Tong W, Levine, RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356(5):459-68.
- Segal GH, Jorgensen T, Masih AS, Braylan RC. Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: I. Low grade B-cell lymphoproliferative disorders of nonfollicular center cell type. *Hum Pathol.* 1994; 25(12):1269-75.
- Shide K, Shimoda HK, Kumano T, Karube K, Kameda T, Takenaka K, Oku S, Abe H, Katayose KS, Kubuki Y, Kusumoto K, Kasuike S, Tahara Y, Nagata K, Matsuda T, Ohshima K, Harada M, Shimoda K. Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2V617F. *Leukemia* 2008; 22(1):87-95.
- Sidon P, El Housni H, Dessars B, Heimann P. The JAK2V617F mutation is detectable at very low level in peripheral blood of healthy donors. *Leukemia.* 2006; 20(9):1622.
- Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernandez-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998; 338(9):564-71.

- Sirhan S, Lasho TL, Hanson CA, Mesa RA, Pardanani A, Tefferi A. The presence of JAK2 V617F in primary myelofibrosis or its allele burden in polycythaemia vera predicts chemosensitivity to hydroxyurea. *Am J Hematol* 2008; 83:363-5.
- Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*. 1999; 98(2):181-91.
- Specht K, Richter T, Müller U, Walch A, Werner M, Höfler H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am J Pathol*. 2001; 158(2):419-29.
- Speletas M, Katodritou E, Daiou C, Mandala E, Papadakis E, Kioumi A, Ritis K, Korantzis I. Correlations of JAK2-V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. *Leuk Res*. 2007; 31(8):1053-62.
- Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R, Marchetti M. Chronic Myeloproliferative Disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003;200-24
- Spivak JL. Polycythaemia Vera and Other Myeloproliferative Diseases in Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Verlag, New York 2005, 16. Auflage, Kapitel 95, 626-631.
- Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, Gilliland DG, Tefferi A. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005;106(4):1207-9.
- Steensma DP, McClure RF, Karp JE, Tefferi A, Lasho TL, Powell HL, DeWald GW, Kaufmann SH. JAK2V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT 3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia* 2006; 20(6):971-8.
- Stein H, Hummel M. Cellular origin and clonality of classic Hodgkin's lymphoma: immunophenotypic and molecular studies. *Semin Hematol*. 1999; 36(3):233-41.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2008.
- Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med* 2000; 342(17):1255- 65.
- Tefferi A, Fonseca R, Pereira DL, Hoagland HC. A long-term retrospective study of young women with essential thrombocythemia. *Mayo Clin Proc*. 2001; 76(1):22-8.
- Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 2005; 23:8520-30.
- Tefferi A, Lasho TL, Gilliland G. JAK2 mutations in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005a; 353(13):1416-7.
- Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Steensma DP, Mesa RA, Li CY, Wadleigh M, Gilliland DG. The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol*. 2005b; 131(3):320-8.
- Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li CY, Dingli D, Wolanskyj AP, Steensma DP, Mesa R, Gilliland DG. Concomitant neutrophil JAK2V617F mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. *Br J Hematol* 2005c ; 131.166-71.
- Tefferi A. Classification, Diagnosis and Management of Myeloproliferative Disorders in the JAK2V617F Era. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006: 240-5.
- Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, Li CY, Wadleigh M, Lee SJ, Gilliland DG. The Clinical Phenotype of Wild-Type, Heterozygous and Homozygous JAK2V617F in Polycythaemia Vera. *Cancer* 2006a; 106(3):631-5.
- Tefferi A, Barosi G, Mesa RA, Cervantes F, Deeg HJ, Reilly JT, Verstovsek S, Dupriez B, Silver RT, Odenike O, Cortes J, Wadleigh M, Solberg jr LA, Camoriano JK, Gisslinger H, Noel P, Thiele J, Vardiman JW, Hoffmann R, Cross NCP, Gilliland G, Kantarjian H International Working Group (IWG) Consensus Criteria for Treatment Response in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia: On Behalf of the IWG for Myelofibrosis Research and Treatment *Blood*. 2006b; 108(5):1497-503.

