

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

**Molekulare Charakterisierung Myeloproliferativer Neoplasien
zur Identifizierung leukämierelevanter Genveränderungen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von Maximilian Johannes Laaths aus Amberg (Bayern)
Ulm, 2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Döhner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Gierschik

Tag der Promotion: 13.01.2017

Meinem Vater

Wolfgang Erasmus Maria Laaths

INHALT

INHALT.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Myeloproliferative Neoplasien (MPN)	1
1.2 Die BCR-ABL1-positive Chronische Myeloische Leukämie (CML)	2
1.3 Die BCR-ABL1-negativen Myeloproliferativen Neoplasien	3
1.3.1 Essentielle Thrombozythämie (ET).....	3
1.3.2 Polyzythämia vera (PV).....	5
1.3.3 Primäre Myelofibrose (PMF)	6
1.4 Genetische und epigenetische Komplexität.....	8
1.4.1 Die Region 17q11.2	11
1.5 Fragestellung	12
2 Material und Methodik	13
2.1 DNA-Extraktion.....	13
2.2 Durchführung der Microarray-Experimente	14
2.2.1 Proben	14
2.2.2 Sty/Nsp-Restriktion	15
2.2.3 Sty/Nsp-Ligation	15
2.2.4 Sty/Nsp-PCR.....	16
2.2.5 Aufreinigung des PCR-Produkts.....	16
2.2.6 Fragmentation	16
2.2.7 Labeling.....	17
2.2.8 Hybridisierung	17
2.2.9 Waschen, Färben und Scannen	17
2.3 Durchführung der DNA-Sequenzanalyse.....	18
2.3.1 Proben	18
2.3.2 cDNA Synthese	18
2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.3.4 PCR-Produktkontrolle.....	20
2.3.5 Aufreinigung des PCR-Produkts.....	21

2.3.6	cycle sequencing reaction (CSR).....	21
2.3.7	Aufreinigung des CSR-Produkts.....	22
2.3.8	Sequenzierung.....	23
2.4	Datenanalyse.....	24
2.4.1	Analyse der microarray-Daten.....	24
2.4.2	Analyse der DNA-Sequenzierung.....	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	SNP 6.0 Arrays.....	28
3.1.1	Kopienzahl-Analyse (CNA).....	29
3.1.2	Die Region 17q11.2.....	34
3.1.3	Heterozygotieverlust-Analyse (UPD).....	35
3.2	NF1-Sequenzanalyse.....	38
3.3	SUZ12-Sequenzanalyse.....	42
3.4	Zusammenfassung.....	42
4	Diskussion.....	45
5	Zusammenfassung.....	60
6	Literaturverzeichnis.....	62
	ANHANG.....	72
	DANKSAGUNG.....	85
	LEBENS LAUF.....	86

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
ABL	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AG	Arbeitsgruppe
AML	akute myeloische Leukämie
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCL6	B-Zell Lymphom 6 Protein
BCOR	BCL-6 interacting corepressor
BCR	breakpoint cluster region
bp	"base pair", Basenpaar
C	"carbon", Kohlenstoff
C	Cytosin
CALR	Calreticulin
CBL	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral
CCT	Cytidintriphosphat
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
CBFB	core-binding factor, beta
cDNA	"complementary DNA", komplementäre DNA
CDRs	"common deleted regions", häufig deletierte Regionen
CML	chronische myeloische Leukämie
CNA	"copy number alteration", Kopienzahlveränderung
CSR	cycle sequencing reaction
CUX1	cut-like homeobox 1
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid

DOCK4	dedicator of cytokinesis 4
EPO	Erythropoietin
ET	essentielle Thrombozythämie
ETV6	ET variant 6
EZH2	enhancer of zeste 2
FACS	"Fluorescence activated cell sorting", Durchflussszytometrie
G	Guanin
GCSF	"granulocyte-colony stimulating factor", Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GM	Granulozyten-Markophagen
GTP	Guanosintriphosphat
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
IKZF1	ikaros zinc finger protein 1
JAK2	Janus kinase 2
JMML	juvenile myelomonozytäre Leukämie
kb	Kilobasen
KDM2B	lysine-specific demethylase 2B
L3MBTL1	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein, isoform 1
LOH	"loss of heterozygosity", Heterozygotieverlust
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MF	Myelofibrose
min	Minute
ml	Milliliter
MNC	"mononuclear cell", mononukleäre Zelle
MPD	"myeloproliferative disorders", Myeloproliferative Erkrankungen
MPL	myeloproliferative leukemia virus oncogene
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
mRNA	messenger RNA
NF1	neurofibromin isoform 1
ng	Nanogramm

OH	Hydroxygruppe
PcG	Polycomb Group
PCR	"Polymerase Chain Reaction", Polymerase-Kettenreaktion
Ph-Chromosom	Philadelphia Chromosom
PMF	primäre Myelofibrose
PRC1/2	Polycomb Repressive Complex 1/2
PV	Polyzythämia vera
R	Rezeptor
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RUNX1	runt-related transcription factor 1
sAML	sekundäre akute myeloische Leukämie
SAPE	Streptavidinphycoerythrin
SNP	"single nucleotide polymorphism", Einzelnukleotidpolymorphismen
STAT	signal transducer and activator of transcription
SUZ12	suppressor of zeste 12
T	Thymin
T-ALL	akute lymphatische T-Zell Leukämie
TCF12	transcription factor 12
TET2	tet oncogene family member 2
TGF- β	transforming growth factor beta
TP53	tumor protein p53
TTP	Thymidintriphosphat
UCSC	University of California Santa Cruz
UPD	uniparentale Disomie
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
WHO	"World Health Organisation", Weltgesundheitsorganisation
WT	"wildtype", Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASIEN (MPN)

Bereits 1951 prägte William Dameshek den Begriff der "myeloproliferative disorders" (MPD) und subsumierte darunter vier verschiedene Bluterkrankungen: die essentielle Thrombozythämie (ET), die Polyzythämia vera (PV), die primäre Myelofibrose (PMF) sowie die chronische myeloische Leukämie (CML) (Tefferi 2008). Diese Einteilung basierte auf Blutbild- und Knochenmarkveränderungen sowie den damit verbundenen klinischen Symptomen.

In der 2001 von der World Health Organisation (WHO) veröffentlichten *Classification of Tumors* wurden erstmals genetische, zytochemische und immunphänotypische Informationen bei der Erstellung einer Klassifikation berücksichtigt (Jaffe et al. 2001). Um aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen Rechnung zu tragen, wurde die Einteilung von MPD im Jahre 2008 erneut von der WHO überarbeitet. Insbesondere die Identifizierung der sog. *Januskinase 2 (JAK2)*-Mutation im Jahr 2005 (s. Kapitel 1.4.), deren Nachweis ein wichtiger klonaler Marker für die Diagnose der oben genannten Entitäten ist, wurde zum Anlass genommen, eine Änderung in der Terminologie vorzunehmen: Auf diese Weise wurde der Begriff der myeloproliferativen Neoplasien (MPN) geprägt (Tefferi et al. 2011, Vardiman et al. 2009).

Myeloproliferative Neoplasien sind eine Gruppe heterogener, chronischer Stammzellerkrankungen des Knochenmarks, denen die verstärkte Produktion von Blutzellen gemein ist. Sie können alle drei Zelllinien der Hämatopoese betreffen und weisen ein dementsprechend variables klinisches Erscheinungsbild auf (siehe Kapitel 1.2. und 1.3.). Grundsätzlich lassen sich bei MPN *BCR-ABL1*-negative Entitäten von der *BCR-ABL1*-positiven chronischen myeloischen Leukämie unterscheiden (Tabelle 1). Innerhalb der *BCR-ABL1*-negativen MPN werden ET, PV und PMF aufgrund ihres vergleichsweise häufigen Vorkommens auch als „klassische MPN“ bezeichnet.

Tabelle 1. Klassifikation der myeloproliferativen Neoplasien von 2008. Unterschieden wird hierbei die *BCR-ABL1*-positive chronische myeloische Leukämie (CML) von den *BCR-ABL1*-negativen Entitäten

MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASIEN (MPN)	
chronische myeloische Leukämie	<i>BCR-ABL1-positiv</i>
Chronische Neutrophilenleukämie	 <i>BCR-ABL1-negativ</i>
Essentielle Thrombozythämie	
Polyzythämia vera	
Primäre Myelofibrose	
Chronische Eosinophilenleukämie	
Mastozytose	
Unklassifizierbare MPN	

1.2 DIE BCR-ABL1-POSITIVE CHRONISCHE MYELOISCHE LEUKÄMIE (CML)

Für die CML ist vor allem eine Proliferation von reifen Granulozyten und deren Vorläuferzellen im peripheren Blut und im Knochenmark charakteristisch. Die CML ist eine seltene hämatopoetische Stammzellerkrankung mit einer Inzidenz von 1-2/100.000 Personen pro Jahr (Hehlmann et al. 2007). Ihr liegt die Translokation t(9;22)(q34;q11), auch bekannt als *Philadelphia (Ph)* Chromosom, zugrunde, die dazu führt, dass ein Teil des *BCR*-Gens von Chromosom 22 mit dem auf Chromosom 9 gelegenen *ABL1*-Gen fusioniert. Das so entstandene *BCR-ABL1*-Fusionsgen codiert nun für eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase und ist für die Entstehung der CML ursächlich (Ren 2005).

Das *Ph*-Chromosom und/oder das *BCR-ABL1*-Fusionsgen haben charakteristische klinische und morphologische Veränderungen zur Folge und werden deshalb als Hauptkriterium zur Diagnosestellung der CML herangezogen (Vardiman et al. 2009). Gleichzeitig bietet die vorliegende genetische Aberration einen wertvollen therapeutischen, zielgerichteten Ansatz: So werden mit oral verfügbaren Tyrosinkinaseinhibitoren wie z.B. Imatinib, Dasatinib und Nilotinib, deren Target das *BCR-ABL1*-Fusionsprotein durch Blockierung der ATP-Bindungsstelle ist, hohe Remissionsraten und ein verbessertes Gesamtüberleben bei der Behandlung der CML erzielt (Druker et al. 2001).

1.3 DIE BCR-ABL1-NEGATIVEN MYELOPROLIFERATIVEN NEOPLASIEN

Im Gegensatz zur CML, bei der das *BCR-ABL1*-Fusionsgen schon lange ein diagnostisches Kriterium darstellt, dienten bei den *BCR-ABL1*-negativen MPN über viele Jahrzehnte lediglich klinische, morphologische und/oder laborchemische Eigenschaften zur Diagnosesicherung. Mit der o.g. 2008 veröffentlichten WHO-Klassifikation änderte sich dies. Der Grund hierfür ist die Erkenntnis, dass auch bei diesen Entitäten genetische Aberrationen (v.a. die *JAK2 V617F* Mutation) als diagnostische Marker herangezogen werden können. So ist es möglich, bei einem überwiegenden Teil der Patienten eine klonale Proliferation nachzuweisen und diese Krankheitsbilder von reaktiven Prozessen abzugrenzen (Vardiman et al. 2009).

Grundsätzlich handelt es sich bei den im Folgenden beschriebenen klassischen MPN um langsam progrediente, chronische Erkrankungen; in einem Teil der Fälle kann es aufgrund genetischer Instabilität der Leukämiezellen zu einer Transformation in eine sekundäre akute myeloische Leukämie (sAML) kommen. Charakteristisch dafür ist ein Blastenschub, also eine exzessive Produktion unreifer Vorstufen von Blutkörperchen, der mit einer sehr schlechten Prognose für den Patienten verbunden ist.

1.3.1 ESSENTIELLE THROMBOZYTHÄMIE (ET)

Die ET ist eine seltene Erkrankung, deren Inzidenz mit 1,5/100.000 Personen pro Jahr angegeben wird. Das mediane Alter bei einer ET-Erstdiagnose liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr (Berger et al. 2011b). Sie ist charakterisiert durch eine anhaltende Thrombozytose im peripheren Blut, bedingt durch megakaryozytäre Proliferation im Knochenmark (Tabelle 2).

Tabelle 2. Diagnosekriterien von 2008 für die Essentielle Thrombozythämie (ET)

DIAGNOSEKRITERIEN DER ET
ET, wenn alle vier Kriterien erfüllt sind
1) Thrombozyten anhaltend $>450 \times 10^9/L$ 2) im Knochenmarksbiopsat hauptsächlich megakaryozytäre Proliferation mit vergrößerten, reifen Megakaryozyten 3) Nichterfüllung der WHO Kriterien für PV, PMF, <i>BCR-ABL1-pos.</i> CML, MDS oder andere myeloische Neoplasien 4) JAK2 V617F Mutation, oder fehlender Nachweis einer reaktiven Thrombozytose

Betroffene Patienten sind meist asymptomatisch und werden oft nur im Rahmen einer Routineuntersuchung entdeckt. Wenn klinische Symptome auftreten, dann handelt es sich in der Regel um Thrombosen oder Kribbelparästhesien (Campbell et al. 2005). Paradoxerweise kommt es besonders bei einer sehr hohen Anzahl von Blutplättchen vermehrt zu Blutungskomplikationen; dieser Umstand ist durch den dann großen Anteil von funktionsuntüchtigen Thrombozyten zu erklären, die durch ein begleitendes, erworbenes von Willebrand-Syndrom bedingt sind.

Für die ET steht keine kurative Medikation zur Verfügung, sodass mit symptomatischen Therapiemaßnahmen die thrombohämorrhagische Komplikationsrate gesenkt werden soll. Das Auftreten von Mikrozirkulationsstörungen (z.B. Kribbeln, Migräne oder Sehstörungen) wird mit niedrigdosierter Acetylsalicylsäure (ASS) behandelt. Trifft einer der drei Risikofaktoren aus Thrombozytose $>1.500.000/\mu l$, Alter >60 Jahre oder stattgehabtes thrombohämorrhagisches Ereignis im Rahmen der ET zu, so wird die Indikation zur zytoreduktiven Behandlung gestellt. Hierbei kommen meistens Hydroxyurea, Anagrelid oder Interferon- α zum Einsatz (Barbui et al. 2011a).

Bei Diagnosestellung lassen sich keine sicheren Aussagen darüber machen, welche ET-Patienten in eine post-ET Myelofibrose transformieren werden und wie hoch das individuelle Risiko für den Übergang in eine sAML ist. Daten hierzu wurden vor allem retrospektiv gewonnen. Von besonderer Bedeutung zur Abschätzung des Risikos einer fibrotischen Transformation ist die Abgrenzung der ET von der präfibrotischen Phase der primären Myelofibrose (PMF), die nur anhand der Knochenmarkhistologie möglich ist. ET-

Patienten gehen vergleichsweise seltener in eine post-ET MF über oder erfahren eine Transformation in eine sAML. Die Ergebnisse einer 2011 veröffentlichten Studie, die 891 ET-Patienten untersucht hatte, beschreiben 15 Jahre nach Diagnosestellung eine Progressionsrate von 9,3% und eine Transformationsrate von 2,1% (Barbui et al. 2011b). Dieselbe Studie gibt die 15-Jahres-Überlebensrate mit 80% an; medikamentös adäquat eingestellte ET-Patienten haben somit eine gute Prognose, die in etwa der der Normalbevölkerung entspricht.

1.3.2 POLYZYTHÄMIA VERA (PV)

Die PV ist eine seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 1-2/100.000 Personen pro Jahr und einem Altersgipfel zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr (Berger et al. 2011a). Eine Erythropoietin(EPO)-unabhängige, neoplastische Proliferation im Knochenmark führt bei dieser Erkrankung zu einer Überproduktion von Erythrozyten und in geringerem Ausmaß von Thrombozyten und Granulozyten (Tabelle 3). Daher lassen sich im Gegensatz zu sekundären Polyzythämien, die zum Beispiel im Rahmen von Hypoxämien, Nierenerkrankungen, Ventilationsstörungen oder paraneoplastischen Prozessen auftreten können, keine erhöhten EPO-Spiegel im Blut nachweisen.

Tabelle 3. Diagnosekriterien von 2008 für die Polyzythämia vera (PV)

DIAGNOSEKRITERIEN DER PV
PV wenn a) beide Hauptkriterien und ein Nebenkriterium oder b) das erste Hauptkriterium und zwei Nebenkriterien erfüllt sind
HAUPTKRITERIEN 1) Hämoglobin >18,5 g/dl bei Männern, >16,5 g/dl bei Frauen oder Hämatokrit über 99. Perzentile 2) JAK2 V617F Mutation oder JAK2 Exon 12 Mutation
NEBENKRITERIEN 1) hyperzelluläres Knochenmark mit Proliferation aller drei Zelllinien (Panmyelose) 2) Serum Erythropoietin-Level unterhalb des Referenzbereichs 3) endogene erythroide Kolonie-Formation in vitro

PV-Patienten leiden vor allem unter Symptomen wie arterieller Hypertonie oder Plethora, und die häufigsten Komplikationen sind auch hier Thrombosen und Blutungen. Therapeutisch stehen die Symptomreduktion und die Risikominderung im Vordergrund: Alle symptomatischen PV-Patienten sollten mit einer Kombination von ASS und Phlebotomien behandelt werden (Landolfi et al. 2004). Bei einem der für die ET geschilderten Risikofaktoren (Thrombozytose $>1.500.000/\mu\text{l}$, Alter >60 Jahre oder stattgehabtes thrombohämorrhagisches Ereignis) wird auch bei der PV die Indikation zur Zytoreduktion gestellt, die in den meisten Fällen entweder mit Hydroxyurea oder Interferon- α durchgeführt wird (Barbui et al. 2011a).

Wie bei der ET ist es aus den oben genannten Gründen sehr schwer, die Progression und Transformation der PV verlässlich zu beschreiben. Studienergebnisse lassen lediglich vermuten, dass die Progressions- und Transformationsraten von der JAK2 V617F Allel-Last abhängig sind (Passamonti et al. 2010). Außerdem haben homozygot mutierte Patienten wahrscheinlich ein höheres Risiko für die Entwicklung einer post-PV MF.

Medikamentös gut eingestellte PV-Patienten, die kein Krankheitsfortschreiten erfahren, haben – ähnlich den ET-Patienten – eine gute Prognose.

1.3.3 PRIMÄRE MYELOFIBROSE (PMF)

Die PMF ist eine seltene hämatopoetische Stammzellerkrankung deren Inzidenz mit 1-3/100.000 angegeben wird und die bevorzugt bei älteren Patienten auftritt, mit einem Altergipfel zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr (Berger et al. 2011c).

Im Anfangsstadium der PMF sind im Knochenmark vermehrt Megakaryozyten zu finden, die im Gegensatz zu den bei der ET anzutreffenden Megakaryozyten histologische Besonderheiten wie z.B. ein abnormes Zellkern/Zytoplasma Verhältnis aufweisen. Mit zunehmender Krankheitsdauer kommt es zu einer ausgeprägten Fibrosierung des Knochenmarks und davon betroffene Patienten zeigen konstitutionelle Symptome wie Kachexie, B-Symptomatik, Pruritus, Müdigkeit und Knochenschmerzen; charakteristisch sind außerdem Zytopenien und eine Leukoerythroblastose mit extramedullärer Blutbildung, die in der Regel zu einer Hepatosplenomegalie führt (Tabelle 4) (Barosi 1999).

PMF-Patienten werden mit Hilfe des *International Prognostic Scoring System* (IPSS) in Gruppen eingeteilt, die die Prognose abschätzen lassen und für das anzuwendende Therapieregime von Bedeutung sind. Dabei werden fünf Parameter zur Risikobestimmung verwendet: Alter >65 Jahre, Vorhandensein von konstitutionellen Symptomen (Gewichtsverlust von >10% im Jahr vor der PMF-Diagnose und/oder nicht durch andere Ursachen erklärbares Fieber und exzessives Schwitzen >1x/Monat), Hämoglobin <10 g/dL, Leukozyten >25x10⁹/L sowie ein Blastenanteil >=1% im peripheren Blut. Basierend auf diesen Parametern wird eine Zuteilung in vier verschiedene Risikogruppen vorgenommen: Low-risk, Intermediate-I, Intermediate-II und High-risk. Die mediane Prognose in den verschiedenen Risikogruppen liegt zwischen 2 (High-risk) und 11 (Low-risk) Jahren.

Tabelle 4. Diagnosekriterien von 2008 für die Primäre Myelofibrose (PMF)

DIAGNOSEKRITERIEN DER PMF
PMF wenn alle Hauptkriterien und zwei Nebenkriterien erfüllt sind
HAUPTKRITERIEN 1) megakaryozytäre Proliferation mit Atypie, begleitet von Retikulin –bzw Kollagenfibrose oder bei Abwesenheit signifikanter Fibrose begleitet von granulozytärer Proliferation und verminderter Erythropoese 2) Nichterfüllen der WHO Kriterien für PV, <i>BCR-ABL1-pos.</i> CML, MDS oder andere myeloische Neoplasien 3) JAK2 V617F Mutation oder andere (MPLW515K/L) oder bei Abwesenheit der genannten Mutationen kein Anhalt für eine sekundäre Myelofibrose
NEBENKRITERIEN 1) Leukoerythroblastose 2) Serum Laktatdehydrogenase-Level oberhalb des Referenzbereichs 3) Anämie 4) palpable Splenomegalie

Eine potentiell kurative allogene Stammzelltransplantation kommt in der Regel auf Grund der hohen therapieassoziierten Mortalität nur bei Patienten unter 70 Jahre im guten Allgemeinzustand in Intermediate-II (zwei Parameter zutreffend) und High-risk (drei oder mehr Parameter zutreffend) Situation in Frage (Cervantes et al. 2012).

Intermediate-I Patienten und Patienten ohne Risikofaktoren wird in der Regel eine symptomatische Therapie empfohlen. Zur Behandlung der Anämie werden im Wesentlichen vier Präparate verwendet: Kortikosteroide, Androgene, Erythropoietin (EPO)-Derivate und Immunmodulatoren (Barbui et al. 2011a, Tefferi et al. 2009). Mittel der Wahl bei der medikamentösen Behandlung der Splenomegalie ist der *JAK2*-Inhibitor Ruxolitinib (Randhawa et al. 2012). Dieser ist seit 2012 zur Behandlung der MF bei Vorliegen konstitutioneller Symptome und und/oder symptomatischer Splenomegalie zugelassen. Im Gegensatz zu den Tyrosinkinaseinhibitoren bei der CML handelt es sich bei der Therapie mit einem *JAK*-Inhibitor allerdings nicht um eine zielgerichtete Therapie der Leukämiezellen. Die Therapie wirkt unabhängig vom Vorhandensein der *JAK2*-Mutation und führt v.a. zur Besserung konstitutioneller Symptome und zu einer Größenreduktion der Milz. Da *JAK2* ein wichtiges Protein der gesunden Hämatopoese ist, kommt es zu einer dosisabhängigen Myelosuppression, die vor allem die Thrombopoese und Erythropoese betrifft.

Die Prognose für PMF-Patienten ist bei einem medianen Überleben (gemittelt über alle Risikogruppen) von 5 bis 6 Jahren und einer sAML-Transformationsrate von bis zu 20% deutlich schlechter als bei den übrigen *BCR-ABL1*-neg. MPN (Cervantes et al. 2009).

Zu unterscheiden ist die PMF von Myelofibrosen, die sich sekundär im Rahmen einer PV oder ET entwickeln. In diesem Fall spricht man von einer post-PV MF bzw. einer post-ET MF.

1.4 GENETISCHE UND EPIGENETISCHE KOMPLEXITÄT

Die ersten Erkenntnisse bezüglich der genetischen Charakteristika der *BCR-ABL1*-negativen MPN lieferte die zytogenetische Analyse aus Knochenmark oder Blut. Diese Untersuchungsmethode lässt chromosomale Aberrationen ab einer Größe von etwa 5 Megabasen (Mb) erkennen. Auf diese Weise entdeckte rekurrente Aberrationen sind bei MPN u.a. die Trisomien 8 und 9 sowie ein Verlust des langen Arms von Chromosom 20 (Deletion 20q).

Mit der Entwicklung molekulargenetischer Techniken konnten weitere, pathogenetisch relevante genomische Veränderungen identifiziert werden, die im Rahmen einer zytogenetischen Analyse unentdeckt blieben: So ließ das Mikrosatelliten-Mapping an Kollektiven von MPN-Patienten einen häufig wiederkehrenden, langstreckigen Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH) auf Chromosom 9p mit Verdoppelung eines elterlichen Allels erkennen (uniparentale Disomie, UPD) (Kralovics et al. 2005). Auf der Suche nach dem relevanten Gen in der kleinsten von dieser Aberration betroffenen Region konnte schließlich auf Chromosom 9p24 eine Punktmutation im *JAK2*-Gen identifiziert werden. Diese Entdeckung der sog. *JAK2* V617F Mutation war ein Meilenstein, nicht zuletzt deshalb, weil sie heute einen wichtigen diagnostischen Marker bei den *BCR-ABL1*-negativen MPN darstellt und neue therapeutische Ansätze lieferte.

Als intrazytoplasmatische Tyrosinkinase und Mitglied der Janus-Kinase-Familie initiiert *JAK2* nach Bindung von Liganden wie z.B. Wachstumshormonen (Erythropoetin, Thrombopoetin oder G-CSF) eine Aktivierung des *JAK-STAT*-Pathway, der Signale von den Rezeptoren zum Zellkern weiterleitet (Vainchenker et al. 2011). Dabei werden die STAT-Proteine von den Janus-Kinasen phosphoryliert, können so dimerisieren und schließlich in den Zellkern translozieren, wo sie eine regulatorische Aktivität bei der Gentranskription ausüben (Imada et al. 2000). Damit spielt *JAK2* eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation.

Die Janus-Kinasen sind wie folgt aufgebaut: Sie besitzen eine aktive Kinasedomäne (JH1) und eine Pseudokinasedomäne (JH2), die als ein negativer Regulator von JH1 dient (Vainchenker et al. 2011). Bei der *JAK2* V617F Mutation handelt es sich um eine Punktmutation (G-->T) in der Pseudokinasedomäne, bei der es zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Phenylalanin an Position 617 kommt. Dieser Austausch resultiert in einer Störung der Regulationsfunktion der Pseudokinase und führt somit zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinasedomäne sowie zu einer Zytokinhypersensitivität (Cross 2011, Tefferi et al. 2011, Vainchenker et al. 2011).

Bei einem Großteil der Patienten mit einer *BCR-ABL1*-negativen MPN konnte diese Mutation gefunden werden. Besonders häufig ist sie mit dem Krankheitsbild der PV vergesellschaftet, bei dem die Punktmutation in ca. 95% der Fälle vorliegt (Baxter et al. 2005, Levine et al. 2005). Eine so hohe Mutationsfrequenz ist bei den übrigen *BCR-ABL1*-

negativen MPN nicht vorhanden, jedoch tragen auch etwas mehr als die Hälfte der PMF- (ca. 50-60%) und ET-Patienten (ca. 65%) diese Aberration (Jones et al. 2005, Tefferi et al. 2011).