- Tefferi A, Strand JJ, Lasho TL, Knudson RA, Finke CM, Gangat N Lasho TL, Knudson RA, Finke CM, Gangat N, Pardanani A, Hanson CA, Ketterling RP. Bone marrow JAK2V617F allele burden and clinical correlates in polycythemia vera. *Leukemia* 2007a; 21:2074–2075.
- Tefferi A. Primary myelofibrosis and its paraneoplastic stromal effects. *Haematologica* 2007b; 92(5):577-9.
- Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, Li CY, Wu W, Hanson CA, Pardanani A. Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a high allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia* 2008; 22(4):756-61.
- Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E, Talmant P, Tichelli A, Hermouet S, Skoda RC. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood* 2007; 110(1):375-9.
- Thiele J, Kvasnicka HM, Boeltken B, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Initial (prefibrotic) stages of idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF)- a clinicopathological study. *Leukemia* 1999; 13(11):1741-8
- Thiele J, Kvasnicka HM, Zankovich R, Diehl V. Relevance of bone marrow features in the differential diagnosis between essential thrombocythemia and early stage idiopathic myelofibrosis. *Haematologica* 2000; 85(11):1126-34.
- Thiele J, Kvasnicka HM. Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification systems (PVSG, WHO) on 839 patients. *Ann Hematol.* 2003; 82(3):148-52.
- Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi O. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica* 2005; 90(8):1128-32.
- Tiedt R, Coers J, Ziegler S, Wiestner A, Hao-Shen H, Bornmann C, Schenkel J, Karakanova S, de Sauvage FJ, Jackson CW, Skoda RC. Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. *Blood* 2008a, Oct 9. Epub ahead of print.
- Tiedt R; Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, Skoda RC. Ratio of mutant JAK2V617F to wild-type JAK2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 2008b; 111(8):3931-40.
- Tsui HW, Siminovitch KA, de Souza L, Tsui FW. Mice with mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet.* 1993; 4(2):124-9.
- Tsukamoto N, Morita K, Maehara T, Okamoto K, Sakai H, Karasawa M, Naruse T, Omine M. Clonality in chronic myeloproliferative disorders defined by X-chromosome linked probes: demonstration of heterogeneity in lineage involvement. *Br J Haematol.* 1994; 86(2):253-8.
- Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2004; 32:179- 87.
- Valentino L, Pierre J. JAK/STAT signal transduction: Regulators and implication in hematological malignancies. *Biochemical Pharmacology* 2006;71(6):713-721.
- Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Mappa S, Pancrazzi A, Bogani C, Ponziani V, Bosi A. Inconsistencies in the association between the JAK2(V617F) mutation and PRV-1 over-expression among the chronic myeloproliferative diseases. *Br J Hematol* 2006a; 132(5): 652–654.
- Vannucchi AM, Pancrazzi A, Bogani C, Antonioli E, Guglielmelli P. A quantitative assay for JAK2(V617F) mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis. *Leukemia.* 2006b; 20(6):1055-60.
- Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, Marfisi RM, Finazzi G, Guerini V, Fabris F, Randi ML, De Stefano V, Caberlon S, Tafuri A, Ruggeri M, Specchia G, Liso V, Rossi E, Pogliani E, Gugliotta L, Bosi A, Barbui T. Clinical profile of homozygous JAK2V617F Mutation in Patients with Polycythaemia Vera or Essential Thrombocythaemia. *Blood* 2007a; 110(3):840-6.
- Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, Bogani C, Ferrini PR, Rambaldi A, Guerini V, Bosi A, Barbui T; MPD Research Consortium.

- Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia* 2007b; 21:1952–1959.
- Vardiman JW, Brunning R, Harris NL: Chronic myeloproliferative diseases. In: World Health Organization classification of tumours. Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Edited by Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Lyon, IARC Press 2001, 15-44.
 - Villeval JL, Cohen-Solal K, Tulliez M, Giraudier S, Guichard J, Burstein SA, Cramer EM, Vainchenker W, Wendling F. High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood* 1997; 90(11):4369-83.
 - Walz C, Crowley BJ, Hudon HE, Gramlich JL, Neuberg DS, Podar K, Griffin JD, Sattler M. Activated JAK2 with the V617F point mutation promotes G1/S-phase transition. *J Biol Chem*. 2006; 281(26):18177-83.
 - Wang JC, Lang HD, Lichter S, Weinstein M, Benn P, Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultured from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Br J Hematol* 1992; 80(2):184-8.
 - Weniger MA, Melzner I, Menz CK, Wegener S, Bucur AJ, Dorsch K, Mattfeldt T, Barth TF, Möller P. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*. 2006; 25(18):2679-84.
 - Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2006; 107(11):4274-81.
 - Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. 1993; 74(2):227-36.
 - Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, Gilliland DG, Tefferi A. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005; 131(2):208-13.
 - Worley J, Lee S, Ma MS, Eisenberg A, Chen HY, Mansfield E. Fluorescence imaging in human identity testing. *Biotechniques*. 1997; 23(1):148-53.
 - Xing S, Wanting TH, Zhao W, Ma J, Wang S, Xu X, Li Q, Fu X, Xu M, Zhao ZJ. Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice. *Blood* 2008; 111(10):5109-17.
 - Xu X, Zhang Q, Luo J, Xing S, Li Q, Krantz SB, Fu X, Zhao ZJ. JAK2(V617F): Prevalence in a large Chinese Hospital Population. *Blood*. 2007; 109(1):339-42.
 - Yoon SY, Li CY, Tefferi A. Megakaryocyte c-Mpl expression in chronic myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome: immunoperoxidase staining patterns and clinical correlates. *Eur J Haematol*. 2000; 65(3):170-4.
 - Zaleskas VM, Krause DS, Lazarides K, et al. Molecular pathogenesis of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. *Blood* 2005;106:A116. abstract.
 - Zaleskas VM, Krause DS, Lazarides K, Patel N, Hu Y, Li S, van Etten RA. Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. *PLoS ONE* 2006;1:e18.
 - Zanjani ED, Lutton JD, Hoffman R, Wasserman LR. Erythroid Colony Formation by Polycythaemia Vera Bone Marrow in Vitro. *J Clin Invest* 1977;59(5):841-8.
 - Zehentner BK, Loken MR, Wells DA. JAK2V617F mutation can occur exclusively in the erythroid lineage and be absent in granulocytes and progenitor cells in classic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol*. 2006; 81(10):806-7.
 - Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005; 280(24):22788-92

8. Anhang

8.1. Immunhistochemie-Puffer

Citratpuffer (pH = 6,0) für die Immunhistochemie

Stammlösung A 0,1 M Zitronensäure (19,2 g Zitronensäure in 1000 ml Aqua dest. gelöst)

Stammlösung B 0,1 M Natriumcitrat Dihydrat (24,4 g in 1000 ml Aqua dest. gelöst)

Herstellung der Arbeitslösung:

- 27 ml Lösung A mit 123 ml Lösung B vermischen
- Zugabe von Aqua destillata ad 1500ml
- Langsame Zugabe von 1,5 ml TWEEN 20

TBS-Puffer für die Immunhistochemie

Stammlösung A 8,3%-ige NaCl-Lösung

Stammlösung B - Lösung von 181,7g TRIS in 2400 ml Aqua destillata
- Titration auf pH=7,6 mit HCl
- Aqua destillata ad 3000ml

Arbeitslösung - 300 ml Stammlösung A und 300 ml Stammlösung B vermischen
- Aqua destillata ad 3000ml

8.2. PCR – Lösungen und Reagenzien

TBE - 54g TRIS, 27,5g Borsäure und 29 ml 0,5 M EDTA vermischen
- Aqua destillata ad 1000ml

Agarose (SeaKam LE agarose)

BMA, Rockland, ME, USA

AmpliTaQGold

Applied Biosystems, Foster City, USA

Bromphenolblau-Xylene-cyanol Dye
(PCR-Ladepuffer, 10xDyes)

Sigma, Deisenhofen

(obiges Pulver wird in 5 ml Aqua dest. gelöst, 20 ml Formamid zugegeben und aliquotiert)