Durch Genomanalysen mittels hochauflösender "Single nucleotide polymorphism"- (SNP-) Microarrays und der Anwendung der „Next-generation Sequencing“- (NGS-) Methode ist es gelungen, weitere Fortschritte im Verständnis von *BCR-ABL1*-negativen MPN zu erzielen und neue Regionen in der DNA zu identifizieren, die mit der Entstehung und/oder der Progression dieser Erkrankungen assoziiert sind. Inzwischen konnte in zahlreichen dieser Regionen auch die zugrunde liegende Genmutation gefunden werden, und so zeigt sich zum heutigen Zeitpunkt, dass die Pathogenese der *BCR-ABL1*-negativen MPN wesentlich komplexer ist als früher angenommen. Erst kürzlich (Ende 2013) wurde mit der Beschreibung von Frameshift-Mutationen in Exon 9 von *Calreticulin* (*CALR*) eine weitere sehr wichtige pathogenetische und diagnostische Lücke geschlossen, da diese bei ca. 25% der ET- und ca. 35% der MF-Patienten ohne *JAK2*-Mutation vorkommen und sowohl ein wichtiger Marker zur Diagnosestellung sind als auch von prognostischer Bedeutung sein könnten (Klampfl et al. 2013, Nangalia et al. 2013).

Tabelle 5 zeigt nur einen Teil der bis heute identifizierten Mutationen und veranschaulicht dennoch die genetische Komplexität der MPN.

Tabelle 5. An der Pathogenese der myeloproliferativen Neoplasien (MPN) beteiligte Gene. Obwohl nicht vollständig, zeigt diese Auflistung die enorme Vielfalt der genomischen Veränderungen, die den MPN zugrunde liegen (Cross 2011, Klampfl et al. 2013, Vainchenker et al. 2011). nk = nicht bekannt

AN DER PATHOGENESE DER MPN BETEILIGTE GENE						
Gen	Lokalisation	Funktion	Häufigkeit			
			ET	PV	PMF	sAML
<i>JAK2</i>	9p24 (gain of function)	Tyrosinkinase	65%	95%	50%	50%
<i>MPL</i>	1p34 (gain of function)	Rezeptor	4%	selten	11%	nk
<i>TET2</i>	4q24 (loss of function)	DNA Methylierung	11%	15%	19%	26%
<i>ASXL1</i>	20q11.21 (loss of function)	Chromatin Modifikation	-5%	-5%	40%	19%
<i>IDH1</i>	2q33.3 (neomorphic mutation)	Metabolismus	selten	selten	2%	8%
<i>IDH2</i>	15q26.1 (neomorphic mutation)	Metabolismus	selten	selten	2%	18%
<i>EZH2</i>	7q35 (loss of function)	Chromatinmethylierung	1%	3%	13%	nk
<i>DNMT3A</i>	2p23 (loss of function)	DNA Methylierung	-5%	6%	10%	20%
<i>CALR</i>	19p13.13 (loss of function)	Transkriptionsregulation	25%	nk	35%	nk

1.4.1 DIE REGION 17Q11.2

Eine von Aberrationen betroffene Region befindet sich auf Chromosom 17, auf dem in mehreren Studien ein rekurrenter Verlust von 17q11.2 bei Myelofibrose-Patienten beschrieben worden ist (Kawamata et al. 2008, Stegelmann et al. 2010). Sucht man im Bereich dieser Deletion nach möglichen Kandidatengenen, stößt man auf die Gene *Neurofibromin-1 (NF1)* und *Suppressor of zeste 12 (SUZ12)*, die nur ca. 600 bp voneinander entfernt liegen (Kent et al. 2002). Sowohl für *NF1* als auch für *SUZ12* ist es auf Grund ihrer physiologischen Funktionen vorstellbar, dass mutierte Varianten eine wichtige Rolle in der Pathogenese und/oder der Progression von malignen Erkrankungen spielen können:

Das *NF1*-Gen ist assoziiert mit der autosomal dominanten "von Recklinghausen Neurofibromatose" (Neurofibromatose Typ I), die durch das Auftreten von meist benignen Tumoren (Neurofibromen) gekennzeichnet ist. Dieses Tumorsuppressorgen ist lokalisiert auf Chromosom 17q11.2 und codiert das Protein Neurofibromin. Neurofibromin ist ein GTPase-aktivierendes Protein, das über den *Ras*-Signalweg einen modulierenden Effekt auf die Zellproliferation ausübt. Nach Degradierung von NF-1 bindet Ras an GTP und wird dadurch in seine aktive Form überführt. So ist es in der Lage, Zellproliferation und Zelldifferenzierung zu induzieren. Nach 60-90 Minuten normalisiert sich der NF1 Spiegel, und das Gen kann seine GTPase-Aktivität wieder aufnehmen: Das gebundene GTP wird hydrolysiert und Ras dadurch inaktiviert (Weinberg 2006).

Der Neurofibromatose Typ I liegt in den allermeisten Fällen eine Keimbahnmutation (frameshift, nonsense oder missense) in *NF1* zu Grunde. In ungefähr 5-10 % der Fälle lässt sich jedoch eine genomische Deletion nachweisen, die u.a. das gesamte *NF1*-Gen beinhaltet. Patienten mit einer solchen Aberration leiden in der Regel an einem ausgeprägteren klinischen Phänotypen (Pasmant et al. 2010, van Minkelen et al. 2014).

Auch Leukämie-Patienten, bei denen keinerlei Anzeichen für das Vorliegen einer Neurofibromatose gefunden werden konnten, tragen Mutationen im *NF1*-Gen. Dabei handelt es sich jedoch um somatische Mutationen, die ausschließlich in den betroffenen Zelllinien zu finden sind. Zu diesem Ergebnis kam u.a. eine Studiengruppe, die ein Kollektiv von adulten AML-Patienten auf das Vorliegen einer *NF1*-Mutation untersuchte (Parkin et al. 2010).

SUZ12 ist ein Kernprotein des *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2). PRC1 und PRC2 sind die beiden in Säugetieren bekannten Familien der *Polycomb Group* (PcG) Proteine; diese Proteine agieren als Chromatin-modifizierende Komplexe und sind damit in der Lage, eine Repression der Transkription zu bewirken. Dazu katalysiert die Histonmethyltransferase EZH2 (enhancer of zeste 2) -neben SUZ12 ein weiteres Kernprotein von PRC2- die Methylierung von aktivem Chromatin, das durch die darauf folgende Ubiquitinierung durch PRC1 in inaktives Chromatin überführt wird (Sauvageau et al. 2010). Dieser epigenetische Prozess wird auch als "Gene-Silencing" bezeichnet.

Daneben spielen PRC1 und PRC2 eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus (Sauvageau et al. 2010) und so ist es nicht verwunderlich, dass *EZH2*-Mutationen mit dem Phänotyp der MPN in Verbindung gebracht werden konnten (Ernst et al. 2010). Auch für das ebenfalls als Kernprotein fungierende *SUZ12* ist ein solcher Zusammenhang denkbar.

1.5 FRAGESTELLUNG

Im Mittelpunkt dieser Dissertation steht die molekulare Charakterisierung einer großen homogenen Myelofibrose-Studienkohorte mittels genomumfassender SNP-Array Analysen, insbesondere auch im Hinblick auf Deletionen in 17q11.2. Aufbauend auf diesen Ergebnissen soll anschließend die nähere Charakterisierung einzelner, pathogenetisch relevanter Kandidatengene erfolgen.

Mit diesem Ziel soll im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit das genetische Profil von 87 MF-Patienten aus der MPNSG-01-09 Studie (NCT00949364) mittels Microarray-basierter, genomweiter Analysen bestimmt werden. Von besonderem Interesse ist hierbei die Frage, wie häufig in dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv informative Mikrodeletionen und Zugewinne mit dort lokalisierten Kandidatengenen zu finden sind. Diese potentiellen Kandidatengene sollen im zweiten Teil der Dissertation durch eine Sequenzieranalyse genauer untersucht werden, um ihre pathogenetische Relevanz näher zu beleuchten. Beispielhaft kann die 17q11.2-Deletion angeführt werden, die bereits in früheren Arbeiten als Aberration mit vermuteter pathogenetischer Relevanz beschrieben worden ist (Kawamata et al. 2008, Stegelmann et al. 2010).

2 MATERIAL UND METHODIK

Die Verfahrensprotokolle, die verwendeten Chemikalien sowie deren Mischverhältnisse sind in Tabellen aufgelistet und gesammelt im Anhang (s.S. 72) zu finden.

2.1 DNA-EXTRAKTION

Zu Beginn beider in dieser Arbeit durchgeführten Arbeitstechniken erfolgt die Extraktion von Patienten-DNA aus bei -70°C gefrorenen Zellpellets. Die Pellets bestehen aus mononukleären Zellen (MNC) oder Granulozyten, die zuvor aus dem peripheren Blut und/oder dem Knochenmark des Patienten mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurden. Für die Microarray-Experimente werden Granulozyten verwendet, da der gesuchte MPN-Klon v.a. in dieser Zellpopulation gefunden werden kann; der für die Sequenzanalyse benötigte sAML-Klon hingegen wird aus MNCs extrahiert.

Aus MNC und Granulozyten kann die DNA mittels DNAzol wie folgt präpariert werden:

Das Patienten-Zellpellet wird mit 2ml DNAzol-Reagenz (Invitrogen) versetzt, welches als Guanidindetergens in der Lage ist, die im Pellet enthaltenen Zellen zu lysieren. Die entstandene Lösung wird durch mehrmaliges Aufziehen der Pipette gut vermischt, um sicherzustellen, dass sich das Pellet komplett gelöst hat und die Zellen vollständig lysiert sind.

Nach Zugabe von 2ml Ethanol absolut (96-100%; Sigma-Aldrich) fällt die sich im Lysat befindende Patienten-DNA als sichtbares weißes Knäuel aus, das mit der Pipettenspitze aspiriert wird und so in ein mit Ethanol 70% gefülltes Tube überführt werden kann. Dort erfolgt das Waschen der DNA durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette; dieser Schritt wird -jeweils in einem neuen 2ml Ethanol-Tube- insgesamt zweimal durchgeführt, um möglichst viele Zelltrümmer und die DNAzol-Reagenz von der DNA zu trennen. Die DNA verbleibt danach in einem dritten mit Ethanol 70% befüllten 1,5ml Tube.

Anschließend wird die Probe für 15min bei Raumtemperatur und 13.000Upm zentrifugiert (Biofuge primo, Heraeus) und der entstandene Überstand sorgfältig abpipettiert. Um den restlichen Alkohol verdunsten zu lassen, erfolgt nun eine 10-minütige Trocknung bei 37°C im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf), bevor

das DNA-Pellet mit 200µl 1x TE-Puffer in Lösung gebracht wird. Durch Inkubation dieser Lösung bei 37°C im Thermomix für mindestens drei Stunden löst sich das DNA-Pellet vollständig auf.

2.2 DURCHFÜHRUNG DER MICROARRAY-EXPERIMENTE

Die Untersuchung des humanen Genoms mit Hilfe von Microarray-Technologien ist eine etablierte Methode, um Regionen zu detektieren, die genetische Aberrationen aufweisen. Der in dieser Arbeit zum Einsatz kommende Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 Array (Affymetrix) erlaubt die Untersuchung genomischer DNA auf Kopienzahlveränderungen (copy number alterations, CNA) und Heterozygotieverluste (loss of heterozygosity, LOH). Dazu werden 906.600 über das Genom verteilte Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) durch komplementäre Proben auf dem Array abgedeckt, der zusätzlich noch 946.000 Proben zur Detektion von CNA enthält. Damit besitzen diese Arrays theoretisch eine Auflösung von 4kb; da in der Realität jedoch mehrere Probenpunkte benötigt werden, um Aberrationen zu identifizieren, beträgt die Auflösung 50-100kb.

2.2.1 PROBEN

Die Microarray-Analysen wurden an einem Kollektiv von 87 MF-Patienten (PMF n=67, post-PV MF n=14, post-ET MF n=6) durchgeführt. Diese Patienten sind waren im Rahmen der MPNSG-01-09 Studie (NCT00949364), die im Dezember 2009 aktiviert wurde und deren Rekrutierung mittlerweile beendet ist, behandelt worden. Es handelt sich um ein Studienkollektiv mit ähnlichen klinischen Charakteristika (Anämie und/oder Thrombozytopenie als wichtigstes Einschlusskriterium). In der einarmigen Phase-II Studie wurden alle Patienten mit dem immunmodulatorischen Medikament Pomalidomid behandelt. Das Labor von Frau Prof. Döhner in der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Ulm ist nationales Referenzlabor für die genetischen Analysen im Rahmen dieser multizentrischen Studie. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt

werden, dass durch Pomalidomid die Erythropoese und Thrombopoese bei einem Teil der MF-Patienten verbessert werden kann.

Für alle 87 Patienten dieses MF-Kollektivs war im Rahmen von Routineanalysen der *JAK2*-Mutationsstatus bekannt.

2.2.2 STY/NSP-RESTRIKTION

Im ersten Schritt wird die Patienten-DNA (50ng/ μ l) von zwei Restriktionsenzymen (Sty und Nsp) verdaut und so in verschieden lange Fragmente geschnitten, die unterschiedliche genomische Bereiche repräsentieren. Für beide Enzyme wird jeweils ein Mastermix hergestellt (Tabelle 6).

Nachdem 5 μ l der Patienten-DNA mit 14,75 μ l Mastermix versetzt worden sind, werden beide Reaktionsansätze in einen Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) verbracht, wo die Reaktion zu den in Tabelle 7 dargestellten Bedingungen abläuft.

2.2.3 STY/NSP-LIGATION

Nach erfolgreicher Restriktion werden im nächsten Schritt an die überhängenden Schnittstellen passende Adapter ligiert, die im weiteren Verlauf als Bindestelle für einen Primer dienen werden.

Wie bei der Restriktion sind auch hier zwei Mastermixe nötig, aus denen jeweils 5,25 μ l auf die Reaktionsansätze der Restriktion pipettiert werden, sodass nun ein Gesamtvolumen von 25 μ l vorliegt (Tabelle 8).

Diese Reaktion findet ebenfalls im Thermocycler zu den in Tabelle 9 dargestellten Parametern statt.

Nach Beendigung dieses Programms werden die Proben mit 75 μ l Molecular biology-grade water (Braun) auf ein Gesamtvolumen von 100 μ l verdünnt.

2.2.4 STY/NSP-PCR

Nun erfolgt die Amplifikation der DNA-Fragmente, bei der ein Primer an die zuvor angebrachten Adapter bindet und eine DNA-Polymerase in mehreren Zyklen die Fragmente vervielfältigt.

Dazu werden je 10µl der beiden 100µl Ligationsverdünnungen mit 90µl des PCR-Mastermix (Tabelle 10) versetzt; in einem Thermocycler durchläuft dieser Ansatz das in Tabelle 11 beschriebene Programm.

2.2.5 AUFREINIGUNG DES PCR-PRODUKTS

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt mit Hilfe von AMPure XP Beads (Agencourt). Dabei bindet die DNA an magnetische Kügelchen und kann so nach einem Waschschriff mit Ethanol (75%, Sigma-Aldrich) von überschüssigen Reagenzien gereinigt werden. Zuletzt werden die PCR-Produkte der Patienten durch einen Eluierungspuffer (Qiagen) von den Beads gelöst.

Bevor die aufgereinigten PCR-Produkte für weitere Schritte zur Verfügung stehen, wird die nach der PCR erreichte Konzentration mit Hilfe eines Spectrophotometers (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific) ermittelt. Zu diesem Zweck wird eine 1:10-Verdünnung mit Wasser angefertigt, deren optimale Konzentration bei Messung mit dem Spectrophotometer zwischen 450 und 600ng/µl liegen sollte.

2.2.6 FRAGMENTATION

In diesem Schritt wird die amplifizierte und gereinigte DNA erneut an definierten Stellen geschnitten und so eine Vielzahl von Fragmenten erzeugt. Zu 45µl gereinigter Patienten-DNA werden zuerst 5µl Fragmentation Buffer pipettiert und anschließend werden diesen 50µl weitere 5µl des Mastermix (Tabelle 12) hinzugefügt. In einem Thermocycler findet die Reaktion zu den in Tabelle 13 genannten Bedingungen statt.

2.2.7 LABELING

Die so entstandenen Fragmente werden nun an ihrem Ende mit Biotin versehen, an das später der Farbstoff binden wird. Dazu werden zu der fragmentierten DNA 19,5µl des Labeling-Mastermix pipettiert und dieser Ansatz schließlich in einen Thermocycler verbracht (Tabellen 14 und 15).

2.2.8 HYBRIDISIERUNG

Zunächst müssen der gelabelten Patienten-DNA 190µl eines Hybridisierungs-Mastermix hinzugefügt werden und diese Komponenten ein Thermocyclerprogramm durchlaufen (Tabellen 16 und 17).

Danach wird der fertige Hybridisierungs-Mix auf den Affymetrix Nsp/Sty 6.0 Array gegeben und dieser sofort in einen Hybridisierungs-Ofen (GeneChip Hybridization Oven 640, Affymetrix) überführt. Dort wird der Array für 16 bis 18 Stunden bei 50°C und 60Upm inkubiert; dabei bindet die Biotin-markierte DNA an die komplementären Sequenzabschnitte auf dem Array.

2.2.9 WASCHEN, FÄRBEN UND SCANNEN

Danach wird der Array mehrmals mit zwei verschiedenen Wasch-Puffern (Tabellen 18 und 19) gewaschen, um die verbliebenen, nicht gebundenen PCR-Produkte zu entfernen. Auch die anschließende Färbung erfolgt in mehreren Schritten: Bei einer ersten Färbung wird der Fluoreszenzfarbstoff Streptavidinphycoerythrin (SAPE) an die Biotin-markierte DNA gekoppelt. Im zweiten Schritt wird ein Biotin-gekoppelter Antikörper an SAPE gebunden und schließlich erfolgt ein letzter Färbedurchgang, bei dem sich SAPE erneut an das Antikörper-gebundene Biotin ankoppeln kann (Tabellen 20 - 22). Auf diese Weise wird das Fluoreszenzpotential des Array deutlich erhöht. All diese Vorgänge erfolgen in einer dafür vorgesehen Waschstation (GeneChip Fluidics Station 450, Affymetrix).

Nach erfolgreicher Färbung müssen die Arrays mit Array Holding Puffer (Tabelle 23) luftblasenfrei befüllt werden. Beim nun folgenden Scannvorgang wird die Fluoreszenz durch einen Argonlaser angeregt und die dabei vom Probenmaterial emittierte Fluoreszenzintensität gemessen (GeneChip Scanner 3000 7G, Affymetrix).

2.3 DURCHFÜHRUNG DER DNA-SEQUENZANALYSE

Durch die Sequenzanalyse der 58 *NF1*-Exons und der 16 *SUZ12*-Exons können beide Gene auf Nukleotidebene untersucht werden. So ist es möglich, auch kleinste genomische Veränderungen (Substitution, Insertion und/oder Deletion) in diesen Genen zu finden, die bei der Anwendung anderer Methoden unentdeckt blieben.

2.3.1 PROBEN

Die *NF1/SUZ12*-Sequenzanalyse wurde an einem Kollektiv von 29 sAML-Patienten durchgeführt. Es handelt sich hierbei um die an unserem Zentrum verfügbaren Proben von Patienten mit ursprünglicher ET-, PV oder MF, die in eine AML transformiert sind und die in der Tumorbank der Klinik für Innere Medizin III seit 2005 durch strukturiertes Biobank asserviert wurden und für molekulargenetische Analysen zur Verfügung stehen. Die Kohorte der 29 sAML-Patienten wurde bereits zu einem früheren Zeitpunkt mittels SNP-Array Analysen hinsichtlich genomischer Aberrationen untersucht. Daher kann auf diese Daten im Rahmen dieser Arbeit zurückgegriffen werden.

2.3.2 cDNA SYNTHESE

Die cDNA ist die komplementäre, einzelsträngige DNA, die aus der mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase synthetisiert wird; folglich besteht die cDNA nur aus Exons. Bei der cDNA Synthese kommt das cDNA-QuantiTect Kit (Qiagen) zum Einsatz. Dabei wird im ersten Schritt die Patienten-RNA mit RNase freiem Wasser und einem Wipeout Buffer vermischt, um so mögliche DNA Kontaminationen zu eliminieren. Dieser Reaktionsansatz wird für 2 Minuten bei 42°C inkubiert und danach sofort auf Eis überführt. Anschließend wird er mit einer reversen Transkriptase, dNTPs, einem Puffer sowie einem Primermix und/oder Hexameren mit zufälliger Basenabfolge (random hexamere) versehen (Tabelle 24). Diese Hexamere dienen als unspezifische Primeräquivalente und sollen die cDNA-Synthese beschleunigen und die Ausbeute erhöhen. Im Thermocycler erfolgt unter den in Tabelle 25 genannten Bedingungen dann die Synthese der cDNA.

2.3.3 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, eine gewünschte Zielsequenz in DNA und cDNA zu amplifizieren und diese vervielfältigten Abschnitte weiteren Untersuchungen zuzuführen. Ausgangsmaterial für die PCR ist die zuvor gewonnene Patienten-DNA, die mit den restlichen für diese Reaktion benötigten Reagenzien versetzt wird:

Einem Primerpaar (vorwärts und rückwärts), das an die 3'-Enden der Einzelstränge bindet und so den zu amplifizierenden Bereich vorgibt (die für die Sequenzierung für *NF1* und *SUZ12* verwendeten Primer sind in den Tabellen 26 und 27 aufgelistet), einer Polymerase, die die Elongation dieses Abschnittes vornimmt, Desoxyribonukleotide (dNTPs), aus denen die DNA-Kopien synthetisiert werden, und schließlich einer Pufferlösung und $MgCl_2$.

Die Mastermixe für die Exons 2-58 des *NF1*-Gens sowie für die Exons 2-16 des *SUZ12*-Gens sind den Tabellen 28 und 29 zu entnehmen.

Für die Exons 1 der beiden Gene war auf Grund ihrer GC-reichen Sequenz ein anderer Mastermix nötig, der zusätzlich mit einem Enhancer versehen ist, um die sehr stabilen GC-reichen Regionen zu denaturieren (Tabelle 30 und 31).

Die Amplifikation selbst erfolgt in mehreren Zyklen, die jeweils in drei Schritten ablaufen: Der Zyklus beginnt mit der Denaturierung der DNA, bei der sich der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge trennt. Dieser Vorgang ist essentiell, um im nächsten Schritt das Anbinden des jeweils für ein Exon spezifischen Primerpaares an das 3'-Ende der Einzelstränge zu ermöglichen (Annealing). Zuletzt folgt die Elongation durch die Polymerase, bei der, der durch die Primer eingegrenzte DNA-Abschnitt vervielfältigt wird. Nach 30 Zyklen liegen genug Kopien der Zielsequenz vor, sodass durch Abkühlen des Reaktionsansatzes die PCR beendet werden kann.

Praktisch wird der Reaktionsansatz dazu in eine Micro Amp Optical 96-Well Platte (Applied Biosystems) pipettiert, wobei zu 1µl Patientenprobe jeweils 24µl des entsprechenden Mastermix gegeben werden. Als no template control (NTC) wird zusätzlich für jeden Mastermix ein PCR-Ansatz ohne Patienten-DNA mit auf die Platte pipettiert.

Die PCR erfolgt in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2720, Applied Biosystems) und bis zur weiteren Verwendung wird das PCR-Amplifikat bei 4°C gelagert (Tabellen 32-34).

2.3.4 PCR-PRODUKTKONTROLLE

Die PCR-Produktkontrolle erfolgt mittels Gelelektrophorese, bei der die PCR-Produkte in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dazu wird im ersten Schritt aus 2g Agarose (Sigma-Aldrich) und 100ml 1xTAE-Puffer ein 2%-Agarosegel hergestellt, welches als Laufmatrix für die Fragmente dient. Es werden jeweils 5µl PCR-Produkt und 5µl Ladepuffer Orange G (eigene Herstellung) gemischt und in die Geltaschen pipettiert; mit der NTC wird ebenso verfahren und zur Größenanalyse des PCR-Produkts werden jeweils 5µl einer 100bp-Ladder (Track It 100bp, Invitrogen) in die erste und letzte Geltasche verbracht. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt bei 140 V, 400 mA und 100 W für 40 Minuten.

Nachdem das Gel in einer Färbelösung (1%, 10mg/ml, Roth) für 45 Minuten mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid gefärbt worden ist, kann das Ergebnis der Gelelektrophorese unter UV-Licht (GeneSnap, Syngene) sichtbar gemacht und dokumentiert werden (Abbildung 1).

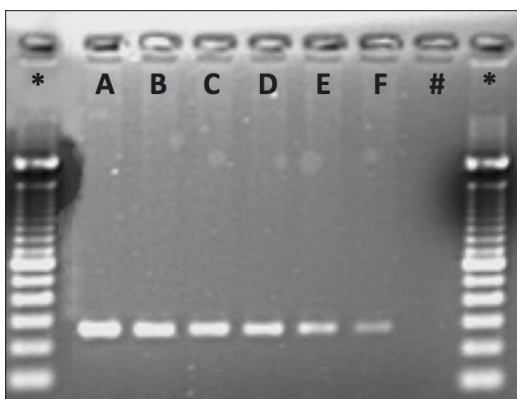


Abbildung 1. Gelelektrophoretische Auftrennung der Polymerasekettenreaktion (PCR)-Produkte. Zu erkennen sind die beiden 100bp-Ladder (*), die no template control (NTC) (#) sowie die amplifizierten PCR-Produkte (A-F).

2.3.5 AUFREINIGUNG DES PCR-PRODUKTS

Bevor die PCR-Produkte weiterverwendet werden können, müssen sie von ungebundenen Primerpaaren und überschüssigen Reagenzprodukten gereinigt werden, die die nachfolgenden Reaktionen beeinträchtigen würden. Dieser Schritt erfolgt mit Hilfe eines PCR Purifikation Kit (QIAvac 96-Kit, Qiagen), das zu diesem Zweck eine Vakuumpumpe und diverse Puffer enthält.

Zunächst wird das PCR-Produkt auf eine spezielle 96-Well Top-Platte des QIAvac 96-Kit pipettiert und anschließend werden 100µl eines Bindepuffers (Buffer PB) hinzugefügt. Nach Anlage eines Vakuums für ca. 1 Minute wird die Lösung aus Bindepuffer und PCR-Produkt vollständig durch einen sich am Boden der 96-Well Platte befindlichen Filter gezogen, an dem nun das gesamte Produkt gebunden ist.

Im nächsten Schritt werden die PCR-Produkte durch Zugabe von 750µl eines Waschpuffers (Buffer PE) und 15-minütige Anlage eines Vakuums von den überschüssigen Reagenzien gereinigt. Nach diesem Schritt ist im Filter nun lediglich das PCR-Produkt der Patienten gebunden.

Zuletzt wird die gereinigte DNA mittels eines Eluierungspuffers (Buffer EB) aus dem Filter gelöst. Dazu wird eine dem Kit beiliegende Auffangplatte unter die 96-Well Top-Platte verbracht, nachdem letztere mit 35µl des Buffer EB versetzt worden ist. Nach Zentrifugation für 6 Minuten bei 3800Upm (Multifuge 4KR, Heraeus) kann die aufgereinigte DNA zur Aufbewahrung bei -20°C aus der Auffangplatte in eine 96-Well PCR-Platte (VWR) umpipettiert werden.

2.3.6 CYCLE SEQUENCING REACTION (CSR)

Nach der Aufreinigung wird das PCR-Produkt in eine CSR eingesetzt. Bei dieser Reaktion werden nach dem Prinzip der enzymatischen Kettenabbruchmethode (Sanger-Prinzip) DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge synthetisiert. Der Reaktionsansatz der CSR enthält neben dNTPs auch Didesoxyribonukleotide (ddNTP), die alle vier (ATP, TTP, GTP, CTP) mit einem unterschiedlichen, fluoreszierenden Farbstoff markiert sind. Diese ddNTPs führen beim Einbau in den neusynthetisierten Strang auf Grund einer fehlenden OH-

Gruppe am 3'-C-Atom zu einem Kettenabbruch, sodass am Ende der CSR DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge vorliegen, die mit dem entsprechenden ddNTP enden.

Praktisch werden die im Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) enthaltenen Komponenten (DNA-Polymerase, dNTPs, ddNTPs) mit den weiterhin benötigten Reagenzien zu einem Mastermix verarbeitet (Tabellen 35 und 36).

Danach erfolgt die CSR wie die PCR in mehreren Zyklen, beginnend mit der Denaturierung des Probenmaterials, gefolgt von der Annealing –und Elongationsphase. Nach 35 Zyklen kann die Reaktion durch Abkühlen auf 4°C beendet werden (Tabelle 37).

Die für die Sequenzierung der PCR-Produkte von *NF1* verwendeten M13-Primer tragen eine Sequenz, die auch auf allen für die PCR verwendeten forward bzw. reverse Primern zu finden ist (Tabelle 38). So ist es möglich, alle PCR-Produkte des *NF1*-Gens mit nur zwei CSR-Primern (forward und reverse) abzudecken.

Der Reaktionsansatz wird in eine Micro Amp Optical 96-Well Platte (Applied Biosystems) pipettiert, wobei zu 1µl PCR-Produkt jeweils 14µl des entsprechenden Mastermix gegeben werden. Die CSR erfolgt in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2720, Applied Biosystems) und die CSR-Produkte werden anschließend lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

2.3.7 AUFREINIGUNG DES CSR-PRODUKTS

Die Aufreinigung des CSR-Produkts erfolgt mit Hilfe des DyeEx 96 Kit (Qiagen), das ungebunden Reagenzien mittels Gelfiltration entfernt; diese werden dabei entsprechend ihres Molekulargewichts von den CSR-Produkten getrennt. Dafür wird zunächst die 96-Well Aufreinigungsplatte des Kit bei 2350Upm für 6 Minuten zentrifugiert (Multifuge 4KR, Heraeus). Beschleunigung und Bremse müssen hierbei auf die Stufen 7 bzw. 5 eingestellt werden, um die entstehende stationäre Phase in den einzelnen Gelsäulen nicht zu zerstören. Im Auffangbehälter unter der 96-Well Platte befindet sich nun der Lagerungspuffer, welcher verworfen wird. Nach dem Unterstellen einer Micro Amp Optical 96-Well Platte (VWR) kann nun das CSR-Produkt aufgebracht werden und bei erneuter Zentrifugation mit identischen Parametern wird dieses beim Durchwandern der Säulen gereinigt. In der 96-Well Platte befindet sich nun das aufgereinigte CSR-Produkt

der Patienten, während die Reagenzien in der Gelsäule verbleiben. Die so gewonnenen Produkte sollten zügig weiterverarbeitet werden.

2.3.8 SEQUENZIERUNG

Bevor die Produkte mit Hilfe des 3500Dx-Sequencers (Applied Biosystems) sequenziert werden können, müssen sie mit Hi-Di Formamid (Applied Biosystems) auf ein Gesamtvolumen von 20µl gebracht werden. Hi-Di Formamid ist ein neutrales, ungeladenes Substrat und verbessert die beim Sequenzieren gewonnenen Ergebnisse -vor allem in GC-reichen Regionen- durch Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotiden.

Nun kann die Sequenzierung nach dem Prinzip der Kapillarelektrophorese erfolgen (Sequencer 3500Dx, Applied Biosystems). Die Patienten-DNA wird dazu mittels elektrokinetischer Injektion in eine Kapillare eingebracht, in der die fluoreszenzmarkierte Probe elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Festkörper-Dioden-Laser angeregt wird. Das dadurch emittierte Licht wird durch eine Kamera beim Passieren eines Detektionsfensters aufgenommen und als elektrisches Signal gespeichert.

2.4 DATENANALYSE

2.4.1 ANALYSE DER MICROARRAY-DATEN

Das Erkennen von Kopienzahlveränderungen wird durch 946.000 auf dem Array abgebildete Oligonukleotide ermöglicht, die den jeweils komplementären Sequenzabschnitten der Patientenproben als Bindungsstellen dienen. Die emittierte Fluoreszenzintensität der erfolgreich gebundenen Patienten-DNA wird durch den Scanner ermittelt und lässt im Vergleich mit Daten einer Kontrollkohorte (siehe unten) Rückschlüsse auf die Kopienzahl (total copy number) der gebundenen Probe zu: Ein Verlust (Loss) imponiert dementsprechend als eine Verminderung der messbaren Signalintensität, bei einem Zugewinn (Gain) hingegen kann ein verstärktes Fluoreszenzsignal detektiert werden.

Darüber hinaus können durch Microarray-Analysen auch Heterozygotieverluste (loss of heterozygosity, LOH) identifiziert werden. Bei einem LOH ist im betroffenen Bereich nur ein Allel vorhanden. Das kann zum einen durch den Verlust einer Kopie eines genomischen Bereichs bedingt sein; dieses Phänomen wird schon in der Kopienzahl-Analyse detektiert. Zum anderen können Allele mit darauffolgender Verdopplung des verbliebenen homologen Abschnitts verloren gehen. In diesem Fall stammen nun beide Kopien von einem Elternteil, weshalb man dieses Ereignis auch "uniparentale Disomie" (UPD) nennt. Es handelt sich dabei um Kopienzahl-neutrale Heterozygotieverluste, die durch sogenannte SNP-Arrays identifiziert werden können. Zu diesem Zweck sind auf einem solchen Array die beiden möglichen Ausprägungsformen von 906.600 Einzelnukleotidpolymorphismen als kurze Sequenzabschnitte abgebildet und nach Binden der fluoreszenzmarkierten Patienten-DNA ist es durch den Vergleich der beiden Intensitätswerte möglich, den Allelstatus eines SNP (AA, AB oder BB) zu bestimmen. Im Vergleich mit der "total copy number" können nun auch Regionen erkannt werden, in denen die Gesamtfluoreszenzintensität der Sequenz unverändert ist und lediglich die Allel-spezifische Intensität Auffälligkeiten zeigt.

Nach dem Einscannen der Arrays wird deren Qualität anhand der "Contrast quality control" (Contrast QC) ermittelt. Dabei wird durch eine Software (Genotyping Console, Affymetrix) ermittelt, inwieweit sich die SNP-Signale den drei möglichen Genotypen (AA, AB, BB) zuordnen lassen. Dazu werden die Kontrastunterschiede von homozygoten und heterozygoten Genotypen verglichen. Bei guten Ergebnissen sind diese Unterschiede deutlich ausgeprägt und entsprechen einer Contrast QC von $>0,4$, die bei allen für diese Arbeit durchgeführten Proben nicht unterschritten worden ist.

In einem weiteren Schritt werden die Rohdaten der SNP Arrays gegen einen Satz eigener Referenzen normalisiert. Als Referenzpool dient hierbei T-Lymphozyten-DNA von 10 MPN-Patienten. Deren T-Lymphozyten wurden mit Hilfe ihrer spezifischen Oberflächenmarker durch Zellseparation aus dem Pool der mononukleären Zellen isoliert; die Reinheit der so gewonnenen lymphatischen Zellen wurde mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Analyse ermittelt, um sicherzustellen, dass sich keine myeloischen Zellen mehr in der Probe befinden.

Nun können die Chip-Daten mittels der Software Genotyping Console (Affymetrix) auf Kopienzahlveränderungen (copy number alterations, CNA) und LOH hin untersucht werden. Dieses Programm ermöglicht ein einfaches und sicheres Erkennen von Aberrationen: Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Proben werden auf der sogenannten Heatmap für jedes Chromosom dargestellt und eine CNA durch die abweichende Farbintensität der betroffenen Region sichtbar (Abbildung 2).

Anschließend kann das betroffene Chromosom detailliert betrachtet werden und unter Zuhilfenahme des UCSC Genome Browser (Kent et al. 2002) lassen sich die in den betroffenen Regionen liegenden Gene identifizieren.

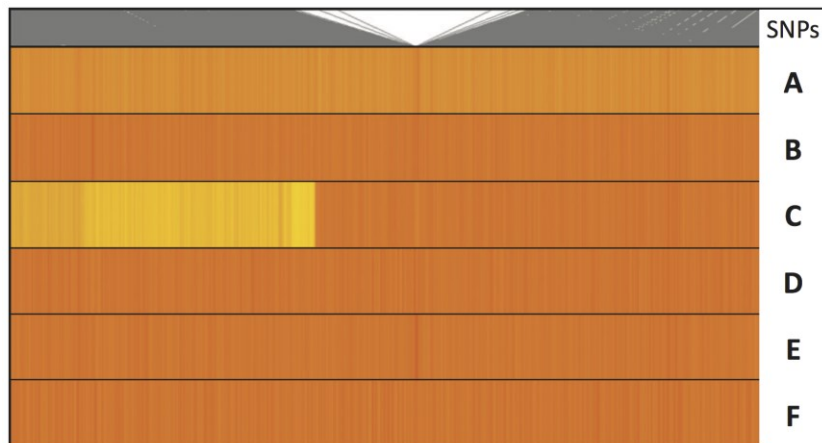


Abbildung 2. Fluoreszenzintensitäten, dargestellt auf einer Heatmap. Zu erkennen sind die auf einem Chromosom abgebildeten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) sowie die untersuchten Proben (A-F). Die Aufhellung, die Probe C in der Heatmap zeigt, entspricht einer Anhebung der Signalintensität in diesem Bereich des Chromosoms. Damit zeigt Probe C eine "copy numer alteration" (CNA) im Sinne eines großen Zugewinns (Gain) in dieser Region.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei UPDs um Kopienzahl-neutrale Veränderungen, die folgerichtig in der Heatmap nicht zu erkennen sind. In solchen Fällen ermöglicht die gemeinsame Analyse der normierten Fluoreszenzgesamtintensität ("Log2Ratio") und der Alleldifferenz ("Allele Difference") das Aufspüren dieser Aberrationen (Abbildung 3).

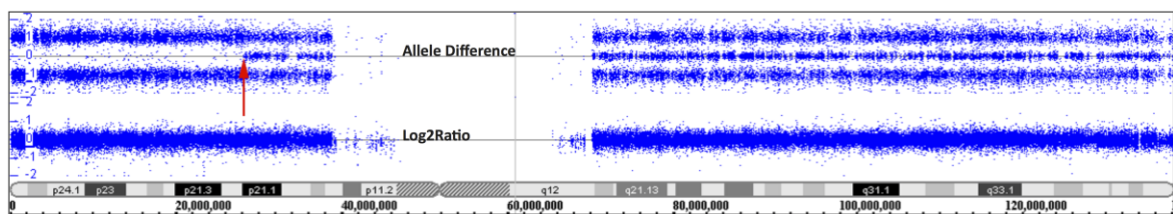


Abbildung 3. Darstellung einer uniparentalen Disomie (UPD) auf Chromosom 9 durch die Genotyping Console. Deutlich ist das für eine UPD charakteristische Muster aus unveränderter Fluoreszenzgesamtintensität (Log2Ratio) und abnormen Werten der Alleldifferenz (Allele Difference) zu erkennen. Der rote Pfeil markiert die Stelle, an der die UPD endet und sich die detektierten Werte der Alleldifferenz normalisieren.

2.4.2 ANALYSE DER DNA-SEQUENZIERUNG

Die bei der Sequenzierung erhaltenen Rohdaten müssen vor der Auswertung durch ein Computerprogramm analysiert werden (Sequencing Analysis 5.2, Applied Biosystems). Da jedes der vier unterschiedlichen ddNTPs eine eigene Fluoreszenzmarkierung besitzt, kann die Abfolge der während der Sequenzierung detektierten Nukleotide in Form eines Elektropherogramms sichtbar gemacht werden (Abbildung 4).

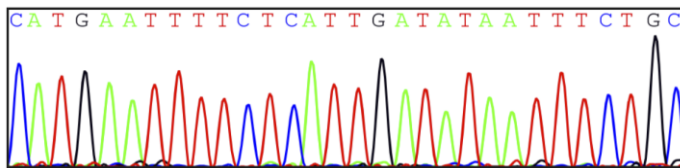


Abbildung 4. Elektropherogramm eines Sequenzabschnitts. Die vier Nukleotide werden durch verschiedenfarbige Peaks dargestellt (blau=Cytosin, grün=Adenin, rot=Thymin, schwarz=Guanin).

Eine Substitutionsmutation wird dadurch als ein weiterer, andersfarbiger Peak (entspricht einem weiteren Nukleotid) sichtbar und eine Deletion/Insertion mit folgendem Frameshift imponiert als plötzlich erscheinende Doppelsequenz.

Die so analysierten Proben werden anschließend mit Hilfe eines weiteren Computerprogramms ausgewertet (SeqMan, DNASTAR), das es ermöglicht, mehrere Proben untereinander im Sinne einer Konsensus-Analyse abzugleichen. Zudem kann ein Schwellenwert für Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) festgelegt werden, der das Erkennen von heterozygoten Mutationen ermöglicht.

3 ERGEBNISSE

3.1 SNP 6.0 ARRAYS

Für die Microarray-Experimente wurden Proben von 87 MF-Patienten (PMF n=67, post-PV MF n=14, post-ET MF n=6) verwendet. Bei Durchführung dieser Experimente waren alle Patientenproben auswertbar, sodass die Daten aller 87 Patienten des SNP-Array Kollektivs bei der Präsentation der Ergebnisse berücksichtigt werden konnten.

Zur Ermittlung der Position und der exakten Größe einer aberrierten Region wurde die *Human Genome Browser Gateway* Datenbank, Stand März 2006, NCBI36/hg18 verwendet (<http://genome.ucsc.edu/>).

Insgesamt konnten 83 Kopienzahlveränderungen (copy number alterations, CNAs) und 27 uniparentale Disomien (UPDs) in 53/87 (60%) Patienten identifiziert werden. Die Verteilung dieser genomischen Veränderungen innerhalb des Kollektivs ist in Abbildung 5 dargestellt.

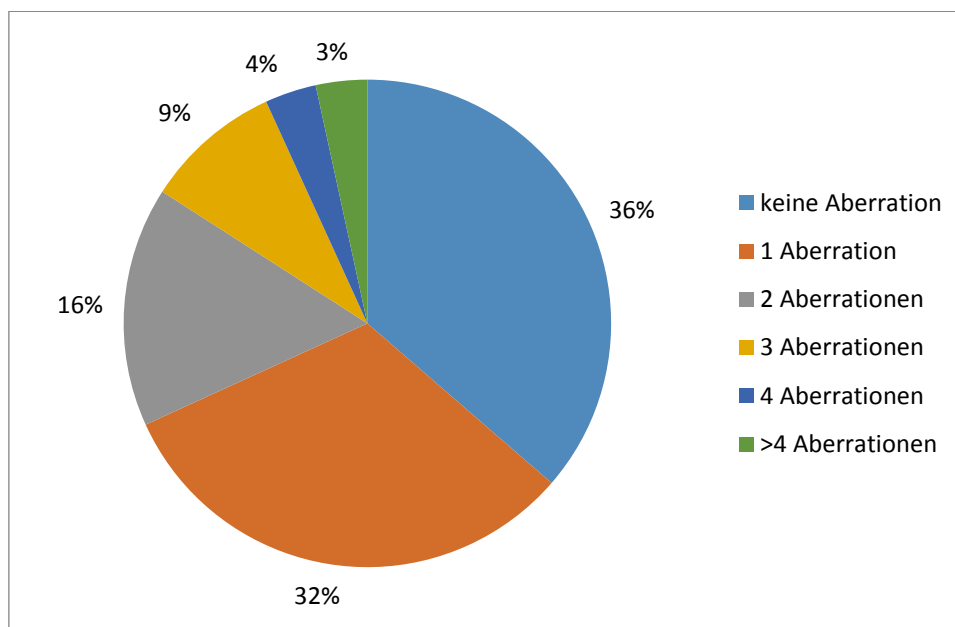


Abbildung 5. Prozentuale Verteilung der genomischen Aberrationen im untersuchten Kollektiv von 87 Myelofibrose-Patienten der MPNSG-01-09 Studie (NCT00949364).

Im Folgenden werden die längerstreckigen CNAs, UPDs und kürzere CNAs (Mikrodeletionen <5Mb) getrennt voneinander dargestellt.

3.1.1 KOPIENZAHL-ANALYSE (CNA)

In dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kollektiv von 87 MF-Patienten konnten bei 48% (42/87) der Patienten eine oder mehrere CNAs identifiziert werden. Insgesamt wurden 83 solcher Aberrationen gefunden (Tabelle 39).

Tabelle 39. Alle im untersuchten Kollektiv von 87 Myelofibrose-Patienten der MPNSG-01-09 Studie (NCT00949364) identifizierten copy number alterations (CNA); n=83

Aberration	Chromosom	Größe (Mb)	n	Pat-ID
Gain	1q12-q32.1	58,3	2	26;50
Gain	1q21.2-qter	98,2	1	12
Gain	3p24.3	1,6	1	41
Trisomie	3	N/A	1	31
Gain	5q11.2-q13.2	24	1	55
Trisomie	8	N/A	6	11;31;33;40;52;78
Gain	9p21.2-pter	27,5	1	16
Trisomie	9	N/A	4	31;33;41;52
Gain	11q14.3	45,7	1	11
Gain	13q21.1-qter	54,9	1	55
Trisomie	13	N/A	1	11
Gain	15q14-qter	63	1	11
Gain	15q23-q24.2	6,4	1	55
Trisomie	16	N/A	1	33
Gain	18p11.32-p11.21	14,8	1	83
Gain	18q22.3-q23	1,1	1	14
Gain	20p12.2	0,7	1	45
Aberration	Chromosom	Größe (Mb)	n	Pat-ID
Loss	3p14.1-p11.2	19,4	1	52
Loss	4q23-q25	6,9	1	67
Loss	4q24	0,8	1	19
Loss	4q26-q27	6,4	1	67
Loss	5q31.2	1,6	1	88
Loss	5q11.2	0,3	1	6
Loss	5q13.2-qter	107,9	1	55
Loss	5q14.3-q31.3	48,9	1	95
Loss	5q14.3-q33.2	68,4	1	90
Loss	5q14.3-q34	78,6	1	92
Loss	5q23.1-qter	61,5	1	6
Loss	6p22.1-pter	28,7	1	12
Loss	6q13-q14.3	15	1	20
Monosomie	7	N/A	2	83;91
Loss	7p12.1-p12.3	5,8	1	6
Loss	7p12.1-pter	53	1	17
Loss	7p22.3-p22.2	1,6	1	55
Loss	7p22.1-p12.2	44,3	1	55
Loss	7q22.1	0,8	1	6

Fortsetzung von Tabelle 39 auf Seite 30

Fortsetzung von Tabelle 39 auf Seite 29

Aberration	Chromosom	Größe (Mb)	n	Pat-ID
Loss	7q22.2-qter	53,4	1	6
Loss	7q35-qter	13,2	1	17
Loss	9q21.31-q22.31	12,3	1	57
Loss	12p13.2-p13.1	1,6	1	11
Loss	12p13.2-p12.3	3,2	1	58
Loss	12p13.2-p12.1	13	1	40
Loss	12q24.31	1,2-1,8	3	56;81;85
Loss	13q12.3-q21.2	27,4	1	73
Loss	13q13.3-q21.1	16,6	1	55
Loss	13q14.2-q14.3	2,9-3,3	2	22;42
Loss	15q14	2,8	1	11
Loss	15q21.3	0,6-1,1	2	56;70
Loss	15q23	1,2	1	55
Loss	15q24.2	0,5	1	55
Loss	16q22.1	0,5	1	88
Loss	16q23.2	0,3	1	16
Loss	17p13.1	1	1	6
Loss	17q11.2	1,3-6,8	3	26;57;83
Loss	18q11.2	1,6	1	6
Loss	18q12.1	0,4	1	6
Loss	19q13.31	0,2	1	27
Loss	20q13.13-q13.2	2	1	88
Loss	20q11.21-q13.12	14	2	35;41
Loss	20q11.21-q13.2	19,5-21,1	4	5;59;81;91
Loss	20q11.21-q13.31	25,1	1	19
Loss	21q22.12	1,4	1	35
Loss	Xp11.4	1,8	1	18

Bei 26 dieser Veränderungen handelte es sich um genomische Zugewinne (Gains), die bei insgesamt 19% (17/87) der Patienten gefunden werden konnten.

Auf Chromosom 1 lagen drei Zugewinne vor: Zum einen ein 98,2 Mb messender Gain auf 1q21.2-qter (n=1: ID 12), zum anderen ein rekurrenter 58,3 Mb großer Zugewinn in 1q12-q32.1, der bei 2 Patienten identifiziert werden konnte (n=2: ID 26 und 50). Chromosom 3 wies neben einem kleinen Gain bei 3p24.3 (n=1: ID 41) auch eine bei ID 31 anzutreffende Trisomie (n=1) auf. Der am häufigsten im Kollektiv anzutreffende Gain war die Trisomie 8, die bei insgesamt sechs Patienten vorlag (n=6: ID 78, 11, 31, 33, 40 und 52), gefolgt von der Trisomie auf Chromosom 9, die in vier Fällen vorlag (n=4: ID 31, 33, 41 und 52). Für Chromosom 13 waren zwei chromosomale Zugewinne zu beschreiben: Neben einem 54,9 Mb großen Gain 13q21.1-qter (n=1: ID 55) konnte eine Trisomie 13 für ID 11 (n=1) identifiziert werden. Ebenfalls zwei Gains sind auf Chromosom 15 detektiert worden: Gain 15q14-qter mit 63 Mb (n=1: ID 11) sowie der 6,4 Mb messende Gain 15q23-q24.2

(n=1: ID 55). Auch Chromosom 18 wies mit Gain 18p11.32-p11.21 (14,8 Mb, n=1: ID 83) und dem 1,1 Mb messenden Gain 18q22.3-q23 (n=1: ID 14) zwei Zugewinne auf.

Zusammenfassend waren somit Trisomie 8, Trisomie 9 und Zugewinn auf Chromosom 1q die häufigsten großen genomischen Gains in der untersuchten MF-Kohorte. Die weiteren Fälle von genomischen Zugewinnen >5 Mb können der Tabelle 39 entnommen werden.

Bei den restlichen 57 CNAs handelte es sich um genomische Verluste (Loss), die bei insgesamt 37% (33/87) der Patienten gefunden werden konnten. Im Folgenden werden die großen genomischen Verluste (>5 Mb) getrennt von den kleineren Verlusten dargestellt:

Chromosom 4 enthielt mit Verlust von 4q23-q25 (6,9 Mb, n=1) und dem 6,4 Mb messenden Verlust von 4q26-q27 (n=1) zwei Verluste >5 Mb, die beide bei ID 67 identifiziert wurden. Fünf große Verluste wurden auf Chromosom 5 detektiert: Loss 5q13.2-qter (107,9 Mb, n=1: ID 55), Loss 5q14.3-q31.3 (48,9Mb, n=1: ID 95), der 68,4 Mb messende Loss 5q14.3-q33.2 (n=1: ID 90), Loss 5q14.3-q34 (78,6 Mb, n=1: ID 92) und der 61,5 Mb große Loss 5q23.1-qter (n=1: ID 6). Chromosom 6 wies mit Loss 6p22.1-pter (28,7 Mb, n=1: ID 12) und Loss 6q13-q14.3 (1 5 Mb, n=1: ID 20) zwei große Verluste auf. Insgesamt sechs Aberrationen in Form genomischer Verluste wurden auf Chromosom 7 identifiziert: Eine Monosomie 7 (n=2: ID 91, 83), Loss 7p12.1-p12.3 (5,8 Mb, n=1: ID 6), der 53 Mb messende Loss 7p12.1-pter (n=1: ID 17), Loss 7p22.1-p12.2 (44,3 Mb, n=1: ID 55), der 53,4 Mb große Loss 7q22.2-qter (n=1: ID 6) und Loss 7q35-qter (13,2 Mb, n=1: ID 17). Mit dem 27,4 Mb messenden Loss 13q12.3-q21.2 (n=1: ID 73) und Loss 13q13.3-q21.1 (16,6 Mb, n=1: ID 55) waren insgesamt zwei große genomische Verluste auf Chromosom 13 zu finden. Drei Verluste >5 Mb konnten für Chromosom 20 beschrieben werden: Der 14 Mb messende Loss 20q11.21-q13.12 (n=2: ID 35, 41), Loss 20q11.21-q13.2 (19,5-21,1 Mb, n=4: ID 5, 59, 81, 91) und der 25,1 Mb große Loss 20q11.21-q13.31 (n=1: ID 19).

Am häufigsten waren somit der lange Arm von Chromosom 5 (Loss 5q, n=5), Chromosom 7 (Loss 7p, Loss 7q und Monosomie 7, n=6) und der lange Arm von Chromosom 20 (Loss 20q, n=3) von größeren genomischen Verlusten in dem Studienkollektiv betroffen. Die übrigen Veränderungen können Tabelle 39 entnommen werden.

Pathogenetisch besonders informative Kopienzahl-Veränderungen sind Aberrationen <5 Mb, die durch zytogenetische Untersuchungen nicht zu identifizieren sind: Diese Regionen sind klein genug, um Kandidatengene zu detektieren; Regionen mit einer Größe von >5 Mb dagegen beinhalten in der Regel eine sehr große Anzahl an Genen und erschweren dadurch die Eingrenzung von pathogenetisch relevanten Genen.

Die zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Daten bei MPN deuten darauf hin, dass vor allem kleine Deletionen (sog. "Mikrodeletionen") Gene mit pathogenetischer Relevanz beinhalten. Diese Veränderungen werden daher im folgenden Absatz genauer beschrieben.