BSA XI

New England Biolabs, Hitchin, UK

BSA XI-Puffer	New England Biolabs, Hitchin, UK
Ethidiumbromid (0,7 mg/ml)	Eurobio, Cedex, Frankreich
MetaPhor	FMC Bio Products, Rockland, ME, USA
Molekulargewichtsmarker IX	Fermentas, St- Leon-Rot
Nukleotide	Pharmacia, Freiburg
PCR-Puffer mit MgCl ₂	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Proteinase K, PCR Grade (20,6 mg/ml)	GE Health Care, Dallas, Texas, USA
(Proteinase K: von der Stocklösung (=20,6 mg/ml) wurden pro 100 µl PK-Puffer 4 µl eingesetzt)	
Taq-Polymerase (5 units/µl)	GE Health Care, Dallas, Texas, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt

8.3. Fragment-Längen-Analyse-Lösungen und Reagenzien

Ammoniumpersulfat (10% APS)	Sigma, Deisenhofen
Aqua-Spüllösung	Delta-Pharma, Pfullingen
Formamid (deionisiert)	Sigma, Deisenhofen
Genescan 500 TAMRA	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Harnstoff	Gibcol, Life Technologies, Carlsbad, USA
Long Ranger Hydrolink Gel Solution	BMA, Rockland, ME, USA
Ladepuffer (Blue Dextran)	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Bio-Rad, München

8.4. Sequenzierung – Lösungen und Reagenzien

QiaQuick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Premix (mit ddNTPs)	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Big Dye Sequencing Buffer	
DMSO (Dimercaptomethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Dye Ex 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden Deutschland

8.5. Aminosäurecodierung

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P

Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure	E	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

8.6 Abkürzungen

ALI	Atypische lymphoide Infiltrate
AML	Akute myeloische Leukämie
AS-PCR	Allelspezifische PCR
bcl	b-cell lymphoma
bFGF	basic fibroblast growth factor
cDNA	copyDNA
CLL	Chronisch-lymphatische Leukämie
CML	Chronisch-myeloische Leukämie
CMML	chronisch myelo-monozytäre Leukämie
CNL	Chronisch-neutrophile Leukämie
CSF	colony-stimulating factor
Ct	Cycle threshold
Del	Deletion
DNA	Deoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEC	endogenous erythroid colonies
EPO	Erythropoietin
ET	Essentielle Thrombozythämie
IFN	Interferon
IgH	Immunglobulin Heavy Chain
IL	Interleukin
ITP	Immunthrombopenie
LCM	Laser Capture Microdissection
MAP	mitogen-activated protein
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
mRNA	messenger RNA
NF-E2	nuclear factor E2
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

OMF	Osteomyelofibrose
PCR	Polymerasekettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction)
PDGF	platelet-derived growth factor
PIAS	protein inhibitors of active STATs
PRV-1	polycythemia rubra vera-1
PV	Polyzythämia vera
qPCR	Quantitative PCR
RA	Refraktäre Anämie
RAEB	Refraktäre Anämie mit Exzess-Blasten
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RFLA	Restriktionsfragmentlängenanalyse
RNA	Ribonukleinsäure
siRNA	short-interfering RNA
SM	Systemische Mastozytose
SOCS	suppressors of cytokine signaling
STAT	signal transducer and activator of transscription
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	transforming growth factor
TPO	Thrombopoietin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
WHO	Weltgesundheitsorganisation (englisch: world health organization)

8.7. Verzeichnis der Tabellen

1.	Bekannte genetische Alterationen bei MPS.....	6
2.	Häufigkeit von JAK2 V617F in den anfänglichen Studien.....	13
3.	Reagenzien für die TaqMan PCR.....	40
4.	Zusammensetzung der Studienpatienten.....	44
5.	Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten.....	44
6.	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung auf Expression von bFGF	46
7.	Ergebnisse der allelspezifischen PCR bei MPS.....	48
8.	Ergebnisse der allelspezifischen PCR der Fälle in der bFGF-Expressionsstudie.....	48
9.	bFGF-Expression, JAK2-Status und Fibrose bei MDS/AML und MPS.....	50
10.	Ergebnisse der Nested PCR.....	51
11.	Korrelation von klinischen Daten mit dem Mutationsstatus.....	54
12.	Korrelation der Krankheitsdauer mit dem JAK2- Status.....	55
13.	Ergebnisse der Untersuchungen an atypischen lymphoiden Infiltraten.....	57