Insgesamt konnten 30 dieser Mikrodeletionen im untersuchten MF-Kollektiv nachgewiesen werden (Tabelle 40), die sich auf 21% (19/87) der untersuchten Patienten verteilen:

Auf Chromosom 4 ließ sich eine 0,8 Mb messende 4q24 Deletion (n=1: ID 19) erkennen, die die Gene *TET2*, *PPA2* und *FLJ20184* enthält. Mit dem 0,3 Mb großen Verlust in 5q11.2 (n=1: ID 6), der die Gene *ARL15*, *HSPB3* sowie *SNX18* enthält, und der 1,6 Mb messenden 5q31.2 Deletion (n=1: ID 88) mit den betroffenen Genen *BRD8*, *CDC25C*, *CTNNA1*, *SIL1* und *UBE2D2*, waren auf Chromosom 5 zwei Deletionen <5 Mb zu finden. Auf Chromosom 7 konnten zwei Mikrodeletionen nachgewiesen werden: Loss 7p22.3-22.2 (1,6 Mb, n=1: ID 55) u.a. mit den Genen *SUN1*, *MAD1L1* und *NUDT1* sowie Loss 7q22.1 (0,8 Mb, n=1: ID 6) mit den Genen *EMID2*, *MYL10* und *CUX1*. Auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 wurden zwei Mikrodeletionen identifiziert: Zum einen Loss 12p13.2-p13.1 (1,6 Mb, n=1: ID 11) u.a. mit den Genen *ETV6*, *BCL2L14*, *LOH12CR1* und *DDX47*, zum anderen Loss 12p13.2-p12.3 (3,2 Mb, n=1: ID 58), der zusätzlich zur erstgenannten Aberration die Gene *GRIN2B* und *ATF7IP* enthält. Des Weiteren war auf dem langen Arm von Chromosom 12 die rekurrente Mikrodeletion Loss 12q24.31 (1,2-1,8 Mb, n=3: ID 56, ID 81, ID 85) zu finden, die u.a. die Gene *CABP1*, *SPPL3*, *CAMKK2* und *KDM2B* beinhaltet. Auch Chromosom 13 wies mit Loss 13q14.2-14.3 (2,9-3,3 Mb, n=2: ID 22, ID 42) eine rekurrente Aberration auf, die u.a. die Gene *SETDB2*, *ARL11* und *TRIM13* enthält. Auf Chromosom 15 waren folgende genomische Verluste <5 Mb zu identifizieren: Loss 15q23 (1,2 Mb, n=1: ID 55) mit den Genen *PIAS1*, *CALML4*, *CLN6*, *ITGA11*, *CORO2B*, *ANP32A* und *NOX5*, Loss 15q24.2 (0,5 Mb, n=1: ID 55) mit den Genen *PTPN9*, *SNUPN*, *CSPG4* und *UBE2Q2* sowie

der rekurrente Loss 15q21.3 (0,6-1,1 Mb, n=2: ID 56, ID 70) mit den Genen *ZNF280D*, *TCF12* und *CGNL1*. Auch Chromosom 16 wies mehrere Mikrodeletionen auf: Neben Loss 16q23.2 (0,3 Mb, n=1: ID 16) mit dem *CMIP*-Gen war eine 0,5 Mb messende 16q22.1 Deletion (n=1: ID 88) u.a. mit den Genen *CBFB*, *LRRC29*, *KCTD19* und *LRRC36* auf diesem Chromosom zu finden. Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 war mit Loss 17p13.1 (1 Mb, n=1: ID 6) eine Deletion vorhanden, die u.a. das *TP53* Gen enthält. Zwei Deletionen <5 Mb betrafen das Chromosom 18: Zum einen Loss 18q11.2 (1,6 Mb, n=1: ID 6) mit den Genen *RBBP8*, *CABLES1*, *LAMA3* und *HRH4*, zum anderen Loss 18q12.1 (0,4 Mb, n=1: ID 6) mit den Genen *TTR*, *B4GALT6* und *TRAPPC8*. Chromosom 19 trug mit Loss 19q13.31 (0,3 Mb, n=1: ID 27) eine kleine Deletion, die die Gene *ZNF222-226*, *ZNF233* und *ZNF235* umfasst. Auf Chromosom 20 war mit Loss 20q13.13-q13.2 (n=1: ID 88) eine 2 Mb messende Deletion zu identifizieren, die die Gene *CEBPB*, *BACS4*, *NFATC2*, *KCNG1* und *SALL4* beinhaltet. Auf Chromosom 21 war mit Loss 21q22.12 (1,4 Mb, n=1: ID 35) eine Mikrodeletion zu finden, in der sich die Gene *RUNX1* und *CBR1* befinden. Auch ein Gonosom wies eine Mikrodeletion auf: Loss Xp11.4 (1,8 Mb, n=1: ID 18), die die Gene *BCOR*, *ATP6AP2* und *MPC1L* enthält.

Tabelle 40. Auflistung der Mikrodeletionen (<5 Mb; n=30) in 87 Myelofibrose-Patienten der MPNSG-01-09 Studie (NCT00949364).

Aberration	Chromosom	Größe (Mb)	n	Pat-ID
Loss	4q24	0,8	1	19
Loss	5q31.2	1,6	2	88
Loss	5q11.2	0,3	1	6
Loss	7p22.3-p22.2	1,6	1	55
Loss	7q22.1	0,8	1	6
Loss	12p13.2-p13.1	1,6	1	11
Loss	12p13.2-p12.3	3,2	1	58
Loss	12q24.31	1,2-1,8	3	56;81;85
Loss	13q14.2-q14.3	2,9-3,3	2	22; 42
Loss	15q14	2,8	1	11
Loss	15q21.3	0,6-1,1	2	56;70
Loss	15q23	1,2	1	55
Loss	15q24.2	0,5	1	55
Loss	16q22.1	0,5	1	88
Loss	16q23.2	0,3	1	16
Loss	17p13.1	1	1	6
Loss	17q11.2	1,3-6,8	3	26;57;83
Loss	18q11.2	1,6	1	6
Loss	18q12.1	0,4	1	6
Loss	19q13.31	0,3	1	27
Loss	20q13.13-q13.2	2	1	88
Loss	21q22.12	1,4	1	35
Loss	Xp11.4	1,8	1	18

3.1.2 DIE REGION 17Q11.2

Neben der bereits oben erwähnten Deletion auf dem p-Arm von Chromosom 17 konnten auch auf dem langen Arm dieses Chromosoms Aberrationen gefunden werden:

Mit dem Loss 17q11.2 (1,3-6,8 Mb, n=3: ID 26, ID 57, ID 83) lag eine rekurrente Mikrodeletion vor, deren kleinste gemeinsam deletierte Region (1,3 Mb) die Gene *ADAP2*, *RNF135*, *OMG*, *EVI2A/B*, *COPRS*, *UTP6*, *SUZ12* und *NF1* umfasst (Abbildung 6).

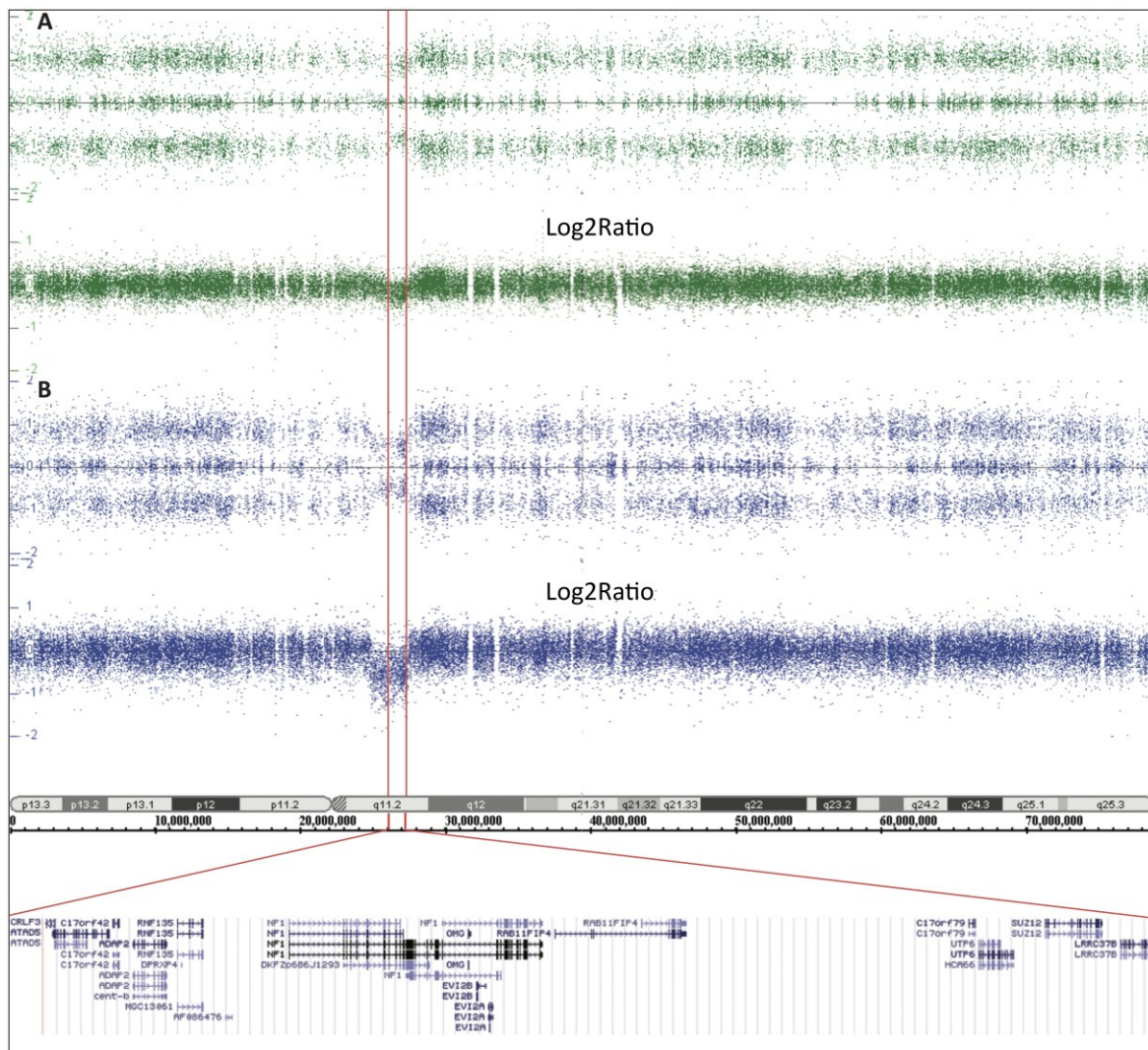


Abbildung 6. commonly deleted region (CDR) in 17q11.2. Zu sehen sind die beiden Proben der Patienten ID=26 und ID=57 (A und B) und die Mikrodeletion in 17q11.2. Die roten Linien grenzen die kleinste gemeinsam deletierte Region ein (1,3 Mb). Im unteren Bildabschnitt ist dieser Bereich exemplarisch vergrößert dargestellt, um die in dieser Deletion enthaltenen Gene aufzuzeigen, zu denen auch *NF1* und *SUZ12* gehören (Log2Ratio = Fluoreszenzgesamtintensität).

3.1.3 HETEROZYGOTIEVERLUST-ANALYSE (UPD)

Bei der Untersuchung des MF-Kollektivs auf Heterozygotieverluste ohne DNA-Verlust sind nur solche UPDs bei der Datenanalyse berücksichtigt worden, die mindestens ein terminales Ende des jeweils betroffenen Chromosoms einschließen, da aktuelle Studienergebnisse zeigen, dass es sich bei den interstitiellen UPDs in den meisten Fällen nicht um klonale Aberrationen handelt (Jankowska et al. 2009). Zur sicheren Verifizierung solcher interstitiellen UPDs müssten zusätzlich Analysen aus Keimbahnmaterial bei den betroffenen Patienten erfolgen; diese wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

Im Rahmen der Array-Analyse der 87 MF-Patienten konnten insgesamt 27 UPDs in 9 Chromosomen identifiziert werden, die den oben genannten Kriterien entsprechen (Tabelle 41). Diese Aberrationen verteilten sich auf 27% (24/87) der untersuchten Patienten.

Tabelle 41. Alle im untersuchten Kollektiv von 87 Myelofibrose-Patienten der MPNSG-01-09 Studie (NCT00949364) identifizierten uniparentalen Disomien (UPD); n=27

Aberration	Chromosom	Größe (Mb)	n	Pat-ID
UPD	1p	55,4-120	3	10;32;75
UPD	3q11.2-qter	104,5	1	54
UPD	4q13.3-qter	115,8	1	91
UPD	4q13.1-qter	131	1	51
UPD	7q22.1-qter	58,9-59,1	2	27;34
UPD	8q22.1-qter	48,7	1	77
UPD	9p	12,9-38,8	13	1;9;12;15;33;42;54;61;69;70;72;89;93
UPD	11q	66,9-77,5	2	40;88
UPD	11p11.2-pter	45,6	1	63
UPD	12q15-qter	66,6	1	70
UPD	14q24.3-qter	33,5	1	77

Rekurrente UPDs oder solche, die ein pathogenetisch interessantes Gen beinhalten, werden im Folgenden detailliert dargestellt:

Auf Chromosom 1 waren drei UPDs zu finden (n=3: ID 10, ID 32, ID 75), deren kleinste gemeinsam betroffene Region 55,4 Mb misst; in dieser Region liegt u.a. in 1p34.2 das *MPL*-Gen. Mit den beiden Disomien UPDs 4q13.1-qter (131 Mb, n=1: ID 51) und UPD 4q13.3-qter (115,8 Mb, n=1: ID 91) war auch Chromosom 4 von zwei sehr großen Aberrationen betroffen, die u.a. auf 4q24 das *TET2*-Gen enthalten. Zwei UPDs konnten auf Chromosom 7 identifiziert werden: Mit UPD 7q22.1-qter (n=2: ID 27, ID 34) ist eine Region von 58,9 Mb Größe betroffen, die u.a. die Gene *EZH2*, *CUX1* und *DOCK4* beinhaltet. Die meisten uniparentalen Disomien waren auf Chromosom 9 zu finden: Insgesamt 13 dieser Aberrationen wurden hier identifiziert (12,9-38,8 Mb, n=13: ID 1, ID 9, ID 12, ID 15, ID 33, ID 42, ID 54, ID 61, ID 69, ID 70, ID 72, ID 89, ID 93), deren kleinste gemeinsam betroffene Region u.a. auf 9p21.3 die Gene *CDKN2A* bzw. *CDKN2B* und auf 9p24.1 das *JAK2*-Gen beinhaltet.

Mit Hilfe des in vorangegangenen Untersuchungen bestimmten *JAK2*-Mutationsstatus konnte außerdem eruiert werden, dass alle im analysierten Kollektiv von einer UPD 9p betroffenen Patienten einen homozygoten *JAK2* V617F-Mutationsstatus hatten.

Auch auf dem langen Arm von Chromosom 11 konnten UPDs nachgewiesen werden (66,9-77,5 Mb, n=2: ID 40, ID 88), die u.a. das *CBL*-Gen einschließen.

3.2 NF1-SEQUENZANALYSE

Im nächsten Schritt dieser Dissertation wurde aufbauend auf den Ergebnissen der Mikroarray-Experimente die Sequenzanalyse potentieller Kandidatengene durchgeführt, um die pathogenetische Relevanz dieser Gene einschätzen zu können. Im Kollektiv der 87 MF-Patienten, die mittels der SNP 6.0 Arrays untersucht wurden, konnte eine „commonly deleted region“ (CDR) auf Chromosom 17q11.2 identifiziert werden, deren kleinste gemeinsame Deletion nur 1,6 Mb misst. Dieser Verlust beinhaltet u.a. das *NF1*-Gen, das auf Grund seiner physiologischen Funktion als Tumorsuppressorgen ein potentielles Kandidatengen darstellt. Außerdem legen frühe Daten unserer Arbeitsgruppe nahe, dass Patienten, die eine Mutation im *NF1*-Gen tragen, im Verlauf sehr rasch in eine sAML transformieren (Stegemann et al. 2010).

Um die Frage nach der Relevanz einer *NF1*-Mutation für die leukämische Transformation beantworten zu können, wurde die Sequenzanalyse des *NF1*-Gens an einer Kohorte von sAML-Patienten aus ET, PV oder MF durchgeführt; sollte *NF1* ein entscheidender Faktor für die Transformation in eine AML sein, wäre hier eine signifikante Mutationsinzidenz zu erwarten. Um diese Fragestellung zu adressieren wurden alle 58 Exons von *NF1* in einer sAML-Kohorte von 29 Patienten sequenziert und ausgewertet, sodass umfassende Sequenzdaten vorlagen.

Im Rahmen dieser Mutationsanalyse konnte bei ID 1661 in Exon 33 eine Substitutionsmutation nachgewiesen werden, bei der die Nukleinbase Adenin (A) durch die Base Guanin (G) ersetzt wird (c.4351A>G). Diese Substitution hat den Aminosäureaustausch von Asparagin (Asn) zu Asparaginsäure (Asp) zur Folge (p.Asn1451Asp); damit handelt es sich hierbei um eine *missense*-Mutation.

Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei c.4351A>G um eine erworbene klonale Mutation handelt, wurde Keimbahnmaterial (Wangenschleimhautabstrich) von ID 1661 auf das Vorliegen dieser *missense*-Mutation hin untersucht. Die anschließende Sequenzierung der Keimbahn-Probe zeigte eine WT-Sequenz für Exon 33 ohne pathologischen Befund und beweist damit, dass es sich bei dieser Substitution um eine erworbene Mutation handelt (Abbildung 7).

Um mögliche Auswirkungen dieser Substitution auf die Proteinfunktion einschätzen zu können, wurde sie diesbezüglich mittels des *SIFT*-Algorithmus analysiert (<http://sift.jcvi.org>). Dieser bioinformatische Algorithmus nutzt u.a. Sequenz-Homologien, um zu berechnen, welchen Effekt eine Aminosäuresubstitution auf die Proteinfunktion hat (Sorting Intolerant From Tolerant). Mit einem *SIFT*-Score von 0,01 ist davon auszugehen, dass es sich bei p.Asn1451Asp um eine nicht-tolerierbare Substitution mit pathologischer Auswirkung auf die Proteinfunktion handelt.

Eine weitere Substitutionsmutation konnte ebenfalls in Exon 33 für ID 2609 nachgewiesen werden, bei der es zu einem Austausch von Cytosin (C) und Adenin (A) kommt (c.4362C>A). Da diese Substitution jedoch keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat, handelt es sich hierbei um eine *silent*-Mutation (Abbildung 7).

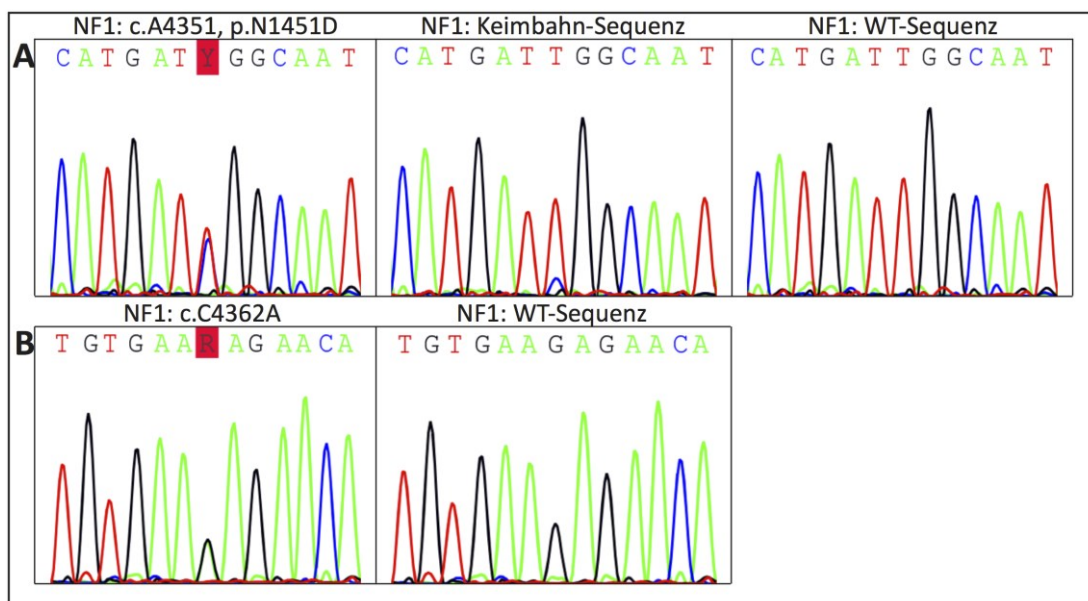


Abbildung 7. Elektropherogramm der NF1 Exon 33-Mutationen. Bei den hier abgebildeten Sequenzabschnitten handelt es sich um reverse Sequenzabschnitte. (A) Zu erkennen ist die *missense*-Mutation von ID 1661, die den Aminosäureaustausch von Asparagin zu Asparaginsäure zur Folge hat. In der Keimbahn-Sequenz ist die Substitution von Adenin zu Guanin nicht zu identifizieren, sodass es sich hierbei um eine erworbene klonale Mutation handeln muss. Daneben ist zur Bestätigung des Befundes die Wildtyp (WT)-Sequenz dieses Abschnittes dargestellt. (B) Bei der Substitutionsmutation von ID 2609 handelt es sich um eine *silent*-Mutation, die keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat. Daher wurde auf die Untersuchung von Keimbahnmaterial in diesem Fall verzichtet. Daneben ist ebenfalls die WT-Sequenz dieser Region dargestellt.

Für ID 1182 konnte in der intronischen Sequenz zwischen den Exons 44 und 45 die 26-stellige Insertion "ACAAAGGTTTTATAAGTTCTGTGGA" nachgewiesen werden. Der

dadurch entstehende *frameshift* beginnt 14 Nukleotide vor dem 5'-Ende von Exon 45 (c.6705-15_6705-14ins26). Intronsche Insertionen wie diese können durch die Modifikation von *splice sites* oder die Entstehung von sogenannten *kryptischen splice sites* durchaus Einfluss auf die extronischen Bereiche der mRNA haben und sind damit in der Lage, die Proteinbiosynthese zu beeinflussen. Möglich ist die Detektion solcher Auswirkungen nur durch eine Sequenzanalyse von cDNA, einer direkten Translation von mRNA mittels einer reversen Transkriptase. Die Sequenzanalyse der cDNA von ID 1182 zeigte eine WT-Sequenz und belegt damit, dass die oben beschriebene intronsche Insertion keine Auswirkungen auf die mRNA und damit auch nicht auf das aus ihr entstehende *NF1*-Protein hat (Abbildung 8).

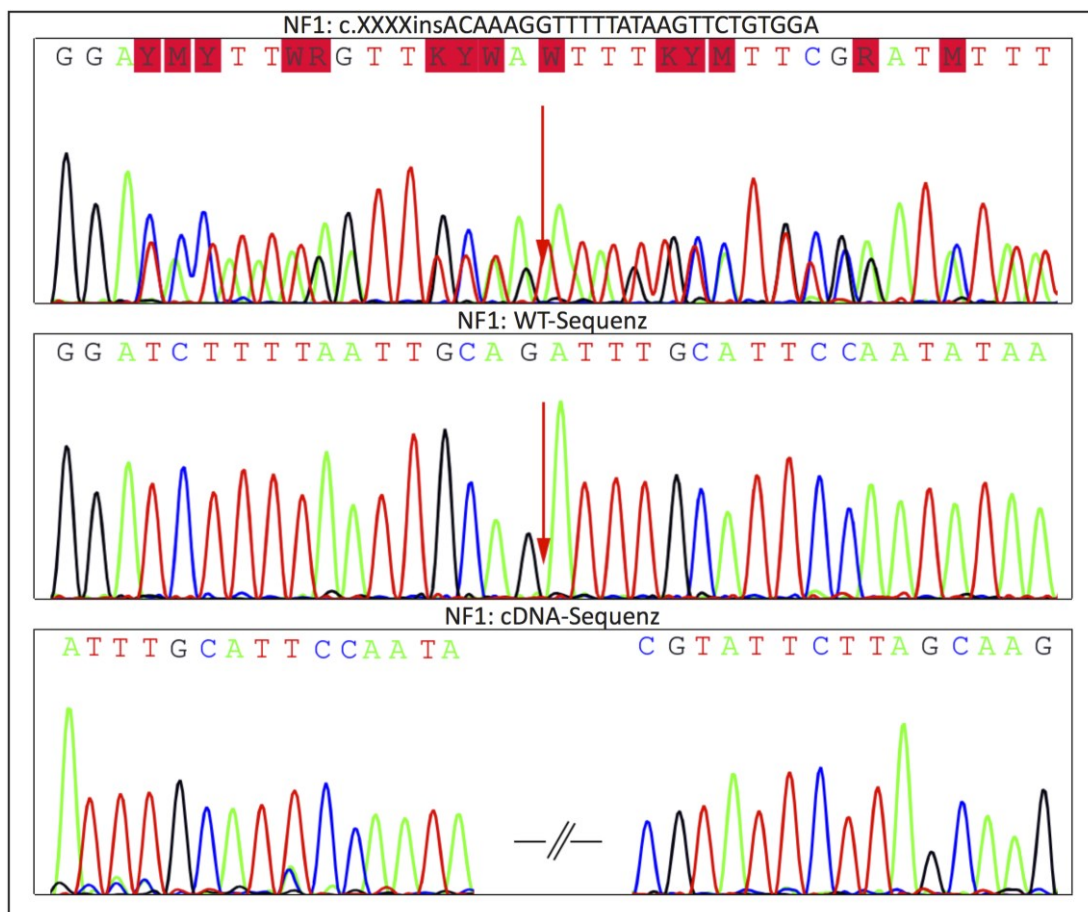


Abbildung 8. Elektropherogramm der intronschen *NF1* Insertion. Im oberen Teil des Bildes ist der Sequenzabschnitt mit dem beginnenden *frameshift* von ID 1182 zu erkennen, der durch die Insertion von 26 Nukleobasen (ACAAAGGTTTTATAAGTTCTGTGGA) bedingt ist. Der rote Pfeil markiert den Beginn von Exon 45. Darunter ist die dazugehörige Wildtyp (WT)-Sequenz dieses Abschnitts dargestellt, und der Beginn von Exon 45 erneut durch einen roten Pfeil angezeigt. Im unteren Bildabschnitt ist die sequenzierte Exon 45-cDNA von ID 1182 abgebildet, die ebenfalls die WT-Sequenz zeigt und so beweist, dass die intronsche Insertion keinen Einfluss auf die mRNA und damit auf die Proteinbiosynthese nimmt. Auf Grund ihrer Länge ist diese Sequenz verkürzt dargestellt.

Wie in Kapitel 2.2. erwähnt, liegen für dieses Kollektiv im Vorfeld generierte SNP-Array Daten vor. Unter deren Berücksichtigung ist es möglich, die Rolle, die *NF1* für die Myeloproliferativen Neoplasien spielt, noch genauer zu beschreiben und die oben genannten Ergebnisse im Hinblick auf möglicherweise vorhandene Deletionen in 17q11.2 zu ergänzen:

Neben ID 1661, der von einer *NF1* *missense*-Mutation betroffen ist (siehe Abbildung 7), sind zwei weitere Proben zu nennen, die einen auffälligen Befund in diesem Gen aufweisen: Bei den IDs 1637 und 1644 ließ sich im Rahmen der SNP-Array Analyse eine 1,9 Mb bzw. 5,9 Mb messende Deletion der Region 17q11.2 nachweisen, die u.a. das *NF1*-Gen beinhaltet. Damit liegt die Inzidenz von *NF1*-Affektionen (Mutation oder Deletion) im untersuchten sAML-Kollektiv bei 10% (3/29).

Die weiterführende Analyse der beiden Datensätze zeigt außerdem, dass alle Patienten mit einem positiven *NF1*-Befund noch eine weitere gemeinsame Genomaberration trugen, die das Tumorsuppressorgen *TP53* betrifft: Sowohl ID 1637, ID 1644 als auch ID 1661 wiesen eine biallelischen *TP53*-Inaktivierung auf: ID 1637 war von einem Loss 17p13.1-pter (7,6 Mb) und einer heterozygoten *TP53*-Mutation betroffen (c.701A>G, p.Tyr233Cys). ID 1644 zeigte in der SNP-Array Analyse einen 14,4 Mb messenden Verlust (Loss 17p12-pter) und in der Sequenzanalyse ebenfalls eine heterozygote *TP53*-Mutation (c.578A>G, p.His192Arg). Die Untersuchungsergebnisse von ID 1661 ließen eine UPD 17p sowie eine homozygote *TP53*-Mutation erkennen (c.743G>A, p.Arg248Gln).

Diese Assoziation von positiven *NF1*- und *TP53*-Befunden in unserem Patientenkollektiv ist in Tabelle 42 zusammengefasst:

Tabelle 42. Das gemeinsame Auftreten von positiven *NF1*-Befunden und biallelischen *TP53*-Inaktivierungen im Kollektiv von 87 Myelofibrose-Patienten der MPNSG-01-09 Studie (NCT00949364). Alle im Kollektiv identifizierten biallelischen *TP53*-Inaktivierungen sind mit *NF1*-Alterationen assoziiert. (UPD=uniparentale Disomie, Loss=Verlust)

ID	NF1		TP53	
	Aberration	Mutation	Aberration	Mutation
1637	Loss 17q11.2	-	Loss 17p13.1-pter	c.701A>G, p.Tyr233Cys
1644	Loss 17q11.1-11.2	-	Loss 17p12-pter	c.578A>G, p.His192Arg
1661	-	c.4351A>G, p.Asn1451Asp	UPD 17p	c.743G>A p.Arg248Gln

3.3 SUZ12-SEQUENZANALYSE

Das zweite im Rahmen der Sequenzanalyse untersuchte Gen war das ebenfalls auf 17q11.2 liegende *SUZ12*. Auch für diese Untersuchung stand das Kollektiv von 29 sAML-Patienten zur Verfügung, deren 16 *SUZ12*-Exons erfolgreich sequenziert werden konnten. Im Rahmen dieser Mutationsanalyse konnte für keine der Proben ein pathologischer Befund erhoben werden.

3.4 ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe der Microarray-Experimente insgesamt 83 *copy number alterations* (CNA) und 27 *uniparentale Disomien* (UPD) in 53/87 (60%) Patienten identifiziert werden konnten. Eine zusammenfassende graphische Darstellung dieser gewonnenen Ergebnisse ist Abbildung 9 (S. 43) zu entnehmen.

In vielen Fällen war es möglich, innerhalb dieser aberranten Regionen – auch im Kontext mit publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen – potentiell pathogenetisch relevante Gene zu identifizieren (Tabelle 43):

Tabelle 43. In 87 Myelofibrose-Patienten der MPNSG-01-09 Studie (NCT00949364) identifizierte Leukämie-relevante Kandidatengene. (UPD=uniparentale Disomie, Loss=Verlust)

Aberration	Chromosom	n	Gen	Pat-ID
UPD	1p34	3	MPL	10;32;75
Loss/UPD	4q24	3	TET2	19;51;91
Loss	7p12.2	2	IKZF1	6;17
Loss/UPD	7q22.1	3	CUX1	6;27;34
UPD	7q31.1	2	DOCK4	27;34
UPD	7q36.1	2	EZH2	27;34
UPD	9p24.1	13	JAK2	1;9;12;15;33;42;54;61;69;70;72;89;93
UPD	9p21.3	13	CDKN2A/B	1;9;12;15;33;42;54;61;69;70;72;89;93
UPD	11q23.3	2	CBL	40;88
Loss	12p13.2	2	ETV6	11;58
Loss	12q24.31	3	KDM2B	56;81;85
Loss	15q21.3	2	TCF12	56;70
Loss	16q22.1	1	CBFB	88
Loss	17p13.1	1	TP53	6
Loss	17q11.2	3	NF1/SUZ12	26;57;83
Loss	20q13.11-q13.12	7	L3MBTL1	5;19;35;41;59;81;91
Loss	21q22.12	1	RUNX1	35
Loss	Xp11.4	1	BCOR	18

Außerdem war es im vorliegenden Kollektiv möglich, die schon zuvor beschriebene Deletionsregion 17q11.2 mit den darin enthaltenen Genen *NF1* und *SUZ12* zu detektieren.

Im Zuge der anschließenden Sequenzierung dieser beiden Gene an einem Kollektiv von 29 sAML-Patienten aus ET, PV oder MF konnte eine erworbene klonale *missense*-Mutation in Exon 33 des *NF1*-Gens nachgewiesen werden. Nach Einbeziehung von ebenfalls für diese Proben vorliegenden SNP-Array Ergebnissen lässt sich für insgesamt drei Patienten des Kollektivs eine *NF1*-Alteration nachweisen. Im *SUZ12*-Gen konnte keine Mutation identifiziert werden.

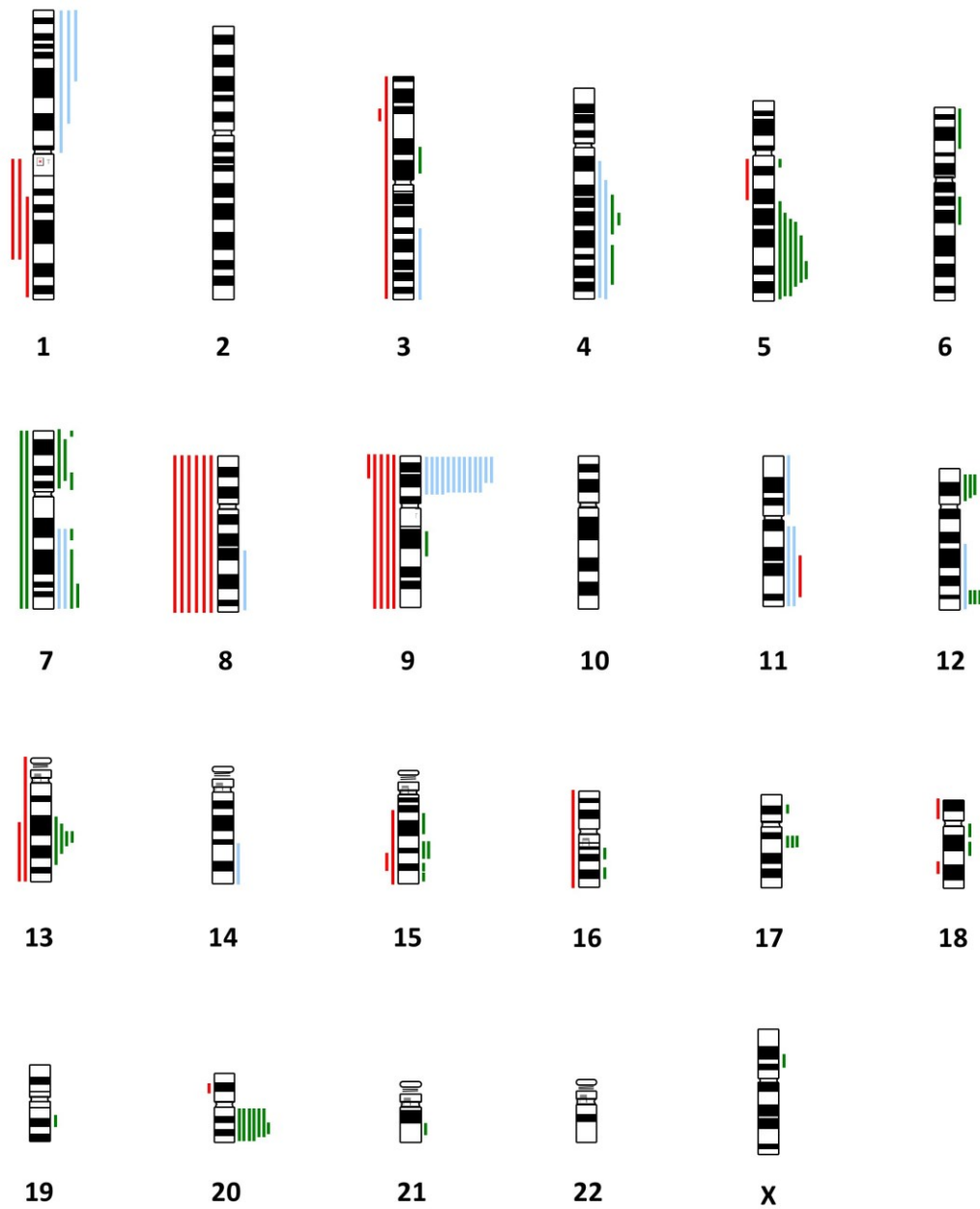


Abbildung 9. Karyogramm aller in der Kohorte von 87 Myelofibrose-Patienten der MPNSG-01-09 Studie (NCT00949364) identifizierten genomischen Aberrationen. Die Balken bilden die Größe und die Position der Aberrationen ab. grün=Verlust, rot=Zugewinn, blau=uniparentale Disomie

4 DISKUSSION

BCR-ABL1-negative MPN sind eine klinisch sehr heterogene Gruppe von hämatopoetischen Stammzellerkrankungen, deren Entstehung lange Zeit nicht erklärt werden konnte. Mit Entdeckung der *JAK2* V617F Punktmutation im Jahr 2005 war jedoch nicht nur ein wichtiger diagnostischer Marker identifiziert worden, vielmehr zeigte diese Mutation erstmals die wichtige Rolle genetischer Aberrationen in der Pathogenese der MPN auf (Kralovics et al. 2005).

Seither ist unter Zuhilfenahme immer genauerer Detektionsmethoden eine Vielzahl von relevanten Genen und Mutationen identifiziert worden, und man weiß heute, dass MPN eine außerordentliche genetische und epigenetische Heterogenität und Komplexität aufweisen (Cross 2011), deren genaue Charakterisierung und Definition unabdingbar ist für das Verstehen und das zielgerichtete Behandeln dieser Erkrankungen.

Bei den akuten myeloischen Leukämien (AML) konnte für einen Teil der Genmutationen gezeigt werden, dass sie sich negativ auf das Überleben auswirken. Bei den klinisch meist chronisch verlaufenden MPN (v.a. ET und PV, aber auch MF) steht die Transformation in eine AML im Vordergrund. Es ist also von großer Bedeutung und hoher klinischer Relevanz, solche Leukämie-relevanten genetischen Aberrationen frühzeitig zu identifizieren.

Um einen Teil zur Beschreibung dieser genetischen Komplexität beizutragen und Gene zu benennen, die an einer leukämischen Transformation beteiligt sein könnten, wurde im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Microarray-basierten Analysen das Genom von 87 homogen behandelten Myelofibrose-Patienten auf genomische Aberrationen hin untersucht.

Bei der genomweiten SNP-Array Analyse des MF-Kollektivs konnten insgesamt 83 Aberrationen bei 60% der untersuchten Patienten gefunden werden. Diese Zahlen unterstreichen die bereits oben erwähnte genetische Komplexität von MPN und decken sich mit den Ergebnissen früherer Studien (Stegelmann et al. 2010, Klampfl et al. 2011). Auch das Auftreten der am häufigsten in diesem Kollektiv vorliegenden Auffälligkeiten

(die Trisomie 8, die Trisomie 9 und der Verlust auf 20q11.21) bestätigt frühere Ergebnisse und damit auch die Validität der in dieser Arbeit erhobenen Daten.

Mit 68% lag die Inzidenz der identifizierten Aberrationen jedoch wesentlich höher als die durch konventionelle zytogenetische Methoden ermittelte, die je nach Studie mit 33-49% angegeben wird (Hussein et al. 2009, Reilly et al. 1997, Tefferi et al. 2001). Damit erlauben SNP-Arrays eine wesentlich genauere Identifizierung von Aberrationen des Genoms, was zum einen durch die höhere Auflösung dieser Methode und zum anderen durch die Detektion von UPDs möglich gemacht wird, die durch eine konventionelle zytogenetische Analyse nicht detektierbar sind.

Die Mehrzahl der betroffenen Regionen im Genom der untersuchten Proben war so groß und umfasste eine so erhebliche Anzahl an Genen, dass es kaum möglich war, in diesen Abschnitten potentielle Kandidatengene einzugrenzen. Daher waren bei der Analyse der Array-Ergebnisse Mikrodeletionen von besonderem Interesse, insbesondere solche Mikrodeletionen, die bei mehr als einem Patienten zu finden waren (commonly deleted region, CDR).

Auf Chromosom 1 fand sich in drei der Patienten eine CDR, deren kleinster gemeinsam durch die UPD 1p betroffener Abschnitt das *MPL* (*myeloproliferative leukemia virus oncogene*)-Gen auf 1p34 enthält. Dieses Gen kodiert für einen Thrombopoietinrezeptor (TpoR), der nach Bindung seines Liganden Thrombopoietin homodimerisiert und so mit intrazytoplasmatischen Tyrosinkinasen wie z.B. *JAK2* interagieren kann. Diese Kinasen generieren durch Phosphorylierung von TpoR Bindungsstellen für diverse Signalproteine und auf diese Weise übt *MPL* einen regulierenden Einfluss auf die Proliferation von Megakaryozyten und deren Differenzierung in Thrombozyten aus (Miyakawa et al. 1995, Sattler et al. 1995).

Gain-of-function Mutationen dieses Onkogens haben eine ligandenunabhängige konstitutive Aktivierung der Tyrosinkinasen und somit die Proliferation verschiedenster Zelllinien zur Folge. Das Mausmodell hat außerdem bewiesen, dass eine *MPL*-Mutation in der Lage ist, ein PMF-ähnliches Erkrankungsbild hervorzurufen, und zeigt die Relevanz solcher Mutationen bei den MPN auf (Pikman et al. 2006). *MPL*-Mutationen können in ca. 11% der MF-Fälle nachgewiesen werden (Beer et al. 2008, Staerk et al. 2006).

Mit *TET2* (*tet oncogene family member 2*) beinhalten die 0,8 Mb messende Deletion 4q24 und die beiden UPDs 4q ein Gen, das in der Pathogenese aller MPN-Entitäten eine Rolle zu spielen scheint. So sind im Mittel 14% der MPN-Patienten von einer Mutation und/oder Deletion in diesem Gen betroffen, wobei die Inzidenz bei MF-Patienten und sAML-Patienten stark ansteigt und hier bei bis zu 26% liegen kann (Abdel-Wahab et al. 2009, Delhommeau et al. 2009). Im vorliegenden Kollektiv konnte eine *TET2*-einschließende Aberration (Loss/UPD) bei drei Patienten nachgewiesen werden.

TET2 kodiert ein Enzym, das 5-Methylcytosin (5mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) abbaut; die genaue Funktion von 5hmC ist nicht abschließend geklärt, es liegen jedoch Daten vor, die vermuten lassen, dass es sich um mehr als nur ein Abbauprodukt von 5mC handelt: So konnte gezeigt werden, dass das Gleichgewicht zwischen 5mC und 5hmC einen entscheidenden Einfluss auf die Pluripotenz von Zellen hat (Ficz et al. 2011). In diesem Zusammenhang sind mehrere Phänotypen beschrieben worden: Zum einen liegen Daten vor, dass ein *TET2*-Knockdown im Mausmodell zu einer erhöhten monozytären Zelldifferenzierung führt (Ko et al. 2010), zum anderen konnte gezeigt werden, dass eine *TET2*-Haploinsuffizienz sowohl myeloische als auch lymphoproliferative Transformationen induzieren kann (Solari et al. 2014). Damit würde *TET2* eine entscheidende Rolle bei der frühen Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zuteil.

Sicher scheint jedoch zu sein, dass eine *TET2*-Mutation in zeitlichem Zusammenhang mit der Entstehung einer sAML bzw. eines Bastenschubs steht und damit ein wichtiges Ereignis im Rahmen der MPN-Progression darstellt (Abdel-Wahab et al. 2010, Schaub et al. 2010).

Die weiterführende Analyse der Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 hat eine 4 Mb messende CDR identifiziert, die auf 7p12.2 mit *IKZF1* (*ikaros zinc finger protein 1*) ein äußerst interessantes Kandidatengen enthält. Dieses Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor aus der Familie der DNA-bindenden Zinkfinger, die am Chromatin-Remodeling beteiligt sind und einen wichtigen Regulator der hämatopoetischen Differenzierung darstellen. Im Mausmodell resultieren Entwicklungsstörungen des lymphatischen und myeloischen Systems dementsprechend u.a. aus einem Funktionsverlust dieses Proteins (Georgopoulos et al. 1994, Lopez et al. 2002, Winandy et al. 1995). Auch in humanen malignen Tumorentitäten scheint *IKZF1* eine wichtige Rolle zu

spielen, allen voran in der *BCR-ABL* positiven akuten lymphatischen Leukämie (ALL), bei der sich mit über 80 Prozent die höchste Inzidenz von *IKZF1*-Aberrationen findet (Mullighan et al. 2008). Außerdem ist bekannt, dass *IKZF1* mit dem Auftreten der leukämischen Transformation von MPN assoziiert ist: So waren in einer 2010 veröffentlichten Studie 21 Prozent aller post-MPN Leukämien von einem Verlust dieses Gens betroffen (Jager et al. 2010) und es ist naheliegend, dass ein solches Ereignis mit einer schlechten Prognose für MF-Patienten vergesellschaftet ist (Strasser-Weippl et al. 2005).

Wie genau eine *IKZF1*-Haploinsuffizienz die MPN-Progression fördert, ist unklar. Es gibt jedoch Anhaltspunkte dafür, dass eine *IKZF1*-Deletion zum einen die Genomstabilität herabsetzt und zum anderen im Verbund mit einer bestehenden *JAK2*-Mutation die leukämische Transformation bedingt (Jager et al. 2010, Mullighan et al. 2009). Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigen beide Thesen: Von einer *IKZF1*-Deletion betroffenen Proben weisen sowohl einen mit 8 bzw. 11 Aberrationen komplexen Karyotyp, als auch einen positiven *JAK2*-Mutationsstatus auf.

Auf dem langen Arm von Chromosom 7 ließ sich mit der UPD 7q22.1-qter und dem Verlust 7q22.1 bei 3/87 Patienten eine nur 0,8 Mb große CDR identifizieren, die das *CUX1*-Gen (*cut-like homeobox 1*) enthält. Dieses Gen spielt eine Rolle bei der transkriptionalen Aktivierung von Zellzyklus-regulierenden Genen und ist außerdem an der Hämatopoese beteiligt (Cadieux et al. 2006, Truscott et al. 2008).

Mit diesem Gen ist möglicherweise ein neues und wichtiges Target für 7q-Deletionen gefunden worden, dessen Rolle in der Pathogenese der MPN noch kaum untersucht ist. Die Daten dieser Arbeit decken sich mit den Ergebnissen zweier weiterer Studien, die ebenfalls *CUX1*-beinhaltende Mikrodeletionen in dieser Region zum Zeitpunkt leukämischer Transformation identifizieren konnten und daher vermuten lassen, dass es sich hierbei um Leukämie-relevante Aberrationen handelt (Klampfl et al. 2011, Thoennissen et al. 2011).

Die beiden Fälle mit UPDs 7q22.1-qter enthielten noch zwei weitere interessante Gene: In 7q31.1 war mit *DOCK4* (*dedicator of cytokinesis 4*) ein Gen zu finden, dass ein GTPase-regulierendes Protein codiert und so Einfluss nimmt auf Adhärenz-Verbindungen

zwischen Zellen. Rekurrente Mutationen dieses Gens konnten bereits in soliden Tumoren nachgewiesen werden, aber auch mit nicht-soliden Tumoren konnte *DOCK4* in Verbindung gebracht werden (Yajnik et al. 2003). So konnte in myelodysplastischem Knochenmark eine signifikante Hypermethylierung und eine reduzierte Expression dieses Gens gezeigt werden. Auch war zu beobachten, dass ein *DOCK4*-Knockdown zu erhöhten Apoptoseraten in primären Knochenmarkszellen führt und damit ein Knochenmarksversagen zur Folge hat (Zhou et al. 2011).

Zwar ist die Rolle dieses Gens in der Pathogenese von MPN zum jetzigen Zeitpunkt unklar, allerdings zeigen diese Ergebnisse die Relevanz, die es in Bezug auf die Hämatopoese haben kann, und daher ist es durchaus denkbar, dass die Affektion von *DOCK4* einen entscheidenden Befund bei 7q Aberrationen darstellt.

Ein weiteres interessantes Gen in UPD 7q ist *EZH2* (*enhancer of zeste 2*), das - wie in Kapitel 1.4. beschrieben - die Histonmethyltransferase des Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) codiert, die durch epigenetische Modifikation von Chromatin u.a. in der Lage ist, die Stammzellerneuerung zu regulieren (Sauvageau et al. 2010). Das onkogene Potential von *EZH2* geht deutlich aus Studiendaten hervor, die besagen, dass ca. 13% der MF-Patienten eines untersuchten Kollektivs von einer Mutation und bis zu 25% der sAML-Patienten von einer Aberration in diesem Gen betroffen sind (Ernst et al. 2010, Makishima et al. 2010).

Diese Daten legen nahe, dass *EZH2* womöglich ein entscheidender Faktor bei der leukämischen Transformation von MPN ist. Ein solcher Zusammenhang wäre von großer prognostischer Relevanz, denn die *EZH2*-Mutation stellt für Leukämie-Patienten einen Risikofaktor dar, der mit einer signifikant erniedrigten Lebenserwartung einhergeht (Grossmann et al. 2011a).

Das Erkennen der *JAK2* (*Janus kinase 2*) V617F Mutation in den UPDs 9p zeigte - wie in Kapitel 1.4. beschrieben - erstmals die Rolle genetischer Aberrationen in der Pathogenese der MPN auf:

JAK2 spielt als intrazytoplasmatische Tyrosinkinase über den *JAK-STAT*-Pathway eine entscheidende Rolle in der Hämatopoese und die 2005 gemachte Entdeckung, dass beinahe alle Patienten, die eine UPD 9p tragen, von einer aktivierenden Punktmutation

(V617F) in diesem Gen betroffen sind, stellte einen Meilenstein in der Erforschung von MPN dar (Kralovics et al. 2005, Neubauer et al. 1998).

JAK2 V617F ist die mit Abstand am häufigsten anzutreffende Mutation bei MPN und nicht nur von diagnostischer Bedeutung, sondern auch ein vielversprechender Ansatz für eine zielgerichtete Therapie dieser Erkrankungen.

Auch in dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv stellte die *JAK2* Mutation die am häufigsten anzutreffende Aberration dar: Bei 13/87 (14%) Patienten konnte eine Hemizygotie für dieses Gen nachgewiesen werden; dabei sind die betroffenen Patienten sowohl von einer UPD, als auch von einer Inaktivierung (V617F-Punktmutation) des verbliebenen Allels betroffen. Bereits im Vorfeld generierte Daten zeigen zudem bei 36/87 (41%) der nicht von einer UPD 9p betroffenen Patienten eine *JAK2*-Punktmutation, sodass die Gesamtinzident für *JAK2* Mutationen im untersuchten Kollektiv bei 56% (49/87) liegt.

Mit *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) und *CDKN2B* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*) enthielt die UPD 9p auf 9p21.3 zwei weitere Gene, die an der Zellzyklusregulation beteiligt sind. *CDKN2A* (auch *p16* genannt) bindet an einen Vertreter der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK4), die für die Regulation des Zellzyklus in der G1-Phase verantwortlich sind (Serrano et al. 1993, Solomon 1993). Die daraus resultierende Störung des Zellzyklus hat onkogenes Potential, was durch Daten belegt ist, die eine *p16*-Aberration mit T-Zell-Leukämien und soliden Tumoren in Verbindung gebracht haben (Fujiwara et al. 1999, Nobori et al. 1994).

Eine weitere Transkriptvariante dieses Gens fungiert als Stabilisator des Tumorsuppressorgens *p53* durch die Regulation von *MDM2* (*mouse double minute 2 homolog*), das in der Lage ist, *p53* zu degradieren (Haupt et al. 1997).

CDKN2B (auch *p15* genannt) übt ganz ähnliche Funktionen aus: Dieses Tumorsuppressorgen scheint als Effektor des TGF- β (transforming growth factor beta) vermittelten Zellarrests in der G1-Phase zu fungieren und *p15*-Affektionen sind ebenfalls für mehrere Tumorentitäten beschrieben (Hannon et al. 1994).

Aus den so dargelegten Einflüssen von *p16* und *p15* auf die Wachstumsvorgänge einer Zelle wird deutlich, dass 9p21.3-einschließende Aberrationen für die Pathogenese von MPN von großer Bedeutung sein können.

Die beiden im Kollektiv beschriebenen UPDs auf Chromosom 11 beinhalteten mit *CBL* (*Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral*) ein Gen, das als E3 Ubiquitin-Ligase weitreichende Effekte auf die Zellproliferation und Zelldifferentiation hat. Bisher wurden drei *CBL*-Proteinhomologe (c-CBL, CBL-b und CBL-c) identifiziert, die allesamt an der Degradierung von Rezeptortyrosinkinasen und anderen Tyrosinkinasen beteiligt sind (Schmidt et al. 2005). Der Einfluss dieser Genprodukte auf die Pathogenese von hämatologischen Erkrankungen ist durch Tiermodelle gut beschrieben: Der *CBL*-Knockdown hat eine Hyperreagibilität der Tyrosinkinasen zur Folge und abhängig von den jeweils betroffenen Proteinhomologen resultieren daraus Phänotypen unterschiedlichster Ausprägung, vom milden proliferativen Erkrankungsbild bis hin zur rasant letal verlaufenden MPN (Murphy et al. 1998, Naramura et al. 2010).

Bei klinisch aggressiv verlaufenden MPN wurde die *CBL*-Mutation als rekurrentes Ereignis beschrieben und insbesondere die Beobachtung, dass betroffene Patienten rasch in eine sAML transformieren macht *CBL* zu einem interessanten Kandidatengen für die leukämische Transformation der MPN (Grand et al. 2009, Makishima et al. 2009).