14.	Ergebnisse der Untersuchungen an mikrodisssezierten Megakaryozyten.....	62f
15.	Ergebnisse der Taq Man PCR am ganzen Mark bei schwierigen Fällen.....	63
16.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Mikrodissektion.....	65

8.8. Verzeichnis der Abbildungen

1.	Knochenmarkshistologie bei MPS.....	10
2.	JAK2- Signaltransduktionsweg.....	15
3.	Lage der Mutation im JAK2-Gen.....	16
4.	Einteilung der Knochenmarksfibrose.....	23
5.	Laser Capture Microdissection.....	27
6.	Funktionsprinzip des TaqMan.....	42
7.	Beispielhaftes Ergebnis der bFGF-Immunhistochemie.....	46
8.	Beispielhaftes Ergebnis der allelspezifischen PCR.....	49
9.	Restriktionsenzymverdau nach Nested PCR.....	52
10.	Korrelation von klinischen Daten mit dem Mutationsstatus.....	53
11.	Beispielhaftes Ergebnis der Sequenzierung.....	56
12.	Beispielhaftes Ergebnis der TaqMan PCR.....	59
13.	Durchführung der Mikrodissektion von Megakaryozyten.....	60
14.	Mutationsfrequenzen der einzelnen Zellpopulationen.....	65
15.	Pathogenetisches Modell der MPS	85

8.9. Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Arbeit sind in den nachfolgenden Artikeln veröffentlicht worden:

1. Horn T, Kremer M, Dechow T, Pfeifer WM, Geist B, Perker M, Duyster J, Quintanilla-Martinez L, Fend F. Detection of the activating JAK2 V617F mutation in paraffin-embedded trephine bone marrow biopsies of patients with chronic myeloproliferative diseases.

J Mol Diagn. 2006 Jul;8(3):299-304.

2. Kremer M, Horn T, Dechow T, Tzankov A, Quintanilla-Martinez L, Fend F. The JAK2 V617F mutation occurs frequently in myelodysplastic/ myeloproliferative diseases, but is absent in true myelodysplastic syndromes with fibrosis. Leukemia. 2006 Jul;20(7):1315-6.

3. Kremer M, Horn T, Koch I, Dechow T, Gattenloehner S, Pfeiffer W, Quintanilla-Martinez L, Fend F. Quantitation of the JAK2V617F Mutation in Microdissected Bone Marrow Trepines: Equal Mutational Load in Myeloid Lineages and rare involvement of lymphoid cells. Am J Surg Pathol. 2008 Jun;32(6):928-35.

9. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich an dieser Stelle allen denjenigen danken, die das Entstehen dieser Arbeit ermöglicht haben. Namentlich sind dies mein Doktorvater Herr Prof. Dr. H. Höfler, dem ich ausserdem für die Schaffung von ausgezeichneten Rahmenbedingungen an seinem Institut danken möchte, Herr Prof. Dr. F. Fend und Herr PD Dr. M. Kremer für die Überlassung des Themas und die vorbildliche Betreuung und Führung während der gesamten Arbeit. Stets standen mir ihre Türen bei jedwem Problem oder Anliegen offen.

Größter Dank gebührt ebenso Frau Birgit Geist, die mich geduldig in die Methoden der Laborarbeit einwies und mir stets hilfsbereit zur Seite stand.

Weitere unschätzbare Hilfen bei der Laborarbeit waren Frau Christa Schott, Frau Ingrid Höptner, Frau Carmen Hartmann, Herr Sebastian Warnecke und Herr Peter Strzelzig.

Als geduldige ZuhörerIn stand mir Frau Dr. J. Slotta-Huspenina stets zur Verfügung.

Beonders herauszuheben ist das Engagement von Frau Dr. Ina Koch, ohne die große methodologische Teile der Arbeit nicht zu verwirklichen gewesen wären und die mit ihrem biochemischen Wissen und ihrer Erfahrung viele Probleme lösen konnte.