Einen weiteren interessanten Befund zeigten Aberrationen von Chromosom 12: Hier war eine nur 1,5 Mb messende CDR zu finden, die auf 12p13.2 u.a. das *ETV6*-Gen (*ET variant 6*) beinhaltet. Als Transkriptionsfaktor ist dieses Gen maßgeblich an der Regulation der Blutbildung beteiligt und es konnte nachgewiesen werden, dass *ETV6* für die adulte Hämatopoese im Knochenmark unabdingbar ist (Wang et al. 1998). Ursprünglich wurde das Pathogenitätspotential dieses Gen bei der CML in Form der Translokation t(5;12) erkannt. Inzwischen sind eine Vielzahl von *ETV6*-Fusionsgenen (z.B. *JAK2* oder *RUNX1*) beschrieben, die jeweils mit spezifischen Leukämieformen vergesellschaftet sind (Bohlander 2005, Golub et al. 1994). *ETV6* ist jedoch nicht nur in Form von Translokationen ein wichtiger leukämischer Faktor: Bis zu 23% der akuten lymphatischen Leukämien im Kindesalter sind von einer LOH im Bereich dieses Gens betroffen (Cave et al. 1997). Diese Daten zeigen deutlich, welchen entscheidenden Einfluss *ETV6* auf die Leukämogenese nehmen kann.

Auf dem langen Arm ebenfalls von Chromosom 12 befindet sich in 12q24.31 das *KDM2B*-Gen (*lysine-specific demethylase 2B*), das im untersuchten Kollektiv in einer nur 0,8 Mb

messenden CDR zu identifizieren war. Das von diesem Gen codierte Protein ist eine Histon H3 Lysin 36 (H3K36) Demethylase und reprimiert die Transkription von ribosomaler RNA; der daraus resultierende stark negative Effekt auf die Zellproliferation macht *KDM2B* zu einem potentiellen Tumorsuppressorgen. Interessanterweise wird dieser Effekt über eine Derepression von *p15 (CDKN2B)* vermittelt, einem weiteren in diesem Kollektiv beschriebenen Kandidatengen (s.o.) (Frescas et al. 2007, He et al. 2008). Die Relevanz einer *KDM2B*-Affektion in der Pathogenese der Leukämie wird durch Daten unterstrichen, die zeigen, dass die *KDM2B*-Expression zum Zeitpunkt der Leukämogenese deutlich gesteigert ist und sich in leukämischen Stammzellen dauerhaft erhöht zeigt (He et al. 2011).

Auf Chromosom 15 war im vorliegenden Kollektiv eine 0,6 Mb große CDR zu finden, die das *TCF12*-Gen (*transcription factor 12*) enthält. Das *TCF12*-Genprodukt ist Mitglied der Helix-Loop-Helix (HLH) Familie; HLH-Proteine sind über die Repression der E-Cadherin Expression in der Lage, die epithelial-mesenchymale Transition zu induzieren, die einen essentiellen Vorgang bei der Tumorprogression darstellt (Peinado et al. 2007); so konnte nachgewiesen werden, dass die E-Cadherin Level bei AML-Patienten signifikant niedriger sind als in der untersuchten Kontrollgruppe (Chen et al. 2013). Interessanterweise geben Immunopräzipitationsexperimente Hinweis darauf, dass *TCF12* diesen Effekt mit Hilfe des *EZH2*-Genprodukts ausübt (Lee et al. 2012); das auf Chromosom 7 gelegene *EZH2* ist ebenfalls ein für dieses Kollektiv beschriebenes Kandidatengen.

Die klinische und onkologische Relevanz von durch *TCF12* induzierter E-Cadherin Repression zeigen Daten, die eine signifikante Überexpression dieses Gens bei der Metastasierung von Kolonkarzinomen beschreiben (Lee et al. 2012). Und auch für maligne hämatologische Entitäten liegen Daten vor, bei denen sich 4,4% der untersuchten PMF-Patienten von einer Mutation im *TCF12*-Gen betroffen zeigen (Tenedini et al. 2013).

Auf Chromosom 16 konnte in diesem Kollektiv eine nur 0,5 Mb messende Mikrodeletion nachgewiesen werden, die das *CBFB*-Gen (*core-binding factor, beta*) beinhaltet. *CBFB* kodiert für die β -Untereinheit der sog. core-binding factor (CBF) Familie, die als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle bei der Regulierung diverser Zellvorgänge spielt. Von besonderem Interesse sind dabei die α -Untereinheit *RUNX1* (dieses auf Chromosom

21 codierte Protein wird im weiteren Verlauf dieser Diskussion besprochen werden) sowie das von *CBFB* codierte CBF- β , deren Funktionen essentiell für die Hämatopoese zu sein scheinen (Speck et al. 2002).

Im CBF- β defizienten Mausmodell konnte ein Versagen der definitiven Hämatopoese durch das Fehlen früher hämatopoetischer Vorläuferzellen beobachtet werden (Sasaki et al. 1996). Des Weiteren ist die Beteiligung von *CBFB* beim AML-Subtyp M4Eo gut beschrieben: Durch die Inversion inv(16)(p13q22) kommt es zu einer Fusion von *CBFB* und *MYH11*. Das so entstandene Fusionsgen verhindert durch Dimerisierung die physiologische Interaktion mit *RUNX1* und führt so einer malignen Entartung der Blutbildung in den betroffenen Zellenlinien (Liu et al. 1993, Shigesada et al. 2004). Diese Erkenntnisse machen *CBFB* zu einem interessanten Kandidatengen für die leukämische Transformation bei den MPN.

Eine Mikrodeletion auf 17p13.1 umfasst mit *TP53* (*tumor protein p53*) ein Tumorsuppressorgen, das u.a. über die Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose in biologische Vorgänge innerhalb einer Zelle eingreift. Eine Keimbahnmutation von *p53* resultiert im "Li-Fraumeni Syndrom", bei dem die betroffenen Patienten ein signifikant erhöhtes Risiko haben, an Tumoren diverser Entitäten zu erkranken (Malkin et al. 1990). Dieser Umstand unterstreicht die zentrale Rolle dieses Gens bei neoplastischen Vorgängen.

So ist es nicht verwunderlich, dass *p53* auch bei MPN eine wichtige Rolle spielt: Dabei scheinen die chronischen Phasen (ET, PV und PMF) von einer Mutation in diesem Gen nicht betroffen zu sein, wohingegen bis zu 27% aller sAML-Patienten ein solches Ereignis erkennen lassen (Harutyunyan et al. 2011). Damit konnte im vorliegenden Kollektiv auf 17p13.1 eine typische Leukämie-relevante Aberration gefunden werden.

Deletionen auf dem langen Arm von Chromosom 20 zählen zu den häufigsten Aberrationen bei den Myeloproliferativen Neoplasien (Dewald et al. 1993). Auch in dem hier untersuchten Kollektiv zeigten sich 8/87 Patienten von einer solchen Deletion betroffen. Die CDR von sieben dieser acht Verluste misst 14 Mb und innerhalb dieser großen Region findet sich auf 20q11.21-13.12 das *L3MBTL1*-Gen (*Lethal(3)malignant brain tumor-like protein, isoform 1*). Sein Protein fungiert durch die Bindung an

methylierte Histone als Transkriptionsrepressor und ist damit essentiell für den Erhalt der genomischen Stabilität (Boccuni et al. 2003, Trojer et al. 2007). Auch ist bekannt, dass eine Repression dieses Proteins eine gestörte Erythropoese sowie Megakaryopoese zur Folge hat (Aziz et al. 2013). Studienergebnisse zeigen außerdem, dass es sich bei *L3MBTL1* um ein imprintetes Gen mit exklusiver Expression des paternalen Allels handelt (Li et al. 2004). Dieser Umstand bedingt, dass schon das alleinige Vorliegen einer Deletion -sofern sie das paternale Allel betrifft- in der Lage ist, einen vollständigen Funktionsverlust des *L3MBTL1*-Gens zu verursachen. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Aberrationsinzidenz unterstützt die These, dass es sich bei *L3MBTL1* um ein Gen mit pathogenetischer Relevanz für MPN handelt.

RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*) konnte in Fällen mit Loss 21q22.12 identifiziert werden. Dieser Transkriptionsfaktor ist als Mitglied der CBF-Familie -wie oben bereits beschrieben- ein essentielles Regulationselement bei der Ausdifferenzierung von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) (Okuda et al. 2001, Speck et al. 2002).

Die aktuelle Datenlage legt nahe, dass *RUNX1* ebenso wie *p53* von besonderer Bedeutung für die leukämische Transformation zu sein scheint: So sind bei sAML-Patienten *de novo* Mutationen in diesem Gen nachgewiesen worden und bei der Untersuchung großer MPN-Kollektive sind *RUNX1*-Aberrationen auf sAML-Fälle beschränkt gewesen (Ding et al. 2009, Klampfl et al. 2011).

Mit *BCOR* (*BCL-6 interacting corepressor*) in Fällen mit Loss Xp11.4 ist ein Gen von einer Aberration betroffen, dass 2011 zum ersten Mal mit leukämischen Erkrankungen in Verbindung gebracht wurde: Bei genauerer Untersuchung einer Subpopulation von AML-Patienten konnte ein gehäuftes Auftreten einer somatischen *BCOR*-Mutation nachgewiesen werden (Grossmann et al. 2011b).

BCOR ist wichtiger Faktor bei der Regulation der Hämatopoese und agiert außerdem als Repressor von *BCL6*, von dem man weiß, dass es die Gentranskription beeinflusst (Huynh et al. 2000, Wamstad et al. 2008). Mutierte und translozierte Kopien von *BCL6* spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von B-Zell Lymphomen (Ye et al. 1993); so ist es durchaus denkbar, dass Aberrationen von *BCOR* ein entscheidendes Ereignis für die Pathogenese von malignen Neoplasien oder leukämischen Erkrankungen darstellen.

Besonderes Augenmerk wurde im Rahmen der SNP-Array Analyse auf die Region 17q11.2 gerichtet, die insbesondere auf Grund früherer Ergebnisse der Arbeitsgruppe ein Genlocus ist, der interessante Kandidatengene für die leukämische Transformation von MPN enthält: So zeigen diese Daten, dass es sich bei der 17q11.2-Deletion in einem Kollektiv von MPN-Patienten um ein rekurrentes Ereignis handelt und dass bei den von einer 17q11.2-Aberration betroffenen MF-Patienten im Verlauf sehr rasch die Transformation in eine sAML zu beobachten war (Stegelmann et al. 2010).

In dem hier untersuchten Kollektiv war die Region 17q11.2 bei drei Patienten durch eine Deletion betroffen. Diese Inzidenz bestätigt die 2010 von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Ergebnisse, die einen 17q11.2-Verlust als seltenes, jedoch rekurrentes Ereignis beschreiben.

Die kleinste gemeinsame Deletion der drei nachgewiesenen Verluste misst nur 1,3 Mb und beinhaltet zwei Gene, die auf Grund ihrer physiologischen Funktionen an einer leukämischen Transformation maßgeblich beteiligt sein könnten:

NF1 (neurofibromin isoform 1) ist ein Tumorsuppressorgen, das mit der autosomal dominanten "von Recklinghausen Neurofibromatose" assoziiert ist. Das von *NF1* codierte Neurofibromin ist ein GTPase-aktivierendes Protein, das über den *Ras*-Signalweg einen modulierenden Effekt auf die Zellproliferation ausübt (Weinberg 2006).

Es ist schon lange bekannt, dass an Neurofibromatose leidende Patienten ein stark erhöhtes Risiko haben, diverse solide Tumoren, aber auch myeloische Leukämien zu entwickeln (Bader et al. 1978). Die *NF1*-Keimbahnmutation scheint ein möglicher prädisponierender Faktor für die Entwicklung einer Leukämie zu sein: Steinemann et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine biallelische *NF1*-Inaktivierung in der Lage ist, eine Neurofibromatose in eine juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) zu transformieren (Steinemann et al. 2010).

Bemerkenswert ist jedoch, dass auch Leukämie-Patienten erworbene Mutationen im *NF1*-Gen tragen. Dies ergaben Untersuchungen an Proben von pädiatrischen Patienten mit akuter lymphatischer T-Zell Leukämie (T-ALL) und akuter myeloischer Leukämie (AML) (Balgobind et al. 2008). Zum selben Ergebnis kam eine Studiengruppe, die ein Kollektiv

von adulten AML-Patienten auf das Vorliegen einer *NF1*-Mutation untersuchte (Parkin et al. 2010).

Auch bei MPN sind Affektionen des *NF1*-Gens in mehreren Studien beschrieben, in denen vor allem die Myelofibrose-Patienten von *NF1*-Aberrationen betroffen waren (Kawamata et al. 2008, Stegelmann et al. 2010). Diese Beobachtungen werden durch am Mausmodell gewonnene Ergebnisse unterstützt, die darlegen, dass eine somatische *NF1*-Mutation in HSZ den Phänotyp von MPN zur Folge hat (Le et al. 2004).

SUZ12 (*suppressor of zeste 12*) ist als ein Kernprotein des *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2) entscheidend an der Chromatinmodifikation beteiligt und damit in der Lage, eine Repression der Transkription zu bewirken (Sauvageau et al. 2010). Dass Störungen dieser Regulationsfunktion, bedingt durch eine Überexpression von *SUZ12*, bei einer Reihe von soliden Tumoren gefunden werden kann, ist bereits seit einigen Jahren bekannt (Rajasekhar et al. 2007, Sparmann et al. 2006).

Für *EZH2*, ein weiteres Kernprotein des PRC2, ist beschrieben, dass Mutationen und Aberrationen mit dem Auftreten von MPN und Leukämien assoziiert sind und außerdem die Lebenserwartung von Betroffenen signifikant senken (Ernst et al. 2010, Grossmann et al. 2011a, Makishima et al. 2010).

Man kann daher vermuten, dass *SUZ12* als Kernprotein auch Einfluss auf die Entstehung und Progression von nicht-soliden Tumoren hat, und es liegen Daten vor, die diese Vermutung untermauern: So konnte gezeigt werden, dass eine *SUZ12*-Mutation in HSZ deren Aktivität im Vergleich zu WT-HSZ erheblich steigert, was dieses Gen zu einem potentiellen Tumorsuppressorgen werden lässt (Majewski et al. 2008). Auch gibt es Indizien dafür, dass eine *SUZ12*-Mutation und nicht eine *NF1*-Mutation das entscheidende Target hinter 17q11.2-Aberrationen bei MPN-Patienten darstellt (Score et al. 2011).

All diese Erkenntnisse machen *NF1* und *SUZ12* zu interessanten Kandidatengenen in der Gruppe der MPN. Beide Gene liegen nur ca. 600 bp voneinander entfernt auf dem langen Arm von Chromosom 17 und so ist es durchaus möglich, dass eine relevante Interaktion zwischen *NF1* und *SUZ12* besteht. 17q11.2 beinhaltende Aberrationen konnten in dieser Arbeit dreimal bestätigt werden und geben Hinweis darauf, dass diese Region bei einem

Teil der Patienten eine wichtige Rolle bei der Entstehung und/oder Progression der MPN spielt.

Um die Rolle, die die Region 17q11.2 mit den darin enthaltenen Genen *NF1* und *SUZ12* bei der leukämischen Transformation der MPN spielt, genauer zu untersuchen, wurden im zweiten Teil der hier vorliegenden Arbeit die Exons von *NF1* und *SUZ12* in einem Kollektiv von 29 sAML-Patienten sequenziert.

Im Rahmen der Sequenzanalyse dieser beider Gene konnte bei einem Patienten mit sAML eine *missense*-Mutation (Exon 33) in *NF1* nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung von für dieses Kollektiv ebenfalls vorliegenden SNP-Array Daten lassen sich zusätzlich zwei Proben mit einer *NF1* beinhaltenden 17q11.2-Deletion ausmachen, sodass die Inzidenz von *NF1*-Affektionen im sAML-Kollektiv bei 10% (3/29) liegt.

Bemerkenswerterweise ist bei allen drei Patienten eine biallelische *TP53*-Inaktivierung nachweisbar. Das gemeinsame Auftreten dieser beiden Pathologien konnte schon für einige solide Tumorentitäten gezeigt werden: So scheint das Zusammenspiel von *NF1* - und *TP53*-Inaktivierungen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von serösen Ovarialkarzinomen zu spielen. Zu diesem Ergebnis gelangt eine Studie, in deren Kollektiv 22% der Proben von gemeinsamen Mutationen in diesen Genen betroffen waren (Sangha et al. 2008). Weitere Studienergebnisse legen dar, dass das gemeinsame Vorliegen einer biallelischen *NF1*- und *TP53*-Inaktivierung stark mit dem Auftreten maligner Neurofibrome bei der Neurofibromatose Typ I Erkrankung assoziiert ist. Dieses Mutationmuster ist nicht in den benignen Tumoren zu beobachten und so liegt die Vermutung nahe, dass die maligne Progression der Neurofibromatose Typ I Erkrankung neben der somatischen Inaktivierung des zweiten *NF1*-Allels einer biallelischen *TP53*-Inaktivierung bedarf (Legius et al. 1994, Rasmussen et al. 2000).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine alleinige *NF1*-Mutation auch für die leukämische Transformation der MPN nicht entscheidend ist. Die Assoziation mit *TP53*-Inaktivierungen lässt jedoch annehmen, dass diese Konstellation für einen Teil der sAML-Patienten von großer Bedeutung ist.

Die Aussagekraft der durch diese Arbeit gewonnenen Daten ließe sich weiter steigern, wenn für die SNP-Array Analyse "matched pairs", also sowohl Tumormaterial als auch tumorfreies Material von einem Patienten zur Verfügung gestanden hätten. Ein direkter Vergleich dieser beiden Proben würde die Detektion Krankheits-relevanter Aberrationen deutlich erleichtern.

Oft werden im Rahmen von "matched pair" Analysen jedoch Proben verwendet, die nach erfolgreicher Chemotherapie im Stadium einer kompletten Remission entnommen wurden. Solche Proben stehen bei MPN-Patienten nicht zur Verfügung, da bei diesen Patienten in der Regel keine remissionsinduzierende Chemotherapie durchgeführt wird.

Eine Möglichkeit tumorfreies Material -sog. Keimbahnmaterial- zu gewinnen, ist die Entnahme von z.B. Hautbiopsien. Da viele der Patienten des MF-Kollektivs im Rahmen der MPNSG-01-09 Studie (NCT00949364) aus diversen Zentren der MPN-Studiengruppe in Deutschland rekrutiert worden sind und die Entnahme einer Hautbiopsie kein Routinestandard ist, ist eine systematische Asservierung von Keimbahnmaterial in dieser Form schwierig.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Erhebung des Mutationsstatus der Kandidatengene, die bei der Microarray Analyse von einer Aberration betroffen waren. Auf Grund der Vielzahl der Gene, die allein in der hier angefertigten Analyse von einer Aberration betroffen waren, ist es vor dem Hintergrund des hohen Arbeitsaufwandes kaum möglich, deren Mutationsstatus durch konventionelle Sequenzierung systematisch zu bestimmen. Daher wird die Anwendung der "Next-generation sequencing" Methode maßgeblich dazu beitragen, die den MPN zugrunde liegenden Mutationen weiter zu entschlüsseln.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die vorliegende Arbeit durch die Anwendung von SNP-Array Analysen einen wichtigen Betrag zur Charakterisierung des genetischen Profils von MPN-Patienten geleistet hat. Durch die Analyse einer definierten homogenen Patientenkohorte können repräsentative Daten generiert werden. Die hier vorgelegte Arbeit gibt einen detaillierten Einblick in die Komplexität dieser Erkrankungsgruppe und durch die Gegenüberstellung der gewonnenen Ergebnisse mit Angaben aus der

wissenschaftlichen Literatur war es möglich, charakteristische genomische Veränderungen von MPN zu identifizieren.

Die Identifizierung der von Aberrationen betroffenen Genen, die Beschreibung ihrer Funktionen und damit ihrer Rolle, die sie in der Pathogenese der Myeloproliferativen Neoplasien spielen, tragen dazu bei, diese Erkrankungen besser zu verstehen, und sind ein wichtiger Schritt hin zu neuen Behandlungsstrategien.

Die Sequenzanalyse der beiden Gene *NF1* und *SUZ12* konnte deren Rolle bei der leukämischen Transformation von MPN nicht abschließend klären. Einerseits konnten *NF1* mit dem Auftreten einer sAML in Verbindung gebracht werden, und die Assoziation dieses Befundes mit einer biallelischen *TP53*-Inaktivierung ist ein interessanter, allerdings bislang rein deskriptiver Befund. Andererseits lässt die Inzidenz solcher Mutationen vermuten, dass Gene wie *NF1* lediglich für eine Subpopulation von Patienten einen entscheidenden Faktor bei der Krankheitsprogression darstellen. Darüber hinaus müssen prospektive und funktionelle Analysen folgen, um die Bedeutung der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in der Pathogenese von MPN künftig besser zu verstehen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

BCR-ABL1-negative myeloproliferative Neoplasien (MPN) sind eine Gruppe von heterogenen, chronisch verlaufenden Stammzellerkrankungen. Die häufigsten Entitäten sind die essentielle Thrombozythämie (ET), die Polyzythämia vera (PV) und die primäre Myelofibrose (PMF). Übergänge einer ET oder einer PV nach mehrjährigem Krankheitsverlauf in eine sekundäre Myelofibrose (Post-ET bzw. Post-PV MF) finden sich in bis zu ca. 10% der Fälle. Die Prognose von MF-Patienten ist im Gegensatz zu ET und PV vergleichsweise ungünstig, da die primäre und sekundäre MF in 20-30% der Fälle in eine sekundäre akute myeloische Leukämie (sAML) transformieren und ein solcher Blastenschub ein nur geringes Ansprechen auf konventionelle Chemotherapie zeigt.

Die Einteilung von MPN basierte lange Zeit vor allem auf dem Nachweis spezifischer, morphologischer Veränderungen des Knochenmarks und des Blutbildes. Die den MPN zugrunde liegende genetische Komplexität und Heterogenität konnte erst durch die Anwendung moderner molekularer Analysemethoden klar aufgezeigt werden, die es ermöglichten, charakteristische genetische Veränderungen zu identifizieren, die in der Pathogenese aber auch für den Verlauf der MPN eine bedeutende Rolle spielen.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, das genetische Profil einer homogenen Studienkohorte von MF-Patienten zu bestimmen und auf diese Weise die Identifikation von potentiell pathogenetisch relevanten Aberrationen zu ermöglichen. Eine solche Charakterisierung der genetischen Heterogenität und Komplexität der MPN ist ein wichtiger Schritt, zum einen um die Erkrankung besser verstehen und klassifizieren zu können, zum anderen um zielgerichtete Therapieansätze entwickeln zu können.

Zu diesem Zweck wurde ein homogenes Studienkollektiv von 87 Patienten aus der MPNSG01-09 Studie (NCT00949364) mit primärer oder sekundärer MF mittels DNA-Extraktion und anschließender hochauflösender SNP-Array Analysen untersucht, die eine genomumfassende Identifizierung von Veränderungen erlauben. Dabei konnten bei 53/87 (60%) der MF-Patienten insgesamt 110 teils rekurrente Aberrationen nachgewiesen werden: 26 Zugewinne (Gain), 57 Verluste (Loss) und 27 Kopienzahl-neutrale Heterozygotieverluste (UPD). Ein Teil der identifizierten Veränderungen war bereits aus zytogenetischen Analysen bei MPN bekannt (z.B. Trisomie 8, Trisomie 9, Deletion 20q)

und belegt die Validität der Methode. Außerdem konnten durch die SNP-Array Analysen Kandidatengene identifiziert werden, die ebenfalls bereits mit der Pathogenese von MPN in Zusammenhang gebracht wurden (z.B. *JAK2*, *MPL*, *CBL*, *TET2*, *EZH2*).

Besonders interessant ist die Identifizierung von Mikrodeletionen (< 5Mb), deren Größe es ermöglicht, neue Kandidatengene zu benennen. Im untersuchten Kollektiv konnten 23 solcher Mikrodeletionen mit einer Vielzahl von Genen identifiziert werden (*CUX1*, *ETV6*, *KDM2B*, *TCF12*, *CBFB*, *BCOR*, *NF1*, *SUZ12*), die eine wichtige Rolle bei der leukämischen Transformation der MPN spielen könnten. Aufgrund ihres rekurrenten Auftretens (n=3) wurde die Mikrodeletion 17q11.2 mit den beiden Kandidatengenen *NF1* und *SUZ12* eingehender untersucht. Die Daten zu dieser Mikrodeletion wurden mit einem unabhängigen Kollektiv von 29 sAML-Patienten verglichen, für die bereits SNP-Array Daten vorlagen. Da 17q11.2 Mikrodeletionen in diesem sAML-Kollektiv ebenfalls rekurrent vorkamen (n=2), wurden *NF1* und *SUZ12* hinsichtlich des Auftretens von Mutationen im sAML-Kollektiv mittels Sequenzierung näher analysiert. Dabei konnte in einem Fall ohne 17q11.2 Mikrodeletion eine *missense*-Mutation im *NF1*-Gen identifiziert werden, während keine *SUZ12*-Mutationen nachweisbar waren. Ein interessanter Befund war außerdem, dass Aberrationen des *NF1*-Gens (Deletion oder Mutation) im sAML-Kollektiv mit einer gleichzeitig vorliegenden biallelischen *TP53*-Inaktivierung assoziiert waren.

Insgesamt handelt es sich bei den identifizierten Patienten mit *NF1*-Veränderungen sowohl bei den MF-Studienpatienten als auch in der sAML-Kohorte um kleinere Subpopulationen (3% bzw. 10%), was die genetische Heterogenität von MPN unterstreicht. Die Ergebnisse legen jedoch auch nahe, dass die Transformationsrate von MF-Patienten mit 17q11.2 Mikrodeletion in eine sAML durch den Verlust von *NF1* erhöht sein könnte, möglicherweise auch durch eine zusätzliche entstehende *TP53*-Inaktivierung. Zur Beantwortung dieser Fragen wären prospektive, serielle Analysen der MF-Studienpatienten unabdingbar. Darüber hinaus sind in diesem Zusammenhang funktionelle Untersuchungen von großer Bedeutung, um die Rolle von *NF1*-Veränderungen im Hinblick auf deren pathogenetische Auswirkungen besser zu verstehen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdel-Wahab, O., Manshouri, T., Patel, J., Harris, K., Yao, J., Hedvat, C., Heguy, A., Bueso-Ramos, C., Kantarjian, H., Levine, R. L. and Verstovsek, S.: Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res.* 2010;70:447-52
2. Abdel-Wahab, O., Mullally, A., Hedvat, C., Garcia-Manero, G., Patel, J., Wadleigh, M., Malinge, S., Yao, J., Kilpivaara, O., Bhat, R., Huberman, K., Thomas, S., Dolgalev, I., Heguy, A., Paietta, E., Le Beau, M. M., Beran, M., Tallman, M. S., Ebert, B. L., Kantarjian, H. M., Stone, R. M., Gilliland, D. G., Crispino, J. D. and Levine, R. L.: Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood.* 2009;114:144-47
3. Aziz, A., Baxter, E. J., Edwards, C., Cheong, C. Y., Ito, M., Bench, A., Kelley, R., Silber, Y., Beer, P. A., Chng, K., Renfree, M. B., McEwen, K., Gray, D., Nangalia, J., Mufti, G. J., Hellstrom-Lindberg, E., Kiladjian, J. J., McMullin, M. F., Campbell, P. J., Ferguson-Smith, A. C. and Green, A. R.: Cooperativity of imprinted genes inactivated by acquired chromosome 20q deletions. *J Clin Invest.* 2013;123:2169-82
4. Bader, J. L. and Miller, R. W.: Neurofibromatosis and childhood leukemia. *J Pediatr.* 1978;92:925-29
5. Balgobind, B. V., Van Vlierberghe, P., van den Ouweland, A. M., Beverloo, H. B., Terlouw-Kromosoeto, J. N., van Wering, E. R., Reinhardt, D., Horstmann, M., Kaspers, G. J., Pieters, R., Zwaan, C. M., Van den Heuvel-Eibrink, M. M. and Meijerink, J. P.: Leukemia-associated NF1 inactivation in patients with pediatric T-ALL and AML lacking evidence for neurofibromatosis. *Blood.* 2008;111:4322-28
6. Barbui, T., Barosi, G., Birgegard, G., Cervantes, F., Finazzi, G., Griesshammer, M., Harrison, C., Hasselbalch, H. C., Hehlmann, R., Hoffman, R., Kiladjian, J. J., Kroger, N., Mesa, R., McMullin, M. F., Pardanani, A., Passamonti, F., Vannucchi, A. M., Reiter, A., Silver, R. T., Verstovsek, S., Tefferi, A. and European, L.: Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol.* 2011 a;29:761-70
7. Barbui, T., Thiele, J., Passamonti, F., Rumi, E., Boveri, E., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., d'Amore, E. S., Randi, M. L., Bertozzi, I., Marino, F., Vannucchi, A. M., Antonioli, E., Carrai, V., Gisslinger, H., Buxhofer-Ausch, V., Mullauer, L., Carobbio, A., Gianatti, A., Gangat, N., Hanson, C. A. and Tefferi, A.: Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol.* 2011 b;29:3179-84
8. Barosi, G.: Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnostic definition and prognostic classification for clinical studies and treatment guidelines. *J Clin Oncol.* 1999;17:2954-70
9. Baxter, E. J., Scott, L. M., Campbell, P. J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G. S., Bench, A. J., Boyd, E. M., Curtin, N., Scott, M. A., Erber, W. N., Green, A. R. and Cancer Genome, P.: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005;365:1054-61
10. Beer, P. A., Campbell, P. J., Scott, L. M., Bench, A. J., Erber, W. N., Bareford, D., Wilkins, B. S., Reilly, J. T., Hasselbalch, H. C., Bowman, R., Wheatley, K., Buck, G., Harrison, C. N. and Green, A. R.: MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood.* 2008;112:141-49

11. Berger, D., Engelhardt, R. and Mertelsmann, R.: Polycythemia vera. In: Berger, D., Engelhardt, R. and Mertelsmann, R. (Hrsg) Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie, 4. Aufl, ecomed Medizin, Heidelberg, 612-16 (2011 a)
12. Berger, D., Engelhardt, R. and Mertelsmann, R.: Essenzielle Thrombozytose (ET). In: Berger, D., Engelhardt, R. and Mertelsmann, R. (Hrsg) Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie, 4. Aufl, ecomed Medizin, Heidelberg, 617-20 (2011 b)
13. Berger, D., Engelhardt, R. and Mertelsmann, R.: Primäre Myelofibrose (PMF). In: Berger, D., Engelhardt, R. and Mertelsmann, R. (Hrsg) Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie, 4. Aufl, ecomed Medizin, Heidelberg, 621-24 (2011 c)
14. Boccuni, P., MacGrogan, D., Scandura, J. M. and Nimer, S. D.: The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6). *J Biol Chem.* 2003;278:15412-20
15. Bohlander, S. K.: ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2005;15:162-74
16. Cadieux, C., Fournier, S., Peterson, A. C., Bedard, C., Bedell, B. J. and Nepveu, A.: Transgenic mice expressing the p75 CCAAT-displacement protein/Cut homeobox isoform develop a myeloproliferative disease-like myeloid leukemia. *Cancer Res.* 2006;66:9492-501
17. Campbell, P. J. and Green, A. R.: Management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005;201-08
18. Cave, H., Cacheux, V., Raynaud, S., Brunie, G., Bakkus, M., Cochaux, P., Preudhomme, C., Lai, J. L., Vilmer, E. and Grandchamp, B.: ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 1997;11:1459-64
19. Cervantes, F., Dupriez, B., Pereira, A., Passamonti, F., Reilly, J. T., Morra, E., Vannucchi, A. M., Mesa, R. A., Demory, J. L., Barosi, G., Rumi, E. and Tefferi, A.: New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood.* 2009;113:2895-901
20. Cervantes, F. and Pereira, A.: Prognostication in primary myelofibrosis. *Curr Hematol Malig Rep.* 2012;7:43-49
21. Chen, Q., Yuan, Y. and Chen, T.: Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients. *Mol Med Rep.* 2013;9:293-98
22. Cross, N. C.: Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:208-14
23. Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Masse, A., Kosmider, O., Le Couedic, J. P., Robert, F., Alberdi, A., Lecluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F. J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S. P., Dessen, P., Soulier, J., Viguie, F., Fontenay, M., Vainchenker, W. and Bernard, O. A.: Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med.* 2009;360:2289-301
24. Dewald, G. W., Schad, C. R., Lilla, V. C. and Jalal, S. M.: Frequency and photographs of HGM11 chromosome anomalies in bone marrow samples from 3,996 patients with malignant hematologic neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993;68:60-9
25. Ding, Y., Harada, Y., Imagawa, J., Kimura, A. and Harada, H.: AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2009;114:5201-05

26. Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S. and Sawyers, C. L.: Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001;344:1031-37
27. Ernst, T., Chase, A. J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C. E., Bryant, C., Jones, A. V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F. M., Reiter, A., Hochhaus, A., Drexler, H. G., Duncombe, A., Cervantes, F., Oscier, D., Boultonwood, J., Grand, F. H. and Cross, N. C.: Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet.* 2010;42:722-26
28. Ficuz, G., Branco, M. R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T. A., Marques, C. J., Andrews, S. and Reik, W.: Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature.* 2011;473:398-402
29. Frescas, D., Guardavaccaro, D., Bassermann, F., Koyama-Nasu, R. and Pagano, M.: JHDM1B/FBXL10 is a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes. *Nature.* 2007;450:309-13
30. Fujiwara, H., Arima, N., Hashimoto-Tamaoki, T., Matsushita, K., Ohtsubo, H., Arimura, K., Hidaka, S. and Tei, C.: Alteration of p16 (CDKN2) gene is associated with interleukin-2-induced tumor cell growth in adult T-cell leukemia. *Exp Hematol.* 1999;27:1004-09
31. Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S. and Sharpe, A.: The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell.* 1994;79:143-56
32. Golub, T. R., Barker, G. F., Lovett, M. and Gilliland, D. G.: Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell.* 1994;77:307-16
33. Grand, F. H., Hidalgo-Curtis, C. E., Ernst, T., Zoi, K., Zoi, C., McGuire, C., Kreil, S., Jones, A., Score, J., Metzgeroth, G., Oscier, D., Hall, A., Brandts, C., Serve, H., Reiter, A., Chase, A. J. and Cross, N. C.: Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2009;113:6182-92
34. Grossmann, V., Kohlmann, A., Eder, C., Haferlach, C., Kern, W., Cross, N. C., Haferlach, T. and Schnittger, S.: Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in >80% of patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance. *Leukemia.* 2011;25:877-79
35. Grossmann, V., Tiacci, E., Holmes, A. B., Kohlmann, A., Martelli, M. P., Kern, W., Spanhol-Rosseto, A., Klein, H. U., Dugas, M., Schindela, S., Trifonov, V., Schnittger, S., Haferlach, C., Bassan, R., Wells, V. A., Spinelli, O., Chan, J., Rossi, R., Baldoni, S., De Carolis, L., Goetze, K., Serve, H., Peceny, R., Kreuzer, K. A., Oruzio, D., Specchia, G., Di Raimondo, F., Fabbiano, F., Sborgia, M., Liso, A., Farinelli, L., Rambaldi, A., Pasqualucci, L., Rabadan, R., Haferlach, T. and Falini, B.: Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood.* 2011;118:6153-63
36. Hannon, G. J. and Beach, D.: p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature.* 1994;371:257-61
37. Harutyunyan, A., Klampfl, T., Cazzola, M. and Kralovics, R.: P53 Lesions in Leukemic Transformation. *N Engl J Med.* 2011;364:488-90
38. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M.: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 1997;387:296-99

39. He, J., Kallin, E. M., Tsukada, Y. and Zhang, Y.: The H3K36 demethylase Jhdm1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15(Ink4b). *Nat Struct Mol Biol.* 2008;15:1169-75
40. He, J., Nguyen, A. T. and Zhang, Y.: KDM2b/JHDM1b, an H3K36me2-specific demethylase, is required for initiation and maintenance of acute myeloid leukemia. *Blood.* 2011;117:3869-80
41. Hehlmann, R., Hochhaus, A., Baccarani, M. and European, L.: Chronic myeloid leukaemia. *Lancet.* 2007;370:342-50
42. Hussein, K., Van Dyke, D. L. and Tefferi, A.: Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion. *Eur J Haematol.* 2009;82:329-38
43. Huynh, K. D., Fischle, W., Verdin, E. and Bardwell, V. J.: BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev.* 2000;14:1810-23
44. Imada, K. and Leonard, W. J.: The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol.* 2000;37:1-11
45. Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H. and Vardiman, J. W.: World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC. 2001;
46. Jager, R., Gisslinger, H., Passamonti, F., Rumi, E., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., Harutyunyan, A., Klampfl, T., Olcaydu, D., Cazzola, M. and Kralovics, R.: Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2010;24:1290-8
47. Jankowska, A. M., Szpurka, H., Tiu, R. V., Makishima, H., Afable, M., Huh, J., O'Keefe, C. L., Ganetzky, R., McDevitt, M. A. and Maciejewski, J. P.: Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2009;113:6403-10
48. Jones, A. V., Kreil, S., Zoi, K., Waghorn, K., Curtis, C., Zhang, L., Score, J., Seear, R., Chase, A. J., Grand, F. H., White, H., Zoi, C., Loukopoulos, D., Terpos, E., Vervessou, E. C., Schultheis, B., Emig, M., Ernst, T., Lengfelder, E., Hehlmann, R., Hochhaus, A., Oscier, D., Silver, R. T., Reiter, A. and Cross, N. C.: Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood.* 2005;106:2162-68
49. Kawamata, N., Ogawa, S., Yamamoto, G., Lehmann, S., Levine, R. L., Pikman, Y., Nannya, Y., Sanada, M., Miller, C. W., Gilliland, D. G. and Koeffler, H. P.: Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray. *Exp Hematol.* 2008;36:1471-79
50. Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M. and Haussler, D.: The human genome browser at UCSC. *Genome research.* 2002;12:996-1006
51. Klampfl, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A. S., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic, J. D., Them, N. C., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., Chen, D., Vladimer, G. I., Bagienski, K., Milanesi, C., Casetti, I. C., Sant'Antonio, E., Ferretti, V., Elena, C., Schischlik, F., Cleary, C., Six, M., Schalling, M., Schonegger, A., Bock, C., Malcovati, L., Pascutto, C., Superti-Furga, G., Cazzola, M. and Kralovics, R.: Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2013;369:2379-90
52. Klampfl, T., Harutyunyan, A., Berg, T., Gisslinger, B., Schalling, M., Bagienski, K., Olcaydu, D., Passamonti, F., Rumi, E., Pietra, D., Jager, R., Pieri, L., Guglielmelli, P., Iacobucci, I., Martinelli, G., Cazzola, M., Vannucchi, A. M., Gisslinger, H. and Kralovics, R.: Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood.* 2011;118:167-76

53. Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A. M., Pape, U. J., Tahiliani, M., Bandukwala, H. S., An, J., Lamperti, E. D., Koh, K. P., Ganetzky, R., Liu, X. S., Aravind, L., Agarwal, S., Maciejewski, J. P. and Rao, A.: Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010;468:839-43
54. Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A. S., Teo, S. S., Tiedt, R., Passweg, J. R., Tichelli, A., Cazzola, M. and Skoda, R. C.: A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779-90
55. Landolfi, R., Marchioli, R., Kutti, J., Gisslinger, H., Tognoni, G., Patrono, C., Barbui, T. and European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera, I.: Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2004;350:114-24
56. Le, D. T., Kong, N., Zhu, Y., Lauchle, J. O., Aiyigari, A., Braun, B. S., Wang, E., Kogan, S. C., Le Beau, M. M., Parada, L. and Shannon, K. M.: Somatic inactivation of Nf1 in hematopoietic cells results in a progressive myeloproliferative disorder. *Blood*. 2004;103:4243-50
57. Lee, C. C., Chen, W. S., Chen, C. C., Chen, L. L., Lin, Y. S., Fan, C. S. and Huang, T. S.: TCF12 protein functions as transcriptional repressor of E-cadherin, and its overexpression is correlated with metastasis of colorectal cancer. *J Biol Chem*. 2012;287:2798-809
58. Legius, E., Dierick, H., Wu, R., Hall, B. K., Marynen, P., Cassiman, J. J. and Glover, T. W.: TP53 mutations are frequent in malignant NF1 tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994;10:250-5
59. Levine, R. L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B. L., Wernig, G., Huntly, B. J., Boggon, T. J., Wlodarska, I., Clark, J. J., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, J. C., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Frohling, S., Dohner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., Mesa, R. A., Tefferi, A., Griffin, J. D., Eck, M. J., Sellers, W. R., Meyerson, M., Golub, T. R., Lee, S. J. and Gilliland, D. G.: Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-97
60. Li, J., Bench, A. J., Vassiliou, G. S., Fourouclas, N., Ferguson-Smith, A. C. and Green, A. R.: Imprinting of the human L3MBTL gene, a polycomb family member located in a region of chromosome 20 deleted in human myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:7341-6
61. Liu, P., Tarle, S. A., Hajra, A., Claxton, D. F., Marlton, P., Freedman, M., Siciliano, M. J. and Collins, F. S.: Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science*. 1993;261:1041-4
62. Lopez, R. A., Schoetz, S., DeAngelis, K., O'Neill, D. and Bank, A.: Multiple hematopoietic defects and delayed globin switching in Ikaros null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:602-7
63. Majewski, I. J., Blewitt, M. E., de Graaf, C. A., McManus, E. J., Bahlo, M., Hilton, A. A., Hyland, C. D., Smyth, G. K., Corbin, J. E., Metcalf, D., Alexander, W. S. and Hilton, D. J.: Polycomb repressive complex 2 (PRC2) restricts hematopoietic stem cell activity. *PLoS Biol*. 2008;6:e93
64. Makishima, H., Cazzoli, H., Szpurka, H., Dunbar, A., Tiu, R., Huh, J., Muramatsu, H., O'Keefe, C., Hsi, E., Paquette, R. L., Kojima, S., List, A. F., Sekeres, M. A., McDevitt, M. A. and Maciejewski, J. P.: Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *J Clin Oncol*. 2009;27:6109-16

65. Makishima, H., Jankowska, A. M., Tiu, R. V., Szpurka, H., Sugimoto, Y., Hu, Z., Sauntharajah, Y., Guinta, K., Keddache, M. A., Putnam, P., Sekeres, M. A., Moliterno, A. R., List, A. F., McDevitt, M. A. and Maciejewski, J. P.: Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2010;24:1799-804
66. Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Jr., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z. and Tainsky, M. A.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990;250:1233-38
67. Miyakawa, Y., Oda, A., Druker, B. J., Kato, T., Miyazaki, H., Handa, M. and Ikeda, Y.: Recombinant thrombopoietin induces rapid protein tyrosine phosphorylation of Janus kinase 2 and Shc in human blood platelets. *Blood*. 1995;86:23-7
68. Mullighan, C. G., Miller, C. B., Radtke, I., Phillips, L. A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T. P., Le Beau, M. M., Pui, C. H., Relling, M. V., Shurtleff, S. A. and Downing, J. R.: BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*. 2008;453:110-4
69. Mullighan, C. G., Zhang, J., Harvey, R. C., Collins-Underwood, J. R., Schulman, B. A., Phillips, L. A., Tasian, S. K., Loh, M. L., Su, X., Liu, W., Devidas, M., Atlas, S. R., Chen, I. M., Clifford, R. J., Gerhard, D. S., Carroll, W. L., Reaman, G. H., Smith, M., Downing, J. R., Hunger, S. P. and Willman, C. L.: JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:9414-8
70. Murphy, M. A., Schnall, R. G., Venter, D. J., Barnett, L., Bertoncello, I., Thien, C. B., Langdon, W. Y. and Bowtell, D. D.: Tissue hyperplasia and enhanced T-cell signalling via ZAP-70 in c-Cbl-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 1998;18:4872-82
71. Nangalia, J., Massie, C. E., Baxter, E. J., Nice, F. L., Gundem, G., Wedge, D. C., Avezov, E., Li, J., Kollmann, K., Kent, D. G., Aziz, A., Godfrey, A. L., Hinton, J., Martincorena, I., Van Loo, P., Jones, A. V., Guglielmelli, P., Tarpey, P., Harding, H. P., Fitzpatrick, J. D., Goudie, C. T., Ortmann, C. A., Loughran, S. J., Raine, K., Jones, D. R., Butler, A. P., Teague, J. W., O'Meara, S., McLaren, S., Bianchi, M., Silber, Y., Dimitropoulou, D., Bloxham, D., Mudie, L., Maddison, M., Robinson, B., Keohane, C., Maclean, C., Hill, K., Orchard, K., Tauro, S., Du, M. Q., Greaves, M., Bowen, D., Huntly, B. J., Harrison, C. N., Cross, N. C., Ron, D., Vannucchi, A. M., Papaemmanuil, E., Campbell, P. J. and Green, A. R.: Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369:2391-405
72. Naramura, M., Nandwani, N., Gu, H., Band, V. and Band, H.: Rapidly fatal myeloproliferative disorders in mice with deletion of Casitas B-cell lymphoma (Cbl) and Cbl-b in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:16274-9
73. Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U. and Pfeffer, K.: Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*. 1998;93:397-409
74. Nobori, T., Miura, K., Wu, D. J., Lois, A., Takabayashi, K. and Carson, D. A.: Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 1994;368:753-56
75. Okuda, T., Nishimura, M., Nakao, M. and Fujita, Y.: RUNX1/AML1: a central player in hematopoiesis. *Int J Hematol*. 2001;74:252-57
76. Parkin, B., Ouillet, P., Wang, Y., Liu, Y., Wright, W., Roulston, D., Purkayastha, A., Dressel, A., Karp, J., Bockenstedt, P., Al-Zoubi, A., Talpaz, M., Kujawski, L., Shedden, K., Shakhani, S., Li, C., Erba, H. and Malek, S. N.: NF1 inactivation in adult acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 2010;16:4135-47

77. Pasmant, E., Sabbagh, A., Spurlock, G., Laurendeau, I., Grillo, E., Hamel, M. J., Martin, L., Barbarot, S., Leheup, B., Rodriguez, D., Lacombe, D., Dollfus, H., Pasquier, L., Isidor, B., Ferkal, S., Soulier, J., Sanson, M., Dieux-Coeslier, A., Bieche, I., Parfait, B., Vidaud, M., Wolkenstein, P., Upadhyaya, M., Vidaud, D. and members of the, N. F. F. N.: NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum Mutat.* 2010;31:E1506-18
78. Passamonti, F., Rumi, E., Pietra, D., Elena, C., Boveri, E., Arcaini, L., Roncoroni, E., Astori, C., Merli, M., Boggi, S., Pascutto, C., Lazzarino, M. and Cazzola, M.: A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia.* 2010;24:1574-79
79. Peinado, H., Olmeda, D. and Cano, A.: Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007;7:415-28
80. Pikman, Y., Lee, B. H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B. L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., DeAngelo, D. J., Clark, J. J., Lee, S. J., Golub, T. R., Wadleigh, M., Gilliland, D. G. and Levine, R. L.: MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* 2006;3:e270
81. Rajasekhar, V. K. and Begemann, M.: Concise review: roles of polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem Cells.* 2007;25:2498-510
82. Randhawa, J., Ostojic, A., Vrhovac, R., Atallah, E. and Verstovsek, S.: Splenomegaly in myelofibrosis--new options for therapy and the therapeutic potential of Janus kinase 2 inhibitors. *J Hematol Oncol.* 2012;5:43-8722-5-43
83. Rasmussen, S. A., Overman, J., Thomson, S. A., Colman, S. D., Abernathy, C. R., Trimpert, R. E., Moose, R., Viridi, G., Roux, K., Bauer, M., Rojiani, A. M., Maria, B. L., Muir, D. and Wallace, M. R.: Chromosome 17 loss-of-heterozygosity studies in benign and malignant tumors in neurofibromatosis type 1. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;28:425-31
84. Reilly, J. T., Snowden, J. A., Spearing, R. L., Fitzgerald, P. M., Jones, N., Watmore, A. and Potter, A.: Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *Br J Haematol.* 1997;98:96-102
85. Ren, R.: Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:172-83
86. Sangha, N., Wu, R., Kuick, R., Powers, S., Mu, D., Fiander, D., Yuen, K., Katabuchi, H., Tashiro, H., Fearon, E. R. and Cho, K. R.: Neurofibromin 1 (NF1) defects are common in human ovarian serous carcinomas and co-occur with TP53 mutations. *Neoplasia.* 2008;10:1362-72
87. Sasaki, K., Yagi, H., Bronson, R. T., Tominaga, K., Matsunashi, T., Deguchi, K., Tani, Y., Kishimoto, T. and Komori, T.: Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:12359-63
88. Sattler, M., Durstin, M. A., Frank, D. A., Okuda, K., Kaushansky, K., Salgia, R. and Griffin, J. D.: The thrombopoietin receptor c-MPL activates JAK2 and TYK2 tyrosine kinases. *Exp Hematol.* 1995;23:1040-8
89. Sauvageau, M. and Sauvageau, G.: Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell.* 2010;7:299-313

90. Schaub, F. X., Looser, R., Li, S., Hao-Shen, H., Lehmann, T., Tichelli, A. and Skoda, R. C.: Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115:2003-07
91. Schmidt, M. H. and Dikic, I.: The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:907-18
92. Score, J., Hidalgo-Curtis, C., Jones, A. V., Winkelmann, N., Skinner, A., Ward, D., Zoi, K., Ernst, T., Stegelmann, F., Dohner, K., Chase, A. and Cross, N. C.: Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;119:1208-13
93. Serrano, M., Hannon, G. J. and Beach, D.: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366:704-07
94. Shigesada, K., van de Sluis, B. and Liu, P. P.: Mechanism of leukemogenesis by the inv(16) chimeric gene CBFβ/PEBP2B-MHY11. *Oncogene*. 2004;23:4297-307
95. Solary, E., Bernard, O. A., Tefferi, A., Fuks, F. and Vainchenker, W.: The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia*. 2014;28:485-96
96. Solomon, M. J.: Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5:180-86
97. Sparmann, A. and van Lohuizen, M.: Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:846-56
98. Speck, N. A. and Gilliland, D. G.: Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:502-13
99. Staerk, J., Lacout, C., Sato, T., Smith, S. O., Vainchenker, W. and Constantinescu, S. N.: An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*. 2006;107:1864-71
100. Stegelmann, F., Bullinger, L., Griesshammer, M., Holzmann, K., Habdank, M., Kuhn, S., Maile, C., Schauer, S., Dohner, H. and Dohner, K.: High-resolution single-nucleotide polymorphism array-profiling in myeloproliferative neoplasms identifies novel genomic aberrations. *Haematologica*. 2010;95:666-69
101. Steinemann, D., Arning, L., Praulich, I., Stuhmann, M., Hasle, H., Stary, J., Schlegelberger, B., Niemeyer, C. M. and Flotho, C.: Mitotic recombination and compound-heterozygous mutations are predominant NF1-inactivating mechanisms in children with juvenile myelomonocytic leukemia and neurofibromatosis type 1. *Haematologica*. 2010;95:320-23
102. Strasser-Weippl, K., Steurer, M., Kees, M., Augustin, F., Tzankov, A., Dirnhofer, S., Fiegl, M., Gisslinger, H., Zojer, N. and Ludwig, H.: Chromosome 7 deletions are associated with unfavorable prognosis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2005;105:4146
103. Tefferi, A.: The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*. 2008;22:3-13
104. Tefferi, A., Mesa, R. A., Schroeder, G., Hanson, C. A., Li, C. Y. and Dewald, G. W.: Cytogenetic findings and their clinical relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 2001;113:763-71
105. Tefferi, A. and Vainchenker, W.: Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol*. 2011;29:573-82

106. Tefferi, A., Verstovsek, S., Barosi, G., Passamonti, F., Roboz, G. J., Gisslinger, H., Paquette, R. L., Cervantes, F., Rivera, C. E., Deeg, H. J., Thiele, J., Kvasnicka, H. M., Vardiman, J. W., Zhang, Y., Bekele, B. N., Mesa, R. A., Gale, R. P. and Kantarjian, H. M.: Pomalidomide is active in the treatment of anemia associated with myelofibrosis. *J Clin Oncol.* 2009;27:4563-69
107. Tenedini, E., Bernardis, I., Artusi, V., Artuso, L., Roncaglia, E., Guglielmelli, P., Pieri, L., Bogani, C., Biamonte, F., Rotunno, G., Mannarelli, C., Bianchi, E., Pancrazzi, A., Fanelli, T., Tagliazucchi, G. M., Ferrari, S., Manfredini, R., Vannucchi, A. M. and Tagliafico, E.: Targeted cancer exome sequencing reveals recurrent mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2013;28:1052-59
108. Thoennissen, N. H., Lasho, T., Thoennissen, G. B., Ogawa, S., Tefferi, A. and Koeffler, H. P.: Novel CUX1 missense mutation in association with 7q- at leukemic transformation of MPN. *Am J Hematol.* 2011;86:703-05
109. Trojer, P., Li, G., Sims, R. J., 3rd, Vaquero, A., Kalakonda, N., Boccuni, P., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Nimer, S. D., Wang, Y. H. and Reinberg, D.: L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell.* 2007;129:915-28
110. Truscott, M., Harada, R., Vadnais, C., Robert, F. and Nepveu, A.: p110 CUX1 cooperates with E2F transcription factors in the transcriptional activation of cell cycle-regulated genes. *Mol Cell Biol.* 2008;28:3127-38
111. Vainchenker, W., Delhommeau, F., Constantinescu, S. N. and Bernard, O. A.: New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2011;118:1723-35
112. van Minkelen, R., van Bever, Y., Kromosoeto, J. N., Withagen-Hermans, C. J., Nieuwlaat, A., Halley, D. J. and van den Ouweland, A. M.: A clinical and genetic overview of 18 years neurofibromatosis type 1 molecular diagnostics in the Netherlands. *Clin Genet.* 2014;85:318-27
113. Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., Harris, N. L., Le Beau, M. M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A. and Bloomfield, C. D.: The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114:937-51
114. Wamstad, J. A., Corcoran, C. M., Keating, A. M. and Bardwell, V. J.: Role of the transcriptional corepressor Bcor in embryonic stem cell differentiation and early embryonic development. *PLoS One.* 2008;3:e2814
115. Wang, L. C., Swat, W., Fujiwara, Y., Davidson, L., Visvader, J., Kuo, F., Alt, F. W., Gilliland, D. G., Golub, T. R. and Orkin, S. H.: The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev.* 1998;12:2392-402
116. Weinberg, R.: *The Biology Of Cancer.* Garland Science, New York, 233-235 (2007)
117. Winandy, S., Wu, P. and Georgopoulos, K.: A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell.* 1995;83:289-99
118. Yajnik, V., Paulding, C., Sordella, R., McClatchey, A. I., Saito, M., Wahrer, D. C., Reynolds, P., Bell, D. W., Lake, R., van den Heuvel, S., Settleman, J. and Haber, D. A.: DOCK4, a GTPase activator, is disrupted during tumorigenesis. *Cell.* 2003;112:673-84
119. Ye, B. H., Lista, F., Lo Coco, F., Knowles, D. M., Offit, K., Chaganti, R. S. and Dalla-Favera, R.: Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science.* 1993;262:747-50

120. Zhou, L., Opalinska, J., Sohal, D., Yu, Y., Mo, Y., Bhagat, T., Abdel-Wahab, O., Fazzari, M., Figueroa, M., Alencar, C., Zhang, J., Kambhampati, S., Parmar, S., Nischal, S., Hueck, C., Suzuki, M., Freidman, E., Pellagatti, A., Boultonwood, J., Steidl, U., Sauthararajah, Y., Yajnik, V., McMahon, C., Gore, S. D., Platanias, L. C., Levine, R., Melnick, A., Wickrema, A., Grealley, J. M. and Verma, A.: Aberrant epigenetic and genetic marks are seen in myelodysplastic leukocytes and reveal Dock4 as a candidate pathogenic gene on chromosome 7q. *J Biol Chem.* 2011;286:25211-23

ANHANG

Tabelle 6. Mastermix für den Verdau der Microarray-Produkte durch das Sty- bzw. Nsp-Enzym

Digestion – Mastermix		
Reagenz	Menge in μl	Hersteller
Molecular biology-grade water	11,55	Lonza
10X Sty I Buffer	2	New England Biolabs
BSA (100X; 10mg/mL)	0,2	New England Biolabs
Sty I bzw. Nsp I (10U/ μL)	1	Affymetrix

Tabelle 7. Thermocycler Programm des Verdaus der Microarray-Produkte durch Sty und Nsp

Digest-Programm	
Temperatur	Dauer
37°C	120min
65°C	20min
4°C	∞

Tabelle 8. Mastermix für die Ligation der Microarray-Produkte durch das Sty- bzw. Nsp-Enzym

Ligation – Mastermix		
Reagenz	Menge in μl	Hersteller
T4 Ligase Buffer 10X	2,5	New England Biolabs
Adaptor Sty I bzw. Nsp I (50 μM)	0,75	Affymetrix
T4 DNA Ligase (400U/ μL)	2	New England Biolabs

Tabelle 9. Thermocycler Programm der Ligation der Microarray-Produkte durch Sty und Nsp

Ligate-Programm	
Temperatur	Dauer
16°C	180min
70°C	20min
4°C	∞

Tabelle 10. Mastermix für die Polymerasekettenreaktion (PCR) der Microarray-Produkte an dem Sty- bzw. Nsp-Adaptor

6.0 CHIP PCR – Mastermix		
Reagenz	Menge in μl	Hersteller
Molecular biology-grade water	39,5	Lonza
Titanium Taq PCR Buffer (10X)	10	Clontech
GC-Melt (5M)	20	Clontech
dNTP (2,5mM)	14	Clontech
PCR Primer 002 (100 μM)	4,5	Affymetrix
Titanium Taq DNA Polymerase (50X)	2	Clontech

Tabelle 11. Thermocycler Programm der Polymerasekettenreaktion (PCR) der Microarray-Produkte

PCR-Programm	
Temperatur	Dauer
94°C	3min
94°C	30sec
60°C	45sec
68°C	15sec
68°C	7min
4°C	∞

} 30 Zyklen

Tabelle 12. Mastermix für die Fragmentation der Microarray-Produkte

Fragmentation – Mastermix		
Reagenz	Menge in μl	Hersteller
Molecular biology-grade water	308	Lonza
10X Fragmentation Buffer	36	Affymetrix
Fragmentation Reagent (2U/ μL)	16	Affymetrix

Tabelle 13. Thermocycler Programm der Fragmentation der Microarray-Produkte

Fragment-Programm	
Temperatur	Dauer
37°C	35min
95°C	15min
4°C	∞

Tabelle 14. Mastermix für das Labeling der Microarray-Produkte

Labeling – Mastermix		
Reagenz	Menge in μl	Hersteller
TdT Buffer (5X)	14	Affymetrix
DNA Labeling Reagent (30mM)	2	Affymetrix
TdT Enzyme (30U/ μL)	3,5	Affymetrix

Tabelle 15. Thermocycler Programm des Labeling der Microarray-Produkte

Labeling-Programm	
Temperatur	Dauer
37°C	240min
95°C	15min
4°C	∞

Tabelle 16. Mastermix für die Hybridisierung der Microarray-Produkte

Hybridisierung – Mastermix		
Reagenz	Menge in μl	Hersteller
MES (12X; 1,25M)	12	Sigma-Aldrich
Denhardt's Solution (50X)	13	Sigma-Aldrich
EDTA (0,5M)	3	Sigma-Aldrich
HSDNA (10 mg/mL)	3	Promega
OCR, 0100	2	Affymetrix
Human Cot-1 DNA (1 mg/mL)	3	Invitrogen
Tween-20 (3%)	1	Pierce
DMSO (100%)	13	Sigma-Aldrich
TMACL (5M)	140	Sigma-Aldrich

Tabelle 17. Thermocycler Programm der Hybridisierung der Microarray-Produkte

Hybridization-Programm	
Temperatur	Dauer
95°C	10min
49°C	∞

Tabelle 18. nicht-stringenter Waschpuffer A für die Microarray-Produkte

Wash A – Waschpuffer		
Reagenz	Menge in ml	Hersteller
20X SSPE	300	Lonza
Tween-20 (10%)	1	Pierce
Molecular biology-grade water	699	Lonza

Tabelle 19. stringenter Waschpuffer B für die Microarray-Produkte

Wash B – Waschpuffer		
Reagenz	Menge in ml	Hersteller
20X SSPE	30	Lonza
Tween-20 (10%)	1	Pierce
Molecular biology-grade water	969	Lonza

Tabelle 20. Färbepuffer für die Microarray-Produkte

Färbepuffer		
Reagenz	Menge in µl	Hersteller
20X SSPE	360	Lonza
Tween-20 (3%)	3,96	Pierce
Molecular biology-grade water	800,04	Lonza
Denhardt's Solution (50X)	24	Sigma-Aldrich

Tabelle 21. SAPE-Färbelösung für die Microarray-Produkte

SAPE-Färbelösung		
Reagenz	Menge in µl	Hersteller
Färbepuffer	594	-
SAPE 1mg/ml	6	Affymetrix

Tabelle 22. Antikörper-Färbelösung für die Microarray-Produkte

Antikörper-Färbelösung		
Reagenz	Menge in µl	Hersteller
Färbepuffer	594	-
Biotin-gekoppelter Antikörper 0,5mg/ml	6	Affymetrix

Tabelle 23. Array Holding Puffer für die Microarray-Produkte

Array Holding Puffer		
Reagenz	Menge in ml	Hersteller
MES Stock Buffer 12X	8,3	Sigma-Aldrich
NaCl 5M	18,5	Sigma-Aldrich
Tween-20 (10%)	0,1	Pierce
Molecular biology-grade water	73,1	Lonza

Tabelle 24. Mastermix für die cDNA-Synthese für das *NF1*-Gen

Reverse Transkription – Mastermix		
Reagenz	Menge in µl	Hersteller
Quantiscript Reverse Transcriptase	1	Qiagen
RT Primer Mix	1	Qiagen
Quantiscript RT Buffer, 5X	4	Qiagen

Tabelle 25. Thermocycler Programm der cDNA-Synthese für das *NF1*-Gen

cDNA Synthese	
Temperatur	Dauer
42°C	20min
95°C	3min
4°C	∞

Tabelle 26. Primersequenzen für die Amplifikation des *NF1*-Gens

Primersequenzen - <i>NF1</i>		
Exon 1	forward	CAGACCCTCTCCTTGCCTCTT
	reverse	CAGGTCATCATCCCCATT
Exon 2	forward	TGTGGTTGATGCAGTTTTCC
	reverse	TCCAAAGTCCACAGAAAATCA
Exon 3	forward	AAGACTTTGATCATTTTCGTG
	reverse	GGACTGTCCTCTTGGTCCAC
Exon 4A	forward	AGGTGGTGTGTATGTAAGGTG
	reverse	CGCAAGCCCAGACAAACTCATTC
Exon 4B	forward	GGTGTGAGATACCACACCTG
	reverse	GTACATTCATGATACTAGTTTTTG
Exon 4C	forward	TCACAATCATTGATGTCCAAG
	reverse	ACCAGCCATATCAGTCTGTG

Fortsetzung von Tabelle 26 auf Seite 77

Fortsetzung von Tabelle 26 auf Seite 76

Primersequenzen - NF1		
Exon 5	forward	AGGTTGCGCAGTTAGCAGTT
	reverse	TTGCTCCAAGGAAAGGAAGA
Exon 6	forward	CAGAATGCATTTGTGTAGTTGC
	reverse	GAGGTATCGTTTAGTCTTCTCAGACA
Exon 7	forward	GCTATAATATTAGCTACATCTGG
	reverse	GAAGAGTCAGAACTTTAATGTTAG
Exon 8	forward	TTCTTCTGGCAGCTGGATTT
	reverse	AAGGTCTTGAAACGAACATCAA
Exon 9	forward	TGCTGTTCTTTTTGGCTTCA
	reverse	TTGAAAACCAAGAGTGCATTT
Exon 9A	forward	TCCGCTGTGGCTCAGAAC
	reverse	GCGATTAGCCTCAAACCAAG
Exon 10A	forward	AAACAGAGCATACAACCTCACG
	reverse	CAGCAGGAATAGGATAAAGACAC
Exon 10B	forward	GGTGCAAAAACGATTTTCATTG
	reverse	GTAGACACTGTGATCGATGGTC
Exon 10C	forward	CAGAAACCACACACCAAAGG
	reverse	TCTTCCTCCTCTAATCTCTCTCG
Exon 11	forward	TGATTTCAATTCTGTCTGTATTATCC
	reverse	CATTCATCGAAAGCATTGGT
Exon 12A	forward	TGCTATTGACACTTTGATAACTGTTT
	reverse	TGTGGTTCTAAGGCCAAAGC
Exon 12B	forward	CCTTCAAGTTGGGGCATAGA
	reverse	CAAAGTTCACAAAGAGCAGTA
Exon 13	forward	CACACAGTTTATTGCATTGTTAGA
	reverse	CCCTGTAAACTTACAAAGTAGTG
Exon 14+15	forward	AGCATTTGCTCTGCTCTTCC
	reverse	TGTTTACTTTACTGAGCGACTCTTG
Exon 16	forward	TGGAAGAAATGTTGGATAAAGCA
	reverse	CTTCTTTCTGCAATTTTTTGGA
Exon 17	forward	ATTTGGCTCTATGCCTGTGG
	reverse	AAGAATGGCCAGTTATTTTATCAAT
Exon 18	forward	TGTTTTCAAACCTACATTTAATTCGTT
	reverse	TCTTTTCTGTACTTCATTGGACA

Fortsetzung von Tabelle 26 auf Seite 78

Fortsetzung von Tabelle 26 auf Seite 77

Primersequenzen - NF1		
Exon 19A	forward	GCACTATAAGAAATCTTACGTG
	reverse	ACACAAAAGTTTGACATCTCAAAAG
Exon 19B	forward	TTCTGGGATCTGCATATTAAGTCA
	reverse	TTCCTATCCTAGTCCTGTCATGG
Exon 20	forward	CCATTCACACCATGCACATA
	reverse	CTTCATAAATGTAGCTCTT
Exon 21	forward	TGCCAACGTAGACAGTGGTC
	reverse	CATCTTTCTTCTGGCTCTGAAA
Exon 22	forward	TTTGCCTTAATTTAGCAAGTGG
	reverse	CAGAAATGCACGAATAGGAG
Exon 23A	forward	GACTCCATGCAGACTCTCTTCC
	reverse	TGGATCTAAGGCAAATAAAAGGAT
Exon 23B	forward	CGTTGCACTTGGCTTAATGTCTGT
	reverse	CCACACACCATCAGCAGCTA
Exon 23C	forward	AGCCAGAAATAGTAGACATGATTG
	reverse	CTATTTTGTGCCAGAATTAGTAGA
Exon 24	forward	TTGAACTCTTTGTTTCATGTCTT
	reverse	CAAAAGCACATAACTGAAAACCA
Exon 25	forward	TTGGGAAGGTTAGAAACACTACCT
	reverse	TGACCTAGAGCAGGAAAAGAAAA
Exon 26	forward	AGCCCTCCATATTTGTAATCTTAG
	reverse	AAATGCCAACGCTAATCTGAAC
Exon 27A	forward	TGGAAGTGAAGCTAAGGGT
	reverse	GGCCTGGTGGCAAACCTCTCC
Exon 27B	forward	GGTGCATGTTGCCAAATTAC
	reverse	TGGTAATTAATCCATTGCAGG
Exon 28	forward	AATGAATCCAGACTTTGAAGAATTG
	reverse	CGACAGCCTTACGTGACATT
Exon 29	forward	CAATGGTGGGAACCTCTCCT
	reverse	CTTGATGAGGTCACAGTGGTTAAC
Exon 30	forward	GAGCCTCACAGTGCTCTTATG
	reverse	GTTCTTCAGTTACAGGATACCAC
Exon 31	forward	TCAAGGACTGTTCTTTCTTCG
	reverse	TGAACCAGATGAAGAGCTGG

Fortsetzung von Tabelle 26 auf Seite 79

Fortsetzung von Tabelle 26 auf Seite 78

Primersequenzen - NF1		
Exon 32	forward	TTGATTAGGCTGTTCCAATGAA
	reverse	CATGGGACTCAAAGTTTTAGCA
Exon 33	forward	TGAAATTGGTTTCAAGCAAGG
	reverse	TCATGTCATTACTGGAGGCTTAAA
Exon 34	forward	GAGGTTTGATTTAGGGAACATGA
	reverse	CCAATAACACAGTCCATGCAA
Exon 35	forward	TGTGTTATTGGTAACAGGTCACCTT
	reverse	TCCACAGAACTTATAAAAACCTTTG
Exon 36	forward	GCTGGACCACTGGACAGAAC
	reverse	TTTCATTGACCTCAAATTTAAACG
Exon 37	forward	CCAAGATCACCATAGCATGA
	reverse	CTTTCCTTTAGCACTGATGAGAC
Exon 38	forward	TGGAAAAGTGAAGAGCTTACTCATA
	reverse	GCTGGTAAGGAAATATACTCACAATAA
Exon 39	forward	GGGCTAACTTACTTCAATTTATTTC
	reverse	TCAAATTGAAAGGATTACTTATCTTG
Exon 40	forward	CCAAATGGCTATTCTTGAAAG
	reverse	GACTGTGAACTTTCTGCTCTGC
Exon 41	forward	TTTCACATTTATGTAGTCTTCCAAA
	reverse	TCACTTACTCTTCTAGGCCATC
Exon 42	forward	CATTAAATCCCCTGAGTGCAG
	reverse	CCTAGGGATACACCAAGAGTTTG
Exon 43	forward	GAAACTGCTCCAGGGATGTAT
	reverse	TTTGGCTACCTATTTACAATGCTG
Exon 44	forward	GGCGAATAGTAATTCTCTATGATGTTT
	reverse	TCTGTTTGGGTGAGAAGTAGAAGA
Exon 45	forward	GGCGCTGCTTCTTACTGTTC
	reverse	AAGTGAGGAAAATGAGCAATGA
Exon 46	forward	GGAATGTATATTATGTTTTCCAC
	reverse	TGTCAACCAGTTACATTGGACA
Exon 47	forward	TGTTTTCAACATGTACATAGGGTTT
	reverse	GCACATTGTGTGTTCTTAAAGCAG
Exon 48A	forward	ATGCAGGTTTCATCTGGAAGC
	reverse	CAACCTTGAATATCATGTGGAC

Fortsetzung von Tabelle 26 auf Seite 80

Fortsetzung von Tabelle 26 auf Seite 79

Primersequenzen - NF1		
Exon 48B	forward	CCTTCTGAAAACCAAGGAACA
	reverse	TGGGTGGGTATTAGCAGCTC
Exon 49	forward	CCTAGAATGTGTCCCCGTTG
	reverse	ACCAGATACACGCCAAAAGT

Tabelle 27. Primersequenzen für die Amplifikation des *SUZ12*-Gens

Primersequenzen - SUZ12		
Exon 1	forward	GAGCGTTGGTATTGCAGGCG
	reverse	AAGGGGGCCAGCAGAGTGTG
Exon 2	forward	TGCGTGATTTCATAGCAGATGA
	reverse	TGATGTTTGTCTGGAGTTTCGATGA
Exon 3	forward	TCGGAATCTCATAGCAGTAAGTAGTCA
	reverse	AACATGGTTTGATCAGCTTGAAA
Exon 4	forward	TAGCGTTTTAGATGGGGCTTGAA
	reverse	TCAAGGTGATCACTAGGAAAATGA
Exon 5	forward	GGGAAAGCATAGAGTCATGGGCCT
	reverse	AGCCTTCACTCTGCACCCCCA
Exon 6	forward	GGAAATCTCTGTTGAAGTTCCTGA
	reverse	TGCATAAAGATGTCCAATTAAGCAA
Exon 7A	forward	TGTTTCCTATAGCTGTGATTAGAAGTT
	reverse	TTCACCATATGGCTGTTACTAGG
Exon 7B	forward	GCAGTTTCCAGTAATGAATTTGA
	reverse	CACTGTTTGCTTT AAGACTCAGC
Exon 8	forward	GCATGTTTTATGTAAAGGGACCA
	reverse	AAAAAGAAACAAAGGCAATGAAA
Exon 9	forward	TTTAAATCTTGTGGGTATGTAAGC
	reverse	AATTAGCATTTGGGAAGAAAAC
Exon 10	forward	TCATTATCTGAGTCTCCAGTCTTTGC
	reverse	CACAAGACCTAACTCTGCAAACCA
Exon 11	forward	TATTTTCCTGCGATCATCAGTT
	reverse	TTCATAATTACTTTAAGAAGGGTCAGC
Exon 12	forward	ATGCGTAAATTGGAGATTGCTT
	reverse	GGGGTACAAGAGATTCTTAACACAAA
Exon 13	forward	AAATTGGAGGGATATTTAGGATAGGA
	reverse	CCTTGTTCTCCAACATCAGTA

Fortsetzung von Tabelle 27 auf Seite 81

Fortsetzung von Tabelle 27 auf Seite 80

Primersequenzen - <i>SUZ12</i>		
Exon 14	forward	CATGTAGAGGCCATAAATCAACA
	reverse	TTCCAAGATAATTGCCAATAAAGA
Exon 15	forward	GAAATGTTGCCACTTTGCTGTAT
	reverse	CACGTAAGATTTCTAGAATGTGAAACA
Exon 16A	forward	TGACAAAAATGCTTTGTATTGCTATT
	reverse	TCCCCCTTTTCTAATTTTGC
Exon 16B	forward	GCATGCATGACTTTAATCTTATTAGCA
	reverse	CCTAAAATGTAATTCAGTGTGTTGTCC

Tabelle 28. Polymerasekettenreaktion (PCR)-Mastermix für Exons 2-58 des *NF1*-Gens

Exon 2-9 – NF1		
Reagenz	Menge in µl	Hersteller
Aqua ad iniectabilia Braun	17,45	Braun
10X PCR Buffer	2,5	Invitrogen
MgCl ₂ (50mM)	0,75	Invitrogen
dNTP (25mM)	0,2	Roche
Primer Forward (10pmol/µl)	1	Eurofins MWG Operon
Primer Reverse (10pmol/µl)	1	Eurofins MWG Operon
Platinum Taq DNA Polymerase	0,1	Invitrogen

Tabelle 29. Polymerasekettenreaktion (PCR)-Mastermix für Exons 2-16 des *SUZ12*-Gens

Exon 2-16 – SUZ12		
Reagenz	Menge in µl	Hersteller
Aqua ad iniectabilia Braun	18,25	Braun
10X PCR Buffer	2,5	Invitrogen
MgCl ₂ (50mM)	0,75	Invitrogen
dNTP (25mM)	0,25	Roche
Primer Forward (10pmol/µl)	0,5	Eurofins MWG Operon
Primer Reverse (10pmol/µl)	0,5	Eurofins MWG Operon
Platinum Taq DNA Polymerase	0,25	Invitrogen

Tabelle 30. Polymerasekettenreaktion (PCR)-Mastermix für Exon 1 des *NF1*-Gens

Exon 1 – NF1		
Reagenz	Menge in μ l	Hersteller
Aqua ad iniectabilia Braun	16,2	Braun
10X PCR Buffer	2,5	Invitrogen
MgCl ₂ (50mM)	0,75	Invitrogen
dNTP (25mM)	0,2	Roche
Primer Forward (10pmol/ μ l)	1	Eurofins MWG Operon
Primer Reverse (10pmol/ μ l)	1	Eurofins MWG Operon
Planinum Taq DNA Polymerase	0,1	Invitrogen
10X PCR Enhancer Solution	1,25	Invitrogen

Tabelle 31. Polymerasekettenreaktion (PCR)-Mastermix für Exon 1 des *SUZ12*-Gens

Exon 1 – SUZ12		
Reagenz	Menge in μ l	Hersteller
Aqua ad iniectabilia Braun	31	Braun
10X PCR Buffer	5	Qiagen
Q-Solution	0,75	Qiagen
dNTP (25mM)	0,5	Roche
Primer Forward (10pmol/ μ l)	1	Eurofins MWG Operon
Primer Reverse (10pmol/ μ l)	1	Eurofins MWG Operon
HotStar Taq DNA Polymerase	0,5	Qiagen

Tabelle 32. Thermocycler Programm für die *NF1*-Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Programm	
Temperatur	Dauer
94°C	10min
94°C	30sec
60°C	30sec
72°C	90sec
72°C	10min
10°C	∞

} 30 Zyklen

Tabelle 33. Thermocycler Programm für *SUZ12*-Polymerasekettenreaktion (PCR), Exon 1

PCR-Programm	
Temperatur	Dauer
95°C	10min
95°C	60sec
57°C	60sec
72°C	60sec
72°C	10min
10°C	∞

} 30 Zyklen

Tabelle 34. Thermocycler Programm für *SUZ12*-Polymerasekettenreaktion (PCR), Exon 2-16

PCR-Programm	
Temperatur	Dauer
94°C	10min
94°C	30sec
58°C	30sec
72°C	60sec
72°C	10min
4°C	∞

} 30 Zyklen

Tabelle 35. Cycle sequencing reaction (CSR)-Mastermix für *NF1*

CSR – Mastermix		
Reagenz	Menge in µl	Hersteller
Aqua ad iniectabilia Braun	10	Braun
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	2	Applied Biosystems
Big Dye Terminator 5X Sequencing Buffer	1	Applied Biosystems
Primer M13 Forward bzw. Reverse	1	Applied Biosystems

CSR – Mastermix		
Reagenz	Menge in µl	Hersteller
Aqua ad iniectionabilia Braun	10	Braun
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	2	Applied Biosystems
Big Dye Terminator 5X Sequencing Buffer	1	Applied Biosystems
Primer des jeweiligen Exons Forward bzw. Reverse	1	Applied Biosystems

CSR-Programm		
Temperatur	Dauer	
96°C	2min	
95°C	15sec	} 35 Zyklen
55°C	60sec	
60°C	3min	
4°C	∞	

Sequenzen der M13-Primer	
forward	TGTAAACGACGCCAGT
reverse	CAGGAAACAGCTATGACC

DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Professor Döhner für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit, meine Arbeit in der MPN-Forschungsgruppe anfertigen zu können.

Besten Dank auch an Dr. Frank Stegelmann für seine stets tatkräftige Unterstützung. Ich habe mich während der gesamten Zeit sehr gut betreut gefühlt, vielen Dank dafür Frank.

Danke sagen möchte ich auch dem gesamten Team der MPN-Forschungsgruppe, das mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist.

Ganz besonders möchte ich mich bei Carmen Blersch bedanken. Ohne Deine Hilfe hätte ich ganz schön alt ausgesehen und würde noch heute im Labor stehen. Das Alles wäre ohne Dich nicht möglich gewesen, ganz herzlichen Dank Carmen!

Meinen Eltern danke ich für ihre fortwährende Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

LEBENS LAUF

Maximilian Laaths

Geboren am 27.Oktober 1985 in Amberg

Schulbildung

1993 – 1996	Volksschule, Amberg
1997 – 2005	Johann - Andreas - Schmeller - Gymnasium, Nabburg
	Abschluss: Abitur (Note: 1,9)

Zivildienst

2005-2006	Krankenhaus St. Barbara Schwandorf
-----------	------------------------------------

Studium

2006 – 2007	Julius - Maximilians - Universität, Würzburg
	Diplomstudiengang Biologie
2007	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin, Universität Ulm
2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote: 1,66

Praxiserfahrungen

2009	Famulatur Chirurgie, Viszeralchirurgie
	Sankt Barbara Krankenhaus Schwandorf
2011	Praktikum "Spezielle Pädiatrie"
2012	Famulatur Innere Medizin, Hämatologie/Onkologie
	Universitätsklinikum Ulm
2012	Famulatur Pädiatrie
	Praxis Dres. Kupferschmid und Gaissmaier, Ulm
2012	Wahlfach Pädiatrie "Vom Symptom zur Diagnose"
2013	Famulatur Anästhesie
	Sankt Barbara Krankenhaus Schwandorf

- 2013 Praktisches Jahr in den Fachgebieten
- Innere Medizin (Universitätsklinikum Zürich, Schweiz)
 - Chirurgie (Universitätsklinikum Ulm, Deutschland)
 - Pädiatrie (Great Ormond Street Hospital for Children London, GB und Children's Hospital of Pittsburgh, USA)

Arbeitsverhältnisse

ab 11/2014 Assistenzarzt an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der
Universitätsklinik Regensburg

Promotion

2011 – 2012 Stipendiat im Promotionsprogramm "Experimentelle Medizin"

2017 Promotion zum Thema "Molekulare Charakterisierung
Myeloproliferativer Neoplasien zur Identifizierung
leukämierelevanter Genveränderungen" unter Frau Prof. Dr. K. Döhner
mit der Gesamtnote „magna cum laude"